

Stabilitet av kitosan-DNA formuleringer

Hovedoppgave i galenisk farmasi

Astrid Aaberge



Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo
Høsten 2002

Forord

Studien presentert i denne hovedoppgaven er utført ved avdeling for Galenisk Farmasi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo i perioden oktober 2001 til november 2002.

Jeg vil spesielt takke cand. pharm. Kristine Romøren for utmerket veiledning og for et lærerikt og spennende år.

Jeg vil også takke dr. ing. Beate J. Thu og 1. amanuensis Gro Smistad for god veiledning og bidrag til oppgaven.

Takk til ansatte og hovedfagsstudenter ved avdeling A for et hyggelig år.

Til slutt vil jeg takke familien min for god støtte.

Oslo, november 2002

Astrid Aaberge

Sammendrag

I genterapi brukes DNA som legemiddel. Generelt for legemidler er det en fordel at stabiliteten av legemiddelet ved lagring er god. Nakent DNA er lite stabilt i seg selv på grunn av kjemisk og enzymatisk nedbrytning. Ved å kompleksere DNA med en polymer, kan DNA beskyttes mot degradering av nukleaser, og opptak av DNA i celler kan bedres. En polymer som kan brukes til slik kompleksing av DNA er kitosan. Kitosan er en kationisk polymer som er biodegraderbar og lite toksisk. Egenskapene til kitosan kan varieres og er blant annet avhengig av kitosanets molekylvekt og acetyleringsgrad.

I denne oppgaven ble ulike formuleringer med kitosan og DNA undersøkt for deres stabilitet under lagring ved forskjellige temperaturer. Det ble brukt kitosantyper med varierende acetyleringsgrad og molekylvekt. Formuleringene ble karakterisert med hensyn på transfeksjon av celler og størrelse av kompleksene. Komplekseringsgrad av DNA med kitosan ble også bestemt. Videre ble stabiliteten av kitosanløsninger, DNA-løsninger og DNA kompleksert med kitosan undersøkt.

Det viste seg at transfeksjonseffektiviteten og størrelsen for formuleringer av DNA og relativt høymolekylært kitosan var stabil i hele lagringsperioden på 22 uker under lagring ved temperaturer på 4 °C og 25 °C. De andre formuleringene som ble undersøkt baserte seg på DNA kompleksert med lavmolekylære kitosantyper. Disse kompleksene hadde redusert transfeksjonseffektivitet, men stabil størrelse under 22 ukers lagring ved 4 °C og 25 °C . Når lagringen skjedde ved høy temperatur (45 °C) ble transfeksjonseffektiviteten redusert for alle kompleksene og størrelsen av kompleksene var svært ustabil. Det skjedde en nedbrytning av DNA ved lagring, og dette var en medvirkende årsak til den reduserte transfeksjonseffektiviteten. Lagring av kitosan førte til nedbrytning av kitosan, men evnen kitosan hadde til å kompleksere DNA var god i hele lagringsperioden. Imidlertid er nedbrytningen av kitosan en sannsynlig forklaring på størrelsesendringene av kompleksene. Totalt sett er formuleringer av relativt høymolekylært kitosan og DNA stabile under lagring ved temperaturer opp til 25 °C i over 5 måneder. Derfor kan slike formuleringer være godt egnet til bruk i genterapi.

Innhold

1	MÅLSETNING	1
2	INNLEDNING	2
2.1	DNA	2
2.1.1	<i>Struktur av DNA</i>	2
2.1.2	<i>Uttrykk av DNA</i>	4
2.1.3	<i>Plasmider</i>	5
2.1.4	<i>Genterapi</i>	6
2.1.5	<i>Formuleringer av DNA</i>	7
2.2	KITOSAN	9
2.2.1	<i>Struktur og egenskaper</i>	9
2.2.2	<i>Anvendelse</i>	10
2.3	KITOSAN-DNA FORMULERINGER	11
2.4	STABILITET AV KITOSAN-DNA FORMULERINGER	12
2.4.1	<i>DNA</i>	12
2.4.2	<i>Kitosan</i>	13
2.4.3	<i>Kitosan-DNA formuleringer</i>	14
2.5	KARAKTERISERING AV KITOSAN-DNA FORMULERINGER	14
2.5.1	<i>Transfeksjon av celler</i>	14
2.5.2	<i>Størrelse</i>	16
2.5.3	<i>Kvantifisering og integritet av DNA</i>	16
2.5.4	<i>Viskositet av kitosan i løsning</i>	17
3	MATERIALER	18
4	METODER	21
4.1	DNA	21
4.1.1	<i>Tillaging av DNA-løsninger</i>	21
4.1.2	<i>Integritet av DNA-løsninger</i>	21
4.2	KITOSAN	22
4.2.1	<i>Tillaging av kitosanløsninger</i>	22
4.2.2	<i>Kinematisk viskositet av kitosanløsninger</i>	22
4.3	KITOSANBASERTE POLYPLEXER	23
4.3.1	<i>Fremstilling av polyplexer</i>	23
4.3.2	<i>Transfeksjonseffektivitet</i>	24
4.3.3	<i>Størrelse</i>	26
4.3.4	<i>Komplekseringsgrad av DNA</i>	27
4.3.5	<i>Stabilitet av DNA i polyplexer</i>	28
4.4	OPPSETT FOR FORSØKENE	28
4.4.1	<i>Forforsøk</i>	28
4.4.2	<i>Lagringsstudie</i>	29

5	RESULTATER	32
5.1	FORFORSØK.....	32
5.1.1	<i>Transfeksjonseffektivitet</i>	32
5.1.2	<i>Størrelse</i>	33
5.2	LAGRINGSSTUDIE.....	34
5.2.1	<i>Transfeksjonseffektivitet</i>	34
5.2.2	<i>Størrelse</i>	38
5.2.3	<i>Komplekseringsgrad av DNA</i>	44
5.2.4	<i>Stabilitet av DNA i lagrede polyplexer</i>	45
5.2.5	<i>Stabilitet av lagrede DNA-løsninger</i>	47
5.2.6	<i>Kinematisk viskositet av lagrede kitosanløsninger</i>	48
5.2.7	<i>pH i løsninger med polyplexer</i>	50
6	DISKUSJON	51
6.1	FORFORSØK.....	51
6.2	LAGRINGSSTUDIE.....	52
6.2.1	<i>Transfeksjonseffektivitet</i>	53
6.2.2	<i>Størrelse</i>	57
7	KONKLUSJON	61
8	REFERANSELISTE	62

1 Målsetning

Formuleringer av DNA og kitosan kan brukes i genterapi. Kitosan-DNA formuleringer har tidligere vært undersøkt for egenskaper som transfeksjonseffektivitet og størrelse av kompleksene. Egenskapene til kitosan-DNA formuleringer kan varieres ved endringer i en rekke parametre, som kitosantype, løsningsmiddel og forholdet mellom mengden av kitosan og DNA i formuleringene. Når slike formuleringer skal brukes som legemidler er det viktig å undersøke lagringsstabiliteten av dem. Målet med denne oppgaven var derfor å undersøke stabiliteten av kitosan-DNA formuleringer ved lagring av formuleringene ved ulike temperaturer.

2 Innledning

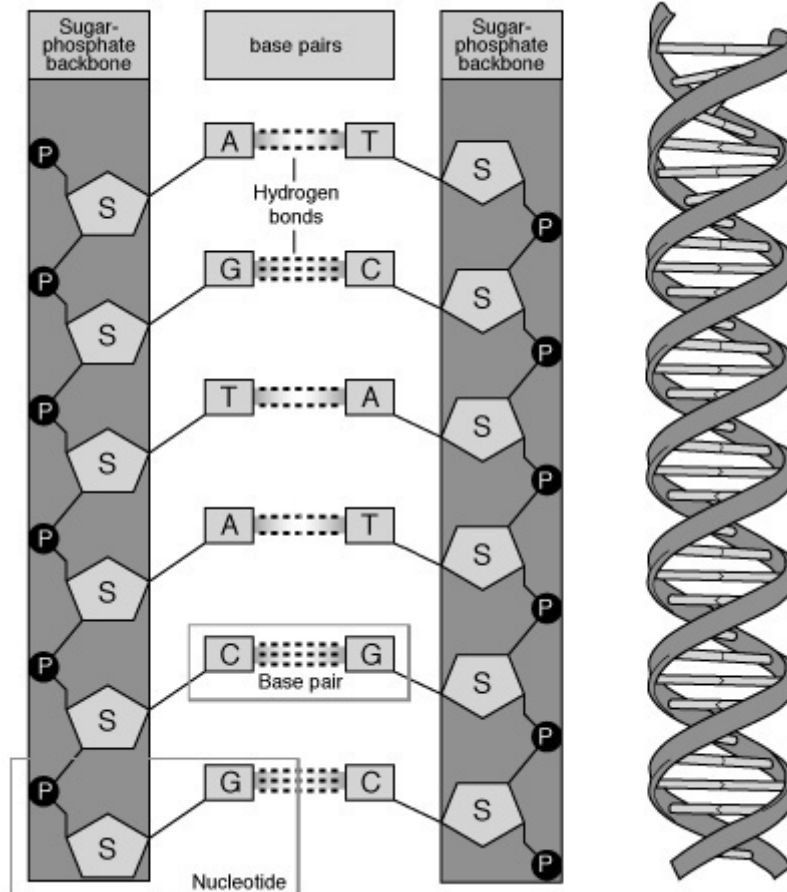
En relativt ny måte å behandle sykdommer på er ved bruk av DNA. Til formulering av legemidler med DNA kan det blant annet brukes kitosan. Det er gunstig at slike formuleringer er stabile ved lagring for å opprettholde effekten av legemiddelet. Stabiliteten av kitosan-DNA formuleringer kan avhenge av egenskapene til DNA, kitosan og formuleringer av disse.

2.1 DNA

2.1.1 Struktur av DNA

DNA (deoksyribonukleinsyre) er et stort molekyl som har til funksjon å oppbevare biologisk informasjon. Byggestenen i DNA kalles et nukleotid og det består av suktermolekylet deoxyribose, en fosfatgruppe og en nitrogenbase. Nitrogenbasene som finnes i DNA er purinene adenin (A) og guanin (G) og pyrimidinene cytosin (C) og tymin (T). Disse nitrogenbasene er festet til en ryggrad av suktermolekyler og fosfatgrupper (figur 2.1). Rekkefølgen av baser i DNA utgjør DNA sekvensen. DNA er negativt ladet ved pH 7, og denne ladningen befinner seg på hver av fosfatgruppene i ryggraden til DNA [1].

To kjeder av nukleotider kan bindes sammen til en dobbel heliks ved hjelp av svake bindinger (hydrogenbindinger) mellom par av nitrogenbaser (figur 2.1). Disse bindingene er spesifikke slik at det alltid er de to samme basene som binder seg til hverandre. Adenin binder seg til tymin ved hjelp av to hydrogenbindinger, mens guanin binder seg til cytosin ved å danne tre hydrogenbindinger. På denne måten blir de to nukleotidkjedene komplementære, men ikke identiske i basesekvens [1].



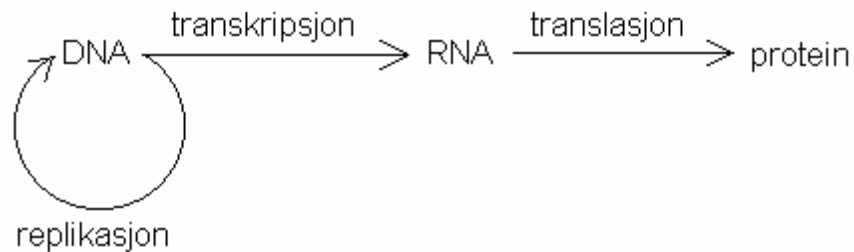
Figur 2.1 Oppbygningen av DNA med sukermolekyler (S), fosfatgrupper (P) og nitrogenbaser (A=adenin, G=guanin, C=cytosin, T=tymin) til venstre og strukturen av en dobbel heliks til høyre.

Mens den primære strukturen til DNA utgjøres av sekvensen av nukleotider i DNA, utgjør den doble heliksen den sekundære strukturen til DNA. Hvordan denne heliksen organiserer seg i forskjellige strukturer kalles den tertiære strukturen til DNA. Den tertiære strukturen kan være alt fra en relativt enkel struktur til den komplekse sammenfoldingen av DNA-helikser i kjernene i celler [1-2].

For å bevare den biologiske informasjonen som finnes i DNA fra celle til celle, skjer det en replikasjon av DNA. Denne replikasjonen skjer ved hjelp av komplementær baseparring mellom den ene tråden i DNA og en ny tråd av DNA som dannes utfra denne. Det finnes en rekke mekanismer for å sikre at denne baseparringen er rett og for å rette opp feil som skjer. På denne måten sikres det at det dannes nye DNA helikser som tilsvarer de gamle [3].

2.1.2 Uttrykk av DNA

For at DNA skal kunne uttrykkes må det oversettes til proteiner ved å gå veien om mRNA i to prosesser som kalles transkripsjon og translasjon [2] (figur 2.2).



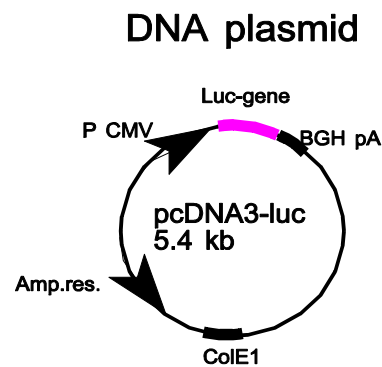
Figur 2.2 Den biologiske informasjonsflyten fra DNA til proteiner

RNA består av nukleotider, hvor suktermolekylet er en ribose, og uracil (U) opptrer som nitrogenbase istedenfor tymin. Dessuten har RNA struktur som en enkel tråd i motsetning til DNA som er dobbelt-trådet. Av de ulike typene RNA som fins benyttes messenger RNA (mRNA) til å oversette den genetiske informasjonen fra DNA til proteiner. Prosessen med å danne mRNA fra DNA kalles transkripsjon. Transkripsjonen skjer ved komplementær baseparring, der hver base i DNA koder for den tilhørende basen i mRNA. Det er varierende i hvor stor grad transkripsjonen skjer, avhengig av visse regulatoriske sekvenser i DNA. Etter at mRNA er dannet, klippes det bort sekvenser, introner, slik at bare exoner blir igjen til å kode for det endelige proteinet [4-5].

Proteinene, som består av aminosyrer, dannes fra mRNA i en prosess som kalles translasjon. Dette skjer ved binding av en aminosyre til et tilhørende transfer RNA (tRNA), med påfølgende komplementær baseparring mellom tre baser i tRNA og tre baser i mRNA. På denne måten bestemmes rekkefølgen av aminosyrene som utgjør en polypeptidkjede. Polypeptidkjedene kan eventuelt modifiseres etter translasjonen. Til slutt vil polypeptidet enten alene eller sammen med flere polypeptider danne den strukturen som utgjør det ferdige proteinet [6].

2.1.3 Plasmider

Et plasmid er et lite sirkulært DNA-molekyl som kan befinne seg utenfor kromosomet i cellene og som kan replikeres selvstendig. Ved hjelp av transkripsjon og translasjon kan det dannes proteiner fra DNA i plasmidet. For at plasmidet skal kunne være funksjonelt må det inneholde en rekke DNA-sekvenser [7] (figur 2.3).



Figur 2.3 DNA plasmid som inneholder sekvenser for genet for luciferase, CMV-promoter, BGH-polyA og ampicillinresistens (figur fremstilt av Katja Einer-Jensen, Statens Veterinære serumlaboratorium, Århus, Danmark)

DNA-sekvenser kan settes inn i plasmider ved hjelp av rekombinant DNA teknologi. For å isolere en DNA enhet kan det brukes restriksjonsendonukleaser. Dette er enzymer som kutter DNA mellom to baser i en gitt sekvens. Imidlertid vil DNA inneholde både exoner, som koder for proteiner, og introner. Syntetisering av DNA som inneholder bare exoner skjer ved hjelp av revers transkripterering av mRNA. Disse DNA enhetene kalles da komplementær DNA (cDNA). Innsetting av cDNA i plasmidet skjer ved at DNA-sekvensen i plasmidet først kuttes med restriksjonsendonukleaser. Deretter limes DNA-sekvensene i cDNA sammen med DNA-sekvensen i plasmidet ved hjelp av DNA ligase [7].

I tillegg til cDNA som koder for proteinet som skal dannes vil plasmider inneholde flere andre sekvenser. For det første må det være et sted på plasmidet hvor replikasjonen av DNA kan begynne. Dette er en bestemt basesekvens som kalles et replikasjonsorigin, eller ori [8].

Det må også være sekvenser som fremmer uttrykk av gener. Slike sekvenser er promotere, enhancere, introner og polyA-haler. En promoter er en basesekvens som RNA polymerase kan binde seg til, og er dermed nødvendig for at mRNA transkripsjonen skal starte. I kombinasjon med promoter-regionen fins enhanceren, som øker hastigheten på å sette i gang transkripsjonen. De mest brukte promoter+enhancer regionene er tatt fra humant cytomegalovirus (CMV) og simianviruset (SV40) [8]. Introner er funksjonelle mRNA sekvenser som kan øke produksjonen av mRNA. Mekanismen for dette er imidlertid ukjent, men det er sannsynlig at de gjør transkripsjonen lettere. I plasmidet plasseres intronene etter promoter+enhancer regionen og før cDNA. Etter cDNA følger en sluttsekvens som ofte inneholder en polyA-hale. En polyA-hale er en sekvens som koder for en lang rekke av adenin-baser i enden av mRNA. Dette beskytter mRNA mot rask degradering og gjør det dermed mer stabilt slik at graden av translasjon av mRNA kan økes [8].

Plasmidet må dessuten inneholde en egenskap som gjør at cellene med plasmidet kan vokse i et bestemt miljø. Denne egenskapen er ofte resistens mot et gitt antibiotikum, og plasmider gis en slik egenskap for at en skal kunne velge ut de cellene som har tatt opp plasmidet. Når mediet som cellene vokser i tilsettes dette antibiotikumet, vil bare de cellene som har tatt opp plasmidet og dermed fått antibiotikaresistens, kunne overleve [7].

2.1.4 Genterapi

Gener, som er deler av DNA, kan oversettes til proteiner som er viktige for en rekke funksjoner i kroppen. Genterapi er en relativt ny måte for å behandle sykdommer. Prinsippet for genterapien er å sette et funksjonelt gen inn i en celle for å oppnå en terapeutisk effekt. Dette gjøres for å erstatte manglende eller ødelagte gener som forårsaker en rekke sykdommer. Ved å administrere det rette genet til de rette cellene, kan det manglende proteinet syntetiseres, og sykdommen vil da kunne helbredes. Gener kan inneholde sekvenser som regulerer i hvor stor grad genene uttrykkes og i hvilke proteiner de uttrykkes. Gener kan være viktige for biologiske funksjoner og mekanismer i celler [9].

Et eksempel på en sykdom som kan behandles med genterapi er cystisk fibrose. Et defekt gen som koder for et viktig regulatorisk protein blir da erstattet med et funksjonelt gen [10]. Videre kan genterapien brukes til å sette inn gener som regulerer celledyklusen eller til å

merke celler for ødeleggelse for å behandle kreft [9]. Det er også mulig å introdusere gener for cytokiner for å aktivere immunsystemet og dette kan brukes til å behandle infeksjoner [10].

Genterapi kan også brukes til DNA vaksiner. Da administreres gener som koder for antigener. Hos mottageren av genet blir antigenet produsert og stimulerer til humoral og cellulær immunitet rettet mot antigenet. Fordeler med DNA vaksiner i forhold til annen genterapi er at det ikke kreves så høy grad av effektivitet når det gjelder å uttrykke genet og selv med forbigående uttrykk av genet kan DNA vaksiner føre til lang tids immunitet [11].

Det er også en rekke fordeler ved bruk av DNA vaksiner i forhold til tradisjonelle vaksiner. Tradisjonelle vaksiner lages av svekkede eller inaktiverede virus eller bakterier, toksoider eller rensede deler av inaktiverede bakterier. Imidlertid er det noen sykdommer, som syfilis og malaria, som det er vanskelig å lage tradisjonelle vaksiner mot blant annet på grunn av problemer med dyrkning av organismene i store nok mengder [11]. Ved hjelp av DNA vaksiner kan immunisering mot disse organismene bli mulig. Dessuten har DNA generelt bedre stabilitet enn proteiner som brukes i tradisjonelle vaksiner. I tillegg er det relativt enkelt å lage rent DNA som ikke inneholder forurensninger [11].

Det pågår forskning på DNA vaksiner mot en rekke bakterier, virus, parasitter og tumorer. Eksempler på sykdommer som det forskes på med hensyn til bruk av DNA vaksiner er HIV, herpes og hepatitt B [12]. Det har vært vist at DNA vaksiner mot influensa, herpes, rabies og hepatitt B har gitt immunitet i dyremodeller [11]. Det arbeides også med å utvikle DNA vaksiner til bruk i dyr [13-14] og fisk [15].

2.1.5 Formuleringer av DNA

DNA i form av et plasmid uten ytterligere formulering kalles nakent DNA. Det er vist at administrasjon av nakent DNA gir effekt i noen tilfeller, for eksempel ved intramuskulær administrasjon [16]. Imidlertid vil nakent DNA kunne brytes ned av endonukleaser i kroppen, og det kan være vanskelig for nakent DNA å bli tatt opp i celler [16]. Det er derfor gunstig å lage en formulering med DNA.

