

Doctoral Thesis ETH No. 17356

# Nucleic acid-free transduction for human protein therapy and advances in transfection processes

A dissertation submitted to the Swiss Federal Institute of  
Technology Zurich for the degree of Doctor of Natural  
Sciences

Presented by Nils Link  
Dipl. Natw. ETH  
born 05.09.1979  
citizen of Germany

Accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Martin Fussenegger, examiner  
Prof. Dr. Bernard Witholt, co-examiner  
Zurich, 2007

## Abstract

Both basic and applied biological research including drug discovery, functional genomics, tissue engineering, biopharmaceutical manufacturing and curing of defective tissues is based on the delivery of exogenous nucleic acids or proteins into mammalian cells. Over the last few years, important biotechnical advances have been made to enable these molecules to cross the cell's plasma membrane. These technologies laid the milestone to straightforward and modern cell engineering.

Nevertheless, academic or industrial research laboratories have to fulfill ever more constraining imperatives regarding quality, costs and reproducibility driven by a competitive pharmaceutical market and rapid biomedical progresses. Therefore, the methodological portfolio available for the introduction of molecules into the cell has to be refined in accordance with the changes and the new requirements in industrial and basic cell engineering procedures, which is definitely one of the most exciting biotechnological challenges for the future decade.

During this doctoral work, biotechnological applications have been pioneered that are presented in this thesis as three main projects.

### **Protein Transduction**

Gene therapy relies on therapeutic transgene delivery into degenerate cells for long-term reversion of genetic disorders. This technology is still in its infancy and thus there continue to exist major limitations including host genome alterations caused by random integration of the transgene and restricted dose control. To overcome these drawbacks, we designed a novel protein therapy approach based on nucleic acid-free viral particles that involves the exclusive packaging of protein therapeutics into a functional viral capsid. This innovative protein delivery system combines the efficiency of lentiviral vectors with the safety comparable with that of classical non-viral therapeutic formulations. Furthermore, this novel technique solves the most critical issue in therapeutic approaches: a fine-tuned control of the curing dose.

## **Nanoparticle-based Transfection**

Further seeking for new routes to transfect mammalian cells, we established novel procedures for industrial large-scale transfection, capitalizing on outstanding biochemical and biophysical properties of inorganic nanoparticles. We showed as first evidence that calcium phosphate particles were able to bind plasmid DNA. Taking this evidence as our starting point, we developed two new approaches, which were tested successfully. First, these particles could be used as new transfection reagent since the complexes produced by the nanoparticles when binding to the DNA mimic those formed by calcium-phosphate precipitation. Second, these particles could bind different viral vectors, and hence, could be used as a novel tool for the removal of viral pathogens from aqueous solutions.

## **Antibiotic Screening**

Capitalizing on the well-known macrolide, streptogramin and tetracycline-responsive regulation systems already established for mammalian cells, we developed a rapid and reliable *in vitro* assay for the detection of antibiotics in food and biological samples. Basically, the operator DNA sequence was bound onto a nitrocellulose, nylon or polyvinylidene fluoride membrane and incubated in presence of its cognate repressor. The repressor protein was detected thereafter with a horseradish peroxidase-coupled antibody. Owing to the fact that the binding of the sensor protein to the DNA sequence depends on the antibiotic concentration in the sample a differential readout is generated. The setup designed here proved to be an easy-to-use dipstick, which also finds application in the discovery of new antibiotics.

## Zusammenfassung

Die Grundlagenforschung sowie die angewandte Forschung, mit eingeschlossen Arzneimittelforschung, funktionelle Genomik, Gewebe Rekonstruktion, biopharmazeutische Produktion, und Heilung kranker Gewebe sind angewiesen auf das Einschleusen von Nukleinsäuren, Proteine oder Arzneimittel in Säugetier Zellen. Während den letzten Jahren wurden wichtige biotechnologische Fortschritte erzielt um diese biologisch aktiven Substanzen durch die Zellmembran zu zwingen. Diese neu entwickelten Technologien legten den Grundstein für ein modernes und einfacheres „Zell-engineering“.

