



Doctoral Thesis

PLL-g-PEG-DNA nanoparticles for local gene therapy to improve cutaneous wound healing

Author(s):

Rimann, Markus

Publication Date:

2009

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005980535> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS ETH NO. 18718

PLL-g-PEG-DNA nanoparticles for local gene therapy to improve cutaneous wound healing

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Markus Rimann

Dipl. Natw. ETH Zurich

February 3, 1975

Citizen of Winterthur, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Viola Vogel, examiner

PD Dr. Heike Hall, co-examiner

Prof. Dr. Marcus Textor, co-examiner

2009

SUMMARY

The idea of treating genetic and acquired diseases by replacing a nonfunctional gene appeared in the sixties of the last century and ultimately led to the first clinical trial in gene therapy in 1989. In the early studies mostly viral-based gene delivery systems were used, because of the virus' inherent cell transduction ability. The rise for the development of non-viral gene vehicles started, due to some disadvantages associated with viral gene delivery systems, such as high immunogenicity, low gene transportation capacity and possible random integration into the genome. Non-viral gene delivery systems are divided into naked DNA delivery and lipid- and polyplex-mediated DNA delivery. By steadily improving their early drawbacks of poor *in vivo* transfection efficiencies, until today one fourth of all the clinical trials for gene therapy were carried out with non-viral gene delivery systems. In total more than 1500 clinical studies were performed so far, which makes gene therapy a promising tool for the treatment of human diseases.

In the field of tissue repair and regeneration adequate treatments are needed, since people with chronic diseases, such as diabetes mellitus as well as elderly persons are prone for the development of chronic wounds. One approach to improve healing capacities of healing-impaired wounds is the use of gene therapy. By transient (temporary) insertion of key regulator genes for wound healing directly into the wound site the orderly sequence of healing phases should ideally be reprogrammed or restarted, respectively, leading to successful wound repair.

This thesis aimed to develop a matrix-released gene delivery system with new poly-L-lysine-graft-poly(ethylene glycol)- (PLL-g-PEG)-based polymers to transiently transfect wound cells with a relevant transcription factor. This can be achieved by the release of these nanoparticles from fibrin wound healing matrices that were directly placed onto normal or healing-impaired wounds.

PLL-g-PEG condensates plasmid-DNA into nanoparticles that are uptaken by cells leading to expression of the desired gene(s) encoded on the plasmid-DNA. PLL-g-PEG/DNA nanoparticles composed of graft copolymers between 20 kDa PLL and 5 kDa PEG with a grafting of 5 % of the lysine-backbone were selected from a pool

of differently-composed PLL-g-PEG polymers for their superior transfection efficiency in COS-7 cells combined with low cytotoxicity. The hydrodynamic diameter of these nanoparticles was around 100 nm independent of the plasmid-size incorporated (between 3 and 10 kb) and was stable for at least two weeks.

Mammalian cells use different endocytosis pathways to internalize particles from their surrounding, namely macropinocytosis, clathrin- and caveolae-mediated endocytosis and clathrin- and caveolae-independent endocytosis. Analysis of PLL-g-PEG/DNA-nanoparticle uptake into COS-7 cells revealed that they do not follow clathrin-mediated endocytosis suggesting that the nanoparticles are not degraded in lysosomes. Furthermore, PLL-g-PEG/DNA-nanoparticle transfection occurred also independent from other endocytosis pathways as application of specific endocytosis inhibitors were only effective when several inhibitors were combined.

For *in vivo* studies two new PLL-g-PEG polymers were synthesized, one having a poly arginine-sequence in order to enhance cellular uptake and another one having a transglutaminase (TG) substrate sequence enabling enzymatic covalent incorporation into 3D-fibrin matrices. Nanoparticles made of the two polymers complexed with DNA showed enhanced transfection efficiencies compared to unmodified PLL-g-PEG/DNA nanoparticles in COS-7 cells. *In vitro* nanoparticle release experiments from 3D-fibrin matrices revealed that TG-peptide-containing nanoparticles remained in the matrix over 7 days, whereas unmodified nanoparticles were released in a fast manner.

