

Dermales Wirkstofftransport therapeutischer Oligonukleotide

Entwicklung und Charakterisierung nanopartikulärer Träger auf Basis von Chitosanpolymeren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

eingereicht von Anna Carola Eicher

Gießen, März 2021

Erstgutachter: Prof. Dr. Frank Runkel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter R. Schreiner

Justus-Liebig-Universität Gießen

Fachbereich 08 - Biologie und Chemie in Kooperation mit dem Institut für Bioverfahrenstechnik und
Pharmazeutische Technologie der Technischen Hochschule Mittelhessen

„What’s the use of doing all this work if we don't get some fun out of this? “

- Rosalind Franklin

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

- Eicher, Anna-Carola; Dobler, Dorota; Kiselmann, C.; Schmidts, Thomas; Runkel, Frank (2019): Dermal delivery of therapeutic DNAzymes via chitosan hydrogels. In: International journal of pharmaceutics 563, S. 208–216. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.04.005.
- Marquardt, Kay; Eicher, Anna-Carola; Dobler, Dorota; Hofer, Frank; Schmidts, Thomas; Schafer, Jens et al. (2016): Degradation and protection of DNAzymes on human skin. In: European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V 107, S. 80–87. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.07.001.
- Marquardt, Kay; Eicher, Anna-Carola; Dobler, Dorota; Mäder, Ulf; Schmidts, Thomas; Renz, Harald; Runkel, Frank (2015): Development of a protective dermal drug delivery system for therapeutic DNAzymes. In: International journal of pharmaceutics 479 (1), S. 150–158. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.043.

Kurzfassung

Die pharmakologische Therapie von Krankheiten schreitet durch den Einsatz biomolekülbasierter Wirkstoffe kontinuierlich voran. Alle Biomoleküle, wie Proteine, Peptide, DNA oder RNA teilen sich jedoch das grundsätzliche Problem der Empfindlichkeit gegenüber enzymatischem oder chemisch-physikalisch induziertem Abbau. Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Entwicklung eines protektiven Wirkstofftransportsystems für kurze DNA-basierte Wirkstoffmoleküle, die DNAzyme.

DNAzyme gehören zu den therapeutischen Oligonukleotiden und besitzen die Fähigkeit, Ziel-mRNA enzymatisch zu spalten. In dieser Arbeit wurde der Wirkstofftransport an den Zielort und der Einsatz von Polyplexen, bestehend aus DNAzym als Polyanion und polykationischen Polymeren, untersucht. Die Anwendbarkeit von natürlich vorkommenden Polyglucosaminen zur Polyplexbildung wurde aufgrund von deren Biokompatibilität und geringer Zytotoxizität untersucht. Für die dermale Applikation der Polyplexe wurden Hydrogele als äußere, polyplexumgebende Matrix entwickelt, ebenfalls basierend auf Chitosanpolymeren. In dieser Matrix wurden die sich spontan bildenden Polyplexe aus DNAzym und Chitosan eingebettet. Die in dieser Arbeit verwendeten Formulierungen wurden hinsichtlich ihrer Polyplex- (Partikel-) Größenverteilung, ihren physikochemischen Eigenschaften und ihrer Langzeitstabilität geprüft. In der zweiten Phase der Untersuchungen wurde die Leistungsfähigkeit des Wirkstofftransportsystems, hinsichtlich des Schutzes vor enzymatischem Abbau des DNAzyms durch hautassoziierte DNasen (Deoxyribonukleasen), untersucht. Basierend auf der Erkenntnis, dass hauptsächlich DNasen der Familie II am epidermalen Abbau des DNAzyms beteiligt sind, wurde ein neues *in vitro* Testsystem entwickelt. Es wurden Penetrationsversuche an Vollhautmodellen für die Hydrogele mit den integrierten Polyplexen durchgeführt und über die Quantifizierung des DNAzyms ausgewertet. Der Gehalt des penetrierten, intakten Oligonukleotides wurde über einen Hybridisierungs-ELISA ermittelt und zusätzlich über Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie lokalisiert. Abgeschlossen wurde der experimentelle Teil durch Transfektionsexperimente auf Keratinozyten (HaCaT) mit fluoreszenzmarkiertem DNAzym.

Die Untersuchungen konnten die effektive Kondensierung von DNAzym und Chitosan, in Abhängigkeit von deren Stoffmengenverhältnissen, zeigen. Die Stabilität des DNAzyms innerhalb des Wirkstofftransportsystems konnte für einen Zeitraum von 30 Tagen bei 25 °C mit einer Wiederfindung von 100 ± 15 % für alle Formulierungen gezeigt werden, sowie für einen Zeitraum von 60 Tagen bei 25 °C für fünf von acht Formulierungen. Über die Langzeitlagerungen der Chitosanhydrogele konnte eine Abnahme der Viskosität beobachtet werden, demnach müssen die Hydrogele weiter optimiert werden. Die mittlere Wiederfindung von $98,5 \pm 4,0$ % des Wirkstoffs aus dem DNase II-Assay weist stark darauf hin, dass DNAzyme, kompaktiert als Chitosanpolyplex, vor enzymatischem Abbau geschützt sind. Diese Erkenntnisse wurden durch die Ergebnisse des Penetrationsversuchs bestätigt.

Im Vergleich zu wässrigen DNAzym Lösungen konnte ein signifikant größerer Gehalt von intaktem DNAzym aus Schweinevollhaut nachgewiesen werden, nach der Behandlung mit polyplexbeladenen Hydrogelformulierungen. Zwischen dem Einsatz von chitosanbasierten Polyplexen und Trans-IT-Oligobasierten Polyplexen konnte in Bezug auf die Transfektionseffizienz kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

Auf Grundlage der hohen Schutzeffizienz für den Wirkstoff gegenüber enzymatischem Abbau bestätigt diese Arbeit abschließend die Anwendbarkeit von DNAzym/Chitosanpolyplexen für den dermalen Wirkstofftransport. Der Einsatz von chitosanbasierten Hydrogelmatrices ist aufgrund von säurevermittelten Polymerinstabilitäten hingegen als eingeschränkt zu bewerten. Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Untersuchungen einen positiven Effekt für die Anwendung von Chitosan als Polyplexbildner für den Transport von DNAzymen ins *stratum corneum*.

Abstract

The pharmacological treatment of diseases using active pharmaceutical ingredients (API) based on biomolecules is undergoing rapid advancement. A fundamental issue shared by all biomolecules like proteins, peptides, DNA and RNA is their sensitivity to degradation due to enzymes and chemical or physical stress. The aim of this work was to develop a protective drug delivery system for short DNA-based compounds, the DNAzymes.

DNAzymes belong to class of therapeutic oligonucleotides with the ability to cleave target m-RNA enzymatically. In this study, to deliver short oligonucleotides to the site of action, the application of polyplexes consisting of a polyanion, the DNAzyme, and a polycation (chitosan) were investigated. The application of polyplexes based on natural occurring polyglucosamine chitosan was focused because of its biocompatibility and low cytotoxic properties. Chitosan molecules form the outer surrounding matrix for the polyplexes and result in a hydrogel for dermal drug delivery. In this matrix the spontaneous assembled polyplex particles consisting of DNAzyme and chitosan were embedded.

The formulations used in this study were characterized by polyplex (particle) size distribution, physicochemical properties, and stability during long term storage.

A second stage of investigation assessed the performance of the drug delivery system in protecting the DNAzyme against enzymatic degradation by skin surface DNases (DNase II family). Based on the finding that DNases from the family II are predominantly involved in the epidermal degradation of DNAzymes, a novel *in vitro* assay was established. Skin penetration assays were performed with the polyplex containing hydrogels and evaluated for DNAzyme quantification. The penetrated amount of intact oligonucleotide was determined by hybridization-ELISA and located by confocal laser scanning microscopy. The experimental part was completed by transfection experiments with fluorescence labelled DNAzyme applied to keratinocytes (HaCaT).

These investigations have shown that polyplexes with chitosan are able to effectively condense DNAzymes according to the DNAzyme /polycation proportion. After 30 days DNAzyme stability in the drug delivery system showed a recovery within $100 \pm 15 \%$ at 25°C for all formulations, and for 60 days at 25°C , for at least five formulations out of eight. Over long storage periods, however, the viscosity of the chitosan hydrogel decreased, thus indicating a need for further improvement. There was strong evidence that DNAzyme compacted in chitosan polyplexes is protected from enzymatic degradation due to an average recovery of the test compound of $98.5 \pm 4.0 \%$ from DNase II-assay. These findings were confirmed by the results of the skin penetration assay. A significantly higher amount of intact DNAzyme was shown in full thickness porcine skin treated with DNAzyme containing polyplex formulations compared to DNAzyme from aqueous solution. No significant difference was found in the transfection efficacy with chitosan based polyplexes compared to polyplexes with TransIT-Oligo.

In conclusion, this study supports the use of DNAzyme/chitosan-polyplexes for drug delivery due to its superior protection efficacy against enzymatic degradation of the API by skin surface associated DNases. But the usage of a hydrogel formulation consisting of chitosan is limited due to acid mediated polymer stability issues. Taken together, these findings indicate a positive effect of chitosan as a polyplex building agent for the delivery of DNAzymes into the *stratum corneum*.

Inhalt

Kurzfassung	I
Abstract	III
Inhalt.....	V
1 Theoretische Grundlagen	1
1.1 Einleitung - Biopharmazeutika	1
1.2 Therapeutische Oligonukleotide	2
1.2.1 Mechanismus der DNA- oder RNA-Besetzung	3
1.2.2 Ribozyme – DNAzyme	4
1.2.3 10-23 DNAzyme – molekularer Wirkmechanismus.....	4
1.3 Arzneimittelformulierungen für Biopharmazeutika - effektiver Transport an den Wirkort ...	7
1.4 Applikationsort Haut	8
1.4.1 Aufbau der Haut I – physikalische Barriere	8
1.4.2 Tight Junctions.....	10
1.4.3 Aufbau der Haut II – biochemische Barriere	11
1.5 Transdermaler Wirkstofftransport für Biopharmazeutika	13
1.5.1 Allgemein.....	13
1.5.2 Physikochemische Faktoren des Wirkstoffs	14
1.5.3 Einfluss auf den Wirkstofftransport in oder über die Haut.....	16
1.5.4 Dermales Wirkstofftransportsystem – Effizienz und Schutz	18
1.6 Dermales Wirkstofftransportsystem für DNAzyme.....	22
1.6.1 Etablierte Wirkstofftransportsysteme für therapeutische DNA	22
1.6.2 Chitosan.....	24
1.6.3 Chitosan in der dermalen Formulierung	25
1.7 Zielsetzung.....	29
2 Methoden.....	30
2.1 Fluoreszenzassay zur Beschreibung der Polyplexbildung	30
2.2 Entwicklung und Herstellung Galenik – Hydrogel	32
2.3 Physikochemische Untersuchungen.....	33
2.3.1 Partikelgrößenverteilung über Bilddatenanalyse – CLSM.....	33
2.3.2 Bestimmung des pH-Wertes der Hydrogelformulierung	34
2.3.3 Rheologische Untersuchungen.....	34
2.3.4 Konservierungsmittelbelastungstest KBT.....	35
2.3.5 Wirkstoffstabilität in Chitosanhydrogelen - Wiederfindung DNAzym Dz13	35
2.4 Bioanalytik DNAzym	36
2.4.1 AEX-HPLC (Anion Exchange-High Performance Liquid Chromatography).....	36

2.4.2	Hybridisierungs Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)	37
2.5	Wirkstofftransport- und Schutzigenschaften Galenik	37
2.5.1	Charakterisierung des enzymatischen Abbaus von DNAzymen auf humaner Haut	37
2.5.2	Bestimmung der spezifischen Aktivität	38
2.5.3	DNase II Assay.....	38
2.5.4	Penetrationsstudie	39
2.6	Transfektion – Oligonukleotidtransport an den Wirkort	40
2.6.1	Bestimmung der Zytotoxizität über Zellviabilitätsmessungen	40
2.6.2	Transfektion HaCaT Zelllinie mit Dz13.....	41
2.7	Statistische Berechnungsgrundlagen	42
3	Ergebnisse und Diskussion	43
3.1	Polyplexbildung – Ergebnisse Fluoreszenz Assay	43
3.2	Physikochemische Eigenschaften.....	48
3.2.1	Partikelgrößenverteilung über Bilddatenanalyse.....	48
3.2.2	Bestimmung des pH-Wertes der Hydrogele.....	57
3.2.3	Rheologische Untersuchungen.....	60
3.2.4	Konservierungsmittelbelastungstest KBT.....	64
3.2.5	Wirkstoffstabilität in Chitosanhydrogelen - Wiederfindung DNAzym Dz13	66
3.3	Wirkstofftransport- und Schutzigenschaften Galenik	70
3.3.1	Identifizierung DNAzym-abbauender Nukleasen und Bestimmung ihrer Aktivität	70
3.3.2	DNase II Assay – Überprüfung der Schutzfunktion der Galenik.....	71
3.3.3	Penetrationsstudie	74
3.4	Transfektion – Oligonukleotidtransport an den Wirkort	81
3.4.1	Zytotoxizität Dz13 auf Keratinozyten (HaCaT)	81
3.4.2	Transfektion HaCaT Zelllinie mit Dz13.....	82
4	Zusammenfassung und Fazit	84
5	Literaturverzeichnis.....	87
6	Anhang.....	96
6.1	Material und Geräte	96
6.2	Polyplexbildung, Maxilon Flavine GFF Assay.....	98
6.2.1	Linearität	98
6.2.2	Messwerte freies DNAzym Polyplexbildung.....	100
6.2.3	Freies DNAzym nach Dekomplexierung der Polyplexe mit 0,91 mg/mL Li-Heparin ...	101
6.3	Ergebnisse Wiederfindung Dz13 nach Lagerung.....	108
6.4	Wiederfindung Dz13 aus DNase II-Assay.....	110
6.5	Wirkstoffpenetration an Vollhautmodell.....	111

6.6	Transfektion HaCaT Zelllinie	112
7	Abkürzungsverzeichnis	114
8	Tabellenverzeichnis	116
9	Abbildungsverzeichnis	118
10	Publikationen.....	120
11	Lebenslauf	121
12	Danksagung	122
13	Eidesstattliche Erklärung nach § 17 Abs. 2 Nr. 1 der Promotionsordnung	123

1 Theoretische Grundlagen

1.1 Einleitung - Biopharmazeutika

Die moderne Biotechnologie bildet das Fundament für die Erforschung und Entwicklung neuer Therapieansätze und hat dabei den Begriff „Biopharmazeutikum“ hervorgebracht. Die Definition des Biopharmazeutikums ist allerdings Gegenstand einer fortwährenden Diskussion, da der Begriff nicht einheitlich verwendet wird. Eine auf den gegenwärtigen Entwicklungsstand angepasste Definition liefert Walsh 2002. In dieser wird die Bezeichnung Biopharmazeutikum für protein- oder nukleinsäurebasierte Moleküle verwendet, welche nicht aus nativen Quellen (Organe, Gewebe) extrahiert wurden und der Therapie oder Diagnostik dienen.

Neben der großen Bedeutsamkeit welche den sogenannten „small molecules“, also kleinen Arzneimittel-molekülen zuteilwird, nimmt der Anteil der zugelassenen Biopharmazeutika konstant zu. Im Jahr 2018 ist der Marktanteil der Biopharmazeutika in Deutschland von 26,0% (2017) auf 27,4% angestiegen, laut Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V. (vfa) (Lücke et al. 2019). Die größten Therapiebereiche, in denen sie zum Einsatz kommen sind die Immunologie, Onkologie und Stoffwechselerkrankungen. Historisch hat die Behandlung von Stoffwechselerkrankungen den Grundstein für die Entwicklung der modernen Biopharmazeutika, mit dem ersten humanen Insulin, gelegt. Dieses wurde von Genentech Inc. entwickelt und 1982 von Eli Lilly and Company auf den Markt gebracht (Quianzon und Cheikh 2012). In den späten 1980er Jahren entwickelten sich neben proteinbasierenden Therapien auch erste Forschungsaktivitäten zum therapeutischen Einsatz von Oligonukleotiden. Es wurden grundlegende Erkenntnisse zum humanen Genom, sowie der Verbindung von Genexpression und Krankheitsbild gewonnen. Mit dem Fortschreiten dieser Forschungsfelder gewann die Entwicklung und Untersuchung therapeutischer Antisense Oligonukleotide (ASO) immer größere Bedeutung (Bennett 2019).

1.2 Therapeutische Oligonukleotide

Im Jahr 1998 wurde mit Fomivirsen erstmals ein ASO durch die FDA für die Therapie von Infektionen mit Cytomegaloviren zugelassen. In den folgenden Jahren gab es weitere Zulassungen, wie die von Macugen®, Mipomersen, Eteplirsen, Defibrotide und Nusinersen. Diese Wirkstoffe besitzen neben ihren diversen Strukturen auch unterschiedliche Wirkmechanismen und lassen sich anhand dieser Merkmale klassifizieren (Crooke et al. 2018; Crooke 2008). Die Wirkmechanismen lassen sich grob in die reine Besetzung bestimmter DNA- oder RNA-Abschnitte und die aktiven Mechanismen unterteilen. Bei den aktiven Mechanismen können verschiedene RNA-Strukturen als Zielstruktur (Target) dienen, die entweder gezielt abgebaut oder deren Expressionen verstärkt werden (Bennett 2019; Scoles et al. 2019). Folgend wird näher auf die einzelnen Wirkmechanismen eingegangen.

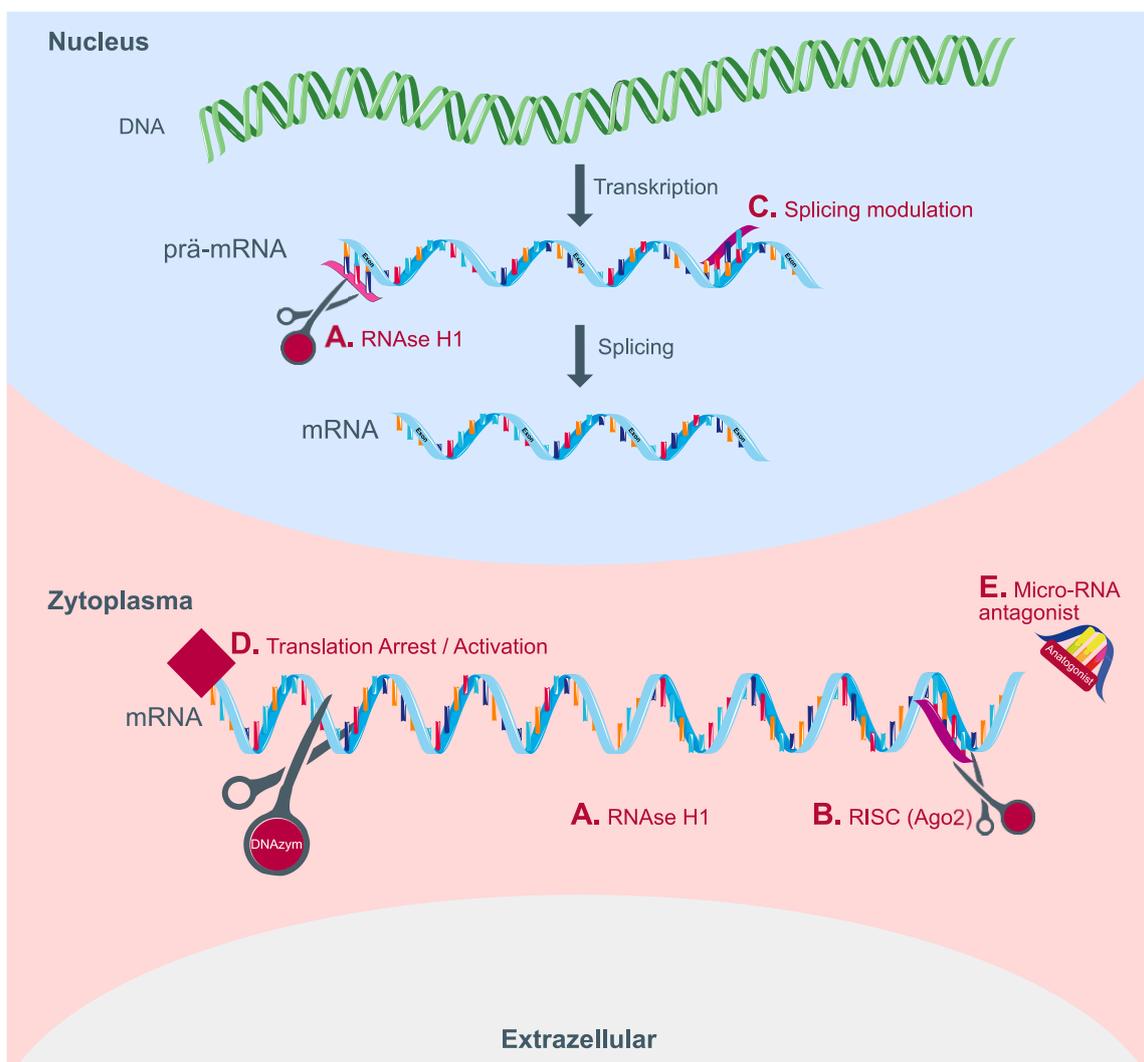


Abbildung 1: Wirkmechanismen therapeutische Oligonukleotide, in Anlehnung an Crooke et al. 2018

1.2.1 Mechanismus der DNA- oder RNA-Besetzung

Der Wirkmechanismus der DNA- oder RNA-Besetzung wird von verschiedenen Antisense Oligonukleotiden verwendet. Dabei wird das Target besetzt und die Prozessierung oder die Translation des Targets unterbunden. In Abbildung 1C ist als Mechanismus die Modulation der Spleißung als Beispiel dargestellt. Das ASO besetzt eine definierte Stelle auf der prä-mRNA und modifiziert somit das Ein- oder Ausschließen von Exons. Als Beispielmolekül ist hier Nusinersen zur Therapie von spinaler Muskelatrophie zu erwähnen. Das Molekül bewirkt, über die Bindung an die SMN2 prä-mRNA, einen Einschluss des Exon 7 und ermöglicht somit ein stabiles Proteinprodukt in der Translation. Eteplirsen wurde hingegen für den Ausschluss eines Exons (exon skipping) designt und soll zur Therapie von Duchenne-Muskeldystrophie eingesetzt werden. Die Translation der mRNA kann außerdem durch eine sterische Blockade von ASOs an regulatorischen Abschnitten inhibiert werden (Abbildung 1, D.). Eine Aktivierung kann ebenfalls durch die Bindung an Inhibitorelemente der mRNA erfolgen. Ein weiterer Mechanismus (Abbildung 1, E.) in dieser Kategorie ist die Bindung von ASO an micro-RNA, welche regulatorische Aufgaben ganzer Genabschnitte übernimmt. Mit der Blockierung von micro-RNA kann somit die Translation von gleich mehreren Proteinen blockiert oder aktiviert werden (Bennett 2019; Bennett et al. 2017; Crooke et al. 2018) .

Mechanismus der RNA Degradierung

Die RNA-Degradierung fasst alle ASO zusammen die gezielt RNA abbauen oder abbauen lassen. Ein Mechanismus ist die Duplexbildung von ASO und Ziel-RNA. Nach der Bindung wird die Heteroduplexstruktur (DNA/RNA) von endogenen RNase H1 Enzymen als Substrat erkannt und abgebaut (Abbildung 1, Mechanismus A.). Der Abbau von RNA kann mit diesem Mechanismus im Nucleus, aber auch im Zytosol erfolgen. Ein anderer Mechanismus nutzt die Endonukleaseaktivität von Ago2 (Argonatenprotein). Dazu bindet siRNA (small interfering RNA) an Ago2, wobei der Passenger-Strang freigesetzt wird. Anschließend bindet der RNA/Proteinkomplex an der Target-RNA und spaltet diese (Abbildung 1, Mechanismus B.).

1.2.2 Ribozyme – DNAzyme

Anfang der 1980er Jahre wurden in prä-RNA Introns entdeckt, deren Sequenzabschnitte ein intrinsisches Spleißen dieser prä-RNA katalysieren (Kruger et al. 1982). Diese katalytisch aktiven RNA-Sequenzen, auch Ribozyme genannt, wurden Gegenstand intensiver Forschung zur Nutzung als molekularbiologische Werkzeuge. Ribozyme ermöglichen die Katalyse verschiedenster chemischer Reaktionen, wie der Spaltung, Modifikation oder Ligation des Substrates (Clark und Pazdernik 2016; Breaker und Joyce 1994; Silverman 2009). In Anbetracht der geringen Stabilität einzelsträngiger RNA wurde untersucht, ob sich die katalytische Aktivität auf einzelsträngige DNA-Moleküle übertragen lässt. Breaker und Joyce veröffentlichten 1994 ihre Daten zu einem groß angelegten *in vitro*-Screening Experiment, bei dem eine Bibliothek von 10^{14} DNA-Molekülen untersucht wurde. Die DNA-Moleküle in einem Selektionsexperiment sind dabei so aufgebaut, dass sie sich selbst, über zwei komplementäre Bindungsregionen falten können (Abbildung 2, CR1 und CR1' bzw. CR2 und CR2'). Diese Bindungsregionen flankieren einen zufälligen Sequenzbereich von 50 Nukleotiden und auf der gegenüberliegenden Seite eine mögliche Spaltstelle (cleavage site). Molekülkandidaten, welche sich in Abhängigkeit von Pb^{2+} -Ionen selbst spalten wurden einer weiteren Amplifikation zugeführt (Ihms und Lu 2012; Breaker und Joyce 1994).

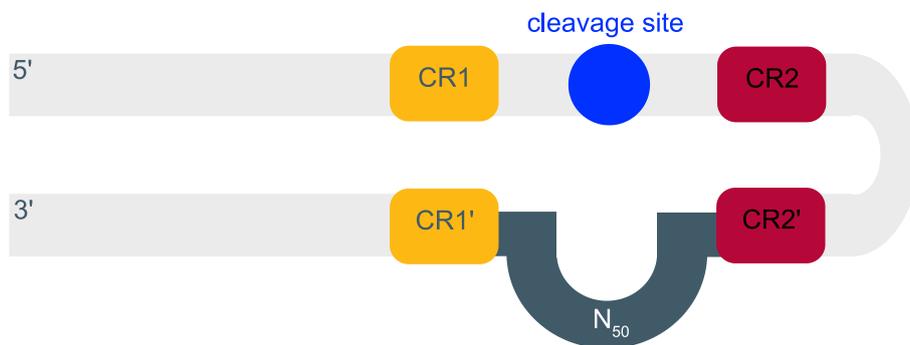


Abbildung 2: Mechanismus Selektionsexperiment zur Entwicklung von selektiven Ribozymen bzw. DNAzymen

1.2.3 10-23 DNAzyme – molekularer Wirkmechanismus

Über die *in vitro* Selektion wurden aktive Klone entdeckt: das 10-23 und das 8-17 DNAzym, benannt nach der Klonnummer und Anzahl der Selektionsrunden (Santoro und Joyce 1997).

Enzymatische Aktivität, wie die der RNA-basierten Ribozyme, lässt sich also mit DNA-Sequenzen erzeugen (Breaker und Joyce 1994). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden weitere Selektionsexperimente durchgeführt, in denen die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von zweiwertigen Ionen näher betrachtet wurde. In diesen Experimenten wurde die Selektion in

Gegenwart von Pb^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} und Zn^{2+} durchgeführt. Ziel der Wissenschaftler war die systematische Selektion von Mg^{2+} -abhängigen DNAzymen, zum prospektiven Einsatz dieser unter physiologischen Bedingungen (Breaker und Joyce 1995). Aus dem aktivsten Klon wurde ein weiterer degenerierter Nukleotidpool gebildet und weitere Selektionsrunden durchgeführt. Es konnten in den aktiven Klonen anschließend Sequenzabschnitte identifiziert werden, welche redundant und hoch konserviert auftraten. Diese sind somit maßgeblich für die enzymatische Aktivität des DNAzyms (Breaker und Joyce 1995). Bezugnehmend zu den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wird auf die Struktur und Funktion des 10-23 DNAzyms näher eingegangen. Santoro und Joyce beschrieben 1997 die Struktur des 10-23 DNAzyms. Das einzelsträngige Oligonukleotid besitzt zwei Bindungsregionen, welche die katalytische Region flankieren. Diese Bindungsabschnitte detektieren über die Watson-Crick-Bindung selektiv ihr Substrat über 6-12 Nukleotide. Der katalytische Bereich „catalytic core“ wird aus 15 Nukleotiden gebildet und bildet eine Haarnadelstruktur. Innerhalb des katalytischen Bereiches gibt es Nukleotide, welche essenziell für die enzymatische Funktion des DNAzyms sind. Diese befinden sich an den folgenden Positionen G_1 , G_2 , T_4 , G_6 , and G_{14} siehe Abbildung 3 (Joyce 2001; Zaborowska et al. 2005; Breaker und Joyce 1995).

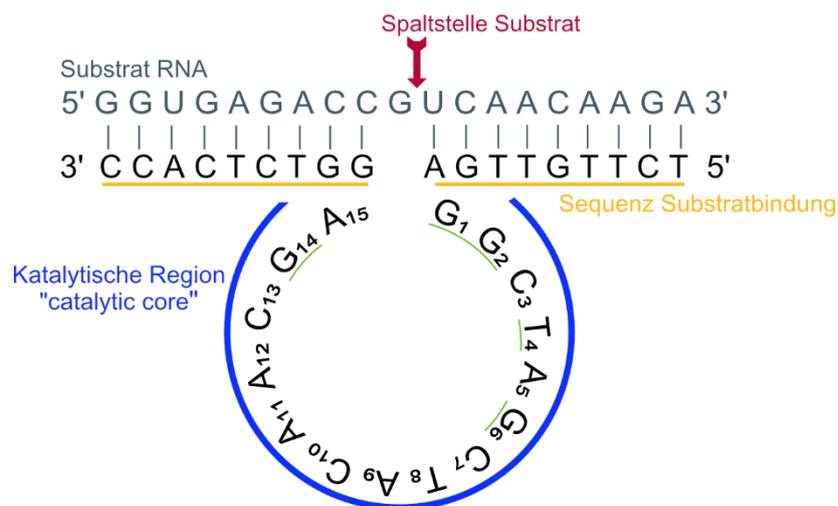


Abbildung 3: Struktur 10-23 DNAzym, in Anlehnung an Abbildung 1A Zaborowska et al. 2002

Das DNAzym ist so aufgebaut, dass es die Substrat-RNA an der Phosphodiesterbindung zwischen einem ungepaarten Nukleotid mit Purinrest und einem Nukleotid mit gepaartem Pyrimidinrest spaltet, Abbildung 3. Der Ablauf der Reaktion auf molekularer Ebene wird von Santoro und Joyce 1998 beschrieben. Die Spaltung der Substrat-RNA beruht dabei auf einer internen Phosphoestertransferreaktion (Breaker et al. 2003). Diese Reaktion kann sehr langsam spontan

ablaufen oder sie lässt sich über die folgenden Katalysemechanismen beschleunigen. Es wird davon ausgegangen, dass die Spaltung der RNA einer Kombination dieser Mechanismen unterliegt.

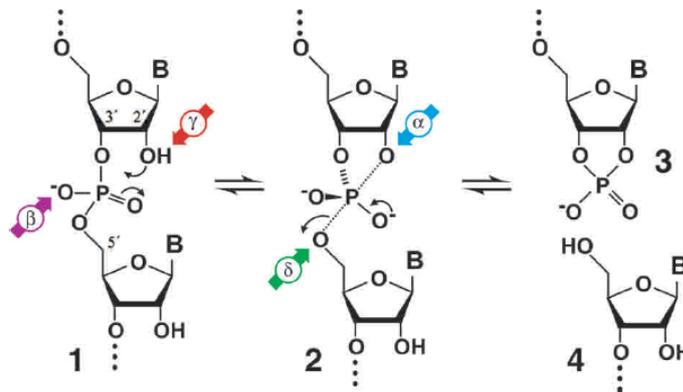


Abbildung 4: Emilsson 2003, Mechanismen der Reaktionskatalyse zum Phosphotransfer zur Spaltung von Substrat-RNA, mit freundlicher Genehmigung des Editors Timothy W. Nilsen von „RNA“, ISSN: 1355-8382.

Die Substrat-RNA wird über den Mechanismus β (Neutralisation der negativen Ladung des nichtbrückenbildenden Sauerstoffs) und/oder den Mechanismus γ (Deprotonierung der 2'-Hydroxylgruppe) in eine Zwischenstufe mit penta-kordiniertem Phosphor (Abbildung 4, 2) überführt. In dieser Zwischenstufe kann die korrekte in-line Substratpositionierung den nukleophilen Angriff des 2'-Sauerstoffs begünstigen (Mechanismus α). Der Mechanismus δ bezeichnet die Katalyse der Neutralisierung des 5'-Sauerstoffatoms (Emilsson et al. 2003; Breaker et al. 2003). Eine vollständige Aufklärung des dreidimensionalen Aufbaus der katalytischen Region und der Fassung des Substrates in diese gibt bisher für das 10-23 DNAzym nicht. Für das RNA-legierende DNAzym 9DB1 konnte die dreidimensionale Struktur durch die Arbeit von Ponce-Salvatierra et al. 2016 beschrieben werden, welche als Durchbruch in der Kristallstrukturanalyse von DNAzymen gilt. Auch die Funktion des divalenten Metallions konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. So gehen einige Theorien davon aus, dass das Metallion die zur Substratspaltung nötige DNA-Konformation unterstützt. Auch die Untersuchungen zur Kristallstruktur des 9DB1-DNAzyms, ein Mg^{2+} -abhängiges DNAzym, konnten die Funktion des Metallions nicht abschließend klären (Wirmer-Bartoschek und Schwalbe 2016).

Wie im vorherigen Abschnitt angedeutet, können DNAzyme nicht nur die Spaltung von RNA-Substraten katalysieren. Es sind DNAzyme entwickelt worden, welche RNA- oder DNA-Ligationen und kovalente Modifizierungen (Änderung der Phosphorylierung, DNA-Adenylierung, DNA-Deglukosylierung) durchführen können. Diese werden ergänzt durch DNAzyme, welche Reaktionen an anderen Substraten wie Oligonukleotiden katalysieren (Silverman 2004, 2016).

1.3 Arzneimittelformulierungen für Biopharmazeutika - effektiver Transport an den Wirkort

Um den Einsatz von sensiblen Biomolekülen zur Therapie überhaupt ermöglichen zu können, bedarf es eines Wirkstofftransportsystems, das den Wirkstoff vor Abbau schützt und effektiv an den Wirkort transportiert.

In Bezug auf die Entwicklung eines geeigneten Wirkstofftransportsystems rückt, aus der Perspektive der Pharmakodynamik und -kinetik, die Absorption in den Fokus. Für die Applikation von Biopharmazeutika ist zu berücksichtigen, dass eine orale Darreichungsform in den meisten Fällen ungeeignet ist. Die hohe enzymatischen Aktivität, die extremen pH-Werte im Gastro-Intestinal-Trakt und die geringe Permeabilität großer Biomoleküle über die Darmwand schließen eine Applikation über diese Route meist aus. (Meibohm 2013) .

Grundlegend müssen zur Entwicklung des Wirkstofftransportsystems, die chemische Struktur des Wirkstoffes, die Molekülgröße und Polarität, sowie die physiologischen Gegebenheiten und Barrieren am Applikationsort betrachtet werden. Basierend darauf, kann die Applikationsform gewählt werden und die Entwicklung des Transportsystems beginnen. Im Falle von therapeutischen Oligonukleotiden schränkt sich die Applikationsform aufgrund des hohen Molekulargewichts (4500-18.000 Da) und der einhergehenden geringen Permeabilität, bereits ein. Zudem sind die Moleküle am Phosphodiesterückgrat mehrfach negativ geladen, sodass eine Permeation über biologische Membranen besonders ungünstig ist (Peters 2012). Werden Oligonukleotide systemisch verabreicht, so kommt es zu einer schnellen renalen Ausscheidung (clearance) aufgrund der Molekülgröße und Ladung mit Plasmaeliminationszeiten unter 10 Minuten. Neben der renalen Ausscheidung wird ein Großteil der therapeutischen Oligonukleotide durch ubiquitär vorkommende Deoxyribonukleasen metabolisiert. Des Weiteren akkumulieren systemisch verabreichte Oligonukleotide häufig in peripheren Geweben wie der Leber, der Niere, dem Knochenmark oder der Haut (Schiffelers und Mastrobattista 2013).

Im folgenden Abschnitt wird als Applikationsort für therapeutische Oligonukleotide die Hautoberfläche betrachtet, da die Idee einer dermalen Applikation von DNAzymen zur Therapie von nicht-melanozytären Hautkrebsvorstufen der Ausgangspunkt der durchgeführten Studien ist.

1.4 Applikationsort Haut

Die topische Applikation von DNAzymen setzt voraus, dass diese mit Hilfe des Wirkstofftransportsystems die Barrieren der Haut überwinden können. Dabei muss die biologische Barriere, berücksichtigt werden. Diese setzt sich aus der Hautflora mit ihrem saurem pH-Wert, endogenen DNA-abbauende Enzymen (DNasen) und exogenen, vom Mikrobiom der Haut stammenden DNasen, zusammen. Eine weitere Barriere ist die rein physikalische Abgrenzung der Haut zur äußeren Umgebung, welche durch einen starken Verbund der Hautzellen untereinander und ihre hydrophobe Oberfläche nach außen gewährleistet wird. Folgend wird der Aufbau der Haut sowie deren Barrierefunktionen näher betrachtet.

1.4.1 Aufbau der Haut I – physikalische Barriere

Die Haut besteht aus mehreren Schichten, welche durch die verschiedenen Grade der Ausdifferenzierung von Keratinozyten definiert werden. Die oberste Schicht, das *stratum corneum* (SC) verliert durch Abschuppung ständig an Substanz, die von den darunterliegenden Hautschichten ersetzt wird, Abbildung 5. Dieser Prozess steht bei gesunder Haut in einem Gleichgewicht, wodurch die konstante Erneuerung der Hautschichten über differenzierende Keratinozyten gegeben ist. Die Morphologie und die Eigenschaften der Keratinozyten verändern sich ausgehend von der Basalschicht bis hin zur Oberfläche, dem *stratum corneum*. Candi et al. 2005 betrachten in ihrem Review die Veränderung des Keratinozytenverbundes auf molekularer Ebene. In der Basalschicht werden Keratinozyten über Proliferation gebildet und treten anschließend ins *stratum spinosum* über. In diesem wird die Bildung des „cornified envelope“ angestoßen, einer Schicht, welche unter der Plasmamembran von vollständig ausdifferenzierten Keratinozyten eine physikalische Barriere bilden. Im ersten Schritt werden Enzyme und Strukturproteine wie verschiedenen Keratine, Envoplakin, Periplakin und Proteine der S100-Familie synthetisiert, wobei die Zelle ihre Fähigkeit zur Mitose verliert. Die „cornified-envelope“-Proteine werden anschließend über Transglutaminasen miteinander vernetzt und an Desmosomen verankert. Desmosomen sind Zellstrukturen, die aus Integrinen bestehen und Keratinfilamente miteinander verbinden, welche benachbarte Zytoskelette miteinander verknüpfen. Nach der Verankerung der Strukturproteine in den Desmosomen werden diese als Corneodesmosomen bezeichnet. Im *stratum granulosum* werden dann Lipide kovalent als Corneodesmosom gebunden. Der Name dieser Hautschicht leitet sich von Keratohyalin granula ab, die bereits im *stratum spinosum* vorkommen, hier aber in einer großen Anzahl zu beobachten sind. Diese bestehen zu einem Großteil aus Profilaggrin und Loricrin. Das Protein Loricrin wird im *stratum*

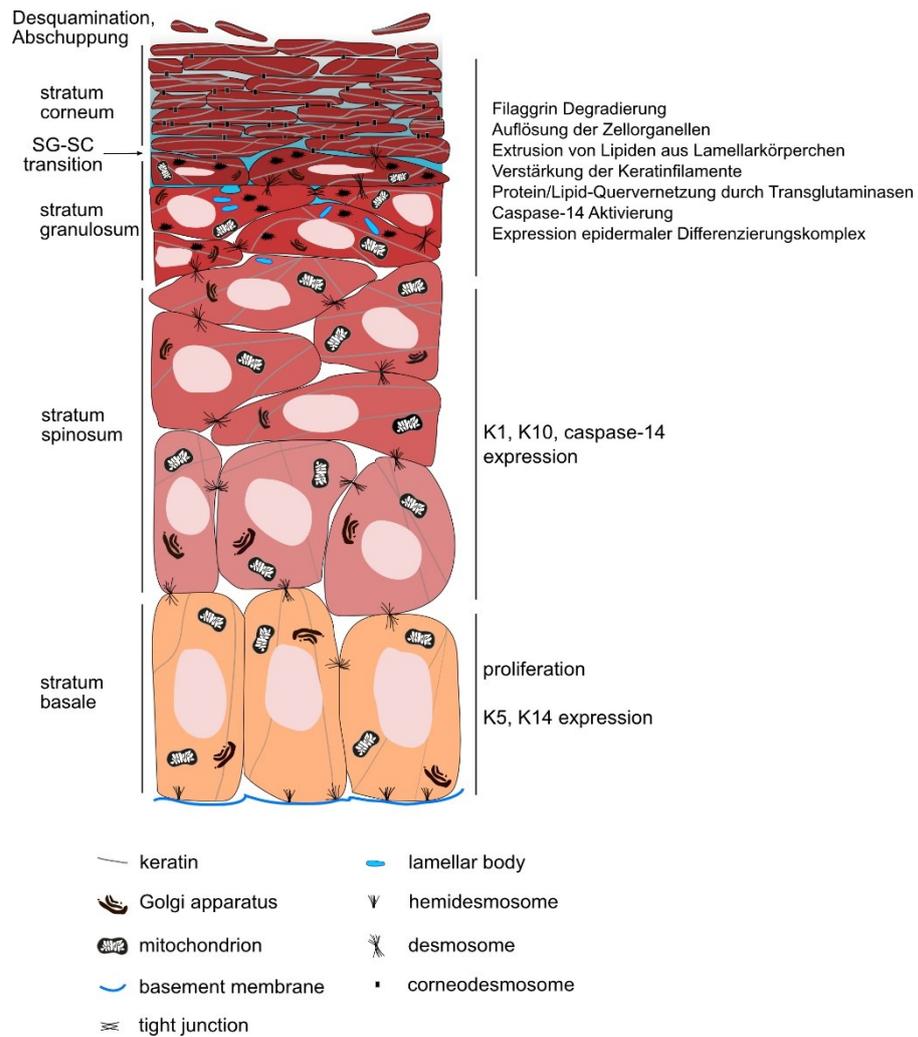


Abbildung 5: Aufbau der Hautschichten, Eckhart et al. 2013: Cell death by cornification, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.010. Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier

granulosum mit kleinen prolinreichen Proteinen (SPR) verbunden. Loricrin macht den größten Anteil der Proteinmasse innerhalb des „cornified envelope“ aus und dient der Verstärkung des Verbundes aus Proteinen, Filamenten und Lipiden. Am Desmosom kommt es zu weiteren Quervernetzungen der gebundenen Proteine und es werden Lipide aus den Lamellarkörperchen (Odland-Körperchen) bereitgestellt. Diese formen nun in der oberen Schicht des *stratum granulosum* den sogenannten „lipid envelope“ über die Bindung an den Desmosomproteinverbund, welcher die Funktion eines Gerüsts übernimmt. Die Lipide sind so positioniert, dass sie dabei aus der Zellmembran herausragen. Die Plasmamembran der Zelle wird immer weiter verdrängt. Im letzten Schritt der Differenzierung verlieren die Zellen ihre Zellkerne und Zellorganellen und flachen stark ab, es kommt zur Verhornung, das *stratum corneum* wird ausgebildet. Die Proteine an den Corneodesmosomen sind weiter quervernetzt worden und schließlich folgt deren proteolytischer Abbau. Parallel dazu werden ω -OH-Ceramide, Cholesterol und Fettsäuren ausgeschleust und ragen in den extrazellulären Raum. Mit

dieser Lipidschicht wird der Raum der abgestorbenen Zelle vor Wasserverlust geschützt (Eckhart et al. 2013; Candi et al. 2005). Das *stratum corneum* kann als Hauptbarriere gegenüber der dermalen Applikation von Wirkstoffen angesehen werden. Die Keratinozyten haben in dieser obersten Schicht über einen gesteuerten Zelltod ihre Zellmembranen aufgelöst und den Endpunkt im Prozess der Verhornung der Haut erreicht, Abbildung 5.

1.4.2 Tight Junctions

Als besonderes Strukturelement der physikalischen Hautbarriere sind die Tight Junctions zu betrachten welche im *stratum granulosum* lokalisiert sind, Abbildung 6. Sie stellen einen äußerst engen Zellkontakt zwischen den Keratinozyten her und verhindern dadurch das parazelluläre Eindringen von Fremdstoffen in den Organismus. Die Struktur der Tight Junctions wird aus faserartigen Proteinsträngen gebildet, wie den Transmembranproteinen der Claudinfamilie und Occludin. Zudem aus den Junctional Adhesion Molekülen (JAMs), und den Tight Junction-assoziierten Plaqueproteinen Zonula Occludens (ZO) Proteinen: 1-3, Multi-PDZ-Domänen Protein 1 (*MUPP1*) und Cingulin (Bäsler et al. 2016). Kommt es zur Modulation der Tight Junction Proteine, können Wirkstoffe bis zu einer Größe von 10 kDa dermal über den parazellulären Weg appliziert werden. Die Tight Junction Proteine können sowohl reversibel als auch irreversibel moduliert werden (Rosenthal et al. 2012). In Kapitel 1.6.3 wird die Modulation der Tight Junction-Proteine und die Nutzung dieser als Wirkstofftransportstrategie näher betrachtet.

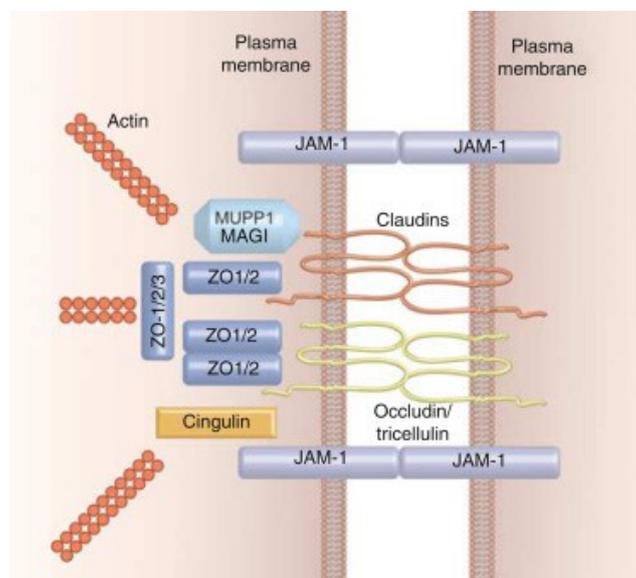


Abbildung 6: Molekulare Architektur der Tight junctions, aus Niessen 2007, *Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function*. In: *The Journal of investigative dermatology* 127 (11), S. 2525–2532. DOI: 10.1038/sj.jid.5700865. Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier B.V.

