

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Mikropartikelherstellung im Mikromischer

Die im Rahmen dieser Arbeit herzustellenden Mikropartikel sollten als Protein-Trägersystem für das Targeting dendritischer Zellen eingesetzt werden. Wie in Abschnitt 1.6 erläutert, wird die optimale Partikelgröße für die Phagozytose mit $< 5-10 \mu\text{m}$ angegeben (O'Hagan und Singh 2004, Johanson et al. 2000). Daher lag im Blickfeld der eigenen Untersuchungen zunächst die Optimierung der Partikelgröße unter Nutzung des Mikromischers sowie die Reproduzierbarkeit der Herstellung und die Auswahl einer geeigneten Beladung mit dem Modellprotein FITC-BSA.

Steuerung der Partikelgröße im Mikromischer

In Abschnitt 1.3 wurde dargelegt, dass statische Mikromischer im Bereich der chemischen Industrie aufgrund ihrer Vorteile in der Prozesssteuerung und beim Scaling-up stetig im Vormarsch sind, die Produktion von Emulsionen in Mikromischern hingegen ein noch weitgehend unerschlossenes Arbeitsgebiet ist. Zu Beginn dieser Arbeit gab es nur eine Publikation zur Herstellung von Mikropartikeln in einem emulsionsbasierten Prozess im verwendeten Mikromischer (Schalper 2002). Schalper untersuchte an unbeladenen Mikropartikeln den Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die Partikelgröße. Im Vergleich zur eigenen Arbeit wurden andere PLGA-Sorten und Ethylacetat statt Dichlormethan als Lösungsmittel verwendet, dennoch ließen sich folgende grundlegende Aussagen für die eigene Arbeit verwenden: (1) Den größten Einfluss auf die Partikelgröße haben die Flussraten der zu emulgierenden Phasen. (2) Innerhalb bestimmter Grenzen beeinflussen die Viskositäten der Polymerphase (abhängig von der Konzentration und Sorte des PLGA) und der externen Detergens-Phase die Partikelgrößen kaum. (3) Ein kleinerer Auslassschlitz im Deckel des Mikromischers führt zu einer leichten Verkleinerung der Mikropartikel.

Für die eigenen Arbeiten wurde aus diesem Grund ein Mikromischer mit dem kleinsten erhältlichen Auslassschlitz ($60 \mu\text{m}$ breit, 4mm lang) verwendet. Als entscheidender Parameter sollte der Einfluss der Flussrate auf die Größe der resultierenden Mikropartikel untersucht werden. Hierfür wurde die zuvor mittels Ultra-Turrax[®] hergestellte W_1/O -

3. Ergebnisse und Diskussion

Primäremulsion des Modellproteins in der Polymerphase bei steigenden Flussraten in einer PVA-Lösung (W_2 -Phase) emulgiert. Wie von Freitas et al. 2003 vorgeschlagen, wurde das Flussratenverhältnis von W_1/O zu W_2 -Phase stets auf 1:25 festgelegt. Wie in Abbildung 27a zu ersehen ist, führten steigende Flussraten zu einer hyperbolischen Abnahme des Modalwerts der Partikelgröße. Außerdem konnte eine Verbreiterung der Partikelgrößenverteilung (s. Abb. 27b) und eine Abnahme der Peaksymmetrie festgestellt werden (Wischke et al. 2006a). Die Form der Partikelgrößenverteilung ist charakteristisch für den verwendeten Mikromischer und wurde auch andersorts beschrieben (Freitas et al. 2003).

Wie zu erwarten war, führte die höchste verwendete Flussrate der W_2 -Phase (25 ml/min) zu den kleinsten Partikeln. Eine weitere Steigerung der Flussrate zum Erzielen noch kleinerer Partikel war nicht sinnvoll, da bereits die Veränderung des Volumenstroms von 20 auf 25 ml/min nur einen geringen Effekt hatte. Die maximal zulässige Gesamtflussrate im verwendeten Mikromischer beträgt 30 ml/min. Dieser Grenzwert wurde vom Hersteller für die Nutzung identischer Volumenströme an beiden Einlässen festgelegt. In den hier beschriebenen Experimenten betrug das Verhältnis der Volumenströme jedoch 1:25, weshalb eine deutlich stärkere Belastung der Kanalwände der Mischstruktur zu erwarten ist und der Grenzwert reduziert werden sollte. Um Druckanstiege und lokal höhere Flussraten infolge eines möglichen Verblockens einzelner Kanäle des Mischelements abzuf puffern, wurde ein Sicherheitsfaktor von 5 ml/min einberechnet und 25 ml/min als maximale Flussrate für die eigenen Experimente festgelegt.

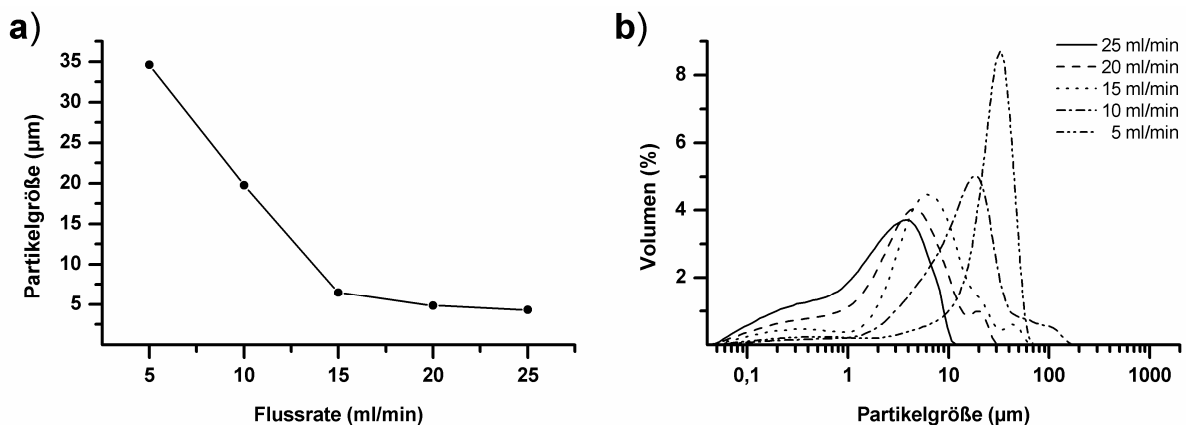


Abb. 27: Einfluss der Flussrate der W_2 -Phase im Mikromischer auf die Größe der erzeugten Mikropartikel (Primäremulgierung: Ultra-Turrax[®]). (a) Modalwert der Partikelgröße in Abhängigkeit von der Flussrate. (b) Volumengewichtete Partikelgrößenverteilung bei verschiedenen Flussraten.

Beladung mit FITC-BSA, Verkapselungseffizienz und Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses

Wie bereits in Abschnitt 1.5 erläutert, war die gewünschte Visualisierung der Mikropartikel in Zellexperimenten einer der Gründe für die Auswahl von fluoreszenzmarkiertem bovinen Serumalbumin (FITC-BSA) als Modellprotein. Zunächst musste durch Veränderung der Proteinbeladung eine optimale Fluoreszenzintensität der Mikropartikel eingestellt werden, so dass die Partikel sowohl im Fluoreszenzmikroskop als auch im Durchflusszytometer erfasst werden konnten. Wie in Tabelle 13 zu sehen ist, resultierte die Beladung der O-Phase mit freiem Fluorescein nicht in fluoreszierenden Mikropartikeln, was auf die geringe Löslichkeit des Fluoreszenzfarbstoffs in Dichlormethan zurückzuführen ist. Hingegen führte die Verkapselung von 1 % FITC-BSA (bezogen auf die Masse des Matrixpolymers) zu intensiv leuchtenden Mikropartikeln und wurde für die weiteren Experimente als Standardbedingung festgelegt.

Tab. 13: Optimierung der Fluoreszenzintensität der Mikropartikel durch Variation der Beladung mit Fluoreszenzmarkern (Primäremulgierung: Ultra-Turrax[®]).

Probe	Beladung	Mikroskopische Analyse
1	Fluorescein-gesättigtes DCM ^a	keine Fluoreszenz
2	0,1 % FITC-BSA	schwache Fluoreszenz
3	1 % FITC-BSA	intensive Fluoreszenz

^aDichlormethan (DCM) wurde mit Fluorescein gesättigt und als Lösungsmittel für die O-Phase im W₁/O/W₂-Prozess verwendet.

Die oben gezeigten, bei verschiedenen Flussraten hergestellten Mikropartikel-Chargen (Sollbeladung 1 % FITC-BSA) wurden hinsichtlich ihrer Verkapselungseffizienz untersucht (Abb. 28). Wie im Methodenteil beschrieben, wurde hierfür ein Solvations-Präzipitations-Verfahren etabliert. Es konnte nachgewiesen werden (Wischke et al. 2006a), dass die verwendete Flussrate keinen Einfluss auf die Verkapselungseffizienz hatte und hohe Einschussraten erzielt wurden (Primäremulgierung: Ultra-Turrax[®]). Die Abhängigkeit der Verkapselungseffizienz vom Primäremulsionsverfahren wird in Abschnitt 3.2 beschrieben.

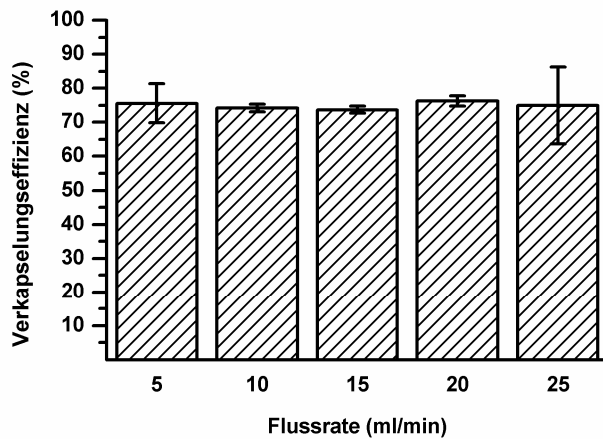


Abb. 28: Verkapselungseffizienz von FITC-BSA bei verschiedenen Flussraten für W_2 im Mikromischer (Dreifachbestimmung einer Charge, \bar{x} und R).

Die Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses im Mikromischer wurde anhand der Partikelgröße und Verkapselungseffizienz für die Standardformulierung (Flussrate 25 ml/min, 1%ige Beladung mit FITC-BSA) untersucht (Tab. 14). Es konnte eine gute Kontinuität beider Größen erzielt werden (Wischke et al. 2006a). Die Reproduzierbarkeit der Partikelgröße von identisch hergestellten Chargen über einen langen Zeitraum setzte jedoch voraus, dass eine intensive Reinigung der Mischstruktur nach der Produktion jeder Charge erfolgte. Unterbleibt die Reinigung, so werden durch präzipitierte Polymerfasern die Mikrokanäle verengt und folglich die lokalen Fließgeschwindigkeiten erhöht, was langfristig zu sinkenden Partikelgrößen führt. Im Extremfall kann es zu einem vollständigen Verblocken des Mikromischers kommen. Durch die Reinigung mit Detergenzienlösung, NaOH und/oder Dichlormethan konnten lichtmikroskopisch sichtbare Ablagerungen entfernt werden. Eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zeigte jedoch, dass die Entfernung von Polymerfasern so nicht restlos möglich war. Tritt trotz intensiver Reinigung langfristig eine deutliche Verkleinerung der Partikelgröße auf, so sollte das Inlay erneuert werden.

Tab. 14: Partikelgröße und Verkapselungseffizienz von 8 Chargen bei einer Flussrate von 25 ml/min (Primäremulgierung: Ultra-Turrax®).

	Median	Range
Partikelgröße (μm)	3,06	1,74
Verkapselungseffizienz (%)	78,7	10,0

Homogenität der Beladung mit FITC-BSA

Wie im Methodenteil erläutert, wurden die Mikropartikel nach Evaporation des organischen Lösungsmittels durch Zentrifugation isoliert und durch Waschschriffe aufgearbeitet. Infolge der Beladung mit FITC-BSA besaßen die Mikropartikel eine gelbliche Farbe. Dies wurde besonders deutlich, wenn die Partikel nach der Zentrifugation konzentriert als Pellet vorlagen. Bei den mit dem Ultra-Turrax[®] (Primäremulgierung) hergestellten Chargen wurde beobachtet, dass bei der Abtrennung der Partikel aus dem Evaporationsmedium das entstandene Pellet nicht homogen gefärbt war, sondern die oberen Schichten eine intensivere Färbung zeigten. Bei den anschließenden Waschschriffen trat dieses Phänomen nicht auf. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass ein Teil des FITC-BSA nur lose an bestimmte Mikropartikel gebunden war und durch die Waschschriffe entfernt wurde. Alternativ könnten den verschiedenen Schichten Mikropartikelfraktionen unterschiedlicher Größe zugeordnet werden, die verschieden stark beladen sind. Bei der Abtrennung von Mikropartikeln aus dem Evaporationsmedium war aufgrund des großen Flüssigkeitsvolumens die Wanderungstrecke der Partikel im Zentrifugenröhrchen groß, so dass Teilchen verschiedener Beschaffenheit durch differentielle Pelletierung möglicherweise in Form von Schichten aufgetrennt wurden. Bei den sich anschließenden Waschschriffen wurde hingegen mit einem geringeren Flüssigkeitsvolumen gearbeitet, weshalb die Wanderungstrecke geringer war und eventuell aus diesem Grund die Auftrennung in Schichten nicht mehr erfolgte.

Von den kleinen Mikropartikeln einer Charge ist zu erwarten, dass sie aufgrund ihres geringeren Volumens weniger FITC-BSA eingeschlossen haben, also entsprechend weniger intensiv gefärbt sind. Hingegen enthalten die größeren Partikel vermutlich mehr Hohlräume, die mit der proteinhaltigen inneren Wasserphase gefüllt sind. Das Matrixpolymer PLGA besitzt selbst eine größere Dichte als Wasser. Mehr wassergefüllte Hohlräume würden dazu führen, dass die Dichte der „großen“ Partikel ($\sim 5 \mu\text{m}$) geringer als die unbeladener kleiner Partikel ist. Gemäß dem Stokes'schen Fallgesetz ist die Teilchengeschwindigkeit proportional dem Quadrat des Teilchenradius, aber auch proportional der Dichtedifferenz zwischen dem Partikel und seinem Suspensionsmedium. Da diese Dichtedifferenz bei den großen, beladenen Teilchen kleiner ist, ist nicht zwingend zu erwarten, dass die großen wassergefüllten Partikel als erste aus dem Evaporationsmedium abgetrennt werden. Möglicherweise konzentrieren sie sich auch in einer der oberen Schichten des Pellets.

Um zu überprüfen, ob tatsächlich die intensiv gefärbten Schichten den größeren Partikeln zuzuordnen sind (s. Abb. 29), wurden die bei verschiedenen Flussraten (10-

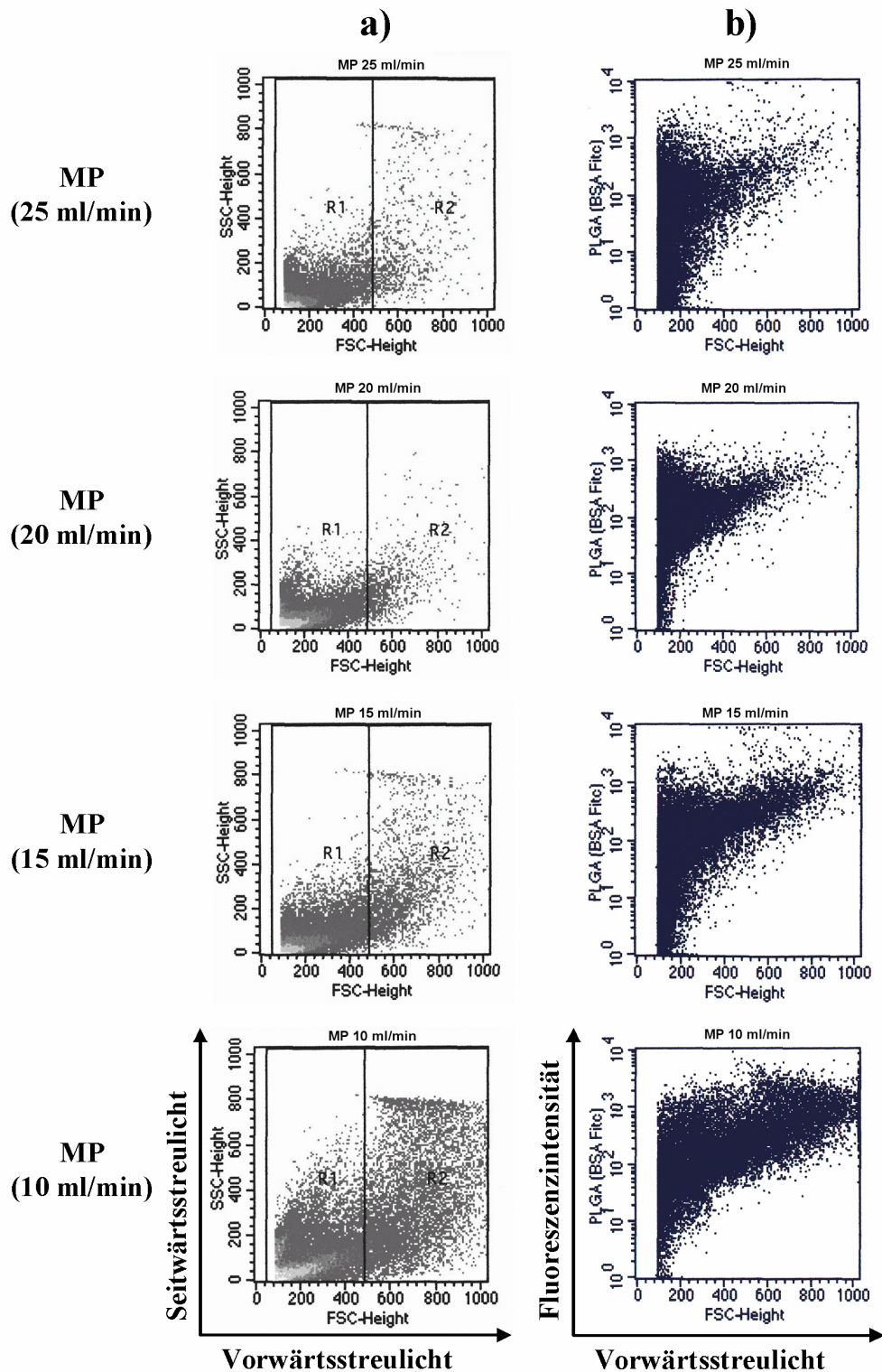


Abb. 29: Durchflusszytometrische Charakterisierung von Mikropartikeln (MP), die bei verschiedenen Flussraten im Mikromischer hergestellt wurden. (a) Muster von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht der Mikropartikel. (b) Intensität der FITC-Fluoreszenz der Mikropartikel in Abhängigkeit von der Partikelgröße (Vorwärtsstreulicht).

25 ml/min) hergestellten Mikropartikel im Durchflusszytometer analysiert. In diesem Gerät werden die Teilchen einer Probe (üblicherweise Zellen) einzeln mit einem Laser bestrahlt und das Streulicht in Richtung des eingestrahnten Lichts (Vorwärtsstreulicht), senkrecht zum eingestrahnten Licht (Seitwärtsstreulicht) sowie die Fluoreszenzintensität der Probe gemessen. Das Vorwärtsstreulicht ist fast unabhängig vom Brechungsindex der Teilchen und wird daher zur Charakterisierung der Partikel- bzw. Zellgröße verwendet. Das Seitwärtsstreulicht, welches abhängig von der Größe und dem Brechungsindex des Teilchens ist, wird bei Zellen zur Charakterisierung der Granularität genutzt. Wie in Abbildung 29a zu erkennen ist, führten niedrigere Flussraten bei der Herstellung (also größere Partikelgrößen) zu einer deutlichen Vergrößerung der Intensität des Vorwärtsstreulichts. Auch die Intensität des Seitwärtsstreulichts stieg, allerdings nur für die Fraktion der großen Partikel innerhalb einer Charge. Es wurde geschlussfolgert, dass das im Durchflusszytometer gemessene Vorwärtsstreulicht zur Charakterisierung der Mikropartikelgröße verwendet werden kann. Im nächsten Schritt wurde die Beladung mit FITC-BSA in Abhängigkeit vom Vorwärtsstreulichtsignal (Partikelgröße) bestimmt (Abb. 29b). Erwartungsgemäß zeigte sich, dass große Partikel eine hohe Fluoreszenzintensität aufwiesen, also viel FITC-BSA enthielten. Der Anteil großer, intensiv gefärbter Partikel nahm zu, wenn niedrigere Flussraten bei der Partikelherstellung im Mikromischer verwendet wurden.

Diese Ergebnisse bestärken die Vermutung, dass die bei der Zentrifugation sichtbaren, intensiv gefärbten Schichten den großen Mikropartikeln zuzuordnen sind. Um dies zu belegen, könnten die verschiedenen Schichten durch vorsichtige Präparation isoliert und die Größe und Verkapselungseffizienz der Fraktionen einzeln bestimmt werden. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Probenvolumina war diese Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Die hier diskutierte Frage zur Homogenität der Beladung mit FITC-BSA war der Anlass für weitere Untersuchungen zur Ultrastruktur der Mikropartikel (s. Abschnitt 3.2.1).

Einfluss der Partikelgröße auf die Vitalität von und die Phagozytose durch dendritische Zellen

Wie bereits erwähnt, wird in der Literatur die Partikelgröße für eine optimale Phagozytose mit $< 5\text{-}10\ \mu\text{m}$ beschrieben (O'Hagan und Singh 2004, Johanson et al. 2000). Es ist anzunehmen, dass Partikel im mittleren bis unteren Nanometerbereich weniger effektiv aufgenommen

werden, da sie einen schwächeren partikulären Reiz für die Phagozytose bieten. Außerdem ist die Beladung von Nanopartikeln mit Proteinen deutlich schwieriger und aufgrund des geringeren Teilchenvolumens kann mit einem Nanopartikel weniger Protein in die Zielzelle eingeschleust werden. Werden hingegen Mikropartikel verwendet, deren Teilchengröße einen kritischen Wert übersteigt, so könnte die Phagozytose der Mikropartikel zum Absterben der Zellen führen.

In Voruntersuchungen wurde daher an unreifen dendritischen Zellen (iDCs) der Einfluss der Phagozytose unterschiedlich großer Mikropartikel (Flussrate 10-25 ml/min im Mikromischer) auf die Vitalität der Zellen untersucht. Außerdem wurde in Abhängigkeit von der Partikelgröße die Fähigkeit der Mikropartikel untersucht, FITC-BSA in die dendritischen Zellen einzuschleusen. Für diese Untersuchungen wurden Monozyten durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert und unter Zytokineinfluss zu iDCs differenziert. Anhand des Expressionsmusters der charakteristischen Oberflächenmarker (s. Abschnitt 3.5) wurde sichergestellt, dass es sich bei den verwendeten Zellen um iDCs handelt.

Wie in Abbildung 30a zu erkennen ist, führte die Aufnahme der Mikropartikel zu einer Zunahme der Granularität (Seitwärtsstreulicht) der iDCs (umrandete Zellpopulation). Sollte in zukünftigen Untersuchungen mit beispielsweise Tumorantigen-beladenen Mikropartikeln keine Verwendung fluoreszenzmarkierter Proteine möglich sein, so könnte als Qualitätskontrolle die Mikropartikel-Phagozytose durch die Seitwärtsstreuung der Zellen abgebildet werden. Der prozentuale Anteil sterbender Zellen innerhalb der Population intakter DCs wurde durch Färbung mit Propidiumiodid bestimmt und ist jeweils im Histogramm angegeben (Abb. 30b). Die im Mikromischer bei Flussraten von 20-25 ml/min hergestellten Mikropartikel führten verglichen mit unbehandelten iDCs nur zu einer geringen Erhöhung des Anteils toter Zellen. Nach Phagozytose von größeren, also bei niedrigeren Volumenströmen hergestellten Mikropartikeln zeigten die iDCs hingegen einen deutlichen Vitalitätsverlust. Für die Messung der Fluoreszenzintensität wurde die Empfindlichkeit des Durchflusszytometers so eingestellt, dass die unspezifische FITC-Fluoreszenz in den unbehandelten iDCs nur zu ~1 % erfasst wurde (Abb. 30c). Die Phagozytose von FITC-BSA beladenen Mikropartikeln führte zu einer deutlichen Verstärkung der Fluoreszenzintensität der Zellen. Nach Inkubation mit den kleinsten Mikropartikeln waren 94,3 % der iDCs FITC-positiv. Mikroskopisch konnte gezeigt werden, dass das FITC-Signal tatsächlich auf eine intrazelluläre Lokalisation der Mikropartikel und nicht auf bloße Adhäsion an die Zellmembran zurückzuführen ist (Abb. 31, vgl. Abschnitt 3.5.2).

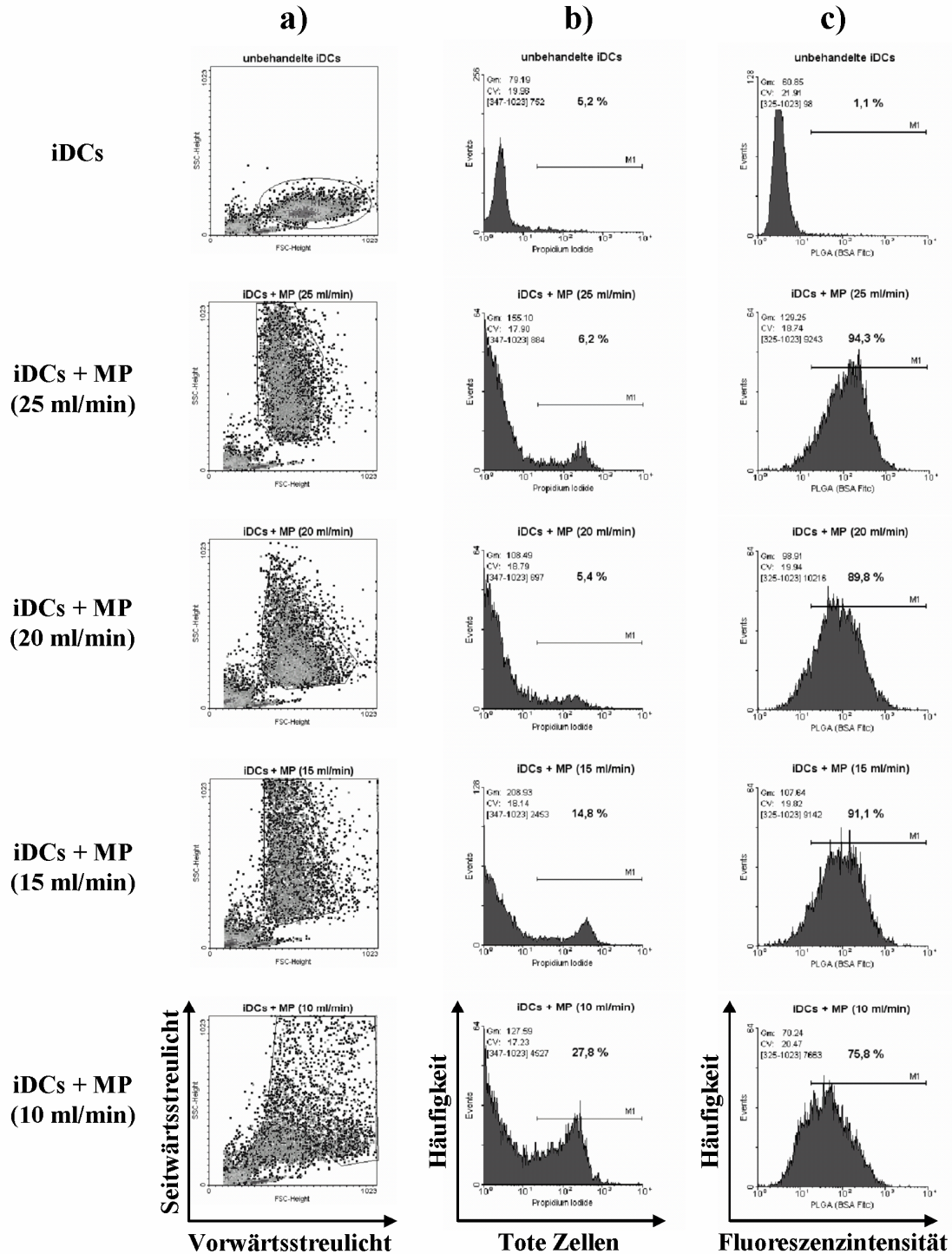


Abb. 30: Einfluss der Größe der Mikropartikel (MP) auf die Eigenschaften von unreifen dendritischen Zellen (iDCs) nach der Partikel-Phagozytose. (a) Muster von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht der dendritischen Zellen. (b) Anteil toter Zellen, bestimmt durch Propidiumiodid-Einlagerung. (c) Intensität der FITC-Fluoreszenz der Zellen. Die in den Spalten b und c angegebenen Prozentzahlen entsprechen dem Anteil Propidiumiodid- bzw. FITC-positiver Zellen.

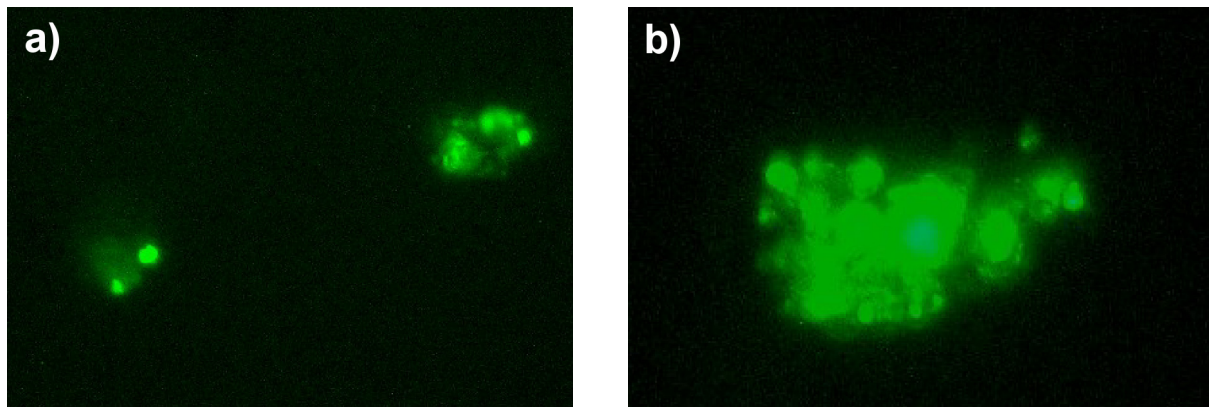


Abb. 31: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von unreifen dendritischen Zellen nach der Phagozytose FITC-BSA beladener Mikropartikel. (a) Übersichtsbild und (b) Detailbild mit jeweils intrazellulärer Lokalisation der fluoreszierenden Partikel.

Standardparameter bei der Mikroverkapselung im Mikromischer

Bei der Festsetzung von Standardbedingungen für die Mikropartikelherstellung im Mikromischer müssen verschiedene Zielgrößen berücksichtigt werden. Grundsätzlich führen höhere Flussraten zu einer Verkleinerung der Partikelgrößen, aber auch zu einer Verbreiterung der Größenverteilung. Die Verkapselungseffizienz wurde dadurch nicht beeinflusst. Bei einer Flussrate von 25 ml/min konnten mit guter Reproduzierbarkeit Mikropartikel mit einem Modalwert von etwa 3 μm hergestellt werden. Aus technischer Sicht sollte diese Flussrate im verwendeten Mikromischer nicht überschritten werden.

Die hergestellten Mikropartikel wurden effektiv durch dendritische Zellen aufgenommen. Es konnte eine Abnahme des Anteils FITC-positiver Zellen und eine Verringerung der Zellvitalität bei steigender Mikropartikelgröße (d. h. niedrigerer Flussrate im Mikromischer) festgestellt werden.

In allen weiteren Untersuchungen wurde daher eine Flussrate von 25 ml/min angewendet (sofern nicht anders angegeben), da so die kleinsten Mikropartikel erzeugt werden konnten. Als Modellprotein wurde 1 % FITC-BSA verkapselt, da diese Konzentration für die Visualisierung der Mikropartikel in der Zellkultur geeignet war. Des Weiteren könnte diese Proteinkonzentration der Menge an Antigen (z. B. Tumorantigen) entsprechen, die in zukünftigen Versuchen für die Mikroverkapselung maximal zur Verfügung steht.

3.2 Primäremulgierung mittels Ultra-Turrax®: Charakterisierung der Mikropartikel

Wie in Abschnitt 3.1 dargestellt, konnten im Mikromischer Partikel hergestellt werden, die hinsichtlich ihrer Partikelgröße für das Targeting dendritischer Zellen geeignet sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Mikropartikel mit einem Modellprotein beladen werden, weshalb ein Doppelemulsionsprozess mit einer proteinhaltigen inneren Wasserphase angewendet wurde. Gemäß der Theorie führt dieses Verfahren zum Einschluss der Proteinlösung ins Innere der Mikropartikel. Dies setzt voraus, dass die W_1 -Tröpfchen der Primäremulsion kleiner als die während der Sekundäremulgierung in der W_2 -Phase erzeugten W_1/O -Tröpfchen sind. Nur so kann die Proteinlösung tatsächlich in die Polymermatrix eingeschlossen werden. Somit hat die Methodik der Primäremulgierung einen entscheidenden Einfluss auf die Ultrastruktur der Mikropartikel. Ein weiterer Einflussparameter ist die Stabilität der Primäremulsion, die beispielsweise durch die Viskosität der dispersen Phase oder die Grenzflächenspannung zwischen W_1 - und O-Phase beeinflusst wird.

