

Der Gesamtüberblick

[https://www.cell.com/cell-biomaterials/fulltext/S3050-5623\(25\)00302-2?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS3050562325003022%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-biomaterials/fulltext/S3050-5623(25)00302-2?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS3050562325003022%3Fshowall%3Dtrue) 10/26

Atemwegsviren wie Coronaviren, Influenza und das Respiratorische Synzytial-Virus (RSV) stellen weiterhin eine Herausforderung für die globale Gesundheit dar und unterstreichen den Bedarf an Impfstoffen, die direkt in den Atemwegen eine Schleimhautimmunität auslösen können. Die pulmonale mRNA-Impfung bietet dieses Potenzial, doch ihre Entwicklung wurde bisher durch die Schwierigkeit eingeschränkt, mRNA durch den Schleim der Atemwege zu transportieren und eine effiziente Transfektion in antigenpräsentierenden Zellen der Lunge mittels einer klinisch relevanten Aerosolverabreichung zu ermöglichen.

In dieser Studie stellen wir ein hybrides polymeres Verabreichungssystem vor, das die komplementären Eigenschaften von Poly(milchsäure-co-glykolsäure) (PLGA) und Poly(β -aminoestern) (PBAEs) nutzt, um diese Herausforderungen zu bewältigen. Die Hybrid-Nanopartikel sind so konzipiert, dass sie durch eine koordinierte Abfolge aus mRNA-Schutz, intrazellulärem Transport und zeitgerechter Freisetzung ins Zytosol wirken; sie ermöglichen eine effiziente mRNA-Transfektion in Antigen-präsentierenden Zellen und unterstützen eine produktive Immunaktivierung. Wichtig ist, dass die Hybrid-Nanopartikel den Schleim der Atemwege durchdringen können, in physiologisch relevanten menschlichen Lungenmodellen funktionieren und den mechanischen Belastungen der Vernebelung mittels vibrierendem Netz standhalten – Eigenschaften, die für die Umsetzung der pulmonalen mRNA-Verabreichung in die praktische Anwendung unerlässlich sind. Solche Hybridsysteme könnten dazu beitragen, die Entwicklung inhalierbarer Impfstoffe der nächsten Generation zu beschleunigen und den therapeutischen Anwendungsbereich von mRNA-Technologien zu erweitern.

Highlights

- PLGA/PBAE koordiniert die Entkopplung aus dem Endosom und die zeitgerechte Freisetzung von mRNA in APCs
- PLGA/PBAE verbessert die mRNA-Transfektion in APCs und fördert die Immunaktivierung
- PLGA/PBAE ermöglicht das Eindringen in den Schleim und eine effektive mRNA-Transfektion in Atemwegsmodellen
- PLGA/PBAE behält die Transfektionseffizienz nach der Vernebelung bei

Zusammenfassung

Eine wirksame pulmonale mRNA-Impfung erfordert Verabreichungssysteme, die in der Lage sind, die Atemwegsbarriere zu überwinden und pulmonale Antigen-präsentierende Zellen effizient zu transfizieren. Hier haben wir ein hybrides Polymersystem entwickelt, das Poly(milchsäure-co-glykolsäure) (PLGA) und Poly(β -Aminoester) (PBAEs) enthält, um die pulmonale mRNA-Verabreichung zu verbessern. Die Komponenten wirkten über eine räumlich-zeitlich koordinierte Kaskade: Die frühe PLGA-Hydrolyse säuerte die Endosomen an, was die Protonierung der PBAEs verstärkte und die mRNA-Kondensation zum Schutz

verdichtete; eine erhöhte Pufferkapazität, angetrieben durch die beschleunigte Protonierung, verstärkte die durch Protonenschwämme vermittelte Flucht; und geschwächte elektrostatische Wechselwirkungen im Zytosol ermöglichten eine schnelle mRNA-Freisetzung und -Translation in dendritischen Zellen, was die Immunaktivierung unterstützte. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit, den Austritt aus den Endosomen mit einer rechtzeitigen mRNA-Freisetzung für eine funktionelle Expression in Einklang zu bringen. Das System überwand zudem die Schleimbarriere und ermöglichte die mRNA-Transfektion in *ex vivo* gewonnenen menschlichen Lungengewebebeurproben. Nach der Vernebelung mittels Vibrationsnetz behielt es im Vergleich zu Lipidnanopartikeln eine überlegene Wirksamkeit bei. Diese Ergebnisse sprechen für das PLGA/PBAE-System als praktikable Plattform für die pulmonale Verabreichung von mRNA-Impfstoffen.

Einleitung

Auf Messenger-RNA (mRNA) basierende Impfstoffe haben im Kampf gegen die COVID-19-Pandemie eine rasche Entwicklung und hohe Wirksamkeit gezeigt und sich als führende Strategie zur Bekämpfung künftiger Virusausbrüche etabliert.^{1,2} Ihre Designflexibilität ermöglicht eine schnelle Anpassung an neu auftretende Varianten oder neuartige Erreger durch Aktualisierungen der kodierten Antigensequenzen. Viele Viren, darunter auch SARS-CoV-2, infizieren Wirte jedoch in erster Linie über die Atemwege.³ Es wurde berichtet, dass herkömmliche mRNA-Impfstoffe, die über eine intramuskuläre Injektion – also einen nicht-respiratorischen Weg – verabreicht werden, im Vergleich zu einer natürlichen Infektion eine suboptimale Schleimhautimmunität hervorrufen, was die Virusclearance an der ursprünglichen Eintrittsstelle potenziell einschränkt und die Betroffenen anfällig für eine akute Infektion macht.^{4,5,6,7} In diesem Zusammenhang sind pulmonale mRNA-Impfstoffe vielversprechend, da sie sowohl starke mukosale als auch systemische Immunantworten auslösen können und so einen direkten Schutz in den Atemwegen bieten.^{8,9}

Um dieses Ziel zu erreichen, ist ein optimierter Träger erforderlich, da einzelsträngige mRNA nicht nur hoch anfällig für den Abbau durch RNasen ist und durch geeignete Träger geschützt werden muss,¹⁰ sondern auch physiologische Barrieren bei der pulmonalen Verabreichung, wie Schleim und Tight Junctions zwischen den Epithelzellen der Atemwege, überwunden werden müssen, bevor eine Transfektion stattfinden kann.^{11,12} Obwohl Lipid-Nanopartikel (LNPs) bei intramuskulären mRNA-Impfstoffen (Comirnaty, Spikevax und mRESVIA) bahnbrechend waren, ist ihre Wirksamkeit bei der lokalen pulmonalen Verabreichung oft eingeschränkt.¹ Lipidbasierte Träger stoßen aufgrund starker Wechselwirkungen mit den periodisch auftretenden hydrophoben Domänen des Atemwegsschleims auf erhebliche Schwierigkeiten, diesen zu durchdringen^{13,14,15} und können Entzündungsreaktionen in den Atemwegen auslösen,¹⁶ wodurch ihre Wirksamkeit bei der pulmonalen Verabreichung eingeschränkt wird. Eine Erhöhung der PEG-Lipid-Dichte kann die Schleimdurchlässigkeit verbessern und Entzündungen abschwächen, geht jedoch in der Regel zu Lasten der Transfektionseffizienz.^{14,15} Parallel dazu wird zunehmend über Anti-PEG-Antikörper berichtet, insbesondere bei Personen, die wiederholte mRNA-LNP-Impfungen erhalten haben, was Bedenken hinsichtlich der langfristigen Durchführbarkeit von PEGylierten Systemen aufkommen lässt.^{17,18} Um diesen Herausforderungen zu begegnen, haben sich Poly(β -aminoester) (PBAEs) als vielversprechende Alternative für einen effektiven mRNA-Transport herausgestellt. Dank biologisch abbaubarer Esterbindungen sowie anpassbarer Grundgerüste und Monomere gewährleisteten PBAEs eine sowohl sichere als auch effiziente Transfektion auf einfache, PEG-freie Weise.¹⁹ Insbesondere haben frühere Studien von Patel et al. und Rotolo et al. gezeigt, dass PBAEs nach lokaler Inhalation eine effiziente mRNA-Transfektion in der Lunge ermöglichen, was ihre Eignung für pulmonale Anwendungen unterstreicht.^{19,20} In

Übereinstimmung mit diesen Berichten haben unsere hier verwendeten, intern synthetisierten PBAEs bereits zuvor einen effizienten pulmonalen Transport von small interfering RNA (siRNA) erreicht,²¹ was ihre Fähigkeit untermauert, die nach der Verabreichung auftretenden Atemwegsbarrieren zu überwinden.

Bei mRNA-Impfstoffen ist die Transfektion von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), insbesondere von dendritischen Zellen (DCs), entscheidend für die Immunaktivierung, da diese eine Schlüsselrolle beim Einfangen, Verarbeiten und Präsentieren von Antigenen spielen, um T-Zellen für effiziente adaptive Immunantworten zu aktivieren.^{2,22} Allerdings lassen sich APCs von Natur aus schwieriger transfizieren als Nicht-APCs, da sie einer härteren endosomalen/lysosomalen Verarbeitung unterliegen, die die internalisierte Fracht rasch abbaut, noch bevor eine Translation stattfinden kann.^{23,24} Im Einklang damit beobachteten wir bei der Verwendung unserer selbst synthetisierten PBAE-Polymere eine deutlich geringere Transfektionsleistung in APCs als in Nicht-APCs. Dies stellt hohe Anforderungen an das chemische Design von PBAEs zur Verbesserung der Transfektion in APCs, und die Synthese sowie die anschließenden Screening-Arbeiten werden recht kompliziert, wenn man sich durch die umfangreiche Bibliothek potenzieller Grundgerüste und Monomere bewegt.^{25,26} Um dieser Herausforderung zu begegnen, stellten wir fest, dass die einfache Einbindung von Poly(milchsäure-co-glykolsäure) (PLGA), einem weit verbreiteten biologisch abbaubaren Polymer in von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen Arzneimitteln,²⁷ in unsere Formulierungen die mRNA-Zufuhr zu APCs deutlich verbesserte. Obwohl frühere Studien gezeigt haben, dass die Integration von PLGA mit protonierbaren Polymeren wie Polyethylenimin (PEI)²⁸ und Poly-L-Lysin (PLL)²⁹ den Nukleinsäuretransport verbessern kann, blieben die zugrunde liegenden Mechanismen bislang unklar. Hier liefern wir unseres Wissens nach den ersten integrierten „ „ und ein visuelles mechanistisches Rahmenwerk, das zeigt, wie PLGA den Schutz der mRNA, die Flucht aus dem Endosom und die kontrollierte Freisetzung ins Zytosol in APCs koordiniert und dadurch Hindernisse überwindet, die die Leistungsfähigkeit von PBAE einschränken.

Ziel dieser Studie war es, ein optimales Trägersystem für eine effiziente mRNA-Transfektion und die Aktivierung von Immunzellen nach pulmonaler Verabreichung zu entwickeln. Zu diesem Zweck haben wir ein hybrides PLGA/PBAE-System entwickelt. Mechanistisch gesehen fördert die PLGA-Hydrolyse während der frühen Endozytose eine stärkere mRNA-Kondensation und schützt so die Fracht vor endosomalen Nukleasen. Parallel dazu erhöht die Bildung von Milchsäure und Glykolsäure die intraluminal Pufferkapazität und verstärkt einen protonenschwammartigen Effekt, der die Flucht aus den Endosomen erleichtert. Im Zytosol, wo der pH-Wert erhöht ist, lassen die elektrostatischen Wechselwirkungen nach, und die mRNA wird leichter aus dem Trägersystem freigesetzt. Insgesamt führt diese Kaskade zu einer überlegenen Transfektion von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) mit mRNA-beladenen PLGA/PBAE-Nanopartikeln im Vergleich zu mRNA/PBAE-Polyplexen. Anschließend bewerteten wir die immunologischen Auswirkungen der Verabreichung. Das PLGA/PBAE-System förderte die Antigenpräsentation und Reifung von aus dem Knochenmark stammenden dendritischen Zellen (BMDCs), was weitere Untersuchungen zu seinem Potenzial zur Immunaktivierung unter Verwendung eines OT-1-Mausmodells veranlasste. Darüber hinaus bewerteten wir die Schleimdurchdringung in einem Atemwegsepithelmodell an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (ALI) sowie die Transfektionseffizienz in *ex vivo* präparierten präzisionsgeschnittenen menschlichen Lungenschnitten (hPCLSs). Wichtig ist, dass die PLGA/PBAE-Formulierung nach der Vernebelung mit einem Aerogen Pro-Gerät einen größeren Teil ihrer Transfektionsaktivität im Vergleich zur SM102-LNP-Kontrolle beibehielt, was ihre erhöhte Toleranz gegenüber Aerosolisierungsstress unterstreicht. Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse das Potenzial

von PLGA/PBAE-Nanoträgern für eine verbesserte pulmonale Verabreichung von mRNA-Impfstoffen.

Ergebnisse und Diskussion

Charakterisierung von mit mRNA beladenen Nanopartikeln

PBAEs finden aufgrund ihrer anpassbaren Struktur, ihrer biologischen Abbaubarkeit und ihrer hohen Transfektionseffizienz zunehmend Beachtung für den Nukleinsäuretransport.³⁰ Basierend auf unseren früheren Erkenntnissen haben amphiphile PBAEs, die Bisphenol-A-Glycerolat als polymeres Grundgerüst sowie polykationisches Spermin (SP) und lipophiles Tetradecylamin (TDA) als Seitenketten verwenden, ihre Wirksamkeit beim RNA-Transport unter Beweis gestellt.²¹ Die Synthese der PBAEs erfolgte nach unserem zuvor etablierten Protokoll; detaillierte Strukturinformationen sind in [Abbildung S1](#) dargestellt. Die Anteile von SP und TDA in unseren synthetischen Polymeren variierten zwischen 40 % und 60 % und wurden alle in diese Studie einbezogen. Durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Phosphatgerüst kondensierten die mit Aminogruppen angereicherten PBAEs die mRNA effektiv zu Polyplexen. Die hergestellten Polyplexe wiesen jedoch eine schlechte Dispersität auf, was durch Polydispersitätsindexwerte (PDI) von durchgehend über 0,3 ([Abbildung 1A](#)) und das Vorhandensein mehrerer Peaks im Diagramm zur Partikelgrößen- und Konzentrationsverteilung ([Abbildung 1B](#)) belegt wurde. Um diese Einschränkung zu überwinden, wurde PLGA in das Transportsystem integriert. Hybride PLGA/PBAE-Nanopartikel wurden mittels einer Doppelemulsions-Lösungsmittelverdampfungsmethode hergestellt, was zu homogeneren Partikeln mit PDIs unter 0,1 führte ([Abbildung 1A](#)), und in den Ergebnissen der Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) war schließlich nur ein einziger schmaler Peak zu beobachten ([Abbildung 1B](#)). Die hydrodynamischen Durchmesser der mit mRNA beladenen PLGA/PBAE-Nanopartikel, gemessen mittels dynamischer Laserstreuung (DLS), lagen im Bereich von 215 bis 230 nm und waren damit etwa doppelt so groß wie die der Polyplexe. Ihre mittels NTA gemessenen Modengrößen lagen jedoch alle unter 135 nm, was auf den geringeren Beitrag großer Partikel zur Gesamtstreuung und den geringeren Einfluss der Hydratationsschicht bei dieser Methode zurückzuführen ist.³¹ Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen (TEM) von mit mRNA beladenen PLGA/PBAE(SP0,5/TDA0,5)-Nanopartikeln zeigten ebenfalls gut dispergierte Nanopartikel, jedoch mit noch kleineren geometrischen Größen im Bereich von 65–80 nm ([Abbildung 1C](#)). Ähnliche Schwankungen der PLGA-Partikeldurchmesser, die mit verschiedenen Techniken bestimmt wurden, wurden bereits in früheren Studien berichtet.^{32,33} Unabhängig von der verwendeten Technik lag die gemessene Partikelgröße im Bereich von 50 bis 250 nm, was aufgrund der Größenähnlichkeit mit den meisten Viren in der Natur als eher immunogen gilt.^{34,35} Insbesondere im Vergleich zum Kryo-TEM-Bild von PBAE-Polyplexen ([Abbildung S2](#)) beobachteten wir in [Abbildung 1C](#) eine deutliche Kern-Hülle-Struktur, was mit den typischen morphologischen Merkmalen von PLGA-Nanopartikeln übereinstimmt. Dieses Merkmal könnte eine optimale Verteilung der amphiphilen PBAEs begünstigen, wobei die lipophile TDA-Gruppe in den hydrophoben Kern eingebettet ist, während sich die kationische SP in Richtung der Hülle erstreckt. Die feste Struktur von PLGA sorgte zudem für die Bildung stabiler Nanopartikel.

