

Regenerative Medizin

Implantatüberzüge für die *in situ*-Transfektion in der regenerativen Medizin

CATHARINA HUSTEDEN¹, THOMAS GROTH², CHRISTIAN WÖLK³

¹ ABTEILUNG BIOCHEMISCHE PHARMAZIE, INSTITUT FÜR PHARMAZIE, UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

² AG BIOMEDIZINISCHE MATERIALIEN, INSTITUT FÜR PHARMAZIE, UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

³ PHARMAZEUTISCHE TECHNOLOGIE, INSTITUT FÜR PHARMAZIE, MEDIZINISCHE FAKULTÄT, UNIVERSITÄT LEIPZIG

A promising approach in regenerative medicine is to modify cell behaviour with growth factors. However, the side of action has to be in spatial control. We present a new strategy in the field of regenerative medicine based on the combination of implant coatings with nano-scaled gene vectors. This enables the local restricted *in situ* transfection of cells to induce the production of cytokines. Therewith, the migration and differentiation of cells can be controlled to support tissue regeneration.

DOI: 10.1007/s12268-021-1594-4
© Die Autoren 2021

Das biomedizinische Gebiet der Gewebekonstruktion und Regenerativen Medizin (*tissue engineering and regenerative medicine*, TERM) eröffnet eine Vielzahl an Perspektiven in der Behandlung von Organ- und Gewebsdefekten [1, 2]. Durch Innovationen im Bereich der biotechnologischen Methoden hat sich das Spektrum der Therapieoptionen auf diesem Gebiet erheblich erweitert. Der Einsatz von Zytokinen und Wachstumsfaktoren bietet neue Möglichkeiten, das Einwandern und die Differenzierung von Zellen zu beeinflussen. Weiterhin kommen immer häufiger therapeutische Ansätze aus dem Gebiet der Arzneimittel für neuartige Therapien zum Einsatz (*advanced therapy medicinal products*, ATMPs). ATMPs sind Therapeutika, die in mindestens eine der folgenden Kategorien eingeordnet werden können (EU-Richtlinie 2001/83/EG):

- Genterapeutika
- somatische Zelltherapeutika
- biotechnologisch bearbeitete Gewebeprodukte

ATMPs bieten neue Ansatzpunkte für die Behandlung von angeborenen oder erworbenen Erkrankungen. In den letzten zwei Dekaden haben Therapiestrategien mit ATMPs

den Bereich der klinischen Forschung verlassen und den Arzneimittelmarkt betreten [3].

Regenerative Medizin durch *in situ*-Transfektion

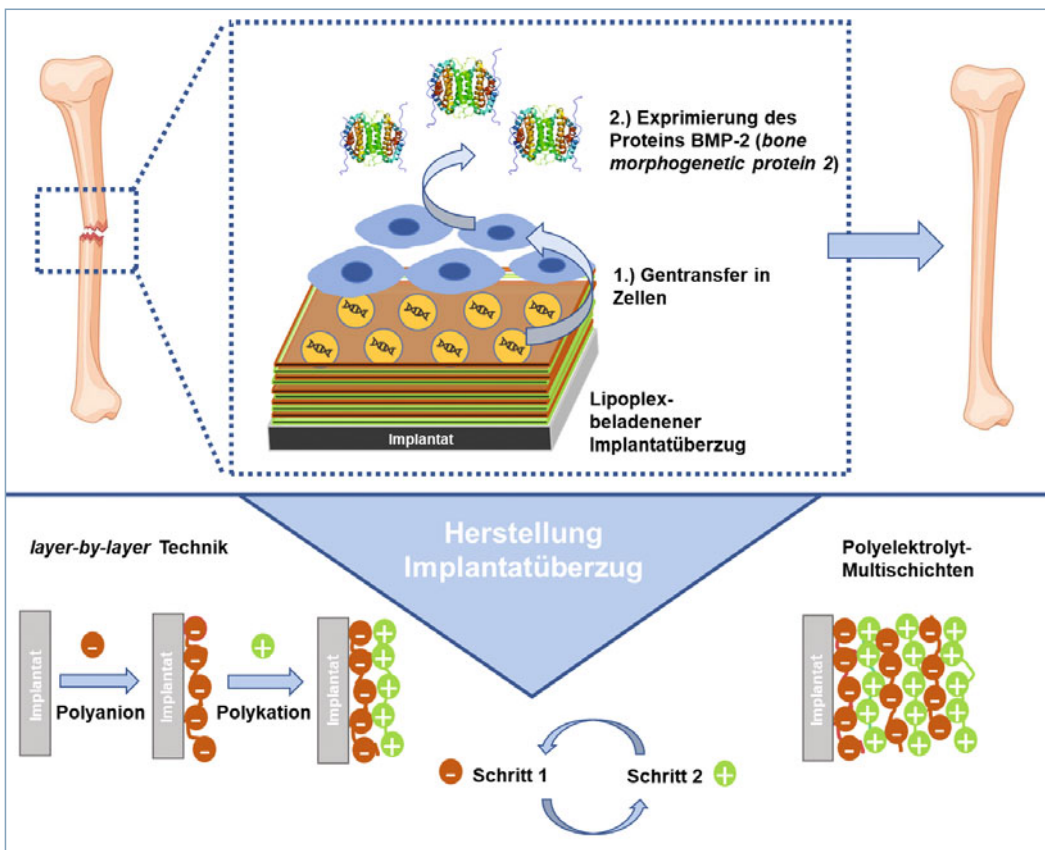
Der von uns gewählte Ansatzpunkt kombiniert materialwissenschaftliche Aspekte und genterapeutische Ansätze, um funktionalisierte Überzüge für Implantate zu entwickeln, welche im Bereich der regenerativen Medizin eingesetzt werden sollen. Die Schlüsselstrategie beinhaltet eine *in situ*-Transfektion (artificialer Nukleinsäuretransfer im Organismus) an Körperzellen ausgehend von den eingesetzten Implantaten. Dieser Prozess soll die Produktion von Zytokinen anregen, welche die gezielte Zelldifferenzierung für die Gewebsregeneration auslösen. Das Pilotprojekt fokussiert sich auf die Regeneration komplizierter Knochenbrüche. Eine vom Implantat ausgehende *in situ*-Transfektion kann dabei genutzt werden, um körpereigene Zellen zur Produktion von knochenmorphogenetischen Proteinen (*bone morphogenetic proteins*, BMPs) anzuregen und damit die Knochenregeneration zu stimulieren (**Abb. 1**). Der Vorteil dieser Strategie besteht darin, dass die hochaktiven Zyto-