En ideell formulering til bruk i genterapi er biodegraderbar, ikke-toksisk, ikke-immunogen, stabil ved lagring og etter administrering, i stand til å nå målcellene og egnet til å gi et godt nok uttrykk av genet. For å formulere DNA finnes det flere forskjellige vektorer som kan brukes. Hovedsakelig kan vektorene deles inn i to typer, virale og ikke-virale. Hvilken vektor som brukes avhenger både av størrelsen av DNA og kravene til sikkerhet og effektivitet [17].

Virale vektorer

Virale vektorer er virus som gjøres replikasjonsdefektive og hvor virale gener erstattes av terapeutiske gener. Eksempler på virale vektorer er retrovirus, adenovirus, adeno-assosiert virus, herpes simplex virus og lentivirus. Disse vektorene transporterer DNA til cellekjernen ved hjelp av infeksjonsprosessen og kan være veldig effektive. Imidlertid kan det ved bruk av virale vektorer være fare for at potente virus replikeres. Avhengig av hvilken vektor som benyttes vil bruken av dem også begrenses av toksisitet og størrelsen på genet som skal settes inn i vektoren [17-18].

Ikke-virale vektorer

DNA kan også formuleres ved hjelp av ikke-virale vektorer. Disse vektorene er relativt enkle å produsere i stor skala. Generelt har de liten toksisitet, selv om det ikke gjelder alle. Mange er i liten grad immunogene og kan derfor administreres gjentatte ganger. Imidlertid kan de være mindre effektive enn virale vektorer. Ikke-virale vektorer komplekserer DNA, noe som fører til beskyttelse mot degradering av DNA og bedret transport gjennom cellemembranen. For å styre opptak av komplekset til bestemte målceller kan ligander konjugeres til vektoren. Ulike ikke-virale vektorer som brukes er liposomer, polymerer og kombinasjoner av disse [19-20].

Liposomer for DNA kompleksing består ofte av et kationisk lipid og et hjelpelipid som dioleoylfosfatidyletanolamin (DOPE) eller dioleoylfosfatidylcholin (DOPC). Ulike kationiske lipider som brukes er kvarternære ammoniumforbindelser og derivater av kolesterol, diacylglyserol og polyaminer. Komplekser mellom slike liposomer og DNA kalles lipoplekser [17-18, 21].

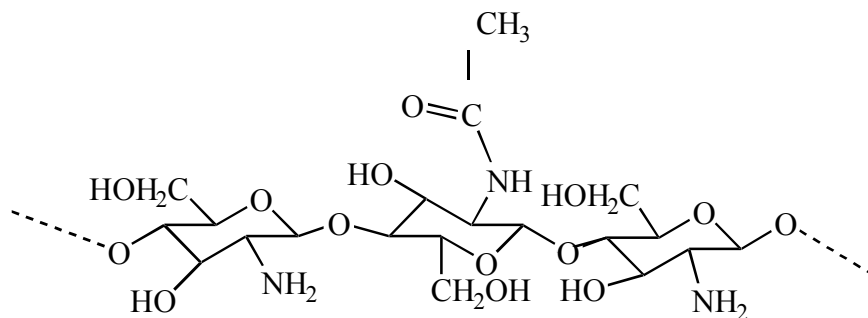
Polyplexer er komplekser mellom polymerer og DNA. Mange av polymerene har forgrenede strukturer og det benyttes også kombinasjoner av forskjellige polymerer og derivater av polymerer. Eksempler på ulike polymerer som er i bruk i forskningen er polyamidoamin, polyetylenimin og kitosan [19-20, 22-23].

2.2 Kitosan

2.2.1 Struktur og egenskaper

Kitosan er en biopolymer som kan dannes fra kitin [24]. Kitin er et av de organiske stoffene som det er mest av i naturen. Blant annet finnes kitin i skjelettet til skalldyr og insekter og i celleveggene til enkelte sopper og grønnalge [25-26]. I naturen er kitin vanligvis bundet til andre stoffer, som proteiner og polysakkarider. Etter isolering av kitin kan det deacetyleres slik at det dannes kitosan [25]. Kitosan kan dessuten finnes naturlig i enkelte sopper [27].

Kitin og kitosan består av sukkerenheter av glukosamin. I kitin er glukosaminene stort sett N-acetyllert (GlcNac), mens kitosan består av både acetyllert og deacetyllert glukosamin (GlcN). Disse glukosaminene bindes sammen med β -1,4-bindinger [25] (figur 2.4).



Figur 2.4 Strukturen til kitosan med acetyllerte (-NHCOCH₃) og deacetyllerte (-NH₂) enheter.

Forholdet mellom acetyllerte og deacetyllerte enheter i kitosan gir opphav til flere typer kitosan med ulik grad av acetyllering (F_A) [27]. Kitosan i kommersiell form finnes med grader av acetyllering fra 10 – 30 % [28]. Under fremstillingen av kitosan vil dessuten polymerkjeden brytes ned i varierende grad avhengig av reaksjonsbetingelser som temperatur, tid og reagenser. Det vil da dannes kitosan med ulik lengde på polymerkjeden og dermed ulike molekylvekter. De fleste kitosantypene har molekylvekter mellom 10^4 og 10^5 Dalton [29].

Kitosan er en svak base som kan protoneres på aminogruppene i glukosemolekylene. Det fører til at kitosan i surt miljø vil være positivt ladet. Dissosiasjonskonstanten, uttrykt som pK_a -verdien til kitosan ligger rundt 6.6 [30]. For polyelektrolytter som kitosan vil ikke dissosiasjonskonstanten være konstant på grunn av påvirkning fra nærliggende ladede grupper som kan føre til at evnen til dissosiering endres. Dette fører til at pK_a -verdien for kitosan er avhengig av ladningstettheten i polymeren som igjen avhenger av ionestyrken til kitosanløsningen [31]. Imidlertid er det vist at graden av acetylering og polymerisering ikke påvirker pK_a -verdien [30].

Kitosan kan løse seg i syrer, blant annet eddiksyre, ved dannelse av vannløselige salter med syrene. Fortynnede løsninger av noen uorganiske syrer, som HCl, HBr, HNO₃ og HClO₄, vil også løse opp kitosan [32]. Løseligheten av kitosan i vann og ved pH høyere enn 6.5 avhenger av graden av acetylering av kitosan [33].

2.2.2 Anvendelse

Kitosan har en rekke egenskaper som gjør det godt egnet til bruk innen flere områder. Kitosan er biodegraderbart og lite toksisk [24]. De fysiske og kjemiske egenskapene til kitosan kan varieres avhengig av molekylvekt, acetyleringsgrad og konsentrasjon av kitosan, i tillegg til pH av løsningen.

Kitosan brukes medisinsk, farmasøytisk og i mat- og kosmetikk-industrien. Noen av bruksområdene til kitosan er i produkter til hår- og hud-pleie, sårbehandling, tannpleie og i kontaktlinser [26]. Kitosan har dessuten en rekke farmakologiske effekter, for eksempel kan kitosan redusere blodkolesterolet [24]. I farmasøytiske formuleringer kan kitosan blant annet brukes til kontrollert frisetting av legemidler, som hjelpestoff i blant annet tabletter og emulsjoner og til dannelse av mikrosfærer og mikrokapsler [24]. De egenskapene som gjør kitosan spesielt godt egnet i formuleringer er evnen til å danne geler og viskøse løsninger ved lav pH, og fuktighetsgivende og filmdannende egenskaper. Kitosan har også evne til å binde seg til biologiske overflater, slik at det kan brukes til bioadhesjon [34] og det har vært gjort flere studier på effekten av kitosan på absorpsjonen gjennom slimhinnen i nesen [35-36]. Evnen kitosan har til å administrere legemidler nasalt har også vært undersøkt i forbindelse med vaksiner [37]. Videre kan kitosan brukes i formuleringer med DNA [38-42].

2.3 Kitosan-DNA formuleringer

Kitosan vil kunne danne komplekser med DNA. Slike komplekser dannes ved hjelp av elektrostatiske krefter mellom kitosan og DNA. Avhengig av pH er kitosan positivt ladet på aminogruppene i sukkerkjeden, mens DNA er negativt ladet på fosfatgruppene i ryggraden av nukleotidkjedene. Et polyplex er per definisjon et kompleks mellom en polymer og DNA [43] og kompleksene mellom kitosan og DNA kalles kitosanbaserte polyplexer.

Det har vært gjort flere studier på kitosanbaserte polyplexer. Muligheten til å bruke kitosan som vektor for levering av DNA til celler ble første gang beskrevet av Mumper *et al* [44]. Slike kitosanbaserte polyplexer har evne til å transfektere celler og transfeksjonseffektiviteten er avhengig av celletypen som brukes [38, 42]. Transfeksjonseffektiviteten kan videre påvirkes av blant annet molekylvekten og acetyleringsgraden av kitosan, konsentrasjonen av DNA og ladningsforholdet mellom kitosan og DNA [45-47].

Kitosan har dessuten god evne til å kompleksere DNA og beskytte DNA mot degradering av DNaser [39-40, 48]. Det har vært vist at kitosanbaserte polyplexer er stabile i serum og saltløsninger og denne stabiliteten avhenger av molekylvekten til kitosan, konsentrasjonen av DNA og ladningsforholdet mellom kitosan og DNA [39].

Biokompatibiliteten av kitosanbaserte polyplexer har også vært undersøkt. Det ble funnet at kitosan har liten cytotoxicitet og ingen hemolytisk aktivitet [40, 48]. Videre blir kitosan raskt eliminert fra blodbanen og lavmolekylært kitosan blir i liten grad akkumulert i leveren [40].

Kitosanbaserte polyplexer har vært administrert topikalt [49] og intratrakealt [50]. Oral administrering av slike polyplexer har vist å gi immunologisk beskyttelse mot peanøttallergi [51].

2.4 Stabilitet av kitosan-DNA formuleringer

Legemidler og formuleringer av legemidler kan bli utsatt for degradering. Degradering av disse kan føre til tap av effekt av legemiddelet, eventuelt endringer i utseendet til formuleringen og dannelsen av toksiske produkter [52]. Det er derfor viktig at det ved formulering av legemidler tas hensyn til stabiliteten av legemiddelet og formuleringen. Stabiliteten kan undersøkes både med hensyn på stabilitet ved lagring før administrering og stabilitet in vivo. Ved lagring av legemidler kan stabiliteten påvirkes ved utsettelse for ytre påkjenninger, som temperatur, lys, luft, fuktighet og prosesser som frysetørking og rystelser [52]. For å kunne forutsi hvilke degraderingsprosesser som kan skje i en formulering er det viktig å kjenne til den kjemiske og strukturelle oppbygningen av komponentene i formuleringen. Videre bør formuleringen testes for stabilitet under kontrollerte forhold for å finne ut i hvilken grad den degraderes.

2.4.1 DNA

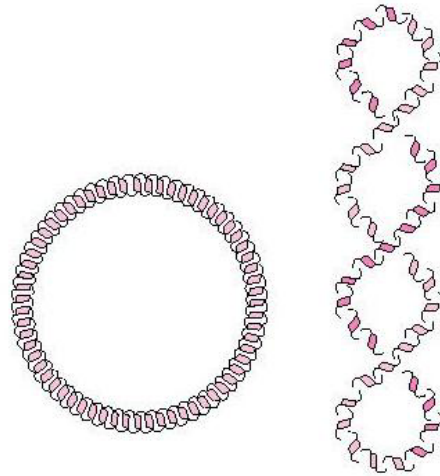
Degradering av DNA kan føre til brudd i nukleotidkjeden til DNA. En av hovedårsakene til degradering av DNA er depurinering, det vil si at bindingen mellom suktermolekylet og en purinbase i DNA brytes. Denne depurineringen er syrekatalysert og har lett for å skje i vandig miljø. Det vil føre til at DNA får et apurinisk område, som lett kan bli gjenstand for β -eliminering med påfølgende brudd i nukleotidkjeden [53-54].

En annen måte DNA kan degraderes på er ved oksideringsreaksjoner. Spormengder av metallioner kan katalysere dannelsen av frie radikaler. Disse frie radikalene kan oksidere baser og bryte nukleotidkjeden i DNA [55].

Videre kan DNA degraderes enzymatisk ved hjelp av nukleaser. Disse enzymene vil hydrolysere fosfodiesterbindingene slik at det dannes brudd i nukleotidkjeden i DNA [3, 7].

Brudd i nukleotidkjeden fører til endret tertiær struktur av plasmid-DNA. Det finnes tre ulike tertiære strukturer som plasmider kan befinne seg i. Når begge trådene i DNA er hele vil plasmidet danne en supercoil, der den doble DNA heliksen tvinner seg rundt sin egen akse.

Plasmider kan også danne en åpen sirkel, når det er brudd i en av trådene i DNA (figur 2.5). Når begge DNA-trådene brytes danner plasmidet et lineært molekyl [10].



Figur 2.5 To ulike tertiære strukturer av plasmider, sirkulært DNA (til venstre) og supercoilet DNA (til høyre).

2.4.2 Kitosan

Kitosan kan degraderes på flere forskjellige måter. I vandig løsning er det mest vanlig at glykosidbindingene i kitosan gjennomgår sur hydrolyse. Det er imidlertid funnet at jo mer deacetylert kitosan er, jo mindre blir polymeren hydrolysert [31]. Kitosan kan også bli degradert under basiske betingelser, deacetyleringen av kitin som fører til dannelse av kitosan er et eksempel på dette [31].

Det finnes dessuten flere ulike enzymer som kan degradere kitosan, disse er kitosanaser, kitinaser og lysozym [31]. Graden av enzymatisk degradering av kitosan avhenger av kitosanets grad av acetylering. Ved degradering av kitinaser vil kitosantyper med få acetylerede grupper bli degradert i mindre grad enn kitosantyper med flere acetylerede grupper [56]. Høy grad av acetylering av kitosan vil også føre til raskere degradering med lysozym [57]. Det er også vist at i humant serum, som inneholder lysozym, vil kitosan degraderes mer jo høyere grad av acetylering det har [58].

2.4.3 Kitosan-DNA formuleringer

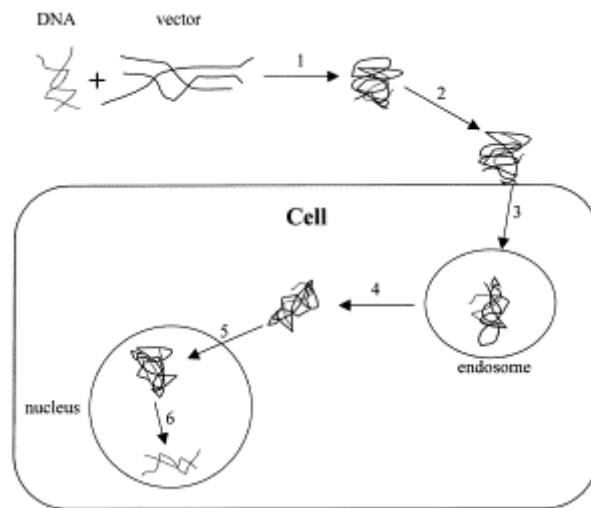
Stabiliteten ved lang tids lagring av kitosanbaserte polyplexer er lite studert. En gruppe bestående av blant annet Leong og Mao har funnet at kitosanbaserte polyplexer lagret i PBS eller serum dissosierte etter kun få timer, mens ved kryssbinding av disse ble stabiliteten bedret til over 3 måneder [59]. Ved konjugering av kitosanbaserte polyplexer med PEG ble det funnet at stabiliteten ved frysetørring og ved lagring i 50 % sukrose ved 4 °C var god i over 4 uker [42, 60].

Når det gjelder stabiliteten av andre polyplexer, har det vært gjort en studie på polyplexer dannet av poly((2-dimetylamino)etylmetakrylat) (PDMAEMA) [61]. Disse polyplexene ble lagret i vandig løsning og i frysetørket tilstand ved 4 °C, 20 °C og 40 °C. Det ble funnet at de PDMAEMA-baserte polyplexene var stabile ved 4 °C og 20 °C, men relativt ustabile ved 40 °C [61].

2.5 Karakterisering av kitosan-DNA formuleringer

2.5.1 Transfeksjon av celler

Transfeksjon av celler vil si å levere det genetiske materialet til cellekjernen. Mekanismen for transfeksjon er ikke fullt ut klarlagt, men det genetiske materialet i form av DNA kompleksert med en vektor må gjennom en rekke trinn for å nå cellekjernen. Det første som skjer er binding av formuleringen til målcellen. Det er antatt at kitosan med sin positive ladning vil binde seg til negative ladninger på sialinsyrer i overflaten av målcellen. Deretter kan formuleringen transporteres gjennom cellemembranen ved opptak i endosomer. Formuleringen slippes fri fra disse endosomene og transporteres til cellekjernen. Til slutt må DNA frigjøres fra vektoren slik at DNA'et blir tilgjengelig for å kunne uttrykke proteiner (figur 2.6) [62].



Figur 2.6 Transfeksjon av en celle i 6 trinn: Trinn 1: DNA komplekseres med en vektor, 2: binding av formuleringen til målcellen, 3: opptak i et endosom, 4: frigjøring fra endosomet, 5: transport til cellekjernen, 6: frigjøring av DNA fra vektoren [62].

Reportergener

Målet med genterapi er at terapeutiske gener som koder for det proteinet som ønskes uttrykt i en celle, kan brukes i plasmidene. Imidlertid må da først formuleringen av plasmidet optimaliseres. Til dette brukes reportergener som settes inn i plasmidet istedenfor det terapeutiske genet. Et reportergen er et gen som koder for et protein som er lett å detektere og som ikke finnes naturlig i cellene som brukes. Det finnes en rekke ulike reportergener med tilhørende deteksjonsmetoder for proteinene. Luciferase kan detekteres ved luminescens, grønt fluorescerende protein kan detekteres ved hjelp av fluorescens, β galaktosidase kan detekteres ved immunofarging, kloramfenikol acetyltransferase kan detekteres ved hjelp av proteinaktivitet og andre spesifikke proteiner kan detekteres ved hjelp av enzybundne immunoanalyser (ELISA) [8].

Analyse av transfeksjonseffektiviteten

I formuleringer med DNA hvor reportergenet for luciferase benyttes, kan transfeksjonen detekteres ved luciferase assay. Transfekterte celler blir først lysert slik at luciferase proteinet som er dannet blir frigjort. Deretter tilsettes luciferin til løsningen. Da vil luciferase katalysere omdannelsen av luciferin til oxyluciferin. Ved denne reaksjonen sendes det ut lys som kan måles ved hjelp av luminometri [63].

I forsøk hvor celler transfekteres kan det være ulik mengde celler i hver brønn. Dette kan skyldes ujevn utsåing av celler på platene, ulik vekst av celler under forsøket eller utvasking av celler ved skifte av medium. Dette vil igjen føre til forskjeller som er uavhengig av transfeksjonseffektiviteten i mengden luciferase protein som blir dannet. Imidlertid kan dette kompenseres for ved å gjøre en analyse av den totale mengden av protein som dannes fordi dette vil gjenspeile antall celler i brønnene [64].

2.5.2 Størrelse

Størrelsen av polyplexer kan måles ved hjelp av foton-korrelasjons-spektroskopi. Partikler i en løsning vil bevege seg tilfeldig, med såkalte Brownske bevegelser. Hvis viskositeten og temperaturen i væsken holdes konstant, vil bevegelsene til partiklene avhenge av størrelsen av dem, forutsatt at partiklene ikke er for store for da kan de sedimentere. Målinger av partikkelstørrelsen gjøres ved at det sendes lys mot væsken som inneholder partiklene. Når fotonene i lyset treffer partiklene vil fotonene spres. Ved hele tiden å sende lys mot partiklene vil spredningen av fotonene variere utfra bevegelsene til partiklene. Etersom bevegelsene avhenger av størrelsen, kan måleinstrumentet utfra dette beregne størrelsen av partiklene [65].

2.5.3 Kvantifisering og integritet av DNA

Mengden av DNA i løsning kan bestemmes ved hjelp av flere metoder. En enkel og grei metode er å måle absorbansen til DNA-løsningen ved 260 nm. En DNA-løsning med dobbelt-trådet DNA som har en konsentrasjon på 50 µg/ml vil ha absorbansen 1 [66]. Utfra dette kan DNA-konsentrasjonen til en gitt løsning bestemmes. Denne metoden for å kvantifisere DNA er imidlertid relativt lite følsom, og forurensning av andre stoffer som RNA og protein kan påvirke absorbansen. Ved å måle absorbansen ved andre bølgelengder i tillegg til 260 nm, vil noen av de eventuelle forurensningene kunne detekteres. En signifikant høyere absorpsjon ved 280 nm vil indikere tilstedeværelse av protein i løsningen. Forholdet mellom absorbansene ved 260 og 280 nm bør derfor beregnes. Hvis dette forholdet har en verdi mellom 1,8 og 2,0 regnes løsningen som ren for forurensning av proteiner [66].