Die Effektivität des Einschlusses der Proteinlösung in die Mikropartikel wird durch die Verkapselungseffizienz ausgedrückt. Nicht eingeschlossenes Protein verteilt sich theoretisch im Evaporationsmedium und wird bei der Partikelauferarbeitung durch Waschschritte entfernt. Wie in Abschnitt 3.1 angegeben (Tab. 14), konnte bei der Primäremulgierung mit dem Ultra-Turrax® eine hohe Verkapselungseffizienz (~ 79 %) erreicht werden.

Im Rahmen der hier dargestellten Untersuchungen sollte überprüft werden, ob die gemessene Verkapselungseffizienz tatsächlich dem Einschluss des Proteins ins Innere der Mikropartikel entspricht. Hierfür wurden die Ultrastruktur der Mikropartikel und die Proteinverteilung untersucht sowie das Freisetzungverhalten der Mikropartikel studiert. Des Weiteren wurde anhand der Glasübergangstemperatur von PLGA der Einfluss der Proteinverkapselung auf das Matrixpolymer analysiert sowie die möglichen Rückstände organischer Lösungsmittel in den Mikropartikeln quantifiziert.

3.2.1 Ultrastruktur der Mikropartikel

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Mittels hochauflösender Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde die Oberflächenstruktur der Mikropartikel untersucht. Die mittels Laserdiffraktometrie bestimmte Partikelgröße (s. Abschnitt 3.1) konnte bestätigt werden. Wie in Abbildung 32 dargestellt, zeigten die Mikropartikel eine sphärische Struktur und eine glatte Oberfläche. Bei den Partikeln $> 1 \mu\text{m}$ konnten einzelne Poren festgestellt werden. In der Fraktion $< 1 \mu\text{m}$ waren solche Poren auch bei mehrfacher Präparation verschiedener Chargen (Primäremulgierung: Ultra-Turrax[®]) nicht zu finden (Wischke et al. 2006a). Eine besondere Schwierigkeit bei der Elektronenmikroskopie stellte die Temperaturempfindlichkeit des verwendeten PLGA dar. Durch die hohe Energie des Elektronenstrahls bei starken Vergrößerungen kam es teilweise zur Erweichung und zu Bewegungen in der Probe, die zu Rissen in der Goldschicht oder zu scheinbar elipsoiden Formen der Mikropartikel führen konnten (Abb. 32b). Die Bildung dieser Artefakte ist auf den Übergang des PLGA vom glasartigen in den gummiartigen Zustand zurückzuführen (s. Abschnitt 3.2.3).

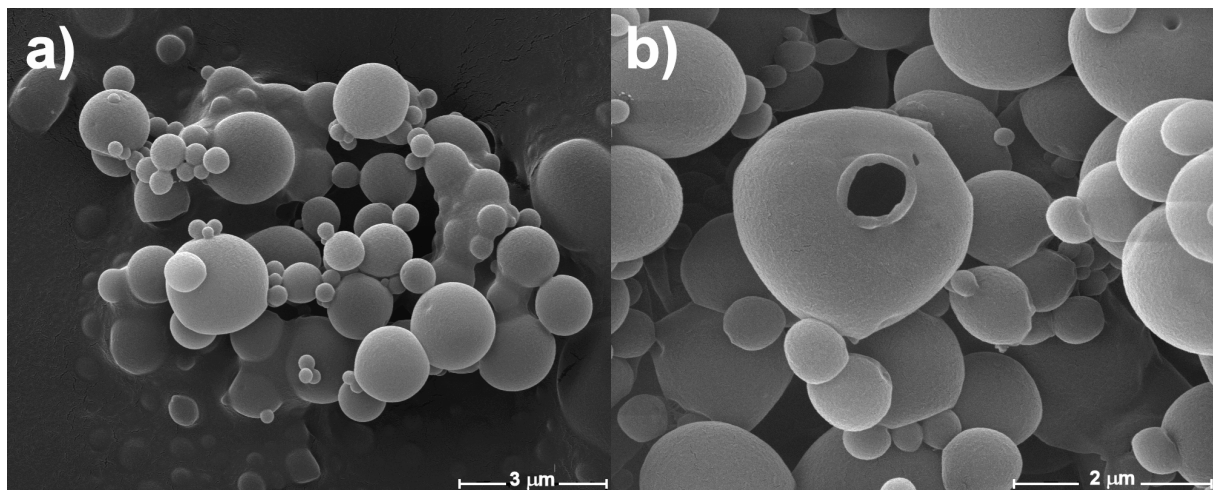


Abb. 32: Ultrastruktur der Mikropartikel, die durch Primäremulgierung mittels Ultra-Turrax[®] hergestellt wurden (REM-Aufnahme).

Während der Mikropartikelherstellung werden zunächst porenfreie Partikel erzeugt. Die in der REM sichtbaren Poren entstehen während der Lyophilisation der Probe, wenn Wasser der W_1 -Phase aus den Mikropartikeln entfernt wird. Teilweise konnte bei den großen

Partikeln statt der in Abbildung 32b gezeigten weit geöffneten Poren nur muldenförmige Verdünnungen der Wandstärke der Mikropartikel festgestellt werden, durch die das Wasser während der Lyophilisation sublimierte. Das Fehlen sichtbarer Poren in den Partikeln $< 1 \mu\text{m}$ war ein Hinweis darauf, dass diese Partikel keine W_1 -Tröpfchen umschlossen hatten und folglich im Inneren auch nicht mit FITC-BSA beladen wurden. Die Tatsache, dass bei Partikeln $> 1 \mu\text{m}$ stets nur eine Pore beobachtet wurde, deutete darauf hin, dass es sich bei den analysierten Proben um Mikrokapseln handelte. Für die Primäremulsion bedeutet dies, dass nach Verwendung des Ultra-Turrax[®] die W_1 -Tröpfchen größer als $1 \mu\text{m}$ waren oder durch Koaleszenz diese Größe schnell erreichten, so dass nur ein W_1 -Tröpfchen pro Mikropartikel eingeschlossen werden konnte. Per Definition enthalten Mikrosphärulen hingegen mehrere kleinere W_1 -Tröpfchen (s. Abb. 1, Abschnitt 1.1), weshalb bei der Sublimation von Wasser aus den Hohlräumen auch mehrere Poren entstehen.

Um die Vermutungen zur Ultrastruktur der Mikropartikel (kleine Partikel: unbeladen; große Partikel: Mikrokapseln) durch elektronenmikroskopische Aufnahmen zu bestätigen, wurden die Proben in verschiedener Weise vorbehandelt. Das mit einer einfachen Apparatur evaluierte Kryo-Bruch-Verfahren führte nicht zum Erfolg, da so weder große noch kleine Partikel aufgebrochen werden konnten. Im nächsten Schritt erfolgte die Einbettung lyophilisierter Mikropartikel in lösungsmittelfreien Klebstoff (Siepmann et al. 2005). Mit diesem sehr einfachen Verfahren war es möglich, Schnitte von größeren Partikeln zu erhalten. So konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den großen Partikeln innerhalb einer Charge (Primäremulgierung: Ultra-Turrax[®]) um Mikrokapseln mit geringer Wandstärke handelte (Abb. 33a). Für die kleineren Partikel war dieses Einbettungs- und Schneiderverfahren ungeeignet, da sie beim Schneiden aus dem Klebstoff herausgerissen wurden. Bei Verwendung eines Ultramikrotoms und einer geeigneten Matrix (lösungsmittelfrei, Einbettung bei Raumtemperatur) könnte auch die innere Struktur der kleinen Partikel untersucht werden.

In einem weiteren Versuch wurden Mikropartikelproben durch Nassvermahlung für die Elektronenmikroskopie vorbereitet. Wie in Abbildung 33b zu erkennen ist, konnten so die großen hohlen Partikel zerdrückt werden. An den Fragmenten ist wieder zu erkennen, dass ihre Kapselwand nur eine geringe Stärke aufwies. Die kleineren Partikel konnten mit der Nassvermahlung nicht aufgeschlossen werden. Daher ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei ihnen ebenfalls um Kapseln mit einem großen Hohlraum handelt. Vielmehr ist anzunehmen, dass diese Partikel unbeladen blieben, da sie zu klein waren, um die vermutlich relativ großen W_1 -Tröpfchen zu umschließen.

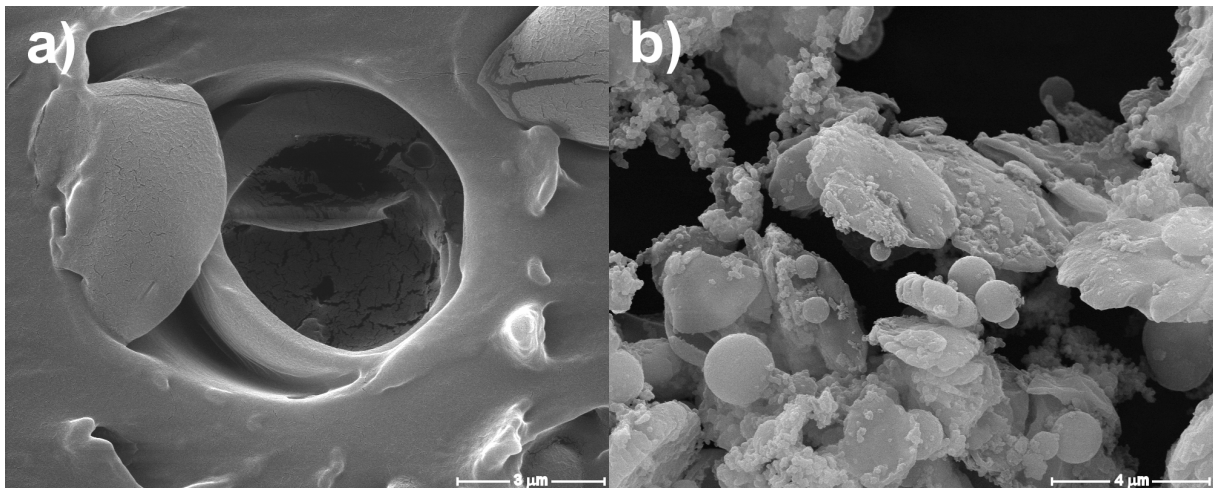


Abb. 33: REM-Aufnahme von speziell vorbehandelten Mikropartikeln (Primäremulgierung: Ultra-Turrax®). (a) Schnitt durch ein in Klebstoff eingebettetes Mikropartikel. (b) Mikropartikelprobe nach Nassvermahlung.

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

In dieser Arbeit wurde zur Mikroverkapselung unter anderem deshalb ein fluoreszenzmarkiertes Modellprotein verwendet, weil anhand des Fluoreszenzmarkers die Lokalisation des Modellproteins im Mikropartikel untersucht werden sollte. Die zu diesem Zweck eingesetzte CLSM kann durch Ausschluss von nicht fokussiertem Licht optische Schnitte einer Probe darstellen. Im Gegensatz zu einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop erfolgt keine Überlagerung der zu untersuchenden Struktur mit Fluoreszenzsignalen aus anderen Ebenen. Daher ist die CLSM dafür geeignet, die Verteilung des Modellproteins in den hergestellten Mikropartikeln abzubilden.

Wie in Abbildung 34 dargestellt, waren alle großen, lichtmikroskopisch sichtbaren Partikel (Abb. 34a) mit FITC-BSA beladen (Abb. 34b). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Verwendung des Ultra-Turrax® für die Primäremulgierung in der Mikropartikelherstellung zu einer oberflächennahen Lokalisation des FITC-BSA im Mikropartikel führte (Wischke et al. 2006a). Die Messung der Fluoreszenzintensität entlang des Pfeils (Abb. 34b) im markierten Mikropartikel verdeutlicht, dass sich im Zentrum des Partikels kaum FITC-BSA befand (Abb. 34c).

Die Ergebnisse der REM und CLSM zeigen in guter Übereinstimmung, dass es sich bei der Fraktion großer Mikropartikel innerhalb einer Charge um Mikrokapseln handelt. Im hohlen Zentrum der großen Mikropartikel war vermutlich deshalb kein FITC-Signal zu beobachten, weil sich das eingeschlossene FITC-BSA während der Lyophilisation an die Innenwand der Mikropartikel anheftete. Das oberflächennahe FITC-Signal in der CLSM

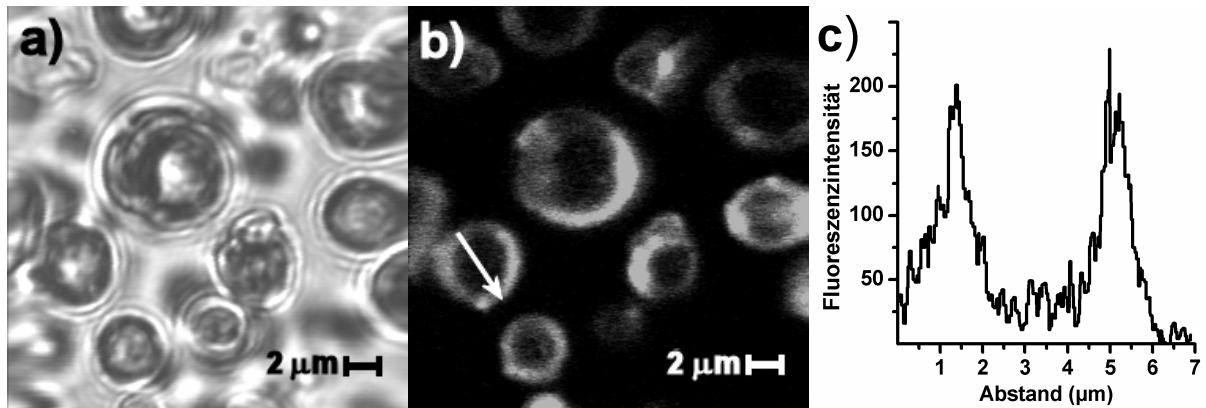


Abb. 34: Untersuchung der Proteinverteilung in Mikropartikeln (Primäremulgierung: Ultra-Turrax[®]) durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM). (a) Lichtmikroskopisches Bild der Mikropartikel, (b) CLSM, (c) Fluoreszenzintensität entlang des Pfeils in Abb. 34b.

könnte jedoch zumindest teilweise auch von FITC-BSA stammen, dass sich von außen an die Mikropartikeloberfläche angelagert hat. Diese Annahme ist nicht unwahrscheinlich, da vermutlich einige der mit dem Ultra-Turrax[®] hergestellten proteinhaltigen W_1 -Tröpfchen zu groß für die Verkapselung in $\sim 3 \mu\text{m}$ große Mikropartikel waren. Diese W_1 -Tröpfchen könnten sich bei der Sekundäremulgierung im Mikromischer mit der W_2 -Phase gemischt haben, wobei das enthaltene FITC-BSA in engen Kontakt mit den naszierenden Mikropartikeln gekommen und von außen auf die Partikeloberfläche gebunden worden sein könnte. Würden tatsächlich größere Anteile des FITC-BSA an die Oberfläche der Mikropartikel adsorbiert sein, so sollten diese theoretisch während der Waschschriffe entfernt werden. Dies würde bedeuten, dass die Verkapselungseffizienz des FITC-BSA recht niedrig ist. Es konnte aber eine hohe Verkapselungseffizienz ($\sim 79 \%$) festgestellt werden.

Aus diesen Überlegungen ergaben sich die folgenden Fragestellungen: Wie hoch ist der Anteil des FITC-BSA, der von außen an die PLGA-Mikropartikel gebunden ist? Wie groß sind die W_1 -Tröpfchen unmittelbar nach der Primäremulgierung? Können durch andere Verfahren der Primäremulgierung kleinere W_1 -Tröpfchen erzeugt werden? Kann damit eine andere Ultrastruktur der Partikel (Mikrosphärulen statt Mikrokapselfn) sowie eine Beladung der kleinen Mikropartikel innerhalb einer Charge erzielt werden?

Von dem oberflächengebundenen Anteil des in den Mikropartikelproben enthaltenen FITC-BSA ist zu erwarten, dass es sich unter den Bedingungen des Freisetzungstests recht schnell von den Partikeln ablöst. Daher wurden die im Folgenden beschriebenen Freisetzungstests durchgeführt. Die Größe der W_1 -Tröpfchen in Abhängigkeit vom Verfahren zur Primäremulgierung und ihr Einfluss auf die Charakteristika der Mikropartikel (z. B. Ultra-

struktur und Freisetzungsverhalten) wurden in einer systematischen Untersuchung studiert (s. Abschnitt 3.3).

3.2.2 Freisetzungstests

Fluorimetrie

Neben den Untersuchungen zur Proteinverteilung im Mikropartikel war einer der Gründe für die Auswahl eines fluoreszenzmarkierten Proteins als Modellantigen die erhoffte hochempfindliche Quantifizierung. Die in Freisetzungstests zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben wurden in Halbmikroküvetten vermessen und ihre Konzentration mit Hilfe der in Abschnitt 2.4 abgebildeten Kalibrierfunktion berechnet. In mehreren unabhängigen Freisetzungstests mit verschiedenen Mikropartikelchargen wurde stets eine Freisetzung von über 100 % festgestellt (Abb. 35). Da dies unrealistisch ist, wurden zunächst die Testbedingungen verändert. Unter anderem wurden Probengefäße aus unterschiedlichen Materialien evaluiert (verschiedene Kunststoffe und Glas) sowie die Einwaagen der Mikropartikel, die Zeitpunkte der Probennahme, das Volumen des Suspensionsmediums und die Menge des entnommenen Überstandes variiert. Keine dieser Maßnahmen führte dazu, dass eine realistische Freisetzung ($< 100\%$) ermittelt werden konnte. Die diesem Phänomen zu Grunde liegenden Prozesse wurden intensiv untersucht und sind in Abschnitt 3.6 beschrieben.

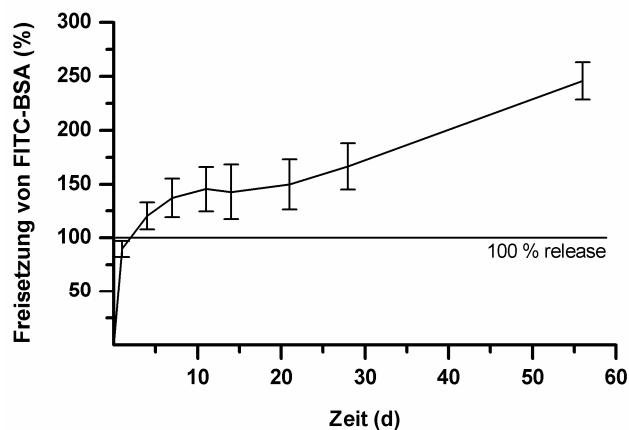


Abb. 35: Fluorimetrische Quantifizierung der Freisetzung von FITC-BSA. (Primäremulgierung: Ultra-Turrax[®], $n = 3$, \bar{x} und R).

Proteinassays und ELISA

Da die fluorimetrische Quantifizierung von freigesetztem FITC-BSA keine brauchbaren Ergebnisse lieferte, mussten andere Methoden zur Proteinbestimmung gefunden werden. In den Freisetzungsprouben betragen die zu erwartenden Proteinkonzentrationen abgesehen vom burst-release weniger als 10 µg/ml. Daher musste das gesuchte Verfahren FITC-BSA in Konzentrationen < 10 µg/ml erfassen können. Die Ph. Eur. sieht neben den instrumentellen Methoden (UV, Fluorimetrie) und dem aufwendigen Kjeldahl-Aufschluss vier kolorimetrische Proteinassays vor. Allerdings ist keine der dort beschriebenen Methoden für den Konzentrationsbereich geeignet, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Daher wurden, wie im Methodenteil beschrieben (Abschnitt 2.4), drei dieser Assays in modifizierter Form eingesetzt, um eine höhere Empfindlichkeit zu erzielen. Manche Proteinassays unterliegen deutlichen tagesabhängigen Schwankungen, so dass die Erstellung einer Standardkalibrierfunktion nicht sinnvoll ist. Daher wurde bei jeder Bestimmung eine Kalibrierfunktion mitgeführt, die zur Auswertung der parallel gehandhabten Proben verwendet wurde.

Wie in Abbildung 36a zu erkennen ist, war der verwendete Mikro-Bradford-Assay nicht in der Lage, FITC-BSA im Konzentrationsbereich < 10 µg/ml zu bestimmen. Auch der Lowry-Assay genügte diesen Anforderungen nicht (Abb. 36b). Bei Zusatz von Malachitgrün (Sargent 1987) konnte die Empfindlichkeit des Lowry-Assays gesteigert werden (steilerer Anstieg im unteren Konzentrationsbereich). Jedoch zeigte sich, dass Tris-Puffer (Standard-Puffer für FITC-BSA) die Reaktion erheblich störte (flacherer Anstieg bei Tris-haltigen Proben, Abb. 36b). In weiteren, hier nicht dargestellten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der an das BSA gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff FITC keine erhebliche Störgröße darstellte.

Von Smith et al. 1985 wurde beschrieben, dass Tris beim BCA-Assay im Gegensatz zum Lowry-Assay keine Störung verursacht. In eigenen, hier nicht dargestellten Experimenten konnte dies nicht bestätigt werden. Allerdings waren die Störungen bei niedrigen Tris-Konzentrationen geringer als im Lowry-Test, so dass eine Quantifizierung von FITC-BSA in 10 mM Tris-Puffer möglich war. Hierfür wurde der von Stoschek 1990 beschriebene BCA-Assay mit gesteigerter Empfindlichkeit angewendet. Diese Methode sieht eine Inkubation der Reagenzien bei 60 °C über 20 min oder 37 °C über 30 min vor, während der die Farbentwicklung eintritt. In Voruntersuchungen an nicht fluoreszenzmarkiertem BSA konnte gezeigt werden, dass durch eine Verlängerung der Inkubationsdauer auf 60 min bei

3. Ergebnisse und Diskussion

60 °C eine Verdopplung des Anstiegs der Kalibrierfunktion zu erzielen ist. Doch auch unter diesen Bedingungen war es nicht möglich, Proteinkonzentrationen kleiner 10 µg/ml sicher zu quantifizieren (Abb. 36c).

Um dennoch die Freisetzung von FITC-BSA mit einem Testverfahren bestimmen zu können, wurde auf einen Silber-Dithizon-Assay zurückgegriffen. Wie in Abbildung 36d dargestellt, konnte mit dieser Methode FITC-BSA auch in Konzentrationen von weniger als 10 µg/ml erfasst werden. Daher wurde der Silber-Dithizon-Assay zunächst als Standard-Methode zur Quantifizierung des freigesetzten FITC-BSA verwendet. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass der Silber-Dithizon-Assay sehr empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen ist. Daher muss eine exakte Einhaltung der Inkubationszeiten für jede der parallel gehandhabten Proben, Lichtschutz und die im Methodenteil beschriebene Herstellung der Reagenzien beachtet werden.

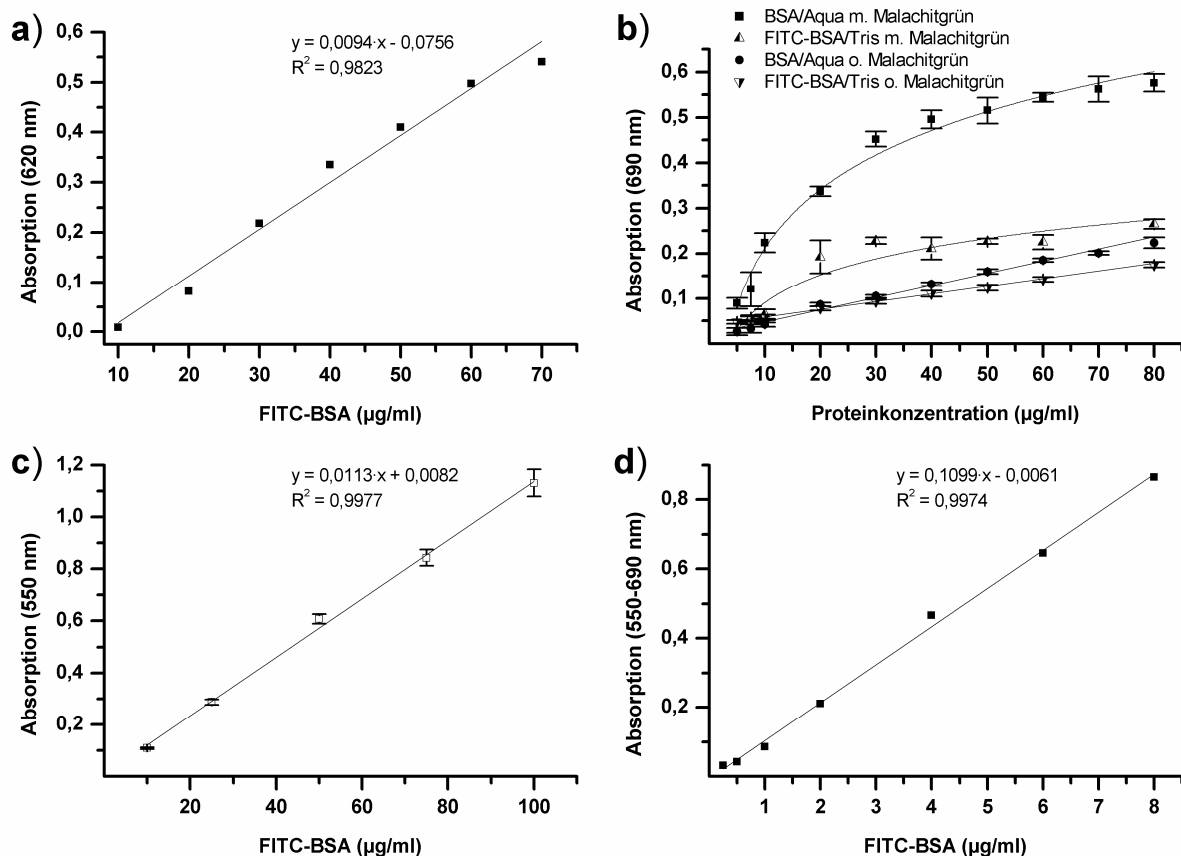


Abb. 36: Kalibrierfunktionen zur Quantifizierung von FITC-BSA in 10 mM Tris pH 7,0. (a) Bradford-Assay (Ergebnisse einer repräsentativen Bestimmung). (b) Lowry-Assay nach Sargent 1987 (\bar{x} und R von 3 parallelen Bestimmungen auf einer Mikrotiterplatte). (c) BCA-Assay (\bar{x} und R von 3 unabhängigen Bestimmungen auf verschiedenen Mikrotiterplatten, 60 °C, 60 min). (d) Silber-Dithizon-Assay (Ergebnisse einer repräsentativen Bestimmung).

Aus diesen Gründen wurde nach einem weiteren Testverfahren gesucht, dass punktuell zur Bestätigung der mit dem Silber-Dithizon-Test ermittelten Freigabeprofile eingesetzt werden sollte. Hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Enzym-gekoppelter Immunobindungstest (ELISA) entwickelt. Schwierigkeiten stellten hierbei vor allem die Auswahl der Matrix, des Antikörpers und der Blockierungslösung dar (s. Abschnitt 2.4).

Wie in Abbildung 37 zu erkennen ist, konnten sowohl mit dem Silber-Dithizon-Assay als auch mit dem ELISA realistische Freisetzungprofile bestimmt werden (Wischke und Borchert 2006a und 2006b). Es wurde beobachtet, dass der größte Anteil des verkapselten FITC-BSA als burst-release freigegeben wurde (Primäremulgierung: Ultra-Turrax®). Dies kann mit der oberflächennahen Lokalisation des Proteins in den Mikropartikeln erklärt werden, die in der CLSM festgestellt wurde. Aufgrund des hohen burst-release stellte sich erneut die Frage, ob sich das FITC-BSA im Inneren der Mikropartikel befindet oder von außen an die Partikel adsorbiert ist.

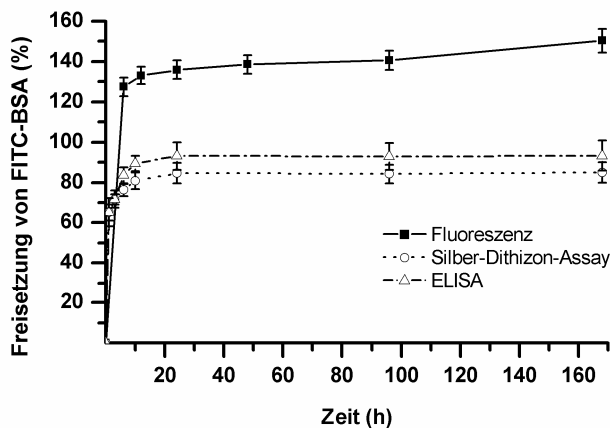


Abb. 37: Freisetzungprofile von FITC-BSA bei Quantifizierung mit Fluorimetrie, Silber-Dithizon-Assay und ELISA (Primäremulgierung: Ultra-Turrax®, n = 3, \bar{x} und R).

Oberflächengebundenes FITC-BSA

Es ist zu erwarten, dass das im Inneren der Partikel eingeschlossene FITC-BSA innerhalb der ersten Stunden die Mikropartikel nur durch die Poren verlassen kann, die während der Lyophilisation in der Partikeloberfläche entstehen. Im Laufe des Freisetzungstests entstehen durch Degradation und Erosion der PLGA-Matrix neue Poren, die zu späteren Zeitpunkten ebenfalls zur Freisetzung beitragen können. Betrachtet man jedoch nur den burst-release, so kann durch Vergleich von lyophilisierten und nicht lyophilisierten Mikropartikeln einer Charge auf den Anteil des äußerlich adsorbierten FITC-BSA geschlossen werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

Hierfür wurden Mikropartikelchargen nach ihrer Herstellung aufgeteilt und ein Teil über Nacht lyophilisiert, während der andere Teil der Charge bei 4 °C gelagert wurde. Am nächsten Tag wurde der Freisetzungstest begonnen. Wie Abbildung 38 verdeutlicht, wurde auch aus den nicht lyophilisierten Proben der größte Teil des Proteins im burst-release freigesetzt. Unter der Annahme, dass während der Lagerung über Nacht bei 4 °C noch keine Poren entstanden sind, bedeutet dies, dass bei Verwendung des Ultra-Turrax® zur Primäremulgierung der größte Teil des FITC-BSA von außen an die Mikropartikel adsorbiert wurde (Wischke und Borchert 2006a). Die Differenz zwischen den beiden Kurven einer Charge entspricht dem Anteil des FITC-BSA, der während des burst-release aus dem Inneren von lyophilisierten Mikropartikeln freigesetzt wird. Wie beim Vergleich von Abbildung 38a und 38b zu erkennen ist, kann dieser Anteil bei verschiedenen Chargen unterschiedlich groß sein, was auf größere Streuungen in der W_1 -Tröpfchengröße bei Verwendung des Ultra-Turrax® zurückgeführt werden konnte (Abschnitt 3.3).

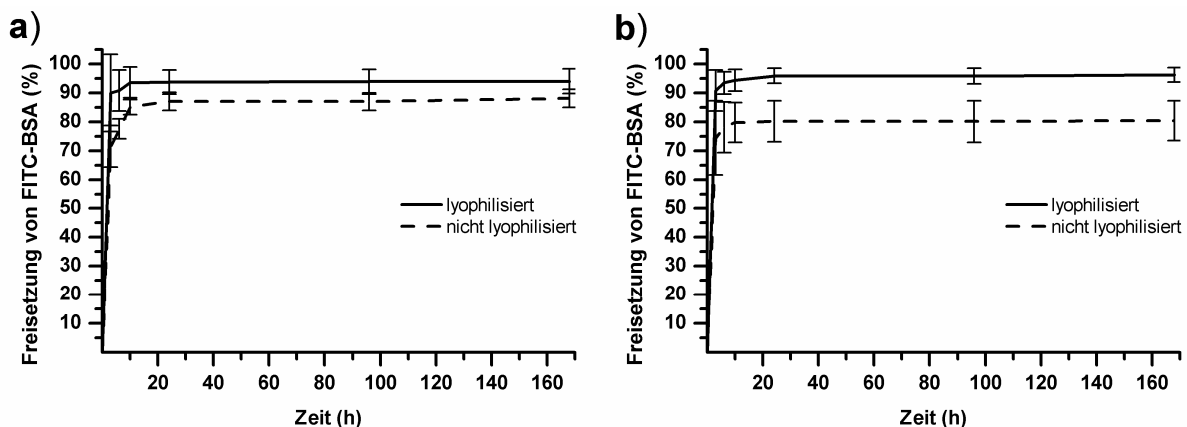


Abb. 38: Freisetzung von FITC-BSA aus entweder lyophilisierten oder nicht lyophilisierten Mikropartikeln, die durch Primäremulgierung mit dem Ultra-Turrax® hergestellt wurden. (a) Charge 1, (b) Charge 2. Quantifizierung mit ELISA ($n = 3$, \bar{x} und R).

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass im Gegensatz zur ursprünglichen Vermutung das Ermitteln einer hohen Verkapselungseffizienz nicht zwingend bedeutet, dass sich das Protein tatsächlich im Inneren der Mikropartikel befindet. Grundsätzlich muss unter Einbeziehung des Wissens über die speziellen Eigenschaften des jeweiligen Proteins abgewogen und unter Umständen experimentell überprüft werden, ob eine Anbindung des Proteins an die Partikeloberfläche in großem Umfang stattgefunden haben könnte. Im Falle des FITC-BSA kann die erfolgte Anbindung anhand der hohen Affinität von Albuminen zu hydrophoben Grenzflächen erklärt werden (s. Abschnitt 1.1.4).