kine so nur am gewünschten Knochendefekt gebildet werden. Somit werden systemische unerwünschte Effekte verhindert, wie z. B. eine ektopische Ossifikation (Verknöcherung von Muskulatur).

Herstellung Lipoplex-beladener Implantatüberzüge mittels *layer-by-layer*-Technik

Um Überzüge von einer Stärke im Submikrometerbereich für Implantate zu generieren, sind hohe Anforderungen an den Herstellungsprozess zu stellen. Die Biokompatibilität der Materialien steht dabei im Vordergrund. Der Überzug muss aber auch flexibel auf Implantate mit unterschiedlichsten Formen und Poren übertragbar sein. Der Aufbau von Polyelektrolytmultischichten ist aufgrund der Flexibilität des Prozesses besonders geeignet. Bei dieser Methode werden Lagen komplementärer multivalenter Moleküle Schicht für Schicht aufgebaut (*layer-by-layer technique*, LbL). Beruht der Prozess auf Interaktionen mehrfach geladener Moleküle, ist auch von Polyelektrolytmultischichten die Rede (**Abb. 1**). Die Flexibilität der LbL-Methode resultiert aus der variablen Verwendung der Grundkomponenten (z. B. geladene Polymere, organische Verbindungen, anorganische Nanopartikel, Biomoleküle). Damit lässt sich die vertikale Struktur des Filmüberzugs, bezogen auf die Oberfläche, sehr leicht variieren. Weiterhin ist der Herstellungsprozess sehr flexibel. Verschiedene Verfahren, wie die Tauch- oder Spray-Methoden bis hin zu Druckverfahren, ermöglichen den Überzug komplexer Geometrien mit Polyelektrolytmultischichten. Ein weiterer Vorteil ist die unkomplizierte Verwendung von wässrigen Lösungsmitteln für den LbL-Prozess unter milden pH-Werten bei Raumtemperatur. Somit kann auch eine hohe Kompatibilität mit biologischen Materialien gewährleistet werden [4].

Unsere Herangehensweise beruht auf einem LbL-basierten Aufbau von Überzügen mit einer Stärke im Submikrometerbereich unter Verwendung von geladenen Biopolymeren. Die Funktionalisierung für die *in situ*-



◀ **Abb. 1:** Darstellung der *in situ*-Transfektion ausgehend von Implantatüberzügen am Beispiel der Behandlung komplizierter Frakturen (oberes Feld). Die induzierte Expression von BMP-2 nach erfolgreichem Gentransfer aus dem *layer-by-layer* (LbL)-Film auf Zellen resultiert in Osteoneogenese. Schematische Darstellung des Aufbaus von Polyelektrolytmultischichten mithilfe der LbL-Technik (unteres Feld).