In order to establish an animal model that allows analysis of normal and impaired wound healing Sprague Dawley rats were injected with streptozotocin (STZ) that destroyed their insulin-producing cells leading to high blood glucose levels and as a consequence to stagnation of the body weight. This animal model serves as a model for diabetes mellitus type 1. 3D-Fibrin hydrogels containing nanoparticles modified with and without TG-peptides were directly (*in situ*) polymerized into cutaneous wounds on the back of these rats. The DNA of interest was HIF-1 α Δ ODD being a stabilized variant of the transcription factor HIF-1 α , which dimerizes with HIF-1 β to initiate transcription of (growth) factors relevant for the stimulation of angiogenesis. The idea is to improve cutaneous wound healing by the transfection of wound cells and thereby stimulating angiogenesis. No macroscopic differences of wound progression were visible between the different wounds and normal versus diabetic rats. After a three and seven day wound healing period the animals were killed and the wounds were histologically analyzed. HE-stainings of wound sections from the midline of the wound showed different wound areas e.g wound edges, where epithelium starts to close the wound and the granulation tissue in the middle of the wound,

indicative for active wound healing processes. Immunostainings against endothelial cells (blood vessels) and smooth muscle cells (mature blood vessels) showed ongoing angiogenesis in the middle of the wound whereas at the borders mainly mature blood vessels were found. The histomorphometric analysis is still ongoing.

We think that this gene therapy approach by using a matrix-released gene delivery system where transfection relies on the natural degradation of the fibrin matrix might be a good alternative for wound treatments.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Idee genetische und angeborene Krankheiten durch Ersetzen eines nichtfunktionierenden Gens zu behandeln entstand in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts und führte schliesslich dazu, dass 1989 die erste klinische Studie in der Gentherapie durchgeführt wurde. In den frühen Studien wurden hauptsächlich virus-basierende Gentransfersysteme verwendet, weil Viren natürlicherweise Zellen transduzieren. Die Entwicklung von nicht-viralen Gentransfervehikeln wurde durch verschiedene Nachteile der viralen Systeme begünstigt wie z.B. die hohe Immunogenität, die geringe Gentransportkapazität und die meist zufällige Integration ins Genom. Die nicht-viralen Gentransfersysteme werden unterteilt in nackten DNS Transfer und Lipid- und Polyplex vermittelten DNS Transfer. Durch stetes Verbessern der anfänglichen Nachteile wie zum Beispiel die schlechte *in vivo* Transfektionseffizienz werden heute ein Viertel aller klinischen Gentherapiestudien mit nicht-viralen Systemen durchgeführt. Bis heute sind mehr als 1500 klinische Studien in der Gentherapie durchgeführt worden, was Gentherapie zu einem vielversprechenden Instrument zur Behandlung von humanen Krankheiten macht.

Im Gebiet der Gewebereparatur und -regeneration werden geeignete Behandlungen gesucht, weil Menschen mit chronischen Krankheiten wie z.B. die Zuckerkrankheit so wie auch ältere Menschen anfällig für das Auftreten von chronischen Wunden sind. Gentherapie ist ein Weg, um das Zuheilen von schlechtheilenden Wunden zu verbessern. Durch das transiente (temporäre) Einfügen eines Schlüsselgens direkt in die Wunde, könnte idealerweise die geordnete Wundheilungssequenz fortgeführt oder neu gestartet werden, was zu einer erfolgreichen Heilung der Wunde führen sollte.

In dieser Doktorarbeit versuchten wir ein von einer Matrix freigesetztes Gentransfersystem zu entwickeln, das auf neuen Poly-L-Lysin-graft-Poly(ethylenglykol)-(PLL-g-PEG)-Polymeren basiert und die DNS von relevanten Transkriptionsfaktoren transient in Wundzellen transfiziert. Das wird erreicht durch die Freisetzung von diesen Nanopartikeln aus Fibrin Wundheilungsmatrizen, die direkt auf normale und diabetische Wunden gegeben wurden.

PLL-g-PEG kondensiert Plasmid-DNA zu Nanopartikeln, die von Zellen aufgenommen werden, was zur Expression des/der gewünschten Gens/Gene, das/die auf der DNS kodiert ist/sind, führt. Aus verschiedenen zusammengesetzten PLL-g-PEG Polymeren wurde ein PLL-g-PEG Polymer ausgewählt, weil es mit der DNS komplexiert die beste Transfektionseffizienz in COS-7 Zellen kombiniert mit geringer Zytotoxizität, aufwies. Das Kopolymer bestand aus einem 20 kDa Poly-L-Lysin Rückgrat mit 5 % graftedem 5 kDa PEG. Der hydrodynamische Durchmesser dieser Nanopartikel war ungefähr 100 nm. Er war unabhängig von der Grösse des komplexierten Plasmids (zwischen 3 und 10 kb) und war stabil für mindestens zwei Wochen.

