

Oberflächenmodifizierung von Mikropartikeln aus
Poly(DL-milchsäure-co-glycolsäure) mit
Toll-*like*-Rezeptor-Agonisten

Wirkung auf Antigen-präsentierende Zellen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Apotheker Andreas Schendler
aus Berlin
2013

Diese Arbeit wurde von 2006 bis 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Hubert Borchert am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Hans-Hubert Borchert

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. Müller

Disputation am 16.07.2013

Danksagung

Meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Borchert, danke ich für das Überlassen des interessanten Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ganz besonders danke ich Ihm für seine fortwährende fachliche Unterstützung und das vertrauensvolle Verhältnis.

Herrn Prof. Dr. Müller danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit und für die Nutzung von Messgeräten seiner Arbeitsgruppe.

Herrn Dr. Brosig gilt mein Dank für die angeregten Diskussionen und für seine Hilfe bei vielen analytischen Methoden. Frau Fuhrmann-Selter danke ich für Ihre Einführung in die Zellkultur und die Unterstützung bei zahlreichen Zellexperimenten. Bei Herrn Dr. Siebenbrodt bedanke ich mich für die Durchsicht der Arbeit und seinen Rat bei technologischen Fragestellungen. Herrn Dr. Herrmann danke ich für die Hilfestellung bei verschiedenen Softwareprogrammen und PC-Problemen.

Herrn Dr. Wessinger danke ich für die anregenden Diskussionen und seine Mitwirkung bei langwierigen Versuchen. Herrn Dr. Wischke danke ich sehr für seinen Beistand in der Anfangsphase der Arbeit sowie für sein stets offenes Ohr bei Problemen. Den anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe danke ich für das familiäre Arbeitsklima und ihr kameradschaftliches Verhalten.

Die hier gezeigten Ergebnisse beruhen zum Teil auf der Kooperation mit Herrn Dr. Lorenzen und Herrn Dr. Nesselhut vom Institut für Tumorthherapie in Duderstadt, denen ich herzlich für ihr Engagement und die hervorragende Zusammenarbeit danke. Besonders der vielfältige Gedankenaustausch mit Herrn Dr. Lorenzen und seine Expertise auf dem Gebiet der Dendritischen Zellen halfen mir sehr bei der Bearbeitung von Fragestellungen dieser Arbeit.

Für ihre Hilfe bei analytischen Verfahren, die nicht in unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung standen, oder die Schenkung von Substanzen danke ich folgenden Personen: Herrn Hastedt (Charité), Herrn Kastrup (MPI Göttingen), Herrn Prof. Dr. Wiesmüller (EMC microcollections), Frau Dr. Freudenberg und Herrn Dr. Dr. Galanos (MPI Freiburg i. Br.). Weiterhin halfen mir Frau Vogel und Frau Struck (Institut für Tumorthherapie).

Von Herzen danke ich meiner Familie und meiner Freundin Juliane, die mich immer gefördert und mir auch in schwierigen Zeiten beigestanden haben.

Meinem Vater, Manfred Schendler (* 1954; † 2011), gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Danksagung..... | III |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Überblick..... | 1 |
| 1.2 Dendritische Zellen..... | 2 |
| 1.2.1 Entdeckung und Unterklassen..... | 2 |
| 1.2.2 Gewinnung autologer DC für die Tumorummuntherapie..... | 4 |
| 1.2.3 Reifung, Antigenerkennung und -aufnahme..... | 6 |
| 1.2.4 Antigenprozessierung und -präsentation..... | 10 |
| 1.2.5 T-Zellantwort..... | 13 |
| 1.3 Toll-like Rezeptoren..... | 17 |
| 1.3.1 Überblick..... | 17 |
| 1.3.2 TLR2/1, TLR2/6 und deren Agonisten..... | 21 |
| 1.3.3 TLR4 und dessen Agonisten..... | 26 |
| 1.4 Antigen-Trägersysteme..... | 29 |
| 1.5 PLGA-Mikropartikel..... | 35 |
| 1.5.1 Allgemeines und Definitionen..... | 35 |
| 1.5.2 Bioabbaubare Polymere aus Milch- und Glycolsäure..... | 36 |
| 1.5.3 Herstellungsverfahren für proteinbeladene PLGA-Mikropartikel..... | 46 |
| 1.5.4 Oberflächenmodifizierung von PLGA-Mikropartikeln..... | 52 |
| 1.6 Zielstellung..... | 61 |
| 2 Material und Methoden..... | 65 |
| 2.1 Herstellung der PLGA-Mikropartikel..... | 65 |
| 2.2 Modifizierung der Mikropartikel..... | 67 |
| 2.2.1 Adsorptive und kovalente Oberflächenmodifizierung mit TLR2-Agonisten..... | 67 |
| 2.2.2 Elektrostatische Oberflächenmodifizierung mit synthetischem Monophosphoryl-Lipid A..... | 72 |
| 2.3 Charakterisierung der Mikropartikel..... | 72 |
| 2.3.1 Partikelgröße – Laserdiffraktometrie..... | 72 |
| 2.3.2 Partikelgröße – Impedanz-Messverfahren..... | 74 |
| 2.3.3 Zetapotenzial..... | 75 |
| 2.3.4 Rasterelektronenmikroskopie..... | 75 |
| 2.3.5 Fluoreszenzmikroskopie..... | 75 |
| 2.3.6 Durchflusszytometrie..... | 76 |
| 2.3.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)..... | 76 |
| 2.3.8 Restlösungsmittel-Gehalt (GC/MS)..... | 77 |
| 2.3.9 Verkapselungseffizienz..... | 78 |
| 2.3.10 Freisetzungstest..... | 79 |
| 2.3.11 Dynamische Differenzkalorimetrie..... | 80 |
| 2.3.12 Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests..... | 81 |
| 2.4 THP-1-Zellen..... | 82 |
| 2.4.1 THP-1-Kultivierung für TNF α -Bestimmung (ELISA)..... | 82 |
| 2.4.2 MTT-Test..... | 84 |
| 2.4.3 THP-1-Kultivierung für ELISPOT-Versuche..... | 85 |
| 2.4.4 Durchflusszytometrische Untersuchungen an THP-1-Zellen..... | 86 |
| 2.4.5 Phagozytose-Assay..... | 88 |
| 2.4.6 Intrazelluläre Lokalisation von Toll-like-Rezeptoren..... | 89 |
| 2.5 Versuche mit humanen monozytären Dendritischen Zellen..... | 90 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 2.5.1 | Generelle Aussagen zu Experimenten mit huMoDC..... | 90 |
| 2.5.2 | Gewinnung und Isolierung von Monozyten..... | 91 |
| 2.5.3 | Kultivierung von unreifen huMoDC..... | 91 |
| 2.5.4 | Einfluss der PLGA-Mikropartikel auf huMoDC..... | 92 |
| 2.5.5 | Durchflusszytometrische Untersuchungen an huMoDC..... | 93 |
| 2.5.6 | ELISPOT-Versuche an huMoDC..... | 93 |
| 2.5.7 | Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie..... | 94 |
| 2.6 | Methoden der Statistik..... | 95 |
| 3 | Ergebnisse und Diskussion..... | 97 |
| 3.1 | Mikropartikel-Charakterisierung..... | 97 |
| 3.1.1 | Partikelgröße..... | 97 |
| 3.1.2 | Oberflächenstruktur und Lagerung..... | 102 |
| 3.1.3 | Verkapselungseffizienz und Freisetzung..... | 104 |
| 3.1.4 | Proteinverteilung..... | 108 |
| 3.1.5 | Glasübergangstemperatur..... | 109 |
| 3.1.6 | Restlösungsmittel-Gehalt..... | 111 |
| 3.1.7 | Endotoxin-Gehalt..... | 114 |
| 3.2 | TLR2-Agonist-modifizierte PLGA-Mikropartikel..... | 115 |
| 3.2.1 | Oberflächenmodifizierung..... | 115 |
| 3.2.2 | Charakterisierung von THP-1-Zellen..... | 121 |
| 3.2.3 | Phagozytose durch THP-1-Zellen..... | 129 |
| 3.2.4 | TLR2-vermittelte Aktivierung und Zellviabilität von THP-1-Zellen..... | 132 |
| 3.2.5 | Versuche an huMoDC..... | 147 |
| 3.3 | TLR4-Agonist-modifizierte PLGA-Mikropartikel..... | 171 |
| 3.4 | Ausblick..... | 178 |
| 4 | Zusammenfassung..... | 179 |
| 5 | Summary..... | 181 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 183 |
| 7 | Publikationen..... | 209 |
| 7.1 | Vorträge..... | 209 |
| 7.2 | Zeitschriftenbeiträge..... | 209 |
| 7.3 | Poster..... | 209 |
| 8 | Lebenslauf..... | 211 |
| 9 | Abkürzungsverzeichnis..... | 213 |

1 Einleitung

1.1 Überblick

Tumorerkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland. Die klassischen Therapien – Stahl, Strahl und Chemotherapie – sind dabei effektiv in der Beseitigung von Primärläsionen, zeigen aber Defizite bei der Eliminierung von Metastasen. Tumorimmuntherapien nutzen die körpereigenen Mechanismen zur Krebsbekämpfung und können diese Defizite ausgleichen (Dougan und Dranoff 2009). So wird das menschliche Immunsystem in die Lage versetzt eine effektive Immunantwort gegen Tumorzellen aufzubauen und diese gezielt zu vernichten. Eine Schlüsselrolle übernehmen dabei die Dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC), welche von Zankvil Cohn und Ralph M. Steinman 1973 beschrieben wurden (Steinman und Cohn 1973). Für die Entdeckung und Rolle der DC in der adaptiven Immunität erhielt letztgenannter 2011 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin *posthum*. Die DC stellen eine heterogene Gruppe von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APC) dar, die Antigene erkennen, aufnehmen, prozessieren und gegenüber T-Zellen präsentieren. Sie steuern in Abhängigkeit von der Art des Antigens die Ausprägung der Immunantwort, welche im Wesentlichen zellulär oder humoral, aber auch toleranzinduzierend ablaufen kann (Steinman 2012, Steinman und Banchereau 2007). Letzteres kann sich ereignen, wenn das Antigen von den DC nicht als gefährlich erkannt wird. Dieser Schutzmechanismus verhindert Immunantworten gegen körpereigene Substanzen, führt aber häufig zur Toleranzentwicklung gegenüber Krebszellen, die anderen Körperzellen gleichen und die verschiedene sogenannte Tumor-*Escape*-Mechanismen nutzen, um der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen (Gabrilovich 2004, Töpfer *et al.* 2011).

Ein Ansatz der Tumorimmuntherapie dies zu verhindern, ist die Gewinnung von Monozyten aus dem peripheren Blut von Patienten und die Differenzierung *in vitro* zu humanen monozytären Dendritischen Zellen (huMoDC). Diese werden mit Tumorantigenen beladen, gereift und dem Patienten reappliziert, um eine Immunantwort gegen die Krebszellen auszulösen (Gilboa 2007). Diese individuelle Therapie ist noch weitgehend experimentell. Lediglich Sipuleucel-T (Provenge[®]) ist von der FDA als erster Impfstoff zur Behandlung des Prostatakarzinoms zugelassen und enthält ein Fusionsprotein aus dem Tumorantigen

prostataspezifische saure Phosphatase und dem Wachstumsfaktor GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) (Sims 2012). Generell umfassen die Schwierigkeiten bei dieser Therapie die Selektion des geeigneten Tumorantigens sowie das effektive Targeting und die Aktivierung der DC.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Herstellung und Charakterisierung eines bioabbaubaren mikropartikulären Antigen-Trägersystems aus Poly(DL-milchsäure-co-glycolsäure) [*poly(DL-lactic-co-glycolic acid)*, PLGA], in das ein Modell-Antigen verkapselt ist. Die Oberfläche der PLGA-Mikropartikel (PLGA-MP) soll mit Reifungsstimuli aus der Gruppe der Toll-like-Rezeptor-Agonisten (*toll-like receptor agonists*, TLR-Agonisten) modifiziert werden. Für die Entdeckung der TLR und deren Beschreibung bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems erhielten Beutler und Hoffman ebenfalls den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin 2011. Die TLR-Agonisten entsprechen zumeist konservierten molekularen Mustern, die auf Pathogenen vorkommen (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP), und stellen für die DC ein Gefahrensignal (*danger signal*) dar (Akira *et al.* 2006, Matzinger 2002). Durch das bifunktionale Trägersystem sollen gezielt die DC, welche das Antigen aufgenommen haben, aktiviert und eine Toleranzentwicklung verhindert werden. Weitere Vorteile der PLGA-MP sind u. a. gute Gewebeerträglichkeit, verzögerte Freisetzung der Antigene und Schutz derselben gegen extrazelluläre Proteasen sowie eine erhöhte Phagozytoserate bei Partikelgrößen unter 5-10 µm. Zudem können die in PLGA-MP verkapselten Antigene durch Kreuzpräsentation zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) aktivieren, welche für eine effektive zelluläre Immunantwort gegen Tumore nötig sind. Somit stellen mit TLR-Agonisten modifizierte PLGA-MP ein vielversprechendes Antigen-Trägersystem für die Tumorummuntherapie mit huMoDC dar, deren Wirkung auf APC in dieser Arbeit gleichfalls untersucht wird.

1.2 Dendritische Zellen

1.2.1 Entdeckung und Unterklassen

Dendritische Zellen sind eine heterogene Gruppe von mononukleären professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, deren Hauptaufgabe die Einleitung der adaptiven Immunantwort durch Erkennung, Aufnahme und Prozessierung von Antigenen sowie

Präsentation der Antigenfragmente an naive antigenspezifische T-Zellen umfasst. Sie stellen ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar und kontrollieren den Verlauf der Immunantwort. Dabei können sie verschiedene T-Zell-Unterklassen aktivieren oder unterdrücken und sind für den Erhalt des immunologischen Gedächtnisses mitverantwortlich (Steinman 2012, Steinman und Banchereau 2007). Steinman und Cohn entdeckten sie 1973 bei der Beobachtung von Oberflächen-adhärenenten Zellen der murinen Milz und benannten die DC nach ihren verästelten Ausläufern (Steinman und Cohn 1973). Bereits 1967 postulierte Mosier das Vorkommen von „Hilfszellen“ für die antigenspezifische Aktivierung von T- und B-Zellen, blieb aber den Beweis für diese Zellen schuldig (Mosier 1967). Wesentlich früher, nämlich im Jahr 1868, berichtete Paul Langerhans von Hautzellen mit rundlichem Leib und zierlichen Ausläufern. Allerdings hielt er diese nach ihm benannten Langerhans-Zellen (LC) irrtümlicherweise für Nervenzellen der Haut und konnte keinen Zusammenhang zu ihrer immunologischen Funktion herstellen (Langerhans 1868).

Die DC im Menschen bestehen aus einem komplexen System, wobei eine einzige DC nicht existiert, sondern viele verschiedene DC-Unterklassen nach Entstehung, Lokalisation, Funktionen, Aktivierungszustand und Oberflächenmarkern unterschieden werden. Die Heterogenität der mononukleären, phagozytotisch aktiven Zellen und deren noch immer nicht vollständig geklärte Entstehungsgeschichte erschweren eine Einteilung der DC sowie eine Abgrenzung gegen andere Zellen, wie z. B. Makrophagen (Collin *et al.* 2011, Geissmann *et al.* 2010). Die historische Unterteilung unterscheidet nach der angenommenen Entstehung zwischen myeloiden DC, welche aus myeloiden Vorläuferzellen entstehen, und plasmazytoiden DC (pDC), die aus lymphatischen Vorläuferzellen entstehen. Verschiedene Formen von DC können im Blut zirkulieren, in lymphatischen Organen lokalisiert sein oder in nicht-lymphatischen peripheren Geweben vorkommen, z. B. epidermal, dermal und alveolar. In physiologischer Umgebung befinden sie sich meist im Zustand der Homöostase (*steady state*) und verändern sich während des pathophysiologischen Entzündungsgeschehens. Weitere Einteilungen unterscheiden nach der Lokalisation in den lymphatischen Organen sowie zwischen LC, pDC, monozytären inflammatorischen DC und zwei Arten von klassischen myeloiden DC (Guilliams *et al.* 2010).

1.2.2 Gewinnung autologer DC für die Tumorimmuntherapie

Die Vielfalt an DC *in vivo* erschwert die Entwicklung eines geeigneten Therapieregimes zum Targeting dieser Zellen und die Auslösung einer tumorspezifischen Immunantwort. Hingegen können *in vitro* generierte DC unter kontrollierten Bedingungen gewonnen und eingesetzt werden. Diese autologen DC werden heutzutage in größerem Umfang aus Vorstufen des peripheren Blutes von Patienten hergestellt. Hierfür werden entweder CD14⁺-Monozyten oder CD34⁺-Vorläuferzellen isoliert und mit Hilfe verschiedener Zytokine zu DC differenziert.

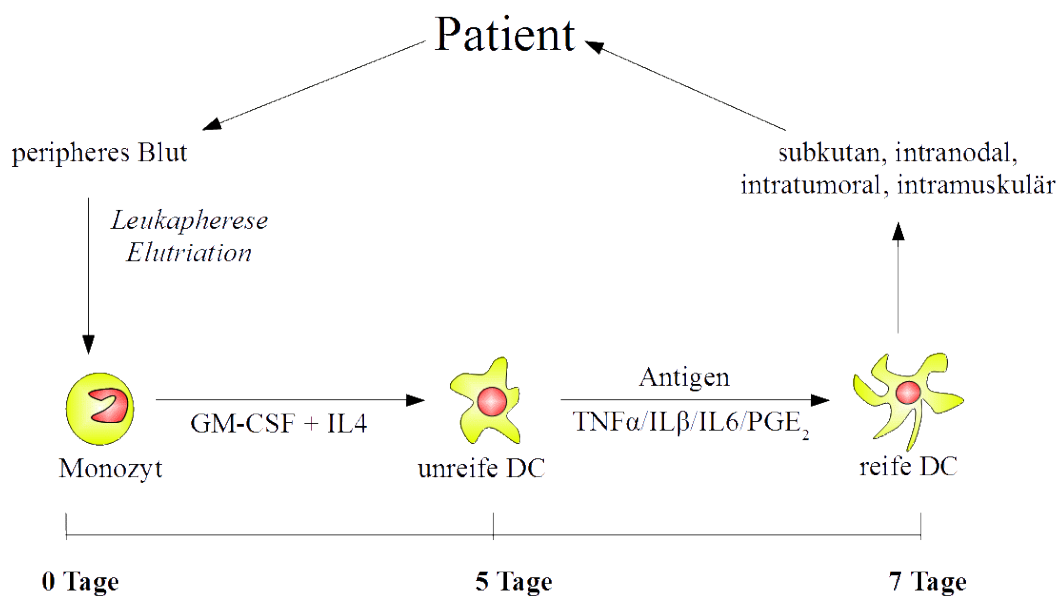


Abb. 1-1. Gewinnung von huMoDC aus dem peripheren Blut von Patienten und deren Beladung mit Antigenen, Reifung und Reapplikation für die Immuntherapie.

Die Isolation von CD14⁺-Monozyten erfolgt normalerweise über Leukapherese des Blutes und anschließende Gegenstrom-Zentrifugation, z. B. mit Hilfe des Elutra[®] Cell Separation Systems (Elutriation). Eine weitere effektive Isolationsmethode aus Zellsuspensionen ist die Bindung der Monozyten an anti-CD14-Antikörper, die an magnetische Nanopartikel (NP) gebunden sind (CD14-Microbeads), und die nachfolgende magnetische Abtrennung der NP (MACS[®], *magnetic-activated cell sorting*). Die isolierten CD14⁺-Monozyten können durch Zusatz von GM-CSF und IL4 innerhalb von fünf bis sechs Tagen gezielt zu unreifen DC (*immature dendritic cells*, iDC) differenziert werden, welche interstitiellen myeloiden DC

stark ähneln (Abb. 1-1, Peters *et al.* 1991, Romani *et al.* 1994, Ruppert *et al.* 1993, Sallusto und Lanzavecchia 1994).

Hierbei wird der typische Monozyten/Makrophagen-Marker CD14 deutlich herunter reguliert. Die erhaltenen iDC sind phagozytotisch aktiv und können Antigene aufnehmen. Gewöhnlich werden sie nach der Antigenaufnahme mit einem Zytokin-Cocktail aus Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α), IL1 β , IL6 und Prostaglandin E₂ (PGE₂) unter serumfreien Bedingungen zu reifen DC (*mature dendritic cells*, mDC) ausdifferenziert (Jonuleit *et al.* 1997). Die Reifung ist ein kritischer Schritt für die Steuerung der später induzierten Immunreaktion, weshalb häufig auch andere Reifungsstimuli eingesetzt werden, die Gegenstand aktueller Forschung sind. Die mDC können nach Reapplikation an den Patienten zu nahegelegenen sekundären lymphatischen Organen migrieren und Antigenfragmente über MHC-Moleküle an T-Zellen präsentieren. Da man sie aus humanen Monozyten gewinnt, werden sie auch huMoDC genannt. Ebenfalls gebräuchlich ist die Bezeichnung IL4-DC aufgrund des eingesetzten Zytokins. Sie können mit hoher Reinheit gewonnen und ihr Reifungsgrad phänotypisiert werden. Deshalb sind sie im Vergleich zu anderen *in vitro* generierten DC einfach standardisierbar und stellen den „Goldstandard“ für die Entwicklung neuer DC-basierter Vakzine dar.

Die Gewinnung von DC aus CD34⁺-Vorläuferzellen ist aufgrund der geringen Anzahl im peripheren Blut sehr aufwendig. Deshalb werden häufig CD34⁺-Vorläuferzellen vor der Isolierung durch Applikation von Flt3-Ligand (*fms-related tyrosine kinase 3 ligand*) aus dem Knochenmark der Patienten mobilisiert (Fong *et al.* 2001, Maraskovsky *et al.* 2000). Die Behandlung erhöht sowohl den Anteil an CD11c⁻-Zellen, die zu pDC-artigen Zellen differenzieren können, als auch den Anteil an CD11c⁺-Zellen im Blut, welche nach weiterer Stimulation zu einem Gemisch von myeloidartigen DC, vorrangig LC und interstitiellen DC, werden. Das erhaltene Produkt zur Vakzinierung ist meist sehr heterogen, was immunologisch von Vorteil sein kann, aber die Standardisierung erschwert.

Die Tumormimmuntherapie mit *in vitro* hergestellten DC wird seit ca. 20 Jahren intensiv erforscht (Romani *et al.* 1994, Tacken *et al.* 2007), wobei anfängliche Misserfolge v. a. auf die Verwendung von iDC zurückzuführen sind (Hsu *et al.* 1996, Nestle *et al.* 1998), die eine Immuntoleranz gegen die präsentierten Antigenfragmente auslösen können. Einen guten Überblick über die Studienlage der Tumormimmuntherapie mit DC geben Palucka und Banchereau (2012).

Vorteile der *ex vivo*-Beladung von DC sind die hohe Kontrolle über den Reifungsstatus und die Aktivierung der DC, die vor der Reapplikation bestimmt werden können. Die *in vitro* kultivierten DC werden gezielt aktiviert, ohne weitere Immunzellen zu beeinflussen. Sie sind nicht den *in vivo* vom Tumor sezernierten Mediatoren ausgesetzt, welche die Bildung, Differenzierung und Reifung der DC negativ beeinflussen können (Gabrilovich 2004). Weiterhin sind *in vitro* generierte DC ein Testmodell, um Antigen-Trägersysteme unter kontrollierten Bedingungen vor der Anwendung *in vivo* zu untersuchen. Nachteilig ist die zeit- und arbeitsintensive Gewinnung der DC von jedem Patienten und die nachfolgende meist mehrstufige Bearbeitung und Kontrolle der DC vor der Reapplikation. Zudem werden verschiedene DC-Unterklassen durch das *ex vivo*-Verfahren nicht aktiviert, die einen Einfluss auf das Resultat der Immuntherapie haben könnten (Palucka *et al.* 2011). Der Anteil an wandernden, nicht nodal reapplizierten DC, die für die T-Zellaktivierung zum nahegelegenen Lymphknoten gelangen müssen, ist bei unzureichenden Reifungsprotokollen sehr gering (de Vries *et al.* 2003). Dies kann durch eine Konditionierung mit proinflammatorischen Zytokinen oder TLR-Agonisten verbessert werden (Randolph *et al.* 2005). Weitere wesentliche Herausforderungen bei der Tumorummuntherapie mit DC umfassen die Auswahl des Tumorantigens sowie das Targeting und die Beladung der DC.

1.2.3 Reifung, Antigenerkennung und -aufnahme

Die klassische Theorie zur Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen durch DC geht von der Lokalisation der DC an den Eintrittspunkten der Antigene aus. Die DC befinden sich vorrangig unter den Epithelien und ihre Hauptaufgabe ist die Erkennung und Aufnahme von Antigenen. Sie zeichnen sich durch eine hohe Antigenaufnahmerate, eine niedrige Oberflächen-Expression von MHC-II-Molekülen und von kostimulatorischen Molekülen zur T-Zellaktivierung, z. B. CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) und CD40, sowie das Fehlen des Chemokinrezeptors CCR7, welcher die Migration zum nahegelegenen Lymphknoten vermittelt, aus (Reis e Sousa 2006). In Analogie zu huMoDC, die einen vergleichbaren Phänotyp aufweisen, werden diese DC auch als unreife DC bezeichnet. Treffen die iDC auf einen geeigneten Reifungsstimulus, so differenzieren sie zu mDC. Reifungsstimuli werden z. B. durch PAMP vermittelt, die durch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) von den DC erkannt werden (Seya *et al.* 2010). Zur Gruppe der PRR gehören u. a. die C-Typ-Lektin-Rezeptoren, RIG-I-like-Rezeptoren, NOD-like-Rezeptoren und TLR

(Kumar *et al.* 2011). Allerdings können Reifungsstimuli auch durch proinflammatorische Zytokine oder durch Signale von sterbenden Zellen, sog. Gefahrensignale (*danger-* oder *damage-associated molecular patterns*), bereitgestellt werden (Matzinger 2002). Hinsichtlich der antitumoralen T-Zellantwort sind hierbei ausschließlich mit Zytokinen gereifte DC solchen unterlegen, die nur mit TLR-Agonisten oder einer Kombination aus TLR-Agonisten und Zytokinen gereift wurden (Maillard *et al.* 2004, Spörri und Reis e Sousa 2005, Watchmaker *et al.* 2010 Zobywalski *et al.* 2007).

Infolge der Reifungsstimulation erhöht sich die Antigenaufnahme der DC zunächst deutlich (West *et al.* 2004). Kurz danach wird die Antigenaufnahme komplett eingestellt, um das im Zusammenhang mit dem Reifungsstimulus stehende Antigen im Inneren zu konservieren (Sallusto und Lanzavecchia 1994, Steinman und Swanson 1995). Die Aufnahme von exogenen Antigenen kann dabei über die Phagozytose oder die Pinozytose erfolgen. Die Pinozytose wird nochmals in die Makropinozytose, die Clathrin-abhängige Endozytose, die Caveolin-abhängige Endozytose sowie die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose unterteilt (Conner und Schmid 2003). Bei der Phagozytose werden feste Partikel in einem Größenbereich von über 0,5 μm bis maximal 5-10 μm aufgenommen, was der Größe von Bakterien oder apoptotischen Zellfragmenten entspricht. Lösliche Antigene und kleinere Partikel ($< 0,5 \mu\text{m}$) werden über Pinozytose aufgenommen. Hierbei ist die Makropinozytose, also die Aufnahme von Volumina im unteren Mikrometerbereich, eine primäre Eigenschaft von iDC (West *et al.* 2000), während andere Zellen, wie Makrophagen, diese erst nach Stimulation zeigen (Francis *et al.* 1993). Sowohl die Makropinozytose als auch die Phagozytose von exogenen Antigenen erfolgt durch die Aktin-abhängige Bildung von Pseudopodien oder Membranausstülpungen, die das Antigen umschließen und zur Internalisierung führen. Im Falle der Phagozytose entstehen Phagosomen, welche das partikuläre Antigen enthalten. Die Phagozytose kann unspezifisch über den partikulären Reiz oder in spezifischer Form über die Interaktion mit Rezeptoren auf den DC erfolgen.

Die unspezifische Phagozytose ist abhängig von Art, Größe, Konzentration, Hydrophilie und Ladung der Partikel sowie der Inkubationszeit *in vitro* (Foged *et al.* 2005, Prior *et al.* 2002, Tabata und Ikada 1988, Thiele *et al.* 2001, 2003). Hierbei werden kationische Partikel besser phagozytiert als anionische, was im Wesentlichen auf einer elektrostatischen Interaktion zwischen den positiv geladenen Partikeln und der negativ geladenen Zellmembran beruht (Roser *et al.* 1998, Tabata und Ikada 1990, Thiele *et al.* 2001). Generell werden

hydrophobe Partikel besser phagozytiert als hydrophile. Letztere werden im Gegensatz zu hydrophoben oder kationischen Partikel v. a. ohne die Bildung von Pseudopodien internalisiert. Stattdessen sinken sie in die Zelle, wobei ein lockerer Kontakt mit der phagosomalen Membran besteht (de Chastellier und Thilo 1997, Thiele *et al.* 2003).

Die spezifische Aufnahme von Antigenen erfolgt über Rezeptoren, u. a. Fc γ -Rezeptoren (Fanger *et al.* 1996, Ravetch und Bolland 2001), Komplement-Rezeptoren (Kazatchkine und Fearon 1990, Roozendaal und Carroll 2007), Integrine (Albert *et al.* 2000) und C-Typ-Lektin-Rezeptoren (Kerrigan und Brown 2009), wie den Mannose-Rezeptor (Engering *et al.* 1997, Ghotbi *et al.* 2011, Wattendorf *et al.* 2008), Dectin-1 (Goodridge *et al.* 2011, Herre *et al.* 2004) oder DC-SIGN (*DC-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM3)-grabbing non-integrin*, CD209) (Tacke *et al.* 2005). Die DC-Aktivierung durch PAMP, z. B. TLR-Agonisten, kann eine erhöhte unspezifische Phagozytose zur Folge haben (West *et al.* 2004). So stellten Lutsiak *et al.* (2002) eine anfängliche Steigerung der Phagozytoserate von PLGA-Nanopartikeln (PLGA-NP) durch huMoDC bei der Verwendung des TLR4-Agonisten Monophosphoryl-Lipid A (MPLA) fest, welche auf die reifungsstimulierende Wirkung von MPLA zurückgeführt wurde. Weiterhin können DC Rezeptor-vermittelte Informationen über die Art der aufgenommenen Partikel bei der Phagozytose erhalten, die den weiteren Verlauf der Phagozytose, die Expression von Molekülen, die Antigenprozessierung und -präsentation sowie die Produktion und Ausschüttung von Zytokinen beeinflussen (Underhill und Goodridge 2012). TLR spielen bei der Informationsvermittlung eine entscheidende Rolle. So ändert sich die Signaltransduktion des auf der Zelloberfläche lokalisierten TLR4 bei der Internalisierung derart, dass anstelle einer TNF α - eine IFN β -Produktion veranlasst wird (Husebye *et al.* 2010, Kagan *et al.* 2008, Zanoni *et al.* 2011). Die Rezeptor-Zusammensetzung bzw. -Signaltransduktion ändert sich mit der Bildung und Reifung des Phagosoms und infolge dessen die Informationen, die die Zelle über den Inhalt im Phagosom erhält. Auch der auf der Zelloberfläche lokalisierte TLR2, welcher Lipopeptide (LP) von grampositiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus* erkennt, wird erst nach der Aufnahme und Digestion der Bakterien verstärkt in die Phagosomen integriert und zeigt dann eine erhöhte Empfindlichkeit gegen TLR2-Liganden (Ip *et al.* 2008, 2010, Underhill *et al.* 1999, Wolf *et al.* 2011).

Die phagozytäre Aufnahme von partikulären Antigenen in Phagosomen ist für die Präsentation der Antigenfragmente sowohl auf MHC-II- als auch auf MHC-I-Molekülen (Kreuzpräsentation an CTL) vorteilhaft (Burgdorf und Kurts 2008). So konnten verschiedene

Arbeitsgruppen eine 1000-10000fache Aufnahme und Kreuzpräsentation von partikulären Antigenen im Vergleich zu löslichen exogenen Antigenen feststellen (Kovacsovics-Bankowski *et al.* 1993, Men *et al.* 1999, Shen *et al.* 1997). Letztere werden größtenteils auf MHC-II-Molekülen präsentiert und nur in geringem Maße kreuzpräsentiert. Die löslichen Antigene werden in Abhängigkeit von der Art der Endozytose in verschiedene frühe Endosomen aufgenommen, welche unterschiedliche Reifungskinetiken aufweisen. Hieraus kann eine andere Prozessierung und Präsentation der Antigene resultieren (Burgdorf *et al.* 2007, Lakadamyali *et al.* 2006). Deshalb sind partikuläre Antigen-Trägersysteme, wie PLGA-MP, sinnvoll für die Induktion einer zellulären CTL-Immunantwort, die für eine effektive Bekämpfung von Tumorzellen nötig ist.

Die Reifung der DC führt zu einer vermehrten Expression von CCR7, dessen Liganden CCL19 (CC-Chemokinligand 19) und CCL21 von sekundären lymphatischen Organen gebildet und sezerniert werden, was zu einer Chemotaxis und einer Wanderung der DC in die T-Zell-Zonen führt. Dabei verändern die DC ihre Morphologie und weisen nun die charakteristischen dendritischen Ausläufer auf, um mit möglichst vielen T-Zellen zu interagieren.

Reife DC aktivieren in den sekundären lymphatischen Organen antigenspezifische zytotoxische CD8⁺-T-Lymphozyten (CTL) sowie CD4⁺-T-Helferzellen. Hierzu exprimieren mDC vermehrt MHC-Moleküle, über die Antigenfragmente an die T-Zellen präsentiert werden. MHC-I-Moleküle werden von CD8-Rezeptoren auf CTL und MHC-II-Moleküle von CD4-Rezeptoren auf T-Helferzellen gebunden. Die spezifische T-Zelle erkennt das präsentierte Antigenfragment über ihren T-Zellrezeptor. Passt das Antigenfragment zum T-Zellrezeptor stellt dies das erste Signal für die T-Zellaktivierung dar. Bei der Reifung werden kostimulatorische Moleküle, wie CD80 und CD86, auf den DC verstärkt exprimiert, welche über die Interaktion mit CD28 auf der T-Zelle das zweite Signal für die T-Zellaktivierung bereitstellen (Abb. 1-2, Keir und Sharpe 2005). Werden beide Signale an die T-Zelle weitergeleitet, so wird diese aktiviert und eine adaptive Immunantwort eingeleitet. Fehlt hingegen das zweite Signal, so führt dies zur Anergie der antigenspezifischen T-Zelle. Diese periphere Toleranz stellt sicher, dass eine adaptive Immunreaktion nur gegen Antigene eingeleitet wird, die in Zusammenhang mit einem Reifungsstimulus stehen und die keine körpereigenen Moleküle darstellen. Durch das Doppelsignal aktivierte T-Zellen exprimieren zudem den CD40-Liganden, der an CD40 auf den DC bindet und die DC zu einer

vollständigen Reifung, d. h. zur vermehrten Expression kostimulatorischer Moleküle, sowie zur Ausschüttung von Zytokinen veranlasst. Dieser Vorgang wird auch Lizenzierung (*licensing*) genannt (Grewal und Flavell 1998). Des Weiteren entscheidet ein drittes Signal über die Differenzierung in T-Zell-Unterklassen (Kaliński *et al.* 1999a), so vermittelt z. B. von den DC ausgeschüttetes IL12p70 die Differenzierung von naiven CD4⁺-T-Zellen in T_H1-Zellen (Trinchieri 2003). Aktivierte antigenspezifische T-Zellen vermehren sich (klonale Selektion und Expansion) und differenzieren in Effektor- und Gedächtniszellen (Abb. 1-2).

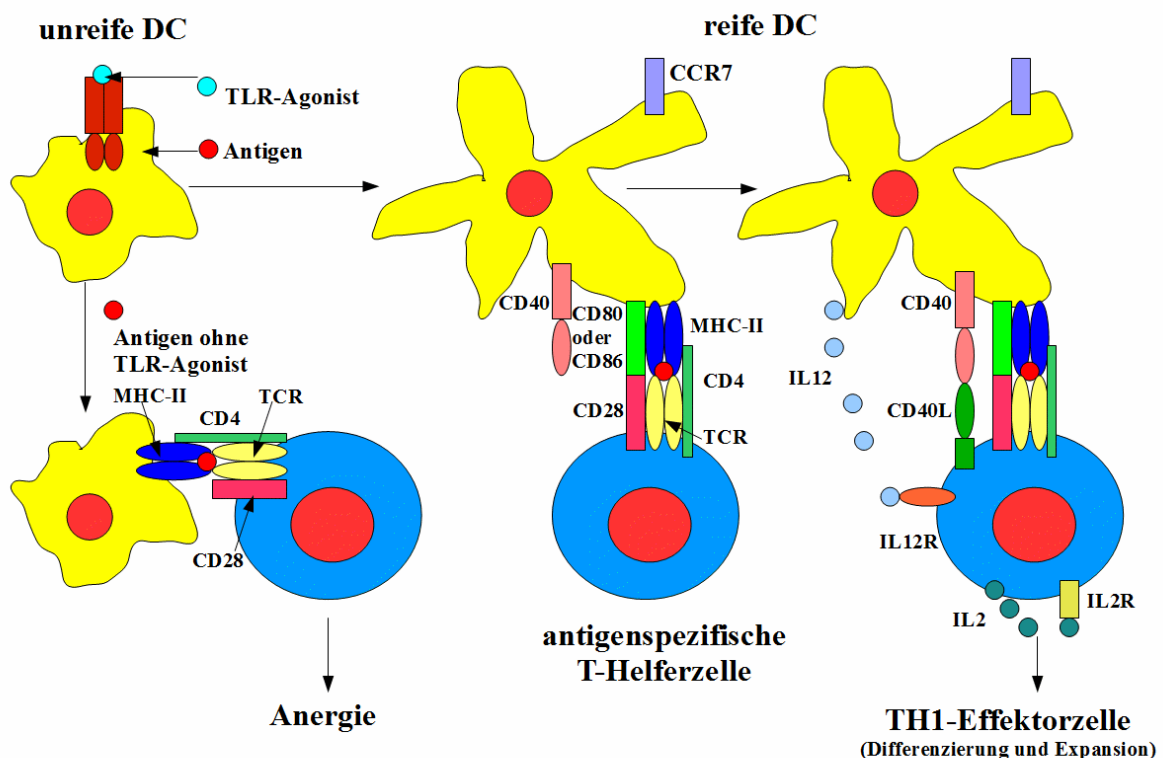


Abb. 1-2. Reifung von dendritischen Zellen und Interaktion mit antigenspezifischen T-Helferzellen.