Dennoch, unter dem Druck eines hoch kompetitiven pharmazeutischen Marktes und dem raschen Fortschritt in der Biomedizin steigt stetig die Nachfrage in den Laboren der Grundlagenforschung sowie der der Industrie nach neuen, zuverlässigeren und billigeren Methoden um DNA oder Proteine in Säugetierzellen zu schleusen. Aus diesem Grund ist es zwingend erforderlich laufend das vorhandene Methodenspektrum an die neuen Anforderungen anzupassen. Diese Nachfrage zu befriedigen ist eines der spannendsten Herausforderungen der Biotechnologie für die nächsten Jahrzehnte.

In diesem Zusammenhang widmet sich diese Doktorarbeit der Entwicklung neuer biotechnologischen Methoden zur Einschleusung von biologisch aktiven Substanzen durch die Zellmembran in die Zellen.

### **Protein Transduktion**

Die Gentherapie basiert auf dem Einführen von Transgenen in biophysiologisch entartete Zellen zur beständigen Korrektur defekter Gene. Diese Technologie steckt heute in den Kinderschuhen und kämpft immer noch mit bedeutenden Problemen wie der willkürlichen Integration von Transgenen in das Wirtsgenom und deren fein-kontrollierten Expressierung. Um diese Nachteile zu überwinden, haben wir einen neuen Proteintherapie Ansatz entwickelt basierend auf Nukleinsäure freien lentiviralen Partikeln. Diese innovative Protein Transduktion beruht auf der exklusiven Verpackung von Proteinen in funktionale virale Kapside und kombiniert die Effizienz von lentiviralen Vektoren mit der Sicherheit klassischer

therapeutischer Verabreichungsmethoden. Zudem löst diese Technik ein Problem, das sich oft bei der therapeutischen Anwendung stellt: eine präzise Kontrolle der Pharmazeutikumdosis.

### **Nanopartikel basierte Transfektion**

Immer auf der Suche nach neuen Wegen um Säugetier Zellen zu transfizieren haben wir neue grosstechnisch einsetzbare DNA Transfektionsmethoden etabliert. Die hier beschriebenen und entwickelten Methoden nutzen die herausragenden biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften von anorganischen Nanopartikeln aus, z.B. das Binden von DNA. Ausgehend von diesen Eigenschaften wurden zwei Ideen entwickelt und erfolgreich umgesetzt. Erstens können diese Nanopartikel als neues Transfektionsreagenz dienen, da die Komplexe die mit der DNA gebildet werden solchen einer Kalzium-Phosphat Präzipitation ähneln. Dabei weisen sie aber eine kleinere Los zu Los Variabilität auf und verkürzen stark die nötige Präparationszeit. Zweitens haben diese Partikel die Eigenschaft virale Vektoren zu binden und können daher genutzt werden um pathogene Viren aus wässrigen Lösungen zu entfernen.

### **Screening von Antibiotikas**

Basierend auf den wohl bekannten Makrolid, Streptogramin und Tetrazyklin sensitiven Regulationssystemen, die für den Einsatz in Säugetierzellen etabliert wurden, haben wir einen zuverlässigen Antibiotika Schnelltest entwickelt zur Analyse von Lebensmitteln und biologischen Proben. Im Wesentlichen wurde jeweils eine Operator Sequenz auf einer Nitrozellulose-, Nylon-, oder Polyvinylidenefluoridmembran immobilisiert und diese wurde im nächsten Schritt mit dem zugehörigen Repressor inkubiert. Da das Binden des Sensorproteins an die Operatorsequenz abhängig von der Antibiotikakonzentration in der Probe ist, ergibt die Präsenz von Antibiotika eine Verringerung der gebundenen Protein Menge, die dann mit einem Antikörper mit angekoppelter „Meerrettich-peroxidase“ detektiert wurde. Dieser Aufbau ergibt ein einfach zu benutzendes Teststäbchen, das neben der Detektion von Antibiotikarückständen in biologischen Proben ebenfalls Anwendung findet bei der Suche nach neuen Antibiotika.