En mer følsom metode for å måle mengden av DNA er Pico Green Assay. Ved Pico Green Assay måles mengden av fritt dobbelt-trådet DNA (dsDNA) i en løsning [67]. Målingene gjøres ved hjelp av fluorometri. Når Pico Green bindes til dsDNA vil fluorescensen til Pico Green økes med inntil 1000 ganger. Pico Green har relativt liten evne til å binde seg til RNA og enkelttrådet DNA (ssDNA) [68]. Denne metoden kan brukes for å kvantifisere DNA med konsentrasjoner mellom 25 pg/ml og 1 µg/ml ved bruk av emisjonsbølgelengden 520 nm under fluorescensmålingene [69]. Imidlertid kan Pico Green målingene påvirkes av den tertiære strukturen til DNA [69].

Fluorescensmålinger med Pico Green vil gi mengden av DNA i en løsning, og kan derfor brukes til å bestemme konsentrasjonen av fritt DNA i løsninger med komplekser av DNA og polymerer. For å bestemme den totale mengden DNA, det vil si både fritt og kompleksert DNA, må DNA frigjøres fra komplekset først. Dette kan gjøres ved å tilsette polyaspartat som har sterkere evne enn DNA til å binde seg til polymeren og dette vil føre til at alt DNA blir fritt i løsningen [70]. Mengden DNA kan deretter måles ved hjelp av Pico Green Assay.

Hvorvidt DNA er tilstede fritt i løsningen og graden av nedbrytning av DNA kan bestemmes ved hjelp av gelelektroforese. Fritt DNA vil på grunn av negativ ladning vandre på gelen. Graden av vandring kan påvirkes av nedbrytningsgraden av DNA. For å visualisere DNA på gelen, kan gelen tilsettes etidiumbromid som binder seg til både enkelt-trådede og dobbelt-trådede nukleinsyrer [53].

2.5.4 Viskositet av kitosan i løsning

Det er antatt at polymerer, som kitosan, vil ha newtonske flyteegenskaper når de befinner seg i løsning [71]. Den mest nøyaktige metoden for å måle viskositeten til løsninger som har newtonske flyteegenskaper er ved å la væsken passere gjennom et kapillær. Ifølge loven til Hagen-Poiseuille kan den kinematiske viskositeten da finnes ved å multiplisere tiden det tar for væsken å passere kapillæret med en gitt konstant for dette kapillæret, det vil si: $v = K \times t$. Tiden måles i sekunder, konstanten for kapillæret har enheten mm^2/s^2 , og viskositeten vil da ha enheten mm^2/s [72].

3 Materialer

Kitosan

SeaCure CL 113 (SC 113)	Pronova Biopolymer, Norge
SeaCure CL 211 (SC 211)	Pronova Biopolymer, Norge
SeaCure CL 214 (SC 214)	Pronova Biopolymer, Norge
SeaCure CL 312 (SC 312)	Pronova Biopolymer, Norge

Lipider

L- α -dioleoylfosfatidyletanolamin (DOPE)	Avanti Polar Lipids, USA
1,2-dioleoyl-1,3-trimetylammoniumpropan (DOTAP)	Avanti Polar Lipids, USA

DNA

pcDNA3-luc 3 mg/ml ¹	GeneCare, Danmark
---------------------------------	-------------------

Cellelinje

Epithelioma papulosum cyprini (EPC)	European Collection of Cell Cultures (ECACC), Storbritannia
-------------------------------------	---

Oppbevaring av kitosan

Sicapent [®] med indikator (fosforpentoksid)	Merck, Norge
---	--------------

Transfeksjon av celler

Eagle's Minimum Essential Medium med Earle's Balanced Salt Solution med 25 mM Hepes (EMEM/Hepes)	Bio-Whittaker, Norge
L-glutamin	Bio-Whittaker, Norge
Gentamicin	Bio-Whittaker, Norge
Føtalt kalveserum (FBS)	Bio-Whittaker, Norge

¹ Plasmidet, av type pcDNA3-luc, inneholder reportergenet for luciferase, cytomegalovirus (CMV) promoter og poly-A fra veksthormon hos svin (BGH pA). Plasmidet er oppskalert i E. coli ved bruk av selektivt medium med ampicillin og løst i Tris-EDTA buffer.

Trypsin EDTA	Bio-Whittaker, Norge
Fosfatbufret saltvann (PBS)	Sigma, Norge
Tris-(hydroksymetyl)-aminometan (Tris)	Prolabo, Norge
DL-dithiothreitol (DTT)	Sigma, Norge
Trans-1,2-diaminosykloheksan-N,N,N',N'-tetraeddiksyre	Sigma, Norge
Glyserol	Sigma, Norge
Triton X-100 [®] (t-Oktylfenoksyppolyetoksyetanol)	Sigma, Norge
Luciferase assay buffer	Promega, Norge
Luciferase assay substrat	Promega, Norge
Rekombinant luciferase	Promega, Norge
Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)	Sigma, Norge
Ammoniumsulfat	Sigma, Norge
Etylenglykol	Merck, Norge
Albumin (BSA)	Sigma, Norge
Bio-Rad Protein Assay fargereagenskonsentrat	Bio-Rad Laboratories, Norge

Pico Green Assay

Pico Green [®] dsDNA kvantifiseringsreagens	Molecular Probes, Norge
Poly-L-aspartatsyre, natriumsalt	Sigma, Norge

Gelelektroforese

Agarose	Gibco, Danmark
Tris-(hydroksymetyl)-aminometan (Tris)	Prolabo, Norge
Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)	Merck, Norge
Hydrogenbromid (HBr)	Sigma, Norge
Etidiumbromid (EtBr)	Sigma, Norge
Bromfenolblått	Bio-Rad Laboratories, Norge
Xylen cyanol FF	Sigma, Norge
Ficoll 400	Pharmacia Biotech, Sverige
DNA markør, 100 bp	Gibco, Danmark

Diverse kjemikalier

Eddiksyre (HAc)	Merck, Norge
Natriumacetat (NaOAc)	Merck, Norge

Dinatriumhydrogenfosfat dihydrat	Merck, Norge
Kaliumdihydrogenfosfat	Merck, Norge
Natriumklorid (NaCl)	Merck, Norge
Aceton	Merck, Norge

Engangsutstyr

Costar celleflaske 75 cm ³	Costar, Norge
Costar 24-brønners plate	Costar, Norge
Falcon 96-brønners plate	Falcon, Norge
Nunc Polysorp Immuno plate	Nunc, Norge
Polaroid Film, 3 ¼ x 4 ¼ `` , 667 ISO 3000/36°, 30 sec.	Kodak, Norge

Apparatur

UV-VIS Scanning Spectrophotometer	Shimadzu, Japan
Lumat LB 9507 luminometer	EG&Berthold, Tyskland
Bio-Rad Model 3550 Microplate reader	Bio-Rad Laboratories, Norge
Coulter N4 MD sub-micron particle analyzer	Coulter, Storbritannia
Cleansphere CA 100	Safetech Limited, Irland
Luminescence Spectrometer LS 50 B (fluorometer)	Perkin Elmer, Tyskland
Easy Cast elektroforesekammer, Model B2, 100 mL	Owl Separation Systems, USA
Electrophoresis Power Supply EPS-600	Pharmacia Biotech, Sverige
UV Transilluminator, Model M-15	UVP, USA
Polaroid Gel Cam, 7 ``x9.50 `` camera 89-0066-02	UVP, USA
Micro Ostwald kapillær	Schott-Geräte, Tyskland
Viskosimeter AVS 310 med vannbad CK 100	Schott-Geräte, Tyskland
Sikafrost Comfort kjøleskap	Siemens
Termaks series 6000 inkubator	Termaks

4 Metoder

4.1 DNA

4.1.1 Tillaging av DNA-løsninger

Det ble brukt en stamløsning av DNA (pcDNA3-luc) på 3 mg/ml. Denne ble først fortynnet med destillert, ionebyttet vann til litt over ønsket konsentrasjon. Deretter ble absorbansen målt på et UV-spektrofotometer. Ved bølgelengden 260 nm har en DNA-løsning med konsentrasjonen 50 µg/ml en absorbans på 1 [66]. Utfra dette ble DNA-løsningens konsentrasjon bestemt. Renheten av DNA-løsningen ble også bestemt, ved å dividere absorbansen ved 260 nm med absorbansen ved 280 nm. Dette forholdet bør ligge mellom 1,8 og 2,0 [66]. Etter at den nøyaktige konsentrasjonen av DNA-løsningen var bestemt, ble DNA-løsningen fortynnet videre med vann (destillert, ionebyttet) til ønsket konsentrasjon.

4.1.2 Integritet av DNA-løsninger

For å undersøke integriteten til DNA etter lagring ble det gjort gelelektroforese på DNA-løsninger. Til gelelektroforesen ble det brukt en 100 ml 0,8 % agarose-gel. Den ble laget ved å blande agarose med TBE-buffer (49 mM Tris, 68 mM HBr og 2mM EDTA, pH 8,0) under oppvarming i mikrobølgeovn. Det ble tilsatt 5 µl 10 mg/ml etidiumbromid i gelen. Under alt arbeid med etidiumbromid ble det benyttet hansker fordi etidiumbromid er mutagent. Gelen ble støpt med 12 brønner. 15 µl prøve ble tilsatt 3 µl farge, bestående av 0,25 % bromfenolblått, 0,25 % Xylene cyanol FF og 15 % Ficoll. Prøve og farge ble blandet godt før det ble påsatt i en brønn på gelen. Det ble også påsatt en DNA-markør tilsatt samme farge. Gelen ble dekket med TBE-buffer og elektroforesen ble utført med en konstant spenning på 80 V i 2,5 timer. Deretter ble gelen bestrålt med UV-lys og avbildet.

4.2 Kitosan

4.2.1 Tillaging av kitosanløsninger

Stock-løsninger av kitosan, som på forhånd var dialysert og frysetørket [73], ble veid inn i en mengde som ga en konsentrasjon på ca. 1 mg/ml i en målekolbe. Løsningsmiddelet, som var destillert, ionebyttet vann eller 25 mM eddiksyre/natriumacetat-buffer pH 5,5, ble først tilsatt i litt for liten mengde. Løsningen ble satt til omrøring med magnetrører over natten, for å få løst opp kitosan fullstendig. Deretter ble resten av mengden av løsningsmiddelet tilsatt. Denne stock-løsningen ble så fortynnet til bruksløsninger med ønsket konsentrasjon. Det ble brukt fire forskjellige kitosantyper med ulik molekylvekt og acetyleringsgrad (tabell 4.1).

Tabell 4.1 De ulike kitosantypene som ble brukt i forsøkene [73]

Kitosantype	Molekylvekt	Acetyleringsgrad
SC 113	6,6 kD	0,17
SC 211	90 kD	0,33
SC 214	160 kD	0,11
SC 312	160 kD	0,27

4.2.2 Kinematisk viskositet av kitosanløsninger

Det ble utført viskositetsmålinger på kitosanløsningene. Løsninger med kitosantypene SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312 som hadde konsentrasjoner på henholdsvis 10 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml og 1 mg/ml, ble brukt for å sikre at prøvene hadde omtrent lik gjennomstrømningstid og at denne var høyere enn for løsningsmiddelet. Det ble tatt ut 2 ml av hver prøve og dette ble tilsatt i et kapillær for viskositetsmålinger. Viskosimeteret ble innstilt på temperatur 20 °C, 5 minutters ventetid før første måling og 4 parallelle målinger. Kapillæret ble satt i viskosimeteret og tiden løsningen brukte gjennom kapillæret ble målt. Ved hjelp av kapillærkonstanten, som var 0,01 mm²/s² [72], ble så viskositeten regnet ut ved å multiplisere konstanten med tiden i sekunder. Dette ga en kinematisk viskositet med enheten mm²/s. Mellom hver prøve ble kapillæret vasket to ganger med destillert vann og to ganger med aceton, før det ble tørket med nitrogengass.

4.3 Kitosanbaserte polyplexer

4.3.1 Fremstilling av polyplexer

Det ble fremstilt flere forskjellige komplekser mellom kitosan og DNA (kitosanbaserte polyplexer). Disse ble fremstilt av ulike kitosantyper og med ulikt ladningsforhold mellom kitosan og DNA. I forsøkene ble det brukt ladningsforhold 0,5, ladningsforhold 2 og ladningsforhold 5. For å få de ulike ladningsforholdene, ble konsentrasjonen av kitosanløsningene variert, mens konsentrasjonen av DNA ble holdt konstant (20 µg/ml i første forsøk, 50 µg/ml i resten av forsøkene). Utfra molekylvekten til en DNA-monomer, som er 330 [43], ble det regnet ut at en DNA-løsning på 1 mg/ml har en negativ ladning på $3,03 \times 10^{-6}$ mol. Kitosan har positiv ladning, og ved å anta at alle aminogrupperne i polymeren var protonert ble den positive ladningen beregnet for hver kitosantype (tabell 4.2).

Tabell 4.2 Ladning av kitosan

Kitosantype	Mengde positiv ladning av en 1 mg/ml løsning
SC 113	$4,2 \times 10^{-6}$ mol
SC 211	$3,4 \times 10^{-6}$ mol
SC 214	$4,5 \times 10^{-6}$ mol
SC 312	$3,7 \times 10^{-6}$ mol

Utfra kitosanets ladning og ønsket ladningsforhold mellom kitosan og DNA, ble konsentrasjonen som kitosanløsningen skulle fortynnes til, bestemt. For å danne polyplexer ble det blandet like volum kitosan og DNA. Begge løsningene hadde romtemperatur ved tilblendingen. Blandingen foregikk ved at den løsningen som var i ladningsunderskudd (det vil si kitosanløsningen for polyplexer med ladningsforhold 0,5 og DNA-løsningen for polyplexer med ladningsforhold 2 og 5) ble dryppet forsiktig til den andre løsningen samtidig som løsningen var i kontinuerlig bevegelse ved hjelp av en vortex-rister. Løsningen ble ristet i 10 sekunder etter at tildryppingen var avsluttet. Deretter ble løsningen holdt i ro i minst 30 minutter før forsøkene ble påbegynt, for å være sikker på at komplekseringen ble fullstendig.

4.3.2 Transfeksjonseffektivitet

Dyrking og transfeksjon av celler

Det ble brukt Epithelioma Papulosum Cyprini (EPC) celler. Dette er en cellelinje som stammer fra epitelceller i karpe [74]. Alt arbeid med cellene ble gjort i LAF-benk og cellene ble inkubert i et varmeskap som holdt en temperatur på 20 – 25 °C. Cellene ble dyrket i 75 cm³ celleflasker i 20 ml komplett medium bestående av EMEM/Hepes tilsatt 5 ml 200 mM L-glutamin, 250 µl 50 mg/ml gentamicin og 25 ml FBS (føtalt kalveserum) per 250 ml medium. Etter en ukes inkubasjon av cellene ble mediet fjernet og det ble vasket to ganger med 5 ml PBS (fosfatbufret saltvann). Så ble det tilsatt 4 ml trypsin-EDTA som ble skylt raskt over cellene. Mesteparten av trypsin-EDTA ble tømt av og det ble banket lett på flasken for at cellene skulle løsne fra flaskeveggen. Deretter ble komplett medium tilsatt. Denne metoden ble brukt ved splitting av celler som ble dyrket videre, og til forberedelser av celler som skulle inngå i forsøk. Celler som skulle brukes i forsøk, ble telt i et Bürker tellekammer. 4 × 12 diagonale B-ruter ble telt og gjennomsnittet per 12 ruter ble beregnet. Antall celler per ml ble regnet ut etter formelen: $(\text{Antall celler per 12 ruter} \times 4,2 / 100) \times 10^6$. Deretter ble cellesuspensjonen fortynnet med komplett medium til 500 000 celler per ml.

I det første forsøket (forforsøket) ble det sådd ut 1 ml, tilsvarende 500 000 celler, per brønn på 24-brønners plater. I resten av forsøkene ble 100 µl, tilsvarende 50 000 celler, sådd ut per brønn på 96-brønners plater. Etter inkubasjon av cellene ved 20 – 25 °C i ett døgn, ble det komplette mediet fjernet, og serumfritt medium (EMEM/Hepes tilsatt 5 ml 200 mM L-glutamin og 250 µl 50 mg/ml gentamicin per 250 ml medium) ble tilsatt i brønnene. Deretter ble polyplexene tilsatt til cellene. Det ble tilsatt tre paralleller av hver prøve. Som negativ kontroll ble DNA i samme konsentrasjon som i polyplexene, tilsatt. Den positive kontrollen som ble brukt var lipoplex 2, som bestod av en lipidkombinasjon av DOPE:DOTAP 1:1 i vann blandet med lik mengde DNA med samme DNA-konsentrasjon som i polyplexene. I forforsøket ble en mengde på 750 µl serumfritt medium og 250 µl prøve brukt, mens i resten av forsøkene ble 100 µl serumfritt medium og 40 µl prøve tilsatt. Etter ytterligere ett døgns inkubasjon, ble det serumfrie mediet og prøve-løsningen fjernet, og komplett medium (1 ml for forforsøket, 100 µl for resten av forsøkene) ble tilsatt. Dette ble så inkubert i ett og et halvt døgn før analyse.

Luciferase assay

Etter inkubasjonen ble det komplette mediet fjernet fra cellene, og cellelyseringsbuffer (250 μ l i forforsøket, 50 μ l i resten av forsøkene) ble tilsatt. Cellelyseringsbufferen ble lagd av 25 mM Tris, 2 mM Dithiothreitol, 2 mM Trans-1,2-diaminosykloheksan-N,N,N',N'-tetraeddiksyre, 10 % glyserol, 1 % Triton X-100 og pH ble justert til pH 7,8. Etter tilsetting av cellelyseringsbuffer ble platene frosset ned til -20 °C i 30 minutter, før de ble tint opp til romtemperatur igjen. Så ble det utført luciferase assay på prøvene fra platene. Det ble gjort ved å tilsette 20 μ l prøve til 100 μ l luciferase assay reagens (luciferase assay substrat løst i 10 ml luciferase assay buffer). Deretter ble lysutsendelsen, angitt i relative lysenheter (RLU), målt på et luminometer i 10 sekunder rett etter tilsettingen av luciferase assay reagens. Det ble laget standardløsninger av luciferase protein i 1% BSA tilsatt 25 mM Tris (pH 7,8), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2 M ammoniumsulfat, 15 % glyserol og 30 % etylenglykol. Lysutsendelsen til disse standardløsningene av luciferase protein i området 0 – 200 ng/ml ble målt etter tilsetting av luciferase assay reagens til standardløsningene.

Proteinanalyse

For å måle den totale mengden av protein som ble dannet i hver brønn ble det gjort en Bio-Rad proteinanalyse. Denne går ut på å tilsette et fargereagens som skifter absorpsjonsmaksimum fra 465 nm til 595 nm når det bindes til protein [64]. Dermed kan mengden protein måles ved hjelp av spektrofotometri ved 595 nm.

Før proteinanalysen ble prøvene fortynnet. Prøvene fra forforsøket ble fortynnet 1:10 med destillert vann, mens prøvene fra resten av transfeksjonsforsøkene ble fortynnet 1:5 med destillert vann. Tre paralleller på 10 μ l hver ble tatt ut av disse prøvene og tilsatt på en 96-brønners Nunc plate. På platen ble det også satt proteinstandarder av BSA i området 0 – 0,4 mg/ml. Disse proteinstandardene var fortynnet i samme løsningsmiddel som prøvene, dvs. cellelyseringsbuffer fortynnet 1:10 eller 1:5 med destillert vann.

Bio-Rad fargereagenskonsentrat ble fortynnet med 4 deler destillert vann per del fargekonsentrat. Til hver av prøvene og standardene ble 200 μ l av det fortynnete fargereagenset tilsatt. Dette ble blandet godt og inkubert ved romtemperatur i 5 – 60 minutter. Deretter ble absorbansen ved 595 nm målt på Bio-Rad plateleser etter 5 sekunders risting av

platen. Det ble lagd en standardkurve for absorbanse relatert til konsentrasjon av protein ved hjelp av verdiene fra proteinstandardene. Deretter ble den totale mengden av protein i prøvene funnet ved hjelp av denne standardkurven. Til slutt ble lysutsendelsen fra luciferase assayet relatert til den totale mengden av protein i prøven. Dette ble oppgitt i log(RLU/mg protein).

4.3.3 Størrelse

Til størrelsesmålinger ble det tatt ut en prøve på 600 µl av hvert polyplex og dette ble overført til en kyvette. For å unngå partikler i løsningen ble det arbeidet i en Cleansphere CA 100 boble, der luften ble filtrert gjennom et hepafilter og det ble opprettholdt overtrykk. Deretter ble det gjort en gjennomlysning av kyvetten for å undersøke om det var noen partikler i løsningen. Så ble kyvetten satt i et Coulter N4 MD partikkelanalyse-apparat, som målte partikkelstørrelsen til polyplexene ved hjelp av foton-korrelasjons-spektroskopi. Apparatet ble innstilt (tabell 4.3) og størrelsen på partiklene ble målt. Mellom hver prøve ble kyvetten skylt to ganger med løsningsmiddel av samme type som kitosan var løst i og som var filtrert med 0,22 µm filter.

