

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Proteinbeladene Mikropartikel

Der Begriff Mikropartikel beschreibt Teilchen mit einem Durchmesser von 1-1000 μm , bei pharmazeutischen bzw. medizinischen Applikationen werden als Mikropartikel üblicherweise sphärische Teilchen im mittleren bis unteren Mikrometerbereich bezeichnet. Mikropartikel aus bioabbaubaren Polymeren werden als Arzneistoffträgersysteme intensiv beforscht. Sie können hinsichtlich ihrer Ultrastruktur in Mikrokapselfn und Mikrosphärulen eingeteilt werden (s. Abb. 1). Als Mikrokapselfn werden Teilchen bezeichnet, die den Arzneistoff in einem zentralen, polymerummantelten Hohlraum enthalten. Ein Riss in der Kapselwand führt zur schnellen Freisetzung des Wirkstoffes. Bei Mikrosphärulen ist der Arzneistoff in der Polymermatrix gelöst oder dispergiert und somit relativ homogen verteilt.

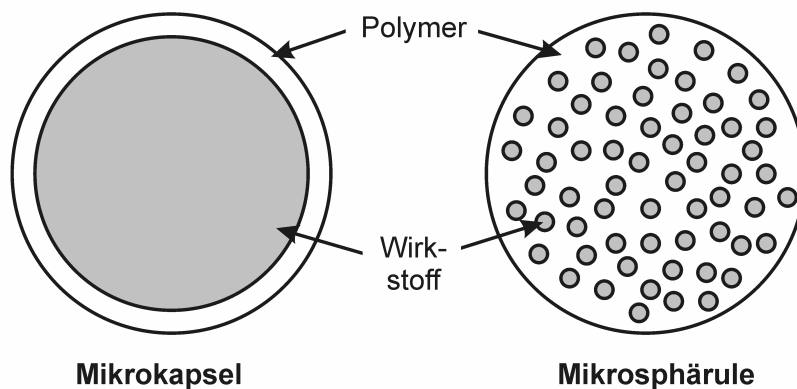


Abb. 1: Schematische Darstellung von Mikrokapselfn und Mikrosphärulen (nach Fahr und Kissel 1998)

1.1.1 PLGA

Polymilchsäure und ihre Copolymere sind die für die Herstellung von Depotarzneiformen am intensivsten untersuchten bioabbaubaren Polymere. Sie werden als resorbierbares chirurgisches Nahtmaterial genutzt und stellen die Matrix von auf dem Markt befindlichen arzneistoffhaltigen Implantaten (z. B. Zoladex[®]) und Mikropartikeln (z. B. Enantone Depot[®]) dar. Wie in Tabelle 1 dargestellt, sind eine Vielzahl solcher Polymere und Copolymere

1. Einleitung

kommerziell verfügbar. Polyester von L-Milchsäure, des Racemates D,L-Milchsäure und Copolymere aus L-Lactid mit D-Lactid oder mit D,L-Lactid werden langsam abgebaut und sind sehr hydrophob. Für die Einbettung von Arzneistoffen mit einer gewünschten Wirkstofffreigabe innerhalb von einer Woche bis zu einigen Monaten werden daher hydrophilere und damit besser benetzbare Copolymere von D,L-Milchsäure mit Glycolsäure [PLGA, poly(lactic-co-glycolic acid)] verwendet. Die Hydrophobizität des Polymers kann zusätzlich reduziert werden, wenn die Carboxylfunktionen an den Kettenenden nicht verestert werden (z. B. bei Resomer[®] RG 502H). Solche Polymere werden überwiegend für die Verkapselung von Proteinen eingesetzt.

Neben PLGA werden auch Polyester anderer Hydroxycarbonsäuren, wie Poly-3-Hydroxybuttersäure, Poly-3-Hydroxyvaleriansäure und Polycaprolacton, sowie Polyorthoester, Polyanhydride und natürliche Polymere wie Gelatine und Chitosan als bioabbaubare Matrices für Arzneistoffträgersysteme untersucht (Domb 1994).

Tab. 1: Kommerziell verfügbare Polymere und Copolymere der Milchsäure (gezeigt für den Hersteller Boehringer Ingelheim).

Polymer	Handelsbezeichnung (Beispiele)
Poly(L-Lactid)	Resomer [®] L 210
Poly(D,L-Lactid)	Resomer [®] R 208
Poly(L-Lactid-co-D,L-Lactid) 70:30	Resomer [®] LR 706
Poly(L-Lactid-co-Glycolid) 85:15	Resomer [®] LG 857
Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid) 50:50	Resomer [®] RG 502
Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid) 50:50, Carboxylgr. frei	Resomer [®] RG 502H

Synthese

Bei PLGA handelt es sich meist um statistische Copolymere, die durch Ringöffnungspolymerisation (s. Abb. 2) aus zyklischen Diestern von Milchsäure und Glycolsäure unter Katalyse mit Zinn-, Zink- oder Aluminiumverbindungen hergestellt werden (Ogawa et al. 1988, Couvreur et al. 1997, Stridsberg et al. 2002). Durch direkte Vakuumschmelzpolykondensation der Monomere können meist nur niedermolekulare Polymere erzeugt werden (Bendix 1998). Kürzlich wurde eine Ringöffnungspolymerisation in

1. Einleitung

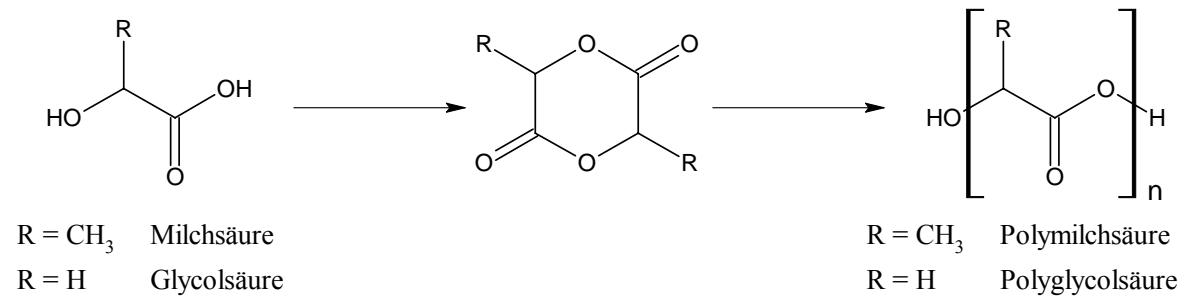
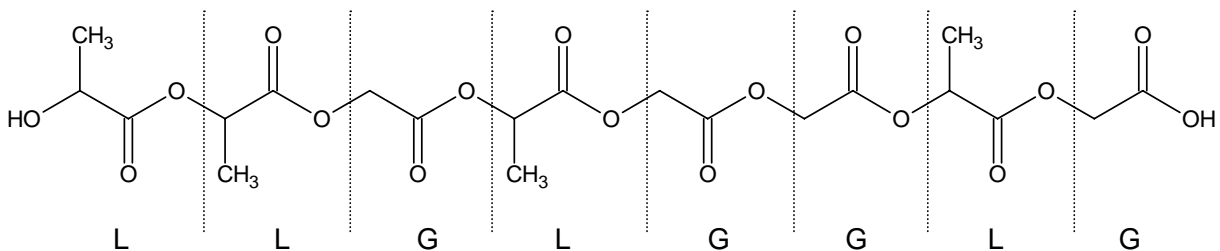
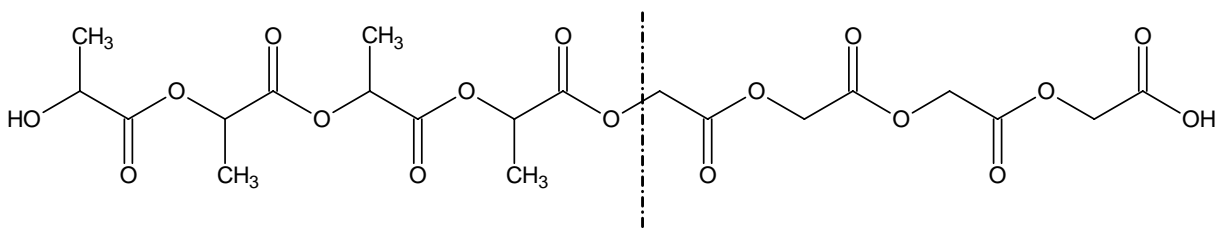


Abb. 2: Prinzip der Ringöffnungspolymerisation

überkritischen Gasen beschrieben, die in einem kontinuierlichen Prozess mit der Abtrennung nicht umgesetzter Monomere und der Herstellung von Mikropartikeln kombiniert wurde (Pack et al. 2004). Die Eigenschaften der statistischen Copolymere (s. Abb. 3) werden durch die Monomerenanteile, die Molmasse des Polymers und ggf. die Veresterung der Carboxyl-Endgruppen bestimmt. Für die Synthese von Block-Copolymeren können zwei oder mehr polymere Ausgangsmaterialien (z. B. Polymere bestehend aus nur L-Milchsäure und nur Glycolsäure) eingesetzt und durch Kettenaustausch in der Schmelze verknüpft werden (Rafler und Müller 1993, Rafler und Jobmann 1994). Die für die Proteinverkapselung als vorteilhaft beschriebenen ABA-Tri-Blockpolymere, in denen PLGA den A- und Polyethylenglycol (PEG) den zentralen hydrophilen B-Block bildet, können durch Kopplung von Milchsäure und Glycolsäure an das vorgelegte PEG über Ringöffnungspolymerisation erhalten werden (Li und Kissel 1993, Li et al 1994, Kissel et al. 1996, Kissel et al. 2002).



Beispiel für statistisches PLGA (50:50) Copolymer



Beispiel für PLGA (50:50) Block-Copolymer

Abb. 3: Aufbau von statistischem PLGA-Copolymer und PLGA-Block-Copolymer.

Polymerabbau und Metabolisierung

Der Begriff des Polymerabbaus (syn. Degradation) beschreibt den Vorgang der Spaltung von Esterbindungen im Polymerrückgrat. Hingegen bezeichnet Erosion (syn. Zerfall) den physikalischen Vorgang der Entfernung von abgespaltenem Matrixmaterial, z. B. von Monomeren, Oligomeren oder sogar von ungespaltenen Teilen der Matrix in das Umgebungsmedium (Tamada und Langer 1993, Göpferich 1996a, Göpferich 1996b). Die Erosion des Polymers wird also durch den Abbau initiiert, welcher in chemische, mechanische, thermische und durch Strahlung ausgelöste Degradation unterteilt werden kann. Der chemische Abbau von PLGA erfolgt durch spontane Hydrolyse der Esterbindung, die dabei entstehenden Carboxylfunktionen können den Abbau autokatalytisch beschleunigen. Grundsätzlich werden kürzere Abbauzeiten beobachtet, wenn das Molekulargewicht sinkt, der Glycolidanteil steigt, die Temperatur erhöht wird, der pH-Wert den neutralen Bereich verlässt und wenn amorphe statt semikristalliner oder kristalliner Polymere verwendet werden (Chu 1981, Witschi und Doelker 1998a, Li 1999, Dunne et al. 2000). Der hydrolytische Angriff in der PLGA-Kette erfolgt bevorzugt an den hydrophileren Glycolid-Einheiten (Li et al. 1990a, Park 1995, Apeldoorn et al. 2004). Im Inneren der PLGA-Matrix kumulieren Glycolsäure, Milchsäure sowie Milchsäureoligomere, wobei Glycolsäure schneller als die anderen Fragmente durch Diffusion freigesetzt wird (Ding und Schwendeman 2004).

Bei Anwesenheit bestimmter Enzyme (z. B. Proteinase K, Bromelain) konnte experimentell eine Beschleunigung der Abbaurate festgestellt werden. Auch bei Inkubation von PLGA-Matrices mit Mikroorganismen zeigten sich beschleunigte Abbauraten. Es wurde angenommen, dass der initiale Abbau durch spontane Hydrolyse erfolgt und anschließend enzymatische Hydrolyse einsetzt (Salthouse und Matlaga 1976, Hakkarainen 2002). Hingegen konnte bei Inkubation eines PLGA-Schaumes mit dem Enzym Trypsin zwar ein beschleunigter Zerfall, nicht aber eine verstärkte Abnahme des Molekulargewichtes der PLGA-Ketten (Abbau) verzeichnet werden, weshalb man den Trypsineinfluss als einen Detergens-Effekt beschrieb (Cai et al. 2003).

Die Überlegungen zur Beteiligung von Enzymen an der Hydrolyse der PLGA-Matrix sind deshalb von Relevanz, weil die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mikropartikel für das Targeting dendritischer Zellen (DCs) bestimmt und somit im Phagolysosom der DCs einem sowohl sauren als auch enzymhaltigen Milieu ausgesetzt sind (s. Abschnitt 1.6). In Bezug auf die Freisetzung verkapselter Proteine sind daher starke Unterschiede zwischen den Ergebnissen eines Freisetzungstests und den Vorgängen in der Zelle zu erwarten. Dies

bestätigen nicht-invasive Untersuchungen an PLGA-Mikropartikeln nach Phagozytose durch Makrophagen, die einen beschleunigten Abbau im phagolysosomalen Milieu aufzeigten (Apeldoorn et al. 2004).

Die entstehenden Monomere werden unverändert renal ausgeschieden (D-Milchsäure) oder im Citratzyklus zu CO_2 metabolisiert (L-Milchsäure, Glycolsäure), welches pulmonal eliminiert wird (Brady et al. 1973). Neben der Bioabbaubarkeit ist PLGA für eine im Allgemeinen gute Biokompatibilität bekannt (Cutright et al. 1971, Laurencin und Elgendy 1994, Anderson und Shive 1997). Bei speziellen Anwendungsgebieten muss gegebenenfalls die Bildung sauer reagierender Abbauprodukte berücksichtigt werden.

Polymererosion und Wirkstofffreigabe

Der Prozess der Polymererosion ist viel komplexer als der Abbau, da neben der Degradation viele Faktoren einen Einfluss haben, z. B. das Quellverhalten und die Glasübergangstemperatur des Polymers, die Diffusion von Wasser in die Matrix, die Löslichkeit und Diffusionseigenschaften der Monomere und Oligomere, die Größe und Porosität der Matrix sowie die Veränderungen von Ultrastruktur und Kristallinität der erodierenden Polymermatrix (Göpferich und Langer 1993, Göpferich 1996a, Göpferich 1996b). Die Erosion von Polymeren (s. Abb. 4) kann grundsätzlich als Oberflächenerosion bzw. nach dem verwandten

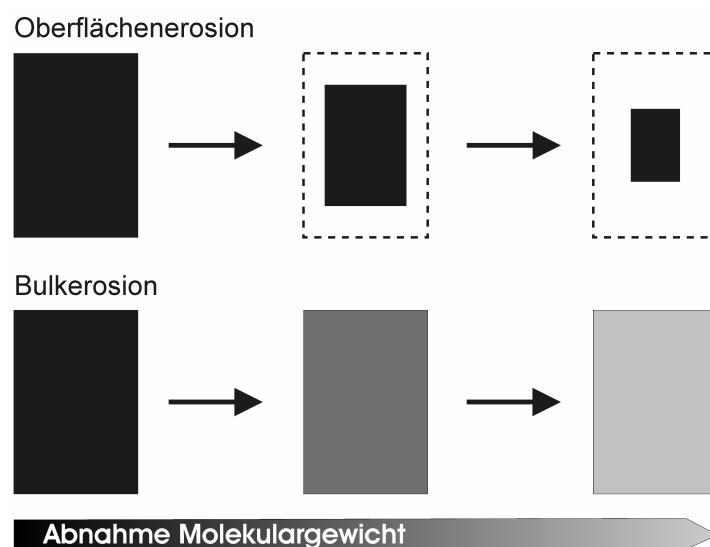


Abb. 4: Prinzip der Oberflächen- und Bulkerosion (modifiziert nach Göpferich 1996a und 1996b).

„surface erosion front“-Mechanismus (Mathiowitz et al. 1993) oder als Bulkerosion erfolgen. Der stattfindende Mechanismus der Erosion hängt unter anderem vom pH-Wert, den Ausmaßen der Matrix und der Wasserdiffusion in diese ab (Burkersroda et al. 2002). Für PLGA-Filme wird von der Mehrheit der Autoren bei neutralem pH eine heterogene Erosion des Polymers ähnlich einer Bulkerosion beschrieben, wobei dickere Filme schneller zerfallen als dünnere (Li et al. 1990a und b, Tamada und Langer 1993, Lu et al. 1999, Grayson et al. 2005). Mechanistisch wurde dies durch die im Inneren der Matrix freigesetzten Säuren erklärt, die bei PLGA-Filmen und -Mikropartikeln autokatalytisch den Abbau beschleunigen (Park 1995). Es finden sich jedoch auch einige Beschreibungen von PLA- oder PLGA-Mikropartikeln, die eine homogene Bulkerosion zeigen (Grizzi et al. 1995, Anderson und Shive 1997, Witschi und Doelker 1998a).