1.2.4 Antigenprozessierung und -präsentation

Proteinogene Antigene werden durch DC intrazellulär in Fragmente prozessiert und dann über MHC-Moleküle an T-Zellen präsentiert. Hierbei werden exogene Antigene anders prozessiert als endogene (Trombetta und Mellman 2005). Letztere befinden sich im Zytosol von DC. Dort werden sie z. B. mit Hilfe von Ubiquitin markiert und durch das Proteasom und weitere Proteasen in Peptide mit einer Länge von 10-20 Aminosäuren zerteilt. Diese werden durch den TAP (*transporter associated with antigen processing*) in das endoplasmatische

Retikulum (ER) aufgenommen und weiter zu Peptiden mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren hydrolysiert (Rock und Goldberg 1999). Die Peptide werden dort auf MHC-I-Moleküle geladen, in Endosomen abgeschnürt und gelangen anschließend zur Zelloberfläche, wo sie die Antigenfragmente an CD8⁺-T-Lymphozyten präsentieren (Jackson und Peterson 1993, York und Rock 1996).

Hingegen werden exogene Antigene in Phagosomen aufgenommen und während der Reifung der Phagosomen prozessiert. Bei der Reifung interagieren die Phagosomen sowohl mit frühen und späten Endosomen als auch mit Lysosomen, wodurch sie schließlich zu Phagolysosomen werden (Chow und Mellman 2005). Dabei wird die Membran der Phagosomen verändert und der pH-Wert sinkt von ca. sieben auf Werte unter fünf, welche ideal für die Aktivität von lysosomalen hydrolytischen Proteasen sind (Trombetta *et al.* 2003). Die proteolytische Aktivität in DC ist aber deutlich geringer als z. B. in Makrophagen und wird während der Reifung der Phagosomen gesteuert (Delamarre *et al.* 2005, Lennon-Duménil *et al.* 2002). Hierüber werden sowohl die optimale Antigen-Degradation, d. h. die Bildung von antigenen Epitopen ohne diese vollständig proteolytisch zu zerstören (Delamarre *et al.* 2006), als auch die Beladung der MHC-II-Moleküle moduliert (Jensen 1990, 1991). Unbeladene MHC-II-Moleküle gelangen aus dem ER über Endosomen zu den Phagosomen, mit denen sie fusionieren, und sind zunächst über ein Polypeptid, die unveränderliche Kette (Ii, *invariant chain*), vor der Beladung mit Peptiden geschützt. Im Phagosom wird die Ii proteolytisch gespalten und die MHC-II-Moleküle können mit Antigenfragmenten, die eine Länge von ca. 12-25 Aminosäuren aufweisen, beladen werden (Bryant und Ploegh 2004). Diese erreichen die Zelloberfläche, wo die Antigenfragmente an CD4⁺-T-Zellen bzw. T-Helferzellen präsentiert werden. Die Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle können lediglich APC, wie DC, Makrophagen und B-Zellen, in größerem Umfang realisieren, während die Präsentation über MHC-I-Moleküle auf allen kernhaltigen Zellen möglich ist (Mellman *et al.* 1998, Schneider und Sercarz 1997).

Dendritische Zellen können exogene Antigene auch über MHC-I-Moleküle an CD8⁺-T-Zellen präsentieren (Kreuzpräsentation). Zwar können andere APC, z. B. Makrophagen, ebenfalls kreuzpräsentieren, allerdings sind die DC ihnen hierbei deutlich überlegen (Ackerman und Cresswell 2004). Bislang ungeklärt ist der genaue Weg, wie DC phagozytierte Antigene auf MHC-I-Moleküle laden und an die Zelloberfläche bringen. Im Wesentlichen existieren drei Theorien, um diese Vorgänge zu erklären.

Bei der ersten Theorie, der TAP-unabhängigen Theorie oder dem „vakuolaren Weg“, werden die Antigene im Phagosom gespalten und dort auf MHC-I-Moleküle geladen, ohne das Zytosol zu erreichen (Kurotaki *et al.* 2007, Rock und Shen 2005). Dieser Weg der Kreuzpräsentation benötigt keinen TAP und ist nicht durch Proteasom-Inhibitoren hemmbar. Essentiell für die Antigen-Degradation in den Phagosomen sind hierbei Phagosom-ständige Proteasen, wie Cathepsin S, die durch den Protease-Inhibitor Leupeptin gehemmt werden können (Shen *et al.* 2004).

Die zweite Theorie oder der „Phagosom-zum-Zytosol-Weg“ geht von einer Translokation der Antigene vom Phagosom in das Zytosol aus (Kovacsovics-Bankowski und Rock 1995). Nachdem die Antigene das Zytosol erreicht haben, werden sie vom Proteasom gespalten, die Fragmente über TAP ins ER transportiert, dort auf MHC-I-Moleküle geladen und gelangen schließlich über Endosomen zur Zelloberfläche (Koch und Tampé 2006). Mitverantwortlich für den Transport der Antigene aus dem Phagosom könnte das donutartige Protein SEC61 sein, welches eine Pore in der Phagosomen-Membran bildet, durch die die Antigene aus dem Phagosom ins Zytosol gelangen (Koopmann *et al.* 2000, Römisch 1999). Dieser Weg der Kreuzpräsentation ist durch Proteasom-Inhibitoren, wie Lactacystin, hemmbar.

Die dritte Theorie oder der „Phagosom-zum-Zytosol-zum-Phagosom-Weg“ beruht auf der Entdeckung, dass auch normalerweise ER-ständige Proteine, wie MHC-I-Moleküle und TAP, in Phagosomen vorkommen (Ackerman *et al.* 2003). Dadurch können Antigene, die aus dem Phagosom ins Zytosol gelangen und anschließend durch das Proteasom fragmentiert werden, über den Phagosom-ständigen TAP wieder ins Phagosom aufgenommen, dort auf MHC-I-Moleküle geladen und schließlich zur Zelloberfläche transportiert werden (Guermontprez *et al.* 2003). Der Transport der MHC-I-Moleküle vom ER zum Phagosom ist bisher ungeklärt. Denkbar ist, dass MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche bei der Phagozytose ins Phagosom eingeschlossen werden oder dass sie durch die Fusion von ER und Phagosom dorthin gelangen, wobei die letztere Möglichkeit auch das Vorhandensein weiterer ER-ständiger Proteine, wie TAP und SEC61, im Phagosom erklären würde.

Die Kreuzpräsentation auf MHC-I-Molekülen ist eine wichtige Voraussetzung für die Induktion einer CTL-Immunantwort, wodurch Tumorzellen direkt zerstört werden. Weiterhin ist die Präsentation der Antigenfragmente auf MHC-II-Molekülen für die Aktivierung von T-Helferzellen nötig. In Abhängigkeit vom Reifungszustand der Phagosomen können phagozytierte partikuläre Antigene zunächst in weniger saurem Milieu der frühen

Phagosomen auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden. Anschließend erfolgt eine stärkere Ansäuerung der Phagosomen, wodurch die Präsentation über MHC-II-Moleküle ermöglicht wird (Burgdorf und Kurts 2008). PLGA-MP können durch die verzögerte Freisetzung der Antigene ihre Präsentation sowohl über MHC-I- als auch über MHC-II-Moleküle sicherstellen und verkapselte Antigene vor einer zu schnellen extra- und intrazellulären Degradation schützen. Die länger währende Bereitstellung der Antigene durch PLGA-MP ist hinsichtlich der Präsentationsdauer ebenfalls von Vorteil, weil MHC-Moleküle nur kurzzeitig auf der Oberfläche von DC für die Antigenpräsentation verfügbar sind und für eine dauerhafte Präsentation immer wieder neu mit Antigenfragmenten beladen werden müssen (Waeckerle-Men *et al.* 2006).

1.2.5 T-Zellantwort

Die Interaktion von DC mit naiven $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen kann zur Differenzierung dieser in funktionell unterschiedliche Effektor-T-Zellen führen. So können naive $CD4^+$ -T-Zellen in T_H1 -, T_H2 - oder T_H17 -Zellen differenzieren sowie in folliculäre T-Helferzellen (T_{FH} -Zellen) und regulatorische T-Zellen (T_{reg}). Naive $CD8^+$ -T-Zellen werden zu effektorischen zytotoxischen T-Lymphozyten, die andere Zellen, z. B. virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen, zerstören können.

Tumorspezifische CTL haben die Fähigkeit auch große metastasierende Tumore langanhaltend zu vermindern und auszulöschen (Dudley *et al.* 2002, Heslop *et al.* 1994, Yee *et al.* 2002). Dafür sollten die CTL in das Mikromilieu des Tumors eindringen, die auf den Tumorzellen präsentierten Peptid-MHC-I-Komplexe mit hoher Avidität erkennen und schließlich die Tumorzellen über die Ausschüttung von Granzymen und Perforinen zerstören (Appay *et al.* 2008). Ebenfalls essentiell für eine erfolgreiche Therapie sind die Induktion durch geeignete DC, die Art der induzierten T-Helferzellen, die Abwesenheit von aktiven T_{reg} und die Überwindung der immunsuppressiven Tumorumgebung (Zhang und Bevan 2011).

Regulatorische T-Zellen kontrollieren und unterdrücken die Immunreaktion und vermitteln somit Toleranz gegenüber den ihnen präsentierten Antigenen. Sie stellen eine heterogene Gruppe von T-Zellen dar, die einerseits natürlich vorkommen und ihre Aufgaben bei der Toleranzentwicklung im Thymus wahrnehmen, andererseits peripher aus naiven $CD4^+$ -T-Zellen nach Aktivierung durch DC entstehen können (adaptive T_{reg}). Regulatorische T-Zellen differenzieren in Effektorzellen, welche den Transkriptionsfaktor FOXP3 (*forkhead*

box protein 3) aufweisen, und können in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen immunsuppressive Zytokine, wie IL10 und TGF β (*transforming growth factor β*) ausschütten (Josefowicz *et al.* 2012). Da sie CTL inhibieren, sollte ihre Entstehung durch tolerogene DC für eine erfolgreiche Tumorthherapie vermieden werden (Ménétrier-Caux *et al.* 2009).

T_{FH}-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor BCL6 (*B-cell CLL/lymphoma 6*), helfen B-Zellen in Antikörper-ausschüttende Plasmazellen zu differenzieren und vermitteln so humorale Immunität (Crotty 2011).

T_H17-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR (*retinoic acid receptor-related orphan receptor*), schütten IL17, IL21 und IL22 aus und vermitteln hoch entzündliche Reaktionen bei der Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen, welche nicht selten zu einer Zerstörung des Gewebes führen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von vielen Autoimmunerkrankungen (Korn *et al.* 2009). Zudem konnten Muranski *et al.* 2008 im Mausmodell eine Eradikation von Melanomen durch *in vitro* vermehrte T_H17-Zellen zeigen, die im Wesentlichen von der Interferon γ -Ausschüttung der Zellen abhing.

Effektorische T_H2-Zellen produzieren IL4, IL5 und IL13 und vermitteln eine humorale Immunantwort gegen parasitäre Erreger, wie Helminthen. Sie weisen den Transkriptionsfaktor GATA3 auf. Pathologisch überwiegt v. a. bei allergischen Erkrankungen die T_H2-Immunantwort. T_H2-Zellen begünstigen die Tumorentwicklung direkt (Aspord *et al.* 2007) oder indirekt (DeNardo *et al.* 2009) durch die Stimulation von Makrophagen, die wiederum tumorfördernde Substanzen, wie EGF (*epidermal growth factor*), sezernieren (De Monte *et al.* 2011). Zudem können sie die Entstehung von CTL durch Ausschüttung von IL4 verhindern. Stattdessen entstehen zytotoxische T-Zellen vom Typ 2 (T_c2), welche aufgrund einer geringen Expression von Granzymen und Perforinen ungeeignet für die Zerstörung von Tumorzellen sind (Sasaki *et al.* 2008).

Im Gegensatz dazu induzieren T_H1-Zellen über die Ausschüttung von Interferon γ (IFN γ) eine zelluläre Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene, wie Viren, verschiedene Arten von Bakterien und Protozoen, aber auch gegen Tumorzellen. Sie exprimieren den Transkriptionsfaktor T-bet und sezernieren IL2. T_H1-Zellen können die Differenzierung und Expansion von tumorspezifischen CD8⁺-T-Zellen günstig beeinflussen (Pardoll und Topalian 1998) und sind für die Bildung von CD8⁺-T-Gedächtniszellen mitverantwortlich (Nishimura *et al.* 2000, Sun und Bevan 2003). Sie können tumornahe Makrophagen aktivieren und so das Tumorwachstum verhindern (Corthay *et al.* 2005).

Für eine effektive Tumormimmuntherapie mit DC sollten diese CTL sowie T_H1- oder T_H17-Zellen aktivieren, während eine Stimulation von T_{reg} oder T_H2-Zellen unerwünscht ist. Die Polarisation der naiven CD4⁺-T-Zellen kann dabei durch die DC über das oben beschriebene dritte Signal vermittelt werden (Kaliński *et al.* 1999a). Dieses bestimmt die Balance zwischen den verschiedenen T-Zell-Unterklassen. Welche T-Zell-polarisierenden Moleküle von den DC exprimiert werden, ist u. a. abhängig von der Art der Pathogene, welche die Reifung der DC auslösen, sowie von weiteren Mediatoren, die das Mikromilieu der DC betreffen. Die Pathogene werden anhand ihrer PAMP über PRR, wie TLR, von den iDC erkannt und beeinflussen die weitere Reifung, Expression von Oberflächenmolekülen und Ausschüttung von Zytokinen (Kapsenberg 2003). Beispielsweise fördern DC, die intrazellulären Erregern ausgesetzt wurden, T_H1-Antworten, während DC, die mit Helminthen interagierten, T_H2-Antworten auslösen (de Jong *et al.* 2002). Bestimmte Pathogene, wie *Candida albicans* (Montagnoli *et al.* 2002), *Plasmodium falciparum* (Urban und Roberts 2002) und *Bordetella pertussis* (McGuirk *et al.* 2002), können entweder die vollständige Reifung von iDC inhibieren oder die Reifung zu regulatorischen DC fördern und so eine T_{reg}-Antwort bewirken (Palucka und Bancherou 2002). Signale, die die Polarisation von naiven CD4⁺-T-Zellen in T_{reg} fördern, sind IL10, TGFβ, inhibitorische Moleküle der B7-Familie, z. B. PD-L1 (*programmed cell death ligand 1*, B7-H1), PD-L2 (B7-DC), B7-H3 und B7-H4 (Latchman *et al.* 2001, Selenko-Gebauer *et al.* 2003, Shin *et al.* 2003, Sica *et al.* 2003); Notch-Liganden, wie Jagged-1 (Hoyne *et al.* 2000, Yvon *et al.* 2003); sowie ILT3 (*immunoglobulin-like transcript 3*) und ILT4 (Vlad *et al.* 2009).

Hervorzuheben ist die immunsuppressive Wirkung von IL10. Dieses Zytokin verhindert die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen indem es die Phosphorylierung von CD28 und damit auch die weitere Signaltransduktion hemmt (Joss *et al.* 2000). Zudem fördert es die Entwicklung von T_{reg}, welche die Aktivierung anderer T-Zellen verhindern (Levings *et al.* 2001). IL10 unterbindet die vollständige Reifung von DC, deren MHC-II-Expression (de Waal Malefyt *et al.* 1991) sowie die Bildung von IL12 (Steinbrink *et al.* 1997). Mit IL10 behandelte DC reifen zu regulatorischen DC, die ihrerseits T_{reg} induzieren. IL10 nimmt somit eine Schlüsselstellung bei der Induktion von Toleranz gegen Tumore ein, weshalb eine Produktion durch DC-basierte Tumorstoffe verhindert werden sollte (Sato *et al.* 2011).

Für die Polarisation von naiven CD4⁺-T-Zellen in T_H2-Zellen ist einerseits eine verminderte Ausschüttung von Zytokinen der IL12-Familie nötig (Jankovic *et al.* 2000, Kuipers *et al.* 2004), andererseits sind weitere T_H2-polarisierende Faktoren, wie IL4 (Paul und Zhu 2010) und OX40-Ligand (OX40L, CD252) (de Jong *et al.* 2002, Jenkins *et al.* 2007), bedeutsam.

T_H1-polarisierende Faktoren sind die Zytokine der IL12-Familie, wie IL12, IL23 und IL27 (Trinchieri 2003), die Typ-I-Interferone IFN α und IFN β (Bracci *et al.* 2008), IL18 (Swain 2001) sowie der Integrin-Ligand ICAM1 (*intercellular adhesion molecule 1*, CD54) (Smits *et al.* 2002). Hierbei stellt IL12 vermutlich den stärksten T_H1-polarisierenden Faktor dar (Athie-Morales *et al.* 2004, Robinson und O'Garra 2002). Biologisch wirksam ist IL12p70, welches aus einer leichten (p35) und einer schweren Kette (p40) besteht, die kovalent miteinander verbunden sind. DC sezernieren IL12 nach der Interaktion mit verschiedenen Pathogenen bzw. den von ihnen exprimierten PAMP, z. B. Lipopolysaccharide (LPS), virale DNA oder doppelsträngige RNA, wobei das Ausmaß der IL12-Ausschüttung von der Art der Pathogene bzw. PAMP abhängig ist. Dabei führt die lokale IL12-Wirkung zu einer Entzündungsreaktion und induziert die IFN γ -Bildung durch natürliche Killerzellen oder durch CD4⁺-T-Zellen. Für eine effektive Polarisation der T-Zellen sollte die IL12-Ausschüttung durch DC erst in der T-Zellzone der sekundären lymphatischen Gewebe erfolgen, wofür u. a. die Interaktion zwischen CD40 und von der T-Zelle nach Doppelstimulation bereitgestelltem CD40-Liganden verantwortlich ist. Die IL12-Sekretion durch DC erfolgt nur kurzzeitig nach der Stimulation durch IL12-induzierende PAMP oder Zytokine. Reifen die DC vollständig, so reagieren sie vermindert auf PAMP oder andere Auslöser der IL12-Bildung, wie IFN γ (Kaliński *et al.* 1999b). Dieses Phänomen wird auch „Auszehrung“ oder „Paralyse“ genannt und verhindert eine langanhaltende Produktion von IL12 durch DC (Langenkamp *et al.* 2000, Reis e Sousa *et al.* 1999). Dementsprechend sollte die Ausschüttung von IL12 durch DC-basierte Tumorstoffe erst nach geeigneter Stimulation auslösbar sein, aber nicht bereits vor der Anwendung erfolgen.

1.3 Toll-like Rezeptoren

1.3.1 Überblick

Dendritische Zellen, aber auch andere Zellen des Immunsystems, können Pathogene anhand von PAMP über PRR detektieren, was nach anschließender Signaltransduktion zur Bildung und Ausschüttung von Zytokinen führt (Akira *et al.* 2006). Die TLR stellen die am besten untersuchte Gruppe der keimbahnkodierten PRR dar. Dabei unterscheiden TLR zwischen „Fremd“ und „Selbst“ und erkennen eine Vielzahl von mikrobiellen Strukturen relativ unspezifisch, welche aber von essentieller Bedeutung für die Mikroorganismen sind. Eine Veränderung der Strukturen, die eine TLR-Erkennung verhindern würde, ist ohne schwerwiegende Folgen für die Mikroorganismen nicht möglich. Durch die TLR kann das angeborene Immunsystem schnell auf eine mögliche Bedrohung des Organismus reagieren bevor das adaptive Immunsystem wirksam wird. Zusätzlich kann der Ablauf der später einsetzenden adaptiven Immunantwort in Abhängigkeit von der Art der Pathogene beeinflusst werden (Takeda *et al.* 2003). Benannt wurden die TLR aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu den Translationsprodukten des Gens „Toll“, welches für die frühe Embryonalentwicklung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wichtig ist. Das von der Arbeitsgruppe um die Biologin Christiane Nüsslein-Volhard entdeckte Gen spielt zudem eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von Pilzkrankungen (Lemaitre *et al.* 1996). Im Menschen wurden bisher zehn TLR (TLR1-TLR10) nachgewiesen, während in der Maus zwölf TLR (TLR1-TLR9 und TLR11-TLR13) existieren, wobei muriner TLR10 aufgrund einer retroviralen Insertion nicht funktional ist.

TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind in intrazellulären Vesikeln, wie dem endoplasmatischen Retikulum, den Endosomen, den Lysosomen und den Endolysosomen, lokalisiert. Sie erkennen v. a. Nukleinsäuren, welche aus Viren oder phagozytierten Pathogenen freigesetzt wurden. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10 sind vorwiegend in der Zytoplasmamembran lokalisiert und erkennen extrazelluläre Pathogene, wobei die Erkennung und Signaltransduktion auch nach der Internalisierung der Pathogene erfolgen kann. So erkennen TLR4 Lipopolysaccharide aus bakteriellen Zellwänden, TLR5 bakterielles Flagellin und TLR2 in Kombination mit TLR1 oder TLR6 bakterielle Lipoproteine und Lipoteichonsäuren (Abb. 1-3, Tab. 1-1, Kawai und Akira 2010). TLR können neben mikrobiellen Stimuli auch durch endogene Liganden, wie Hitzeschockproteine

Einleitung

und Fibrinogen, sowie synthetische Agonisten, z. B. LP (Pam₂CysSK₄, Pam₃CysSK₄), Nukleinsäuren [CpG-ODN, Poly(I:C)] und Imidazochinoline (Imiquimod, Resiquimod), aktiviert werden (Tab. 1-1).

Tab. 1-1. TLR-Lokalisation und -Expression in verschiedenen APC sowie TLR-Liganden modifiziert nach Lee *et al.* 2012, Schreibelt *et al.* 2010 sowie Zarembler und Godowski 2002.

| TLR | Zelluläre Lokalisation | TLR-Liganden | | Expression | | | |
|-----|------------------------|---|---|------------|-----|--------|-------------------------|
| | | physiologisch | synthetisch | myDC | pDC | huMoDC | PMA-THP-1 ^{a)} |
| 1 | Plasmamembran | TLR2/1: triacylierte LP | BAS, Pam ₃ CysSK ₄ | + | ± | + | ++ |
| 2 | Plasmamembran | Peptidoglykane, Phospholipomannane, tGPI-Mucin, Hämagglutinin, Porine, Lipoarabinomannane, Glucuronoxylomannane, HMGB1 | Siehe TLR2/1 und TLR2/6 | ++ | - | ++ | ± |
| 3 | Endosom | dsRNA | Poly(I:C) | ++ | - | + | ± |
| 4 | Plasmamembran | LPS, VSV- Glykoprotein G, RSV-Fusionsprotein, MMTV-Hüllprotein, Mannane, Glucuronoxylomannane, Glycosylinositolphospholipide, HSP60, HSP70, Fibrinogen, Nickel, HMGB1 | sMPLA | + | - | ++ | + |
| 5 | Plasmamembran | Flagellin | | + | - | + | - |
| 6 | Plasmamembran | TLR2/6: diacylierte LP, LTA, Zymosan | FSL1, MALP2, Pam ₂ CysSK ₄ | + | - | ± | + |
| 7 | Endosom | ssRNA | Imiquimod, Resiquimod, Loxoribin | + | ++ | ± | + |
| 8 | Endosom | ssRNA | Resiquimod | ± | - | + | + |
| 9 | Endosom | DNA, Hämозoin | CpG-A, CpG-B und CpG-C ODN | - | +++ | - | - |
| 10 | Plasmamembran | n. b. | n. b. | + | + | - | - |

a) TLR-mRNA-Expression infolge der Stimulation von THP-1-Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)

Abkürzungen: BAS: synthetisches Analogon eines LP aus *Bacillus cereus* (*Bacillus anthracis strain*), dsRNA: doppelsträngige RNA, FSL1: S-(2,3-bispalmitoyloxypropyl)-CGDPKHSPKSF, HMGB 1: *High-Mobility-Group-Box-1*-Protein, HSP: Hitzeschock-Protein, LPS: Lipopolysaccharide, LTA: Lipoteichonsäure, MALP2: 2 kDa schweres Makrophagen-aktivierendes LP, MMTV: Maus-Mammatumovirus, myDC: myeloide DC, n. b.: nicht bestimmt, ODN: Oligodesoxynukleotide, pDC: plasmazytoide DC, Poly(I:C): Polyinosin-Polycytidin-Säure, RSV: Respiratorischer-Synzytial-Virus, sMPLA: synthetisches Monophosphoryl-Lipid A, ssRNA: einzelsträngige RNA, tGPI-Mucin: *Trypanosoma cruzi* Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Mucin-artiges Glykoprotein, VSV: Vesikular-Stomatitis-Virus

TLR sind hufeisenförmige, transmembranäre Proteine vom Typ-I, deren Ektodomäne Leucin-reiche Wiederholungen (*leucin-rich repeats*) enthält und über die PAMP detektiert wird. Die transmembranäre Domäne und die zytoplasmatische Toll-Interleukin-1-Rezeptor(TIR)-Domäne sind für die nachgeschaltete Signaltransduktion nach erfolgter

Ligandenbindung und Rezeptor-Dimerisierung verantwortlich (Kang und Lee 2011). Initiiert wird die Signaltransduktion durch die Rekrutierung von sog. Adapterproteinen (Abb. 1-3).

Vier verschiedene dieser Adapterproteine, nämlich MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*), TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*, syn. Mal), TRIF (*TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β* , syn. TICAM1) und TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*, syn. TICAM2), können über TIR-Domänen assoziiert werden. Die verschiedenen TLR unterscheiden sich hinsichtlich der verwendeten Adapterproteine, wobei MyD88 und TRIF auf unterschiedlichen Wegen der Signaltransduktion zur Bildung verschiedener Zytokine führen. Hingegen sind TIRAP und TRAM für die Zuordnung der anderen beiden Adapterproteine zu den jeweiligen Rezeptoren verantwortlich (Barton und Kagan 2009).

Alle TLR verwenden MyD88 als Adapter, ausgenommen TLR3, der TRIF verwendet. TLR5, TLR7, TLR8 und TLR9 nutzen ausschließlich MyD88 als Adapter. TLR2 bildet mit TLR1 oder TLR6 Heterodimere und benötigt für die Rekrutierung von MyD88 zusätzlich TIRAP. TLR4 ist der einzige TLR, der sowohl MyD88-abhängige Signalwege, als auch TRIF-abhängige Signalwege aktivieren kann. Welcher Signalweg aktiviert wird, hängt von der Lokalisation des TLR ab. Befindet sich der TLR4 in der Zytoplasmamembran, so rekrutiert dieser nach Interaktion mit seinem Liganden MyD88 über TIRAP. Eine sich anschließende Endozytose von TLR4 führt zur Rekrutierung von TRIF über TRAM (Abb. 1-3, Barton und Kagan 2009). Beide Signalwege sind für die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen nach TLR4-Aktivierung nötig (Kawai und Akira 2010).

In Makrophagen und klassischen DC führen die MyD88-abhängigen Signalwege über die Aktivierung von mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) und dem Transkriptionsfaktor Nf κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen, darunter IL6 und TNF α . TRIF-abhängige Signalwege aktivieren neben Nf κ B auch den Transkriptionsfaktor IRF3 (*interferon-regulatory factor 3*), welcher zur Bildung von Interferonen des Typs I führt. In pDC führt die Ligation von TLR7 und TLR9 über MyD88-abhängige Signalwege zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Nf κ B und IRF7, was ebenfalls die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen und Typ-I-Interferonen induziert (Kawai und Akira 2010).

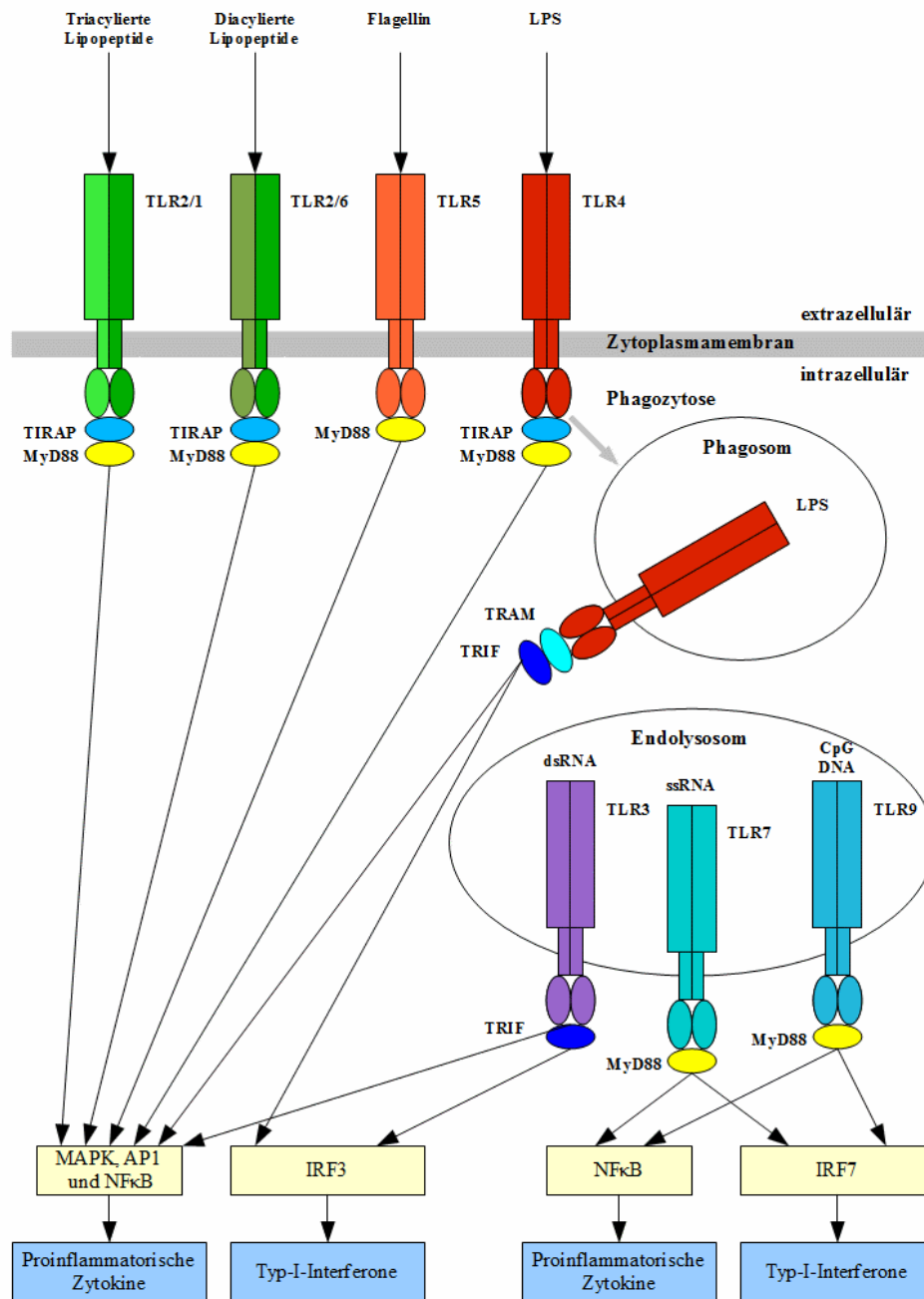


Abb. 1-3. Lokalisationen und physiologische Funktionen von TLR. TLR sind Transmembranproteine, die PAMP extrazellulär (TLR2/1, 2/6, 4, 5) oder intrazellulär (TLR3, 4, 7, 9) erkennen. Die Aktivierung der TLR führt zur Rekrutierung von Adapterproteinen, wie MyD88, TRIF, TRAM und TIRAP, die über die zytosomatischen TIR-Domänen an die TLR assoziiert sind. Alle TLR rekrutieren MyD88 als Adapterprotein, außer TLR3, der TRIF verwendet. TLR4 aktiviert abhängig von seiner Lokalisation extrazellulär die MyD88-abhängige Signaltransduktion oder nach erfolgter Internalisierung die TRIF-abhängige Signaltransduktion. Die Signaltransduktion kann zur Aktivierung von MAPK und verschiedenen Transkriptionsfaktoren, darunter NFκB, AP1, IRF3 und IRF7, führen, die die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen oder Typ-I-Interferonen (IFN α und IFN β) veranlassen.

Die Expression der TLR und die Folgen der TLR-Aktivierung unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Zelltypen und DC-Unterklassen (Tab. 1-1, Schreibelt *et al.* 2010). Hierbei zeigen huMoDC und myeloide BDCA1⁺-DC (BDCA, *blood dendritic cell antigen*) ähnliche TLR-Expressionsprofile, hinsichtlich der extrazellulären TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 sowie der intrazellulären TLR3 und TLR8. Die Aktivierung der TLR führt in beiden DC-Typen zur Reifung und Produktion von proinflammatorischen Zytokinen.

Matsumoto *et al.* zeigten 2003, dass myeloide BDCA1⁺-DC und unreife huMoDC TLR2, TLR3 und TLR4 exprimieren. Die Stimulation von TLR4 durch LPS führt in beiden DC zur Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL12, wobei nur in huMoDC zusätzlich Typ-I-Interferone über die intrazelluläre TRIF-abhängige Aktivierung von TLR4 sezerniert werden (Ito *et al.* 2002, Means *et al.* 2003). TLR1, TLR2 und TLR6 werden ebenfalls von huMoDC und myeloiden DC exprimiert (Jarrossay *et al.* 2001). Die Aktivierung der TLR2/1- bzw. TLR2/6-Heterodimere führt zur Reifung der DC und zur Ausschüttung von verschiedenen Zytokinen, z. B. IL6, IL8, IL10, IL12 und TNF α (Schreibelt *et al.* 2010). HuMoDC und humane myeloide DC exprimieren im Gegensatz zu murinen DC keinen TLR9 und werden durch TLR9-Liganden nicht aktiviert. Daher sind die vielversprechenden Versuche mit TLR9-Liganden bei DC-Krebsimpfstoffen im Mausmodell nicht auf den Menschen übertragbar. TLR9 wird nur von humanen pDC exprimiert, welche nach TLR9-Stimulation durch unmethylierte CpG-DNA hohe Mengen an Typ-I-Interferonen ausschütten, was zu einer antiviralen Immunreaktion führt. Weiterhin exprimieren pDC TLR7, der virale einzelsträngige RNA erkennt, und TLR10, dessen Funktionen und Liganden bisher unbekannt sind (Schreibelt *et al.* 2010). Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Modifizierung von PLGA-MP mit TLR2/1-, TLR2/6- und TLR4-Liganden, weshalb im Weiteren auf diese TLR und ihre Agonisten näher eingegangen wird. Zudem werden als Testsystem für die TLR-Aktivierung makrophagenähnliche THP-1-Zellen verwendet, da diese die entsprechenden TLR exprimieren und nach TLR-Stimulation proinflammatorische Zytokine sezernieren (Tab. 1-1, Zarembek und Godowski 2002).

1.3.2 TLR2/1, TLR2/6 und deren Agonisten

TLR2 wird durch viele verschiedene mikrobielle Produkte aktiviert; darunter bakterielle, wie Lipoproteine und Peptidoglykane; pilzartige, z. B. Zymosan und Phospholipomannane; sowie virale Komponenten, beispielsweise Hämagglutinin (Masernvirus) und *Herpes simplex*

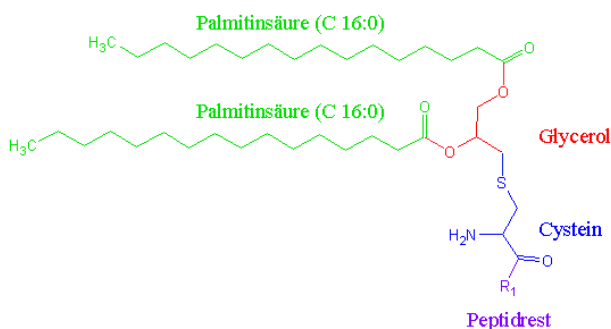
(Zähringer *et al.* 2008). TLR2 kann mit TLR1 oder TLR6 Heterodimere bilden, wobei der jeweilige Dimerisierungspartner ligandenspezifisch ist. So bindet TLR2/1 bevorzugt triacylierte Lipoproteine, während TLR2/6 durch diacylierte Lipoproteine aktiviert wird. Die Lipoproteine sind in bakteriellen Zellwänden verankert und entstehen durch die posttranslationale Modifizierung von extrazellulären N-terminalen Cystein-Resten mit Diacylglycerolen, wobei diacylierte Lipoproteine entstehen, die für grampositive Bakterien und Mykoplasmen charakteristisch sind. Hingegen zeigen Lipoproteine von gramnegativen Bakterien häufig eine dritte Acylierung, welche an der Aminogruppe des Cysteins durch eine N-Acyltransferase erfolgt (Schenk *et al.* 2009). Synthetische LP ahmen den N-Terminus der bakteriellen Lipoproteine nach, wobei an das zentrale Strukturelement S-Glycerylcystein zumeist zwei (Pam₂Cys) bzw. drei (Pam₃Cys) Palmitinsäurereste gebunden sind. Diacylierte synthetische LP binden die Fettsäuren über Ester an das Glycerol, während bei triacylierten LP die dritte Fettsäure über eine Amidbindung an das Cystein gekoppelt ist (Abb. 1-4). Das acylierte S-Glycerylcystein stellt das wesentliche immunstimulatorische Motiv der LP dar (Bessler *et al.* 1985, Seifert *et al.* 1990, Wiesmüller *et al.* 1992). Der Peptidteil ist nur in untergeordnetem Maße für die Aktivierung der TLR verantwortlich und moduliert die Immunantwort und Rezeptordimerisierung.