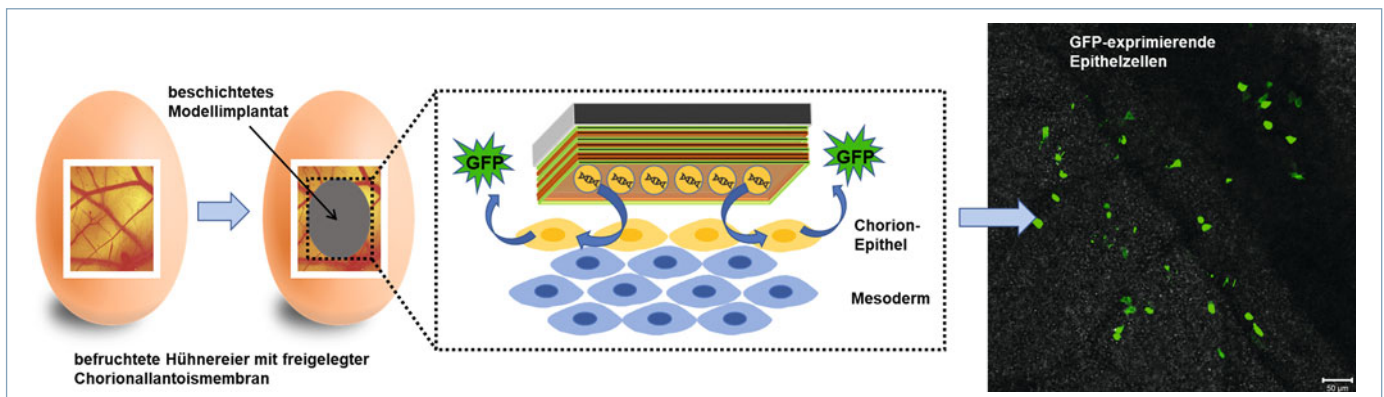
Transfektion beruht auf der Einbettung DNA-beladener Lipidnanopartikel, die Lipoplexe, in die Polyelektrolytmultischichten (**Abb. 1**). Die dabei verwendeten Materialien haben einen erheblichen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften und die Stabilität des Überzugs. Weiterhin beeinflussen die Eigenschaften des Films wesentlich die Interaktion mit Zellen und Proteinen. Besonders interessant sind LbL-Filme, die auf Komponenten der humanen extrazellulären Matrix beruhen – eine Strategie, die auch in unseren Arbeiten Anwendung findet [5]. Über solche Systeme können gezielt Wachstumsfaktoren aus der interstitiellen Flüssigkeit über die natürlichen Bindungsmotive gebunden werden. Dadurch kann ein Mikromilieu geschaffen werden, welches dem natürlichen Gewebe entspricht. Des Weiteren besitzen Komponenten der extrazellulären Matrix Bindungsmotive für Rezeptoren auf der Zelloberfläche, über die Zelladhäsivität und Differenzierung beeinflusst werden können [6].

Die *in situ*-Transfektion ausgehend vom LbL-Film kann für die lokale Produktion von Wachstumsfaktoren durch transfizierte Zellen genutzt werden, wodurch man einen autokrinen oder parakrinen Effekt erzielen kann. Erste Polyelektrolytmultischichtbasierte Transfektionssysteme nutzten DNA

als Polyanion für den LbL-Aufbau in Kombination mit einem Polykation [7]. Ein Problem besteht aber in der Freisetzung von unkomplexierter DNA. Diese wird schnell von Nucleasen abgebaut und sehr ineffizient von Zellen aufgenommen. Diese Nachteile können umgangen werden, indem man Nucleinsäure-beladene Nanopartikel in die Polyelektrolytmultischichten einbaut. Die Nanopartikelformulierung hat einen schützenden Effekt auf die Nucleinsäure und fördert die zelluläre Aufnahme. Lipoplexe ermöglichen die Umsetzung dieser Strategie.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit stellen wir einen vielversprechenden Kandidaten für Lipoplex-beladene Implantatüberzüge vor [8]. Als Komponenten für den Schichtaufbau wurden Chitosan und Hyaluronsäure verwendet. Chitosan ist ein kationisches Biopolymer, das durch Deacetylierung von Chitin gewonnen wird. Seine antimikrobiellen Eigenschaften machen es zu einem interessanten Material für Implantatüberzüge [9]. Hyaluronsäure ist ein natürlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix im menschlichen Organismus. Weiterhin existieren für beide Biopolymere Qualitätsanforderungen im Europäischen Arzneibuch und der United States Pharmacopeia. Dies erleichtert eine mögliche Marktzulassung.