1.4.3 Aufbau der Haut II – biochemische Barriere

Neben der physikalischen Barriere grenzt sich die Haut auch biologisch und chemisch gegen die äußere Umgebung ab. Das Mikrobiom der Haut, bestehend aus verschiedenen kommensalen Bakterienstämmen, verhindert eine Ansiedlung von pathogenen Erregern. Die Oberfläche der intakten, gesunden Haut ist vollständig besiedelt und bietet keinen Raum für pathogene Erreger. Der saure pH-Wert der intakten Hautoberfläche schafft zudem ein Milieu, welches nur die Existenz angepasster Enzymen und Mikroorganismen begünstigt. Diese passiven Mechanismen werden um aktive Barrieremechanismen ergänzt. Keratinozyten gesunder Haut sekretieren antimikrobielle Peptide (AMP) in geringer Konzentration. Diese richten sich mit den verschiedensten Wirkmechanismen und hoher Effizienz gegen Bakterien, Pilze und Viren. Im Falle einer Infektion oder Verletzung kann ein Anstieg der AMP-Expression beobachtet werden (Bäsler et al. 2016). Auf der Hautoberfläche ist zusätzlich ein weites Spektrum protein- und DNA-degradierender Enzyme vertreten. Dazu zählen Endo- und Exonukleasen (DNase I Familie, DNase II, Three Prime Repair-Exonuclease 1 (TREX)) sowie Proteasen (Kallikrein) und Transglutaminasen (Fischer et al. 2017; Eckhart et al. 2013). In Bezug auf die dermale Applikation von DNA-basierten Wirkstoffen ist die Betrachtung der Enzymfamilie der DNasen somit elementar.

DNasen kommen in nahezu allen Geweben lebender Organismen vor, wobei sie in hohen Konzentrationen in Endolysosomen nachzuweisen sind. Im Prozess der Verhornung von Keratinozyten bauen DNasen den Nukleus ab, wodurch sie essenziell für den korrekten Umbau zu Corneozyten sind. Kommt es zum unvollständigen Abbau der Nukleus-DNA in diesem Prozess, z.B. durch mutationsbedingter Fehlfunktion dieser DNasen, resultiert dies in einer Störung der Verhornung - der Parakeratose (Fischer et al. 2017). Auf der Hautoberfläche lassen sich verschiedene DNase-Typen nachweisen. Dominiert wird der enzymatische Abbau von DNA auf der Hautoberfläche jedoch von der DNase IIa, deren Katalysoptimum in einer Umgebung mit saurem pH-Wert liegt. Studien von Fischer et al. 2011 wiesen nach, dass sich der enzymatische Abbau von DNA-Substraten durch die DNase IIa primär gegen exogene DNA richtet. In knockdown-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die DNase IIa am Abbau des Nukleus im Prozess der Hautverhornung nicht beteiligt ist. Sie kann somit als enzymatisch aktive Barriere betrachtet werden, die sich explizit gegen das Eindringen von Fremd-DNA in die Haut richtet.

Die Effizienz der Hautbarriere, gegen äußere Einflüsse zu schützen, ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Der Gesundheitsstatus der Haut steht in starkem Zusammenhang mit der Barrierefunktion. Hautkrankheiten können diese in beide Richtungen verändern. Die Arbeit von Bos und Meinardi 2000 beschreibt die Permeabilität der Haut in Abhängigkeit von Molekülgröße und Gesundheitsstatus. Die atopische Dermatitis beispielsweise stört die Hautbarriere, sodass Molekülgrößen von bis zu 900 Da

die Barriere penetrieren können. Eine intakte Hautbarriere schließt die meisten Moleküle mit mehr als 500 Da hingegen aus. Weitere Unterschiede in der Barriereausprägung ergeben sich durch das Alter, die betrachtete Körperregion und die Hydratisierung des Gewebes (Benson und Watkinson 2011).

1.5 Transdermaler Wirkstofftransport für Biopharmazeutika

1.5.1 Allgemein

Biomoleküle, wie therapeutische Peptide, Proteine oder Oligonukleotide, stellen für viele ubiquitär im Organismus vorkommende Enzyme Substrate dar. Sie können daher relativ schnell in sämtlichen Geweben abgebaut werden. Im Vergleich dazu werden kleine, chemische Moleküle meist hepatisch oder renal transformiert, ab- bzw. umgebaut und ausgeschieden. Für die Applikation von Biomolekülen ist es daher von großer Bedeutung ein Wirkstofftransportsystem zu nutzen, welches die Integrität und die dreidimensionale Konformation des Wirkstoffes so zu schützen vermag, dass ein Transport des intakten Moleküls ans Target gewährleistet ist.

Zur Therapie von dermalen, lokal begrenzten Krankheiten ist die topische Applikation von Therapeutika besonders interessant, da nicht das gesamte System mit Wirkstoff belastet wird und zudem am Wirkort relativ hohe Wirkstoffkonzentrationen zu erreichen sind. Außerdem kann der First-Pass-Effekt über die topische Gabe von Wirkstoffen umgangen werden. Ein weiterer Aspekt der dermalen Applikation ist die Möglichkeit Wirkstoffe kontrolliert und retardiert in Form eines Wirkstofftransportsystems (Drug delivery system DDS)) mit Depotfunktion abgeben zu können. Ein Beispiel für die Anwendung findet sich in der modernen Schmerztherapie im Einsatz von Fentanyl-, oder Diclofenacpflastern (Benson und Watkinson 2011). Die erfolgreiche Applikation von Biomolekülen in oder über die Haut setzt, neben der bereits erwähnten Gewährleistung der Wirkstoffintegrität, auch die Freisetzung aus der Formulierung voraus. Auf die Freisetzung folgt die Penetration in die Haut. Der Prozess der Wirkstoffpermeation/-penetration ist maßgeblich für den Therapieerfolg, da die Konzentration des Wirkstoffs am Wirkort für den therapeutischen Effekt ausreichend sein muss. Zusammenfassend wird das Design eines dermalen Wirkstofftransportsystems durch folgende Anforderungen beeinflusst: die Löslichkeit (oder homogene Dispersion) des Wirkstoffs, die Wirkstoffstabilität/-integrität, die Freisetzung aus der Formulierung und die Permeation/Penetration zum Wirkort. Das Wirkstofftransportsystem nimmt Einfluss auf diese Parameter und bietet somit die Möglichkeit der Steuerung dieser.

1.5.2 Physikochemische Faktoren des Wirkstoffs

Der von der Formulierungsmatrix umgebene Wirkstoff muss für den Transport an den Wirkort freigesetzt werden, denn Effekte am Target können nur in gelöster Form erzielt werden. Die physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs selbst und die des Transportsystems, im Zusammenspiel mit der Physiologie der verschiedenen Hautschichten beeinflussen die Permeabilität des Wirkstoffs in die Haut. Die chemische Struktur eines Wirkstoffs bestimmt dessen physikochemische Eigenschaften und schließlich die Administrationsfähigkeit.

Löslichkeit

Eine ausreichende Löslichkeit des Wirkstoffs in der Formulierung, mit meist hydrophilen Eigenschaften, muss für den Transport gegeben sein. Gleichzeitig muss eine Löslichkeit in der lipophilen Barriere des *stratum corneums* gegeben sein, um einen Transport in tiefere Hautschichten zu ermöglichen. Sehr lipophile Substanzen mit einer hohen Löslichkeit in der Lipidmembran der obersten Hautschicht diffundieren mit großer Geschwindigkeit in die Haut. Dies kann zu einer frühzeitigen Auszehrung des Wirkstofftransportsystems führen und wodurch der Transportstrom des Wirkstoffs (Flux) einbricht. Der ideale Wirkstoffkandidat für die dermale Applikation sollte demnach lipophile Eigenschaften besitzen, zusammen mit einer gewissen Wasserlöslichkeit. Eine Prognose über die Löslichkeit eines Wirkstoffes kann anhand mathematischer Modelle, basierend auf Schmelzpunktdaten, erstellt werden. Die Konzentration des Wirkstoffs in der Galenik ist unter der Berücksichtigung der Löslichkeit in einem gewissen Bereich justierbar und kann somit der Steuerung der Freisetzungskinetik dienen. Der Massentransport über die Haut (Flux, J_s) kann über die Applikationsfläche (A), den Diffusionskoeffizienten (D), den Verteilungskoeffizienten zwischen Vehikel und Hautmembran (P) und die Pfadlänge der Diffusion (h) beschrieben werden. Unter einer vereinfachten Betrachtung mit konstanten Parametern für A , D , P , und h , wird die starke Abhängigkeit des Flux von der eingesetzten Wirkstoffkonzentration im Vehikel (C_v) deutlich (Gibson 2009).

Steady-state Flux J_s über die Haut:

$$J_s = \frac{ADPC_v}{h} \quad \text{Formel 1}$$

Octanol/Wasser Verteilungskoeffizient

Der n-Octanol/Wasser Verteilungskoeffizient, gibt die Verteilung einer Substanz innerhalb eines Zweiphasensystems aus Octanol und Wasser an. Oftmals wird er durch den logP-Wert beschrieben, dem Logarithmus des Quotienten der Konzentration in der lipophilen Octanol-Phase und der Konzentration der wässrigen Phase im Gleichgewichtszustand (Formel 2).

$$\log P_{Oct} = \log \frac{c_o}{c_w} \quad \text{Formel 2}$$

Therapeutische Oligonukleotide weisen eine sehr hohe Wasserlöslichkeit auf und deren logP-Wert liegt daher im negativen Bereich. Als Beispiel wird der logP von Mipomersen, einem Phosphothioat-Oligonukleotid, mit -2,9 angegeben (Drug Bank Online, DB05528, Wishart et al. 2018).

Der logP gibt die intrinsische Lipophilie eines Moleküls an, berücksichtigt jedoch nicht den Ladungszustand des Wirkstoffs in Bezug auf den pH-Wert in der wässrigen Phase. Diese Berücksichtigung beinhaltet der logD-Wert. Der logD-Wert ist an den pH-Wert in der wässrigen Phase geknüpft und berücksichtigt somit mögliche Ladungszustände des Moleküls (Formel 3). Der logD-Wert umfasst somit die intrinsische Lipophilie mit dem pH-Wert assoziierten Ladungszustand und gibt den Verteilungskoeffizienten wieder (Smith et al. 2012).

$$\log D = \log P - \log (1 + 10^{pH-pK_a}) \quad \text{Formel 3}$$

Der Ladungszustand/ die Ionisierung beeinflusst zudem die Penetration in die Haut stark. Wirkstoffmoleküle passieren die Lipidbarriere im ungeladenen Zustand schneller. Ihr Transport kann demnach auf dem interzellulären Weg erfolgen. Geladene Moleküle werden bevorzugt, wie hydrophile Moleküle, auf der transzellulären Route oder über Hautanhangsgebilde in die Haut permeieren. Die verschiedenen Routen für den Wirkstofftransport über die Haut werden nachfolgend näher betrachtet.

Molekülgröße

Die Diffusionsfähigkeit eines Wirkstoffes in die Haut ist abhängig von der dreidimensionalen Struktur des Moleküls, dem Molekülvolumen. Vereinfacht auf ein sphärisches Modell ist die Diffusionseigenschaft an das molekulare Gewicht des Wirkstoffes und das hydrodynamische Volumen gebunden. Im Allgemeinen wird die Penetration durch die Haut für Moleküle > 500 Dalton (Da) als unwahrscheinlich angesehen. Bos und Meinardi 2000 zeigten in einem Review, dass Moleküle die sich in der Therapie über dermale Applikation als erfolgreich bewiesen, meist ein Molekulargewicht < 500 Da besitzen, wie beispielsweise Clotrimazol (345 Da), Hydrokortisonacetat (405 Da), oder Estradiol (272 Da). Eine weitere Begründung für die Beschränkung auf Moleküle < 500 Da liefern die Autoren über die Betrachtung der Molekülgröße bekannter Kontaktallergene (International Contact Dermatitis Research Group, Patch Test Liste). Die Applikation größerer

Moleküle, wie die der Biomoleküle ist nach Ansicht der Autoren nur mit einer invasiven Störung der Hautbarriere zu erreichen, beispielsweise über den Einsatz von Phonophorese oder Elektroporation. Die Geschwindigkeit und Effizienz des Transports hängt dabei maßgeblich von den Parametern: Wirkstoffkonzentration, Verteilungskoeffizient und Diffusionsvermögen ab.

So beeinflussen die Parameter Viskosität, Hydrophilie / Lipophilie der äußeren Phase, Wirkstoffkonzentration und -distribution das Freisetzungsverhalten für einen spezifischen Wirkstoff. Diese Parameter lassen sich ebenfalls als Steuerelement einsetzen, um ein gewünschtes Freisetzungsprofil zu erhalten, wie beispielsweise bei einer langen, kontinuierlichen Wirkstoffabgabe durch ein Wirkstofftransportsystem mit Depotfunktion. Übergreifendes Ziel für die Steuerung der Kinetik ist für alle Wirkstofftransportsysteme das Erreichen des therapeutischen Bereiches (therapeutischen Fensters). Der therapeutische Bereich bezeichnet die Konzentration am Zielort, die zum gewünschten Effekt führt, jedoch kleiner als die Konzentration bleibt, bei der erste toxische Effekte sichtbar werden. Welche Wirkstoffkonzentrationen am Wirkort erreicht werden können hängt, neben der Freisetzung aus dem Transportsystem, von der Permeation bzw. Penetration ins Zielgewebe ab (Benson und Watkinson 2011; Brown und Williams 2019; Gibson 2009).

1.5.3 Einfluss auf den Wirkstofftransport in oder über die Haut

Diffusion über die erste Barriere – stratum corneum

Die oberste Hautschicht, das *stratum corneum*, bildet mit seiner assoziierten Lipidschicht (Kapitel 1.4.) die erste, sehr hydrophobe Diffusionsbarriere im Prozess der dermalen Wirkstoffapplikation. Das sich einstellende Verteilungsgleichgewicht zwischen Formulierung und dieser obersten Hautmembran wird maßgeblich von der Lipophilie des Wirkstoffs beeinflusst. Der logP-Wert kann zu einer ersten Abschätzung für die Freisetzung des Wirkstoffs aus der Formulierung herangezogen werden. Lipophile Moleküle mit einem großen logP-Wert werden sich, nach Applikation der Galenik, bevorzugt in der obersten lipophilen Hautschicht verteilen. Dieser Prozess wird beschleunigt, wenn die Formulierung im Vergleich zum Applikationsort hydrophiler ist. Für die dermale Applikation eignen sich Wirkstoffe mit einem logP zwischen 2-3 besonders gut (Benson 2011). Neben dem logP-Wert beeinflussen weitere physikochemischen Parameter, wie bereits in 1.5.2 beschrieben, die Überwindung dieser ersten Barriere.

Die Diffusion durch das *stratum corneum* kann über verschiedene Routen erfolgen. Die transzelluläre Diffusion wird für Wirkstoffe mit hydrophilen Eigenschaften von größerer Relevanz sein. Die interzelluläre Route mit Diffusion zwischen den Corneozyten und durch die Lipidmatrix hindurch, ist für die Diffusion lipophiler Moleküle maßgeblich. Das *stratum corneum*, mit seiner ausgeprägten Barrierefunktion, gilt oftmals als Grund für die Transportlimitierung in der dermalen Applikation. Ein weiterer Transportweg ist die Wirkstoffpassage durch Hautanhangsgebilde wie Schweiß-, und

Talgdrüsen oder Haarfollikel. Die Dichte dieser Hautanhangsgebilde ist stark abhängig von Individuum und Körperregion. Im Allgemeinen ist deren Gesamtfläche mit 0,1 – 1,0 % in Bezug auf die Oberfläche der Haut relativ gering und der Transport über diese kleine Fläche für die dermale Applikation, von vorwiegend hydrophoben Wirkstoffen, nicht relevant. In der Applikation von hydrophilen, geladenen Molekülen sollte die Transportroute über die Hautanhangsgebilde jedoch betrachtet werden. Die stark lipophile, interzelluläre Route über das *stratum corneum* stellt für hydrophile, geladene Wirkstoffe eine nicht zu überwindende Barriere dar. Essa et al. 2002 konnten jedoch den Transport von stark hydrophilem Mannitol ($\log P = -2.47$) über die Haut beschreiben. Über ein Sandwich-Hautmodell konnte bewiesen werden, dass die Hautanhangsgebilde und die damit assoziierte „shunt-route“ den transdermalen Transport ermöglichen, vor allem in der frühen Phase des dermalen Wirkstofftransports. Die Diffusion tritt zeitlich verzögert (lag-Phase) ein, bedingt durch die Molekülgröße und die Eigenschaft über die polaren Gruppen Wasserstoffbrückenbindungen ausbauen zu können. Abschließend konnte für Mannitol ein Flux von $8.81 \text{ ng cm}^{-2}\text{h}^{-1}$ in der frühen Phase der Applikation beobachtet werden (Barry 2002; Essa et al. 2002).

Freisetzung aus dem stratum corneum in die Epidermis und tiefere Hautschichten

Nach Passage des *stratum corneums* muss sich ein weiteres Verteilungsgleichgewicht des Wirkstoffs einstellen zwischen der viablen, hydrophileren Epidermis und dem *stratum corneum*. Die Diffusionsgeschwindigkeit lipophiler Moleküle, welche die interzelluläre Lipidmatrix schnell überwinden wird an der Grenze zur Epidermis stark vermindert. Es entsteht ein Wirkstoffreservoir am Übergang zum hydrophileren Gewebe wodurch die Transportrate in tiefere Schichten der Haut abnimmt (Gibson 2009)

1.5.4 Dermales Wirkstofftransportsystem – Effizienz und Schutz

Die Anforderungen, welche an ein dermales Wirkstofftransportsystem gestellt werden, sind in Abbildung 7 grafisch dargestellt. Sie sind mit den spezifischen physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs assoziiert und müssen daher für jede Wirkstoff-Formulierungskombination individuell betrachtet werden. Ist eine Grundformulierung mit ausreichender Löslichkeit für den Wirkstoff und Stabilität entwickelt, kann zur Optimierung der Effizienz physikalisch/technische oder chemische Penetrationsverstärkung eingesetzt werden. Da die Wirkstoffklasse der DNAzyme über eine sehr hohe Wasserlöslichkeit verfügt fokussierten sich die hier beschriebenen experimentellen Arbeiten auf die Überprüfung der Permeation und Penetration, die Wirkstoff- und Formulierungsstabilität sowie die mikrobiologische Beständigkeit.

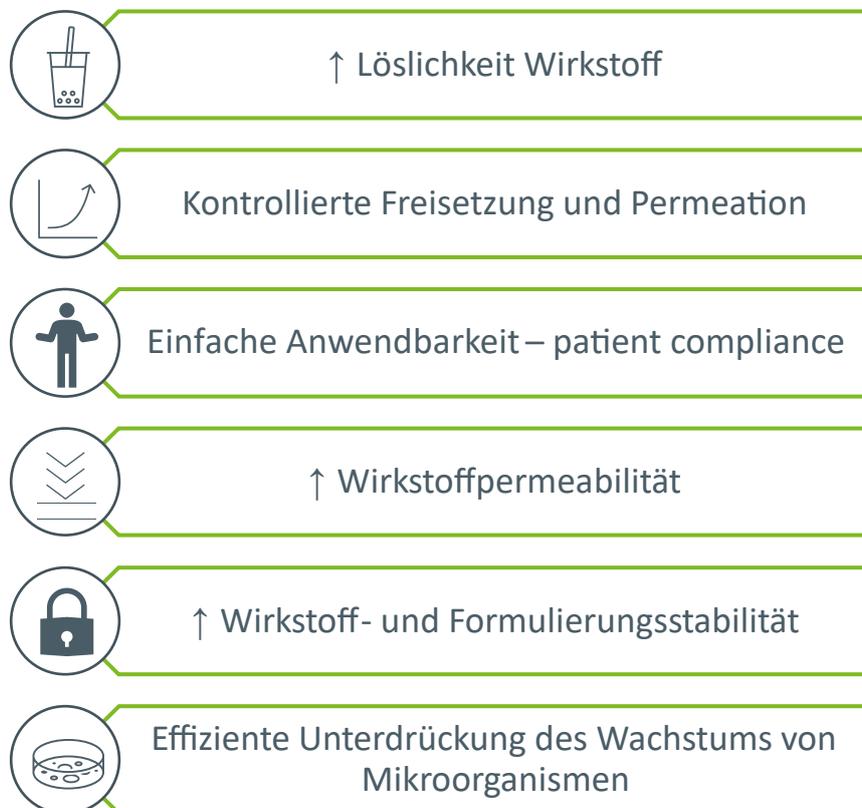


Abbildung 7: Grafische Darstellung der Anforderungen an ein Wirkstofftransportsystem, in Anlehnung an Benson und Watkinson 2011, Kapitel 14.

Wirkstoffstabilität/-integrität

Die eingesetzten Wirkstoffe, vor allem Biomoleküle unterliegen einem konstanten Angriff durch chemische, biologische und physikalische Einflüsse. Kommt es zum Ab- oder Umbau der Moleküle, so können diese ihre Eigenschaften wesentlich verändern und ihren therapeutischen Effekt oder ihre Löslichkeit verlieren bis hin zur Entwicklung toxischer Eigenschaften. Das Wirkstofftransportsystem muss über Schutzeigenschaften verfügen, die einer Modifizierung der Molekülstruktur über eine geeignete Zeitspanne, bei definierten Lagerbedingungen entgegenwirkt.

Zu den häufigsten Abbaumechanismen zählen die Hydrolyse, Oxidation, der lichtinduzierte Abbau und der biologische, enzymatische Abbau. Es kann des Weiteren zudem zu Reaktionen zwischen dem Wirkstoff und Komponenten der Formulierung kommen (Inkompatibilität) oder des Verpackungsgebundes (extractables und leachables). Bezugnehmend, auf den Einsatz von Biopharmazeutika (NBE), ist der enzymatische Angriff von Wirkstoffen von großer Bedeutung. Die biochemischen Moleküle können ohne geeignete Schutzstrategie ubiquitär vorkommenden Enzymen und Mikroorganismen als Substrat dienen und mit hoher Effizienz abgebaut werden. Strategien zur Stabilisierung eines Wirkstoffes über die Formulierung sind beispielsweise der Einsatz von Konservierungsmitteln, die Reduktion des Wassergehalts, die Justierung des pH-Wertes, die Einarbeitung des Wirkstoffs in eine ölige Phase. Die Herstellung von Systemen in denen der Wirkstoff als Nanopartikel oder -kristall vorliegt kann ebenfalls zu einer Erhöhung der Stabilität beitragen.

Zur Überprüfung der Wirkstoffstabilität in Formulierungen schreibt die ICH Guideline „ICH Topic Q 1 A (R2), Stability Testing of new Drug Substances and Products“ die Überprüfung der reinen Wirkstoffstabilität, in Kombination mit dem vorgesehenen Wirkstofftransportsystem sowie dem Verpackungsgebunde vor.

Penetrationsverstärkung

Unter der physikalischen/technischen Penetrationsverstärkung wird die Einwirkung auf die oberste Hautschicht mit Methoden wie Ultraschall, Iontophorese (Beschleunigung geladener Moleküle im elektrostatischen Feld), Laserablation oder der Einsatz von Microneedles zusammengefasst. Weniger invasiv ist dagegen der Einsatz von chemischen Penetrationsverstärkern (CPE). Diese wirken nur zeitlich begrenzt auf die oberste Hautschicht ein und deren Modulation der Lipidmembranen ist reversibel. Zur Verstärkung der Penetration werden die folgenden Optionen in Betracht gezogen:

- Flux ins *stratum corneum* wird erhöht
- die Löslichkeit des Wirkstoffs in der Formulierung wird gesteigert
- das Verteilungsgleichgewicht für den Wirkstoff zwischen Formulierung und SC-Lipiden wird in Richtung des *stratum corneums* verschoben
- oder die Schichtdicke des *stratum corneums* / der Haut wird vermindert

Diese Manipulationen, werden von den verschiedenen chemischen Penetrationsverstärkern, in unterschiedlicher Ausprägung und Kombination, ermöglicht. Die Effizienz eines Penetrationsverstärkers ist jeweils spezifisch für den Wirkstoff und setzt sich aus verschiedenen Wirkmechanismen zusammen. Williams und Barry 2012 geben einen detaillierten Überblick über diese Mechanismen:

- Der Penetrationsverstärker induziert eine Konformationsänderung oder Denaturierung von intrazellulären Keratinfilamenten, mit der Folge einer erhöhten Hydratisierung und Anschwellung des Keratins. Die Ordnung der Filamente wird gestört, wodurch die Barrierefunktion beeinträchtigt wird. Über diese geschwächte Barriere kann sich ein höherer Flux des Wirkstoffes einstellen. Dieser Mechanismus beeinflusst maßgeblich die intrazelluläre Route für den Wirkstofftransport und ist beschrieben für Dimethylsulfoxid (DMSO), ionische Tenside, Harnstoff und N-Decylmethylsulfoxid.
- Der Penetrationsverstärker nimmt Einfluss auf die Desmosomen innerhalb des *stratum corneum* und damit auf den Verbund der Corneozyten. Mit der Schwächung dieses Verbunds wird der interzelluläre Wirkstofftransport erleichtert. Die Penetrationsverstärkung kann über den Einsatz hoher Lösungsmittelkonzentrationen erreicht werden. Diese ist jedoch mit starken Hautirritationen assoziiert und daher für den therapeutischen Wirkstofftransport nicht applikabel.
- Die Anordnung der interzellulären Doppellipidmembranen wird über penetrationsverstärkende Substanzen gestört. Die Moleküle des CPEs (beispielsweise DMSO oder Laurocapram) treten in Wechselwirkung mit den polaren Kopfgruppen der Lipide über die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder ionischen Wechselwirkungen. Die

Hydrathülle der polaren Kopfgruppen sowie die geordnete Ausrichtung der Lipide wird gestört. Es kommt dadurch zu einer Fluidisierung der Lipide und der vermehrten Aufnahme von Wassermolekülen in die Lipiddoppelschicht. Der Diffusionswiderstand der Lipidmembran nimmt ab, höhere Diffusionsraten für den Wirkstoff werden erreicht. Die nach außen gerichtete polare Schicht der Doppellipidmembranen kann durch polare CPEs, wie Propylenglykol oder Ethanol, so moduliert werden, dass sich eine höhere Löslichkeit für den Wirkstoff in dieser Schicht ergibt. Das Verteilungsgleichgewicht zwischen SC und Formulierung wird dadurch stärker in Richtung des SCs verschoben. Lösungsmittelbasierende CPEs können zudem Lipide aus der Membran extrahieren und somit für Fehlstellen sorgen, welche ebenfalls einen verminderten Diffusionswiderstand ergeben.

Unpolare CPEs können die Lipidbarriere über die hydrophobe Wechselwirkung beeinflussen. Die Anlagerung an die Alkylketten der Lipide verursacht eine Störung der dicht gepackten Strukturen. Diese Störung der Ordnung führt ebenfalls zu einer Fluidisierung der Lipide in der Doppellipidmembran und somit zu einer Herabsetzung des Diffusionswiderstandes (Dragicevic und Maibach 2015).

Die Unterscheidung der CPE erfolgt anhand von deren chemischer Struktur. Die Mechanismen, über die sie eine Penetration verstärken überschneiden sich dabei häufig. Die folgenden Substanzgruppen werden für dermale Penetrationsverstärkung eingesetzt: Terpene, Azone, Fettsäuren, Alkohole, Glykole, Tenside, Sulfoxide, Ester, Glycolether, Pyrrolidone und Wasser. Bezugnehmend auf die vorliegende Arbeit wird die Substanzklasse der Glykole genauer beschrieben.

Glykole als Penetrationsverstärker

Propylenglykol (PG) wird aufgrund seiner hervorragenden Eigenschaften als Cosolvent (Benson 2011), häufig für dermale Formulierungen eingesetzt. Zur Aufklärung der Mechanismen, die der penetrationsverstärkenden Wirkung zu Grunde liegen, wurde eine Vielzahl von Studien angefertigt. Die Literatur verweist darauf, dass die Wirkungsweise von Propylenglykol nicht vollständig aufgeklärt ist, aber verschiedene Elemente der dermalen Barriere moduliert oder gestört werden. Eine Theorie ist die der thermodynamischen Aktivierung des Wirkstoffs. Nach der Applikation der Formulierung auf die Haut verdunstet oder diffundiert Propylenglykol mit einem hohen Flux ins *stratum corneum*. Die Konzentration des Wirkstoffs in der Formulierung steigt an, bei gleichzeitiger Verringerung der Löslichkeit im Vehikel, bis zur Übersättigung. Dadurch ändert sich der thermodynamische Zustand für den Wirkstoff in der Formulierung. Der Zustand wird als „aktiviert“ bezeichnet und unterstützt als eine Art Antriebskraft die Penetration aus der Formulierung ins SC (push-Effekt (Williams und Barry 2012)). Ein weiterer in der Literatur beschriebener Mechanismus ist der sogenannte „drag effect“. Diesem liegt die Theorie zugrunde, dass die schnelle Diffusion der PG-Moleküle (carrier solvent)

Wirkstoffmoleküle mitschleppt. Dieser Ansatz wird mit Beobachtungen begründet, in denen die Wirkstoffmoleküle Cinnamaldehyd und Propylenglykol eine vergleichbare Kinetik hinsichtlich der Eindringtiefe in die Haut aufweisen konnten (Hoelgaard und Møllgaard 1985; Bonnist et al. 2011). Neben diesen indirekten penetrationsfördernden Eigenschaften induziert PG direkte Effekte an den Lipiddoppelmembranen im *stratum corneum*. Es kommt zu Wechselwirkungen mit den polaren Kopfgruppen der Lipide, wodurch die Löslichkeit für den Wirkstoff in SC erhöht wird. Des Weiteren wird die Anordnung der polaren Kopfgruppen gestört und darüber die Barrierefunktion der Doppelmembran geschwächt (Dragicevic und Maibach 2015). Neben Propylenglykol werden für pharmazeutische Formulierungen außerdem Butylenglykol (BG) oder Pentylenglykol (PenG) eingesetzt (Johnson et al. 2012; European Medicines Agency 2017; Steiner et al. 2017).

1.6 Dermales Wirkstofftransportsystem für DNAzyme

1.6.1 Etablierte Wirkstofftransportsysteme für therapeutische DNA

Grundsätzlich eignet sich der Transport von DNA oder RNA in eine vitale Zelle zur Modifikation von deren Eigenschaften oder zur Therapie krankhafter Expressionsmuster verschiedener Gene. Die Transportstrategien werden in viral und nicht-viral unterschieden. In dieser Arbeit wird, der nicht-virale Transport von DNA, genauer betrachtet. Das DNAzym nimmt innerhalb der Zelle die enzymatische Spaltung von spezifischer mRNA vor. Es muss somit nicht in endogene DNA oder RNA eingebaut werden. Ein nicht-virales System ist zudem für die gewählte, dermale Applikation geeigneter.

Für den Transport und vor allem für die Transfektion von Zellen durch DNA-basierte Wirkstoffe sind in der Literatur bereits verschiedenste halb feste Systeme zu dermalen Applikation diskutiert worden, wie Emulsionen, Micro- und Nanoemulsionen oder Liposomen (Beer, Schmidts, Cevic 2010). In der Transfektion von kultivierten Zellen werden oft Nanocarrier (nanopartikuläre Transportsysteme) eingesetzt, um Fremd-DNA über die Zellmembran schleusen zu können. Grundlage dieser Technologie ist die Abschirmung der Mehrfachladung des Phosphatrückgrates des DNA-Oligonukleotids. Das reine DNAzym verfügt in Lösung und je nach pH-Wert über ein komplett negativ geladenes Phosphatrückgrat und ist somit nicht fähig die Lipiddoppelschicht der Zellmembran überwinden zu können.

Eine häufig untersuchte Technologie für den nicht-viralen Transport von therapeutischer DNA ist die Herstellung von Liposomen. Liposomen bestehen aus Lipiddoppel- oder Mehrfachschichten, welche sich häufig aus verschiedenen Phospholipiden zusammensetzen. Diese bilden Vesikel mit einem Durchmesser von bis zu 300 nm. Die Lipidmembran umschließt ein Volumen, indem der Wirkstoff zum Transport eingebracht ist. Der in Liposomen eingeschlossene Wirkstoff wird bei dermalen Applikation

zu einem Großteil im *stratum corneum* freigesetzt. Ein möglicher Mechanismus beschreibt die Liberation wie folgt: Das Liposom penetriert in das *stratum corneum*, bis die Lipide der Liposomenmembran mit den Lipiden des *stratum corneums* fusionieren (Brown und Williams 2019). An diesem Punkt wird der Wirkstoff freigesetzt, jedoch werden tiefere, viable Hautschichten meist nicht erreicht. Die Kapazität der Liposomen für das Einschließen des Wirkstoffes ist eine weitere Limitierung, neben der Beobachtung von zytotoxischen Effekten durch Liposome. Die kationischen Lipide der Liposome führen intrazellulär häufig zu einer Permeabilisierung der Lysosomenmembran, darüber zu einer Funktionsstörung der Zellorganellen, welche über verschiedene Mechanismen den Zelltod einleiten kann (Yang et al. 2016).

Bindet das Molekül an ein Gegenion, so entsteht ein ungeladener Komplex. Der Komplex aus einem mehrfach geladenen DNA-Molekül (Polyanion) in Verbindung mit einem entgegengesetzt geladenen Polykation wird als Polyplex bezeichnet. Die folgenden Substanzklassen werden derzeit in der Erforschung effizienter Transfektionsmöglichkeiten angewendet: Kationische Lipide (1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium propane (DOTAP), *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium chloride (DOTMA)) sowie kationische Polymere (Polyethylenimin, Chitosan, Polylysin, Chitosan (Poly-D-Glucosamin) oder Dextran-spermine (D-SPM)).

Für die Herstellung von Polyplexen zur Transfektion von Zellkultursystemen wird häufig Polyethylenimin (PEI) eingesetzt. Dieses Polymer ermöglicht eine sehr effiziente Transfektionen, jedoch wirkt es zytotoxisch. Auch andere Polykationen, welche eine hohe Transfektionseffizienz besitzen, weisen starke bis mäßige zytotoxische Eigenschaften auf, wie hochmolekulare Poly-L-Lysine. Für den Einsatz in einem dermalen Wirkstofftransportsystem für Therapien über längere Zeiträume sind diese Polymere daher ungeeignet.

1.6.2 Chitosan

Das ubiquitär vorkommende, kationische Polymer Chitosan, ist in den letzten Jahrzehnten vermehrt in den Vordergrund der Erforschung von DNA-Transportstrategien gerückt. In den Jahren 2010-2020 sind in der PubMed Datenbank 24.517 Veröffentlichungen zu Chitosan registriert worden (Stand 18.11.2020). Das hohe Interesse in der Erforschung des Polyglucosamins begründet sich, neben der hohen Materialverfügbarkeit, in der geringen Toxizität.

Chitosan ist die deacetylierte Form von Chitin (Deacetylierungsgrad > 50%) und setzt sich aus β -1,4-verknüpften D-Glucosamin- und N-acetyl-D-glucosamin-Untereinheiten zusammen. Seine physikochemischen Eigenschaften sind dabei stark abhängig vom mittleren Molekulargewicht (10-1000 kDa) sowie dem Deacetylierungsgrad (50-95%). Der Deacetylierungsgrad (DD) bestimmt zudem den pKa-Wert von Chitosan, welcher in einem Bereich von 6.3 - 7.0 liegt. Die Lösung des Polymers in Wasser ist über eine Ansäuerung möglich. Bei pH-Werten > 6.0 fällt das Polymer hingegen wieder aus. In Abbildung 8 sind die deacetylierten Positionen im Polymerstrang zu sehen, die bei einem pH-Wert < 6.0 in geladener Form vorliegen. Auf diesen Ladungen basiert die Wasserlöslichkeit des Polymers. In der Literatur sind Modifizierungen des Polymers, zur Optimierung der Wasserlöslichkeit und Transfektionseffizienz, beschrieben worden. Ein Vertreter ist das Derivat Chitosan-Oligosaccharidlactat (COS), mit guten Eigenschaften hinsichtlich der Wasserlöslichkeit (Kumar et al. 2004).

Die physikochemische Charakterisierung von Chitosan ist überaus anspruchsvoll, da es sich um ein Gemisch des Polymers aus unterschiedlichen Kettenlängen handelt. Je nach Heterogenität der Kettenlängen und der Verteilung der Deacetylierungsstellen können die physikochemischen Eigenschaften schwanken. Damit ändert sich auch die Toxizität und Wirkstofftransporteigenschaften je nach Stichprobe aus dem Gemisch (Dutta 2016; Sogias et al. 2010; Visakh et al. 2014).

Der Einsatz als pharmazeutischer Hilfsstoff im regulierten Umfeld ist aufgrund dieser schwierigen Charakterisierung herausfordernd. Die herausragenden Eigenschaften von Chitosan in Bezug auf die Formulierungsentwicklung gleichen den Nachteil der schwierigen Charakterisierung allerdings aus. Wie bereits erwähnt, weist das kationische Polymer eine geringe Toxizität auf (Kean und Thanou 2010). Die Transfektion von Zellen mit therapeutischer DNA/RNA ist über die Bindung an Chitosan möglich. Das Polymer hat die Fähigkeit die Viskosität der Formulierung zu erhöhen (Verdickungsmittel) und wirkt gleichzeitig antibakteriell und antifungal (Rabea et al. 2003). Diese Eigenschaft wird derzeit bereits für die Konservierung von Lebensmitteln genutzt. Eine weitere Eigenschaft ist die Mucoadhäsion, welche die Wirkstoffadministration über Schleimhäute ermöglichen kann (Illum et al. 1994).

Bis heute ist weder von der FDA noch von der EMA, ein Arzneimittel mit Chitosan als Hilfsstoff zugelassen worden. Aktuell befinden sich allerdings einige Arzneimittelformulierungen mit Chitosan in klinischen Studien (22 Studien insgesamt, Recruiting, Active not recruiting, not yet recruiting, Stand 19.11.2020, www.clinicaltrials.gov).

Im Gegensatz zu einigen synthetischen Polymeren, die nicht abbaubar sind und im Körper akkumulieren (PEG), können die meisten Organismen Chitosan verstoffwechseln (Verhoef und Anchordoquy 2013). Kean 2009 geben in ihrem Review einen umfangreichen Überblick über den Metabolismus von Chitosan. Der Abbau kann unspezifisch über die saure Hydrolyse oder Oxidation erfolgen, sowie über verschiedene Enzyme. Neben Lysozym welches die β 1,4-glykosidische Bindung in Chitosan hydrolytisch aufspaltet, können spezifische Chitinasen im menschlichen Körper Chitosan metabolisieren. Von den bekannten Chitinasen können drei aktiv Chitosan abbauen. Zu ihnen zählt: di-N-acetylchitobiase (lysosomaler Abbau von Glykoproteinen), Chitotriosidase (exprimiert von aktivierten Makrophagen) und die AMCCase (acidic mammalian chitinase), welche verbreitet im Gastro-Intestinal-Trakt und in Lungengewebe vorkommt (Funkhouser und Aronson 2007). Über den unspezifischen und spezifischen Abbau des Polymers werden Oligosaccharide produziert, deren Molekulargewicht eine renale Eliminierung erlaubt. Daten zur *in vitro*-Toxizität von Chitosan an verschiedenen Zelllinien zeigen, dass verschiedene Chitosane (Salzformen und Derivate) in hohen Konzentrationen toleriert werden. Die Toxizität ist allerdings abhängig von der eingesetzten Salzform, dem Deacetylierungsgrad und dem molekularen Gewicht (Kean und Thanou 2010).

1.6.3 Chitosan in der dermalen Formulierung

Chitosan als Gelbildner - Hydrogele

Das Polysaccharid Chitosan kann als Grundlage für die Herstellung von Hydrogelen verwendet werden. Die Polymerketten müssen zu diesem Zweck miteinander chemisch oder physikalisch quervernetzt werden, um die für Hydrogele charakteristische innere Struktur aufzubauen. Diese innere Struktur, oft als Netz oder Gewebe beschrieben, ist dazu fähig Wassermoleküle zu absorbieren. Sie schwellen dabei an, jedoch lösen die Polymerstrukturen sich dabei nicht auf. Ein Hydrogel definiert sich über die Eigenschaften des Wasseraufnahmevermögens, der Geschwindigkeit der Wasseraufnahme und der Stabilität des Polymernetzwerkes (rheologisches Verhalten) (Peers et al. 2020; Knapczyk 1993).

Zur chemischen Quervernetzung werden häufig kovalente Bindungen zwischen den freien Ammoniumresten der Polymerkette gebildet. Für die Vernetzung werden daher zwei reaktive Gruppen benötigt. Es eignen sich somit für die Reaktion vor allem Dialdehyde, die sich mit den Ammoniumresten des Polymers vernetzen. In der Literatur sind viele Verfahren beschrieben,

beispielsweise die Quervernetzung über die Crosslinker Glutaraldehyd, Oxalaldehyd oder Formaldehyd (Berger et al. 2004). Die Anwendbarkeit dieser Crosslinker in der Arzneimittelformulierung wird allerdings kritisch eingeschätzt (Peers et al. 2020). Verbleiben Rückstände der Substanzen nach der Quervernetzung im Hydrogel, so können diese toxische Effekte verursachen (Berger et al. 2004). Eine alternative Substanz zur Quervernetzung ist Genipin, ein Metabolit, der sich aus dem pflanzlichen Terpen Geniposid ableitet. Verschiedene Studien, zusammengefasst von Muzzarelli et al. 2016, weisen darauf hin, dass eine geringe Toxizität von Genipin ausgeht (Liu und Wang 2017; Lai et al. 2010). Die physikochemischen Eigenschaften der chemischen vernetzten Chitosanhydrogele lassen sich über den Crosslinker, sowie dessen Einsatzkonzentration steuern. Um das physikochemische Verhalten weiter steuern zu können, werden häufig Mischungen aus Chitosan mit anderen Biopolymeren (Hyaluronsäure, Gelatine oder Collagen) quervernetzt und Hydrogele hergestellt, die pH- oder temperatursensitiv reagieren. Neben der chemischen Quervernetzung kann auch über physikalische Methoden eine Vernetzung der Polymerstränge hergestellt werden (Berger et al. 2004).

Die physikalische Vernetzung des Chitosanpolymers ist aufgrund der Mehrfachladung des Polymerrückgrates (Polykation) in saurer Umgebung möglich. Es kommt über ionische Wechselwirkungen zwischen Chitosan und einem negativ geladenen Molekül oder Polymer zur Vernetzung, Abbildung 8. Die Stärke des Polymernetzwerkes ist auch hier abhängig vom Crosslinker. Über den Einsatz von Metallionen (Mo(VI), Pt(II)) lassen sich beispielsweise stärkere Verbindungen im Netzwerk aufbauen als über den Einsatz von anionischen Molekülen (Triphosphosphate) oder Polymeren (Berger et al. 2004; Racine et al. 2017). Die Ausbildung ionischer Bindungen zwischen Chitosan und Crosslinker kann zu Folge haben, dass die elektrostatische Repulsion der Ammoniumgruppen neutralisiert wird und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Chitosan und der Quervernetzungsreagenz zusätzlich die Hydrogelstärke beeinflussen (Ruel-Gariépy et al. 2000; Berger et al. 2004). Die Bildung von Polyelektrolytkomplexen (Polyplex) ist je nach Quervernetzer, Konzentration und Herstellungstechnik ebenfalls möglich.

Chitosanbasierte Polyelektrolytkomplexe - Polyplexe

Polyelektrolytkomplexe, kurz Polyplexe, entstehen unter definierten Mischungsverhältnissen von Polykationen und Polyanionen. Es kommt zu einer Kompaktierung der Polymerketten aufgrund der Neutralisation der Mehrfachladungen. Diese Kompaktierung führt zur Bildung von nanopartikulären Strukturen unterschiedlicher Geometrien. Die spontane Bildung der Polyplexe unterliegt verschiedenen thermodynamischen Prozessen, welche bis heute nicht abschließend aufgeklärt sind. Ein Ansatz ist die Entropiezunahme des Systems während der Polyplexbildung, aufgrund der Freisetzung von Gegenionen. Dieser Vorgang verringert die freie Energie des Reaktionssystems (Kronberg et al. 2014). Die Entropiezunahme ist vor allem als Hauptantriebskraft zu sehen in der Bildung von Polyplexen aus stark geladenen (völlig dissoziierten) Polymeren. Rathee et al. 2018 beschreiben in ihrer Arbeit unter welchen Voraussetzungen der Anteil der Enthalpie zusätzlich zur Beschreibung der freien Energie zu betrachten ist. Weiterführend haben Ma et al. 2009 sich in ihrer Arbeit auf die Beschreibung der Enthalpie für die Polyelektrolytkomplexbildung fokussiert.

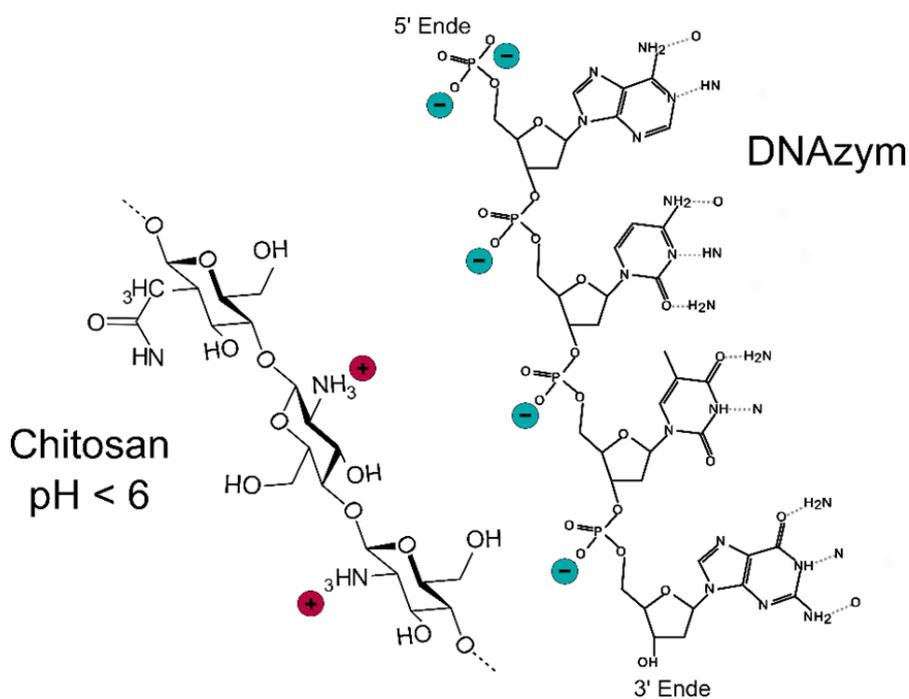


Abbildung 8: Polyplexbildung zwischen Polykation (Chitosan) und Polyanion (DNAzym)

Neben der Kettenlänge der Ausgangsmoleküle, beeinflusst besonders deren Ladungsdichte die Stärke des Polyplexes (Ma et al. 2009). Chitosan, als Polykation mit steuerbarer Ladungsdichte (variabler Deacetylierungsgrad), ist für die nicht-virale Transfektion von Plasmiden oder siRNA, von besonderem Interesse. Dies begründet sich vor allem in der Biokompatibilität des Polymers. Strand et al. 2009 beschreiben in ihrer Arbeit umfangreich den Zusammenhang zwischen Deacetylierungsgrad und dem Grad der Polymerisierung des Chitosans auf die Polyplexstärke. Diese muss für eine effektive Transfektion ausreichen, um die DNA im extrazellulären Raum vor Abbau schützen zu können und über die Zellmembran transportieren zu können. Intrazellulär muss der Polyplex allerdings dissoziieren und die zu transportierende DNA/RNA freisetzen. Zur Beschreibung der Polyplexe wird das Stickstoff zu Phosphat-Verhältnis (kurz N/P-Verhältnis) herangezogen. Dieses wird zusammen mit der Polymerkettenlänge, ausgedrückt als Molekulargewicht (M_w) oder dem Grad der Polymerisierung (DP) betrachtet. Die Autoren haben für die Transfektion von HEK293 (Human Embryonic Kidney) Zellen mit verschiedenen Reporterplasmiden (~6.7 kbp) optimale N/P-Verhältnisse zusammen mit optimalen Polymerisierungsgraden ermittelt. Des Weiteren wurde der Einsatz von ungeladenen Oligosacchariden untersucht, welche sterisch die Bindung von Chitosan und DNA hindern, mit dem Ziel die Freisetzung der DNA in der Zielzelle zu erhöhen. Eine Erhöhung der Transfektionseffizienz über den Einsatz der Oligosaccharide konnte berichtet werden und gilt für Chitosan mit hohem Molekulargewicht, dessen Polyplexstärke andernfalls zu hoch für die intrazelluläre Freisetzung der DNA/RNA wäre. Danielsen et al. 2005b untersuchten grundlegend den Zusammenhang zwischen: eingesetzter Chitosankonzentration, sowie den N/P-Verhältnissen zur Polyplexbildung mit Plasmiden (~4 kbp) und linearer Kalbsthymus-DNA (M_w 10–15·10⁶g/mol) und Polyplexstabilität. Die Veröffentlichung beschreibt umfangreich, dass die Polyplexstabilität maßgeblich vom N/P-Verhältnis abhängig ist und ansteigt mit dem Einsatz größerer Kettenlänge des Chitosanpolymers. Auch hier weisen die Autoren drauf hin, dass ein Gleichgewicht zwischen Polyplexstabilität und Dissoziationsvermögen für eine effektive Transfektion bestehen muss.