LP, die in Verbindung mit Antigenen eingesetzt werden, induzieren erstens die Reifung von DC, d. h. die vermehrte Expression von MHC-II-Molekülen, des Reifungsmarkers CD83 und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 (Chua *et al.* 2003, Hertz *et al.* 2001). Zweitens stimulieren sie Makrophagen proinflammatorische Zytokine auszuschütten, z. B. TNF α und IL6 (Mühlradt und Schade 1991). Drittens fördern sie die Reifung und Aktivierung von B-Zellen und steigern die Produktion von antigenspezifischen IgG und IgM (Borsutzky *et al.* 2005) und viertens verbessern sie die CTL-Antwort (Deres *et al.* 1989). Synthetische LP wurden bereits in allen relevanten Tiermodellen und verschiedenen klinischen Studien untersucht. Bisher wurden dabei keine toxischen oder andere schwerwiegende Nebenwirkungen beobachtet. Sie können in großen Mengen GMP-konform und reproduzierbar hergestellt werden, sind chemisch stabil und einfach zu lagern (Spohn *et al.* 2004). Deshalb sind sie interessante Kandidaten für den Einsatz als immunologische Adjuvanzen in Impfstoffen.

Pam₂CysSK₄ und Pam₃CysSK₄ sind einfache di- bzw. triacylierte synthetische LP, deren Peptidteil aus Serin und vier Lysin besteht (Abb. 1-4). Die Kristallstruktur des Komplexes

des TLR2/1-Heterodimers mit Pam₃CysSK₄ entspricht dem Buchstaben „m“. Die N-terminalen Domänen zeigen nach außen, während die C-terminalen Domänen in der Mitte zusammentreffen. Die Bindungsstellen für Pam₃CysSK₄ befinden sich zwischen der zentralen und der C-terminalen Region des TLR2/1-Heterodimers, wobei die beiden an das Glycerol gebundenen Fettsäuren eine weiträumige hydrophobe Bindungstasche am TLR2 besetzen, während die dritte verbleibende Fettsäure sich in einem engen hydrophoben Kanal im TLR1 positioniert. Durch die Dimerisierung von TLR2 und TLR1 wird so eine gemeinsame hydrophobe Bindungstasche für das triacylierte LP geschaffen, welches die beiden TLR-Monomere über die drei Fettsäuren verbindet. Die Stabilität des TLR2-TLR1-Pam₃CysSK₄-Komplexes wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem TLR2/1-Heterodimer und Glycerol bzw. dem Peptidrückgrat des LP weiter verbessert (Jin *et al.* 2007).

a)



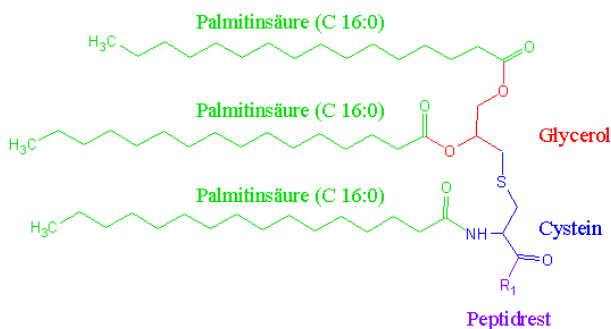
Peptidrest

Pam₂CysSK₄: R₁-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys

FSL1: R₁-Gly-Asp-Pro-Lys-His-Pro-Lys-Ser-Phe

MALP2: R₁-Gly-Asn-Asn-Asp-Glu-Ser-Asn-Ile-Ser-Phe-Lys-Glu-Lys

b)



Peptidrest

Pam₃CysSK₄: R₁-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys

OspA: R₁-Asp-Thr-Asp-Ser-Ser-Ala-Ala-Thr-Lys-Lys-Thr-Ala

BAS: R₁-Ala-Gln-Glu-Lys-Glu-Ala-Lys-Ser-Glu-Leu-Asp-Tyr-Asp-Lys-Lys-Lys

Abb. 1-4. Chemische Strukturen von synthetischen LP. - a) diacylierte LP; b) triacylierte LP.

TLR6 bildet, ähnlich wie TLR1, mit TLR2 ein „m“-förmiges Heterodimer nach der Bindung von diacylierten LP, wie Pam₂CysSK₄. Im Gegensatz zu TLR1 ist bei TLR6 der hydrophobe Bindungskanal für die dritte amidgebundene Fettsäure durch zwei Phenylalanine blockiert, was die Spezifität des TLR2/6-Heterodimers für diacylierte LP bedingt (Kang *et al.* 2009).

Die Erkennung von LP durch TLR2/1- bzw. TLR2/6-Heterodimere ist an bestimmte strukturelle Voraussetzungen der LP geknüpft, die Kang und Lee 2011 zusammenfassend dargestellt haben. Dabei stellt die Interaktion der beiden an das Glycerol gebundenen Fettsäuren mit der hydrophoben Bindungstasche des TLR2 die wesentliche Triebkraft für die Ligandenbindung dar. Erforderlich für eine Aktivierung von humanem TLR2 sind zwei Fettsäuren mit zwölf oder mehr Kohlenstoffatomen, die aufgrund der großen Bindungstasche auch Z-Doppelbindungen enthalten oder verzweigt sein können. Weiterhin sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Glycerol bzw. Peptidrückgrat des Liganden und den beiden TLR-Monomeren für die Heterodimerisierung wichtig, ohne die keine Aktivierung von TLR2/1 bzw. TLR2/6 erfolgt. Bei triacylierten LP sollte die amidgebundene Fettsäure für eine TLR2/1-Aktivierung mindestens acht oder mehr Kohlenstoffatome aufweisen. Der Peptidteil der LP hat den geringsten Einfluss auf die TLR2-Bindung und die Heterodimerisierung, wobei das N-terminale Cystein essentiell für die kovalente Bindung und Positionierung des Diacylglycerols ist, hydrophobe Bindungsstellen mit dem Schwefelatom auf den TLR besetzt und deshalb nicht austauschbar ist. Die dem Cystein nachfolgende Aminosäure sollte klein sein, z. B. Glycin, Alanin oder Serin, damit sie in den engen Kanal zwischen den TLR-Monomeren passt, der durch die Ligandenbindung und Dimerisierung über der Bindungstasche entstanden ist. Die Aminosäuresequenz nach der dritten Aminosäure ist variabel. Diese Aminosäurereste interagieren nur noch schwach mit den TLR, modulieren die Immunantwort und sind für die Wahl des Dimerisationspartners für TLR2 mitverantwortlich.

Komplexere diacylierte synthetische LP stellen FSL1 (*fibroblast-stimulating lipopeptide 1*) und FSL2 dar (Abb. 1-4). FSL1 entspricht dem N-Terminus eines 44 kDa schweren Lipoproteins aus *Mycoplasma salivarium*. FSL2 unterscheidet sich von FSL1 lediglich durch die C-terminale Aminosäure Arginin, die das in FSL1 vorhandene Phenylalanin ersetzt. Dieser Austausch führt zu einem Anstieg des isoelektrischen Punktes und zur Einführung einer bei neutralem pH-Wert stark positiv geladenen Guanidgruppe in den Peptidteil, aber ebenfalls zu einer geringeren Aktivierung von NFκB in THP-1-Zellen und TLR-transfizierten HEK293-

Zellen durch FSL2 (Okusawa *et al.* 2004). Die hydratisierte positiv geladene Guanidingruppe verhindert vermutlich die hydrophoben Wechselwirkungen des Peptidteils des Liganden mit dem TLR und moduliert somit die TLR-Aktivierung. FSL1 zeigt große Ähnlichkeit zu dem von Mühlradt *et al.* 1997 synthetisierten 2 kDa schweren mykoplasmatischen LP MALP2 (*macrophage-activating lipopeptide of 2 kDa molecular mass*, Abb. 1-4). Das aus *Mycoplasma fermentans* stammende LP weist ebenfalls Pam₂Cys als Grundstruktur auf und aktiviert Makrophagen. Das *RR*-Stereoisomer, welches auch der natürlichen Konformation der Lipoproteine entspricht, ist aktiver als das *RS*-Stereoisomer (Takeuchi *et al.* 2000). Es ist aber FSL1 hinsichtlich der immunstimulierenden Potenz unterlegen (Okusawa *et al.* 2004). MALP2 stimuliert die Expression des Reifungsmarkers CD83 in huMoDC und erhöht die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 sowie der MHC-I-Moleküle HLA-ABC. MALP2 reduziert die Endozytose-Kapazität von huMoDC und führt zur Ausschüttung von TNF α und IL10 (Weigt *et al.* 2003). Zudem wurde MALP2 intratumoral bei zehn Patienten mit Pankreaskarzinom in einer Phase I/II-Studie eingesetzt (Schmidt *et al.* 2007). Hierbei wurden 20 μ g MALP2 gut toleriert und keine unerwünschten systemischen Wirkungen festgestellt.

Zu den komplexeren triacylierten synthetischen LP gehören Analoga von OspA (*outer surface protein A*) aus *Borrelia burgdorferi*, die kovalent an Pam₃Cys gekoppelt wurden (Abb. 1-4). Das lipidierte OspA wurde in LYMERixTM, einem Impfstoff gegen die von Spirochäten hervorgerufene Lyme-Borreliose, an über 20000 Menschen getestet. Nach dreimaliger Impfung zeigten über 75 % der Probanden eine Serokonversion und schützende IgG-Titer. Der Impfstoff wurde gut vertragen. So berichteten Lathrop *et al.* 2002 von 905 Fällen mit milden selbstlimitierenden Reaktionen und 59 Fällen mit Impfstoff-assoziiierter Arthritis bei über 1,4 Millionen Impfdosen.

Ein weiteres triacyliertes synthetisches LP ist BAS, das aus Pam₃Cys und einem Hexadecapeptid besteht, welches dem N-Terminus eines Lipoproteins aus *Bacillus cereus* entspricht (Abb. 1-4). Die immunstimulatorische Aktivität von gelöstem BAS und liposomal verkapseltem BAS untersuchte Wessinger 2010 an THP-1-Zellen. Die Aktivierung von THP-1-Zellen wurde anhand der Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF α gemessen. In der Standardkonzentration eingesetztes gelöstes BAS (10 ng/ml) bewirkte ca. 1/3 der TNF α -Ausschüttung, die durch LPS (10 ng/ml) erreicht wurde. Liposomal

verkapseltes BAS (100 ng/ml) zeigte gegenüber gelöstem BAS (10 ng/ml) erst bei einer 10fach höheren Konzentration eine vergleichbare Ausschüttung von TNF α .

1.3.3 TLR4 und dessen Agonisten

TLR4 erkennt zusammen mit seinem Kofaktor MD2 (*myeloid differentiation protein 2*, syn. LY96) LPS von gramnegativen Bakterien. MD2 ist ein lösliches Glykoprotein, welches sich an die extrazelluläre Domäne von TLR4 anlagert und im Verhältnis 1:1 mit TLR4-Monomeren ein stabiles Heterodimer bildet. Es wird für die Expression von TLR4 auf der Zelloberfläche benötigt und ist essentiell für die TLR4-abhängige zelluläre Antwort nach LPS-Stimulation *in vivo*. So zeigen MD2-negative B-Zellen, Makrophagen und DC eine stark verminderte Reaktion auf LPS. Ein weiterer Kofaktor, der die TLR4-abhängige zelluläre Antwort auf LPS vermittelt, ist das lösliche LBP (*LPS-binding protein*), welches an LPS bindet und damit die Anlagerung an CD14 und die TLR4-Erkennung verbessert (Lee *et al.* 2012).

LPS bestehen aus lipidierten Kohlenhydraten und befinden sich in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien, wie *Escherichia coli* oder *Salmonella*-Arten (Raetz und Whitfield 2002). Bei der Zerstörung der Bakterien werden LPS frei und induzieren eine starke Immunantwort, die einerseits den Organismus vor der Infektion mit Bakterien schützt. Andererseits kann eine überschießende Immunantwort zum septischen Schock führen. Die dafür verantwortlichen Substanzen werden auch als Endotoxine bezeichnet, da ihr Namensgeber Richard Pfeiffer (1858-1945) diese hitzestabilen Komponenten im Inneren von Bakterienzellen vermutete und sie für die Ursache der Symptome von bakteriellen Erkrankungen hielt (Beutler und Rietschel 2003). Später stellte sich heraus, dass die Hauptkomponente der Endotoxine LPS waren. LPS bestehen nicht aus einem einzelnen chemischen Molekül sondern sind eher ein Gemisch verschiedener Moleküle, die sich in ihrer Struktur voneinander unterscheiden (Raetz und Whitfield 2002). Hierbei produzieren verschiedene Bakterien unterschiedliche Arten von LPS, zum Teil differieren die Strukturen auch bei den gleichen Bakterien unter voneinander abweichenden Wachstumsbedingungen. LPS bestehen im Wesentlichen aus drei Strukturkomponenten: Lipid A, einer Kernregion aus Kohlenhydraten und einem variablen Polysaccharid, welches das O-Antigen des Bakteriums darstellt (Abb. 1-5).

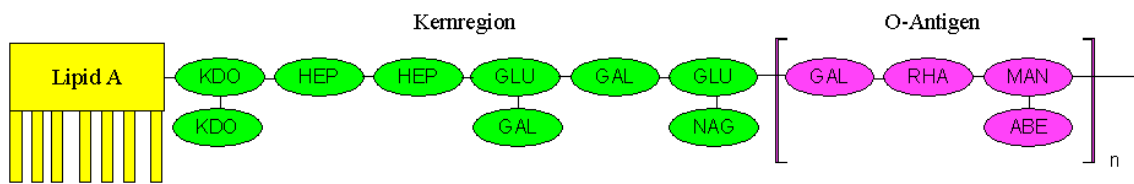


Abb. 1-5. Schematische Darstellung von LPS aus *Salmonella typhimurium* modifiziert nach Ernst *et al.* 1999 und Rietschel *et al.* 1994. ABE: Abequose (3,6-Didesoxy-D-galactose), GAL: Galactose, GLU: Glucose, HEP: L-Glycero-D-Mannoheptose, KDO: 2-Keto-3-desoxyoctonsäure, MAN: Mannose, NAG: N-Acetyl-glucosamin, RHA: Rhamnose.

Lipid A setzt sich aus mehreren langkettigen Fettsäuren zusammen, die über Esterbindungen an ein Rückgrat aus zwei Glucosaminen gebunden sind. Es lässt sich durch milde saure Hydrolyse von der Kernregion abspalten und ist hauptsächlich für die immunologischen Eigenschaften von LPS verantwortlich (Galanos *et al.* 1985). Die Glucosamine des Lipid A-Rückgrats sind miteinander über β -1-6-glykosidische Bindungen verbunden. An das Disaccharid sind vier bis sieben Fettsäuren, die 12-14 Kohlenstoffatome lang sind, über Ester oder Amide gebunden (Abb. 1-6). Lipid A ist aufgrund der Phosphatgruppen in 1- und 4'-Position des Glucosamin-Rückgrats negativ geladen. In verschiedenen Bakterienarten variieren die Anzahl und Struktur der Fettsäuren. Weiterhin können die Phosphatgruppen kovalent mit weiteren Phosphatgruppen, Phosphoethanolamin und 4-Amino-4-deoxy-L-Arabinose modifiziert sein. Die Kernregion besteht aus Kohlenhydraten, wie KDO (2-Keto-3-desoxyoctonsäure, syn. 3-Desoxy-D-manno-oct-2-ulosonsäure), HEP (L-Glycero-D-Mannoheptose), Glucose, Galactose und N-Acetylglucosamin, und hat einen modulierenden Einfluss auf die immunologische Aktivität. Das sich an die Kernregion anschließende lange Polysaccharid oder O-Antigen besteht aus sich wiederholenden Einheiten und ist sehr variabel. Die Struktur und Anzahl der sich wiederholenden Einheiten unterscheiden sich bei verschiedenen Bakterienarten und -stämmen (Erridge *et al.* 2002, Rietschel *et al.* 1994).

Die Bindung von LPS an TLR4-MD2-Heterodimere induziert deren Dimerisierung und ermöglicht so die Signaltransduktion ins Zellinnere. Dabei sind die hydrophoben Fettsäurereste und die hydrophilen Phosphatgruppen des Lipid A für die Dimerisierung von entscheidender Bedeutung. Für eine optimale Dimerisierung und immunologische Aktivierung sind sechs Fettsäurereste mit 12-14 Kohlenstoffatomen nötig. Bereits eine Fettsäure mehr oder weniger führt zu einer Reduktion der inflammatorischen Aktivität um das 100fache. Fehlen zwei Fettsäuren, so zeigt LPS keine agonistische Aktivität an TLR4 mehr.

Ebenso führt das Entfernen einer Phosphatgruppe zur Reduktion der LPS-Aktivität. Die Kernregion und das O-Antigen werden für die Dimerisierung der TLR4-MD2-Heterodimere nicht benötigt und sind für die inflammatorischen Wirkungen von LPS vernachlässigbar. Sie beeinflussen aber die physikochemischen Eigenschaften von LPS und interagieren mit Proteinen, die den Transport und Abbau von LPS bewerkstelligen (Kang und Lee 2011).

Aus Bakterien isoliertes LPS bzw. Lipid A kann mit weiteren immunologisch aktiven Substanzen verunreinigt sein, die u. a. TLR2 aktivieren können (Hirschfeld *et al.* 2000, Lee *et al.* 2002). Zudem weisen diese Substanzen eine hohe inflammatorische Toxizität auf, die zum septischen Schock führen kann. Deshalb werden als Impfstoff-Adjuvantien hoch gereinigte oder synthetische Derivate des Lipid A eingesetzt, bei denen zur Reduktion der Toxizität eine Phosphatgruppe entfernt wurde (Johnson 1994). Ein Beispiel hierfür ist synthetisches Monophosphoryl-Lipid A (sMPLA) aus *E. Coli*, welches lediglich eine Phosphatgruppe in 4'-Position aufweist und sechs Myristinsäure-Reste (C14) enthält (Abb. 1-6). Damit ist es aktiver als natürliches MPLA aus *E. Coli*, da dieses ein Gemisch aus MPLA mit fünf, sechs oder sieben Myristinsäure-Resten darstellt.

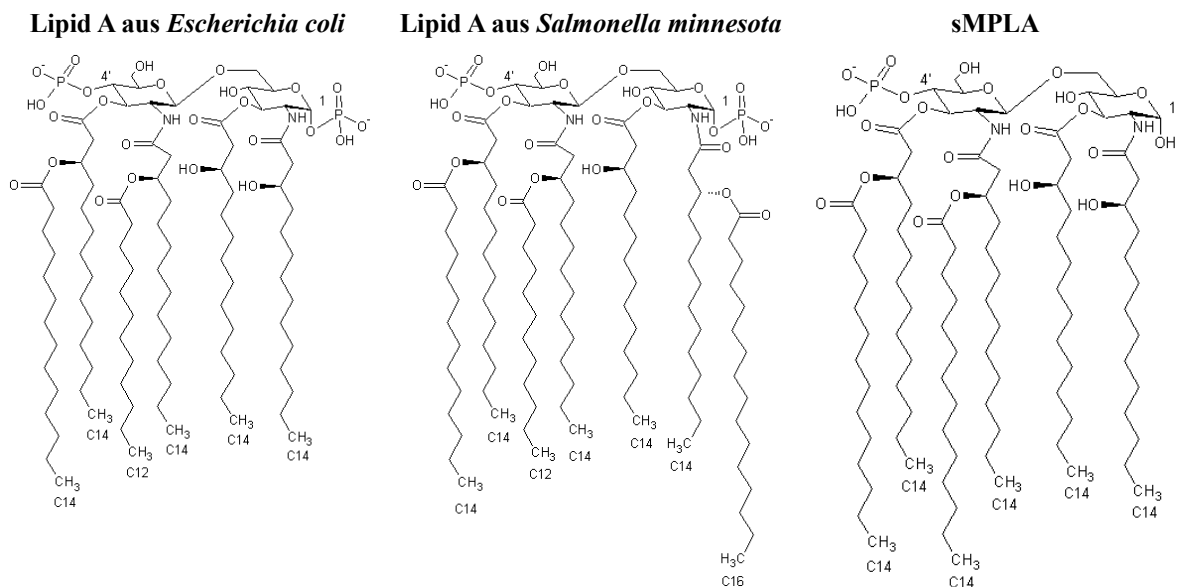


Abb. 1-6. Chemische Strukturen der Lipide A aus *Escherichia coli* und *Salmonella minnesota* nach Johnson 1994 sowie synthetisches Monophosphoryl-Lipid A aus *Escherichia coli* (InvivoGen, Toulouse, Frankreich).

Das Adjuvans AS04, welches in zugelassenen Impfstoffen gegen HPV und HBV eingesetzt wird, besteht aus 3-O-Desacyl-4'-monophosphoryl-Lipiden A (MPL[®]), die an partikuläre Aluminiumsalze adsorbiert wurden (Garçon 2010). MPL[®] wird aus LPS des *Salmonella minnesota*-Stamms R595 gewonnen und besteht aus einer Mischung

verschiedener 3-O-Desacyl-4'-monophosphoryl-Lipide A. Dabei sind die Positionen 1, 3, 4 und 6' des Glucosamin-Rückgrats nicht substituiert. Die Positionen 2, 2' und 3' können mit den Fettsäuren Myristinsäure, 3-(R)-Hydroxymyristinsäure oder 3-(R)-Acyloxymyristinsäure substituiert sein, wobei die absolute Anzahl an Fettsäureresten zwischen drei und sechs variieren kann (Garçon und Leo 2010). Ismaili *et al.* beobachteten 2002, dass MPL[®] in hoher Dosis (100 µg/ml) zur Reifung von huMoDC, d. h. zur vermehrten Expression von HLA-DR, CD80, CD86, CD40 und CD83, sowie zur Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL12 führte. Die Reifungsstimulation war schwächer ausgeprägt als bei LPS, reichte aber für eine effiziente T-Zellstimulation aus. Eine niedrigere Dosis MPL[®] (5 µg/ml) verursachte keine Reifung der huMoDC. MPL[®] wird allein oder zusammen mit anderen Adjuvanzen, beispielsweise mit Zellwandbestandteilen von *Mycobacterium phlei* (Detox[®], Biomira Inc.), dem Saponin QS21 (AS01B, AS02B, GSK Biologicals) oder der Kombination aus QS21 und CpG-Oligonukleotiden (AS15, GSK Biologicals), bei einer Vielzahl von experimentellen Krebsimpfstoffen als Adjuvans eingesetzt. Darunter befinden sich Impfstoffe gegen kolorektale Karzinome, Prostatakarzinome, Melanome, Mammakarzinome und Karzinome, die die Tumor-assoziierten Antigene MAGE3, MUC1, ras und Sialyl-Tn überexprimieren (Cluff 2010). Weiterhin wird MPL[®] als sicheres Adjuvans betrachtet. So wurde das Sicherheitsprofil des HPV-Impfstoffs Cervarix[™] (AS04 als Adjuvans) mit dem eines HAV-Impfstoffs (Aluminiumsalze als Adjuvans) in einer Kohorte von ca. 30000 Mädchen und Frauen miteinander verglichen. Dabei zeigte die Verumgruppe vermehrt lokale und generalisierte Symptome, die leicht bis moderat waren und nur kurzzeitig auftraten. Hinsichtlich der schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse sowie dem Auftreten von neuen chronischen oder Autoimmunerkrankungen unterschieden sich die Verum- und Kontrollgruppe nicht (Descamps *et al.* 2009).

1.4 Antigen-Trägersysteme

Zur Verbesserung der durch DC-Vakzine ausgelösten Immunantwort gegenüber von wenig immunogenen Antigenen, z. B. Tumorantigenen, werden einerseits immunstimulatorische lösliche Adjuvanzen, wie TLR-Agonisten, eingesetzt. Andererseits werden partikuläre Antigen-Trägersysteme für die optimale „Lieferung“ der Antigene an die DC verwendet. Diese sollen die Aufnahme der Antigene durch die DC erhöhen und ihre Präsentation sowohl

über MHC-II- als auch über MHC-I-Moleküle (Kreuzpräsentation) sicherstellen. Letzteres ist die Voraussetzung für die Aktivierung von CTL, die wesentlich zur Tumorzerstörung beitragen. Eine kontrollierte verzögerte Freisetzung der Antigene (Depoteffekt) ist von Vorteil, um eine langanhaltende Präsentation der Antigenfragmente auch bei hohem Durchsatz der MHC-Moleküle auf den DC zu gewährleisten. Die beladenen Antigen-Trägersysteme sollten für längere Zeit stabil sein und das Antigen vor schädigenden äußeren Einflüssen, z. B. extrazellulären Proteasen, sowie einem zu schnellen intrazellulären Abbau schützen. Letzterer führt zu einer verminderten Antigenpräsentation über MHC-I-Moleküle (Burgdorf und Kurts 2008). Wünschenswert ist ebenfalls eine Kompatibilität mit unterschiedlichen Antigenen, z. B. hydrophile und hydrophobe Substanzen, Peptide sowie Proteine, darunter auch Glyko- und Lipoproteine, und ein vollständiger, rückstandsloser Abbau *in vivo* (Bioabbaubarkeit). Die Antigen-Trägersysteme sollten sicher sein und keine Schädigungen der DC und des Organismus hervorrufen. Weiterhin sind eine einfache und reproduzierbare Herstellung unter GMP-Bedingungen sowie geringe Gesamtkosten vorteilhaft. Für eine stärkere immunologische Reaktion und eine gezielte Beeinflussung der Ausprägung der Immunantwort sollten die Antigen-Trägersysteme das Antigen zusammen mit dem Immunstimulanz (Reifungsstimulanz) in dieselbe DC transportieren (*co-delivery*). Entscheidend für eine erfolgreiche Krebsimmuntherapie mit DC-Vakzinen ist dabei der Zeitpunkt der Antigenaufnahme im Zusammenhang mit der Reifungsstimulation, z. B. durch TLR-Agonisten. Werden die Antigene vor dem Reifungsstimulus von den iDC aufgenommen und die DC in der Folge nur unzureichend gereift, können diese DC Immuntoleranz gegen die präsentierten Antigenfragmente induzieren. Erreicht aber der Reifungsstimulus die iDC vor den Antigenen, so reifen die DC frühzeitig, woraus eine verminderte Antigenaufnahme und eine unzureichende Antigenpräsentation resultieren können. Des Weiteren zeigten Blander und Medzhitov 2006, dass die Lokalisation des Antigens und des Reifungsstimulus, dort in Form des TLR4-Agonisten LPS, zusammen in einem Phagosom in den DC für eine effiziente Präsentation der Antigenfragmente über MHC-II-Moleküle an CD4⁺-T-Zellen bedeutsam ist. Schlosser *et al.* (2008) beobachteten am Mausmodell eine stärkere CTL-Immunantwort, wenn das Antigen und Polyinosin-Polycytidin-Säure [Poly(I:C), TLR3-Ligand] bzw. CpG-Oligonukleotide (TLR9-Ligand) zusammen in einer mikropartikulären Formulierung verkapselt wurden, während Mischungen aus Antigen-beladenen PLGA-MP mit gelöstem TLR-Ligand oder TLR-Ligand-beladenen PLGA-MP unterlegen waren. Für eine effektive

Tumorimmuntherapie mit DC sollte ein Antigen-Trägersystem verwendet werden, welches die Aufnahme des Antigens zusammen mit dem TLR-Liganden in dasselbe Phagosom gewährleistet. Zudem werden durch die Verbindung von Antigen-Trägersystem und Immunstimulanz Toxizitäten oder unerwünschte Nebenwirkungen der Immunstimulanzien nach parenteraler Applikation der DC-Vakzine lokal begrenzt. Häufig wird auch eine Reduktion der Gesamtkonzentration des Immunstimulanz erreicht.

Potenzielle partikuläre Antigen-Trägersysteme für das Targeting von DC und die gleichzeitige Applikation von Antigen und Immunstimulanz stellen u. a. O/W-Emulsionen, immunstimulierende Komplexe (ISCOM, *immune-stimulating complexes*), Virus-artige Partikel (VLP, *virus-like particles*), Liposomen sowie polymere Mikro- und Nanopartikel dar. In Tabelle 1-2. sind verschiedene Antigen-Trägersysteme, die Antigene zusammen mit TLR-Agonisten tragen, aufgeführt.

Für die effektive Aufnahme der Antigen-Trägersysteme durch APC ist deren Größe entscheidend. Partikel, die größer als 0,5 μm sind, werden bevorzugt durch Phagozytose aufgenommen, während kleinere Partikel und lösliche Antigene endozytiert werden (Burgdorf und Kurts 2008). Für die effiziente Kreuzpräsentation ist die Aufnahme in Phagosomen vorteilhaft (Ackerman *et al.* 2003). So werden lösliche Antigene v. a. über MHC-II-Moleküle präsentiert und nur in geringem Ausmaß über MHC-I-Moleküle kreuzpräsentiert (Lakadamyali *et al.* 2006). Abzugrenzen davon ist die Auslösung einer stärkeren CTL-Antwort durch PLGA-NP (< 500 nm) im Vergleich zu PLGA-MP (> 2 μm) *in vivo*, wenn diese parenteral appliziert und nicht direkt für die Beladung von DC verwendet werden (Nixon *et al.* 1996). Dieser Sachverhalt ist u. a. auf die bessere Penetration der NP in die lymphatischen Gewebe und die dort erfolgenden Interaktionen mit den DC *in vivo* zurückzuführen.

Partikel, die größer als fünf bis zehn Mikrometer sind, werden durch APC nur noch vermindert aufgenommen bzw. führen zu ihrem Absterben (Wischke 2006, S. 88-91). Der Größenbereich der Antigen-Trägersysteme für die Beladung von huMoDC beginnt zwischen 20-200 nm für VLP, ISCOM und NP, steigt auf 100-200 nm für kleine Liposomen an und endet im Bereich von 100 nm-20 μm für größere Liposomen, O/W-Emulsionen und Mikropartikel (MP) (Bachmann und Jennings 2010).

Einleitung

Tab. 1-2. Partikuläre Antigen-Trägersysteme für die gleichzeitige Applikation von Antigen und TLR-Liganden (*co-delivery*).

| Antigen-Trägersystem | TLR | TLR-Ligand | Antigen | Quelle |
|----------------------------------|--------|---|----------------------------|--|
| O/W-Emulsion (AS02) | TLR4 | MPL [®] | HBV-OAg | Vandepapelière <i>et al.</i> 2008 |
| O/W-Emulsion (MF59) | TLR4 | E6020 | N/H (Influenza) | Baudner <i>et al.</i> 2009 |
| Liposomen | TLR2/1 | Pam ₃ CAG | Hämagglutinin | Espuelas <i>et al.</i> 2005 |
| Liposomen | TLR2/6 | Pam ₂ CAG | Hämagglutinin | Espuelas <i>et al.</i> 2005 |
| Liposomen | TLR3 | Poly(I:C) | Ovalbumin, gp 61-Peptid | Zaks <i>et al.</i> 2006 |
| Liposomen | TLR4 | LPS | HBV-OAg | Jain <i>et al.</i> 2008 |
| Liposomen (AS01) | TLR4 | MPL [®] | HBV-OAg | Vandepapelière <i>et al.</i> 2008 |
| Liposomen (L-BLP25) | TLR4 | MPLA | MUC1-Peptid | Samuel <i>et al.</i> 1998, Sangha und Butts 2007 |
| Liposomen | TLR4 | Lipid A | Malaria-Antigen | Alving <i>et al.</i> 1992 |
| Liposomen | TLR7 | 3M-019 | Ovalbumin | Johnston <i>et al.</i> 2007 |
| Liposomen | TLR9 | Plasmid-DNA | HBV-OAg | Gürsel <i>et al.</i> 1999 |
| Liposomen | TLR9 | CpG-ODN | N/H (Influenza), HBV-OAg | Joseph <i>et al.</i> 2002 |
| Liposomen | TLR9 | CpG-ODN | Ovalbumin | Gursel <i>et al.</i> 2001 |
| Liposomen | TLR9 | CpG-ODN | Ovalbumin, gp 61-Peptid | Zaks <i>et al.</i> 2006 |
| Liposomen | TLR9 | CpG-ODN | TT | Tafaghodi <i>et al.</i> 2006 |
| Liposomen | TLR9 | CpG-ODN | TRP2-Peptid | Jérôme <i>et al.</i> 2006 |
| Chitosan-NP | TLR2/1 | Pam ₃ Cys (kovalent gekoppelt an Chitosan-Derivat) | Plasmid-DNA | Heuking <i>et al.</i> 2009 |
| PLGA-MP | TLR3 | Poly(I:C) | BSA | Wischke <i>et al.</i> 2009 |
| Polyketal-MP | TLR3 | Poly(I:C) | Ovalbumin | Heffernan <i>et al.</i> 2009 |
| PLGA-NP | TLR4 | MPLA | MUC1-Peptid | Elamanchili <i>et al.</i> 2007 |
| PLGA-NP | TLR4 | MPLA | HBV-KAg | Chong <i>et al.</i> 2005 |
| PLGA-NP | TLR4 | 7-Acyl-Lipid A | TRP2 | Hamdy <i>et al.</i> 2008 |
| Polyanhydrid-NP | TLR5 | Flagellin | Ovalbumin | Salman <i>et al.</i> 2009 |
| Polypropylensulfid-NP | TLR5 | Flagellin | Ovalbumin | Stano <i>et al.</i> 2011 |
| PLGA-MP | TLR9 | CpG-ODN | Ovalbumin-Peptid | Fischer <i>et al.</i> 2009 |
| PLGA-MP | TLR9 | CpG-ODN | Ovalbumin | San Román <i>et al.</i> 2008 |
| PLGA-MP | TLR9 | CpG-ODN | p 55 gag, gp 120 env (HIV) | Singh <i>et al.</i> 2001 |
| Alginat-beschichtete Chitosan-NP | TLR9 | CpG-ODN | HBV-OAg | Borges <i>et al.</i> 2008 |

Abkürzungen: **3M-019:** (2E, 3E)-2-[(4-chlorophenyl)hydrazinylidene]-3-hydrazinylidene-1-thiophen-2-ylpropan-1-on; **AS01:** *adjuvant system 01*, liposomale Formulierung mit MPL[®] (3-O-desacyl-4'-monophosphoryl-Lipide A) und QS21 (Saponin-Extrakt aus der Rinde von *Quillaria saponaria*); **AS02:** *adjuvant system 02*, O/W-Emulsion mit MPL[®] und QS21; **BSA:** bovines Serumalbumin; **CpG-ODN:** DNA-Oligonukleotide mit hohem Anteil an unmethylierten CpG-Motiven (C: Cytosin, p: Phosphat, G: Guanin); **E6020:** synthetisches dimeres Phospholipid; **gp 61-Peptid:** synthetisches Fragment der Aminosäuren 61 bis 80 eines Glykoproteins des lymphozytären Choriomeningitis-Virus; **HBV-KAg:** Hepatitis B Virus-Kernantigen; **HBV-OAg:** Hepatitis B Virus-Oberflächenantigen; **L-BLP25:** liposomales Vakzin mit 25 Aminosäure-langem lipidierten Peptid der Kernregion des TAA MUC1 und MPLA als Immunstimulanz; **LPS:** Lipopolysaccharide; **MF59:** *microfluidized emulsion 59*, O/W-Emulsion mit Squalen, Tween[®] 80 und Span[®] 85, ca. 150 nm Tröpfchengröße; **MP:** Mikropartikel; **N/H:** Neuraminidase/Hämagglutinin; **Pam₂CAG:** synthetisches diacyliertes Lipopeptid mit Pam₂Cys-Grundstruktur und Ala-Gly als Peptidteil; **NP:** Nanopartikel; **Pam₃CAG:** synthetisches triacyliertes Lipopeptid mit Pam₃Cys-Grundstruktur und Ala-Gly als Peptidteil; **PLGA:** *poly(lactic-co-glycolic acid)*; **Poly(I:C):** Polyinosin-Polycytidin-Säure; **TRP2:** *melanocyte differentiation antigen tyrosinase-related protein 2*; **TT:** Tetanus-Toxoid

O/W-Emulsionen, beispielsweise die squalenhaltige MF59 (*microfluidized emulsion 59*), werden hauptsächlich als Adjuvans für direkt applizierte prophylaktische Impfstoffe, wie

Influenza-Vakzine, verwendet. APC *in vivo* sollen die mit Antigen assoziierten Emulsionströpfchen aufnehmen und die immunstimulatorische Wirkung über eine Zytokin-Ausschüttung vermitteln (Dupuis *et al.* 1998, Schultze *et al.* 2008). O/W-Emulsionen spielen für die Beladung von huMoDC mit Antigenen bisher eine untergeordnete Rolle.