Die Freigabe der eingeschlossenen Arzneistoffe kann prinzipiell erosions-, diffusions- oder quellungskontrolliert verlaufen. Bei der Proteinverkapselung in PLGA ist aufgrund des hohen Molekulargewichtes der Proteine kaum eine diffusionsgesteuerte Freisetzung zu erwarten. Vielmehr ist, abgesehen vom burst-release oberflächenassoziierter Proteine, eine erosionskontrollierte Freigabe wahrscheinlich (Cohen et al. 1991). Bei ABA-Block-Copolymeren aus PLGA und PEG konnte eine Kombination aus Diffusion durch die gequollene PEG-Matrix und erosionsgesteuerter Freisetzung beobachtet werden (Li et al. 1994, Kissel et al. 1996, Kissel et al. 2002).

1.1.2 Herstellung proteinbeladener Mikropartikel

Für die Herstellung von biodegradablen Mikropartikeln sind eine Vielzahl von Methoden beschrieben worden, aus denen in Abhängigkeit von der zu verkapselnden Substanz und dem verwendeten Polymer ein geeignetes Verfahren ausgewählt werden muss. PLGA- oder PLA-Mikropartikel können unter anderem durch Koazervation (Ruiz und Benoit 1991, Rafler und Jobmann 1997, Jeon et al. 2000 und 2003), nach einem Sprüh-Kollisions-Koazervations-Prinzip (solvent exchange, Yeo et al. 2004), unter Verwendung überkritischer Gase (Debenedetti et al. 1993, Witschi und Doelker 1998b), mit einer Emulsions-Lyophilisations-Technik (Sato et al. 1988), mit der „hot melting“-Methode (Wichert und Rohdewald 1990), durch Hochdruckhomogenisation (Calvör und Müller 1998) oder einem kryogenen Sprüh-Extraktionsverfahren (Johnson et al. 1997, Cleland et al. 1997, Herbert et al. 1998) hergestellt werden.

Für die Proteinverkapselung sind die genannten Methoden jedoch nicht ohne weiteres anwendbar oder sie sind apparativ sehr aufwendig. Daher werden Proteine überwiegend mit den in Abbildung 5 dargestellten Verfahren verkapselt. Am häufigsten werden Lösungsmittelverdampfungs- bzw. Extraktionsmethoden eingesetzt, da sie in kleinem Maßstab gut durchführbar sind und nicht zwingend kostspielige Gerätschaften erfordern. Das Matrixpolymer wird hierbei in einem organischen Lösungsmittel (s. Abschnitt 1.1.3) gelöst (O-Phase). In dieser O-Phase wird anschließend entweder eine Lösung des zu verkapselnden Proteins emulgiert (W/O) oder ein Protein-Feststoff (engl. solid) suspendiert (S/O). Die W/O bzw. S/O-Dispersion kann nun entweder in eine externe Wasserphase (W/O/W bzw. S/O/W) oder eine externe Ölphase (W/O/O bzw. S/O/O) emulgiert werden. Das organische Lösungsmittel der polymerhaltigen O-Phase wird im Folgenden durch Evaporation entfernt, so dass das Polymer präzipitiert und Mikropartikel entstehen. Die Verdampfung des flüchtigen organischen Lösungsmittels wird meist bei Raumtemperatur und Normaldruck unter Rühren durchgeführt. Bei Zugabe großer Volumina einer externen Phase, in der das organische Lösungsmittel der polymerhaltigen O-Phase eine begrenzte Löslichkeit zeigt und

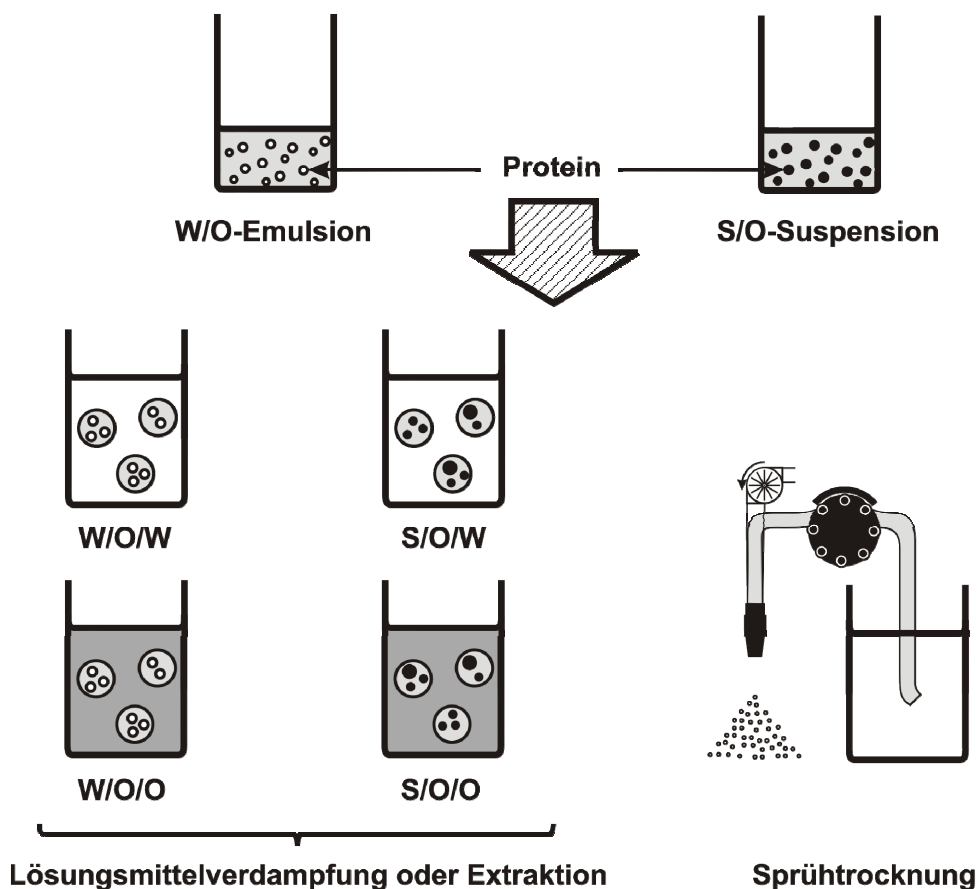


Abb. 5: Schematische Darstellung einer Auswahl häufig verwendeter Techniken in der Protein-Mikroverkapselung (modifiziert nach Kissel et al. 1996).

folglich dieser O-Phase besonders schnell entzogen wird, spricht man von Lösungsmittel-extraktion. Nach Aushärtung können die Mikropartikel durch Zentrifugation oder Filtration isoliert und im Vakuum oder durch Lyophilisation getrocknet werden. Bei der Sprühtrocknung werden die W/O bzw. S/O-Dispersion in einem gasdurchströmten Raum versprüht und die Prozesse der Mikropartikelformung und -trocknung kombiniert.

Das einfachste der genannten Verfahren ist die $W_1/O/W_2$ -Technik. Jedoch ist bei dieser Methode während des zweiten Emulgierschrittes ein Verlust des Proteins aus der W_1 -Phase in die W_2 -Phase und somit eine reduzierte Verkapselungseffizienz denkbar (Couvreur et al. 1997). Bei der W/O/O-Technik wurde daher die W_2 -Phase durch eine zweite O-Phase ersetzt, in der das Protein keine Löslichkeit zeigt. Häufig sind die als W/O/O-Extraktion beschriebenen Verfahren eher als Koazervation zu bezeichnen, da die verwendeten Ölphasen mischbar sind, aber die externe O-Phase kein Lösungsmittel für das Polymer darstellt (Yeh et al. 1996, Yeh 2000, Li et al. 2000).

Ein anderes Problem bei der $W_1/O/W_2$ -Technik ist möglicherweise die Denaturierung des Proteins an der W_1/O -Grenzfläche. Daher wurde die S/O/W entwickelt, bei der das Protein als Feststoff dispergiert wird und daher nicht einer W_1/O -Phasengrenze ausgesetzt ist (Castellanos et al. 2001, Castellanos et al. 2002). Werden hierbei jedoch zu grobe Proteinpulver eingesetzt, können sie nicht verkapselt werden oder die resultierenden Mikropartikel setzen fast allen Arzneistoff schlagartig (burst release) frei (Costantino et al. 2004). Daher muss eine geeignete Teilchengröße des Proteins in einem zusätzlichen aufwendigen Arbeitsschritt erreicht werden, etwa durch Gefriertrocknung mit Lyoprotektoren oder durch Lyophilisation nach Versprühen einer Proteinlösung in flüssigen Stickstoff (Carrasquillo et al. 2001a, Costantino et al. 2000 und 2002, Yu et al. 2006). In der S/O/O-Emulsionsmethode sind die beiden Verfahrensmodifikationen vereint (Blanco und Alonso 1998, Sánchez et al. 1999, Leach et al. 2005).

Neben den bereits genannten Prinzipien findet sich in der Literatur auch eine S/O-Koazervationsmethode, bei der das Matrixpolymer aus dem organischen Lösungsmittel durch langsame Zufuhr von Silikonöl ausgefällt wird (Carrasquillo et al. 2001a und b). Auf die Emulgierung bzw. Suspendierung des Proteins in der Polymerphase kann gänzlich verzichtet werden, wenn ein Cosolventien-System eingesetzt wird, in dem das Matrixpolymer und das Protein gleichermaßen löslich sind. Diese klare O-Phase wird dann in eine externe Wasserphase gegeben, wo durch spontane Emulgierung (Fu et al. 2003) oder unter Ultraschallbehandlung (Park et al. 1998) eine O/W-Emulsion entsteht und nach Lösungsmittelverdampfung Mikropartikel mit homogener Proteinverteilung vorliegen.

Die Sprühtrocknung ist für die Proteinverkapselung in PLGA-Mikropartikel gut geeignet (Bittner et al. 1998, Bittner und Kissel 1999, Johanson et al. 2000a, Freitas et al. 2004), besitzt jedoch neben der notwendigen apparativen Ausstattung unter anderem den Nachteil geringerer Ausbeuten im Labormaßstab und größerer benötigter Chargengrößen.

Sowohl die Emulsionsmethoden als auch die Sprühverfahren erfordern eine Dispergierung des Proteinfeststoffs oder seiner wässrigen Lösung in der Polymerphase, die Doppelemulsionsverfahren eine zusätzliche Emulgierung in der kontinuierlichen Phase. Die hierfür eingesetzten Geräte sind meist rotierende Labormischer (Vortexer), Rotor-Stator-Homogenisatoren (z. B. Ultra-Turrax[®]) oder Ultraschallstäbe. Mit Ultraschall können feinere Primäremulsionen erzeugt werden als mit dem Ultra-Turrax[®] (Wischke und Borchert 2006a, Abschnitt 3.3). Die Emulgiermethode kann einen Einfluss auf die Nativität des zu verkapselnden Proteins (Abschnitt 1.1.4), aber auch auf das Molekulargewicht und den Polydispersitätsindex des Matrixpolymers haben. In einem $W_1/O/W_2$ -Prozess konnte bei Ultraschallbehandlung der reinen Polymerlösung und der W_1/O -Emulsion eine Abnahme des PLGA-Molekulargewichtes beobachtet werden. Bei der Sekundäremulgierung war dieser Effekt stärker ausgeprägt und zusätzlich stieg der Polydispersitätsindex des Molekulargewichtes dramatisch an (Reich 1998).

Für die eigenen Experimente wurde die $W_1/O/W_2$ -Methode gewählt, da hier keine aufwendige Vorbereitung des einzuschließenden Proteins nötig ist (vgl. S/O/W) und teure oder nur begrenzt verfügbare Proteine in kleinen Chargengrößen verkapselt werden können (vgl. Sprühtrocknung). Die aus der Literatur bekannten Probleme der $W_1/O/W_2$ -Methode, wie eine niedrige Verkapselungseffizienz und die Denaturierung von Proteinen an der W_1/O -Grenzfläche sollen dabei gezielt untersucht werden. Auf die Nutzung von Ultraschall zur Sekundäremulgierung wurde verzichtet (Abschnitt 1.3).

1.1.3 Organische Lösungsmittel

Beim $W_1/O/W_2$ -Lösungsmittelverdampfungsverfahren wird das Matrixpolymer in einem flüchtigen, organischen Lösungsmittel solvatisiert. Während der Sekundäremulgierung wird die W_1/O -Phase in einer externen Wasserphase dispergiert, in der das organische Lösungsmittel eine geringe Löslichkeit zeigt und aus der es langsam verdampft. Damit wird das Lösungsmittel den W_1/O -Tröpfchen langsam entzogen, diese schrumpfen und schließlich präzipitiert das Matrixpolymer in Form von Mikropartikeln. Die Löslichkeit des organischen

Lösungsmittels in der externen Wasserphase hat einen entscheidenden Einfluss auf die Geschwindigkeit der Polymerpräzipitation und damit die Größe und Porosität der naszierenden Mikropartikel, die Verkapselungseffizienz und die Arzneistofffreisetzung. Sein Siedepunkt bestimmt die Geschwindigkeit der Evaporation von gelöstem Lösungsmittel aus der Wasserphase in die Luft. Löslichkeit und Siedepunkt beeinflussen den Restlösungsmittelgehalt in der Mikropartikelsuspension, der durch Vakuumtrocknung oder Lyophilisation weiter reduziert werden kann.

Dichlormethan wird bei der Mikroverkapselung als Standardlösungsmittel genutzt. Es besitzt gute Lösungseigenschaften für PLGA, hat einen niedrigen Siedepunkt und zeigt eine geringe Wasserlöslichkeit, weshalb es für die Bildung stabiler Emulsionen geeignet ist (s. Tabelle 2). Nachteilig ist die hohe akute Toxizität von Dichlormethan. Nach Aufnahme größerer Mengen können unter anderem ZNS-Störungen, Herzrhythmusstörungen und Atemlähmung auftreten. Bei chronischer Exposition gegenüber niedrigen Dosen besteht der Verdacht auf karzinogene Wirkung, wobei es auch anderslautende Berichte gibt (Jones 1996). Dessen ungeachtet wurde Dichlormethan aufgrund des potentiellen Risikos bei dauerhafter Zufuhr im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.) als Lösungsmittel Klasse II eingestuft und eine Höchstgrenze von 600 ppm in Arzneimitteln festgelegt.

Um Dichlormethan zu vermeiden, wurden in emulsionsbasierten Verkapselungsverfahren für die Polymerphase auch andere Lösungsmittel eingesetzt, z. B. Ethylacetat (Herrmann und Bodmeier 1995 und 1998, Sah 1997), Ethylformiat (Sah 2000), Methyläthylketon (Sah et al. 1996) und Butylacetat (Castellanos und Griebenow 2003). Bei *in situ*-Mikropartikeln wird vollständig auf derartige Lösungsmittel verzichtet (Jain et al. 2000, Kranz et al. 2001, Packhaeuser et al. 2004). Wie in Tabelle 2 zu ersehen ist, werden die letztgenannten Lösungsmittel im Vergleich zu Dichlormethan als weniger toxisch eingestuft, zeigen aber auch andere Wasserlöslichkeiten und Siedepunkte. Bei hoher Wasserlöslichkeit des Lösungsmittels muss das Phasenverhältnis von O- zu W₂-Phase optimiert und exakt eingehalten werden, um reproduzierbare Ergebnisse (Partikelgröße, Ultrastruktur, Verkapselungseffizienz) zu erzielen.

Die Wasserlöslichkeit des Lösungsmittels bezieht sich nicht nur auf die W₂-, sondern auch auf die proteinhaltige W₁-Phase in einem W₁/O/W₂-Prozess. Da wassermischbare organische Lösungsmittel zu Proteindenaturierung führen können, ist eine hohe Wasserlöslichkeit des organischen Lösungsmittels bei der W₁/O/W₂-Proteinmikroverkapselung möglicherweise nachteilig. Hingegen konnte in Untersuchungen zum Lösungsmiteleinfluss auf die Proteinestabilität bei einigen Proteinen das besser wasserlösliche

1. Einleitung

Ethylacetat als vorteilhaft identifiziert werden, nicht aber Dichlormethan (Alonso et al. 1994, Stureson und Carlfors 2000). In diesen Fällen scheint die Proteinadsorption und -entfaltung an der W_1/O -Grenzfläche (s. Abschnitt 1.1.4) bei Dichlormethan stärker ausgeprägt gewesen zu sein, was zeigt, dass nicht ein Parameter (z. B. Wasserlöslichkeit) allein betrachtet werden darf.

Auch der umgekehrte Prozess, nämlich die Löslichkeit von Wasser im organischen Lösungsmittel, kann die Proteinstabilität und Verkapselungseffizienz beeinflussen. In einem S/O/W-Prozess konnte gezeigt werden, dass hier Ethylacetat dem Dichlormethan unterlegen war (Castellanos und Griebenow 2003). Dies könnte damit erklärt werden, dass bei Ethylacetat mehr Wasser in die O-Phase eindringen kann (s. Tab. 2), das Protein hydratisiert und dieses zum einen aus der O- in die W_2 -Phase ausgeschleust wird (Verkapselungseffizienz sinkt) und zum anderen das hydratisierte Protein in der organischen Phase denaturiert.