Da das Gewichtsverhältnis von Polymer zu RNA in allen Formulierungen bei 60:1 gehalten wurde, führten PBAEs mit einem hohen SP-Anteil aufgrund einer größeren Anzahl protonierbarer Amine zu einem erhöhten Zeta-Potential. Im Vergleich zu PBAE/mRNA-Polyplexen führte die Einbindung von PLGA zu einer signifikanten Abnahme des Zeta-Potentials ([Abbildung 1D](#)). Insbesondere im pH-neutralen

HEPES-Puffer wiesen alle mit mRNA beladenen PLGA/PBAE-Formulierungen Zeta-Potenziale von unter 6 mV auf. Wichtig ist, dass die mRNA-Einkapselung durch diese Abschirmung der Elektropositivität nicht beeinträchtigt wurde und bei allen getesteten Formulierungen über 95 % blieb, wie durch den SYBR-Gold-Assay und die Agarose-Gelelektrophorese bestimmt wurde ([Abbildung S3](#)). Um die mRNA-Integrität unter enzymatischem Stress zu bewerten, analysierten wir mit PBAE(SP0,5/TDA0,5) hergestellte Formulierungen und beobachteten einen wirksamen Schutz vor RNase-Abbau im Vergleich zu identisch verarbeiteter nackter mRNA ([Abbildung S4](#)). Aufgrund der Abschirmung der Elektropositivität durch die Einbindung von PLGA wurde die Freisetzung der mRNA aus PLGA/PBAE-Nanopartikeln unter Triton X-100-Interferenz und Heparin-Kompetition jedoch im Vergleich zu Polyplexen, die mit der entsprechenden Menge an PBAEs formuliert wurden, beschleunigt ([Abbildung 1E](#)). Dieses Phänomen trat in saurem HEPES-Puffer (pH 5,4) nicht deutlich zutage, da hier stärkere elektrostatische Wechselwirkungen durch stärker protonierte Amine vermittelt wurden; dies stellt einen Vorteil für Nanopartikel dar, die im sauren Endosom eingeschlossen sind, da die mRNA fest eingekapselt und somit geschützt war. In HEPES-Puffer mit pH 7,4 stellten wir jedoch bereits nach Zugabe von 0,01 % Heparin und Triton X eine sichtbare mRNA-Freisetzung bei zwei PLGA/PBAE-Formulierungen fest. Je niedriger das SP-Verhältnis des verwendeten Polymers war, desto schneller verlief die beobachtete mRNA-Freisetzung. Nach Durchführung einer nichtlinearen Anpassung der freigesetzten mRNA an die zugesetzten Störsubstanzen zeigten die EC_{50} -Werte, dass zum Erreichen des gleichen Grades an mRNA-Freisetzung mit steigendem SP-Verhältnis der Polymere hohe Konzentrationen an Triton X und Heparin erforderlich waren, sei es bei PBAE/mRNA-Polyplexen oder bei mit mRNA beladenen PLGA/PBAE-Nanopartikeln. Dies deutete darauf hin, dass die Bindungsstärke der mRNA in erster Linie durch elektrostatische Wechselwirkungen von protonierten SP-Aminen bestimmt wurde. Eine Verringerung des SP-Verhältnisses in den verwendeten Polymeren senkte die kationische Ladungsdichte (weniger protonierbare Amine), was zu einer beschleunigten mRNA-Freisetzung führte. Obwohl der Anteil des hydrophoben Monomers TDA mit sinkendem SP-Verhältnis zunahm, trugen hydrophobe Wechselwirkungen im Vergleich zu elektrostatischen Kräften nur minimal zur mRNA-Kondensation bei. Zudem entsprachen die hohen EC_{50} -Werte einer langsameren mRNA-Freisetzung in den getesteten Polyplexen, was mit ihrer im Vergleich zu PLGA/PBAE-Nanopartikeln stärkeren Elektropositivität übereinstimmte, wie durch Zeta-Potential-Analyse gemessen wurde.

Formulierungsscreening auf Basis der mRNA-Transfektion in verschiedenen Zelltypen

Die erfolgreiche Transfektion von mRNA in Zellen, insbesondere in APCs, ist eine entscheidende Voraussetzung für die Wirksamkeit von mRNA-Impfstoffen.²² Um Formulierungen aus PBAEs mit unterschiedlichen Verhältnissen von SP und TDA effizient zu screenen, untersuchten wir direkt deren mRNA-Transfektion in verschiedenen Zelltypen, darunter DC2.4-Zellen, THP-1-Zellen und 16HBE14o-Zellen. DC2.4, eine murine DC-Zelllinie, und THP-1, eine menschliche monozytäre Leukämie-Zelllinie, werden beide als professionelle APCs klassifiziert und können nach der mRNA-Transfektion Antigen-signalen präsentieren, um T-Zellen zu aktivieren und dadurch Immunantworten auszulösen. 16HBE14o-Zellen, eine menschliche Bronchialepithelzelllinie, stellen den ersten Kontakt mit der Formulierung bei der pulmonalen Verabreichung dar, was ebenfalls ein Schwerpunkt dieser Studie ist.

Bemerkenswert ist, dass die Transfektion von Nicht-APCs ebenfalls zu humoralen Immunantworten beitragen kann, indem sie die Antigenproduktion und -sekretion fördert. Extrazellulär sekretierte lösliche Antigene können von professionellen APCs aufgenommen und über Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse II (MHC Klasse II) an Helfer-T-Zellen präsentiert werden, die für die humorale Immunität unerlässlich sind. Darüber hinaus können diese Antigene von B-Zellen über deren B-Zell-Rezeptoren direkt erkannt werden, wodurch die Antikörperproduktion gesteigert wird.¹

Um die Vielseitigkeit von Trägersystemen bei der Verabreichung von mRNA unterschiedlicher Länge zu untersuchen, haben wir sowohl mRNA des Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) (908 nt) als auch mRNA der Firefly-Luciferase (Fluc) (1.816 nt) in diese Untersuchung einbezogen. Unter den getesteten Formulierungen zeigte PLGA/PBAE(SP0,5/TDA0,5) durchweg eine effiziente Transfektion sowohl der EGFP-mRNA ([Abbildungen](#) 2A, 2B und [S5](#)) als auch der Fluc-mRNA ([Abbildung](#) 2C) in allen drei Zelltypen. Der dieser Beobachtung zugrunde liegende Mechanismus bleibt komplex; auf der Grundlage der erzielten Ergebnisse vermuten wir jedoch, dass eine angemessene mRNA-Freisetzung eine entscheidende Rolle spielt. Wie bereits in [Abbildung](#) 1E festgestellt wurde, zeigten PBAE/mRNA-Polyplexe im Vergleich zu hybriden PLGA/PBAE-Formulierungen eine langsamere mRNA-Freisetzung und wiesen in den meisten Fällen eine geringe Transfektionseffizienz auf. Eine Ausnahme von der allgemein besseren Transfektionseffizienz der PLGA/PBAE-Formulierungen wurde jedoch beobachtet, als DC2.4- und 16HBE14o-Zellen mit Polyplexen transfiziert wurden, die mit PBAE(SP0,4/TDA0,6) formuliert waren. Die geringe GFP- ([Abbildungen](#) 2A und 2B) und Fluc-Expression ([Abbildung](#) 2C) nach der Transfektion mit PLGA/PBAE(SP0,4/TDA0,6) lässt sich auf die besonders schnelle mRNA-Freisetzung aus dieser Formulierung zurückführen ([Abbildung](#) 1E), was in gewissem Maße deren Instabilität widerspiegelt und die Transfektionseffizienz beeinträchtigen kann. Im Gegensatz dazu zeigte PLGA/PBAE(SP0,6/TDA0,4) nach Zugabe gleicher Mengen an Störsubstanzen (Triton X und Heparin) eine stärker eingeschränkte Freisetzung von mRNA ([Abbildung](#) 1E), was eine effiziente Zufuhr der mRNA ins Zytoplasma verhindern und die mRNA-Translation behindern könnte ([Abbildungen](#) 2B und 2C). Insgesamt sorgte ein ausgewogenes SP-zu-TDA-Verhältnis (50:50) in den PBAE-Polymeren für die Stabilität der Formulierung, während die PLGA-Integration ein geeignetes mRNA-Freisetzungsprofil ermöglichte, das einer effizienten Transfektion und Proteinexpression förderlich war. Aufgrund ihrer Vielseitigkeit und hohen Effizienz bei der Übertragung verschiedener mRNAs in unterschiedliche Zelltypen wurde schließlich die PLGA/PBAE(SP0,5/TDA0,5)-Formulierung für weitere Tests ausgewählt.

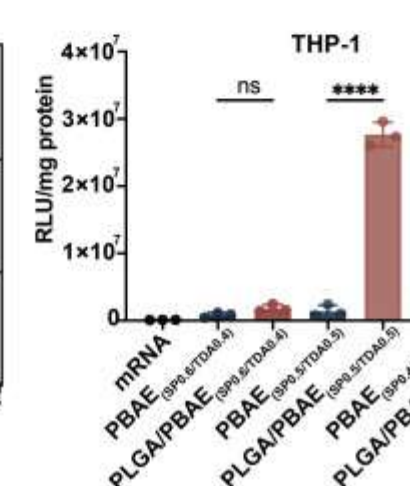
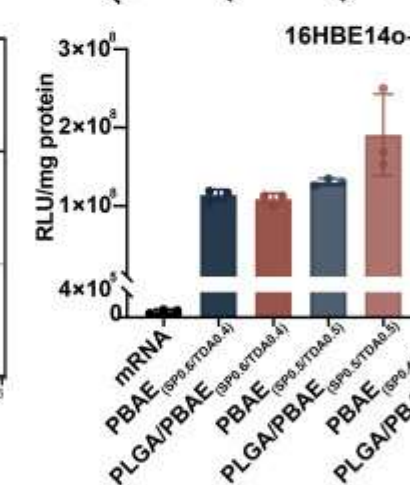
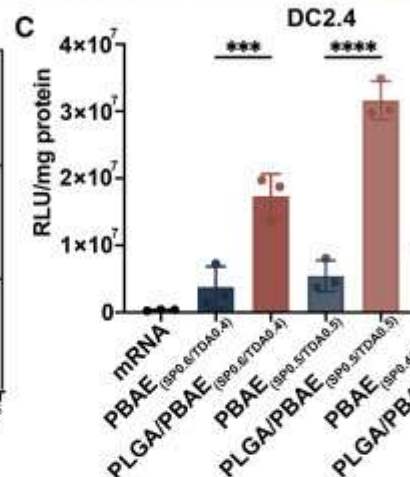
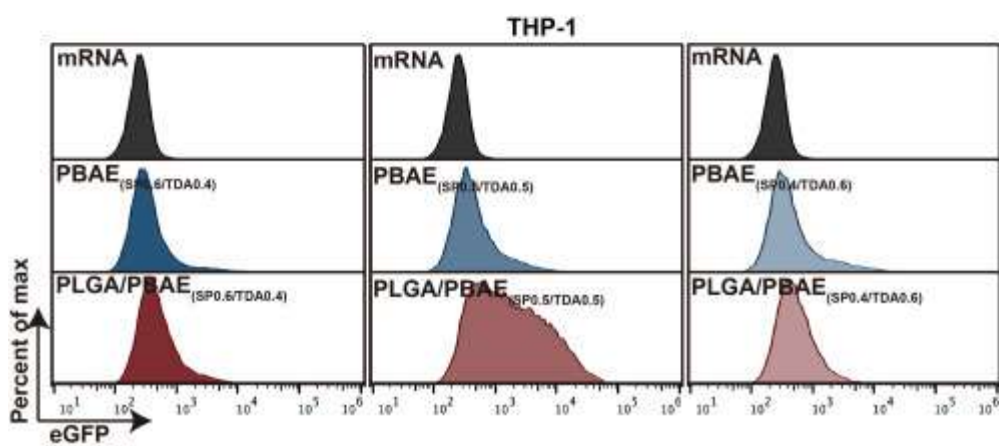
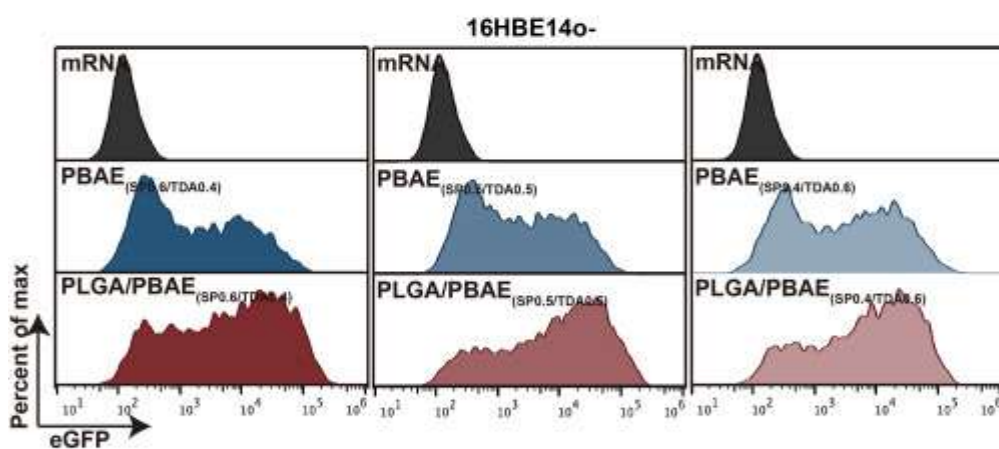
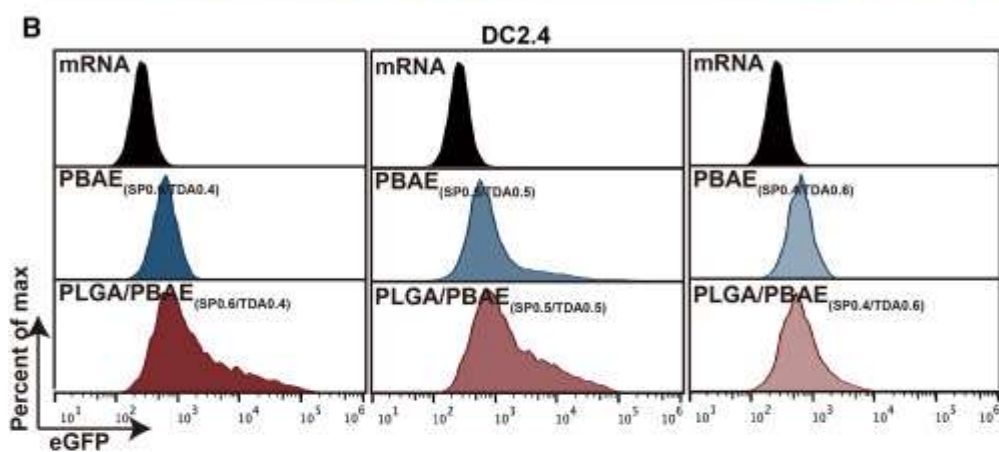
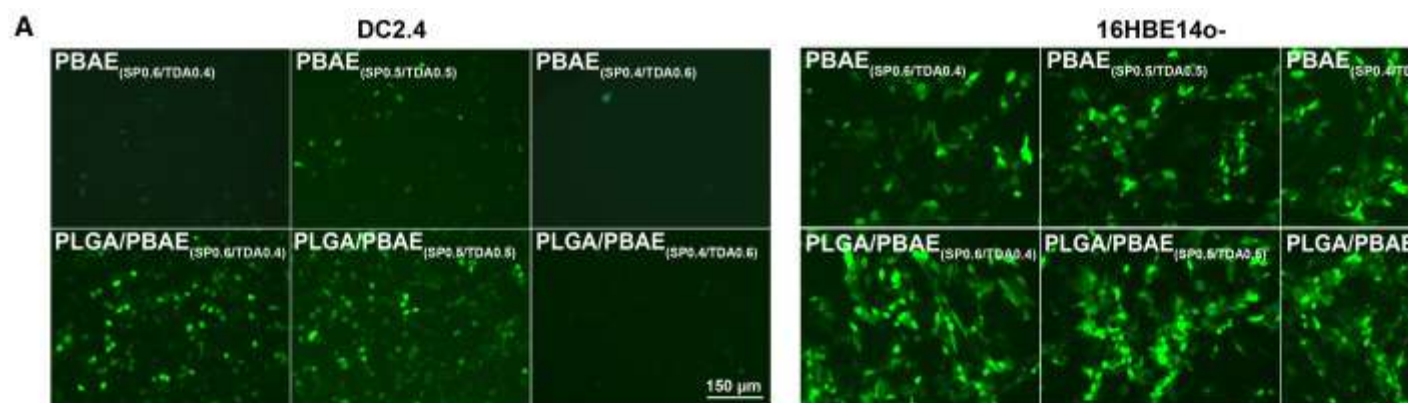