Es wurde geschlussfolgert, dass bei Verwendung des Ultra-Turrax[®] zur Primäremulgierung W₁-Tröpfchen entstehen, die nicht effektiv in das Innere von ~ 3 µm großen Mikropartikeln eingeschlossen werden. Dies war sowohl im Freisetzungstest als auch in den Untersuchungen zur Ultrastruktur zu erkennen. Folglich kann in bestimmten Fällen bereits aus der Ultrastruktur auf das zu erwartende Freisetzungsverhalten geschlossen werden. So ist bei Mikropartikel-Chargen mit mehreren Poren pro Partikel (sichtbar in der REM) wahrscheinlich, dass es sich um Mikrosphärulen mit einem niedrigen burst-release handelt. Gleichmaßen ist bei Proben, die in der CLSM eine homogene Verteilung des FITC-Signal aufweisen, ein geringer burst-release zu erwarten.

In Hinblick auf die zukünftige Anwendung der Mikropartikel für das Antigen-Targeting dendritischer Zellen inklusive der langanhaltenden Stimulierung der DCs durch eine retardierte Freisetzung des Antigens sind die hier beschriebenen Mikrokapseln vermutlich wenig geeignet. Zwar kann aus den Ergebnissen des Freisetzungstests nicht auf die Prozesse im Inneren der Zellen geschlossen werden, jedoch ist anzunehmen, dass der hier beobachtete burst-release auch in den Zellen stattfinden wird. Da aber die langanhaltende Stimulierung der DCs durch die verzögerte Freisetzung eines zukünftig verkapselten Antigens erreicht werden soll, musste durch ein alternatives Primäremulsionsverfahren die Ultrastruktur der Partikel verändert und das Ausmaß der Freisetzung innerhalb der ersten Stunden reduziert werden. Daher wurde, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, eine Optimierung des Primäremulsionsverfahrens vorgenommen.

3.2.3 Einfluss der Proteinverkapselung auf die Eigenschaften des Matrixpolymers

Das als Partikelmatrix verwendete PLGA (Resomer[®] RG 502H) ist ein amorphes Polymer, das bei Erreichen seiner Glasübergangstemperatur T_g aus dem glasartigen in einen gummiartigen Zustand übergeht. Es ist zu erwarten, dass diese Umwandlung zu Veränderungen im Freisetzungsverhalten führt und eine Aggregation der Mikropartikel hervorrufen kann. Aufgrund des niedrigen Molekulargewichtes von Resomer[®] RG 502H, welches sich in seiner niedrigen inhärenten Viskosität widerspiegelt, liegt seine T_g nur knapp oberhalb der Körpertemperatur. Ein Absenken der T_g durch Beladung der Polymermatrix mit

anderen Molekülen könnte für die Stabilität der Mikropartikel während der Lagerung und ihr Verhaltens *in vivo* bzw. in der Zellkultur kritisch sein.

Wie in Tabelle 15 angegeben, führte die Beladung der Mikropartikel mit 1 % FITC-BSA verglichen mit unbeladenen Mikropartikeln und reinem PLGA nicht zu einer Abnahme der T_g (Wischke et al. 2006a). Hingegen wurde in der Literatur ein Absenken der T_g um 3 °C beschrieben, wenn PLGA-Mikropartikel mit 5 % BSA beladen wurden (Conway und Alpar 1996). Bei noch höherer Beladung wurde in der zitierten Studie eine noch stärkere Reduzierung der T_g festgestellt, was auf proteingebundenes Wasser zurückgeführt wurde. Wasser wirkt als Weichmacher auf PLGA (Blasi et al. 2005).

In den eigenen Untersuchungen konnte der unerwünschte Effekt einer reduzierten T_g nicht festgestellt werden. Es ist anzunehmen, dass hierbei die geringe Proteinbeladung der eigenen Mikropartikel einen Einfluss hat. Weiterhin könnten Unterschiede in der Ultrastruktur der Mikropartikel und eine höhere Effizienz der eigenen Lyophilisationsbedingungen diese Ergebnisse erklären.

Tab. 15: Glasübergangstemperatur von Resomer[®] RG 502H und daraus hergestellten Mikropartikeln (MP).

Probe	Glasübergangstemperatur (°C)	
	Median ^a	Range ^a
Resomer [®] RG 502H	42,49	0,40
unbeladene MP	43,14	0,55
FITC-BSA beladene MP ^b	42,99	0,12

^an = 3; ^bPrimäremulgierung: Ultra-Turrax[®]

3.2.4 Restlösungsmittel

Bei der Herstellung der Mikropartikel wurde Dichlormethan als Lösungsmittel für PLGA eingesetzt, welches anschließend durch Evaporation entfernt wurde. Wie in Abschnitt 1.1.3 beschrieben, besitzt Dichlormethan eine hohe akute und möglicherweise auch eine chronische Toxizität. Daher ist es in der Ph. Eur. als Lösungsmittel Klasse 2 eingestuft und muss in pharmazeutischen Formulierungen auf 600 ppm begrenzt werden. Aufgrund dieser Reglementierung wurden in zahlreichen Studien Anstrengungen unternommen, PLGA-

3. Ergebnisse und Diskussion

Mikropartikel ohne Verwendung von Dichlormethan herzustellen (Abschnitt 1.1.3). Hingegen gibt es kaum Publikationen, die den Restgehalt von Dichlormethan in PLGA-Mikropartikeln beschreiben.

Mit Hilfe einer semiquantitativen Methode wurde der Restgehalt von Dichlormethan in lyophilisierten PLGA-Mikropartikeln durch MS-gekoppelte GC-Headspace-Technik im SIM-Modus bestimmt. Wie aus Tabelle 16 zu entnehmen ist, konnte in den Mikropartikeln eine Dichlormethankonzentration von weniger als 0,6 ppm festgestellt werden, was einem Tausendstel des Grenzwertes der Ph. Eur. entspricht. Daraus ist zu schlussfolgern, dass bei dem verwendeten Herstellungsverfahren (inklusive der Lyophilisation) ein Verzicht auf Dichlormethan nicht notwendig ist (Wischke et al. 2006a).

Tab. 16: Semiquantitative Analyse des Restgehaltes von Dichlormethan in PLGA-Mikropartikeln mittels GC-MS.

	AUC ^a	Errechneter Gehalt an Dichlormethan (ppm) ^b
0 ppm Standard	0,82	0,014
1 ppm Standard	89,36	1,000
Probe 1	39,81	<0,6 (0,445)
Probe 2	25,77	<0,6 (0,288)

^aStandardisierte AUC (area under the curve), Berechnung s. Abschnitt 2.3; ^bBerechnung des Restgehaltes aus dem Verhältnis der AUC von Probe und 1 ppm Standard.

3.3 Optimierung des Primäremulsionsverfahrens

Tröpfchengröße der Primäremulsion

Wie in Abschnitt 3.2 dargelegt, hat die Tröpfchengröße der Primäremulsion einen entscheidenden Einfluss auf die Ultrastruktur der Mikropartikel. Mittels REM und CLSM konnte festgestellt werden, dass die Verwendung des Ultra-Turrax[®] bei der Primäremulgierung zur Bildung von Mikrokapseln führte. Als Erklärung dafür wurde die W_1 -Tröpfchengröße angeführt, von der vermutet wurde, dass sie nur knapp unterhalb der Größe der im Mikromischer hergestellten Mikropartikel lag. Wie in Abbildung 39 dargestellt, konnte dies durch Messung der Tröpfchengröße mittels Photonenkorrrelationspektroskopie bestätigt werden. Wie zu erkennen ist, unterlag die Größe der mit dem Ultra-Turrax[®] hergestellten Tröpfchen der W_1 -Phase erheblichen Schwankungen. Damit kann der bei verschiedenen Chargen unterschiedlich große Anteil von im Partikelinneren befindlichem FITC-BSA erklärt werden (vgl. Abschnitt 3.2.2). Des Weiteren war bei den im Ultra-Turrax[®] hergestellten Primäremulsionen eine Zunahme der Tröpfchengröße während der Messdauer (Koaleszenz) zu beobachten.

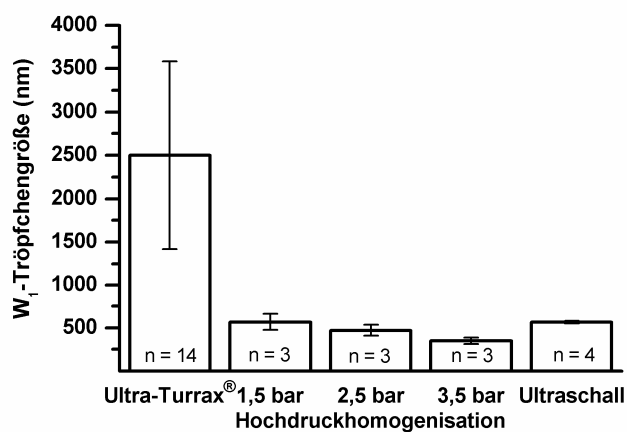


Abb. 39: Bestimmung der W_1 -Tröpfchengröße für verschiedene Verfahren zur Primäremulgierung (\bar{x} und R).

Um Mikropartikel mit einer homogenen Verteilung des Modellproteins im Inneren der Teilchen zu erhalten, wurden Möglichkeiten gesucht, kleinere W_1 -Tröpfchen zu erzeugen als dies mit dem Ultra-Turrax[®] möglich war. Daher wurde die Emulsionsbildung mit dem Ultra-Turrax[®] (Rotor-Stator-Prinzip) mit zwei anderen Verfahren, der Hochdruckhomogenisation und der Ultraschallbehandlung, verglichen. Die hier angegebenen Drücke bei der Hochdruckhomogenisation sind die am Gerät ablesbaren Einstellungen für die Druckluft-

zufuhr (1,5 bis 3,5 bar) und entsprechen hydraulischen Drücken von 300 bis 700 bar. Wie in Abbildung 39 dargestellt, konnten mit beiden Verfahren Tröpfchen im Nanometerbereich erzeugt werden. Hierbei waren die mit Ultraschall und Hochdruckhomogenisation bei 1,5 bar hergestellten Teilchen von vergleichbarer Größe. Eine Erhöhung des Druckes von 1,5 auf 3,5 bar führte zu einer Abnahme der Tröpfchengröße von ~ 570 auf ~ 350 nm (Wischke und Borchert 2006a). Um die Stabilität der Primäremulsion während der Messung (6 min) zu studieren, wurde die Veränderung der Tröpfchengröße analysiert. Während, wie oben erwähnt, beim Ultra-Turrax[®] ein leichter Anstieg festgestellt wurde, war dies bei Ultraschall-behandelten und durch Hochdruckhomogenisation hergestellten Emulsionen nicht der Fall. Die Messdauer bei der Tröpfchengrößenbestimmung entsprach in etwa der Zeit, die sonst zur Sekundäremulgierung im Mikromischer benötigt wurde. Daher kann davon ausgegangen werden, dass auch bei der Mikropartikelherstellung keine Koaleszenz von W_1 -Tröpfchen bei Chargen stattfand, deren Primäremulsionen mit Ultraschall und Hochdruckhomogenisation erzeugt wurden.

Wie in Abbildung 39 veranschaulicht, konnten bei der Primäremulgierung mit dem EmulsiFlex[®] B3 Hochdruckhomogenisators die kleinsten Tröpfchengrößen erzeugt werden. Es wurden jedoch die folgenden Schwierigkeiten bei der Nutzung des EmulsiFlex[®] B3 zur Mikropartikelherstellung festgestellt: (1) Um die proteinbeladenen Mikropartikel zur Klärung immunologischer Fragestellungen verwenden zu können, ist eine aseptische Herstellung der Partikel erforderlich. Diese erfolgt üblicherweise in einer Laminar-Flow Werkbank mit sterilisierten Materialien. Der EmulsiFlex[®] B3 Hochdruckhomogenisator ist hierfür nicht angepasst. (2) In einigen Mikropartikel-Chargen wurde Abrieb von Dichtungsringen des Homogenisators festgestellt. Auch die Verwendung von hochresistenten Kalrez[®] Dichtungen konnte bei den verwendeten Bedingungen (Dichlormethan bei bis zu 700 bar) eine Kontamination des Produktes nicht verhindern.

Einfluss des Verfahrens zur Primäremulgierung auf die Mikropartikelgröße

In dieser Arbeit wurde zur Herstellung der Mikropartikeln ein Mikromischer genutzt, bei dem die angelegten Flussraten entscheidend für die Größe der resultierenden Mikropartikel sind. Die in Abschnitt 3.1 beschriebenen Untersuchungen zum Einfluss der Flussrate auf die Partikelgröße wurden bei Chargen durchgeführt, deren Primäremulsionen mit dem Ultra-Turrax[®] erzeugt wurden. Daher musste ausgeschlossen werden, dass sich bei Nutzung eines

anderen Primäremulsionsverfahrens die Größe der im Mikromischer geformten Mikropartikel ändert. Wie in Abbildung 40 zu erkennen ist, trat erwartungsgemäß keine Abhängigkeit der Partikelgröße vom Primäremulsionsverfahren auf. Die größere Spannweite bei den Ultra-Turrax[®] Proben konnte auf die höhere Anzahl von Chargen und den längeren Zeitraum zurückgeführt werden, in dem diese Daten erhoben wurden.

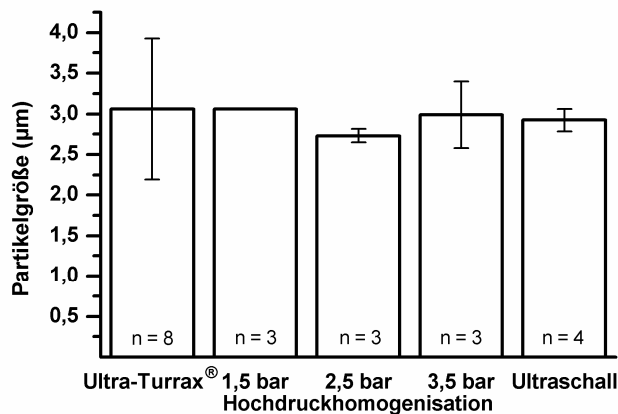


Abb. 40: Größe der im Mikromischer geformten Mikropartikel, wobei die Primäremulgierung mit verschiedenen Methoden erfolgte (\bar{x} und R).

Einfluss des Verfahrens zur Primäremulgierung auf die Verkapselungseffizienz

In Abschnitt 1.1.4 wurde beschrieben, dass sich Proteine während des Emulsionsprozesses an die W_1/O -Grenzfläche anlagern und dabei ihre native Konformation verlieren können. Das Einwirken von Scherkräften, Wärme und dem in geringem Umfang in der W_1 -Phase gelöstem Dichlormethan kann die Proteinentfaltung begünstigen. Hierdurch könnte die Nativität des eingeschlossenen Proteins, aber auch die Effizienz der Verkapselung beeinflusst werden. Da in dieser Arbeit verschiedene Methoden zur Primäremulgierung eingesetzt wurden, die vermutlich zu unterschiedlichen Ultrastrukturen der Mikropartikel führen, könnte die Verkapselungseffizienz je nach Methode unterschiedlich hoch sein. Wie Abbildung 41 verdeutlicht, wurde für alle Primäremulsionstechniken eine hohe Verkapselungseffizienz bestimmt. Ultraschall und Hochdruckhomogenisation (1,5 bar) führten zu einer höheren Verkapselungseffizienz, als sie mit dem Ultra-Turrax[®] erreicht wurde. Die Anwendung verschiedener Drücke bei der Hochdruckhomogenisation führte zu deutlichen Unterschieden im Anteil des eingeschlossenen FITC-BSA. Wie oben beschrieben (s. Abb. 39), sank die Größe der W_1/O -Tröpfchen mit steigendem Homogenisationsdruck. Daher könnte man erwarten, dass mehr von den so entstandenen, kleineren Tröpfchen pro Mikropartikel verkapselt werden. Weiterhin könnte man annehmen, dass bei kleinerer Tröpfchengröße ein

geringerer Anteil der W_1 -Phase nicht inkorporiert wird und folglich die Verkapselungseffizienz steigt. Im Gegensatz zu diesen Vermutungen wurde eine Abnahme der Verkapselungseffizienz von 94 auf 74 % bei steigendem Homogenisationsdruck festgestellt. Dies ist vermutlich auf Proteindenaturierung und -fällung im Hochdruckhomogenisator zurückzuführen, die durch lokal auftretende hohe Drücke und Temperaturen sowie die Kavitation des Lösungsmittels ausgelöst wurde. Des Weiteren führte die Reduzierung der W_1/O -Tröpfchengröße zu einer vergrößerten Tröpfchenoberfläche, so dass ein Verlust des Proteins durch Austauschprozesse mit der äußeren Phase stattgefunden haben könnte (Wischke und Borchert 2006a).

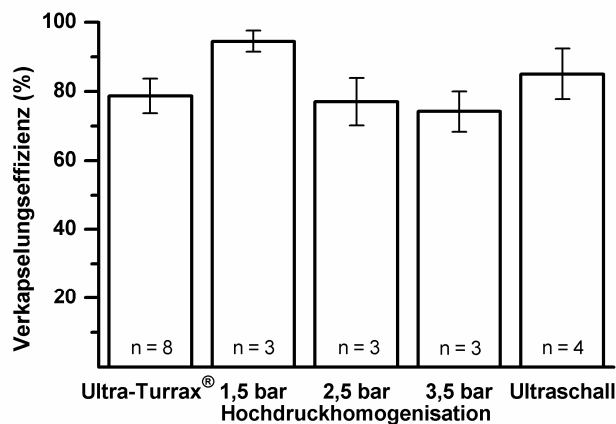


Abb. 41: Verkapselungseffizienz von FITC-BSA in Mikropartikel, die unter Nutzung verschiedener Primäremulsionstechniken hergestellt wurden (\bar{x} und R).

Einfluss des Verfahrens zur Primäremulgierung auf die Ultrastruktur der Partikel

Wie oben beschrieben, entstanden bei Nutzung des Ultra-Turrax® zur Primäremulgierung W_1 -Tröpfchengrößen, die in etwa dieselbe Größe wie die letztlich geformten Mikropartikel aufwiesen (vgl. Abb. 39 und 40). Daher konnte nur ein W_1 -Tröpfchen pro Mikropartikel eingeschlossen werden und es wurden Mikrokapseln erzeugt. Hingegen zeigte die W_1/O -Emulsion im Falle von Ultraschall- und Hochdruckhomogenisation Tröpfchengrößen im Nanometerbereich, während die Mikropartikelgröße unverändert blieb. Daher wurde vermutet, dass mehr als ein W_1 -Tröpfchen pro Mikropartikel eingeschlossen werden konnte und Mikrosphärulen entstanden (Abb. 42). Diese erwarteten Unterschiede sollten anhand der Oberflächenstruktur der Mikropartikel und der Verteilung des Proteins im Mikropartikel visualisiert werden.

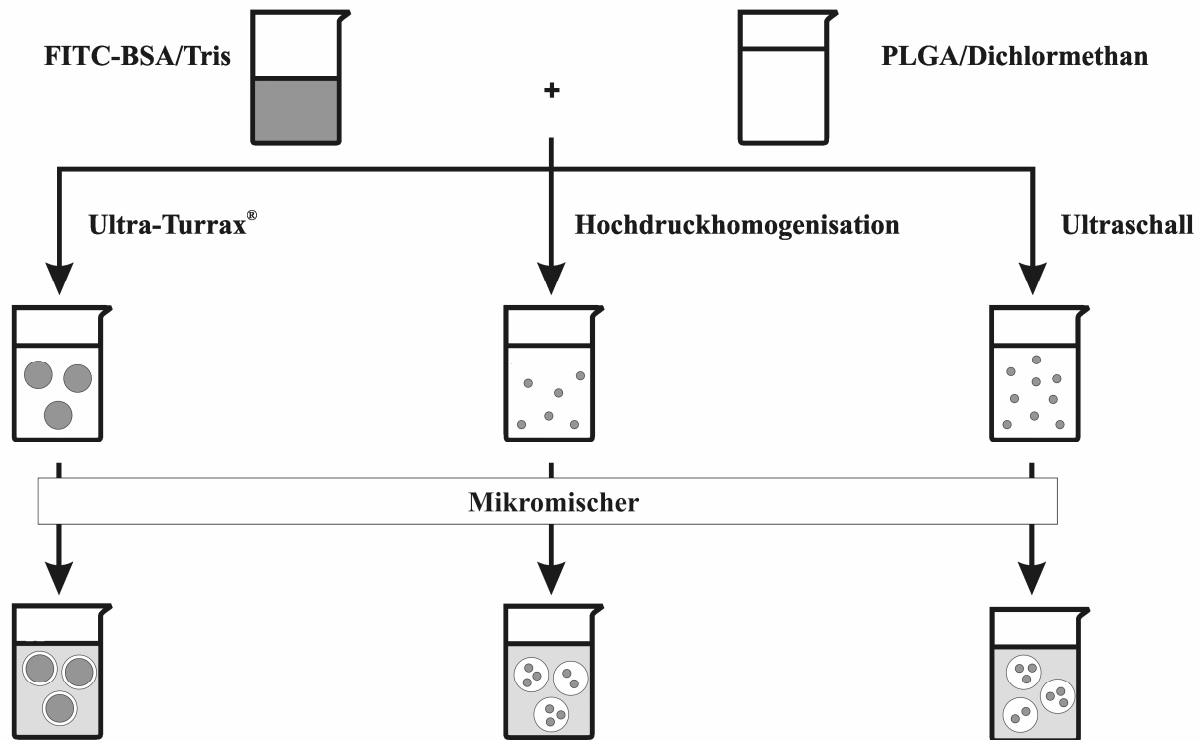


Abb. 42: Schematische Darstellung der morphologischen Unterschiede von Mikropartikeln, bei deren Herstellung zur Primäremulgierung die Ultra-Turrax[®]-, Hochdruck- oder Ultraschallhomogenisation eingesetzt wurden.

Durch Rasterelektronenmikroskopie (REM) konnte gezeigt werden, dass in allen Fällen sphärische Mikropartikel mit einer glatten Oberfläche entstanden sind (Abb. 43a-c). Bei Mikropartikeln, deren Primäremulsionsprozess mit dem Ultra-Turrax[®] durchgeführt wurde, konnten abermals nur Poren in der Partikelfraktion $> 1 \mu\text{m}$ festgestellt werden (vgl. Abschnitt 3.2). Bei diesen Partikeln handelte es sich um Mikrokapseln. Hingegen konnten in Proben, bei denen der Hochdruckhomogenisator oder Ultraschall zur Primäremulgierung genutzt wurde, zusätzlich auch Poren bei Partikeln $< 1 \mu\text{m}$ beobachtet werden (Wischke und Borchert 2006a). Dies deutete darauf hin, dass mit den beiden letztgenannten Techniken auch die Partikelfraktion $< 1 \mu\text{m}$ mit FITC-BSA beladen werden konnte.

Für die drei Primäremulsionsmethoden konnte mit Hilfe der kofokal Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) deutliche Unterschiede in der Proteinlokalisierung und damit in der Ultrastruktur der Partikel ausgemacht werden. Während sich das FITC-BSA bei Ultra-Turrax[®]-Proben an der Partikeloberfläche befand, zeigten die beiden anderen Techniken ein Vorhandensein des Proteins auch im Zentrum der Mikropartikel (Abb. 43d-e, Wischke und Borchert 2006a). Aus den Ergebnissen der W_1 -Tröpfchengrößenanalytik, dem Erscheinungs-

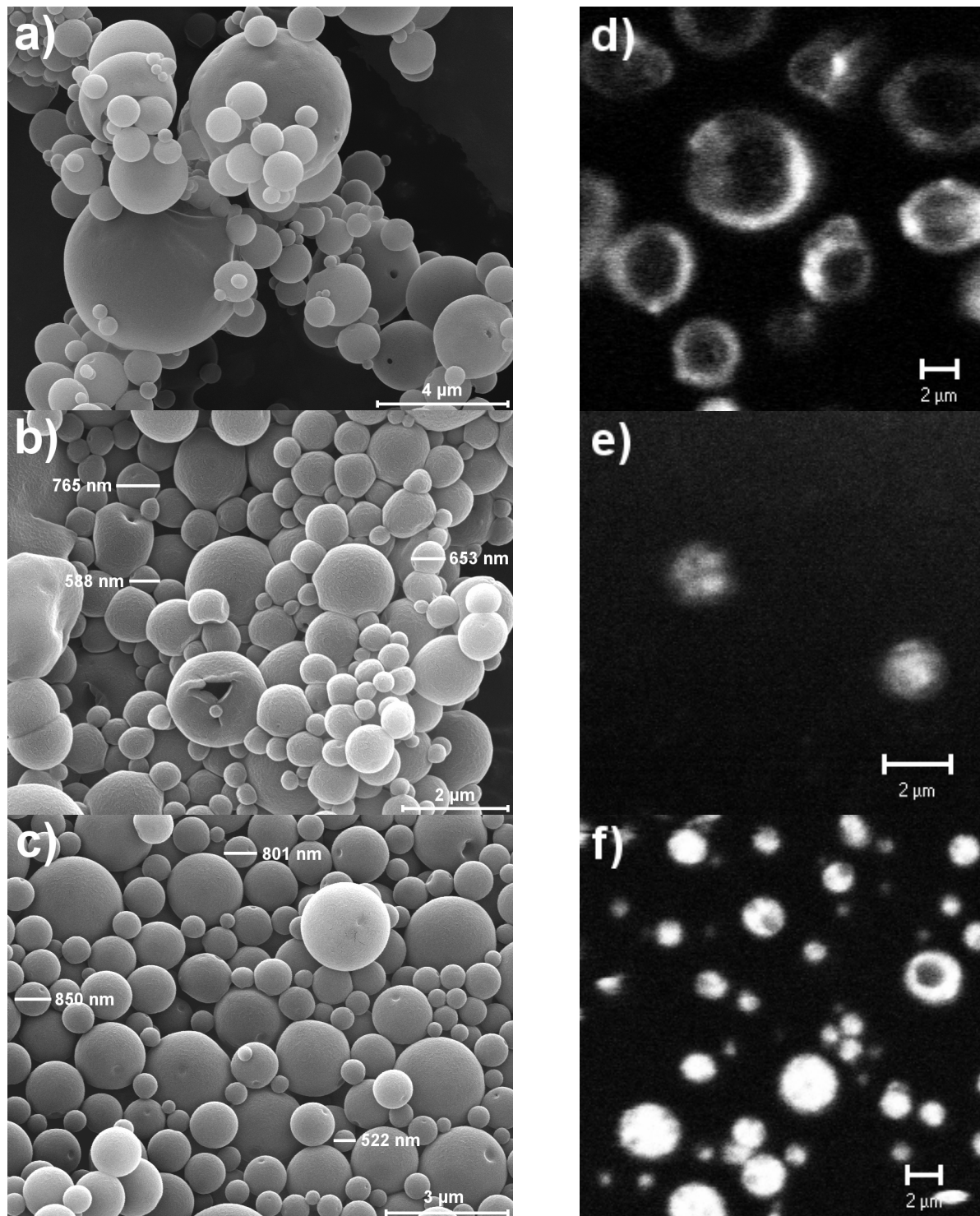


Abb. 43: Einfluss der Primäremulsionsmethode auf die Oberflächenstruktur und das Auftreten von Poren (a-c) sowie die Proteinverteilung im Mikropartikel (d-f). (a, d) Ultra-Turrax[®], (b, e) Hochdruckhomogenisator (2,5 bar), (c, f) Ultraschallstab.

bild in der REM und der Proteinverteilung im Mikropartikel wurde geschlussfolgert, dass sich bei Verwendung des Hochdruckhomogenisators und des Ultraschallstabes das FITC-BSA in mehreren Hohlräumen pro Mikropartikel aufhielt und damit Mikrosphärülen vorlagen. Aufgrund der Inkorporierung des FITC-BSA im Partikelinneren sollten sich diese Mikro-

partikel hinsichtlich ihres Freisetzungsverhaltens deutlich von denen unterscheiden, die unter Nutzung des Ultra-Turrax[®] zur Primäremulgierung hergestellt wurden.

Freisetzungstests

In Abschnitt 3.2.2 wurde verdeutlicht, dass FITC-BSA in den Proben des Freisetzungstests nicht anhand der Fluoreszenzintensität seines Markers erfasst werden konnte, weshalb ein Silber-Dithizon-Proteinassay und ein ELISA etabliert wurden. Bei der Quantifizierung des freigesetzten FITC-BSA mit dem Silber-Dithizon-Assay (Abb. 44a) zeigte sich der schon zuvor beschriebene hohe burst-release bei Mikropartikeln, für deren Herstellung der Ultra-Turrax[®] eingesetzt wurde. Hingegen konnte für die Ultraschallbehandlung und die Hochdruckhomogenisation ein deutlich reduzierter burst-release festgestellt werden, wobei es keine Unterschiede zwischen den bei 1,5, 2,5 und 3,5 bar hergestellten Proben gab. Die Nutzung des ELISA als Bestimmungsmethode (Abb. 44b) ergab ebenfalls einen hohen burst-release für den Ultra-Turrax[®] und eine reduzierte Freisetzung im Falle der Ultraschallbehandlung und der Hochdruckhomogenisation.

Beim Vergleich der Kurven des Silber-Dithizon-Assays und ELISAs zeigte sich, dass der Silber-Dithizon-Test leicht erhöhte Werte in den Ultraschall- und Hochdruckhomogenisations-Proben, aber niedrigere Freisetzungsraten in den mittels Ultra-Turrax[®] hergestellten Mikropartikeln detektierte. Vermutlich ergeben sich beim Silber-Dithizon-Assay aufgrund der Vielzahl von Fehlerquellen stets etwas niedrigere Werte. Die im Gegensatz dazu gelegentlich erhöhten Konzentrationen sind vermutlich auf Produkte aus dem PLGA-Abbau zurückzuführen, die den Silber-Dithizon-Assay störten. Wie im Methodenteil erläutert, beruht das Testprinzip auf einer Stabilisierung von Silberionen durch Proteine, weshalb die Silberionen vor der Fällung geschützt sind und in einem weiteren Schritt einen farbigen Komplex mit Dithizon bilden können. Die löslichen Degradationsprodukte des PLGA konnten mit ihren freien Carboxyl- und Hydroxylgruppen die Silberionen vermutlich ebenfalls vor der Abtrennung schützen. Das hätte zur Folge, dass durch den Silber-Dithizon-Assay der Proteingehalt in solchen Proben überschätzt wurde, die ein hohes Konzentrationsverhältnis von PLGA-Abbauprodukten zu Protein aufwiesen. Dies trifft auf die Proben zu, die durch Ultraschall und Hochdruckhomogenisation hergestellt wurden (Wischke und Borchert 2006a).

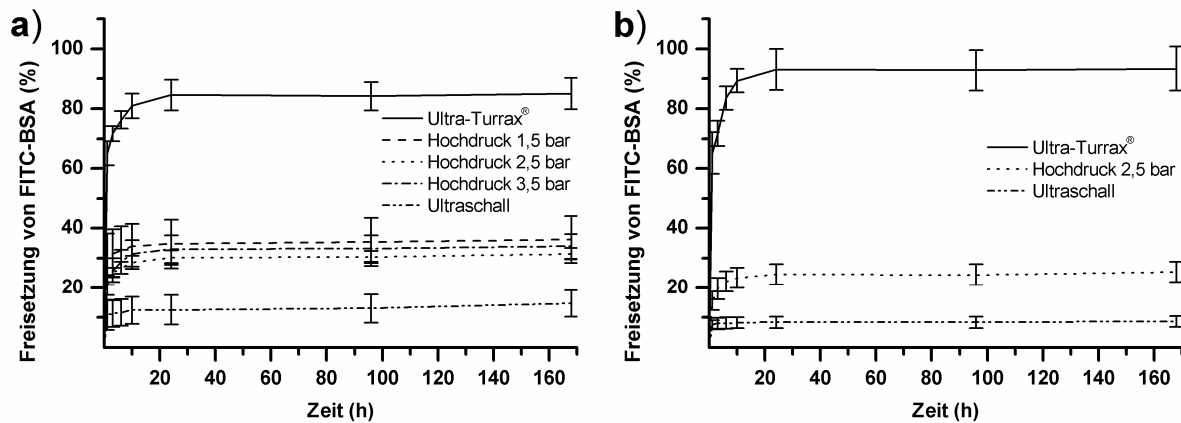


Abb. 44: Freisetzung von FITC-BSA aus Mikropartikeln, die unter Anwendung verschiedener Primäremulsionsverfahren hergestellt wurden. Quantifizierung der Freisetzung durch (a) Silber-Dithizon-Assay oder (b) ELISA (n = 3, \bar{x} und R).

In allen Mikropartikelchargen konnte nach Abschluss des burst-release beinahe keine weitere Proteinfreisetzung festgestellt werden. Dies könnte auf Proteindenaturierung beim Emulsionsprozess oder bei der Lyophilisation, also auf den Herstellungsgang der Mikropartikel zurückzuführen sein (Alonso et al. 1994, Schwendeman et al. 1996). In diesem Fall müsste auch der schlagartig freigesetzte Anteil des FITC-BSA (burst-release) einen Verlust der Nativität zeigen, was es in weiteren Untersuchungen zu analysieren galt. Eine andere Erklärung für das Fehlen einer fortgesetzten Proteinfreigabe könnte das Absinken des pH im Inneren der Mikropartikel auf bis zu 3,5 liefern, was durch die Degradation des PLGA-Matrixpolymers in saure Mono- und Oligomere hervorgerufen wird (Mäder et. al. 1998, Li und Schwendeman 2005). Dabei handelt es sich um einen Prozess, der unter Freisetzungsbedingungen stattfindet und weniger das schlagartig freigegebene, als vielmehr das im Kern verkapselte Protein betrifft.