ISCOM wurden von Morein *et al.* 1984 erstmalig beschrieben und sind 40 nm große, käfigartige, sphärische Komplexe, die aus Saponinen, Cholesterol, Phospholipiden und Antigen bestehen. Sie entsprechen in etwa der Größe von Viren, werden schnell von DC über Endozytose aufgenommen und können aufgrund der Saponine eine Reifung induzieren (Morein und Bengtsson 1999). Allerdings werden nur hydrophobe Antigene in ausreichendem Maß von ISCOM inkorporiert, was deren Anwendung stark begrenzt (Mowat und Reid 2001).

VLP bestehen aus viralen Proteinen, die sich spontan zu Virion-artigen Strukturen zusammenlagern. Sie besitzen kein virales Erbgut und sind daher nicht infektiös (Roldão *et al.* 2010). VLP induzieren aufgrund ihrer Virus-ähnlichen Strukturen die Reifung von DC und die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen (Lenz *et al.* 2003). Da VLP sowohl Träger von Antigenen, als auch Immunstimulanzen sind, ist eine gezielte Beeinflussung der Immunantwort durch eine Kombination von Antigen-Trägersystem und Immunstimulanz nicht möglich.

Liposomen sind Cholesterol- und Phospholipid-haltige sphärische Partikel, die aus einer (unilamellar) oder mehreren (multilamellar) Doppelschicht(en) bestehen und einen wässrigen Kern umhüllen. Dabei sind die hydrophoben Anteile der Phospholipide ins Innere der Doppelschicht gerichtet und die hydrophilen Kopfgruppen zeigen zur wässrigen Phase (Kern, Umgebungsmilieu). Aufgrund dieses Aufbaus sind Liposomen in der Lage hydrophile, lipophile und amphiphile Stoffe zu inkorporieren und können mit Antigenen und Immunstimulanzen gleichzeitig beladen werden. Ihre physikochemischen Parameter, wie die Oberflächenladung, können verändert werden. Sie werden infolge der Ähnlichkeit zu Zellmembranen als nicht toxisch, bioabbaubar und biokompatibel betrachtet. In Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren können Liposomen unter 50-100 nm groß sein, beispielsweise SUV (*small unilamellar vesicles*), aber auch mehrere Mikrometer erreichen, z. B. LUV (*large unilamellar vesicles*) und GMV (*giant multilamellar vesicles*). Liposomen werden von APC durch Endo- oder Pinozytose aufgenommen und können die inkorporierten Antigene vor schneller intra- und extrazellulärer Degradation schützen. Zudem verbessern sie die Kreuzpräsentation über MHC-I-Moleküle (Altin und Parish 2006). Nachteilig sind die geringe

Verkapselungseffizienz für Antigene und Immunstimulanzien, das schlecht steuerbare Freisetzungsverhalten und bei der Lagerung auftretende Instabilitäten (Hernández-Caselles *et al.* 1990, Kayser *et al.* 2003).

Neben der höheren Stabilität weisen polymere Mikro- und Nanopartikel im Vergleich zu Liposomen weitere Vorteile auf. Das Freisetzungsverhalten kann durch das Herstellungsverfahren, die Hilfsstoff- und Polymerzusammensetzung sowie die resultierende Partikelgröße und -morphologie gesteuert werden. So konnten Wackerle-Men *et al.* 2006 eine verlängerte Antigenpräsentation durch PLGA-MP im Vergleich zu löslichen Antigenen zeigen. Die polymeren Partikel können in den verschiedensten Größen produziert und weitere physikochemische Parameter, wie Oberflächenladung und Hydrophobizität, angepasst werden, so dass eine Aufnahme durch APC forciert werden kann (Foged *et al.* 2005). Sie schützen die Antigene gegen extra- und zu schnellen intrazellulären Abbau und sind in der Lage die Kreuzpräsentation über MHC-I-Moleküle zu verbessern (Burgdorf und Kurts 2008). Zudem sind unterschiedlichste Antigene durch eine geeignete Hilfsstoff- und Polymerauswahl verkapselbar. Die polymeren Antigen-Trägersysteme können mit einer Vielzahl von Immunstimulanzien verbunden werden (Tab. 1-2, Demento *et al.* 2011) und die gemeinsame Aufnahme von Antigen und Reifungsstimulanz in ein Phagosom sicherstellen. Das verwendete Polymer sollte nicht toxisch, bioabbaubar und biokompatibel sein. Seine Eigenschaften sollten für die Herstellung der Immunstimulanz-modifizierten Antigen-beladenen Partikel geeignet bzw. durch eine veränderbare Zusammensetzung an die Erfordernisse anpassbar sein. Vorteilhaft sind ebenfalls eine Zulassung für die Anwendung am Menschen, eine einfache Verarbeitung, GMP-Qualität und ein geringer Preis. Diesen Erfordernissen entsprechen im Wesentlichen Nano- und Mikropartikel aus dem Polymer PLGA, das auf eine langjährige Geschichte als Polymer für die kontrollierte Freisetzung von Arzneistoffen und Antigenen zurückblicken kann. Im Folgenden werden sie daher ausführlicher besprochen.

1.5 PLGA-Mikropartikel

1.5.1 Allgemeines und Definitionen

Als MP bezeichnet man Partikel mit einer Größe von einem bis 1000 μm , wobei je nach Aufbau nochmals in Mikrokapseln und Mikrosphärulen unterschieden wird. Bei Mikrokapseln wird der wirkstoffhaltige Kern von einer Kapsel aus Polymer umhüllt (Reservoir-System), während bei Mikrosphärulen der Wirkstoff in eine Polymermatrix eingebettet ist (Matrix-System) und diese keine spezielle Kapselwand aufweisen (Bauer, Frömming und Führer 2002). MP für pharmazeutische Anwendungen werden vorwiegend als Arzneistoff-Trägersysteme (*drug delivery systems*, DDS) eingesetzt und sollen den enthaltenen Arzneistoff kontrolliert freisetzen (*controlled drug release*) (Freiberg und Zhu 2004). Als Trägermaterial dienen dabei Polymere, d. h. Makromoleküle, welche aus sich wiederholenden Einheiten oder Monomeren bestehen, die normalerweise kovalent miteinander verbunden sind. Homopolymere bestehen dabei nur aus einer Art von Monomeren, während Copolymere aus zwei oder mehr Arten aufgebaut sind. Die Anordnung der Monomere in den Copolymeren kann dabei willkürlich, alternierend oder in Blöcken erfolgen. Bei Pfropf-Copolymeren besteht die Hauptkette aus einer Monomerart auf die Seitenketten einer anderen Monomerart aufgepfropft sind. Weiterhin unterscheidet man Polymere nach der räumlichen Anordnung der Monomere, was zu linearen, verzweigten, quervernetzten oder dendritischen Polymeren führen kann (Mahato 2005).

Für die Anwendung am und im Menschen werden v. a. natürliche oder synthetische bioabbaubare Polymere eingesetzt, welche letztlich rückstandslos aus dem Körper entfernt werden (Jalil und Nixon 1990). Dies kann durch Zersetzung bzw. Abbau der Polymere sowie physiologische Metabolisierung und/oder Eliminierung der Abbauprodukte oder die Auflösung des Polymers und Ausscheidung der gelösten Bestandteile erfolgen. Die durch den Abbau bzw. die Auflösung entstehenden Produkte sollten biologisch verträglich und nicht immunogen, karzinogen oder toxisch sein (Vert 2009). Als natürliche Polymere werden u. a. Albumine, Alginate, Cellulosederivate, Chitosan, Kollagen, Fibrin, Gelatine, Hyaluronsäure und verschiedene Polysaccharide verwendet (Gombotz und Pettit 1995). Allerdings gibt es hinsichtlich der reproduzierbaren Herstellung und der Reinheit immer wieder Bedenken. So wurden beispielsweise immunologische Reaktionen auf Implantate aus Kollagen beobachtet, welche eine parenterale Anwendung dieser Polymere problematisch erscheinen lassen

(De Lustro *et al.* 1990). Des Weiteren zeigten Verbandmaterialien aus Calciumalginaten zytotoxische Effekte auf Fibroblasten und einen verminderten Bioabbau (Suzuki *et al.* 1998). Synthetische bioabbaubare Polymere umfassen u. a. Polyorthoester, Polycyanoacrylate, Polyaminosäuren, Polyamide, Polyanhydride und verschiedene aliphatische Polyester, darunter Polyhydroxybuttersäure, Polycaprolacton, Polydioxanon sowie Polyglycolsäure [PGA, *poly(glycolic acid)*], Polymilchsäure [PLA, *poly(lactic acid)*] und deren Copolymer PLGA (Gombotz und Pettit 1995). In der vorliegenden Arbeit wird PLGA als Trägermaterial verwendet, welches im Folgenden genauer charakterisiert wird.

1.5.2 Bioabbaubare Polymere aus Milch- und Glycolsäure

Zu den bioabbaubaren linearen aliphatischen Polyestern aus den Monomeren Milch- und Glycolsäure gehören die Homopolymere PLA und PGA sowie das Copolymer PLGA. PLA und PGA werden seit den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts für die Anwendung am und im Menschen erforscht, wobei sich die Bemühungen zunächst auf chirurgische Implantate (Kulkarni *et al.* 1966) und Materialien für die Gewebereparatur (Schmitt und Polistina 1969) beschränkten. Die Firma American Cynamid Company entwickelte 1962 das erste synthetische bioabbaubare Nahtmaterial DexonTM aus PGA, welches 1970 kommerziell vermarktet wurde (Frazza und Schmitt 1971). Fünf Jahre später wurde unter dem Namen VicrylTM auch PLGA als Nahtmaterial vertrieben (Wassermann und Versfelt 1974). Aufgrund der Bioabbaubarkeit und der guten biologischen Verträglichkeit, welche von verschiedenen Gruppen untersucht wurden (Anderson und Shive 1997, Brady *et al.* 1973, Cutright *et al.* 1971, 1974, Ignatius und Claes 1996, Kulkarni *et al.* 1971, Miller *et al.* 1977), setzte man PLA und PLGA seit den 1970er Jahren zunehmend für die Herstellung von DDS mit kontrollierter Wirkstoff-Freisetzung ein. Verschiedene Arzneiformen, darunter parenteral anzuwendende Implantate (Wise *et al.* 1976, 1978, Yolles *et al.* 1975a, 1975b), MP (Beck *et al.* 1979a, 1979b, 1983, Boswell und Scribner 1973, Mason *et al.* 1976) und NP (Krause *et al.* 1985), welche vorwiegend niedrigmolekulare und hydrophobe Wirkstoffe enthielten, wurden entwickelt.

Im gleichen Zeitrahmen erfolgte auch die Erforschung von Trägersystemen für therapeutische Peptide und Proteine (Chang 1976, Kent *et al.* 1987, Kwong *et al.* 1986, Ogawa *et al.* 1988, Redding *et al.* 1984, Sanders *et al.* 1984), wobei PLGA-Formulierungen mit Gonadoliberin-Analoga, u. a. das Implantat Zoladex[®] sowie die MP Lupron[®] Depot und

Decapeptyl[®], erfolgreich in den Markt eingeführt wurden. Die Zulassungen von Formulierungen aus den Polymeren PLA und PLGA sind bis in die heutige Zeit ansteigend und dem guten Sicherheitsprofil sowie den Eigenschaften dieser Polymere geschuldet. Einen Überblick über in Deutschland zugelassene Fertigarzneimittel gibt Tab. 1-3.

Tab. 1-3. In Deutschland zugelassene Fertigarzneimittel (FAM) mit den bioabbaubaren Polymeren PLA und PLGA. Rote Liste, Stand: Februar 2013.

| FAM | Hersteller | Wirkstoff | Arzneiform | Polymer ^{a)} | Dosierungsintervall (Wochen) |
|--|--|---------------------|--------------------------|--|------------------------------|
| Bydureon [®] 2 mg | Lilly | Exenatid | Mikropartikel | PLGA (50:50) | 1 |
| Decapeptyl [®] N 3,75 mg und GYN | Ferring Arzneimittel | Triptorelinacetat | Mikropartikel | PLGA (50:50) | 4 |
| Eligard [®] 7,5 mg/22 mg/45 mg | Astellia Pharma | Leuprorelinacetat | <i>in-situ</i> Implantat | PLGA (50:50) in N-Methylpyrrolidon | 4/12/24 |
| Enantone [®] Monats-Depot und GYN Monats-Depot | Takeda Pharma | Leuprorelinacetat | Mikropartikel | PLGA (75:25) | 4 |
| Ozurdex [®] | Allergan Pharmaceuticals | Dexamethason | intravitreales Implantat | PLGA (50:50) mit veresterten sowie PLGA (50:50) mit unveresterten Endgruppen | einmalig |
| Pamorelin [®] LA 3,75 mg/11,25 mg/22,5 mg | Ipsen Pharma | Triptorelin-embonat | Mikropartikel | PLGA | 4/12/24 |
| Profact [®] Depot 6,3 mg/9,45 mg | Sanofi-Aventis Deutschland | Buserelinacetat | Implantat | PLGA (75:25) | 8/12 |
| Risperdal [®] Consta [®] 25 mg/37,5 mg/50 mg | Janssen-Cilag | Risperidon | Mikropartikel | PLGA (75:25) | 2 |
| Salvacyl [®] 11,25 mg | Ipsen Pharma, Mitvertrieb Dr. R. Pfleger | Triptorelin-embonat | Mikropartikel | PLGA (25:75) | 12 |
| Sandostatin [®] LAR [®] -Monatsdepot 10 mg/20 mg/30 mg | Novartis Pharma | Octreotidacetat | Mikropartikel | PLGA (55:45) | 4 |
| Zoladex [®] 3,6 mg und GYN | AstraZeneca | Goserelinacetat | Implantat | PLGA (50:50) | 4 |
| Zoladex [®] 10,8 mg | AstraZeneca | Goserelinacetat | Implantat | PLGA (95:5) | 12 |
| Sixantone [®] | Takeda Pharma | Leuprorelinacetat | Mikropartikel | PLA | 24 |
| Trenantone [®] und GYN | Takeda Pharma | Leuprorelinacetat | Mikropartikel | PLA | 12 |

^{a)} Das molare Verhältnis der Monomere Milchsäure zu den Monomeren Glycolsäure bei PLGA ist in Klammern hinter dem Polymer angegeben.

Im Vergleich zu PLA weist PLGA meist kürzere Freisetzungzeiträume auf. Dabei sollte die Freisetzung für die Beladung von huMoDC mit Antigenen innerhalb von vier Wochen erfolgen, da diese mit der Überlebenszeit der Zellen korreliert (Waeckerle-Men und Groettrup 2005). Hierfür brauchbare PLGA sind die hydrophileren Copolymere aus Glycol- und Milchsäure, die u. a. für die Herstellung von FAM verwendet werden, welche

Dosierungsintervalle von Wochen bis zu einem Monat aufweisen können, z. B. Bydureon[®] oder Enantone[®] (Tab. 1-3).

PLGA für die kontrollierte Arzneistoff-Freisetzung existieren in verschiedenen Formen und haben unterschiedliche Eigenschaften. Variieren können die Polymere u. a. in der Molekülgröße und damit verbunden der inhärenten Viskosität, im Anteil der Monomere Glycol- und Milchsäure, in der stereochemischen Ausprägung des Milchsäureanteils sowie den Carboxylendgruppen, welche verestert oder unverestert vorliegen können (Tab. 1-4).

Tab. 1-4. Eigenschaften von ausgesuchten PLA und PLGA der Firma Evonik Röhm zur Anwendung als Medizinprodukte oder zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung. Stand 2011.

| Polymer ^{a)} | RESOMER [®] - Bezeichnung | Molmasse (g mol ⁻¹) | inhärente Viskosität ^{b)} (dl g ⁻¹) | T _g ^{c)} (° C) | T _m ^{d)} (° C) | Endgruppe |
|-----------------------|--|------------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------|
| L-PLA | L 206 S | n. a. | 0,80-1,20 | 60-65 | 180-185 | verestert |
| DL-PLA | R 202 S | 10000-18000 | 0,16-0,24 | 38-42 | amorph | verestert |
| DL-PLA | R 202 H | 10000-18000 | 0,16-0,24 | 44-48 | amorph | unverestert |
| DL-PLA | R 203 S | 18000-28000 | 0,25-0,35 | 46-50 | amorph | verestert |
| DL-PLA | R 203 H | 18000-28000 | 0,25-0,35 | 48-52 | amorph | unverestert |
| DL-PLGA (50:50) | RG 502 | 7000-17000 | 0,16-0,24 | 42-46 | amorph | verestert |
| DL-PLGA (50:50) | RG 502 H | 7000-17000 | 0,16-0,24 | 42-46 | amorph | unverestert |
| DL-PLGA (50:50) | RG 503 H | 24000-38000 | 0,32-0,44 | 44-48 | amorph | unverestert |
| DL-PLGA (50:50) | RG 504 H | 38000-54000 | 0,45-0,60 | 46-50 | amorph | unverestert |
| DL-PLGA (65:35) | RG 653 H | 24000-38000 | 0,32-0,44 | 46-50 | amorph | unverestert |
| DL-PLGA (75:25) | RG 752 H | 4000-15000 | 0,14-0,22 | 42-46 | amorph | unverestert |
| DL-PLGA (75:25) | RG 756 S | 76000- 116000 | 0,71-1,00 | 49-55 | amorph | verestert |

a) Das molare Verhältnis der Monomere Milchsäure zu den Monomeren Glycolsäure bei PLGA ist in Klammern hinter dem Polymer angegeben. Die stereochemische Orientierung des Milchsäureanteils ist durch die vorangestellten Stereodeskriptoren angegeben.

b) 0,1%ige Lösung in Chloroform bei 25 °C

c) Glasübergangstemperatur

d) Schmelztemperatur

Die Abkürzung PLGA [*poly(DL-lactic-co-glycolic acid)*] umfasst dabei aufgrund der alphabetischen Reihenfolge nur Copolymere mit DL-Milchsäure als Monomer, während Copolymere mit L-Milchsäure korrekterweise als PGLA [*poly(glycolic-co-L-lactic acid)*] bezeichnet werden. Da in der gängigen Literatur PLGA aber häufig als Oberbegriff für beide Formen gebraucht wird und um Verwechslungen zu vermeiden, werden in dieser Arbeit die Stereodeskriptoren für die Milchsäure der Abkürzung PLGA vorangestellt, sofern dies für die getroffenen Aussagen relevant ist.

Die Polymere können je nach Anordnung der Monomere als statistische, alternierende oder Block-Copolymere existieren (Abb. 1-7), wobei kommerziell erhältliche PLGA zumeist statistische Copolymere sind, die eine zufällige Verteilung der monomeren Einheiten aufweisen.

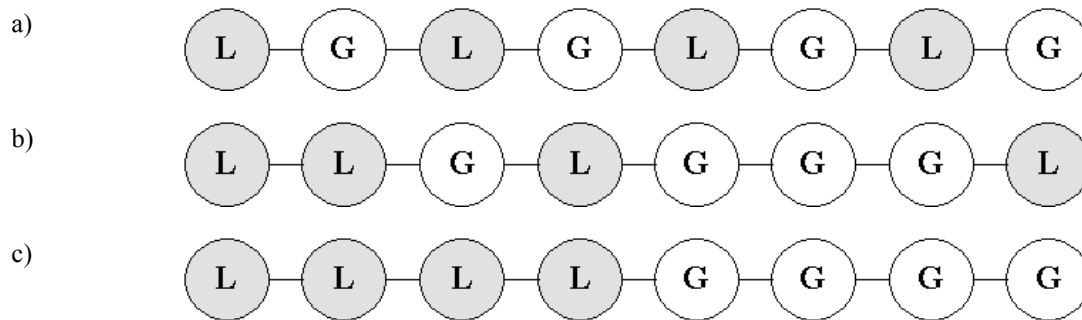


Abb. 1-7. Mögliche Anordnungen von linearen Copolymeren aus DL-Lactid (L) und Glycolid (G). - a) alternierend; b) statistisch; c) blockartig.

Höhermolekulare PLGA ($M_w > 10000$ g/mol) werden aus zyklischen Diestern von Glycol- bzw. Milchsäure synthetisiert (Abb. 1-8) und weisen als sich wiederholende monomere Einheiten Glycolid bzw. Lactid auf. Daher werden diese Polymere auch als Poly(DL-lactid-co-glycolide) [PLG, *poly(DL-lactide-co-glycolide)*] bezeichnet. Die Synthese von statistischen Copolymeren erfolgt zumeist nach dem Prinzip der Ringöffnungs-Polymerisation (Abb. 1-8). Als Katalysator wird normalerweise Zinn(II)-2-ethylhexanoat verwendet, aber auch andere organometallische Verbindungen mit Zink, Magnesium, Lanthanoiden und Aluminium sind in der Literatur beschrieben (Kricheldorf *et al.* 1995, Kricheldorf und Lee 1995, Ogawa *et al.* 1988, Stridsberg *et al.* 2002). Zusätzlich werden häufig Alkohole als Koinitiatoren und Laurylalkohol zur Kontrolle der Molmasse des Polymers verwendet (Kricheldorf *et al.* 1995, Wang *et al.* 2000).

Die physikochemischen Eigenschaften der verschiedenen PLGA unterscheiden sich deutlich. Entscheidend für die Auswahl des PLGA ist die vorgesehene Anwendung. So werden z. B. für den Einsatz als chirurgisches Nahtmaterial oder als resorbierbare Implantate zur Fixierung von Knochen v. a. kristalline hochmolekulare PLGA eingesetzt, die hohe mechanische Festigkeit aufweisen (Daniels *et al.* 1990, Pulapura und Kohn 1992). Im Gegensatz dazu werden PLGA als Materialien für Arzneistoff-Trägersysteme mit kontrollierter Wirkstoff-Freisetzung eingesetzt, die eine niedrigere Molmasse aufweisen, welche üblicherweise unter 100000 g/mol liegt, und die meist amorph sind. Zudem sind PLGA, die mehr als 50 % Glycolsäure-Anteil aufweisen, schlecht löslich in gängigen organischen Lösungsmitteln und werden somit nicht für DDS eingesetzt, deren Herstellungsverfahren die vorherige Lösung des Polymers erfordert.

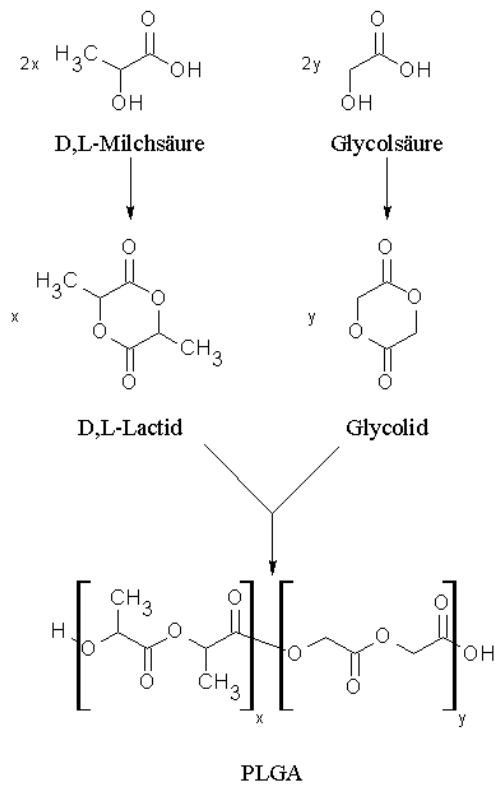


Abb. 1-8. Schematischer Ablauf der PLGA-Synthese durch Ringöffnungs-Polymerisation. (Die Monomere DL-Lactid und Glycolid variieren bei statistischen Polymeren zufällig in der Polymerkette von PLGA.)

Copolymere aus Glycolsäure und L-Milchsäure (L-PLGA) liegen bei einem Anteil von 25-70 % (m/m) Glycolsäure amorph vor. Der amorphe Bereich erweitert sich auf Copolymere mit 0-70 % (m/m) Glycolsäure-Anteil, wenn racemische DL-Milchsäure als Monomer verwendet wird, da das zugehörige Polymer DL-PLA bereits amorph ist. Kristallinitätsgrad und Schmelztemperatur von L-PLGA mit hohem Anteil an Glycolsäure [70-100 % (m/m)] oder hohem Anteil an L-Milchsäure [75-100 % (m/m)] zeigen die Maxima bei den Homopolymeren. Beide verringern sich mit zunehmendem Anteil des jeweils anderen Monomers bis der amorphe Bereich erreicht wird (Gilding und Reed 1979).

Die Glasübergangstemperaturen (T_g) der PLGA sind u. a. abhängig von der Molmasse und dem molaren Verhältnis der Monomere Milch- und Glycolsäure. Beim Übergang vom glasartigen in den gummielastischen Zustand nimmt die Beweglichkeit der Polymerketten zu. Das Polymer ist somit anfälliger für chemische bzw. physikalische Veränderungen und weist eine höhere Permeabilität für Wirkstoffe und Wassermoleküle auf. Dies kann zu einem schnelleren hydrolytischen Abbau des Polymers und einer beschleunigten Freisetzung des Wirkstoffs führen. Entscheidend für die Anwendung der DDS im menschlichen Körper ist dabei, ob die T_g bei den Umgebungsbedingungen *in vivo* unter 37 °C liegt. Gleichartig zusammengesetzte PLGA weisen mit steigender Molmasse höhere T_g auf (Tab. 1-4, Park

1994, Zolnik *et al.* 2006). Wang *et al.* zeigten 2000, dass für PLGA mit einem molaren Verhältnis von 75 % Lactid und 25 % Glycolid eine deutliche Erhöhung der T_g von ca. 22 auf 50 °C erfolgt, wenn die gewichtsmittlere Molmasse der PLGA von ca. 11000 auf 67000 g/mol ansteigt. Bei höhermolekularen PLGA mit gewichtsmittleren Molmassen von ca. 124000 und 167000 g/mol beobachteten sie nur noch eine marginale Steigerung der T_g um weniger als zwei Grad Celsius. Gilding und Reed konnten 1979 bei L-PLGA mit steigendem Lactid-Anteil von 0 auf 50 % eine deutliche Erhöhung der T_g feststellen. Eine weitere Erhöhung des Lactid-Anteils führte aber nur noch zu einem geringen Anstieg der T_g , was durch Ergebnisse von Wang *et al.* (2000) auch für DL-PLGA bestätigt wurde.

Die T_g von Polymeren kann durch die Mischung mit niedrigmolekularen Substanzen, sogenannten Weichmachern, erniedrigt werden. Für DDS von Bedeutung sind dabei der enthaltene Wirkstoff (Blasi *et al.* 2007) bzw. zusätzliche Hilfsstoffe (Kranz *et al.* 2000) sowie bei der hydrolytischen Spaltung des Polymers entstehende oligomere Abbauprodukte (Schlieker *et al.* 2003). Des Weiteren können aus der Umgebung eindringende Stoffe, darunter Wasser, als Weichmacher dienen. Blasi *et al.* zeigten 2005, dass die T_g von DL-PLGA [(50:50), M_w 30000 g/mol] bereits nach einstündiger Inkubation mit Wasser, unabhängig von den Inkubationstemperaturen (23, 30, 37 und 55 °C), um ca. 15 °C sank. Die T_g lag dann mit ca. 30 °C unter der Körpertemperatur, was das Freisetungsverhalten von DDS *in vivo* beeinflussen kann.

Der hydrolytische Abbau von PLGA *in vitro* beruht auf der Spaltung der Esterbindung zwischen den Monomeren Milch- und Glycolsäure, welche formal durch Addition von Wassermolekülen an die Alkoxy-carbonylgruppe und anschließender Eliminierung der alkoholischen Komponente abläuft (Abb. 1-9).

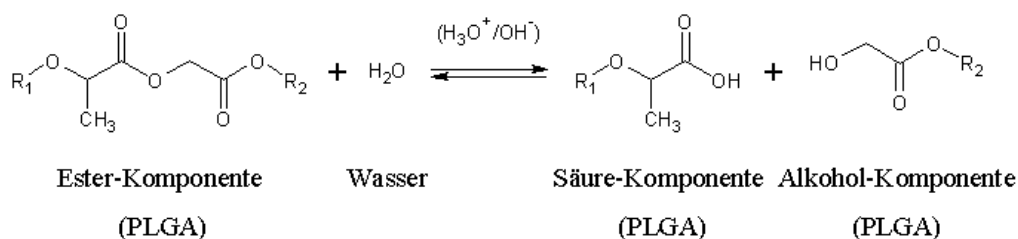


Abb. 1-9. Formale Darstellung der hydrolytischen Esterspaltung von PLGA.

Der Vorgang wird sowohl durch Säuren als auch durch Basen katalysiert, wobei die hydrolytische Degradation von DDS aus PLGA durch eine Reihe von weiteren Faktoren

beeinflusst wird. Diese beinhalten einerseits verschiedene Polymer-Eigenschaften, u. a. die Molmasse, die Morphologie (Kristallinitätsgrad), die T_g , den Anteil von Milch- bzw. Glycolsäure im Copolymer sowie das Vorliegen von veresterten oder unveresterten Carboxylendgruppen. Andererseits wird der Abbau auch durch Eigenschaften des DDS, wie die Größe, Form, Porosität und Dichte der Matrix, die eingesetzten Wirk- und Hilfsstoffe sowie das enthaltene Restlösungsmittel beeinflusst, welche maßgeblich in Zusammenhang mit der verwendeten Herstellungsmethode stehen. Des Weiteren können die äußeren Bedingungen, denen das DDS ausgesetzt ist, zu einer Veränderung des Degradationsprofils führen. Dies beinhaltet die Art der Sterilisation, die ausgeübte mechanische Belastung, die Temperatur, den pH-Wert und die Osmolarität des Umgebungsmediums sowie dessen Durchmischung.

Der Abbau der PLGA umfasst im Wesentlichen drei Schritte: die Wasseraufnahme bzw. das Hydratisieren des Copolymers (I), die Hydrolyse der Esterbindungen der Polymerkette (II) sowie die Solubilisierung der Spaltprodukte bzw. die Erosion der Matrix (III). Dabei wird die PLGA-Matrix durch die sogenannte Bulkerosion (Abb. 1-10) abgebaut (Kenley *et al.* 1987). Bei dieser ist, im Gegensatz zur Oberflächenerosion (Abb. 1-10), die Geschwindigkeit mit der das Wasser in die Matrix diffundiert größer als die Geschwindigkeit mit der die Bindungen in der Polymerkette gespalten werden und wasserlösliche Spaltprodukte entstehen (von Burkersroda *et al.* 2002). Das eindringende Wasser führt dabei zu einer Herabsetzung der T_g und zu einer Relaxation des Polymers (Blasi *et al.* 2005). Die Spaltung der Esterbindung erfolgt an den hydratisierten Stellen und führt zu einer Abnahme der gewichts- und anzahlmittleren Molmasse der PLGA-Matrix. Zunächst bleibt die Integrität der Matrix erhalten, d. h. es entstehen kaum wasserlösliche Spaltprodukte oder diese können nicht ins Umgebungsmedium diffundieren. Erst nach länger anhaltender Spaltung der Bindungen im Polymer wird ein kritischer Wert für die Molmasse erreicht, die Matrix verliert ihre Integrität, wasserlösliche Spaltprodukte diffundieren in das Medium und führen zu einem hohen Verlust der Gesamtmasse (Dunne *et al.* 2000, Kenley *et al.* 1987, Pitt *et al.* 1981, Reed und Gilding 1981).

Li *et al.* (1990a, b) konnten für zwei Millimeter dicke Polymerscheiben eine heterogene Bulkerosion (Abb. 1-10) nachweisen, die im Inneren schneller erfolgte als außen. Als Ursache führten sie einen autokatalytischen Effekt der innen entstehenden sauren Polymer-Spaltprodukte an, welche, im Gegensatz zu den an der Oberfläche gebildeten Polymer-

Spaltprodukten, nicht hinaus diffundieren konnten, sobald deren Molmasse niedrig genug für die Lösung im Umgebungsmedium war. Die Bulkerosion von PLGA verläuft bei großen DDS schneller als bei kleinen (Grizzi *et al.* 1995, Dunne *et al.* 2000), was auf einen längeren Diffusionsweg von innen nach außen bei größeren Arzneiformen zurückzuführen ist. Strittig ist hingegen, ob bei kleinen DDS ebenfalls eine heterogene Bulkerosion abläuft oder diese aufgrund der kurzen Diffusionswege schon homogen ist (Grizzi *et al.* 1995, Li *et al.* 1990a, Lu *et al.* 1999, Park 1995).

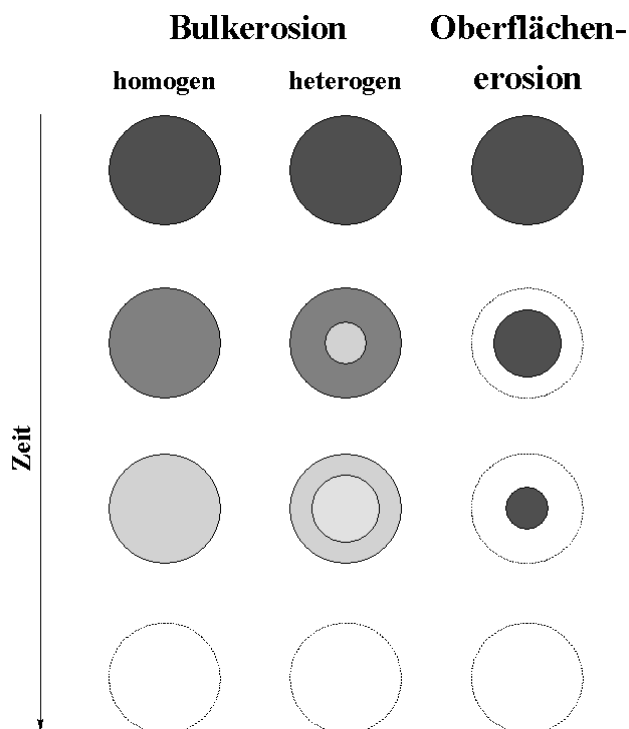


Abb. 1-10. Schematischer Ablauf der homogenen und heterogenen Bulkerosion sowie der Oberflächenerosion.

Neben der Größe des DDS ist auch die Zusammensetzung des Polymers entscheidend. Dabei führen Faktoren, die die Hydrophobizität des Polymers erhöhen, zu einer verminderten Wasseraufnahme bzw. Hydratation des Polymers und folglich zu langsameren Abbaugeschwindigkeiten. Gängige DL-PLGA für den Einsatz in DDS variieren in ihrem Verhältnis der Monomere DL-Milch- zu Glycolsäure zwischen 50:50 und 100:0 (Tab. 1-4). Generell werden DL-PLGA mit höherem Anteil an hydrophilen Glycolsäure-Einheiten schneller abgebaut (Rafler und Jobmann 1994, Wu und Wang 2001). Bei gleichartiger Zusammensetzung des DL-PLGA verlangsamt sich die Abbaugeschwindigkeit mit steigender Molmasse, da mehr Esterbindungen gespalten werden müssen bis wasserlösliche Oligomere entstehen (Park 1994, Wu und Wang 2001). Eine Veresterung der Carboxylendgruppen des Polymers führt zu

einer verlangsamten Degradation, was auf eine erhöhte Hydrophobizität und den Entzug von freien Carboxylgruppen zurückgeführt wird, welche die Spaltung der Esterbindungen des Polymers katalysieren (Tracy *et al.* 1999). Die Morphologie des Polymers ist ebenfalls entscheidend für die Länge der Abbauphase. Kristalline Teile des Polymers PLGA zeigen im Allgemeinen ein schlechteres Wasseraufnahmevermögen und werden langsamer abgebaut als amorphe Teile des Polymers (Fischer *et al.* 1973, Li *et al.* 1990b, Li 1999). Zu beachten ist, dass für die Herstellung von DDS gebräuchliche DL-PLGA mit einem Glycolsäure-Anteil von unter 70 % intrinsisch amorph sind und somit nicht kristallisieren (Gilding und Reed 1979).

Der Einfluss von in der PLGA-Matrix enthaltenen Wirk- und Hilfsstoffen auf die Degradation ist vielfältig und würde den Rahmen der Einleitung sprengen. Prinzipiell können Wirk- und Hilfsstoffe in Abhängigkeit von ihren Eigenschaften und der enthaltenen Menge im DDS den Abbau von PLGA beschleunigen (Giunchedi *et al.* 1998) oder vermindern (Miyajima *et al.* 1998). Die Wasseraufnahme und Hydrolyserate kann durch ihre Hydrophilie bzw. Hydrophobie, ihre oberflächenaktiven Eigenschaften oder eine durch sie veränderte Osmolarität beeinflusst werden (Chung *et al.* 2006, Kang und Schwendeman 2002, Zhang *et al.* 1997). Basische Stoffe können, je nach Gehalt und Basenstärke, entweder die Autokatalyse durch Neutralisierung der sauren Polymerspaltprodukte vermindern oder eine basenkatalysierte Esterhydrolyse bewirken (Alexis *et al.* 2005, Chen *et al.* 2006, Li *et al.* 1996, Zhang *et al.* 1997). Ebenso dienen saure Stoffe als Katalysatoren für die Esterspaltung (Tang und Singh 2008). Die Wirk- und Hilfsstoffe können als Weichmacher fungieren (Blasi *et al.* 2007, Kranz *et al.* 2000) oder den Kristallinitätsgrad der PLGA-Matrix verändern.