Chitosan als Penetrationsverstärker

Chitosan kann die Penetration von Wirkstoffmolekülen verstärken. Erste Beobachtungen zur Penetrationsförderung wurden, Anfang der 1990er Jahre, für nasale Schleimhaut und Caco-Zellsysteme gemacht. (Artursson et al. 1994; Illum et al. 1994; Schipper et al. 1996; Smith et al. 2004). Ersten Absorptionsstudien von C14-makiertem Mannitol auf Caco-2 Zellkulturen (Artursson et al. 1994), folgten *in vivo*-Absorptionsstudien zur nasalen Aufnahme von Insulin, die eine Penetrationsförderung belegen konnten. Die zu Grunde liegenden Mechanismen wurden später aufgeklärt und in der Literatur mehrfach beschrieben. Schipper et al. 1997 konnten die Bindung von Chitosan an die Oberfläche von Caco-2 Zellsystemen beschreiben. Sie zeigten zudem eine Umlagerung von zytoskelett-assoziiertem F-Aktin und Zonula Occludens-1 (ZO-1), einem Protein der Tight Junctions

(Abbildung 6). Weiterführende Studien von Smith et al. 2004 zeigten die Translokation von ZO-1 und Occludin. Die Verringerung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) durch Chitosan in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration konnte ebenfalls in Smiths Arbeit gezeigt werden. Eine Umlagerung von F-Aktin konnte allerdings nicht bestätigt werden. Die chitosaninduzierte Störung der Tight junctions ist, laut der Autoren, maßgeblich auf die Translokalisierung von ZO-1 und Occludin zurückzuführen. Diese Ergebnisse konnten Smith et al. 2005 bestätigen und zusätzlich zeigen, dass das Enzym Proteinkinase C in den Prozess der Verminderung des TEER eingebunden ist. Vllasaliu et al. 2010 zeigten die Störung von Tight Junctions über Chitosannanopartikel an bronchialen Epithelzellen (Calu-3). Über den Einsatz von Chitosanlösungen und -nanopartikeln konnte die Permeation von Fluorescein-isothiocyanat markierten Dextranen (FITC-Dextran) mit 4 kDa und 10 kDa signifikant erhöht werden. Rosenthal et al. 2012 erklären die Erhöhung der Permeabilität von HT-29/B6 Zellen durch Chitosan über die Aktivierung des Anionen-Austauscher 1 (AE1) Proteins. Über die Aktivierung kommt es zu einer intrazellulären Verschiebung des pH-Wertes und zu einer Verminderung des transzellulären und parazellulären Transportwiderstands. Aus der Literatur geht hervor, dass Chitosan als Penetrationsverstärker großes Potential für das Formulierungsdesign von großen Biomolekülen zeigt.

1.7 Zielsetzung

Auf Biomolekülen basierende Arzneimittel benötigen protektive und effiziente Wirkstofftransportsysteme. Die Erforschung der dermalen Applikation von DNAzymen ist grundlegend das Ziel der vorliegenden Arbeit. Therapeutische Oligonukleotide unterliegen in der systemischen Administration einem schnellen Abbau durch Nukleasen und einer sehr schnellen renalen Clearance. Die topische Administration soll diesen Nachteil umgehen, um hohe Einsatzkonzentration am Wirkort zu erreichen. Der Abbau des DNAzyms durch Nukleasen auf und in der Haut sollte durch das Wirkstofftransportsystem verhindert werden und effiziente, verbesserte Methoden zur Überprüfung dieser angewendet werden. Das polykationische Biopolymer Chitosan wurde in dieser Arbeit zur Herstellung von kompakten Chitosan / DNAzym Nanopartikeln verwendet. Gleichzeitig wurde auch der Einsatz von Chitosan als äußere Matrix der halbfesten Formulierung untersucht. Im Hinblick auf die Anwendbarkeit der Arzneimittelformulierung sollten anschließend die physikochemischen Eigenschaften des Systems untersucht werden und mögliche Optimierungsansätze identifiziert werden. Abschließend wurden dafür der Transport des Wirkstoffes in ein Vollhautmodell und die Transfektion in Hautzellen erforscht, bei gleichzeitiger Beobachtung zytotoxischer Effekte auf Hautzellkulturen.

2 Methoden

2.1 Fluoreszenzassay zur Beschreibung der Polyplexbildung

Diese Methode ist grundlegend für die vorliegende Arbeit entwickelt worden. Der Entwicklungsprozess wird im Ergebnis- und Diskussionsabschnitt beschrieben. Die finale Methode basiert auf dem Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs Maxilon Brilliant Flavine 10GFF (GFF). Es wurden wässrige Dz13 Standards (0-500 µg/mL) über Verdünnung der Stammlösung (1 mg/mL in Reinstwasser) mit Triethylammoniumacetat (TEAA)-Puffer (10 mM, pH 5,0) hergestellt und eingesetzt. Zu den Kalibrierstandards wurden 10 µL GFF (0,1 mg/mL) in eine weiße Mikrotiterplatte vorgelegt und 90 µL Dz13-Standard (in 100 mM TEAA-Puffer, pH 5,0 mit 1 mM MgCl₂) hinzugegeben. Die Platte wurde nach dem Protokoll in Tabelle 1 im Microplate Reader Synergy HTX (BioTek) vermessen:

Tabelle 1: Messprotokoll Fluoreszenzassay Maxilon Brilliant Flavine 10GFF, Synergy HTX Microplate Reader

<u>Procedure Details</u>	
Plate Type	96 WELL PLATE
Eject plate on completion	
Set Temperature	Setpoint 25°C, Gradient 0 °C
	Preheat before moving to next step
Shake	Orbital: 1:00 (MM:SS)
	Frequency: 365 cpm (2 mm)
Read	Fluorescence Endpoint
	Random
	Filter Set 1
	Excitation: 485/20, Emission: 528/20
	Optics: Top, Gain: 55
	Light Source: Tungsten, Extended Dynamic Range
	Read Speed: Normal, Delay: 100 msec, Measurements/Data
	Point: 10
	Read Height: 1 mm

Nachdem der lineare Bereich für den Farbstoff 10GFF auf 2,5 - 125 µg/mL DNAzym festgelegt wurde, konnten DNAzym-Chitosan-Polyplexe verschiedener N/P-Verhältnisse getestet werden. Dazu wurde eine Dz13 Stammlösung von 200 µg/mL eingesetzt und Chitosanlösungen von 5-500 µg/mL im Volumenverhältnis 1:1 gemischt und 90 µL der resultierenden Polyplexsuspension mit 10 µL Farbstofflösung 10GFF (0,1 mg/mL) versetzt. Die Chitosanformen, Chitopharm S, Chitosan XS, Chitosan-Oligosaccharidlactat und Polyethylenimin wurden als Komplexbilder in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, der nicht gebundene Anteil DNAzym über das Fluoreszenzsignal detektiert und über die mitgeführte Kalibrierfunktion quantifiziert. Jedes Polykation wurde in drei unabhängigen Versuchen (n=3) in Doppelbestimmung getestet. Die Dekomplexierung wurde wie folgt untersucht:

Es wurden 100 µL Probe (90 µL Polyplexsuspension + 10 µL GFF (0,1 mg/mL)) mit 10 µL Lithiumheparin (Li-Heparin, 10 mg/mL in 100 mM TEAA-Puffer pH 5,0 mit 1mM MgCl₂) versetzt und nach dem folgenden Protokoll prozessiert:

Tabelle 2: Messprotokoll Fluoreszenzassay mit Maxilon Brilliant Flavine 10GFF und Dekomplexierung mit Li-Heparin, Synergy HTX Microplate Reader

Procedure Details	
Plate Type	96 WELL PLATE
Eject plate on completion	
Set Temperature	Setpoint 25°C, Gradient 0 °C Preheat before moving to next step
Shake	Orbital: 1:00 (MM:SS) Frequency: 365 cpm (2 mm)
Read	Fluorescence Endpoint Random Filter Set 1 Excitation: 485/20, Emission: 528/20 Optics: Top, Gain: 55 Light Source: Tungsten, Extended Dynamic Range Read Speed: Normal, Delay: 100 msec, Measurements/Data Point: 10 Read Height: 1 mm
Plate Out/In	Heparin hinzufügen
Shake	Linear: 1:00 (MM:SS) Frequency: 567 cpm (3 mm)
Read	Fluorescence Endpoint Random Filter Set 1 Excitation: 485/20, Emission: 528/20 Optics: Top, Gain: 55 Light Source: Tungsten, Extended Dynamic Range Read Speed: Normal, Delay: 100 msec, Measurements/Data Point: 10 Read Height: 1 mm
Delay	0:20:00 (HH:MM:SS)
Shake	Linear: 1:00 (MM:SS) Frequency: 567 cpm (3 mm)
Read	Fluorescence Endpoint Random Filter Set 1 Excitation: 485/20, Emission: 528/20 Optics: Top, Gain: 55 Light Source: Tungsten, Extended Dynamic Range Read Speed: Normal, Delay: 100 msec, Measurements/Data Point: 10 Read Height: 1 mm

2.2 Entwicklung und Herstellung Galenik – Hydrogel

Zur Entwicklung eines Wirkstofftransportsystems für DNAzyme auf Basis des Chitosanpolymers wurden zunächst Polymere verschiedener Hersteller, mit diversen Molekülgrößenverteilungen und Deacetylierungsgraden, eingesetzt. Der Gehalt von Milchsäure im Formulierungsansatz ist dabei für die Lösung des Chitosans essenziell und wurde zur Ermittlung des Optimums variiert. Chitosanpolymere bei denen unlösliche Rückstände im Hydrogel verblieben (visuelle Kontrolle) wurden von der weiteren Entwicklung ausgeschlossen.

Mit der finalen Rezeptur wurden Chitosanhydrogele mit den Polymeren Chitopharm S, Chitopharm M und Chitopharm L hergestellt, Tabelle 3. Zunächst wurde eine homogene Suspension aus Chitosan, Wasser und DNAzymlösung hergestellt und die Polymerpartikel bei 1000 rpm mit einem Magnetrührer in Schwebelage gehalten. Anschließend wurde die verdünnte Milchsäure (4,3 %) der Suspension hinzugefügt, sowie die Glykole Propylenglykol (Propan-1,2-diol, PG), Butylenglykol (Butan-1,3-diol, BG) oder Pentylenglykol (Pentan-1,2-diol, PenG) und das Hydrogel 10 Minuten bei 1000 rpm homogenisiert. Zur Sicherstellung der Homogenität und vollständigen Einstellungen von Konzentrationsgleichgewichten wurden die Testformulierungen erst 24 Stunden nach ihrer Herstellung charakterisiert. Die Formulierungen wurden auf ihre Partikelgrößenverteilung (2.3.1) in Abhängigkeit zum mittleren Molekulargewicht des Chitosans untersucht.

Tabelle 3: Zusammensetzung Hydrogelformulierungen

	Massenanteil			
Chitosan S / M / L	2 %			
Glykol	-	PG 20 %	BG 10 %	Pen G 5 %
H ₂ O reinst	37 %	17 %	27 %	32 %
(S)-Milchsäure 4,3 %	21 %			
DNAzym Dz13 0,5 mg/mL	40 %			

2.3 Physikochemische Untersuchungen

Die physikochemische Charakterisierung des Wirkstofftransportsystems erfolgte über die Bestimmung folgender Eigenschaften: Rheologisches Fließverhalten und pH-Wert des Hydrogels, sowie der Partikelgrößenverteilung der Polyplexe innerhalb der Gelmatrix. Änderungen der Messergebnisse dieser Parameter über die Zeit können Hinweise auf Instabilitäten des Wirkstofftransportsystems und des Wirkstoffes geben. Die Parameter wurden daher jeweils 24 Stunden nach der Herstellung erfasst und nach verschiedenen temperatur- und luftfeuchtereulierten Lagerperioden.

2.3.1 Partikelgrößenverteilung über Bilddatenanalyse – CLSM

Standardisierte Verfahren zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung über dynamische oder statische Lichtstreuung konnten aufgrund der vergleichsweise hohen Viskosität (Chitosan L Hydrogele) keine zuverlässigen Messungen erzielen. Die Partikelgrößenverteilung wurde über die Auswertung von Mikroskopiebilddaten realisiert. Es wurden Hydrogele nach dem Verfahren in 2.2 hergestellt wobei 5% des DNAzym-Anteils durch fluoreszenzmarkiertes DNAzym (Dz13-ATTO-520) ersetzt wurden. Die Vermessung der Proben erfolgte 24 Stunden nach der Herstellung, um die Homogenität der Proben zu gewährleisten. Zudem sollte der Polyplexbildungsprozess vollständig abgeschlossen sein. Von jedem Hydrogelansatz wurden jeweils zwei Proben gezogen und dünne Gelschichten auf Objektträger ausgestrichen. Von jeder dieser Proben wurden 3 Bilder mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (confocal laser scanning microscopy, CLSM) aufgenommen. Das folgende System und die angegebenen Parameter wurden zur Aufnahme der Bilder verwendet: Leica, TCS SP 5; Objektiv: HCX PL APO CS 63.0x1.20 water, UV; Anregung: Laser Argon, power 29 %, AOTF 514 nm 9.00 %.; Emissionsbandbreite: 529 nm-605 nm; Gain PMT 2 (HV): 827 V. Aus den Bilddaten wurden anschließend softwareunterstützt die Partikeldurchmesser ermittelt (Image J 1.51w, NIH mit Bio-Formats Plugin 5.2.3., Open Microscopy Environment). Dazu wurde der Schwellenwert (Threshold) auf 25 gesetzt und anschließend das Rauschen entfernt (Remove Outliers, Radius: 2 Pixel, Threshold: 50). Anschließend wurde das „Analyze Particle“-Tool verwendet, um die Partikelflächen und somit deren Durchmesser zu ermitteln (Size micron²: 20-infinity, pixel units, Circularity: 0,00-1,00). Die Statistik zur Partikelgrößenverteilung wurde mit Graph Pad Prism 5 angefertigt. Partikelgrößen unterhalb der Auflösungsgrenze, definiert über die Wellenlänge und numerische Apertur (NA) des Objektivs, können nicht angegeben werden und sind von der Darstellung der Verteilung ausgeschlossen worden. Die Auflösungsgrenze bei 514 nm und NA=1,20 liegt bei d=261,3 nm und berechnet sich wie folgt:

$$\text{Auflösung } d = \frac{0,61 \cdot \text{Wellenlänge } \lambda}{\text{Numerische Apertur (NA)}} \quad \text{Formel 4}$$

2.3.2 Bestimmung des pH-Wertes der Hydrogelformulierung

Die Änderung des pH-Wertes über die Zeitspanne der Stabilitätsuntersuchung kann auf mögliche Instabilitäten hinweisen. Der pH-Wert aller Hydrogelproben (n=3 Herstellungsansätze) wurde 24 Stunden nach Herstellung ($t_0=24$ Stunden) und zu den Zeitpunkten $t_1=7$ Tage, $t_2= 1$ Monat $t_3= 2$ Monate gemessen, unter Einsatz einer speziellen Messelektrode für viskose Medien (Mettler-Toledo, InLab Viscous Pro-ISM). Die Hydrogelproben wurden kontrolliert bei 25 °C und 60 % RH eingelagert (Binder, KBF115). Die Daten zu diesem Versuchsaufbau wurden durch Frau Lisa Rühl erhoben.

2.3.3 Rheologische Untersuchungen

Das Fließverhalten kann eine Vorhersage über die Stabilität der halbfesten Galenik ermöglichen. Zudem können Instabilitäten über die Zeit der Lagerung über Abweichungen zur ursprünglichen Fließkurve nachgewiesen werden. Für diese Untersuchung wurden Chitosanhydrogele mit den Polymeren Chitosan S und Chitosan L in Kombination mit verschiedenen Konservierungsmitteln hergestellt, siehe Tabelle 3. Die jeweiligen Formulierungen wurden in drei Chargen angesetzt, um Abweichungen im Herstellungsprozess abbilden zu können. Es erfolgte die Aufnahme der Fließkurve $t= 0$ und 24 Stunden nach Herstellung der Gele, um eine vollständige Lösung der Polymere und Ausbildung der inneren Struktur gewährleisten zu können. Anschließend an die Lagerung der Formulierungen bei 25 °C und 60 % relativer Luftfeuchte (RH) sowie bei 40 °C und 75 % RH wurden die Fließkurven nach 7 Tagen, einem Monat und zwei Monaten erneut bestimmt (Anton Paar, MCR 102). Dazu wurde ein Kegel-Platte Messsystem eingesetzt (Durchmesser 40 mm, Anton Paar, CP 40-1) und die Fließkurve im Scherratenbereich von $\dot{\gamma} = 1-500 \text{ s}^{-1}$ aufgenommen, über einen Messzeitraum von 135 Sekunden. Jede Formulationscharge (n=3) wurde einmal vermessen und deren mittlere Fließkurve zur Auswertung herangezogen. Die Nullviskosität wurde anschließend über die Carreau-Yasuda Regression berechnet.

2.3.4 Konservierungsmittelbelastungstest KBT

Wirkstofftransportsysteme müssen eine spezifische Resistenz gegen die Ausbreitung mikrobieller Verunreinigungen aufweisen. Der Nachweis wird durch den Eintrag verschiedener Testmikroben und Inkubationen über definierte Zeiträume erbracht, gemäß der Europäischen Pharmakopöe 2017 (5.1.3 Prüfung auf ausreichende antimikrobielle Konservierung, Kriterium A, siehe Tabelle 4). Die Hydrogele wurden mit den folgenden Teststämmen inokuliert: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Candida albicans* (ATCC 10231) und *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Das Wachstum der Bakterien in den Testformulierungen wurde nach 2 Tagen und 7 Tagen durch eine Keimzahlbestimmung über serielle Verdünnung überprüft. Die Keimzahlbestimmung für *Candida albicans* und *Aspergillus brasiliensis* erfolgen nach 7 Tagen. Nach einer Versuchsdauer von 28 Tagen wurde abschließend überprüft, ob die Keimzahl im Testmedium angestiegen ist, im Vergleich zur vorhergehenden Messung. Die Testformulierungen wurden in den Laboren der THM, wie in Abschnitt 2.2 beschreiben, hergestellt und die mikrobiologische Versuchsdurchführung durch das Institut UEG GmbH Wetzlar übernommen.

Tabelle 4: Akzeptanzkriterien Bewertung des antimikrobiellen Schutzes Chitosan Hydrogele, in Anlehnung an Ph. Eur. 9.0, 5.1.3.

Kriterium A	Reduktionswerte in logarithmischen Einheiten für Formulierungen zur kutanen Anwendung			
	2 Tage	7 Tage	14 Tage	28 Tage
Bakterien <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	2	3	-	kein weiterer Anstieg der Keimzahl akzeptiert
Fungi <i>C. albicans</i> , <i>A. brasiliensis</i>	-	-	2	kein weiterer Anstieg der Keimzahl akzeptiert

2.3.5 Wirkstoffstabilität in Chitosanhydrogelen - Wiederfindung DNAzym Dz13

Für die Überprüfung der Wirkstoffstabilität innerhalb des Chitosanhydrogels wurden pro Chitosanform vier Formulierungen (ohne Glykol, 20% PG, 10% BG und 5% PenG) unabhängig voneinander hergestellt, wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Aliquote eines jeden Herstellungsansatzes wurden unter verschiedenen Bedingungen temperatur- und luftfeuchtereguliert in Klimaschränken (Binder, KBF115) eingelagert (Tabelle 5). Die Quantifizierung des DNAzyms erfolgte nach der Lagerung mittels AEX-HPLC (Anion Exchange-High Performance Liquid Chromatography) in Sechsfachbestimmung (n=6).

Tabelle 5: Parameter Wirkstoffstabilität Dz13 in Chitosanhydrogelen

Lagerperiode	t= 0, (24 h nach Herstellung)	30 Tage	2 Monate
Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit (RH %)	25 °C, 60 % RH, 40 °C, 75 % RH	25 °C, 60 % RH, 40 °C, 75 % RH	25 °C, 60 % RH,

2.4 Bioanalytik DNAzym

2.4.1 AEX-HPLC (Anion Exchange-High Performance Liquid Chromatography)

Zur quantitativen Bestimmung des Oligonukleotids muss dieses zunächst von der polykationschen Matrix getrennt werden und frei vorliegen. Die Probenaufarbeitung erfolgte über das Ausfällen des Chitosanpolymers, in dem zu 50 μL Formulierung 130 μL Reinstwasser und 20 μL NaOH (2 M) hinzugegeben wurden. Anschließend wurden die Proben für 2 Stunden bei 50 °C unter Schütteln, 1200 rpm inkubiert (Thermomix Eppendorf). Die Gehaltsbestimmung des DNAzyms aus der Hydrogelmatrix erfolgte über Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (Hitachi LaChrom Elite System). Zur Selektion des Analyten von der Formulierungsmatrix, wurde als stationäre Phase eine spezielle Anionenaustauschersäule (Thermo Scientific DNA-Pac 200, 4 x 250 mm) verwendet. Die Laufmittel A (20% ACN, 0,2 M NaClO₄, 4% TEAA 1M) und B (20% ACN, 4% TEAA 1M) wurden mit Reinstwasser angesetzt und im Ultraschallbad entgast. Zur Auftrennung der Proben wurde ein Gradient mit steigendem NaClO₄-Gehalt, bei 60 °C und einer Flussrate von 1 mL/min angelegt, Abbildung 9. Die HPLC-Methode wurde detailliert in Marquardt et al. 2015 beschrieben. Der Analyt wurde spektrometrisch bei 260 nm detektiert (LaChrom UV-Vis). Für die Integration des Chromatogramms wurde die Software EZChrom Elite (Version 3.3.2) genutzt.

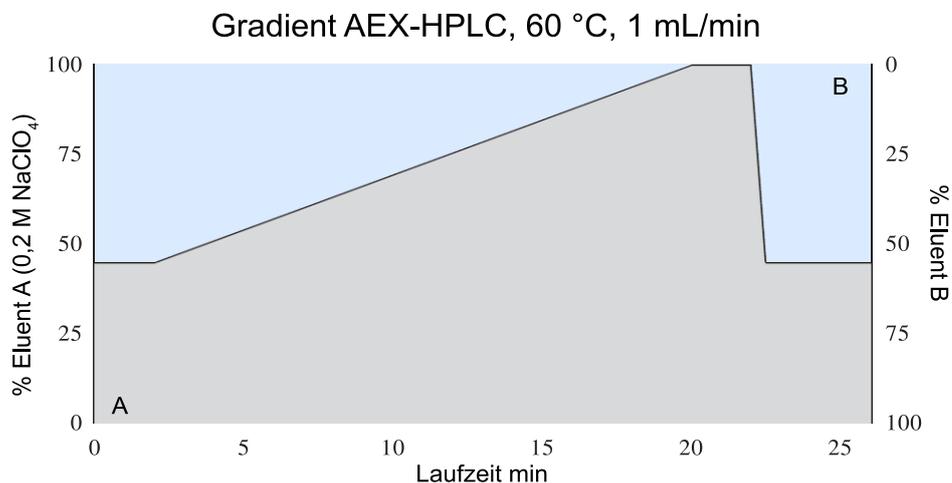


Abbildung 9: Gradientenverlauf AEX-HPLC mit UV-Vis Detektion bei 260 nm zur Quantifizierung von DNAzymen

2.4.2 Hybridisierungs Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay (ELISA)

Zur Detektion von DNAzymen in geringen Konzentrationen und aus biologischen Matrices ist ein Hybridisierungs-ELISA basierend auf der Arbeit von Dicke 2009 entwickelt worden und publiziert worden (Schmidts et al. 2012). Zur Anwendung des Hybridisierungs-ELISA für das DNAzym Dz13 wurden die folgenden Sonden zur komplementären Bindung designt und von der Firma Biomers synthetisiert: Biotin-Dz13-Sonde (5'-CTAGCCTTCCTCCCGAAA-3'-Biotin-TEG) und die Digoxigenin-Dz13-Sonde (5'-Digoxigenin-AAACAACGCCTCTCGTTG-3'). Alle weiteren Parameter wurden, wie in der Literatur beschrieben, übernommen. Zur Quantifizierung der Proben wurden in jedem Assay sieben Kalibrierstandards (Dz13 in H₂O) im Konzentrationsbereich von 2,5 - 100 ng/mL in Doppelbestimmung mitgeführt.

2.5 Wirkstofftransport- und Schutzeigenschaften Galenik

2.5.1 Charakterisierung des enzymatischen Abbaus von DNAzymen auf humaner Haut

Auf der Hautoberfläche applizierte DNAzyme werden maßgeblich durch Enzyme der DNase Familie II abgebaut. Zur Bestätigung erster Hinweise aus der Literatur (Fischer et al. 2011) wurde zunächst das Abbaumuster bestimmt, welches beim enzymatischen Verdau des DNAzyms auf der humanen Hautoberfläche entsteht. Dazu wurden Proben der intakten, gesunden Hautoberfläche verschiedener Individuen mittels Abschürfung über Einwegrasierer gesammelt (n=3 männlich, n=3 weiblich). Die Probanden haben vor der Entnahme der Proben die Hautfläche für mindestens 12 Stunden nicht gereinigt und zudem das Auftragen von Hautpflegeprodukten vermieden. Anschließend wurden 10 mg Hautprobe in 1 mL TEAA-Puffer (100 mM, 1 mM MgCl₂) mit pH-Werten von 5,0 beziehungsweise 6,6 suspendiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (20000 rpm) und der Überstand zusammen mit Dz13 50 µg/mL (Endkonzentration) bei 32-33 °C für 15 bis 180 Minuten unter Schütteln (300 rpm) inkubiert. Die Abbauprodukte wurden anschließend, nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit ethanolischer Fällung, mittels AEX-HPLC analysiert und untereinander verglichen.

Zur Identifizierung des Enzyms, welches maßgeblich das Oligonukleotid abbaut, wurden Referenzabbaumuster mit reinen DNase-Standardlösungen erzeugt. Dazu wurden Dz13 Standards mit einer Endkonzentration von 50 µg/mL mit Deoxyribonuclease I (DNase I, bovine pancreas), Deoxyribonuclease II (porcine spleen), T5 Exonuclease (*E. coli*) und Micrococcal nuclease (*Staphylococcus aureus*) in einem TEAA-Puffersystem mit pH 5,0 und 6,6 inkubiert, beziehungsweise im mitgelieferten Reaktionspuffer des Herstellers (T5 exonuclease in 50 mM Kaliumacetat, 20 mM Tris-acetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT mit pH 7,9).

2.5.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität

In einem weiteren Schritt wurde die enzymatische Aktivität der Hautoberfläche gegenüber des DNAzyms untersucht, mit der Fragestellung wie stark sich die enzymatische Aktivität der Hautoberfläche verschiedener Individuen unterscheidet. Dazu wurden die Hautproben der Spender einzeln in TEAA-Pufferlösung (pH 5,0 und 6,6) suspendiert (10 mg/mL). Ein Volumen von 90 µL der Suspension wurden mit 10 µL Dz13 (Endkonzentration 50 µg/mL in H₂O) inkubiert, bei 32-33°C für 60 Minuten beziehungsweise drei Stunden. Im Anschluss wurde zum Nachweis einer mittleren spezifischen Aktivität der Hautoberfläche eine gepoolte Hautsuspension von sechs Spendern (n=6, drei männlich, drei weiblich) hergestellt und ebenfalls eine Inkubation mit Dz13-Standards nach dem beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Analyse erfolgte für beide Versuchsaufbauten über AEX-HPLC. Zur Bestimmung der Nukleaseaktivität der Hautproben, sowie der DNase-Standardlösungen wurde das intakte Dz13 nach verschiedenen Inkubationszeiten quantifiziert. Die Ergebnisse dieses Versuchsaufbaus wurden teilweise in Marquardt et al. 2016 veröffentlicht.

2.5.3 DNase II Assay

Auf Basis der Auswertung der Versuche aus Abschnitt 2.5.2 wurde ein Assay zur Überprüfung der Schutzfunktion des Wirkstofftransportsystems gegen enzymatischen Abbau des Oligonukleotids entwickelt. Das Wirkstofftransportsystem mit Dz13 wurde mit DNase II in einem TEAA-Puffersystem (100 mM, pH 5,0, 100 mM MgCl₂) inkubiert. Dazu wurden 100 µL Chitosanhydrogel (Dz13 200 µg/mL) mit DNase II-Lösung (118 Units/mL in TEAA-Puffer) gemischt und bei 32 °C und 300 rpm inkubiert. Die Reaktion wurde nach 90 Minuten über die Zugabe von 160 µL Reinstwasser und 40 µL NaOH (2M) abgestoppt. Die ausgefallenen Chitosanaggregate wurden für 7 Minuten bei 20.000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden 50 µL des Überstandes, zur Quantifizierung des intakten DNAzyms, für die AEX-HPLC abgenommen. Die Wiederfindung des DNAzyms aus der Hydrogelmatrix erfolgte in einer Sechsfachbestimmung (n=6). Als Positivkontrolle wurden in Dreifachbestimmung wässrige Standards (n = 3) einer Dz13 Lösung (200 µg/mL) im Assay mitgeführt.

2.5.4 Penetrationsstudie

Der Transport des Wirkstoffes in die Haut setzt zunächst eine Freisetzung aus der Hydrogelmatrix voraus und anschließend eine ausreichende Wirkstoffpenetration bis zum Zielort. Der Einfluss von Chitosanhydrogelen auf die Penetration von Dz13 in Vollhautproben wurde untersucht. Für den Versuchsaufbau wurden Franz-Diffusionszellen gewählt und diese mit frisch präparierter Schweinevollhaut (*Sus scrofa domesticus*), von der Rückseite der Ohren, bestückt. Die Akzeptorkammer wurde luftblasenfrei mit PBS (pH 7,4) befüllt und auf 32 °C temperiert. Eine homogene Durchmischung des Akzeptormediums wurde zudem durch Magnetrührer mit einer Drehzahl von 500 rpm sichergestellt. Eine Stunde nach Equilibrierung des Systems wurde auf das *stratum corneum* der Vollhautprobe 300 µL der verschiedenen Hydrogelproben (Dz13-Gehalt: 200 µg/mL mit 5 % ATTO-Dz13), beziehungsweise wässriger DNAzym-Standards appliziert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden Rückstände der Formulierungen intensiv unter fließendem Wasser von den Hautoberflächen entfernt. Ein Teil der Vollhautproben wurde ausgestanzt und in Einbettkassetten in stickstoffgekühltem Isopentan eingefroren. Der zweite Teil der Probe, eine definierte Fläche von 2,27 cm², wurde mittels Proteinase K (600 Anson U) in 1 mL Lysepuffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS, pH 8,5) lysiert. Zur vollständigen Lyse der Hautstrukturen wurden die Proben bei 50 °C und 1400 rpm für 20 Stunden inkubiert. Die Testung jeder Formulierungsrezeptur erfolgte auf Hautproben von sechs unterschiedlichen Individuen. Jede Hautsektion aus dem Penetrationsversuch wurde in sechsfacher Wiederholung mittels Hybridisierungs-ELISA quantifiziert.

2.6 Transfektion – Oligonukleotidtransport an den Wirkort

2.6.1 Bestimmung der Zytotoxizität über Zellviabilitätsmessungen

Zum Nachweis möglicher Zytotoxischer Effekte wurde die Viabilität der Zellen nach der Transfektion mit verschiedenen Dz13 -Chitosanpolyplexen (PP) gemessen. Der Umsatz des Substrats Resazurin (Promocell, Fluorometric Cell Viability Kit I) innerhalb der Zelle wurde zur Bestimmung der Zellviabilität gemessen. Dazu wurden 500 µL Resazurinlösung (50 µL Resazurin + 450 µL HG DMEM) auf die zweifach mit 1000 µL PBS gewaschenen Zellen gegeben. Die Änderung der Absorption des Resazurins bei 570 nm wurde im Plate Reader, (BioTek Synergy HTX) für 90 Minuten nach dem folgenden Protokoll gemessen.

Tabelle 6: Protokoll Messung Resazurin Umsatz

<u>Procedure Details</u>	
Plate Type	24 WELL PLATE
Set Temperature	Setpoint 37°C, Gradient 0 °C Preheat before moving to next step
Start Kinetic Read	Runtime 1:30:00 (HH:MM:SS), Interval 0:02:00, 46 Reads Absorbance Endpoint Full Plate Wavelengths: 570, 600 Read Speed: Normal, Delay: 100 msec, Measurements/Data Point: 8
End Kinetic Set Temperature	Incubator off

Die Auswertung erfolgte zum Zeitpunkt $t = 60$ Minuten, da dieser innerhalb des exponentiellen Umsatzes des Substrats lag.

2.6.2 Transfektion HaCaT Zelllinie mit Dz13

Die humane, spontan transformierte Keratinozytenzelllinie HaCaT (CLS Cell Lines Service GmbH, ab Passage 31) wurde zunächst in T-75 Flaschen mit dem Kultivierungsmedium bestehend aus: HG-DMEM mit 10% FKS und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Die Inkubation im Brutschrank (Thermo Scientific) erfolgte bei 37 °C und 8,5 % CO₂ nach Standardprotokoll (CLS Cell Lines Service GmbH). Bevor eine vollständige Konfluenz erreicht wurde (ca. 80-90 %) wurden die Zellen mittels 4 mL Trypsin-EDTA (0.05 %) in PBS von der Wachstumsfläche gelöst und passagiert. Zur Aussaat wurde eine Stammlösung der Zellen mit 18.500 Zellen/mL hergestellt und jeweils 1 mL/well der Zellsuspension in 24-well Platten (Sarstedt TC, Flachboden, 1,82 cm² Wachstumsfläche) überführt.

Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion der Zellen mit Polyplexen verschiedener DNAzym/Chitosan Verhältnisse Tabelle 7. Für eine Positivkontrolle wurden Polyplexe mit TransIT®-Oligo (Mirus Bio LLC) hergestellt. Dazu wurden die folgenden Stammlösungen eingesetzt: FAM-Dz13 1 mg/mL in Reinstwasser und Chitosan S in 0.25% Essigsäure mit 1 mg/mL bzw. 4 mg/mL, sowie der TransIT®-Oligo Lösung von Mirus Bio LLC.

Tabelle 7: Herstellung der Polyplexe für die Transfektion von HaCaT Zellen

Volumen in µL	PP1	PP4	PPTransIT	Blank _{Chitosan}	BlankTransIT
PBS	450	450	450	450	450
FAM Dz13 1 mg/mL	4,5	4,5	4,5	-	-
Chitosan S 1 mg/mL	9	-	-	-	-
Chitosan S 4 mg/mL	-	9	-	9	-
TransIT®-Oligo	-	-	9	-	9

Diese wurden 15-30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Diese Inkubation dient der Sicherstellung einer abgeschlossenen Polyplexbildung. Es wurden 50 µL der hergestellten Polyplexe mit 500 µL HG-DMEM auf die HaCaTs appliziert. Diese wurden für 24 Stunden und 48 Stunden mit den Transfektionsproben bei 37 °C und 8.5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation mit den Transfektionsproben wurden die Wells jeweils zweifach mit 1000 µL PBS gewaschen. Anschließend wurde das fluoreszenzmarkierte FAM-Dz13 mit dem Plate Reader bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 528 nm detektiert. Der Versuch wurde in drei von aneinander unabhängigen Experimenten (n=3) mit jeweils 4 Wiederholungen pro Zellkulturplatte durchgeführt.

Tabelle 8: Plattenlayout 24 well plate, FAM-Dz13 Nachweis und Zellviabilität nach Transfektion

	1	2	3	4	5	6
A	Blank PBS	PP1	PP4	PP _{TransIT}	Blank _{Chitosan}	Blank _{TransIT}
B						
C						
D						

2.7 Statistische Berechnungsgrundlagen

Tabelle 9: Übersicht statistischer Berechnungsgrundlagen

Symbol	Definition	Berechnung
Mean	Arithmetischer Mittelwert	$\text{Mean} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i)$
s	Standardabweichung	$s = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$
CV %	Variationskoeffizient	$CV = \frac{s}{\text{Mean}} \cdot 100$
Median	Median	$\tilde{x} = \begin{cases} \frac{x_{\frac{n+1}{2}}}{2} & \text{für } n \text{ ungerade} \\ \frac{1}{2} (x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2}+1}) & \text{für } n \text{ gerade} \end{cases}$
R ²	Bestimmtheitsmaß	$R^2 = \frac{\text{Summe der Quadrate der Erklärten Abweichungen}}{\text{Summe der Quadrate der Totalen Abweichungen}}$

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Polyplexbildung – Ergebnisse Fluoreszenz Assay

Die Ergebnisse dieses Versuchsaufbaus wurden teilweise als Poster veröffentlicht, 21st Annual Meeting of CRS Local Chapter Germany, 2-3 März 2017 in Marburg. Zunächst wurde ein Fluoreszenzassay zur Beschreibung der Polyplexbildung zwischen dem anionischen DNAzym und dem kationischen Polymer Chitosan entwickelt. Grundlegende Idee zur Entwicklung des Assays ist die Nutzung der Änderung des Emissionssignals eines ionischen Farbstoffs, wenn dieser an ein Molekül bindet oder aus einem Komplex freigesetzt wird. Es wurden verschiedene kationische Farbstoffe untersucht mit dem Ziel eine möglichst große Änderung im Emissionssignal des Farbstoffes zu

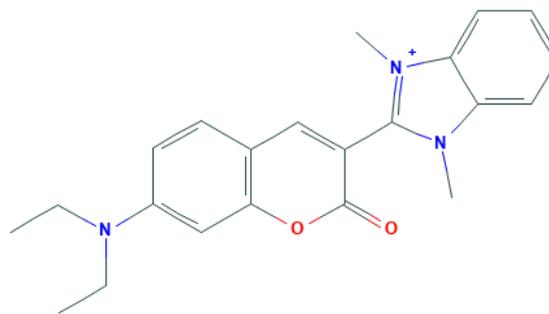


Abbildung 10: 2D Struktur von Maxilon Brilliant Flavine 10GFF, ein kationischer Farbstoff aus der Gruppe der Coumarine (Zollinger 2003, S. 81). PubChem Compound Summary for CID 169053. Retrieved January 3, 2021 from, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/169053>.

detektieren, wenn dieser mit seiner positiven Ladung vom negativ geladenen Rückgrat des DNAzym-Moleküls verdrängt wird (Abbildung 10).

Die Farbstoffe SybrSafe, Malachitgrün, Maxilon Brilliant Flavine 10GFF (auch als basic yellow 40 bezeichnet) und Fluorescent brightener 28 wurden auf ihre Eignung untersucht. Ziel war es, eine lineare Abhängigkeit zwischen der Änderung des Fluoreszenzsignals und der eingesetzten DNAzym-Konzentration messen zu können. Dazu wurden zunächst wässrige DNAzym-Standards eingesetzt und die Änderung des Fluoreszenzsignals der Farbstoffe mit einem Multi-Mode-Reader für Mikroplatten detektiert.

Das Emissionssignal des Farbstoffs Maxilon Brilliant Flavine 10GFF (10GFF) zeigte eine lineare Abhängigkeit bei Inkubation mit DNAzym-Lösungen im Konzentrationsbereich von 2,5 – 100 µg/mL. Zur Quantifizierung der Polyplexgrößen wurden insgesamt 12 Kalibrierfunktionen (n=12) mit jeweils sechs Dz13-Standards (2,5; 5; 12,5; 25; 50 und 100 µg/mL in TEAA Puffer) aufgenommen. Das

Bestimmtheitsmaß R^2 lag im Bereich von 0,999-0,997 für $n=12$, womit die Linearität des Assays im untersuchten Konzentrationsbereich gegeben ist. Eine ausführliche Darstellung der Messergebnisse findet sich im Anhang (6.2).

Der etablierte Assay zur Untersuchung der Polyplexbindung basiert auf der Verdrängung des Fluoreszenzfarbstoffs 10GFF vom geladenen DNA-Rückgrat. Dieser Farbstoff ist aufgrund seiner hohen Verfügbarkeit (Einsatz in der Textilindustrie) und dem linearen Verhalten des Emissionssignals im untersuchten Bereich besonders geeignet. Alle anderen Farbstoffe konnten im untersuchten Bereich keine ausreichende Änderung des Messsignals (Sensitivität) oder Linearität zeigen. Da der Assay auf einfacher Mischung der Komponenten in Multiwellplatten basiert, eignet er sich für die Durchführung von Screenings zur Polyplexoptimierung. Viele Proben können über die Messung im Multiplaterreader parallel quantifiziert werden, wodurch eine erste Abschätzung der Bindungsstärke zwischen DNA und Polykation ermöglicht wird. Die Quantifizierung des freien DNA-Anteils bei verschiedenen Polykation/DNA-Verhältnissen wäre beispielsweise über HPLC weitaus zeit- und kostenintensiver.

Bei Inkubation von DNAzym mit steigenden Konzentrationen von Polyplexbildnern, konnte eine Abnahme des Fluoreszenzsignals beobachtet werden (Abbildung 11). Das Fluoreszenzsignal nimmt ab, je mehr negative Ladungen am DNAzym durch die kationischen Polymere abgeschirmt werden. Der Assay konnte daher zur Bestimmung der Konzentration von ungebundenem, freiem DNAzym Dz13 unter Berücksichtigung verschiedener Polykation-/DNA-verhältnisse eingesetzt werden. Der prozentuale Anteil an freiem DNAzym wird dem Massenverhältnis (m/m) von Polyplexbildner und DNA in Abbildung 11 gegenübergestellt. Für die verschiedenen Chitosanformen zeigen sich sigmoidale Verläufe für die Bindung des DNAzyms in Form eines Polyplexes, im Gegensatz zu Polyethylenimin (PEI). Bereits bei niedrigen PEI/DNA-Verhältnissen wird das geladene Rückgrat der DNA vollständig abgeschirmt, also ein großer Anteil der DNA in Form eines Polyplexes gebunden. Clamme et al. 2003 beschreiben in ihrer Arbeit, dass es schon bei Verhältnissen < 1 von geladenen Stickstoff/Phosphatgruppen zur Polyplexbildung zwischen DNA und PEI kommt. Diese Beobachtung wird mit der Verzweigung des PEI Moleküls erklärt. Auch wenn nicht alle Phosphatgruppen des DNA-Moleküls in elektrostatische Wechselwirkungen mit einbezogen werden, so ist die Krümmung und Verwindung über die Bindung an PEI ausreichend für die Kondensation zu einem Polyplex. Diese Theorie liefert ebenfalls eine Erklärung für die starke positive Ladung auf PEI/DNA-Polyplexen (Marquardt et al. 2016). Im Inneren des Polyplexes gehen stöchiometrisch nicht alle geladenen Phosphatgruppen eine elektrostatische Bindung mit PEI ein. Es stehen somit noch freie PEI Moleküle zur Verfügung, die sich auf der Oberfläche des Polyplexes anlagern. Diese freien PEI-Moleküle können für die zytotoxischen Effekte durch PEI in Betracht gezogen werden (Clamme et al. 2003).

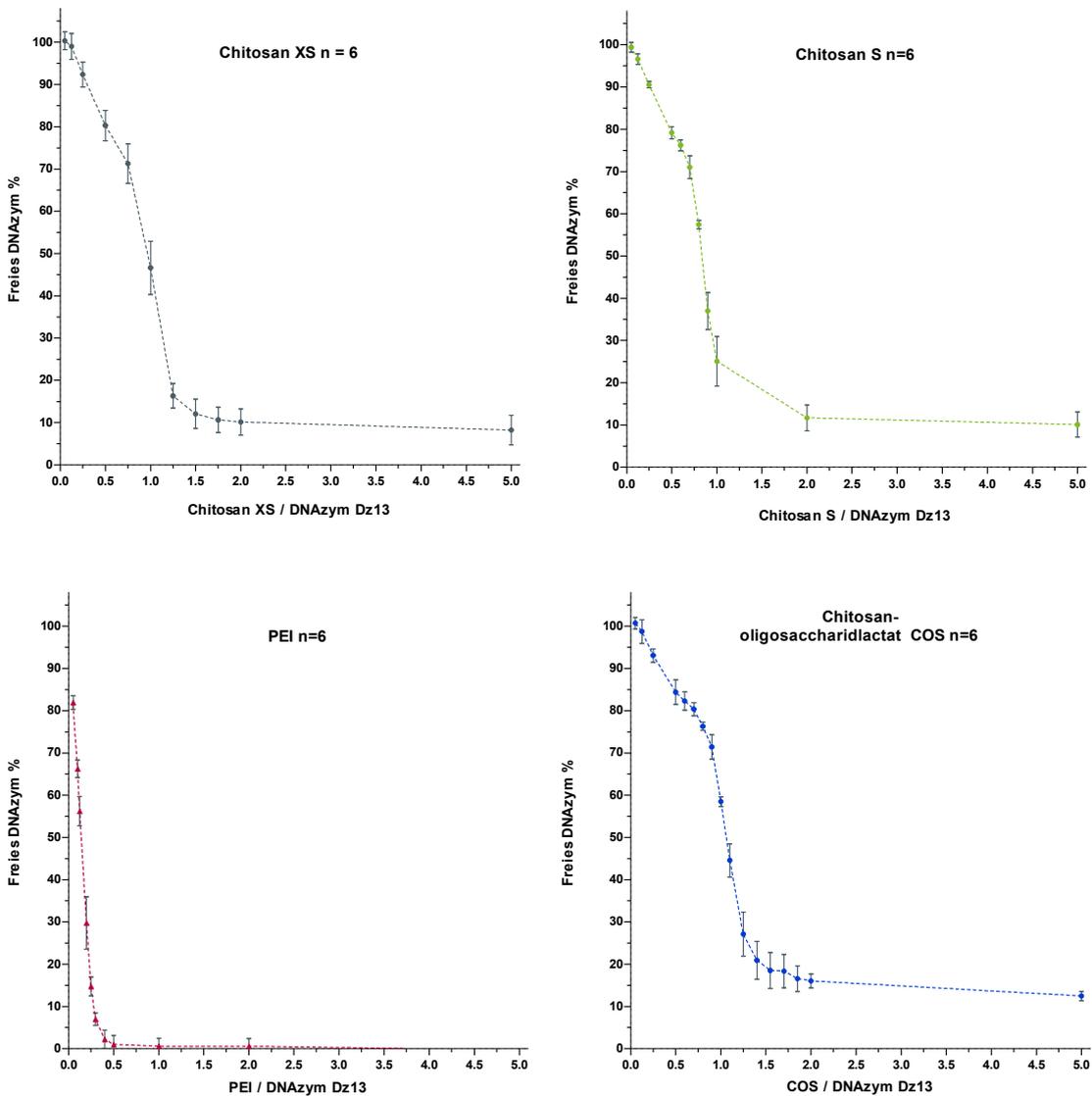


Abbildung 11: Messung des freien Anteils von DNAzym Dz13 nach Inkubation mit Polykationen in verschiedenen Massenverhältnissen mittels Fluoreszenzassay

Für die Kompaktierung des DNAzyms, innerhalb eines Polyplexes auf Basis von linearem Chitosan, müssen höhere Konzentrationen eingesetzt werden als für die Formulierung von DNA/PEI-Partikeln. Die Unterschiede lassen sich mit Blick auf die molekulare Struktur der Polyplexbildner ableiten. Die Parameter Polymerkettenlänge, Verzweigung, Ladungsdichte und Valenz sind die Schlüsselfaktoren für die Polyplexbildung (Maurstad et al. 2007). Das eingesetzte PEI weist im Gegensatz zum linearen Chitosan Verzweigungen innerhalb des Polymerstranges auf. Damit ergeben sich bei gleicher Anzahl an Ladungen unterschiedliche lokale Ladungsdichten.