Tab. 2: Eigenschaften^a der Lösungsmittel (LM).

LM	Löslichkeit (%)		Siedepunkt (°C)	Einstufung des LM (Ph. Eur.)	Grenzwerte (ppm)	
	LM in Wasser	Wasser in LM			Ph. Eur.	USP
Dichlormethan	1,32	0,20	39,8	Klasse 2	600	600
Butylacetat	0,68	1,20	126,6	Klasse 3	5000	5000 ^b
Ethylacetat	8,70	3,30	76,7	Klasse 3	5000	5000 ^b
Ethylformiat	13,60	4,50	54,7	Klasse 3	5000	5000 ^b
Methylethylketon	26,80	11,80	79,6	Klasse 3	5000	5000 ^b

^aLöslichkeit in % (m/m) bei 20 °C (Dichlormethan: 25 °C) und Siedepunkt nach Doolittle 1954; ^bAngaben gemäß FDA 1997.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Dichlormethan als Lösungsmittel für PLGA eingesetzt, da es einen niedrigen Siedepunkt zeigt, der bei Raumtemperatur und Normaldruck eine nahezu vollständige Evaporation innerhalb weniger Stunden erwarten lässt und seine geringe Wasserlöslichkeit möglicherweise für die Proteinstabilität von Vorteil ist. Der Restgehalt an Dichlormethan in den lyophilisierten Mikropartikeln sollte im Rahmen der Arbeit gemäß Arzneibuch mit GC-Headspace-Technik untersucht werden.

1.1.4 Stabilität von Proteinen bei der Mikroverkapselung und Freisetzung

In Hinblick auf die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit von Arzneimitteln mit Proteinwirkstoffen muss die Stabilität der Proteine bzw. die Abwesenheit potentiell schädlicher Derivate nachgewiesen werden (Niu und Chiu 1998). Bei den Betrachtungen zur Stabilität von mikroverkapselten Proteinen muss grundsätzlich zwischen den Vorgängen während der Herstellung der Mikropartikel und denen unter Freisetzungsbedingungen unterschieden werden. Der Begriff der Proteinstabilität umfasst Änderungen in der Konformation des Proteins (oft als physikalische Stabilität bezeichnet) sowie mögliche Reaktionen der Seitenketten und des Peptidrückgrates (sog. chemische Stabilität) [Wang 1999].

Proteinkonformation und die Reaktivität der Seitenketten

Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaut, die über Peptidbindungen miteinander verknüpft werden (Primärstruktur) und lokale Konformationen (Sekundärstruktur) sowie übergeordnete räumliche Anordnungen (Tertiärstruktur, z.T. auch Quartärstrukturen) ausbilden. Unter der sogenannten chemischen Stabilität eines Proteins versteht man vor allem die Integrität der Primärstruktur und der Aminosäureseitenketten, aber auch kovalente Bindungen (Disulfidbrücken) zur Ausbildung der Tertiärstruktur werden betrachtet. Mögliche Reaktionen sind unter anderem die Hydrolyse der Peptidbindungen, Oxidationen, Desamidierungen, β -Eliminierungen, Isomerisierung und Racemisierung der Seitenketten sowie die Bildung, der Austausch oder die Spaltung von Disulfidbrücken (Samanen 1991, Bummer und Koppenol 2000, Bilati et al. 2005a).

Änderungen in der nativen Konformation des Proteinmoleküls durch Aggregation oder Denaturierung betreffen die Tertiärstruktur und, sofern vorhanden, die Quartärstruktur des Proteins. Diese kann durch reversible oder irreversible Entfaltung zerstört werden, wodurch ein Protein seine Funktionalität (z. B. seine Enzymaktivität) und unter Umständen auch seine Antigenität verliert. Während die Sekundärstruktur von Proteinen im Wesentlichen über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird, spielen bei der Tertiärstruktur auch hydrophobe Wechselwirkungen eine große Rolle. Zusätzlich treten ionische Wechselwirkungen, van-der-Waals-Bindungen und die oben beschriebenen Disulfidbrücken auf.

Die Konformation des Proteins kann durch Spaltung nicht-kovalenter Bindungen bei Veränderungen des pH-Wertes, der Temperatur, durch Denaturierungsmittel (z. B. Detergenzien, wassermischbare organische Lösungsmittel), Druck, Scherkräfte oder Exposition an Grenzflächen zerstört werden. An die Entfaltung des Proteins können sich zusätzlich die oben genannten Reaktionen der Seitenketten, die Adsorption des Proteins an Oberflächen oder die Bildung von di- und oligomeren Aggregaten anschließen (Bummer und Koppenol 2000).

Proteinstabilität während der Mikroverkapselung

Wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, werden für die Proteinverkapselung am häufigsten Doppelemulsionsmethoden eingesetzt. Im Falle einer $W_1/O/W_2$ -Methode wird das Protein in der W_1 -Phase gelöst und in einer polymerhaltigen O-Phase dispergiert. Hierfür werden verschiedene Prinzipien eingesetzt, unter anderem Rotor-Stator-Homogenisatoren, Ultraschall und rotierende Reagenzglasrührer (Vortexer). Dabei wird in das System Energie eingebracht, die nur zu einem geringen Teil zur Zerkleinerung der W_1 -Tröpfchen genutzt wird. Vor allem bei der Ultraschallbehandlung kommt es zu einer deutlichen Erwärmung des Systems, die zur Proteindenaturierung führen kann. Neben der Erwärmung des gesamten Systems entstehen durch Kavitation hohe lokale Temperaturen und Drücken, sogenannte „hot spots“. Außerdem können die gebildeten Radikale zu Reaktionen der Proteinseitenketten führen. Bei einigen Proteinen führt bereits die Ultraschallbehandlung wässriger Lösungen ohne die Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels zur Inaktivierung, bei anderen tritt dies nicht ein (Meinel et al. 2001, Tian et al. 2003 und 2004).

Für die Herstellung von Mikrosphärulen sind beim Dispergieren von W_1 in der Polymerphase möglichst kleine Tröpfchen wünschenswert, um eine homogene Verteilung des Proteins in der Polymermatrix zu gewährleisten. Andererseits steigt dabei die Oberfläche der W_1 -Phase stark an, weshalb Austauschprozesse und damit Verlust des Proteins in die später hinzugegebene W_2 -Phase denkbar sind (sofern das Protein in der O-Phase löslich ist) [Reich 1998]. Vor allem aber kann eine große Grenzfläche zwischen Wasser und organischem Lösungsmittel zu einer Assoziation und Aggregation von Proteinen führen. Die Wassermoleküle liegen an dieser Grenzfläche viel stärker geordnet vor als im Inneren der Lösung, was energetisch ungünstig ist. Andererseits besitzen Proteine apolare Aminosäurereste, die über hydrophobe Wechselwirkungen im Inneren des Moleküls

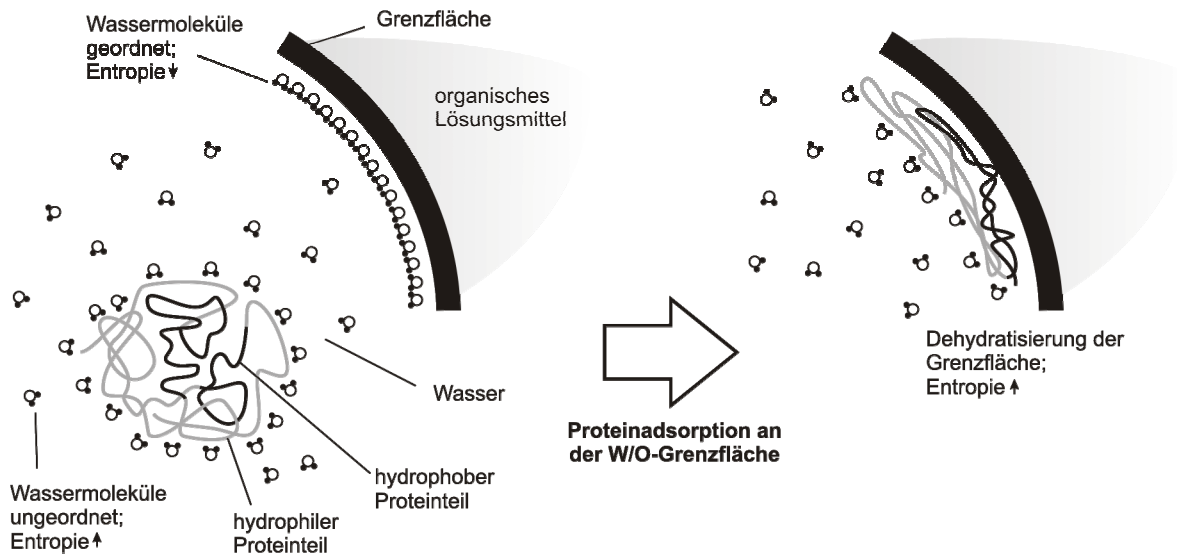


Abb. 6: Schematische Darstellung der Adsorption von Proteinen an die W_1/O -Grenzfläche.

stabilisiert und vor Wechselwirkungen mit Wasser geschützt sind. Beim Kontakt des Proteins mit der Grenzfläche kann das Protein an diese adsorbiert werden, sich entfalten und seine hydrophoben Reste in das organische Lösungsmittel einbringen (Abb. 6). Dabei wird das geordnete Wasser sowohl von der Grenzfläche als auch von weniger polaren Teilen des Proteinmoleküls entfernt. Seine Entropie steigt, was energetisch günstig ist. Zusätzlich liegen die hydrophoben Molekülteile des Proteins nach Adsorption an die Grenzfläche ebenfalls weniger stark geordnet vor. Daher ist davon auszugehen, dass Proteine mit ausgeprägten polaren und apolaren Molekülteilen sich spontan an die Grenzfläche assoziieren (Sah 1999). Ist die Grenzfläche vollständig besetzt, kann keine weitere Proteinassoziation erfolgen. Folglich könnte man durch Einsetzen hochkonzentrierter W_1 -Phasen einen prozentual größeren Anteil des Proteins vor der Wechselwirkung mit der Grenzfläche schützen (Bilati et al. 2005a).

Eine Vielzahl von Substanzen wurde hinsichtlich ihres Potenzials untersucht, Proteine vor der Aggregation an Grenzflächen zu schützen (s. Tab. 3). Gemäß der Theorie der bevorzugten Hydratisierung ist die direkte Bindung des Stabilisators an das Protein thermodynamisch ungünstig, weshalb der Stabilisator von der Proteinoberfläche ausgeschlossen wird und diese bevorzugt durch Wassermoleküle hydratisiert wird (Wang 1999). Zu diesen Stabilisatoren gehören Zucker, Aminosäuren und bestimmte Salze. Bei allen Stabilisatoren zeigt sich, dass es keine allgemeine Strategie zum Schutz von Proteinen gibt, sondern sie für jedes Protein individuell ermittelt werden muss. Beispielsweise kann mit Trehalose häufig, aber nicht in jedem Fall, eine Stabilisierung von Proteinen erzielt werden,

1. Einleitung

wobei teilweise erst der Zusatz hoher Konzentrationen effektiv ist (Fu et al. 1999, Sah 1999, Perez und Griebenow 2001, Cleland et al. 2001).

Andere Stabilisatoren (s. Tab. 3), wie Proteine, Detergenzien und Polyethylenglycole (PEG), zeigen grenzflächenaktive Eigenschaften. Beispielsweise diffundiert PEG 400 viel schneller als Proteine zur W_1/O Grenzfläche, besetzt diese und schützt Proteine somit vor Denaturierung (Péan et al. 1999, Castellanos et al. 2003). Hochkonzentriert eingesetzte Albumine wie bovines Serumalbumin (BSA) lagern sich ebenfalls bevorzugt an die Grenzfläche an und schützen so die weniger konzentriert eingesetzten Protein-Wirkstoffe vor Denaturierung (Chen et al. 1997, Johanson et al. 1998, Meinel et al. 2001). Detergenzien können hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb von Proteinen stören und, wie oben beschrieben, zur physikalischen Destabilisierung führen. Werden sie jedoch bei wenig hydrophoben Proteinen eingesetzt, können sie zu deren Stabilisierung beitragen, indem sie die Grenzflächenspannung und somit auch die Affinität von Proteinen zur Grenzfläche reduzieren (Wang 1999). Da die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und der O-Phase von dem ausgewählten organischen Lösungsmittel abhängt, kann neben der Wasserlöslichkeit des Solvents (vgl. Abschnitt 1.1.3) auch seine Grenzflächenspannung für die Proteinstabilität entscheidend sein.

Tab. 3: Als Stabilisatoren in der Proteinmikroverkapselung untersuchte Substanzen^a.

Zucker	Aminosäuren	Proteine	Polymere	Detergenzien	Anorg. Salze
Trehalose	Arginin	Albumine	PEG 400	Tween 20	Ca(HCO ₃) ₂
Mannitol	Glycin	Gelatine	PEG 2000	Tween 80	CaCO ₃
Saccharose	Lysin		PEG 6000	Poloxamer 188	Ca ₃ (PO ₄) ₂
Lactulose	Histidin		PEG 8000 ^d	Poloxamer 407	Mg(OH) ₂
Lactose				Lecithin	MgCO ₃ ^g
Maltose				SDS ^e	ZnCO ₃ ^h
HP-β-CD ^b				PVA ^f	Zn-Acetat ^{h,i}
CM-Cellulose ^c					

^aZusammenstellung nach Bilati et al. 2005a sofern nicht anders angegeben; ^bHydroxypropyl-β-Cyclodextrin nach Johanson et al. 1998 und Kang und Singh 2003; ^cCarboxymethylcellulose; ^dPolyethylenglycol, M_w 8000, nach Castellanos et al. 2003; ^eNatriumdodecylsulfat; ^fPolyvinylalkohol nach van der Weert et al. 2000a; ^gnach Li und Schwendeman 2005, ^hnach Lam et al. 2001; ⁱnach Costantino et al. 2000.

1. Einleitung

Wie schon bei der W_1/O -Primäremulgierung kann auch bei der Sekundäremulgierung in der kontinuierlichen W_2 -Phase die Einwirkung von Scherkräften und erhöhter Temperatur die native Konformation des Proteins zerstören (s. Abb. 7). Niedermolekulare Protein-Stabilisatoren können infolge der begrenzten Löslichkeit von Wasser in der O-Phase aus der W_1 in die W_2 -Phase verloren gehen. Um dies zu verhindern, könnten sie der W_2 -Phase in gleicher Konzentration wie in W_1 zugesetzt werden.

Die bisher beschriebenen Prozesse der Primär- und Sekundäremulgierung dauern wenige Minuten. Durch die nur langsam erfolgende Evaporation des Lösungsmittels ist die Zeit bis zur vollständigen Verfestigung der Mikropartikel oft deutlich länger. Die daraus resultierende lange Exposition des Proteins gegenüber dem organischen Lösungsmittel kann das Ausmaß der oben beschriebenen Denaturierung erhöhen. Zusätzlich können Matrixpolymere mit freien Carboxylgruppen am Ende des Polymerstranges diese Endgruppen in der Zeitspanne von der Primäremulgierung bis zur Partikelverfestigung aus der O- in die W_1 -Phase einbringen. Dies kann in ungepufferten Systemen aufgrund des pH-Abfalls zur Proteindenaturierung führen (Schwendeman et al. 1996).

Bei der Lyophilisation reiner Proteinlösungen treten gelegentlich Instabilitäten der Proteine auf, die durch Zusatz von Lyoprotektoren verhindert werden können. Deutlich schwieriger sind nicht-invasive Untersuchungen zur Stabilität von mikroverkapselten Proteinen während der Lyophilisation. Es ist davon auszugehen, dass das Ausmaß der Denaturierung bei der Lyophilisation deutlich niedriger ist, als bei den vorhergehenden Herstellungsschritten (Weert et al. 2000b).