Auch die Art der Sterilisation kann den Abbau von PLGA beeinflussen. Die gängigste Form der Sterilisation für Pharmazeutika, die Wasserdampfsterilisation bei 121 °C und 2 bar, ist für PLGA ungeeignet, da die Hitze zu einer Verformung der Matrix führt und durch den Wasserdampf die Hydrolyse des Polymers eingeleitet wird. Somit ist das häufigste Sterilisationsverfahren für PLGA die Strahlensterilisation mit Gammastrahlen. Als sichere Strahlendosis werden ca. 2,5 Mrad angesehen, wobei diese schon zu einer Veränderung des Polymers, v. a. durch Kettenspaltung und Quervernetzung, führen kann, welche sich bei höhermolekularen PLGA ($M_w > 25000$ g/mol) in einer Erniedrigung der gewichts- und anzahlmittleren Molmasse zeigt (Rothen-Weinhold *et al.* 1997). Zudem beobachteten Hausberger *et al.* 1995, dass mit steigender Strahlendosis die massebezogenen Halbwertszeiten für den hydrolytischen Abbau von PLGA (Resomer® RG 503) abnahmen.

Auch die Sterilisation mit mikrobiziden Gasen, wie Ethylenoxid und Formaldehyd, ist aufgrund der chemischen Reaktivität der Verbindungen, hohen Desorptionszeiten und der geringen Tiefenwirkung bei PLGA-Matrizes, weniger geeignet. Eine aseptische Herstellung von Arzneiformen aus PLGA ist deshalb vorzuziehen.

Der Abbau von PLGA erfolgt temperaturabhängig, wobei höhere Temperaturen zu einem schnelleren Abbau führen. Dunne *et al.* zeigten 2000, dass MP aus DL-PLGA (50:50, M_n 27200 g/mol) bei 5 °C über 175 Tage in PBS keinem nennenswerten Abbau hinsichtlich der gewichtsmittleren Molmasse und der Gesamtmasse unterlagen. Wurde hingegen die Temperatur auf 25, 37 bzw. 45 °C erhöht, konnten sie mit steigender Temperatur eine beschleunigte Degradation erfassen, wobei die Abbaugeschwindigkeit von 25 auf 37 °C um ein Vielfaches anstieg. Hakkarainen *et al.* (1996) beobachteten bei DL-PLGA (50:50, M_n 75460 g/mol) eine Erniedrigung der Molmasse um 93 % und einen Verlust an Gesamtmasse von 18 % nach 26 Tagen Lagerung bei 37 °C in PBS. Wurde die Temperatur auf 60 °C und damit über die T_g erhöht, kam es zu einer drastischen Beschleunigung des Abbaus, welcher zu einem vollständigen Verlust der Gesamtmasse innerhalb von zwei Tagen führte.

Die Zusammensetzung des Umgebungsmediums kann ebenfalls einen Einfluss auf die PLGA-Degradation haben. Da sowohl Basen als auch Säuren den Abbau katalysieren, kann sich dieser bei hohen bzw. niedrigen pH-Werten beschleunigen. Jedoch können basische pH-Werte durch Neutralisation von sauren Polymerspaltprodukten den Abbau eventuell verlangsamen (Wu und Wang 2001). Auch scheinen pH-Werte zwischen fünf und zehn den Abbau hinsichtlich der gewichtsmittleren Molmasse innerhalb der ersten zwei Wochen nicht maßgeblich zu beeinflussen (Wu und Wang 2001, Faisant *et al.* 2006). Dies wird mitunter auf eine saure Mikroumgebung in der PLGA-Matrix zurückgeführt (Kenley *et al.* 1987), die durch äußere Faktoren kaum verändert wird. Extremere pH-Werte von z. B. 2,4 führen innerhalb von wenigen Tagen zu einem schnelleren Abbau. Die heterogene Bulkerosion, welche bei neutralem Umgebungsmedium im Inneren schneller vonstatten geht, erfolgt im Gegensatz dazu bei pH 2,4 von außen nach innen (Zolnik und Burgess 2007).

Im Hinblick auf den Abbau von PLGA *in vivo* gegenüber der *in vitro*-Degradation gibt es konträre Aussagen. Während Kenley *et al.* (1987) einen geringen Unterschied in der Abbaugeschwindigkeit innerhalb von vier Wochen fanden, konnten Tracy *et al.* (1999) einen ca. zweimal schnelleren Abbau *in vivo* beobachten. Allerdings beschleunigte sich der Abbau *in vivo* auch bei den Untersuchungen von Kenley *et al.* nach vier Wochen. Als mögliche

Ursachen für den schnelleren Abbau *in vivo* werden ein enzymatischer Einfluss, weichmachende Lipid-Komponenten, fehlende *sink*-Bedingungen und immunologische Reaktionen diskutiert. Nach dem Abbau des PLGA in Monomere wird die Milchsäure im Citratzyklus zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut, wobei CO₂ pulmonal eliminiert wird (Brady *et al.* 1973). Glycolsäure kann entweder unverändert renal eliminiert werden oder ebenfalls im Citratzyklus verstoffwechselt werden (Jain 2000).

1.5.3 Herstellungsverfahren für proteinbeladene PLGA-Mikropartikel

Der Einsatz von PLGA-MP als Trägersystem für Proteine bzw. Antigene erfordert ein geeignetes Herstellungsverfahren für die effiziente Verkapselung dieser zumeist hydrophilen Substanzen. Bei der Auswahl des Verfahrens sollten die Eigenschaften und Stabilität der Proteine, die Verwendung von toxischen Substanzen, die Größe der entstehenden MP, die Durchführbarkeit im Labormaßstab, die Möglichkeit der aseptischen Herstellung sowie die instrumentellen und materiellen Kosten berücksichtigt werden. Prinzipiell geeignete und weitgehend etablierte Verfahren sind die Sprühtrocknung, die organische Phasentrennung (Koazervation) sowie die Lösungsmittel-Evaporation bzw. -Extraktion (Abb. 1-11, Sinha und Trehan 2003). Alle drei Verfahren beginnen entweder mit der Dispersion eines festen Proteinpulvers (S-Phase, engl. *solid phase*) oder der Emulsion einer wässrigen Proteinlösung (W-Phase, engl. *water phase*) in einer organischen Polymerlösung (O-Phase, engl. *oil phase*), was zu einer S/O-Suspension bzw. W/O-Emulsion führt. Da die Herstellung von phagozytischen MP, welche idealerweise kleiner als 5-10 µm sind, eine aufwendige Mikronisierung der zu verkapselnden Proteine für die Bildung einer S/O-Suspension voraussetzt, werden im Folgenden nur W/O-Methoden eingehender besprochen.

Nach der initialen Herstellung der W/O-Emulsion unterscheiden sich die drei Verfahren im weiteren Ablauf. Bei der Sprühtrocknung wird die W/O-Emulsion mit Hilfe verschiedener Düsen oder Zerstäuberscheiben feinst zerteilt und die sich bildenden Tropfen werden in einen temperierten Luftstrom eingebracht. Die Durchmischung der Tropfen mit der Luft führt zur Verdunstung des vorzugsweise leicht flüchtigen organischen Lösungsmittels aus der Polymer-Phase, was zur Präzipitation des Polymers und damit zur Bildung von proteinhaltigen MP führt. Kommerziell eingesetzt wurde diese Technik u. a. zur Herstellung der Bromocriptin-haltigen MP Parlodel LAR[®], wobei zur Steuerung der Freisetzungsgeschwindigkeit ein verzweigtes Sternpolymer aus einem zentralen Glucosemolekül und damit verknüpften

PLGA-Ketten verwendet wurde (Kissel *et al.* 1991). Vorteile der Sprühtrocknung liegen in der guten Reproduzierbarkeit, der schnellen und kontinuierlichen Herstellung, hohen Ausbeuten, guter Kontrolle der Partikelgröße und der relativ leichten Übertragung des Prozesses auf größere Anlagen (*scaling-up*) (Jain 2000).

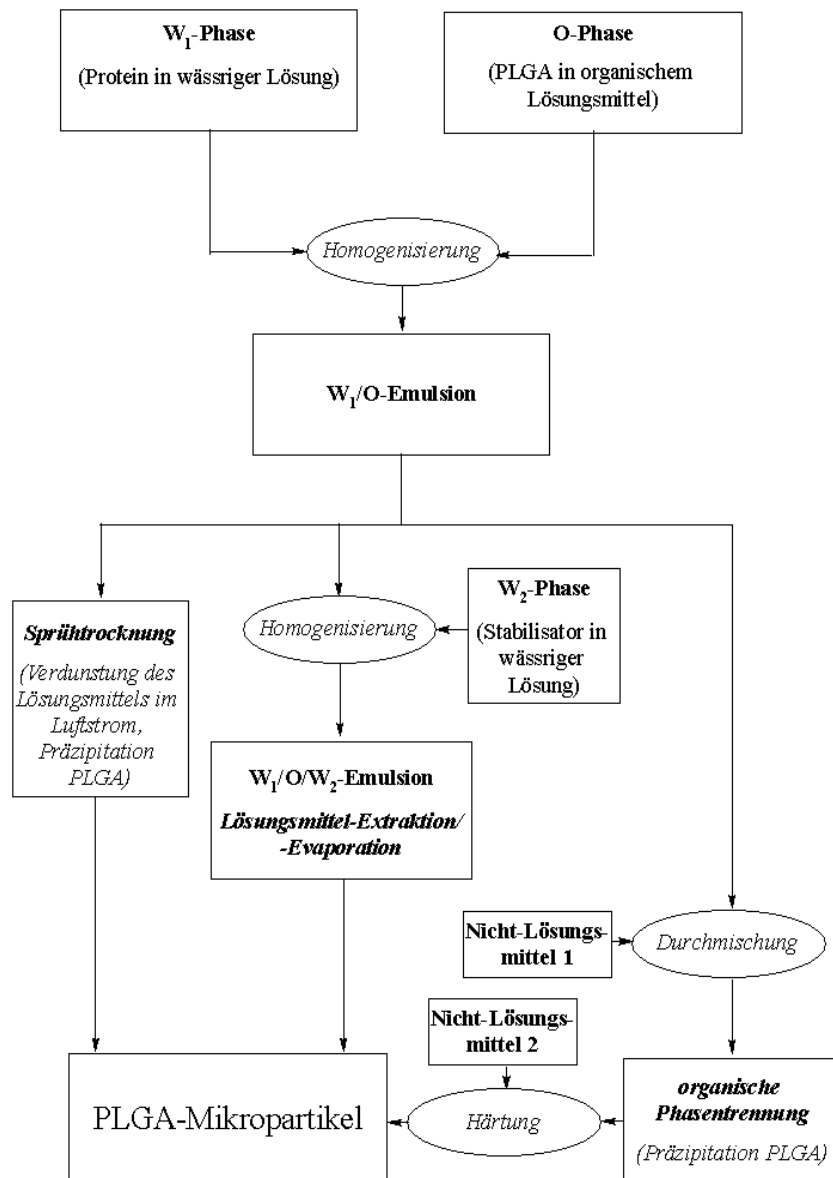


Abb. 1-11. Übersicht über MP-Herstellungsverfahren für die Verkapselung von wasserlöslichen Proteinen.

Allerdings kommen viele dieser Vorteile bei Geräten für den Labormaßstab, welche für Chargengrößen von ca. 1-5 g ausgelegt sind, nicht zum Tragen. Bei diesen Kleinstgeräten werden häufig niedrige Ausbeuten erreicht, es kann zur Faserbildung kommen und die Partikelgröße kann nur unzureichend durch die Methode beeinflusst werden (Bodmeier und Chen 1988, Johansen *et al.* 2000b, Kissel *et al.* 1997). Das Verfahren ist aufgrund des erhitzten Luftstroms ungeeignet für temperaturempfindliche Wirkstoffe. Auch ist der Gehalt

an Restlösungsmittel in den MP vergleichsweise hoch und muss häufig durch zusätzliche Abtrennungsschritte vermindert werden (Bitz und Doelker 1996). Des Weiteren sind eine aseptische Produktion und eine Rückgewinnung von organischem Lösungsmittel zwar möglich, aber apparativ und finanziell aufwendig.

Die organische Phasentrennung erfolgt durch Temperaturveränderungen und/oder durch langsame Zugabe eines organischen Nicht-Lösungsmittels für das Polymer/Protein zu der aggitierten W/O-Emulsion (Fong 1979, Ruiz *et al.* 1989, Sanders *et al.* 1984). Das Nicht-Lösungsmittel, z. B. Silikonöl, vermindert die Löslichkeit des Polymers in der O-Phase. Dadurch bildet sich an der Phasengrenzfläche um die innere W-Phase eine polymerreiche Phase, die sogenannte Koazervat-Phase, welche zu einer Hülle fusioniert. Somit entstehen noch nicht vollständig gefestigte MP, die durch Überführen des Ansatzes in einen Überschuss eines zweiten organischen Nicht-Lösungsmittels, z. B. Heptan, gehärtet werden.

Im Anschluss werden die MP durch Filtration oder Zentrifugation gesammelt, gewaschen und getrocknet. Dieses Verfahren wurde u. a. für die Verkapselung von Peptiden bei der Herstellung der FAM Decapeptyl® Depot und Sandostatin® LAR® angewendet. Vorteile dieser Methode sind die gute Kontrolle der Partikelgröße sowie die Herstellung kleiner Chargengrößen mit geringem apparativem Aufwand und ggf. unter aseptischen Bedingungen. Nachteile liegen in der relativ starken Beeinflussung des Prozesses durch die Polymereigenschaften und der Verwendung von großen Mengen an organischen, zum Teil entflammaren Lösungsmitteln, die zum einen das *scaling-up* erschweren und zum anderen zu einem erhöhten Restlösungsmittel-Gehalt führen können, welcher aufwendigere Wasch- und Trocknungsschritte zur Verminderung benötigt (Kissel *et al.* 1997). Zudem ist das Verfahren für die Herstellung von phagozytierbaren MP im unteren Mikrometer-Bereich aufgrund von auftretenden Aggregationen wenig geeignet oder erfordert eine Anpassung der Methode, bei der die organische Polymerlösung zu einer W/O-Emulsion aus wässriger Proteinlösung und Nicht-Lösungsmittel gegeben wird (McGee *et al.* 1995).

Für die Lösungsmittel-Evaporation bzw. -Extraktion wird die initiale W/O-Emulsion (Primäremulsion) zumeist durch Homogenisierung mittels Ultraschall-, Hochdruck- oder Rotor-Stator-Homogenisatoren hergestellt (Freitas *et al.* 2005). Die innere wässrige Phase (W₁-Phase) enthält das gelöste Protein bzw. Antigen und ist von einer organischen Polymer-Phase (O-Phase) umgeben, welche aus PLGA gelöst in einem leicht flüchtigen, nicht mit Wasser mischbaren, organischen Lösungsmittel, wie Dichlormethan (DCM), besteht. Die

Primäremulsion wird in eine überschüssige äußere wässrige Phase (W_2 -Phase) emulgiert und es bildet sich eine W/O/W-Doppelemulsion (Couvreur *et al.* 1997). In der Regel wird Polyvinylalkohol (PVA) als makromolekularer Stabilisator in der W_2 -Phase verwendet. Das leicht flüchtige organische Lösungsmittel geht zunächst aus der O-Phase in die W_2 -Phase über (Extraktion) und verdunstet dann aus dieser (Evaporation), wobei beide Vorgänge teilweise simultan ablaufen können. Die Diffusionsgeschwindigkeiten des organischen Lösungsmittels in der O- und der W_2 -Phase, dessen Löslichkeit in der W_2 -Phase sowie das Volumen der letzteren bestimmen unter anderem, ob die Extraktion oder die Evaporation für die Eliminierungsgeschwindigkeit des organischen Lösungsmittels aus der O-Phase entscheidend ist (Katou *et al.* 2008). Der Verlust des organischen Lösungsmittels führt zur Koazervation bzw. Präzipitation des Polymers, welches idealerweise die W_1 -Phase und das darin enthaltene Protein umschließt, und führt somit zur Bildung von MP. Die Lösungsmittel-Extraktion und -Evaporation erfolgt meist durch mehrstündiges Rühren der W/O/W-Doppelemulsion bei Raumtemperatur (RT). Anschließend werden die MP durch Filtration oder Zentrifugation gesammelt und überschüssiges PVA sowie nicht verkapseltes Protein durch mehrere Waschschrte entfernt. Zur Verminderung des Restlösungsmittel-Gehalts und zur Erhöhung der Lagerungsstabilität werden die MP getrocknet, wobei häufig eingesetzte Verfahren die Vakuum- oder Gefriertrocknung sind (Kissel *et al.* 2006). Die Firma Takeda sicherte sich in den 1980er Jahren verschiedene Patente (Okada *et al.* 1985, Okada *et al.* 1987, Yamamoto *et al.* 1986) für die W/O/W-Methode und konnte in der Folge mit dem Präparat Enantone[®] eine PLGA-MP-Depot-Formulierung des Peptids Leuprorelinacetat bis zur Marktreife entwickeln. Mit der W/O/W-Lösungsmittel-Evaporations-Methode steht somit ein Verfahren zur Verfügung, das es ermöglicht wasserlösliche Substanzen unter milden Prozessbedingungen zu verkapseln.

Vorzüge der Methode sind im Vergleich zur Sprühtrocknung der geringe apparative Aufwand, die einfach zu realisierende aseptische Herstellung, die geringe thermische Belastung, die gute Kontrolle der Partikelgröße und -verteilung sowie der zumeist niedrigere Gehalt an Restlösungsmitteln. Vorteilhaft gegenüber der organischen Phasentrennung ist die geringere Beeinflussung des Verfahrens durch die Polymereigenschaften sowie der deutlich geringere Einsatz und Restgehalt an organischen Lösungsmitteln (Kissel *et al.* 1997). Die positiven Aspekte der W/O/W-Lösungsmittel-Evaporations-Methode führten zur Auswahl dieses Verfahrens für die Herstellung der MP in der vorliegenden Arbeit. Allerdings werden

die Partikelcharakteristika aufgrund des mehrstufigen Prozesses durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, welche in Tab. 1-5 zusammengefasst sind. Deshalb sollte eine Anpassung der Prozessparameter hinsichtlich der Partikelgröße und -verteilung sowie der Verkapselungseffizienz für die verwendeten Polymere bzw. das Modell-Antigen erfolgen.

Nachteilig ist eine mögliche Beeinträchtigung der Proteinstabilität beim Verkapselungsprozess, welche zu einer verminderten Bioaktivität bzw. Antigenität führen kann. Protein-Antigene können während des Herstellungsverfahrens, aber auch bei der Lagerung sowie der Freisetzung aus der Matrix, aggregieren oder abgebaut werden. Die Denaturierung der Proteine erfolgt bei der Herstellung zumeist durch den Kontakt mit dem organischen Lösungsmittel an der W_1/O -Grenzfläche (Alonso *et al.* 1994, Sah 1999, Uchida *et al.* 1998) und den Energieeintrag durch hohe Scherkräfte bzw. Ultraschall bei der Emulsionsbildung. Eine detaillierte Übersicht über die Einflussfaktoren, welche die Proteinstabilität beeinträchtigen, und Strategien zur Behebung dieser Probleme geben Bilati *et al.* (2005).

Weitere potenziell nutzbare Verfahren zur Herstellung von phagozytischen proteinbeladenen PLGA-MP umfassen die Emulgierung mittels mikroporöser Membranen (Doan und Olivier 2009, Gasparini *et al.* 2008, Ma *et al.* 1999, Veldhuis *et al.* 2009) und verschiedene *jet break-up*-Prozesse, darunter elektrostatische Tropfengeneration (Ding *et al.* 2005, Lee *et al.* 2010, Xie *et al.* 2008), akustische *jet excitation* (Berkland *et al.* 2001, Zvonar *et al.* 2009), *flow focusing* (Holgado *et al.* 2009, Xu *et al.* 2009) und Trägerstromverfahren (Berkland *et al.* 2001). Diese Verfahren sind aber zumeist apparativ aufwendig und schwierig aseptisch durchzuführen.

Tab. 1-5. Prozessparameter der W/O/W-Lösungsmittel-Evaporationsmethode und deren Einfluss auf die Partikelcharakteristika modifiziert nach Kissel *et al.* 2006.

| Phasenzusammensetzung und Herstellungsbedingungen | Parameter | Genereller Einfluss auf die Partikelcharakteristika |
|--|---|--|
| <i>W₁-Phase</i> | | |
| Eigenschaften des Wirkstoffs (IEP, M _w) | Diffusionsvermögen, Löslichkeit, Größe, Interaktion mit dem Polymer | Einfluss auf die Wirkstoff-Freisetzung |
| Wirkstoff-Beladung: Volumen des Wassers, Konzentration, Viskosität | erhöhte Beladung | erhöhte Partikelgröße und Porosität |
| Hilfsstoffe (Stabilisatoren, Puffersalze, Salze, Lösungsmittel) | erhöhter osmotischer Druck | verminderte Verkapselungseffizienz |
| <i>O-Phase</i> | | |
| Polymereigenschaften (M _w , Struktur, Quellfähigkeit) | erhöhtes M _w , erhöhte Viskosität | erhöhte Partikelgröße, erhöhte Verkapselungseffizienz |
| Lösungsmittleigenschaften (Dampfdruck) | verminderte Härtungsdauer | erhöhte Verkapselungseffizienz |
| | zu schnelle Härtung/Aggregation vor der Homogenisierung | Einfluss auf Porosität/Dichte |
| Polymermenge, Volumen des organischen Lösungsmittels, Konzentration, Viskosität, Löslichkeit in der kontinuierlichen Phase | erhöhte Polymerkonzentration, erhöhte Viskosität | erhöhte Partikelgröße, erhöhte Verkapselungseffizienz, verminderte „burst“-Freisetzung |
| Hilfsstoffe (Stabilisatoren, Weichmacher) | oberflächenaktive Substanzen | verminderte Partikelgröße und Verkapselungseffizienz, höhere „burst“-Freisetzung |
| <i>W₂-Phase</i> | | |
| Stabilisatoreigenschaften, -typ und -konzentration, Viskosität | Fähigkeit zur Stabilisierung der dispergierten Phase | Einfluss auf Verkapselungseffizienz/Partikelgröße |
| Hilfsstoffe (Puffersalze) | erhöhter osmotischer Druck | erhöhte Verkapselungseffizienz |
| Volumenverhältnisse der Phasen: W ₁ /O ↔ W ₂ , W ₁ ↔ O, O ↔ W ₂ | verminderte W ₂ -Phase, erhöhte W ₁ -Phase | verminderte Verkapselungseffizienz, erhöhte Freisetzungsrate |
| <i>Herstellungsbedingungen</i> | | |
| Temperatur | | |
| Homogenisierungstechnik, -gerät und -intensität (z. B. Rührgeschwindigkeit, Dauer) | erhöhte Intensität, Zeit | verminderte Partikelgröße, verminderte Verkapselungseffizienz |
| Entzug des organischen Lösungsmittels, Druckverhältnis | verminderte Härtungsdauer | erhöhte Verkapselungseffizienz, Einfluss auf Porosität/Dichte |
| geplante Ansatzgröße, Gefäßgestaltung | <i>scaling up</i> | |
| <i>weitere Verarbeitung der Mikropartikel</i> | | |
| Isolation (Filtrieren, Zentrifugieren), Waschen, Trocknen (Vakuum, Lyophilisation) | | |

1.5.4 Oberflächenmodifizierung von PLGA-Mikropartikeln

Für eine erfolgreiche Tumorummuntherapie mit huMoDC ist die *ex vivo*-Reifung von iDC zu mDC und die nachfolgende *in vivo*-Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen erforderlich. Da die meisten Tumorantigene sowie PLGA-MP als Antigen-Trägersysteme keine Reifung der iDC verursachen (Fischer *et al.* 2007, Wischke *et al.* 2006), müssen die MP mit einem Reifungsstimulanz, beispielsweise TLR-Agonisten, modifiziert werden. Zudem ist die Aufnahme des TLR-Agonisten und des Antigens in dasselbe Phagosom für die gezielte nachfolgende Aktivierung von antigenspezifischen Zellen vorteilhaft (Blander und Medzhitov 2006, Kazzaz *et al.* 2006, Schlosser *et al.* 2008). Eine Modifizierung der PLGA-MP mit den entsprechenden TLR-Agonisten ist sinnvoll, wobei der TLR-Agonist auf der Oberfläche der PLGA-MP lokalisiert sein sollte, um mit dem zugehörigen Rezeptor auf bzw. in den DC zu interagieren. Die Assoziation des TLR-Agonisten an die MP-Oberfläche kann dabei über kovalente oder nicht-kovalente Bindungen erfolgen. Man unterscheidet weiterhin bei den nicht-kovalenten Bindungsarten zwischen elektrostatischen, hydrophilen und hydrophoben Interaktionen.

Für die nachträgliche kovalente Oberflächenmodifizierung von hergestellten PLGA-MP sind v. a. nasschemische, im wässrigen Milieu ablaufende Methoden geeignet, da bei diesen die Integrität der PLGA-MP erhalten bleibt. Alternativ kann PLGA vor der MP-Herstellung in organischer Lösung chemisch modifiziert werden (Lavik *et al.* 2001, Nam und Park 1999). Bei der Verwendung von Proteinen als Kopplungspartner besteht die Gefahr einer Denaturierung im organischen Lösungsmittel. Das so veränderte Polymer weist andere Eigenschaften als das Ausgangspolymer auf, was die Herstellungsparameter und MP-Charakteristika beeinflusst (Caponetti *et al.* 1999). Deshalb werden im Weiteren nur die erstgenannten Methoden besprochen.

Die im PLGA vorhandenen freien Carboxylendgruppen stellen die Angriffspunkte für eine nasschemische kovalente Kopplung dar. Die funktionellen Gruppen des zu bindenden Moleküls entscheiden darüber, welche Methode ausgewählt wird (Goddard und Hotchkiss 2007). Die gängigste Kopplung erfolgt zwischen Carboxylgruppen und primären Aminen mit Hilfe von wasserlöslichen Carbodiimiden, wie N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDAC), und führt unter Abspaltung eines Isoharnstoff-Derivats zur Entstehung einer stabilen Amidbindung zwischen den MP und den zu bindenden

Molekülen (Abb. 1-12) (Hoare und Koshland 1966, Williams und Ibrahim 1981). Als Zwischenprodukt entsteht ein sehr reaktiver O-Acylisoharnstoffester, der auch mit anderen Nucleophilen, wie Thiolen, Hydrazinen und Hydroxylgruppen, reagiert (Abb. 1-12).

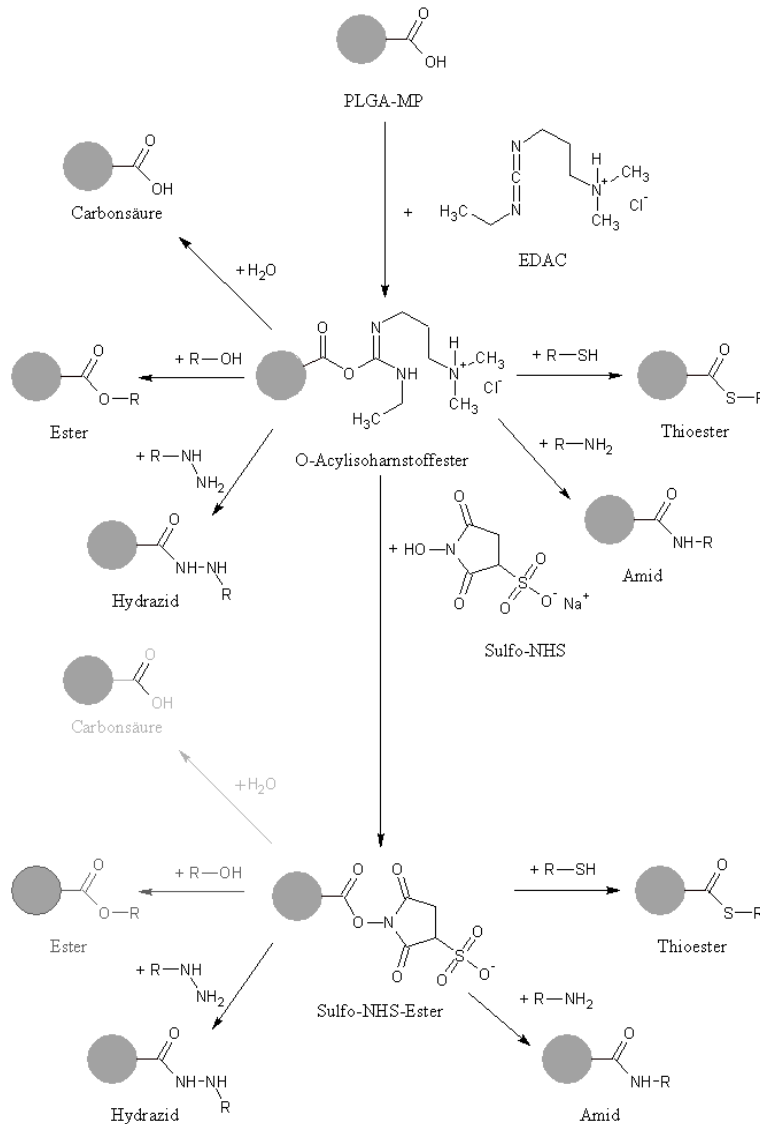


Abb. 1-12. Schematische Darstellung der Kopplung von Reaktionspartnern mit verschiedenen funktionellen Gruppen an Carboxylgruppen auf PLGA-MP mit Hilfe von EDAC bzw. EDAC/sulfo-NHS.

Problematisch ist dabei die schnelle Hydrolyse in wässrigem Milieu, welche zur Regeneration der Carboxylgruppe führt und v. a. bei niedriger Konzentration des primären Amins überwiegt (Gilles *et al.* 1990). Enthält das zu koppelnde Molekül sowohl Carboxylgruppen als auch Nucleophile, so kann es in Gegenwart von EDAC zur Selbst-Polymerisation kommen und die Bindung des Moleküls an die PLGA-MP verhindert werden. Um diese Probleme zu umgehen, fügten Staros *et al.* 1986 das wasserlösliche N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) zu der EDAC-Lösung hinzu. Sulfo-NHS reagiert mit dem reaktiven O-Acylisoharnstoffester unter Abspaltung eines Isoharnstoff-Derivats zu

einem Sulfo-NHS-Ester. Letzterer ist weniger reaktiv und somit hydrolysestabiler als der O-Acylisoharnstoffester (Abb. 1-12). Zudem wird Sulfo-NHS in deutlich höherer Konzentration als das anzukoppelnde Molekül verwendet, womit eine nahezu quantitative Umwandlung der Carboxylgruppen in Sulfo-NHS-Ester gewährleistet wird. Als Folge wird eine erheblich höhere Ausbeute bei der Derivatisierung der Carboxylgruppen erreicht.

Chakravarthi und Robinson verglichen 2011 die kovalente Kopplung von Chitosan mittels EDAC/NHS-Methode an Paclitaxel-beladene PLGA-MP mit der Adsorption. Die Effizienz der Assoziation war bei der kovalenten Methode (ca. 98 %) höher als bei der adsorptiven (ca. 81 %). Darüber hinaus sank die Assoziationseffizienz bei der adsorptiven Methode auf ca. 60 %, wenn die Chitosankonzentration in der Beschichtungslösung von 0,2 auf 1 % erhöht wurde, während sie bei der kovalenten Methode gleich blieb.

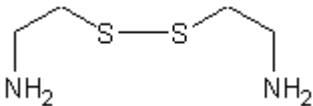
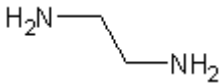
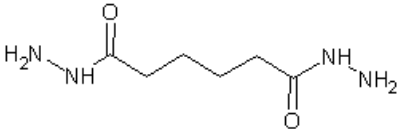
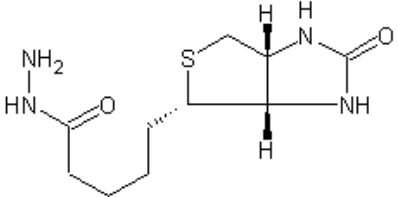
Die EDAC/Sulfo-NHS-Methode wurde von Kasturi *et al.* 2005 verwendet, um verzweigt-kettiges Polyethylenimin (PEI) kovalent an PLGA-MP (Resomer[®] RG 502H) zu binden. Während unmodifizierte PLGA-MP ein negatives Zetapotenzial zeigten, führte die kovalente Kopplung von PEI an die MP-Oberfläche zu einem positiven Zetapotenzial von ca. + 35 mV, welches signifikant höher war als bei der Adsorption (+ 10-24 mV).

Die Bindung des anzukoppelnden Moleküls kann direkt oder über ein chemisches Verbindungsstück, einen sog. Spacer, erfolgen (Tab. 1-6). Die Spacer konvertieren die endständigen Carboxylgruppen in andere funktionelle Gruppen, welche dann mit den anzukoppelnden Molekülen reagieren. So wandelten Nobs *et al.* 2004 die endständigen Carboxylgruppen von PLA-NP mit Hilfe von EDAC/Cystamin/Tris(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid in Thiolgruppen um. Die thiolierten NP wurden im Anschluss an NeutrAvidin[™], welches mit sulfo-MBS (m-Maleinimidobenzyl-N-hydroxysuccinimidester) aktiviert wurde, kovalent gebunden. Die NeutrAvidin[™]-modifizierten PLA-NP zeigten eine Biotin-Bindungskapazität, die geringer als die von löslichem NeutrAvidin[™] war, was die Autoren auf Aggregatbildung der Proteine zurückführten.

Zudem kann über Spacer der Abstand des Moleküls zur MP-Oberfläche erhöht werden, was eine sterische Hinderung vermeidet. Der Einsatz von Spacern ist aber nicht immer für eine Interaktion des PLGA-MP-gebundenen Liganden mit seinem Rezeptor auf der Zelloberfläche nötig. Brandhonneur *et al.* koppelten 2009 RGD- und RAD-Heptapeptide, die Proteine Weizenkeim-Agglutinin (WGA, *wheat germ agglutinin*) und bovines Serumalbumin (BSA, *bovine serum albumin*), Poly-L-lysin sowie Mannose-PEG₃-NH₂ mittels einer

Carbodiimid-Methode an PLGA-MP (D[4,3] 2,5 µm; Resomer[®] RG 503H). Aufgrund der Größe und der funktionellen Gruppen der anzukoppelnden Moleküle waren für das Protein WGA ($M_w \sim 38000$ g/mol) und das RGD-Heptapeptid ($M_w \sim 720$ g/mol) keine Spacer notwendig, wohl aber für das kleinere Mannosemolekül ($M_w \sim 180$ g/mol), welches über einen PEG₃-Spacer an die MP gebunden wurde.

Tab. 1-6. Spacer für die Reaktion mit EDAC- oder EDAC/NHS-aktivierten Carboxylgruppen zusammengestellt aus Hermanson 2008.

| Spacer | Strukturformel | Funktion(en) - Beispiele |
|---|---|--|
| Cystamin [2,2'-Dithiobis(ethylamin)] |  | Reaktion mit Thiolen zu Disulfidbrücken, Konversion Carboxylgruppe zu primärem Amin |
| Ethylendiamin (Ethan-1,2-diamin) |  | Konversion Carboxylgruppe zu primärem Amin, Umwandlung von negativer in positive Oberflächenladung von PLGA-MP (pH < 8-10) |
| Adipinsäuredihydrazid (Hexan-1,6-disäuredihydrazid) |  | Konversion Carboxylgruppe zu Hydrazid, Reaktion mit Aldehyden /Ketonen zu Hydrazone |
| (+)-Biotinhydrazid {5-[(3a <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,6a <i>R</i>)-2-Oxohexahydro-1 <i>H</i> -thieno[3,4- <i>d</i>]imidazol-4-yl]pentansäurehydrazid} |  | Konversion Carboxylgruppe zu Biotin, nicht-kovalente Bindung mit Streptavidin/Avidin |

Vorteil der kovalenten Kopplung ist die permanente Bindung des Agonisten an die PLGA-MP, was die Aufnahme des Antigens zusammen mit dem TLR-Agonisten in dasselbe Phagosom garantiert, sowie eine verminderte Wirkung durch Ablösen des TLR-Agonisten von der MP-Oberfläche und dessen Verdünnung im Umgebungsmedium verhindert. Des Weiteren sind die häufig eingesetzten nasschemischen Methoden mit einer gebräuchlichen Laborausstattung durchführbar.

Nachteile sind die zumeist aufwendigen mehrstufigen Arbeitsabläufe, welche bei Verzicht auf eine Endsterilisation aseptisch durchgeführt werden müssen, sowie der Einsatz von z. T. gefährlichen Chemikalien, die eine entsprechende Entsorgung benötigen und deren Restgehalt

in den PLGA-MP die DC negativ beeinflussen könnte. Eine kovalente Kopplung kann durch oberflächenverankertes PVA, welches als Stabilisator häufig in der äußeren wässrigen Phase bei der Herstellung von PLGA-MP mittels W/O/W-Lösungsmittel-Evaporations-Methode eingesetzt wird, sterisch verhindert werden (Boury *et al.* 1995, Scholes *et al.* 1999). Allerdings wurde bei den genannten Studien PVA in relativ hohen Konzentrationen von 5-15 % (m/V) eingesetzt. Shakesheff *et al.* konnten 1997 mit Hilfe der Röntgenphotoelektronen-Spektroskopie (*X-ray photoelectron spectroscopy*) auf der Oberfläche von PLGA-MP (Resomer® RG 506, D[4,3] 10,8 µm) bei Verwendung einer 1%igen PVA-Lösung 50 % Vinylalkohol-Einheiten und 50 % Milchsäure-Einheiten identifizieren und somit keine vollständige Bedeckung der Oberfläche mit PVA feststellen. Zudem kann durch die kovalente Kopplung des TLR-Agonisten dessen Konformation und sterische Zugänglichkeit verändert werden, was die Rezeptor-Ligand-Interaktion beeinträchtigt und ggf. zu einer verminderten biologischen Wirkung führen kann. So konnten Kocbek *et al.* 2007 eine verminderte Bindung von kovalent an PLGA-NP gebundenen Antikörpern an ihre Zielmoleküle feststellen, während adsorptiv gebundene Antikörper nicht beeinträchtigt waren. Die Bindung des TLR-Agonisten über Spacer kann in diesen Fällen eine sterische Hinderung vermeiden.