Tabell 4.3 Instillinger på Coulter N4 MD

Parameter	Verdi
Tid før første måling	5 minutter
Tid mellom målingene	0 minutter
Antall parallelle målinger	3
Type analyse	Diameter
Varighet av hver måling	200 sekunder (300 sekunder i forforsøket)
Vinkel	90,0 grader
Temperatur	25 °C
Viskositet	0,894 cP
Størrelsesfordeling	Unimodal

4.3.4 Komplekseringsgrad av DNA

DNA kan kvantifiseres ved hjelp av Pico Green Assay som måler fritt DNA i løsning [68]. Dette ble brukt til å måle mengden av DNA som ikke var kompleksert med kitosan i polyplexene. Hver prøve ble fortynnet til 0,5 µg/ml DNA med 20 mM natriumacetat pH 6, og det ble blandet godt. Kontroller til analysene ble lagd ved at 50 µg/ml DNA ble fortynnet 1:1 med destillert vann (positiv kontroll) og 25 mM eddiksyre/natriumacetat-buffer pH 5,5 ble fortynnet 1:1 med destillert vann (negativ kontroll). Kontrollene ble deretter fortynnet med 20 mM natriumacetat pH 6 i samme forhold som prøvene.

Til 100 µl av den fortynnete prøven eller kontrollen ble det satt 100 µl Pico Green reagens. Pico Green reagens var på forhånd fortynnet 1:200 med 20 mM natriumacetat pH 6 i en polypropylenbeholder dekket med aluminiumsfolie fordi reagenset kan absorbere til glass og er følsomt for fotodegradering. Dette ble så inkubert i 2 til 5 minutter. Deretter ble det overført til en kyvette som ble satt i fluorometeret (innstilt som i tabell 4.4), og fluorescensen ble målt.

Tabell 4.4: Målebetingelser på fluorometeret

Parameter	Verdi	Parameter	Verdi
Metode	Time Drive		
Eksitasjonsbølgelengde	480 nm	Eksitasjonsspalte	5 nm
Emisjonsbølgelengde	520 nm	Emisjonsspalte	10 nm
Varighet	30 sekunder		
Data intervall	0,5	Responstid	0,5 sekunder
Umiddelbar start			
Intervall for respons	10 – 20 sekunder		

Arealet under kurven (AUC) for prøvene i fluorescensmålingene ble relatert til AUC for den negative kontrollen (bakgrunn) og AUC for den positive kontrollen. Mengde DNA som ble kompleksert, kalt komplekseringsgrad av DNA, ble beregnet etter følgende formel:

$$\text{Komplekseringsgrad} = 100 - (\text{AUC}_{\text{prøve - bakgrunn}} \times 100 / \text{AUC}_{\text{positiv kontroll}}).$$

4.3.5 Stabilitet av DNA i polyplexer

For å måle mengden av DNA som ikke ble nedbrutt under lagring i form av polyplexer ble polyaspartat satt til polyplexene før det ble utført Pico Green Assay. Polyaspartat frigjorde DNA fra polyplexene [70] slik at mengden av DNA som ikke ble nedbrutt kunne bestemmes. Til fortynning av polyaspartat ble det brukt PBS (fosfatbufret saltvann). PBS ble lagd av 13,4 mM dinatriumhydrogenfosfat, 1,4 mM kaliumdihydrogenfosfat og 137 mM natriumklorid, og pH ble justert til 7,4. Polyaspartat ble fortynnet til 5 mg/ml med PBS.

Prøver av polyplexer og kontroller av DNA og buffer ble fortynnet til 0,5 µg/ml DNA med 20 mM natriumacetat pH 6. Til 100 µl av den fortynnete prøven ble det tilsatt 5 µl 5 mg/ml polyaspartat. Deretter ble 100 µl Pico Green reagens (fortynnet 1:200 i natriumacetat pH 6) tilsatt. Etter inkubasjon i 2 til 5 minutter, ble det overført til en kyvette, og fluorescensen ble deretter målt i fluorometeret (innstilt som i tabell 4.4).

Mengden DNA som befant seg i polyplexløsningen ble regnet om til mengde DNA som ble nedbrutt i polyplexet ved hjelp av følgende formel:

$$\text{Mengde nedbrutt DNA} = 100 - \left(\text{AUC}_{\text{prøve - bakgrunn}} \times 100 / \text{AUC}_{\text{positiv kontroll}} \right).$$

4.4 Oppsett for forsøkene

4.4.1 Forforsøk

Først ble det gjort forforsøk for å bestemme hvilket løsningsmiddel for kitosan som egnet seg best. I forforsøkene ble det brukt både ulike kitosantyper og ulike ladingforhold mellom kitosan og DNA. De løsningsmidlene for kitosan som ble undersøkt i forforsøket, var destillert, ionebyttet vann med en pH-verdi på 5,9 og 25 mM eddiksyre/natriumacetat buffer pH 5,5. De fire kitosantypene som ble undersøkt, var SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312. Det ble variert mellom ladingforhold 0,5, ladingforhold 2 og ladingforhold 5 mellom kitosan og DNA. I forforsøket ble 3 parallelle prøver analysert. Forforsøket bestod av to forskjellige analyser. Den ene var transfeksjonseffektivitet i celler. Til kompleksing med kitosan for å danne polyplexer, ble det i dette transfeksjonsforsøket benyttet en DNA-løsning

på 20 µg/ml. I transfeksjonsforsøket ble det for ladningsforhold 0,5 bare analysert prøver av kitosan SC 113 og SC 211 løst i vann. Den andre analysen i forforsøket var størrelsesmåling av polyplexene. Kitosanløsningene som her ble brukt, ble før kompleksering med DNA filtrert gjennom et 0,8 µm filter for å fjerne eventuelle partikler i løsningen. Konsentrasjonen av DNA-løsningen som ble brukt til komplekseringen under størrelsesmålingene var 50 µg/ml.

4.4.2 Lagringsstudie

For å undersøke stabiliteten til polyplexene ble de lagret ved forskjellige temperaturer (tabell 4.5). Løsningsmiddelet for kitosan var 25 mM eddiksyre (HAc)/natriumacetat (NaOAc) buffer pH 5,5. Det ble brukt et ladningsforhold på 2 mellom kitosan og DNA. I tillegg til polyplexene, ble også løsninger av bare kitosan og av bare DNA lagret. Disse ble lagret i samme konsentrasjon som kitosan og DNA hadde rett før kompleksering for å gi ladningsforhold 2. Ved uttakstidspunktene ble disse kitosanprøvene tatt ut og kompleksert med nylaget DNA, og DNA-prøven ble kompleksert med nylaget kitosan SC 312. I tillegg ble det lagret DNA-løsninger til gelelektroforese og kitosanløsninger til viskositetsmålinger. Uttak fra prøvene ble tatt ved gitte tidsintervall og de forskjellige forsøkene ble utført. Det ble også målt pH på prøvene ved forskjellige tidspunkter under lagringsstudien. For hvert uttak ble det gjort en visuell inspeksjon av prøvene for å se at løsningene var klare.

Tabell 4.5 Oppsett for lagringsstudien

Parameter	Verdier
Kitosantyper	SC 113, SC 211, SC 214, SC 312
Løsningsmiddel	25 mM HAc/NaOAc pH 5,5 (filtrert 0,22 µm og autoklavert)
DNA-konsentrasjon før kompleksering	50 µg/ml
Ladningsforhold	2
Temperaturer	4 °C ¹ , 25 °C ² , 45 °C
Paralleller	3 ³
Responser	Transfeksjonseffektivitet Størrelse Komplekseringsgrad av DNA Stabilitet av DNA i polyplexer Stabilitet av DNA-løsninger (gelelektroforese) Stabilitet av kitosanløsninger (viskositet)

¹ Til å lagre prøvene ved 4 °C ble det brukt et kjøleskap hvor temperaturen varierte i intervallet 2 – 7 °C

² I mesteparten av lagringsstudien var temperaturen på inkubatoren innstilt på 25 °C, men fra uke 21 ble temperaturen innstilt på 20 °C

³ Til viskositetsmålinger av kitosanløsninger lagret ved 4 °C og 25 °C ble det ved enkelte målinger kun brukt 2 paralleller

Tidspunktene for uttak av prøvene ble bestemt slik at det var flest uttak i begynnelsen av lagringsstudien og færre uttak etterhvert. Det var ikke alle forsøkene som ble gjort ved hvert uttakstidspunkt fordi dette ikke var praktisk mulig. Gelelektroforesen ble kjørt en gang med både nylaget DNA-løsning og DNA-løsninger som var lagret. For de andre forsøkene ble det tatt uttak av prøvene og gjort forsøk etter at prøvene var lagret så lenge som angitt (tabell 4.6).

Tabell 4.6 Tid for lagring av prøver før forsøk ble gjennomført. X = forsøk gjennomført.

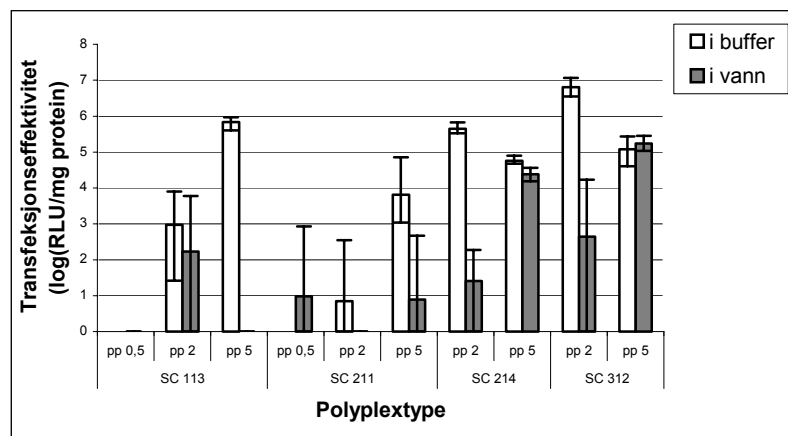
Tid for lagring	Transfeksjons-effektivitet	Størrelse	Kompleks-eringsgrad av DNA	Stabilitet av DNA i polyplexer	Stabilitet av DNA-løsninger	Stabilitet av kitosan-løsninger
0 dager	X	X	X	X	X	X
3 dager		X				
1 uke	X	X				X
2 uker		X	X		X	X
5 uker	X	X	X	X		X
7 uker					X	
8 uker		X	X	X		X
13 uker	X					
16 uker		X				X
19 uker			X	X		
22 uker	X	X				
31 uker					X	

5 Resultater

5.1 Forforsøk

5.1.1 Transfeksjonseffektivitet

Transfeksjonseffektiviteten av polyplexene var varierende, fra ingen transfeksjonseffektivitet for noen av polyplexene der kitosan var løst i vann til 6,8 log(RLU/mg protein) for polyplexet med kitosan SC 312 løst i buffer og ladningsforhold 2 (figur 5.1).

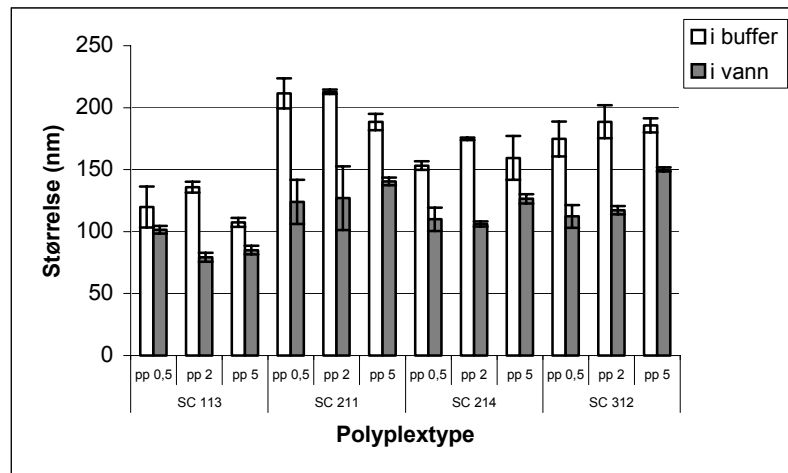


Figur 5.1 Transfeksjonseffektivitet av polyplexer med ulike kitosantyper (SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312) løst i buffer eller vann og ulike ladningsforhold (pp 0,5, pp 2 og pp 5). For ladningsforholdet 0,5 er det bare utført transfeksjonsforsøk for kitosan SC 113 og SC 211 løst i vann. Verdiene er gjennomsnittsverdier av 3 paralleller \pm maksimums- og minimumsverdier.

Det viste seg at nesten alle polyplexene dannet av kitosan løst i vann hadde lavere transfeksjonseffektivitet enn de samme polyplexene med kitosan løst i buffer. Den største forskjellen i transfeksjonseffektivitet var på 100 % for polyplexene med kitosan SC 113 med ladningsforhold 5 og kitosan SC 211 med ladningsforhold 2, her hadde polyplexene med kitosan løst i vann ingen transfeksjonseffektivitet. Den minste forskjellen var på 3 % for polyplexene med SC 312 og ladningsforhold 5. Dette var det eneste paret av polyplexer der transfeksjonseffektiviteten var større for polyplexet med kitosan løst i vann enn for polyplexet med kitosan løst i buffer.

5.1.2 Størrelse

Størrelsesmålingene viste at alle polyplexene med kitosan løst i vann var mindre enn de tilsvarende polyplexene med kitosan løst i buffer, som hadde størrelser på 107 ± 4 nm til 213 ± 2 nm (figur 5.2).



Figur 5.2 Størrelse av polyplexer med ulike kitosantyper (SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312) løst i buffer eller vann og ulike ladningsforhold (pp 0,5, pp 2 og pp 5). Verdiene er oppgitt som gjennomsnittsverdier med standardavvik av tre parallelle prøver.

Hvor mye mindre polyplexene med kitosan løst i vann var enn polyplexene med kitosan løst i buffer varierte avhengig av kitosantypen og ladningsforholdet. Forskjellen i størrelse var minst for polyplexene med kitosan SC 113 og ladningsforhold 0,5, her var polyplexet med kitosan løst i vann 15 % mindre enn polyplexet med kitosan løst i buffer. Den største forskjellen i størrelse mellom polyplexene med kitosan løst i vann og buffer var på 41 % for polyplexene med kitosan SC 211 og ladningsforhold 0,5. Det var generelt minst forskjell i størrelse mellom polyplexer med kitosan løst i vann og buffer for polyplexer med ladningsforhold 5, her var forskjellen 19 – 21 %.

5.2 Lagringsstudie

5.2.1 Transfeksjonseffektivitet

Lagring av polyplexer

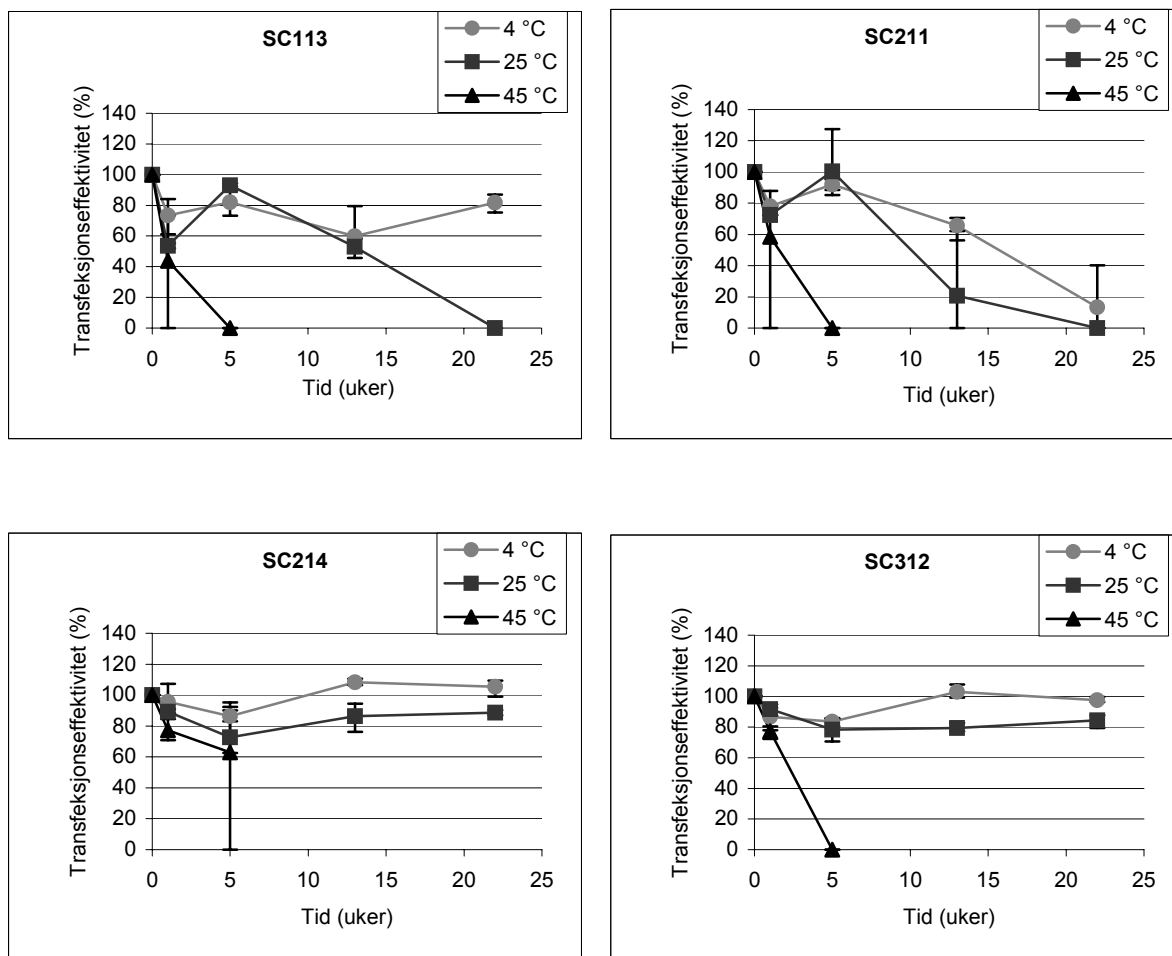
Resultatene av transfeksjonsforsøket varierte både med henhold til hvilken kitosantype som var brukt i polyplexene og hvilken temperatur de var lagret ved. Transfeksjonseffektiviteten ved starttidspunktet var lavest for polyplexer dannet med kitosan SC 211 ($4,1 \pm 0,5$ log(RLU/mg protein)) og høyest for polyplexer dannet med kitosan SC 312 ($6,7 \pm 0,1$ log(RLU/mg protein)) (tabell 5.1).

Tabell 5.1 Transfeksjonseffektivitet av polyplexer med kitosan SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312 med ladningsforhold 2 ved starttidspunktet for lagringen. Verdiene er angitt som gjennomsnittsverdi og standardavvik for 9 paralleller.

Kitosantype	Transfeksjonseffektivitet av polyplexet (log(RLU/mg protein))
SC 113	$5,3 \pm 0,5$
SC 211	$4,1 \pm 0,5$
SC 214	$6,3 \pm 0,2$
SC 312	$6,7 \pm 0,1$

Figur 5.3 viser variasjonene i transfeksjonseffektivitet ved lagring av polyplexene i 0 til 22 uker. Verdiene som er benyttet i omtalen av transfeksjonseffektiviteten er verdier angitt i prosent av verdiene for transfeksjonseffektiviteten ved starttidspunktet av lagringen. Verdiene ved starttidspunktet er satt til 100 %.

Generelt sett for hele lagringsperioden viste polyplexene lagret ved 4 °C minst reduksjon i transfeksjonseffektivitet. For polyplexer laget av kitosan SC 113, SC 214 og SC 312 var transfeksjonseffektiviteten med visse variasjoner rundt 100 % i hele lagringsperioden. Når det gjaldt polyplexer av kitosan SC 211 ble transfeksjonseffektiviteten av polyplexene redusert med tiden de hadde vært lagret. Etter 13 ukers lagring var transfeksjonseffektiviteten redusert med 34 % og etter 22 uker var den 87 % lavere enn startverdien.