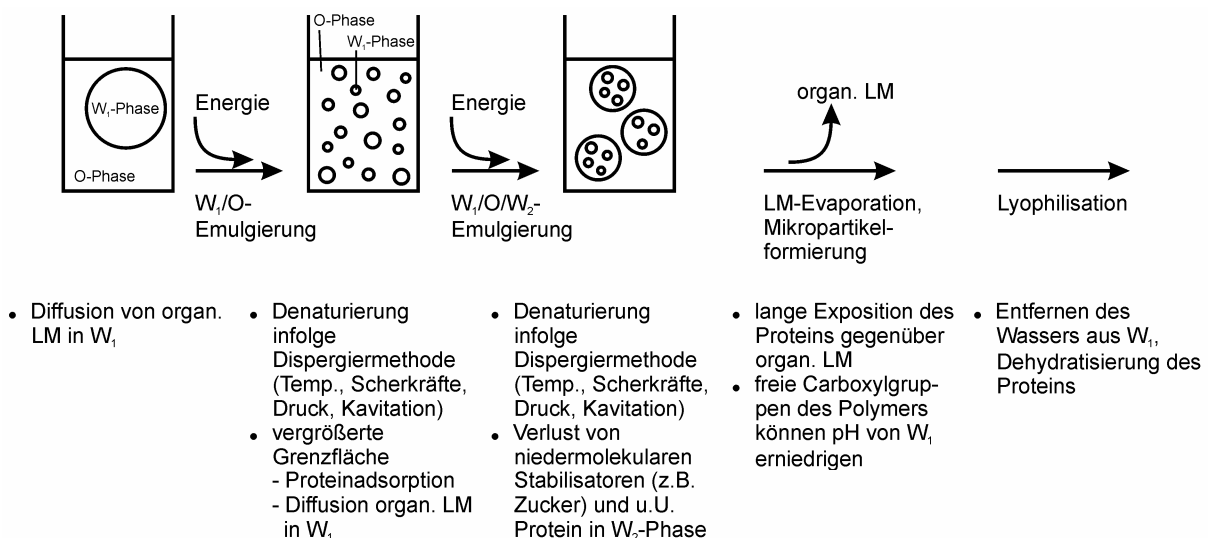


Abb. 7: Einflussfaktoren auf die Proteinstabilität bei der Mikroverkapselung mit einem $W_1/O/W_2$ -Lösungsmittelverdampfungsverfahren (modifiziert nach Schwendeman et al. 1996).

Vor der Lyophilisation werden die Mikropartikelsuspensionen zunächst eingefroren. In den W_1 -Tröpfchen im Inneren der erhärteten Mikropartikel wird der Proteinlösung durch Gefrierkonzentrierung Wasser entzogen und damit die Konzentration von Salzen stark erhöht. Die Kristallisation einzelner Pufferbestandteile der W_1 -Phase kann den pH der Proteinphase stark verändern (Schwendeman et al. 1996). Während der Trocknung wird der Mikropartikelsuspension sowohl die Flüssigkeit der kontinuierlichen W_2 -Phase, als auch die der im Inneren der Partikel befindlichen W_1 -Phase unter Porenbildung entzogen. Dabei kann auch eine Dehydratisierung des Proteins stattfinden, wodurch möglicherweise hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb des Proteins und mit der PLGA-Matrix verstärkt werden. Größere Restfeuchtigkeit infolge unvollständiger Lyophilisation kann während der Lagerung zur Hydrolyse der Polymerketten führen. Die entstandenen Carboxylfunktionen senken den pH-Wert ab und könnten mit Aminogruppen des Proteins Amide bilden (Weert et al. 2000b). Für bovines Serumalbumin (BSA) konnte nachgewiesen werden, dass die Restfeuchtigkeit in den Mikropartikeln während der Partikellagerung zur Bildung kovalenter Aggregate führt (Crotts und Park 1998). Daher ist eine vollständige Lyophilisation wünschenswert.

Proteinstabilität unter Freisetzungsbedingungen

In Freisetzungstests werden lyophilisierte Mikropartikel in Pufferlösungen resuspendiert, üblicherweise bei 37 °C gelagert und die Konzentration des verkapselten Proteins im Freisetzungsmedium zu definierten Zeitpunkten bestimmt. Nur in wenigen Fällen dürften die Bedingungen des Freisetzungstests den Bedingungen der Proteinfreisetzung *in vivo* oder in der Zellkultur entsprechen. Dennoch können aus der Form der Freisetzungsprofile und der Nativität des abgegebenen Proteins unter anderem Rückschlüsse auf die Qualität des Herstellungsprozesses gezogen werden. Man unterscheidet zwischen der als burst-release bezeichneten schlagartigen Freisetzung innerhalb der ersten 24 Stunden und der weiterführenden Freisetzung in den folgenden Tagen bis Wochen. Wird im burst-release natives Protein freigesetzt, so bedeutet dies, dass die angewendeten Verfahren bei der Mikroverkapselung (und die Lagerung) die Proteinnativität nicht zerstört haben. Findet sich im Folgenden jedoch keine weitere Proteinfreisetzung oder wird denaturiertes Protein abgegeben, so ist dies auf Vorgänge unter den Freisetzungsbedingungen zurückzuführen.

Wie in Abschnitt 1.1.1 erläutert, wurde für PLGA-Mikropartikel eine Bulkerosion beschrieben. Im Inneren der Partikel läuft dieser Prozess besonders schnell ab, da die infolge

der Polymerspaltung freigesetzten Carboxylfunktionen den Abbau autokatalytisch beschleunigen. Dies führt zur Ausbildung eines sauren Milieus und zum Anstieg des osmotischen Drucks im Inneren der Mikropartikel. Durch Inkorporierung pH-sensitiver Spinsonden in PLGA-Mikropartikel konnte mit Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie festgestellt werden, dass im Inneren degradierender Mikropartikel ein pH von 3,5 herrscht (Mäder et al. 1998, Brunner et al. 1999). Je kleiner die Mikropartikel sind, desto kürzer sind die Diffusionswege und desto schneller erfolgt der Abtransport der sauren Degradationsprodukte in den Freisetzungspuffer. Durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie nach Verkapselung pH-empfindlicher Fluoreszenzfarbstoffe konnte gezeigt werden, dass selbst im Inneren sehr kleiner Mikropartikel von 2 μm ein Abfall des pH unter 5,8 (Detektionslimit dieser Studie) erfolgte (Li und Schwendeman 2005). Infolge der Diffusion von PLGA-Monomeren und -Oligomeren ins Freisetzungsmilieu kann dessen Pufferkapazität überschritten werden und folglich neben der Mikroacidität im Partikel auch eine Ansäuerung des gesamten Systems auftreten (Park et al. 1995).

Der lokal vorhandene saure pH kann sowohl zur Proteindenaturierung führen und die Freisetzung behindern, als auch durch Hydrolyse die Funktionalität des freigegebenen Proteins zerstören (Xing et al. 1996, Fu et al. 2000). Zusätzlich können die Abbauprodukte des PLGA, Milchsäure und Glycolsäure, die verkapselten Proteine am N-Terminus und beispielsweise an Lysin-Seitenketten acylieren (Lucke et al. 2002, Na et al. 2003). Daher wird durch Coverkapselung alkalischer Substanzen wie $\text{Mg}(\text{OH})_2$ versucht (s. Tab. 3), den pH-Wert im Inneren der Mikropartikel abzupuffern und somit Proteininstabilitäten zu vermeiden.

Im Falle der hier beschriebenen Mikropartikel für das Targeting dendritischer Zellen (DCs) ist eine solche Maßnahme jedoch nicht sinnvoll, da die proteinhaltigen Partikel im Phagolysosom der DCs sowieso einem sauren Milieu mit einer Vielzahl von Hydrolasen ausgesetzt sind (s. Abschnitt 1.6). Unter diesen Bedingungen wird sowohl das Polymer, als auch das verkapselte Protein hydrolysiert. Der nach Phagozytose in den Zellen stattfindende burst-release ähnelt vermutlich den Ergebnissen von Freisetzungstests in Puffermedien, das weiterführende Freisetzungsprofil ist jedoch nicht vergleichbar. Aus diesem Grund ist es nicht sinnvoll, durch Zusatz von Basen die Proteininstabilität unter Bedingungen der Freisetzungstests zu optimieren. Darüber hinaus ist die Spaltung der Proteine durch saure Hydrolyse und enzymatischen Angriff in den Phagolysosomen (Prozessierung) eine essentielle Voraussetzung für die Präsentation der Antigene und damit den immunologischen Effekt. Es sollte berücksichtigt werden, dass der Erhalt der Antigenität während der

Verkapselung und Freisetzung dafür wichtiger ist als die Nativität des gesamten Proteins. Aus biopharmazeutischer Sicht ist es notwendig, den burst-release zugunsten einer weiterführenden Freigabe so weit wie möglich zu reduzieren, um eine langanhaltende Proteinfreisetzung und somit eine dauerhafte Stimulation der DC zu erzielen.

Neben dem sauren Mikromilieu gibt es eine Reihe weiterer Faktoren, die die Proteinstabilität unter Freisetzungsbedingungen beeinflussen. So sind die Proteine erhöhten Temperaturen (meist 37 °C) ausgesetzt, außerdem haben, je nach Protein, der pH-Wert, die Art des Puffersalzes und die Anwesenheit von Detergenzien (z. B. SDS) im Medium einen Effekt auf das Freigabeprofil. Werden für die Probennahme die Mikropartikel vom Überstand durch Zentrifugation abgetrennt, so können hohe Zentrifugalkräfte zu einem „Herausquetschen“ der Proteine aus der schwammartigen Matrix und somit zu Überbestimmung der Freisetzung führen (Yang und Cleland 1997). Während des Freisetzungstests können die Proteine zum einen unspezifisch über hydrophobe Wechselwirkungen an PLGA gebunden werden. Zum anderen können bei Proteinen mit einem hohen Isoelektrischen Punkt (pI) wie dem Modellprotein Lysozym verstärkt ionische Wechselwirkungen mit den Säuregruppen des PLGA auftreten. Dieses Phänomen findet man auch bei BSA in PLGA-Partikeln mit freien Carboxylfunktionen (Blanco und Alonso 1997), obwohl fettsäurehaltiges BSA einen pI von nur 4,7 besitzt (Carter and Ho 1994).

1.2 Stabilisierung und Modifizierung der Mikropartikeloberfläche

Das als Matrix für die Mikropartikel eingesetzte PLGA ist hydrophob, daher würden in einem Standard-W₁/O/W₂-Prozess die naszierenden Mikropartikel ohne den Zusatz von Stabilisatoren aggregieren. Üblicherweise werden daher in der W₂-Phase grenzflächenaktive Substanzen gelöst, die nach der Sekundäremulgierung die Oberfläche der Mikropartikel bedecken. Werden nichtionische Detergenzien eingesetzt, so resultieren aufgrund der Carboxylgruppen des PLGA anionische Mikropartikel (s. Abschnitt 1.2.1). Sollen hingegen kationisch modifizierte Mikropartikel hergestellt werden, so können die in Abschnitt 1.2.2 beschriebenen Techniken genutzt werden. In Hinblick auf die Nutzung der in dieser Arbeit beschriebenen Mikropartikel im Zellversuch ist es wichtig, überschüssige Detergenzien zu entfernen, die Konzentration der verbleibenden Stabilisatoren zu quantifizieren und die Toxizität der eingesetzten Hilfsstoffe an dendritischen Zellen zu untersuchen.

1.2.1 Anionische PLGA-Mikropartikel

Polyvinylalkohol

Polyvinylalkohol (PVA) ist der mit Abstand am häufigsten genutzte Stabilisator bei der Herstellung von anionischen PLGA-Mikropartikeln. Er wird üblicherweise durch partielle Deacetylierung aus Polyvinylacetat hergestellt (Herrmann und Haehnel 1927), wobei die noch acetylierten Bereiche den lipophilen Molekülteil bilden, die freien Hydroxylgruppen hingegen hydrophil sind (Abb. 7). In der Mikroverkapselung wird als Stabilisator meist zu 88 % deacetyliertes PVA verwendet.

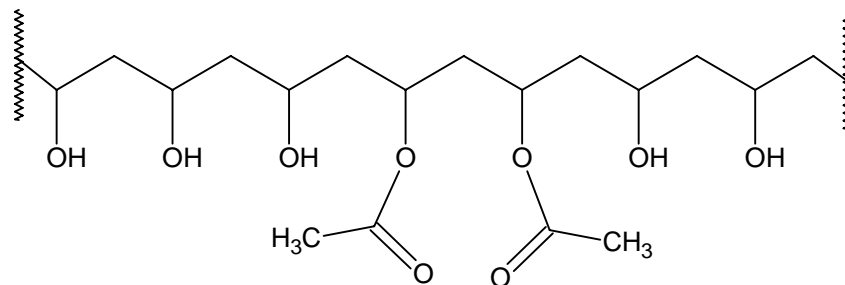


Abb. 7: Struktur von Polyvinylalkohol

Während der Sekundäremulgierung penetrieren die lipophilen Schleifen des Polyvinylalkohols in die polymerhaltige O-Phase, während die hydrophilen Segmente in der Wasserphase verbleiben und die naszierenden Mikropartikel sterisch stabilisieren (Abb. 8). Während der Lösungsmittelverdunstung präzipitiert das Matrixpolymer und PVA wird an der Oberfläche verankert (Boury et al. 1995). Steigende Konzentrationen und höhere Molekulargewichte des eingesetzten PVA führen vor allem bei Rotor-Stator-Homogenisatoren zu kleineren Mikropartikeln, da aufgrund der höheren Viskosität der kontinuierlichen Phase die Übertragung der Scherkräfte auf die dispergierte Phase verbessert und die Koaleszenz der polymerhaltigen O-Phase reduziert wird (Jobmann und Rafler 1998, Freitas et al. 2005). Es gibt unterschiedliche Aussagen dazu, ob die eingesetzte Konzentration von PVA in der externen Wasserphase einen Einfluss auf die dauerhaft an den PLGA-Partikeln gebundene PVA-Menge hat (Lee et al. 1999, Sahoo et al. 2002). Im Gegensatz zu anderen Stabilisatoren ist die Anbindung von Polyvinylalkohol an die Partikeloberfläche irreversibel, das heißt, PVA wird durch Waschschriffe nicht restlos entfernt und kann die Mikropartikel dauerhaft vor Aggregation schützen.

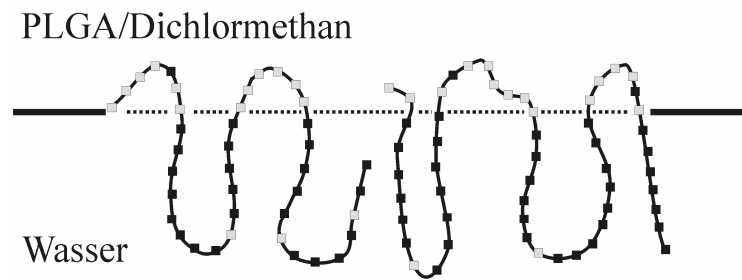


Abb. 8: Schematische Darstellung der irreversiblen Verankerung von PVA an der Oberfläche naszierender Mikropartikel (nach Boury et al. 1995). Schwarze Quadrate: hydrophile Segmente; graue Quadrate: lipophile Segmente.

Wird Polyethylenglycol (PEG) kovalent an PLGA gekoppelt, so bildet es in der hydrophoben PLGA-Matrix hydrophile Bereiche aus, weshalb die Grenzflächenspannung reduziert ist und zur Stabilisierung der Partikel an deren Oberfläche deutlich weniger PVA gebunden werden muss (Shakesheff et al. 1997).

Zur Quantifizierung von PVA werden zahlreiche Methoden beschrieben, unter anderem die Nutzung von Turbidimetrie (Karpyuk et al 1993), Dünnschichtchromatographie (Livinova et al. 1990), Größenausschlusschromatographie, Voltametrie (Song et al. 1997), Statischer Sekundärionen-Massenspektrometrie und Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (Scholes et al. 1999). Am häufigsten wird eine kolorimetrische Methode angewendet, die auf der Bildung eines blauen Komplexes aus PVA und Iod beruht (Finley 1961). Zunächst bildet sich das stabile lineare Ion I_3^- aus Iod/Kaliumiodid aus, um das sich helikale Strukturen des PVA schlingen (Abb. 9). Aus der Verbindung Helix- I_3^- entsteht über Zwischenstufen schließlich ein Helix- I_8 -Komplex, der blau erscheint und rotes Licht ($\lambda_{\max}=690$ nm) absorbiert. Liegt hingegen Iod im Überschuss vor, verschiebt sich das Maximum des breiten Absorptionspeaks der Probe auf 660 nm, da Iod selbst blau-violettes Licht absorbiert. Die Probe erscheint gelb-grün. Der Zusatz von Borsäure beschleunigt die Reaktion, weil durch Ausbildung zyklischer Strukturen zwischen PVA und Borsäure die Flexibilität der PVA-Kette reduziert wird, was für die Helixbildung essenziell ist. Bei Abwesenheit von Borsäure bildet sich der Iodkomplex nur langsam an den in geringer Zahl bei der Deacetylierung entstehenden cyclischen Acetal- und Ketalstrukturen (Pritchard und Akintola 1972). Diese Methode wurde bereits zur Quantifizierung von PVA bei der Mikroverkapselung genutzt und sollte auch im Rahmen dieser Arbeit angewendet werden.

Ein alternativer Ansatz nutzt statt klassischer Detergenzien niedermolekulares PLA ($M_w = 2,4$ kDa), das zusammen mit PLGA in der O-Phase gelöst wird und seine freien Carboxylfunktionen mit dem Effekt der Partikelstabilisierung aus der O-Phase in die externe Wasserphase einbringt. Hingegen besitzt PLA mit einem noch geringeren Molekulargewicht (0,6 kDa) eine zu große Löslichkeit in Wasser, geht aus der O-Phase verloren und führt zu geringeren Ausbeuten (Carrio et al. 1995). Als weiterer Detergenzien-freier Herstellungsgang wurde eine Koazervations-Dialysemethode beschrieben, die jedoch nur eine geringe Verkapselungseffizienz zeigte und wahrscheinlich nicht ohne weiteres zur Proteinbeladung anwendbar ist (Jeon et al. 2000 und 2003).