Abbildung 2: Formulierungsscreening mittels mRNA-Transfektion in verschiedenen Zelllinien

Vollständige Bildunterschrift anzeigenBildbetrachter

In-vitro-Leistung in dendritischen Zellen und Bewertung des Einflusses des Zelltyps

Auf der Grundlage unserer *In-vitro*-Transfektionsergebnisse ([Abbildung 2](#)) erwies sich die PLGA/PBAE(SP0,5/TDA0,5)-Formulierung als vielversprechender Kandidat für die mRNA-Transfektion. Um die Faktoren, die zu ihrer Wirksamkeit beitragen, insbesondere in den wichtigsten APCs, den DCs, besser zu verstehen, untersuchten wir ihre Leistung in DC2.4-Zellen im Vergleich zu PBAE(SP0,5/TDA0,5)/mRNA-Polyplexen. Um die Notation in den Datenabbildungen zu vereinheitlichen, beziehen sich PBAE und PLGA/PBAE von nun an jeweils speziell auf mRNA/PBAE(SP0,5/TDA0,5)-Polyplexe bzw. auf mit mRNA beladene PLGA/PBAE(SP0,5/TDA0,5)-Nanopartikel.

Um die Verträglichkeit sicherzustellen, lagen die Konzentrationen der dem Medium zugesetzten, mit mRNA beladenen Formulierungen gemäß unserem Zytotoxizitätstest nicht über 1 µg/mL mRNA ([Abbildung S7A](#)). Aufgrund ihrer stärkeren Elektropositivität vermittelten mRNA/PBAE-Polyplexe eine hohe Internalisierung in DC2.4-Zellen ([Abbildung S8A](#)), und nur die Hälfte der Aufnahme wurde durch Inkubation bei 4 °C gehemmt ([Abbildung S8B](#)). Im Gegensatz dazu zeigten mRNA-beladene PLGA/PBAE-Nanopartikel eine geringere Aufnahme und wurden über dieselben Wege internalisiert, darunter die durch Scavenger-Rezeptoren vermittelte³⁶ und die Clathrin-vermittelte Endozytose,³⁷ die hauptsächlich energieabhängig waren. Bemerkenswerterweise reduzierte Dextransulfat, ein spezifischer Inhibitor der durch Scavenger-Rezeptoren vermittelten Endozytose, die zelluläre Aufnahme von PLGA/PBAE-Nanopartikeln signifikant auf lediglich 5 % des ursprünglichen Niveaus und beeinträchtigte zudem die mRNA-Transfektion in DC2.4-Zellen ([Abbildung S8C](#)). Unabhängig davon, ob die Endozytose über Scavenger-Rezeptoren oder clathrinvermittelte Wege erfolgt, werden internalisierte Formulierungen zunächst in endozytische Vesikel eingeschlossen, in denen der pH-Wert allmählich sinkt, was zu ihrer Umwandlung in frühe Endosomen führt.³⁸ Gelingt es den Formulierungen nicht, innerhalb kurzer Zeit zu entweichen, würden sie durch die fortschreitende Ansäuerung der Umgebung während der Endosomenreifung einem starken Abbau durch erhöhte enzymatische Aktivität ausgesetzt. Wie die Bilder der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) zeigen, wurde in den meisten DC2.4-Zellen nach 2-stündiger Behandlung mit beiden Formulierungen ein orangefarbenes Signal beobachtet, das aus der Überlappung von roter Fluoreszenz (markierte mRNA) und grüner Fluoreszenz (LysoTracker) resultierte ([Abbildung 3A](#)). Dies deutete auf eine erfolgreiche Internalisierung hin, bestätigte jedoch, dass die mRNA hauptsächlich innerhalb der ersten 2 Stunden in den Endosomen eingeschlossen wurde. Nach 8 Stunden stellten wir bei den mit PLGA/PBAE-Nanopartikeln behandelten DC2.4-Zellen eine deutliche Trennung der roten und grünen Fluoreszenz fest, und der entsprechende Pearson-Korrelationskoeffizient (PCC) sank von 0,7 (2 h) auf 0,2222 (8 h). Der PCC-Wert, ein in der CLSM-Bildanalyse häufig verwendeter Indikator zur Beurteilung des Grades der Kolo-kalisierung zwischen zwei Variablen, reicht von -1 bis 1.³⁹ Liegt der PCC-Wert nahe bei 1, deutet dies auf einen hohen Grad an räumlicher Kolo-kalisierung der beiden Fluoreszenzsignale hin, während eine minimale oder keine Überlappung

durch einen Wert nahe bei 0 oder einen negativen Wert zum Ausdruck kommt. Im Gegensatz zu den PLGA/PBAE-Nanopartikeln blieb das überlappende orangefarbene Signal in den mit mRNA/PBAE-Polyplexen behandelten DC2.4-Zellen sichtbar, was auf eine anhaltende Kollokalisierung der markierten mRNA und der Endosomen hindeutet; dies wurde zusätzlich durch den entsprechenden PCC-Wert gestützt, der nur geringfügig von 0,5543 (2 h) auf 0,4577 (8 h) abnahm. Interessanterweise wurden in den mit PLGA/PBAE behandelten Zellen zu beiden Zeitpunkten stärkere LysoTracker-Green-Signale (grüne Fluoreszenz) beobachtet, obwohl die Aufnahmeparameter identisch mit denen der Kontrollen waren. Da LysoTracker Green eine acidotrope Sonde ist, deren Signal in erster Linie das Vorhandensein saurer Kompartimente und nicht den genauen luminalen pH-Wert widerspiegelt, setzten wir LysoSensor Green ein, eine pH-abhängige Sonde mit höherer Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen des Säuregehalts im „“. Die erhaltenen Messwerte ([Abbildung 3B](#)) zeigten deutlichere Unterschiede in der grünen Fluoreszenz zwischen den PBAE- und den PLGA/PBAE-Formulierungen, was mit den LysoTracker-Ergebnissen übereinstimmt. Dieser Effekt lässt sich auf die Hydrolyse von PLGA zurückführen,⁴⁰ wobei die in den Endosomen gebildete Milchsäure und Glykolsäure die LysoSensor-Fluoreszenz verstärkten.

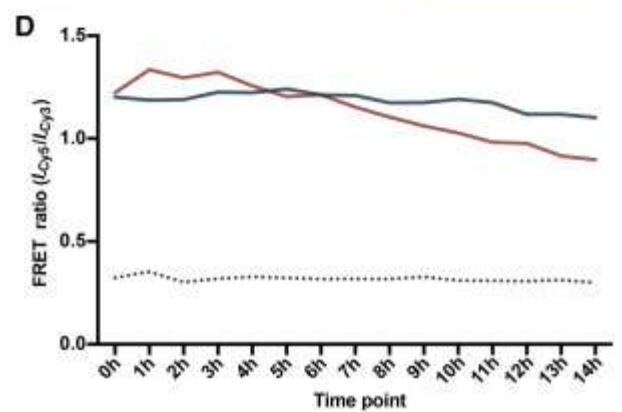
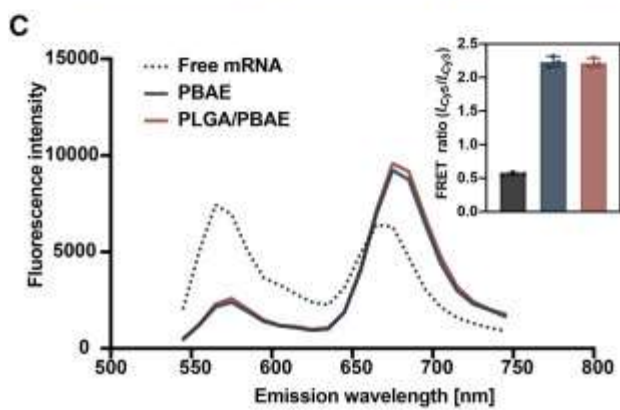
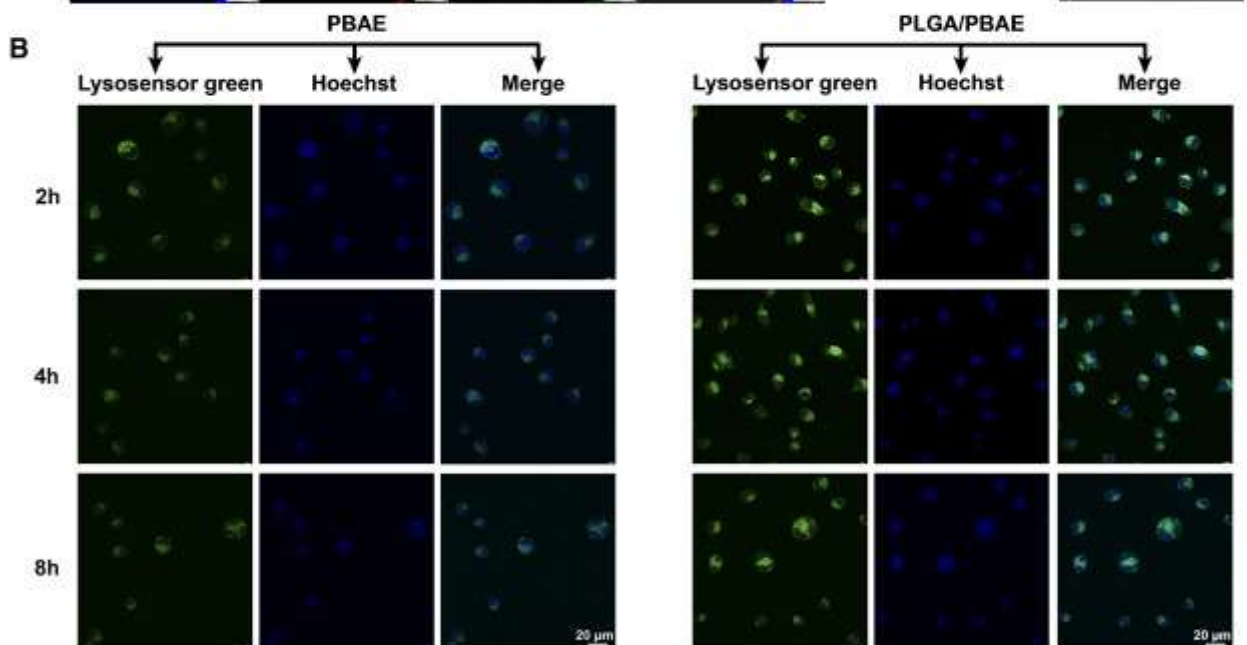
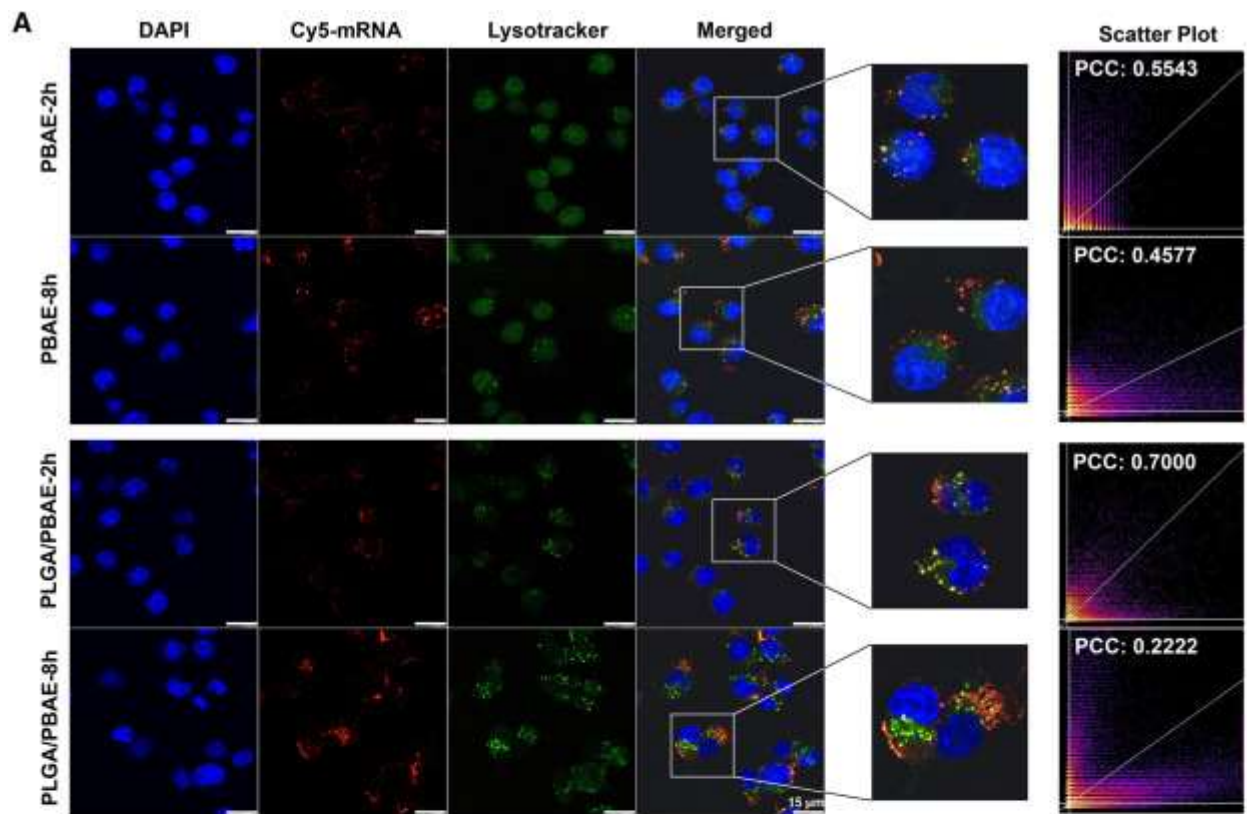


Abbildung 3 *In-vitro*-Leistung in DC2.4-Zellen

Vollständige Bildunterschrift anzeigenBildbetrachter

Es wurde erwartet, dass der erhöhte Säuregrad in den Endosomen die Protonierung der Aminogruppen innerhalb der SP-Einheit der mitbeladenen PBAE-Polymere verstärkt und dadurch die elektrostatische Kondensation der mRNA verstärkt. Wie in [den Abbildungen](#) 3C und 3D dargestellt, waren die FRET-Verhältnisse (Fluoreszenz-Resonanz-Energieübertragung) der PBAE- und PLGA/PBAE-Formulierungen nach der Einkapselung von Cy3/Cy5-doppeltmarkierter mRNA sowohl in zellfreien als auch in zellulären Systemen vergleichbar. Nach einer Inkubation mit DC2.4-Zellen über 1–4 Stunden stieg das FRET-Verhältnis in der PLGA/PBAE-Gruppe jedoch an und blieb hoch gegenüber den PBAE-Polyplexen, was auf eine stärkere mRNA-Kondensation und dementsprechend einen besseren Schutz vor endosomalen Nukleasen hindeutet. Parallel dazu erhöhte die verstärkte Protonierung der SP-Gruppe die intraluminale Pufferkapazität und vermittelte einen protonenschwammartigen Effekt,^{41,42} zusammen mit dem lipophilen TDA, das zudem die Membranauflösung erleichterte und letztendlich die Flucht aus dem Endosom förderte (wie zuvor in DC2.4-Zellen beobachtet). In der Folge nahm das FRET-Verhältnis bei PLGA/PBAE zu späteren Zeitpunkten schneller ab, was auf eine Dekondensation und Freisetzung der mRNA beim Eintritt in das Zytosol mit hohem pH-Wert hindeutete, wo die elektrostatischen Wechselwirkungen abgeschwächt waren. Die freigesetzte mRNA stand dann für die Translation zur Verfügung, während ein größerer Anteil der an den Träger gebundenen mRNA in PBAE-Polyplexen mit geringerer Wahrscheinlichkeit rechtzeitig ihre Funktion erfüllen konnte.