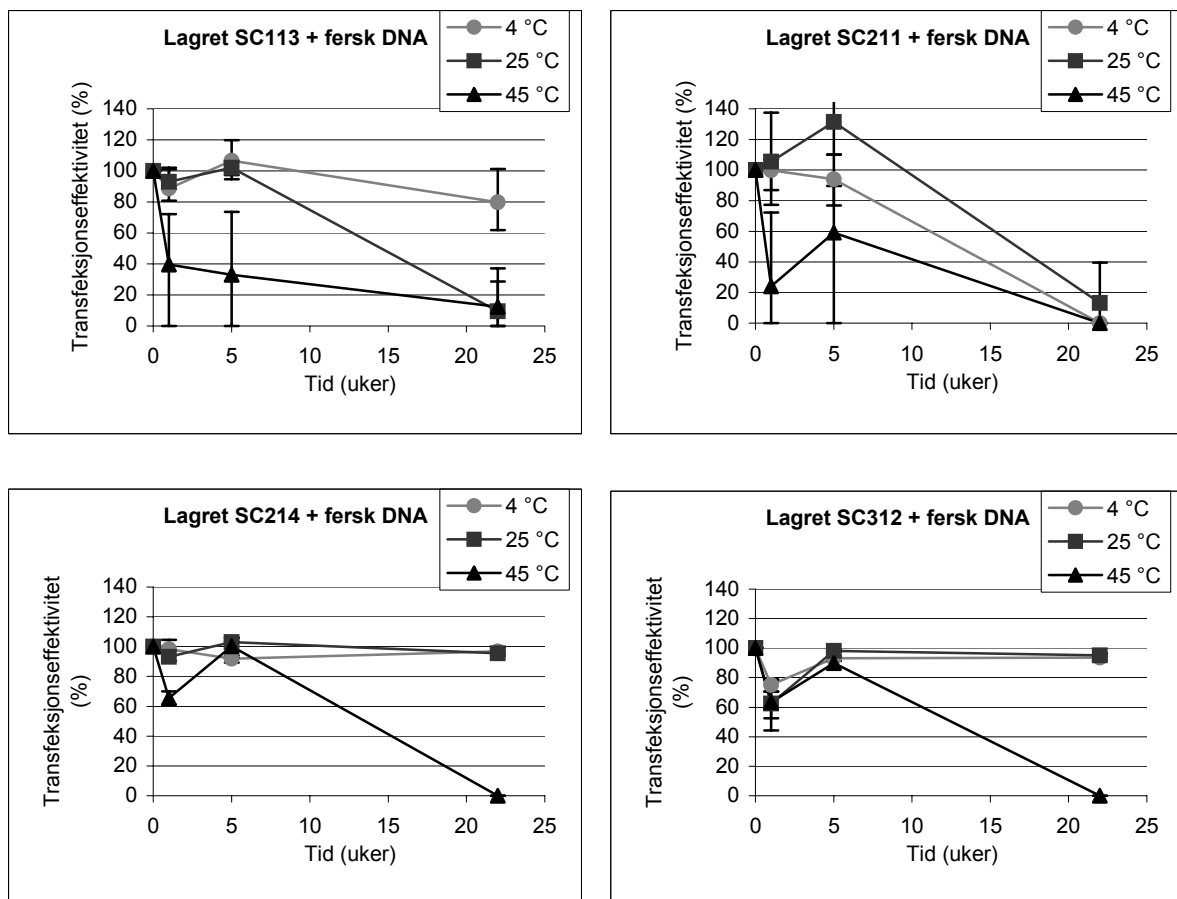
Figur 5.3 Transfeksjonseffektivitet i EPC celler av polyplexer lagret ved 4 °C, 25 °C og 45 °C i 0 – 22 uker. Polyplexene ble laget av kitosan SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312 med ladningsforhold 2 mellom kitosan og DNA. Transfeksjonseffektiviteten ved starttidspunktet for lagringen er 100 %. Verdiene er angitt som gjennomsnitt \pm maks/min for 3 paralleller.

Reduksjonen i transfeksjonseffektivitet var generelt noe større for polyplexer lagret ved 25 °C enn for polyplexer lagret ved 4 °C. Både for polyplexer med SC 113 og SC 211 lagret ved 25 °C ble transfeksjonseffektiviteten kraftig redusert i løpet av lagringstiden, etter 13 uker var den redusert med henholdsvis 47 % og 79 % og etter 22 uker viste polyplexene med SC 113 og SC 211 ingen transfeksjonseffektivitet. Polyplexer med SC 214 og SC 312 lagret ved 25 °C derimot hadde forholdsvis høy transfeksjonseffektivitet, reduksjonen var på rundt 20 %.

Alle polyplexene som var lagret ved 45 °C viste stor reduksjon i transfeksjonseffektivitet ved økt lagringstid. Etter 1 ukes lagring av polyplexene ved 45 °C var transfeksjonseffektiviteten mest redusert for polyplexer med SC 113 (56 %) og minst for polyplexer med SC 312 (23 %). Alle polyplexene lagret ved 45 °C, bortsett fra SC 214-baserte polyplexer, hadde ingen transfeksjonseffektivitet etter lagring i 5 uker. Gjennomsnittsreduksjonen for polyplexene med SC 214 var 37 % etter lagring i 5 uker, en parallell hadde ingen transfeksjonseffektivitet.

Lagring av kitosanløsninger

Det ble også gjort transfeksjon av cellene med polyplexer der bare kitosan hadde vært lagret, og deretter ble kitosanet kompleksert med nylaget DNA (figur 5.4).



Figur 5.4 Transfeksjonseffektivitet i EPC celler av polyplexer dannet med lagret kitosan (SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312) og fersk DNA. Kitosanløsningene er lagret ved 4 °C, 25 °C og 45 °C i 0 – 22 uker. Polyplexene har et ladningsforhold på 2 mellom kitosan og DNA. Transfeksjonseffektiviteten ved starttidspunktet for lagringen er 100 %. Verdiene er angitt som gjennomsnitt ± maks/min for 3 paralleller.

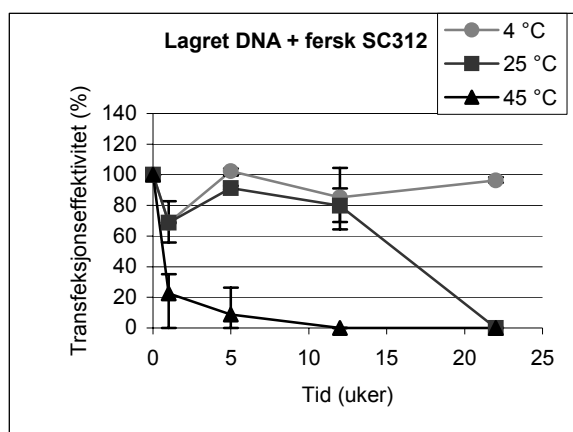
Også her viste polyplexene med SC 113, SC 214 og SC 312 der kitosanet var lagret ved 4 °C høy transfeksjonseffektivitet gjennom hele lagringsperioden, for polyplexer med SC 214 og SC 312 holdt transfeksjonseffektiviteten seg rundt 100 %, mens for polyplexer med SC 113 sank transfeksjonseffektiviteten med 20 % etter 22 ukers lagring. Transfeksjonseffektiviteten til polyplexer med SC 211 lagret ved 4 °C var imidlertid mye dårligere enn for de andre kitosantypene ved lang tids lagring. Etter 22 uker viste disse polyplexene ingen evne til transfeksjon av cellene.

Transfeksjonseffektiviteten til polyplexer laget av kitosan lagret ved 25 °C var høy både for polyplexer med SC 214 og SC 312, her lå den på rundt 100 % selv etter lang tids lagring (22 uker). Når det gjaldt polyplexer med SC 113 og SC 211 lagret ved 25 °C var transfeksjonseffektiviteten høy når kitosanet var lagret i 5 uker, resultatene viste en økt transfeksjonseffektivitet på henholdsvis 2 % og 32 %. Imidlertid var transfeksjonseffektiviteten for polyplexer av SC 113 og SC 211 lagret i 22 uker redusert med henholdsvis 90 % og 87 %.

Polyplexene med kitosan som var lagret ved 45 °C viste liten eller ingen transfeksjonseffektivitet ved lang tids lagring. For polyplexene dannet av SC 214 og SC 312 var transfeksjonseffektiviteten ved kort tids lagring (5 uker) høy (90 – 100 %) mens ved lang tids lagring (22 uker) var den 0 %. For polyplexene med SC 113 lagret ved 45 °C ble transfeksjonseffektiviteten mest redusert etter kort tids lagring av kitosanet, etter 1 uke var den redusert med 60 % og den var redusert med 88 % etter 22 ukers lagring av SC 113. Transfeksjonseffektiviteten til polyplexer av kitosan SC 211 lagret ved 45 °C varierte noe, men var generelt lav, etter 1 ukes lagring av kitosanet var den redusert med 76 % og etter 22 uker var det ingen transfeksjonseffektivitet.

Lagring av DNA-løsninger

Det ble i tillegg gjort transfeksjon med polyplexer av lagret DNA og nylaget kitosan SC 312. Som for lagrede polyplexer og lagrede kitosanløsninger av SC 312, viste polyplexene av DNA lagret ved 4 °C høy transfeksjonseffektivitet (4 – 15 % reduksjon i løpet av lagringsperioden på 22 uker). Ved lagring av DNA ved 25 °C ble transfeksjonseffektiviteten av polyplexet som ble laget lite redusert i begynnelsen (20 % etter 12 uker) og redusert til 0 etter 22 uker. Polyplexer dannet av DNA lagret ved 45 °C viste lav transfeksjonseffektivitet ved kort tids lagring (reduksjonen var på 77 % etter 1 ukes lagring) og ingen transfeksjonseffektivitet ved 12 ukers lagring av DNA (figur 5.5).



Figur 5.5 Transfeksjonseffektivitet i EPC celler av polyplexer dannet med lagret DNA og fersk kitosan SC 312. DNA-løsningene er lagret ved 4 °C, 25 °C og 45 °C i 0 – 22 uker. Polyplexene har et ladningsforhold på 2 mellom kitosan og DNA. Transfeksjonseffektiviteten ved starttidspunktet er 100 %. Verdiene er angitt som gjennomsnitt \pm maks/min.

5.2.2 Størrelse

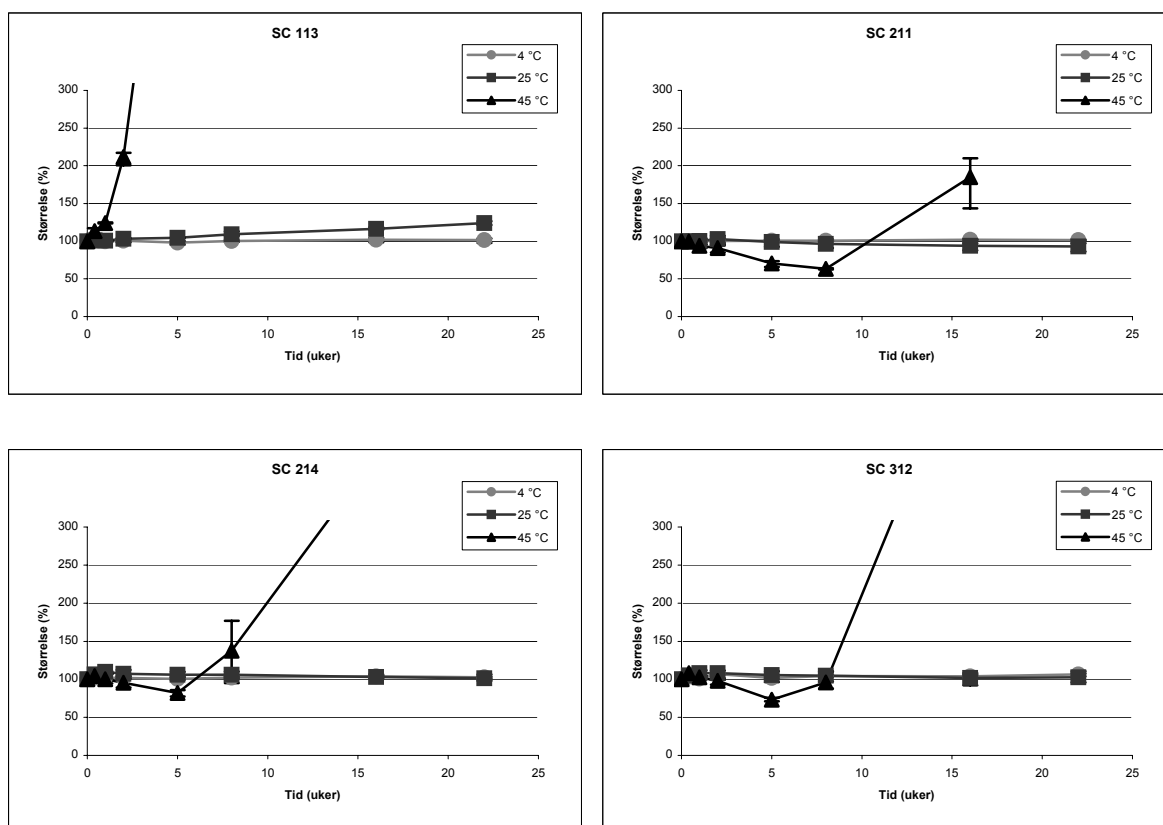
Lagring av polyplexer

Størrelsen av polyplexene er videre i teksten angitt i prosent av verdien ved starttidspunktet for lagringen. Polyplexer laget av SC 113 hadde den minste størrelsene ved starttidspunktet (148 ± 16 nm) og polyplexer laget av kitosan SC 211 var størst (265 ± 24 nm) (tabell 5.2). Disse verdiene ved starttidspunktet er satt til 100 % størrelse.

Tabell 5.2 Størrelse av polyplexer med kitosan SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312 og ladningsforhold 2 ved starttidspunktet for lagring av polyplexene. Verdiene er angitt som gjennomsnittsverdi og standardavvik for 9 paralleller.

Kitosantype	Størrelse av polyplex (nm)
SC 113	148 ± 16
SC 211	265 ± 24
SC 214	223 ± 18
SC 312	231 ± 19

Endringene i polyplexstørrelsen etter lagring i 0 til 22 uker er vist i figur 5.6 med verdier i prosent av verdiene ved starttidspunktet for lagringen av polyplexene.



Figur 5.6 Størrelse av polyplexer med ladningsforhold 2 etter lagring ved 4 °C, 25 °C og 45 °C i 0 – 22 uker. Polyplexene er laget av ulike kitosantyper (SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312). Størrelsen ved starttidspunktet for lagringen er 100 %. Verdiene er angitt som prosent av dette og som gjennomsnitt ± maks/min for 3 paralleller. Noen verdier er så høye at de ligger utenfor skalaen på y-aksen.

Etter lagring av polyplexene ved 4 °C og 25 °C var det generelt liten endring i størrelsen, mens for polyplexene lagret ved 45 °C var det store endringer i størrelsen. For kitosan SC 113 var endringen i størrelse av polyplexene lagret ved 4 °C på ± 2 %. Lagret ved 25 °C ble polyplexene med SC 113 noe større etterhvert. Det skjedde en jevn økning i størrelsen, og etter 22 uker var polyplexene 24 % større enn ved forsøkets start. For polyplexene med SC 113 lagret ved 45 °C skjedde det en rask økning i størrelsen. Allerede etter 3 dagers lagring hadde størrelsen økt med 14 % av startverdien. Etter 2 ukers lagring var størrelsen av polyplexet 112 % større enn ved starten av lagringsperioden.

Størrelsen til polyplexer laget av kitosan SC 211 endret seg lite (+ 2 %) ved lagring av dette polyplexet ved 4 °C. For lagring ved 25 °C ble størrelsen av polyplexet noe redusert, med 7 % etter lagring i 22 uker. Når dette polyplexet ble lagret ved 45 °C varierte størrelsen mellom reduksjon og stigning. Først sank den forholdsvis jevnt, med 36 % etter 8 ukers lagring. Deretter steg størrelsen og etter 16 ukers lagring var polyplexet 85 % større enn ved forsøkets start.

Ved lagring av polyplexer med kitosan SC 214 ved 4 °C og 25 °C endret størrelsen seg lite (henholdsvis + 4 % og + 10 %). Polyplexet lagret ved 45 °C endret størrelsen mer under lagring. I begynnelsen ble størrelsen redusert, med 18 % etter 5 uker, og deretter skjedde det en økning i størrelse. Etter lagring i 16 uker var polyplexene over 200 % større enn ved starten av forsøket.

Størrelsen til polyplexer laget med SC 312 lagret ved 4 °C og 25 °C endret seg lite gjennom hele lagringsperioden (henholdsvis 7 % og 8 % økning i størrelse). Også for dette polyplexet når det ble lagret ved 45 °C sank størrelsen til å begynne med (27 % etter 5 uker) og steg etterhvert, slik at polyplexet var over 200 % større enn startverdien etter 16 ukers lagring.

Lagring av kitosanløsninger

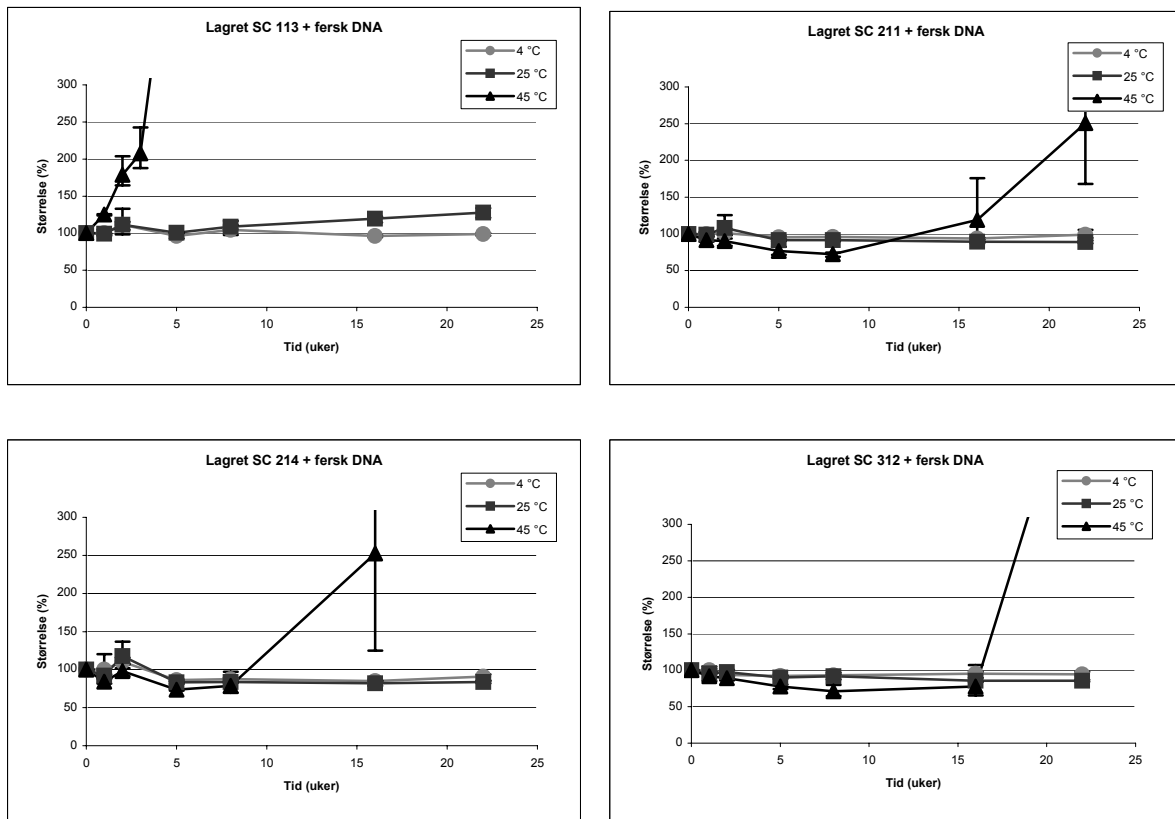
Størrelsen ble også målt på polyplexer der bare kitosan hadde vært lagret, og deretter kompleksert med fersk DNA. Mengden av kitosan og DNA som ble blandet for å danne disse polyplexene var mindre enn for de polyplexene som ble lagret, så størrelsen av disse polyplexene var generelt mindre. Også disse polyplexene var minst med kitosan SC 113 (118 ± 5 nm) og størst med kitosan SC 211 (221 ± 4 nm) (tabell 5.3). Verdiene for polyplexene videre i teksten er angitt som prosent av disse startverdiene, der startverdiene er 100 %.

Tabell 5.3 Størrelse av polyplexer med kitosan SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312 og ladningsforhold 2 ved starttidspunktet for lagring av kitosan. Verdiene er angitt som gjennomsnittsverdi og standardavvik for 3 paralleller.

Kitosantype	Størrelse av polyplex (nm)
SC 113	118 ± 5
SC 211	221 ± 4
SC 214	203 ± 36
SC 312	196 ± 8

Størrelsen av polyplexene dannet av kitosan lagret i inntil 22 uker kompleksert med fersk DNA er vist i figur 5.7.

Når kitosan SC 113 ble lagret ved 4 °C og deretter kompleksert med DNA, var størrelsen på polyplexet som ble dannet forholdsvis lik for alle uttakstidspunktene (+11/−4 % endring). Lagring ved 25 °C ga en noe økende størrelse av polyplexet etterhvert som lagringstiden ble lengre (+ 28 % etter 22 uker). Ved 45 °C lagring av SC 113 økte størrelsen av polyplexet raskt (25 % etter 1 uke, 78 % etter 2 uker) og etter 5 ukers lagring var størrelsen økt med over 200 %.



Figur 5.7 Størrelse av polyplexer med ladningsforhold 2 av lagret kitoan (SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312) og fersk DNA etter lagring av kitoanløsningene ved 4 °C, 25 °C og 45 °C i 0 – 22 uker. Størrelsen ved starttidspunktet for lagringen er 100 %. Verdiene er angitt som prosent av dette og som gjennomsnitt \pm maks/min for 3 paralleller. Noen verdier er så høye at de ligger utenfor skalaen på y-aksen.

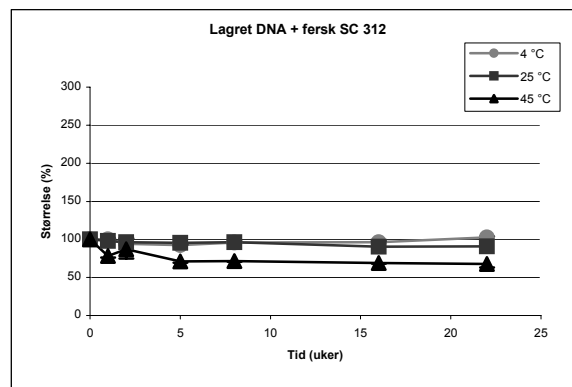
For de polyplexene som ble dannet av SC 211 skjedde det en liten reduksjon i størrelsen (maks 11 %) av polyplexene som ble dannet etter lagring av denne kitoantypen både ved 4 °C og 25 °C. For lagring av kitoanet ved 45 °C skjedde det først en reduksjon i størrelsen av det dannede polyplexet, med 28 % etter 8 uker, og deretter en stigning i størrelsen med 151 % etter 22 ukers lagring av kitoanet.