1.2.2 Kationisch modifizierte PLGA-Mikropartikel

Für die Herstellung kationisch modifizierter PLGA-Mikropartikel finden sich in der Literatur drei Grundprinzipien: a) Die kovalente Kopplung eines Ladungsträgers an das PLGA, b) die physikalische Mischung von PLGA mit einem kationischen Polymer und c) die Adsorption kationischer Substanzen an die Mikropartikeloberfläche.

Derivatisierung des Matrixpolymers

Die chemische Modifizierung des PLGA kann durch Einbau funktioneller Gruppen in die Polymerkette oder durch kovalente Kopplung von Ladungsträgern an die fertigen Mikropartikel erfolgen. Durch peptidische Einbindung von Lysin statt Glycolsäure in die Polymerkette kann ein PLA-Lysin-Copolymer synthetisiert werden (Barrera et al. 1993). Über die freie ϵ -Aminofunktion des Lysins können an dieses Polymerrückgrat nun kammartig Polylysin-Zweige oder andere Aminosäuren angebunden werden (Hrkach et al. 1995). In einem O/W-Emulsionsverfahren konnten aus diesem Polymer kationische Mikropartikel erzeugt werden, die trotz des Fehlens einer inneren Wasserphase eine hochporöse Struktur ausbildeten (Caponetti et al. 1999). Eine andere Arbeitsgruppe verwendete als Partikelmatrix einen derivatisierten Polyvinylalkohol, an den kammartig sowohl Diethylaminopropyl-Gruppen als Ladungsträger als auch PLGA-Ketten gekoppelt waren (Dailey et al. 2003).

Alternativ kann auch nur die Oberfläche von vorgeformten PLGA-Matrices durch Anbindung polykationischer Substanzen modifiziert werden. So wurde die Kopplung von Chitosan (Wang et al. 2003) und Polyethylenimin (Kasturi et al. 2005) beschrieben. Im Falle

proteinbeladener Mikropartikel könnte dieser nachgelagerte Arbeitsschritt in Hinblick auf die Stabilität und Verkapselungseffizienz der Proteine möglicherweise nachteilig sein. Im Gegensatz zur Herstellung der oben beschriebenen kationischen Copolymere ist hier jedoch ein wesentlich geringerer synthesechemischer Aufwand nötig.

Mischungen von PLGA und kationischen Polymeren

Zheng und Hornsby 1999 beschrieben PLGA-Mikropartikel mit Aminofunktionen an der Partikeloberfläche, die aus einer physikalischen Mischung von PLGA und einem mit Schutzgruppen besetzten Polylysin hergestellt wurden. Durch Hydrolyse wurden die Schutzgruppen der Oberflächen-assoziierten Aminogruppen entfernt. Diese Aminogruppen können für weitere Kopplungsreaktionen genutzt werden, beispielsweise für die Anbindung des kationischen Polyethylenimins (Manuel et al. 2001).

Adsorption grenzflächenaktiver Moleküle

Bei der Adsorption von Molekülen an PLGA-Mikropartikel kann zwischen klassischen Tensiden und grenzflächenaktiven Polymeren unterschieden werden. Die Gruppe von Singh und O'Hagan hat in einer Vielzahl von Veröffentlichungen kationische Mikropartikel als Adjuvans bei Vakzinierungsstudien beschrieben (Singh et al. 2000 und 2001, Briones et al. 2001, Denis-Mize et al. 2003, O'Hagan et al. 2004). Bei der Herstellung der Mikropartikel wurde statt PVA das Tensid Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) eingesetzt. An die Oberfläche der Partikel konnte für Vakzinierungsstudien DNA gebunden werden.

Von anderen Gruppen wurden statt CTAB polykationische Moleküle für die Oberflächenmodifizierung in Emulsions-basierten Herstellungsprozessen genutzt. So wurde die Anwendung von Polylysin (Cui und Schwendeman 2001), PEG-Polylysin (Faraasen et al. 2003), Polyethylenimin (Shakweh et al. 2005) und Chitosan (Kumar et al. 2004) beschrieben. Diese funktionellen, grenzflächenaktiven Polymere werden in der kontinuierlichen Wasserphase gelöst, binden an die naszierenden Mikropartikel, schützen die O-Tröpfchen vor Koaleszenz, verhindern die Aggregation der erhärteten Mikropartikel und führen zu einer positiven Oberflächenladung.

Im Vergleich zu den oben genannten Techniken besitzt die Oberflächenmodifizierung durch Adsorption von grenzflächenaktiven Molekülen den Vorteil, dass keine chemischen Synthesen notwendig sind. Nachteilig ist hingegen das Fehlen einer kovalenten Bindung des Ladungsträgers an die Mikropartikel, so dass Desorption und damit Destabilisierung und Verlust der kationischen Ladung stattfinden kann.

Chitosan

Chitosan ist ein Derivat des Chitins, dem nach Cellulose zweithäufigsten natürlichen Biopolymer (s. Abb. 10). Es kann aus diesem durch Deacetylierung unter alkalischen Bedingungen (Rege und Block 1999, Sabnis und Block 2000) oder durch enzymatische Deacetylierung (Martinou et al. 1997) hergestellt werden. Seine Eigenschaften werden wesentlich durch den Grad der Deacetylierung und das Molekulargewicht bestimmt. Der pK_a -Wert von Chitosan wird mit 6,3 angegeben (Yi et al. 2003, Mansouri et al. 2004). Daher ist hochmolekulares Chitosan im Alkalischen unlöslich, es sei denn, eine spezielle Vorbehandlung wird durchgeführt (Muzzarelli et al. 2003). Chitosan ist ein biodegradables Polymer von geringer Toxizität und Immunogenität (Felt et al. 1998, Mansouri et al. 2004), dass seit 2002 in der Ph. Eur. monographiert ist. Für Chitosan konnten antimikrobielle Effekte nachgewiesen werden (No et al. 2002).

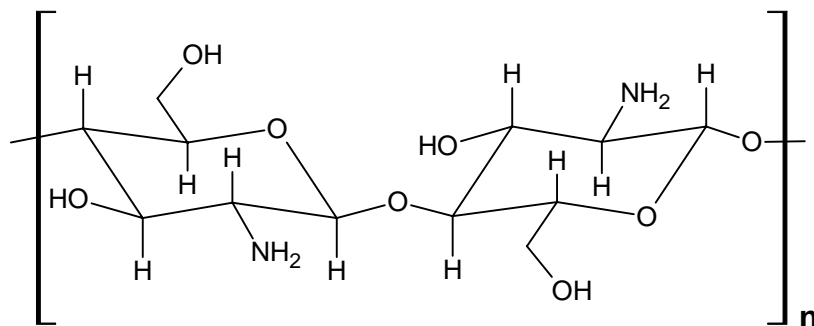


Abb. 10: Struktur von Chitosan, je nach Grad der Deacetylierung tragen einige Amino-
gruppen noch Acetylreste.

Die Chitosaneigenschaften können verändert werden, beispielsweise durch Reacetylierung (Sorlier et al. 2001), säurekatalysierte Depolymerisation (Allan und Peyron 1997, Dong et al. 2001), kovalente oder ionische Quervernetzung unter Bildung von Hydrogelen (Berger et al. 2004), Thiolierung für verstärkte Mucoadhäsivität (Bernkop-Schnürch et

Auswahl von Methoden zur Oberflächenmodifizierung

Da die CTAB-Methode gemäß den Beschreibungen in der Literatur einfach durchzuführen und CTAB relativ preiswert ist, sollte im Rahmen der vorgelegten Arbeit diese Methode angewendet werden. Darüber hinaus sollte die Oberflächenmodifizierung von PLGA-Mikropartikeln durch Chitosan und andere geeignete Polymere auf ihre Anwendung in einem Mikromischer basierten Herstellungsprozess untersucht werden. Da in der Literatur Angaben zum Desorptionsverhalten weitestgehend fehlen, lag ein Schwerpunkt der Arbeit auf Betrachtungen zur Stabilität der Oberflächenmodifizierung während der Wasch- und Verdünnungsschritte.

1.3 Mikromischer zur Herstellung von Mikropartikeln

Einteilung, Aufbau und Einsatz von Mikromischern

Der Begriff Mikromischer umfasst alle Mischer, die mit Mikrostrukturtechniken hergestellt werden und zum Mischen von Flüssigkeiten konzipiert sind. Reagieren die Medien miteinander, so spricht man von einem Mikroreaktor. Der Begriff „Mikro“ bezieht sich nicht auf den Flüssigkeitsdurchsatz, denn dieser kann je nach Aufbau des Mikromischers im Bereich von $\mu\text{l/h}$ bis m^3/h liegen. Werden zwei miteinander mischbare Flüssigkeiten in einen Mikrokanal eingespeist, so lagern sie sich unter Bildung einer virtuellen Grenzfläche aneinander. Eine Durchmischung der Flüssigkeiten unterbleibt, da in linearen Mikrokanälen ohne weiteres keine turbulenten Strömungen auftreten und aufgrund der immer noch relativ großen Schichtdicken kaum Diffusion zum Tragen kommt.

Um eine Durchmischung zu erzielen, wird bei den sogenannten aktiven Mikromischern von außen zusätzlich Energie eingebracht und damit eine Störung der linearen Strömung erzeugt, beispielsweise durch Ultraschall, Mikrorotoren aus magnetischem Material, piezoelektrisch betriebene vibrierende Membranen, akustische Wellen oder Kanalwände mit einer alternierenden Anordnung von positivem und negativem Zetapotenzial (Lin et al. 2005, Hessel et al. 2005). Hingegen wird bei passiven (syn. statischen) Mikromischern die Durchmischung durch die Geometrie der Mischstruktur sichergestellt (Tab. 5). So können je nach Mischer chaotische Strömungen beispielsweise durch Drehung

1. Einleitung

und Verjüngung der Flüssigkeitsströmung in winkligen und unterschiedlich weiten Kanälen (Lee et al. 2005), durch sogenannte Dean-Wirbel infolge der Zentrifugalkräfte in Kanalkrümmungen (Howell et al. 2004) oder durch Seitenkanalströmungen bei mäanderförmigen Hauptkanälen (Melin et al. 2004) erzeugt werden. Davon zu unterscheiden sind die passiven Mischer, die durch Ausbildung einer Multilamination die Kontaktfläche erhöhen (Kim et al. 2005). Mikromischer können aus Silizium, Kunststoffen oder Metall bestehen und werden je nach Material durch Ätzen, einen Schmelz-Sprühprozess bzw. durch LIGA-Technik (Lithographie-Galvanoformung-Abformung) hergestellt.

Tab. 5: Charakteristika passiver Mikromischer (nach Hessel et al. 2005).

Mischprinzipien statischer Mikromischer	Mikrostrukturen statischer. Mischer
<ul style="list-style-type: none">• Interdigitaler multilamellarer Aufbau• Aufspaltung und Rekombination der Ströme• Chaotische Mischung durch Strudel-Bildung• Einleitung mehrerer Nebenströme in einen Hauptstrom• Kollision versprühter Flüssigkeitsstrahlen• andere	<ul style="list-style-type: none">• T-oder Y-förmige Kanäle• Interdigitale Kanäle oder Aufgabungen• Verjüngte Strukturen für beschleunigten Fluss und geringere Schichtdicke• Wiederholte Strukturen zur Aufspaltung und Rekombination der Ströme• Mäanderförmige oder Zick-Zack-Strukturen• Strömungshindernisse• Mehr-Loch-Platten• Feine Düsen• andere

Die Nutzung von Mikromischern ist vor allem in der chemischen Industrie stetig auf dem Vormarsch. In der Analytik können miniaturisierte Systeme mit einem geringen Verbrauch von teuren Chemikalien auskommen. Chemische Reaktionen laufen in Mikrosystemen deutlich schneller ab als in großen Anlagen, was zu kürzeren Prozesszeiten führt. Das große Verhältnis von Oberfläche zu Volumen ist für die Temperatursteuerung der Reaktionen von entscheidendem Vorteil. Die Nutzung von Mikromischern zur Emulgierung nicht miteinander mischbarer Flüssigkeiten ist derzeit in der Industrie noch nicht etabliert, es gibt einzelne Beschreibungen für die experimentelle Herstellung von O/W-Emulsionen (Kawakatsu et al. 1999, Tong et al. 2001) und Lipid-Mikropartikeln (Sugiura et al. 2000).

Beschreibung des verwendeten Mikromischers

Der für die eigenen Experimente verwendete Mikromischer ist ein sogenannter statischer interdigitaler Mikromischer, der vom Institut für Mikrotechnik GmbH Mainz (IMM) vertrieben wird. Der Mikromischer besteht aus einem mittels LIGA-Technik hergestellten Mischelement, das in ein zweiteiliges Gehäuse aus Edelstahl eingesetzt wird (Abb. 12a). Im Deckel des Gehäuses befinden sich zwei Einlässe, durch die die Flüssigkeiten in das Mischelement geführt werden. Dort strömen sie in sinusförmigen Kanälen (Abb. 12b) aufeinander zu, sind aber durch die Kanalwände noch voneinander getrennt. Es bilden sich vielschichtige Flüssigkeitslamellen aus, die senkrecht zu den beiden Einflussrichtungen nach oben in Richtung des Gehäusedeckels strömen (Abb. 12c). Dort befindet sich ein enger schlitzförmiger Auslass (z. B. $4 \text{ mm} \cdot 0,06 \text{ mm}$), in dem die Flüssigkeiten stark beschleunigt werden. Anschließend kommt es infolge der Querschnittsaufweitung zu turbulenten Strömungen, die zur Mischung der Flüssigkeiten bzw. zur Emulsionsbildung führen (Haverkamp et al. 1999).

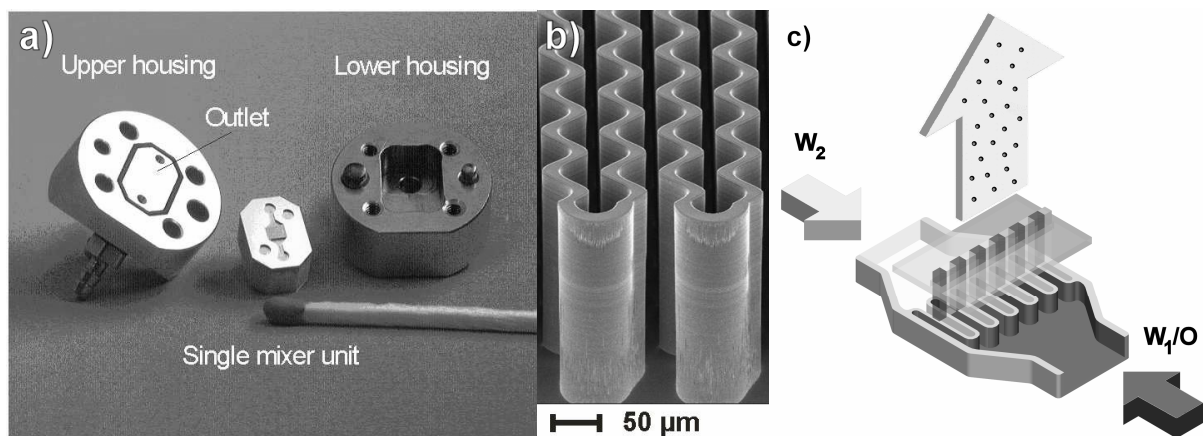


Abb. 12: Aufbau und Funktionsweise des verwendeten Mikromischers. (Quelle: IMM).

- Links: Gehäusedeckel mit zwei Einlässen und dem Auslassschlitz; Mitte: Inlay mit der interdigitalen Mischstruktur; Rechts: Gehäuseboden mit Aussparung für das Inlay.
- Vergrößerung der sinusförmigen Kanäle im Zentrum des Inlays.
- Schematische Darstellung des Mischprinzips: Die nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten strömen in den Kanälen aufeinander zu und formen Lamellen, die bei Passieren des Auslassschlitzes zu Tropfen zerteilt werden.