Die Adsorption von Liganden an die PLGA-MP kann prinzipiell über Van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken-Bindung) und ionische Wechselwirkungen (elektrostatische Anziehung) erfolgen und ist von den physikochemischen Eigenschaften des Liganden abhängig. Sie erfolgt an der Grenzfläche zwischen Partikel und Umgebungsmedium und kann unter thermodynamischen und kinetischen Aspekten betrachtet werden. Häufig genutzt wird die elektrostatische Assoziation von Molekülen an die Partikeloberfläche. Dabei spielen die Ladungsdichte, die Partikelgröße, der pH-Wert, die Ionenstärke und die Temperatur eine wichtige Rolle. Eine ausführliche Darstellung der theoretischen Hintergründe der Adsorption von Ionen, Polyelektrolyten und Proteinen geben Cohen Stuart *et al.* 1991.

PLGA-MP sind aufgrund der endständigen Carboxylgruppen, sofern diese unverestert vorliegen, bei neutralem pH-Wert negativ geladen und können somit positiv geladene Moleküle vorwiegend über elektrostatische Anziehung adsorbieren. Um eine noch stärkere Ladungsdichte der PLGA-MP zu erreichen, werden geladene Moleküle in der Oberfläche der Partikel verankert. Die Verankerung erfolgt oftmals durch die Zugabe der Moleküle zur

W₂-Phase bei der Herstellung mittels W/O/W-Lösungsmittel-Evaporations-Methode. Dabei diffundieren hydrophobe Anteile der Moleküle aus der W₂-Phase in die polymerhaltige O-Phase der entstehenden und noch nicht ausgehärteten PLGA-MP, während die hydrophilen Teile der Moleküle in der W₂-Phase verbleiben. Nach dem Entzug des Lösungsmittels und der Aushärtung der PLGA-MP sind die Moleküle dann auf der Oberfläche verankert. Dieses Phänomen wurde zunächst für den Stabilisator PVA beobachtet (Boury *et al.* 1995, Shakesheff *et al.* 1997, Scholes *et al.* 1999). Als Ersatz für PVA wurden anionische oberflächenaktive Stoffe, wie Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) und Natriumdocusat verwendet, um negativ geladene PLGA-MP herzustellen (Chesko *et al.* 2005, Kazzaz *et al.* 2000).

Kationische PLGA-MP wurden ebenfalls über das Verfahren der Oberflächen-Verankerung hergestellt. Die positiv geladenen PLGA-MP können Nukleinsäuren, wie Plasmide, mRNA, siRNA, Antisense-Oligonukleotide und einigen TLR-Liganden (TLR3/7/8/9), elektrostatisch adsorbieren und stabilisieren (Briones *et al.* 2001, O'Hagan *et al.* 2004, Singh *et al.* 2001, Wischke *et al.* 2009). Zudem wird die Muco- und Zelladhäsion durch die positive Oberflächenladung verbessert, da diese verstärkt an die negativ geladene Schleimhaut bzw. Zelloberfläche binden (Tabata und Ikada 1988, Thiele *et al.* 2001, Vila *et al.* 2002, Wischke *et al.* 2006). Als kationische Moleküle wurden das Tensid Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, Singh *et al.* 2000) und polykationische Polymere, wie Poly-L-lysin (Cui und Schwendeman 2001), Poly-L-lysin-g-PEG (Faraasen *et al.* 2003), Polyethylenimin (Shakweh *et al.* 2005), Chitosan (Ravi Kumar *et al.* 2004, Vila *et al.* 2002), Protamin (Fischer *et al.* 2007, Martínez Gómez *et al.* 2008) und Diethylaminoethyl-dextran (DEAE-Dextran, Wischke *et al.* 2006), verwendet.

Wischke *et al.* (2006) verglichen die Herstellung von verschiedenen positiv geladenen MP, wobei als Zusätze zur W₂-Phase CTAB, Chitosan/PVA und DEAE-Dextran/PVA verwendet wurden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um O'Hagan (Briones *et al.* 2001, O'Hagan *et al.* 2004, Singh *et al.* 2000, 2001, 2003) konnte keine stabile Assoziation des niedermolekularen CTAB an die MP-Oberfläche (Singh *et al.* 2003) gefunden werden. So wurde mit zunehmender Anzahl an Waschschritten mit destilliertem Wasser eine Agglomeration der CTAB-PLGA-MP durch Ablösen von oberflächengebundenem CTAB festgestellt. Das Verändern der CTAB-Konzentrationen (1-5 mg/ml) und der Hydrophobizität des eingesetzten Polymers war erfolglos. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Oster *et al.*

(2005), die ebenfalls eine Agglomeration von CTAB-PLGA-MP feststellten. Im Gegensatz dazu führte der Einsatz von höhermolekularen Polymermischungen, d. h. Chitosan/PVA und DEAE-Dextran/PVA, zu stabilen MP-Formulierungen, bei denen eine Abnahme des positiven Zetapotenzials mit zunehmenden Waschschritten bei pH 7 beobachtet wurde, was auf einen partiellen Verlust der Polykationen Chitosan und DEAE-Dextran schließen ließ. Hierbei wiesen DEAE-Dextran-modifizierte PLGA-MP auch nach dreimaligem Waschen ein positives Zetapotenzial auf, während Chitosan-modifizierte PLGA-MP bereits ein leicht negatives Zetapotenzial zeigten. Neben der elektrostatischen Stabilisierung durch die Polykationen schien also v. a. die sterische Stabilisierung durch PVA bedeutsam zu sein.

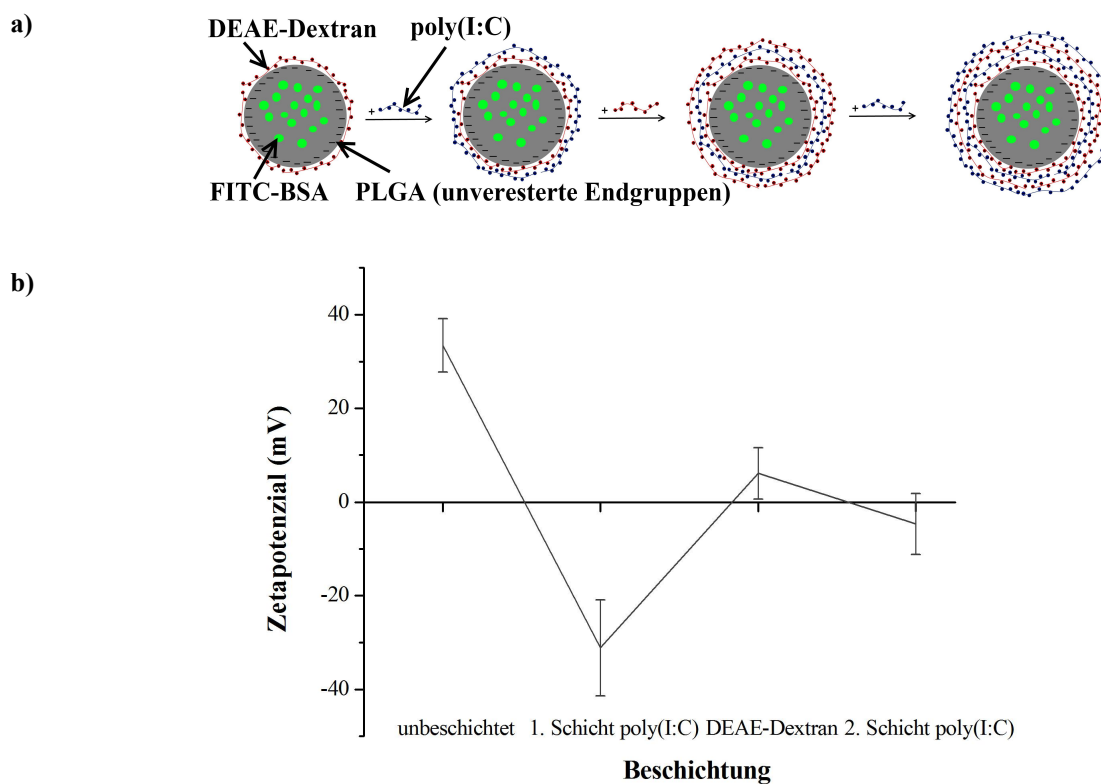


Abb. 1-13. Beschichtung von FITC-BSA-beladenen DEAE-Dextran-modifizierten PLGA-MP mit Poly(I:C) in einem Mehrschicht-Verfahren (modifiziert nach Schendler *et al.* 2008). - a) Schematische Darstellung des Beschichtungsverfahrens; b) Zetapotenzial nach der jeweiligen Beschichtung (MW \pm SD, n = 5).

Des Weiteren konnte in unserer Arbeitsgruppe ein Mehrschicht-Verfahren entwickelt werden, welches eine erhöhte Beladung von PLGA-MP mit der doppelsträngigen RNA Polyinosin-Polycytidin-Säure [Poly(I:C)], einem TLR3-Agonisten, ermöglicht (Abb. 1-13, Wischke *et al.* 2009).

Eine vergleichbare Schicht-für-Schicht-Methode (*layer-by-layer*) wurde von Decher 1997 für die Funktionalisierung von flachen Oberflächen mit sich abwechselnder Anlagerung von

positiv und negativ geladenen Polyelektrolyten beschrieben. In unserem Verfahren wurden positiv geladene DEAE-Dextran-modifizierte PLGA-MP zunächst mit negativ geladener Poly(I:C), dann mit positiv geladenem DEAE-Dextran und schließlich wieder mit Poly(I:C) beschichtet. Die Beschichtungen mit den verschiedenen Polyelektrolyten führte jeweils zur Umkehr des Zetapotenzials (Abb. 1-13b). Zudem konnte eine deutlich höhere Beladung mit Poly(I:C) erreicht werden als in einem Einfachschicht-Verfahren möglich gewesen wäre (Abb. 1-14). Die so hergestellten Poly(I:C)-PLGA-MP wurden effizient von huMoDC phagozytiert und induzierten eine Reifung, die der eines Zytokin-Cocktails oder einer mehr als 12fach höheren Konzentration an gelöster Poly(I:C) entsprach.

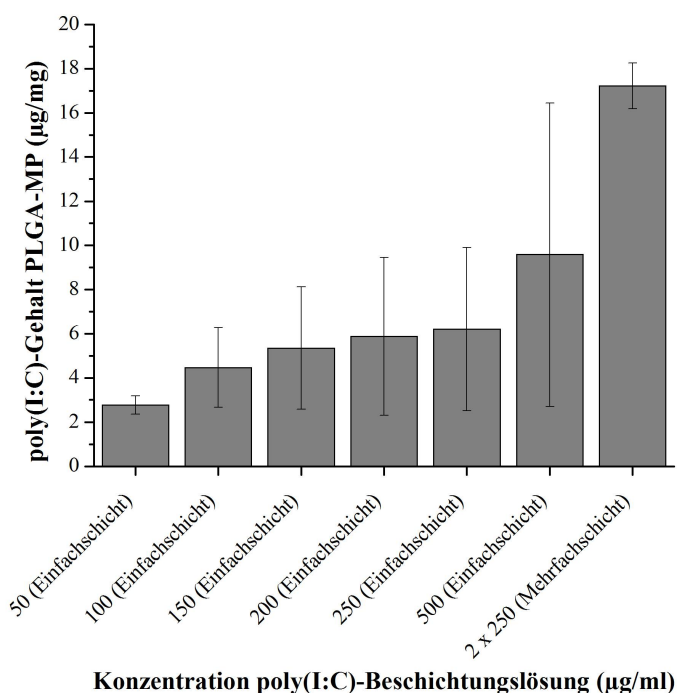


Abb. 1-14. Vergleich des Gehalts an Poly(I:C) von PLGA-MP in Abhängigkeit von der Poly(I:C)-Konzentration der Beschichtungslösung im Einfach- und Mehrfachschicht-Verfahren nach Wischke *et al.* 2009 (bisher unveröffentlichte Daten). Dargestellt ist der MW \pm SD von mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Auch amphiphile Moleküle, wie LPS, konnten durch Zusatz zu einer PVA-haltigen W_2 -Phase in der Oberfläche von PLGA-NP verankert werden. So zeigten Demento *et al.* 2009 einen Einbau von ca. 13 $\mu\text{g}/\text{mg}$ LPS in proteinbeladene PLGA-NP mit Hilfe des *Limulus*-Amöbozyten-Lysat-Tests (LAL-Test).

Vorteile der Oberflächenverankerung von Liganden sind der vergleichsweise geringe Arbeitsaufwand und der geringe Gehalt des Liganden im bzw. auf den PLGA-MP im Vergleich zur Inkorporation des Liganden in die O-Phase (Evora *et al.* 1998). Bei letztgenannter Methode werden die Liganden meist mit Hilfe von Kosolvenzien in der O-Phase gelöst und finden sich nach der Lösungsmittel-Evaporation auch auf der Oberfläche

der PLGA-MP wieder (Bivas-Benita *et al.* 2004). Allerdings ist der Gehalt des Liganden im PLGA-MP relativ hoch, was zur Veränderung der Eigenschaften des Polymers und veränderten MP-Charakteristika führen kann (Atuah *et al.* 2003). Vorteilhaft bei der Oberflächenverankerung ist weiterhin das im Vergleich zur kovalenten Kopplung unveränderte Polymer, wodurch die Zulassung von PLGA für die Anwendung am Menschen erhalten bleibt.

Nachteilig ist die mögliche Desorption des Liganden von der Oberfläche und die relativ große Gesamtmenge an Ligand bei der direkten Oberflächenverankerung, die in der zumeist großvolumigen W_2 -Phase vorhanden ist. Bei teuren Liganden ist somit die Beschichtung mit hoher Konzentration in kleinem Volumen günstig.

Den letzten Ansatz verfolgten Trimaille *et al.* (2003) und beschichteten kleine (280 nm) und große (980 nm) PLA-NP nach der Herstellung mit verschiedenen PEI-Konzentrationen, was zu einer Vergrößerung des hydrodynamischen Teilchendurchmessers und zu einem Anstieg des negativen Ausgangs-Zetapotenzials auf positive Werte führte. Dabei wurde bei den größeren Partikeln eine niedrigere absolute Adsorption von PEI erreicht, was auf die geringere spezifische Oberfläche zurückgeführt wurde. Unterstützt wurde diese Annahme durch den schnelleren Anstieg des Zetapotenzials und das frühere Erreichen eines Plateaus bei + 25-30 mV mit steigender PEI-Adsorption bei den größeren PLA-NP. Die Adsorption von PEI war zudem abhängig von der Ionenstärke des Umgebungsmediums, wobei eine geringe Ionenstärke eine niedrige Adsorption von PEI bedingte. Messai *et al.* (2003) untersuchten dieses Phänomen näher und vermuteten aufgrund der erhaltenen Adsorptions-Isotherme, der elektrophoretischen Messungen und der rasterelektronenmikroskopischen Bilder, dass bei geringer Salzkonzentration eine Einzelschicht des Polyelektrolyten gebildet wird, während bei höherer Ionenstärke Mehrfachschichten entstehen. Die weitere Adsorption von negativ geladener DNA an PEI-modifizierten PLA-NP war bei niedrigen pH-Werten und hohen Ionenstärken hinsichtlich der adsorbierten Menge an DNA und der Adsorptionsstärke erhöht. Munier *et al.* (2005) konnten auch für die Polyelektrolyte Chitosan und Poly(2-dimethylamino)ethyl-methacrylat eine effektive nachträgliche Adsorption an PLA-NP zeigen. Die nach der Herstellung erfolgte Beschichtung von Partikeln aus PLA bzw. PLGA ist somit geeignet für die Modifizierung der Oberfläche mit positiv geladenen Polyelektrolyten.

1.6 Zielstellung

In vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten mit DEAE-Dextran modifizierte kationische PLGA-MP hergestellt werden, die effektiv das Modell-Antigen FITC-BSA verkapselten (Wischke *et al.* 2006). Die Herstellung erfolgte nach der W/O/W-Lösungsmittel-Evaporations-Methode mit Hilfe eines Mikromischers. Das Verfahren war geeignet für die Herstellung von proteinbeladenen PLGA-MP zum Targeting von DC, erwies sich aber durch die gelegentliche Verstopfung des Mikromischers als wenig robust. Die kationischen PLGA-MP wurden effektiv mit dem TLR3-Agonisten Poly(I:C) modifiziert (Wischke *et al.* 2009). Hierzu wurde eine Schicht-für-Schicht-Methode angewendet, bei der die negativ geladene doppelsträngige RNA Poly(I:C) abwechselnd mit dem positiv geladenen Polymer DEAE-Dextran auf die MP-Oberfläche über elektrostatische Wechselwirkungen aufgebracht wurden. Die erhaltenen Poly(I:C)-modifizierten PLGA-MP wurden effizient von huMoDC aufgenommen und führten zu deren Reifung. Die Reifung durch Poly(I:C)-modifizierte PLGA-MP war vergleichbar mit der Reifung durch eine ca. 12fach höhere Konzentration an gelöster Poly(I:C).

Das Ziel der hier vorgelegten Arbeit war die Herstellung von PLGA-MP als Antigen-Trägersystem, die das Modell-Antigen BSA (falls erforderlich FITC-BSA) effektiv verkapseln sollten. Die folgenden Anforderungen wurden dabei an das Herstellungsverfahren und die PLGA-MP gestellt:

- Herstellung mittels aseptischer W/O/W-Lösungsmittel-Evaporations-Methode unter Einsatz des robusteren Rotor-Stator-Homogenisators als Dispergierwerkzeug
- Einfluss des verwendeten PLGA, der PLGA-Konzentration sowie der Homogenisationsgeschwindigkeit und -zeit bei der Sekundäremulgierung auf die Partikelcharakteristika
- Partikelgröße für eine Phagozytose durch APC kleiner als 5-10 μm
- kontrollierte Freisetzung des Modell-Antigens BSA
- Charakterisierung der Partikel hinsichtlich ihrer Ultrastruktur, ihrer Ladung, ihres Restlösungsmittel- und Endotoxingehalts

Die im ersten Schritt als geeignet ermittelten PLGA-MP sollten in einem zweiten Schritt mit TLR-Agonisten modifiziert werden, um ein bifunktionales Antigen-Trägersystem zu erhalten, welches das Antigen zusammen mit dem TLR-Agonisten in dasselbe Phagosom in

den DC transportiert. Dies ist für eine optimale Antigenpräsentation und Reifung der DC notwendig (Blander und Medzhitov 2006) und essentiell für die Entwicklung einer optimalen antitumorellen T-Zellantwort (Hamdy *et al.* 2008, Schlosser *et al.* 2008). Die gleichzeitige Applikation von PLGA-MP mit TLR-Agonisten als Antigen-Trägersystem wurde bisher für TLR3- (Wischke *et al.* 2009), TLR4- (Kazzaz *et al.* 2006) und TLR9-Agonisten (Fischer *et al.* 2009, San Román *et al.* 2008, Singh *et al.* 2001) beschrieben. In dieser Arbeit sollten erstmalig PLGA-MP mit dem TLR2/1-Agonisten BAS sowie dem TLR2/6-Agonisten FSL1 modifiziert werden. Eine Bindung der TLR2-Agonisten an die Oberfläche der PLGA-MP ist dabei sinnvoll, damit trotz niedrigem Gesamtgehalt an TLR2-Agonist eine hohe Interaktionsdichte zwischen TLR-Ligand auf den MP und TLR auf den APC erreicht wird. Hierzu waren Verfahren für die Adsorption und die kovalente Kopplung der TLR2-Agonisten an die MP-Oberfläche zu etablieren und der Gehalt an gebundenen TLR2-Agonisten zu bestimmen.

Die TLR2-Agonist-modifizierten PLGA-MP sollten hinsichtlich ihrer Aufnahme durch und immunstimulatorischen Wirkung auf APC im Vergleich zu gelösten TLR2-Agonisten, unmodifizierten PLGA-MP und deren Mischung erforscht werden. Für anfängliche Untersuchungen wurden makrophagenähnliche THP-1-Zellen ausgewählt, da Versuche mit dieser Zelllinie deutlich preiswerter und weniger aufwendig als Versuche mit huMoDC sind. Die THP-1-Zellen sollten durchflusszytometrisch charakterisiert und die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen mittels ELISA oder ELISPOT bestimmt werden. Nach einer erfolgreichen Bewertung der TLR2-Agonist-modifizierten PLGA-MP als Antigen-Trägersystem für THP-1-Zellen war nachfolgend der Einfluss dieser Partikel auf huMoDC zu analysieren. Die folgenden Fragestellungen sollten dabei bearbeitet werden:

- Führt die Phagozytose der TLR2-Agonist-modifizierten PLGA-MP zu einer Reifung der huMoDC oder wird diese durch die PLGA-MP beeinträchtigt?
- Wird durch die TLR2-Agonist-modifizierten PLGA-MP eine Sekretion von T_H1-polarisierenden Zytokinen induziert bzw. bleibt diese induzierbar?
- Bietet die Anwendung von partikulär gebundenem TLR2-Agonisten Vorteile gegenüber der Anwendung in gelöster Form bei der Reifung und T-Zell-Polarisierung von huMoDC?
- Bestehen Unterschiede zwischen TLR2/1- und TLR2/6-Agonisten hinsichtlich der Wirkung auf huMoDC?

Ebenfalls sollten BSA-beladene PLGA-MP mit dem Polykation Protamin beschichtet werden, um nachfolgend eine Assoziation des anionischen TLR4-Agonisten sMPLA über elektrostatische Wechselwirkungen an die Oberfläche der MP zu realisieren. Im Gegensatz zu bereits bekannten Experimenten mit verkapseltem MPLA (Hamdy *et al.* 2007) würde diese Methode eine nachträgliche Oberflächen-Modifizierung von Antigen-beladenen PLGA-MP mit sMPLA ermöglichen. Dabei war die Überlegenheit der elektrostatischen Assoziation gegenüber der unspezifischen Adsorption zu zeigen. Der Gehalt an sMPLA sollte mit Hilfe des chromogenen LAL-Tests bestimmt werden. Die für die TLR2-Agonist-modifizierten PLGA-MP zu bearbeitenden Fragestellungen hinsichtlich der Wirkungen auf huMoDC waren auch für sMPLA-modifizierten PLGA-MP zu bearbeiten. Dabei sollte die bekannte reifungsstimulierende und T_H1-polarisierende Wirkung von gelöstem MPL[®] aus *S. minnesota* (R595) auf huMoDC (Ismaili *et al.* 2002) für gelöstes und Oberflächen-gebundenes sMPLA bestätigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung der PLGA-Mikropartikel

Die Herstellung der Protein-beladenen PLGA-MP erfolgte mit Hilfe eines W/O/W-Lösungsmittel-Evaporations-Verfahrens. Die nachfolgend beschriebene Herstellungstechnik wurde für alle in dieser Arbeit hergestellten MP verwendet, falls dies nicht im Text explizit ausgeschlossen wird.

Die innere wässrige Phase (W_1 -Phase) enthielt als Modell-Antigen 10 mg/ml BSA oder mit Fluoresceinisothiocyanat markiertes BSA (FITC-BSA) (beides von Sigma Aldrich, Schnellendorf, Deutschland) in PBS (Biochrom, Berlin, Deutschland).

Für die Herstellung der polymerhaltigen organischen Lösungsmittel-Phase (O-Phase) wurden 400 mg PLGA Resomer[®] RG 502 H von Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Deutschland) in eine 10 ml-Spritze Injekt[®] Solo von B. Braun Melsungen (Melsungen, Deutschland) eingewogen. Dafür wurde der Spritzenstempel entfernt und die Spritze mit einer Sterican[®] Einmalkanüle Gr. 14 (B. Braun Melsungen) in einem Rotilabo[®]-Stopfen aus Silikongummi (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Nach der Einwaage des PLGA wurde mit DCM (HPLC-Reinheit, Carl Roth) auf 4000 mg aufgefüllt, die Spritze mit dem Stempel verschlossen und das PLGA unter Schütteln gelöst.

Im Anschluss daran erfolgte die Herstellung der W_1/O -Emulsion (Primäremulsion). Dazu wurde der Spritzenstempel entfernt und 200 μ l der W_1 -Phase zu der O-Phase pipettiert. Unter einminütiger Einwirkung eines Ultraschall-Homogenisators Sonopuls[®] HD 70 mit einer Sonotrode[®] MS 73 (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) bei 80 % der maximalen Leistung erfolgte die Emulsionsbildung.

Hiernach wurde die Spritze mit dem Stempel verschlossen und von der Kanüle getrennt. Die in der Spritze verbliebene Luft wurde entfernt und die Spritze mit einer Sterican[®] Einmalkanüle Gr. 20, welche an einen Teflonschlauch mit 0,8 mm Innendurchmesser angeschlossen war, verbunden. Die Spritze wurde in einer Spritzenpumpe (Typ 540200, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) arretiert und das offene Ende des Teflonschlauchs in eine Vorlage aus 50 ml äußerer wässriger Phase (W_2 -Phase), welche sich in einem 100 ml-Messzylinder befand, eingetaucht. Die W_2 -Phase bestand aus einer 0,25%igen (m/V) PVA-

Lösung (Mowiol® 4-88, Kuraray Specialities Europe, Frankfurt a. M., Deutschland), die unter Rühren durch Erhitzen der Ausgangsstoffe auf ca. 90 °C hergestellt wurde.

Für die Bildung der $W_1/O/W_2$ -Emulsion (Sekundäremulsion) wurde ein Ultra Turrax® T25 Rotor-Stator-Homogenisator mit dem Dispergierwerkzeug S 25 N - 18 G der IKA® Werke (Staufen, Deutschland) verwendet. Die Drehzahl war auf 20500 U/min eingestellt und das Dispergierwerkzeug wurde in der W_2 -Phase kurz über dem Boden des Messzylinders befestigt. Drei Sekunden nachdem der Rotor-Stator-Homogenisator gestartet wurde, erfolgte die Zugabe der Primäremulsion mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min über die Spritzenpumpe. Nach einer Minute Homogenisierungszeit wurde die entstandene Sekundäremulsion in ein Härtingsbad aus 100 ml W_2 -Phase in einem 250 ml-Rundkolben mit elipsenförmigem Magnetrührkern gegossen und für mindestens vier Stunden bei RT gerührt (Lösungsmittel-Evaporation).

Darauffolgend wurde die entstandene MP-Suspension in drei 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und die MP durch Zentrifugieren bei 1000 g (Heraeus Sepatech Minifuge Rf, Heraeus Holding, Hanau, Deutschland) pelletiert. Die Überstände wurden entfernt und die MP jedes Zentrifugenröhrchens mit 2 ml MilliQ-Wasser resuspendiert (1. Waschen) und in ein einziges Zentrifugenröhrchen überführt. Die MP wurden im Anschluss zweimal mit 2 ml MilliQ-Wasser gewaschen und dann in 2 ml davon resuspendiert.

Die so erhaltene MP-Suspension wurde durchmischt und in flüssigem Stickstoff (Linde, Pullach, Deutschland) eingefroren. Die gefrorene Suspension wurde mit Hilfe der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode am Harz, Deutschland) für 24 h lyophilisiert und danach bei 2-8 °C gelagert.

Die aseptische Herstellung von PLGA-MP erfolgte unter einer Laminar-Air-Flow Box LB-48-C von Heraeus. Nicht sterile Herstellungs-Materialien, die Produktkontakt hatten, sowie PVA-Lösungen und MilliQ-Wasser wurden über 15 min bei 2 bar und 121 °C autoklaviert (Autoklav Typ 26, Melag, Berlin, Deutschland). Alle nicht-autoklavierbaren flüssigen Ausgangsstoffe (DCM, BSA-Lösung) wurden sterilfiltriert.

2.2 Modifizierung der Mikropartikel

2.2.1 Adsorptive und kovalente Oberflächenmodifizierung mit TLR2-Agonisten

Die nach dem Standard-Verfahren hergestellten BSA-beladenen PLGA-MP wurden sowohl adsorptiv als auch kovalent mit hochreinen, synthetischen LP oberflächenmodifiziert. Die verwendeten LP waren ein Geschenk von Herrn Prof. Dr. Wiesmüller (EMC microcollections, Tübingen, Deutschland).

Als TLR2/6-Agonist wurden die diacylierten Lipopeptide FSL1 (Pam₂Cys-GDPKHPKSF) und FSL2 (Pam₂Cys-GDPKHPKSR) verwendet. FSL1 ist ein synthetisches MALP2-Analogon und entspricht dem N-Terminus des 44 kDa schweren Lipoproteins LP44 aus *Mycoplasma salivarium*. Für die spätere Untersuchung mit CLSM (*confocal laser scanning microscopy*) wurden auch Rhodamin-gekoppeltes (Pam₂Cys-GDPKHPKSFK-Aca-Aca-Rhodamin, FSL1-Rho) und mit Biotin gekoppeltes FSL1 (Pam₂Cys-GDPKHPKSFK-Aca-Aca-Biotin, FSL1-bio) verwendet. Ebenfalls eingesetzt wurde das triacylierte LP BAS (Pam₃Cys-AQEKEAKSELDYDKKK), welches ein Agonist an TLR2/1-Heterodimeren und analog zum N-Terminus eines Lipoproteins aus *Bacillus cereus* ist.

Zur Modifizierung der lyophilisierten MP mit den verschiedenen LP wurden zunächst 20 mg PLGA-MP in einem Milliliter MES-Puffer (100 mmol/l, pH 5,2) von Carl Roth resuspendiert. Die MP-Suspension wurde im Anschluss sechs Minuten lang bei 4000 U/min (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt und die MP in 600 µl MES-Puffer resuspendiert.

Für die Herstellung von kovalent mit LP gekoppelten PLGA-MP (kLP-MP) wurden zu dieser MP-Suspension tropfenweise 100 µl einer frisch hergestellten Lösung von 200 mg/ml N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDAC, Sigma Aldrich) in MES-Puffer hinzugefügt und vermischt. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe einer frisch hergestellten Lösung von N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS, Sigma Aldrich) in MES-Puffer (230 mg/ml). Bei der Herstellung von adsorptiv mit LP modifizierten PLGA-MP wurden die Lösungen mit den Kopplungsreagenzien EDAC und Sulfo-NHS durch MES-Puffer ersetzt.

Danach wurden die MP-Suspensionen für 15 min bei RT auf einer Rollwippe (Typ RM5, Hecht, Sondheim, Deutschland) inkubiert, zweimal mit je 800 µl MES-Puffer gewaschen und das MP-Pellet in 800 µl PBS (Biochrom) resuspendiert.

Nun wurden 800 µl der Suspension tropfenweise in eine Vorlage von 200 µl LP-Lösung in PBS (50 µg/ml) gegeben, die sich in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen von Carl Roth befand. Nach jeder Zugabe von 2-3 Tropfen Suspension wurde der Ansatz auf einem Wirbelschichter vermischt. Zur Herstellung von Kontroll-MP wurden diese bis hierhin wie kLP-MP behandelt, dann aber in eine LP-freie Vorlage von 200 µl PBS pipettiert. Zusätzlich diente eine MP-freie Mischung aus 800 µl PBS und 200 µl LP-Lösung, die im Weiteren wie die anderen Proben behandelt wurde, als Kontrolle für die anschließende LP-Bestimmung mittels HPLC. Die hergestellten Ansätze wurden für zwei bis vier Stunden bei RT auf der Rollwippe inkubiert und danach 6 min lang bei 4000 U/min (Centrifuge 5415C, Eppendorf) zentrifugiert.

Es wurden 900 µl Überstand (Ü1) entfernt. Zu dem MP-Pellet und dem restlichen Überstand wurden 900 µl Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung (10 mmol/l, analytisch rein) in PBS hinzugefügt, die MP resuspendiert und dann für 30 min auf der Rollwippe inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden 900 µl Überstand (Ü2) entfernt und die MP mit 900 µl PBS gewaschen. Dies wurde zweimal wiederholt. Alle erhaltenen Überstände (Ü1, Ü2, Ü3 und Ü4) wurden bei 2-8 °C bis zur zeitnahen Bestimmung des LP-Gehalts gelagert. Die hergestellten LP-modifizierten PLGA-MP wurden unter gleichen Temperaturbedingungen in PBS aufbewahrt.