Insgesamt deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass die PLGA-Integration Vorteile bot, die über eine verbesserte Dispergierbarkeit und Biokompatibilität hinausgingen. Die PLGA- und PBAE-Polymere wirkten räumlich und zeitlich synergistisch zusammen. Kurz nach der Aufnahme erhöhte die PLGA-Hydrolyse den Säuregehalt im Endosom, was die Protonierung von PBAE verstärkte und so die mRNA-Kondensation verfestigte, wodurch die Fracht vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt wurde. Mit zunehmender Protonierung sorgte die Pufferkapazität des PBAE für einen anhaltenden Wasserzufluss, was zu einer erhöhten Membranspannung führte, die den Aufbruch der Endosomen und das Entweichen erleichterte. Nach dem Entweichen schwächte die Exposition gegenüber dem Cytosol mit hohem pH-Wert die elektrostatischen Wechselwirkungen und erleichterte die Freisetzung der mRNA aus dem Träger, was der herkömmlichen Auffassung von PLGA als langsam freisetzender Matrix widersprach und letztlich zu einer effektiveren mRNA-Transfektion führte.

Obwohl die oben genannten mechanistischen Untersuchungen an DC2.4-Zellen durchgeführt wurden, haben wir zusätzlich die Endosomenflucht in zwei weiteren Zellmodellen, nämlich HeLa-Gal8-mRuby3 und Calu-3, untersucht, um den potenziellen Einfluss des Zelltyps zu bewerten. In HeLa-Gal8-mRuby3-Zellen zeigten PBAE-Polyplexe eine signifikant höhere zelluläre Aufnahme als PLGA/PBAE; beide Formulierungen induzierten jedoch ein vergleichbares Ausmaß an Gal8-Rekrutierung, was auf ein ähnliches Ausmaß an endosomaler oder lysosomaler Disruption hindeutet ([Abbildung S9](#)). In Calu-3-Epithelzellen wurden hinsichtlich der Endosomenflucht keine ausgeprägten Unterschiede zwischen den beiden Formulierungen festgestellt ([Abbildung S10](#)), und ihre mRNA-Transfektionseffizienzen waren vergleichbar ([Abbildung S6](#)). Dieses Fehlen eines Vorteils in Nicht-APCs unterstrich, dass die Vorteile der PLGA-Einbindung eng mit

der APC-spezifischen Aufnahme und dem intrazellulären Transport verbunden waren und nicht zu einer allgemeinen Steigerung über alle Zelltypen hinweg führten.

Antigenpräsentation und BMDC-Reifung nach Transfektion mit mRNA-Impfstoffen

Um eine effiziente Immunaktivierung zu erreichen, sollten dendritische Zellen (DCs) – die einzigen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), die naive T-Zellen aktivieren können⁽⁴³⁾ – effizient transfiziert werden und anschließend den T-Zellen Antigensignale präsentieren. Darüber hinaus müssen DCs das zweite kostimulatorische Signal, wie beispielsweise B7- und CD40-Moleküle, bereitstellen, um T-Zellen vollständig zu aktivieren. In diesem Zusammenhang sind sowohl die Transfektion als auch die Reifung der DCs gleichermaßen wichtig. BMDCs werden aufgrund ihres unreifen Zustands und ihrer Ähnlichkeit mit den *in-vivo*-Bedingungen häufig für diese Untersuchung verwendet.^{44,45} In unserer Studie wurden BMDCs durch Stimulation von aus C57BL/6-Mäusen isolierten Knochenmarkszellen mit Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) nach etablierten Protokollen gewonnen ([Abbildung 4A](#)).⁴⁶

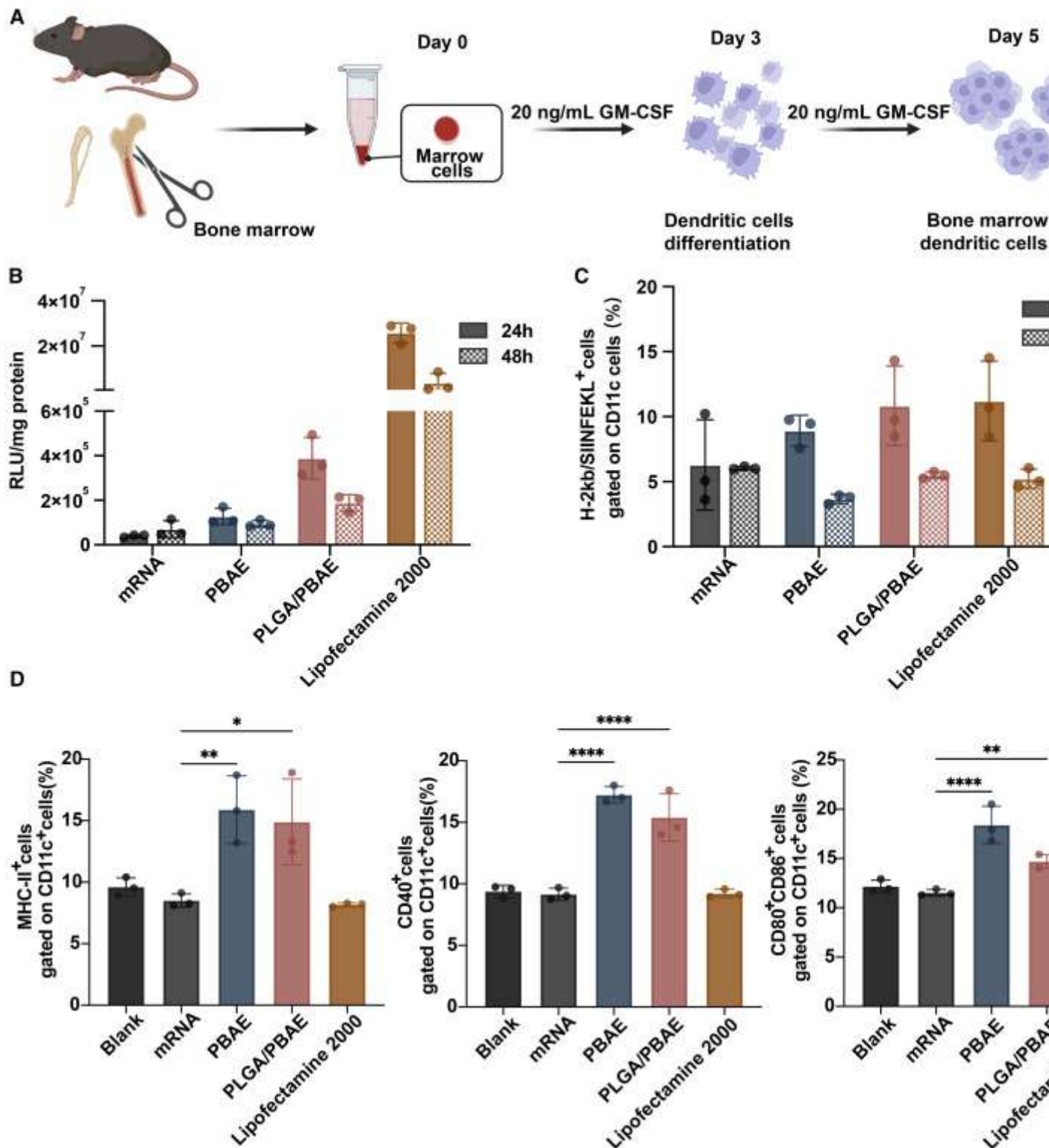


Abbildung 4 Ex-vivo-Leistungsmerkmale von BMDCs

Vollständige Bildunterschrift anzeigen

Zunächst wurden, wie in [Abbildung S11](#) dargestellt, sowohl die PBAE-Polyplexe als auch die PLGA/PBAE-Nanopartikel von den BMDCs effizient internalisiert. Anschließend verwendeten wir Fluc-mRNA, um die Transfektion von „*Fluc*“ in BMDCs zu bewerten. Wie in [Abbildung 4B](#) dargestellt, erreichten die relativen Lichteinheiten (RLUs) pro mg Protein nach 24-stündiger Inkubation bei PBAE 120.000 und bei PLGA/PBAE 380.000, was einem 3- bzw. 10-fachen Anstieg gegenüber freier mRNA entspricht. Insgesamt gestaltete sich die mRNA-Transfektion in primären DCs im Vergleich zu DC2.4-Zellen schwieriger ([Abbildung 2C](#)), was mit früheren Studien

übereinstimmt.⁴⁴ Obwohl Lipofectamine 2000 in diesem Assay die polymeren Formulierungen übertraf, schränkte seine gut dokumentierte Zytotoxizität, die auch in unserer Studie deutlich wurde ([Abbildung S7B](#)), seinen translationalen Nutzen ein. Daher wurde Lipofectamine 2000 hier eher als Positivkontrolle denn als praktische Verabreichungsoption herangezogen. Um einen Zusammenhang zwischen der Expression und der Antigenpräsentation herzustellen, verabreichten wir als Nächstes mRNA, die für das Modellantigen OVA kodiert, und quantifizierten die H-2Kb/SIINFEKL-Komplexe auf BMDCs. Dabei stellten wir fest, dass die mRNA-Transfektion und die MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation einen positiven Zusammenhang aufwiesen. Nach 24 Stunden wurden 6,3 % der BMDCs in der Gruppe mit freier mRNA als H-2Kb/SIINFEKL-positiv nachgewiesen; dieser Anteil stieg bei Verwendung von PBAE auf durchschnittlich 8,9 % und bei PLGA/PBAE auf 10,8 %, wobei letzterer Wert mit dem von Lipofectamine 2000 (durchschnittlich 11,2 %) vergleichbar war ([Abbildung 4C](#)). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem von Huang et al. berichteten, bei dem die PBS-Kontrollgruppe eine Positivitätsrate von 8,73 % aufwies und das zugelassene Spikevax-mRNA-LNP 18,5 % erreichte.⁴⁵ Nach 48 Stunden nahmen sowohl die Luciferase-Expression als auch die H-2Kb/SIINFEKL-Spiegel bei allen Formulierungen ab, was mit früheren Berichten übereinstimmt, wonach die Expression um die 24-Stunden-Marke ihren Höhepunkt erreicht und danach abnimmt.⁴⁷ Aus Sicht der Verabreichung ist dieser frühe 24-Stunden-Höhepunkt, gefolgt von einem Rückgang, mit einer pulmonalen Verabreichung vereinbar, bei der in den Atemwegen ansässige APCs und lokale T-Zellen das Antigen am Ablagerungsort schnell binden können.

Parallel dazu untersuchten wir die MHC-Klasse-II-Präsentation 24 Stunden nach der OVA-mRNA-Transfektion. Im Gegensatz zum Trend bei MHC-Klasse-I-Werten zeigte Lipofectamine 2000 (durchschnittlich 8,1 %) Werte ähnlich denen der freien mRNA, während PBAE die höchste MHC-Klasse-II-positive Population aufwies (durchschnittlich 15,9 %) und PLGA/PBAE (durchschnittlich 14,9 %) zwar etwas niedriger lag, aber dennoch deutlich über der freien mRNA blieb ([Abbildung 4D](#)). Zusätzlich zur MHC-Klasse-II-Expression, die mit dem Reifungsstatus der BMDC korreliert,⁴⁶ haben wir die Anteile der CD40⁺ und CD80⁺ CD86⁺-Zellpopulationen quantifiziert (Gating-Strategie in [Abbildung S12](#)) und denselben Trend beobachtet. Eine plausible Erklärung ist, dass unser hausintern synthetisiertes PBAE als kationisches Polymer möglicherweise eine adjuvansähnliche Wirkung entfaltete, die die DC-Reifung förderte, was mit häufigen Berichten über kationische Materialien übereinstimmt.⁴⁸ Darüber hinaus könnte die lipophile Gruppe TDA die Membraninteraktionen weiter verstärken und so zu dieser Reaktion beitragen. Bei der Integration in PLGA schienen eine teilweise Ladungsneutralisierung und eine verbesserte Biokompatibilität die Reifungssignale abzuschwächen, was zu Häufigkeiten führte, die zwar etwas niedriger als bei PBAE, aber immer noch deutlich über denen von freier mRNA lagen. Obwohl der genaue Mechanismus weiterhin unklar ist, stimmt der bei Lipofectamine 2000 beobachtete geringe Reifungswert mit veröffentlichten Daten zu Lipofectamine MessengerMAX in Monozyten überein, in denen unter ähnlichen Bedingungen eine eingeschränkte CD80-Hochregulation berichtet wurde.⁴⁹

Kokultur von transfizierten BMDCs und CD8⁺T-Zellen, die aus OT-1-Mäusen gewonnen wurden

Angeregt durch die oben genannten Ergebnisse untersuchten wir weiter, ob mRNA-transfizierte BMDCs T-Zellen aktivieren können. Zu diesem Zweck verwendeten wir C57BL/6-Tg (TcraTcrb)1100Mjb/J (OT-1)-Mäuse, die transgene Inserts für die Mausgene Tcra-V2 und Tcrb-V5 tragen. Diese gentechnische Veränderung ermöglicht es CD8⁺T-Zellen aus OT-1-Mäusen, die OVA-Aminosäuren 257–264 (SIINFEKL) spezifisch zu erkennen, wenn diese im Kontext von H-2Kb präsentiert werden.⁵⁰ Daher können die BMDCs nach erfolgreicher Transfektion mit der für OVA kodierenden „“-mRNA den H-2Kb/SIINFEKL-Komplex auf ihrer Oberfläche präsentieren. Sobald CD8⁺ T-Zellen von OT-1-Mäusen mit transfizierten BMDCs interagieren, werden sie antigenspezifisch aktiviert, was sich in Proliferation und Zytokinsekretion zeigt ([Abbildung 5A](#)).