Wie oben schon erwähnt, werden in der Pharmazeutischen Industrie bisher keine Mikromischer für die Produktion von Emulsionen angewendet und auch aus der Forschung gibt es nur wenige Berichte. Für den hier vorgestellten Mikromischer wurden hingegen schon

erste Untersuchungen durchgeführt, die seine Eignung für die Herstellung proteinbeladener Mikropartikel in einem W/O/W-Prozess zeigen und in eigenen Arbeiten bestätigt wurden (Freitas et al. 2003, Wischke et al. 2006a). Die Verwendung des Mikromischers zur Herstellung von Emulsionen bei der Mikroverkapselung besitzt eine Reihe von Vorteilen. Die Größe der produzierten Emulsionströpfchen kann einfach durch die Flussraten der beiden Phasen gesteuert werden (Haverkamp et al. 1999, Schalper et al. 2005). Die Tröpfchengröße ist innerhalb eines bestimmten Bereiches kaum abhängig von der Konzentration und Molmasse des gelösten Matrixpolymers (also der Viskosität der Polymerphase), da die voreingestellten Flussraten der beiden Phasen durch gleichmäßige Förderung mittels HPLC-Pumpen sichergestellt werden (Schalper et al. 2005). Der verwendete Mikromischer ist beständig gegen organische Lösungsmittel und besitzt keine beweglichen Teile, die durch Abrieb das Produkt verunreinigen könnten. Er kann einfach sterilisiert werden, was in Hinblick auf die Mikropartikelherstellung für immunologische Untersuchungen von Vorteil ist. Der Mischer arbeitet kontinuierlich und ist aufgrund seines kleinen Totvolumens gut im Labormaßstab nutzbar.

Im Vergleich zu konventionellen Mixern besitzt der Mikromischer hinsichtlich eines möglichen Scaling-up entscheidende Vorteile, da dieses durch parallelen Betrieb mehrerer Mikromischer (Numbering-up) ohne Veränderung der Mischbedingungen möglich ist. Während für einzelne Mikromischer ein internes Numbering-up (Parallelschaltung mehrerer Mischelemente in einem gemeinsamen Gehäuse) bereits etabliert wurde (Schenk et al. 2004a und b), wäre im Falle des verwendeten Mikromischers ein externes Numbering-up (Parallelschaltung mehrerer kompletter Mixer) anzuwenden. Weiterhin besitzt der Mikromischer im Vergleich zu Rotor-Stator-Mixern eine größere Effizienz, das heißt, gleiche Partikelgrößen können mit einem viel kleineren Energieeintrag erzielt werden. Dies ist im Hinblick auf die thermische Belastung des Produktes von Bedeutung (Schalper 2002).

Die aufgeführten Vorteile des Mikromischers verdeutlichen, dass er ein interessantes Gerät für die Herstellung von flüssigen und mikropartikelären Arzneistoffträgersystemen sein könnte. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit sollte die Herstellung biodegradabler Mikropartikel im Mikromischer genauer charakterisiert werden, wobei hinsichtlich des gewünschten Targets (dendritische Zellen) der Steuerung und Reproduzierbarkeit der Partikelgröße besondere Aufmerksamkeit zu widmen war.

1.4 BSA als Modellprotein

Im Zentrum der vorgelegten Arbeit steht die Herstellung und Charakterisierung von Mikropartikeln für das Targeting dendritischer Zellen. Um die Effekte eines verkapselten Proteins auf die Zellen zu studieren, sollten möglichst Substanzen von hoher Antigenität gewählt werden. Hingegen ist für die Untersuchung des Mikroverkapselungsprozesses mit neuen Geräten (Mikromischer) die Verwendung therapeutisch relevanter Proteine aus Kostengründen nicht sinnvoll. Daher wird bei Studien zur Proteinmikroverkapselung meist mit Modellproteinen gearbeitet (Tab. 6). Für die eigenen Arbeiten wurde Fluorescein-Isothiocyanat-gekoppeltes bovines Serumalbumin (FITC-BSA) verwendet, da es sich bei bovinem Serumalbumin (BSA) um ein preiswert verfügbares, gut erforschtes und gegenüber W/O-Grenzflächen relativ stabiles Protein handelt. Gründe für die Auswahl einer fluoreszenzmarkierten Form des Proteins und die Charakterisierung des Fluorophors sind in Abschnitt 1.5 zu finden.

Tab. 6: Übersicht häufig verwendeter Modellproteine in der Mikroverkapselung.

Modellproteine in der Mikroverkapselung	
Bovines Serumalbumin	Heparinase
Humanes Serumalbumin	Lysozym
Ovalalbumin	Trypsin
Carboanhydrase	Chymotrypsin
Superoxiddismutase	Urease
Meerrettichperoxidase	Glucoseoxidase

Tab. 7: Charakteristika von bovinem Serumalbumin.

Parameter	Wert
Aminosäuren	583
M_w	66.430,3
Cystein-Reste	17 Disulfidbrücken, Cys-34 frei
pI (FS ^a -frei)	~5,3
pI (1-2 FS ^a)	~4,7
Löslichkeit	bis zu 30% (pH 7)
Konformation (pH 7)	herzförmig, 3 helikale Domänen

^aFS = Fettsäuren

Die im Blut befindlichen Serumalbumine sind globuläre Proteine. Sie sind unter anderem an der Aufrechterhaltung des Blut-pH (Proteinpuffer), an der Regulation der Flüssigkeitsverteilung zwischen Blutgefäßen und Interstitium (kolloidosmotischer Druck) sowie an Transportprozessen für schlecht wasserlösliche Substanzen beteiligt. Bovines Serumalbumin (vgl. Tab. 7) besteht aus 583 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht

von 66.430,3 Da (Hirayama et al. 1990). Seine Sekundärstruktur ist überwiegend aus α -Helices aufgebaut. In frühen Untersuchungen wurde für Albumin eine zigarrenförmige Tertiärstruktur postuliert (Peters 1985, Carter et al. 1989). Später wurde diese bezweifelt und kristallographisch eine kompaktere, herzförmige Konformation ermittelt (Carter und He 1990, Carter und Ho 1994). Es sind drei homologe Domänen (I, II, III) zu unterscheiden, die jeweils aus zwei Subdomänen aufgebaut sind und über Disulfidbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen untereinander stabilisiert werden.

An Albumin sind unter physiologischen Bedingungen ein bis zwei Fettsäuren in Form ihrer Salze gebunden (Peters 1985), es wurde jedoch auch die Möglichkeit der Anbindung von sechs und mehr Fettsäuren an ungeladene Bereiche der Moleküloberfläche beschrieben (Carter und Ho 1994). Wenngleich bis heute Gegenstand der Forschung, so ist von drei hochaffinen und etlichen weiteren Bindungsstellen auszugehen, wobei die Carboxylgruppen der Fettsäuren durch ionische Wechselwirkungen an der Bindung beteiligt sein können, aber nicht müssen (Kuznetsov et al. 1975, Simard et al. 2005). Die Anbindung der Fettsäuren trägt zu leichten strukturellen Veränderungen (Hamilton 2004) und zu einer erhöhten Stabilität des Proteins bei (Peters 1985). Außerdem wird hierdurch der pI des Albumins auf etwa 4,7 abgesenkt (Carter und Ho 1994). Aufgrund der hohen negativen Ladung bei neutralem pH können Löslichkeiten von bis zu 30% erzielt werden (Tab. 7).

Wie in Tabelle 8 und Abbildung 13 zu ersehen ist, hat der pH-Wert der Lösung einen starken Einfluss auf die Albumin-Konformation. Sinkt der pH unter 4,5 ab, so entsteht aus der herzförmigen N-Form zunächst die teilweise entfaltete F-Form mit einem deutlich kleineren α -Helix-Anteil und bei weiterer Ansäuerung die fast vollständig entfaltete E-Form. Bei Verschiebung des pH-Wertes zu pH 8-9 erfolgt die Bildung der B-Form mit einem ebenfalls reduzierten α -Helix-Anteil, die nach einer gewissen Zeit zur schwerer löslichen A-Form wird (Foster 1960, Peters 1985, Carter and Ho 1994). Um derartige Phänomene zu vermeiden, sollte für die eigenen Experimente BSA in einem geeigneten Puffer bei pH 7 gelöst werden.

Werden Albuminlösungen erhitzt, wie es während des Mikroverkapselungsprozesses vor allem bei der Primäremulgierung lokal denkbar ist, so ist eine Denaturierung des Proteins zwischen 60 und 75 °C festzustellen (Rüegg et al. 1977). Die exakte mechanistische Beschreibung der Denaturierung von BSA ist widersprüchlich. Einerseits wurde bei fettsäurefreiem Protein ein einfacher Übergang mit zwei Stadien (nativ [N] \leftrightarrow reversibel ungefaltet [U] \rightarrow irreversibel denaturiert [I]) berichtet, der je nach experimentellen Bedingungen bei 57 oder 63 °C lag (Poole et al. 1987, Kosa et al. 1998). Andererseits wurde ebenfalls für

Tab. 8: Isomere Konformationen von Serumalbumin^a.

E	F	N	B	A
expanded	fast	normal	basic	aged
<ul style="list-style-type: none"> - 35% Helix - Entfalten mehrerer Helices, soweit Disulfidbrücken das zulassen - 21·250Å 	<ul style="list-style-type: none"> - 45% Helix - wandert schnell in Elektrophorese - Entfaltung der Domäne III vom Rest des Molek. - Vol.zunahme - Lösl.keit sinkt - 40·129 Å 	<ul style="list-style-type: none"> - 55% Helix - natives Albumin - herzförmige Struktur ähnlich einem regelmäßigen dreiseitigen Prisma von 84·84·84·31,5Å^b 	<ul style="list-style-type: none"> - 48% Helix - wandert langs. in Elektrophorese - Deprotonierung von His-Resten in Domäne I^c - weniger drast. räuml. Veränderung als bei N→F 	<ul style="list-style-type: none"> - bei längerer Exposition bei pH > 9 unter Bildung von Disulfidbrücken - Lösl.keit sinkt - geringe elektrophoret. Mobilität

^anach Peters 1985 und Carter und Ho 1994, sofern nicht anders angegeben; ^bnach Ferrer et al. 2001, untersucht an humanem Serumalbumin; ^cnach Bos et al. 1989, untersucht an humanem Serumalbumin.

entfettetes BSA beschrieben (Giancola et al. 1997), dass ein doppelter Übergang von zunächst einer BSA-Domäne und dann der anderen beiden Domänen zu beobachten ist (NN* ↔ NU* ↔ UU* → I; 63,2 bzw. 64,1 °C bei pH 7,0), und dass sich bovines und humanes Serumalbumin hinsichtlich ihrer thermischen Denaturierung unterscheiden. Bei Erwärmung erfolgt zunächst eine partielle Entfaltung des BSA unter Wahrung der Sekundärstruktur in weiten Bereichen des Proteins (U-Form), anschließend werden intermolekulare Disulfidbrücken (I-Form) geknüpft (Oakes 1976). Für humanes Serumalbumin beschrieben Wetzel et al. 1980 in guter Analogie, dass die freie Thiolgruppe von Cys³⁴ infolge der temperaturbedingten

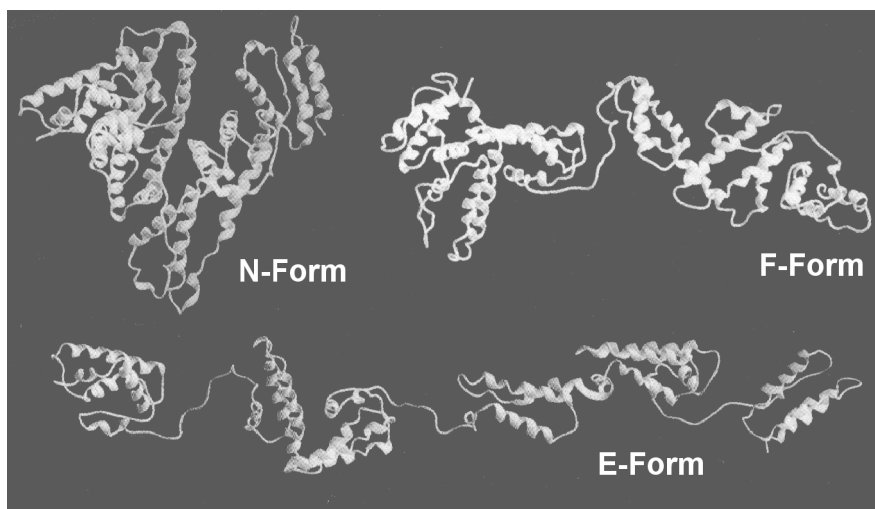


Abb. 13: Auswahl isomerer Konformationen von Serumalbumin (nach Carter und Ho 1994).

Konformationsänderung nicht mehr geschützt in einer Tasche vorliegt und somit intermolekulare Disulfidbrücken unter irreversibler Denaturierung des Proteins ausbilden kann. Bemerkenswert ist, dass nach Abkühlen der Proteinlösung zum Teil 80-90 % des Albumins wieder renaturieren, die Bildung der Disulfidbrücken also nur langsam oder unvollständig erfolgt.

Untersuchungen zur Stabilität wässriger BSA-Lösungen bei der Primäremulgierung in PLGA-haltigem Methylenchlorid zeigten auch ohne Adjuvanzen eine gute Stabilität und Wiederfindung des Proteins (Kang und Singh 2003), weshalb BSA als Modellprotein zur Charakterisierung der Mikropartikelherstellung im Mikromischer gut geeignet ist. Gleichzeitig muss bedacht werden, dass in der Zukunft verwendete, therapeutisch relevante Proteine möglicherweise empfindlicher gegenüber Temperaturerhöhung und hydrophoben Grenzflächen sind und folglich für jedes Protein individuelle Strategien zur Stabilisierung entwickelt werden müssen.

1.5 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Grundlagen der Fluorimetrie

Das Phänomen der Fluoreszenz wurde erstmals 1565 von Monardes beschrieben (vgl. Bright 1988). Als erste fluoreszierende Reinsubstanz wurde Chinin untersucht (Herschel 1845). Stokes erkannte, dass das von der Probe ausgesandte Licht eine andere Wellenlänge als das eingestrahlte Licht hat (Stokes 1852). Der Unterschied zwischen Exzitations- und Emissionsmaximum wird daher als Stokes-Verschiebung bezeichnet. Wie im Jablonski-Termschema in Abbildung 14 dargestellt, können Elektronen durch Lichtabsorption aus dem Singulett-Grundzustand S_0 in den angeregten Singulett-Zustand S_1 , teilweise sogar in S_2 gehoben werden. Von dort fallen sie strahlungslos auf das niedrigste Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustandes ($S_1, v = 0$) zurück. Das angeregte Elektron besitzt einen dem im Grundzustand verbliebenen Elektron entgegengerichteten Spin, die Rückkehr in den Grundzustand ist Spin-erlaubt und Fluoreszenzlicht wird bis maximal 10 ns nach der Bestrahlung ausgesendet. Die Emission ist langwelliger, also energieärmer als die Exzitation, da Teile der Anregungsenergie durch sogenannte innere Umwandlung (Energieverteilung im Molekül, Rotation, Vibration, Kollision) verbraucht werden. Der angeregte Triplettzustand T_1

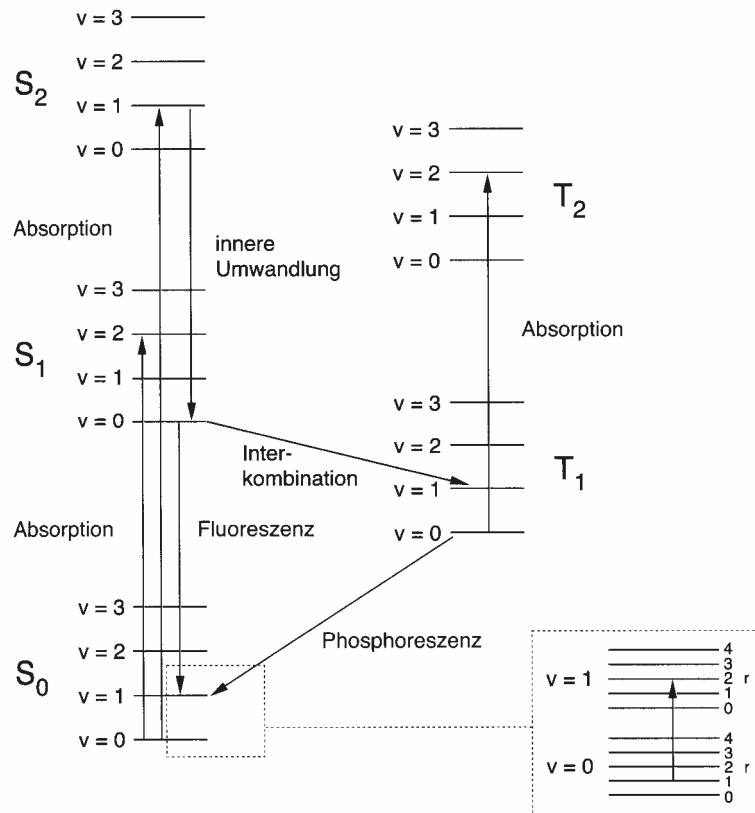


Abb. 14: Jablonski-Termschema (nach Lottspeich und Zorbas 1998).

kann durch Interkombination (Intersystem-Crossing) unter strahlungslosem Energieverlust erreicht werden. Da hier das angeregte Elektron den gleichen Spin wie das im Grundzustand verbliebene besitzt, kann nur Phosphoreszenz, nicht aber Fluoreszenz ausgesendet werden (Otto 1995, Lottspeich und Zorbas 1998, Lakowicz 1999). In der praktischen Arbeit ist der Übergang von Fluorophoren in den angeregten Triplett-Zustand unerwünscht, da die Akkumulation von Molekülen im T₁-Zustand und sich anschließende weitere Reaktionen zum „Ausbleichen“ fluoreszenzmarkierter Substanzen führen (Song et al. 1996).