Die MP-gebundene Menge an LP wurde aus den Überständen mittels HPLC ermittelt. Dafür wurde das Volumen der Überstände wie folgt bestimmt. Die 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit 200 µl Vorlage wurden vor und nach der Zugabe von 800 µl MP-Suspension gewogen. Die erhaltene Differenz stellt die Gesamtmasse an pipettierter MP-Suspension [$m(Sus_{pip})$] dar. Ebenfalls gewogen wurde die gesamte MP-Suspension vor Abnahme der 800 µl [$m(Sus_{ges})$]. Zudem wurden mindestens zweimal 800 µl PBS [$V(PBS)$] in 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und gewogen [$m(PBS)$]. Zunächst wurde die Dichte des PBS [$\rho(PBS)$] errechnet:

$$\rho(PBS) = \frac{m(PBS)}{V(PBS)} \quad (1)$$

Dann erfolgte die Berechnung der Masse an MP in der pipettierten Suspension [$m(MP_{Sus})$]. Sie ergab sich aus dem Verhältnis der Einwaage der lyophilisierten MP

$[m(MP_{EW})]$ zur gesamten MP-Suspension $[m(Sus_{ges})]$ multipliziert mit der Masse an pipettierter Suspension.

$$m(MP_{Sus}) = \frac{m(MP_{EW}) \cdot m(Sus_{pip})}{m(Sus_{ges})} \quad (2)$$

Im Folgenden wurde die Masse an PBS in der pipettierten MP-Suspension $[m(PBS_{pip})]$ errechnet.

$$m(PBS_{pip}) = m(Sus_{pip}) - m(MP_{Sus}) \quad (3)$$

Das zugehörige Volumen an PBS in der pipettierten MP-Suspension $[V(PBS_{pip})]$ errechnete sich über die zuvor bestimmte Dichte von PBS $[\rho(PBS)]$.

$$V(PBS_{pip}) = \frac{m(PBS_{pip})}{\rho(PBS)} \quad (4)$$

Das Volumen des Überstands $[V(\ddot{U}b)]$ wurde durch Addition des pipettierten Volumens PBS $[V(PBS_{pip})]$ und des Volumens der Vorlage $[V(Vor)]$ erhalten.

$$V(\ddot{U}b) = V(PBS_{pip}) + V(Vor) \quad (5)$$

Dieses war für die Berechnung der Konzentration des LP aus dem Überstand essentiell, da davon ausgegangen wurde, dass sich die eingesetzte Masse an LP $[m(LP_{eing})]$ nur in diesem Volumen verteilte oder an die MP gebunden war. Die eingesetzte Masse an LP wurde experimentell aus dem ersten Überstand der MP-freien Kontrolle mittels HPLC bestimmt. Die MP-gebundene Masse an LP $[m(LP_{geb})]$ errechnete sich aus der Differenz zwischen eingesetzter Masse an LP und dem Produkt der mittels HPLC bestimmten Massenkonzentration des LP im ersten Überstand $[\beta(\ddot{U}I_{HPLC})]$ und dem Volumen des Überstands $[V(\ddot{U}b)]$.

$$m(LP_{geb}) = m(LP_{eing}) - \beta(\ddot{U}I_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) \quad (6)$$

Bei den weiteren Inkubations- und Waschschrinen blieb immer ein Restvolumen an Überstand $[V(Rest)]$ zurück, das sich aus der Differenz zwischen Gesamtvolumen des Überstands $[V(\ddot{U}b)]$ und dem abgenommenen Volumen $[V(abg)]$ von 900 μ l errechnete.

$$V(Rest) = V(\ddot{U}b) - V(abg) \quad (7)$$

Die darin enthaltene Masse an LP [$m(LP_{\ddot{U}1Rest})$] errechnete sich aus dem Produkt des Restvolumens [$V(Rest)$] und der gemessenen Massenkonzentration des LP im vorherigen Überstands, nach Abnahme des ersten Überstands also $\beta(\ddot{U}1_{HPLC})$.

$$m(LP_{\ddot{U}1Rest}) = V(Rest) \cdot \beta(\ddot{U}1_{HPLC}) \quad (8)$$

Durch das anschließende Hinzufügen von 900 μ l Flüssigkeit (Waschen) bestand die Möglichkeit des Ablösens von schon gebundenem LP. Deshalb wurde auch die Konzentration des LP in den weiteren Überständen (Ü2 bis Ü4) mittels HPLC bestimmt. Die abgelöste Masse an LP im zweiten Überstand [$m(LP_{\ddot{U}2abgel})$] errechnete sich aus dem Produkt aus der Massenkonzentration des Überstands und dem Volumen des Überstands [$V(\ddot{U}b)$] abzüglich der Restmasse an LP [$m(LP_{\ddot{U}1Rest})$]. Für den zweiten Überstand galt also folgender Sachverhalt.

$$m(LP_{\ddot{U}2abgel}) = \beta(\ddot{U}2_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) - m(LP_{\ddot{U}1Rest}) \quad (9)$$

Deshalb erweiterte sich die Formel zur Berechnung des MP-gebundenen LP (6) wie folgt.

$$m(LP_{geb}) = m(LP_{eing}) - \beta(\ddot{U}1_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) - m(LP_{\ddot{U}2abgel}) \quad (10)$$

Für die Überstände Ü3 und Ü4 galt dies analog, so dass Formel (10) erweitert wurde zu (11).

$$m(LP_{geb}) = m(LP_{eing}) - \beta(\ddot{U}1_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) - m(LP_{\ddot{U}2abgel}) - m(LP_{\ddot{U}3abgel}) - m(LP_{\ddot{U}4abgel}) \quad (11)$$

Ersetzte man nun die abgelösten Massen an LP durch Gleichung (9), die darin enthaltenen Restmassen an LP durch Gleichung (8) und das darin enthaltene Restvolumen durch Gleichung (7), ergab sich der folgende Sachverhalt.

$$m(LP_{geb}) = m(LP_{eing}) - \beta(\ddot{U}1_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) - [\beta(\ddot{U}2_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) - m(LP_{\ddot{U}1Rest})] - [\beta(\ddot{U}3_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) - m(LP_{\ddot{U}2Rest})] - [\beta(\ddot{U}4_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) - m(LP_{\ddot{U}3Rest})] \quad (12)$$

$$m(LP_{geb}) = m(LP_{eing}) - \beta(\ddot{U}1_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) - \beta(\ddot{U}2_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) + m(LP_{\ddot{U}1Rest}) - \beta(\ddot{U}3_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) + m(LP_{\ddot{U}2Rest}) - \beta(\ddot{U}4_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) + m(LP_{\ddot{U}3Rest}) \quad (13)$$

$$\begin{aligned}
 m(LP_{geb}) &= m(LP_{eing}) - \beta(\ddot{U}1_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) \\
 &\quad - \beta(\ddot{U}2_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) + V(Rest) \cdot \beta(\ddot{U}1_{HPLC}) \\
 &\quad - \beta(\ddot{U}3_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) + V(Rest) \cdot \beta(\ddot{U}2_{HPLC}) \\
 &\quad - \beta(\ddot{U}4_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) + V(Rest) \cdot \beta(\ddot{U}3_{HPLC})
 \end{aligned} \tag{14}$$

$$\begin{aligned}
 m(LP_{geb}) &= m(LP_{eing}) - \beta(\ddot{U}1_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) \\
 &\quad - \beta(\ddot{U}2_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) + [V(\ddot{U}b) - V(abg)] \cdot \beta(\ddot{U}1_{HPLC}) \\
 &\quad - \beta(\ddot{U}3_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) + [V(\ddot{U}b) - V(abg)] \cdot \beta(\ddot{U}2_{HPLC}) \\
 &\quad - \beta(\ddot{U}4_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) + [V(\ddot{U}b) - V(abg)] \cdot \beta(\ddot{U}3_{HPLC})
 \end{aligned} \tag{15}$$

$$\begin{aligned}
 m(LP_{geb}) &= m(LP_{eing}) - \beta(\ddot{U}1_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) \\
 &\quad - \beta(\ddot{U}2_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) + V(\ddot{U}b) \cdot \beta(\ddot{U}1_{HPLC}) - V(abg) \cdot \beta(\ddot{U}1_{HPLC}) \\
 &\quad - \beta(\ddot{U}3_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) + V(\ddot{U}b) \cdot \beta(\ddot{U}2_{HPLC}) - V(abg) \cdot \beta(\ddot{U}2_{HPLC}) \\
 &\quad - \beta(\ddot{U}4_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b) + V(\ddot{U}b) \cdot \beta(\ddot{U}3_{HPLC}) - V(abg) \cdot \beta(\ddot{U}3_{HPLC})
 \end{aligned} \tag{16}$$

$$\begin{aligned}
 m(LP_{geb}) &= m(LP_{eing}) - V(abg) \cdot \beta(\ddot{U}1_{HPLC}) - V(abg) \cdot \beta(\ddot{U}2_{HPLC}) \\
 &\quad - V(abg) \cdot \beta(\ddot{U}3_{HPLC}) - \beta(\ddot{U}4_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b)
 \end{aligned} \tag{17}$$

$$\begin{aligned}
 m(LP_{geb}) &= m(LP_{eing}) - V(abg) \cdot [\beta(\ddot{U}1_{HPLC}) + \beta(\ddot{U}2_{HPLC}) + \beta(\ddot{U}3_{HPLC})] \\
 &\quad - \beta(\ddot{U}4_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b)
 \end{aligned} \tag{18}$$

Für den Fall, dass in Überstand 4 kein LP mehr detektiert wurde, vereinfachte sich die Gleichung (18) auf die folgende Gleichung (19).

$$\begin{aligned}
 m(LP_{geb}) &= m(LP_{eing}) - V(abg) \cdot [\beta(\ddot{U}1_{HPLC}) + \beta(\ddot{U}2_{HPLC})] - \beta(\ddot{U}3_{HPLC}) \cdot V(\ddot{U}b)
 \end{aligned} \tag{19}$$

Der Gehalt an LP der hergestellten MP [$w(LP)$] berechnete sich dann aus dem Quotienten der Masse des gebundenen LP [$m(LP_{geb})$] und der Masse an MP in der pipettierten Suspension [$m(MP_{Sus})$].

$$w(LP) = \frac{m(LP_{geb})}{m(MP_{Sus})} \tag{20}$$

2.2.2 Elektrostatische Oberflächenmodifizierung mit synthetischem Monophosphoryl-Lipid A

Für die elektrostatische Oberflächenmodifizierung von FITC-BSA-beladenen PLGA-MP wurden 10 mg lyophilisierte MP mit einem Milliliter 0,25%iger (m/V) Protaminlösung (Sigma Aldrich) resuspendiert und für eine Stunde bei 2-8 °C rotiert. Danach wurden die MP 6 min lang bei 1000 g pelletiert und 950 µl des Überstands entfernt. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte nach Zugabe von 950 µl einer sMPLA-Lösung (InvivoGen, Toulouse, Frankreich) in sterilem pyrogenfreiem Wasser (5 µg/ml). Die Suspension wurde für eine Stunde bei RT rotiert und 6 min bei 1000 g zentrifugiert. Es wurden 950 µl Überstand entnommen und die sMPLA-Konzentration mit Hilfe der kinetisch-chromogenen Methode des LAL-Tests bestimmt. Aus dieser wurde der ungebundene Anteil an sMPLA errechnet, folglich war der restliche Anteil an sMPLA MP-gebunden. Als Kontrollen dienten nicht mit Protamin beschichtete MP mit und ohne sMPLA-Beschichtung sowie Protamin-beschichtete MP ohne sMPLA-Beschichtung.

Die hergestellten MP wurden dreimal mit je 950 µl sterilem pyrogenfreiem Wasser gewaschen und nach Resuspendierung in einem Milliliter sterilen pyrogenfreien Wasser bei 2 - 8 °C gelagert. Die Konzentration an sMPLA in den Waschüberständen wurde ebenfalls mit der kinetisch-chromogenen Methode des LAL-Tests bestimmt.

2.3 Charakterisierung der Mikropartikel

2.3.1 Partikelgröße – Laserdiffraktometrie

Mit Hilfe der Laserdiffraktometrie (LD) wurde die Größe der MP als volumengewichtete Teilchengrößenverteilung ermittelt. Die Partikelgrößenbestimmung mittels LD beruht auf der Tatsache, dass Laserlicht in Abhängigkeit von der Partikelgröße unterschiedlich stark in Vorwärtsrichtung gebeugt wird. Prinzipiell beugen große Partikel das Laserlicht weniger stark und weisen eine geringere Lichtstreuung sowie eine höhere Lichtintensität des gebeugten Lichts auf. Kleine Partikel beugen das Laserlicht stärker. Das gebeugte Licht ist in seiner Intensität geringer. Zudem erhöht sich die Lichtstreuung mit der Verringerung der Teilchengröße. Anhand der für die Partikelgröße charakteristischen Beugungs- und

Streuungsmuster kann mittels mathematischer Modelle der volumetrische Partikeldurchmesser berechnet werden. Die Messungen wurden an einem Laserdiffraktometer LS230 von Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland) durchgeführt, wobei dieses Gerät für die Optimierung der Prozessparameter des Herstellungsverfahrens eingesetzt wurde. Später wurde das LS230 durch einen Mastersizer 2000 von Malvern Instruments (Herrenberg, Deutschland) ersetzt.

Die Auswertung der Messungen am LS230 erfolgte mit der Software LS Version 3.19 von Beckman Coulter. Das LS230 verfügt über einen 750 nm-Laser und war mit dem Messmodul „Small Volume Modul“ (125 ml) ausgerüstet, das eine Rührer-Einheit beinhaltet. Jede Probe wurde dreimal für 60 Sekunden in Aqua demineralisata (Aqua dem.) gemessen. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte nach der Fraunhofer-Näherung und der Mie-Theorie. Die Fraunhofer-Näherung gilt nicht für sehr kleine Teilchen. Zuverlässige Aussagen über die Teilchengröße erhält man bei einer Partikelgröße von über drei bis vier Mikrometern, was dem Vier- bis Fünffachen der Wellenlänge des Laserlichts ($\lambda_{\text{Laser}} 750 \text{ nm}$) entspricht (Keck 2006, S. 50). Für kleiner Partikel wurde die Mie-Theorie verwendet. Diese setzt die Kenntnis des realen Brechungsindex des Umgebungsmediums und der Partikel sowie den durch die Partikel adsorbierten Anteil an Laserlicht (imaginärer Brechungsindex) voraus. Hier wurden die von Schalper 2002 bestimmten Werte für PLGA-MP übernommen (Brechungsindex Wasser 1,33; realer Brechungsindex der PLGA-Partikel 1,44; imaginärer Brechungsindex 0,01). Zum Vergleich wurde auch ein Modell für Polystyren-Latex-Partikel (Brechungsindex Wasser 1,33; realer Brechungsindex der Polystyren-Latex-Partikel 1,6; imaginärer Brechungsindex 0) genutzt. Um Partikel im Submikron-Bereich ($< 0,1 \mu\text{m}$) zu erfassen, wurde die PIDS-Technologie (*Polarization Intensity Differential Scattering*) eingesetzt. Hierbei werden Abweichungen in den Streuungsmustern zwischen vertikal und horizontal polarisiertem Licht verwendet. Dafür werden die Proben bei drei Wellenlängen (450 nm, 600 nm und 900 nm) einmal mit vertikal und einmal mit horizontal polarisiertem Licht bestrahlt und die Unterschiede in den Intensitäten der Streuungsmuster durch PIDS-Detektoren bei verschiedenen Messwinkeln (60° , 75° , 90° , 105° , 120° und 146°) registriert. Durch Einsatz der PIDS-Technologie kann der Messbereich der Laserdiffraktometrie auf 0,04-2000 μm erweitert werden.

Der Mastersizer 2000 wurde mit der Dispergiereinheit Hydro 2000S betrieben. Die für die Nassdispergierung verwendete Einheit beinhaltet eine stufenlos regelbare Pumpen-Rührer-

Einheit und eine Ultraschallsonde. Der Mastersizer 2000 besitzt einen roten Helium-Neon-Laser (632,8 nm) und eine blaue Festkörperlichtquelle (LED, 470 nm) und ermöglicht die Detektion der Streuungs- und Beugungsmuster bei verschiedenen Winkeln (rotes Licht: Vorwärts-, Seitwärts- und Rückwärtsstreuung; blaues Licht: Vorwärts- und Rückwärtsstreuung). Dadurch können Partikel zwischen 0,02-2000 μm erfasst werden. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Software Mastersizer 2000 Version 5.54 und nach der Fraunhofer-Näherung sowie der Mie-Theorie [Modell für Polystyren-Latex-Partikel (Brechungsindex Wasser 1,33; realer Brechungsindex der Polystyren-Latex-Partikel 1,59; imaginärer Brechungsindex 0)].

2.3.2 Partikelgröße – Impedanz-Messverfahren

Zur Überprüfung der Partikelgrößenmessung mittels LD wurde die volumengewichtete Teilchengrößenverteilung über ein Impedanz-Messverfahren mit Hilfe des Multisizer™ 4 Coulter Counter® (Beckman Coulter) ermittelt. Hierbei wird eine elektrolythaltige verdünnte Partikelsuspension in einem Probenbecher durchmischt und durch eine Öffnung in eine Kapillare gesaugt. Innerhalb und außerhalb der Kapillare befinden sich Elektroden zwischen denen ein konstanter Strom fließt. Tritt ein Partikel durch die Kapillaröffnung so verringert sich der Öffnungsdurchmesser, was zu einer kurzzeitigen Erhöhung des elektrischen Widerstands (Impedanz) und einer Fluktuation des Stromflusses führt. Die Fluktuationen werden verstärkt und in Spannungspulse umgewandelt, deren Amplituden direkt proportional zum Volumen der Partikel sind. Verwendet wurde eine Kapillare mit einer 30 μm großen Öffnung, die standardmäßig Partikel von 0,611-18 μm erfasst. Für die Messung wurden 100 μl Probe mit einer PLGA-MP-Konzentration von 1 mg/ml in 100 ml Elektrolyt-Lösung Isoton® II (Beckman Coulter) suspendiert. Es wurden mindestens 50000 Ereignisse gezählt und die Koinzidenz-korrigierten Rohdaten mit Hilfe der Multisizer™-4-Software Version 4.01 (Beckman Coulter) ausgewertet. Jede Probe wurde mindestens dreimal vermessen. Die Partikelgrößen-Bestimmungen nach dem Impedanz-Messverfahren erfolgten in Kooperation mit Herrn Dr. rer. nat. Dirk Lorenzen (Institut für Tumorthherapie, Duderstadt).

2.3.3 Zetapotenzial

Das Zetapotenzial wurde durch Laser-Doppler-Anemometrie mittels des Zetasizer Nano ZS von Malvern Instruments bestimmt. Die Daten wurden mit der Zetasizer-Software DTS Version 5.00 ausgewertet. Das Gerät verfügt über einen Helium-Neon-Laser (633 nm). Für die Messungen wurden die PLGA-MP mit MilliQ-Wasser stark verdünnt (Endkonzentration ca. 10-40 µg/ml). Der pH-Wert wurde, falls erforderlich, mit Salzsäure (0,01 mol/l, analytisch rein) oder Natriumhydroxid-Lösung (0,01 mol/l, analytisch rein) auf Werte zwischen 6,5 und 8 eingestellt. Die elektrische Leitfähigkeit wurde mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (B. Braun Melsungen) auf 50 µS/cm eingestellt. Es wurden Einwegzellen („gefaltete Kapillarzellen“) von Malvern Instruments für die Zetapotenzial-Messungen verwendet, die zuvor mit ca. 2 ml Probe gespült und dann blasenfrei mit einer 10 ml-Spritze Injekt® Solo von B. Braun Melsungen befüllt wurden. Die dreimalige Messung der Proben erfolgte bei 25 °C. Die Abschwächung des Laserlichts entsprechend der Trübung der Probe sowie die Anzahl der Einzelmessungen (runs) wurde durch die Software gesteuert.

2.3.4 Rasterelektronenmikroskopie

Die Oberflächenstruktur der MP wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Das verwendete Feldemissions-Elektronenmikroskop war ein Gemini Supra™ 40 VP SEM (Carl Zeiss NTS, Oberkochen, Deutschland). Die lyophilisierten MP wurden auf Aluminium-Probenteller, welche mit einem leitfähigen Kleber beschichtet waren, aufgepinselt. Die weitere Analyse erfolgte ohne Beschichtung der MP mit leitfähigen Materialien („Sputtern“), um die Bildung von Artefakten zu vermeiden. Die Detektion der MP erfolgte bei einer Beschleunigungsspannung von 1 kV mit einem Everhart-Thornley-Detektor. Ausgewertet wurden die Bilder mit Hilfe der Software SmartSEM®.

2.3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Größe der FITC-BSA-beladenen PLGA-MP, die Proteinverteilung in den PLGA-MP und die Aufnahme dieser in phagozytierende Zellen wurde mit Hilfe des Inversions-Fluoreszenz-Mikroskops Olympus CKX41 (Olympus, Hamburg, Deutschland) beurteilt. Dabei wurden als Anregungswellenlänge 450 nm und als Emissionswellenlänge 530 nm für

den Fluoreszenzmarker FITC ausgewählt. Das Mikroskop war mit dem Adapter Olympus U-CMAD3 (Olympus) an ein Kamerasystem für die Bildaufnahme angeschlossen. Die Aufnahme und Auswertung der Bilder erfolgte mittels der Software qualySIS docu 5.0 (Build 1233).

2.3.6 Durchflusszytometrie

Zur qualitativen Bestimmung der kovalenten Oberflächenmodifizierung von PLGA-MP mit FSL1-Rho wurden 10 mg der lyophilisierten, kovalent mit FSL1-Rho modifizierten PLGA-MP (kFSL1-Rho-MP) in einem Milliliter PBS resuspendiert und mit IsoFlow[®] (Beckman Coulter) 1:10 verdünnt. Die MP-Suspension wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers (*fluorescence-activated cell sorter*, FACS) Navios[™] 10/3 (Beckman Coulter) unter Verwendung der Kaluza Analysis Software analysiert. Die MP wurden im Vergleich zu reinem IsoFlow[®] anhand ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreuungsintensitäten ausgewählt („gated“). Innerhalb der Auswahl (Gate) wurde die Häufigkeitsverteilung der Rhodamin-positiven PLGA-MP bestimmt, was den Anteil der mit FSL1-Rho modifizierten MP darstellte.

2.3.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)

Zur Bestimmung des LP-Gehalts von TLR2-Agonist-modifizierten PLGA-MP wurde die Konzentration der LP aus den Überständen bei Beschichten und Waschen der MP mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) ermittelt. Dafür wurden die Überstände bei 14000 U/min 20 min lang zentrifugiert (Centrifuge 5415C, Eppendorf) und falls notwendig mit Aqua dem. verdünnt. Die letzte Verdünnung erfolgte im Verhältnis 1:1 mit Acetonitril (HPLC-Reinheit). Die verdünnten Überstände wurden in 1,1 ml-Autosamplervials mit konischem Boden abgefüllt. Die Standards der Kalibrierfunktion wurden mit 25, 50, 100, 200 und 400 ng/ml LP in Aqua dem. hergestellt und ebenfalls vor der Vermessung im Verhältnis 1:1 mit Acetonitril verdünnt.

Die Analyse der Proben erfolgte an einer HPLC-Anlage von Merck-Hitachi (Darmstadt, Deutschland) mit einem Autosampler AS-2000, einem Interface D-6000, einer L-6200A-Intelligent-Pump und einem Diodenarray-Detektor L-4500. Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus 950 Teilen Acetonitril, 50 Teilen Aqua dem. und einem Teil Trifluoressigsäure

(analytisch rein) verwendet. Es wurde eine isokratische Methode mit einer Flussrate von 1 ml/min und einer Laufzeit von 5 min eingesetzt. Das Probenvolumen betrug 20 µl und jede Probe wurde zweimal eingespritzt. Zur Trennung wurde eine HPLC-Säule LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) von Merck (Darmstadt, Deutschland) genutzt. Detektiert wurde das LP bei 210 nm. Die Konzentration der LP wurde anhand der Peakflächen mit Hilfe der Kalibrierfunktion errechnet.

2.3.8 Restlösungsmittel-Gehalt (GC/MS)

Die Bestimmung des Restlösungsmittel-Gehalts von lyophilisierten BSA-beladenen PLGA-MP, welche nach dem Standard-Verfahren hergestellt wurden, erfolgte mittels Gaschromatografie (GC) an einer Anlage von Agilent (Typ HP 6890, Waldbronn, Deutschland). Die Extraktion des Lösungsmittels DCM aus den MP erfolgte dabei durch eine Dampfraum-Festphasenmikroextraktion (*headspace solid phase microextraction*, Headspace-SPME) an einem MPS2-Autosampler der Firma Gerstel (Mühlheim an der Ruhr, Deutschland). Detektiert wurde das Lösungsmittel mit einem GC-gekoppelten Quadrupol-Massenspektrometer HP 5973 von Agilent.

Zur Bestimmung des Gehalts wurden 10 bis 40 mg lyophilisierte MP in 10 ml-Headspace-Probengefäße eingewogen und verschlossen. Nach fünfminütigem Vorheizen der Probengefäße im Autosampler erfolgte die Extraktion des DCM für 30 min bei 250 U/min und 40 °C. Dabei wurde das in den Gasraum übergehende DCM an eine Schicht aus Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen (PDMS/DVB) (65 µm Schichtdicke) adsorbiert, welche auf eine Quarzglasfaser aufgebracht war (Supelco®, Vertrieb über Sigma Aldrich). Die Desorption des DCM im GC-Probeninjektor erfolgte bei 270 °C. Nach der Probenaufgabe erfolgte die Trennung auf einer GC-Säule von Agilent vom Typ HP-5MSi (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Als Trägergas wurde Helium mit einer Anfangsflussrate von 0,9 ml/min und einem Vordruck von 33,2 kPa eingesetzt. Die durchschnittliche lineare Trägergasgeschwindigkeit betrug 36 cm/s. Bei dem verwendeten Temperaturprogramm wurde die Kapillartrennsäule zunächst für 2 min bei 40 °C belassen, dann mit 40 °C pro Minute auf 150 °C erhitzt, diese Temperatur für 2 min beibehalten und danach wieder abgekühlt. Die Laufzeit wurde auf 9,50 min eingestellt.

Die Detektion des DCM erfolgte im gekoppelten Massenspektrometer im Modus „selected ion monitoring“ (SIM). Dieser wurde aufgrund der erhöhten Empfindlichkeit

gegenüber einer Erfassung aller Ionen („full scan“) herangezogen. Im SIM-Modus wurden die Chromatogramme für ein Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) von 84, welches dem Molekulargewicht von einfach positiv geladenem DCM entspricht, und von 49, welches ein ionisiertes Fragment von DCM nach Verlust eines Chloratoms ($M_r = 35$) darstellt, aufgenommen. Zur Berechnung der Flächen unter den Kurven (AUC) wurden die Chromatogramme mit dem m/z 84 verwendet. Die Auswertung erfolgte auf einem PC mit der Software ChemStation von Agilent. Zur Errechnung des DCM-Gehalts wurden als Standards 10, 50 und 100 ng DCM in wässriger Lösung eingesetzt und die aus den Chromatogrammen erhaltenen Werte für die AUC nach Abzug des Leerwerts (Wasser) zur Erstellung einer Kalibrierfunktion genutzt. Der Gehalt an DCM in den MP errechnete sich aus der mit Hilfe der Kalibrierfunktion bestimmten Masse an DCM geteilt durch die Einwaage der MP. Reines Polymer Resomer® RG 502 H von Boehringer Ingelheim diente als Kontrolle. Die Bestimmung des DCM-Gehalts erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Apotheker Martin Hastedt (Forensische Toxikologie, Institut für Rechtsmedizin der Charité Berlin).

2.3.9 Verkapselungseffizienz

Die Bestimmung der Verkapselungseffizienz erfolgte nach einer Methode von Jiang und Schwendemann (2001), die wie folgt modifiziert wurde. Es wurden 10 mg lyophilisierte BSA-beladene PLGA-MP und 10 μ l Aqua dem. in 1,5 ml-Reaktionsgefäße eingewogen. Für die Erstellung einer Kalibrierfunktion erfolgte die Einwaage von je 10 mg Resomer® RG 502 H (Boehringer Ingelheim) unter Zusatz von je 10 μ l einer Standard-BSA-Lösung (Sigma Aldrich). Die Proben für die Wiederfindung wurden durch Einwaage von 10 mg MP, welche ohne Protein in der W_1 -Phase produziert wurden, und Zusatz von 10 μ L einer Protein-Lösung, deren Konzentration einer 100%igen Verkapselungseffizienz bei den zu prüfenden MP entsprach, hergestellt.

Alle Proben wurden mit 400 μ l Aceton vermischt und das Polymer unter Vortexen gelöst. Dabei ausgefallenes Protein wurde durch Zentrifugieren bei 14000 U/min (Centrifuge 5415C, Eppendorf) für 15 min pelletiert. Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und die Reaktionsgefäße für 5 min kopfüber auf Papier gelagert. Nach zweimaligem Wiederholen dieses Vorgangs wurden die offenen Reaktionsgefäße unter 0,3 bar in einem Vakuumschrank von Heraeus (Hanau, Deutschland) gelagert, um restliches Aceton zu entfernen.

Das zurückbleibende Proteinpellet wurde in 40 µl 5%iger SDS-Lösung (Ultrapure, Carl Roth) in NaOH (0,1 mol/l, analytisch rein) unter Vortexen gelöst und danach mit 60 µl Aqua dem. gemischt. Die weitere Analyse der Proben auf den Proteingehalt erfolgte mittels Bicinchoninsäure-Kit (BCA-Kit) von Sigma Aldrich. Hierfür wurden je 25 µl Probe mit 200 µl frisch hergestelltem Arbeitsreagenz, bestehend aus 50 Teilen alkalischer BCA-Lösung und einem Teil Kupfer(II)sulfat-Lösung, in einer 96 well-Mikrotiterplatte (MTP) mit flachem Boden (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gemischt und für ca. 15 min bei 60 °C in einem Trockenschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) inkubiert. Nach Abkühlen der Platte auf RT wurde die Absorption der Proben bei 562 nm in einem Plattenfotometer BioTek® Synergy Mx (Bad Friedrichshall, Deutschland) bestimmt.

Die Protein-Konzentration der Proben wurde anhand der Korrelationsfunktion der Standardreihe bestimmt. Der Proteingehalt der MP ergab sich aus der daraus errechneten Proteinmasse bezogen auf die MP-Einwaage. Die Wiederfindung resultierte aus dem Quotienten von gefundener und eingesetzter Protein-Konzentration. Für die Verkapselungseffizienz wurde der Quotient aus Ist- und Sollproteingehalt der MP gebildet und mit 100 % multipliziert. Zur Korrektur der Verkapselungseffizienz wurde diese durch die Wiederfindung geteilt.

2.3.10 Freisetzungstest

Für die Bestimmung des Freisetzungsprofils der BSA-beladenen PLGA-MP wurden 100 mg dieser in 4 ml-Rotilabo®-Probenfläschchen mit PTFE-Septum und geschlossener Schraubkappe (Carl Roth) eingewogen. Hiernach wurden 2 ml PBS (Biochrom) mit 0,02 % (m/V) Natriumazid (Sigma Aldrich) hinzu pipettiert und die verschlossenen Probenfläschchen in einem Umluft-Inkubator (Typ GFL 3032, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) bei 37 °C auf einer Rollwippe (Typ RM5, Hecht) ständig bewegt. Nach 2, 6, 24, 48, 336 und 672 h wurden Proben genommen. Dazu wurden die Probengefäße bei 1000 g (Heraeus Sepatech Minifuge Rf, Heraeus Holding) zentrifugiert, 1000 µl vom Überstand in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und diese Proben bei -80 °C gelagert. Der entnommene Überstand wurde durch frischen Puffer ersetzt, die MP durch Vortexen resuspendiert und wieder bei 37 °C unter ständiger Bewegung gelagert.

Nach der letzten Probennahme wurde das in den Proben enthaltene BSA mit Hilfe eines BCA-Kits von Sigma Aldrich analysiert. Dazu wurden die Proben zunächst der in dem Kit

beschriebenen Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung) unterzogen. Die Proben wurden mit 100 μ l 0,15%iger (m/V) Natriumdeoxycholat-Lösung (Sigma Aldrich) gemischt und für 10 min bei RT stehen gelassen. Im Anschluss wurden 100 μ l Trichloressigsäure-Lösung (1 g/ml, analytisch rein) hinzugefügt, die Lösungen vermischt und für 5 min bei RT gelagert (Proteinfällung). Die Proben wurden dann bei 14000 U/min (Centrifuge 5415C, Eppendorf) für 15 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Reaktionsgefäße für 5 min kopfüber auf Papier gestellt. Das Proteinpellet wurde wie unter 2.3.9 (Verkapselungseffizienz) beschrieben resuspendiert und der Bestimmung des Proteingehalts unterzogen.

2.3.11 Dynamische Differenzkalorimetrie

Die Dynamische Differenzkalorimetrie (*differential scanning calorimetry*, DSC) wurde zur Bestimmung der T_g verwendet. Dazu wurden ca. 2 mg Probe in einen 40 μ l Standard-Aluminiumtiegel eingewogen und hermetisch versiegelt. Dann erfolgte die Messung gegen einen unbefüllten versiegelten Referenztiegel in einem Kalorimeter DSC 821[°] von Mettler Toledo (Giessen, Deutschland) unter Stickstoff-Atmosphäre mit folgendem Temperaturprogramm: Abkühlen auf 15 $^{\circ}$ C mit 10 K/min, Erhitzen auf 90 $^{\circ}$ C mit 5 K/min, Abkühlen auf 15 $^{\circ}$ C mit 10 K/min, Erhitzen auf 90 $^{\circ}$ C mit 5 K/min, Abkühlen auf 15 $^{\circ}$ C mit 10 K/min. Die Kühlung erfolgte mit flüssigem Stickstoff und der differenzielle Wärmestrom wurde mit Hilfe der STAR[°]-Software aufgezeichnet. Die Probe wurde zweimal erhitzt, da der Wärmestrom-Temperaturverlauf des ersten Erhitzens durch die vorangegangenen Lagerungsbedingungen der Probe beeinflusst wird und einen endothermen Relaxationspeak (kinetischer Überschuss) zeigen kann, der nicht zuverlässig die tatsächlichen Polymereigenschaften widerspiegelt (Hausberger und DeLuca 1995). Deshalb wurde nach dem ersten Erhitzen die Probe mit einer höheren Rate abgekühlt, was die „thermale Vorgeschichte“ des Polymers löscht, und zur Auswertung der Wärmestrom-Temperaturverlauf des zweiten Erhitzens verwendet. Der Übergang vom spröden glasartigen zum gummielastischen Zustand des Polymers bei Erhitzen ist eine endotherme Reaktion, die sich als sigmoidale Kurve im Wärmestrom-Temperaturverlauf darstellt. Die T_g kann aus dem Wendepunkt ermittelt werden und charakterisiert den Umwandlungsprozess. Da die genaue Bestimmung des Wendepunkts mit Hilfe der STAR[°]-Software nicht möglich war, wurden die Daten exportiert und mit Hilfe der Software Origin[®] durch Kurvenanpassung nach Boltzmann ausgewertet.

2.3.12 *Limulus*-Amöbozyten-Lysat-Tests

Festgel-Methode

Die Bestimmung von Endotoxinen gramnegativer Bakterien in den aseptisch hergestellten mikropartikulären Zubereitungen erfolgte mit Hilfe eines Pyrotell®-Kits (Pyroquant Diagnostik, Mörfelden-Walldorf, Deutschland). Hierbei wird der Endotoxin-Gehalt über die Gelbildung eines Amöbozyten-Lysats von Pfeilschwanzkrebsen (*Limulus polyphemus*) festgestellt. Die Prüfung entsprach der Gelbildungsmethode A (Grenzwertprüfung) der Prüfung auf Bakterien-Endotoxine des Ph. Eur. 7.0.

Glasröhrchen zur Herstellung der Verdünnungen und Spatel wurden für 30 min bei 250 °C heißluftsterilisiert. Alle weiteren Materialien und Reagenzien mit Probenkontakt, darunter Pipettenspitzen, Reaktionsröhrchen und LAL-Reagenzwasser (LRW), wurden pyrogen- bzw. endotoxinfrei von Pyroquant Diagnostik bezogen.

Das nach der Hersteller-Anweisung mit LRW rekonstituierte *Limulus*-Amöbozyten-Lysat wies eine Empfindlichkeit λ von 0,06 Endotoxin-Einheiten (*endotoxin units*, EU) auf. Die Empfindlichkeit wurde durch vier Endotoxin-Arbeitslösung mit Konzentrationen, die 2λ , 1λ , $\frac{1}{2}\lambda$ und $\frac{1}{4}\lambda$ entsprachen, bestätigt. Als Endotoxinstandard wurde Kontroll-Standard-Endotoxin (*control standard endotoxin*, CSE) aus *E. coli* 0113:H10 von Associates of Cape Cod (East Falmouth, MA, USA) verwendet. Ein Nanogramm CSE entsprach zehn Endotoxin-Einheiten. Positivkontrollen wurden durch Mischen der Probelösungen mit Endotoxin-Standard-Lösung hergestellt (Inhibitions-Kontrolle). Die Endkonzentration an Endotoxin entsprach dabei 2λ . Als Negativkontrolle wurden LRW eingesetzt.

Für die Bestimmung des Endotoxingehalts wurden 100 μ l der Probelösung mit 100 μ l LAL im Reaktionsröhrchen gemischt und für 60 min bei 37 °C erschütterungsfrei in einem Heizblock Thermomixer 5436 von Eppendorf inkubiert. Danach wurde das Reaktionsröhrchen vorsichtig aus dem Heizblock genommen und langsam und gleichmäßig um 180 ° gedreht. Der Test war positiv, wenn sich ein festes Gel gebildet hatte, negativ, wenn dies nicht der Fall ist.

Kinetisch-chromogene Methode

Zur Bestimmung der sMPLA-Konzentration aus den Beschichtungsüberständen und den Waschflüssigkeiten bei der Herstellung von sMPLA-MP wurde ein chromogener LAL-Test von Pyroquant Diagnostik verwendet.

Dafür wurden die Proben mit LRW verdünnt und je 50 µl in eine 96 well-MTP Pyroplate[®] pipettiert. Anschließend wurden 50 µl des rekonstituierten LAL Pyrochrome[®] hinzugegeben und in einem auf 37 °C temperierten Plattenfotometer Multiskan EX von Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) 10 s durchmischt. Danach wurde alle 10 s die Absorption bei 405 nm gemessen. Die Zeit bis zur Änderung der Ausgangsabsorption um einen Wert von 0,03 wurde als *onset time* verwendet. Die Bestimmung der sMPLA-Konzentration erfolgte anhand einer Kalibrierung bei der die logarithmischen *onset times* gegen die logarithmischen Standardkonzentrationen aufgetragen wurden (Abb. 2-1).

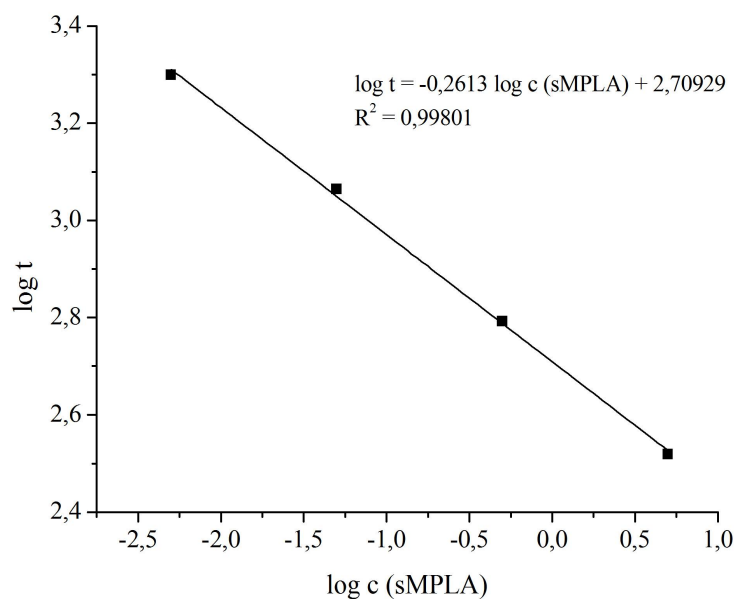


Abb. 2-1. Kalibriergerade und -funktion zur Bestimmung der sMPLA-Konzentration mit Hilfe eines kinetischen chromogenen LAL-Tests.

2.4 THP-1-Zellen

2.4.1 THP-1-Kultivierung für TNF α -Bestimmung (ELISA)

Monozytoide THP-1-Zellen (DSMZ-Nr. ACC 16) wurden nach viertägiger Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm² Zellkulturflaschen (Biochrom) in 20 ml Standard-Medium (SM), bestehend aus RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaHCO₃, 10 % (V/V) hitzeinaktiviertem fötalem

Kälberserum (FCS, Charge 0025), 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (alles von Biochrom), in 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One) überführt. Nach Zentrifugieren bei 600 U/min (Megafuge 1.0, Heraeus Holding) über 5 min wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml Differenzierungs-Medium (DZM) bestehend aus SM und 6 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, Sigma Aldrich) resuspendiert. Die Zellzahl und -vitalität wurde nach Färbung von 20 µl Zellsuspension mit 80 µl Trypanblau-Lösung (0,5 % (m/V), Merck) mit Hilfe eines Hämozytometers (Neubauer Zählkammer, Brand, Wertheim, Deutschland) mikroskopisch bestimmt. Die Zellen wurden nur bei einer Vitalität von über 80 % weiter verwendet und die Zellzahl der restlichen Suspension mit DZM auf 250000 Zellen/ml eingestellt. In eine 48 well-Platte (Greiner Bio-One) wurden je 400 µl der eingestellten Zellsuspension pro Kavität (well) pipettiert und die Platte für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit RPMI 1640 gewaschen (400, 200, 200 µl/well) und für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die zu prüfenden Stimuli [MP, LP, LPS 0111:B4 (Sigma Aldrich)] wurden in autoklavierten 1,5 ml-Reaktionsgefäßen (Carl Roth) mit SM unter Zusatz von 5 ng/ml PMA verdünnt und nach Absaugen des RPMI 1640 zu 200 µl/well auf die THP-1-Zellen gegeben. Im Anschluss wurden diese für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, dann die Stimuli entfernt und 200 µl/well RPMI 1640 unter Zusatz von 3,5 mg/ml D-Glucose (Carl Roth) und 5 ng/ml PMA hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 14-16 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Überstände in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, bei 1300 U/min (Centrifuge 5415C, Eppendorf) zentrifugiert und danach in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. In Versuchen zur Hemmung der TLR2-Rezeptorbindung wurden die THP-1-Zellen 10 min vor der Zugabe der Stimuli mit 5 µg/ml TLR2-Antikörper (Pab hTLR2, InvivoGen) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und der TLR2-Antikörper auch bei den beiden folgenden Inkubationsschritten in dieser Konzentration dem Medium zugesetzt. Die erhaltenen Überstände wurden bei -80 °C gelagert und nach Auftauen mit Hilfe eines Sandwich-ELISA auf TNF α untersucht.