Für die effektive Transfektion therapeutischer DNA bedarf es einer ausreichenden Polyplexstabilität aber auch einer Freisetzung der DNA im Zytosol (Strand et al. 2009). Das Chitosanpolymer kann über

die Variation der Kettenlänge und des Deacetylierungsgrades ganz gezielt für die jeweilige Anforderung optimiert werden. In der Literatur sind diverse Chitosanpolymere mit optimierter Ladungsdichte und Valenz (über den Grad der Deacetylierung und Molekülkettenlänge) beschrieben (Strand et al. 2009; Sorlier et al. 2001; Alatorre-Meda et al. 2011; Domard 2011).

Die Polyplexoptimierung kann über das Screening strukturell verschiedener Chitosane und deren Derivate (bspw. Chitosanglutamat, Chitosanlactat) erfolgen. Das optimierte Polyplexvehikel berücksichtigt dabei die Stoffeigenschaften (Oligonukleotidlänge, Modifizierungen) und die Bedingungen am Wirkort (Gewebe, bzw. Zellkompartimente mit unterschiedlichen physiologischen Umgebungen). Beispielsweise zeigt Chitosan-Oligosaccharidlactat (COS) erst bei hohen Polymer/DNAzym-Verhältnissen eine nahezu vollständige Bindung des DNAzyms (Abbildung 11). Dies ist auf die ungeladenen Oligosaccharide im Polymer zurückzuführen, da sie sterisch die elektrostatischen Wechselwirkungen behindern. COS wurde in den vorliegenden Versuchsanordnungen ausgewählt, um ein Beispiel für Chitosanpolymere mit ungeladenen Polymerabschnitten beschreiben zu können.

Bei unzureichender Freisetzung der therapeutischen DNA aus einem Polyplex, kann der Einbau von ungeladenen Oligosacchariden ins Chitosanpolymer zur Optimierung genutzt werden. (Strand et al.

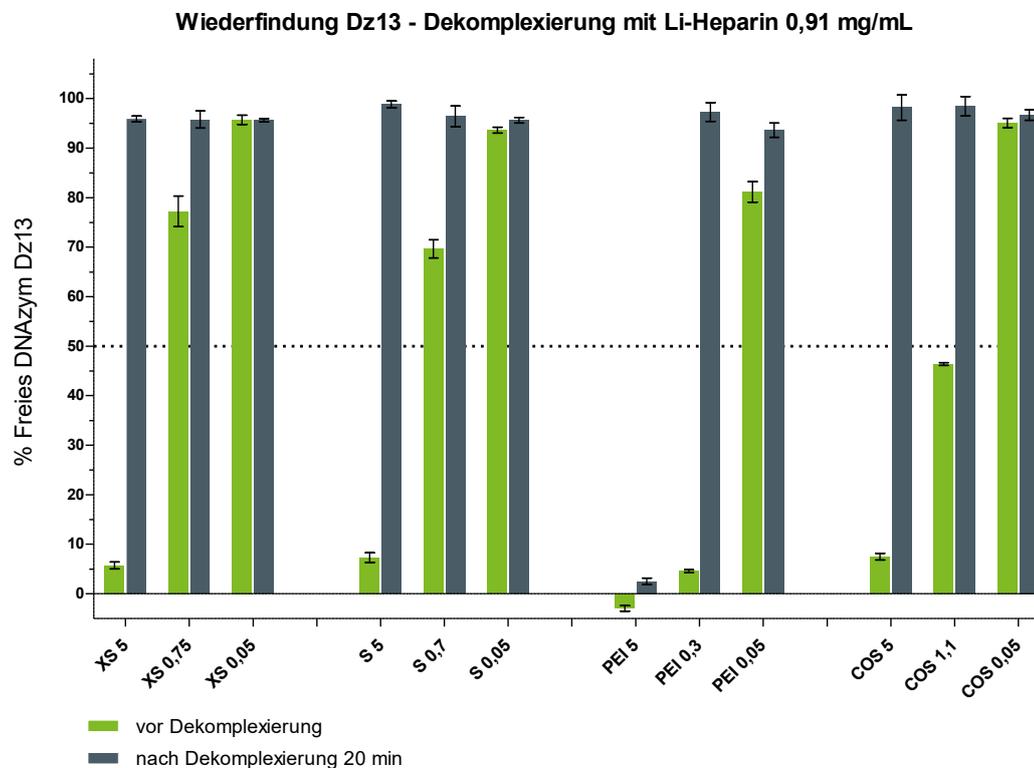


Abbildung 12: Wiederfindung des freien DNAzyms Dz13 nach Dekomplexierung mit Li-Heparin für eine Inkubationsdauer von 20 Minuten. Quantifizierung mittels Fluoreszenzassay mit 10GFF, Kalibrierbereich 2,5-100 µg/mL.

2009). Das Gleichgewicht zwischen Polyplexstabilität und der Freisetzung der therapeutischen DNA wurde in der vorliegenden Arbeit für eine erste Abschätzung über die Verdrängung der DNA aus dem Polyplex mit Lithium-Heparin (Li-Heparin) untersucht. Der Einsatz von Heparin zur Stabilitätsprüfung von Polyplexen ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden, unter anderem in Danielsen et al. 2005b. Das Glukosaminglykan Heparin besitzt stark anionische Eigenschaften und besitzt die höchste, bei Biopolymeren vorkommende, negative Ladungsdichte (Nelson und Cox 2017, S. 254). Aus allen getesteten Polyplexen konnte über die Inkubation mit Li-Heparin nahezu die gesamte, eingesetzte DNAzym-Konzentration freigesetzt werden, außer für Polyplexe mit einem Massenverhältnis DNA/PEI von 1 zu 5. Der negative Messwert spiegelt die systematische Abweichung wider und liegt im Bereich der Messungenauigkeit des Assays (ausgedrückt über CV%). Für dieses Verhältnis ist die Inkubationsdauer, sowie die eingesetzte Li-Heparinkonzentration für eine Verdrängung der DNA vom PEI-Polymer nicht ausreichend gewesen. Im ersten Versuchsteil wurde bereits gezeigt, dass bei sehr geringen DNAzym/PEI Verhältnissen das DNAzym vollständig als Polyplex gebunden wird. Der Dekomplexierungsversuch bestätigt diese erste Beobachtung, dass mit der eingesetzten PEI-Form sehr stark kompaktierte Polyplexe entstehen. Um zu überprüfen, ob das DNAzym aus einem Dz13/PEI Polyplex mit dem Massenverhältnis 1:5 prinzipiell über den Einsatz von Li-Heparin (4,54 mg/mL) verdrängt werden kann, wurde über die Aufnahme einer Kinetik im Fluoreszenzassay durchgeführt (Anhang 6.2.3). Die vollständige Verdrängung des DNAzyms mit der fünffachen Li-Heparinkonzentration benötigte mehr als 120 Minuten. Der Einsatz von verzweigten PEI Molekülen kann in der Entwicklung einer Polyplexformulierung als Marker genutzt werden für den Bereich der stark kompaktierten Polyplexe. Für die Eingrenzung des benötigten Stabilitätsbereichs für den Polyplex muss allerdings die Freisetzung am Wirkort, beziehungsweise die Effektivität der Transfektion in Zellkultursystemen betrachtet werden. Eine zu hohe Polyplexstabilität wirkt einer Freisetzung am Target und damit erfolgreichen Transfektion entgegen (Clamme et al. 2003; Maurstad et al. 2007).

3.2 Physikochemische Eigenschaften

Die vorliegenden Ergebnisse wurden in Teilen bereits in der Publikation Eicher et al. 2019 veröffentlicht.

3.2.1 Partikelgrößenverteilung über Bilddatenanalyse

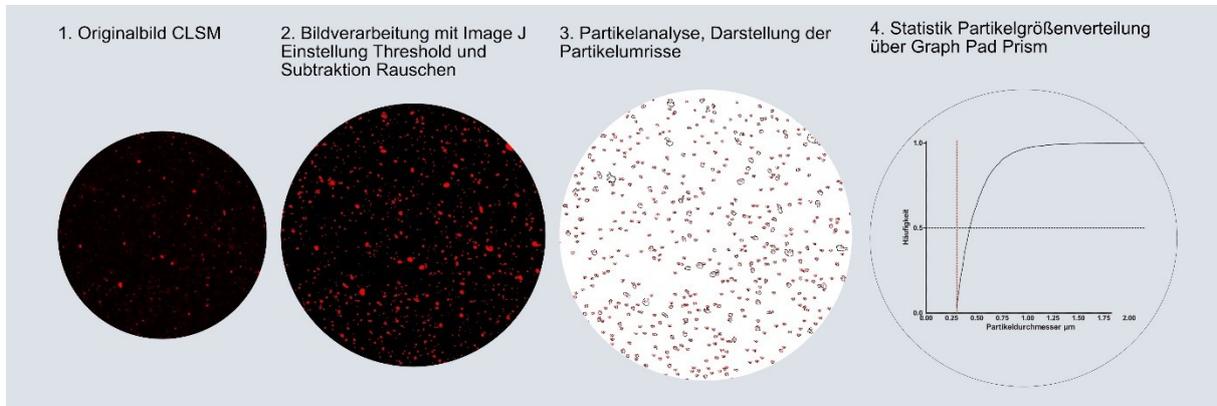


Abbildung 13: Prozess der Bilddatenanalyse zur Ermittlung der Partikelgrößenverteilung der Polyplexe innerhalb der Hydrogelmatrix

Die Bilddaten wurden softwaregestützt (Image J) analysiert, der entsprechende Prozess der Bildverarbeitung wird in Abbildung 13 dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Graph Pad Prism 5 durchgeführt und die Ergebnisse in Tabelle 10 zusammengefasst. Zur besseren Beurteilung der Ergebnisse werden neben dem Median auch das erste Dezil $p=0,1$ und das neunte Dezil $p=0,9$ der Größenverteilung angegeben. Unterschiede in der Größenverteilung der einzelnen Hydrogelformulierungen zwischen dem Herstellungszeitpunkt $t=0$ und verschiedener Einlagerungsintervalle wurden mit dem Mann-Whitney-Test detektiert ($p < 0.05$).

Tabelle 10: Ergebnisse Partikelgrößenverteilung über die Bilddatenanalyse (CLSM), Lagertemperatur: 25°C, 60 % RH

Chitosan Hydrogel	Median p = 0,5 µm	Dezil p = 0,1 µm	Dezil p = 0,9 µm	p-Wert, Mann-Whitney-Test (bezogen auf t = 0, Gaußsche Approximation)	Median signifikant verschieden (p < 0,05)
S t= 0	0,439	0,325	0,758		
S 1 m	0,434	0,325	0,733	0,0503	nein
S 2 m	0,423	0,318	0,711	< 0,0001	ja
S 20% PG t= 0	0,470	0,325	0,838		
S 20% PG 1 m	0,465	0,325	0,847	0,9260	nein
S 20% PG 2 m	0,460	0,325	0,836	0,2039	nein
S 10% BG t= 0	0,429	0,325	0,761		
S 10% BG 1 m	0,429	0,325	0,746	0,6714	nein
S 10% BG 2m	0,429	0,325	0,733	0,2101	nein
S 5% PenG t= 0	0,455	0,325	0,776		
S 5% PenG 1 m	0,455	0,325	0,830	0,0990	nein
S 5% PenG 2 m	0,444	0,325	0,785	0,4326	nein
L t= 0	0,498	0,332	0,945		
L 1 m	0,484	0,332	0,912	0,0018	ja
L 2 m	0,479	0,332	0,904	0,0010	ja
L 20% PG t= 0	0,516	0,339	1,012		
L 20% PG 1 m	0,521	0,339	1,056	0,7869	nein
L 20% PG 2 m	0,514	0,332	0,997	0,2372	nein
L 10% BG t= 0	0,503	0,332	0,994		
L 10% BG 1 m	0,503	0,332	0,996	0,5125	nein
L 10% BG 2m	0,498	0,332	0,990	0,6529	nein
L 5% PenG t= 0	0,503	0,332	0,929		
L 5% PenG 1 m	0,484	0,332	0,928	0,0111	ja
L 5% PenG 2 m	0,479	0,332	0,912	0,0011	ja

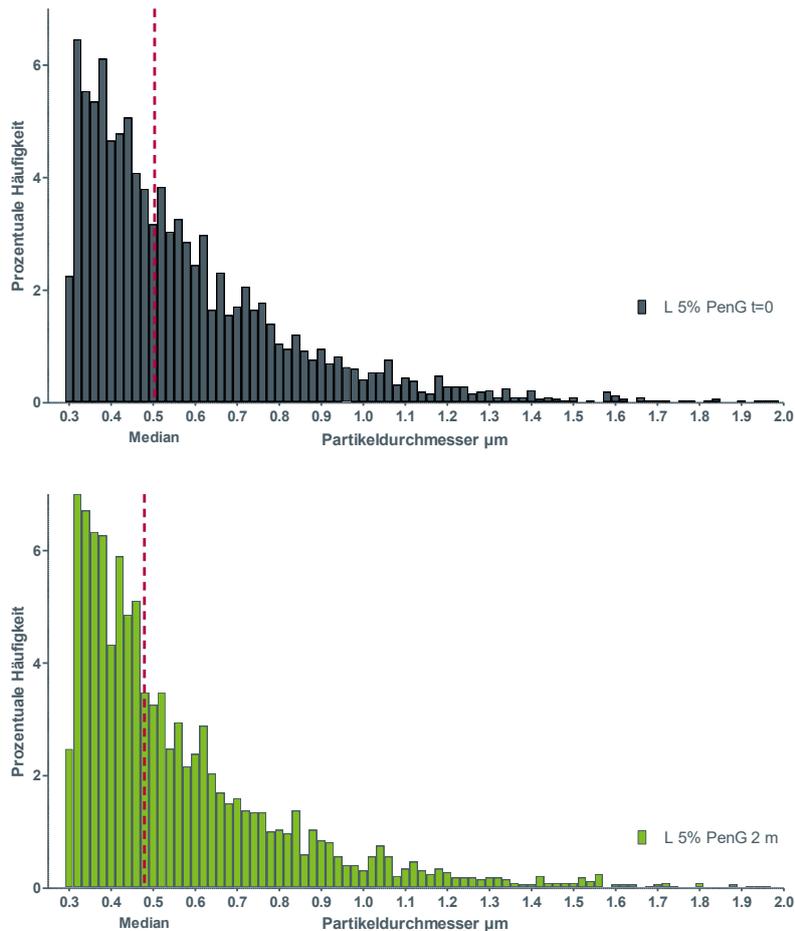


Abbildung 14: Vergleich der prozentualen Häufigkeit der Partikeldurchmesser, Hydrogel L 5% Pentylenglykol zum Herstellungszeitpunkt $t=0$, grau und nach zwei Monaten (2m) grün, bei einer Lagertemperatur von 25°C und 60 % RH.

Die Mediane, dargestellt in Tabelle 10, der Polyplexgrößen weisen eine Abhängigkeit zur Länge des eingesetzten Chitosanpolymers auf. Der Einfluss der Chitosanform (Molekülgröße, Ladungsdichte, räumlich Anordnung der Ladungen) auf den resultierenden Partikel lässt sich aus den Bilddaten (Größenverteilung und Zirkularität) extrahieren. Mit dem Einsatz von Chitosan L entstehen vergleichsweise größere Polyplexe (Median: $0,499 \pm 0,015 \mu\text{m}$) als mit Chitosan S (Median: $0,444 \pm 0,014 \mu\text{m}$). Der Hersteller der Polymere gibt für Chitopharm™ S eine mittlere Molekülgröße von 50-1000 kDa (Chitosan S) und für Chitopharm™ L 500–5000 kDa (Chitosan L) an. Die längeren Polymerketten in Chitosan L führen im Prozess der Polyplexbildung schließlich zu deutlich größeren Partikeln (Tabelle 10). Bei nahezu allen Formulierungen kommt es, über die Zeit der Einlagerung, zu einer Abnahme des mittleren Partikeldurchmessers (Median) und zu einer Verschiebung der Größenverteilungen in Richtung kleinerer Polyplexe. Die Abbildung 14 zeigt, dass die Gesamtfläche der prozentualen Häufigkeit für kleine Partikelgrößen über die Lagerzeit zunimmt.

Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass 24 Stunden nach der Herstellung die Polyplexbildung nicht vollständig abgeschlossen ist und es im gesamten Beobachtungszeitraum dynamische Effekte zwischen beiden Polymeren gibt. Der Prozess der Polyplexbildung wird dabei von verschiedenen Einflussfaktoren bestimmt. Deren Beobachtung ist ausführlich in der Literatur beschrieben, unter anderem bei Danielsen et al. 2005a. In der Arbeit von Danielsen et al. 2005a wurde der Einfluss konkurrierender Polyanionen (Xanthan 5000 kDa, Alginat 450 kDa) auf die Polyplexbildung zwischen Chitosan und Polylysin mit DNA (linear calf thymus DNA, 10.000-15.000 kDa) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die resultierende Morphologie im Zusammenhang mit dem eingesetzten Polyanion steht und sich Polyplexe aus linearer DNA und Chitosan zu sphärischen Partikeln kompaktieren (Danielsen et al. 2005a). Diese Beobachtung ist übertragbar auf die Partikelmorphologie aus der Chitosanhydrogelmatrix der hier untersuchten Formulierungen, siehe Abbildung 15 und Tabelle 11. Ein perfekt sphärischer Partikel würde eine Zirkularität von 1 aufweisen. Die mikroskopisch ermittelte Zirkularität der Polyplexe mit Werten zwischen 0,67-0,75 zeigt die Entstehung nahezu sphärischer Partikel, übereinstimmend mit den Ergebnissen von Danielsen et al. 2005a. Für Formulierungen, vor allem mit Glykolanteil, ist zu erkennen, dass die Zirkularität der Polyplexe über die Lagerperiode von zwei Monaten abnimmt.

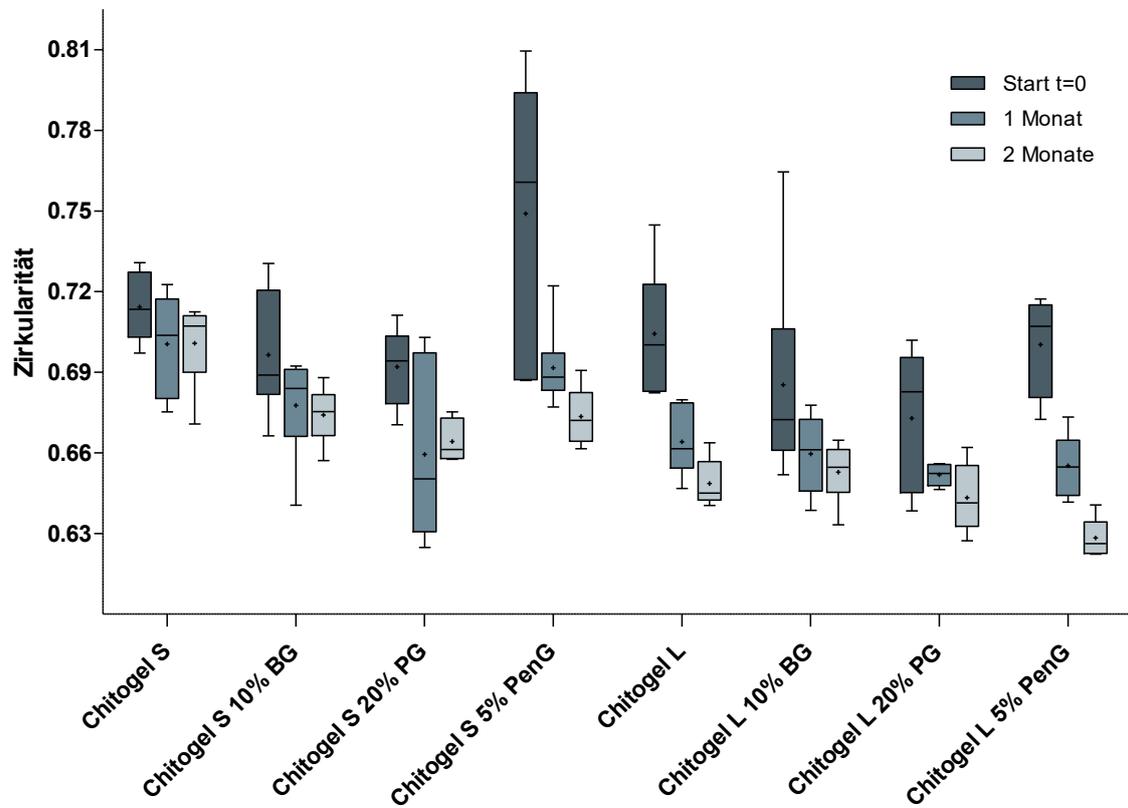


Abbildung 15: Zirkularität der Chitosan-DNA Polyplexe. Der Median wird als Linie und der Mittelwert der Zirkularität mit einem „+“ innerhalb der Box dargestellt. Die Whisker der Boxen zeigen das Minimum bzw. Maximum der Daten an. Die Hydrogele wurden zum Start der Untersuchung vermessen, nach einem und zwei Monaten bei einer Lagertemperatur: von 25°C und 60 % RH.

Tabelle 11: Zusammenfassung Daten Zirkularität aus Bilddatenanalyse

Probe Chitogel (n=6)	t= 0		1 Monat		2 Monate	
Lagertemperatur: 25 °C und 60 % RH	Mean	s	Mean	s	Mean	s
S	0,71	0,01	0,70	0,02	0,70	0,01
L	0,70	0,02	0,66	0,01	0,65	0,01
S 20% PG	0,69	0,01	0,66	0,03	0,66	0,01
L 20% PG	0,67	0,02	0,65	0,00	0,64	0,01
S 10% BG	0,70	0,02	0,68	0,02	0,67	0,01
L 10% BG	0,69	0,04	0,66	0,01	0,65	0,01
S 5% PenG	0,75	0,05	0,69	0,01	0,67	0,01
L 5% PenG	0,70	0,02	0,66	0,01	0,63	0,01

Die Zirkularität der Polyplexe mit Chitosan S ist in allen Formulierungsansätzen größer, verglichen mit Polyplexen aus Chitosan L. Auffällig ist besonders die starke Abnahme der Zirkularität über die Lagerungszeit bei Chitosan L Polyplexen. Die in Abbildung 16 dargestellten Histogramme für die prozentuale Verteilung der Zirkularität von Polyplexen mit Chitosan L lassen eine Verschiebung von sehr sphärischen Partikeln (0,9 - 1,0), hinzu weniger sphärischen Partikeln über die Zeit erkennen.

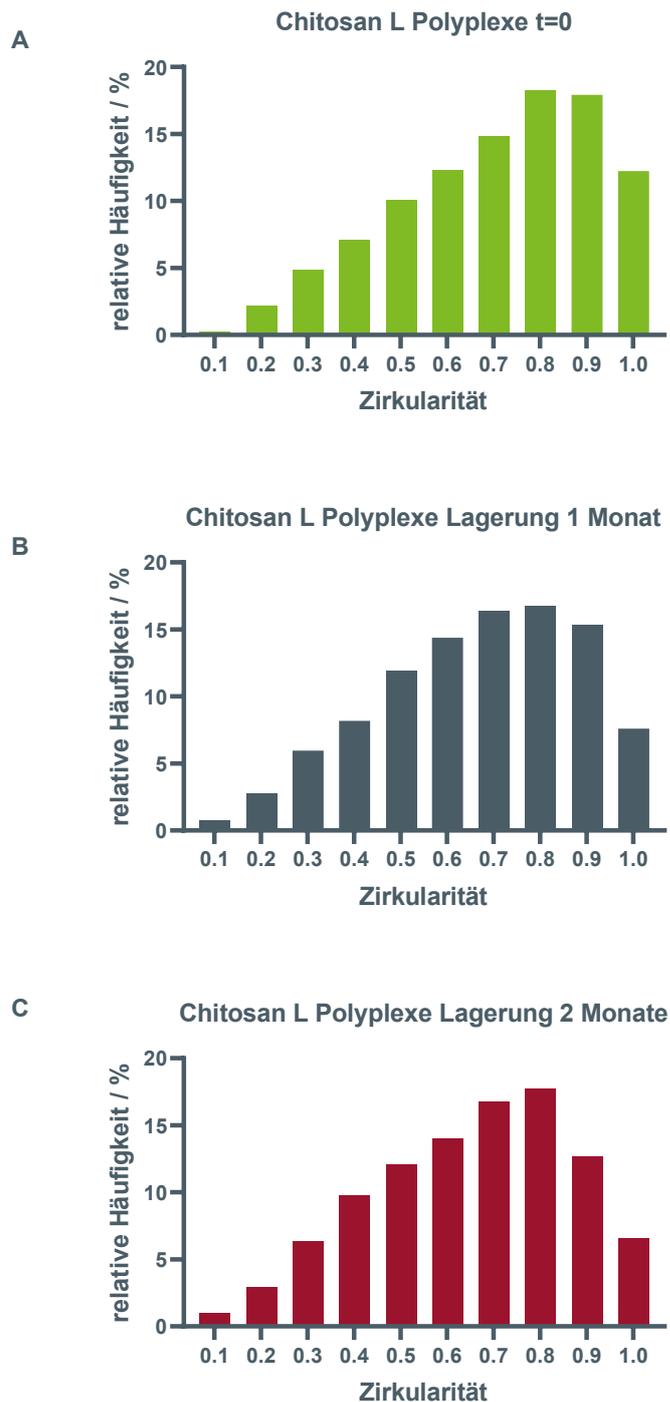


Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung der Zirkularität von Polyplexen mit Chitosan L über die Lagerperiode von A: Startzeitpunkt $t = 0$, B: nach einem Monat und C: nach zwei Monaten, bei einer Lagertemperatur von 25°C und $60\% \text{ RH}$.

Die Polymere Chitosan S und Chitosan L unterscheiden sich zunächst in der mittleren Molekularmasse, welche als Bereich angegeben ist und eine gewisse Verteilungsbreite hat. Weiter kann sich der Deacetylierungsgrad beider Polymere voneinander unterscheiden, da dieser vom Hersteller ebenfalls als Bereich $> 70\%$ und damit relativ unpräzise angegeben wird.

Sorlier et al. 2001 haben den Einfluss des Deacetylierungsgrades von Chitosan auf seine elektrostatischen Eigenschaften untersucht und beschreiben die folgenden Zusammenhänge: es gibt

einen linearen Zusammenhang zwischen dem initialen pH-Wert einer Chitosanlösung (bei einem Dissoziationsgrad nahe 0) und dem Deacetylierungsgrad. Je größer der Deacetylierungsgrad des Polymers ist, desto kleiner wird der initiale pH-Wert der Lösung. In Kapitel 3.2.2 werden die pH-Messwerte der Hydrogelformulierungen dargestellt und diskutiert.

Auch die eingesetzten Glykole haben einen sichtbaren Einfluss auf die Zirkularität zu Messbeginn aber auch über die Zeit der Probeneinlagerung. Die Zirkularität ist schon zum Startzeitpunkt der Untersuchung niedriger, als in der entsprechenden Probe ohne Glykol und es ist in allen glykolphaltigen Formulierungen eine weitere Abnahme der Zirkularität zu beobachten. Besonders deutlich zu sehen ist dies für Hydrogelformulierungen mit Pentylenglykol. Verringert sich die Zirkularität, so kann ein möglicher Verlust in der Kompaktheit des Partikels angenommen werden. Dieser Verlust kann sich wiederum negativ auf die Gesamtstabilität des Wirkstofftransportsystems auswirken und auf die Stabilität des Wirkstoffes selbst. Ist der Partikel weniger kompakt, so kann das DNAzym Molekül effektiver enzymatisch oder chemisch angegriffen und abgebaut werden. Die Parameter, welche die Kompaktheit des resultierenden Polyplexes maßgeblich beeinflussen, werden in den folgenden Kapiteln genauer betrachtet und der Zusammenhang dieser Parameter skizziert.

Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen DNAzym und Chitosan kann durch Ionen und andere Formulierungsbestandteile beeinflusst werden. Diese treten in Konkurrenz zur elektrostatischen Anziehungskraft zwischen Polyanion und Polykation.

Die folgenden Parameter können Einfluss auf die Polyplexstabilität nehmen (Domard 2011):

- Physikochemische Umgebung (Ionenstärke, pH-Wert, Temperatur)
- Art der umgebenden Ionen/Gegenionen
- Molekulares Gewicht Polyelektrolyte
- Ladungsdichte der Polyelektrolyte (räumlicher Abstand der Ladungen innerhalb des Polymers)
- Konzentration der eingesetzten Polyelektrolyte,
- Ladungsverhältnisse (im Falle von Chitosan/DNA Polyplexen das N/P-Verhältnis).

Den Einfluss verschiedener Salzkonzentrationen auf die Stabilität von Polyplexen wurde in zahlreichen Veröffentlichungen untersucht, beispielsweise in Leclercq et al. 2003, Etrych et al. 2005, Sorlier et al. 2001 Izumrudov und Zhiryakova 2011 und Mao et al. 2001. Zusammenfassend beschreiben alle Autoren, dass hohe Salzkonzentrationen, in Abhängigkeit von der Ionenart und des pH-Wertes, zu einer Dissoziation der Polyelektrolytkomplexe führen. Die ionischen Polymere werden über die konkurrierenden Salzionen vom Komplexpartner verdrängt. Kritische Konzentrationen für die Ionenstärke sind dabei individuell für die eingesetzten Polymere und Salze. Im Abschnitt 3.1 wird auf die Bindungsstärke des DNAzym-Chitosan-Polyplexes aus den Untersuchungen dieser Dissertation

tiefer eingegangen. In diesem Assay wurde, vergleichbar zu den Ethidiumbromid-Verdrängungsassays aus der Literatur, die Bindungsstärke zwischen DNAzym und Chitosan untersucht. Über diesen Fluoreszenzassay ließe sich der Einfluss verschiedener Ionen und Ionenstärken auf die Polyplexstabilität untersuchen und zur Formulierungsoptimierung einsetzen. Die Verschiebung in der Häufigkeitsverteilung der Partikelzirkularität über den Lagerzeitraum zu kleineren Werten kann zudem auf eine Aggregatbildung hinweisen. Dieser Aggregatbildung kann während der Partikelherstellung entgegengewirkt werden, beispielsweise über einen thermischen Prozess. Dieser wurde von Bugnicourt et al. 2014 beschrieben. Da sich über den betrachteten Lagerzeitraum sowohl die Morphologie und als auch die mittleren Partikeldurchmesser ändern, indiziert dies dynamische Vorgänge im Formulierungssystem, aus denen Instabilitäten der Polyplexe oder aber auch der Gesamtformulierung resultieren können.

3.2.2 Bestimmung des pH-Wertes der Hydrogele

Die folgenden Daten wurden durch Lisa Rühl im Rahmen der Anfertigung ihrer Masterarbeit mit dem Titel „Charakterisierung von Formulierungen zur dermalen Applikation DNA-basierter Wirkstoffe mittels physikochemischer Testsysteme“ erhoben. Zur Betrachtung der wirkstofffreien Formulierungsumgebung wurden Blank-Hydrogele ohne DNAzym hergestellt. Zum Vergleich wurden wirkstoffhaltige Hydrogele, mit DNAzym hgd40, hergestellt. Die pH-Werte der unterschiedlichen Hydrogelformulierungen wurden 24 Stunden nach der Herstellung und über einen Lagerzeitraum von drei Monaten überprüft, Tabelle 12. Ziel war es die Umgebungsmatrix für den Wirkstoff beschreiben zu können und mögliche Änderungen dieser über die Zeit beobachten zu können.

Tabelle 12: Messergebnisse pH-Werte der Hydrogelformulierungen, dargestellt als Mittelwert (Mean) mit Standardabweichung (s) und relativer prozentualer Standardabweichung (CV) in %. Die orange eingefärbten Zellen beinhalten die oberen 10 % der Messwerte und die blau dargestellten die unteren 10 % der Messwerte.

Hydrogel Blank, Lagertemperatur 25°C, 60 % RH												
Chitosanhydrogel	24 Stunden			1 Woche			4 Wochen			3 Monate		
	Mean	s	CV %	Mean	s	CV %	Mean	s	CV %	Mean	s	CV %
S	5,54	0,16	2,87	5,55	0,09	1,62	5,36	0,17	3,18	4,90	0,30	6,14
S 20% PG	5,38	0,06	1,02	5,47	0,04	0,76	5,32	0,05	0,87	4,86	0,02	0,31
S 5% PenG	5,43	0,04	0,65	5,45	0,02	0,38	5,26	0,03	0,61	4,71	0,03	0,68
L	4,89	0,02	0,31	4,92	0,05	1,00	4,74	0,05	0,97	4,21	0,02	0,48
L 20% PG	4,93	0,05	0,96	5,00	0,04	0,72	4,85	0,02	0,43	4,42	0,02	0,52
L 5% PenG	4,83	0,03	0,67	4,92	0,01	0,12	4,75	0,01	0,24	4,25	0,01	0,24
0,2 mg/mL DNAzym hgd40, Lagertemperatur 25°C, 60 % RH												
	24 Stunden			1 Woche			4 Wochen			3 Monate		
	Mean	s	CV %	Mean	s	CV %	Mean	s	CV %	Mean	s	CV %
S	5,42	0,03	0,59	5,53	0,07	1,27	5,27	0,01	0,19	4,68	0,02	0,37
S 20% PG	5,47	0,04	0,74	5,52	0,04	0,73	5,30	0,03	0,55	4,84	0,02	0,41
S 5% PenG	5,42	0,03	0,56	5,46	0,02	0,28	5,25	0,01	0,22	4,74	0,00	0,00
L	4,84	0,05	0,93	4,89	0,01	0,20	4,67	0,04	0,87	4,20	0,02	0,36
L 20% PG	4,93	0,03	0,62	4,94	0,05	1,02	4,91	0,04	0,73	4,39	0,01	0,13
L 5% PenG	4,87	0,06	1,17	4,90	0,01	0,24	4,76	0,01	0,12	4,25	0,01	0,27

Die beiden verwendeten Polymere Chitosan S und Chitosan L erzeugen unterschiedliche pH-Werte in den Hydrogelformulierungen. Die Herstellung von Chitosan erfolgt über die Deacetylierung von Chitin. Die resultierenden, freien Aminogruppen verteilen sich über die Chitosanpolymerkette und sind maßgeblich für die physikochemischen Eigenschaften. Die Aminogruppen liegen dann, je nach pH-Wert der Umgebung, protoniert vor. Der resultierende pH-Wert innerhalb der Formulierung ist in Bezug des eingesetzten Chitosans besonders vom Grad der Deacetylierung des Polyglucosaminrückgrades und vom Dissoziationsgrad des Polymers abhängig, ferner von der Polymerlänge. In sauren Lösungen bestehen folgende, aus der Henderson-Hasselbalch-Gleichung abgeleitete Zusammenhänge (Wang et al. 2006; Sorlier et al. 2001; Domard 1987):

Tabelle 13: Formeln zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen pKa und Dissoziationsgrad α von Chitosan (Katchalsky 1971; Domard 1987; Sorlier et al. 2001)

$K_a = \frac{[R - NH_2][H_3O^+]}{RNH_3^+}$	Formel 5
$pK_a = -\log K_a$	Formel 6
$pK_a = pH + \log\left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) = pK_0 - \frac{\epsilon \Delta\Psi_{(\alpha)}}{KT}$	Formel 7

K_a = Säure-Dissoziationskonstante

pK_a = negativ dekadischer Logarithmus K_a

pK_0 = intrinsische Dissoziationskonstante

α = Dissoziationsgrad

ϵ = dielektrische Konstante des Mediums

$\Delta\Psi$ = Differenz elektrostatisches Potential zwischen Polyionenoberfläche und Umgebung

Wang et al. 2006 haben den Einfluss der Polymerlänge auf die resultierende intrinsische Dissoziationskonstante (pK_0) untersucht, mit dem Ergebnis, dass der Einfluss der Polymerlänge im untersuchten Bereich (M_w 1370 - 60 kDa) sehr gering war. Als Erklärung für die unterschiedlichen pH-Werte der Hydrogelformulierungen scheint der Parameter des molekularen Gewichts daher vernachlässigbar zu sein. Für die in dieser Arbeit untersuchten Hydrogele wurden äquivalente Massen (2% w/w) Chitosanpolymer eingesetzt und auch der Milchsäureanteil in allen Formulierungen gleich gehalten. Es ist also festzuhalten, dass in allen Formulierungen eine nahezu gleiche Anzahl an Glucosaminuntereinheiten vorliegen. Bezugnehmend auf die Literatur kann also davon ausgegangen werden, dass die Chitosanformen S und L sich deutlich in ihrem Deacetylierungsgrad unterscheiden müssen. Aufgrund der gemessenen pH-Werte der Formulierungen im Bereich von 4,2 - 5,6 kann davon ausgegangen werden, dass alle zugänglichen Amingruppen protoniert wurden (vgl. Sorlier et al. 2001, Figure 2). Unter der Annahme, dass der Dissoziationsgrad $\alpha = 0$ ist, muss der Deacetylierungsgrad für Chitosan L höher sein als der für das Chitosanpolymer S (Wang et al. 2006). Formel 7 in der Tabelle 13 beschreibt diesen Zusammenhang. Formulierungen mit Chitosan L weisen daher einen niedrigeren pH-Wert auf, verglichen mit Hydrogelen aus Chitosan S.

Die Abnahme des pH-Werts über die Lagerperiode weist auf Polymeralterung hin. Der pH-Wert der Formulierungen mit Chitosan S fällt im Beobachtungszeitraum stärker ab (Abbildung 17). Diese Beobachtung machten auch Sorlier et al. 2002, die einen stärkeren Alterungsprozess der Polymere mit kleinerem Deacetylierungsgrad beschrieben. Bei der Lagerung von Chitosan in Lösung kann es über die Zeit zur Deprotonierung der Aminogruppen kommen und zu einer vermehrten Ausbildung von Wasserstoffbrücken im molekularen Netzwerk. Über die Freisetzung der Protonen kommt es zur Abnahme des pH-Wertes (Sorlier et al. 2002). Gleiches konnte auch von No et al. 2006 beobachtet werden. Die Autoren lagerten Chitosanlösungen bei 4 °C und 25 °C für 15 Wochen ein. Nach 15 Wochen

wurde in den bei 25 °C gelagerten Proben ein niedrigerer pH-Wert gemessen, im Vergleich zu den Referenzproben (Lagerung bei 4 °C). Bezugnehmend auf die Bilddatenanalyse der Polyplexpartikel in Kapitel 3.2.1, könnte eine Polymeralterung auch die Abnahme der Partikelzirkularität erklären. Werden die Polymerketten chemisch abgebaut, so kann dies die Partikelkompaktheit verringern wodurch auch die Polyplexzirkularität abnimmt.

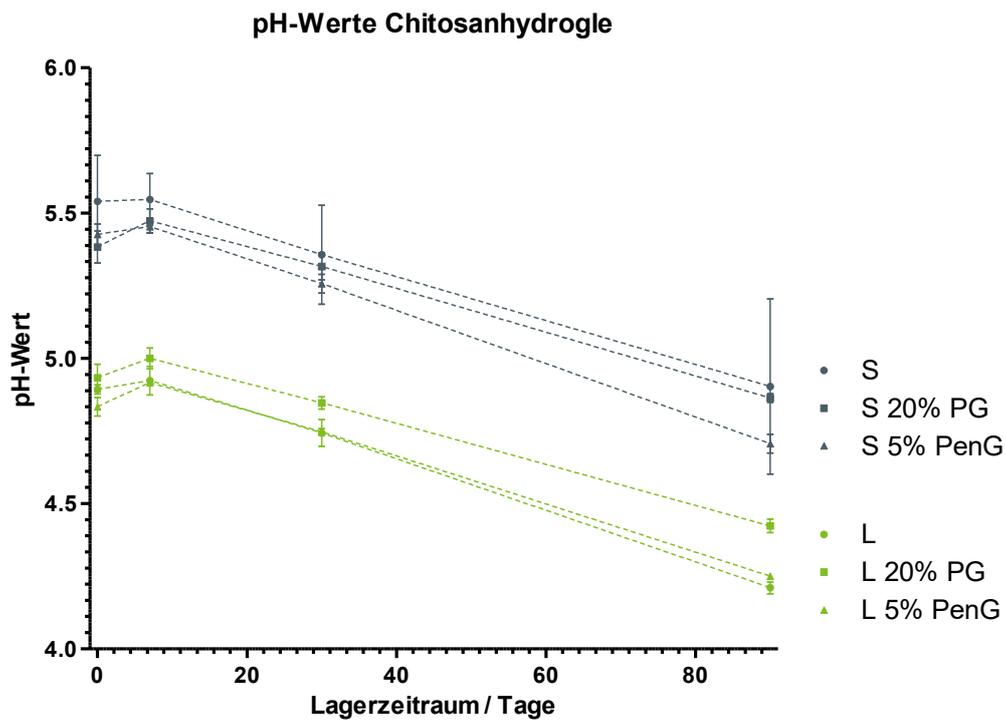


Abbildung 17: pH-Werte der Hydrogele über die Lagerperiode von 90 Tagen, grau Hydrogele Chitosan S, grün: Hydrogele mit Chitosan L. Die Hydrogele wurden bei 25 °C und 60% RH gelagert.

3.2.3 Rheologische Untersuchungen

Die Daten aus den rheologischen Untersuchungen wurden im Rahmen einer Masterthesis von Frau Lisa Rühl erhoben, mit dem Titel „Charakterisierung von Formulierungen zur dermalen Applikation DNA-basierter Wirkstoffe mittels physikochemischer Testsysteme“. Die Überprüfung der Fließeigenschaften der Hydrogele dient zunächst der Charakterisierung der Wirkstofftransportsysteme. Änderungen der Fließeigenschaften in einem definierten Beobachtungszeitraum können auf mögliche Instabilitäten des Hydrogelsystems hinweisen. Das Fließverhalten der verschiedenen Hydrogelformulierungen ist in Tabelle 14 dargestellt, (drei Herstellungsansätze pro Formulierung, einfache Messung n=3).

Tabelle 14: Ergebnisse der Carreau-Yasuda Regression für die Fließkurven der verschiedenen Chitosanhydrogele n=3, *n=2.