Etter lagring av kitoan SC 214 ved 4 °C og 25 °C varierte størrelsen av polyplexet som ble dannet med henholdsvis +10/–15 % og \pm 18 %. Størrelsen av polyplexet dannet av kitoanet lagret ved 45 °C økte med 21 % etter 8 uker og 153 % etter 16 ukers lagring av kitoan.

Størrelsen av polyplexer med kitosan SC 312 holdt seg forholdsvis stabil gjennom hele lagringsperioden når kitosanet ble lagret ved 4 °C og 25 °C (henholdsvis –8 % og –15 % endring). Størrelsen til dette polyplexet ble redusert med 29 % etter kort tids lagring (8 uker) av kitosanet ved 45 °C. Etter lengre tids lagring av kitosanet (22 uker) ved 45 °C ble imidlertid størrelsen av polyplexet økt med over 200 % av startverdien.

Lagring av DNA-løsninger

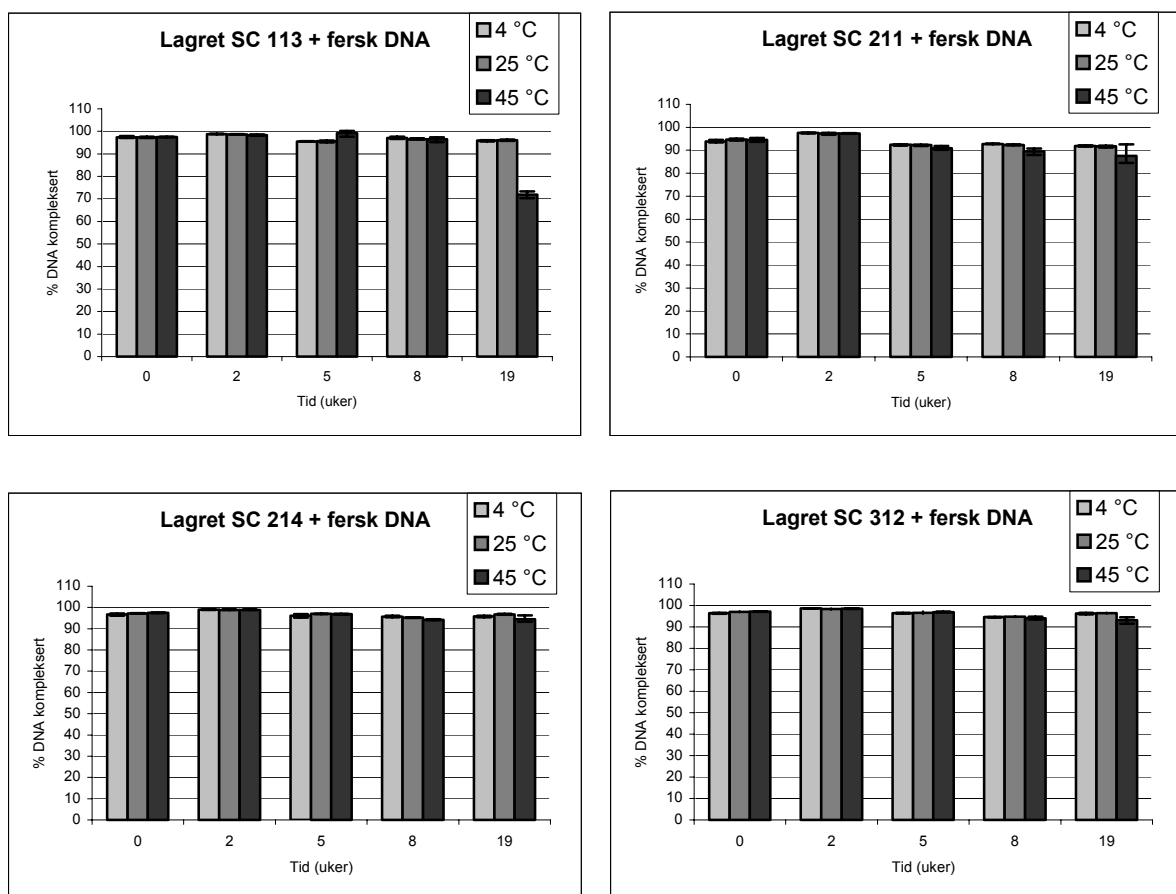
DNA som ble lagret ved de ulike temperaturene, ble kompleksert med fersk kitosan SC 312. Det viste seg at disse polyplexene var stabile i størrelsen når DNA var lagret ved 4 °C og 25 °C (henholdsvis +3/–7 % og –9 % endring). For polyplexer dannet av DNA lagret ved 45 °C sank størrelsen mest helt i begynnelsen av lagringstiden (22 % etter 1 ukes lagring av DNA) og etter 22 ukers lagring av DNA var størrelsen av polyplexet som ble dannet 32 % mindre enn startverdien (figur 5.8).



Figur 5.8 Størrelse av polyplexer med ladningsforhold 2 av lagret DNA og fersk kitosan SC 312 etter lagring av DNA-løsningene ved 4 °C, 25 °C og 45 °C i 0 – 22 uker. Størrelsen ved starttidspunktet for lagringen er 100 %. Verdiene er angitt som prosent av dette og som gjennomsnitt ± maks/min for 3 paralleller.

5.2.3 Komplekseringsgrad av DNA

Ved å utføre Pico Green Assay på polyplexer, ble den mengden av DNA som ikke var kompleksert med kitosan målt, slik at komplekseringsgraden av DNA med kitosan ble funnet. Før lagring av polyplexene ble komplekseringsgraden funnet til å være over 94 % for alle polyplexene. Polyplexer med kitosan SC 113 hadde best komplekseringsgrad (97,4 %) mens polyplexer med SC 211 hadde lavest komplekseringsgrad (94,3 %) (figur 5.9).



Figur 5.9 Komplekseringsgrad av DNA målt ved Pico Green Assay for polyplexer av lagret kitosan (SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312) og fersk DNA. Kitosanløsningene er lagret ved 4 °C, 25 °C og 45 °C i 0 – 19 uker og polyplexene har ladningsforhold 2. Verdiene er gjennomsnittsverdier \pm maks/min for 3 paralleller. Noen paralleller var svært like slik at maks/min-verdiene ikke synes.

Ettersom polyplexene ble lagret, kunne det ikke lenger måles komplekseringsgrad, fordi DNA som ikke var kompleksert med kitosan ble brutt ned. Imidlertid ble det gjort Pico Green Assay på polyplexer dannet av lagret kitosan og fersk DNA. På disse polyplexene kunne det måles komplekseringsgrad. Generelt var den evnen kitosan hadde til å kompleksere DNA god selv etter lang tids lagring (figur 5.9).

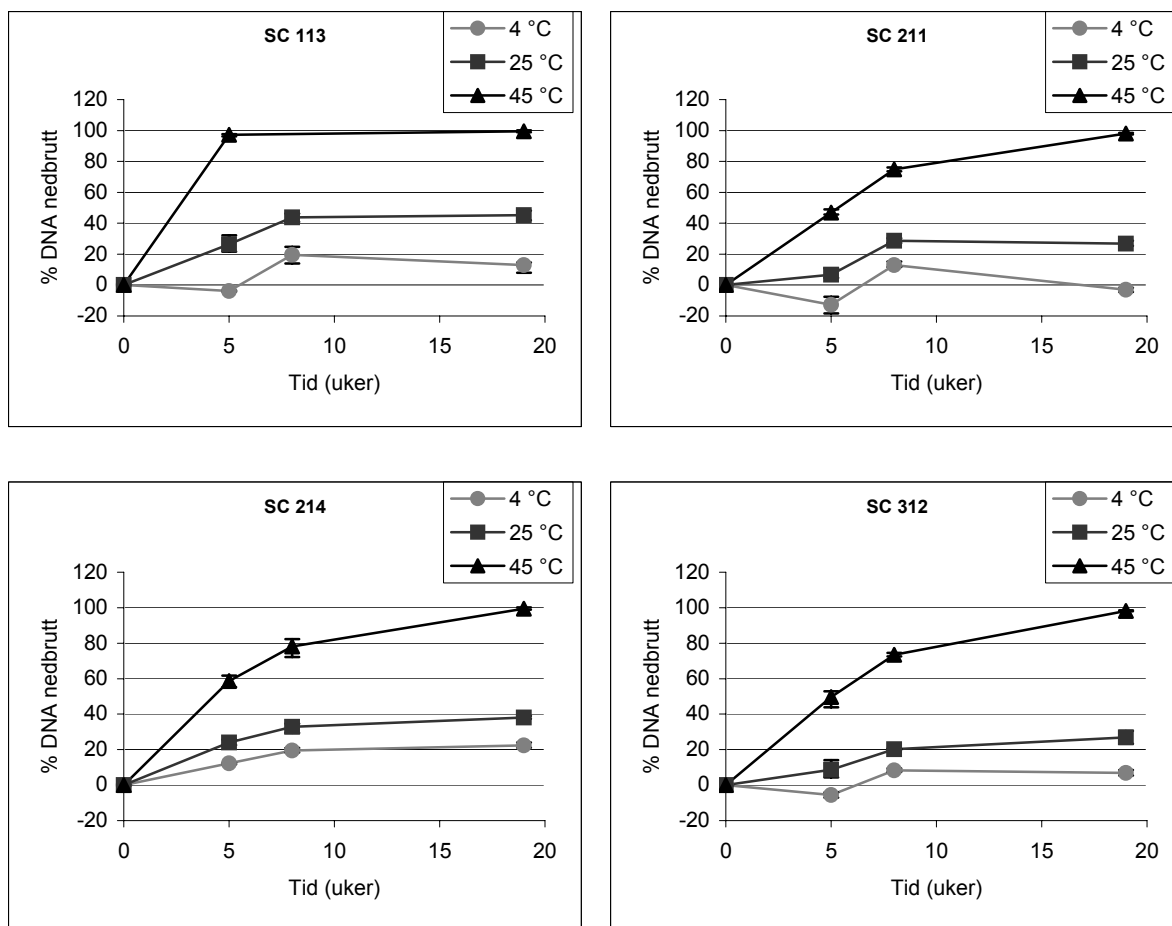
For kitosan SC 113 lå evnen til å kompleksere DNA på henholdsvis 95,9 % og 96,1 % etter 19 ukers lagring ved 4 °C og 25 °C. Lagret ved 45 °C hadde SC 113 god evne til kompleksering etter 8 uker (96,5 %) mens etter lagring i 19 uker var komplekseringsgraden 71,9 %. Etter 19 ukers lagring av kitosan SC 211 hadde denne kitosanløsningen en evne til å kompleksere DNA på 92 % ved lagring ved 4 °C og 25 °C, og 87,6 % ved lagring ved 45 °C.

Både polyplexene med kitosan SC 214 og SC 312 hadde en komplekseringsgrad på over 90 % etter 19 ukers lagring. For SC 214 var komplekseringsgraden etter 19 ukers lagring ved 4 °C, 25 °C og 45 °C henholdsvis 95,9 %, 96,8 % og 94,4 %. Komplekseringsgraden til polyplexene dannet med SC 312 lagret i 19 uker var 96,2 % ved 4 °C lagring, 96,4 % ved 25 °C lagring og 93,1 % ved 45 °C lagring.

5.2.4 Stabilitet av DNA i lagrede polyplexer

Ved tilsetning av polyaspartat til de lagrede polyplexene før det ble gjort Pico Green Assay, ble mengde nedbrutt DNA til tross for kompleksering med kitosan, bestemt (figur 5.10).

Ved lagring av polyplexene ved 4 °C ble DNA minst brutt ned. Resultatene viste at for polyplexer med kitosan SC 113, ble DNA ikke brutt ned etter 5 ukers lagring og brutt ned med 12,9 % etter 19 uker. For lagring ved 25 °C av polyplexene med SC 113 ble DNA brutt noe mer ned, etter 19 ukers lagring var 45,3 % av DNA nedbrutt. DNA ble mest og raskest brutt ned ved lagring av polyplexene ved 45 °C (97,2 % etter 5 uker).



Figur 5.10 Mengde DNA nedbrutt målt ved Pico Green Assay av polyplexer tilsatt polyaspartat. Polyplexene er laget med kitosan SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312 og ladningsforhold 2 og lagret ved 4 °C, 25 °C og 45 °C i 0 – 19 uker. Verdiene er gjennomsnittsverdier \pm maks/min for 3 paralleller.

For polyplexet dannet av kitosan SC 211 lagret ved 4 °C viste resultatene en nedbrytning av DNA som varierte mellom 0 og 13 %. DNA i polyplexet med SC 211 lagret ved 25 °C viste tegn til noe nedbrytning (26,8 % etter 19 uker). I polyplexet med SC 211 lagret ved 45 °C, ble etterhvert omtrent alt DNA brutt ned. Dette skjedde gradvis og etter 19 ukers lagring var 97,9 % av DNA brutt ned.

Lagret ved 4 °C ble DNA i polyplexet med SC 214 brutt noe mer ned enn DNA i de andre polyplexene lagret ved 4 °C. For dette polyplexet var nedbrytningen av DNA på 22,3 % etter 19 ukers lagring. Lagret ved 25 °C var nedbrytningen av DNA i dette polyplexet noe større enn ved 4 °C lagring, DNA var brutt ned med 38,1 % etter 19 uker. Også for dette polyplexet ble DNA helt brutt ned når polyplexet ble lagret ved 45 °C.

Det var relativt liten nedbrytning av DNA ved 4 °C lagring av polyplexet med kitosan SC 312 (6,8 – 8,3 %). Nedbrytningen var noe større, men fortsatt liten for lagring av dette polyplexet ved 25 °C, etter 19 ukers lagring var 26,9 % av DNA brutt ned. Når dette polyplexet ble lagret ved 45 °C derimot viste det seg at i likhet med de andre polyplexene, ble DNA her brutt helt ned.

5.2.5 Stabilitet av lagrede DNA-løsninger

Stabiliteten av DNA-løsninger ble undersøkt ved gelelektroforese av lagrede DNA-løsninger (figur 5.11).



Figur 5.11 Gelelektroforese av DNA-løsninger etter lagring ved ulike temperaturer. Kolonne 1=DNA-markør, kolonne 2=fersk DNA, kolonne 3-5=DNA lagret i 2 uker (kolonne 3=4 °C, 4=25 °C, 5=45 °C), kolonne 6-8=DNA lagret i 7 uker (kolonne 6=4 °C, 7=25 °C, 8=45 °C), kolonne 9-11=DNA lagret i 31 uker (kolonne 9=4 °C, 10=25 °C, 11=45 °C)

DNA fortynnet samme dag som gelelektroforesen ble utført, kalt fersk DNA, hadde et bånd øverst på gelen i gelelektroforesen (kolonne 2). Etter lagring av DNA i 2 uker hadde DNA-løsningene lagret ved 4 °C og 25 °C også dette båndet i tillegg til et svakt bånd like nedenfor. DNA-løsningen lagret ved 45 °C i 2 uker hadde derimot ingen av disse øverste båndene, men istedenfor bånd som fløt over i hverandre lenger nede på gelen.

Når det gjaldt DNA-løsningene som hadde vært lagret i 7 uker hadde løsningen lagret ved 4 °C fortsatt det øverste båndet som det sterkeste og båndet like nedenfor var noe tydeligere enn ved 2 ukers lagring. For lagring ved 25 °C i 7 uker derimot var det øverste båndet forholdsvis svakt, mens båndet like nedenfor var det sterkeste. Det var ingen bånd for DNA-løsningen lagret ved 45 °C i 7 uker.

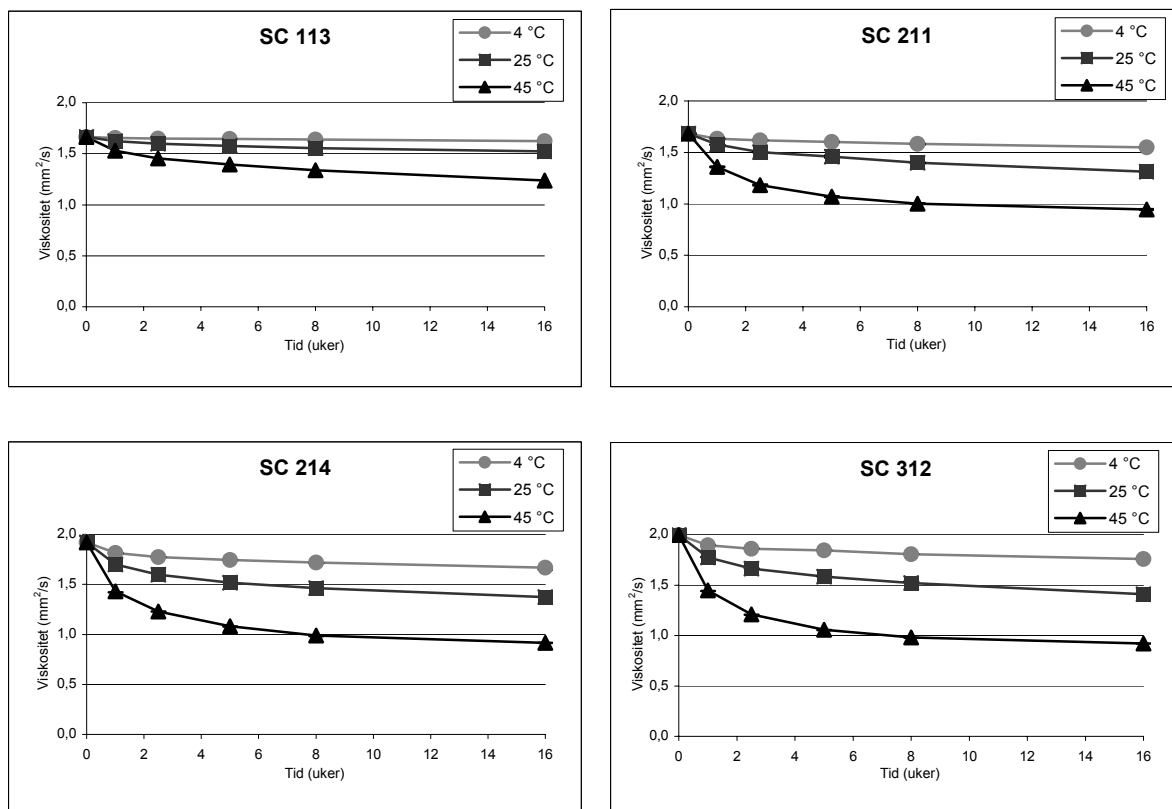
Etter 31 ukers lagring ved 4 °C var de to båndene øverst på gelen like sterke. Ved 25 °C lagring i 31 uker var det ingen bånd øverst på gelen, men bånd som fløt over i hverandre lenger nede på gelen. Det var heller ikke etter 31 ukers lagring noen bånd for DNA-løsningen lagret ved 45 °C.

5.2.6 Kinematisk viskositet av lagrede kitosanløsninger

Resultatene av viskositetsmålingene viste at alle kitosantypene fikk redusert viskositet ved lagring. Reduksjon i viskositet var minst ved lagring ved 4 °C, og størst ved lagring ved 45 °C. Det var liten variasjon (maks $\pm 0,005 \text{ mm}^2/\text{s}$) mellom de forskjellige parallellene (figur 5.12).

For kitosan SC 113 ble viskositeten redusert fra $1,66 \text{ mm}^2/\text{s}$ ved starten av lagringsstudien til 2 % lavere viskositet etter 16 ukers lagring ved 4 °C. Reduksjonen var noe større ved lagring ved 25 °C, her ble viskositeten redusert med 8 %, mens ved lagring ved 45 °C var viskositeten 26 % lavere etter 16 ukers lagring.

Når det gjaldt kitosan SC 211 skjedde det en større reduksjon i viskositeten til å begynne med. Deretter flatet reduksjonen noe ut. For lagring ved 4 °C var reduksjonen i viskositet liten, på 8 % fra $1,68 \text{ mm}^2/\text{s}$ viskositet ved starten av lagringsstudien. Ved 25 °C lagring i 16 uker ble viskositeten redusert med 22 %. For lagring ved 45 °C ble viskositeten redusert mest i starten, etter 1 uke var viskositeten redusert med 19 % og etter 2 ½ uke var reduksjonen 30 %. Etter 16 ukers lagring av kitosan SC 211 ved 45 °C var viskositeten redusert med 44 %.



Figur 5.12 Kinematisk viskositet av ulike kitosanløsninger (SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312) lagret ved temperatuene 4 °C, 25 °C og 45 °C i 0 – 16 uker. Verdiene er gjennomsnittsverdier av 2-3 paralleller ± maks/min-verdier (disse er på det meste ± 0,005 slik at de ikke synes i figurene).