Intrinsische Fluoreszenz von Proteinen

Die drei aromatischen proteinogenen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sind für die endogene Fluoreszenz von Proteinen verantwortlich. Wie in Tabelle 9 zu sehen ist, besitzen Tryptophan und Tyrosin im Vergleich zu Phenylalanin eine hohe Quantenausbeute. Jedoch kann die Fluoreszenz von Tyrosin durch Ionisierung, Wechselwirkung der Hydroxylfunktion mit benachbarten Carboxyl- oder Aminofunktionen oder durch Energie-

transfer auf Tryptophan leicht gelöscht werden. Folglich wird die intrinsische Proteinfluoreszenz bevorzugt bei 350 bis 360 nm quantifiziert, was dem Emissionsmaximum von Tryptophan entspricht. Die exakte Lage des Maximums hängt unter anderem von der Polarität und Viskosität des Lösungsmittels ab, da der angeregte Fluorophor mit polaren und niedrigviskosen Lösungsmitteln unter Absenkung seines Energieniveaus wechselwirken kann (sog. Lösungsmittelrelaxation) und somit Licht höherer Wellenlängen emittiert (Lakowicz 1999).

Tab. 9: Fluoreszenzeigenschaften aromatischer Aminosäuren (Quellen: Lottspeich und Zorbas 1998/ Holtzhauer 1996/ Lakowicz 1999, sofern nicht anders angegeben).

Aminosäure	Exzitation (nm) ^a	Emission (nm) ^a	Quantenausbeute ^b	Häufigkeit ^c
Tryptophan	285 / 280 / 295	360 / 348 / 353	0,20 / 0,20 / 0,13	1,4 %
Tyrosin	275 / 274 / 275	310 / 303 / 304	0,21 / 0,14 / 0,14	3,2 %
Phenylalanin	260 / 257 / 260	283 / 282 / 282	0,04 / 0,04 / 0,02	3,9 %

^aAngabe für wässrige Lösungen bei pH 7,0 und 25 °C; ^bQuantenausbeute ist das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen; ^cdurchschnittliche Häufigkeit in Proteinen nach Nelson und Cox 2001.

Fluoreszenzmarkierung von BSA

Durch Markierung von Proteinen mit Fluorochromen kann die Fluoreszenzintensität um ein Vielfaches gesteigert werden. Es gab im Wesentlichen drei Gründe, eine fluoreszenzmarkierte Form des BSA als Modellprotein in der vorgelegten Arbeit einzusetzen (Wischke und Borchert 2006b). Zum einen sollte das Protein in wässrigen Lösungen so empfindlicher nachgewiesen werden. Zum anderen wurde die Möglichkeit der Visualisierung des Proteins im Mikropartikel über konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie geschaffen, wobei die Proteinlokalisierung zur Charakterisierung des Herstellungsgangs herangezogen werden sollte. Darüber hinaus sollte in Zellexperimenten die Phagozytose der fluoreszierenden Mikropartikel durchflusszytometrisch quantifiziert werden.

Grundsätzlich sollen als Fluoreszenzmarker verwendete Fluorophore a) einfach, schnell und stabil gebunden werden, b) Raumstruktur und immunologische Eigenschaften des Proteins möglichst wenig verändern, c) geringes Ausbleichen zeigen, d) eine gute Quantenausbeute besitzen und e) leicht herstellbar oder preiswert verfügbar, gut wasserlöslich und rein sein (Storch 1997). Als Fluoreszenzmarker werden meist Derivate des Fluoresceins

Eigenschaften von Fluorescein und Prinzipien der Fluoreszenzlösung

Die Fluoreszenzintensität von Fluorescein ist stark pH-abhängig, eine Erniedrigung des pH-Wertes von 8,0 auf 7,0 führt zu einer Reduzierung der Intensität um etwa zwei Drittel. Dies kann anhand der sechs prototropen Fluorescein-Formen (s. Abb. 16) erklärt werden (Zanker und Peter 1958). Die Protonierung des Dianions zum Monoanion besitzt einen pK_a -Wert von 6,71 (Smith und Pretorios 2002), wobei das Monoanion aufgrund einer veränderten räumlichen Stellung seines Monozyklus zum Trizyklus (Tamulis et al. 2003) nur noch 19 % der Fluoreszenzintensität des Dianions zeigt (Diehl und Markuszewski 1989). Daher war es für die eigenen Untersuchungen wichtig, durch geeignete Puffersysteme den pH-Wert für die fluorimetrische Quantifizierung stabil zu halten. Im Falle der Freisetzungstests aus PLGA-Partikeln ist dies aufgrund der entstehenden Säuren bekanntermaßen kritisch, folglich müssen die pH-Werte der entnommenen Proben überprüft und gegebenenfalls eingestellt werden.

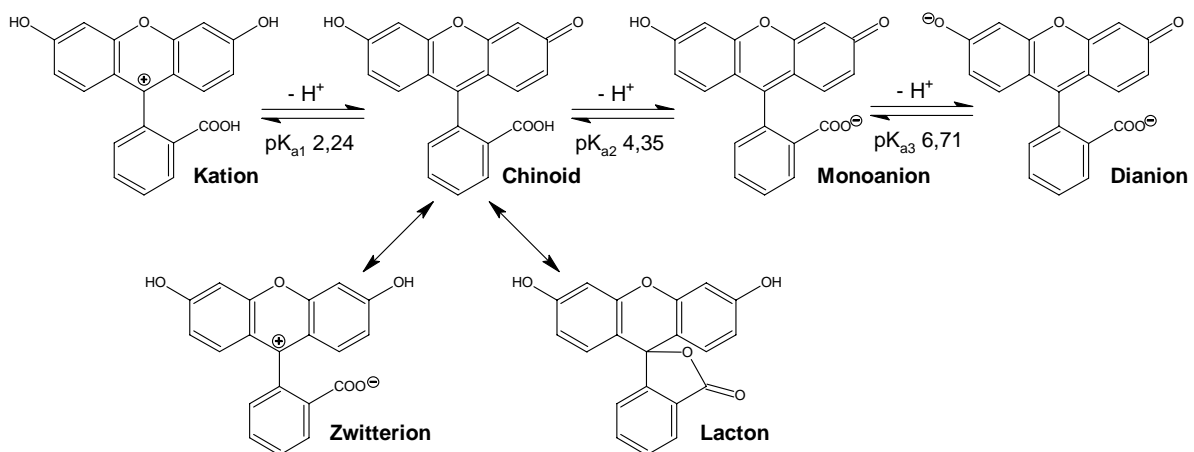


Abb. 16: Die sechs prototropen Formen des Fluoresceins (nach Zanker und Peter 1958, pK_a -Werte nach Smith und Pretorios 2002).

Bei den meisten Fluorophoren bewirkt ein Temperaturanstieg um $1\text{ }^\circ\text{C}$ eine Erniedrigung der Fluoreszenz um 1 % (Williams und Bridges 1964), da aufgrund der erhöhten Beweglichkeit bei steigender Temperatur der angeregte Fluorophor häufiger mit Lösungsmittelmolekülen kollidiert und so Energie abgibt (sog. Stoßlöschung). Für FITC konnte dies nicht beobachtet werden (Cherry 1970). Hingegen bewirkt eine Erhöhung der Ionenstärke der Lösung einen hyperbolischen Anstieg der Fluoreszenzintensität (Cortese et al. 1991). Bei zunehmender Ionenstärke wird der Aktivitätskoeffizient nach Debye-Hückel erniedrigt, weshalb auch der pK_{a3} -Wert sinkt und eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Mono- und Dianion zugunsten des stärker fluoreszierenden Dianions zur Folge hat.

Das Ausbleichen von Fluorophoren infolge Bestrahlung kann, wie oben beschrieben, mit einem Übergang angeregter Fluorophore aus dem Singulett- in den Triplett-Zustand erklärt werden. Für Fluorescein ist dieser Effekt unter den Bedingungen einer normalen fluorimetrischen Messung als gering einzustufen (Smith et al. 1981), dennoch sollte im Rahmen dieser Arbeit während der Mikropartikel-Herstellung und -Handhabung so gut wie möglich auf Lichtschutz geachtet werden. Hingegen zeigt Fluorescein bei andauernder, sehr intensiver Bestrahlung geringer Schichtdicken, beispielsweise während der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie, deutliche Photolabilität. Dies ist auf die Entstehung radikalischer Formen des Dianions im T_1 -Zustand zurückzuführen, aus denen sich stabile, nicht-fluoreszierende Produkte bilden (Song et al. 1996).

Als Fluoreszenzlöschung wird ein Prozess bezeichnet, bei dem eine Komponente die Fluoreszenz einer anderen Komponente abschwächt oder vollständig aufhebt. Im Gegensatz zum Ausbleichen kommt es nicht zu einer chemischen Veränderung des Moleküls. Als statische Löschung bezeichnet man die Bildung eines Komplexes zwischen einem Löschermolekül (Quencher) und dem Fluorophor im S_0 -Zustand, der dann nicht mehr angeregt werden kann. Die dynamische Fluoreszenzlöschung (Stoßlöschung, collisional quenching) beschreibt hingegen die Energieübertragung vom angeregten Zustand des Fluorophors auf einen Quencher infolge Kollision. Da dieser hierfür innerhalb der kurzen Fluoreszenzlebensdauer zum Fluorophor diffundieren muss, ist das Ausmaß der Stoßlöschung abhängig von der Temperatur und Viskosität der Lösung sowie der Konzentration des Löschermoleküls. Ebenfalls vom angeregten Fluorophor ausgehend kann Energie strahlungslos durch Resonanz-Energie-Transfer (RET) auf einen Akzeptor übertragen werden, welcher selbst nicht fluoreszieren muss, aber eine Überlappung seines Absorptionsspektrums mit dem Emissionsspektrum des Donors zeigt. Das Ausmaß dieses auch als Förster-Transfer bezeichneten Prozesses wird beeinflusst durch die spektrale Überlappung und den Abstand zwischen Donor und Akzeptor (Lakowicz 1999). Das Auftreten von Konzentrationslösungen, also der nichtlinearen Zunahme der Fluoreszenzintensität bei steigender Fluorophorkonzentration, wurde für Fluoresceinlösungen schon sehr früh beschrieben (Walter 1888). Es wurde postuliert, dass sich in konzentrierten Lösungen zusammengesetzte Moleküle bilden (Walter 1889). Aus heutiger Sicht sind bei reinen Fluorophor-Lösungen sogenannte innere Filtereffekte (Reabsorption von emittiertem Licht) wahrscheinlicher, bei mehrfach FITC-markierten Proteinen tritt hingegen Konzentrationslöschung der Fluorophore untereinander auf (Wischke und Borchert 2006b), wie im Ergebnisteil dieser Arbeit detailliert beschrieben wird.

1.6 Dendritische Zellen – immunologische Funktion

Dendritische Zellen (DCs) sind hochspezialisierte Zellen des Immunsystems, die als solche erstmals 1973 beschrieben wurden (Steinmann und Cohn 1973, Voorhis et al. 1982). Im Gegensatz zu anderen phagozytierenden Zellen des Immunsystems besteht ihre Aufgabe jedoch nicht vornehmlich darin, Pathogene zu zerstören. Vielmehr stellen dendritische Zellen einen Teil der adaptiven Immunantwort dar und sind darauf spezialisiert, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren, den Lymphozyten zu präsentieren und so primäre T-Zell-Antworten auszulösen (Banchereau et al. 2000, Guemronprez et al. 2002).

Dendritische Zellen stellen nur einen Anteil von $< 1\%$ der Leukozyten des Blutes dar. DC-Subtypen sind in verschiedenen Geweben zu finden (Shortman und Liu 2002), wie beispielsweise die nach Paul Langerhans benannten Langerhans-Zellen der Haut (Romani et al. 2003). Man unterscheidet zwischen unreifen (iDCs) und reifen (mDCs) dendritischen Zellen. Unreife dendritische Zellen kommen in den meisten Geweben dauerhaft vor. Nach ihrer Bildung im Knochenmark werden sie mit dem Blut zu den peripheren Geweben transportiert. Wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten analysieren dendritische Zellen ihre Umgebung, erkennen Pathogene anhand deren bekannter wiederkehrender Merkmale und nehmen sie durch rezeptorabhängige Endozytose auf (Sallusto et al. 1995, Fanger et al. 1996). Darüber hinaus können sich dendritische Zellen auch rezeptorunabhängig extrazelluläres Material einverleiben. So können partikuläre Strukturen phagozytiert werden (Matsuno et al. 1996) oder durch Makropinozytose (Sallusto et al. 1995) auch Viren inkorporiert werden, die die von Rezeptoren erkannten, wiederkehrenden Merkmale der Pathogene nicht tragen. Für eine optimale Phagozytose müssen die Partikel kleiner $5\text{-}10\ \mu\text{m}$ sein (O'Hagan und Singh 2004, Johanson et al. 2000). Das aufgenommene Material befindet sich nun in einem Phagosom, welches zunächst acidifiziert wird und anschließend mit Lysosomen unter Bildung eines Phagolysosoms fusioniert (Jacques und Bainton 1978, Hackham et al. 1997, Janeway et al. 2002, Stuart und Ezekowitz 2005). Zusätzlich zum sauren Milieu liegen nun eine Vielzahl von Hydrolasen vor, die die aufgenommenen Substanzen prozessieren (Uchida et al. 1985, Stuart und Ezekowitz 2005).

Infolge der Aufnahme von Antigenen können dendritische Zellen aktiviert werden. Dazu wandern die DCs in die sekundären, d. h. peripheren lymphatischen Organe, insbesondere in Lymphknoten, die dem Infektionsherd am nächsten gelegen sind. Der hier stattfindende, auch als Reifung bezeichnete Vorgang führt in den DCs zu Veränderungen der

Zytoskelettstruktur, dem Verlust der Fähigkeit zur Phagozytose, einer veränderter Expression von Oberflächenproteinen und einer modifizierten Zytokinfreisetzung. Die Hauptaufgabe der entstandenen reifen dendritischen Zelle besteht nun in der Präsentation der aufgenommenen und prozessierten Antigene. Dazu werden die Antigenbruchstücke an die Haupthistokompatibilitätsmoleküle MHC I oder II (major histocompatibility complex) an der Zelloberfläche gebunden. MHC I sind auf fast allen menschlichen Zellen vorhanden und präsentieren den Immunzellen die im Zellinneren vorhandenen Strukturen, gegebenenfalls also auch virale oder tumorös entartete Proteine. MHC II finden sich hingegen nur auf professionellen Antigenpräsentierenden Zellen (antigen presenting cells, APCs) wie dendritischen Zellen und zeigen die von den APCs aus der Umgebung aufgenommenen Antigene. Dendritische Zellen haben zusätzlich die Fähigkeit zur sogenannten Cross-Präsentation, das heißt, sie können aus der Umgebung aufgenommene Fremdartigene auch über MHC I präsentieren (Brode und Macary 2004). Damit können sie zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) gegen tumoröse oder virusinfizierte Zellen aktivieren, aber auch zur Toleranz gegen körpereigene Strukturen beitragen (Carbone et al. 1998).