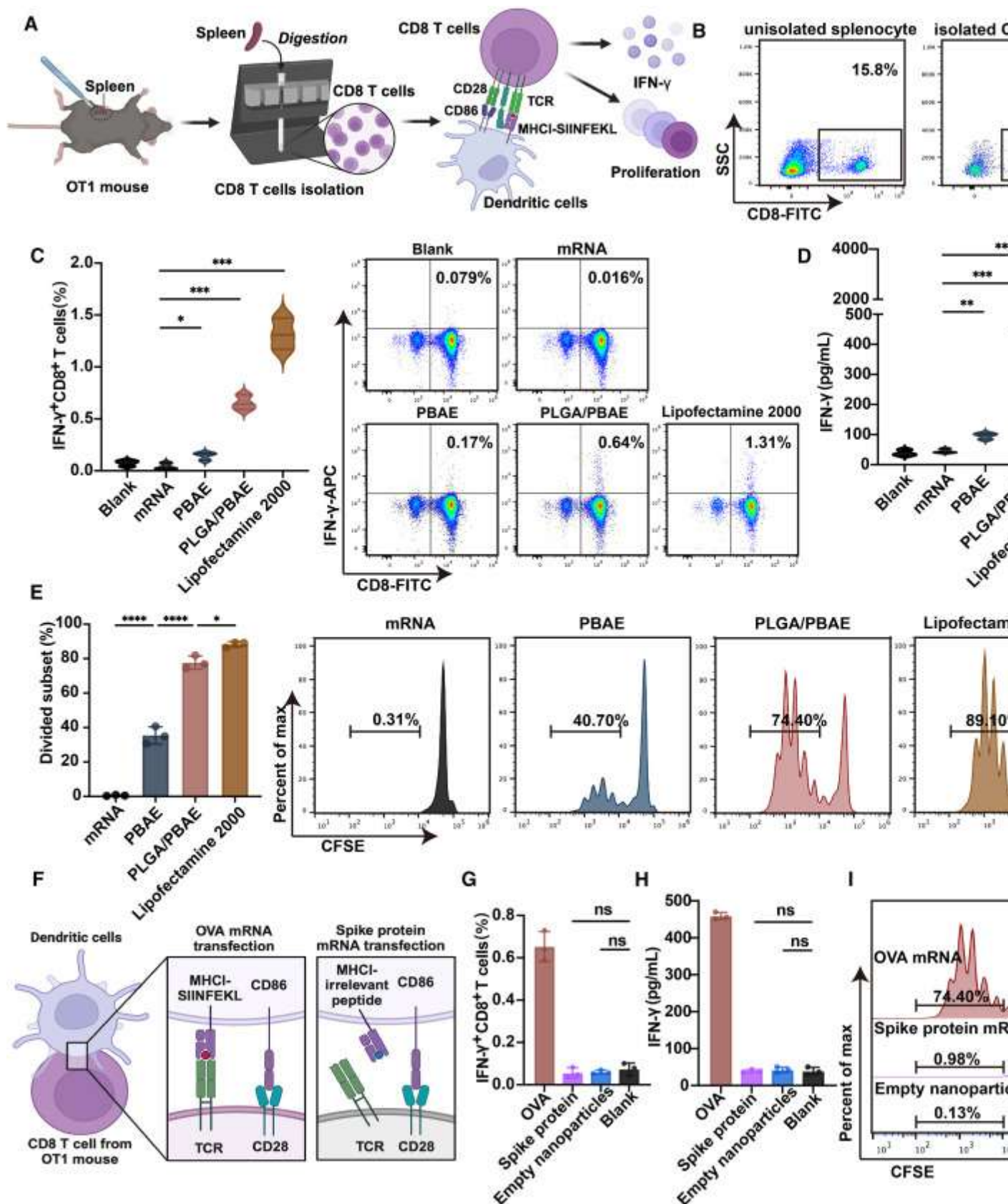


Abbildung 5: Kokultur von transfizierten BMDCs und CD8 $^+$ T-Zellen von OT-1-Mäusen

Vollständige Bildunterschrift anzeigen
 Zunächst wurden CD8 $^+$ T-Zellen aus Milzzellen der OT-1-Maus mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) durch negative Selektion isoliert. Durch diesen Reinigungsprozess stieg der Anteil an CD8 $^+$ T-Zellen von 15,8 % in den

Ausgangspunkten auf 70,7 % in den isolierten Proben ([Abbildung 5B](#)). Anschließend wurden die transfizierten BMDCs 6 Stunden lang mit den isolierten CD8⁺T-Zellen kokultiviert, und es wurde eine intrazelluläre Interferon (IFN)- γ -Färbung durchgeführt, um die T-Zell-Aktivierung zu beurteilen. Sowohl in den Blindproben als auch in den mit freier mRNA behandelten Proben blieben die IFN- γ ⁺-CD8⁺-T-Zellen auf einem niedrigen Niveau (<0,08 %), während die PBAE- und PLGA/PBAE-Gruppen einen signifikanten Anstieg auf 0,14 % bzw. 0,65 % zeigten ([Abbildung 5C](#)). Diese Ergebnisse wurden durch die nach 3 Tagen Inkubation im Kulturmedium gemessenen IFN- γ -Konzentrationen weiter untermauert. Der höchste IFN- γ -Wert wurde in der mit Lipofectamine 2000 behandelten Gruppe beobachtet (2.946 pg/mL), gefolgt von den Gruppen PLGA/PBAE (458,9 pg/mL) und PBAE (95,6 pg/mL) ([Abbildung 5D](#)). Zusätzlich wurde die Proliferation von CD8⁺T-Zellen mittels Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE)-Färbung untersucht, wobei eine Abnahme der CFSE-Fluoreszenzintensität und geteilte Peaks in der Histogrammdarstellung aus der Durchflusszytometrie auf Zellteilung hindeuteten. Wie in [Abbildung 5E](#) gezeigt, erschien das CFSE-Signal in der mit freier mRNA behandelten Gruppe als einzelner, starker Peak auf der rechten Seite des Fluoreszenzspektrums. Im Gegensatz dazu wies die PBAE-Gruppe mehrere Peaks auf der linken Seite auf, die 40,7 % der Fluoreszenzverteilung ausmachten. Die mit PLGA/PBAE und Lipofectamine 2000 behandelten Gruppen zeigten eine noch höhere Proliferation und erreichten 74,4 % bzw. 89,1 %, was mit den Ergebnissen vergleichbar war, die von Zeng et al. berichtet wurden, die mRNA-LNPs für Impfzwecke untersuchten.⁵¹ Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass das Ausmaß der mRNA-Transfektion und der antigenspezifischen MHC-Klasse-I-Präsentation unter unseren Bedingungen den primären Einfluss auf die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen ausübt. Kostimulatorische Signale bleiben zwar wichtig, ihr Einfluss schien bei dieser Messung jedoch zweitrangig zu sein.

Um die Antigenpezifität des Experiments zu bestätigen, ersetzten wir die OVA-mRNA durch SARS-CoV-2-Spike-Protein-mRNA ([Abbildung 5F](#)). Mit OVA-mRNA beladene PLGA/PBAE-Nanopartikel induzierten erfolgreich eine hohe IFN- γ -Sekretion, während die Beladung mit Spike-Protein-mRNA zu einer minimalen Sekretion führte, vergleichbar mit der Blindkontrolle ([Abbildungen 5G und 5H](#)). In ähnlicher Weise zeigte die CFSE-Färbung, dass die CD8⁺ T-Zell-Division in dieser Gruppe mit irrelevanten Antigenen nur 0,98 % betrug ([Abbildung 5I](#)). Als zusätzliche Kontrolle wurden leere Nanopartikel ohne mRNA-Beladung getestet, bei denen bestätigt wurde, dass sie keinen Einfluss auf die antigenspezifische Immunaktivierung in diesem OT-1-Mausmodell hatten ([Abbildung 5I](#)). Diese Ergebnisse bestätigten, dass PLGA/PBAE-Nanotransporter mRNA effektiv in dendritische Zellen (DCs) transportierten, die Antigenpräsentation verstärkten und die T-Zell-Aktivierung auf antigenspezifische Weise förderten, was ihr Potenzial als vielversprechende Verabreichungsplattform für die Entwicklung von mRNA-Impfstoffen unterstreicht.

mRNA-Aufnahme und Transfektion in ALI-kultivierten Zellen

Bei pulmonalen Impfstoffen stellt die Schleimschicht auf der Oberfläche der Atemwege eine bedeutende biologische Barriere dar, die die Tiefendurchdringung von Formulierungen einschränkt und den direkten Kontakt mit dem Trachealepithel verhindert.¹² Das ALI-Kulturmodell, bei dem die apikale Seite von Atemwegsepithelzellen – beispielsweise Calu-3-Zellen, einer Lungenepithelzelllinie – der Luft ausgesetzt ist, während die basolaterale Seite im Medium eingetaucht bleibt,

ermöglicht die Differenzierung der Epithelzellen zu einem pseudostratifizierten Epithel ([Abbildung 6A](#)).⁵² Dieses aus Calu-3-Zellen gewonnene pseudostratifizierte Epithel ahmt das *in vivo vorkommende* Schleimhautepithel sehr genau nach, einschließlich wesentlicher Merkmale wie der Schleimproduktion und der Bildung von Tight Junctions. Daher verwendeten wir ALI-kultivierte Calu-3-Zellen, um die Fähigkeit von mit mRNA beladenen Nanopartikeln zu untersuchen, die Schleimbarriere zu durchdringen. Wie in [Abbildung 6B](#) gezeigt, markierten die CLSM-Bilder Schleim (grün), Zellkerne (blau) und mRNA (rot). Das weit verbreitete grüne Signal, das das blaue überlagerte, bestätigte eine erfolgreiche Schleimproduktion auf der Oberfläche der Zellen. Bei den mit freier mRNA behandelten Zellen war das rote Signal, das die markierte mRNA darstellte, nahezu nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu war bei den mit PBAE behandelten Zellen eine rote Fluoreszenz unter dem Schleim deutlich sichtbar, die sich mit den Zellkernen überlagerte ([Abbildungen 6B und S13](#)). Entsprechend zeigten Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) bei PBAE-behandelten Zellen nach 24-stündiger Inkubation einen signifikanten Rückgang von 663 auf 247 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ([Abbildung 6C](#)), was bestätigte, dass die Polyplexe die Integrität der tight junctions nach der Permeabilisierung des Schleims veränderten. In der PLGA/PBAE-Gruppe war das rote Signal im Vergleich zur Behandlung mit Polyplexen weniger ausgeprägt, blieb jedoch deutlich höher als in den mit Lipofectamine 2000 behandelten Zellen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit früheren Erkenntnissen, wonach lipidbasierte Systeme größere Schwierigkeiten haben, die Schleimbarriere zu durchdringen.⁵³ Allerdings korrelierte die höhere mRNA-Aufnahme in den in ALI kultivierten Calu-3-Zellen in unserer Studie nicht direkt mit einer stärkeren mRNA-Transfektionseffizienz. Im Gegensatz dazu wurde die Luciferase-Expression in den mit PLGA/PBAE behandelten Zellen am höchsten nachgewiesen; sie zeigte einen 7-fachen Anstieg im Vergleich zu freier mRNA und war signifikant höher als sowohl bei PBAE als auch bei Lipofectamine 2000 ([Abbildung 6D](#)). Im Gegensatz zu den zuvor bei Submerszellen beobachteten Ergebnissen bestätigte die geringere Leistungsfähigkeit von Lipofectamine 2000 im ALI-Kulturmodell, dass die Schleimbarriere die zelluläre Aufnahme und die anschließende Transfektionseffizienz negativ beeinflusste.

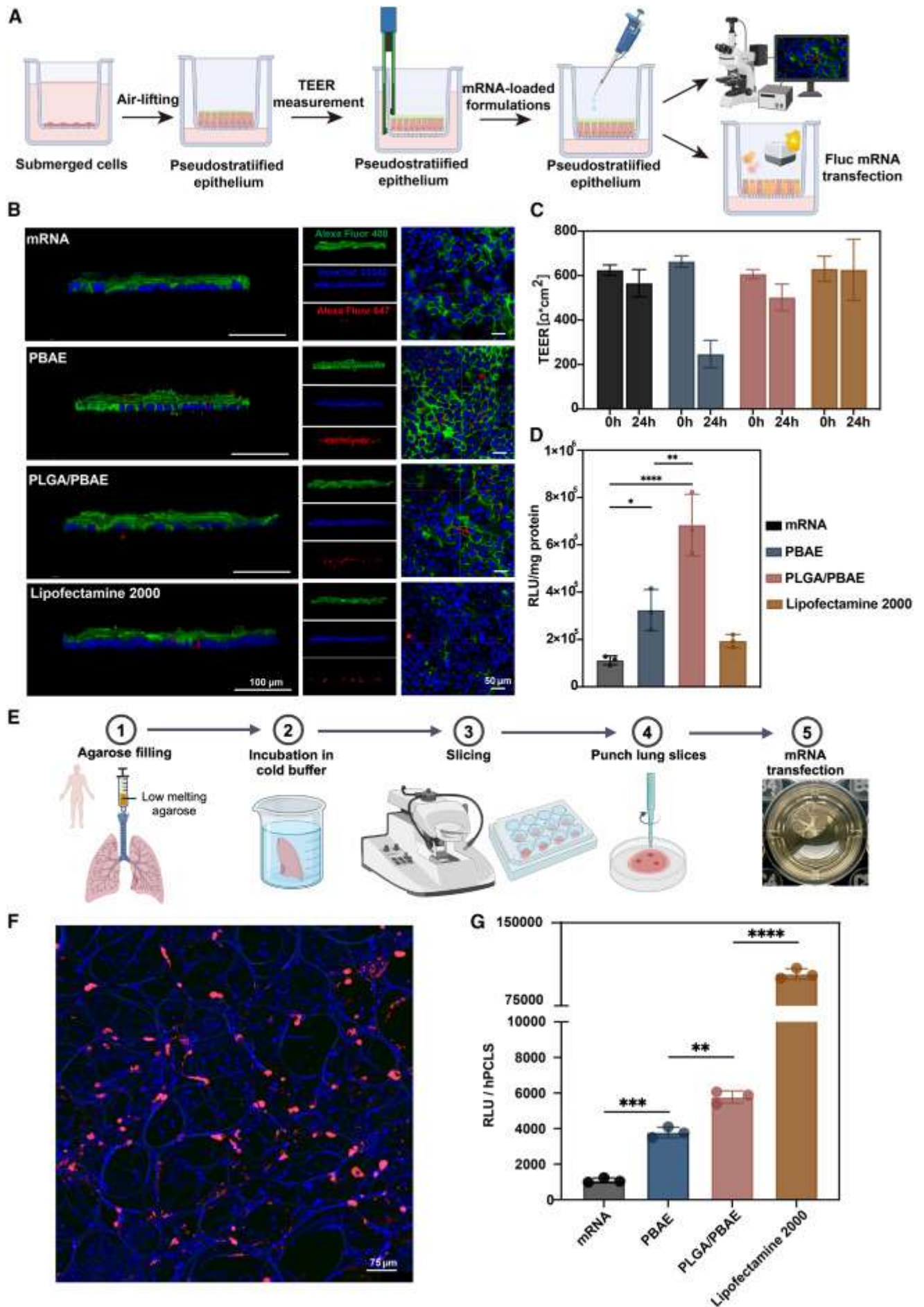


Abbildung 6: mRNA-Aufnahme und Transfektion in einer ALI-Kultur von Calu-3-Zellen und in hPCLSs

Vollständige Bildunterschrift anzeigenBildbetrachter

mRNA-Aufnahme und Transfektion in hPCLS

Um weiter zu untersuchen, ob die mRNA-Transfektion auch in tieferen Lungenregionen wirksam bleibt, verwendeten wir präzise geschnittene menschliche Lungenschnitte (hPCLS), die die native Architektur der menschlichen Lunge – einschließlich Atemwege, Alveolen und Blutgefäße – in einer natürlichen 3D-Anordnung bewahren. hPCLS bewahren zudem zahlreiche in der Lunge ansässige Zelltypen, wie Typ-I- und Typ-II-Alveolarzellen, Bronchialepithelzellen, Endothelzellen und Immunzellen, und bieten somit ein physiologisch relevantes Modell zur Untersuchung biologischer Reaktionen.^{54,55} Die Herstellung von hPCLS ist in [Abbildung 6E](#) dargestellt.

Nach einer 24-stündigen Inkubation von mit mRNA beladenen PLGA/PBAE-Nanopartikeln mit hPCLS zeigte die CLSM-Bildgebung eine rote Fluoreszenz (mRNA), die weitläufig in der verzweigten Lungenstruktur verteilt war und sich mit der blauen Fluoreszenz (Zellkerne) überlappte, was auf eine effiziente zelluläre Aufnahme hindeutete ([Abbildung 6F](#)). Die anschließende Quantifizierung der Luciferase-Aktivität bestätigte, dass die PLGA/PBAE-Nanopartikel eine signifikant höhere Transfektionseffizienz erzielten als freie mRNA und PBAE-Polyplexe und dabei einen Durchschnittswert von 5392 RLU erreichten ([Abbildung 6G](#)). In diesem Assay schnitt Lipofectamine 2000 aufgrund des Fehlens der Schleimbarriere in den mit Agarose gefüllten Lungenschnitten erneut besser ab. Seine Anwendung in der klinischen Praxis ist jedoch durch seine hohe Toxizität eingeschränkt, über die bereits vielfach berichtet wurde⁵⁶ und die auch in unserem Zytotoxizitätstest beobachtet wurde ([Abbildung S4](#)).