Chitosanhydrogel		η_0 Nullviskosität / mPa·s	λ_{CY} Zeit- konstante / s	a Yasuda- exponent	nPL Power Law index	R ²	s (η) / mPa·s	$\Delta\eta_{time}$ / %
S	t= 0*	289,2	0,0008	0,985	0,0001	0,976	3,0	12,6
	2 m	252,9	0,0079	2,051	0,9900	0,977	2,2	
S 20% PG	t= 0	559,0	0,0105	1,348	0,9900	0,998	2,7	21,4
	2 m	439,5	0,0096	1,636	0,9900	0,996	2,4	
S 5% PenG	t= 0	352,9	0,0097	1,960	0,9900	0,994	2,0	20,0
	2 m	282,2	0,0084	2,107	0,9900	0,985	2,1	
L	t= 0	12055	0,0666	0,585	0,2543	1,000	50	57,9
	2 m	5075	0,0410	0,672	0,3848	1,000	14	
L 20% PG	t= 0	39069	0,6245	0,805	0,3953	0,997	458	26,9
	2 m	28569	0,6065	0,809	0,4495	0,996	382	
L 5% PenG	t= 0	17693	0,1030	0,582	0,2529	0,999	86	45,5
	2 m	9639	0,0580	0,614	0,2951	1,000	36	

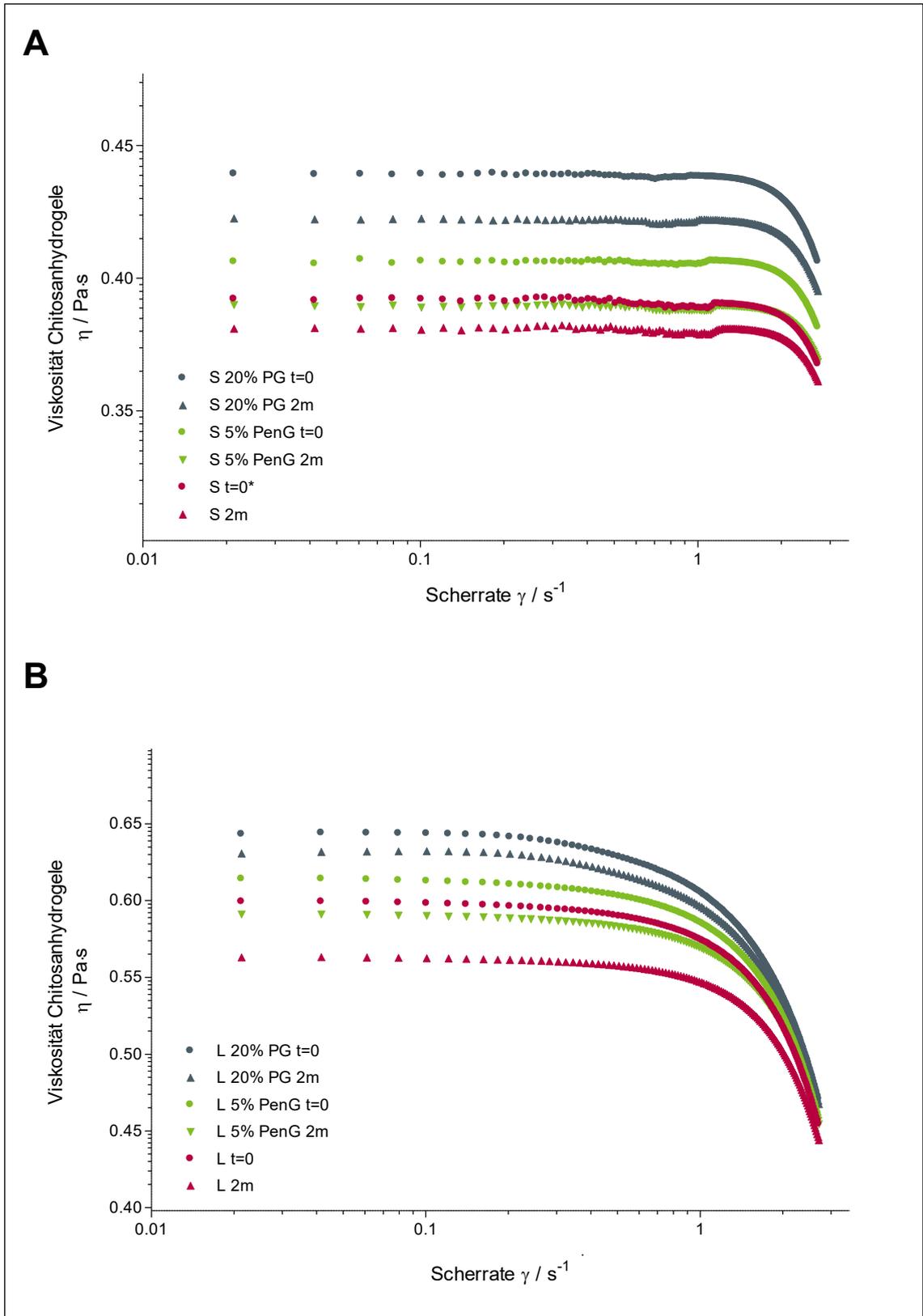


Abbildung 18: Fließkurven der Hydrogele, A Chitosan S, B Chitosan L, im Scherratenbereich von 1-500 s⁻¹, Punkt markiert die Fließkurve 24 h nach Herstellung, das Dreieck die Fließkurve nach einer Einlagerung der Hydrogele für 2 Monate bei 25° C und 65 % RH

Die Nullviskosität wurde zur Beschreibung der Hydrogele verwendet und deren Änderung über die Zeit für die Stabilitätsuntersuchung betrachtet. Die Berechnung erfolgte über die Regression nach dem Modell von Carreau-Yasuda. Das Modell erwies sich für die Beschreibung der Fließeigenschaften als geeignet, wie die Werte des Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,976-1,0 erkennen lassen. Anhand der Fließkurven in Abbildung 18 lässt sich erkennen, dass mit Chitosan L, dem Polymer mit der größeren mittleren Molekülmasse, Hydrogele mit größerer Viskosität entstehen. Des Weiteren lässt sich, bei Einsatz von Chitosan S sowie von Chitosan L, ein scherverdünnendes Fließverhalten beobachten, da die dynamische Viskosität der Probe bei zunehmenden Scherraten abnimmt. Der Power Law index zeigt, dass die Hydrogele aus Chitosan S mit n_{PL} von nahezu 1 kaum quervernetzt sind (Nyström et al. 1999). Der Einsatz von Glykolen wirkt sich ebenfalls auf das Fließverhalten der Formulierungen aus und erhöht die Nullviskosität η_0 der Hydrogele. Die Messwerte für die dynamische Viskosität der Hydrogelformulierungen nähern sich im hohen Scherratenbereich einander an, besonders die Messwerte für Hydrogelformulierungen mit Chitosan L, siehe Abbildung 18 B. Bei allen untersuchten Hydrogelformulierungen kommt es über die Zeit der Einlagerung bei 25 °C, 60% RH und 2 Monaten zu einer Reduktion der Nullviskosität (siehe $\Delta\eta_{Time}$, Tabelle 14). Diese weist auf ein instabiles Verhalten der Chitosanpolymere hin, wobei eine Fehleranfälligkeit der Messung bei kleinen Scherraten ebenfalls zu berücksichtigen ist. Die Nullviskosität η_0 der Hydrogele steht im Zusammenhang mit dem Grad der Verschlaufung der Polymermoleküle. Kommt es zu einem Abbau der Polymere, so entstehen insgesamt kürzere Polymerketten, die sich unter Einfluss von Scherkräften schneller in Bewegungsrichtung dieser Kräfte ausrichten. Es resultiert eine Abnahme der Nullviskosität η_0 der Hydrogele und damit eine Instabilität der Formulierung. Die säurekatalysierte Depolymerisierung von Chitosan ist ebenfalls in der Literatur beschrieben worden (No et al. 2006; Falk et al. 1966; Vårum et al. 2001; Il'ina und Varlamov 2004). Vårum et al. 2001 untersuchten die Kinetik des säurekatalysierten Abbaus von Chitosan in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur. Diese detektierten sie über die Änderung der Viskosität, da dieser Parameter kleinste Veränderungen in den Polymerstrukturen sehr sensitiv abbildet (Nordtveit et al. 1994). Die Autoren machten Versuche zur sauren Hydrolyse des Chitosanpolymers mit konzentrierter und verdünnter Salzsäure. Die Experimente zur Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure ergaben, dass die Menge der hydrolysierten O-glycosidischen Bindungen in etwa der Menge der de-N-acetylierten Bindungen entsprach. Hervorzuheben ist, dass bei Einsatz konzentrierter Salzsäure die O-glycosidische Bindung 10-fach schneller aufgespalten wird als die N-acetyl-Bindung. Begründet wird dieser Unterschied in den unterschiedlichen Reaktionsmechanismen, welche für die Hydrolyse der Bindungen angenommen werden.

Bezugnehmend auf die hier untersuchten Hydrogele ist die Hydrolyse in verdünnter Säure zu betrachten. Die Literatur beschreibt, dass die Depolymerisierung und die de-N-acteylierung in diesem Fall mit ähnlicher Geschwindigkeit abläuft. Die Viskosität nimmt also aufgrund der Depolymerisierung ab, bei gleichzeitigem Absinken des pH-Wertes, da über die de-N-acetylierung Essigsäure aus der Reaktion frei wird, Abbildung 19 (Vårum et al. 2001).

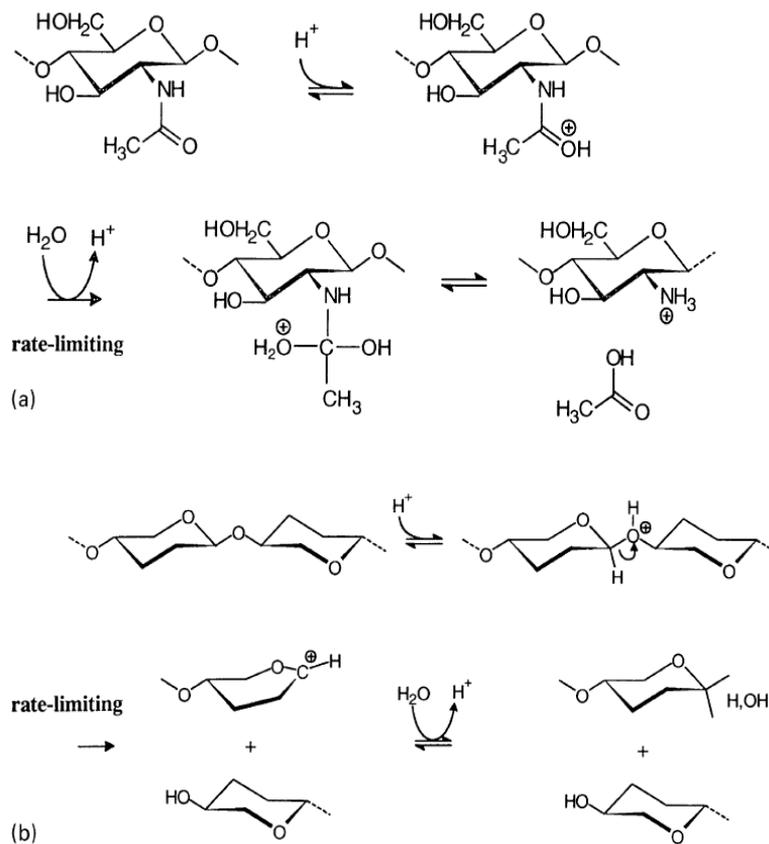


Abbildung 19: Reaktionsmechanismen saure Hydrolyse Chitosan. a) de-N-Acetylierung, b) Depolymerisierung durch Spaltung der o-glykosidischen Bindung, (Vårum et al., 2001). Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier B.V.

3.2.4 Konservierungsmittelbelastungstest KBT

Besonders halb feste Formulierungen mit einem hohen Wassergehalt sind häufig anfällig für mikrobielles Wachstum. Die entwickelten Hydrogele wurden einem extern durchgeführten Konservierungsmittelbelastungstest unterzogen. Eine mikrobiologische Wachstumskontrolle erfolgt nach 2 und 7 Tagen. Innerhalb des Testzeitraums konnte in allen Formulierungen eine ausreichend starke Reduktion der Keimbelastung nach 2 und 7 Tagen nachgewiesen werden (Reduktion > 99 %, bzw. > 99,9 % für Bakterien, Reduktion > 99 % für Pilze), die Tabelle 15 gibt dazu eine Übersicht. Die detaillierten Ergebnisse sind im Prüfbericht UEG Nr. 17-0349 dokumentiert.

Tabelle 15: Übersicht Test-Formulierungen für den Konservierungsmittelbelastungstest

Chitosanhydrogel	Bezeichnung in der Testeinrichtung UEG	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
S	Hydrogel A4	KBT bestanden				
S 20% PG	Hydrogel A1					
S 10% BG	Hydrogel A2					
S 5% PenG	Hydrogel A3					
L	Hydrogel B4					
L 20% PG	Hydrogel B1					
L 10% BG	Hydrogel B2					
L 5% PenG	Hydrogel B3					

Neben den mit Glykolen konservierten Hydrogelen, konnten auch die Formulierungen ohne Glykole den KBT bestehen. Zurückzuführen ist dies auf die antimikrobiellen Eigenschaften des Chitosanpolymers. Eine umfangreiche Übersicht zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Chitosan ist in einem Review von Sahariah und Másson 2017 zu finden. Die Autoren haben Arbeiten zur antibakteriellen sowie zur antifungalen Wirksamkeit von Chitosan in dieser Arbeit zusammengefasst. Es existieren verschiedene Theorien zum antimikrobiellen Wirkmechanismus des Polyglucosamins, wobei davon auszugehen ist, dass ein Zusammenspiel der verschiedenen Mechanismen die hohe antimikrobielle Effizienz von Chitosan begründet.

Die Bindung an divalente Ionen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} in der bakteriellen Zellwand oder der von Peptidoglykanen, im Falle von grampositiven Bakterien, kann zu einer Änderung der Membranintegrität führen. Dies kann bei hohen Einsatzkonzentrationen von Chitosan zur Lyse der Zelle führen und die Freisetzung von intrazellulären Proteinen resultieren (Chen und Cooper 2002). Über die Bindung der positiv geladenen Stickstoffgruppen des Chitosans an die Plasmamembran

können Bakterien oder Pilzelloberflächen hyperpolarisiert werden. Dies führt auch hier zu einer Schwächung der Membran und dem Austritt negativ geladener Moleküle aus der Zelle, wie Nukleotide, Phosphate und Enzymsubstrate (Peña et al. 2013). Die Änderung der Polarität der Zellmembran führt gleichzeitig zu einer veränderten Permeabilität (Liu et al. 2004). Dadurch kann der transmembrane Transport von Nährstoffen und Sauerstoff in die Zelle sowie die Ausschleusung von Ionen behindert werden.

Der positiven Ladung der NH_3^+ -Gruppen des Chitosans kommt die Schlüsselfunktion in Bezug auf die antimikrobielle Eigenschaft des Chitosans zu. Die Abhängigkeit der minimalen inhibitorischen Konzentration vom Ladungszustands des Molekülrückgrats wurde in diversen Arbeiten gezeigt (No 2002; Sahariah und Másson 2017; Rúnarsson et al. 2007).

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Hydrogele weisen einen pH-Wert von 4,2 – 5,6 auf. Das Chitosanmolekül mit einem $\text{pK}_a = 6,1 - 7,0$ (Sorlier et al. 2001) liegt in den untersuchten Hydrogelformulierung größtenteils geladen vor. Zusammen mit der hohen Einsatzkonzentration von 2 % ist keine Zugabe von konservierenden Substanzen nötig, um das Wachstum der hier betrachteten Testkeime zu verhindern. Auch das Molekulargewicht des Chitosanpolymers beeinflusst die antimikrobielle Effektivität, eine Übersicht gibt Sahariah und Másson 2017. Die optimale Polymerkettenlänge zur Wachstumshemmung ist dabei vom Bakterium und sogar von dessen Stamm abhängig. Es kann somit kein allgemein gültiges Molekulargewicht für die antimikrobielle Aktivität von Chitosan angegeben werden.

Die Molekülkettenlängen der hier untersuchten Chitosanformen S und L verteilen sich über die Bereiche 50 – 1000 kDa, beziehungsweise 50 – 5000 kDa und weisen damit einen großen, sich überschneidenden Bereich auf. Ein signifikanter Unterschied in der Effektivität der antimikrobiellen Wirksamkeit der beiden Chitosanformen konnte mit dem Versuchsaufbau dieser Arbeit daher nicht gezeigt werden. Der Bereich des Molekulargewichtes von Chitosan, welcher in diesem Versuch abgedeckt wurde, konnte eine hohe Effizienz gegenüber der Wachstumshemmung aller getesteten Keime zeigen. Der Einsatz von Chitosanpolymeren mit einer bestimmten Verteilungsbreite im molekularen Gewicht kann sich somit als Vorteil erweisen. Bezugnehmend auf den negativen Einfluss der Glykole auf die Partikelgrößenverteilung während der Lagerung, kann auf den Einsatz dieser verzichtet werden. Die konservierenden Eigenschaften des Chitosanpolymers allein waren ausreichend, um im Beobachtungszeitraum die mikrobiologische Belastung zu reduzieren.

3.2.5 Wirkstoffstabilität in Chitosanhydrogelen - Wiederfindung DNAzym Dz13

Zur abschließenden Beschreibung der Lagerstabilität der Chitosanhydrogele als Wirkstofftransportsystem für DNAzyme, wurde die Wirkstoffwiederfindung nach Einlagerung bei 25 °C und 65 % RH sowie 40 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75 % über einen Zeitraum von drei Monaten überprüft. Die Konzentrationsbestimmung von Dz13 aus den eingelagerten Chitosanhydrogelen erfolgte zu jedem Zeitpunkt in Sechsfachbestimmung n=6. Die Tabelle beschreibt die arithmetischen Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen.

Tabelle 16: Prozentuale Wiederfindung des DNAzym Dz13 aus Chitosanhydrogelen nach 30 Tagen, bzw. 2 Monaten

DNAzym Wiederfindung Mittelwert (Mean) (n=6) / %			
Chitosanhydrogel	30 Tage	2 Monate	30 Tage
	25 °C, 60% RH	25 °C, 60% RH	40 °C, 75% RH
S	100,4 ± 1,0	92,7 ± 2,3	68,9 ± 0,6
S PG 20%	97,1 ± 3,8	92,7 ± 4,0	75,8 ± 1,6
S BG 10%	90,6 ± 3,2	78,2 ± 1,1	38,3 ± 0,7
S PenG 5%	92,9 ± 1,3	88,0 ± 1,5	61,4 ± 0,8
L	94,5 ± 1,0	80,4 ± 3,8	42,5 ± 3,8
L PG 20%	96,8 ± 3,2	85,5 ± 2,3	53,0 ± 1,2
L BG 10%	85,9 ± 1,2	67,2 ± 2,9	26,4 ± 0,7
L PenG 5%	94,2 ± 2,4	86,4 ± 1,8	50,4 ± 9,5

In der Tabelle 16 sind die Messergebnisse der prozentualen Wiederfindung des intakten DNAzyms zusammengefasst worden. Es lässt sich ein deutlicher Verlust des intakten Oligonukleotids bei einer Lagerung bei 40°C erkennen, welche die einzelnen Formulierungen unterschiedlich stark beeinflusst hat. Die Abbildung 21 (A und B) verdeutlicht die Abnahme der Wiederfindung von Dz13 aus den Hydrogelen über die Versuchszeit. Die Proben, welche bei 40 °C eingelagert wurden zeigen dabei die größte Abnahme an intaktem DNAzym. Des Weiteren sind die Wiederfindungsraten bei Hydrogelformulierungen mit Chitosan L geringer als in den Formulierungen mit Chitosan S.

Über den Zeitraum des Lagerstabilitätstests konnte eine Veränderung des DNAzym Peaks im Chromatogramm beobachtet werden, Abbildung 21 C und D. Diese Beobachtung gibt erste Hinweise auf die verminderte Wiederfindung von Dz13 aus den Chitosanhydrogelmatrizes.

Die Herstellung der Chitosanhydrogele erfordert den Einsatz von Säuren, damit die deacetylierten Gruppen geladen vorliegen und das Polymer gelöst werden kann. Es ergibt sich, wie in Abschnitt Bestimmung des pH-Wertes der Hydrogele beschrieben, eine saure Umgebung für das DNAzym. In der

Literatur sind verschiedene Reaktionen auf Oligonukleotide in saurer Umgebung beschrieben. Hervorzuheben ist dabei der Effekt der säurekatalysierten Depurinierung.

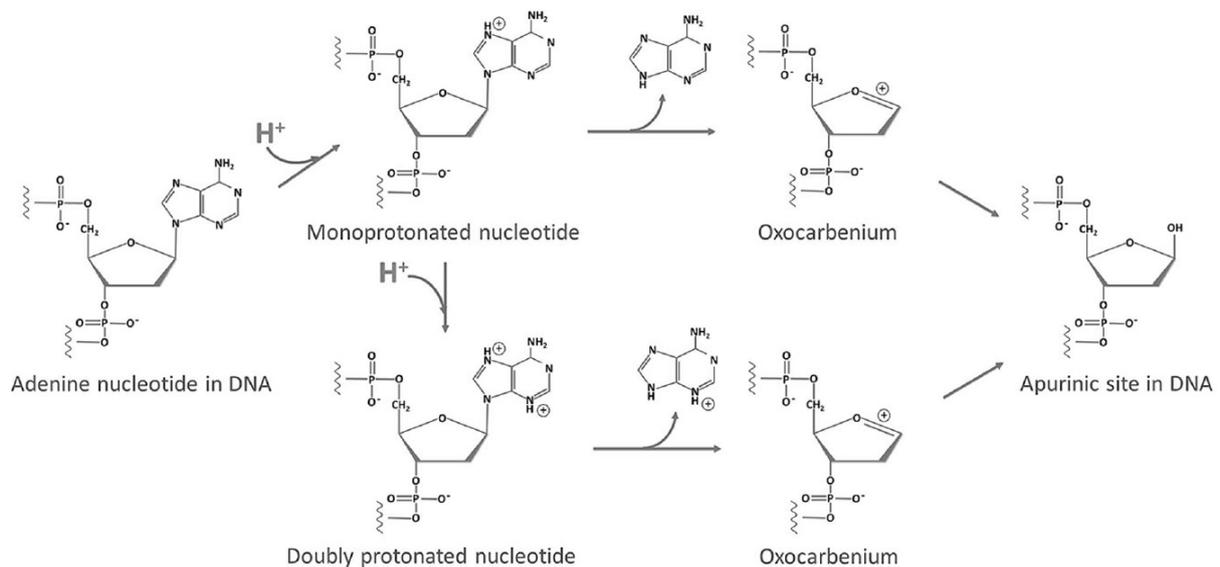


Abbildung 20: Reaktionsmechanismus säurekatalysierte Depurinierung, An et al. 2014

Bei dieser Reaktion kommt es zu einer Abspaltung der Purineinheit vom DNA-Rückgrat jedoch zunächst nicht zum Strangbruch des Oligonukleotids, Abbildung 20. Diese Reaktion könnte die beobachtete Peakschulter im Chromatogramm (Abbildung 21 D) erklären. Wäre ein komplettes Nukleotid abgespalten worden (34 nt-1), so wäre im Chromatogramm ein neuer Peak mit kleinerer Retentionszeit entstanden. Versuche zur Auflösung von sämtlichen Abbruchprodukten von Dz13 wurden in Marquardt et al. 2016 gezeigt. Jedoch ist die Peakschulter sehr schlecht getrennt vom Hauptpeak und verursacht ein Tailing des Peaks in Richtung größerer Retentionszeiten. Diese Beobachtung spricht dafür, dass eine Veränderung des Dz13-Moleküls, ohne die Abspaltung eines gesamten Nukleotids stattgefunden hat. Diese Beobachtung konnte auch in vorherigen Versuchen (Marquardt et al. 2015) gemacht werden, in der Untersuchung des Einflusses von Benzoesäure auf Dz13.

Frühe Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen der Depurinierung und dem umgebenden pH-Wert, sowie die resultierende Reaktionsgeschwindigkeit (Hevesi et al. 1972; Suzuki et al. 1994; Zoltewicz et al. 1970). Neben diesen Parametern untersuchten An et al. 2014 weitere Einflussgrößen, wie die Oligonukleotidsequenz und Sekundärstruktur. In den Untersuchungen wurden Oligonukleotide mit 30 Nukleotiden verschiedener Sequenzen untersucht. Daher besteht eine gute Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf das DNAzym Dz13, mit 34 Nukleotiden. Auch der von An et al. 2014 untersuchte pH-Wert Bereich deckt die pH-Werte der Hydrogele ab. Die Ergebnisse der Autoren zeigen, wie die Geschwindigkeitskonstante k der Depurinierungsreaktion vom pH-Wert abhängt. Im Bereich pH 4,1

wird $k_{\text{Guanin}} = 2,1 \cdot 10^{-7} \text{s}^{-1}$, $k_{\text{Adenin}} = 2,4 \cdot 10^{-7} \text{s}^{-1}$ angegeben und im Bereich von pH 5,1 mit $k_{\text{Guanin}} = 2,4 \cdot 10^{-8} \text{s}^{-1}$, $k_{\text{Adenin}} = 1,9 \cdot 10^{-8} \text{s}^{-1}$. Diese Beobachtung kann die unterschiedlichen Wiederfindungsraten für das DNAzym aus den Hydrogelformulierungen mit Chitosan S und Chitosan L aufklären. Die Hydrogelformulierungen mit Chitosan L haben im Vergleich zu denen mit Chitosan S einen niedrigeren pH-Wert (Kapitel 3.2.2), wodurch die Depurinierung des Oligonukleotids in diesem schneller abläuft. Eine erhöhte Lagertemperatur beschleunigt die Reaktion zusätzlich. Chitosan wurde in einer Studie von An et al. 2017 zum Schutz von DNA vor Depurinierung untersucht. Die Studienergebnisse zeigen einen Schutz, mit einem protektiven Effekt im sauren Bereich von pH 1,5 - 3,0. Die Autoren begründen den protektiven Effekt mit der Unterdrückung der Protonierung von Adenin und Guanin ($\text{pK}_{\text{aAdenin}} = 4,2$ und $\text{pK}_{\text{aGuanin}} = 3,4$ Verdolino et al. 2008), durch die Stickstoffgruppen des Chitosanpolymers mit einem $\text{pK}_{\text{a}} = 6,4 - 6,7$, (Filion et al. 2007). Die Amine des Chitosans liegen schon bei einem pH-Wert von 4,5 fast vollständig protoniert vor (An et al. 2017). Dieser Effekt verliert sich jedoch im pH-Wert Bereich der hier untersuchten Hydrogele (pH 4,2 - 5,6). Eine Verschiebung des pH-Wertes der Hydrogele stellt hier keine Optimierungsmöglichkeit dar, um einer Depurinierung des Oligonukleotides entgegengewirkt zu können. Da eine weitere Absenkung des pH-Wertes die Polymeralterung beschleunigen würde.

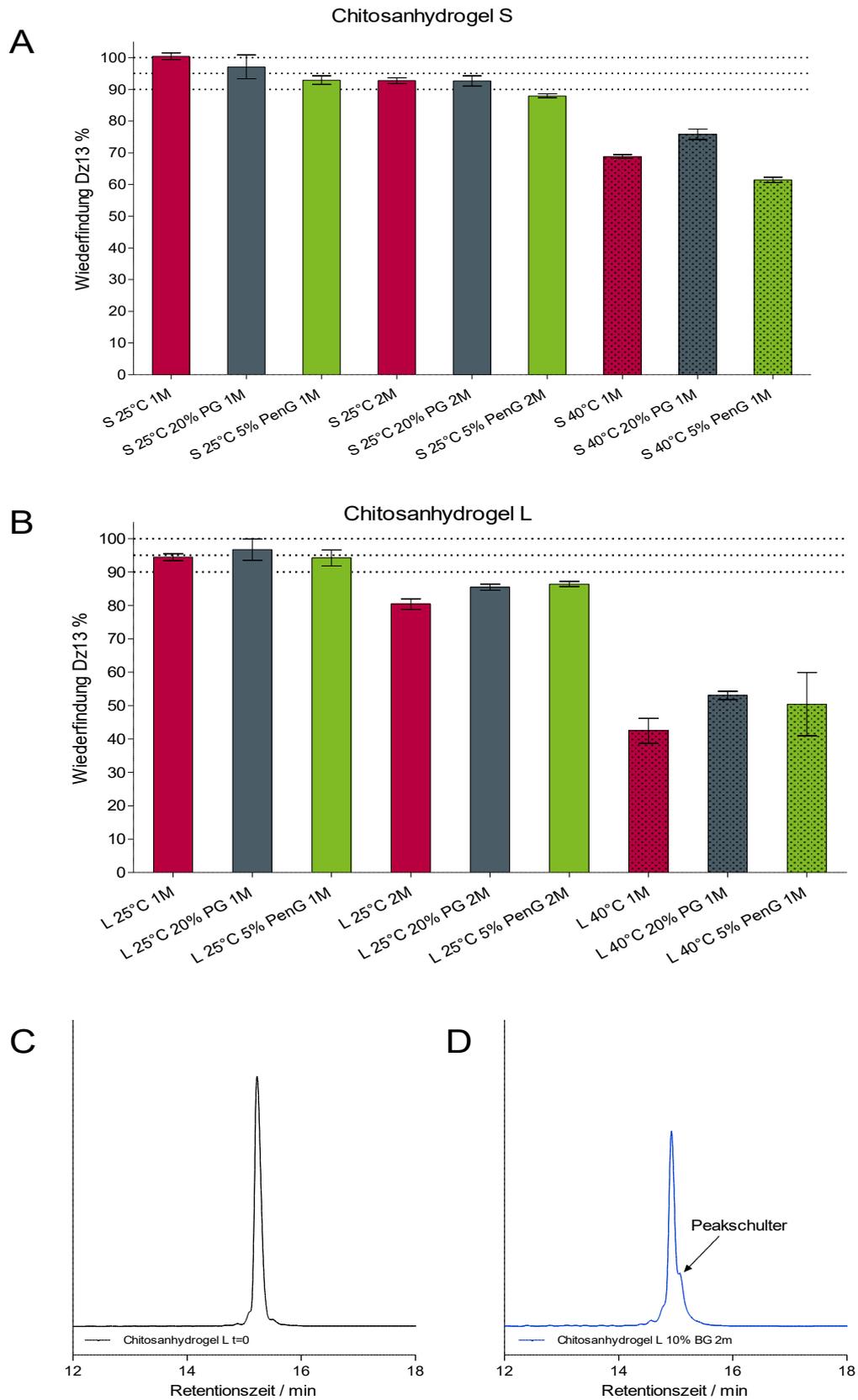


Abbildung 21: A und B prozentuale Wiederfindung Dz13 aus Chitosanhydrogelen nach Lagerung, C Dz13 aus Chitosanhydrogel L zum Startzeitpunkt der Lagerstabilitätsuntersuchung, D Chitosanhydrogel L mit 10% BG, 2 Monate nach Start der Lagerstabilitätsuntersuchung

3.3 Wirkstofftransport- und Schutzeigenschaften Galenik

3.3.1 Identifizierung DNAzym-abbauender Nukleasen und Bestimmung ihrer Aktivität

Neben einem effektiven Transport an den Wirkort muss der Schutz des Oligonukleotids vor enzymatischem Abbau eine der grundlegenden Eigenschaften des Wirkstofftransportsystems sein. Zur Überprüfung der Schutzeigenschaften des Chitosanhydrogels vor enzymatischem Abbau wurde zunächst die Nukleasefamilie identifiziert, welche hauptsächlich auf der humanen Hautoberfläche Dz13 abbaut. Die Identifizierung wurde über den Vergleich der Abbauproduktmuster im HPLC-Chromatogramm von Hautextrakten und Nukleasestandardlösungen vorgenommen (Abbildung 22).

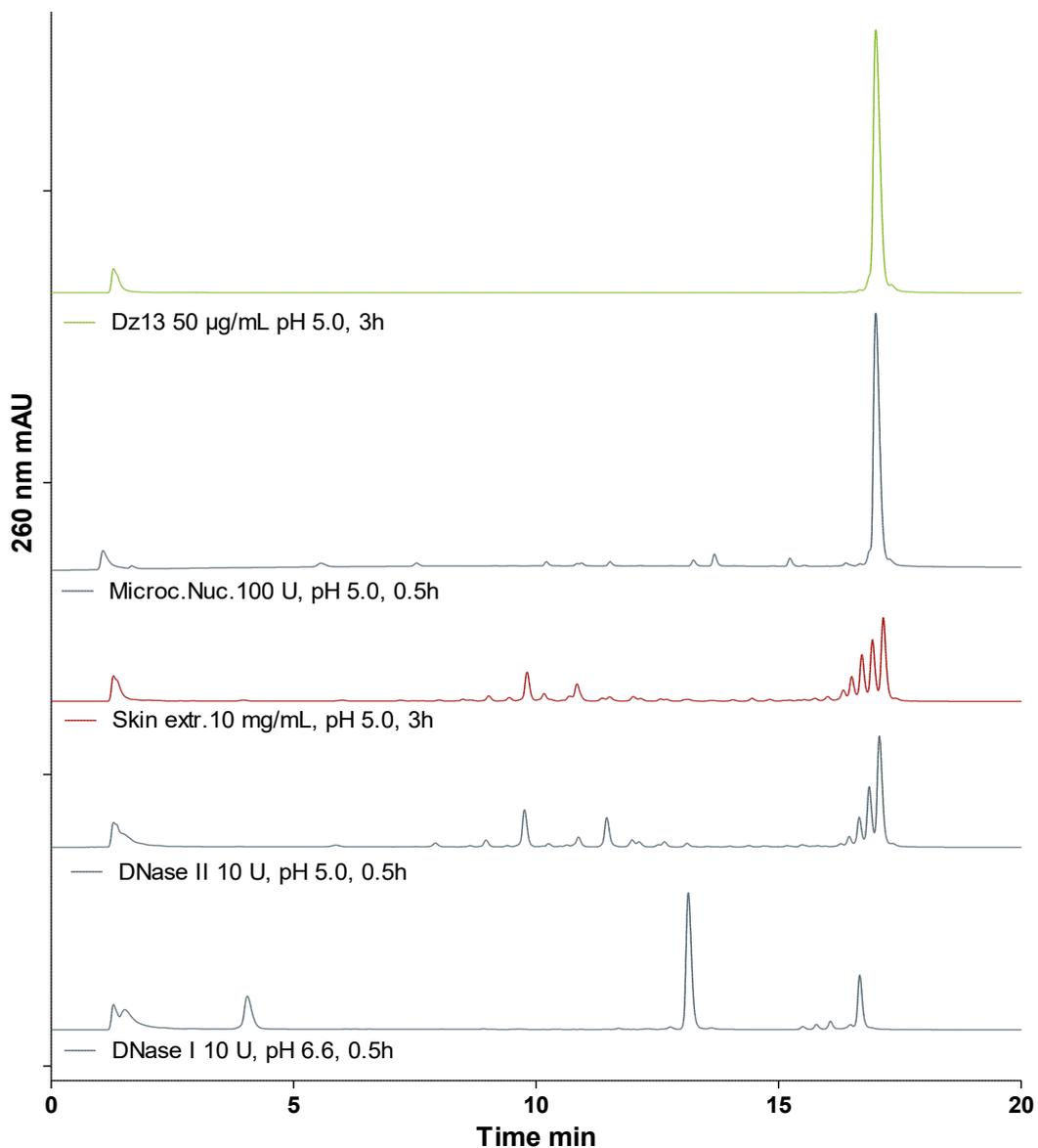


Abbildung 22: HPLC Chromatogramme der Abbauprodukte von Dz13 mit DNase I, DNase II, Hautextrakt humanes startum corneum (Skin extr.), Micrococcale Nuklease (Microc. Nuc.) und der Referenzlösung Dz13 in TEAA Puffer, pH 5,0.

Die Peakmuster der Abbauprodukte von Dz13 im Chromatogramm sind charakteristisch für jede untersuchte Nukleasefamilie. Auf Grundlage der Literatur (Fischer et al. 2011) und dem Vergleich der Abbauproduktmuster konnte der hauptsächlich enzymatische Abbau von Dz13 auf der humanen Haut der Nukleasefamilie II zugeordnet werden. Die spezifische Aktivität der DNasen auf der humanen Hautoberfläche wurde über zwei verschiedene Methoden bestimmt. Eine fluoreszenzbasierte Methode und eine Endpunktanalytik mittels HPLC wurden für die Untersuchungen in Marquardt et al. 2016 durchgeführt, mit dem Ergebnis einer spezifischen Aktivität der hautoberflächenassoziierten DNasen von 0,59 Units/mg. Die Identifizierung des Enzyms und die Bestimmung der Aktivität auf der humanen Hautoberfläche sind die Grundlage für die Entwicklung des folgenden in vitro Assays.

3.3.2 DNase II Assay – Überprüfung der Schutzfunktion der Galenik

Basierend auf der Identifizierung und Aktivitätsbestimmung wurden die Chitosanhydrogelproben mit DNase II in einem TEAA Puffersystem mit pH 5,0 inkubiert, um den Schutz des DNAzyms durch die Galenik gegenüber enzymatischem Abbau nachweisen zu können. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 graphisch dargestellt und sind detailliert im Anhang 6.4 zu finden.

Die Chitosanhydrogele zeigen insgesamt einen fast vollständigen Schutz des DNAzyms vor enzymatischem Abbau für 90 Minuten bei 32 °C. Im Fall der Formulierung Chitosanhydrogel L mit 20 % Propylenglykol ist allerdings ein Verlust von intaktem DNAzym von 11,5 % detektiert worden. Eine

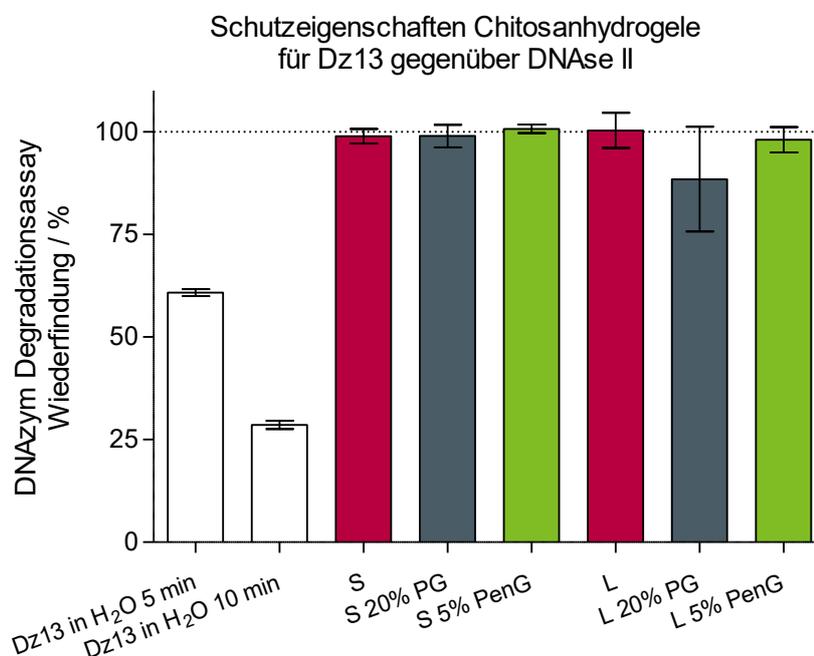


Abbildung 23: DNase II Degradationsassay, DNase II 59 U/mL Lösung wurde für 90 Minuten bei 32°C in einem TEAA Puffersystem mit pH 5,0 und verschiedenen Hydrogelformulierungen inkubiert. Als Referenz wurden wässrige Dz13 Standardlösungen (n=3) für 5 Minuten bzw. 10 Minuten mit DNase II 59 U/mL unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Wiederfindung des intakten DNAzyms Dz13(n=6) sind in Prozent dargestellt und die Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

mögliche Erklärung ist, dass eine unzureichende Extraktion des DNAzyms aus der Hydrogelmatrix nach der Inkubation mit DNase II stattgefunden hat. Die Probenaufarbeitung der Formulierung mit Chitosan L und 20 % Propylenglykol war besonders kritisch, aufgrund der hohen Probenviskosität. Die Liberation des DNAzyms während der Probenaufarbeitung kann unzureichend gewesen sein. Zudem kann eine mangelhafte Abtrennung des freien DNAzyms aus der viskosen Umgebungsmatrix Chitosan eine mögliche Fehlerquelle gewesen sein. Alle anderen Hydrogelproben zeigen eine akzeptable Wiederfindung von Dz13 im Bereich von $100 \pm 5\%$. Die Schutzfunktion der Wirkstofftransportsysteme gegenüber der DNase II konnte somit erfolgreich gezeigt werden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit ähnlichen Studien, wie beispielsweise die Arbeit von Richardson 1999. Die Polyplexe hindern die Nukleasen am enzymatischen Abbau des Oligonukleotids zunächst rein sterisch über die Ausdehnung des Biopolymers (Thibault et al. 2010). Des Weiteren sind über die ionische Wechselwirkung zwischen den Amingruppen des Chitosans und dem DNA-Rückgrat die Phosphatgruppen abgeschirmt. Die enzymatische Spaltung des Oligonukleotids durch DNasen basiert allerdings auf einem nukleophilen Angriff des Phosphats.

Die Reaktion wird über zwei Histidinreste in der Enzymbindungstasche katalysiert, wie in Cheng et al. 2006 und Varela-Ramirez et al. 2017 beschrieben. In dem zweistufigen Reaktionsmechanismus wird zunächst das Phosphoratom nukleophil angegriffen, indem das Stickstoffatom im Heterozyklus des Histidinrestes ein Elektron zur Verfügung stellt. Es kommt zu einer kovalenten Bindung des Oligonukleotids an den ersten Histidinrest. Der zweite Histidinrest stellt ein Proton zur Verfügung, wodurch es zur Abspaltung eines Rests vom Phosphatrückgrat kommt. Ein Wassermolekül wird durch den zweiten Histidinrest aktiviert. Das deprotonierte Wassermolekül greift am Phosphoratom an, wodurch die Bindung zum ersten Histidinrest gespalten wird und die Phosphatgruppe mit dem zweiten Rest aus der Reaktion hervorgeht (Varela-Ramirez et al. 2017; Cheng et al. 2006).

Dieser Prozess wird über die Maskierung der Phosphatgruppen mit Chitosan unterbunden und die elektrochemischen Umgebungsbedingungen für diese Reaktion gestört. Eine sehr große Polyplexstabilität und somit ein hoher Schutz des DNAzyms vor enzymatischem Abbau kann jedoch die Transfektionseffizienz beeinträchtigen. Ist die ionische Wechselwirkung zwischen Polykation und DNAzym zu groß, wird die Liberation des therapeutischen Oligonukleotids im Zytosol behindert mit der Konsequenz, dass keine pharmakologische Wirkung einsetzen kann. Untersuchungen zum Zusammenhang von Polyplexstärke und Transfektionseffizienz machten Thibault et al. 2010. Die Autoren beschrieben den Zusammenhang zwischen Transfektionseffizienz und Dekondensierung des Chitosanpolyplexes. Dabei konnten sie nachweisen, dass die Transfektionseffizienz an den Prozess der Freisetzung aus den Lysosomen, dem „lysosomal escape“, geknüpft ist. Polyplexe mit einer hohen Stabilität, bestehend aus Chitosan mit großem M_w und hohem Deacetylierungsgrad, dissoziierten nicht. Damit setzten sie das zu transportierende Oligonukleotid nicht frei. Polyplexe aus Chitosanen

mit zu geringem M_w dissoziierten zu früh, also vor dem lysosomal escape und zeigten daher eine geringe Transfektionseffizienz. Die besten Resultate wurden mit Polyplexen mittlerer Stabilität erzielt, da hier das ausgewogenste Gleichgewicht zwischen der Dekondensierung und dem lysosomal escape beobachtet werden konnte. Für die in diesem Abschnitt diskutierten Ergebnisse des DNase II-Assays bedeuten diese Erkenntnisse, dass die Erzielung höchster Polyplexstabilität, und damit der höchste Widerstand gegenüber von enzymatischem Abbau, nicht unbedingt erstrebenswert sind. Die Polyplexstabilität muss in einem ausgewogenen Gleichgewicht zur Wirkstofffreisetzung stehen für einen Therapieerfolg.

3.3.3 Penetrationsstudie

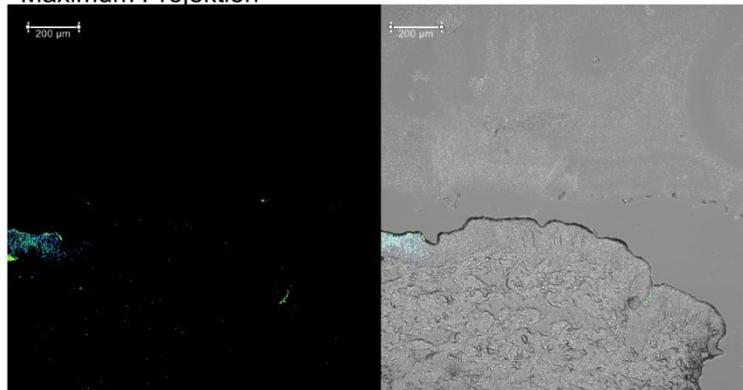
Kern dieser Arbeit ist der dermale Wirkstofftransport von DNAzymen. Um diesen so realitätsnah wie möglich untersuchen zu können wurde die Applikation der entwickelten Hydrogelformulierungen auf intakten Vollhautproben getestet. Zur Untersuchung des Wirkstofftransports in das Zielgewebe wurde ein Versuchsaufbau mit Diffusionszellen nach Franz gewählt und die Wirkstoffpenetration an frischer Schweinehaut (*Sus scrofa domestica*) beobachtet und quantifiziert. Alle Formulierungen (Dz13-Gehalt 200 µg/mL) wurden auf sechs Hautsektionen geprüft, um Unterschiede in der Hautkonstitution und einen möglichen Einfluss dieser auf die Penetrationseffizienz auszugleichen (n=6). Es wurden zudem Penetrationsversuche mit fluoreszenzmarkiertem DNAzym durchgeführt. Aus diesen Hautproben wurden Kryoschnitte angefertigt und die Lokalisation des Fluoreszenzsignals zur qualitativen Beschreibung über Konfokale Laser Scanning Mikroskopie untersucht, Abbildung 24.

Des Weiteren wurde jede der lysierten Hautproben sechsfach über einen Hybridisierungs-ELISA quantifiziert. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 25 dargestellt und werden ausführlich im Anhang 6.5 präsentiert. Zum Vergleich der DNAzym-Penetration mit und ohne Wirkstofftransportsystem wurden die Messwerte über eine Varianzanalyse (one way ANOVA) mit Dunnett-Test ausgewertet, wobei der Mittelwert der wässrigen Dz13-Probe (ohne Wirkstofftransportsystem) als Kontrollgruppe eingesetzt wurde, Anhang 6.5.

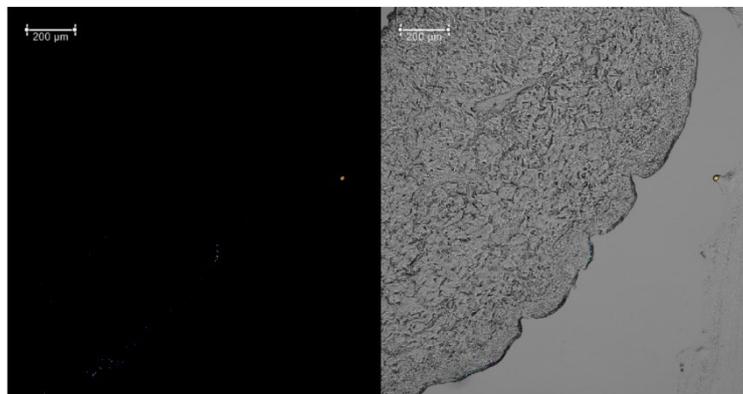
Fluoreszenzsignal
 Anregung λ : 514 nm
 Emission λ : 535 nm - 580 nm
 Maximum Projektion

Overlay
 Fluoreszenzsignal und
 Hellfeldaufnahme

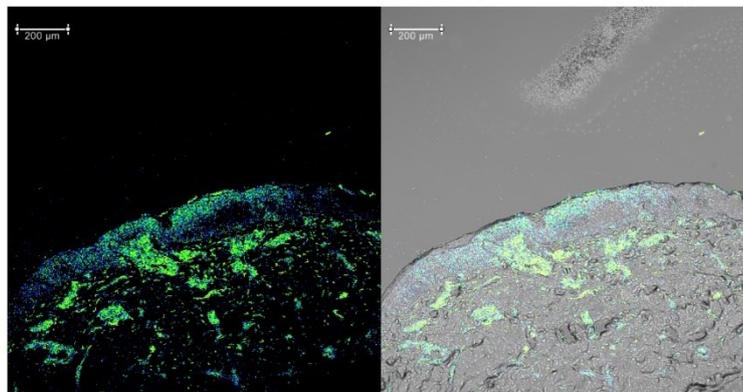
Chitosanhydrogel S
 Blank
 (Placebo)



ATTO 520-Dz13
 in PBS 200 μ g/mL



Chitosanhydrogel S mit
 ATTO 520-Dz13
 (200 μ g/mL)



Chitosanhydrogel S mit
 ATTO 520-Dz13
 (200 μ g/mL) und 20%
 Propylenglykol

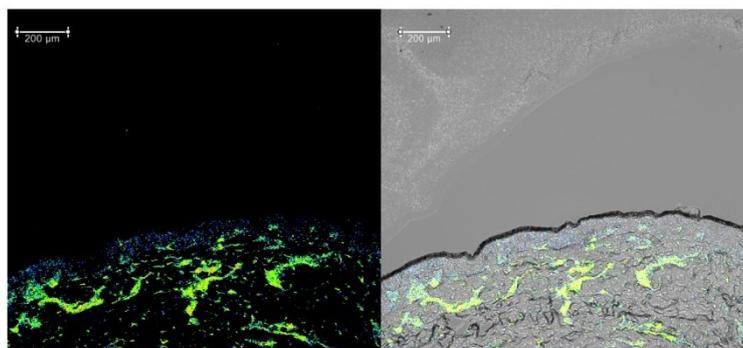


Abbildung 24: Schnitte der Schweinevollhaut aus der Penetrationsstudie. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie, Leica TCS SP5, Objektiv: HCX PL APO CS 63.0 \times 1.20 Wasser UV. Die Anregung des Farbstoffs wurde mit einem Argon Laser bei 514 nm ausgeführt und die Emission im Bereich von 535 nm – 580 nm aufgezeichnet. Dargestellt ist die Maximumprojektion eines z-Stacks mit einer Ausdehnung von 40 μ m, Bereich der LUT 40-255.