Als aktive Komponente für die Transfektion wurden selbstentwickelte Lipidformulierungen für den Lipoplexaufbau verwendet, welche herausragende Eigenschaften als Transfektionsreagenz aufweisen [10]. Der kationische Charakter der Lipoplexe erlaubt außerdem eine effiziente Einbettung in die Polyelektrolytmultischicht aus Hyaluronsäure und Chitosan. Um eine effiziente Interaktion von Zellen mit dem Filmüberzug zu gewährleisten, wurde eine finale Funktionalisierung mit Fibronectin, einem wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix, durchgeführt. Zellen interagieren über Integrine mit Fibronectin und werden in ihrer Adhäsivität und Funktionalität beeinflusst [11]. Die veröffentlichten Studien demonstrieren den effektiven Aufbau des funktionalisierten Überzugs auf Oberflächen. Die Nucleinsäure war dabei fest in den Lipoplexen eingebettet und somit im Überzug verankert. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung der Strategie der *in situ*-Transfektion. Eine sofortige Freisetzung der DNA-beladenen Lipoplexe würde das Risiko einer Transfektion ferner Gewebe durch systemische Zirkulation erhöhen. Die lokale Wirkung wäre nicht gegeben. Unsere Strategie sieht vor, dass lediglich solche Zellen transfiziert werden, die direkt im Kontakt mit dem Implantat stehen. Der Lipoplex-



▲ **Abb. 2:** Proof-of-concept-Experiment der *in situ*-Transfektion an der Chorionallantoismembran im Hühnerei. Der Überzug auf dem Modellimplantat besteht aus Chitosan und Hyaluronsäure. Die eingebetteten Lipoplexe sind mit GFP-codierender DNA beladen. Experimentelle Details sind in [8] beschrieben.

beladene Überzug aus Chitosan und Hyaluronsäure wurde effizient von Zellen besiedelt, wobei eine hohe Zytokompatibilität beobachtet wurde. Die auf dem Film wachsenden Zellen konnten die Nukleinsäure aus der Polyelektrolytmultischicht effektiv aufnehmen und das codierte Gen, in diesem Fall das *GFP*-Reporter gen (grün fluoreszierendes Protein) effizient exprimieren. Auch komplexe Gewebe, wie die Chorioallantoismembran des befruchteten Hühnereis als *in vivo*-Modell, konnten durch direkten Kontakt mit dem Lipoplex-beladenen Filmüberzug transfiziert werden (**Abb. 2**). Diese Pilotstudie demonstriert das große Potenzial des von uns entwickelten Systems für die *in situ*-Transfektion. Aktuelle Arbeiten beschäftigen sich mit der Anwendung von Genen für spezielle Wachstumsfaktoren und deren Wirkung auf Stammzellen, welche den Polymerüberzug besiedeln.

Danksagung

Dieses Projekt wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), Projektnummer 396823779, finanziell unterstützt. Wir danken der Arbeitsgruppe von Prof. Udo Bakows-

ky, Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Philipps Universität Marburg, für die CAM-Experimente. ■

Literatur

- [1] Vacanti JP, Langer R (1999) Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 354: 32–34
- [2] Vacanti JP (2010) Tissue engineering and regenerative medicine: from first principles to state of the art. *Journal of pediatric surgery* 45: 291–294
- [3] Paul-Ehrlich-Institut. <https://www.pei.de>
- [4] Borges J, Mano JF (2014) Molecular interactions driving the layer-by-layer assembly of multilayers. *Chem Rev* 114: 8883–8942
- [5] Brito Barrera YA, Hause G, Menzel M et al. (2020) Engineering osteogenic microenvironments by combination of multilayers from collagen type I and chondroitin sulfate with novel cationic liposomes. *Materials Today Bio* 7: 100071
- [6] Zhao M, Altankov G, Grabiec U et al. (2016) Molecular composition of GAG-collagen I multilayers affects remodeling of terminal layers and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *Acta Biomaterialia* 41: 86–99
- [7] Zhang J, Chua LS, Lynn MD (2004) Multilayered thin films that sustain the release of functional DNA under physiological conditions. *Langmuir* 20: 8015–8021
- [8] Husteden C, Doberenz F, Goergen N et al. (2020) Contact-triggered lipofection from multilayer films designed as surfaces for in situ transfection strategies in tissue engineering. *ACS Appl Mater Interfaces* 12: 8963–8977
- [9] Zheng L, Zhu J (2003) Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers* 54: 527–530
- [10] Janich C, Wölk C, Erdmann F et al. (2015) Composites of malonic acid diamides and phospholipids – Impact of lipoplex stability on transfection efficiency. *J Control Release* 220: 295–307

- [11] Altankov G, Grinell F, Growth T (1996) Studies on the biocompatibility of materials: fibroblast reorganization of substratum bound fibronectin on surfaces varying in wettability. *J Biomed Mater Res* 30: 385–391

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/ die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Catharina Husteden, Thomas Groth und Christian Wölk (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Dr. Christian Wölk
 Institut für Pharmazie
 Universität Leipzig
 Eilenburger Straße 15a
 D-04317 Leipzig
christian.woelk@medizin.uni-leipzig.de