Vernebelung

Um praktische Dosierungsstrategien für die pulmonale Verabreichung zu untersuchen, haben wir flüssige Formulierungen mit einem Vibrationsnetz-Vernebler (Aerogen Pro) vernebelt, der feine Tröpfchen erzeugt, indem er die Flüssigkeit durch eine perforierte Membran drückt, was eine effiziente Ablagerung in der Lunge ermöglicht.⁵⁷ Die Laserdiffraktion zeigte, dass nach der Vernebelung von PLGA/PBAE-Nanopartikeln 50 % der Tröpfchen in den Bereich von $1\text{--}4,46 \pm 0,08 \mu\text{m}$ fielen und fast 60 % kleiner als $5 \mu\text{m}$ waren – ein inhalierbarer Bereich, der für die Ablagerung in den Atemwegen geeignet ist ([Abbildung 7A](#)). Wichtig ist, dass die PLGA/PBAE-Partikelgröße nach der Vernebelung stabil blieb, während SM102-LNP, das in den Komponentenverhältnissen von mRNA-1273 (Moderna) formuliert wurde, eine durchschnittliche Zunahme der Partikelgröße um $78,17 \pm 2,89 \text{ nm}$ aufwies ([Abbildung 7B](#)). Im Einklang mit diesen Trends wiesen vernebelte SM102-LNPs im Vergleich zu nicht vernebelten LNPs einen Rückgang der Verkapselungseffizienz um 26,4 % und einen mRNA-Verlust von 44,1 % auf ([Abbildungen 7C und 7D](#)), verglichen mit einem Verlust von 36,2 % bei vernebelten PLGA/PBAE-Partikeln. Obwohl sowohl SYBR-Gold- als auch RiboGreen-Assays auf einen mRNA-Verlust nach der Vernebelung hindeuteten, waren entsprechende Veränderungen in den Bioanalyser-Kurven nicht ohne Weiteres erkennbar ([Abbildung 7E](#)). Der Rückgang des mRNA-Gehalts spiegelte sich funktionell in einer verminderten Transfektion nach

der Vernebelung wider, während PLGA/PBAE unter identischen Bedingungen eine signifikant höhere Aktivität beibehält als SM102-LNP ([Abbildung 7F](#)).

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass PLGA/PBAE besser mit der Standard-Vibrationsgitter-Vernebelung kompatibel ist und günstige aerosolphysikalische, physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften für die pulmonale Verabreichung beibehält. Es ist anzumerken, dass die hier vernebelten Formulierungen nicht optimiert waren. Theoretisch ließe sich die Leistung durch die Wahl alternativer Vernebler, die Anpassung der Betriebsparameter und die Zugabe von Hilfsstoffen verbessern, um die Stabilität von mRNA und Nanopartikeln während und nach der Aerosolisierung besser zu gewährleisten. Diese Strategien werden in zukünftigen Arbeiten untersucht werden.

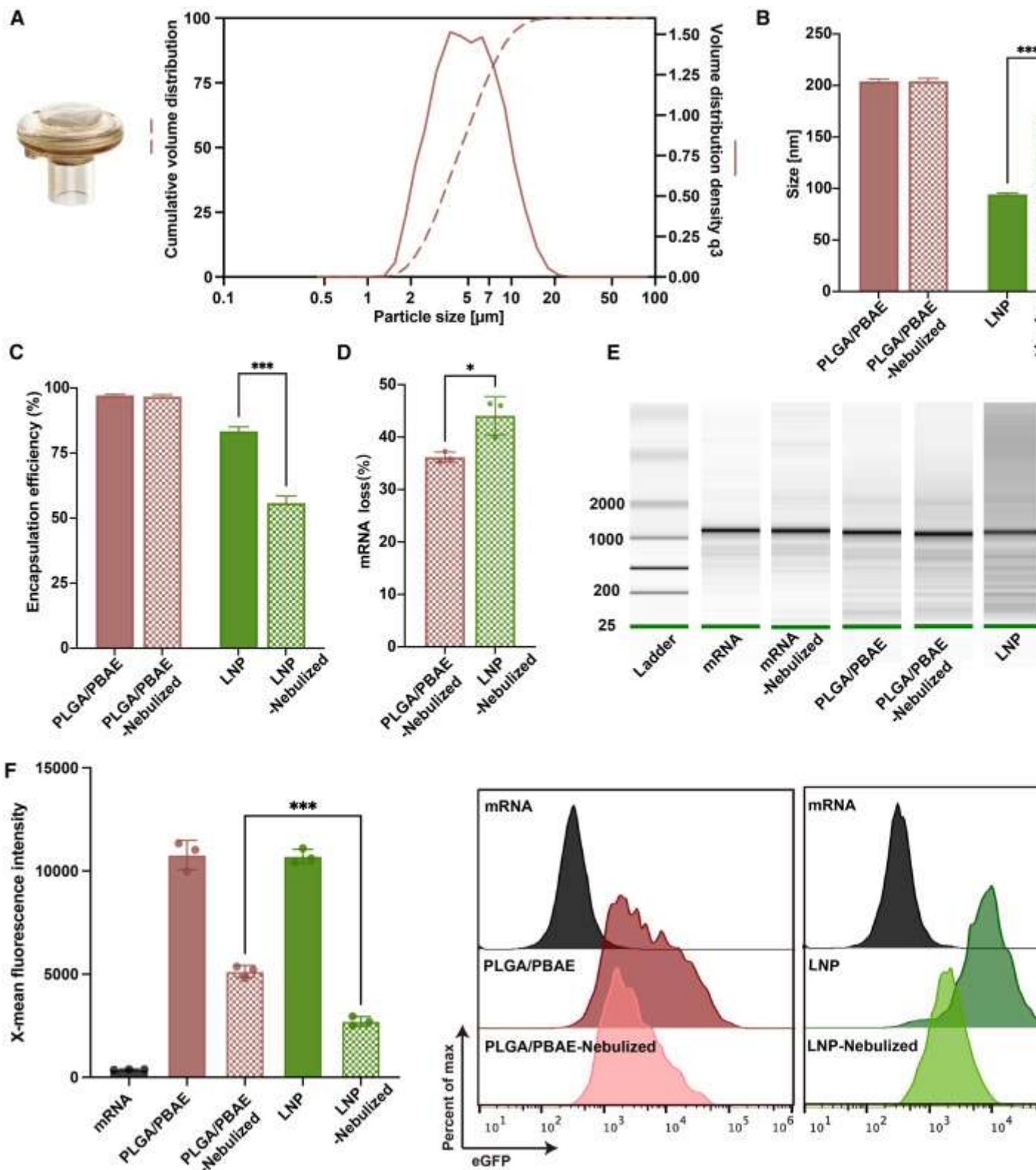


Abbildung 7: Vernebelung von PLGA/PBAE und SM102-LNP mit einem Aerogen Pro-Vibrationsgitter-Vernebler
Vollständige Bildunterschrift anzeigenBildbetrachter

Methoden

Materialien

Resomer RG 502 H, Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid), RNase A, Cell Counting Kit-8, Nystatin, Chlorpromazinhydrochlorid und Dextransulfat-Natriumsalz aus *Leuconostoc* spp. wurden von Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Deutschland) bezogen. Mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser und Roti@GelStain wurden von CalRoTh (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. EGFP-mRNA, Fluc-mRNA und mit Alexa Fluor 647 markierte EGFP-mRNA wurden von RiboPro (Oss, Niederlande) bezogen. OVA-mRNA wurde von GenScript (Piscataway, NJ, USA) bezogen. Die SARS-CoV-2-Spike-Protein-mRNA wurde von Daiichi Sankyo Europe (München, Deutschland) bereitgestellt. Invitrogen SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (10.000-faches Konzentrat in DMSO), 2× RNA-Ladepigment, Lipofectamine 2000, LysoTracker Green DND-26 und rekombinantes GM-CSF-Protein der Maus von PeproTech wurden von Thermo Fisher (Waltham, MA, USA) bezogen. Aminoallyl-UTP-Cy3 und Aminoallyl-UTP-Cy5 wurden von Jena Bioscience (Dortmund, Deutschland) bezogen. Das HiScribe T7 ARCA mRNA-Kit (E2060S) wurde von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) bezogen. Zombie Violet Fixable Viability Kit, Monensin-Lösung (1.000×), APC-Antikörper gegen Maus-I-A^b, Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Antikörper gegen Maus-CD40, FITC-Antikörper gegen Maus-CD80, APC-Antikörper gegen Maus-CD86, PE-Antikörper gegen Maus-CD11c, Brilliant Violet 605-Antikörper gegen Maus-CD11c, PE-Antikörper gegen Maus-H-2Kb, gebunden an SIINFEKL-Antikörper, APC-Antikörper gegen *Maus-IFN-γ*, ELISA MAX Standard Set Mouse IFN-γ-Kit und CFSE Cell Division Tracker Kit wurden von Bioligand (San Diego, CA, USA) bezogen. Der FITC-Antikörper gegen Maus-CD8 und die CD8a⁺T-Zell-Isolierungskits (Maus) wurden von Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland) bezogen.

Synthese von PBAE

PBAE-Polymere wurden in unserem Labor gemäß einem zuvor beschriebenen Protokoll synthetisiert.²¹ Kurz gesagt wurden Tri-Boc-SP (0,5 Äquivalente), TDA (0,5 Äquivalente) und Bisphenol-A-Diglycidylether-Diacrylat (1,2 Äquivalente) gemischt und 48 Stunden lang bei 90 °C gerührt. Das erhaltene Produkt wurde in einer Mischung aus Trifluoressigsäure (TFA) und Dichlormethan (DCM) (TFA:DCM 1:20 v/v) gelöst und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt, um die Boc-Gruppen abzuspalten. Das entschützte Polymer wurde durch dreimalige Fällung in Diethylether gereinigt.

Herstellung von hybriden PLGA/PBAE-Nanopartikeln

Die PLGA/PBAE-Hybrid-Nanopartikel wurden mittels eines Doppelemulsionsverfahrens mit Lösungsmittelverdampfung hergestellt. Kurz gesagt wurden in DCM gelöstes PLGA und in DEPC-behandeltem Wasser gelöstes PBAE in gleichen Mengen gemischt und mit der MS72-Sonde eines Ultraschallhomogenisators (BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland) emulgiert. Anschließend wurde der ersten Emulsion das gleiche Volumen einer 0,5 %igen (w/v) wässrigen Polyvinylalkohol (PVA)-Lösung zugegeben und ultraschallbehandelt, um die Doppelemulsion herzustellen. Die erhaltene Emulsion wurde langsam tropfenweise in DEPC-behandeltes Wasser gegeben und 4 Stunden lang bei 1.200 U/min gerührt, damit das DCM verdampfen und die Partikel aushärten konnten. Anschließend wurden die Formulierungen unter Verwendung eines 15-ml-Amicon-Ultra-Zentrifugalfilters (Molekulargewichtsgrenze 30 kDa, Millipore) 50 Minuten lang bei 500 × g in einer Megafuge-16-Zentrifuge (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt,

Deutschland) ultrafiltriert, um eine Endformulierung mit einer Konzentration von 1 mg/ml an PBAE-Polymeren zu erhalten.

Herstellung von mRNA-beladenen Formulierungen

Zur Herstellung von mRNA-beladenen Formulierungen wurden die konzentrierten hybriden PLGA/PBAE-Nanopartikel und die PBAE-Polymere (1 mg/ml in RNase-freiem destilliertem Wasser) jeweils einzeln mit der gewünschten Menge an mRNA (verdünnt in 10 mM HEPES-Puffer, pH 5,4) durch Pipettieren im Gewichtsverhältnis (w/w) von 60:1 vermischt und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Nanopartikelgröße, PDI und Oberflächenladung

Der hydrodynamische Durchmesser und der PDI der Nanopartikel wurden mittels DLS unter Verwendung eines Zetasizer Advance Ultra (Malvern Instruments, Malvern, Großbritannien) gemessen. Das Zetapotential der mit mRNA beladenen Nanopartikel, verdünnt entweder in 10 mM HEPES-Puffer (pH 5,4) oder in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4), wurde mittels Phasenanalyse-Lichtstreuung (PALS) unter Verwendung desselben Geräts bestimmt. Die Modengröße und die Konzentration der mit mRNA beladenen Nanopartikel wurden mittels NTA gemessen. Konkret wurden PBAE/mRNA-Polyplexe im Verhältnis 1:50 und mit mRNA beladene PLGA/PBAE-Nanopartikel im Verhältnis 1:500 mit dem Formulierungspuffer verdünnt und anschließend gemäß den Herstellerangaben über die Spritzenpumpe des NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Malvern, Großbritannien) in das Gerät injiziert.

mRNA-Einkapselung

Die mRNA-Einkapselung wurde mittels eines SYBR-Gold-Assays quantifiziert. Kurz gesagt wurden 15 µL der hergestellten Nanopartikel in 384-Well-Platten gegeben, anschließend wurden 5 µL einer 4× SYBR-Gold-Lösung in jede Vertiefung gegeben und die Proben 10 Minuten lang im Dunkeln inkubiert. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem Plattenlesegerät (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei einer Anregungswellenlänge (Ex) von 492 nm und einer Emissionswellenlänge (Em) von 555 nm gemessen. Freie mRNA diente als 100-prozentige Referenz zur Berechnung der nicht eingekapselten mRNA. Zusätzlich wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, um die mRNA-Einkapselung sichtbar zu machen. Eine Mischung aus 10 µL der hergestellten Nanopartikel und 10 µL 2× RNA-Ladungsfarbstoff wurde in die Vertiefungen eines mit Roti@GelStain versetzten 1-prozentigen Agarosegels aufgetragen. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge an freier mRNA aufgetragen. Das Agarosegel wurde bei einer konstanten Spannung von 150 V für 20 Minuten in einem Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure und 2 mM EDTA) elektrophoretisch aufgetrennt, und die mRNA-Banden wurden unter Verwendung eines UV-Transilluminators (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) sichtbar gemacht.

mRNA-Freisetzungssassay

Der SYBR-Gold-Assay wurde durchgeführt, um die Freisetzung von mRNA aus Nanoträgern unter verschiedenen Bedingungen zu bewerten. Zunächst wurden mRNA-beladene Formulierungen mit einem Gewichtsverhältnis von 60 wie zuvor beschrieben hergestellt. Verschiedene Formulierungen, die 55 ng mRNA enthielten,

wurden mit 20 µL serieller Verdünnungen von Triton X und Heparin in einer 384-Well-Platte bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die 100-%-Freisetzungskontrolle bestand aus 10 µL 2-prozentigem Triton X und 10 µL Heparinlösung (2.000 IE/mL). Als Puffer für die Herstellung der seriellen Verdünnungen wurde 10 mM HEPES verwendet, der jeweils auf pH 5,4 bzw. pH 7,4 eingestellt wurde. Anschließend wurden 8,25 µL einer 4× SYBR Gold-Lösung in jede Vertiefung gegeben und 10 Minuten lang inkubiert. Die Ergebnisse wurden wie zuvor beschrieben gemessen.

RNase-Protection-Assay

mRNA-haltige Formulierungen mit einem Gewichtsverhältnis von 60 wurden wie zuvor beschrieben hergestellt. Insgesamt 18 µL der jeweiligen Formulierungen, die 200 ng mRNA enthielten, wurden mit 2 µL reinem fötalem Rinderserum (FBS) inkubiert, um eine Endkonzentration von 10 % FBS zu erreichen, und 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollen wurde die gleiche Menge an freier mRNA verwendet, die entweder mit FBS inkubiert oder unbehandelt gelassen wurde. Anschließend wurde die mRNA unter Verwendung eines RNeasy Mini-Kits (QIAGEN) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt und in 10 µL RNase-freiem Wasser eluiert. Die gewonnenen Proben wurden auf einem Agilent Bioanalyzer unter Verwendung des RNA 6000 Pico-Kits analysiert, um die Integrität der mRNA zu bewerten.