In der Literatur sind eine Vielzahl von modifizierten Herstellungsmethoden und verwendeten Hilfsstoffen beschrieben worden, um Proteine vor der Denaturierung beim Verkapselungsprozess und unter Freisetzungsbedingungen zu stabilisieren (vgl. Abschnitt 1.1.4). In dieser Arbeit wurden keine Versuche unternommen, um FITC-BSA vor der sauren Hydrolyse im Inneren der Mikropartikel zu schützen. Dies ist mit der gewünschten Anwendung der Mikropartikel zum Targeting dendritischer Zellen (DCs) zu erklären. Nach Aufnahme der Partikel in das Phagosom der DC erfolgt die Ansäuerung und Fusion von Phagosom und Lysosom unter Bildung eines Phagolysosomen. Die Mikropartikel werden durch das darin herrschende saure Milieu sowie möglicherweise auch durch die vorhandenen Enzyme attackiert (vgl. Abschnitt 1.1.1 und 1.6). Unter diesen Bedingungen wird sowohl die PLGA-Matrix als auch das verkapselte Protein hydrolysiert. Daher kann das im Freisetzungs-

test bestimmte Freigabeprofil nicht mit den Prozessen im Inneren der Zellen verglichen werden. Eine Stabilisierung des im Mikropartikel eingeschlossenen Proteins gegenüber der Hydrolyse in diesem Milieu ist unrealistisch und auch gar nicht gewünscht. Schließlich ist die Prozessierung (Hydrolyse) der eingeschleusten Antigene durch die DC eine essentielle Voraussetzung für alle weiterführenden immunologischen Reaktionen.

Aus biopharmazeutischer Sicht ist es wünschenswert, den burst-release von Proteinen zu reduzieren. Im Inneren der Zellen ist eine weiterführende Freisetzung von antigenen Strukturen durch Hydrolyse zu erwarten. Nur Mikropartikel mit einem niedrigen burst-release besitzen die Möglichkeit einer verzögerten Proteinfreisetzung und damit das Potenzial für eine lang andauernde DC-Stimulierung. Die stärkste Reduktion des burst-release konnte durch die Verwendung von Ultraschall für die Primäremulgierung erreicht werden.

Nativität des freigesetzten FITC-BSA

Die Nativität von mikroverkapselten Proteinen kann durch verschiedene Schritte im Herstellungsgang beeinträchtigt werden (vgl. Abschnitt 1.1.4). Falls die strukturelle Beschädigung des Proteins durch einen bestimmten Prozess vor dem Freisetzungstest, beispielsweise also durch die Primäremulgierung erfolgte, würde dies sowohl die im burst-release freigesetzte als auch die im Inneren der Partikel verbleibende Proteinfraction betreffen. Daher wurde die Nativität des FITC-BSA in den Freisetzungstests mittels nativer PAGE analysiert, um Aussagen über den Einfluss des Primäremulsionsprozesses auf die Struktur des zu verkapselnden Proteins zu treffen.

Aufgrund der sehr niedrigen Proteinkonzentration war eine auswertbare elektrophoretische Analyse der Proteinstruktur nur bei einem größtmöglichen Verhältnis von Probenvolumen zu Auftragepuffer möglich, welches durch den beschriebenen 8X Auftragepuffer erzielt wurde. In den Proben des burst-release konnte für alle Primäremulsionstechniken dieselbe Hauptbande wie in den FITC-BSA Referenzlösungen gefunden werden (Abb. 45). Die Intensitätsunterschiede in den Hauptbanden sind auf die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen in den Proben des burst-release zurückzuführen. Zusätzlich zur Hauptbande ist in den Referenzlösungen und den Ultra-Turrax[®]-Proben noch eine Nebenbande zu finden. Diese Bande entspricht FITC-BSA Oligomeren, die typischerweise in kommerziellem BSA vorliegen (Janatova et al. 1968, Folta-Stogniew und Williams 1999, Hunter und Carta 2001). Aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration im burst-release

war diese zweite Bande für die Proben von Ultraschall und Hochdruckhomogenisation unter dem Detektionslimit. Das Intensitätsverhältnis von erster zu zweiter Bande blieb in allen Proben nahezu unverändert (Wischke und Borchert 2006a).

Die Untersuchungen des freigesetzten FITC-BSA mittels nativer PAGE erbrachten keinen Hinweis darauf, dass durch den Primäremulsionsprozess die Nativität des Proteins zerstört worden sein könnte. In der Literatur wird beschrieben, dass BSA andere Proteine vor der Denaturierung an der W_1/O -Grenzfläche schützen kann (Sah 1999). Daher wäre in zukünftigen Studien zur Mikroverkapselung starker Antigene die Coverkapselung von FITC-BSA möglicherweise vorteilhaft, da so nicht nur die Aufnahme der fluoreszierenden Partikel in die Zellen visualisiert, sondern auch das Antigen vor einer möglichen Zerstörung beim Verkapselungsprozess geschützt werden könnte.

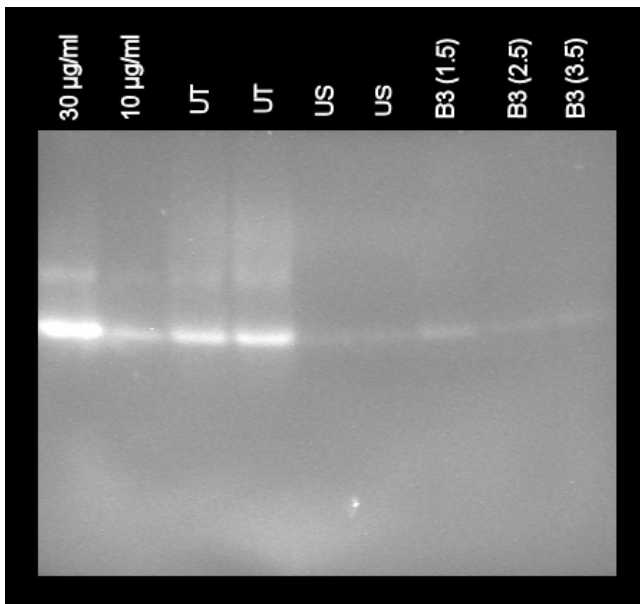


Abb. 45: Native PAGE von FITC-BSA Referenzen und burst-release Proben. UT: Ultra-Turrax[®], US: Ultraschall, B3: Emulsi-Flex[®] B3 Hochdruckhomogenisator (Druck in bar).

Einfluss des Verfahrens zur Primäremulgierung auf das Matrixpolymer PLGA

In Abschnitt 3.2.3 wurde dargelegt, dass die zur Mikroverkapselung verwendete PLGA-Sorte eine Glasübergangstemperatur (T_g) von knapp oberhalb der Körpertemperatur besitzt und ein Absenken der T_g beispielsweise durch den Weichmachereffekt von proteingebundenem Wasser kritisch in Hinblick auf die Stabilität der Teilchen sein könnte. Die unter Nutzung des Ultra-Turrax[®] hergestellten Mikropartikel zeigten keine Reduzierung der T_g (s. Abschnitt 3.2.3). Aus den oben dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass durch die Verwendung von Ultraschall oder der Hochdruckhomogenisation eine wesentlich feinere

3. Ergebnisse und Diskussion

Primäremulsion mit einer größeren W_1/O Grenzfläche erzeugt wurde. Daher war eine verstärkte Interaktion zwischen der Mikropartikelmatrix und dem verkapselten Protein und infolgedessen eine Absenkung der T_g denkbar. Wie in Tabelle 17 dargestellt, wurde dieser Effekt jedoch nicht beobachtet (Wischke und Borchert 2006a). Es wurde geschlussfolgert, dass keines der Primäremulsionsverfahren die unerwünschte Reduzierung der T_g begünstigt und, wie schon in Abschnitt 3.2.4 diskutiert, dieses Phänomen möglicherweise nur bei weniger effizienter Lyophilisation oder höherer Proteinbeladung auftritt.

Tab. 17: Glasübergangstemperatur von PLGA und PLGA-Mikropartikeln, die mit verschiedenen Verfahren zur Primäremulgierung hergestellt wurden.

Probe	Glasübergangstemperatur (° C)	
	Median ^a	Range ^a
Reines PLGA	42,49	0,40
Ultra-Turrax [®]	43,01	0,06
Hochdruckhomogenisation (2,5 bar)	43,18	0,38
Ultraschall	43,34	0,90

^a $n = 3$

3.4 Oberflächenmodifizierung von Mikropartikeln

Die Mehrheit der in der Natur vorkommenden Oberflächen zeigt ein negatives Oberflächenpotenzial. So sind die Oberflächen von Zellen, wie beispielsweise dendritischen Zellen (DCs), negativ geladen. Auch die mit dem Standardverfahren hergestellten PLGA-Mikropartikel, mit denen die bisher präsentierten Ergebnisse erzielt wurden, weisen eine anionische Ladung auf. Der bei der Herstellung verwendete Polyvinylalkohol ist ein sterischer Stabilisator, der die negative Ladung des PLGA (Carboxylgruppen) nicht vollständig nach außen abschirmt, so dass auch die PVA-ummantelten Mikropartikel anionisch sind. Es wäre möglich, dass die Mikropartikel von dendritischen Zellen infolge der elektrostatischen Abstoßung zwischen den gleich geladenen Oberflächen nicht optimal aufgenommen werden können. Daher sollte eine kationische Oberflächenmodifizierung der Mikropartikel durchgeführt werden, um so möglicherweise das Ausmaß ihrer Aufnahme durch Phagozyten zu steigern. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die Aufnahme unterschiedlich geladener Teilchen zu einer veränderten Expression verschiedener costimulatorischer Moleküle auf den DCs führt (s. Abschnitt 3.5).

Wie in Abschnitt 1.2.2 ausgeführt, gibt es drei verschiedene Prinzipien zur Oberflächenmodifizierung von Mikropartikeln. Hierbei ist die Adsorption grenzflächenaktiver kationischer Moleküle die einfachste der drei Methoden, die daher auch am häufigsten angewendet wird. In diesem Teil der Arbeit sollten in der Literatur beschriebene Methoden für die eigene Fragestellung evaluiert und gegebenenfalls neue Substanzen zur kationischen Oberflächenmodifizierung von PLGA-Mikropartikeln etabliert werden.

3.4.1 CTAB-modifizierte Mikropartikel

Bisherige Untersuchungen zu CTAB und dessen Toxizität

Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) wurde von der Gruppe um D. O'Hagan erstmalig zur kationischen Aufladung von PLGA-Mikropartikeln beschrieben. In einer Vielzahl von Publikationen wurden diese Partikel als Vehikel für DNA-Transfektionen *in vitro* und *in vivo* eingesetzt. Gemäß den Literaturangaben (Singh et al. 2000) wurden die Mikropartikel nach

3. Ergebnisse und Diskussion

einem $W_1/O/W_2$ -Verfahren mit PBS als W_1 - und einer CTAB-Lösung als W_2 -Phase hergestellt. Während des Emulsionsprozesses lagerte sich CTAB aus der W_2 -Phase an die naszierenden Mikropartikel an und gab ihnen ein positives Oberflächenpotenzial. Nach der vollständigen Verdampfung des Lösungsmittels der PLGA-haltigen O-Phase wurden die Partikel nach den Literaturangaben zweifach mit destilliertem Wasser gewaschen und lyophilisiert.

Für Detergenzien wie CTAB ist zu erwarten, dass sie sich in Zellmembranen einlagern und so zum Absterben der Zellen führen. Weil die in dieser Arbeit hergestellten Mikropartikel hinsichtlich ihres Effektes auf phagozytierende Zellen charakterisiert werden sollten, musste zunächst ausgeschlossen werden, dass die verwendeten Hilfsstoffe selbst toxische Effekte zeigen. Wie Abbildung 46 verdeutlicht, besitzt CTAB in den verwendeten Konzentrationen (1-5 mg/ml in der W_2 -Phase) eine hohe Zelltoxizität. Daher ist es unbedingt erforderlich, durch Waschstschritte überschüssiges CTAB aus der Formulierung zu entfernen.

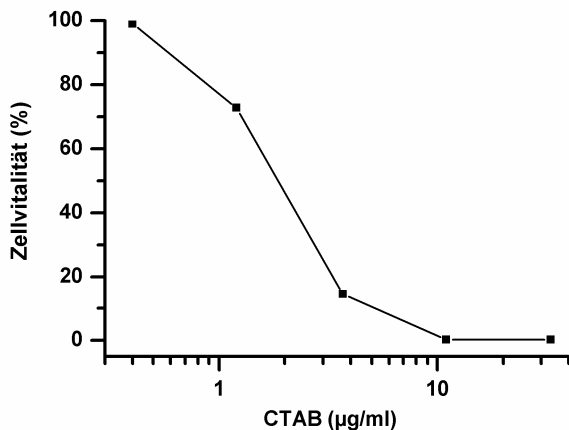


Abb. 46: Toxizität von CTAB auf humane GM-CSF stimulierte Monozyten (Propidiumiodid-Einlagerung). Die angegebene Vitalität ist bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

Stabilität der Mikropartikel und Variation der Herstellungsbedingungen

Bei Anwendung der von O'Hagan beschriebenen Methode konnte im Mikromischer eine milchige Suspension von Mikropartikeln geeigneter Größe erzielt werden. Jedoch aggregierten die Partikel während der Waschstschritte mit destilliertem Wasser und zeigten starke Flotation und Adhäsion an Grenzflächen. Bei visuellen Untersuchungen erschienen diese Proben nicht mehr als homogene milchige Suspension, sondern als trübe Lösung mit Flockungen und mit sich an den Wandungen der Glas- bzw. Kunststoffprobengefäße heraufziehenden Mikropartikelaggregaten (Wischke et al. 2006b).

3. Ergebnisse und Diskussion

Es wurden weitere Untersuchungen mit dem Ziel einer Optimierung der Mikro- partikelstabilität während der Waschschriffe durchgeführt. Zunächst wurde der Anteil des in der W_2 -Phase gelösten CTAB variiert, da die stabile Adhäsion des CTAB an die Mikro- partikel von der Konzentration des Detergens in der W_2 -Phase abhängen könnte (Tab. 18).

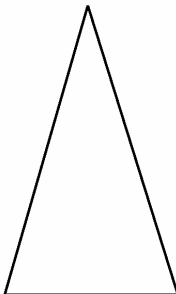
Tab. 18: Stabilitätsuntersuchungen an CTAB-modifizierten Mikropartikeln mit unter- schiedlichen Konzentrationen von CTAB in der W_2 -Phase.

Formulierung	Polymer	Polymer in O-Phase (%)	CTAB in W_2 -Phase (mg/ml)	Sekundär- emulgierung	Visuelle Untersuchung ^a
1	RG 503 H	5	1	Mikromischer	Aggregation und Flotation
2	RG 503 H	5	2,5	Mikromischer	
3	RG 503 H	5	5	Mikromischer	

^a Die visuelle Untersuchung wurde nach dem zweiten Waschschriff durchgeführt.

Aufgrund der Strukturen von CTAB und PLGA sind ionische Wechselwirkungen, Dipol- Wechselwirkungen und solche durch π -Elektronen zwischen den Substanzen unwahrschein- lich. Daher ist die Adsorption des CTAB an die Mikropartikel durch hydrophobe Wechselwirkungen oder andere schwache Bindungskräfte zwischen der Cetylkette und dem in der O-Phase gelösten Matrixpolymer zu erklären. Da eine Abhängigkeit der Bindungsstärke von der Art des Matrixpolymers zu erwarten ist, wurden in weiteren Studien für die Partikelherstellung Polymere von steigender Hydrophobizität eingesetzt (Tab. 19).

Tab. 19: Stabilitätsuntersuchungen an CTAB-modifizierten Mikropartikeln aus verschie- denen Matrixpolymeren.

Formulierung	Polymer	Polymer in O-Phase (%)	Hydropho- bizität	Sekundär- emulgierung	Visuelle Untersuchung ^a
4	RG 502 H	5		Ultra-Turrax [®]	Aggregation und Flotation
5	RG 503 H	5		Ultra-Turrax [®]	
6	RG 503	5		Ultra-Turrax [®]	
7	LR 706	3 ^b		Ultra-Turrax [®]	
8	L 210	3 ^b		Ultra-Turrax [®]	
9	PHB-co-HV	3 ^b		Ultra-Turrax [®]	

Die CTAB Konzentration in der W_2 -Phase betrug stets 2,5 mg/ml.

^a Die visuelle Untersuchung wurde nach dem zweiten Waschschriff durchgeführt.

^b Eine Reduzierung der Polymerkonzentration erfolgte wegen geringer Löslichkeit des Polymers oder zu hoher Viskosität der Polymerlösung.

3. Ergebnisse und Diskussion

Außerdem wurden Mischungen aus PLGA mit 0,25 bis 25 % CTAB (m/m) hergestellt und in der O-Phase cosolvatisiert, um abzuklären, ob die Cetylkette auf diesem Wege stabiler in die Polymermatrix eingebettet werden kann (Tab. 20). Wie die visuellen Untersuchungen dieser Proben ergaben, konnte durch keine der durchgeführten Variationen des Herstellungsprozesses die Aggregation und Flotation der Mikropartikel verhindert werden. Weder hydrophobe Wechselwirkungen noch andere Bindungskräfte waren stark genug, um CTAB dauerhaft an die Mikropartikel zu binden (Wischke et al. 2006b).

Tab. 20: Stabilitätsuntersuchungen an CTAB-modifizierten Mikropartikeln mit unterschiedlichen Konzentrationen von CTAB in der O-Phase.

Formulierung	Polymer	Polymer in O-Phase (%)	CTAB in W ₂ -Phase (% v. PLGA)	Sekundär-emulgierung	Visuelle Untersuchung ^a
10	RG 503	5	0,25	Mikromischer	Aggregation und Flotation
11	RG 503	5	2,5	Mikromischer	
12	RG 503	5	25	Mikromischer	

Die CTAB Konzentration in der W₂-Phase betrug stets 2,5 mg/ml.

^a Die visuelle Untersuchung wurde nach dem zweiten Waschschrift durchgeföhrt.

Ursache der Mikropartikelaggregation

Die beobachtete Aggregation könnte damit erklärt werden, dass CTAB während der Waschschrirte von der Mikropartikeloberfläche entfernt wurde. Infolge dessen haften sich die hydrophoben PLGA-Mikropartikel aneinander, um die Größe ihrer mit Wasser in Kontakt stehenden Oberfläche zu reduzieren. Die Durchführung der Waschschrirte ist jedoch erforderlich, um das überschüssige, toxische CTAB aus der Formulierung zu entfernen.

Die Messung der elektrophoretischen Mobilität der Mikropartikel im Zetasizer 4 bestätigte den vollständigen Verlust des CTAB von der Partikeloberfläche infolge der Waschschrirte, der durch die visuelle Untersuchung bereits vorhergesagt wurde. Eine exakte und reproduzierbare Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität dieser Proben war jedoch nicht möglich, da die Partikel keine stabile Suspension darstellten, sondern aggregierten und an der Wand der Messkapillare adhärirten. Die Zunahme der Teilchengröße infolge der Aggregation konnte durch Laserdiffraktometrie nachvollzogen werden (Abb. 47a).

3. Ergebnisse und Diskussion

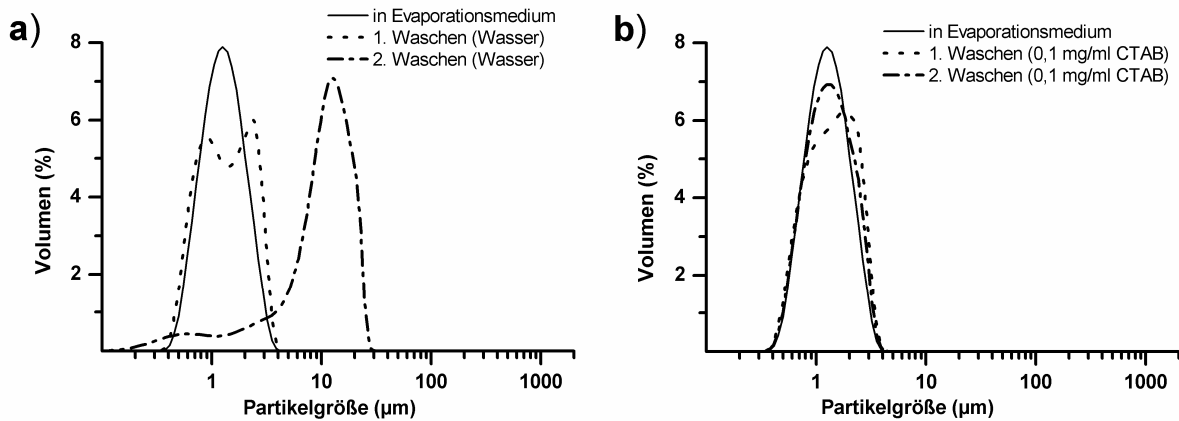


Abb. 47: Partikelgrößenverteilung von CTAB-modifizierten Mikropartikeln in Abhängigkeit von den Waschschritten mit (a) destilliertem Wasser oder (b) 0,1 mg/ml CTAB. Die für diese Untersuchung verwendeten Mikropartikel entsprechen Formulierung 6 in Tab. 20.

Es gibt verschiedene Erklärungen, weshalb in dieser Arbeit keine stabilen CTAB-modifizierten Mikropartikel erzeugt werden konnten. Die Gruppe um O'Hagan nutzte Resomer[®] RG 505 als Matrixpolymer, welches jedoch von Boehringer Ingelheim nicht mehr als Standardpolymer zur Verfügung gestellt wird. Daher wurden in dieser Arbeit verschiedene Polymere mit niedrigerer und höherer Hydrophobizität eingesetzt, wobei von denen mit größerer Hydrophobizität eine stärkere Wechselwirkung mit dem CTAB erwartet wurde. Wie oben dargestellt, konnte so keine stabile Formulierung erzielt werden. Die hier dargestellten Ergebnisse stimmen mit kürzlich publizierten Daten einer anderen Arbeitsgruppe überein (Oster et al. 2005), die ebenfalls keine stabilen CTAB-modifizierten Mikropartikel erzeugen konnten. In der genannten Arbeit wurde Resomer[®] RG 505 (wie von O'Hagan) und zusätzlich RG 502H als Partikelmatrix eingesetzt. Aus den Ergebnissen von Oster et al. ist zu schlussfolgern, dass sich Resomer[®] RG 505 hinsichtlich des Desorptionsverhaltens von CTAB und der Partikelstabilität nicht anders verhält als das breite Spektrum von Polymeren, das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde.

Oster et al. 2005 beobachteten große Partikelgrößen von CTAB-modifizierten im Vergleich zu PVA-stabilisierten Mikropartikeln. Dies wurde über einen Weichmachereffekt des CTAB auf das PLGA erklärt, der während der Herstellung oder Aufarbeitung zu einer Aggregation der Partikel geführt haben soll. Diese Hypothese könnte durch die Bestimmung der Glasübergangstemperatur der CTAB-modifizierten Mikropartikel untermauert werden, solche Untersuchungen wurden jedoch nicht durchgeführt. Die von Oster et al. 2005 durchgeführte Partikelgrößenmessung erfolgte erst nach Abschluss aller Waschschriffe, daher wurde nicht die ursprüngliche Größe der einzeln vorliegenden Teilchen bestimmt. Vielmehr

3. Ergebnisse und Diskussion

ist davon auszugehen, dass Oster et al. Aggregate von Mikropartikeln erfasst hat, die in der zitierten Publikation in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen auch zu erkennen sind.

Um die Hypothese von Oster zu überprüfen, wurde die Glasübergangstemperatur T_g von Resomer[®] RG 503, von daraus hergestellten CTAB-modifizierten Mikropartikeln sowie von Gemengen aus CTAB und PLGA bestimmt. Wie in Tabelle 21 dargestellt, konnte die postulierte Reduzierung der T_g und damit die Hypothese zur Destabilisierung der Partikel nicht nachvollzogen werden.

Tab. 21: Glasübergangstemperaturen von Resomer[®] RG 503, daraus hergestellten CTAB-modifizierten Mikropartikeln (MP) und Gemengen aus CTAB und RG 503.

Probe	Glasübergangstemperatur (°C)	
	Median	Range
Resomer [®] RG 503 ^a	45,73	0,38
CTAB-stabilisierte MP ^b	45,51	1,22
<i>Gemenge</i>		
0,1 % CTAB/RG 503 ^a	45,93	0,36
1 % CTAB/RG 503 ^a	45,70	0,51
10 % CTAB/RG 503 ^a	45,72	0,49

^an = 3; ^bErgebnisse von 4 Chargen

Wie die in Abbildung 47a dargestellten Ergebnisse zeigen, entstanden in den eigenen Arbeiten zunächst Mikropartikel, deren Partikelgröße den Erwartungen entsprach. Erst während der Waschschritte kam es zu einem Verlust der positiven Oberflächenladung und zu Aggregation. Daraus ist zu schlussfolgern, das CTAB mit seiner Cetylkette nicht stabil an der Partikeloberfläche verankert werden konnte und somit das ungünstige Verhältnis von Desorption zu Adsorption an der Partikeloberfläche die Ursache für die beobachtete Instabilität ist (Wischke et al. 2006b).

Gemäß dieser Hypothese müsste eine erhöhte Stabilität der Formulierung erzielt werden, wenn die Desorption des CTAB von der Partikeloberfläche reduziert werden kann. Da das Ausmaß der Desorption von der Konzentration des CTAB im Suspensionsmedium abhängt, wurden zum Waschen der Mikropartikel anstelle von Aqua dest. CTAB-Lösungen verschiedener Konzentrationen (0,01, 0,1, 0,3, 0,5 mg/ml) eingesetzt. Wie in Abbildung 48 zu erkennen ist, zeigte die visuelle Untersuchung bei den mit Wasser oder niedrigen CTAB-Konzentrationen gewaschenen Mikropartikeln deutliche Aggregation und Adhäsion an Grenzflächen. Durch Zusatz von 0,1 mg/ml CTAB konnte bei zwei Waschschritten die

3. Ergebnisse und Diskussion

Aggregation unterbunden werden (Abb. 47b). Bei Durchführung weiterer Waschschriffe oder der Verdünnung der hochkonzentrierten Mikropartikelsuspension mit der entsprechenden CTAB-Lösung konnten nur Lösungen mit mindestens 0,3 mg CTAB/ml die Aggregation der Partikel verhindern. Diese Konzentration (0,3 mg/ml) entspricht der Kritischen Mizellkonzentration von CTAB (Paredes und Tribout 1984).

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie konnte die Aggregation der Mikropartikel während der Waschschriffe ebenfalls visualisiert werden (Abb. 49). Um eine Verfälschung durch Aggregationen aus dem Lyophilisationsprozess zu vermeiden, wurden für diese Untersuchungen nicht-lyophilisierte Mikropartikel verwendet und die Suspensionen auf Siliziumwaver statt den sonst üblichen Probestellern aufgebracht. Wie die Abbildungen 49a und b veranschaulichen, zeigten die Mikropartikel nach viermaligem Waschen mit Wasser bzw. 0,1 mg/ml CTAB deutliche Aggregation, während sich bei Verwendung von 0,3 mg/ml CTAB (Abb. 49c) ein ähnliches Bild wie bei der ursprünglichen Probe im Evaporationsmedium ergab (Abb. 49d). Die in geringem Umfang auch in Probe c) vorhandenen Aggregate können durch die Zentrifugalkraft erklärt werden, welche bei der Abtrennung der Partikel aus dem Waschmedium auf die Teilchen einwirkte.

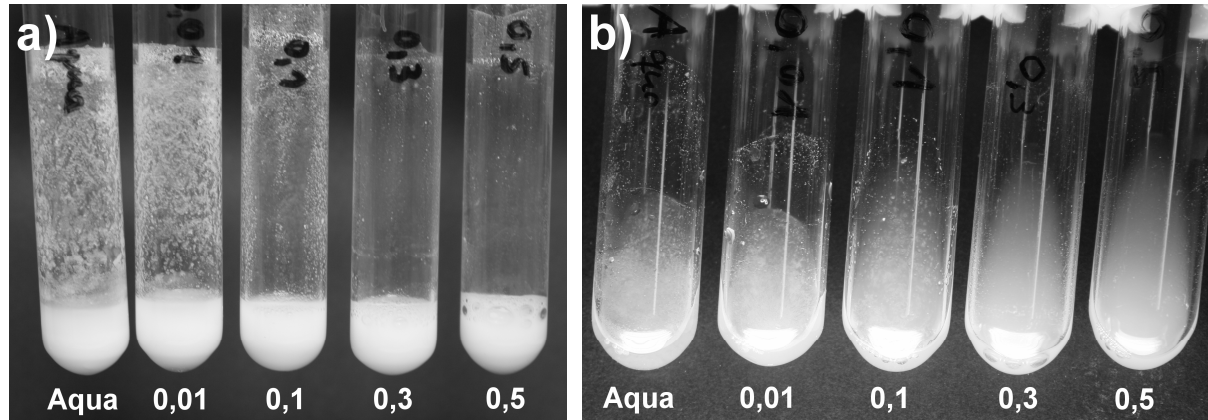


Abb. 48: Visuelle Untersuchung der Aggregation von Mikropartikeln beim Waschen mit Wasser bzw. 0,01, 0,1, 0,3 oder 0,5 mg/ml CTAB beim vierten Waschschriffe. (a) Aggregation und Anhaftung an die Reagenzglaswand. (b) Flockung der Mikropartikel (1:10 Verdünnung im entsprechenden Medium).

Anhand der oben dargestellten Ergebnisse wurde geschlussfolgert, dass eine kationischen Oberflächenmodifizierung von PLGA-Mikropartikeln nach der von O'Hagan und Mitarbeitern publizierte Methode nicht möglich ist (Wischke et al. 2005a und 2006b). Als Ursache für die auftretende Aggregation der Mikropartikel während ihrer Aufarbeitung konnte die Desorption des CTAB von der Partikeloberfläche ausgemacht werden. Wie

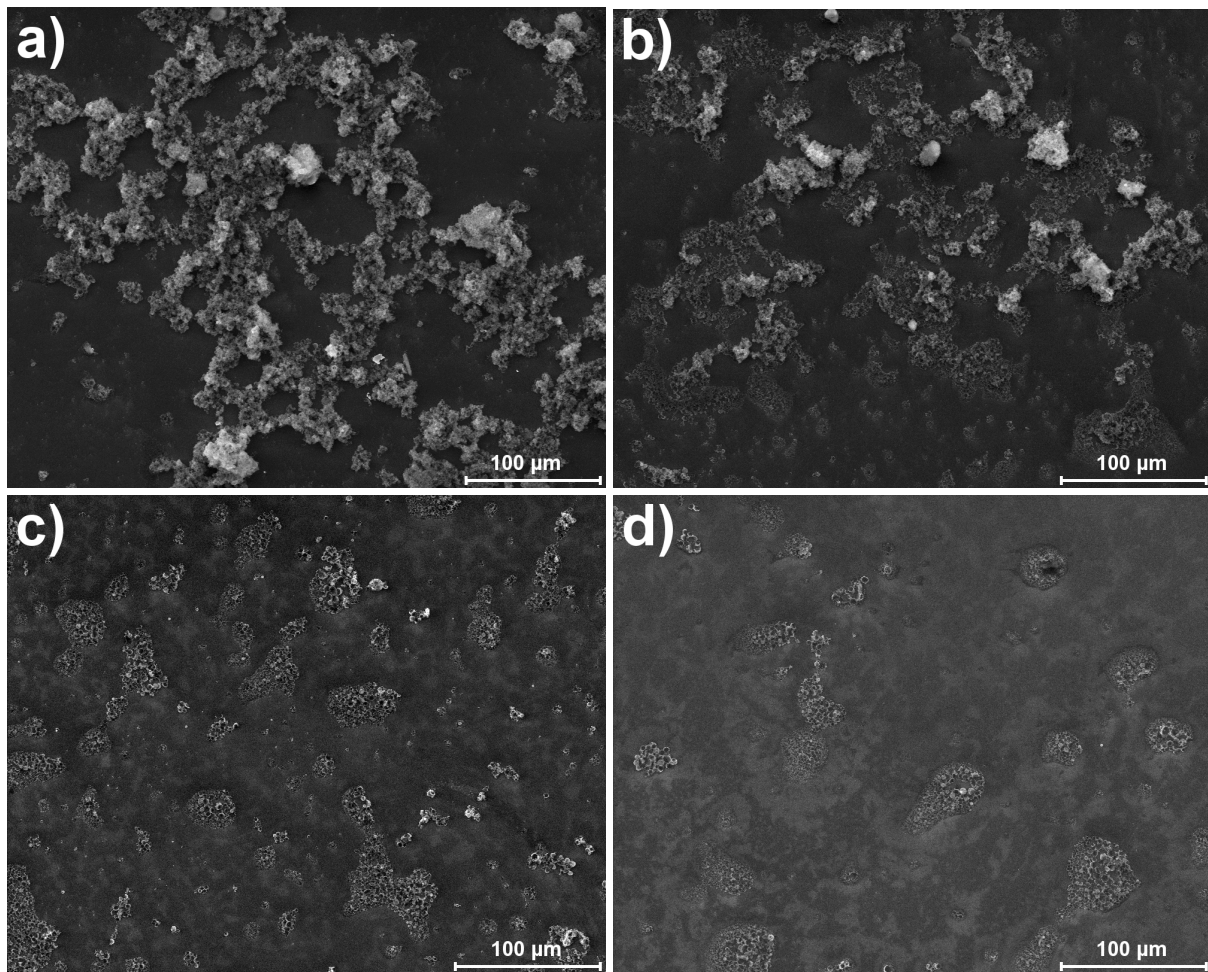


Abb. 49: REM-Überblicksbild zum Aggregationsverhalten von nicht-lyophilisierten CTAB-modifizierten Mikropartikeln. (a-c) Partikel beim vierten Waschschrift in (a) Wasser, (b) 0,1 mg/ml CTAB und (c) 0,3 mg/ml CTAB; (d) Partikel im Evaporationsmedium (Ausgangszustand ohne Waschen).