Også for kitosan SC 214 var reduksjonen i viskositet størst i starten av lagringen. For disse kitosanløsningene var viskositeten ved nulltidspunktet 1,92 mm²/s. Kitosanløsninger lagret ved 4 °C hadde minst reduksjon i viskositet, 13 % etter 16 uker, og noe større reduksjon i viskositet ved lagring ved 25 °C, da var reduksjonen 28 % etter 16 uker. Den største reduksjonen i viskositet skjedde ved lagring ved 45 °C, her ble viskositeten redusert med 25 % etter 1 uke, 44 % etter 5 uker og 52 % etter 16 uker i forhold til ved forsøkets start.

De samme tendensene viste seg ved lagring av kitosan SC 312. For denne kitosantypen var viskositeten ved forsøkets start på 2,00 mm²/s. Etter 16 ukers lagring ved 4 °C sank viskositeten med 12 %. Kitosanløsningene som ble lagret ved 25 °C hadde en reduksjon i viskositet på 29 % etter 16 ukers lagring. Viskositeten sank med 27 % etter 1 ukers lagring ved 45 °C og 47 % i forhold til startverdien etter 5 uker. Etter 16 ukers lagring ved 45 °C var viskositeten 54 % lavere enn ved starten av lagringsstudien.

5.2.7 pH i løsninger med polyplexer

Det ble målt pH-verdier i alle prøvene med polyplexer etter lagring av polyplexene i 3 dager, 1 uke, 2 uker, 5 uker, 8 uker, 16 uker, 19 uker og 22 uker. Det ble funnet at pH-verdien varierte lite. Den største pH-verdien var 5,66 og den minste var 5,37 for hele perioden (tabell 5.4).

Tabell 5.4 pH-verdier i løsninger av kitosanbaserte polyplexer (med kitosan SC 113, SC 211, SC 214 og SC 312) med ladningsforhold 2 etter lagring i opptil 22 uker.

	Dag 3	Uke 1	Uke 2	Uke 5	Uke 8	Uke 16	Uke 19	Uke 22
Maksimums-pH	5,49	5,55	5,65	5,56	5,56	5,60	5,66	5,65
Minimums-pH	5,44	5,37	5,55	5,45	5,44	5,51	5,51	5,49

6 Diskusjon

6.1 Forforsøk

Forforsøkene ble gjort hovedsakelig for å finne ut om det kunne brukes vann til å løse opp kitosan til polyplexene. De fire kitosantypene som ble brukt, ble valgt fordi disse i en tidligere studie har vært undersøkt med hensyn til en rekke parametere [46-47]. Det ble videre valgt å gjøre forforsøk med 3 ulike ladningsforhold, for å se om vann var egnet som løsningsmiddel ved disse ladningsforholdene. I tidligere studier er det vist at 25 mM eddiksyre/natriumacetatbuffer pH 5,5 egner seg godt til å løse opp kitosan til bruk i polyplexer [46-47]. Derfor ble dette løsningsmiddelet sammenlignet med vann. Vann er billig, enkelt å fremstille (destillering, ionebytting) og har svært lav ionestyrke.

Polyplexer dannet med vann som løsningsmiddel for kitosan hadde lavere transfeksjonseffektivitet og mindre størrelse enn polyplexene hvor kitosan var løst i bufferen. Dette kan skyldes ulik pH og ionestyrke av vann og buffer. Vann har høyere pH enn bufferen, løsningsmidlene har pH på henholdsvis 5,9 og 5,5. Ved høyere pH vil færre av aminogruppene i kitosan være protonert, noe som fører til at polymeren får mindre positiv ladning. Ettersom det er antatt at opptak i celler skjer ved binding av de positive ladningene på kitosan til den negativt ladete cellemembranen, kan dette føre til lavere transfeksjonseffektivitet [45].

Størrelsen av polyplexene kan påvirkes av pH-verdien for løsningsmiddelet. Høyere pH gir færre protonerte aminogruupper og dermed færre positive ladninger. Når det blir færre ladninger vil dette gi svakere bindinger mellom kitosan og DNA og dermed større polyplexer. Videre kan ionestyrken av løsningsmiddelet påvirke størrelsen av polyplexene. Ionestyrken til vann er lav ettersom det er relativt få ioner i vann, mens bufferen har en høyere ionestyrke. En høy ionestyrke vil føre til at det elektriske dobbeltlaget på overflaten av polyplexene presses sammen. For polyplexene som har en netto positiv ladning kan dette føre til reduksjon i netto ladning slik at den totale ladningen av polyplexet kan nærme seg nøytral. Når polyplexene har liten total ladning vil frastøtningskreftene mellom polyplexene bli svakere og dette kan resultere i økt størrelse av polyplexene [75].

Ettersom mange av polyplexene med kitosan løst i vann ga liten eller ingen transfeksjonseffektivitet ble det valgt å ikke bruke vann som løsningsmiddel til lagringen av polyplexene.

6.2 Lagringsstudie

En formulering som skal brukes som et legemiddel må kunne holde seg stabil ved lagring av legemiddelet før det administreres til brukeren. Det er dermed hensiktsmessig å vite noe om stabiliteten av en formulering ved lagring hvis den i fremtiden skal brukes. Derfor ble lagringsstabiliteten av kitosanbaserte polyplexer studert i denne oppgaven.

Ettersom en lagringsstudie hvor alle ladningsforholdene skulle undersøkes, hadde blitt for omfattende, ble det valgt å bare bruke ett ladningsforhold i denne studien. Det ble valgt å bruke ladningsforholdet 2 mellom kitosan og DNA. Ved dette ladningsforholdet er det størst mulighet for å se endringer hvis det skjer noe med formuleringen. En endring i kitosan som fører til færre positive ladninger kan gi et reelt ladningsforhold nærmere 1, det vil si ingen ladning av polyplexet. Dette medfører at ikke blir noen elektrostatiske frastøtninger mellom polyplexer slik at de har lettere for å aggregere [75]. Dessuten vil polyplexer hvor kitosan har færre positive ladninger kunne tas dårligere opp i celler ettersom grunnlaget for opptak antas å være binding mellom positive ladninger på kitosan og negative ladninger i cellemembranen [62]. En endring i DNA som gir færre negative ladninger på DNA kan føre til svakere bindingskrefter mellom kitosan og DNA, noe som kan medføre større polyplexer. Videre ble ladningsforhold 2 valgt fordi alle polyplexene viste evne til å transfektere celler ved dette ladningsforholdet, som vist i forforsøkene i denne studien.

Stabiliteten av kitosanbaserte polyplexer kan påvirkes av mikrobiologisk kontaminasjon i polyplex-løsningen. I denne oppgaven ble det ikke gjort noen analyse for bakterievekst. Imidlertid er det lite sannsynlig at det var vekst i løsningene ettersom kitosan har bakteriostatisk egenskaper [76-77]. Det ble ved visuell inspeksjon av løsningene ikke funnet tegn til endringer i væsken. Videre ble løsninger som ble benyttet filtrert og autoklavert før bruk, og utstyr ble autoklavert. Dessuten vil bakterievekst gi opphav til større variasjon i parallellene ettersom veksten av bakterier sannsynligvis ikke vil være lik for hver løsning.

6.2.1 Transfeksjonseffektivitet

Ved formulering av kitosanbaserte polyplexer er målet å få en god transfeksjonseffektivitet som også holder seg ved lagring av polyplexet. Det ble vist at polyplexer med SC 214 og SC 312 beholdt den samme transfeksjonseffektiviteten etter lagring i 22 uker ved 4 °C og 25 °C. Imidlertid ble transfeksjonseffektiviteten sterkt redusert når polyplexene ble lagret ved høy temperatur (45 °C). Dessuten var det for polyplexene med SC 113 og SC 211 reduksjon i transfeksjonseffektiviteten etter lagring uansett temperatur. Reduksjonen økte jo høyere temperatur polyplexet ble lagret ved og jo lenger tid det ble lagret. Grunnen til større reduksjon i transfeksjonseffektivitet ved høyere temperatur, er at reaksjoner som kan skje i løsningen vil tilføres mer energi ved høyere temperatur, slik at de skjer fortere og lettere.

Det kan tenkes at transfeksjonseffektiviteten kan påvirkes av størrelsen til polyplexene. Transfeksjonen er avhengig av binding til celler, opptak i celler, transport til cellekjernen og dekompleksing av DNA [62]. Størrelsen av polyplexene kan ha noe å si for opptak i celler. Imidlertid var det slik at for polyplexene av lagret DNA og fersk kitosan var størrelsen av polyplexene lite endret, mens transfeksjonseffektiviteten ble redusert med temperaturen og tiden. Derfor er det grunn til å tro at reduksjonen i transfeksjonseffektivitet ikke skyldes størrelsesendringene i polyplexene, men andre faktorer, som endringer i kitosan eller DNA. Det er dessuten uvisst om størrelsen av polyplexene ble endret ved tilsetning til cellemediet ettersom størrelsesmålingene ble utført før polyplex-løsningen ble satt til cellemediet. Derfor kan det ikke vites noe om størrelsen av polyplexene som transfekterte cellene.

For å finne ut om reduksjonen i transfeksjonseffektivitet skyldtes endringer i kitosan eller endringer i DNA, ble løsninger av disse lagret og kompleksert med ferskt DNA/kitosan. Reduksjonene i transfeksjonseffektivitet var mindre for lagret kitosan kompleksert med fersk DNA enn for lagrede polyplexer. For lagret DNA kompleksert med fersk kitosan var reduksjonen i transfeksjonseffektivitet lik eller større enn for det tilsvarende lagrede polyplexet (polyplexet basert på kitosan SC 312). Dette kan tilsa at lagret DNA påvirker transfeksjonseffektiviteten i større grad enn lagret kitosan.

Ettersom den reduserte transfeksjonseffektiviteten kan skyldes nedbrytning av DNA ved lagring ble stabiliteten av DNA studert ved hjelp av gelelektroforese. Hvor mange bånd DNA dannet i gelen viste hvor mye det ble nedbrutt. Jo flere bånd, jo mer nedbrutt var DNA. Resultatene fra gelelektroforesen viste at DNA ble nedbrutt under lagring ved alle temperaturene som ble undersøkt (4 °C, 25 °C og 45 °C). Etterhvert som lagringstiden ble lengre, ble DNA mer nedbrutt. Nedbrytningen økte med økende temperatur i løsningen.

Nedbrytningen av DNA kan skje ved at DNA gjennomgår en depurineringsreaksjon. Dette kan ofte føre til brudd i nukleotidkjeden [53]. Da kan DNA gå over fra å være supercoilet til å ha en åpen sirkulær eller lineær form. Det har vært vist i noen studier at DNA vil ha størst potensiale for transfeksjon i supercoilet form. For den åpne sirkulære formen er transfeksjonspotensialet en del mindre, og minst for den lineære formen av DNA [78]. Det er derfor stor sannsynlighet for at det er nedbrytningen av DNA som fører til den reduserte transfeksjonseffektiviteten ved høy temperatur i denne oppgaven.

Ved tilsetning av polyaspartat til polyplexene ble alt DNA i polyplex-løsningen fritt og kunne dermed måles ved hjelp av Pico Green Assay. Resultatene fra dette viste en nedbrytning av DNA som var kompleksert. Nedbrytningen økte med økende temperatur og tid, og ved høy temperatur ble alt DNA brutt ned i løpet av lagringsperioden. Dette samsvarer med at polyplexer lagret ved høy temperatur i lang tid ikke viste noen evne til transfeksjon av celler.

For kompleksering av DNA med andre kationiske polymere er det tidligere funnet at når DNA er i ladningsunderskudd vil kompleksering med polyetylenimin eller poly-L-lysin stabilisere DNA [79]. Mine forsøk baserte seg på polyplexer med DNA i ladningsunderskudd og resultatene av disse forsøkene tydet på at stabiliteten av kompleksert DNA ble redusert med økende temperatur. I en studie hvor PDMAEMA er brukt som polymer for å kompleksere DNA er det imidlertid sett at DNA brytes raskere ned i polyplexet enn i form av nakent DNA [61].

Ved nedbrytning av DNA vil DNA gå over i ulike tertiære strukturer, og det er vist at Pico Green Assay kan ha forskjellig følsomhet for ulike tertiære strukturer [69]. Denne forskjellen i følsomhet mellom ulike tertiære strukturer er imidlertid liten og det er vist at lineær DNA gir en noe økt fluorescens enn supercoilet DNA ved Pico Green Assay [68]. Dette kan være en

forklaring på at kurvene for nedbrytning av DNA i noen tilfeller viste mindre nedbrytning etter lengre tid enn det som var tilfellet ved et tidligere tidspunkt.

Grunnen til at polyplexene med SC 113 og SC 211 viste større reduksjon i transfeksjonseffektivitet enn polyplexene med SC 214 og SC 312, kan være at ladningsforhold 2 ikke er optimalt for disse polyplexene. Det er vist i en tidligere studie at for SC 214 gir ladningsforhold 3 optimal transfeksjon, mens for SC 113 gir ladningsforhold 10 optimal transfeksjon [46]. Etersom polyplexene med SC 113 ligger lenger unna sitt optimale ladningsforhold enn polyplexer med SC 214 vil disse polyplexene gi lavere transfeksjon. Dette kan føre til at en endret transfeksjonseffektivitet av polyplexer med SC 113 raskere vil komme ned på nivået for ingen transfeksjon.

Det har vært gjort få andre studier på transfeksjonseffektiviteten av kitosanbaserte polyplexer som er lagret i lang tid. Imidlertid har kitosanbaserte polyplexer vært lagret i en måned under en tidligere studie [59]. Disse polyplexene ble konjugert med PEG og lagret i 50 % sukrose og i frysetørket tilstand. Det ble da funnet at transfeksjonseffektiviteten holdt seg i 4 ukers lagring ved 4 °C. Mine resultater stemmer godt overens med dette selv om det var forskjeller i lagringsmåten av polyplexene.

Det har også vært gjort en studie på lagring av polyplexer med en annen polymer enn kitosan. Polymeren som ble brukt i denne studien var poly((2-dimetylamino)etylmetakrylat) (PDMAEMA), og polyplexene ble lagret i 10 måneder både i vandig løsning og frysetørket tilstand [61]. Det ble da funnet at polyplexene beholdt nesten den samme transfeksjonseffektiviteten etter lagring ved 4 °C og 20 °C i 10 måneder i vandig løsning, mens polyplexer lagret ved 40 °C mistet sin transfeksjonseffektivitet med en halveringstid rundt 2 måneder. Også i mine forsøk ble det funnet god transfeksjonseffektivitet ved normal temperatur og redusert transfeksjonseffektivitet ved høy temperatur for SC 214- og SC 312-baserte polyplexer. I studien med PDMAEMA ble det videre funnet at endringene i transfeksjonseffektivitet for PDMAEMA-baserte polyplexer skyldtes strukturelle endringer i DNA under lagring [61]. Også i min studie kan endringene i transfeksjonseffektiviteten forklares med endringer i DNA.

Ettersom stabiliteten av polyplexer ved lagring har vært lite undersøkt, kan det være naturlig å sammenligne med stabilitetsstudier for andre non-virale vektorer, som liposomer. En lengre lagringsstudie har vært gjort på kationiske liposomer med det kationiske lipidet N-[3-[2-(1,3-dioleoyloxy)propoxy-karbonyl]propyl]-N,N,N-trimetylammoniumjodid (YKS 220) som har en esterbinding. Det ble da funnet at det ikke var noen signifikant endring i transfeksjonseffektivitet eller størrelse etter et års lagring ved 4 °C [80]. Min studie viser at dette også gjelder for minst 5 måneders lagring av kitosanbaserte polyplexer med relativt høymolekylære kitosantyper.

Komplekseringsgraden for lagret kitosan var god for alle kitosantyper i hele lagringsperioden på 19 uker, bortsett fra for kitosan SC 113 lagret i 19 uker ved 45 °C. Som vist ved viskositetsmålingene vil kitosan brytes ned under lagring, slik at polymerkjedene blir kortere. Imidlertid ser det ut til at disse kortere polymerkjedene også viser god evne til å kompleksere DNA. Grunnen til at kitosan SC 113 ved lagring i 19 uker ved høy temperatur har en såpass redusert evne til kompleksing av DNA kan være at det muligens finnes en grense for hvor liten polymeren kan være for å kompleksere DNA. SC 113 er den kitosantypen som i utgangspunktet har lavest molekylvekt, og det er derfor sannsynlig at lengden på denne polymerkjeden blir kortest av alle når den over tid brytes ned.

Komplekseringsgraden kan påvirke transfeksjonseffektiviteten til polyplexet. Når DNA blir godt kompleksert blir det bedre beskyttet mot degradering av DNaser som finnes blant annet i blod [40]. Dermed vil det bli større opptak av DNA i cellene, og økt transfeksjon. Imidlertid er det nødvendig at DNA slippes fri fra komplekset når det er fraktet inn i cellekjernen for at DNA skal kunne transkriberes [62]. En for sterk interaksjon mellom DNA og kitosan kan føre til liten frigjøring av DNA i cellekjernen og dermed redusert transfeksjon og mindre uttrykk av proteinet.

6.2.2 Størrelse

Det ble målt størrelse av polyplexene for å finne ut om denne endret seg med tiden og om endringene var større ved høyere temperatur slik som for transfeksjonseffektiviteten. Det viste seg at alle polyplexene generelt hadde små endringer i størrelse ved lagring i 22 uker ved 4 °C og 25 °C. Når polyplexene ble lagret ved 45 °C derimot var det store endringer i størrelse, først ble størrelsen redusert, deretter økte den sterkt. Kitosanløsningene som ble lagret og kompleksert med fersk DNA like før størrelsesmålingene viste de samme tendensene. DNA-løsningene som ble kompleksert med fersk kitosan like før størrelsesmålingene hadde små endringer i størrelse for løsningene lagret ved alle tre temperaturene. Dette kan tyde på at endringene i kitosan som skjer ved lagring har mer å si for størrelsen av polyplexene enn endringene av DNA ved lagring.

For å finne ut om kitosan ble brutt ned under lagring, ble det gjort viskositetsmålinger av lagrede kitosanløsninger. Det ble vist at for alle kitosantypene ble viskositeten redusert over tid og med høyere temperatur. Når viskositeten av kitosanløsningene reduseres kan dette skyldes at polymeren brytes ned i kortere kjeder. Jo kortere polymerkjedene er, jo mindre interaksjoner er det mellom polymerkjedene og løsningsmiddelet, og jo lavere blir viskositeten. Dessuten kan stive konformasjoner av polymeren bli brutt, slik at polymeren lettere kan flyte rundt i løsningsmiddelet. Dermed sier viskositeten noe om nedbrytningen av kitosan. Siden viskositeten blir lavere med høyere temperatur, blir kitosan mer brutt ned jo høyere temperaturen er.

Nedbrytning av kitosan kan skyldes flere ulike prosesser. Kitosan kan brytes ned kjemisk eller enzymatisk. Når det gjelder kjemisk nedbrytning av kitosan er det vanligst at det skjer en sur hydrolyse. Da vil protoner angripe oksygenet i glykosidbindingene i polymeren. Det har blitt funnet i en studie at de glykosidbindingene som er mest utsatt for et slikt angrep, er de som følger etter en acetylering i polymeren [81]. Dette angrepet på glykosidbindingene vil føre til brudd i polymerkjeden. Det ble funnet at hastigheten av degradering av ulike kitosantyper økte med økende grad av acetylering [81]. Resultatene mine stemmer imidlertid ikke med dette. Løsningene av kitosan SC 214 og SC 312 hadde lik konsentrasjon og kan derfor sammenlignes med hensyn til viskositeten. Disse løsningene hadde lik reduksjon i viskositet, selv om kitosantypene hadde ulik acetyleringsgrad og pH i løsningen var lik.

Den enzymatiske nedbrytningen av kitosan kan skje ved hjelp av kitinaser, kitosanaser og lysozym. Denne nedbrytningen skjer ved at enzymet binder seg til polymeren på bestemte steder og splitter polymerkjeden. Avhengig av hvilket enzym som sørger for nedbrytningen, er spesifisiteten når det gjelder rekkefølgen av acetylerede og deacetylerede enheter ulik [81]. Det har blitt gjort en studie på et kommersielt tilgjengelig enzympreparat som inneholdt en kitinase. For denne kitinase økte degraderingen av kitosan med synkende molekylvekt og økende acetyleringsgrad [83]. Imidlertid har ulike kitinaser ulik spesifisitet for de ulike glykosidbindingene. For eksempel vil en kitinase fra *Bacillus* i størst grad bryte bindingene mellom deacetylerede monomerer [81]. Når det gjelder lysozym er det vist at økende acetyleringsgrad gir økende degradering [57]. Dette gjelder også ved degradering av kitosan i serum, som inneholder lysozym [58]. I min studie ble det ikke tilsatt noen enzymer til løsningene, men ettersom kitosan er en biopolymer kan det ikke utelukkes at løsningene kunne inneholde små mengder av disse enzymene.