Zellkultur

Sowohl murine DC2.4-Dendritenzellen als auch THP-1-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) kultiviert, das mit 10 % (v/v) FBS (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland), 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (P/S) (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) und 0,05 mM 2-Mercaptoethanol. 16HBE14o-Zellen und Calu-3-Zellen wurden in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), ergänzt mit 10 % FBS und 1 % P/S, kultiviert. HeLa-Gal8-mRuby3-Zellen wurden freundlicherweise von Professor Ernst Wagner (Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt und in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – Low Glucose mit 10 % FBS und 1 % P/S kultiviert. Alle Zellen wurden in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO_2 bei 37 °C kultiviert.

Formulierungsscreening mittels mRNA-Transfektion in verschiedenen Zelllinien

Für die EGFP-mRNA-Transfektion wurden DC2.4-Zellen, THP-1-Zellen, 16HBE14o-Zellen und Calu-3-Zellen in 96-Well-Platten mit Dichten von 10.000, 10.000, 20.000 bzw. 20.000 Zellen pro Well ausgesät. Nanopartikel, die 200 ng EGFP-mRNA enthielten, wurden in jede Vertiefung gegeben und 24 Stunden lang inkubiert. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge an freier mRNA verwendet. Nach der Inkubation wurden die Zellen trypsinisiert und durch Zentrifugation bei $500 \times g$ für 5 Minuten (Eppendorf-Zentrifuge 5418/5418R) gewonnen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der mit mRNA behandelten Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie (Attune NxT, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Zur Beobachtung der EGFP-Expression nach der Behandlung mit EGFP-mRNA wurden DC2.4-Zellen und 16HBE14o-Zellen, die in 96-Well-Platten kultiviert wurden, unter einem EVOS M5000-Mikroskop (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) mit einem

20×-Objektiv beobachtet. Die Fluoreszenzbilder wurden im GFP-Kanal aufgenommen.

Für die Fluc-mRNA-Transfektion wurden DC2.4-Zellen, THP-1-Zellen und 16HBE14o-Zellen wie zuvor beschrieben ausgesät und 24 Stunden lang mit verschiedenen Formulierungen inkubiert, die 200 ng Fluc-mRNA enthielten. Nach der Inkubation wurden je nach Zelltyp unterschiedliche Folgebehandlungen durchgeführt. Bei DC2.4-Zellen und 16HBE14o-Zellen wurde das Medium in jeder Vertiefung direkt abgesaugt, und die Zellen wurden zweimal vorsichtig mit PBS gespült. Bei THP-1-Zellen, die in Suspension wachsen, wurden die Zellen durch Zentrifugation bei $500 \times g$ für 5 min in 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen gesammelt und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µL 0,5× Zellkultur-Lysispuffer (Promega) in jede Vertiefung der Platten bzw. in jedes Eppendorf-Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden 30 Minuten lang bei Raumtemperatur lysiert. Als Nächstes wurden 35 µL Zelllysat in jede Vertiefung einer weißen 96-Well-Platte überführt, um die Luciferase-Aktivität zu messen. Nach Zugabe von 100 µL Luciferase-Assay-Reagenz (LAR)-Puffer (20 mM Glycylglycin, 1 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA, 3,3 mM Dithiothreitol [DTT], 0,55 mM Adenosintriphosphat [ATP], 0,27 mM Coenzym A; pH 8,5), ergänzt mit 5 % (v/v) einer Mischung aus 10 mM Luciferin und 29 mM Glycylglycin in jede Vertiefung gegeben wurden, wurden die Lumineszenzwerte 10 Sekunden lang mit dem Tecan-Plattenlesegerät gemessen. Die Proteinmenge in jeder Probe wurde mit einem Bicinchoninsäure-Assay (BCA)-Kit bestimmt. Die Transfektionseffizienz wurde als RLU/mg angegeben, indem die RLU durch die Proteinmenge (mg) dividiert wurde.

Zellviabilität

Für die Zytotoxizitätsassays wurden DC2.4-Zellen verwendet, die in 96-Well-Platten mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro Well ausgesät wurden. Die Formulierungen wurden wie zuvor beschrieben hergestellt und jedem Well mit unterschiedlichen Mengen an mRNA im Bereich von 100 bis 400 ng zugegeben. Das Gesamtvolumen der Formulierungen und des Zellkulturmediums betrug 200 µL. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden 5 µL des Cell Counting Kit-8 in jede Vertiefung gegeben und 3–4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion bei 450 nm wurde mit einem Tecan-Plattenlesegerät gemessen, und die Zellviabilität wurde berechnet, indem die Extinktion der behandelten Gruppen durch die der unbehandelten Gruppe dividiert wurde.

Aufnahme durch DC2.4-Zellen und endozytische Wege

DC2.4-Zellen wurden mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro Vertiefung in 96-Well-Platten ausgesät und 2 Stunden lang mit Formulierungen inkubiert, die 200 ng mRNA enthielten, von der 20 % durch mit Alexa Fluor 647 markierte mRNA ersetzt waren. Als Negativkontrolle diente freie mRNA. Lipofectamine 2000 wurde ebenfalls verwendet, wobei 0,2 µL des Reagenzes zur Zufuhr von 200 ng mRNA eingesetzt wurden, das gemäß den Unterweisungen des Herstellers zubereitet wurde. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet und mittels Durchflusszytometrie (Attune NxT, Thermo Fisher Scientific) analysiert.

Um die Aufnahmemechanismen zu untersuchen, wurden die Zellen 1 Stunde lang mit verschiedenen Inhibitoren vorbehandelt, darunter 5 µg/mL Chlorpromazin, 100 µg/mL Dextransulfat und 20 µg/mL Nystatin. Eine Platte mit besiedelten Zellen wurde 1 Stunde lang bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den

Formulierungen inkubiert, die die gleiche Menge an Alexa Fluor 647-markierter mRNA enthielten, entweder in Gegenwart der noch im Medium vorhandenen Inhibitoren oder durch weitere 2-stündige Lagerung der Platte bei 4 °C. Unbehandelte Zellen dienten als Blindkontrolle, und mit den Formulierungen, jedoch ohne Inhibitoren behandelte Zellen dienten als Nicht-Inhibitionskontrolle. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet und mit einem Attune NxT-Durchflussszytometer gemessen.

Endosomale Flucht

DC2.4-Zellen wurden in einer 8-Well-ibiTreat-Kammerplatte (Ibidi, Gräfelfing, Deutschland) mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro Well ausgesät. Die Zellen wurden 2 und 8 Stunden lang mit Formulierungen behandelt, die 200 ng mRNA sowie 20 % Cy5-markierte Negativkontroll-mRNA enthielten. Die Cy5-markierte mRNA wurde intern durch In-vitro-Transkription (IVT) ohne Poly(A)-Verlängerung hergestellt. Nach der Behandlung wurde das Medium aus jeder Vertiefung abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült. Jede Vertiefung wurde mit 200 µL Medium gefüllt, das LysoTracker Green in einer Konzentration von 75 nM enthielt, und 1 Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die DC2.4-Zellen dreimal mit PBS gewaschen und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur mit einer 4-prozentigen Paraformaldehyd (PFA)-Lösung fixiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen 5–10 Minuten lang mit einer 5 µg/mL 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Lösung gefärbt. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und unter einem SP8-Invers-CLSM (Leica Camera, Wetzlar, Deutschland) mit einem 63×-Ölimmersions -Objektiv beobachtet. Die erhaltenen Bilder wurden mit dem Fuji-Plugin von ImageJ zur Kolokalisationsanalyse mittels PCC verarbeitet.

Calu-3-Zellen wurden in einer 8-Well-ibiTreat-Kammerplatte (Ibidi) mit einer Dichte von 20.000 Zellen pro Well ausgesät und anschließend 2 bzw. 8 Stunden lang mit Formulierungen behandelt, die 200 ng mRNA sowie 20 % mit Alexa Fluor 647 markierte mRNA enthielten. Nach der Behandlung wurde das Medium in jedem Well abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült. Jede Vertiefung wurde mit 200 µL Medium gefüllt, das LysoSensor Green DND-189 in einer Konzentration von 1 µM enthielt, und 1 Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 8 Minuten lang bei Raumtemperatur mit Hoechst 33342 (1 µg/mL) gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben mit einem SP8-Invers-CLSM unter Verwendung eines 63×-Ölimmersionsobjektivs abgebildet.

Säuregrad in Endosomen/Lysosomen

DC2.4-Zellen wurden in 8-Well-ibiTreat-Kammerobjektträgern (Ibidi, Gräfelfing, Deutschland) mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro Well ausgesät. Die Zellen wurden 2, 4 und 8 Stunden lang mit Formulierungen behandelt, die 200 ng OVA-mRNA enthielten. Nach der Behandlung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült. Jede Vertiefung wurde anschließend 30 Minuten lang bei 37 °C mit 200 µL Medium inkubiert, das LysoSensor Green (1 µM) enthielt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit Hoechst 33342 (1 µg/mL, 8 Minuten) gegengefärbt, gefolgt von einer abschließenden PBS-Waschung. Die Bildgebung erfolgte auf einem inversen Leica SP8-CLSM unter Verwendung eines 63×-Ölimmersionsobjektivs.

Endosomale Flucht in HeLa-Gal8-mRuby3-Zellen

HeLa-Gal8-mRuby3-Zellen wurden in einer 8-Well-ibiTreat-Kammer (Ibidi) mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro Well ausgesät und anschließend 1, 4 und 8 Stunden lang mit Formulierungen behandelt, die 200 ng mRNA enthielten, wobei 20 % davon durch mit Alexa Fluor 674 markierte mRNA ersetzt waren. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 4 % PFA fixiert und danach 5–10 Minuten lang mit 5 µg/mL DAPI gefärbt. Schließlich wurden die Zellen mit dem inversen SP8-CLSM (Leica Camera) unter Verwendung eines 63×-Ölobjektivs beobachtet. Die Fluoreszenzpunkte von Gal8-mRuby3 und Alexa Fluor 647 wurden mit dem Fuji-Plug-in von ImageJ analysiert.

FRET-Analyse

Cy3/Cy5-doppeltmarkierte mRNA wurde intern mittels IVT unter Verwendung des HiScribe T7 ARCA mRNA-Kits (New England Biolabs) hergestellt, wobei der Reaktion Aminoallyl-UTP-Cy3 und Aminoallyl-UTP-Cy5 zugesetzt wurden. Die doppeltmarkierte mRNA wurde mit einem RNeasy Mini-Kit (QIAGEN) gereinigt und auf einem NanoDrop-Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert. Mit mRNA beladene Nanopartikel wurden wie zuvor beschrieben unter Verwendung von 100 % doppelt markierter mRNA hergestellt. Zur spektralen Charakterisierung wurden Nanopartikel, die 200 ng markierte mRNA enthielten, in 200 µL PBS verdünnt, und ein Fluoreszenz-Em-Scan wurde mit einer Ex-Wellenlänge von 500 nm und einer Em-Wellenlänge von 545 bis 745 nm auf dem Tecan-Plattenlesegerät aufgenommen. Für die *In-vitro*-FRET-Messungen wurden 10.000 DC2.4-Zellen pro Vertiefung in eine schwarze 96-Well-Platte mit transparentem Boden (µCLEAR, Greiner Bio-One) ausgesät und entweder mit 200 ng freier doppelt markierter mRNA oder den entsprechenden mRNA-beladenen Nanopartikeln behandelt. Die Fluoreszenz wurde in Echtzeit auf einem Spark Cyto-Plattenlesegerät (Tecan) mit einer Ex-Wellenlänge von 500 nm und dual n Em-Wellenlängen von 570 nm (Cy3) und 670 nm (Cy5) in Intervallen von 1 Stunde erfasst. Das FRET-Verhältnis wurde als I_{Cy5}/I_{Cy3} berechnet.

Tiere

Alle Versuche mit tierischen Organen oder Geweben wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und von der Regierung von Oberbayern, München, Deutschland, genehmigt (5.1-231 5682/LMU/BMC/Core Facility Animal Models [CAM]). C57BL/6J-Mäuse wurden von der CAM am Biomedizinischen Zentrum (BMC) der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) bezogen. C57BL/6-Tg (TcraTcrb)1100Mjb/J (OT-1)-Mäuse wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) bezogen und durch eigene Zucht an der CAM gehalten. Alle Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen bei einer Raumtemperatur von $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit (RH) von $50\% \pm 5\%$ gehalten. Der Lichtzyklus wurde auf eine Periode von 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit eingestellt. Alle Mäuse hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter (bestraht, 10-mm-Pellets; 1314P, Altromin, Laage, Deutschland).⁵⁸

BMDC-Kultur

6–8 Wochen alte C57BL/6J-Mäuse wurden eingeschläfert, um ihre Hinterbeine zu entnehmen. Nach Entfernung der Muskeln am Bein wurden der gewonnene Femur und die Tibia 5 Minuten lang in 70 %iges Ethanol getaucht und anschließend in normales RPMI-1640-Medium gegeben. Alle nachfolgenden Schritte wurden unter der Laminar-Flow-Haube durchgeführt. Eine Seite des Oberschenkelknochens oder des Schienbeins wurde eingeschnitten und mit der Schnittfläche nach unten in ein 0,5-ml-Röhrchen gelegt, dessen Boden zuvor mit einer G18-Nadel durchstoßen worden war. Das kleinere Röhrchen mit den Knochen wurde anschließend in ein 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen eingesetzt und 15 Sekunden lang bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde gesammelt und in einer Dichte von 1×10^7 Zellen pro Schale in einer 100-mm-Petrischale mit 10 ml RPMI-1640-Medium, ergänzt mit 0,05 mM 2-Mercaptoethanol und 20 ng/ml Maus-GM-CSF, resuspendiert. Nach 3 Tagen wurden 10 mL des Mediums, das 20 ng/mL Maus-GM-CSF enthielt, in jede Schale gegeben. Am 5. Tag wurden die lose anhaftenden Zellen gesammelt, resuspendiert und 30 Minuten lang bei 37 °C in 50 % FBS gehalten. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten lang bei $200 \times g$ zentrifugiert und mit einem PE-markierten Anti-Maus-CD11c-Antikörper gefärbt, um die Reinheit der DCs mittels eines Attune NxT-Durchflusszytometers zu bewerten. BMDCs galten als bereit für die nachfolgenden Experimente, wenn die Reinheit 80 % erreichte.

mRNA-Aufnahme und Transfektion in BMDCs

BMDCs wurden mit einer Dichte von 120.000 Zellen pro Vertiefung in 96-Well-Platten ausgesät und 1, 4 und 8 Stunden lang mit Formulierungen behandelt, die insgesamt 200 ng mRNA enthielten, darunter 20 % mit Alexa Fluor 647 markierte mRNA. Nach der Inkubation wurden die BMDCs geerntet, um mittels Durchflusszytometrie (Attune NxT) sowohl den prozentualen Anteil an Alexa-Fluor-647-positiven Zellen als auch den MFI zu messen. Zusätzlich wurden Zellen, die mit den Formulierungen behandelt, aber nicht von den Platten abgelöst worden waren, mit 5 µg/mL DAPI gefärbt und unter einem EVOS M5000-Mikroskop (Thermo Fisher Scientific) mit einem 20×-Objektiv abgebildet.

Zur Transfektion von BMDCs mit Fluc-mRNA wurden 120.000 Zellen pro Vertiefung in 96-Well-Platten ausgesät und anschließend jeweils 24 bzw. 48 Stunden lang mit Formulierungen inkubiert, die 200 ng Fluc-mRNA enthielten. Die Zellen in jeder Vertiefung wurden durch Zentrifugation bei $500 \times g$ für 5 Minuten in ein 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen gesammelt und anschließend in 100 µl 0,5×-Zellkultur-Lysispuffer resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Luciferase- -Aktivität in 35 µl Zelllysate wie zuvor beschrieben gemessen. Die Transfektionsergebnisse werden als RLU/mg angegeben.