Abbildung 50 schematisch verdeutlicht, resultierte ein Waschen der Mikropartikel mit CTAB-Lösung statt Wasser in einer stabilen Suspension. Die hierfür benötigte CTAB-Konzentration zeigte jedoch eine hohe Zytotoxizität. Außerdem können Verdünnungsschritte dieser Probe mit Wasser oder Zellkulturmedium erneut zur Aggregation führen. Daher wurden andere Methoden zur kationischen Modifizierung von PLGA-Partikeln entwickelt.

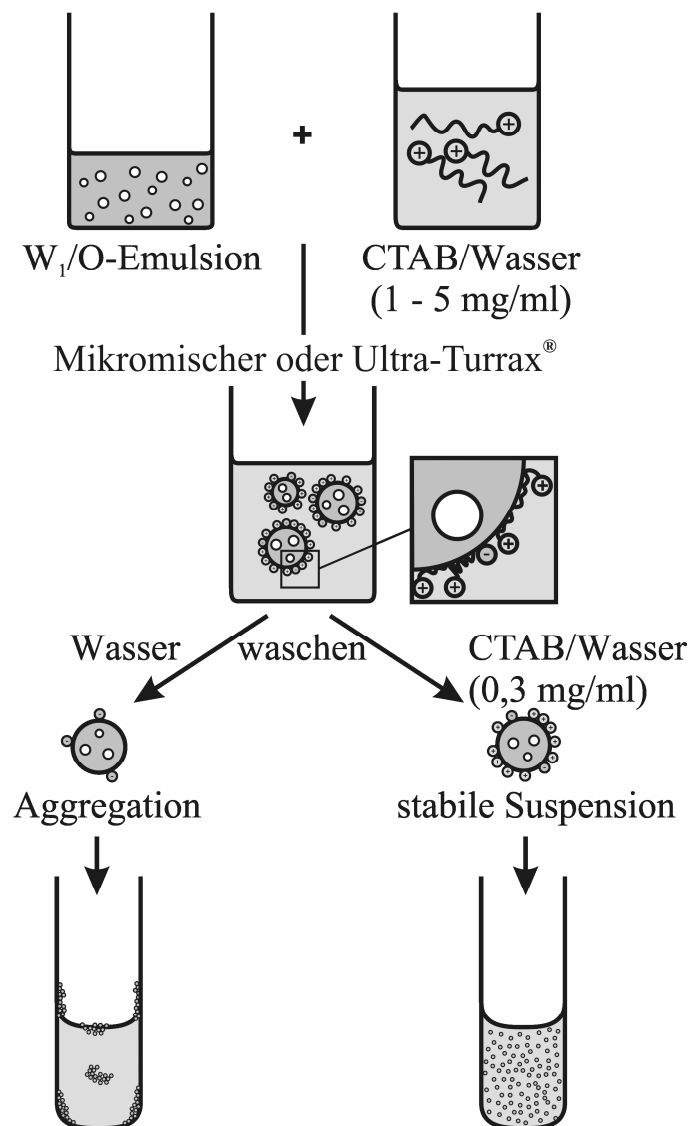


Abb. 50: Schema zur Stabilität von CTAB-modifizierten Mikropartikeln: Herstellung der Mikropartikel; Adsorption von CTAB an die Partikeloberfläche; Ergebnis der visuellen Untersuchung nach Waschen mit entweder Aqua dest. oder CTAB-Lösung.

3.4.2 Chitosan- und DEAE-Dextran-modifizierte Mikropartikel

Auswahl funktioneller Polymere zur Oberflächenmodifizierung

Es wurden Mikropartikel von entweder anionischer oder kationischer Ladung hergestellt, indem beim Doppemulsionsprozess Polyvinylalkohol (PVA) oder Mischungen von PVA mit kationischen funktionellen Polymeren in der W₂-Phase gelöst wurden. Wie in Abschnitt 1.2.1 ausgeführt, kann PVA seine hydrophoben Schleifen in die O-Phase einbringen und wird

bei der Präzipitation des Matrixpolymers irreversibel verankert. Daher zeigen PVA-stabilisierte Mikropartikel während der Waschschrirte keine Aggregation infolge der Desorption von PVA.

Die Verwendung von Chitosan als funktionelles Polymer zur kationischen Modifizierung der Oberfläche von PLGA-Mikropartikeln wurde in der Literatur bisher nur selten beschrieben (Kumar et al. 2004, Yamamoto et al. 2005). Parallel zu den eigenen Arbeiten (Wischke et al. 2006b) wurde Chitosan von Fischer et al. 2006 ebenfalls in einem Mikromischer-basierten Herstellungsprozess eingesetzt. In den genannten Publikationen wurde keine Aussage dazu getroffen, wie stabil Chitosan an der Oberfläche der PLGA-Mikropartikel gebunden ist und wie sich die Partikel bei Waschschrirten verhalten. Darüber hinaus finden sich in den genannten Arbeiten keine Aussagen zur Toxizität von Chitosan oder den damit modifizierten Mikropartikeln.

Grundsätzlich ist es wünschenswert, dass die zur positiven Aufladung der Oberfläche eingesetzten Substanzen pH-unabhängig geladen sind (z. B. CTAB). Dies ist bei kationischen, grenzflächenaktiven Polymeren (z. B. Chitosan) in der Regel nicht der Fall. Daher sollten zur Oberflächenmodifizierung solche Polymere eingesetzt werden, deren funktionelle Gruppen (üblicherweise primäre oder tertiäre Amine) einen möglichst hohen pK_a -Wert besitzen. So kann auch im neutralen pH-Bereich durch Adsorption von wenigen Molekülen des funktionellen Polymers eine hohe Oberflächenladung erzeugt werden. Chitosan hat einen pK_a von 6,3, daher ist bei physiologischem pH-Wert nur noch jede zehnte Aminogruppe geladen (s. Abschnitt 1.2.2). Aus diesem Grund sollte zur Oberflächenmodifizierung der PLGA-Mikropartikel neben Chitosan ein polykationisches, grenzflächenaktives Molekül mit höherem pK_a eingesetzt werden. Es wurde DEAE-Dextran ausgewählt, da seine Diethylaminoethyl-Funktion einen pK_a von etwa 9,5 besitzt. Dies ist nach Wissen des Autors die erste Beschreibung von DEAE-Dextran zur Modifizierung von PLGA-Mikropartikeln (Wischke et al. 2006b).

Einfluss der Oberflächenmodifizierung auf die Partikelgröße, Ultrastruktur und Glasübergangstemperatur

Wie schon mehrfach erwähnt, sollten Mikropartikel für eine optimale Aufnahme durch phagozytierende Zellen eine Teilchengröße von $< 5-10 \mu\text{m}$ besitzen. Wie in Tabelle 22 dargestellt, besitzen die verschiedenen W_2 -Phasen unterschiedliche Viskositäten. Viskosere

3. Ergebnisse und Diskussion

Lösungen zeigen bei vorgegebenem Druck eine geringere Fließgeschwindigkeit durch Kapillaren und Mikrostrukturen. Die Fließgeschwindigkeit hat jedoch einen entscheidenden Einfluss auf die Größe der im Mikromischer erzeugten Partikel. Durch Verwendung einer HPLC-Pumpe zum Transport der W₂-Phasen sollte unter automatischer Anpassung des Druckes für alle W₂-Phase eine Flussrate von 25 ml/min gewährleistet werden. Aufgrund der Druckbegrenzung des Mikromischers auf 30 bar und der hohen Viskosität einer Chitosanlösung von 3 mg/ml (Konzentration bei Kumar et al. 2004) musste die Chitosan-konzentration auf 1,5 mg/ml reduziert werden.

Tab. 22: Kinematische Viskosität, Dichte und errechnete dynamische Viskosität von Wasser und den verwendeten W₂-Phasen bei 20 °C.

	Kinematische Viskosität (mm ² /s)	Dichte (g/cm ³)	Dynamische Viskosität (mPa·s)
Aqua dest.	0,940 (0,033)	0,9981 (0)	0,938
PVA (2,5 mg/ml)	1,035 (0,028)	0,9984 (0)	1,033
PVA + DEAE-Dextran (5 mg/ml)	5,027 (0,288)	0,9998 (0)	5,026
PVA + Chitosan (1,5 mg/ml)	8,764 (0,753)	0,9989 (0)	8,754

n=3, Median, Range in Klammern

Wie in Abbildung 51 zu erkennen ist, wurden im Mikromischer mit allen Stabilisatoren bzw. Stabilisatormischungen Partikel der gewünschten Größe hergestellt, wobei die Größenverteilung das für den Mischer charakteristische Bild zeigte (Wischke et al. 2006b). Aufgrund der Druckanpassung durch die HPLC-Pumpen wurde die voreingestellte Flussrate realisiert, so dass keine Verschiebung der Hauptfraktion in der Größenverteilung

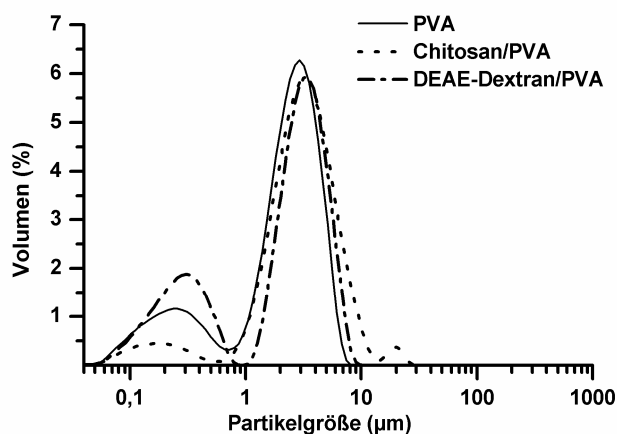


Abb. 51: Partikelgrößenverteilung von PVA-, Chitosan/PVA- und DEAE/PVA-stabilisierten Mikropartikeln.

auftrat. Nach der Lyophilisation zeigten die Chitosan- und DEAE-Dextran-modifizierte Mikropartikel eine schlechtere Benetzbarkeit als die PVA-stabilisierten Teilchen und eine leicht erhöhte Aggregationsneigung.

Der Einfluss der Oberflächenmodifizierung mit den kationischen Hilfsstoffen auf die Ultrastruktur der Mikropartikel wurde durch REM untersucht. Wie Abbildung 52 verdeutlicht, erfuhr die Oberflächenstruktur keine Veränderung. Des Weiteren wurde die Glasübergangstemperatur T_g des PLGA in Abhängigkeit vom verwendeten Stabilisator analysiert, da die Wechselwirkung von eingebetteten Substanzen mit der Polymermatrix theoretisch zu Veränderungen der T_g führen kann. Es zeigte sich, dass die verschiedenen Hilfsstoffe die T_g des PLGA nicht beeinflussten (Tab. 23).

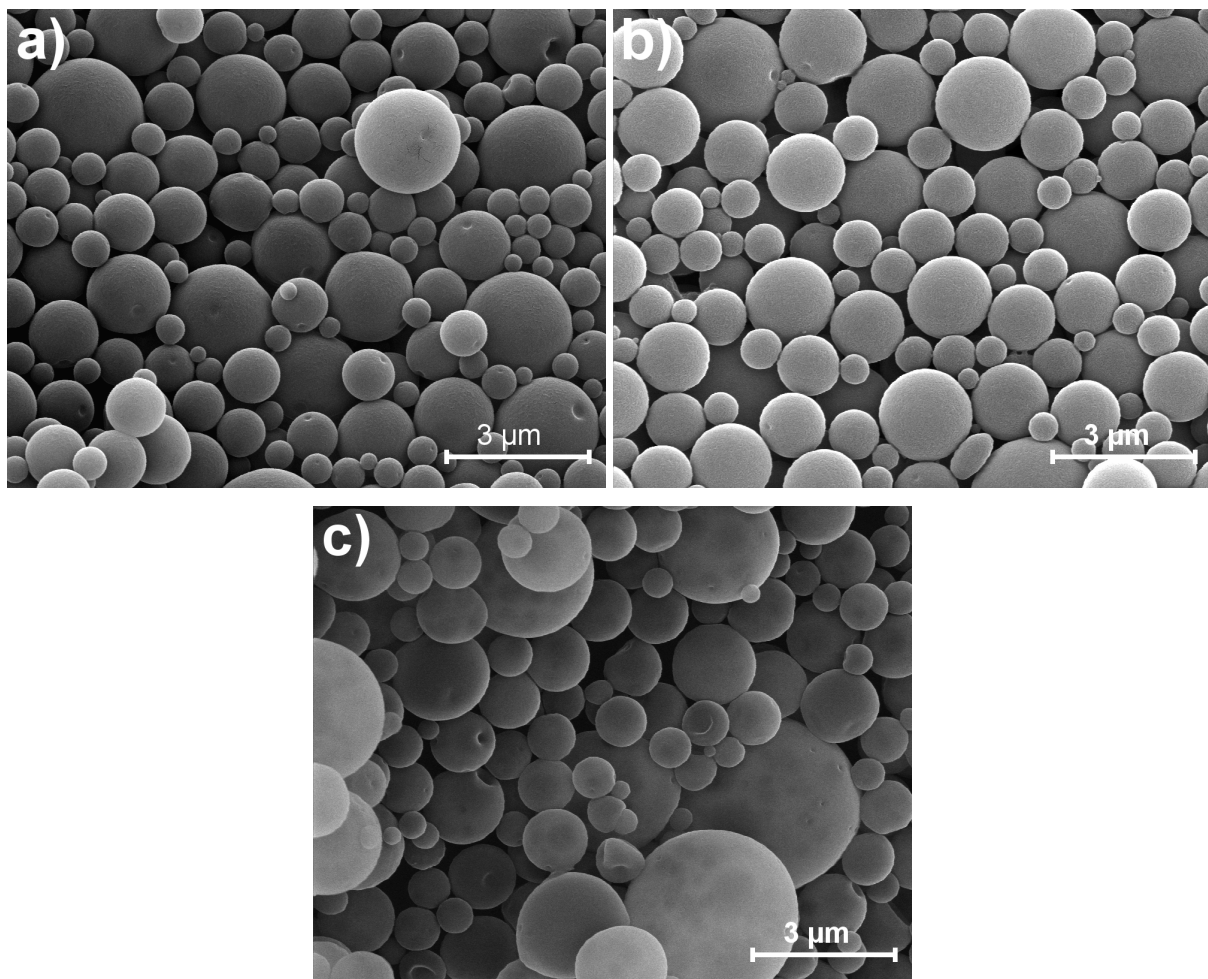


Abb. 52: Ultrastruktur von (a) PVA-, (b) Chitosan/PVA- und (c) DEAE-Dextran/PVA-stabilisierten Mikropartikeln.

Tab. 23: Glasübergangstemperatur von PLGA-Mikropartikeln.

Stabilisator	Glasübergangstemperatur (° C)	
	Median ^a	Range ^a
PVA	43,43	0,52
Chitosan/PVA	43,79	0,70
DEAE-Dextran/PVA	43,21	0,27

^an = 3

Oberflächenladung der Mikropartikel

In Abschnitt 1.2.1 wurde beschrieben, dass PVA ein stabiles Netzwerk auf der Oberfläche der Mikropartikel bildet und nicht entfernt werden kann. Die Anbindung von PVA führt zu einer sterischen Stabilisierung der Mikropartikel, bei zusätzlicher Anhaftung von Chitosan bzw. DEAE-Dextran kommt eine elektrosterische Komponente hinzu. In der Literatur finden sich Angaben zum Zetapotenzial PVA-stabilisierter Mikropartikel (Oster et al. 2005). Die im Laser-Doppler-Anemometer als Messgröße bestimmte elektrophoretische Mobilität der Teilchen ist ein Maß für deren Oberflächenladung. Die Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung, über die vom Zetasizer 4 und vergleichbaren Geräten aus der Mobilität das Zetapotenzial der Probe berechnet wird (Faktor 12,85 für Proben, die bei 25 °C suspendiert in Aqua dest. vorliegen [Müller 1996]), gilt ausschließlich für rein elektrostatisch stabilisierte Partikel. Daher ist das vom Gerät angegebene Zetapotenzial für die überwiegend sterische stabilisierten, PVA-ummantelten Mikropartikel nur eine Näherung. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zur Charakterisierung der Mikropartikel statt des Zetapotenzials die elektrophoretische Mobilität verwendet.

Es ist zu berücksichtigen, dass eine Reihe von Faktoren die Messungen stören und zu großen Streuungen der Messwerte führen: (1) Bei den vorliegenden Partikeln mit einer Größe von ~ 3 µm ist die lineare elektrophoretische Bewegung überlagert von Sedimentation. (2) Bei Proben mit einer breiten Partikelgrößenverteilung (trifft hier zu) wandern die kleinen Partikel schneller als die großen, können mit ihnen Zusammenstoßen und Aggregate bilden, welche ihrerseits aufgrund der höheren Reibung langsamer wandern. (3) Die Sedimentation von einzelnen Partikeln oder von Aggregaten kann die lineare Bewegung anderer Partikel stören. (4) Die akkurate Einstellung der Proben auf einen neutralen pH-Wert ist in ungepufferten Systemen schwierig. Der Zusatz von Pufferionen könnte jedoch zu einer

3. Ergebnisse und Diskussion

Verfälschung der elektrophoretischen Mobilität führen, da eine Adsorption von Pufferionen an die Teilchen oder eine Reduzierung der kolloidalen Stabilität möglich ist.

Anhand der elektrophoretischen Mobilität wurde in dieser Arbeit sowohl grundsätzlich das Auftreten einer kationischen Oberflächenladung, als auch der Verlust des Hilfsstoffes bei Chitosan- und DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikeln während der Waschschrte überprüft. Hierfür wurden bei jedem Waschschrte der Mikropartikel Proben entnommen. Da die Ladung von Chitosan und DEAE-Dextran pH-abhängig ist, wurden die Proben nach Herstellung einer für die Messung geeigneten Verdünnung entweder auf pH 4 oder pH 7 eingestellt. Wie in Abbildung 53 dargestellt, zeigten die modifizierten, direkt nach der Herstellung im Evaporationsmedium suspendierten Mikropartikel eine hohe kationische Oberflächenladung. Während der Waschschrte wurde sowohl Chitosan als auch DEAE-Dextran partiell entfernt, was sich in einer Reduzierung der elektrophoretischen Mobilität zeigt. Der Verlust des kationischen Ladungsträgers kann am besten bei einem pH-Wert etwas unterhalb des pK_a -Wertes des entsprechenden Moleküls beobachtet werden. Da der pK_a -Wert von Chitosan 6,3 beträgt, wiesen die entsprechenden Mikropartikel nach Entfernung von allem überschüssigen Hilfsstoff bei pH 7 keine kationische Ladung mehr auf (Abb. 53a). Hingegen konnte durch Messung der elektrophoretischen Mobilität bei pH 4 festgestellt werden, dass auch nach mehreren Waschschrten immer noch Chitosan an der Oberfläche der Mikropartikel gebunden war. Betrachtet man die elektrophoretische Mobilität der DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikel bei pH 4, so scheint es, als würde das kationische

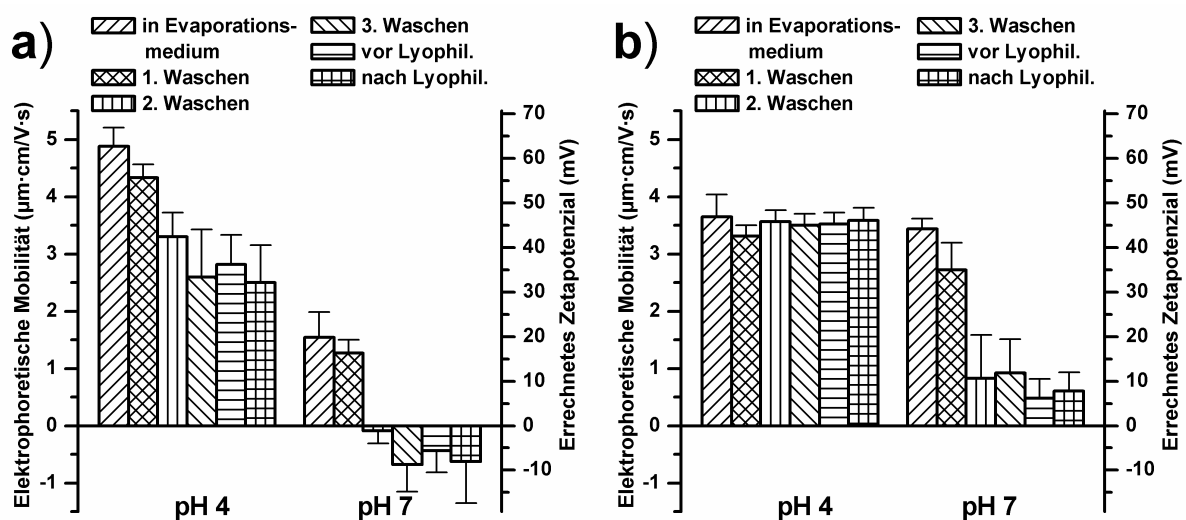


Abb. 53: Elektrophoretische Mobilität und errechnetes Zetapotenzial von (a) Chitosan- und (b) DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikeln während der Waschschrte und nach der Lyophilisation. Die Messungen wurden bei pH 4 und pH 7 durchgeführt (\bar{x} und SD von 5 Chargen).

3. Ergebnisse und Diskussion

Dextran bei den Waschschritten gar nicht abgelöst werden, da die Mobilität der Partikel konstant bleibt (Abb. 53b). Die Messung bei pH 7, also näher am pK_a von DEAE-Dextran ($pK_a \sim 9,5$), verdeutlicht, dass auch bei diesen Mikropartikeln der Ladungsträger langsam entfernt wurde. Aufgrund des höheren pK_a von DEAE-Dextran verglichen mit Chitosan besaßen die DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikel wie erhofft auch bei pH 7 noch eine positive Ladung (Wischke et al. 2006b).

In Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Partikelladung, gemessen anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität, wurden lyophilisierte Mikropartikel in Wasser bei verschiedenen pH-Werten resuspendiert und analysiert (Abb. 54). Es zeigte sich sowohl bei den Chitosan- als auch bei den DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikeln ein Schnittpunkt der Kurve mit der pH-Achse unterhalb des pK_a -Wertes der Hilfsstoffe.

Der Zetasizer 4 nutzt als Messprinzip die Wanderung der Partikel im elektrischen Feld. Herausragende Kettensegmente der Stabilisatorschicht könnten diese Bewegung durch Reibungseffekte abbremsen. Zusätzlich ist die Adsorption entgegengesetzt geladener Ionen (Cl^- , OH^-) an die Partikeloberfläche denkbar, was zu einer Reduzierung der effektiven Partikelladung und der elektrophoretischen Mobilität führt. Die Partikelmatrix, also PLGA, besitzt in nicht-saurem Milieu infolge der Deprotonierung freier Carboxylgruppen selbst eine anionische Ladung, die um so mehr ansteigt, je mehr der pH ins Neutrale verschoben wird. Ungeladene grenzflächenaktive Polymere wie PVA ummanteln die geladene Partikeloberfläche, schirmen die Ladung jedoch nur partiell nach außen ab. Damit würde es, von außen betrachtet, knapp unterhalb des pK_a des jeweiligen kationischen Hilfsstoffes zu einer Aufhebung der positiven Ladung der Mikropartikel kommen, so wie es in dieser Arbeit beobachtet wurde.

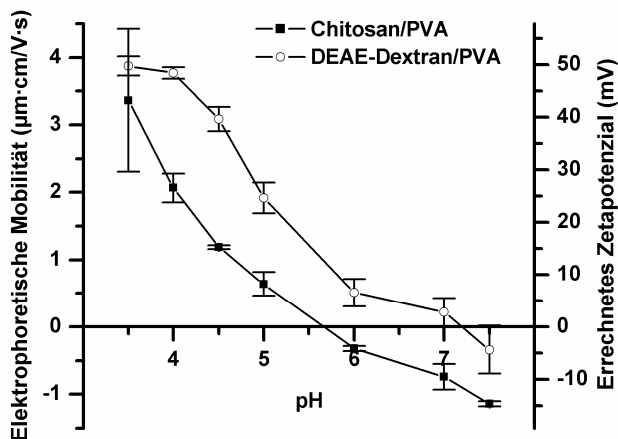


Abb. 54: Elektrophoretische Mobilität und errechnetes Zetapotenzial von lyophilisierten Chitosan- bzw. DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikeln in Abhängigkeit vom pH-Wert ihrer Umgebung ($n = 3$, \bar{x} und R).

Restkonzentration an Hilfsstoffen und deren Toxizität

Bei der Mikropartikelherstellung wurde in der W₂-Phase ein Überschuss der jeweiligen Stabilisatoren eingesetzt, um eine Aggregation der naszierenden Partikel zu verhindern. Der Herstellungsgang sieht vor, dass nach der Evaporation des Dichlormethans mehrere Waschschriffe durchgeführt werden, um nicht verkapseltes Protein und überschüssige Hilfsstoffe zu entfernen. In diesem Zusammenhang muss die Toxizität dieser Substanzen, ihr Restgehalt in den Proben und die daraus resultierende Konzentration am Anwendungsort (Zellkultur) sowie die zur Wahrung der Stabilität der Formulierung nötigen Hilfsstoffmenge betrachtet werden. Wie oben ausgeführt, war nach Durchführung der Waschschriffe keine starke Tendenz zur Aggregation bei Chitosan- und DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikeln festzustellen, die Formulierung war stabil.

Die Toxizität der gelösten Hilfsstoffe auf phagozytierende Zellen wurde an humanen Monozyten mit verschiedenen Methoden untersucht (Propidiumiodid-Einlagerung, Färbung mit Trypanblau, Casy[®]-Technologie). Wie Abbildung 55 verdeutlicht, zeigte PVA keine Zytotoxizität. Hingegen konnte für die kationischen Polymere Chitosan und DEAE-Dextran eine ausgeprägte Toxizität festgestellt werden. Daher war es notwendig, durch gründliches Waschen alle überschüssigen Moleküle zu entfernen und den Restgehalt der Stabilisatoren zu detektieren. Die Quantifizierung stellte eine besondere Herausforderung dar, da kaum Methoden beschrieben sind, um die genannten Substanzen im unteren µg/ml-Bereich nachzuweisen. Da die Polarimetrie nicht empfindlich genug war, wurde für DEAE-Dextran eine aufwendige Methode verwendet, bei der ein Triphenylmethanfarbstoff durch Reaktion von Glukose mit Phenol und einer wasserentziehenden Säure gebildet wurde. Für Chitosan

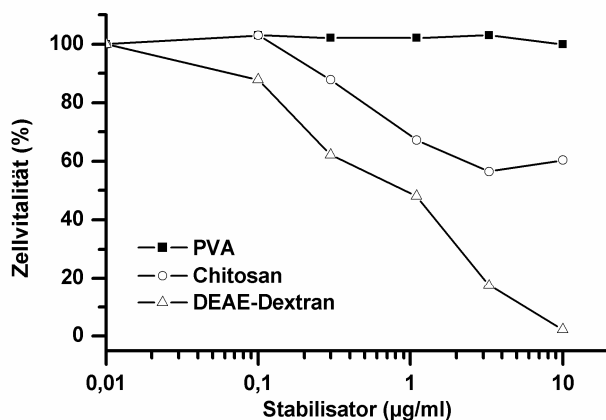


Abb. 55: Toxizität verwendeter Stabilisatoren auf humane GM-CSF stimulierte Monozyten (Propidiumiodid-Einlagerung). Die angegebene Vitalität ist bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

3. Ergebnisse und Diskussion

wurde die Empfindlichkeit des von Muzzarelli 1998 beschriebenen Nachweises mit Cibacron Brilliant Red 3B-A entscheidend verbessert (s. Abb. 20, Abschnitt 2.3).

Wie in Tabelle 24 dargestellt, war der Gehalt von PVA, Chitosan bzw. DEAE-Dextran in der dritten Waschlösung sehr gering. Wie im Methodenteil beschrieben, wurden die Mikropartikel, nachdem sie aus der dritten Waschlösung durch Zentrifugation abgetrennt wurden, erneut resuspendiert und dann lyophilisiert. Dieser Dispergierungsschritt stellt im Prinzip einen weiteren Waschschrift dar, so dass letztlich die Konzentration im Suspensionsmedium vor der Lyophilisation noch geringer ist (für alle Hilfsstoffe unter der Nachweisgrenze) als beim angegebenen dritten Waschen. Für die anionischen, nur mit PVA-stabilisierten Mikropartikel war es möglich, den Restgehalt von PVA in den lyophilisierten Proben zu bestimmen, wobei das oberflächengebundene wie auch das bereits abgelöste PVA erfasst wurde. Wie Abbildung 56 verdeutlicht, war diese Konzentration sehr gering. Für Chitosan und DEAE-Dextran konnte diese Bestimmung nicht durchgeführt werden, da die bei der Aufarbeitung entstehenden PLGA-Hydrolyseprodukte die Nachweisverfahren störten.

Tab. 24: Restkonzentration von gelösten Hilfsstoffen in Mikropartikel-Medien und Abschätzung ihrer Konzentration nach Einbringung in die Zellkultur.

	PVA ^a (µg/ml)	Chitosan ^b (µg/ml)	DEAE-Dextran ^c (µg/ml)
Evaporationsmedium	2576,8 (129,8)	1600,7 (64,4)	4977,0 (1533,6)
1. Waschen	142,6 (14,4)	116,0 (156,0)	651,0 (861,6)
2. Waschen	17,4 (1,6)	8,0 (3,6)	17,0 (43,0)
3. Waschen	9,6 (1,4)	< 5	< 5
<i>Geschätzte Konzentration</i>			
Nach Lyophilisation (20 mg MP/ml) ^d	< 10	< 5	< 5
In Zellkultur (50 µg MP/ml)	< 0,025	< 0,0125	< 0,0125
Zytotoxische Konz. ^e	>10,0	0,3	0,1

^aErgebnisse für PVA-stabilisierte Mikropartikel (n = 3, \bar{x} , R in Klammern).

^bErgebnisse für Chitosan/PVA-stabilisierte Mikropartikel (n = 5, \bar{x} , R in Klammern).

^cErgebnisse für DEAE-Dextran/PVA-stabilisierte Mikropartikel (n = 5, \bar{x} , R in Klammern).

^dLyophilisierte Mikropartikel wurden entsprechend dem Volumen vor der Lyophilisation in Wasser suspendiert. Bei einer Ausbeute von schlechtestenfalls 60 % waren mindestens 60 mg/3 ml (= 20 mg/ml) Suspensionsmedium enthalten, in dem auch die festgestellte Hilfsstoffkonzentration vorlag.

^eEine Abnahme der Vitalität auf 80 % (verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen) wurde als zytotoxische Konzentration festgelegt (vgl. Abb. 55).

3. Ergebnisse und Diskussion

Daher wurde bei allen Proben der Gehalt der abgelösten Stabilisatoren in der dritten Waschlösung verwendet, um die Konzentration der mit den Mikropartikeln in die Zellkultur eingebrachten Hilfsstoffe abzuschätzen (Tab. 24). Wie zu erkennen ist, lag dieser Gehalt in allen Fällen unter der toxischen Konzentration. Es wurde geschlussfolgert, dass die in der Mikropartikelsuspension gelösten Hilfsstoffe die Zellviabilität nicht beeinflussen (Wischke et al. 2006b).

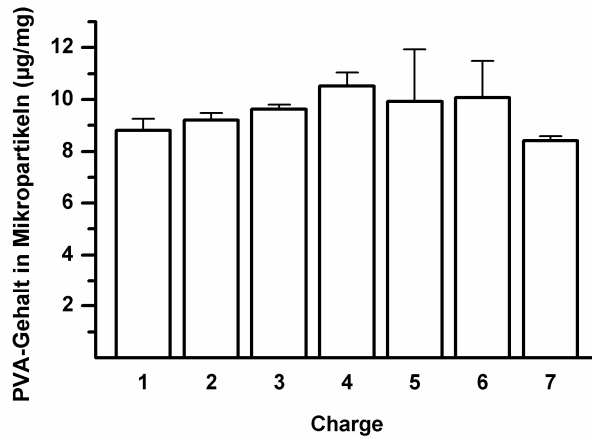


Abb. 56: Restgehalt von oberflächengebundenem und freiem PVA in verschiedenen Chargen PVA-stabilisierter Mikropartikel (Dreifachbestimmung, \bar{x} und R).

Endotoxine

Gramnegative Bakterien besitzen in ihrer Zellwand Lipopolysaccharide (LPS), welche aus einer nach außen gerichteten Kette sich wiederholender Oligosaccharid-Einheiten (O-Antigen), einem Kernsaccharid und einer Lipidkomponente (Lipid A) bestehen. Der Lipidanteil ist verantwortlich für die Toxizität von LPS. Die immunologischen Effekte von LPS werden hingegen über das O-Antigen vermittelt. LPS kann nach Bindung mit dem Lipopolysaccharid-bindenden Protein über TLR 4 (Poltorak et al. 1998) zu einer Reifung von dendritischen Zellen führen. Aufgrund der Annahme einer intrazellulären Lokalisation wurde LPS von Pfeiffer als Endotoxin bezeichnet (nach Rietschel und Cavaillon 2003).