Die Probe „Chitosanhydrogel S Blank“ in Abbildung 24 beinhaltet keinen fluoreszenzmarkierten Wirkstoff, dennoch ist ein niedriges Fluoreszenzsignal zu sehen. Hautproben weisen eine Autofluoreszenz auf bei 450 nm, 520 nm und 625 nm, bei Anregungswellenlängen zwischen 340 nm und 370 nm. Verantwortlich dafür sind verschiedene in der Haut befindliche Fluorophore wie NADH, FAD, Porphyrine, Kollagen, Elastin und weitere (Na et al. 2000). Der Fluoreszenzfarbstoff ATTO 520 wurde ausgewählt, um das DNAzym Dz13 zu markieren. ATTO 520 wird in einem Wellenlängenbereich von 510 - 535 nm angeregt wird. Demnach ist der Abstand zu den Anregungswellenlängen der häufigsten Autofluoreszenzbänder der Haut ausreichend groß. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Haut Verbindungen enthält, die ebenfalls, wie ATTO 520 von der Laserlinie mit 514 nm angeregt wurden. Das Absorptions- und Emissionsspektrum der Haut ist variabel aufgrund der unterschiedlichen Fluorophorzusammensetzungen abhängig von Hautregion und Individuum (Na et al. 2000).

Chen et al. 2006 beschreiben ein Autofluoreszenzsignal bei einer Anregungswellenlänge von 514 nm, welches ein Absorptionsmaximum bei 564 nm zeigt. Jedoch geben die Autoren keinen Hinweis auf biochemische Verbindungen, welche dieses Signal liefern könnten. Die Arbeiten von Borisova et al. 2014 untersuchen Emissionsspektren der Haut mit verschiedenen Anregungswellenlängen unter anderem mit 500 nm. Die Signale des Emissionsspektrums zwischen 530 – 570 nm ordnen die Autoren Keratin und Flavinen zu. Da im hier durchgeführten Versuch der Emissionsbereich von 535 - 580 nm aufgezeichnet wurde können Signale aus der Autofluoreszenz zu einem Bildrauschen beitragen und völlig variabel bezüglich der Proben mit ihren individuellen Fluorophorzusammensetzungen sein.

In der zweiten Zeile der Abbildung 24 ist die Hautprobe dargestellt, auf welche das DNAzym in wässriger Lösung (ATTO520-Dz14 in PBS 200 µg/mL) appliziert wurde. Bis auf einige Punkte, die einem Bildrauschen zugeordnet werden können, ist kein Fluoreszenzsignal zu erkennen. Eine unzureichende Penetration des Wirkstoffes ohne Transportsystem in die Hautprobe kann angenommen werden. Oligonukleotide in wässriger Lösung können, laut Literatur, intaktes *stratum corneum* nicht überwinden (White et al. 2002; Regnier und Pr at 1998). Die Autoren Bos und Meinardi 2000 schließen in ihrem Review generell die Penetration von Molekülen über 500 Dalton aus. Dies begründen Sie damit, dass Verbindungen welche größer als 500 Dalton sind das *stratum corneum* nicht überwinden und belegen ihre Aussage mit der maximalen Molekülgröße für Kontaktallergene (meist < 712 Dalton). Die Autoren zeigen zudem einen Überblick über Molekülgrößen von gängigen, effektiven topischen Arzneimitteln, deren durchschnittliches Molekulargewicht unterhalb von 500 Dalton liegt.

Das DNAzym ist mit 10,6 kDa ein vergleichsweise sehr großes Molekül und ohne Wirkstofftransportsystem an seinem Rückgrat mehrfach negativ geladen und wirkt somit einer Penetration entgegen. Im Gegensatz zu diesen Arbeiten zeigen Lenn et al. 2018 die Penetration eines Aptamers mit 62 Nukleotiden (MW=20,4 kDa) in intakte humane Vollhaut. Allerdings wurden diese

V Versuchsergebnisse mit einem Versuchsaufbau realisiert, welcher bedingt mit der vorliegenden Penetrationsstudie zu vergleichen ist. Lenn et al. 2018 verwendeten für ihre Penetrationsuntersuchungen humane Haut, welche sich strukturell und vor allem im Behaarungsgrad von Schweinehaut unterscheidet. Nach der Entnahme wurde die humane Haut in einem Puffersystem für einen nicht definierten Zeitraum gelagert. Dies könnte ein Aufquellen des *stratum corneum* zur Folge gehabt haben, mit einhergehender Änderung der Barriereeigenschaften. Norlén et al. 1997 untersuchten das Quellverhalten des *stratum corneum* in vertikaler und horizontaler Richtung unter Einfluss der Quellzeit und der Temperatur. Die Autoren schreiben zusammenfassend, dass eine kurze Quellzeit (einige Stunden) dazu führen kann, dass sich die Hautbarriere weiter schließt, eine lange Exposition gegenüber Wasser (> 2 Stunden bis Tage) zu einer Störung der Barriere führen kann.

Im Gegensatz zur Studie von Lenn et al, wurden die Schweinhautproben zur Untersuchung der DNAzym-Penetration frisch verwendet, in die Diffusionszelle nach Franz gespannt und lediglich eine Stunde mit einem Kunststofffilm abgedeckt, um ein Austrocknen des *stratum corneum* zu verhindern. Einen weiteren großen Unterschied gibt es in der Applikationsmenge der Formulierungen. Ein Volumen von 300 µL DNAzym-beladenes Hydrogel wurde appliziert (34 µg/cm²), wobei nur 5 % des Wirkstoffes fluoreszenzmarkiert waren. In der Studie von Lenn et al. wurde eine Öl / Wasser Formulierung mit 1 % Aptamer (10 mg/cm²) aufgetragen. Die Studien sind somit aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen Herangehensweisen nur sehr eingeschränkt zu vergleichen. Eine weitere Studie untersucht die topische Administration von Plasmid DNA über die Haut und wurde von Wu et al. 2001 angefertigt. Diese zeigt ebenfalls eine geringe Penetration des Wirkstoffes in wässriger Lösung gegenüber einer wirkstoffbeladenen Nanoemulsion. Die Autoren beschreiben einen Zusammenhang zwischen der Behaarung der Probe und der Penetrationseffizienz und weisen auf einen follikulären Wirkstofftransport hin. Allerdings ist auch hier die Vergleichbarkeit der Studien gering, da die Experimente von Wu et al. 2001 an Maushaut durchgeführt wurden. Maushaut unterscheidet sich in ihrem Aufbau und der Schichtdicke im Vergleich zu humaner Haut, wodurch die Ergebnisse schlecht auf Schweine- oder Humanhaut übertragbar sind.

Die Aufnahme des Hautschnitts mit der Probe Chitosanhydrogel S zeigt ein deutliches Fluoreszenzsignal in Abschnitten des *stratum corneum* und in der Epidermis, welches zunächst abnimmt. Die großen Fluoreszenzsignale unter der Epidermis sollten nicht überbewertet werden, da hier die Bilder aus der Hellfeldaufnahme vermuten lassen, dass Falten im Hautschnitt und damit übereinanderliegende Schichten in dieser Region das Fluoreszenzsignal verstärken. Dies gilt ebenso für den Hautschnitt mit der Probe Chitosanhydrogel S mit 20% Propylenglykol. Bei dieser Probe ist insgesamt weniger Fluoreszenzsignal im *stratum corneum* lokalisiert, in der Epidermis hingegen ist ein Signal zu erkennen.

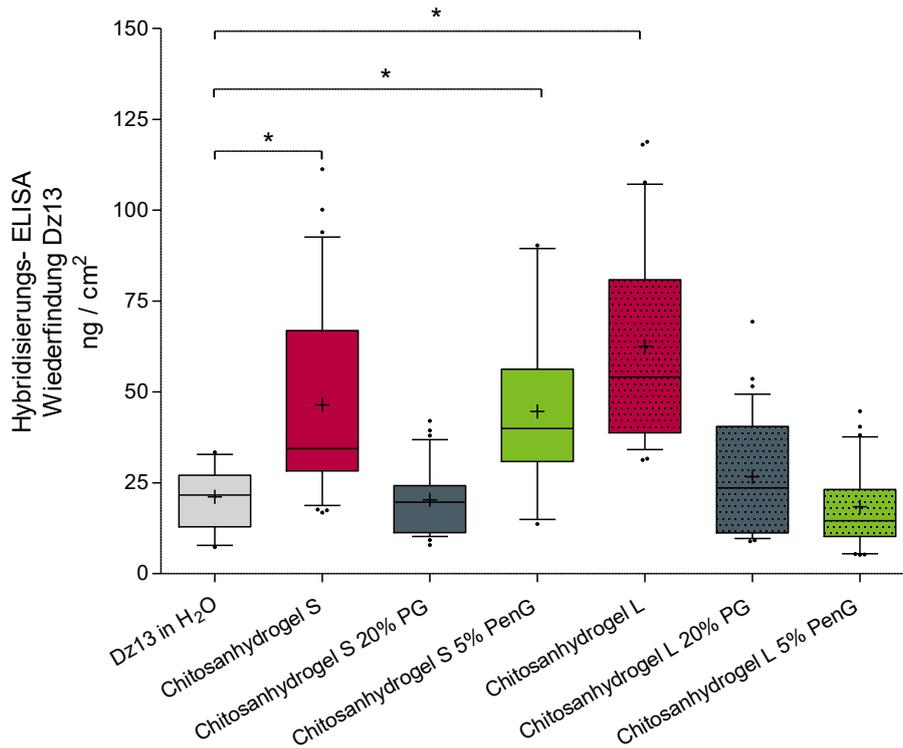


Abbildung 25: Box plot Wiederfindung von intaktem Dz13 via Hybridisierungs-ELISA. Dargestellt sind die Whisker der 10%-90% Perzentile. Formulierungen deren Dz13 Wiederfindung sich signifikant von der Wiederfindung aus der Penetration einer wässrigen Lösung Dz13 Lösung unterscheiden sind mit „*“ gekennzeichnet.

Die penetrationsfördernden Eigenschaften von Glykolen können den Transport des fluoreszenzmarkierten DNAzyms über das *stratum corneum* positiv beeinflusst haben. Die Arbeit von Brinkmann und Müller-Goymann 2005 untersucht den Mechanismus der Penetrationförderung durch Propylenglykol. Über Röntgenbeugungsanalysen (Kleinwinkel- und Weitwinkelröntgenbeugung) konnte gezeigt werden, dass es in den Bilayerstrukturen des *stratum corneum* zu einem Einschub der Glykole zwischen die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide kommt. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (Bouwstra et al. 1991), können die Autoren neben einem lateralen Einschub von Glykole auch die aufrechte Insertion zwischen die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide nachweisen.

Die Dz13-Wiederfindung mittels Hybridisierungs-ELISA zeigt bei drei Formulierungen, Chitosanhydrogel S, Chitosanhydrogel S mit 5% Pentylenglykol und Chitosanhydrogel L eine deutlich höhere Rate im Vergleich zur Kontrolle (Dz13 in H₂O), Abbildung 25. Die der Kontrolle überlegenen Formulierungen konnten Dz13 zwischen $44,6 \pm 20,9$ und $62,6 \pm 26,2$ ng/cm² in die Vollhautproben transportieren. Im Vergleich dazu wurde eine Wiederfindung von intaktem Dz13 aus wässriger Lösung von $21,1 \pm 8,1$ ng/cm² beobachtet. Die verhältnismäßig großen Standardabweichungen sind mit dem Versuchsaufbau zu begründen. Der Einsatz von Hautproben unterschiedlicher Tiere trägt Abweichungen ins Endergebnis ein, da die durchschnittliche Dicke der Haut, der physiologische

Zustand (Membranfunktion und enzymatische Aktivität) und der Behaarungsgrad variieren. Des Weiteren ist der durchgeführte Hybridisierungs-ELISA fehlerbehaftet, da er wie die meisten biologischen Quantifizierungsassays größere Varianzen im Messergebnis beinhaltet. Im Allgemeinen werden bei ELISA-basierend Quantifizierungen größere Varianzen akzeptiert (Andreasson et al. 2015; European Medicines Agency 2011).

Das *stratum corneum* stellt die größte zu überwindende Barriere dar. In der vorliegenden Studie sollte diese Barriere nicht physikalisch beeinflusst werden, wie beispielsweise durch tape-stripping, Elektroporation oder Iontophorese. Der Verzicht auf diese Methoden sollte die Anwendbarkeit und Compliance gewährleisten. Daher sollte die Penetrationsförderung chemisch erfolgen über 1) die Maskierung des negativ geladenen Rückgrates der DNA via Chitosanpolyplexbildung und 2) über den Einsatz von penetrationsfördernden Alkanolen.

Das chitosanbasierte Wirkstofftransportsystem hat zusammenfassend einen positiven Effekt auf die Wiederfindung des intakten Oligonukleotids. Maßgeblich sind dafür die Schutzfunktion der Formulierung sowie die Penetrationförderung. Die Schutzfunktion gegenüber enzymatischem Abbau wurde bereits in Kapitel 3.3.2 gezeigt und diskutiert.

Die Förderung der Penetration kann auf der Maskierung der negativen Ladungen des DNAzym-Rückgrates basieren. Über die Bildung von Polyplexen mit dem polykationischen Chitosan sind die Polyplexe nach außen hin neutral bis positiv geladen. In der Literatur sind zahlreiche Studien zu finden, welche die Transfektionseffizienz von freien DNA-Molekülen mit Polyplexen vergleichen.

White et al. 1999 untersuchten die dermale Applikation von Antisense-Oligonukleotiden, mit dem Ergebnis, dass der fluoreszenzmarkierte Wirkstoff im *stratum corneum* akkumuliert. Diese Beschreibung korreliert gut mit den CLSM-Aufnahmen der Hautproben aus den vorliegenden Untersuchungen. Wird das *stratum corneum* vor der Applikation des Oligonukleotids durch tape-stripping entfernt, so kann die DNA den Wirkort, das *stratum basale*, erreichen und in diesem Bereich im Nukleus der Keratinozyten nachgewiesen werden.

Hingegen der Erwartungen konnten Glykole die Wiederfindung des intakten Wirkstoffes nach der Penetration nicht erhöhen. Im Kapitel 3.2.5 wurde bereits ein negativer Einfluss der Alkanole auf die DNAzym-Stabilität gezeigt. Die Destabilisierung des DNAzyms durch die Polyole ist über die erhöhte Temperatur (Inkubation bei 32°C für 24 Stunden) forciert worden. Die Versuche zur Lagerstabilität wiesen schon eindeutig auf den negativen Einfluss der Temperatur auf die DNAzymstabilität in Gegenwart von Glykolen hin. Der negative Effekt der Polyplex- und DNAzymdestabilisierung, zusammen mit der Beobachtung, dass keine signifikante Steigerung der Penetrationsförderung über Glykole zu erzielen war, sollten diese für die dermale Formulierungsentwicklung für DNAzyme zukünftig ausgeschlossen werden.

Eine Penetrationsförderung wurde jedoch auch ohne den Einsatz von zusätzlichen Alkanolen beobachtet und kann mit den physikochemischen Eigenschaften des Chitosanmoleküls diskutiert werden. Der Einfluss von Chitosan auf den Wirkstofftransport in Schleimhautgewebe wurde bereits in verschiedenen Arbeiten beschrieben. Borchard et al. 1996 führten Untersuchungen an Caco-2-Monolayern durch und beschrieben die Absenkung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) durch die Inkubation der Darmzellen mit Chitosanglutamatlösung (1,5 %). Die Minderung des TEER kann die parazelluläre Aufnahme hydrophiler Wirkstoffe fördern. In der durchgeführten Studie konnte eine Absenkung des TEER auf $59,6 \pm 4,1\%$ mit Chitosanglutamat gezeigt werden.

Schipper et al. 1996; 1997 fertigten ebenfalls Studien an Caco-2 Modellen an und untersuchten den Einfluss des Deacetylierungsgrades und des Molekulargewichts verschiedener Chitosanpolymere auf die Zytotoxizität und die Penetrationsförderung. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass ein hoher Deacetylierungsgrad zwischen 85 - 99% eine dosisabhängige Zytotoxizität zeigt. Sie konnten außerdem eine penetrationsfördernde Wirkung mit hoch-, aber auch niedermolekularem Chitosan zeigen. Chitosanpolymere mit einem Deacetylierungsgrad von 51 - 65 % zeigten eine geringe Zytotoxizität, konnten allerdings nur mit hohem Molekulargewicht zur Wirkstoffpenetration beitragen. Eine sehr gute Kombination beider Parameter konnte für das Polymer mit 65 % Deacetylierung und einem Molekulargewicht von 170 kDa bestimmt werden (Schipper et al. 1996). Ausschlaggebend für die Absorptionsförderung und Bindung an die Zelloberfläche ist die positive Ladung des Chitosanrückgrats. Somit ist ein hoher Deacetylierungsgrad für die Penetrationsförderung von Wirkstoffen erforderlich (Schipper et al. 1997).

Der Mechanismus der Penetrationsförderung wird von verschiedenen Autoren folgendermaßen beschrieben: Zunächst erfolgt die Bindung des Chitosanpolymers über ionische Wechselwirkungen an die Zelloberfläche. Artursson et al. 1994 und Schipper et al. 1997 beschreiben eine Änderung in der Verteilung des Strukturproteins F-Actin mit einem verringerten Fluoreszenzsignal nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit Chitosan. Andere Autoren, wie Rosenthal et al. 2012 und Smith et al. 2004 können diesen Effekt nicht bestätigen. Hingegen zeigen alle Autoren in ihren Studien, dass es zu einer Reduzierung des Tight Junction-assoziierten Proteins ZO-1 kommt (Smith et al. 2004; Schipper et al. 1997)

3.4 Transfektion – Oligonukleotidtransport an den Wirkort

3.4.1 Zytotoxizität Dz13 auf Keratinozyten (HaCaT)

Für einen erfolgreichen Wirkstofftransport muss dieser den Wirkort erreichen. In Bezug auf therapeutische Oligonukleotide liegt dieser meist innerhalb des Zytosols, oder sogar innerhalb des Zellkerns. Die Abbildung 26 zeigt die Viabilität der HaCaT-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit DNAzym/Chitosan-Polyplexen bzw. dem Transfektionsreagenz TransIT Oligo (Polyamin-basierend). Die Messwerte wurden mit einem one-way ANOVA und dem Dunnett's Post-hoc Test geprüft, ob sie sich signifikant von den unbehandelten Zellen (PBS) unterscheiden. Die Auswertung ergaben, dass sich keine Gruppe der behandelten Zellen signifikant von den unbehandelten Zellen in ihrer Viabilität unterscheiden. Allerdings lassen die Daten einen Trend erkennen. Insgesamt weist die Viabilität aller Gruppen, die mit DNAzym behandelt wurden, große Standardabweichungen auf. Die größten Schwankungen wurden außerdem in der Gruppe beobachtet, die nur mit dem Transfektionsreagenz TransIT Oligo behandelt wurden. Der größte Anteil der Viabilitätsminderung ist bei Einsatz von TransIT Oligo scheinbar auf das Transfektionsreagenz selbst zurückzuführen. Die Chitosanpolyplexdaten weisen darauf hin, dass das Polyglucosamin in den eingesetzten Konzentrationen die Viabilität wenig

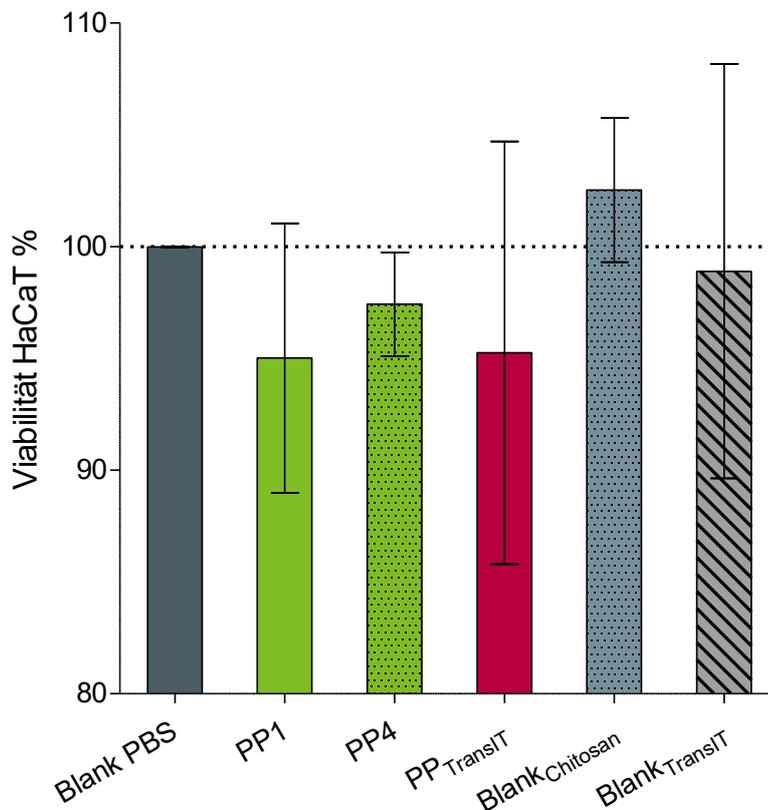


Abbildung 26: Zellviabilität HaCaTs nach Transfektion über Resazurinumsatz $n=3$ mit vier Replikaten pro Transfektionsprobe, 48 Stunden nach Transfektion mit Chitosan-DNAzym Polyplexen

beeinflusst (Blank_{Chitosan}). Die Kombination von Chitosan S und DNAzym (PP1 und PP4) hingegen scheint Einfluss auf die Viabilität zu nehmen.

Die zytotoxische Wirkung, vor allem von Guanin-Cytosin (GC) reichen DNAzymen, beschreiben Rivory et al. 2006 und Gozar et al. 2008. Die Zytotoxizität wurde in diesen Arbeiten an einer humanen mikrovaskulären Endothelzelllinie (HMEC-1) durchgeführt. Es wurden dazu in der Arbeit von Rivory et al. Konzentrationen im Bereich von 0 - 0,4 µM eingesetzt und ein IC50 für Dz13 von < 0,1 µM gezeigt. Im Transfektionsversuch der vorliegenden Arbeit wurde umgerechnet eine Dz13-Konzentration von 0,91 µM eingesetzt, jedoch keine signifikante Änderung der Viabilität beobachtet. Die Unterschiede dieser Ergebnisse können in der Sensitivität der unterschiedlichen Zelllinien (HaCaT und HMEC-1) gegenüber dem Wirkstoff begründet sein. Die Transfektionseffizienz der angewandten Methode könnte außerdem nicht ausreichend für zytotoxische Effekte innerhalb der Zellen gewesen sein. Die Autoren der Rivory et al. und Gozar et al. verwendeten für die Transfektion das auf Lipiden basierende Reagenz FuGENE6.

3.4.2 Transfektion HaCaT Zelllinie mit Dz13

Der Wirkstofftransport ins Zytosol, also die Transfektion der Zellen mit FAM-Dz13 wurde mit einer weiteren Methode überprüft. Dazu wurde das Fluoreszenzsignal von FAM-Dz13 mit einer Anregung bei 485 nm und Emission bei 528 nm gemessen nach der Transfektion und zweifachem Waschen der Zellen mit PBS. Die Ergebnisse aus zwei Versuchswiederholungen n=2 mit jeweils vier Replikaten sind in Abbildung 27 dargestellt.

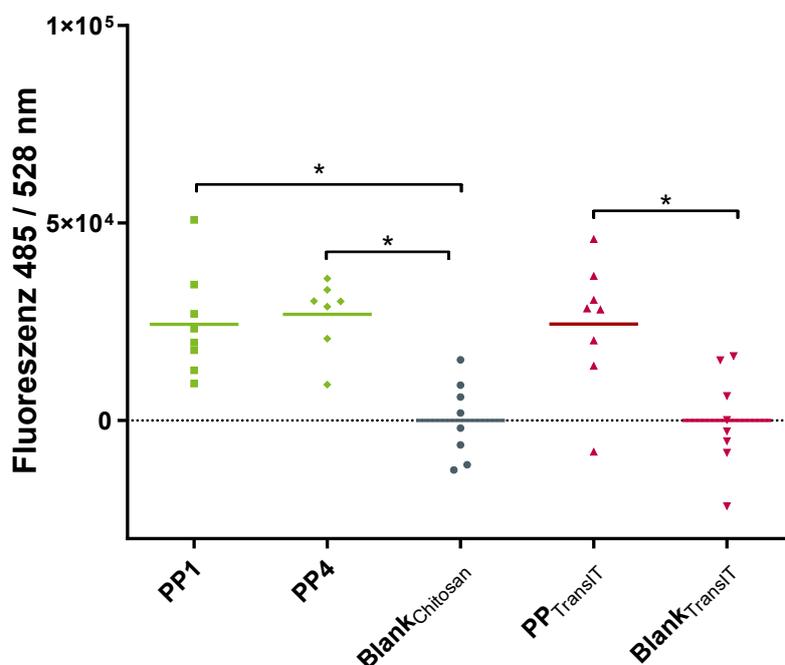


Abbildung 27: Fluoreszenzsignal FAM-Dz13, 48 Stunden nach Transfektion. Die mit „*“ gekennzeichneten Proben unterscheiden sich signifikant zur entsprechenden Blank-Probe. Die statistische Auswertung wurde anhand eines unabhängigen t-Testes durchgeführt.

In Übereinstimmung mit den Zellviabilitätsdaten sind für die Proben PP1 und PP_{TransIT} die größten Fluoreszenzsignale zu messen gewesen. Das Massenverhältnis von DNAzym und Chitosan S von 1:1 (PP1) zeigt somit eine höhere Transfektionseffizienz gegenüber den Polyplexen mit einem Massenverhältnis von 1:4. In Kapitel 3.1 konnte gezeigt werden, dass ein Massenverhältnis von Chitosan S und DNAzym von 1:1 (m/m) bereits nahezu das gesamte DNAzym als Polyplex gebunden hat. Der Polyplex PP4 kann theoretisch mit seinem Massenverhältnis von Chitosan/DNAzym von 4:1 einen Überschuss positiver Ladungen auf der Polyplexoberfläche aufweisen. Diese würden einer Transfektion entgegenwirken, da die Zellmembran am besten von ungeladenen Molekülen durchdrungen wird. Im durchgeführten Versuch ist die Transfektionseffizienz des PP1 mit den kommerziell erhältlichen TransIT-Oligo vergleichbar. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht jedoch keine Aussage über die Freisetzung am Wirkort. Hier müssen sich weitere Versuche anschließen, die auf Ebene der mRNA einen Abbau der Ziel-mRNA des DNAzyms zeigen. Alternativ könnte auf der posttranslationalen Ebene eine Abnahme des Proteins gezeigt werden, welches über die Translation der Ziel-mRNA hergestellt wird. Für eine Optimierung der Transfektionseffizienz können Polyplexe mit weiteren Massenverhältnissen und unterschiedlichen Einsatzkonzentrationen untersucht werden. Zusammenfassend können die Ergebnisse zeigen, dass eine der Hauptbarrieren im Wirkstofftransport, die Zellmembran, mit Hilfe der chitosanbasierten Polyplexe überwunden werden kann.

4 Zusammenfassung und Fazit

In der gegenwärtigen Arzneimittelentwicklung haben sich Biomoleküle als Therapeutika fest etabliert. Über sie werden Therapien für Krankheiten ermöglicht, die in der Vergangenheit als nicht therapierbar galten. Als Beispiel ist hier Spinraza zur Behandlung von spinaler Muskelatrophie zu nennen. Der Einsatz von targetspezifischen Proteinen, Antikörpern oder Oligonukleotiden eröffnet enorm vielfältige Möglichkeiten, in diversen Therapiebereichen und auch bei seltenen Krankheitsbildern.

Die Identifizierung eines Targets und das Design eines passenden Moleküls zu diesem Target sind allerdings nicht ausreichend für die erfolgreiche Entwicklung eines neuen Arzneimittels. Die Galenik des Arzneistoffs muss den Schutz des Moleküls und den Transport an den Wirkort gewährleisten. Im gleichen Maß, wie die Komplexität der Wirkstoffmoleküle vorangeschritten ist, müssen auch die Technologien zur Formulierung dieser voranschreiten.

Bezugnehmend auf diese Anforderung, wurde in der vorliegenden Arbeit die dermale Applikation von einem DNA-basierten, therapeutischen Oligonukleotid untersucht, dem DNAzym. DNAzyme sind kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle mit der Fähigkeit mRNA über ihren katalytischen Sequenzbereich spalten zu können. Als Vorlage für ihre Entwicklung dienten die natürlich vorkommenden Ribozyme, RNA-Makromoleküle mit katalytischer Aktivität. Der katalytische Sequenzbereich der DNAzyme liegt zwischen zwei Bindungsarmen, welche spezifisch die Ziel-mRNA erkennen. Seit Entwicklung dieser therapeutischen Oligonukleotide ab den frühen 1980er Jahren konnte noch kein Therapeutikum auf der Basis von DNAzymen zugelassen werden. Als großes Hindernis erweisen sich *in vivo* zu geringe Konzentrationen divalenter Ionen, welche für die Spaltung von mRNA über DNAzyme grundlegend sind. Da jedoch immer mehr Moleküle auf Oligonukleotidbasis entwickelt werden und allen eine vergleichbare Ausgangsstruktur zugrunde liegt, wurde das DNAzym in dieser Arbeit als Beispielstruktur eingesetzt, um allgemein die dermale Applikation von DNA-basierten Wirkstoffen zu prüfen.

Auf dieser Grundlage wurde für das DNAzym ein nanopartikuläres Wirkstofftransportsystem entwickelt, über den Einsatz des Biopolymers Chitosan. Dabei wurden sowohl die Grundstrukturen der Nanopartikel, sowie die äußeren Hydrogelstrukturen der Galeniken aus Chitosan aufgebaut. Hervorzuheben ist besonders die biokompatible Zusammensetzung der Applikationsform, deren Grundstruktur das nicht zytotoxische Chitosan ausmacht. Die Hydrogelformulierungen wurden zunächst auf ihre physikochemischen Eigenschaften untersucht und bewertet. Für verschiedene DNAzym/Chitosan Verhältnisse konnte eine hohe Kompaktierung des Oligonukleotids gezeigt werden, aber auch die Reversibilität der ionischen Bindung (Verdrängung von DNA über Heparin), welche wichtig ist für eine Liberation des Wirkstoffes am Wirkort. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Hydrogelformulierungen sich schwerverdünnend verhalten. Dieses rheologische Verhalten der

halbfesten Formulierung kann zu einer guten Spreitung auf der Hautoberfläche und damit zu einer gleichmäßigen Applikation des Wirkstoffes beitragen.

Die in der inneren Gelstruktur verteilten Polyplexpartikel kompaktieren das therapeutische Oligonukleotid auf eine so effektive Weise, dass es vor Abbau durch Nukleasen auf und im Zielgewebe geschützt ist. Zur Überprüfung dieser Schutzeffizienz wurde mit dieser Arbeit die Entwicklung eines spezifischen Tests unterstützt, das den Wirkort Humanhaut genauer simuliert, als dies bisher der Standard war (DNase II-Assay). Für die Entwicklung des Assays wurde im Rahmen der experimentellen Arbeiten das Enzym identifiziert, welches hauptsächlich den Abbau des DNAzyms auf dem humanem *stratum corneum* übernimmt - die DNase II. Nach der Ermittlung der spezifischen Aktivität dieser, wurden die verschiedenen Hydrogelformulierungen mit einem Überschuss an DNase II inkubiert und der Abbau des Oligonukleotids quantifiziert. Das DNAzym konnte über eine Versuchsdauer von 90 Minuten nahezu vollständig vor enzymatischem Abbau geschützt werden. Der Schutz des Wirkstoffs in Polyplexform konnte mit dem DNase II-Assay direkt nachgewiesen werden, aber auch indirekt über die Quantifizierung des intakten Wirkstoffs aus Hautproben der Penetrationsversuche. Die Penetrationsversuche zeigten die Überlegenheit der polyplexbasierten Hydrogele gegenüber wässrigen Lösungen für die Applikation von DNAzymen in Vollhautmodelle. Mit den Chitosanhydrogelen konnten ähnliche Konzentrationen DNAzym in die Haut transportiert werden, wie mit Submicronemulsionen aus früheren Studien. Allerdings konnten die Hydrogele diesen Transport auch ohne den zusätzlichen Einsatz von chemischen Penetrationsverstärkern zeigen.

Die Stabilität der Polyplexe innerhalb der Hydrogelstruktur ist bei einer Lagertemperatur von 25 °C für die meisten der untersuchten Hydrogele über zwei Monate gegeben. Allerdings ließ sich in einigen Formulierungen ein negativer Effekt von Glykolen auf die Polyplexstabilität zeigen. Zukünftige Optimierungsversuche sollten zum einen die Stabilität des Polyplexes selbst, aber auch die des Chitosanpolymers, in Betracht ziehen werden. Die Alterung des Chitosanpolymers, welche über einen Verlust der Nullviskosität gezeigt werden konnte, ist als kritisch einzustufen. Möglicherweise eignen sich Derivate des Polyglucosamins besser für die Herstellung von Hydrogelen, mit höherer Stabilität gegen Polymeralterung. Chitosan in Kombination mit verdünnter Milchsäure konnte in geringen Einsatzkonzentrationen den Konservierungsmittelbelastungstest bestehen, auch wenn Hydrogele im Allgemeinen für ihre Sensibilität gegenüber mikrobiologischem Befall bekannt sind. Auch an diesem Punkt konnte gezeigt werden, dass auf den Einsatz von Glykolen als zusätzliche Konservierungs- und penetrationsfördernde Mittel verzichtet werden kann. Die antimikrobiellen und antifungalen Eigenschaften des Chitosanhydrogels sind herausragend. Über die Anwendung als pharmazeutischen Hilfsstoff hinaus, wird der Einsatz von Chitosan in sämtlichen Bereichen diskutiert, in denen antimikrobielle Eigenschaften benötigt werden, wie der Wundversorgung oder der Lebensmittelkonservierung.

In einer ersten Überprüfung konnte gezeigt werden, dass neben der Überwindung des *stratum corneum* auch die Zellmembran von Keratinozyten mit Chitosanpolyplexen überwunden werden kann. Nachfolgend wären Untersuchungen zum lysosomal escape und der Nachweis der Funktionsfähigkeit des therapeutischen Oligonukleotids innerhalb der Zelle zur vollendeten Bewertung Studien nötig. Dies kann als Anknüpfungspunkt für zukünftige Forschungsarbeiten dienen. Die Transfektionseffizienz für Oligonukleotide mittels Chitosan ist aktuell Gegenstand der Forschung und bietet Raum zur weiteren Optimierung. Bisher fällt die Transfektionseffizienz mittels Chitosan noch geringer aus, im Vergleich zu anderen Transfektionsstrategien (Liposome, Lipoplexe). Für die weitere Erforschung spricht die geringe Zytotoxizität, die hohe Materialverfügbarkeit, die spontane Bildung der nanopartikulären Strukturen und die hohe Biokompatibilität des Polymers. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen den Wert von Chitosan als Biopolymer für die Entwicklung moderner, funktioneller Wirkstofftransportsysteme für die Administration von therapeutischen Oligonukleotiden.

5 Literaturverzeichnis

- Alatorre-Meda, Manuel; Taboada, Pablo; Hartl, Florian; Wagner, Tobias; Freis, Michael; Rodríguez, Julio R. (2011): The influence of chitosan valence on the complexation and transfection of DNA: the weaker the DNA-chitosan binding the higher the transfection efficiency. In: *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 82 (1), S. 54–62. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.08.013.
- An, Ran; Dong, Ping; Komiyama, Makoto; Pan, Xiaoming; Liang, Xingguo (2017): Inhibition of nonenzymatic depurination of nucleic acids by polycations. In: *FEBS open bio* 7 (11), S. 1707–1714. DOI: 10.1002/2211-5463.12308.
- An, Ran; Jia, Yu; Wan, Baihui; Zhang, Yanfang; Dong, Ping; Li, Jing; Liang, Xingguo (2014): Non-enzymatic depurination of nucleic acids: factors and mechanisms. In: *PLoS one* 9 (12), S. e115950. DOI: 10.1371/journal.pone.0115950.
- Andreasson, Ulf; Perret-Liaudet, Armand; van Waalwijk Doorn, Linda J. C.; Blennow, Kaj; Chiasserini, Davide; Engelborghs, Sebastiaan et al. (2015): A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. In: *Frontiers in neurology* 6, S. 179. DOI: 10.3389/fneur.2015.00179.
- Artursson, P.; Lindmark, T.; Davis, S. S.; Illum, L. (1994): Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). In: *Pharmaceutical research* 11 (9), S. 1358–1361. DOI: 10.1023/a:1018967116988.
- Barry, B.W (2002): Drug delivery routes in skin: a novel approach. In: *Advanced drug delivery reviews* 54, S31-S40. DOI: 10.1016/S0169-409X(02)00113-8.
- Bäsler, Katja; Bergmann, Sophia; Heisig, Michael; Naegel, Arne; Zorn-Kruppa, Michaela; Brandner, Johanna M. (2016): The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 242, S. 105–118. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.08.007.
- Bennett, C. Frank (2019): Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. In: *Annual review of medicine* 70, S. 307–321. DOI: 10.1146/annurev-med-041217-010829.
- Bennett, C. Frank; Baker, Brenda F.; Pham, Nguyen; Swayze, Eric; Geary, Richard S. (2017): Pharmacology of Antisense Drugs. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 57, S. 81–105. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104846.
- Benson, Heather A. E. (2011): Skin Structure, Function, and Permeation. In: Heather A. E. Benson und Adam C. Watkinson (Hg.): *Topical and Transdermal Drug Delivery*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, S. 1–22.
- Benson, Heather A. E.; Watkinson, Adam C. (Hg.) (2011): *Topical and Transdermal Drug Delivery*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. (2004): Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. In: *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 57 (1), S. 19–34. DOI: 10.1016/S0939-6411(03)00161-9.
- Bonnist, E. Y. M.; Gorce, J-P; Mackay, C.; Pendlington, R. U.; Pudney, P. D. A. (2011): Measuring the penetration of a skin sensitizer and its delivery vehicles simultaneously with confocal Raman spectroscopy. In: *Skin pharmacology and physiology* 24 (5), S. 274–283. DOI: 10.1159/000328729.
- Borchard, Gerrit; Lueßen, Henrik L.; Boer, Albertus G. de; Verhoef, J.Coos; Lehr, Claus-M.; Junginger, Hans E. (1996): The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption. III. Effects of chitosan-glutamate and carbomer on epithelial tight junctions in vitro. In: *Journal of Controlled Release* 39 (2-3), S. 131–138. DOI: 10.1016/0168-3659(95)00146-8.
- Borisova, Ekaterina G.; Angelova, Liliya P.; Pavlova, Elmira P. (2014): Endogenous and Exogenous Fluorescence Skin Cancer Diagnostics for Clinical Applications. In: *IEEE J. Select. Topics Quantum Electron.* 20 (2), S. 211–222. DOI: 10.1109/JSTQE.2013.2280503.

- Bos, J. D.; Meinardi, M. M. (2000): The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. In: *Experimental dermatology* 9 (3), S. 165–169.
- Bouwstra, J. A.; Vries, M. A. de; Gooris, G. S.; Bras, W.; Brussee, J.; Ponc, M. (1991): Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier. In: *Journal of Controlled Release* 15 (3), S. 209–219. DOI: 10.1016/0168-3659(91)90112-Q.
- Breaker, Ronald R.; Emilsson, Gail Mitchell; Lazarev, Denis; Nakamura, Shingo; Puskarz, Izabela J.; Roth, Adam; Sudarsan, Narasimhan (2003): A common speed limit for RNA-cleaving ribozymes and deoxyribozymes. In: *RNA (New York, N.Y.)* 9 (8), S. 949–957. DOI: 10.1261/rna.5670703.
- Breaker, Ronald R.; Joyce, Gerald F. (1994): A DNA enzyme that cleaves RNA. In: *Chemistry & Biology* 1 (4), S. 223–229. DOI: 10.1016/1074-5521(94)90014-0.
- Breaker, Ronald R.; Joyce, Gerald F. (1995): A DNA enzyme with Mg²⁺-dependent RNA phosphoesterase activity. In: *Chemistry & Biology* 2 (10), S. 655–660. DOI: 10.1016/1074-5521(95)90028-4.
- Brinkmann, I.; Müller-Goymann, C. C. (2005): An attempt to clarify the influence of glycerol, propylene glycol, isopropyl myristate and a combination of propylene glycol and isopropyl myristate on human stratum corneum. In: *Die Pharmazie* 60 (3), S. 215–220.
- Brown, Marc B.; Williams, A. C. (2019): The art and science of dermal formulation development. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group (Drugs and the pharmaceutical sciences).
- Bugnicourt, Loïc; Alcouffe, Pierre; Ladavière, Catherine (2014): Elaboration of chitosan nanoparticles: Favorable impact of a mild thermal treatment to obtain finely divided, spherical, and colloiddally stable objects. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 457, S. 476–486. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2014.06.029.
- Candi, Eleonora; Schmidt, Rainer; Melino, Gerry (2005): The cornified envelope. A model of cell death in the skin. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (4), S. 328–340. DOI: 10.1038/nrm1619.
- Chen, Chris Zhisheng; Cooper, Stuart L. (2002): Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. In: *Biomaterials* 23 (16), S. 3359–3368. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00036-4.
- Chen, Jianxin; Zhuo, Shuangmu; Luo, Tianshu; Jiang, Xingshan; Zhao, Jingjun (2006): Spectral characteristics of autofluorescence and second harmonic generation from ex vivo human skin induced by femtosecond laser and visible lasers. In: *Scanning* 28 (6), S. 319–326. DOI: 10.1002/sca.4950280604.
- Cheng, Yu-Che; Hsueh, Chin-Chen; Lu, Shao-Chun; Liao, Ta-Hsiu (2006): Identification of three crucial histidine residues (His115, His132 and His297) in porcine deoxyribonuclease II. In: *The Biochemical journal* 398 (2), S. 177–185. DOI: 10.1042/BJ20060564.
- Clamme, Jean Pierre; Azoulay, Joel; Mély, Yves (2003): Monitoring of the Formation and Dissociation of Polyethylenimine/DNA Complexes by Two Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Biophysical journal* 84 (3), S. 1960–1968. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)75004-8.
- Clark, David P.; Pazdernik, Nanette J. (2016): RNA-Based Technologies. In: *Biotechnology*: Elsevier, S. 131–179.
- CLS Cell Lines Service GmbH: CLS Product Information: HaCaT, 300493. Culture Conditions and Handling. Hg. v. CLS Cell Lines Service GmbH. Online verfügbar unter <https://www.clsgmbh.de/pdf/hacat.pdf>, zuletzt geprüft am 20.03.2021.
- Crooke, Stanley T.; Witztum, Joseph L.; Bennett, C. Frank; Baker, Brenda F. (2018): RNA-Targeted Therapeutics. In: *Cell metabolism* 27 (4), S. 714–739. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.03.004.
- Crooke, Stanley Thomas (Hg.) (2008): Antisense drug technology. Principles, strategies, and applications. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press.