Säugetierzellen benutzen verschiedene Endozytose-Aufnahmewege, um Partikel aufzunehmen. Wie zum Beispiel Makropinozytose, Klathrin- und Caveolae-vermittelte Endozytose und Klathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose. Bei der Analyse vom Aufnahmeweg von PLL-g-PEG/DNS Nanopartikeln konnte gezeigt werden, dass diese nicht über Klathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen werden und deshalb auch nicht in den Lysosomen abgebaut werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass PLL-g-PEG/DNS Nanopartikel auch nicht spezifisch über andere Endozytosewege aufgenommen werden, da die Transfektion nur durch die Kombination von verschiedenen Endozytoseinhibitoren reduziert werden konnte.

Für *in vivo* Studien wurden zwei neue PLL-g-PEG Polymere synthetisiert, wobei eines eine Polyarginin-Sequenz trägt, um die Zellaufnahme zu verbessern und das andere eine Transglutaminase (TG) Substrat-Sequenz, um kovalent in Fibrinmatrizen eingebaut werden zu können. Nanopartikel, die beide Polymere enthielten transfizierten COS-7 Zellen besser als die unmodifizierten PLL-g-PEG/DNS Nanopartikel. *In vitro* Nanopartikel Freisetzungsexperimente von 3D-Fibrinmatrizen zeigten, dass TG-Peptid-enthaltende Nanopartikel während sieben Tagen in der Matrix verblieben, im Gegensatz zu den unmodifizierten Nanopartikeln, die schnell aus der Matrix freigesetzt wurden.

Um ein Tiermodell zu etablieren, das einem erlaubt die normale und verzögerte Wundheilung zu untersuchen, wurden Sprague Dawley Ratten mit Streptozotocin (STZ) injiziert, welches die insulinproduzierenden Zellen im Körper zerstört und zu hohen Blutglukosewerten führt und als Konsequenz zur Stagnation vom Körpergewicht führt. Dieses Tiermodell ist ein Modell für Diabetes Mellitus Typ 1. 3D-Fibrin Hydrogele mit Nanopartikeln, mit oder ohne TG-Peptid wurden direkt (*in situ*) in Hautwunden auf dem Rücken von Ratten polymerisiert. Die DNS kodierte für das Gen HIF-1 α ΔODD, welches die stabilisierte Variante vom Transkriptionsfaktor HIF-1 α ist, die mit HIF-1 β dimerisiert und so die Transkription von (Wachstums-) Faktoren initiiert, die wichtig bei der

Blutgefässneubildung sind. Die Idee dahinter ist, die Hautwundheilung zu verbessern, indem Wundzellen transfiziert werden die somit die Blutgefässneubildung stimulieren. Es konnten keine makroskopischen Unterschiede beim Zustand der Wunden festgestellt werden, weder bei den verschiedenen Wunden noch bei den normalen gegenüber den diabetischen Ratten. Nach einer drei- beziehungsweise siebentägigen Wundheilungsphase wurden die Tiere getötet und die Wunden histologisch analysiert. HE-Färbungen von der Mittellinie der Wunden zeigten die verschiedenen Wundgebiete, z.B. die Wundränder, wo das Epithelium anfängt die Wunde wieder zu schliessen und das Granulationsgewebe in der Mitte der Wunde, wo die Wundheilung am meisten aktiv ist. Immunfärbungen gegen Endothelzellen (Blutgefässe) und glatte Muskelzellen (ausgewachsene Blutgefässe) zeigten deutlich, dass in der Mitte der Wunde viele neue Blutgefässe gebildet wurden, im Gegensatz zu den Wundrändern, wo hauptsächlich grosslumige Blutgefässe vorhanden waren. Histomorphometrische Analysen werden zur Zeit durchgeführt.

Wir denken, dass dieser Gentherapieansatz, in dem ein von einer Matrix freigesetztes Gentransfersystem verwendet wird, das vom natürlichen Abbau der Fibrinmatrix abhängt, eine gute Alternative zu den herkömmlichen Wundbehandlungen darstellt.