

### 4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden proteinbeladene, biodegradable Mikropartikel aus Poly(Lactid-co-Glycolid) [PLGA] in einem neuen, reproduzierbaren, Mikromischer-basierten  $W_1/O/W_2$ -Doppelsemulsions-Lösemittelverdampfung-Verfahren unter aseptischen Bedingungen hergestellt. Im Mikromischer konnte die Größe der resultierenden Partikel gesteuert und so Teilchen mit einer optimalen Größe für die Phagozytose durch dendritische Zellen (DCs) erzeugt werden. Die  $W_1/O$ -Primäremulgierung der wässrigen Lösung des Modellproteins FITC-BSA in der organischen Lösung des Matrixpolymers wurde unter Berücksichtigung der Ultrastruktur der Mikropartikel, der Proteinverteilung sowie des Freisetzungsverhaltens optimiert. Es erfolgte eine umfassende Charakterisierung der Mikropartikel.

Ohne den tatsächlichen Restgehalt an Lösungsmitteln in den Mikropartikeln zu prüfen, werden in der Literatur gelegentlich Herstellungsmethoden mit alternativen Lösungsmitteln vorgeschlagen, für die die Arzneibücher einen höheren Restgehalt zulassen. In den vorgelegten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass bei dem hier angewendeten Verfahren der Partikelherstellung der Restlösungsmittelgehalt den Grenzwert des Arzneibuches für Dichlormethan um drei Zehnerpotenzen unterschritt und damit die Verwendung alternativer Lösungsmittel nicht notwendig ist.

Im Rahmen der Arbeit wurde FITC-BSA hinsichtlich seiner Eignung als Modellprotein für die Mikroverkapselung bewertet. Anhand der Fluoreszenzmarkierung waren bei qualitativen Untersuchungen zur Proteinverteilung im Mikropartikel und zur Lokalisation der Partikel im Zellexperiment zahlreiche Schlussfolgerungen zur Ultrastruktur der Teilchen bzw. ihrer Phagozytose möglich. Die fluorimetrische Quantifizierung des FITC-BSA in Proben aus den Freisetzungstests schlug hingegen fehl, weshalb andere Methoden zur Proteinquantifizierung entwickelt bzw. etabliert werden mussten. Die Hintergründe des unter den Freisetzungsbedingungen auftretenden Fluoreszenzanstiegs wurden intensiv untersucht und als Quenching infolge minimaler Proteinhydrolyse erkannt. Es handelt sich hierbei um ein grundsätzliches Phänomen bei mehrfach FITC-markierten Proteinen und kann auf andere Arbeitsbereiche (z. B. Immunfluoreszenz) übertragen werden.

In Zellexperimenten wurden die im Mikromischer erzeugten Mikropartikel effektiv durch phagozytierende Zellen aufgenommen, wobei die intrazelluläre Lokalisation mit unterschiedlichen Verfahren eindeutig nachgewiesen werden konnte. Zeitgleich mit den Arbeiten einer anderen Gruppe konnte erstmals nachgewiesen werden, dass PLGA-

Mikropartikel bei Abwesenheit von Endotoxinen und anderen starken Antigenen keine Reifung der DCs oder Veränderungen in der Expression ihrer Oberflächenmarker auslösen. Dies bestätigte die durch den LAL-Test bestimmte Abwesenheit von Endotoxinen in den Mikropartikeln und zeigte den Erfolg des aseptischen Herstellungsverfahrens.

Eine in der Literatur beschriebene Methode zur kationischen Oberflächenmodifizierung von PLGA-Partikeln mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) konnte nicht nachvollzogen werden. Als Ursache für die Instabilität wurde die Desorption des CTAB von der Partikeloberfläche festgestellt. In einem alternativen Verfahren wurde erstmals DEAE-Dextran zur Oberflächenmodifizierung von PLGA-Mikropartikeln eingesetzt. So konnten stabile kationische Mikropartikel hergestellt werden. Im Gegensatz zu der in der Literatur vorgeschlagenen Oberflächenmodifizierung mit Chitosan konnte bei DEAE-Dextran-ummantelten Teilchen aufgrund seines hohen  $pK_a$ -Wertes auch bei pH 7 eine positive Oberflächenladung festgestellt werden. Während der Partikelauflagerung wurde die Ladung der Teilchen und die Konzentration des kationischen Stabilisators überwacht. Unter Wahrung der Stabilität der Formulierung konnte der Restgehalt an überschüssigem DEAE-Dextran in der Mikropartikelsuspension unter die Toxizitätsgrenze abgesenkt werden.

Die DEAE-Dextran modifizierten Mikropartikel wurden effektiver als unmodifizierte Partikel in phagozytierende Zellen aufgenommen. Auch die Phagozytose der oberflächenmodifizierten Teilchen führte nicht zu einer Veränderung des DC-Phänotyps. Damit konnten in Übereinstimmung mit aktuellen Daten einer anderen Arbeitsgruppe frühere widersprüchliche Publikationen widerlegt werden, die vermutlich aufgrund der Kontamination mit bakteriellen Lipopolysacchariden eine verstärkte Expression verschiedener Oberflächenmarker durch die Phagozytose von anionischen bzw. kationischen Partikeln postulierten. Die Phagozytose der oberflächenmodifizierten oder unmodifizierten Teilchen führte bei den verwendeten Konzentrationen an Mikropartikeln nicht zur Zytotoxizität.

Damit stellen PLGA-Mikropartikel ein sicheres Trägersystem dar, um Antigene in dendritische Zellen einzuschleusen. Für eine verbesserte immunologische Tumorthherapie sollte die Antigenpulsung autologer dendritischer Zellen mit mikroverkapselten Antigenen erfolgen. Die neuartige Oberflächenmodifizierung der Mikropartikel mit DEAE-Dextran ermöglicht die Anbindung anionischer Liganden von Toll-like Rezeptoren. Durch diese könnte die Richtung der nachgeschalteten Immunantwort gesteuert und über eine verminderte Rückdifferenzierung der dendritischen Zellen *in vivo* eine weitere Verbesserung der Wirksamkeit DC-basierter Zelltherapien erzielt werden.