Under lagring ved høy temperatur (45 °C) skjedde det endringer i størrelsen av polyplexene. Da ble størrelsen først redusert noe, og så økte den sterkt. Størrelsesendringene skjedde antagelig på grunn av endrede elektrostatiske krefter mellom de to komponentene i komplekset, kitosan og DNA. Kitosan har positive ladninger på aminogruppene når disse er protonert. Det er ulike mengder aminogrupper som kan protoneres i forskjellige kitosantyper på grunn av ulik grad av acetylering av aminogruppene. I hvor stor grad disse aminogruppene er protonert, avhenger av pH i løsningen. I den løsningen som er brukt i denne oppgaven var pH 5,5. Ved denne pH-verdien er ca. 90 % av aminogruppene i polymeren protonert [42]. DNA-molekylene bærer negativ ladning på fosfatgruppene i ryggraden av nukleotidkjeden. Det er interaksjonene mellom de positive ladningene på kitosan og de negative ladningene på DNA som holder komplekset sammen. Ved nedbrytning av kitosan og DNA kan det skje endringer i molekylene slik at ladninger kan bli nøytralisert. Den reduserte ladningstettheten som følger av dette kan føre til at interaksjonen mellom negativt ladet DNA og positivt ladet kitosan blir svakere. Dermed blir polyplexet mindre tettpakket og størrelsen øker. Dessuten kan endrede ladningsforhold føre til at kompleksene totalt sett får tilnærmet ingen ladning. Mangel på ladning fører til fravær av frastøtning mellom polyplexene slik at de lett kan aggregere. Dette kan føre til stor økning i størrelse, slik som sett ved høy temperatur og lang lagringstid av polyplexene. Det er logisk at denne aggregeringen skjer ved høy temperatur, ettersom høy temperatur gir mer energi slik at prosesser som kan skje i løsningen vil skje fortere og i større grad.

Dette viste seg å være i overensstemmelse med studien av PDMAEMA-baserte polyplexer [61]. De polyplexene vokste også i størrelse når de ble lagret ved høy temperatur, mens polyplexer av lagret DNA og fersk PDMAEMA hadde lik størrelse uavhengig av lagringstiden av DNA.

Når det gjelder størrelsesendringer av kitosanbaserte polyplexer har det vært antatt at på grunn av den høye overflatespenningen i polyplexene, har de lett for å aggregere i løsning og ved frysetørring [60]. I en studie hvor kitosanbaserte polyplexer ble konjugert til PEG har det blitt vist at denne konjugeringen hindret aggregering i løsning og kakedannelse ved frysetørring [42]. I mine forsøk skjedde imidlertid aggregering av polyplexene i løsning kun ved høye temperaturer.

Andre non-virale vektorer for levering av gener som har vært studert med hensyn på lagring, er kationiske liposom- eller lipid-baserte formuleringer med DNA, såkalte lipoplexer. Disse har ofte en tendens til å danne store aggregater ved lagring [82]. Det har derfor vært gjort studier der DNA/lipid komplekser har vært tilsatt stoffer for å hindre aggregering. DC-Chol (3 β [N-(N',N' dimetyl aminoetan)karbamoyl]kolesterol) ble blandet med Tween 80 alene eller sammen med flere lipid-komponenter som "castor oil" og forfatidylcholin (PC) eller dioleoylfosfatidyletanolamin (DOPE) for å lage ulike formuleringer. Det ble da vist at DC-Chol/DOPE liposomer aggregerte raskt, etter kun en dags lagring, mens de andre formuleringene beholdt sin opprinnelige størrelse under hele lagringsperioden på 10 dager [82].

Størrelsen av kitosanbaserte polyplexer kan påvirkes av endringer i pH [46-47]. Økt pH vil medføre mindre positiv ladning på kitosan, noe som kan gi polyplexet en total ladning som nærmer seg nøytral. Da vil den elektrostatiske frastøtningen mellom polyplexer være liten og det kan gi økt sjanse for aggregering. Derfor ble pH-verdiene i polyplex-løsningene målt i lagringsperioden. Det viste seg da at pH var tilnærmet lik i hele lagringsperioden og dette gir grunn til å tro at størrelsesendringene ikke skyldes effekten av pH-endringer.

Det kan tenkes at den størrelsen som ble målt kunne vært størrelsen til aggregater av kitosan istedenfor størrelsen av polyplexene, ettersom kitosanløsningene ikke ble filtrert. Imidlertid ble det gjort en analyse av filtertapet etter oppløsning av kitosan over natt (resultatene av dette forsøket er ikke tatt med i oppgaven). Dette forsøket viste at filtertapet var så lite at ved oppløsning av kitosan over natt var det ikke nødvendig med filtrering av kitosanløsningen. Derfor ble kitosanløsningene til bruk i lagringsstudien ikke filtrert og det er sannsynlig at de målte størrelsene gjaldt polyplexene.

7 Konklusjon

Formuleringer av DNA med kitosan SC 214 og SC 312 var stabile med hensyn på transfeksjonseffektivitet og størrelse i 22 uker når lagringen skjedde ved temperaturer på 4 °C og 25 °C. Formuleringene med kitosan SC 113 og SC 211 var også stabile med hensyn på størrelse, men transfeksjonseffektivitet ble redusert under lagring ved temperaturer på 4 °C og 25 °C. For alle formuleringene førte lagring ved høy temperatur (45 °C) til at transfeksjonseffektiviteten ble redusert og størrelsen av polyplexene var ustabil. Det er sannsynlig at endringene i transfeksjonseffektivitet ved høy temperatur skyldes nedbrytning av DNA, mens størrelsesendringene ved høy temperatur så ut til å være avhengig av nedbrytning av kitosan. Slik nedbrytning av DNA og kitosan vil skje raskere ved høy temperatur. Imidlertid hadde kitosan god evne til å kapsle inn DNA selv etter lang tids lagring av kitosan.

Forsøkene som er utført i denne oppgaven viser at kitosanbaserte polyplexer basert på relativt høymolekylære kitosantyper er stabile under lagring i over 5 måneder ved temperaturer opp til romtemperatur. Kitosan er derfor velegnet som vektor for DNA i formuleringer.

8 Referanseliste

- [1] A.L. Lehninger, D.L. Nelson og M.M. Cox, Nucleotides and nucleic acids, i Principles of biochemistry, A.L. Lehninger, D.L. Nelson og M.M. Cox (red), Worth Publishers, Inc., New York (1998), 324-357.
- [2] A.L. Lehninger, D.L. Nelson og M.M. Cox, Genes and chromosomes, i Principles of biochemistry, A.L. Lehninger, D.L. Nelson og M.M. Cox (red), Worth Publishers, Inc., New York (1998), 789-813.
- [3] A.L. Lehninger, D.L. Nelson og M.M. Cox, DNA metabolism, i Principles in biochemistry, A.L. Lehninger, D.L. Nelson og M.M. Cox (red), Worth Publishers, Inc., New York (1998), 814-855.
- [4] A.L. Lehninger, D.L. Nelson og M.M. Cox, RNA metabolism, i Principles of biochemistry, A.L. Lehninger, D.L. Nelson og M.M. Cox (red), Worth Publishers, Inc., New York (1998), 856-891.
- [5] A.L. Lehninger, D.L. Nelson og M.M. Cox, Regulation of gene expression, i Principles in biochemistry, A.L. Lehninger, D.L. Nelson og M.M. Cox (red), Worth Publishers, Inc, New York (1998), 941-983.
- [6] A.L. Lehninger, D.L. Nelson og M.M. Cox, Protein metabolism, i Principles of biochemistry, A.L. Lehninger, D.L. Nelson og M.M. Cox (red), Worth Publishers, Inc., New York (1998), 892-940.
- [7] A.L. Lehninger, D.L. Nelson og M.M. Cox, Recombinant DNA technology, i Principles of biochemistry, A.L. Lehninger, D.L. Nelson og M.M. Cox (red), Worth Publishers, Inc., New York (1998), 984-1013.
- [8] D.D. Lasic, Gene Expression, i Liposomes in gene delivery, D.D. Lasic (red), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida (1997), 45-51.
- [9] D.D. Lasic, Gene Therapy, i Liposomes in gene delivery, D.D. Lasic (red), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida (1997), 3-13.
- [10] F.D. Ledley, Pharmaceutical approach to somatic gene therapy. *Pharmaceutical Research* 13(11) (1996), 1595-1614.
- [11] R.G. Webster, H.L. Robinson, DNA vaccines: A review of developments. *Biodrugs* 8(4) (1997), 273-292.
- [12] G. Gregoriadis, Genetic vaccines: Strategies for optimization. *Pharmaceutical Research* 15(5) (1998), 661-670.
- [13] L. Van Drunen, V. Gerdt, B.I. Loehr, R. Pontarello, R. Rankin, R. Uwiera, L.A. Babiuk, Recent advances in the use of DNA vaccines for the treatment of diseases of farmed animals. *Advanced Drug Delivery Reviews* 43(1) (2000), 13-28.
- [14] B.R. Krishnan, Current status of DNA vaccines in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 43(1) (2000), 3-11.
- [15] J. Heppell, H.L. Davis, Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Advanced Drug Delivery Reviews* 43(1) (2000), 29-43.
- [16] D.D. Lasic, Gene delivery, i Liposomes in gene delivery, D.D. Lasic (red), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida (1997), 53-66.
- [17] L. Huang og E. Viroonchatapan, Introduction, i Nonviral vectors for gene therapy, L. Huang, M.C. Hung, og E. Wagner (red), Academic Press, San Diego, California (1999), 3-22.

- [18] J. Smith, Y. Zhang, R. Niven, Toward development of a non-viral gene therapeutic. *Advanced Drug Delivery Reviews* 26(2-3) (1997), 135-150.
- [19] E. Tomlinson, A.P. Rolland, Controllable gene therapy pharmaceuticals of non-viral gene delivery systems. *Journal of Controlled Release* 39 (1996), 357-372.
- [20] S.C. De Smedt, J. Demeester, W.E. Hennink, Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharmaceutical Research* 17(2) (2000), 113-126.
- [21] C.W. Pouton, P. Lucas, B.J. Thomas, A.N. Uduehi, D.A. Milroy, S.H. Moss, Polycation-DNA complexes for gene delivery: A comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *Journal of Controlled Release* 53(1-3) (1998), 289-299.
- [22] C.L. Gebhart, A.V. Kabanov, Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *Journal of Controlled Release* 73(2-3) (2001), 401-416.
- [23] K.W. Leong, Biopolymer-DNA Nanospheres, i *Nonviral vectors in gene therapy*, L. Huang, M.C. Hung og E. Wagner (red), Academic Press, San Diego, California (1999), 267-287.
- [24] J. Akbuga, A biopolymer: Chitosan. *International Journal of Pharmaceutical Advances* 1(1) (1995), 3-18.
- [25] G.A.F. Roberts, Structure of chitin and chitosan, i *Chitin Chemistry*, G.A.F. Roberts (red), Macmillan Press Ltd, London (1992), 1-53.
- [26] N.K. Mathur, C.K. Narang, Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education* 67(11) (1990), 938-942.
- [27] M.W. Anthonsen, K.M. Vårum, O. Smidsrød, Solution properties of chitosans: Conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Polymers* 22(3) (1993), 193-201.
- [28] Ø. Skaugrud, Chitosan makes the grade. *Manufacturing Chemist* October (1989), 31-35.
- [29] M.G. Peter, Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *Journal of Macromolecular Science, Pure and Applied Chemistry* A32(4) (1995), 629-640.
- [30] M.W. Anthonsen, O. Smidsrød, Hydrogen ion titration of chitosans with varying degrees of N-acetylation by monitoring induced ¹H-NMR chemical shifts. *Carbohydrate Polymers* 26 (1995), 303-305.
- [31] G.A.F. Roberts, Chemical behaviour of chitin and chitosan, i *Chitin Chemistry*, G.A.F. Roberts (red), Macmillan Press Ltd, London (1992), 203-273.
- [32] G.A.F. Roberts, Solubility and solution behaviour of chiton and chitosan, i *Chitin chemistry*, G.A.F. Roberts (red), Macmillan Press Ltd, London (1992), 274-329.
- [33] T. Sannan, K. Kurita, Y. Iwakura, Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility. *Makromol. Chem.* 177(12) (1976), 3589-3600.
- [34] I. Henriksen, K.L. Green, J.D. Smart, G. Smistad, J. Karlsen, Bioadhesion of hydrated chitosans: An in vitro and in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics* 145(1-2) (1996), 231-240.
- [35] T.J. Aspden, J. Adler, S.S. Davis, O. Skaugrud, L. Illum, Chitosan as a nasal delivery system: Evaluation of the effect of chitosan on mucociliary clearance rate in the frog palate model. *International Journal of Pharmaceutics* 122(1-2) (1995), 69-78.
- [36] T.J. Aspden, L. Illum, O. Skaugrud, Chitosan as a nasal delivery system: Evaluation of insulin absorption enhancement and effect on nasal membrane integrity using rat models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 4(1) (1996), 23-31.

- [37] L. Illum, I. Jabbal-Gill, M. Hinchcliffe, A.N. Fisher, S.S. Davis, Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 51 (2001), 81-96.
- [38] P. Erbacher, S. Zou, T. Bettinger, A.-M. Steffan, J.-S. Remy, Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: Biophysical characteristics and transfection ability. *Pharmaceutical Research* 15(9) (1998), 1332-1339.
- [39] F.C. MacLaughlin, R.J. Mumper, J.J. Wang, J.M. Tagliaferri, I. Gill, M. Hinchcliffe, A.P. Rolland, Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of Controlled Release* 56(1-3) (1998), 259-272.
- [40] S.C.W. Richardson, H.V.J. Kolbe, R. Duncan, Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *International Journal of Pharmaceutics* 178(2) (1999), 231-243.
- [41] T. Sato, T. Ishii, Y. Okahata, In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials* 22(15) (2001), 2075-2080.
- [42] H.-Q. Mao, K. Roy, V.L. Troung-Le, K.A. Janes, K.Y. Lin, Y. Wang, J.T. August, K.W. Leong, Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: Synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release* 70(3) (2001), 399-421.
- [43] P.L. Felgner, Y. Barenholz, J.P. Behr, S.H. Cheng, P. Cullis, L. Huang, J.A. Jessee, L. Seymour, F. Szoka, A.R. Thierry, E. Wagner, G. Wu, Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Human Gene Therapy* 8(5) (1997), 511-512.
- [44] R.J. Mumper, J. Wang, J.M. Claspell, A.P. Rolland, Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. *Proceedings of the International Symposium on the Controlled Release of Bioactive Materials* 22 (1995), 178-179.
- [45] T. Ishii, Y. Okahata, T. Sato, Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1514(1) (2001), 51-64.
- [46] K. Romøren, S. Pedersen, G. Smistad, Ø. Evensen, B.J. Thu, The influence of formulation variables on *in vitro* transfection efficiency and physicochemical properties of chitosan-based polyplexes. *International Journal of Pharmaceutics* Submitted 10/2002
- [47] S. Pedersen, Ulike faktorerers innvirkning på kitosan-DNA-partiklers egenskaper - en multivariat evaluering, Hovedfagsoppgave, UiO, (2001), 1-83.
- [48] M. Lee, J.-W. Nah, Y. Kwon, J.J. Koh, K.S. Ko, S.W. Kim, Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. *Pharmaceutical Research* 18(4) (2001), 427-431.
- [49] Z. Cui, R.J. Mumper, Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. *Journal of Controlled Release* 75(3) (2001), 409-419.
- [50] M. Koping-Hoggard, I. Tubulekas, H. Guan, K. Edwards, M. Nilsson, K.M. Vårum, P. Artursson, Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine *in vitro* and after lung administration *in vivo*. *Gene Therapy* 8 (2001), 1108-1121.
- [51] K. Roy, H.Q. Mao, S.K. Huang, K.W. Leong, Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nature Medicine* 5(4) (1999), 387-391.
- [52] A.T. Florence og D. Attwood, *Drug Stability, i Physicochemical principles of pharmacy*, A.T. Florence og D. Attwood (red), Macmillan Press LTD, London (1998), 101-151.
- [53] C.R. Middaugh, R.K. Evans, D.L. Montgomery, D.R. Casimiro, Analysis of plasmid DNA from a pharmaceutical perspective. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 87(2) (1998), 130-146.

- [54] T. Suzuki, S. Ohsumi, K. Makino, Mechanistic studies on depurination and apurinic site chain breakage in oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Research* 22(23) (1994), 4997-5003.
- [55] R.K. Evans, Z. Xu, K.E. Bohannon, B. Wang, M.W. Bruner, D.B. Volkin, Evaluation of degradation pathways for plasmid DNA in pharmaceutical formulations via accelerated stability studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89(1) (2000), 76-87.
- [56] S.I. Aiba, Studies on chitosan: 6. Relationship between N-acetyl group distribution pattern and chitinase digestibility of partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules* 15(4) (1993), 241-245.
- [57] K. Tomihata, Y. Ikada, In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* 18(7) (1997), 567-575.
- [58] K.M. Vårum, M.M. Myhr, R.J. Hjerde, O. Smidsrød, In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydrate Research* 299(1-2) (1997), 99-101.
- [59] K.W. Leong, H.-Q. Mao, V.L. Truong-Le, K. Roy, S.M. Walsh, J.T. August, DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *Journal of Controlled Release* 53(1-3) (1998), 183-193.
- [60] H.-Q. Mao, K. Roy, V. Truong-Le, K.W. Leong, DNA-chitosan nanospheres: Derivatization and storage stability. *Proceedings of the International Symposium on the Controlled Release of Bioactive Materials* 24 (1997), 671-672.
- [61] J.Y. Cherng, H. Talsma, D.J. Crommelin, W.E. Hennink, Long term stability of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-based gene delivery systems. *Pharmaceutical Research* 16(9) (1999), 1417-1423.
- [62] G. Borchard, Chitosans for gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 52 (2001), 145-150.
- [63] Technical bulletin, Luciferase assay system. (TB281) (2002).
- [64] Instruction manual, Bio-Rad protein assay. (Bulletin #9004) (1999).
- [65] R. Xu, Multiangle photon correlation spectroscopy in particle characterization, i *Particle surface characterization methods*, R.H. Müller og W. Mehnert (red), Medpharm GmbH Scientific Publishers, (1997), 1-17.
- [66] Appendix 8: Commonly used techniques in molecular cloning, i *Molecular Cloning - a laboratory manual*, J. Cambrook og D.W. Russel (red), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (2001),
- [67] M.E. Ferrari, C.M. Nguyen, O. Zelphati, Y. Tsai, P.L. Felgner, Analytical methods for the characterization of cationic lipid-nucleic acid complexes. *Human Gene Therapy* 9(3) (1998), 341-351.
- [68] V.L. Singer, L.J. Jones, S.T. Yue, R.P. Haugland, Characterization of picogreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Analytical Biochemistry* 249 (1997), 228-238.
- [69] S.P. Barman, L. Lunsford, P. Chambers, M.L. Hedley, Two methods for quantifying DNA extracted from poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release* 69(3) (2000), 337-344.
- [70] S. Katayose, K. Kataoka, Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer. *Bioconjugate Chemistry* 8(5) (1997), 702-707.
- [71] A.T. Florence og D. Attwood, Polymers and macromolecules, i *Physicochemical principles of pharmacy*, A.T. Florence og D. Attwood (red), Macmillan Press LTD, London (1998), 308-371.
- [72] Schott Geräte Operating intructions. Viscosity measuring unit AVS 310, (1997).

- [73] K. Romøren, B.J. Thu, Ø. Evensen, Immersion delivery of plasmid DNA II. A study of the potentials of a chitosan based delivery system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Journal of Controlled Release* 85(1-3) (2002), 215-225.
- [74] N. Fijan, D. Sulimanovic, M. Bearzotti, P. de Kinkelin, L.O. Zwillenberg, S. Chilmoczyk, J.F. Vautherot, Some properties of the *epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Annales de l'Institut Pasteur, Virologie* 134 E (1983), 207-220.
- [75] A.T. Florence og D. Attwood, Emulsions, suspensions and other dispersions, i *Physiochemical principles of pharmacy*, A.T. Florence og D. Attwood (red), Macmillan Press LTD, London (1998), 252-307.
- [76] H.K. No, N.Y. Park, S.H. Lee, S.P. Meyers, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology* 74(1-2) (2002), 65-72.
- [77] M. Jumaa, F.H. Furkert, B.W. Muller, A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. *European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics* 53(1) (2002), 115-123.
- [78] T. Hao, U. McKeever, M.L. Hedley, Biological potency of microsphere encapsulated plasmid DNA. *Journal of Controlled Release* 69(2) (2000), 249-259.
- [79] B.A. Lobo, S.A. Rogers, S. Choosakoonkriang, J.G. Smith, G. Koe, C.R. Middaugh, Differential scanning calorimetric studies of the thermal stability of plasmid DNA complexed with cationic lipids and polymers. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91(2) (2002), 454-466.
- [80] S. Obika, W. Yu, A. Shimoyama, T. Uneda, T. Minami, K. Miyashita, T. Doi, T. Imanishi, Properties of cationic liposomes composed of cationic lipid YKS-220 having an ester linkage: adequate stability, high transfection efficiency, and low cytotoxicity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 22(2) (1999), 187-190.
- [81] K.M. Vårum og O. Smidsrød, Specificity in enzymatic and chemical degradation of chitosans, i *Advances in chitin and chitosan, Volume II*, A. Domard, G.A.F. Roberts, og K.M. Vårum (red), Jacques Andre Publisher, Lyon (1998), 168-175.
- [82] F. Liu, J. Yang, L. Huang, D. Liu, New cationic lipid formulations for gene transfer. *Pharmaceutical Research* 13(12) (1996), 1856-1860.
- [83] H. Zhang, S.H. Neau, In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* 22(12) (2001), 1653-1658