- Danielsen, Signe; Maurstad, Gjertrud; Stokke, Bjørn T. (2005a): DNA-polycation complexation and polyplex stability in the presence of competing polyanions. In: *Biopolymers* 77 (2), S. 86–97. DOI: 10.1002/bip.20170.
- Danielsen, Signe; Strand, Sabina; Lange Davies, Catharina de; Stokke, Bjørn T. (2005b): Glycosaminoglycan destabilization of DNA-chitosan polyplexes for gene delivery depends on chitosan chain length and GAG properties. In: *Biochimica et biophysica acta* 1721 (1-3), S. 44–54. DOI: 10.1016/j.bbagen.2004.10.011.
- Dicke, Tanja Maria (2009): Characterisation of GATA-3-specific DNazymes and analysis of their therapeutic potency in experimental models of allergic bronchial asthma. Unter Mitarbeit von Holger Garn und Physiologische Chemie.
- Domard, A. (1987): pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan. Application to Cull—polymer interactions. In: *International journal of biological macromolecules* 9 (2), S. 98–104. DOI: 10.1016/0141-8130(87)90033-X.
- Domard, A. (2011): A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. In: *Carbohydrate Polymers* 84 (2), S. 696–703. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.04.083.
- Dragicevic, Nina; Maibach, Howard I. (2015): Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Dutta, Pradip Kumar (2016): Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine. New Delhi: Springer India.
- Eckhart, Leopold; Lippens, Saskia; Tschachler, Erwin; Declercq, Wim (2013): Cell death by cornification. In: *Biochimica et biophysica acta* 1833 (12), S. 3471–3480. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.010.
- Eicher, Anna-Carola; Dobler, Dorota; Kiselmann, C.; Schmidts, Thomas; Runkel, Frank (2019): Dermal delivery of therapeutic DNazymes via chitosan hydrogels. In: *International journal of pharmaceutics* 563, S. 208–216. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.04.005.
- Emilsson, Gail Mitchell; Nakamura, Shingo; Roth, Adam; Breaker, Ronald R. (2003): Ribozyme speed limits. In: *RNA (New York, N.Y.)* 9 (8), S. 907–918. DOI: 10.1261/rna.5680603.
- Essa, Ebtessam A.; Bonner, Michael C.; Barry, Brian W. (2002): Human skin sandwich for assessing shunt route penetration during passive and iontophoretic drug and liposome delivery. In: *The Journal of pharmacy and pharmacology* 54 (11), S. 1481–1490. DOI: 10.1211/002235702135.
- Etrych, Tomás; Leclercq, Laurent; Boustta, Mahfoud; Vert, Michel (2005): Polyelectrolyte complex formation and stability when mixing polyanions and polycations in salted media. A model study related to the case of body fluids. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 25 (2-3), S. 281–288. DOI: 10.1016/j.ejps.2005.03.005.
- European Medicines Agency (2011): Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**. Fundstelle: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf.
- European Medicines Agency (2017): Propylene glycol used as an excipient. Report published in support of the 'Questions and answers on propylene glycol used as an excipient in medicinal products for human use' (EMA/CHMP/704195/2013. Hg. v. Committee for Human Medicinal Products (CHMP) ((EMA/CHMP/704195/2013)). Online verfügbar unter https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/propylene-glycol-used-excipient-report-published-support-questions-answers-propylene-glycol-used_en.pdf, zuletzt geprüft am 30.01.2021.
- Falk, Michael; Smith, D. G.; McLachlan, J.; McInnes, A. G. (1966): Studies on chitan (β -(1 → 4)-linked 2-acetamido-2-deoxy- D -glucan) fibers of the diatom thalassiosira fluviatilis hustedt: II. Proton

- magnetic resonance, infrared, and x-ray studies. In: *Can. J. Chem.* 44 (19), S. 2269–2281. DOI: 10.1139/v66-342.
- Filion, Dominic; Lavertu, Marc; Buschmann, Michael D. (2007): Ionization and solubility of chitosan solutions related to thermosensitive chitosan/glycerol-phosphate systems. In: *Biomacromolecules* 8 (10), S. 3224–3234. DOI: 10.1021/bm700520m.
- Fischer, Heinz; Buchberger, Maria; Napirei, Markus; Tschachler, Erwin; Eckhart, Leopold (2017): Inactivation of DNase1L2 and DNase2 in keratinocytes suppresses DNA degradation during epidermal cornification and results in constitutive parakeratosis. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 6433. DOI: 10.1038/s41598-017-06652-8.
- Fischer, Heinz; Scherz, Jennifer; Szabo, Sandra; Mildner, Michael; Benarafa, Charaf; Torriglia, Alicia et al. (2011): DNase 2 is the main DNA-degrading enzyme of the stratum corneum. In: *PloS one* 6 (3), e17581. DOI: 10.1371/journal.pone.0017581.
- Funkhouser, Jane D.; Aronson, Nathan N. (2007): Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. In: *BMC evolutionary biology* 7, S. 96. DOI: 10.1186/1471-2148-7-96.
- Gibson, Mark (2009): Pharmaceutical preformulation and formulation. A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form. 2nd ed. New York: Informa Healthcare (Drugs and the pharmaceutical sciences, v. 199). Online verfügbar unter <http://lib.myilibrary.com/detail.asp?id=227830>.
- Gozar, Mary Margaret; Goodchild, Amber; Passioura, Toby; King, Andrew; Lai, Angela; Witherington, Craig; Rivory, Laurent (2008): Dz13, a DNAzyme targeting c-jun, induces off-target cytotoxicity in endothelial cells with features of nonapoptotic programmed cell death. In: *Oligonucleotides* 18 (3), S. 257–268. DOI: 10.1089/oli.2008.0139.
- Hevesi, L.; Wolfson-Davidson, E.; Nagy, J. B.; Nagy, O. B.; Bruylants, A. (1972): Contribution to the mechanism of the acid-catalyzed hydrolysis of purine nucleosides. In: *Journal of the American Chemical Society* 94 (13), S. 4715–4720. DOI: 10.1021/ja00768a046.
- Hoelgaard, Annie; Møllgaard, Birgitte (1985): Dermal drug delivery — Improvement by choice of vehicle or drug derivative. In: *Journal of Controlled Release* 2, S. 111–120. DOI: 10.1016/0168-3659(85)90037-9.
- Ihms, Hannah E.; Lu, Yi (2012): In vitro selection of metal ion-selective DNAzymes. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 848, S. 297–316. DOI: 10.1007/978-1-61779-545-9_18.
- Il'ina, A. V.; Varlamov, V. P. (2004): Hydrolysis of Chitosan in Lactic Acid. In: *Applied Biochemistry and Microbiology* 40 (3), S. 300–303. DOI: 10.1023/B:ABIM.0000025956.98250.30.
- Illum, L.; Farraj, N. F.; Davis, S. S. (1994): Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. In: *Pharmaceutical research* 11 (8), S. 1186–1189. DOI: 10.1023/A:1018901302450.
- Izumrudov, V. A.; Zhiryakova, M. V. (2011): Competitive reactions in solutions of the complex of chitosan and DNA. In: *Polym. Sci. Ser. A* 53 (6), S. 441–448. DOI: 10.1134/S0965545X1106006X.
- Johnson, Wilbur; Bergfeld, Wilma F.; Belsito, Donald V.; Hill, Ronald A.; Klaassen, Curtis D.; Liebler, Daniel et al. (2012): Safety assessment of 1,2-glycols as used in cosmetics. In: *International journal of toxicology* 31 (5 Suppl), 147S–68S. DOI: 10.1177/1091581812460409.
- Joyce, Gerald F. (2001): RNA Cleavage by the 10-23 DNA Enzyme. In: *Ribonucleases - Part A, Bd. 341: Elsevier (Methods in Enzymology)*, S. 503–517.
- Katchalsky, A. (1971): Polyelectrolytes. In: *Pure and Applied Chemistry* 26 (3-4), S. 327–374. DOI: 10.1351/pac197126030327.
- Kean, T.; Thanou, M. (2010): Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. In: *Advanced drug delivery reviews* 62 (1), S. 3–11. DOI: 10.1016/j.addr.2009.09.004.
- Knapczyk, J. (1993): Chitosan hydrogel as a base for semisolid drug forms. In: *International journal of pharmaceutics* 93 (1-3), S. 233–237. DOI: 10.1016/0378-5173(93)90182-F.

- Kronberg, Bengt; Holmberg, Krister; Lindman, Björn (Hg.) (2014): *Surface Chemistry of Surfactants and Polymers*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Kruger, Kelly; Grabowski, Paula J.; Zaug, Arthur J.; Sands, Julie; Gottschling, Daniel E.; Cech, Thomas R. (1982): Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. In: *Cell* 31 (1), S. 147–157. DOI: 10.1016/0092-8674(82)90414-7.
- Kumar, M. N. V. Ravi; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A. J. (2004): Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. In: *Chemical reviews* 104 (12), S. 6017–6084. DOI: 10.1021/cr030441b.
- Lai, Jui-Yang; Li, Ya-Ting; Wang, Tsu-Pin (2010): In vitro response of retinal pigment epithelial cells exposed to chitosan materials prepared with different cross-linkers. In: *International journal of molecular sciences* 11 (12), S. 5256–5272. DOI: 10.3390/ijms11125256.
- Leclercq, Laurent; Boustta, Mahfoud; Vert, Michel (2003): A physico-chemical approach of polyanion-polycation interactions aimed at better understanding the in vivo behaviour of polyelectrolyte-based drug delivery and gene transfection. In: *Journal of drug targeting* 11 (3), S. 129–138. DOI: 10.1080/1061186031000150287.
- Lenn, Jon D.; Neil, Jessica; Donahue, Christine; Demock, Kellie; Tibbetts, Caitlin Vestal; Cote-Sierra, Javier et al. (2018): RNA Aptamer Delivery through Intact Human Skin. In: *The Journal of investigative dermatology* 138 (2), S. 282–290. DOI: 10.1016/j.jid.2017.07.851.
- Liu, Hui; Du, Yumin; Wang, Xiaohui; Sun, Liping (2004): Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. In: *International journal of food microbiology* 95 (2), S. 147–155. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022.
- Liu, Tai-Xiang; Wang, Zheng (2017): Biomechanics of sclera crosslinked using genipin in rabbit. In: *International journal of ophthalmology* 10 (3), S. 355–360. DOI: 10.18240/ijo.2017.03.05.
- Lücke, J.; Bädeker, M.; Hildinger, M. (2019): Biotech-Report. Medizinische Biotechnologie in Deutschland 2019. Hg. v. Boston Consulting Group GmbH (Medizinische Biotechnologie in Deutschland). Online verfügbar unter www.vfa.de/de/presse/publikationen.
- Ma, Pei Lian; Lavertu, Marc; Winnik, Françoise M.; Buschmann, Michael D. (2009): New insights into chitosan-DNA interactions using isothermal titration microcalorimetry. In: *Biomacromolecules* 10 (6), S. 1490–1499. DOI: 10.1021/bm900097s.
- Mao, Hai-Quan; Roy, Krishnendu; Troung-Le, Vu L.; Janes, Kevin A.; Lin, Kevin Y.; Wang, Yan et al. (2001): Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. In: *Journal of Controlled Release* 70 (3), S. 399–421. DOI: 10.1016/S0168-3659(00)00361-8.
- Marquardt, Kay; Eicher, Anna-Carola; Dobler, Dorota; Hofer, Frank; Schmidts, Thomas; Schafer, Jens et al. (2016): Degradation and protection of DNazymes on human skin. In: *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 107, S. 80–87. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.07.001.
- Marquardt, Kay; Eicher, Anna-Carola; Dobler, Dorota; Mäder, Ulf; Schmidts, Thomas; Renz, Harald; Runkel, Frank (2015): Development of a protective dermal drug delivery system for therapeutic DNazymes. In: *International journal of pharmaceuticals* 479 (1), S. 150–158. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.043.
- Maurstad, Gjertrud; Danielsen, Signe; Stokke, Bjørn T. (2007): The influence of charge density of chitosan in the compaction of the polyanions DNA and xanthan. In: *Biomacromolecules* 8 (4), S. 1124–1130. DOI: 10.1021/bm0610119.
- Meibohm, Bernd (2013): Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Peptide and Protein Therapeutics. In: Daan J. A. Crommelin, Robert D. Sindelar und Bernd Meibohm (Hg.): *Pharmaceutical Biotechnology*. New York, NY: Springer New York, S. 101–132.

- Muzzarelli, Riccardo A. A.; El Mehtedi, Mohamad; Bottegoni, Carlo; Gigante, Antonio (2016): Physical properties imparted by genipin to chitosan for tissue regeneration with human stem cells: A review. In: *International journal of biological macromolecules* 93 (Pt B), S. 1366–1381. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.03.075.
- Na, Renhua; Stender, Ida-Marie; Ma, Lixin; Wulf, Hans Christian (2000): Autofluorescence spectrum of skin: component bands and body site variations. In: *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)* 6 (3), S. 112–117. DOI: 10.1034/j.1600-0846.2000.006003112.x.
- Nelson, David L.; Cox, Michael M. (2017): *Lehninger principles of biochemistry*. Seventh edition, international edition. New York NY, Houndmills, Basingstoke: W.H. Freeman; Macmillan Higher Education.
- No, H. (2002): Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. In: *International journal of food microbiology* 74 (1-2), S. 65–72. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00717-6.
- No, Hong Kyoon; Kim, Su Hyun; Lee, Shin Ho; Park, Na Young; Prinyawiwatkul, Witoon (2006): Stability and antibacterial activity of chitosan solutions affected by storage temperature and time. In: *Carbohydrate Polymers* 65 (2), S. 174–178. DOI: 10.1016/j.carbpol.2005.12.036.
- Nordtveit, Ragnhild J.; Vårum, Kjell M.; Smidsrød, Olav (1994): Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozyme. In: *Carbohydrate Polymers* 23 (4), S. 253–260. DOI: 10.1016/0144-8617(94)90187-2.
- Norlén, L.; Emilson, A.; Forslind, B. (1997): Stratum corneum swelling. Biophysical and computer assisted quantitative assessments. In: *Archives of dermatological research* 289 (9), S. 506–513. DOI: 10.1007/s004030050231.
- Nyström, Bo; Kjøniksen, Anna-Lena; Iversen, Christian (1999): Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity. Part of this paper was presented at the conference on 'Associating Polymer', Fontevraud, France, November 1997.1. In: *Advances in Colloid and Interface Science* 79 (2-3), S. 81–103. DOI: 10.1016/S0001-8686(98)00069-4.
- Peers, S.; Montebault, A.; Ladavière, C. (2020): Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 326, S. 150–163. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.06.012.
- Peña, Antonio; Sánchez, Norma Silvia; Calahorra, Martha (2013): Effects of chitosan on *Candida albicans*: conditions for its antifungal activity. In: *BioMed research international*, S. 527549. DOI: 10.1155/2013/527549.
- Peters, Sheila Annie (2012): *Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulations. Principles, Methods, and Applications in the Pharmaceutical Industry*. Hoboken: John Wiley & Sons. Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=448024>.
- Ponce-Salvatierra, Almudena; Wawrzyniak-Turek, Katarzyna; Steuerwald, Ulrich; Höbartner, Claudia; Pena, Vladimir (2016): Crystal structure of a DNA catalyst. In: *Nature* 529 (7585), S. 231–234. DOI: 10.1038/nature16471.
- Quianzon, Celeste C.; Cheikh, Issam (2012): History of insulin. In: *Journal of community hospital internal medicine perspectives* 2 (2). DOI: 10.3402/jchimp.v2i2.18701.
- Rabea, Entsar I.; Badawy, Mohamed E-T; Stevens, Christian V.; Smagghe, Guy; Steurbaut, Walter (2003): Chitosan as antimicrobial agent. Applications and mode of action. In: *Biomacromolecules* 4 (6), S. 1457–1465. DOI: 10.1021/bm034130m.

- Racine, Lisa; Texier, Isabelle; Auzély-Velty, Rachel (2017): Chitosan-based hydrogels: recent design concepts to tailor properties and functions. In: *Polym. Int* 66 (7), S. 981–998. DOI: 10.1002/pi.5331.
- Rathee, Vikramjit S.; Sidky, Hythem; Sikora, Benjamin J.; Whitmer, Jonathan K. (2018): Role of Associative Charging in the Entropy-Energy Balance of Polyelectrolyte Complexes. In: *Journal of the American Chemical Society* 140 (45), S. 15319–15328. DOI: 10.1021/jacs.8b08649.
- Regnier, Vincent; Pr eat, Veronique (1998): Localization of a FITC-labeled phosphorothioate oligodeoxynucleotide in the skin after topical delivery by iontophoresis and electroporation. In: *Pharmaceutical research* 15 (10), S. 1596–1602. DOI: 10.1023/A:1011963318843.
- Richardson, S. (1999): Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. In: *International journal of pharmaceuticals* 178 (2), S. 231–243. DOI: 10.1016/S0378-5173(98)00378-0.
- Rivory, Laurent; Tucker, Carly; King, Andrew; Lai, Angela; Goodchild, Amber; Witherington, Craig et al. (2006): The DNazymes Rs6, Dz13, and DzF have potent biologic effects independent of catalytic activity. In: *Oligonucleotides* 16 (4), S. 297–312. DOI: 10.1089/oli.2006.16.297.
- Rosenthal, Rita; G unzel, Dorothee; Finger, Caroline; Krug, Susanne M.; Richter, Jan F.; Schulzke, J org-Dieter et al. (2012): The effect of chitosan on transcellular and paracellular mechanisms in the intestinal epithelial barrier. In: *Biomaterials* 33 (9), S. 2791–2800. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.12.034.
- Ruel-Gari epy, E.; Chenite, A.; Chaput, C.; Guirguis, S.; Leroux, J.-C (2000): Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. In: *International journal of pharmaceuticals* 203 (1-2), S. 89–98. DOI: 10.1016/S0378-5173(00)00428-2.
- R unarsson,  gmundur Vidar; Holappa, Jukka; Nevalainen, Tapio; H j lmarsd ottir, Martha; Järvinen, Tomi; Loftsson, Thorsteinn et al. (2007): Antibacterial activity of methylated chitosan and chitooligomer derivatives: Synthesis and structure activity relationships. In: *European Polymer Journal* 43 (6), S. 2660–2671. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2007.03.046.
- Sahariah, Priyanka; M asson, M ar (2017): Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. In: *Biomacromolecules*, S. 3846–3868. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01058.
- Santoro, S. W.; Joyce, G. F. (1997): A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (9), S. 4262–4266.
- Santoro, S. W.; Joyce, G. F. (1998): Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. In: *Biochemistry* 37 (38), S. 13330–13342. DOI: 10.1021/bi9812221.
- Schiffelers, Raymond M.; Mastrobattista, Enrico (2013): Oligonucleotides. In: Daan J. A. Crommelin, Robert D. Sindelar und Bernd Meibohm (Hg.): *Pharmaceutical Biotechnology*. New York, NY: Springer New York, S. 459–475.
- Schipper, N. G.; Olsson, S.; Hoogstraate, J. A.; deBoer, A. G.; Vårum, K. M.; Artursson, P. (1997): Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2. Mechanism of absorption enhancement. In: *Pharmaceutical research* 14 (7), S. 923–929.
- Schipper, N. G.; Vårum, K. M.; Artursson, P. (1996): Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. In: *Pharmaceutical research* 13 (11), S. 1686–1692. DOI: 10.1023/A:1016444808000.
- Schmidts, Thomas; Marquardt, Kay; Schlupp, Peggy; Dobler, Dorota; Heinz, Florian; M ader, Ulf et al. (2012): Development of drug delivery systems for the dermal application of therapeutic DNazymes. In: *International journal of pharmaceuticals* 431 (1-2), S. 61–69. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.034.

- Scoles, Daniel R.; Minikel, Eric V.; Pulst, Stefan M. (2019): Antisense oligonucleotides: A primer. In: *Neurology. Genetics* 5 (2), e323. DOI: 10.1212/NXG.0000000000000323.
- Silverman, Scott K. (2004): Deoxyribozymes: DNA catalysts for bioorganic chemistry. In: *Organic & biomolecular chemistry* 2 (19), S. 2701–2706. DOI: 10.1039/b411910j.
- Silverman, Scott K. (2009): Deoxyribozymes: selection design and serendipity in the development of DNA catalysts. In: *Accounts of chemical research* 42 (10), S. 1521–1531. DOI: 10.1021/ar900052y.
- Silverman, Scott K. (2016): Catalytic DNA: Scope, Applications, and Biochemistry of Deoxyribozymes. In: *Trends in biochemical sciences* 41 (7), S. 595–609. DOI: 10.1016/j.tibs.2016.04.010.
- Smith, Douglas A.; Allerton, Charlotte; Kalgutkar, Amit S.; Waterbeemd, Han; Walker, Don K.; Mann, Raimund (2012): Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design. 3. Aufl. s.l.: Wiley-VCH (Methods and Principles in Medicinal Chemistry). Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=915729>.
- Smith, Jennifer; Wood, Edward; Dornish, Michael (2004): Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. In: *Pharmaceutical research* 21 (1), S. 43–49. DOI: 10.1023/B:PHAM.0000012150.60180.e3.
- Smith, Jennifer M.; Dornish, Michael; Wood, Edward J. (2005): Involvement of protein kinase C in chitosan glutamate-mediated tight junction disruption. In: *Biomaterials* 26 (16), S. 3269–3276. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.06.020.
- Sogias, Ioannis A.; Khutoryanskiy, Vitaliy V.; Williams, Adrian C. (2010): Exploring the Factors Affecting the Solubility of Chitosan in Water. In: *Macromol. Chem. Phys.* 211 (4), S. 426–433. DOI: 10.1002/macp.200900385.
- Sorlier, P.; Denuzière, A.; Viton, C.; Domard, A. (2001): Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. In: *Biomacromolecules* 2 (3), S. 765–772.
- Sorlier, Pierre; Viton, Christophe; Domard, Alain (2002): Relation between Solution Properties and Degree of Acetylation of Chitosan. Role of Aging. In: *Biomacromolecules* 3 (6), S. 1336–1342. DOI: 10.1021/bm0256146.
- Steiner, A.; Kugarajan, K.; Wullimann, M.; Ruty, B.; Kunze, G. (2017): Margin of safety of pentylene glycol derived using measurements of cutaneous absorption and volatility. In: *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 87, S. 106–111. DOI: 10.1016/j.yrtph.2017.05.007.
- Strand, Sabina P.; Lelu, Sylvie; Reitan, Nina K.; Lange Davies, Catharina de; Artursson, Per; Vårum, Kjell M. (2009): Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. In: *Biomaterials* 31 (5), S. 975–987. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.102.
- Suzuki, T.; Ohsumi, S.; Makino, K. (1994): Mechanistic studies on depurination and apurinic site chain breakage in oligodeoxyribonucleotides. In: *Nucleic Acids Research* 22 (23), S. 4997–5003.
- Thibault, Marc; Nimesh, Surendra; Lavertu, Marc; Buschmann, Michael D. (2010): Intracellular trafficking and decondensation kinetics of chitosan-pDNA polyplexes. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (10), S. 1787–1795. DOI: 10.1038/mt.2010.143.
- Varela-Ramirez, Armando; Abendroth, Jan; Mejia, Adrian A.; Phan, Isabelle Q.; Lorimer, Donald D.; Edwards, Thomas E.; Aguilera, Renato J. (2017): Structure of acid deoxyribonuclease. In: *Nucleic Acids Research* 45 (10), S. 6217–6227. DOI: 10.1093/nar/gkx222.
- Vårum, K.; Ottøyb M. H.; Smidsrøda O. (2001): Acid hydrolysis of chitosans. In: *Carbohydrate Polymers* 46 (1), S. 89–98. DOI: 10.1016/S0144-8617(00)00288-5.
- Verdolino, Vincenzo; Cammi, Roberto; Munk, Barbara H.; Schlegel, H. Bernhard (2008): Calculation of pKa values of nucleobases and the guanine oxidation products guanidinohydantoin and spiroiminodihydantoin using density functional theory and a polarizable continuum model. In: *The journal of physical chemistry. B* 112 (51), S. 16860–16873. DOI: 10.1021/jp8068877.

- Verhoef, Johan J. F.; Anchordoquy, Thomas J. (2013): Questioning the Use of PEGylation for Drug Delivery. In: *Drug delivery and translational research* 3 (6), S. 499–503. DOI: 10.1007/s13346-013-0176-5.
- Visakh, P. M.; Bayraktar, O.; Picó, G. A. (2014): *Polyelectrolytes*. Cham: Springer International Publishing.
- Vllasaliu, Driton; Exposito-Harris, Ruth; Heras, Angeles; Casettari, Luca; Garnett, Martin; Illum, Lisbeth; Stolnik, Snow (2010): Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: comparison with chitosan solution. In: *International journal of pharmaceutics* 400 (1-2), S. 183–193. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.08.020.
- Walsh, Gary (2002): Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 15 (2), S. 135–138. DOI: 10.1016/S0928-0987(01)00222-6.
- Wang, Qi Zhao; Chen, Xi Guang; Liu, Nan; Wang, Shi Xi; Liu, Cheng Sheng; Meng, Xiang Hong; Liu, Chen Guang (2006): Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. In: *Carbohydrate Polymers* 65 (2), S. 194–201. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.01.001.
- White, P. J.; Fogarty, R. D.; Liepe, I. J.; Delaney, P. M.; Werther, G. A.; Wraight, C. J. (1999): Live confocal microscopy of oligonucleotide uptake by keratinocytes in human skin grafts on nude mice. In: *The Journal of investigative dermatology* 112 (6), S. 887–892. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1999.00593.x.
- White, Paul J.; Gray, Andrew C.; Fogarty, Rhys D.; Sinclair, Rodney D.; Thumiger, Susan P.; Werther, George A.; Wraight, Christopher J. (2002): C-5 propyne-modified oligonucleotides penetrate the epidermis in psoriatic and not normal human skin after topical application. In: *The Journal of investigative dermatology* 118 (6), S. 1003–1007. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.01729.x.
- Williams, Adrian C.; Barry, Brian W. (2012): Penetration enhancers. In: *Advanced drug delivery reviews* 64, S. 128–137. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.032.
- Wirmer-Bartoschek, Julia; Schwalbe, Harald (2016): Understanding How DNA Enzymes Work. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 55 (18), S. 5376–5377. DOI: 10.1002/anie.201601175.
- Wishart, David S.; Feunang, Yannick D.; Guo, An C.; Lo, Elvis J.; Marcu, Ana; Grant, Jason R. et al. (2018): DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. In: *Nucleic Acids Research* 46 (D1), D1074-D1082. DOI: 10.1093/nar/gkx1037.
- Wu, Huailiang; Ramachandran, Chandrasekharan; Bielinska, Anna U.; Kingzett, Kristen; Sun, Rong; Weiner, Norman D.; Roessler, Blake J. (2001): Topical transfection using plasmid DNA in a water-in-oil nanoemulsion. In: *International journal of pharmaceutics* 221 (1-2), S. 23–34. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00672-x.
- Yang, Kaixuan; Lu, Ying; Xie, Fangyuan; Zou, Hao; Fan, Xiaoyu; Li, Bohua et al. (2016): Cationic liposomes induce cell necrosis through lysosomal dysfunction and late-stage autophagic flux inhibition. In: *Nanomedicine (London, England)* 11 (23), S. 3117–3137. DOI: 10.2217/nnm-2016-0289.
- Zaborowska, Zaneta; Schubert, Steffen; Kurreck, Jens; Erdmann, Volker A. (2005): Deletion analysis in the catalytic region of the 10-23 DNA enzyme. In: *FEBS letters* 579 (2), S. 554–558. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.12.008.
- Zoltewicz, J. A.; Clark, D. F.; Sharpless, T. W.; Grahe, G. (1970): Kinetics and mechanism of the acid-catalyzed hydrolysis of some purine nucleosides. In: *Journal of the American Chemical Society* 92 (6), S. 1741–1749. DOI: 10.1021/ja00709a055.

6 Anhang

6.1 Material und Geräte

Tabelle 17: Chemikalien

Substanz	Hersteller
1-Step™ ABTS solution	Thermo Scientific™
5'- fluoreszenzmarkiertes DNAzym Dz13-ATTO 520	Biomers
Acetonitril (ACN) gradient grade	VWR
Anti-Digoxigenin-POD, Fab-Fragmente, polyclonal sheep	Sigma Aldrich
BG, Butylenglykol, butane-1,3-diol	Merck KGaA
Chitosan L, Mean: 500–5000 kDa, DD > 70%	Cognis
Chitosan S, Chitopharm S, Mean: 50-1000 kDa, DD > 70%	Chitopharm™
Chitosan XS, Chitosan HCl, Mean: 30–70 kDa, DD: 70%,	Kraeber & Co, Ellerbek
COS Chitosan-oligosaccharidlactat Mean: 4–6 kDa, DD : 90%,	Sigma Aldrich
Deoxyribonuclease I from bovine pancreas, 3048 units/mg (DNase I)	Sigma Aldrich
Deoxyribonuclease I, bovine pancreas	Sigma Aldrich
Deoxyribonuclease II type IV, porcine spleen	Sigma Aldrich
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O	VWR
DMEM High Glucose (4.5 g/l), mit L-Glutamine und Sodium Pyruvate	Capricorn Scientific GmbH
DNA-Sonden Hybridisierungs ELISA (3'-Biotin oligonukleotid, 5'-Digoxigeninoligonukleotid)	Biomers
DNAzym Dz13, Mean: 10.621,9 Da	Integrated DNA Technologies, Inc
DNAzym Dz13 fluoreszenzmarkiert 6FAM	Biomers
DNAzym-Längenstandards	Integrated DNA Technologies, Inc
Essigsäure 100%	Carl Roth
Ethanol (EtOH) gradient grade	VWR,
HaCaT Zelllinie	Prof. Dr. Weindl, Pharmacology und Toxicology, Freie Universität Berlin
Kaliumdihydrogenphosphat KH ₂ PO ₄	Merck KGaA
Magnesiumsulfat MgSO ₄	Caesar & Loretz
Maxilon Flavine 10GFF	Huntsman Advanced Materials GmbH
Natriumacetat C ₂ H ₃ NaO ₂	Carl Roth
Natriumhydroxid NaOH	Merck KGaA
Natriumperchlorat Monohydrat ClNaO ₄ 1H ₂ O for analysis EMSURE	Merck KGaA
PenG, pentylenglykol, pentane-1,2-diol	Acros organics
PG, Propylenglykol, propane-1,2-diol	Caesar & Loretz GmbH
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25 : 24 : 1)	AppliChem
Proteinase K ≥ 30 mAnson U/mg, <i>Tritirachium album</i>	Carl Roth
Resazurin, Fluorometric Cell Viability Kit I	PromoCell GmbH
S-Milchsäure, 90%,	Caesar & Loretz GmbH
Streptavidin coated 96-well Platten	Thermo Scientific™
Triethylammoniumacetatpuffer pH 7,0 (1 M)	AppliChem

Tabelle 18: Laborgeräte und Software

Gerätebezeichnung	Hersteller
HPLC-System Elite LaChrom	VWR, Hitachi
UV-Vis-Detektor L-2420	
Autosampler L-2200	
Gradientenpumpe L-2130	
Säulenofen L-2300	
pH-Messgerät, SevenGo Duo pro	Mettler Toledo
Analysenwaage XPE206	Mettler Toledo
Heiz- und Rührplatte, MR 3001K	Heidolph
Rheometer MCR 102	Anton Paar
Kegel-Platte-Messsystem (CP 40-1)	Anton Paar
Franz-Diffusionszellen	Gauer Glas
Zentrifuge, Mega Star 600R	VWR
Zentrifuge Zentrifuge Mikro 20	Hettich
Klimaschränke KBF115	Binder
Thermomixer comfort	Eppendorf
Plate Reader, Synergy HTX Multi Mode Reader	BioTek
Sicherheitswerkbank, S2020 1.2	Thermo Scientific
CO ₂ -Inkubator Heracell vios 100i	Thermo Scientific
Reinstwasseranlage, Puranity PU 15	VWR
Konfokales Laser Scanning Mikroskop, TCS SP5 CLSM	Leica Microsystems GmbH
Objektiv HCX PL APO CS 10x0.4 dry UV	
Objektiv HCX PL APO CS 63x1.20 water UV	
Kryostat, CM 1850UV	Leica Microsystems GmbH
Software	Hersteller
HPLC-Software EZ Chrom Elite, Version 3.3.2	Agilent
Statistik software, GraphPad Prism 5, Version 5.03	GraphPad Software
LAS AF Lite, Version 4.0.11706.0	Leica Microsystems GmbH
ImageJ, Version 1.51w	National Institute of Health
Bioformats Plugin for ImageJ Version 5.2.3.	Open Microscopy Environment
Plate Reader HTX Synergy Gen 5™, Version 4.29.18	BioTek
Rheocompass Version 1.20	Anton Paar

6.2 Polyplexbildung, Maxilon Flavine GFF Assay

6.2.1 Linearität

Tabelle 19: Kalibrierfunktionen Dz13 Standards zur Quantifizierung des freien Anteils aus Chitosan XS Polyplexen

Linear Regression Chitosan XS	150723	150729	150811
Best-fit values			
Slope (m)	793,7 ± 8,103	813,4 ± 10,92	814,1 ± 10,14
Y-intercept when X=0,0 (b)	25731 ± 381,7	27185 ± 514,5	38920 ± 477,4
X-intercept when Y=0,0	-32,42	-33,42	-47,81
1/slope	0,00126	0,001229	0,001228
95% Confidence Intervals			
Slope (m)	775,7 to 811,8	789,1 to 837,8	791,5 to 836,6
Y-intercept when X=0,0 (b)	24881 to 26581	26038 to 28331	37856 to 39983
X-intercept when Y=0,0	-34,12 to -30,78	-35,70 to -31,26	-50,29 to -45,45
Goodness of Fit			
R ²	0,999	0,9982	0,9985
S _{y,x}	957,1	1290	1197
Is slope significantly non-zero?			
F	9594	5545	6450
DFn, DFd	1,000, 10,00	1,000, 10,00	1,000, 10,00
P value	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Deviation from zero?	Significant	Significant	Significant
Data			
Number of X values	6	6	6
Maximum number of Y replicates	2	2	2
Total number of values	12	12	12
Number of missing values	0	0	0

Tabelle 20: Kalibrierfunktionen Dz13 Standards zur Quantifizierung des freien Anteils aus Chitosan S Polyplexen

Linear Regression Chitosan S	150727	150729	150811
Best-fit values			
Slope (m)	806,1 ± 6,088	823,1 ± 11,11	855,3 ± 14,42
Y-intercept when X=0,0 (b)	26722 ± 286,8	27236 ± 523,4	40663 ± 679,5
X-intercept when Y=0,0	-33,15	-33,09	-47,54
1/slope	0,001241	0,001215	0,001169
95% Confidence Intervals			
Slope (m)	792,5 to 819,6	798,4 to 847,9	823,2 to 887,4
Y-intercept when X=0,0 (b)	26083 to 27361	26070 to 28402	39149 to 42177
X-intercept when Y=0,0	-34,41 to -31,92	-35,37 to -30,92	-50,93 to -44,38
Goodness of Fit			
R ²	0,9994	0,9982	0,9972
S _{y,x}	719	1312	1704
Is slope significantly non-zero?			
F	17533	5487	3516
DFn, DFd	1,000, 10,00	1,000, 10,00	1,000, 10,00
P value	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Deviation from zero?	Significant	Significant	Significant
Data			
Number of X values	6	6	6
Maximum number of Y replicates	2	2	2
Total number of values	12	12	12
Number of missing values	0	0	0

Tabelle 21: Kalibrierfunktionen Dz13 Standards zur Quantifizierung des freien Anteils aus PEI Polyplexen

Linear Regression PEI			
	150727	150805	150812
Best-fit values			
Slope (m)	767,5 ± 5,357	769,0 ± 4,959	869,8 ± 10,70
Y-intercept when X=0,0 (b)	25733 ± 252,3	25248 ± 233,6	37654 ± 504,2
X-intercept when Y=0,0	-33,53	-32,83	-43,29
1/slope	0,001303	0,0013	0,00115
95% Confidence Intervals			
Slope (m)	755,6 to 779,4	757,9 to 780,0	845,9 to 893,6
Y-intercept when X=0,0 (b)	25170 to 26295	24727 to 25768	36531 to 38778
X-intercept when Y=0,0	-34,70 to -32,39	-33,91 to -31,79	-45,63 to -41,07
Goodness of Fit			
R ²	0,9995	0,9996	0,9985
S _{y,x}	632,7	585,7	1264
Is slope significantly non-zero?			
F	20525	24047	6602
DFn, DFd	1,000, 10,00	1,000, 10,00	1,000, 10,00
P value	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Deviation from zero?	Significant	Significant	Significant
Data			
Number of X values	6	6	6
Maximum number of Y replicates	2	2	2
Total number of values	12	12	12
Number of missing values	0	0	0

Tabelle 22: Kalibrierfunktionen Dz13 Standards zur Quantifizierung des freien Anteils aus COS Polyplexen

Linear Regression COS			
	150728	150803	150804
Best-fit values			
Slope (m)	829,4 ± 7,065	742,7 ± 4,094	700,1 ± 4,013
Y-intercept when X=0,0 (b)	27607 ± 332,8	26911 ± 192,9	25704 ± 189,0
X-intercept when Y=0,0	-33,28	-36,23	-36,72
1/slope	0,001206	0,001346	0,001428
95% Confidence Intervals			
Slope (m)	813,7 to 845,2	733,6 to 751,8	691,1 to 709,0
Y-intercept when X=0,0 (b)	26866 to 28348	26481 to 27341	25283 to 26125
X-intercept when Y=0,0	-34,71 to -31,90	-37,19 to -35,30	-37,71 to -35,74
Goodness of Fit			
R ²	0,9993	0,9997	0,9997
S _{y,x}	834,4	483,6	474
Is slope significantly non-zero?			
F	13784	32909	30427
DFn, DFd	1,000, 10,00	1,000, 10,00	1,000, 10,00
P value	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Deviation from zero?	Significant	Significant	Significant
Data			
Number of X values	6	6	6
Maximum number of Y replicates	2	2	2
Total number of values	12	12	12
Number of missing values	0	0	0

6.2.2 Messwerte freies DNAzym Polyplexbildung

Tabelle 23: Messwerte freies DNAzym bei Einsatz verschiedener Polykationenverhältnisse (m/m)

Chitosan XS										
Polykation /DNAzym (m/m)	% freies DNAzym						Mean	s	RSD %	
5	11,388	10,907	8,791	10,531	3,129	4,627	8,23	3,51	42,71	
2	12,391	12,643	11,697	11,629	6,779	5,607	10,12	3,09	30,54	
1,75	12,754	12,399	12,180	13,015	7,050	6,524	10,65	3,01	28,29	
1,5	14,547	15,122	13,401	13,930	7,924	7,395	12,05	3,46	28,67	
1,25	18,772	18,273	17,450	18,204	12,758	12,443	16,32	2,91	17,84	
1	39,306	40,044	46,968	46,156	53,352	53,936	46,63	6,26	13,43	
0,75	68,896	67,509	67,910	68,793	77,986	76,567	71,28	4,70	6,59	
0,5	80,750	79,977	77,426	75,337	84,977	83,319	80,30	3,58	4,46	
0,25	93,685	94,037	89,029	88,267	95,234	93,850	92,35	2,93	3,17	
0,125	100,016	104,168	95,414	96,800	99,726	98,005	99,02	3,06	3,09	
0,05	103,329	102,434	98,688	98,377	100,369	98,827	100,34	2,11	2,10	
Chitosan S										
Polykation /DNAzym (m/m)	% freies DNAzym						Mean	s	RSD %	
5	13,559	12,439	10,357	11,014	6,872	6,267	10,08	2,95	29,23	
2	14,202	13,874	13,347	13,056	8,226	7,288	11,67	3,07	26,30	
1,75	29,160	30,989	19,588	20,535	10,117	11,340	20,29	8,69	42,82	
1,5	38,968	40,035	38,763	41,247	31,534	31,453	37,00	4,36	11,77	
1,25	57,674	55,946	57,392	57,584	58,936	57,041	57,43	0,97	1,69	
1	70,325	68,504	68,908	69,459	74,166	74,528	70,98	2,68	3,78	
0,75	76,634	74,017	75,485	76,663	76,744	77,687	76,21	1,28	1,68	
0,5	80,882	79,783	77,856	77,813	80,607	78,070	79,17	1,42	1,80	
0,25	90,442	90,185	90,746	91,934	90,067	89,819	90,53	0,76	0,84	
0,125	95,260	95,007	96,795	98,060	96,547	97,779	96,57	1,26	1,30	
0,05	97,767	98,741	98,722	100,573	100,682	99,837	99,39	1,16	1,17	
PEI										
Polykation /DNAzym (m/m)	% freies DNAzym						Mean	s	RSD %	
5	0,171	0,428	1,490	0,949	-2,343	-3,335	-0,44	1,94	-440,49	< LLOQ
2	1,666	2,054	1,502	1,722	-1,838	-1,591	0,59	1,79	306,00	< LLOQ
1,75	1,525	1,597	2,113	1,857	-1,608	-1,984	1,77	0,27	15,10	< LLOQ
1,5	1,757	2,564	2,555	2,518	-1,506	-1,989	2,55	0,02	0,95	n=3
1,25	3,407	3,821	3,481	3,677	-0,202	-0,957	3,60	0,19	5,23	n=4
1	6,748	6,241	8,575	9,055	5,900	5,374	6,98	1,50	21,43	
0,75	11,986	12,419	17,434	16,810	14,621	15,071	14,72	2,22	15,08	
0,5	21,608	22,068	32,535	32,320	35,489	34,411	29,74	6,23	20,96	
0,25	50,432	*	57,019	56,006	58,654	59,054	56,23	3,47	6,17	n=5
0,125	64,246	63,488	65,775	68,539	67,035	68,203	66,21	2,08	3,13	
0,05	82,172	81,451	83,602	82,623	78,945	82,789	81,93	1,63	1,98	
* Pipettierfehler										

Tabelle 24: Fortsetzung Tabelle 23

COS	% freies DNAzym						Mean	s	RSD %
Polykation /DNAzym (m/m)	% freies DNAzym						Mean	s	RSD %
5	13,798	13,776	11,161	11,736	12,043	12,148	12,44	1,10	8,81
2	18,298	17,982	14,924	14,963	14,774	15,234	16,03	1,64	10,26
1,85	19,826	21,011	14,722	14,076	14,874	14,884	17,41	3,52	20,21
1,7	24,710	21,813	16,119	16,634	15,191	15,556	18,34	3,95	21,56
1,55	25,404	22,167	16,375	15,464	15,699	15,772	18,48	4,25	22,97
1,4	25,913	27,424	18,104	17,809	17,833	18,417	20,92	4,49	21,45
1,25	31,773	35,530	24,317	24,692	23,271	23,062	27,11	5,24	19,34
1,1	46,867	45,097	48,341	47,626	39,467	39,879	44,55	3,93	8,82
1	56,125	58,536	59,249	58,543	58,972	59,200	58,44	1,17	2,01
0,9	67,833	70,770	69,169	71,713	72,735	76,085	71,38	2,90	4,06
0,8	74,479	76,112	76,716	76,378	76,852	77,306	76,31	0,98	1,29
0,7	78,416	80,137	79,325	79,980	82,642	81,603	80,35	1,54	1,91
0,6	82,294	81,541	80,575	80,032	85,942	83,322	82,28	2,14	2,61
0,5	84,818	84,251	81,023	81,108	88,007	86,923	82,80	2,02	2,44
0,25	93,427	93,204	92,040	90,516	95,084	94,034	93,05	1,59	1,71
0,125	98,312	101,518	98,286	102,500	96,678	95,119	98,74	2,81	2,85
0,05	101,850	100,669	101,722	101,734	99,569	98,677	100,70	1,33	1,32

6.2.3 Freies DNAzym nach Dekomplexierung der Polyplexe mit 0,91 mg/mL Li-Heparin

Tabelle 25: Prozentuale Wiederfindung des DNAzyms Dz13 nach Dekomplexierung über AEX-HPLC

Polykation /DNAzym (m/m)	Wiederfindung vor Dekomplexierung %				Mean	s	CV %
Chitosan XS 5	5,3	5,0	6,1	6,5	5,7	0,7	12,0
Chitosan XS 0,75	79,3	79,9	76,5	73,1	77,2	3,1	4,0
Chitosan XS 0,05	95,9	96,5	96,1	94,4	95,7	0,9	1,0
Chitosan S 5	6,5	6,5	8,4	7,9	7,3	1,0	13,4
Chitosan S 0,7	71,7	69,1	70,3	67,5	69,7	1,8	2,6
Chitosan S 0,05	92,9	93,7	93,4	94,4	93,6	0,6	0,6
PEI 5	-3,3	-3,6	-2,7	-2,3	-3,0	0,6	-19,2
PEI 0,3	4,7	4,2	4,8	4,6	4,6	0,3	6,2
PEI 0,05	82,5	82,8	80,9	78,3	81,2	2,1	2,5
COS 5	6,5	7,8	7,7	8,1	7,5	0,7	9,0
COS 1,1	46,5	46,0	46,2	46,7	46,3	0,3	0,6
COS 0,05	94,8	93,9	96,0	95,7	95,1	0,9	1,0
	Wiederfindung nach Dekomplexierung (20 min Inkubation) %				Mean	s	CV %
Chitosan XS 5	96,6	95,2	95,8	95,9	95,9	0,5	0,6
Chitosan XS 0,75	97,3	94,9	97,0	93,7	95,7	1,7	1,8
Chitosan XS 0,05	95,7	95,9	95,1	95,6	95,6	0,3	0,4
Chitosan S 5	99,0	98,7	99,6	97,9	98,8	0,7	0,7
Chitosan S 0,7	98,0	93,8	98,1	95,6	96,4	2,1	2,2
Chitosan S 0,05	95,2	96,4	95,3	95,4	95,6	0,6	0,6
PEI 5	3,2	2,8	1,7	2,3	2,5	0,7	25,9
PEI 0,3	97,5	94,8	99,4	97,5	97,3	1,9	1,9
PEI 0,05	92,8	94,1	95,4	92,3	93,6	1,4	1,5
COS 5	98,4	101,7	96,7	95,9	98,2	2,6	2,6
COS 1,1	97,0	96,6	99,2	100,8	98,4	2,0	2,0
COS 0,05	95,3	96,3	97,5	97,5	96,7	1,0	1,1

Tabelle 26: Polyplexpartikelgrößenverteilung über die Bilddatenanalyse (CLSM) nach verschiedenen Lagerperioden bei 25° C und 60 % RH, Ergebnisse der verschiedenen Formulierungen bis Tabelle 14

Chitosanhydrogel S t = 0					
Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Circ.
170925 Chitogel S Stabi t=0.lif - 1.1	652	1492183	0,2289	39442	0,7058
170925 Chitogel S Stabi t=0.lif - 1.2	637	1438532	0,2258	38024	0,7260
170925 Chitogel S Stabi t=0.lif - 1.3	686	1607529	0,2343	42491	0,7051
170925 Chitogel S Stabi t=0.lif - 2.1	676	1659989	0,2456	43878	0,6971
170925 Chitogel S Stabi t=0.lif - 2.2	602	1318676	0,2190	34856	0,7308
170925 Chitogel S Stabi t=0.lif - 2.3	634	1458953	0,2301	38564	0,7211
Mean n=6	648	1495977	0,2306	39543	0,7143
s	27,9	112149	0,01	2964	0,01
CV%	4,31	7,50	3,54	7,50	1,72
170925 Chitogel S 10%BG .lif - 1.1	774	1884693	0,2435	49817	0,6663
170925 Chitogel S 10%BG .lif - 1.2	863	2007256	0,2326	53057	0,6886
170925 Chitogel S 10%BG .lif - 1.3	590	1499687	0,2542	39640	0,6894
170925 Chitogel S 10%BG .lif - 2.1	554	1277653	0,2306	33772	0,7172
170925 Chitogel S 10%BG .lif - 2.2	533	1159817	0,2176	30657	0,7305
170925 Chitogel S 10%BG .lif - 2.3	606	1470679	0,2427	38874	0,6869
Mean n=6	653	1549964	0,2369	40970	0,6965
s	121,9	304505	0,01	8049	0,02
CV%	18,65	19,65	4,90	19,65	3,05
170925 Chitogel S 20% PG Stabi t=0.lif - 1.1	844	2.007.544	0,2379	53.064	0,7112
170925 Chitogel S 20% PG Stabi t=0.lif - 1.2	914	2.419.177	0,2647	63.945	0,6919
170925 Chitogel S 20% PG Stabi t=0.lif - 1.3	923	2.370.506	0,2568	62.658	0,6966
170925 Chitogel S 20% PG Stabi t=0.lif - 2.1	877	2.244.047	0,2559	59.316	0,7009
170925 Chitogel S 20% PG Stabi t=0.lif - 2.2	908	2.619.203	0,2885	69.232	0,6809
170925 Chitogel S 20% PG Stabi t=0.lif - 2.3	955	2.774.418	0,2905	73.335	0,6704
Mean n=6	904	2405816	0,2657	63592	0,6920
s	35,13	247526,62	0,02	6542,88	0,01
CV%	3,89	10,29	7,01	10,29	1,92
170925 Chitogel S PenG t=0.lif - 1.3	621	1.886.353	0,3038	49.861	0,6874
170925 Chitogel S PenG t=0.lif - 1.2	656	1.889.492	0,288	49.944	0,6869
170925 Chitogel S PenG t=0.lif - 1.1	599	1.319.253	0,2202	34.871	0,7537
170925 Chitogel S PenG t=0.lif - 2.2	491	955.534	0,1946	25.257	0,8095
170925 Chitogel S PenG t=0.lif - 2.1	505	1.081.957	0,2142	28.599	0,7888
170925 Chitogel S PenG t=0.lif - 2.3	560	1.250.268	0,2233	33.048	0,7677
Mean n=6	572	1397143	0,2407	36930	0,7490
s	59,69	365999	0,04	9674	0,05
CV%	10,44	26,20	16,77	26,20	6,28