Um die Effekte der Mikropartikel bzw. der zu untersuchenden verkapselten Antigene auf das biologische Verhalten von DCs zu studieren, war es daher nötig, die Verunreinigung mit LPS so gering wie möglich zu halten. Wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, wurde zur Vermeidung von LPS die Partikelherstellung unter aseptischen Bedingungen mit endotoxinfreien Materialien durchgeführt. Mit Hilfe des LAL-Testes wurde der Erfolg dieser Maßnahmen anhand des Gehaltes von Endotoxinen in diversen Mikropartikelchargen überprüft. Die Validierung des Testes erfolgte durch Standard-Addition (2.λ). In der

Standardprozedur wurde semiquantitativ die Konzentration von Endotoxinen erfasst, welche sich bei 37 °C innerhalb von 30 min von der Partikeloberfläche ablösten. Hierfür wurden die Proben nach Abschluss der Inkubation zentrifugiert und der Überstand im LAL-Test eingesetzt. Die Endotoxinkonzentration betrug bis auf einen Ausreißer stets $< 0,6$ EU/mg Mikropartikel. Erfolgte keine Abtrennung der Mikropartikel durch Zentrifugation, so ergaben beide Durchführungen (Suspension und Überstand) stets dasselbe Ergebnis. Für Chitosan- und DEAE-Dextran-modifizierte Mikropartikel wurde kein Unterschied zu PVA-stabilisierten Partikeln hinsichtlich des Gehaltes an Endotoxinen festgestellt.

In der Literatur fand sich nur eine Beschreibung zum Endotoxingehalt von Mikropartikeln (Jilek et al. 2004; < 5 EU/mg). Jilek gibt keine Informationen zur Validierung und genauen Durchführung des Testes. Daher können die Literaturdaten nicht mit dem erzielten Ergebnis verglichen werden.

Das verwendete Versuchsdesign erfasst nur oberflächenassoziierte, im burst-release freigesetzte Endotoxine. Es ist anzunehmen, dass sich die Endotoxinkonzentration im Inneren der Mikropartikel nicht wesentlich von der Konzentration auf der Oberfläche unterscheidet, sofern nicht die W_1 -Phase mit Endotoxinen kontaminiert ist. Nach Kenntnisstand des Autors gibt es in der Literatur keine methodische Beschreibung zur Erfassung und keine Angabe zum Gehalt von mikroverkapselten Endotoxinen.

Für die Bestimmung der eingeschlossenen Endotoxine wurde zunächst das zur Prüfung der Verkapselungseffizienz verwendete Verfahren der Partikelauflösung getestet. Da das hierbei verwendete Acetonitril-Trifluoressigsäure-Reagenz einen Störfaktor für den LAL-Test darstellte, konnte diese Methode jedoch nicht genutzt werden. Daher wurde eine Hydrolyse der Polymermatrix mit NaOH geplant. Weil ein pH-Wert jenseits von 7 ± 1 als Störfaktor für den LAL-Test bekannt ist, sollten die Proben anschließend neutralisiert und dann der Endotoxin-Bestimmung zugeführt werden. Die Inkubation von Endotoxinstandards (1 bis $50 \cdot \lambda$) mit NaOH zeigte jedoch, dass Endotoxine durch diese Behandlung zerstört und im LAL-Test nicht mehr erfasst wurden. Damit stellt auch die Hydrolyse der Mikropartikel mit NaOH keine geeignete Methode zur Bestimmung mikroverkapselter Endotoxine dar.

3.5 Zellstudien

Die Ergebnisse zum Einfluss mikropartikulärer Träger auf die Charakteristika phagozytierender Zellen entstammen der Zusammenarbeit mit Julian Zimmermann (Universität Göttingen) und Dr. rer. nat. Dirk Lorenzen (Institut für Tumorthherapie, Duderstadt). Zum Nachweis des Auftretens der angegebenen Zelltypen und zum Verständnis der in den Studien erzielten Ergebnisse sind in Abschnitt 3.5.1 zunächst die Phagozytosefähigkeit und die typische Expression von Oberflächenmarkern für die jeweiligen Zellen dargestellt.

3.5.1 Charakteristika der verwendeten Zellen

Phagozytosefähigkeit

Alle Prozesse der Aufnahme von extrazellulärem Material in Zellen bezeichnet man übergeordnet als Endozytose. Ist ein partikulärer Reiz der Auslöser für die Inkorporierung (z. B. bei Mikropartikeln), so spricht man von Phagozytose. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass bei Anwesenheit von Serumproteinen eine Opsonierung der Mikropartikel erfolgen und daher auch rezeptorvermittelte Endozytose über F_c -Rezeptoren an der Aufnahme beteiligt sein kann.

Wie in Abschnitt 1.7 beschrieben, können dendritische Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes erzeugt werden. Monozyten und unreife dendritische Zellen (iDCs) besitzen die Fähigkeit zur Aufnahme extrazellulären Materials. Während der Differenzierung zu reifen dendritischen Zellen (mDCs) geht diese Fähigkeit verloren (Abb. 57). Da auch Monozyten phagozytieren können, wurden die Untersuchungen zum Ausmaß der Mikropartikelaufnahme in Abhängigkeit von deren Eigenschaften mehrheitlich an Monozyten durchgeführt und in Einzelexperimenten an DCs bestätigt.

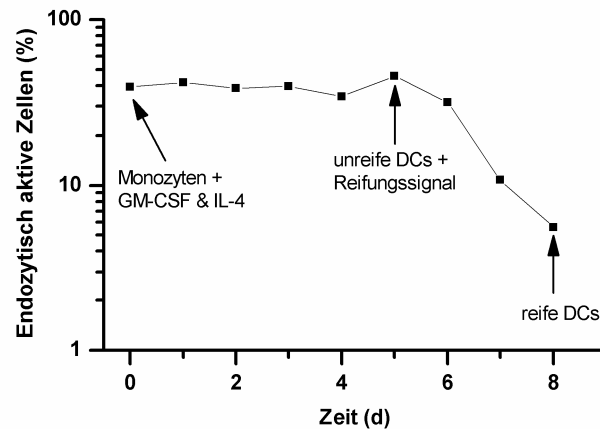


Abb. 57: Fähigkeit zur Endozytose von Partikeln im Laufe der Dendritogenese. Mit freundlicher Genehmigung entnommen bei Zimmermann 2006 (untersucht wurde die Aufnahmefähigkeit opsonierter Partikel aus fluoreszenzmarkiertem Zymosan, indem Zellen in parallelen Kulturen an verschiedenen Tagen Partikel zugesetzt und die Fluoreszenzaktivität der Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert wurde).

Generierung von DCs aus Monozyten

Die Dendritogenese (Abb. 17, Abschnitt 1.7) unter Einfluss der Zytokine IL-4 und GM-CSF führt zu morphologischen und funktionellen Änderungen der Zellen. Außerdem ist ein Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Kulturschale festzustellen. Wie Abbildung 58 verdeutlicht, führt die Differenzierung der Monozyten über iDCs zu mDCs zum Verlust von CD 14. Die entstandenen iDCs exprimieren im Gegensatz zu Monozyten die Oberflächenmarker CD 1a und CD 209 (DC-SIGN). CD 1a kann bei mDCs wieder verschwinden, hingegen bleibt die Expression von CD 209 unverändert.

Reifung dendritischer Zellen

Reife dendritische Zellen besitzen, wie oben dargestellt, nicht mehr die Fähigkeit zur Phagozytose. Vielmehr besteht ihre biologische Funktion darin, die aufgenommenen und prozessierten Antigene über MHC-Moleküle den naiven T-Zellen zu präsentieren und die T-Zellen gegebenenfalls zu aktivieren. Wie Abbildung 59 zeigt, führt die Differenzierung von Monozyten über iDCs zu mDCs zu einer Zunahme von HLA-DR, einem MHC II-Molekül. Weiterhin ist eine deutlich gesteigerte Expression von CD 80 und CD 86 charakteristisch, die

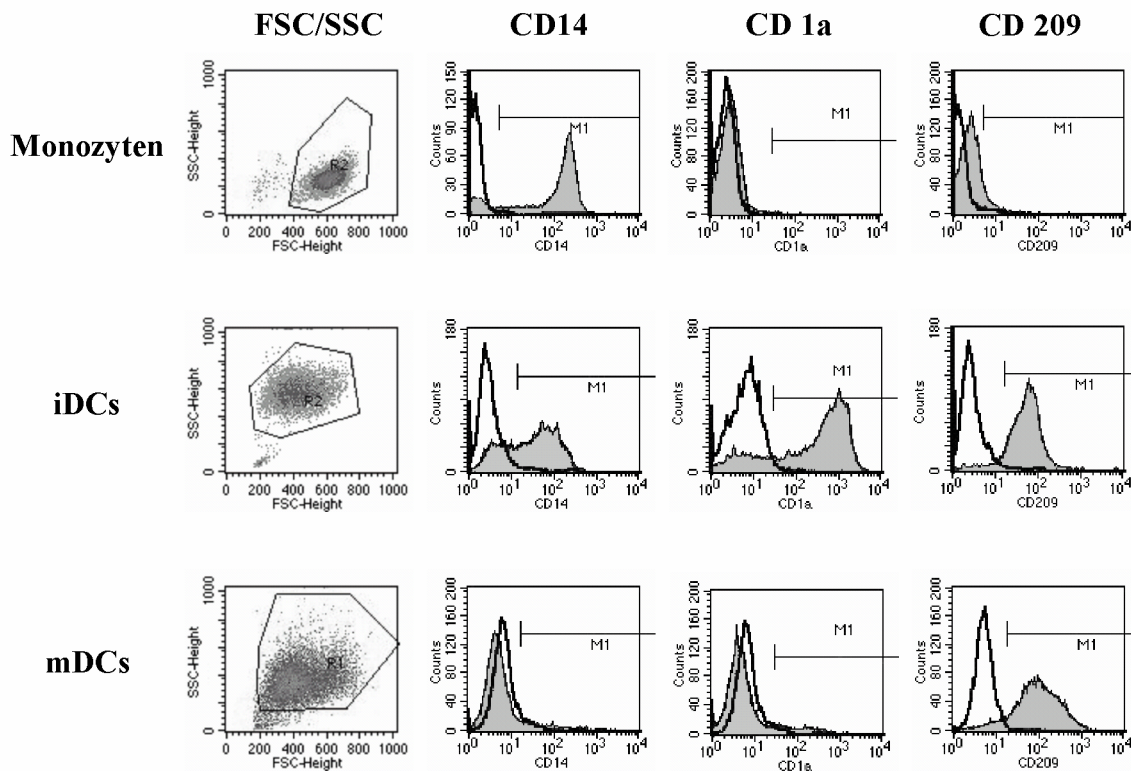


Abb. 58: Typisches Muster der Expression von Oberflächenmarkern bei Monozyten, unreifen dendritischen Zellen (iDCs) und reifen DC (mDCs), mit denen die Bildung von DCs nachgewiesen werden kann.

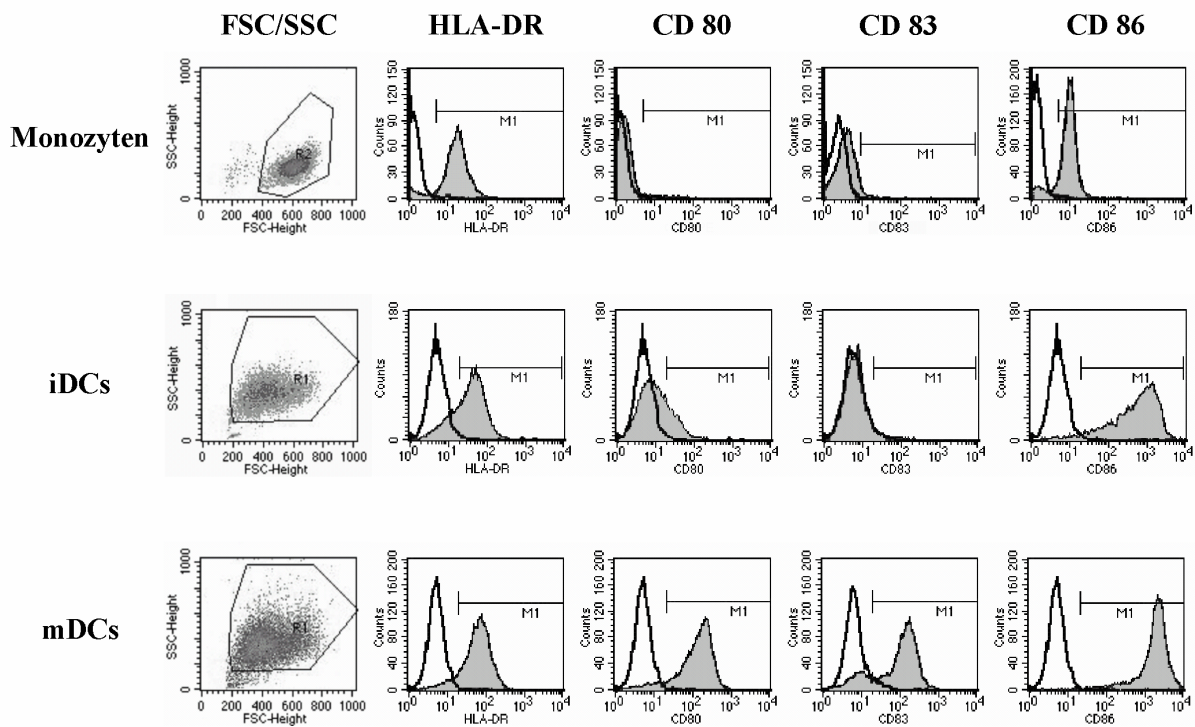


Abb. 59: Typisches Muster der Expression von Oberflächenmarkern bei Monozyten, unreifen dendritischen Zellen (iDCs) und reifen DCs (mDCs), die zur Charakterisierung der Reifung verwendet wurden.

als costimulatorische Moleküle (Signal 2, vgl. Abschnitt 1.6) zusammen mit bestimmten Zytokinen (Signal 3) die Aktivierung von T-Zellen induzieren können. CD 83 kann als Reifungsmarker verwendet werden, da es auf mDCs, nicht aber auf Monozyten oder iDCs gefunden wird. In folgenden Experimenten wurde die Expression dieser Marker zur Bewertung des Reifungsstadiums von DCs nach Mikropartikel-Phagozytose herangezogen (Abschnitt 3.5.3).

3.5.2 Phagozytosestudien

Überprüfung der intrazellulären Lokalisation

Wie in Abschnitt 3.5.1 gezeigt wurde, besitzen Monozyten und iDCs gleichermaßen eine ausgeprägte Fähigkeit zur Endozytose. Monozyten sind jedoch einfacher, schneller und preiswerter verfügbar und die mit ihnen erzielten Daten zur Partikelaufnahme sind gut auf iDCs übertragbar. Daher wurden Monozyten für die hier beschriebenen Untersuchungen verwendet. In weiteren, hier nicht dargestellten Experimenten konnte unter serumfreien Bedingungen (Ausschluss von Opsonierung und F_c-Rezeptor vermittelter Endozytose) eine vergleichbare Aufnahme der Mikropartikel festgestellt werden. Daher ist anzunehmen, dass die Endozytose auch unter serumhaltigen Bedingungen kaum rezeptorvermittelt ist, sondern durch den partikulären Reiz der Vehikel stimuliert wird. Daher wird im Folgenden der Begriff Phagozytose verwendet.

Neben den FITC-BSA-beladenen Partikeln wurden als Kontrolle unbeladene Mikropartikel mit den Monozyten inkubiert und die Eigenschaften der Zellen mit unbehandelten Monozyten verglichen. Wie Abbildung 60a verdeutlicht, konnten die proteinbeladenen Mikropartikel im Zellexperiment gut visualisiert werden. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme wurde geschlussfolgert, dass die überwiegende Mehrheit der Mikropartikel sich im Inneren der Zellen befindet. Bei sehr wenigen Mikropartikeln ist eine extrazelluläre Lokalisation sichtbar. Da es sich bei der dargestellten Abbildung nicht um eine konfokalmikroskopische Aufnahme handelt, war nicht auszuschließen, dass einzelne, hier intrazellulär erscheinende Partikel tatsächlich nur von oben oder unten an die Zellen adhärirt waren. Das Ausmaß der Adhärenz sollte durch weitere Untersuchungen quantifiziert werden.

Die Phagozytose der Mikropartikel führte nicht zu einer entscheidenden Veränderung der Expression des Monozytenmarkers CD 14 und des MHC-Moleküls HLA-DR (Abb. 60b-

3. Ergebnisse und Diskussion

e, obere Reihe). Die Inkubation der Monozyten mit unbeladenen Mikropartikeln führte erwartungsgemäß nicht zu einer starken Zunahme der FITC-Fluoreszenz der Zellen. Folglich war eine unspezifische Fluoreszenz durch den Vehikel auszuschließen. Hingegen stieg die Zellfluoreszenz nach Inkubation mit proteinbeladenen Mikropartikeln auf 87 % an. Um hierbei den Anteil der adhärenierten von den intrazellulär lokalisierten Mikropartikeln zu unterscheiden, wurde den Zellen in einem parallel durchgeführten Experiment Cytochalasin B zugesetzt. Cytochalasin B hemmt die Zusammenlagerung von Actin und damit die Bildung intakter Mikrofilamente. Dies führt zu einer verminderten Fähigkeit der Zellen, Phagosomen zu bilden (Malawista et al. 1971) und Mikropartikel aufzunehmen. Wie Abbildung 60b-e (untere Reihe) verdeutlicht, konnte mit Cytochalasin D die Zellfluoreszenz stark reduziert werden. Daher wurde geschlussfolgert, dass die Mehrheit der Mikropartikel ins Innere der

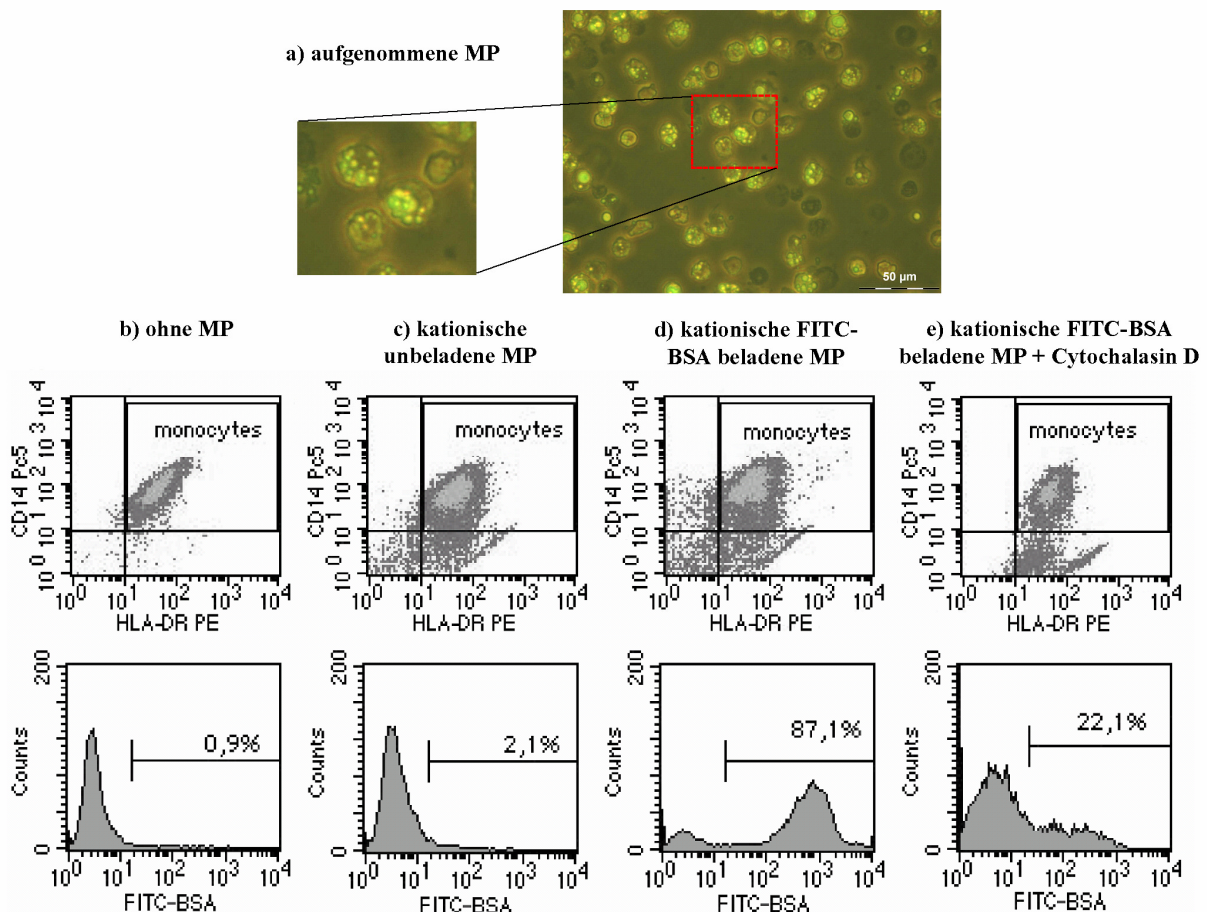


Abb. 60: Phagozytose von DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikeln (MP) durch humane Monozyten. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der intrazellulären Lokalisation der FITC-BSA beladenem MP. (B-E) Obere Reihe: Phagozytose der MP hat keinen Effekt auf die Expression von CD 14 und HLA-DR. Untere Reihe: Aufnahme der FITC-BSA-beladenen Mikropartikel kann durchflusszytometrisch als Zunahme der FITC-Fluoreszenzintensität der Monozyten erfasst werden. Cytochalasin D hemmt die Phagozytose und reduziert damit das FITC-Signal.

Zellen aufgenommen wurde (Wischke et al. 2006b). Damit ist die Messung der FITC-Fluoreszenz der Monozyten im Durchflusszytometer geeignet, um Aussagen über das Ausmaß der Phagozytose zu treffen.

Der Nachweis der intrazellulären Lokalisation der Mikropartikel ist entscheidend für die Bewertung des Ausmaßes der Partikelphagozytose in Abhängigkeit von den Mikropartikeleigenschaften und ihrer Konzentration. Daher wurde zusätzlich zur Fluoreszenzmikroskopie und dem Cytochalasin D-Test als weitere Methode die Färbung mit Trypanblau zur Bestimmung der Mikropartikel-Lokalisation angewandt (Abb. 61 und 62). Der Farbstoff Trypanblau wird üblicherweise zur Bestimmung der Zellvitalität eingesetzt. Er kann intakte Zellmembranen nicht ungehindert durchdringen, dass heißt, die Färbung des Zytoplasmas erfolgt bei lebenden Zellen nur sehr langsam, bei defekten Zellen hingegen sofort. Zusätzlich kann Trypanblau die Fluoreszenz von FITC löschen (Sahlin et al. 1983, Hed et al. 1987), was unter anderem von Thiele et al. 2001 für die Bestimmung des Anteils extrazellulärer Mikropartikel genutzt wurde. Nach Phagozytose von FITC-BSA-beladenen DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikeln wurde die FITC-Fluoreszenz der Zellen durch Zusatz von Trypanblau nicht verändert (Abb. 61a). Hingegen wurde eine starke Abnahme der FITC-Fluoreszenzintensität beobachtet, wenn Zellen mit einem extrazellulären FITC-Labeling (CD 14-FITC-Antikörper) mit Trypanblau versetzt wurden (Abb. 61b). Zusätzlich zur Durchflusszytometrie wurden mikroskopische Untersuchungen (Abb. 62) durchgeführt, die eindeutig die intrazelluläre Lokalisation der Mikropartikel belegen.

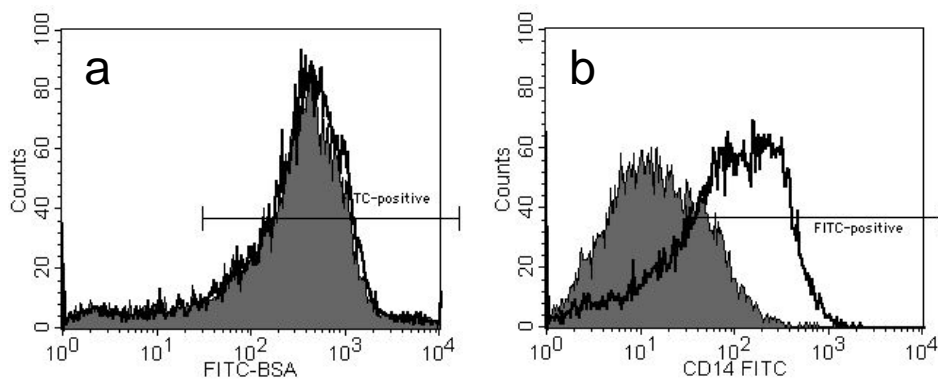


Abb. 61: Trypanblau-Test zur Überprüfung der intrazellulären Lokalisation von DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikeln nach Inkubation mit humanen Monozyten (durchflusszytometrische Untersuchung). (a) Inkubation mit FITC-BSA-beladenen Mikropartikeln führte zu FITC-positiven Zellen. Trypanblau konnte die Fluoreszenzintensität von FITC-BSA nicht reduzieren, da die Partikel intrazellulär vorlagen. (b) CD 14, ein extrazellulärer Monozytenmarker, wurde mit CD 14-FITC-Antikörpern angefärbt. Diese extrazelluläre FITC-Fluoreszenz wurde durch Zusatz von Trypanblau stark reduziert. Schwarze Linien: Proben ohne Trypanblau; grau gefüllte Kurven: Proben mit Trypanblau.

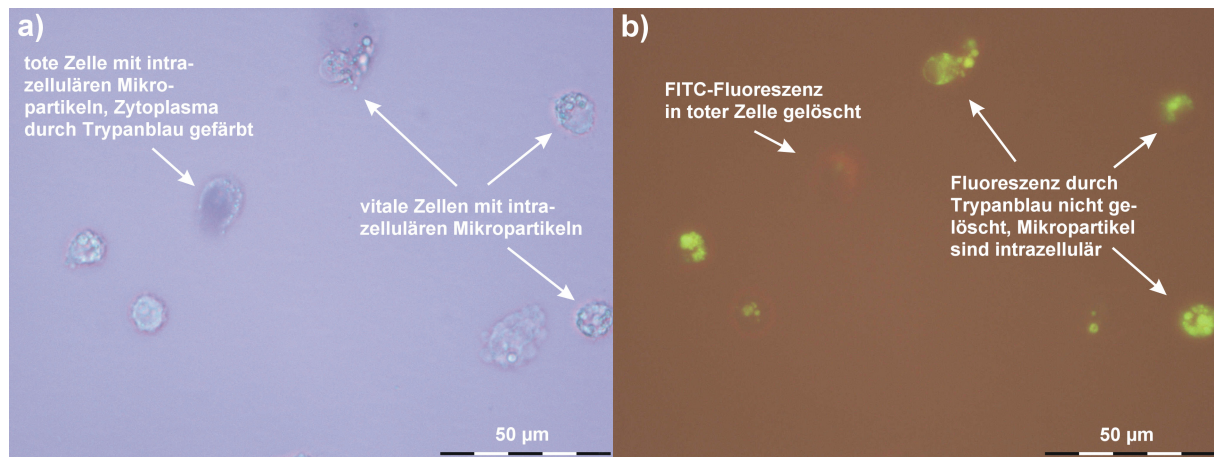


Abb. 62: Trypanblau-Färbung von Monozyten nach Phagozytose von FITC-BSA-beladenen DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikeln. (a) Lichtmikroskopische und (b) fluoreszenzmikroskopische Aufnahme.

Ausmaß der Phagozytose in Abhängigkeit von den Mikropartikeleigenschaften und ihrer Konzentration

Zellen besitzen aufgrund des Aufbaus ihrer Zellmembran aus Phospholipiden eine negative Oberflächenladung. Um die Wechselwirkung von Arzneistoffträgersystemen mit biologischen Oberflächen zu verstärken, wurde in der Literatur eine kationische Aufladung von Vehikeln realisiert. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde ebenfalls eine Oberflächenmodifizierung der Mikropartikel durchgeführt, wobei Chitosan und DEAE-Dextran als kationische Stabilisatoren verwendet wurden. Die als Maß für die Oberflächenladung bestimmte elektrophoretische Mobilität der Mikropartikel ergab bei physiologischem pH-Wert für die DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikel eine positive Ladung. Hingegen waren die Chitosan-ummantelten Mikropartikel bei physiologischem pH-Wert aufgrund des niedrigeren pK_a -Wertes nicht kationisch. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass neben der Partikelladung weitere Faktoren einen Einfluss auf das Ausmaß der Phagozytose haben können. So könnten die zur Oberflächenmodifizierung verwendeten Moleküle unabhängig von ihrer Ladung die Erkennung der Partikel durch Phagozyten verändern. Ein weiterer Aspekt ist die Benetzbarkeit und das Resuspendierungsverhalten der lyophilisierten Mikropartikel, da nur die einzeln vorliegenden, nicht aggregierten Mikropartikel die optimale Teilchengröße für die Phagozytose aufweisen.

Abbildung 63 zeigt die Abhängigkeit der Phagozytose von der zugesetzten Partikelkonzentration für anionische PVA-stabilisierte Mikropartikel sowie für Chitosan- und DEAE-Dextran-modifizierte Teilchen. Mit zunehmender Partikelkonzentration konnten die

PVA-stabilisierten Vehikel das fluoreszierende Modellprotein in bis zu 90 % der Zellen einschleusen. Für die DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikel konnte bei niedriger und mittlerer Teilchenkonzentration eine verstärkte Phagozytose festgestellt werden. Dies kann mit ihren Oberflächeneigenschaften inklusive der kationischen Ladung erklärt werden, aufgrund derer die DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikel intensiver mit der Zelloberfläche wechselwirken konnten (Wischke et al. 2006b). Die Chitosan-modifizierten Mikropartikel zeigten hingegen eine geringere Aufnahme als die PVA-stabilisierten Teilchen. Dieser Effekt kann nicht auf die fehlende positive Partikelladung bei physiologischem pH-Wert zurückgeführt werden, da rein PVA-stabilisierte PLGA-Mikropartikel üblicherweise eine vergleichbare anionische Ladung aufweisen. Vielmehr wurde angenommen, dass die nach der Lyophilisation beobachtete schlechte Benetzbarkeit der Proben zu einem erhöhten Anteil aggregierter Teilchen führte. Diese Aggregate könnten die kritische Größe für die Phagozytose überschreiten. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass Chitosan unabhängig von seiner Ladung zu einer verminderten Erkennung der Mikropartikel durch die Phagozyten führte.

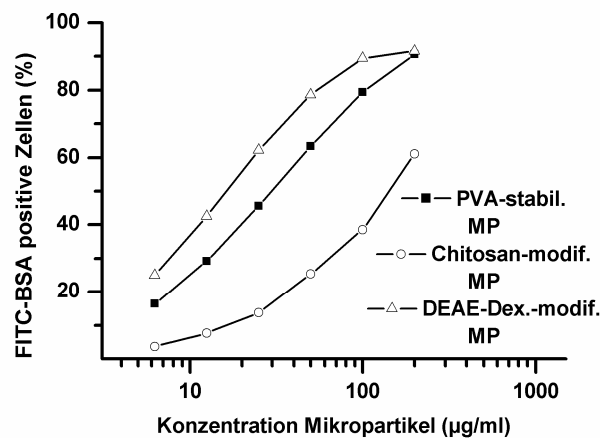


Abb. 63: Ausmaß der Mikropartikel-Phagozytose durch humane Monozyten in Abhängigkeit von der Konzentration und den Oberflächeneigenschaften der Mikropartikel (MP) [durchflusszytometrische Bestimmung nach 18 h Inkubation; dargestellt wurden die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes von insgesamt 4 Versuchen mit gleichen Resultaten].

Vitalität in Abhängigkeit von den Mikropartikeleigenschaften und ihrer Konzentration

Wie in Abschnitt 3.4 angegeben, besitzt PVA eine sehr geringe Zytotoxizität. Hingegen waren Chitosan und DEAE-Dextran schon bei geringen Konzentrationen toxisch. Durch die Waschschriffe im Herstellungsprozess der Mikropartikel konnte der Restgehalt der genannten

3. Ergebnisse und Diskussion

Hilfsstoffe im Suspensionsmedium um mindestens eine Zehnerpotenz unter diesen Wert abgesenkt werden. In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass die auf der Partikeloberfläche verankerten Moleküle von Chitosan und DEAE-Dextran methodisch nicht erfassbar waren. Es ist anzunehmen, dass diese Partikel-gebundenen Moleküle während des Prozesses der Phagozytose viel intensiver mit den Zellen in Wechselwirkung treten können, als dies bei Stabilisatormolekülen der Fall ist, die gelöst aus der Mikropartikelsuspension ins Zellkulturmedium eingetragen werden. Daher sind die in Abschnitt 3.4 beschriebenen Überlegungen nur ein Indiz, nicht aber ein Beweis für das Fehlen toxischer Effekte bei Chitosan- bzw. DEAE-Dextran-modifizierten Mikropartikeln.

Die Ergebnisse der Vitalitätsprüfung nach Inkubation von Monozyten mit verschiedenen Konzentrationen von Mikropartikeln unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheit sind in Abbildung 64 dargestellt. In der Mehrheit der Experimente konnte unabhängig von den verwendeten Stabilisatoren keine deutliche Toxizität der proteinbeladenen Mikropartikel festgestellt werden (Abb. 64a). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass neben den Mikropartikeln auch andere, spenderabhängige Faktoren einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen haben können. In Ausnahmen könnte schlimmstenfalls die in Abbildung 64b gezeigte Abhängigkeit der Vitalität von der Mikropartikelkonzentration auftreten. In zukünftigen Studien könnte als optimale Mikropartikelkonzentration 25 µg/ml verwendet werden, da selbst im ungünstigsten Fall noch vertretbare Vitalitäten zu erwarten sind. Wie oben gezeigt, waren bei einer Konzentration von 25 µg Mikropartikel/ml Zellkulturmedium die DEAE-Dextran-modifizierten den PVA-stabilisierten Partikeln hinsichtlich des Ausmaßes der Phagozytose und damit auch des Protein-Targetings in die Zellen überlegen.