Die Reifung der DCs ist ein kritischer Schritt für die Auslösung von Immunantworten und wird sowohl durch das aufgenommene Pathogen selbst (Rescigno et al. 1999), als auch durch das Mikromilieu in der Umgebung der DCs bestimmt (Jonuleit et al. 1997). Erfolgt keine Aktivierung der iDC zu mDC, so kommt es zur Ausbildung einer Immuntoleranz gegenüber dem präsentierten Antigen (Mahnke et al. 2002). Eine aktivierte dendritische Zelle kann in den Lymphknoten ihr prozessiertes Antigen über die in großer Anzahl exprimierte MHC I- und II-Moleküle den naiven T-Zellen präsentieren (erstes Signal). Naive T-Zellen sind reife T-Lymphozyten, die zwischen Blut und Lymphe pendeln und auf ihre Aktivierung warten. Diese tritt jedoch nur ein, wenn die Antigenpräsentierende dendritische Zelle außer der Antigenpräsentation noch ein costimulatorisches Signal (zweites Signal) aussendet. Dabei handelt es sich um die Oberflächenproteine B 7.1 (CD 80) und B 7.2 (CD 86), die bei reifen dendritischen Zellen in besonders hoher Konzentration vorkommen und mit CD 28 auf den T-Zellen wechselwirken (Janeway 2002). Außerdem findet man bei reifen humanen dendritischen Zellen CD 83 (als Reifungsmarker analytisch genutzt), dessen Funktion jedoch noch weitgehend ungeklärt ist (Zhou and Tedder 1996). Die auf den reifen dendritischen Zellen in großer Zahl exprimierte Adhäsionsproteine wie beispielsweise ICAM-1 und ICAM-2 sorgen dafür, dass die DCs in engen Kontakt mit naiven T-Lymphozyten treten und letztere die zahlreichen MHC II-Moleküle nach präsentierten Antigenen absuchen können. Neben dem Antigen-spezifischen ersten Signal (s. Abb. 17) und dem costimulatorischen

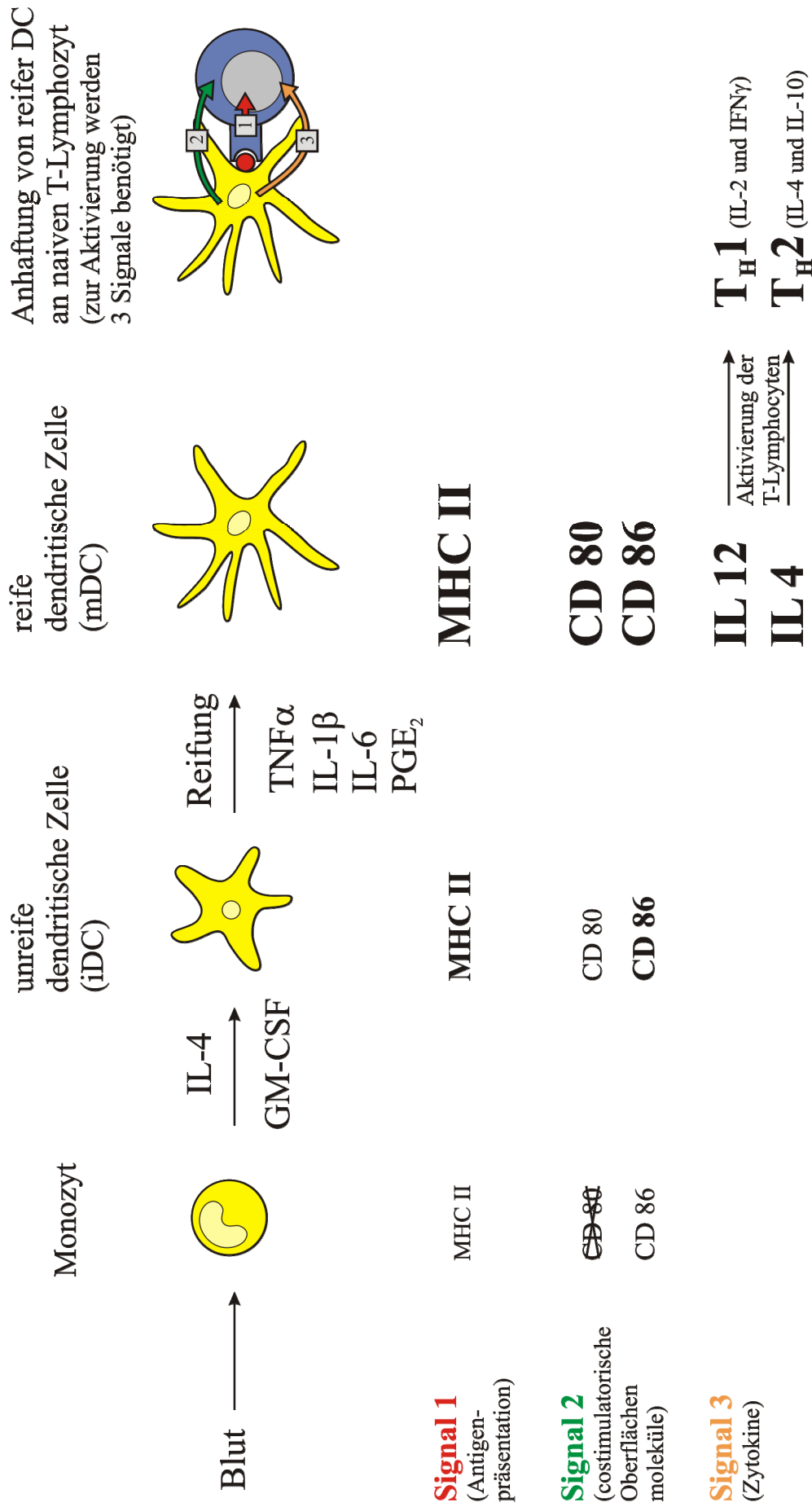


Abb. 17: Die aus Humanblut über Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Monozyten werden 5 Tage mit IL-4 und GM-CSF inkubiert, es entstehen unreife dendritische Zellen. Bei Zugabe eines Zytokin-Cocktails aus TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂ reifen sie in 2 Tagen aus. Die entstandenen mDCs besitzen im Gegensatz zu Monozyten und iDCs alle drei benötigten Signale zur Aktivierung naiver T-Zellen in ausreichender Anzahl. Sezernieren sie IL-12, wird der T_H1-Weg aktiviert, bei IL-4 hingegen der T_H2-Weg.

zweiten Signal wird zur T-Zell-Aktivierung noch ein drittes Signal in Form von Zytokinen benötigt (Kalinski et al. 1999), welches über die Entwicklung der T-Zellen in Richtung T_H1 (mittels Interleukin 12, IL-12) oder T_H2 -Zellen (mittels IL 4) entscheidet. Für die Entstehung von regulatorischen T-Zellen ($CD 4^+ CD 25^+$) ist vermutlich die Sekretion von Transformierendem Wachstumsfaktor β durch die Antigen präsentierende Zelle als drittes Signal nötig (Randolph and Fathman 2006).

Wie oben erläutert, werden Antigene von DCs unter anderem rezeptorabhängig aufgenommen (pathogen recognition receptors, PRR). Dabei werden konservierte pathogenassoziierte Strukturen, sogenannte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) erfasst (Medzhitov und Janeway 2002). Neben beispielsweise Mannoserezeptoren findet man hierfür auf der Oberfläche der DCs die sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR). Dieser Begriff leitet sich von den zuvor bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschriebenen Toll-Rezeptoren ab (Medzhitov et al. 1997). Die zehn beim Menschen bekannten TLR erkennen unter anderem bakterielle Strukturen, wie Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien (TLR 4), Lipoproteine und Peptidoglycane grampositiver Bakterien (TLR 2/TLR 1 und TLR 2/TLR 6) und Flagellin begeißelter Bakterien (TLR 5). Virale einzelsträngige RNA kann von TLR 7 und TLR 8, virale doppelsträngige RNA oder ihre synthetischen Analoga (z. B. Poly(I:C)) von TLR 3 erfasst werden (Mazzoni und Segal 2004). Nicht alle TLR sind bei allen DC-Subtypen gleichermaßen vorhanden, außerdem gibt es Unterschiede zwischen den Spezies. So besitzen humane myeloide DCs keinen Rezeptor (TLR 9) für CpG-ODN, ein unmethyliertes Motiv viraler und bakterieller DNA, weshalb die im Mausmodell mit dieser Substanz erzielten Erfolge nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind (Hornung et al. 2002, Mazzoni and Segal 2004). Wird ein PAMP an den passenden TLR gebunden, so führt dies über den Transkriptionsfaktor NF- κ B zur Bildung proinflammatorischer Zytokine und costimulatorischer Moleküle und damit zu einer Reifung der dendritischen Zellen (Medzhitov et al. 1997).

1.7 Tumorstimmulierung mit dendritischen Zellen

Tumorzellen präsentieren, wie fast alle anderen Körperzellen auch, zelleigene Proteine auf MHC I an ihrer Oberfläche, weshalb sie von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) erkannt werden (Boon et al. 1994). Oft ist die generierte Immunantwort nicht ausreichend zur Eliminierung des Tumors, unter anderem deshalb, weil dieser Strategien entwickelt der Immunantwort zu entgehen – sog. escape-Mechanismen (Ahmad et al. 2004). Infolgedessen werden unter anderem die Antigen präsentierenden Zellen (APCs) nicht ausreichend aktiviert.

Daher wird im Rahmen klinischer Studien und in individuellen Heilversuchen die Therapie von Tumoren mit *ex vivo* stimulierten autologen dendritischen Zellen erprobt. Sowohl im Mausmodell (Flamand et al. 1994, Mayordomo et al. 1995), als auch beim Menschen konnte die Wirksamkeit hinsichtlich immunologischer und in Einzelfällen auch hinsichtlich klinischer Endpunkte nachgewiesen werden (Hsu et al. 1996, Nestle et al. 1998, Schnurr et al. 2002, Banchereau und Palucka 2005). Dies zeigt, dass eine tumorgerichtete Immuntherapie mittels dendritischer Zellen grundsätzlich möglich ist. Der Erfolg einer solchen Therapie ist entscheidend abhängig von den Eigenschaften der verabreichten dendritischen Zellen.

Da dendritische Zellen wie oben beschrieben nur einen sehr kleinen Teil der Leukozyten darstellen, ist die Gewinnung geeigneter Mengen autologer DCs aus dem Blut schwer realisierbar. Die Arbeitsgruppe um J.H. Peters konnte jedoch in Monozytenkulturen einzelne dendritische Zellen nachweisen (Nau und Peters 1986, Peters et al. 1987, Najar et al. 1990). Später konnten diese DCs als sogenannte monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) durch Zusatz von Granulozyten-Macrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) und IL-4 gezielt aus Monozyten erzeugt werden (Peters et al. 1991, Ruppert et al. 1993, Sallusto und Lanzavecchia 1994, Romani et al. 1994). MoDCs ähneln dem DC-Subtyp der myeloiden dendritischen Zellen. Wie in Abbildung 17 dargestellt, können hierfür aus Patientenblut die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen werden. Aus den PBMCs lassen sich über die Adhärenz an Zellkulturplatten die Monozyten isolieren und mittels GM-CSF und IL-4 zu unreifen MoDCs (iMoDCs) differenzieren (Anton et al. 1998). Alternativ können DCs aus CD 34⁺ hämatopoetischen Stammzellen erzeugt (Caux et al. 1992, Bernhard et al. 1995, Zhou und Tedder 1996) oder mit Hilfe des Wachstumsfaktors Flt3-Ligand ihr Anteil im Blut erhöht werden (Maraskovsky et al. 2000).

Um eine Ausrichtung der DCs gegen Tumorgewebe zu erzielen, werden sie mit autologem Tumorlysate (falls Gewebe verfügbar) oder mit isolierten Tumorpeptiden, synthetischen Peptiden oder Tumor-RNA bzw. -DNA inkubiert (Antigenpulsung) [Lotze et al. 1999, Thumann et al. 2003]. Ein alternativer Weg ist die Fusion von DCs und Tumorzellen (Kao et al. 2005, Rosenblatt et al. 2005, Xia et al. 2005). Die Ausreifung der iMoDCs zu mMoDCs kann durch TLR-Liganden wie beispielsweise Poly(I:C) erzielt werden (Verdijk et al. 1999), üblicherweise wird jedoch ein Zytokin-Cocktail aus TNF α , IL-1 β , IL-6 und PGE-2 eingesetzt (Jonuleit et al. 1997). Die Applikation der autologen DC erfolgt meist intradermal, subkutan oder intratumoral.

Zahlreiche Fragen hinsichtlich der Herstellung von optimalen DC-Tumorvakzinen sind noch ungeklärt, beispielsweise die Auswahl der Tumorantigene, des Reifungsstimulus, des zu verwendenden DC-Reifungsgrades (meist mDCs), des Applikationsortes und der Anzahl der zu injizierenden Zellen. Unklar ist weiterhin das Reifungsstadium der durch *ex vivo*-Stimulation gewonnenen mDCs nach Applikation beim Patienten. Möglicherweise tritt eine Rückdifferenzierung der mDCs und damit ein Verlust der costimulatorischen Signale ein, was *in vitro* bei Entfernen des Reifungsstimulus (Zytokin-Cocktail) beobachtet wird. Zum Erzielen einer zytotoxischen Reaktion müssen die aufgenommenen Tumorpeptide auf MHC I cross-präsentiert werden, jedoch ist die Cross-Präsentation von extrazellulären gelösten Proteinen ineffizient. Könnte ein gelöstes Antigen nach der Phagozytose das Endosom verlassen und im Zytosol durch Proteasomen bzw. Immuno-Proteasomen zu Peptiden zerlegt werden (Kloetzel und Sijts 2002), so ist die anschließende Präsentation der Peptid/MHC I-Komplexe oft zu kurz, um eine effektive CTL-Antwort auszulösen (Ludewig et al. 2001).

Durch Einschließen des Antigens in ein geeignetes bioabbaubares Trägersystem könnte infolge der partikulären Struktur eine gesteigerte Phagozytose, ein verbessertes Entkommen aus dem Phagosom ins Zytosol mit verstärkter Cross-Präsentation und aufgrund der retardierten Freisetzung des Antigens eine verlängerte DC-Stimulation und MHC I-Präsentation erfolgen.

1.8 Zielstellung

In ersten Experimenten mit PLGA-Mikropartikeln, die mit Tetanustoxoid (TT) beladen wurden, konnte von Zimmermann et al. 2003 nachgewiesen werden, dass dendritische Zellen (DCs) das mikroverkapselte Modellantigen effektiver aufnehmen als gelöst zugesetztes TT und dass durch die Verkapselung eine Verstärkung des in der Tumorthherapie gewünschten T_H1 -Weges erfolgte. Die Mikropartikel wurden jedoch nicht unter kontrollierten Bedingungen hergestellt und es erfolgte keine adäquate Charakterisierung der Teilchen sowie des Vehikeleffektes auf dendritische Zellen.

Daher sollte im Rahmen der vorgelegten Arbeit ein geeignetes standardisiertes Verfahren für die Herstellung von Mikropartikeln aus Poly(Milchsäure-co-Glycolsäure) [PLGA] unter aseptischen Bedingungen etabliert werden. Für eine reproduzierbare Steuerung der Teilchengrößen in einem $W_1/O/W_2$ -Doppemulsionsverfahren wurde ein statischer Mikromischer verwendet und erstmals seine Eignung zur Erzeugung von Partikeln für immunologische Untersuchungen an DCs überprüft. Die Mikropartikel sollten u. a. hinsichtlich ihrer Partikelgröße, Verkapselungseffizienz, Ultrastruktur, Proteinverteilung, Proteinfreisetzung, des Endotoxin- und Restlösungsmittelgehaltes, der Ladung der Partikeloberfläche und des Einflusses der Methode der Primäremulgierung charakterisiert werden, wobei aufgrund der geringen Probenmengen und Proteinkonzentrationen besondere Schwierigkeiten zu erwarten waren.

Als Modellprotein sollte fluoreszenzmarkiertes bovines Serumalbumin (FITC-BSA) eingesetzt werden, um gleichzeitig die Verkapselung von Proteinen zu evaluieren und anhand der Fluoreszenz eine empfindlichere Quantifizierung des Proteins, eine Visualisierung der Proteinverteilung im Mikropartikel und die Lokalisierung der beladenen Mikropartikel in Zellexperimenten zu ermöglichen. Eine Bewertung der Eignung von FITC-BSA auf der Grundlage dieser Anforderungen sollte vorgenommen werden.

An humanen dendritischen Zellen sollte erstmals systematisch die Fragestellung untersucht werden, ob die so hergestellten und physikochemisch charakterisierten PLGA-Mikropartikel als Trägersystem für das Targeting von DC geeignet sind, inwiefern die Aufnahme der Mikropartikel die Expression von DC-Oberflächenmarkern beeinflusst und ob die Phagozytose der Vehikel eine Reifung der Zellen auslöst. Die Beantwortung dieser Fragen sollte helfen, ein neues Konzept für eine verbesserte DC-basierte immunologische Tumorthherapie zu entwickeln.

Für eine verstärkte Aufnahme der Mikropartikel in phagozytierende Zellen und als Grundlage für eine zukünftige Kopplung spezieller Liganden von DC-Rezeptoren an die Mikropartikel sollte eine kationischen Oberflächenmodifizierung der PLGA-Mikropartikel vorgenommen werden. In der Literatur sind hierfür verschiedene Methoden beschrieben worden (s. Abschnitt 1.2.2), wobei sich nur die Adsorption grenzflächenaktiver Moleküle durchgesetzt hat. Im Rahmen dieser Arbeit sollten bekannte Methoden zur Oberflächenmodifizierung hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit für das Targeting von DCs geprüft und neue Methoden entwickelt werden.

In der Literatur erfolgten bisher keine Untersuchungen zum Restgehalt der kationischen Substanzen in der Mikropartikelsuspension und zu dessen Toxizität auf phagozytierende Zellen. Um Schädigungen von Zellen zu vermeiden, sollte daher die Toxizität der hier verwendeten Substanzen ermittelt und ihr Restgehalt in den Mikropartikeln so weit wie möglich reduziert werden. Dabei musste gleichzeitig die Stabilität der Formulierung, speziell die Oberflächenladung betrachtet werden.

Die Zellexperimente mit Monozyten und dendritischen Zellen wurden in Kooperation mit Dr. med. J. Zimmermann (Universität Göttingen) und Dr. rer. nat. Dirk Lorenzen (Institut für Tumorthherapie, Duderstadt) durchgeführt.