Tabelle 27: Fortsetzung Tabelle 10, 2 von 6

Chitosanhydrogel S 1 Monat					
Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Circ.
171023 Chitogel S 1M,lif - 2,3	661	1436187	0,2173	37962	0,7155
171023 Chitogel S 1M,lif - 2,2	663	1486915	0,2243	39303	0,6752
171023 Chitogel S 1M,lif - 2,1	598	1198999	0,2005	31693	0,7226
171023 Chitogel S 1M,lif - 1,3	669	1543308	0,2307	40793	0,6933
171023 Chitogel S 1M,lif - 1,2	671	1553085	0,2315	41052	0,6819
171023 Chitogel S 1M,lif - 1,1	662	1398159	0,2112	36957	0,7142
Mean n=6	654	1436109	0,2193	37960	0,7005
s	25,31	119316	0,01	3154	0,02
CV%	3,87	8,31	5,02	8,31	2,57
171023 Chitogel S 10% BG 1M.lif - 2.3	678	1451088	0,214	38356	0,6923
171023 Chitogel S 10% BG 1M.lif - 2.2	701	1673519	0,2387	44235	0,6822
171023 Chitogel S 10% BG 1M.lif - 2.1	656	1517438	0,2313	40110	0,6906
171023 Chitogel S 10% BG 1M.lif - 1.3	736	1608070	0,2185	42505	0,6858
171023 Chitogel S 10% BG 1M.lif - 1.2	657	1374202	0,2092	36324	0,6747
171023 Chitogel S 10% BG 1M.lif - 1.1	845	2004225	0,2372	52977	0,6405
Mean n=6	712	1604757	0,2248	42418	0,6777
s	65,45	203596	0,01	5382	0,02
CV%	9,19	12,69	5,10	12,69	2,60
171023 Chitogel S 20% PG 1M.lif - 2.3	1039	3.158.955	0,304	83.499	0,6326
171023 Chitogel S 20% PG 1M.lif - 2.2	920	2.699.372	0,2934	71.351	0,6248
171023 Chitogel S 20% PG 1M.lif - 2.1	953	2.804.436	0,2943	74.128	0,646
171023 Chitogel S 20% PG 1M.lif - 1.3	873	2.179.681	0,2497	57.614	0,6953
171023 Chitogel S 20% PG 1M.lif - 1.2	857	2.340.055	0,2731	61.853	0,6546
171023 Chitogel S 20% PG 1M.lif - 1.1	771	1.952.270	0,2532	51.603	0,703
Mean n=6	902	2522462	0,2780	66675	0,6594
s	83,39	406575	0,02	10747	0,03
CV%	9,24	16,12	7,52	16,12	4,51
171023 Chitogel S Pen G 5% 1M.lif - 2.3	688	1.833.280	0,2665	48.458	0,6887
171023 Chitogel S Pen G 5% 1M.lif - 2.2	717	1.761.986	0,2457	46.574	0,6853
171023 Chitogel S Pen G 5% 1M.lif - 2.1	735	1.972.944	0,2684	52.150	0,6888
171023 Chitogel S Pen G 5% 1M.lif - 1.3	607	1.506.975	0,2483	39.833	0,7221
171023 Chitogel S Pen G 5% 1M.lif - 1.2	690	1.889.384	0,2738	49.941	0,6876
171023 Chitogel S Pen G 5% 1M.lif - 1.1	710	2.008.230	0,2828	53.082	0,6771
Mean n=6	691	1828800	0,2643	48340	0,6916
s	40,90	165679	0,01	4379	0,01
CV%	5,92	9,06	5,02	9,06	2,06

Tabelle 28: Fortsetzung Tabelle 10, 3 von 6

Chitosanhydrogel S 2 Monate					
Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Circ.
171205 Chitogel S 2M.lif - 2.3	607	1231687	0,2029	32557	0,7053
171205 Chitogel S 2M.lif - 2.2	693	1468370	0,2119	38813	0,6965
171205 Chitogel S 2M.lif - 2.1	684	1467288	0,2145	38784	0,7125
171205 Chitogel S 2M.lif - 1.3	599	1207478	0,2016	31917	0,7105
171205 Chitogel S 2M.lif - 1.2	659	1498280	0,2274	39603	0,7091
171205 Chitogel S 2M.lif - 1.1	693	1644114	0,2372	43458	0,6707
Mean n=6	656	1419536	0,2159	37522	0,7008
s	39,12	153600	0,01	4060	0,01
CV%	5,96	10,82	5,91	10,82	2,06
171205 Chitogel S BG 2M.lif - 2.3	663	1411472	0,2129	37309	0,6880
171205 Chitogel S BG 2M.lif - 2.2	626	1554023	0,2482	41077	0,6571
171205 Chitogel S BG 2M.lif - 2.1	662	1469489	0,222	38842	0,6795
171205 Chitogel S BG 2M.lif - 1.3	706	1538040	0,2179	40654	0,6796
171205 Chitogel S BG 2M.lif - 1.2	709	1505929	0,2124	39805	0,6711
171205 Chitogel S BG 2M.lif - 1.1	703	1780423	0,2533	47061	0,6695
Mean n=6	678	1543229	0,2278	40791	0,6741
s	30,43	115897	0,02	3064	0,01
CV%	4,49	7,51	7,30	7,51	1,45
171205 Chitogel S PG 2M.lif - 2.3	902	2.564.687	0,2843	67.791	0,6722
171205 Chitogel S PG 2M.lif - 2.2	971	2.609.137	0,2687	68.966	0,658
171205 Chitogel S PG 2M.lif - 2.1	907	2.462.617	0,2715	65.093	0,6588
171205 Chitogel S PG 2M.lif - 1.3	974	2.555.847	0,2624	67.557	0,6576
171205 Chitogel S PG 2M.lif - 1.2	935	2.358.852	0,2523	62.350	0,6752
171205 Chitogel S PG 2M.lif - 1.1	919	2.405.106	0,2617	63.573	0,6637
Mean n=6	935	2492708	0,2668	65888	0,6643
s	28,71	90573	0,01	2394	0,01
CV%	3,07	3,63	3,71	3,63	1,06
171205 Chitogel S PenG 2M.lif - 2.3	724	1.780.423	0,2459	47.061	0,6736
171205 Chitogel S PenG 2M.lif - 2.2	730	1.787.026	0,2448	47.235	0,6653
171205 Chitogel S PenG 2M.lif - 2.1	673	1.700.001	0,2526	44.935	0,6705
171205 Chitogel S PenG 2M.lif - 1.3	702	1.667.854	0,2376	44.086	0,6797
171205 Chitogel S PenG 2M.lif - 1.2	715	1.806.256	0,2526	47.744	0,6615
171205 Chitogel S PenG 2M.lif - 1.1	703	1.779.774	0,2532	47.044	0,6907
Mean n=6	708	1753556	0,2478	46351	0,6736
s	18,60	50859	0,01	1344	0,01
CV%	2,63	2,90	2,28	2,90	1,43

Tabelle 29: Fortsetzung Tabelle 10, 4 von 6

Chitosanhydrogel L t = 0					
Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Circ.
170925 Chitogel L Stabi t=0.lif - 2.3	576	1995710	0,3465	52752	0,6921
170925 Chitogel L Stabi t=0.lif - 2.2	588	1864380	0,3171	49280	0,7154
170925 Chitogel L Stabi t=0.lif - 2.1	555	1628203	0,2934	43037	0,7448
170925 Chitogel L Stabi t=0.lif - 1.3	535	1733267	0,3240	45815	0,7082
170925 Chitogel L Stabi t=0.lif - 1.2	600	2081833	0,3470	55028	0,6823
170925 Chitogel L Stabi t=0.lif - 1.1	610	2167233	0,3553	57285	0,6831
Mean n=6	577	1911771	0,3306	50533	0,7043
s	25,78	189626	0,02	5012	0,02
CV%	4,47	9,92	6,47	9,92	3,10
170925 Chitogel L BG 10% t=0.lif - Series016	643	2207209	0,3433	58342	0,677
170925 Chitogel L BG 10% t=0.lif - Series014	270	645104	0,2389	17052	0,7645
170925 Chitogel L BG 10% t=0.lif - Series009	562	2134797	0,3799	56428	0,6867
170925 Chitogel L BG 10% t=0.lif - Series007	579	2053799	0,3547	54287	0,6678
170925 Chitogel L BG 10% t=0.lif - Series005	532	2192922	0,4122	57964	0,6518
170925 Chitogel L BG 10% t=0.lif - Series003	572	2066210	0,3612	54615	0,664
Mean n=6	526	1883340	0,3484	49781	0,6853
s	119,36	556730	0,05	14716	0,04
CV%	22,68	29,56	15,41	29,56	5,40
170925 Chitogel L PG 20%.lif - 2.3	606	2.305.454	0,3804	60.939	0,652
170925 Chitogel L PG 20%.lif - 2.2	597	2.299.249	0,3851	60.775	0,689
170925 Chitogel L PG 20%.lif - 2.1	629	2.338.648	0,3718	61.816	0,6827
170925 Chitogel L PG 20%.lif - 1.2	626	2.406.189	0,3844	63.601	0,6384
170925 Chitogel L PG 20%.lif - 1.1					
170925 Chitogel L PG 20%.lif - 1.3	602	2.052.824	0,341	54.261	0,7019
Mean n=5	612	2280473	0,3725	60278	0,6728
s	13,01	119991	0,02	3172	0,02
CV%	2,13	5,26	4,42	5,26	3,53
170925 Chitogel L PenG 5% t=0.lif - 2.3	508	1.571.197	0,3093	41.531	0,7075
170925 Chitogel L PenG 5% t=0.lif - 2.2	540	1.666.411	0,3086	44.047	0,7067
170925 Chitogel L PenG 5% t=0.lif - 2.1	519	1.536.488	0,296	40.613	0,7172
170925 Chitogel L PenG 5% t=0.lif - 1.3	541	1.784.572	0,3299	47.171	0,6833
170925 Chitogel L PenG 5% t=0.lif - 1.2	535	1.727.314	0,3229	45.657	0,6725
170925 Chitogel L PenG 5% t=0.lif - 1.1	518	1.686.832	0,3256	44.587	0,7143
Mean n=6	527	1662136	0,3154	43934	0,7003
s	12,48	85561	0,01	2262	0,02
CV%	2,37	5,15	3,73	5,15	2,36

Tabelle 30: Fortsetzung Tabelle 10, 5 von 6

Chitosanhydrogel 1 Monat					
Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Circ.
171023 Chitogel L 1M.lif - 2.2	518	1690296	0,3263	44679	0,6797
171023 Chitogel L 1M.lif - 2.1	544	1739545	0,3198	45980	0,6595
171023 Chitogel L 1M.lif - 1.3	484	1443042	0,2981	38143	0,6468
171023 Chitogel L 1M.lif - 1.2	494	1477570	0,2991	39056	0,6636
171023 Chitogel L 1M.lif - 1.1	482	1338772	0,2778	35387	0,6782
171023 Chitogel L 1M.lif - 2.3	531	1801457	0,3393	47617	0,6569
MW n=6	509	1581780	0,3101	41810	0,6641
s	23,70	170335	0,02	4502	0,01
CV%	4,66	10,77	6,61	10,77	1,75
171023 Chitogel L 10% BG.lif - Series019	559	1955049	0,3497	51677	0,6707
171023 Chitogel L 10% BG.lif - Series015	501	1843671	0,368	48733	0,6386
171023 Chitogel L 10% BG.lif - Series011	531	2141580	0,4033	56607	0,656
171023 Chitogel L 10% BG.lif - Series007	500	1908253	0,3817	50440	0,6662
171023 Chitogel L 10% BG.lif - Series005	504	1907748	0,3785	50426	0,6482
171023 Chitogel L 10% BG.lif - Series003	554	2052283	0,3704	54247	0,6777
MW n=6	525	1968097	0,3753	52022	0,6596
s	24,75	100049	0,02	2644	0,01
CV%	4,72	5,08	4,31	5,08	2,03
171023 Chitogel L 20% PG.lif - Series010	675	2.347.090	0,3477	62.039	0,656
171023 Chitogel L 20% PG.lif - Series008	674	2.570.351	0,3814	67.941	0,6483
171023 Chitogel L 20% PG.lif - Series006	641	2.444.722	0,3814	64.620	0,6464
171023 Chitogel L 20% PG.lif - Series004	598	2.513.742	0,4204	66.444	0,651
171023 Chitogel L 20% PG.lif - Series002	602	2.646.443	0,4396	69.952	0,6537
171023 Chitogel L 20% PG.lif - Series012	584	2.551.409	0,4369	67.440	0,6556
MW n=6	629	2512293	0,4012	66406	0,6518
s	36,51	95531	0,03	2525	0,00
CV%	5,81	3,80	8,37	3,80	0,55
171023 Chitogel L PenG.lif - 2.3	485	1.464.510	0,302	38.711	0,6486
171023 Chitogel L PenG.lif - 2.2	482	1.611.029	0,3342	42.583	0,645
171023 Chitogel L PenG.lif - 2.1	478	1.540.746	0,3223	40.726	0,6618
171023 Chitogel L PenG.lif - 1.3	489	1.650.644	0,3376	43.631	0,6733
171023 Chitogel L PenG.lif - 1.2	493	1.479.194	0,3	39.099	0,6608
171023 Chitogel L PenG.lif - 1.1	467	1.534.829	0,3287	40.569	0,6417
MW n=6	482	1546825	0,3208	40887	0,6552
s	8,36	66372	0,01	1754	0,01
CV%	1,73	4,29	4,61	4,29	1,69

Tabelle 31: Fortsetzung Tabelle 10, 6 von 6

Chitosanhydrogel L 2 Monate					
Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Circ.
171205 Chitogel L 2M.lif - 2.3	503	1539988	0,3062	40706	0,6435
171205 Chitogel L 2M.lif - 2.2	500	1649995	0,3300	43613	0,6431
171205 Chitogel L 2M.lif - 2.1	522	1677776	0,3214	44348	0,6544
171205 Chitogel L 2M.lif - 1.2	487	1397690	0,2870	36944	0,6637
171205 Chitogel L 2M.lif - 1.3	477	1587613	0,3328	41965	0,6466
171205 Chitogel L 2M.lif - 1.1	493	1587361	0,3220	41958	0,6404
MW n=6	497	1573404	0,3166	41589	0,6486
s	14,06	90506	0,02	2392	0,01
CV%	2,83	5,75	4,96	5,75	1,24
171205 Chitogel L BG 2M.lif - 2.3	572	1997911	0,3493	52810	0,6601
171205 Chitogel L BG 2M.lif - 2.2	665	2495847	0,3753	65971	0,653
171205 Chitogel L BG 2M.lif - 2.1	541	1673519	0,3093	44235	0,6647
171205 Chitogel L BG 2M.lif - 1.3	546	1933365	0,3541	51104	0,6563
171205 Chitogel L BG 2M.lif - 1.2	549	1985933	0,3617	52493	0,6332
171205 Chitogel L BG 2M.lif - 1.1	585	2044454	0,3495	54040	0,6494
MW n=6	576	2021838	0,3499	53442	0,6528
s	42,57	243657	0,02	6440	0,01
CV%	7,39	12,05	5,78	12,05	1,54
171205 Chitogel L PG 2M.lif - 2.3	622	2.346.802	0,3773	62.032	0,6273
171205 Chitogel L PG 2M.lif - 2.2	607	2.241.882	0,3693	59.258	0,662
171205 Chitogel L PG 2M.lif - 2.1	674	2.301.738	0,3415	60.841	0,6531
171205 Chitogel L PG 2M.lif - 1.3	591	2.409.580	0,4077	63.691	0,6391
171205 Chitogel L PG 2M.lif - 1.2	571	2.114.629	0,3703	55.895	0,6344
171205 Chitogel L PG 2M.lif - 1.1	621	2.377.938	0,3829	62.855	0,6437
MW n=6	614	2298762	0,3748	60762	0,6433
s	31,99	98325	0,02	2599	0,01
CV%	5,21	4,28	5,24	4,28	1,79
171205 Chitogel L PenG 2M.lif - 2.2	527	1.736.478	0,3295	45.899	0,6295
171205 Chitogel L PenG 2M.lif - 2.3	521	1.592.232	0,3056	42.087	0,6227
171205 Chitogel L PenG 2M.lif - 2.1	516	1.737.885	0,3368	45.937	0,6223
171205 Chitogel L PenG 2M.lif - 1.3	539	1.523.644	0,2827	40.274	0,6322
171205 Chitogel L PenG 2M.lif - 1.2	520	1.541.034	0,2964	40.733	0,6406
171205 Chitogel L PenG 2M.lif - 1.1	568	1.762.528	0,3103	46.588	0,6229
MW n=6	532	1648967	0,3102	43586	0,6284
s	17,75	99193	0,02	2622	0,01
CV%	3,34	6,02	5,96	6,02	1,06

6.3 Ergebnisse Wiederfindung Dz13 nach Lagerung

Tabelle 32: Prozentuale Wiederfindung des intakten DNAzyms aus verschiedenen Hydrogelformulierungen bei unterschiedlichen Lagerbedingungen über AEX-HPLC

Chitosanhydrogel	S 25°C	S 25°C 20% PG	S 25°C 10% BG	S 25°C 5% PenG
	95,2	100,2	101,3	99,0
	103,0	97,9	100,5	101,5
	99,0	102,0	98,0	100,3
	97,0	95,3	99,8	100,6
	102,8	104,6	100,6	101,5
	102,9	99,9	99,9	97,2
Mean	100,0	100,0	100,0	100,0
s	3,4	3,2	1,1	1,7
CV %	3,4	3,2	1,1	1,7
Chitosanhydrogel	S 25°C 1M	S 25°C 20% PG 1M	S 25°C 10% BG 1M	S 25°C 5% PenG 1M
	101,8	99,1	90,9	92,0
	99,1	97,9	92,0	94,6
	101,5	54,6*	93,7	91,7
	99,7	91,0	92,2	91,6
	100,5	96,5	90,4	94,1
	100,0	100,9	84,5	93,7
Mean	100,4	97,1	90,6	92,9
s	1,0	3,8	3,2	1,3
CV %	1,0	3,9	3,5	1,4
Chitosanhydrogel	S 40°C 1M	S 40°C 20% PG 1M	S 40°C 10% BG 1M	S 40°C 5% PenG 1M
	69,1	78,3	38,5	62,6
	69,6	77,0	38,2	61,1
	68,5	76,0	38,0	60,3
	69,2	74,2	39,4	43,96*
	68,7	75,3	38,3	61,4
	67,9	74,2	37,2	61,6
Mean	68,9	75,8	38,3	61,4
s	0,6	1,6	0,7	0,8
CV %	0,8	2,1	1,9	1,3
Chitosanhydrogel	S 25°C 2M	S 25°C 20% PG 2M	S 25°C 10% BG 2M	S 25°C 5% PenG 2M
	95,7	86,1	77,9	88,8
	92,4	95,2	79,7	86,7
	93,0	97,6	76,9	88,1
	93,6	93,3	79,4	88,9
	88,7	93,4	77,2	89,5
	93,1	90,6	78,0	85,7
Mean	92,7	92,7	78,2	88,0
s	2,3	4,0	1,1	1,5
CV %	2,4	4,3	1,5	1,7

Tabelle 33: Fortsetzung Tabelle 15

Chitosanhydrogel	L 25°C	L 25°C 20% PG	L 25°C 10% BG	L 25°C 5% PenG
	95,6	99,5	97,8	102,2
	100,5	98,1	98,7	101,3
	100,3	102,0	101,8	101,6
	101,5	95,4	101,6	101,9
	102,5	102,9	100,9	93,8
	99,6	102,2	99,2	99,2
Mean	100,0	100,0	100,0	100,0
s	2,4	2,9	1,7	3,2
CV %	2,4	2,9	1,7	3,2
Chitosanhydrogel	L 25°C 1M	L 25°C 20% PG 1M	L 25°C 10% BG 1M	L 25°C 5% PenG 1M
	94,8	98,2	85,3	92,8
	93,3	96,4	84,2	92,7
	95,4	100,8	87,0	93,4
	93,3	91,1	85,1	93,3
	94,3	96,6	86,6	99,0
	95,6	97,5	87,1	94,1
Mean	94,5	96,8	85,9	94,2
s	1,0	3,2	1,2	2,4
CV %	1,1	3,3	1,4	2,6
Chitosanhydrogel	L 40°C 1M	L 40°C 20% PG 1M	L 40°C 10% BG 1M	L 40°C 5% PenG 1M
	48,3	54,5	26,3	44,5
	39,4	51,1	26,1	44,0
	38,5	52,6	27,1	44,0
	40,1	52,7	25,2	44,8
	43,7	53,1	26,6	62,6
	44,8	54,2	26,8	62,8
Mean	42,5	53,0	26,4	50,4
s	3,8	1,2	0,7	9,5
CV %	8,9	2,3	2,5	18,8
Chitosanhydrogel	L 25°C 2M	L 25°C 20% PG 2M	L 25°C 10% BG 2M	L 25°C 5% PenG 2M
	74,1	86,4	69,9	87,3
	83,5	88,1	64,6	87,3
	82,6	82,9	63,0	88,2
	82,2	82,4	67,2	83,6
	77,3	87,1	69,9	84,7
	82,8	85,7	68,7	87,3
Mean	80,4	85,5	67,2	86,4
s	3,8	2,3	2,9	1,8
CV %	4,8	2,7	4,3	2,1

6.4 Wiederfindung Dz13 aus DNase II-Assay

Tabelle 34: Prozentuale Wiederfindung DNAzym Dz13 aus DNase II Assay (59 U/mL) nach 90 Minuten Inkubation bei 32°C über AEX-HPLC

Chitosan-hydrogel	S	S 20% PG	S 10% BG	S 5% PenG	L	L 20% PG	L 10% BG	L 5% PenG	Dz13 in H2O 5 min	Dz13 in H2O 10 min
Wiederfindung %	100,4	100,7	97,0	101,8	101,6	83,1	99,6	97,9	61,8	29,7
	100,7	101,3	100,1	100,7	99,9	88,5	98,1	98,1	60,4	28,2
	99,9	100,9	102,0	101,1	96,6	87,3	101,4	99,5	60,2	27,9
	99,2	96,7	101,3	100,1	104,5	101,9	102,1	92,4		
	97,1	94,6	103,3	101,6	94,4	102,0	103,5	99,3		
	96,4	99,7	101,0	99,1	105,1	68,0	105,4	101,5		
Mean	98,9	99,0	100,8	100,7	100,4	88,5	101,7	98,1	60,8	28,6
s	1,8	2,7	2,2	1,0	4,3	12,8	2,6	3,1	0,9	1,0
CV%	1,8	2,8	2,1	1,0	4,3	14,4	2,6	3,2	1,5	3,5

6.5 Wirkstoffpenetration an Vollhautmodell

Tabelle 35: Wiederdung (ng/cm²) des intakten DNAzyms aus Hautlysaten über Hybridisierungs-ELISA nach Penetrationsversuch an Schweinevollhautsektionen

	Dz13 in H2O	Chitogel S	Chitogel S 20% PG	Chitogel S 5% PenG	Chitogel L	Chitogel L 20% PG	Chitogel L 5% PenG
	42,19	227,44	82,56	79,49	269,75	25,01	56,45
	50,45	201,66	89,42	78,98	214,29	20,89	32,52
	38,63	252,64	77,48	91,59	242,78	27,38	52,43
	26,73	208,34	95,47	70,15	244,38	22,65	32,52
	40,2	*360,04*	71,11	128,37	267,98	33,97	50,48
	26,03	175,83	86,21	66,85	225,86	22,65	33,03
	51,74	151,89	53,44	68,26	109,22	22,06	26,47
	49,18	151,14	56,03	70,15	115,31	20,3	21,37
	48,34	148,15	55,59	77,48	107,51	22,06	24,65
	54,77	184,42	50,46	74,51	116,2	22,65	22,01
	49,18	168,37	50,04	89,96	114,43	26,78	25,1
	57,88	213,23	44,27	82,04	115,31	24,42	22,88
	26,03	65,22	23,59	36,34	78,3	52,11	12,91
	37,08	69,99	26,15	30,99	85,79	57,36	12,55
	24,97	64,28	23,22	34,41	71,8	52,11	12,37
	71,45	74,42	23,22	35,18	77,57	57,36	12,91
	26,38	53,03	25,05	42,25	71,09	62,06	12,01
	44,21	99,65	23,59	38,29	87,32	68,27	11,83
	67,92	71,44	39,07	161,73	178,43	36,65	43,43
	73,26	71,44	45,08	164,25	170,07	57,8	54,41
	74,26	83,42	39,86	149,61	186,3	37,04	46,42
	73,26	73,51	45,49	204,96	183,86	36,26	52,1
	71,78	76,11	47,54	183,02	192,41	55,16	44,91
	73,76	80,81	47,54	202,85	182,65	43,81	52,75
	75,73	44,23	46,28	112,24	145,64	87,32	27,07
	17,83	40,15	36,07	114,42	140,53	108,37	27,83
	16,51	49,85	43,72	125,96	129,29	92,77	32,01
	19,14	38,11	38,62	123,75	141,66	105,82	43
	45,91	39,64	46,79	128,74	143,36	100,83	43,41
	19,14	50,87	80,81	118,79	175,43	121,6	33,16
	61,1	81,26	17,83	107,48	84,95	95,95	83,42
	47,13	81,26	24,27	88,05	97,39	110,08	84,47
	56,24	76,96	21,08	112,58	82,49	89,64	86,58
	51,99	80,64	25,54	86,81	89,91	117,09	85
	55,03	78,18	32,42	172,39	77,57	85,03	91,86
	61,71	64,14	26,8	93,02	96,76	157,4	101,44
Mean	21,1	46,5	20,3	44,6	62,6	26,7	18,5
s	8,1	27,3	9,5	20,9	26,2	16,2	11,1
CV%	38,4	58,8	46,9	46,9	41,8	60,8	60,3

Tabelle 36: Statistische Auswertung der Wiederfindung (ng/cm²) des intakten DNAzyms aus Hautlysaten

Friedman test					
One-way analysis of variance					
P value	< 0,0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	7				
F	30,21				
R2	0,4262				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	89,14				
P value	< 0,0001				
P value summary	***				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes				
ANOVA Table	SS	df		MS	
Treatment (between columns)	62207	6		10368	
Residual (within columns)	83737	244		343,2	
Total	145944	250			
Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	q	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
Dz13 in H ₂ O vs S	-25,33	5,761	Yes	***	-36,74 to -13,92
Dz13 in H ₂ O vs S 20% PG	0,8007	0,1834	No	ns	-10,53 to 12,13
Dz13 in H ₂ O vs S 5% PenG	-23,48	5,378	Yes	***	-34,81 to -12,15
Dz13 in H ₂ O vs L	-41,44	9,491	Yes	***	-52,77 to -30,11
Dz13 in H ₂ O vs L 20% PG	-5,526	1,266	No	ns	-16,86 to 5,803
Dz13 in H ₂ O vs L 5% PenG	2,685	0,6149	No	ns	-8,645 to 14,01

6.6 Transfektion HaCaT Zelllinie

Tabelle 37: Fluoreszenzsignale aus Transfektionsversuchen mit ATTO-Dz13. Die Fluoreszenzsignale sind normiert auf den Mittelwert der entsprechenden Blankprobe.

Fluoreszenzsignal 485 / 528 nm						
	Blank PBS	Chitosan PP1	Chitosan PP4	Blank Chitosan	PP TransIT	Blank TransIT
	19476	19727	*-71009	-6220	28005	-8200
	13381	9320	9073	-11247	-7977	15280
	16954	17772	30207	-1972	13754	122
	25223	26960	20681	-12557	28309	-21703
	26186	34375	30118	8919	20236	16276
	15443	12694	28813	1848	36536	6203
	5729	23230	33020	15333	30487	-5233
	8602	50743	35903	5895	45911	-2748
Mean	16374	24353	26831	0	24408	0
s	7251	13264	9128	9853	16276	12593
CV%	44,3	54,5	34,0		66,7	
* Ausreißer identifiziert über ROUT Analyse						

Tabelle 38: Statistische Auswertung der normierten Fluoreszenzsignale aus Transfektionsversuchen mit ATTO-Dz13

Statistische Auswertung unpaired t-Test			
Polyplex	Chitosan S	Chitosan S	TransIT Oligo
	PP1	PP4	PPTransIT
	vs	vs	vs
	Blank _{Chitosan}	BlankChitosan	BlankTransIT
Unpaired t test			
P value	0,0009	0,0001	0,0047
P value summary	***	***	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=4,169 df=14	t=5,443, df=13	t=3,355 df=14
How big is the difference?			
Mean ± SEM of column B	24353 ± 4690 N=8	26831	24408 ± 5754 N=8
Mean ± SEM of column D	-0,1250 ± 3484 N=8	-0,125	-0,3750 ± 4452 N=8
Difference between means	24353 ± 5842	26831 ± 4930	24408 ± 7276
95% confidence interval	11822 to 36884	16181 to 37481	8802 to 40014
R2	0,5538	0,695	0,4456
F test to compare variances			
F,DFn, Dfd	1,812, 7, 7	1,165, 7, 6	1,670, 7, 7
P value	0,451	0,8682	0,5147
P value summary	ns	ns	ns
Are variances significantly different?	No	No	No

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
ACN	Acetonitril
AEX-HPLC	Anion Exchange-High Performance Liquid Chromatography
Ago2	Argonautenprotein 2
AMCase	Acidic Mammalian Chitinase
AMP	Antimicrobial Peptide
ANOVA	analysis of variance
API	Active Pharmaceutical Ingredient
ASO	Antisense Oligonukleotide
BG	Butylenglykol
C	Cytosin
Caco	Colorektal Adenocarcinomzellen
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
COS	Chitosan oligosaccharid-lactat
CPE	chemischen Penetrationsverstärkern
C _v	eingesetzten Wirkstoffkonzentration im Vehikel
CV %	Prozentualer Variationskoeffizient
D	Diffusionskoeffizient
Da	Dalton
DD	Degree of Deacetylation, Deacetylierungsgrad
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNAzym	Deoxyribozym
DOTAP	1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium propane
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride
DP	Polymersierungsgrad
D-SPM	Dextran-Spermin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAM	Fluorescein amidite
FKS	Fetales Kälberserum
G	Guanin
GFF	Maxilon Brilliant Flavine 10GFF, CAS Registry Number:12221-32-5
h	Pfadlänge der Diffusion
HCl	Salzsäure
HEK	Human Embryonic Kidney-Zellen
HG-DMEM	High Glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
JAM	Junctional Adhesion Molecule
J _s	Flux
kbp	Kilo Base Pair
Li-Heparin	Lithium Heparin
logD	Äquivalent zu logP unter Berücksichtigung pH-Wertes in wässriger Phase
logP	Logarithmus des Quotienten der Konzentration in der lipophilen Octanol-Phase und der Konzentration der wässrigen Phase im Gleichgewichtszustand
LUT	Look up table
Mean	Arithmetischer Mittelwert
Mg ²⁺	Magnesiumion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mn ²⁺	Manganion
Mo(VI)	Molybdän
mRNA	messenger-RNA

msec	Millisekunde
MUPP	Multi-PDZ-Domänen Protein
M_w	Molekulargewicht
N/P	Amin-/ Phosphatgruppen-Verhältnis
NA	Numerische Apertur
NaClO_4	Natriumperchlorat
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NBE	New Biological Entities
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
P	Verteilungskoeffizienten zwischen Vehikel und Hautmembran
Pb^{2+}	Blei Ion
PBS	Phosphate-buffered Saline
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PenG	Pentylenglykol
PG	Propylenglykol
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pKa	negativ dekadischer Logarithmus Säurekonstante
P_{oct}	Verteilungskoeffizienten Octanol
PP	Polyplex
Pt (II)	Platin
RH	Relative Luftfeuchtigkeit
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute
s	Standardabweichung
SC	stratum corneum
SDS	Sodium Dodecylsulfate
siRNA	small interfering RNA
SPR	Small Proline-rich Protein
T	Thymin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEER	Transepithelialen elektrischen Widerstands
TEG	Triethylene Glycol Spacer
TREX	Three Prime Repair Exonuclease
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV-Vis	Spektralphotometrie Ultraviolett- sichtbarer Wellenlängenbereich
Zn^{2+}	Zinkion
ZO	Zonula Occludens
α	Dissoziationsgrad
η_0	Nullviskosität
10GFF	Maxilon Brilliant Flavine 10GFF

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Messprotokoll Fluoreszenzassay Maxilon Brilliant Flavine 10GFF, Synergy HTX Microplate Reader	30
Tabelle 2: Messprotokoll Fluoreszenzassay mit Maxilon Brilliant Flavine 10GFF und Dekomplexierung mit Li-Heparin, Synergy HTX Microplate Reader	31
Tabelle 3: Zusammensetzung Hydrogelformulierungen	32
Tabelle 4: Akzeptanzkriterien Bewertung des antimikrobiellen Schutzes Chitosan Hydrogele, in Anlehnung an Ph. Eur. 9.0, 5.1.3.	35
<i>Tabelle 5: Parameter Wirkstoffstabilität Dz13 in Chitosanhydrogelen</i>	<i>35</i>
Tabelle 6: Protokoll Messung Resazurin Umsatz	40
Tabelle 7: Herstellung der Polyplexe für die Transfektion von HaCaT Zellen	41
Tabelle 8: Plattenlayout 24 well plate, FAM-Dz13 Nachweis und Zellviabilität nach Transfektion	41
Tabelle 9: Übersicht statistischer Berechnungsgrundlagen	42
Tabelle 10: Ergebnisse Partikelgrößenverteilung über die Bilddatenanalyse (CLSM), Lagertemperatur: 25°C, 60 % RH	49
<i>Tabelle 11: Zusammenfassung Daten Zirkularität aus Bilddatenanalyse</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 12: Messergebnisse pH-Werte der Hydrogelformulierungen, dargestellt als Mittelwert (Mean) mit Standardabweichung (s) und relativer prozentualer Standardabweichung (CV) in %. Die orange eingefärbten Zellen beinhalten die oberen 10 % der Messwerte und die blau dargestellten die unteren 10 % der Messwerte.</i>	<i>57</i>
Tabelle 13: Formeln zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen pKa und Dissoziationsgrad α von Chitosan (Katchalsky 1971; Domard 1987; Sorlier et al. 2001)	58
<i>Tabelle 14: Ergebnisse der Carreau-Yasuda Regression für die Fließkurven der verschiedenen Chitosanhydrogele n=3, *n=2.</i>	<i>60</i>
Tabelle 15: Übersicht Test-Formulierungen für den Konservierungsmittelbelastungstest	64
Tabelle 16: Prozentuale Wiederfindung des DNAzym Dz13 aus Chitosanhydrogelen nach 30 Tagen, bzw. 2 Monaten	66
<i>Tabelle 17: Chemikalien</i>	<i>96</i>
Tabelle 18: Laborgeräte und Software	97
<i>Tabelle 19: Kalibrierfunktionen Dz13 Standards zur Quantifizierung des freien Anteils aus Chitosan XS Polyplexen</i>	<i>98</i>
<i>Tabelle 20: Kalibrierfunktionen Dz13 Standards zur Quantifizierung des freien Anteils aus Chitosan S Polyplexen</i>	<i>98</i>
<i>Tabelle 21: Kalibrierfunktionen Dz13 Standards zur Quantifizierung des freien Anteils aus PEI Polyplexen</i>	<i>99</i>
<i>Tabelle 22: Kalibrierfunktionen Dz13 Standards zur Quantifizierung des freien Anteils aus COS Polyplexen</i>	<i>99</i>
<i>Tabelle 23: Messwerte freies DNAzym bei Einsatz verschiedener Polykationenverhältnisse (m/m) ..</i>	<i>100</i>
Tabelle 24: Fortsetzung Tabelle 23	101
Tabelle 25: Prozentuale Wiederfindung des DNAzyms Dz13 nach Dekomplexierung über AEX-HPLC	101
Tabelle 26: Polyplexpartikelgrößenverteilung über die Bilddatenanalyse (CLSM) nach verschiedenen Lagerperioden bei 25° C und 60 % RH, Ergebnisse der verschiedenen Formulierungen bis Tabelle 14	102
Tabelle 27: Fortsetzung Tabelle 10, 2 von 6	103
Tabelle 28: Fortsetzung Tabelle 10, 3 von 6	104
Tabelle 29: Fortsetzung Tabelle 10, 4 von 6	105

Tabelle 30: Fortsetzung Tabelle 10, 5 von 6.....	106
Tabelle 31: Fortsetzung Tabelle 10, 6 von 6.....	107
Tabelle 32: Prozentuale Wiederfindung des intakten DNAzyms aus verschiedenen Hydrogelformulierungen bei unterschiedlichen Lagerbedingungen über AEX-HPLC.....	108
Tabelle 33: Fortsetzung Tabelle 15	109
Tabelle 34: Prozentuale Wiederfindung DNAzym Dz13 aus DNase II Assay (59 U/mL) nach 90 Minuten Inkubation bei 32°C über AEX-HPLC.....	110
Tabelle 35: Wiederfindung (ng/cm ²) des intakten DNAzyms aus Hautlysaten über Hybridisierungs-ELISA nach Penetrationsversuch an Schweinevollhautsektionen.....	111
Tabelle 36: Statistische Auswertung der Wiederfindung (ng/cm ²) des intakten DNAzyms aus Hautlysaten	112
Tabelle 37: Fluoreszenzsignale aus Transfektionsversuchen mit ATTO-Dz13. Die Fluoreszenzsignale sind normiert auf den Mittelwert der entsprechenden Blankprobe.	112
Tabelle 38: Statistische Auswertung der normierten Fluoreszenzsignale aus Transfektionsversuchen mit ATTO-Dz13	113

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkmechanismen therapeutische Oligonukleotide, in Anlehnung an Crooke et al. 2018	2
Abbildung 2: Mechanismus Selektionsexperiment zur Entwicklung von selektiven Ribozymen bzw. DNAzymen	4
Abbildung 3: Struktur 10-23 DNAzym, in Anlehnung an Abbildung 1A Zaborowska et al. 2002	5
Abbildung 4: Emilsson 2003, Mechanismen der Reaktionskatalyse zum Phosphotransfer zur Spaltung von Substrat-RNA, mit freundlicher Genehmigung des Editors Timothy W. Nilsen von „RNA“, ISSN: 1355-8382.	6
Abbildung 5: Aufbau der Hautschichten, Eckhart et al. 2013: Cell death by cornification, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.010. Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier	9
Abbildung 6: Molekulare Architektur der Tight junctions, aus Niessen 2007, Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. In: The Journal of investigative dermatology 127 (11), S. 2525–2532. DOI: 10.1038/sj.jid.5700865.Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier B.V.	10
Abbildung 7: Grafische Darstellung der Anforderungen an ein Wirkstofftransportsystem, in Anlehnung an Benson und Watkinson 2011, Kapitel 14.	18
Abbildung 8: Polyplexbildung zwischen Polykation (Chitosan) und Polyanion (DNAzym)	27
Abbildung 9: Gradientenverlauf AEX-HPLC mit UV-Vis Detektion bei 260 nm zur Quantifizierung von DNAzymen	36
Abbildung 10: 2D Struktur von Maxilon Brilliant Flavine 10GFF, ein kationischer Farbstoff aus der Gruppe der Cumarine (Zollinger 2003, S. 81). PubChem Compound Summary for CID 169053. Retrieved January 3, 2021 from, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/169053	43
Abbildung 11: Messung des freien Anteils von DNAzym Dz13 nach Inkubation mit Polykationen in verschiedenen Massenverhältnissen mittels Fluoreszenzassay	45
Abbildung 12: Wiederfindung des freien DNAzyms Dz13 nach Dekomplexierung mit Li-Heparin für eine Inkubationsdauer von 20 Minuten. Quantifizierung mittels Fluoreszenzassay mit 10GFF, Kalibrierbereich 2,5-100 µg/mL	46
Abbildung 13: Prozess der Bilddatenanalyse zur Ermittlung der Partikelgrößenverteilung der Polyplexe innerhalb der Hydrogelmatrix	48
Abbildung 14: Vergleich der prozentualen Häufigkeit der Partikeldurchmesser, Hydrogel L 5% Pentylenglykol zum Herstellungszeitpunkt t= 0, grau und nach zwei Monaten (2m) grün, bei einer Lagertemperatur von 25°C und 60 % RH	50
Abbildung 15: Zirkularität der Chitosan-DNA Polyplexe. Der Median wird als Linie und der Mittelwert der Zirkularität mit einem „+“ innerhalb der Box dargestellt. Die Whisker der Boxen zeigen das Minimum bzw. Maximum der Daten an. Die Hydrogele wurden zum Start der Untersuchung vermessen, nach einem und zwei Monaten bei einer Lagertemperatur: von 25°C und 60 % RH.	52
Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung der Zirkularität von Polyplexen mit Chitosan L über die Lagerperiode von A: Startzeitpunkt t = 0, B: nach einem Monat und C: nach zwei Monaten, bei einer Lagertemperatur von 25°C und 60 % RH.	54
Abbildung 17: pH-Werte der Hydrogele über die Lagerperiode von 90 Tagen, grau Hydrogele Chitosan S, grün: Hydrogele mit Chitosan L. Die Hydrogele wurden bei 25 °C und 60% RH gelagert.	59
Abbildung 18: Fließkurven der Hydrogele, A Chitosan S, B Chitosan L, im Scherratenbereich von 1-500 s ⁻¹ , Punkt markiert die Fließkurve 24 h nach Herstellung, das Dreieck die Fließkurve nach einer Einlagerung der Hydrogele für 2 Monate bei 25° C und 65 % RH	61
Abbildung 19: Reaktionsmechanismen saure Hydrolyse Chitosan. a) de-N-Acetylierung, b) Depolymerisierung durch Spaltung der o-glykosidischen Bindung, (Vårum et al., 2001). Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier B.V.	63

Abbildung 20: Reaktionsmechanismus säurekatalysierte Depurinierung, An et al. 2014	67
Abbildung 21: A und B prozentuale Wiederfindung Dz13 aus Chitosanhydrogelen nach Lagerung, C Dz13 aus Chitosanhydrogel L zum Startzeitpunkt der Lagerstabilitätsuntersuchung, D Chitosanhydrogel L mit 10% BG, 2 Monate nach Start der Lagerstabilitätsuntersuchung	69
Abbildung 22: HPLC Chromatogramme der Abbauprodukte von Dz13 mit DNase I, DNase II, Hautextrakt humanes startum corneum (Skin extr.), Micrococcale Nuklease (Microc. Nuc.) und der Referenzlösung Dz13 in TEAA Puffer, pH 5,0.	70
Abbildung 23: DNase II Degradationsassay, DNase II 59 U/mL Lösung wurde für 90 Minuten bei 32°C in einem TEAA Puffersystem mit pH 5,0 und verschiedenen Hydrogelformulierungen inkubiert. Als Referenz wurden wässrige Dz13 Standardlösungen (n=3) für 5 Minuten bzw. 10 Minuten mit DNase II 59 U/mL unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Wiederfindung des intakten DNAzyms Dz13(n=6) sind in Prozent dargestellt und die Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.	71
Abbildung 24: Schnitte der Schweinevollhaut aus der Penetrationsstudie. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie, Leica TCS SP5, Objektiv: HCX PL APO CS 63.0x1.20 Wasser UV. Die Anregung des Farbstoffs wurde mit einem Argon Laser bei 514 nm ausgeführt und die Emission im Bereich von 535 nm – 580 nm aufgezeichnet. Dargestellt ist die Maximumprojektion eines z-Stacks mit einer Ausdehnung von 40 µm, Bereich der LUT 40-255.....	75
Abbildung 25: Box plot Wiederfindung von intaktem Dz13 via Hybridisierungs-ELISA. Dargestellt sind die Whisker der 10%-90% Perzentile. Formulierungen deren Dz13 Wiederfindung sich signifikant von der Wiederfindung aus der Penetration einer wässrigen Lösung Dz13 Lösung unterscheiden sind mit „*“ gekennzeichnet.	78
Abbildung 26: Zellviabilität HaCaTs nach Transfektion über Resazurinumsatz n=3 mit vier Replikaten pro Transfektionsprobe, 48 Stunden nach Transfektion mit Chitosan-DNAzym Polyplexen	81
Abbildung 27: Fluoreszenzsignal FAM-Dz13, 48 Stunden nach Transfektion. Die mit „*“ gekennzeichneten Proben unterscheiden sich signifikant zur entsprechenden Blank-Probe. Die statistische Auswertung wurde anhand eines unabhängigen t-Testes durchgeführt.	82

10 Publikationen

Jahr	Journal	Autoren	Titel
2019	International Journal of Pharmaceutics Volume 563, 30 May 2019, Pages 208-216 doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.04.005	Anna-Carola Eicher, Dorota Dobler, C. Kiselmann, Thomas Schmidts, Frank Runkel	Dermal delivery of therapeutic DNAzymes via chitosan hydrogels
2016	European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Volume 107, October 2016, Pages 80-87 doi: 10.1016/j.ejpb.2016.07.001	Kay Marquardt, Anna- Carola Eicher, Dorota Dobler, Frank Höfer, Thomas Schmidts, Jens Schäfer, Harald Renz, Frank Runkel	Degradation and protection of DNAzymes on human skin
2015	International Journal of Pharmaceutics Volume 479 Issue 1 1 February 2015 Pages 150-158 doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.043	Kay Marquardt, Anna- Carola Eicher, Dorota Dobler, Ulf Mäder, Thomas Schmidts, Harald Renz, Frank Runkel	Development of a protective dermal drug delivery system for therapeutic DNAzymes
2018	International Journal of Pharmaceutics Volume 550 Issues 1–2 25 October 2018 Pages 463-469 doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.002	C.Kiselmann, D.Dobler, T.Schmidts, A.C.Eicher, C.Möbs, W.Pfützner, F.Runkel	Development of a skin- friendly microemulsion for dermal allergen- specific immunotherapy

11 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde für die digitale Veröffentlichung entfernt.

12 Danksagung

Meine größte Dankbarkeit gilt allen, die mich in den Jahren meiner Promotion unterstützt haben. Ein so großes Projekt zum Abschluss zu bringen ist der Verdienst vieler, nicht der eines Einzelnen.

Allen voran möchte ich Prof. Dr. Frank Runkel danken. Lieber Frank, vielen Dank für dein Vertrauen in mich und deine Unterstützung, schon von dem Tag an, an dem ich mein Diplomthema bei dir vorstellen durfte. Ich werde mich besonders gerne an unsere Gespräche über Innovation, Wissenschaft und den allgemeinen Wissenschaftsbetrieb zurückerinnern. Danke, dass du immer dazu bereit gewesen bist deinen Erfahrungsschatz mit uns teilen, andere Perspektiven einzunehmen und neue Wege aufzuzeigen. Ich möchte mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Peter R. Schreiner für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken und für die Zeit, die Sie mir geschenkt haben zur Vorstellung meines Promotionsthemas.

Um zu einem der ersten Sätze dieser Arbeit zurückzukommen - „What’s the use of doing all this work if we don't get some fun out of this? “ – möchte ich mich ganz besonders bei Dr. Dorota Dobler und Dr. Kai Marquardt bedanken, die mir als Mentoren zur Seite standen und mit mir die Freude an der Wissenschaft teilen. Neben der großartigen Unterstützung von Dorota waren meine „Doktorbrüder“ Chris, Axel und David eine unverzichtbare Hilfe. Vielen Dank für die Korrekturen, Anmerkungen und die wundervolle Zeit im Büro, auf Reisen und im Labor. Im Labor konnte ich mit Lisa Rühl zusammenarbeiten, die wertvolle Daten für diese Arbeit im Rahmen ihrer Masterthesis beigetragen hat, vielen Dank dafür. Ein großes Dankeschön gilt zudem Dr. Thomas Schmidts. Vielen Dank für deine offene Art, deinen Pragmatismus und vor allem dafür, dass du dich stets um die Finanzierung meines Forschungsvorhabens gekümmert hast. Ich möchte mich auch bei Frau Dr. Christina Zinecker und Frau Dr. Petra Isberner von FTN bedanken, für ihre Fürsorge und die Ermöglichung der Konferenz- und Seminarbesuche. Mein Dank gilt zudem allen Mitarbeitern der THM und JLU, die durch ihre tägliche Arbeit die Forschung ermöglichen. Mein allergrößter Dank gilt Till. Du hast mich darin bestärkt die Promotion anzufangen und vor allem durchzuhalten und teilst mit mir die Idee, dass die Wissenschaft Fortschritt für die Gesellschaft bedeutet. Vor allem möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, ihr seid eine große Unterstützung für mich. Vielen Dank.

13 Eidesstattliche Erklärung nach § 17 Abs. 2 Nr. 1 der Promotionsordnung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, 30.03.2021

Ort, Datum

Unterschrift