Antigenpräsentation und BMDC-Reifung

BMDCs wurden mit einer Dichte von 300.000 Zellen pro Vertiefung in 24-Well-Platten ausgesät und jeweils 24 bzw. 48 Stunden lang mit Formulierungen inkubiert, die 500 ng OVA-mRNA enthielten. Mit der gleichen Menge an freier OVA-mRNA behandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Nach der Inkubation wurden die Zellen 20 Minuten lang bei Raumtemperatur mit Zombie Violet gefärbt und gleichmäßig aufgeteilt. Die Hälfte der Zellen wurde zur Untersuchung der Antigenpräsentation verwendet, gefolgt von einer 30-minütigen Färbung mit dem PE-markierten Anti-Maus-H-2Kb/SIINFEKL-Antikörper. Der Anteil der PE-positiven Zellen wurde mit

einem Attune NxT-Durchflusszytometer analysiert. Die andere Hälfte wurde für die Analyse der BMDC-Reifung verwendet, nach einer Färbung mit den Antikörpern BV605 gegen Maus-CD11c, APC gegen Maus-MHC Klasse II, FITC gegen Maus-CD40 oder FITC gegen Maus-CD80 sowie APC gegen Maus-CD86 für 30 Minuten bei 4 °C. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle auf der Oberfläche der BMDCs wurde mittels Durchflusszytometrie (Attune NxT) bestimmt.

Kokultur von transfizierten BMDCs und CD8⁺ T-Zellen

16 Wochen alte OT-1-Mäuse wurden getötet und ihre Milzen zur weiteren Verarbeitung entnommen. Die Isolierung von CD8⁺T-Zellen erfolgte unter Verwendung eines von Miltenyi bezogenen Isolierungskits für CD8a⁺T-Zellen der Maus. Zunächst wurden die Milzen durch 70-µm-Zellsiebe zerkleinert, um Einzelzellsuspensionen zu erhalten. Die Zellen wurden gezählt und anschließend in MACS-Puffer, der einen Biotin-Antikörper-Cocktail enthielt, resuspendiert und 5 Minuten lang inkubiert. Danach wurden die Zellen weitere 10 Minuten bei 4 °C mit Anti-Biotin-Mikroperlen inkubiert. Schließlich wurden insgesamt 1×10^6 Zellen zur weiteren Trennung auf eine LS-Säule aufgetragen. Die isolierten Zellen wurden mit einem FITC-markierten Anti-Maus-CD8a-Antikörper gefärbt und anschließend mit einem Attune NxT-Durchflusszytometer gemessen, um den prozentualen Anteil an CD8⁺-T-Zellen zu bestimmen.

BMDCs wurden mit einer Dichte von 600.000 Zellen pro Vertiefung in 12-Well-Platten ausgesät und anschließend 24 Stunden lang mit verschiedenen Formulierungen transfiziert, die 1 µg OVA-mRNA enthielten. Mit leeren PLGA/PBAE-Nanopartikeln behandelte BMDCs sowie mit SARS-CoV-2-Spike-Protein-mRNA beladene PLGA/PBAE-Nanopartikel dienten jeweils als Negativkontrolle bzw. zur Überprüfung einer irrelevanten Antigenkontrolle. Nach 24 Stunden Transfektion wurden 200.000 BMDCs in 12-Well-Platten ausgesät, und anschließend wurden 1×10^6 isolierte CD8⁺T-Zellen von OT-1-Mäusen in jede Vertiefung gegeben.

Nach einer Kokulturzeit von 1 Stunde wurde in jede Vertiefung eine verdünnte Monensin-Lösung gegeben, um die Zytokin-Exozytose zu hemmen.⁵⁹ Die Zellen wurden weitere 5 Stunden kokultiviert und anschließend zur Lebend-/Tot-Färbung mit Zombie Violet inkubiert, gefolgt von einer Färbung mit FITC-markierten Anti-Maus-CD8a- und APC-markierten Anti-Maus-IFN-γ-Antikörpern für 30 Minuten bei 4 °C. Schließlich wurden die Zellen mit einem Attune NxT-Durchflusszytometer analysiert. Parallel dazu wurde ein weiterer Satz von Zellen 72 Stunden lang ohne Zugabe von Monensin kontinuierlich in Kokultur gehalten. Nach der Inkubation wurde das Zellkulturmedium aus jeder Vertiefung entnommen, um die IFN-γ-Konzentration mithilfe des ELISA MAX Standard Set Mouse IFN-γ-Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers zu messen.

Zur Untersuchung der T-Zell-Proliferation wurden aus OT-1-Mäusen isolierte CD8⁺T-Zellen zunächst mit CFSE in einer Konzentration von 4 µM im Zellkulturmedium markiert und anschließend wie zuvor beschrieben mit den transfizierten BMDCs kokultiviert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen entnommen und mit Zombie Violet sowie anschließend mit dem APC-Cy7-Anti-Maus-CD8-Antikörper markiert. Schließlich wurden die prozentualen Anteile der unterteilten Untergruppe der CD8⁺T-Zellen mithilfe eines Attune NxT-Durchflusszytometers analysiert.

mRNA-Aufnahme und Transfektion in ALI-Zellen

Calu-3-Zellen wurden mit einer Dichte von 250.000 Zellen pro Vertiefung auf der apikalen Seite von Transwell-Polyester-Zellkultur-Einsätzen (6,5 mm, 0,4 µm Porengröße) ausgesät. Das basolaterale Kompartiment wurde mit 700 µL normalem EMEM-Medium gefüllt. Nach 3 Tagen wurde das Medium in der apikalen Kammer entfernt und das Medium in der basolateralen Kammer durch 300 µL PneumaCult-ALI-Medium (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada) ersetzt, um eine ALI-Kondition herzustellen. Das ALI-Medium veränderte sich alle 3 Tage. Nach 7 Tagen Kultur wurde der TEER-Wert mit einem EVOM-Epithel-Volt/Ω-Messgerät (World Precision Instruments, Sarasota, USA) gemessen. Sobald die TEER-Werte 300 Ω·cm² erreichten, galten die ALI-Zellen als bereit für die nachfolgenden Experimente.

Die unter ALI-Bedingungen kultivierten Calu-3-Zellen wurden mit verschiedenen Formulierungen behandelt, die 500 ng mRNA (20 % Alexa Fluor 647-markierte mRNA) enthielten, und 24 Stunden lang inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Flüssigkeit aus der apikalen Kammer vorsichtig abgesaugt. Eine 100-µL-Mischung aus Hoechst 33342 (Konzentration 50 µg/mL) und AF488-markiertem Weizenkeim-Agglutinin wurde auf die apikale Seite gegeben. Die Transwell-Einsätze wurden in die basolaterale Kammer gesetzt, die mit 400 µL einer Hoechst-33342-Lösung in derselben Konzentration gefüllt war. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 20 Minuten wurden die ALI-Monolayer dreimal vorsichtig mit PBS sowohl von der apikalen als auch von der basolateralen Seite gespült. Die Membran wurde aufgeschnitten und unter Verwendung von FluorSave-Reagenz auf Objektträger aufgebracht und sofort mit einem SP8-Invers-CLSM (Leica) mit einem 40×-Ölimmersionsobjektiv beobachtet. Die Bilder wurden aus der Leica Image Analysis Suite exportiert und mit dem Fuji-Plug-in von ImageJ verarbeitet.

Für die Transfektion von ALI-Zellen mit Fluc-mRNA wurden auf der apikalen Seite dieselben Behandlungen mit Formulierungen durchgeführt, die 500 ng Fluc-mRNA enthielten. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Transwells zweimal mit 300 µL PBS gewaschen, und anschließend wurden 200 µL 0,5× Zellkultur-Lysispuffer (Promega) in jede Vertiefung gegeben. Die Zelllysate wurden nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur durch gründliches Pipettieren gewonnen. Die Luciferase-Aktivität in 35 µL Zelllysate wurde wie zuvor beschrieben gemessen. Die Transfektionseffizienz wird in RLU/mg angegeben.

mRNA-Aufnahme und Transfektion in hPCLS

Menschliches Lungengewebe wurde aus dem CPC-M-Bioarchiv am Comprehensive Pneumology Center (CPC), dem Universitätsklinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität (München, Deutschland) und der Asklepios-Biobank für Lungenerkrankungen (Gauting, Deutschland) bezogen. Die Verwendung von menschlichem Lungengewebe in dieser Studie wurde von der lokalen Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München (Projekt 19-630) genehmigt, und alle Teilnehmer gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme ab. Wir bedanken uns herzlich für die Bereitstellung von menschlichem Lungengewebe und klinischen Daten durch das CPC-M-BioArchiv und seine Partner. Wir danken den Patienten und ihren Familien für ihre Unterstützung. hPCLS wurden aus tumorfreiem Gewebe gemäß einer früheren Beschreibung hergestellt.⁶⁰ Das Lungengewebe wurde mit einer 3-prozentigen Agarose-Lösung aufgebläht und bei 4 °C verfestigt. Anschließend wurden mit einem Vibrationsmikrotom (HyraxV50) (Karl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) Lungenschnitte mit einer Dicke von 500 µm aus den Gewebestücken geschnitten. Die hPCLS wurden in DMEM-F-12-Medium,

ergänzt mit 0,1 % FBS, kultiviert. Vor den Experimenten wurden die hPCLS zu kleinen Stanzlingen mit einem Durchmesser von 4 mm verarbeitet.

Die hPCLS wurden 24 Stunden lang in das Kulturmedium getaucht, das mit mRNA beladene Formulierungen (mit 20 % Alexa Fluor 647-markierter mRNA) in einer Endkonzentration von 1 µg/mL Gesamt-mRNA enthielt. Anschließend wurden die hPCLS 30 Minuten lang mit einer 4%igen PFA-Lösung fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte weitere 30 Minuten lang mit einer 5 µg/mL DAPI-Lösung gefärbt. Anschließend wurden die hPCLS mit FluorSave-Reagenz auf Objektträger aufgebracht und mit einem SP8-Invers-CLSM (Leica) mit einem 20×-Objektiv beobachtet. Die aufgenommenen Bilder wurden mit dem Fiji-Plugin von ImageJ verarbeitet.

Zur Transfektion mit Fluc-mRNA wurden die hPCLS 24 Stunden lang mit verschiedenen Formulierungen behandelt, die jeweils 1 µg Fluc-mRNA enthielten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte zweimal mit PBS gespült und anschließend in kleine Stücke geschnitten. Die hPCLS-Fragmente wurden in 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen überführt und in 200 µl 0,5×-Zellkultur-Lysispuffer (Promega) eingetaucht. Nach drei Gefrier-Auftau-Zyklen wurde das Gewebelysats zur Messung der Luciferase-Aktivität wie zuvor beschrieben verwendet.

Vernebelung

mRNA-beladene PLGA/PBAE-Nanopartikel wurden wie zuvor beschrieben hergestellt. SM-102-LNPs wurden in einem Molverhältnis von SM-102 (ionisierbares Lipid):Cholesterin:1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DSPC):PEG-2000-DMG = 50:38,5:10:1,5 (N/P 6) formuliert. Frisch hergestellte Suspensionen wurden sofort mit einem Aerogen Pro-Gerät vernebelt, und die erhaltenen Aerosole wurden zur weiteren Analyse in vorgekühlten 15-ml-Falcon-Röhrchen aufgefangen.

Aerosolcharakterisierung mittels Laserdiffraktion

Die Tröpfchengrößenverteilung des Aerosols wurde mittels Laserdiffraktion gemessen. Mit EGFP-mRNA beladene PLGA/PBAE-Nanopartikel wurden mit dem Aerogen Pro direkt in einen HELOS-Laserdiffraktor (Sympatec, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) vernebelt, der mit einer R2-Linse und einem INHALER-Modul ausgestattet war. Das Aerosol wurde über ein gelochtes Silikonmundstück unter Verwendung eines Aerogen Pro-T-Stücks zugeführt, das 50–100 mm stromaufwärts des Laserstrahls positioniert war. Der Aufbau wurde in einer Plexiglasbox eingeschlossen, um während der Messung eine relative Luftfeuchtigkeit von > 70 % aufrechtzuerhalten. Das Aerosol wurde mit einer Durchflussrate von 13,9 L/min abgesaugt, um ein Zurückfließen in den Strahlengang zu verhindern. Jede Messung umfasste drei Durchläufe à 5 s mit einer Signalintegrationszeit von 200 ms. Die Experimente wurden dreifach durchgeführt ($n = 3$).

Einkapselungseffizienz und mRNA-Verlust nach der Vernebelung

Die mRNA-Verkapselung wurde sowohl für die PLGA/PBAE-Proben vor als auch nach der Vernebelung mittels des SYBR-Gold-Assays quantifiziert, während der mRNA-Verlust ausschließlich für die Proben nach der Vernebelung im Verhältnis zu ihren Ausgangsmengen vor der Vernebelung berechnet wurde. Freie mRNA diente als 100-%-Referenz. PLGA/PBAE-Proben, die theoretisch 55 ng mRNA enthielten,

wurden entweder mit 10 µL einer 2-prozentigen Triton-X-Lösung und 10 µL Heparinlösung (2.000 IE/mL) in einer 384-Well-Platte bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert, um eine vollständige Freisetzung der mRNA zu erreichen, oder mit 20 µL Puffer, um die nicht eingekapselte mRNA zu quantifizieren. Anschließend wurden 8,25 µL einer 4× SYBR Gold-Lösung in jede Vertiefung gegeben und die Proben vor der Fluoreszenzmessung 10 Minuten im Dunkeln inkubiert, wie zuvor beschrieben.

Bei den LNP-Formulierungen wurde die mRNA-Einkapselung mithilfe des Quant-iT RiboGreen RNA-Assays quantifiziert. Kurz gesagt wurden 5 µL jeder LNP-Probe in eine 384-Well-Platte gegeben und mit 10 µL 2 %igem Triton X bzw. 10 µL 1× Tris-EDTA-Puffer als Kontrolle für die vollständige Freisetzung bzw. als Kontrolle für nicht eingekapselte mRNA inkubiert. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37 °C wurden 5 µL des 100-fach verdünnten RiboGreen-Reagenzes in jede Vertiefung gegeben und 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Ex-Wellenlänge von 480 nm und einer Em-Wellenlänge von 525 nm gemessen.

mRNA-Integrität nach der Vernebelung

Die durch Vernebelung von PLGA/PBAE- und SM-102-LNP-Formulierungen erzeugten Aerosole wurden in gekühlten 15-ml-Röhrchen aufgefangen. Die mRNA aus den Proben vor und nach der Vernebelung wurde mit einem RNeasy Mini Kit (QIAGEN) gereinigt, und die entsprechende Integrität wurde mit einem Agilent Bioanalyzer unter Verwendung des RNA 6000 Pico Kits bewertet.

mRNA-Transfektion in DC2.4-Zellen nach der Vernebelung

DC2.4-Zellen wurden mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro Vertiefung in 96-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden lang mit den vor und nach der Vernebelung gewonnenen PLGA/PBAE- und SM-102-LNP-Formulierungen behandelt. Nach der Inkubation wurde die GFP-Expression mittels Durchflusszytometrie (Attune NxT, Thermo Fisher Scientific) quantifiziert.

Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwerte $\pm$ SD angegeben. Alle statistischen Analysen wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) in GraphPad Prism oder, sofern ausdrücklich angegeben, mittels Student-t-Test durchgeführt. Signifikanzniveaus wurden wie folgt angegeben: ns, nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Verfügbarkeit von Ressourcen

Hauptansprechpartnerin

Anfragen für weitere Informationen und sonstige Anfragen sind an die Hauptansprechpartnerin Olivia M. Merkel (olivia.merkel@lmu.de) zu richten und werden von ihr bearbeitet.

Verfügbarkeit von Materialien

Im Rahmen dieser Studie wurden keine neuen, einzigartigen Reagenzien entwickelt.

Verfügbarkeit von Daten und Code

Alle in diesem Artikel genannten zusätzlichen Informationen oder Daten werden auf Anfrage von der [Hauptansprechpartnerin](#) zur Verfügung gestellt.