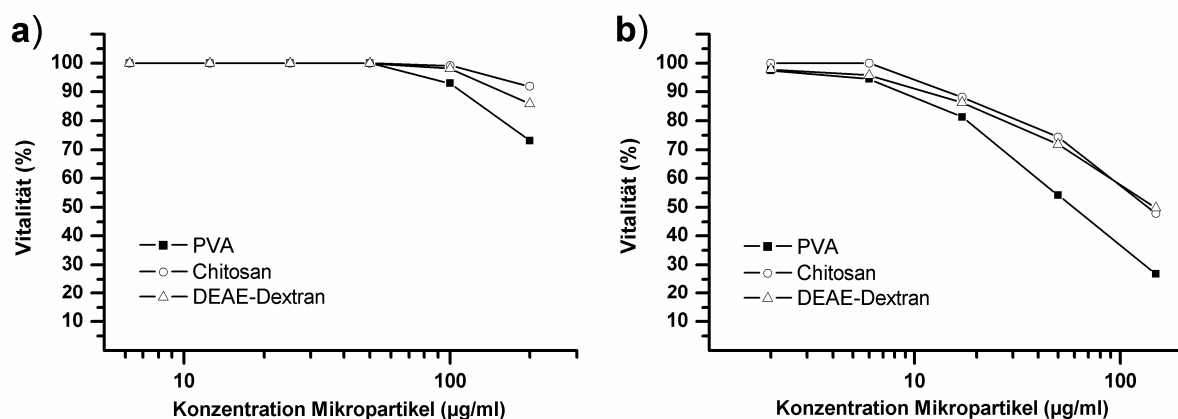


Abb. 64: Vitalität von Monozyten in Abhängigkeit von der Konzentration zugesetzter PVA-stabilisierter und Chitosan- bzw. DEAE-Dextran-modifizierter Mikropartikel. (a) Im Regelfall auftretende Vitalitätskurven. (b) Worst-case-Szenario. (Durchflusszytometrische Bestimmung nach 20 h Inkubation; Angabe in % bezogen auf die Vitalität der unbehandelten Kontrolle.)

3.5.3 Einfluss von PLGA-Mikropartikeln auf den Phänotyp dendritischer Zellen

Die Differenzierung unreifer dendritischer Zellen (iDCs) zu reifen DCs (mDCs) ist eine essentielle Voraussetzung für die Aktivierung naiver T-Zellen durch die DCs. Für das in Abschnitt 1.7 beschriebene Konzept einer immunologischen Tumorthherapie mit dendritischen Zellen ist es daher wünschenswert, dem Patienten mDCs zu applizieren. Die Oberflächenmarker CD 80, CD 83 und CD 86 sind geeignet, den Phänotyp der aus Monozyten gewonnenen DCs analytisch zu erfassen, da sie infolge der Reifung vermehrt exprimiert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten proteinbeladenen Mikropartikel konnten, wie oben gezeigt wurde, in phagozytierende Zellen eingeschleust werden. Zur Verkapselung wurde statt eines starken Antigens ein fluoreszenzmarkiertes Modellprotein (FITC-BSA) ausgewählt, da so die PLGA-Mikropartikel als Trägersystem hinsichtlich ihrer Effekte auf humane DCs untersucht werden konnten. Es sollte geklärt werden, ob die Phagozytose der Vehikel selbst eine Reifung auslöst und inwiefern die Oberflächenbeschaffenheit der Teilchen zu Veränderungen in der Expression von costimulatorischen Molekülen oder Reifungsmarkern führt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 65 dargestellt. Das Vorliegen von DCs wurde durch die Expression von CD 209, einem DC-spezifischen Lectin (DC-SIGN, DC-specific intercellular adhesion molecule 3 [ICAM-3]-grabbing nonintegrin) nachgewiesen. Die Aufnahme der Mikropartikel in die Zellen konnte als Zunahme der FITC-Fluoreszenzintensität der DCs dargestellt werden (Abb. 65, linke Spalte). Verglichen mit den unbehandelten iDCs, führte die Phagozytose von Mikropartikeln nicht zu einer Veränderung der Expression der costimulatorischen Moleküle CD 80 und CD 86, des Reifungsmarkers CD 83 sowie von HLA-DR, einem MHC II-Molekül. Hingegen konnten nach Zusatz eines Zytokin-Cocktails (Jonuleit et al. 1997) eine vollständige Ausreifung Mikropartikel-freier iDC-Kulturen zu mDCs erzielt werden. Somit wurde geschlossen, dass PLGA-Mikropartikel in Abwesenheit von Endotoxinen und starken Antigenen selbst keine Reifung von DCs auslösen (Wischke et al. 2004). Weiterhin wurde festgestellt, dass die unterschiedliche Beschaffenheit der Partikeloberflächen (PVA-stabilisiert, Chitosan- bzw. DEAE-Dextran-modifiziert) nicht zu einer Veränderung der Expression einzelner Reifungs-assoziiierter Marker führte (Wischke et al. 2006b).

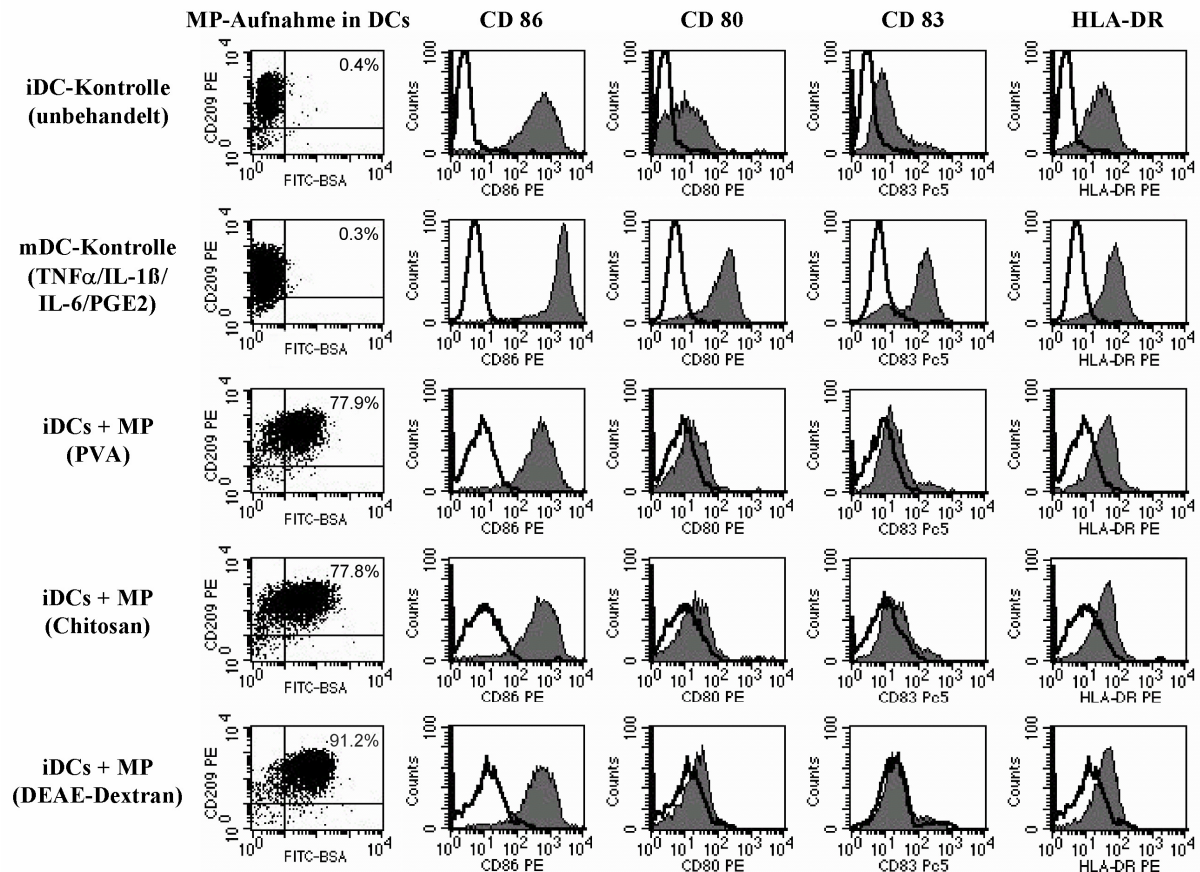


Abb. 65: Einfluss der Phagozytose von Mikropartikeln (MP) auf die Eigenschaften humaner dendritischer Zellen (DCs). Das Vorliegen von DCs wurde durch CD 209 und die Aufnahme der MP durch die Rechtsverschiebung des FITC-Signals nachgewiesen (linke Spalte). Die Mikropartikelphagozytose durch unreife DCs (iDCs) veränderte die Expression der Oberflächenmarker CD 86, CD 80, CD 83 und HLA-DR nicht und es wurde keine Differenzierung zu reifen DCs (mDCs) induziert. Grau gefüllte Kurven: gefärbte DCs; schwarze Kurven: Isotypenkontrolle. (Daten aus Parallelkulturen; die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes von insgesamt 3 Versuchen mit gleichen Resultaten wurden dargestellt.)

In weiteren Versuchen konnte durch den Zusatz des Zytokin-Cocktails gezeigt werden, dass die Phagozytose von Mikropartikeln die Reifung der DCs auch nicht verhindert. Wesentlich umfangreicher wurde dies von Waeckerle-Men et al. 2004 untersucht, die eine volle Funktionalität der reifen dendritischen Zellen nach Phagozytose von PLGA-Mikropartikeln nachweisen konnten.

Parallel zu den eigenen Arbeiten wurde auch von anderen Gruppen der Einfluss der Mikropartikel-Phagozytose auf den Phänotyp dendritischer Zellen studiert. Thiele et al. 2001 untersuchten Polyesterol-Partikel unterschiedlicher Größe hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Expression von CD 83. Während 1 μm große Partikel keinerlei Effekt zeigten, wurde für 4,5 μm große Teilchen ein leichter Anstieg von CD 83 beobachtet. Wurden die Partikel mit

kationischem Polylysin ummantelt, so war bei beiden Partikelgrößen eine stärkere Expression von CD 83 zu sehen, die jedoch deutlich unter dem Level von mDCs lag. Yoshida und Babensee 2004 beschrieben anionische PLGA-Mikropartikel als DC-Reifungsstimulus. Die genaue Betrachtung der von Yoshida und Babensee dargestellten durchflusszytometrischer Untersuchungen zeigt jedoch nur für CD 86 einen deutlichen Anstieg, während die anderen reifungsassoziierten Marker, z. B. CD 83 weitestgehend unverändert blieben. Jilek et al. 2004 verglichen anionische PLGA-Mikropartikel mit Polyethylenimin-modifizierten kationischen PLGA-Partikeln hinsichtlich der Expression von CD 83 und CD 86. Hierbei wurde für anionische Partikel eine Verstärkung von CD 83 und für kationische Vehikel eine Erhöhung von CD 86 gefunden, die jedoch unter dem Level LPS-stimulierter mDCs blieb. Zusammenfassend ist zu schlussfolgern, dass die in den drei Publikationen beschriebenen Zellen semimaturierte DCs darstellen. Auffällig ist, dass jeweils unterschiedliche Marker vermehrt exprimiert wurden und sich die Arbeiten damit widersprechen.

Wie in Abbildung 65 dargestellt wurde, konnten in den eigenen Arbeiten keine Vehikeleffekte der PLGA-Mikropartikel auf den Phänotyp der DCs festgestellt werden (Wischke et al. 2004, Wischke et al. 2006b). Auch hinsichtlich der Expression einzelner Marker bestand kein Unterschied zwischen anionischen PVA-stabilisierten Mikropartikeln und den kationischen DEAE-Dextran-modifizierten Teilchen. Für anionische PLGA-Mikropartikel wurden diese Ergebnisse von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt, die ebenfalls an der Verbesserung DC-basierter Zelltherapien arbeitet (Waeckerle-Men et al. 2004). Für kationische Mikropartikel wurde von derselben Arbeitsgruppe das gleiche Ergebnis erzielt und soll in Kürze publiziert werden.

Ein möglicher Grund für das Auftreten von semimaturierten DCs in den oben genannten Untersuchungen ist eine Kontamination der Mikropartikel mit Endotoxinen. Es ist zu erwarten, dass während des Herstellungsprozesses vorhandene Endotoxine an die Teilchenoberfläche adhären, auch wenn dies nach Wissen des Autors für PLGA bisher nicht systematisch untersucht wurde. Außerdem ist bekannt, dass gelöste Endotoxine nach Zusatz zu iDCs deren Reifung induzieren. Es ist anzunehmen, dass auf Partikeloberflächen gebundene Endotoxine während der Phagozytose viel intensiver mit dem entsprechenden Rezeptor (TLR 4) der DCs wechselwirken und so möglicherweise ein Reifungssignal darstellen können, während die gleiche Konzentration von gelöstem Endotoxin dies nicht vermag. Daher wird angenommen, dass sehr geringe Konzentrationen von oberflächen-gebundenen Endotoxinen in den oben genannten Studien zur vermehrten Expression einzelner Marker führten (vgl. Abschnitt 3.4.2).

PLGA-Mikropartikel können verkapselte Proteine effektiv in dendritische Zellen einschleusen. Dies führt nicht zu einer Abnahme der Zellvitalität und löst per se keine Reifung aus. Bei Vorhandensein eines Reifungsstimulus, z. B. durch Zugabe entsprechender Zytokine, können die iDCs zu voll funktionsfähigen mDCs differenzieren. Zusammenfassend ist festzustellen, dass PLGA-Mikropartikel nach dem derzeitigen Wissensstand ein sicheres Trägersystem für das Zelltargeting darstellen. Aufgrund des Fehlens eines Vehikeffektes sind sie geeignet, den Einfluss von verkapselten Antigenen auf das komplexe biologische Verhalten von DCs zu studieren. Die in dieser Arbeit durchgeführte systematische Untersuchung des Vehikels stellt die Basis für zukünftige Vakzinierungsstudien mit tumorspezifischen oder anderweitig krankheitsspezifischen, mikroverkapselten Antigenen dar.

Erste Daten aus der Literatur, erzielt mit mikroverkapselten Modellantigenen, waren durchaus viel versprechend. Zimmermann et al. 2003 beschrieben in einem kurzen Abstract erstmals den Effekt von Tetanustoxoid-haltigen Mikropartikeln auf die Expression von Oberflächenmarkern von humanen DCs und die Richtung der nachgeschalteten T-Zell-Antwort. Zimmermann zeigte *in vitro* eine verstärkte und verlängerte Antigenpräsentation gegenüber den T-Zellen und deren Modulation in Richtung des für die Tumorthherapie gewünschten T_H1-Weges. Die verwendeten Mikropartikel, deren Herstellungsgang sowie der Vehikeffekt wurden von Zimmermann nicht umfassend untersucht und stellten den Ausgangspunkt für die eigenen Arbeiten dar. Die Ergebnisse von Zimmermann konnten kürzlich unter anderem für Tetanustoxoid bestätigt werden (Waeckerle-Men und Groettrup 2005, Waeckerle-Men et al. 2006). Dies bestätigt die Vermutung, dass PLGA-Mikropartikel als Antigenträgersystem zur Verbesserung der DC-basierten Tumorthherapie führen könnten.

3.6 FITC-BSA als Modellprotein in der Mikroverkapselung

Proteinarzneistoffe gewinnen in der Therapie von meist immunologischen Erkrankungen (z. B. Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis) ständig an Bedeutung. Oft müssen sie jedoch mehrfach pro Woche parenteral angewendet werden. Um eine Reduzierung der Applikationsfrequenz zu ermöglichen, wurden im letzten Jahrzehnt biodegradable Mikropartikel als Trägersystem nicht nur für konventionelle Arzneistoffe, sondern verstärkt auch für Proteine erforscht. Es existiert eine Vielzahl von Literaturbeschreibungen zur Mikroverkapselung von therapeutischen Proteinen und Modellsubstanzen. Üblicherweise wurden Modellproteine ausgewählt, um die Eigenschaften des Matrixpolymers und die Stabilität der verkapselten Proteine zu untersuchen (Conway und Alpar 1996, Mäder et al. 1998, Sah 1999, Castellanos et al. 2001, Jiang et al. 2002, Li und Schwendeman 2005, Bilati et al. 2005a). In den seltensten Fällen handelte es sich hierbei um fluoreszenzmarkierte Modellproteine. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich die Fluoreszenzmarkierung von Modellproteinen eignet, um (1) die Lokalisierung des Proteins im Mikropartikel, (2) die Detektion der Mikropartikel in der Zellkultur und (3) die hochempfindliche Quantifizierung des Proteins im Freisetzungstest zu ermöglichen.

Fluoreszenzmarkierte Proteine, wie beispielsweise fluoreszenzmarkierte Antikörper für die Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie, werden in vielfältiger Form in der Forschung auf dem Gebiet der Lebenswissenschaften eingesetzt. Es gibt eine Vielzahl von geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen (Haughland 1996 und 2002), aber der am häufigsten eingesetzte Fluorophor zur Markierung von Proteinen ist Fluorescein. Mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC) markierte Formen von Antikörpern und anderen Proteinen können von kommerziellen Herstellern bezogen werden und tragen eine Vielzahl von Fluorophormolekülen pro Proteinmolekül (F/P-Verhältnis).

3.6.1 Analytische Möglichkeiten bei Verwendung fluoreszenzmarkierter Proteine

Die kovalente Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen an Proteine ermöglicht über die Visualisierung des Markers Aussagen zur Lokalisation der Proteine. Wie bereits zuvor

dargestellt wurde (Abb. 34, 43), konnte so durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) die Verteilung von FITC-BSA in PLGA-Mikropartikeln untersucht werden. Die beobachtete Proteinverteilung ermöglichte in Übereinstimmung mit der Rasterelektronenmikroskopie grundsätzliche Erkenntnisse zur Ultrastruktur der Mikropartikel und die Unterscheidung von Mikrokapseln und Mikrosphärulen (Wischke und Borchert 2005 und 2006a). Darüber hinaus konnten anhand der konfokalmikroskopischen Aufnahmen Rückschlüsse auf die Effizienz der Primäremulgierung gezogen werden, die durch Messung der W_1 -Tröpfchengröße bestätigt wurden. Weiterhin wurden Prognosen zum Freisetzungverhalten des Proteins aus dem Mikropartikel getroffen, die in entsprechenden Untersuchungen ebenfalls nachvollziehbar waren. Damit erweisen sich fluoreszenzmarkierte Proteine im besonderen Maße als geeignet, um mit nur einer analytischen Methode (CLSM) Hinweise auf mehrere typische Charakteristika der Mikropartikel zu erhalten.

Während mit der CLSM optische Schnitte der Mikropartikel und die Lokalisation des fluoreszenzmarkierten Proteins in deren Innerem betrachtet werden können, erscheinen die FITC-BSA-beladenen Partikel im konventionellen Fluoreszenzmikroskop als homogen leuchtende Teilchen. Anhand der Fluoreszenz der Partikel konnte ihre Aufnahme in Phagozyten beobachtet werden (Abb. 31, 60, 62). Durch Löschung der extrazellulären FITC-Fluoreszenz mit Trypanblau wurde zweifelsfrei der Nachweis erbracht, dass sich die proteinbeladenen Partikel im Inneren der Zellen befanden.

Die FITC-Markierung des Proteins ermöglichte weiterhin die Verwendung der Durchflusszytometrie zur Charakterisierung der Mikropartikel sowie der mit ihnen inkubierten Zellen. So konnte qualitativ die Beladung der Mikropartikel in Abhängigkeit von ihrer Teilchengröße untersucht werden (Abb. 29). Des Weiteren wurde der Einfluss der Partikelgröße (Abb. 30) und der Oberflächeneigenschaften der Mikropartikel (Abb. 63) auf das Ausmaß der Phagozytose analysiert.

Wie verdeutlicht wurde, stellen fluoreszenzmarkierte Proteine in der Mikroverkapselung gut geeignete Modellsubstanzen dar, wenn bildgebende Messverfahren (CLSM, Fluoreszenzmikroskop) angewendet werden sollen. Bei der Durchflusszytometrie werden für jede Zelle Fluoreszenzintensitäten bestimmt und aufaddiert. Um sichere quantitative Aussagen unter Ausschluss von Dequenching-Phänomenen treffen zu können, sollten hierbei nur parallel gehandhabte Proben untereinander verglichen werden (s. Abschnitt 3.6.2 und 3.6.3).

3.6.2 FITC-Markierung zur Quantifizierung von BSA unter Bedingungen des Freisetzungstests

Freisetzungsstudien

In Abbildung 35 wurde dargestellt, dass die fluorimetrische Quantifizierung von FITC-BSA in Proben aus Freisetzungstests unrealistische Kurven mit Werten deutlich über 100 % ergab. Hingegen konnten mit einem Silber-Dithizon-Assay und einem ELISA, also Methoden die das Protein und nicht den Fluorophor erfassen, realistische Profile bestimmt werden (Abb. 37).

FITC-BSA wurde bereits zuvor gelegentlich bei der Mikroverkapselung genutzt (Cohen et al. 1991, Frangione-Beebe et al. 2001, Fu et al. 2003, Bilati et al. 2005b), ohne dass die Gründe für die Wahl des fluoreszenzmarkierten Proteins von den Autoren genannt wurden. Auffällig ist, dass in allen Publikationen statt der empfindlicheren Fluorimetrie ein Proteinassay oder die Absorption des Fluorophors zur Quantifizierung herangezogen wurden. Dies könnte in einer fehlenden Ausstattung mit einem Fluorimeter begründet sein. Viel wahrscheinlicher ist jedoch, dass das in der Literatur beschriebene Vorgehen auch auf den in dieser Arbeit beobachteten Schwierigkeiten bei der Quantifizierung von FITC-BSA in Freisetzungsprouben beruht.

Fluorimetrische Untersuchungen an FITC-BSA Standardlösungen

Die Auswertung der für die Freisetzungsprouben ermittelten fluorimetrischen Rohdaten erfolgte mithilfe einer zuvor bestimmten Kalibrierfunktion (Abb. 25). Diese ergab sich aus den Mittelwerten von unabhängigen Bestimmungen, bei denen jeweils frisch hergestellte und bei Raumtemperatur gehandhabte Lösungen von FITC-BSA in 10 mM Tris-Puffer verwendet wurden. Während des Freisetzungstests war FITC-BSA jedoch einer Temperatur von 37 °C ausgesetzt. Daher musste überprüft werden, ob die Lagerung bei 37 °C zu Veränderungen des Proteins führte. Hierfür wurden Aliquote einer Verdünnungsreihe von FITC-BSA hergestellt und ihre Fluoreszenzintensität ohne Inkubation bzw. nach bis zu 56 Tagen Lagerung bei 37 °C bestimmt. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität der Proben (Abb. 66a). Beispielsweise betrug die Fluoreszenzintensität von 0,5 µg/ml FITC-BSA nach

3. Ergebnisse und Diskussion

56 Tagen mehr als das 8fache von Tag 0. Es wurde geschlussfolgert, dass vermutlich strukturelle Veränderungen im FITC-BSA die Ursache für das beobachtete Phänomen darstellen (Wischke und Borchert 2006b).

Im Folgenden wurde überprüft, ob an die in Abbildung 66a dargestellten Messwerte tagesspezifische Kalibrierfunktionen angepasst werden können, mit denen im nächsten Schritt die Konzentrationen unabhängiger Standardlösungen berechnet werden sollten. Abbildung 66b zeigt, dass sich mit der Standardkalibrierfunktion rechnerisch eine stark erhöhte Konzentration von FITC-BSA ergab. Bei Verwendung der tagesspezifischen Kalibrierfunktion war die Überbestimmung weniger stark ausgeprägt, jedoch wurden auch hier zu hohe Werte ermittelt. Dies konnte mit einer Abnahme der Linearität der Kurven bei steigender Inkubationszeit erklärt werden, weshalb nur eine suboptimale Kurvenanpassung möglich war. Daher wurde die Fluorimetrie zur Quantifizierung von FITC-BSA in Freisetzungspuren als ungeeignet eingestuft und stattdessen der Silber-Dithizon-Assay und ein ELISA verwendet (Wischke und Borchert 2006b).

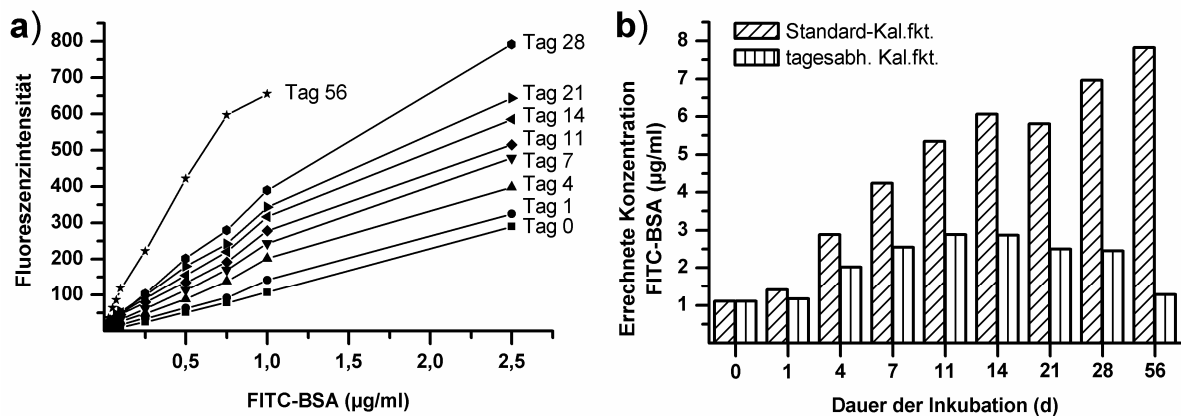


Abb. 66: Einfluss der Inkubationsdauer von FITC-BSA bei 37 °C auf seine Fluoreszenz. (a) Fluoreszenzintensität einer Verdünnungsreihe von FITC-BSA, deren Aliquote unterschiedlich lange inkubiert wurden. (b) Aus den Fluoreszenzintensitäten errechnete Konzentrationen eines unabhängigen 1 µg/ml Standards, wobei entweder die Standardkalibrierfunktion (s. Abb. 25) oder eine tagesspezifische Kalibrierfunktion (durch Anpassung an die Kurven in (a) ermittelt) angewendet wurde. (Geräteeinstellung: Emissionsspal 14).

SDS-PAGE

Um ein tiefgründiges Verständnis für die Ursachen des Fluoreszenzanstiegs zu erhalten, wurden weiteren Untersuchungen mit FITC-BSA-Standardlösungen durchgeführt. Hierbei

3. Ergebnisse und Diskussion

wurde eine erhöhte Proteinkonzentration von 100 µg/ml verwendet, damit möglicherweise auftretende Abbauprodukte analytisch zu erfassen waren. Die fluorimetrische Untersuchung zeigte auch bei diesen Proben einen Fluoreszenzanstieg nach der Inkubation bei 37 °C. Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proben aufgetrennt (Abb. 67). Die Lage der Proteinbanden wurde durch die FITC-Fluoreszenz sowie nach der Gelfärbung anhand der Farbstoffeinlagerung bestimmt. BSA besitzt ein Molekulargewicht von 66430 Da (Hirayama et al. 1990), so dass sich nach 10fachem Labelling mit FITC ($M_w = 389$ Da) für das verwendete FITC-BSA rechnerisch ein Molekulargewicht von 70,31 kDa ergibt. Erwartungsgemäß lag die Hauptbande des FITC-BSA in der SDS-PAGE bei etwa 70 kDa. Die zusätzlichen Banden bei höheren Molekulargewichten waren auf Dimere und Oligomere des FITC-BSA zurückzuführen, welche typischerweise in kommerziellem BSA auftreten (Janatova et al. 1968, Folta-Stogniew und Williams 1999, Hunter und Carta 2001). Die Intensität der Oligomer-Banden nahm mit fortschreitender Inkubation zugunsten von FITC-BSA-Monomeren ab. Bei niedrigerem Molekulargewicht waren einige breite Nebenbanden zu beobachten, deren Intensität sich nicht deutlich änderte. Jedoch trat bei ≤ 10 kDa eine neue Bande auf, die im Laufe der Inkubation an Intensität gewann (s. auch Abb. 68).

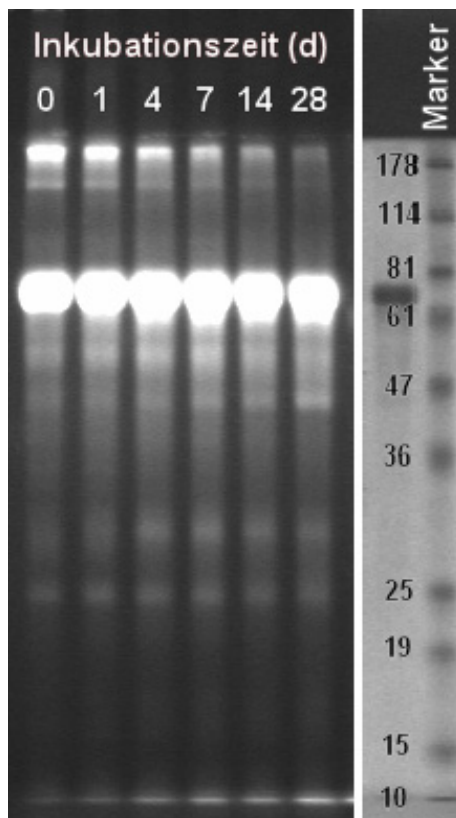


Abb. 67: Einfluss der Inkubation bei 37 °C auf das Muster der Haupt- und Nebenbanden von FITC-BSA (SDS-PAGE).

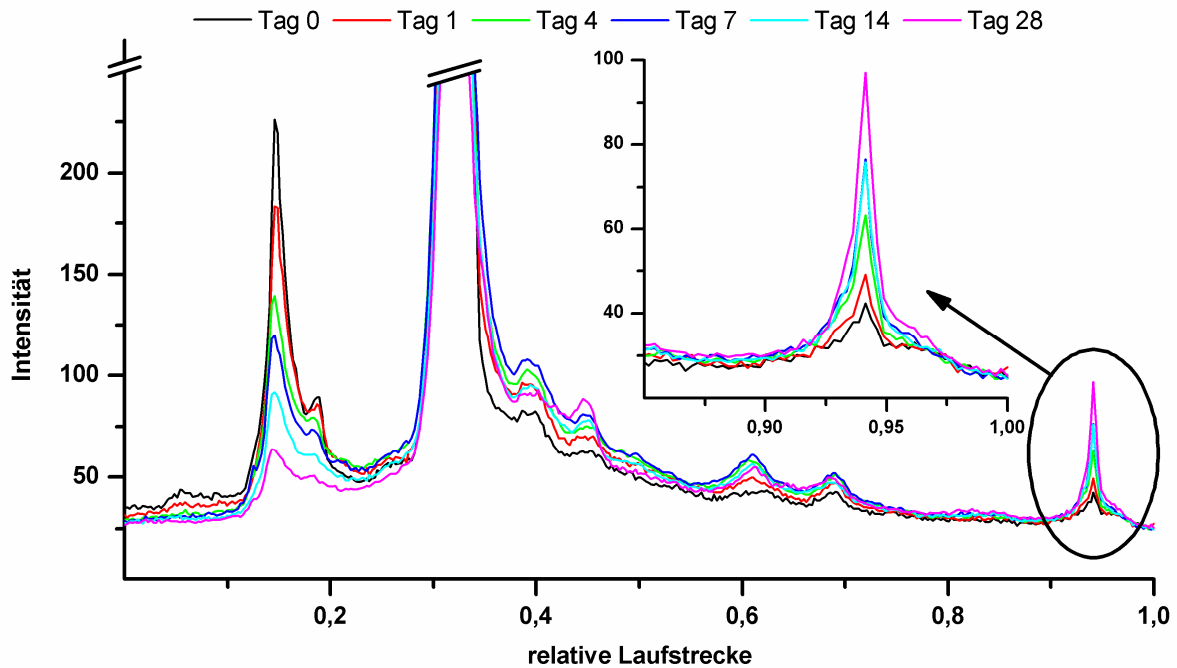


Abb. 68: Intensität der in Abb. 67 (SDS-PAGE) gezeigten Banden. Links: Abnahme der Di- und Oligomere. Rechts und vergrößerter Ausschnitt: Zunahme der Fragmente ≤ 10 kDa.

In Abschnitt 1.5 wurde beschrieben, dass unter physiologischen Bedingungen an Albumine Fettsäuren gebunden sind, die bei nicht speziell entfetteten Albuminen auch nach der Aufreinigung noch vorhanden sind. Die Säurefunktionen könnten pH-abhängig als Protonendonatoren wirken und zu einer Hydrolyse von FITC-BSA beitragen. Um das Auftreten dieses Effektes zu überprüfen, wurde in einzelnen Versuchen der pH-Wert des Tris-Puffers auf 8,0 statt 7,0 eingestellt. Um zu untersuchen, ob das beobachtete Phänomen ursächlich auf die Kopplung von Fluorescein an BSA zurückzuführen ist, wurde in weiteren Experimenten neben FITC-BSA auch das ungekoppelte BSA eingesetzt. In beiden Versuchen konnte analog zu Abbildung 67 eine Abnahme der FITC-BSA-Oligomere und eine Zunahme der Bande ≤ 10 kDa festgestellt werden. Folglich waren weder die Katalyse durch Fettsäuren, noch die Anbindung des FITC die Ursachen für die Veränderungen im FITC-BSA.

Die beschriebenen Experimente wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt, so dass Umsetzungen durch mikrobielle Enzyme ausgeschlossen werden konnten. Wenn aber bereits das bezogene FITC-BSA mit Proteasen verunreinigt wäre, könnte auch dies zu Veränderungen im Protein führen. Daher sollte untersucht werden, welchen Einfluss der Zusatz von Proteaseinhibitoren (Zusammensetzung s. Tab. 11) auf die Lagerstabilität von FITC-BSA besitzt. Mit dem zuerst verwendeten Inhibitor-Cocktail (P 2714) flockte das FITC-BSA innerhalb der ersten Tage aus. Mit den Inhibitor-mischungen Complete Mini mit bzw.

ohne EDTA trat keine Fällung auf, aber in der SDS-PAGE war eine zunehmende Aggregation des Proteins zu Oligomeren zu erkennen. Daher konnte in allen drei Fällen keine Aussage zu der Bande ≤ 10 kDa getroffen werden.

Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die FITC-BSA-Proben wurden zusätzlich mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) untersucht. Um innerhalb einer Messung für jeden Peak zugleich den Gehalt an Protein (UV-Absorption bei 280 nm) und die FITC-Fluoreszenzintensität zu bestimmen, wurde eine Kopplung eines UV- mit einem Fluoreszenzdetektor verwendet. Es muss berücksichtigt werden, dass FITC selbst auch zur Absorption bei 280 nm beiträgt. Dies beeinflusste die Aussagekraft der Untersuchung nicht, da hier die relativen Peakhöhen der Fluoreszenzintensität und UV-Absorption miteinander verglichen wurden und nicht eine Berechnung der absoluten Proteinkonzentration aus der Absorption erfolgte. Die fluorimetrische Quantifizierung der aufgetrennten Proben (Abb. 69a) zeigte links des FITC-BSA-Hauptpeaks eine Schulter, die dem Dimer entsprach und in Analogie zur SDS-PAGE mit zunehmender Inkubationsdauer abnahm. Die Intensität des Hauptpeaks und seiner rechten Schulter, einem ≈ 37 kDa Fragment, nahm zunächst leicht zu. Während die Peakhöhe des monomeren FITC-BSA wieder auf das Ursprungsniveau abfiel, blieb sie für das 37 kDa-Fragment erhöht. Besonders auffällig waren drei Peaks mit höheren Retentionszeiten (also kleinerem

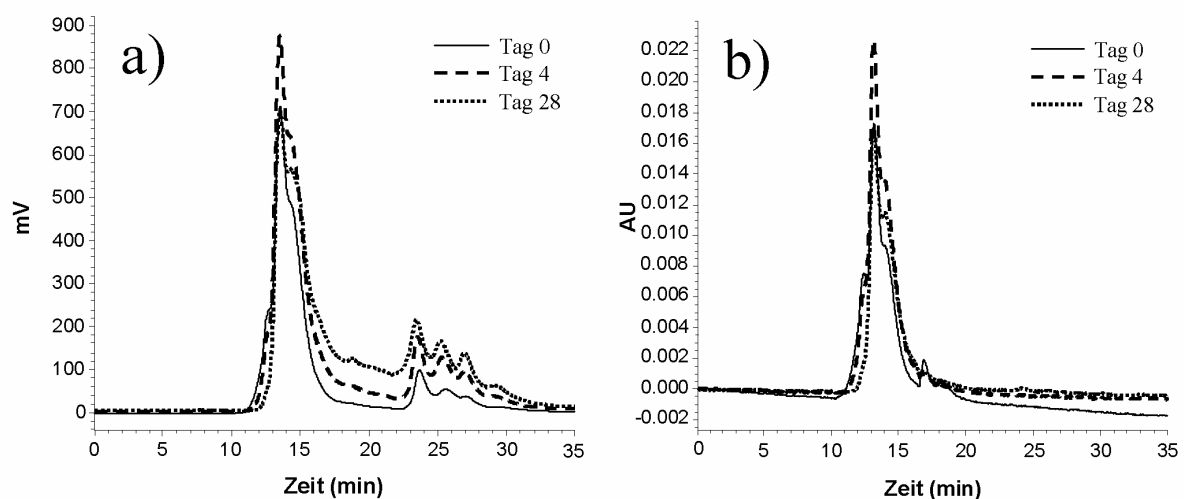


Abb. 69: Größenausschlusschromatographie von FITC-BSA-Standardlösungen, die für 0, 4 oder 28 Tage bei 37 °C gelagert wurden. (a) Fluoreszenzemission, (b) UV-Absorption.

3. Ergebnisse und Diskussion

Molekulargewicht), deren Intensität bei steigender Inkubationszeit stetig zunahm. Durch Extrapolation wurden für diese Fragmente Molekulargewichte von ~ 4700 , ~ 3500 und ~ 2800 Da ermittelt. Die UV-Absorptionsmessung (Abb. 69b) ergab, verglichen mit der Fluorimetrie, nahezu deckungsgleiche Kurvenverläufe für das FITC-BSA-Dimer, das Monomer und das 37 kDa Fragment. Hingegen waren bei 280 nm keine Peaks mit höherer Retentionszeit zu finden. Aus dem Vergleich der Kurvenverläufe der Absorptions- und Fluoreszenzmessung wurde daher entnommen, dass den Fluoreszenzintensitäten der Fragmente < 5 kDa nur eine sehr geringe Protein/FITC-Konzentration (unter der Nachweisgrenze) zuzuordnen ist. Anders ausgedrückt besitzt eine sehr geringe Konzentration an Fragmenten eine sehr hohe Fluoreszenzintensität (Wischke und Borchert 2006b).

Massenspektrometrie (SELDI-TOF)

Um weitere Informationen zu den in der SDS-PAGE (Abb. 67 und 68) sichtbaren Nebenbanden zu erhalten, wurden die FITC-BSA-Proben mittels Massenspektrometrie untersucht (Abb. 70). Die Hauptfraktion lag in Übereinstimmung mit dem errechneten Molekulargewicht bei $m/z = 70370$. Das doppelt geladene Molekül war bei $m/z = 35352$ sichtbar und überlagerte vermutlich das 37 kDa Fragment, das in der SEC beobachtet wurde. Das dreifach geladene Protein ($z = 3$) trat bei $m/z = 23997$ auf. Ein zusätzliches Fragment wurde bei $m/z = 47797$ gefunden. Es wurde angenommen, dass dieses Fragment aus der limitierten Proteolyse des BSA stammt, die bei niedrigem pH stattfinden kann (Wilson und Förster 1971). Hierbei entstehen zwei Fragmente von 21 und 24 kDa vom C-Terminus sowie ein 46 kDa Fragment vom N-Terminus. In Folge der Kopplung des FITC an BSA wurde das Molekulargewicht des N-terminalen Fragments vermutlich verschoben, so dass es dem Peak

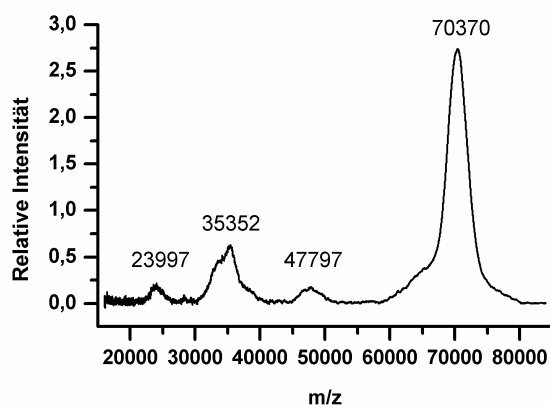


Abb. 70: Massenspektrum von FITC-BSA.

bei $m/z = 47797$ entsprechen könnte. Die beiden C-terminalen Fragmente wurden wahrscheinlich durch FITC-BSA mit $z = 3$ überlagert. Da sich infolge der Inkubation bei 37 °C die Intensität dieser Banden in der SDS-PAGE nicht deutlich änderte, war nicht davon auszugehen, dass sie einen Beitrag zum Fluoreszenzanstieg der Proben leisten (Wischke und Borchert 2006b).

Fluoreszenzlebensdauer und -anisotropie

Aus den Ergebnissen der SDS-PAGE und SEC wurde abgeleitet, dass die Fluoresceinmoleküle an den entstehenden kleinen Proteinfragmenten intensiver fluoreszieren als die an intaktes BSA gebundenen Fluorophore. Diese Annahme sollte durch Untersuchungen zur Fluoreszenzlebensdauer und –anisotropie bestätigt werden. In Abschnitt 1.5 wurde dargelegt, dass Fluoreszenzlicht eine mittlere Lebensdauer τ von bis zu 10 ns besitzt. Je freier sich ein bestimmter Fluorophor bewegen kann, desto größer ist seine Fluoreszenzlebensdauer τ und desto schneller nimmt die Anisotropie ab. Durch Proteinbindung sinkt die Beweglichkeit des Fluorophors und es kann u. a. zusätzlich eine Energieübertragung an Chromophore des Proteins stattfinden. Dies führt zu einer geringeren Fluoreszenzlebensdauer und einem steileren Abfall der Fluoreszenzabklingkurven. Hingegen nimmt die Anisotropie bei Proteinbindung in Abhängigkeit von dessen Molekulargewicht zu.

In Abbildung 71a sind Fluoreszenzabklingkurven für freies Fluorescein sowie für FITC-BSA nach 0 bzw. 28 Tagen Inkubation dargestellt. Es ist zu erkennen, dass das Abklingen bei FITC-BSA infolge der Proteinbindung wesentlich schneller erfolgte, sich durch die Inkubation bei 37 °C über 28 Tage aber deutlich abschwächte. Das kann damit erklärt werden, dass innerhalb der Probe kleine Proteinfragmente auftraten, die sich freier bewegen konnten und bei denen die Emission des Fluoreszenzlichts somit weniger behindert wurde. Die Mischung von FITC-BSA und seiner verschiedenen Fragmente, die jeweils mehrere Fluorophore mit unterschiedlichen Eigenschaften enthalten können, führte dazu, dass die Fluoreszenzabklingkurven des Proteins bei semilogarithmischer Darstellung nicht linear verliefen. Damit waren sie im Gegensatz zu freiem Fluorescein nicht mit einer einzigen e-Funktion und einem τ zu beschreiben. Vielmehr wurde eine Überlagerung von vier Fraktionen bestimmt, die wiederum aus mehreren Komponenten bestehen können. Infolge der Inkubation des FITC-BSA bei 37 °C war eine Zunahme kleiner Fragmente mit hoher Fluoreszenzlebensdauer (und damit anteilmäßig hoher Fluoreszenzintensität) festzustellen (Tab. 25).

3. Ergebnisse und Diskussion

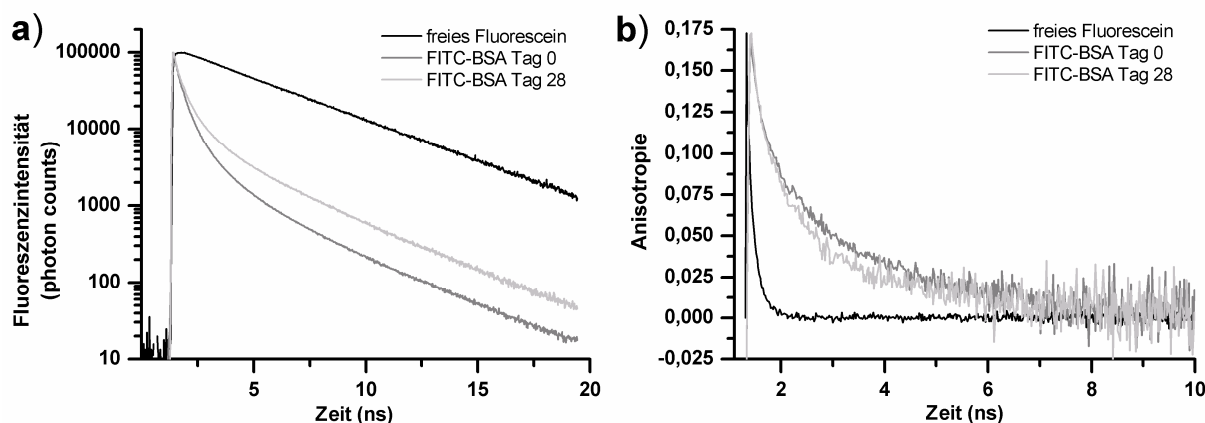


Abb. 71: Untersuchung der Fluoreszenzlebensdauer und –anisotropie von freiem Fluorescein sowie FITC-BSA nach 0 bzw. 28 Tagen Inkubation bei 37 °C. (a) Fluoreszenzabklingkurven, aus denen durch Kurvenanpassung die Fluoreszenzlebensdauer errechnet werden kann. Je größer die Fläche unter der Kurve, desto größer ist die Gesamt-Fluoreszenzintensität der Probe. (b) Anisotropie-Abklingkurven. Je freier sich Fluorescein bzw. FITC drehen kann, d. h. je weniger es durch seine Umgebung (u. a. Größe des gebundenen Proteins) an der Bewegung gehindert wird, desto schneller erfolgt die Depolarisation.

Die Untersuchungen zur Anisotropie (Abb. 71b) zeigten grundsätzlich denselben Effekt. Erwartungsgemäß fiel die Anisotropiekurve bei freiem Fluorescein schnell ab. Die Depolarisation erfolgte bei proteingebundenem FITC insgesamt langsamer, aber im Verhältnis zur Größe des Proteins immer noch sehr schnell. Dies ist vermutlich auf Homotransfer zwischen den FITC-Molekülen zurückzuführen (s. Abschnitt 3.6.3), weshalb anhand der Anisotropie-Abklingkurve nicht die Zeit für die Gesamtdrehung des BSA bzw. seiner Fragmente (Maß für die Molekülgröße) bestimmt werden konnte. Dennoch ist deutlich zu erkennen, dass infolge der Inkubation bei 37 °C (Tag 28 verglichen mit Tag 0) Proteinfragmente entstanden, deren FITC-Moleküle stärker depolarisierten und zu einem beschleunigten Abklingen der Anisotropie führten.

Tab. 25: Mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ für Fluorescein sowie für FITC-BSA (bzw. seine Fraktionen) nach 0 und 28 Tagen Inkubation bei 37 °C.

freies Fluorescein		FITC-BSA Tag 0		FITC-BSA Tag 28	
τ (ns)	Anteil (%)	τ (ns)	Anteil (%)	τ (ns)	Anteil (%)
3,99	100	0,161	68,0	0,179	65,3
		0,482	25,4	0,580	24,9
		1,33	5,2	1,65	6,1
		3,61	1,4	3,74	3,7

Eignung von FITC-BSA als Modellprotein bei fluorimetrischer Quantifizierung

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass während der Inkubation bei 37 °C zwei Hauptprozesse abliefen. Zum einen dissoziierten FITC-BSA-Oligomere zugunsten von Monomeren. Zum anderen erfolgte in einem sehr geringen Umfang eine Degradation des FITC-BSA. Die dabei entstandenen Fragmente < 5 kDa wiesen eine sehr hohe Fluoreszenzintensität auf. Es wurde geschlussfolgert, dass die Bildung dieser Fragmente die Ursache des Fluoreszenzanstiegs darstellte. Hierbei müssen Veränderungen in der Umgebung des proteingebundenen Fluorophors stattfinden. Weiterhin wurde angenommen, dass die Zersetzung des FITC-BSA durch eine sehr langsame, spontane Hydrolyse der Peptidbindungen erfolgt. Eine Degradation durch bereits im Ausgangsmaterial enthaltene Proteasen konnte jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden.

Unabhängig von der Ursache der Hydrolyse musste geschlussfolgert werden, dass das 10fach FITC-gekoppelte BSA nicht geeignet ist, um unter Freisetzungsbedingungen mittels Fluorimetrie quantitative Aussagen zu treffen. Damit wurde durch das verwendete FITC-BSA die in der Einleitung formulierte Erwartung einer zuverlässigen und empfindlicheren Quantifizierung bei Verwendung fluoreszenzmarkierter Proteine nicht erfüllt. Die in Abschnitt 3.6.3 aufgeführte Betrachtung zum Mechanismus des Dequenchings weist auch auf Alternativen in der Fluoreszenzmarkierung hin, mit denen das beschriebene Phänomen möglicherweise umgangen werden kann.

Da in den eingangs erwähnten Publikationen (Cohen et al. 1991, Frangione-Beebe et al. 2001, Fu et al. 2003, Bilati et al. 2005b) ebenfalls FITC-BSA des selben Herstellers als Modellsubstanzen bei der Mikroverkapselung eingesetzt wurden, muss davon ausgegangen werden, dass auch in diesen Untersuchungen die hier beobachteten Phänomene aufgetreten sind. Die Messung der FITC-Absorption (~ 485 nm) statt der Fluoreszenz schützt dabei nicht vor Verfälschungen, da einhergehend mit dem Fluoreszenzanstieg auch die Absorption der Proben zunimmt (allerdings in geringerem Umfang). Vielmehr sollten zur Quantifizierung von 10fach FITC-markiertem BSA Verfahren angewendet werden, die das Protein und nicht den Fluorophor erfassen.

3.6.3 Mechanismus des Dequenching

Theoretische Überlegungen

In Abschnitt 1.5 wurde schematisch dargestellt, wie die kovalente Bindung von FITC an Proteine durchgeführt wird. Bei der Kopplung eines FITC-Moleküls an Biopolymere geht meist 50 % von dessen ursprünglicher Fluoreszenzintensität verloren (Haugland 1996). Da FITC über Lysinreste an das Protein gebunden wird, ist wegen fehlender Doppelbindungen keine Konjugation des Fluorophors mit dem Peptidrückgrat und benachbarten Aminosäuren möglich. Denkbar hingegen ist eine direkte Interaktion mit aromatischen Aminosäuren durch Komplexbildung.

Es wurde bereits erwähnt, dass das verwendete FITC-BSA ein Fluorophor-zu-Protein-Verhältnis (F/P) von 10 besitzt. Auf Nachfrage teilte der Hersteller mit, dass ein sehr hohes F/P wegen der empfindlicheren Detektion wünschenswert sei. In der Literatur wird jedoch das Gegenteil beschrieben. Die Kopplung von F_{ab} -Fragmenten eines Antikörpers mit einem steigendem Anteil von FITC-Markern führte zu einer Abnahme der relativen Fluoreszenz jedes einzelnen Fluorophors. Außerdem erreichte die absolute Fluoreszenz des gesamten Proteins ein Maximum bei $F/P = 4$ und nahm bei steigenden F/P ab (Der-Balian et al. 1988).

In einem mehrfach FITC-gekoppelten Protein befinden sich die Fluorophore nahe beieinander an der Proteinoberfläche. Aufgrund dieser räumlichen Nähe können die FITC-Moleküle nicht-fluoreszierende Dimere bilden, was als Sonderform der Konzentrationslöschung bezeichnet wurde. Die Bildung der Fluorescein-Dimere ist möglich, da die negative Ladung ihrer Carboxylfunktionen mit Hilfe der Exzitationsenergie über das gesamte Molekül verteilt wird. Die resultierenden temporären Dipole werden durch Londonsche Dispersionskräfte angezogen (Förster und König 1957). Bei zunehmender Annäherung der Monomere erfolgt eine Kopplung der Elektronensysteme. Dabei wird der Grundzustand S_0 abgesenkt und es werden stabile Dimere gebildet. Nach der Exzitation unterbleibt infolge der Dimerisierung jedoch die Emission von Fluoreszenzlicht (Förster 1982). Daher fluoreszieren bei mehrfach markiertem BSA nur die monomeren FITC-Moleküle. Da die Dimere weiterhin einen Teil des eingestrahnten Lichts aufnehmen, steht den Monomeren nicht das gesamte Anregungslicht zur Verfügung. Je größer der Anteil der Dimere ist, desto mehr Anregungslicht wird den Monomeren entzogen.

Die Dimerbildung allein reicht quantitativ nicht aus, um das Ausmaß der Löschung zu erklären (Chen und Knutson 1988). Unter Berücksichtigung des von den Monomeren tatsächlich aufgenommenen Anregungslichtes tritt eine zu geringe Fluoreszenzausbeute auf. Folglich muss die von den Monomeren aufgenommene, aber nicht als Fluoreszenz ausgesendete Energie durch einen weiteren Mechanismus gelöscht werden. Als Erklärung wird der Resonanz-Energietransfer (RET) vom strahlungsfähigen Monomer zu anderen Monomeren sowie zum strahlungsunfähigen Dimer herangezogen (Förster und König 1957, Chen und Knutson 1988). Für Fluorescein beträgt der Förster-Abstand, innerhalb dem der RET zu 50 % effizient ist (Lakowicz 1999), 20 bis 42 Å (Kawaski 1983, Chen und Knutson 1988). Da sich bei FITC-BSA die einzelnen FITC-Moleküle nach Bindung an BSA (herzförmige Struktur von 45 x 60 Å) innerhalb des Förster-Abstandes zueinander befinden, ist die Übertragung der Energie durch Homotransfer von Fluorescein zu Fluorescein möglich. Die Energie von 90 % der absorbierten Photonen verlieren die Monomere durch RET zu strahlungslosen Dimeren. Von den verbleibenden 10 % werden 96 % auf andere FITC-Monomere übertragen, die wiederum 90 % dieser Energie auf Dimere übertragen u.s.w. (Chen und Knutson 1988). Verglichen mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen ist bei Fluorescein das Ausmaß des RET und damit der Konzentrationslöschung besonders hoch, da Fluorescein eine starke Überlappung des Absorptions- und Emissionsspektrums (kleine Stokes-Verschiebung) zeigt (Lakowicz 1999). Grundsätzlich könnten bei niedriger Fluorophorkonzentration die angeregten Monomere ihre Energie auf andere monomere Fluorophore auch durch Kollision übertragen, jedoch trat dieser Mechanismus in einer Untersuchung an einem Fluoresceinderivat (Carboxyfluorescein) nicht auf (Chen und Knutson 1988).

Es ist zu erwarten, dass bei dem verwendeten FITC-BSA mit einem F/P = 10 der oben beschriebene Zustand der maximalen Fluoreszenz weit überschritten war und es sich um ein hochgradig gequenchtes Molekül handelte. Die erläuterten Mechanismen der Fluoreszenzlöschung (Dimerisierung, RET) setzen voraus, dass sich die FITC-Moleküle in einem bestimmten Abstand zueinander befinden. Die Inkubation des FITC-BSA bei 37 °C führte, wie u. a. in der SDS-PAGE nachgewiesen wurde, zu einer Zersetzung des Proteins und damit zu einer Aufhebung des definierten Abstandes zwischen den Fluorophoren. In Folge dessen war das Quenching nicht mehr möglich und die Fluoreszenzintensität des abgespaltenen Peptides nahm massiv zu (Abb. 72). Dies erklärt die Beobachtung in der SEC (vgl. Abb. 69), wo für die vermutlich vollständig dequenchten Fragmente < 5 kDa deutliche Fluoreszenzpeaks zu finden waren, während die Absorption bei 280 nm unter dem Detektionslimit blieb (Wischke und Borchert 2006b).

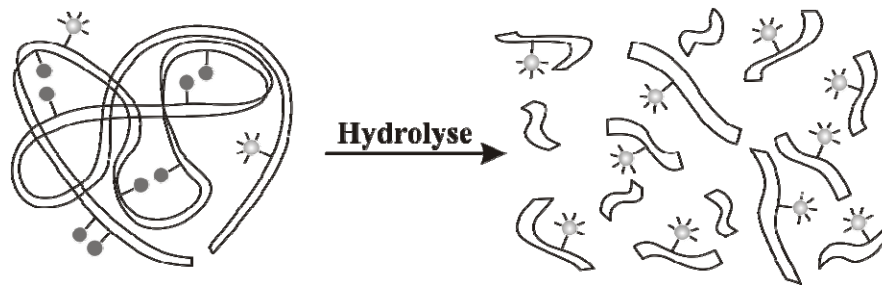


Abb. 72: Schematische Darstellung des Fluoreszenz-Dequenchings infolge der Hydrolyse von FITC-BSA. Dunkelgrau gefüllte Kreise: nicht fluoreszierende, dimerisierte FITC-Moleküle; Hellgrau gefüllte Kreise: strahlungsfähige FITC-Monomere.

Proteolyseexperimente

Um nachzuweisen, dass im vorliegenden Fall die oben angeführten Mechanismen des Dequenchings tatsächlich die Ursache des Fluoreszenzanstiegs darstellen, sollte eine enzymatische Spaltung von FITC-BSA durchgeführt werden. Hierbei sollten struktur- aber nicht substratspezifische Proteasen verwendet werden, die an unterschiedlichen Orten im Proteinrückgrat angreifen. Proteasen wie Pepsin, die ihre optimale Aktivität im Sauren entfalten, sind hierfür u. a. deshalb ungeeignet, da es in diesem Milieu zu einer starken pH-bedingten Abnahme der Fluoreszenzintensität kommt (s. Abschnitt 1.5). Daher wurden für diese Experimente Trypsin und Proteinase K ausgewählt, die bei neutralem pH-Wert arbeiten.

Trypsin ist eine Serinprotease, am katalytischen Mechanismus sind neben Ser¹⁹⁵ die im aktiven Zentrum vorhandenen Aminosäuren His⁵⁷ und Asp¹⁰² beteiligt (Sprang et al. 1987). Außerdem besitzt Trypsin im aktiven Zentrum einen weiteren Aspartatrest (Asp¹⁸⁹), der mit Lysin- oder Argininresten des Substrates wechselwirkt und so zur Strukturspezifität von Trypsin beiträgt (Stroud et al. 1972, Graf et al. 1987, Ma et al. 2005). Der fixierte Proteinstrang wird an der Carboxylseite der genannten basischen Reste gespalten. Im FITC-BSA ist Fluorescein über eine Thioharnstoffbrücke an Lysin gebunden, so dass die Aminosäure ihre Basizität verliert. Daher sollte geklärt werden, ob Trypsin hier überhaupt angreifen kann. Als weitere Endopeptidase wurde Proteinase K eingesetzt, die den Proteinstrang an unpolaren Aminosäuren angreift (Ebeling et al. 1974).

Wie Abbildung 73 verdeutlicht, zeigte FITC-BSA nach Zusatz von Proteinase K bereits nach 10 min Inkubation bei 37 °C einen massiven Anstieg seiner Fluoreszenzintensität. Auch Trypsin konnte an FITC-BSA angreifen und trotz einiger blockierter Lysinreste das Protein spalten, allerdings war der Fluoreszenzanstieg und daher vermutlich auch

der Grad der Hydrolyse weniger groß. Eine Ausdehnung der Inkubationszeit auf 24 h führte zu einer weiteren Erhöhung der Fluoreszenzintensität.

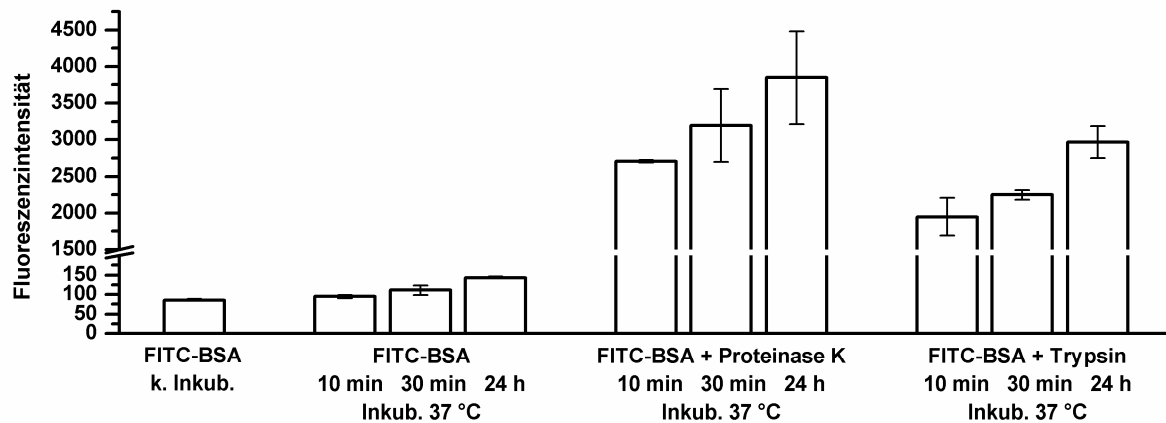


Abb. 73: Veränderung der Fluoreszenzintensität von FITC-BSA durch Inkubation bei 37 °C ohne oder mit Zusatz proteolytischer Enzyme.

Diese Ergebnisse bestätigten die Hypothese, dass das Dequenching infolge einer minimalen Hydrolyse des Proteins die Ursache des Fluoreszenzanstiegs unter den Bedingungen des Freisetzungstests war. Daher sollte die fluorimetrische Quantifizierung von FITC-BSA und anderen mehrfach FITC-gekoppelten Proteinen nur dann erfolgen, wenn Dequenching-Effekte ausgeschlossen wurden. Durch Verwendung anderer Fluorophore mit weniger stark ausgeprägter Konzentrationslöschung oder durch dosiertes Koppeln des Proteins mit nur ein bis zwei FITC-Molekülen könnten die hier beschriebenen Phänomene vermieden werden (Wischke und Borchert 2006b).

3.7 Konzept einer verbesserten DC-basierten Zelltherapie

In Abschnitt 1.7 wurde dargelegt, dass für die DC-basierte Tumorthherapie sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen eine immunologische Wirksamkeit nachgewiesen werden konnte. Eine klinische Wirksamkeit war hingegen nur in Einzelfällen zu beobachten. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass das Patientenkollektiv in der Regel aus schulmedizinisch austherapierten Personen besteht, die im Rahmen der ärztlichen Therapiefreiheit in individuellen Heilversuchen eine DC-Vakzine erhalten. Unter diesen Umständen ist ein direkter Vergleich der Wirksamkeit von Chemotherapie und Zelltherapie nicht möglich. Es mangelt immer noch an klinischen Studien, die u. a. Fragen zum optimalen DC-Typ, Reifungsstimulus, Applikationsort, der Zelldosis und dem auszuwählenden Antigen umfassend untersuchen.

Die Mehrheit dieser Fragen konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden und das therapeutische Vorgehen basiert meist auf den Erfahrungswerten des jeweiligen Arztes. Zu Beginn der eigenen Arbeit waren in Übersichtsarbeiten u. a. die Frage nach der Identifizierung und Auswahl Tumor-assoziierten Antigene präsent (Geissler und Weth 2002). In der aktuellen Literatur finden sich verstärkt auch Berichte zum experimentellen Einsatz von Adjuvantien (Gatza und Okada 2006), zu veränderten Zytokin-Cocktails bei der Dendritogenese (Trakatelli et al. 2006) und auch Übersichtsarbeiten zur DC-Tumorthherapie, die auf das Potenzial der Mikroverkapselung von Antigenen hinweisen (Farkas et al. 2006). Es ist zu erwarten, dass sich die Forschungsschwerpunkte noch mehr in Richtung der Adjuvantien und Trägersysteme verlagern werden. In ersten Untersuchungen mit antigen-beladenen PLGA-Mikropartikeln wurde eine Verschiebung der Immunantwort in Richtung des für die Tumorthherapie gewünschten T_H1 -Weges erzielt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Mikropartikel können Proteine einschließen, effektiv in dendritische Zellen einschleusen und verzögert freisetzen. In weiterführenden Untersuchungen sollte das hier verwendete Modellprotein durch tumorassoziierte Antigene ersetzt werden. Zusätzlich zu der Verkapselung von Proteinen wurde eine kationische Oberflächenmodifizierung der Partikel mit DEAE-Dextran durchgeführt. Die positiv geladene Partikeloberfläche birgt das Potenzial einer stärkeren Wechselwirkung mit anionischen Zelloberflächen. Darüber hinaus konnten anionische Substanzen an die kationische Oberfläche dieser Partikel gebunden werden (unveröffentlichte Ergebnisse). Dabei handelte es sich um Liganden von Toll-like Rezeptoren (TLR), die nach Phagozytose durch DCs in ersten

3. Ergebnisse und Diskussion

Experimenten deren Reifung induzierten. Während in der Literatur gelegentlich die Co-Verkapselung von Antigenen und TLR-Liganden beschrieben oder vorgeschlagen wurde (Diwan et al. 2003, Waeckerle-Men und Groettrup 2005), scheint die Anbindung dieser Substanzen auf die Partikeloberfläche und die damit ermöglichte direkte Wechselwirkung mit den TLRs vielversprechender. Somit könnten zukünftige Mikropartikel (Abb. 74) als Trägersystem für DC-Therapien im Inneren ein oder mehrere Tumor-assoziierte Antigene enthalten, welche in den Zellen langsam freigesetzt werden und diese dauerhaft stimulieren. Die zusätzlich auf der Partikeloberfläche elektrostatisch (oder auch kovalent) gebundenen TLR-Liganden könnten durch Wechselwirkung mit ihren Rezeptoren die Richtung der Immunantwort steuern und diese verstärken. Grundsätzlich könnte dieses Konzept nicht nur auf die immunologische Tumorthherapie, sondern auch auf die Prävention oder Therapie von Infektionserkrankungen angewendet werden.

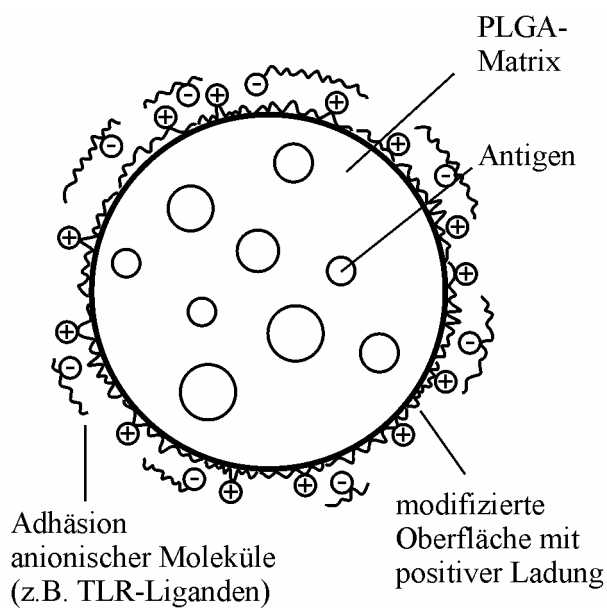


Abb. 74: Konzept eines optimierten Mikropartikels für DC-basierte Zelltherapien.