Verwendet wurde dazu ein Antikörper-Paar gegen den humanen TNF α (huTNF α) von Invitrogen (CHC1753, Darmstadt, Deutschland), welches auch einen TNF α -Standard und Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Strep-HRP) für die Entwicklung beinhaltet. Nach Verdünnen des Fänger-Antikörpers gegen huTNF α mit PBS (Biochrom) auf 2 µg/ml erfolgte das Beschichten (Coating) der 96 well-MTP Nunc MaxiSorp[®] F96 (MTP, Thermo Fisher

Scientific NUNC A/S, Roskilde, Dänemark) mit 100 µl der Antikörperlösung pro well über Nacht bei 2-8 °C. Die Antikörperlösung wurde durch Ausschlagen entfernt und die Platte einmal mit 200 µl/well Wasch-Puffer pH 7,4 (WP), bestehend aus 0,2 g KH₂PO₄; 1,9 g K₂HPO₄ • 3 H₂O; 0,4 g Na₂-EDTA • 2 H₂O und 0,5 mL Tween[®] 20 in 1,0 l Aqua dem. (alle analytisch rein), gewaschen. Das Blockieren der freien Proteinbindungsstellen erfolgte anschließend mit 200 µl/well Assay-Puffer pH 7,4 (AP), welcher aus 0,5 % (m/V) BSA (Sigma Aldrich) und 0,1 % (V/V) Tween[®] 20 in PBS bestand, bei RT unter Rütteln der Platte für eine Stunde. Nach Ausschlagen des AP wurden in die MTP 100 µl/well TNF α -Standard-Verdünnungen und die zu untersuchenden Überstände gegeben. Verdünnungen des TNF α -Standards und der Proben erfolgte mit AP. Direkt danach wurden 50 µl/well des biotinylierten Detektions-Antikörpers gegen huTNF α hinzugefügt (0,32 µg/ml in AP) und die Platte für zwei Stunden bei RT gerüttelt. Im Anschluss wurde die Platte ausgeschlagen und fünfmal mit 200 µl/well WP gewaschen. Es erfolgte dann die Zugabe von 100 µl/well Strep-HRP in AP und eine Inkubation der Platte bei RT für 30 min. Wiederum wurde die MTP nach dem Ausschlagen fünfmal mit 200 µl/well WP gewaschen und hiernach mit 100 µl/well Substrat-Lösung versetzt. Diese bestand zu einem Teil aus Lösung A, bestehend aus 120 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und 100 µl Wasserstoffperoxid [30 % (V/V), beides von Carl Roth] in einer Mischung aus 5 ml Aceton und 45 ml Ethanol [96 % (V/V), beides analytisch rein], sowie zehn Teilen Lösung B, Kaliumcitrat-Puffer (30 mmol/l, pH 4,1) (Luttmann *et al.* 2006). Nach ca. 30 min Inkubation bei RT erfolgte das Stoppen der Farbentwicklung mit 100 µl/well Schwefelsäure (2 mol/l) und die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm an dem Plattenfotometer BioTek[®] Synergy Mx.

2.4.2 MTT-Test

Der MTT-Test bestimmt die Zellviabilität anhand der Bildung eines violetten Formazans aus dem gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen. Eine Schädigung der Mitochondrien der Zellen führt zu einer geringeren Bildung des violetten Formazans (Mosmann 1983). Störend können mikrobielle Verunreinigen sein, da Mikroorganismen ebenfalls über Dehydrogenasen verfügen, die eine Umsetzung des MTT katalysieren (Abate *et al.* 1998). Die Bestimmung der Zellviabilität von THP-1-Zellen wurde nach der Inkubation der Zellen mit verschiedenen Stimuli (MP-Formulierungen, LP, LPS) durchgeführt. Dafür wurden nach der Abnahme der

Überstände für die Bestimmung des Zytokins TNF α mittels ELISA die THP-1-Zellen in einer 48 well-Platte mit 200 μ l einer Lösung, bestehend aus 0,5 mg/ml MTT (Sigma Aldrich) in RPMI-1640 (Biochrom), versetzt und zwei Stunden lang bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Überstände entfernt und auf die Zellen 200 μ l sterilfiltrierter Isopropanol (analytisch rein) pipettiert. Die in den vitalen Zellen gebildeten Formazankristalle wurden durch Rütteln für 10 min auf einem Plattenrüttler gelöst. Es wurden je 100 μ l dieser Lösungen in eine 96 well-MTP überführt und die Absorption der Lösungen mit Hilfe des Plattenfotometers BioTek® Synergy Mx bei einer Wellenlänge von 550 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm bestimmt. Die Viabilität ergab sich aus dem prozentualen Verhältnis der Absorptionen von den zu testenden Zellen gegenüber einer Kontrolle von unstimulierten lebenden Zellen (Positiv-Kontrolle). Um eine störende mikrobielle Kontamination auszuschließen, wurden die zu testenden Stimuli ohne Zellen dem MTT-Test unterzogen. Für den Ausschluss einer Kontamination sollte die gemessene Absorption kleiner oder gleich der Absorption einer Kontrolle ohne Zellen und Stimuli (Negativ-Kontrolle) sein.

2.4.3 THP-1-Kultivierung für ELISPOT-Versuche

Monozytoide THP-1-Zellen wurden geerntet, die Zellzahl und -vitalität mit Hilfe eines CASY® Cell Counters Modell TT (Roche Innovatis, Reutlingen, Deutschland) bestimmt und die Zellsuspension auf 1 x 10⁶ Zellen/ml mit Medium, bestehend aus RPMI 1640 (Lonza, Köln, Deutschland), 10 % (V/V) FCS (Biochrom), Gentamicin (100 μ g/ml, CT Arzneimittel, Berlin, Deutschland) und PMA (6 ng/ml, Sigma Aldrich), eingestellt. Die Zellen wurden nur bei einer Vitalität von über 80 % weiterverwendet.

Jeweils 3 ml Zellsuspension pro Kavität wurde in 6 well-Platten (Greiner Bio-One) ausgesät. Die Zellen wurden für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und dreimal mit je 1 ml RPMI 1640 gewaschen. Die zu testenden Stimuli wurden mit RPMI 1640, welches 10 % (V/V) FCS, 100 μ g/ml Gentamicin und 5 ng/ml PMA enthielt, in 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One) verdünnt. Je 3 ml pro Kavität der verdünnten Lösungen wurden nach Entfernen der Waschflüssigkeit auf die Zellen gegeben und diese für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 3 ml/well GIBCO® Dulbecco's PBS (DPBS, Invitrogen) gewaschen und für 30 min mit 2 ml/well BioWhittaker® PBS-EDTA (Lonza) bei 37 °C und 5 % CO₂ stehen gelassen. Die abgelösten Zellen wurden im Anschluss resuspendiert und in 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One), welche eine Vorlage aus

20 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS enthielten, pipettiert. Dann wurden die entsprechenden Kavitäten zweimal mit je 3 ml DPBS gespült und die Spülflüssigkeiten ebenfalls in die Zentrifugenröhrchen überführt.

Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden bei 300 g 8 min zentrifugiert, zweimal mit je 10 ml DPBS gewaschen und in einem Milliliter DPBS resuspendiert. Die Zellzahl und -vitalität wurde mittels CASY[®] Cell Counter Modell TT bestimmt. Je 10^4 Zellen/well, suspendiert in RPMI 1640 unter Zusatz von 5 ng/ml PMA, wurden in sterile PVDF-96-well-ELISPOT-Platten (MultiScreen_{HTS}-IP, Millipore, Schwalbach/Ts., Deutschland) pipettiert. Die Vorbereitung, Inkubation und Entwicklung der Platten erfolgte mittels Diaclone[®] ELISpot Sets (Milenia Biotec, Gießen, Deutschland) für humanen TNF α und humanes IL6. Die Inkubationszeit der Zellen auf der ELISpot-Platte betrug 16 Stunden. Alle nicht im ELISpot Set enthaltenen Chemikalien waren analytisch rein. Die entwickelten Platten wurden von CTL-Europe GmbH (Bonn, Deutschland) mittels ImmunoSpot[®] gescannt und analysiert. Die ELISPOT-Versuche mit THP-1-Zellen erfolgten in Kooperation mit Herrn Dr. rer. nat. Dirk Lorenzen (Institut für Tumorthherapie, Duderstadt).

2.4.4 Durchflusszytometrische Untersuchungen an THP-1-Zellen

Zur Bestimmung von humanen Oberflächenmarkern wurden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Dafür wurden jeweils maximal 1×10^6 Zellen in 150 μ l Blockpuffer, bestehend aus 5 % Kaninchenserum (R4505, Sigma Aldrich) in IsoFlow[™] (Beckman Coulter), resuspendiert und mit 5-20 μ l Stammlösung (entsprechend dem jeweiligen Hersteller-Protokoll) eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers versetzt. Einen Überblick über die verwendeten Antikörper zur Charakterisierung von THP-1-Oberflächenmarkern gibt Tab. 2-1. Die Zellsuspension wurde für 20 min bei 2-8 °C inkubiert, zweimal mit je einem Milliliter IsoFlow[™] gewaschen und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die restlichen Zellen in 400 μ l IsoFlow[™] aufgenommen.

Hiernach wurden die Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur[™] von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) analysiert. Das Gerät verfügt über einen 488 nm-Argonlaser (Ion Laser Technologies, Salt Lake City, USA) und wurde mit CaliBRITE[™]-Partikeln (BD Biosciences) kalibriert. Sofern möglich, wurden mindestens 10000 Ereignisse je Probe detektiert. Die Auswertung erfolgte mittels BD

CellQuestPro™-Software von Becton Dickinson. Intakte Zellen wurden anhand der Vorwärts- und Seitwärtsstreuungscharakteristika für die weitere Analyse ausgewählt („gated“).

Tab. 2-1. Antikörper zur FACS-Charakterisierung von THP-1-Oberflächenmarkern.

| Oberflächenmarker | Fluoreszenzmarker | Wirtstier | Isotyp | Klon | Hersteller |
|-------------------|-------------------|-----------|--------|--------------|-----------------|
| Isotyp FITC | FITC | Maus | IgG1 | DAK-GO1 | Dako |
| Isotyp 1 PE | PE | Maus | IgG2a | DAK-GO5 | Dako |
| Isotyp 2 PE | PE | Maus | IgG1 | DAK-GO1 | Dako |
| Isotyp PE/Cy5 | PE/Cy5 | Maus | IgG1 | MOPC-21 | BD Biosciences |
| CD2 | FITC | Maus | IgG1 | MT910 | Dako |
| CD11b | PE/Cy5 | Maus | IgG1 | ICRF44 | BD Biosciences |
| CD14 | PE | Maus | IgG2a | RMO52 | Beckman Coulter |
| CD16 | PE | Maus | IgG1 | 3G8 | Beckman Coulter |
| CD19 | PE | Maus | IgG1 | HD37 | Dako |
| CD24 | PE | Maus | IgG1 | ALB9 | Beckman Coulter |
| CD29 | FITC | Maus | IgG1 | K20 | Dako |
| CD33 | FITC | Maus | IgG1 | WM-54 | Dako |
| CD34 | PE | Maus | IgG1 | 581 | BD Biosciences |
| CD44 | FITC | Maus | IgG2b | G44-26 (C26) | BD Biosciences |
| CD64 | FITC | Maus | IgG1 | 10.1 | BD Biosciences |
| CD66b | FITC | Maus | IgG1 | 80H3 | AbD SeroTec |
| CD80 | FITC | Maus | IgG1 | L307.4 | BD Biosciences |
| CD80 | PE | Maus | IgG1 | L307.4 | BD Biosciences |
| CD86 | PE | Maus | IgG1 | 2331 (FUN-1) | BD Biosciences |
| CD90 | FITC | Maus | IgG1 | F15-42-1 | AbD SeroTec |
| CD105 | FITC | Maus | IgG1 | SN6 | AbD SeroTec |
| CD117 | PE | Maus | IgG1 | 61708 | R&D Systems |
| CD124 | PE | Maus | IgG1 | hIL4R-M57 | BD Biosciences |
| CD133/1 | PE | Maus | IgG1 | AC133 | Miltenyi Biotec |
| CD166 | PE | Maus | IgG1 | 3A6 | BD Biosciences |
| CD184 | PE | Maus | IgG2a | 12G5 | Beckman Coulter |
| CD195 | PE | Maus | IgG2a | 2D7/CCR5 | BD Biosciences |
| CDw197 | PE | Ratte | IgG2a | 3D12 | BD Biosciences |
| CD206 | FITC | Maus | IgG1 | 19.2 | BD Biosciences |
| CD282 | FITC | Maus | IgG2a | TL2.1 | Imgenex |
| CD282 | PE | Maus | IgG2a | TL2.1 | Imgenex |
| CD284 | PE | Maus | IgG2a | HTA125 | eBioscience |
| CD326 | FITC | Maus | IgG1 | HEA-125 | Miltenyi Biotec |
| HLA-ABC | PE | Maus | IgG2a | W6/32 | AbD Serotec |
| HLA-A2 | FITC | Maus | IgG2b | BB7.2 | BD Biosciences |
| HLA-DR | FITC | Maus | IgG2a | G46-6 | BD Biosciences |
| HLA-DR | PE | Maus | IgG2b | B8.12.2 | Beckman Coulter |

Abkürzungen: FITC: Fluoresceinisothiocyanat, PE: Phycoerythrin; PE/Cy5: Phycoerythrin-Cyanin-5-Tandem-Konjugat. Firmen: AbD SeroTec (Düsseldorf, Deutschland); BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland); Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland); Dako (Hamburg, Deutschland); eBioscience (Frankfurt, Deutschland); Imgenex (San Diego, USA; Vertrieb über Biomol, Hamburg, Deutschland); Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland); R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland).

Die Zellvitalität wurde durch Ausschluss von Propidiumiodid bestimmt. Bei toten Zellen kann dieser Farbstoff die Zellmembran durchdringen und sich in die DNA einlagern, was zu einer Fluoreszenz dieser Zellen führt. Hingegen wird die Zellmembran von intakten Zellen nur in geringem Ausmaß durch den Farbstoff überwunden. Hierfür wurden ca. 400 µl

Zellsuspension mit 10 µl Propidiumiodid-Lösung in PBS (50 µg/ml, BD Biosciences) gemischt und innerhalb von zwei Minuten durchflusszytometrisch analysiert. Innerhalb der Auswahl (Gate) für die intakten Zellen, wurden lebende ungefärbte Zellen und tote gefärbte Zellen miteinander verglichen. Die Gesamtzahl an toten Zellen ergab sich aus der Summe der gemessenen Ereignisse für gefärbte Zellen und der Ereignisse, die sich außerhalb des Gates für intakte Zellen befanden. Die Gesamtzahl der lebenden Zellen ergab sich aus den ungefärbten Zellen innerhalb des Gates für intakte Zellen. Die Vitalität wurde durch die prozentuale Angabe der lebenden Zellen im Verhältnis zu allen gemessenen Ereignissen (kein Gate) ermittelt. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrollen eingesetzt, wobei das dort ermittelte Gate für intakte Zellen, auch auf behandelte Proben angewendet wurde. Dadurch konnte eine eventuelle Reduktion der Vitalität im Vergleich zur Kontrolle angegeben werden.

Die unspezifische Bindung der fluoreszenzmarkierten Antikörper an die Zellen, beispielsweise über die Bindung des Fc-Teils des Antikörpers an Fc-Rezeptoren auf den Zellen, wurde durch den Einsatz einer Isotypen-Kontrolle ermittelt und entsprechend kompensiert. Hierfür wurden Isotypen-Antikörper, die den gleichen Isotyp und den gleichen Fluoreszenzmarker aufwiesen, wie der für den Oberflächenmarker spezifische Antikörper, eingesetzt. Die FACS-Versuche erfolgten in Kooperation mit Herrn Dr. rer. nat. Dirk Lorenzen (Institut für Tumorthherapie, Duderstadt).

2.4.5 Phagozytose-Assay

Monozytoide THP-1-Zellen in Suspensionskultur wurden wie unter 2.4.3 (THP-1-Kultivierung für ELISPOT-Versuche) beschrieben geernet, die Zellzahl und -vitalität bestimmt und eine Zellsuspension mit 1×10^6 Zellen pro ml erhalten. Jeweils ein Milliliter pro Kavität der Zellsuspension wurde in 24 well-Platten (Greiner Bio-One) ausgesät und für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dabei differenzierten die monozytoiden THP-1-Zellen durch den PMA-Einfluss zu adhärennten makrophagenartigen Zellen. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen mit je einem Milliliter RPMI 1640.

Um das Ausmaß der Phagozytose zu bestimmen wurde ein Teil der Ansätze mit 50 µg/ml Cytochalasin D (Sigma Aldrich) in RPMI 1640, welches 10 % (V/V) FCS, 100 µg/ml Gentamicin und 5 ng/ml PMA enthielt, versetzt. Der andere Teil der Ansätze wurde nicht mit Cytochalasin D behandelt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für zwei Stunden inkubiert und dann dreimal mit jeweils einem Milliliter RPMI 1640 gewaschen. Anschließend

wurden jeweils ein Milliliter pro Kavität der zu testenden FITC-BSA-beladenen PLGA-MP-Suspensionen in RPMI 1640, welches 10 % (V/V) FCS, 100 µg/ml Gentamicin und 5 ng/ml PMA enthielt, zu den THP-1-Zellen hinzugegeben. Bei Ansätzen, die bereits mit Cytochalasin D behandelt wurden, wurde die Konzentration an Cytochalasin D von 50 µg/ml weiterhin aufrechterhalten. Als Positiv-Kontrolle dienten Fluorescein-markierte Zymosan A-Partikel aus *Saccharomyces cerevisiae* (BioParticles[®], Molecular Probes als Marke von Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Gegebenenfalls wurden die Ansätze mit gelöstem FSL1 versetzt, um den Einfluss von partikelgebundenem und freiem LP auf die Phagozytose zu evaluieren.

Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit einem Milliliter DPBS pro Kavität gewaschen. Die Aufnahme der FITC-markierten Partikel wurde mit Hilfe des Inversions-Fluoreszenz-Mikroskops Olympus CKX41 (Olympus) phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopisch (Anregungswellenlänge 450 nm, Emissionswellenlänge 530 nm) bewertet. Danach wurden die Zellen für 30 min mit einem Milliliter BioWhittaker[®] PBS-EDTA pro Kavität bei 37 °C und 5 % CO₂ stehen gelassen. Die abgelösten Zellen wurden resuspendiert, in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und dreimal mit DPBS gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und die verbliebene Zellsuspension in 400 µl IsoFlow[™] resuspendiert. Der Anteil an fluoreszierenden Zellen wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur[™] bestimmt. Die Versuche zur Phagozytose mit THP-1-Zellen erfolgten in Kooperation mit Herrn Dr. rer. nat. Dirk Lorenzen (Institut für Tumorthapie, Duderstadt).

2.4.6 Intrazelluläre Lokalisation von Toll-like-Rezeptoren

Für die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation der TLR2 und TLR4 wurden sowohl PMA-unbehandelte monozytoide THP-1-Zellen als auch für 48 h mit PMA behandelte makrophagenartige Zellen verwendet. Die Kultivierung, Differenzierung und Ernte der Zellen erfolgte wie unter 2.4.3 (THP-1-Kultivierung für ELISPOT-Versuche) beschrieben.

Die geernteten Zellen wurden mit Hilfe des Kits IntraStain von DakoCytomation (Glostrup, Dänemark; Vertrieb über BIOZOL Diagnostika Vertrieb, Eching, Deutschland) untersucht. Hierfür wurden jeweils maximal 1 x 10⁶ Zellen in 150 µl Blockpuffer, bestehend aus 5 % Kaninchenserum (R4505, Sigma Aldrich) in IsoFlow[™], resuspendiert und mit 5 µl

Stammlösung eines Antikörpers, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) gekoppelt war, versetzt. Als Negativ- bzw. Isotypkontrolle diente der monoklonale Maus-Antikörper IgG2a (Katalog-Nr. MCA929) von AbD Serotec, zur Bestimmung von TLR2 der monoklonale Maus-Antikörper TLR2/CD282 (Katalog-Nr. IMG-416D) von Imgenex und von TLR4 der monoklonale Maus-Antikörper Anti-Human CD 284 (TLR4) PE (Katalog-Nr. 12-9917-41) von eBioscience. Die Zellsuspension wurde für 20 min bei 2-8 °C inkubiert, dann mit einem Milliliter IsoFlow™ versetzt und bei 300 g fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die verbliebene Zellsuspension in 400 µl IsoFlow™ resuspendiert. Nach dieser ersten Färbung wurde der Anteil an gebundenem Antikörper mit Hilfe des FACS Navios™ 10/3 von Beckman Coulter und unter Verwendung der Kaluza Analysis Software bestimmt. Die Instrumenten-Einstellungen wurden für die weiteren Messungen nicht verändert. Im Anschluss wurden die Zellen entsprechend der Produktbeschreibung mit dem Formaldehyd-haltigen IntraStain Reagenz A fixiert und gewaschen. Hierbei wurde die PBS-Arbeitslösung durch IsoFlow™ ersetzt. Die gewaschenen Zellen wurden in 400 µl IsoFlow™ resuspendiert und der Anteil PE-fluoreszierender Zellen erneut mittels FACS bestimmt. Nach der Messung wurde die Zellsuspension zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 50 µl IsoFlow™ resuspendiert. Anschließend wurden zur Permeabilisierung und intrazellulären Färbung der Zellen 100 µl IntraStain Reagenz B sowie 5 µl des anfänglich verwendeten PE-konjugierten Antikörpers hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde für 20 min bei 2-8 °C inkubiert, dann mit einem Milliliter IsoFlow™ versetzt und bei 300 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die verbliebene Zellsuspension in 400 µl IsoFlow™ resuspendiert und mittels FACS analysiert. Die Versuche zur intrazellulären Lokalisation von TLR mit THP-1-Zellen erfolgten in Kooperation mit Herrn Dr. rer. nat. Dirk Lorenzen (Institut für Tumorthherapie, Duderstadt).

2.5 Versuche mit humanen monozytären Dendritischen Zellen

2.5.1 Generelle Aussagen zu Experimenten mit huMoDC

Die Experimente mit huMoDC wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. Dirk Lorenzen am Institut für Tumorthherapie in Duderstadt durchgeführt. Da huMoDC von verschiedenen freiwilligen Spendern gewonnen werden und diese keine Zelllinie darstellen,

deren Versuchsergebnisse in engen Grenzen reproduzierbar sind, war eine statistische Auswertung von Versuchswiederholungen meist nicht möglich. In diesen Fällen wurde ein repräsentatives Experiment ausgewählt und im Ergebnisteil präsentiert.

2.5.2 Gewinnung und Isolierung von Monozyten

Humane mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) gesunder, freiwilliger Spender wurden mittels Leukapherese gewonnen. Dafür wurde ein COBE® Spectra Cell Separator (Gambro BCT, Martinsried, Deutschland) mit dem Standardprogramm für die Isolierung von mononukleären Zellen eingesetzt. Die PBMC wurden in Calcium- und Magnesium-freier HBSS (*Hank's balanced salt solution*) suspendiert und die darin enthaltenen Monozyten durch Gegenstromzentrifugation bei 2400 U/min im Elutra® Cell Separation System (Gambro BCT) isoliert. Dafür wurde die Flussrate schrittweise von 37,0 auf 103,9 ml/min erhöht. Die Monozyten befanden sich in der letzten von fünf Fraktionen und konnten nach Abschluss der Zentrifugation aus der Trennkammer entnommen werden (*rotor off fraction*, Berger *et al.* 2005).

Die Reinheit und Vitalität der isolierten Monozyten wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe eines FACSCalibur™ von Becton Dickinson bestimmt. Die Reinheit wurde durch den Anteil an CD14⁺-Zellen (> 85 %) und die Abwesenheit von Granulozyten (< 5 %) ermittelt. Dafür wurden die Zellen mit einem monoklonalen, PE/Cy5-markierten Maus-anti-Human-CD14-Antikörper (Klon RMO52, Isotyp IgG2a) von Beckman Coulter gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (siehe 2.4.4). Der Anteil der Granulozyten wurde anhand der Vorwärts- und Seitwärtsstreuungs-Charakteristika bestimmt. Die Vitalität wurde über Propidiumiodid-Färbung ermittelt (siehe 2.4.4). Die Zellen wurden nur bei einer Vitalität von über 95 % weiterverwendet.

Für spätere Versuche wurden Monozyten in 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 90 % autologes Serum (hitzeinaktiviert, 56 °C, 60 min) überführt und mit einer Rate von 1 °C/min bis auf -80 °C abgekühlt. Die Lagerung erfolgte bei -152 °C in bzw. über flüssigem Stickstoff.

2.5.3 Kultivierung von unreifen huMoDC

Unreife huMoDC wurden aus Monozyten gewonnen. Dafür wurden die Monozyten bei 37 °C schnell aufgetaut und das DMSO sowie das autologe hitzeinaktivierte Serum durch

Zugabe von warmen RPMI 1640 verdünnt. Die Monozyten wurden mit einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml in dem serumfreien DC-Medium CellGro® (CellGenix™, Freiburg i. Br., Deutschland) unter Zusatz von 800 U/ml GM-CSF (INN: Sargramostin, Genzyme, Neu-Isenburg, Deutschland) suspendiert. Nach 20 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden dem Medium 500 U/ml IL4 (CellGenix™) zugesetzt und die Zellen für weitere fünf Tage inkubiert. Danach wurden nicht adhärenzte Zellen (iDC) geerntet (Tag 6), die Zellzahl und -vitalität mittels CASY® Cell Counter Modell TT bestimmt und die Zellen durchflusszytometrisch phänotypisiert (siehe 2.5.5).

2.5.4 Einfluss der PLGA-Mikropartikel auf huMoDC

Die an Tag 6 gewonnenen iDC wurden in 6 well-Platten (3 ml Arbeitsvolumen, Greiner Bio-One) mit einer Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in frischem serumfreien DC-Medium CellGro® unter Zusatz von 800 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL4 suspendiert. Die zu untersuchenden PLGA-MP wurden in Konzentrationen von 2-200 µg/ml eingesetzt. Bei LP- und sMPLA-modifizierten PLGA-MP wurden vergleichbare Konzentrationen der Reifungsstimulanzen in gelöster Form als Kontrollen eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte iDC. Die Positivkontrolle für die Reifung der DC stellte ein Zytokin-Cocktail nach Jonuleit *et al.* (1997) dar, der aus 10 ng/ml TNF α , 10 ng/ml IL1 β , 100 U/ml IL6 (alle von R&D Systems) und 1 µg/ml PGE₂ (Sigma Aldrich) bestand. Die Inkubation mit den verschiedenen Stimuli wurde für 20 h bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt. Gegebenenfalls wurden nach den ersten sechs Stunden Inkubation 100 ng/ml LPS R60 und 500 U/ml IFN γ zugesetzt, um die Reifungsfähigkeit der DC zu überprüfen. Das LPS R60 war ein Geschenk von Frau Dr. Freudenberg und Herrn Dr. Dr. Galanos vom Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg i. Br. Die Zellen wurden geerntet (Tag 7) und die Aufnahme der FITC-BSA-beladenen PLGA-MP wurde fluoreszenzmikroskopisch (Olympus CKX41) und durchflusszytometrisch (FACSCalibur™) bestimmt. Die DC wurden mit PE- und PE/Cy5-markierten Antikörpern gegen relevante Oberflächenmarker gefärbt und im Durchflusszytometer FACSCalibur™ analysiert (siehe 2.5.5). Für die Bestimmung des Zytokinprofils wurden die geernteten Zellen in ELISPOTs untersucht (siehe 2.5.6).

2.5.5 Durchflusszytometrische Untersuchungen an huMoDC

Die an Tag 6 und Tag 7 geernteten DC wurden gewaschen und mit PE- und PE/Cy5-markierten Antikörpern entsprechend dem Herstellerprotokoll gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Vorgehensweise entsprach der unter Punkt 2.4.4 angegebenen. Die in Tab. 2-2 angegebenen Antikörper wurden verwendet.

Tab. 2-2. Antikörper zur FACS-Charakterisierung von DC-Oberflächenmarkern.

| Oberflächenmarker | Fluoreszenzmarker | Wirtstier | Isotyp | Klon | Hersteller |
|-------------------|-------------------|-----------|--------|--------------|-----------------|
| Isotyp FITC | FITC | Maus | IgG1 | DAK-GO1 | Dako |
| Isotyp 1 PE | PE | Maus | IgG2a | DAK-GO5 | Dako |
| Isotyp 2 PE | PE | Maus | IgG1 | DAK-GO1 | Dako |
| Isotyp PE/Cy5 | PE/Cy5 | Maus | IgG1 | MOPC-21 | BD Biosciences |
| CD1a | PE/Cy5 | Maus | IgG1 | BL6 | Beckman Coulter |
| CD14 | PE/Cy5 | Maus | IgG2a | RMO52 | Beckman Coulter |
| CD80 | PE | Maus | IgG1 | L307.4 | BD Biosciences |
| CD83 | PE/Cy5 | Maus | IgG2b | HB15a | Beckman Coulter |
| CD86 | PE | Maus | IgG1 | 2331 (FUN-1) | BD Biosciences |
| CD209 | PE | Maus | IgG1 | AZND1 | Beckman Coulter |
| CD282 (TLR2) | PE | Maus | IgG2a | TL2.1 | Imgenex |
| HLA-DR | PE | Maus | IgG2b | B8.12.2 | Beckman Coulter |

Abkürzungen: FITC: Fluoresceinisothiocyanat, PE: Phycoerythrin; PE/Cy5: Phycoerythrin-Cyanin-5-Tandem-Konjugat.

2.5.6 ELISPOT-Versuche an huMoDC

Die an Tag 7 geernteten DC wurden gewaschen. Die Zellzahl und -vitalität wurde mittels CASY[®] Cell Counter Modell TT bestimmt. Hiernach wurde die Zellzahl mit frischem serumfreien DC-Medium CellGro[®] unter Zusatz von 800 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL4 auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt und pro Ansatz jeweils drei Kavitäten der vorbereiteten sterilen PVDF-96-well-ELISPOT-Platte (MultiScreen_{HTS}-IP, Millipore, Schwalbach/Ts., Deutschland) mit 100 µl Zellsuspension, d. h. mit 5×10^4 Zellen/well, beladen. Gegebenenfalls wurden zu den Ansätzen 100 ng/ml LPS R60 und/oder 500 U/ml IFN γ zugesetzt. Die Vorbereitung, Inkubation und Entwicklung der Platten erfolgte nach dem Herstellerprotokoll der Diaclone[®] ELISpot Sets für humanen TNF α , humanes IL10 und humanes IL12p70. Die Inkubationszeit der Zellen auf der ELISpot-Platte betrug 16 Stunden. Alle nicht im ELISpot Set enthaltenen Chemikalien waren analytisch rein. Die entwickelten Platten wurden von CTL-Europe GmbH (Bonn, Deutschland) mittels ImmunoSpot[®] gescannt und analysiert.

2.5.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Aufnahme von kovalent mit FSL1-bio modifizierten, FITC-BSA-beladenen PLGA-MP (kFSL1-bio-MP) in Monozyten und iDC sowie die intrazelluläre Lokalisation des TLR2 wurden mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) an einem Leica TCS SP-5 Konfokal-Mikroskop (Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) untersucht. Dazu wurden Monozyten und iDC, wie oben beschrieben, kultiviert und geerntet. Die Zellzahl wurde auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Je 300 μ l/Kammer der Zellsuspensionen wurden in Lab-TekTM Kammerdeckgläser (Vertrieb über Thermo Electron LED, Langenselbold, Deutschland) pipettiert. Danach wurden 50 μ g kFSL1-bio-MP hinzugegeben. Als Positivkontrolle dienten Ansätze mit 5 nmol/l gelöstem FSL1-bio, bei der Negativkontrolle wurden keine weiteren Substanzen zugesetzt. Die Zellen wurden für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden die Überstände entfernt und die Zellen einmal mit DPBS gewaschen. Die intrazelluläre Färbung erfolgte mit Hilfe des Kits IntraStain von DakoCytomation entsprechend der Herstelleranweisung. Dazu wurden die Zellen 15 min bei RT mit 100 μ l IntraStain Reagenz A fixiert, mit PBS-Arbeitslösung gewaschen und dann mit 100 μ l IntraStain Reagenz B 15 min bei RT permeabilisiert. Hiernach wurden die Zellen mit PBS-Arbeitslösung gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit 1%iger BSA-Lösung in PBS (Blockpuffer) blockiert. Die Zellen wurden zunächst mit 50 μ l/Kammer Streptavidin-Atto 590 (1:25 Verdünnung mit Blockpuffer, Sigma Aldrich, Anregungswellenlänge 561 nm) im Dunkeln für 30 min inkubiert und anschließend zweimal mit Blockpuffer gewaschen. Gegebenenfalls wurden 50 μ l/Kammer Maus-anti-Human-TLR2.1-Antikörper (1:20 Verdünnung mit Blockpuffer, Imgenex) hinzugefügt und die Zellen für 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Blockpuffer wurden 50 μ l/Kammer Alexa Fluor[®] 488-gelabelter anti-Maus-Antikörper (1:20 Verdünnung mit Blockpuffer, Invitrogen) zu den Zellen gegeben und diese für 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und dann mit 70 μ l Mowiol und 10 μ l 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Invitrogen) fixiert bzw. gefärbt. Die CLSM-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Dirk Lorenzen (Institut für Tumorthherapie, Duderstadt) und Lars Kastrop am Max-Planck-Institut in Göttingen durchgeführt.

2.6 Methoden der Statistik

Die statistische Auswertung der Unterschiede zwischen adsorptiver und kovalenter Modifizierung von PLGA-MP mit LP erfolgte mit der Software Origin Pro 8.5. Angewendet wurde ein Zwei-Stichproben-t-Test für unverbundene Stichproben. Die Voraussetzung für die Durchführung des t-Test sind Normalverteilung und Varianzhomogenität. Die Prüfung auf Normalverteilung wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests durchgeführt, die Prüfung auf Varianzhomogenität mittels des F-Tests.

Die statistische Auswertung der TNF α -Produktion durch THP-1-Zellen erfolgte mit der Software SPSS Statistik Version 19 von IBM (Ehningen, Deutschland). Für den Vergleich der Mittelwerte von mehr als zwei Probenansätzen (Gruppen) mit je 4 oder mehr unabhängigen Stichproben wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) verwendet. Voraussetzung für die Anwendung war die Normalverteilung der Stichproben, die mit dem Shapiro-Wilk-Test festgestellt wurde. Im Anschluss wurde die Varianzhomogenität mit Hilfe des Levene-Tests überprüft. Da keine Varianzhomogenität vorlag, wurde für die ANOVA eine Auswertung nach Welch genutzt. Waren die Gruppen voneinander signifikant unterschiedlich, so wurde der multiple Post-Hoc-Test nach Dunnett-T3 durchgeführt, um zu ermitteln, welche Gruppen signifikant unterschiedlich und welche gleich zueinander waren. Normalverteilte Stichproben wurden trotz der geringen Stichprobenanzahl ($n \geq 4$) mit arithmetischem Mittelwert und Standardabweichung angegeben, da diese aussagekräftige Lage- und Streuungsparameter bei vorhandener Normalverteilung sind.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Mikropartikel-Charakterisierung

3.1.1 Partikelgröße

Im Folgenden soll der Einfluss verschiedener Herstellungsparameter auf die Partikelgröße von BSA-beladenen PLGA-MP untersucht werden. Für eine effektive Aufnahme der MP durch phagozytierende APC sollte die Partikelgröße in einem Bereich von unter 5-10 μm liegen (Johansen *et al.* 2000a; Wischke 2006, S. 88-90). Die MP wurden mittels eines W/O/W-Lösungsmittel-Evaporations-Verfahrens hergestellt.

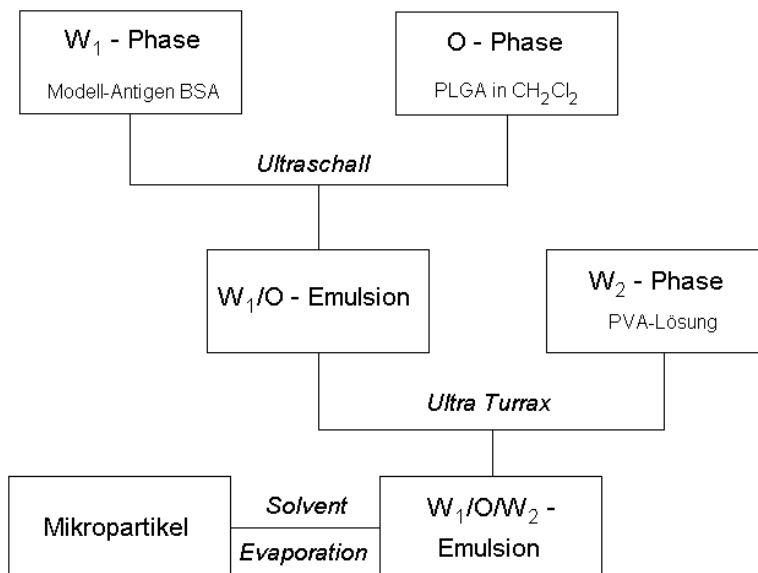


Abb. 3-1. Schematischer Ablauf der Herstellung von Protein-beladenen PLGA-MP mit Hilfe des W/O/W-Lösungsmittel-Evaporations-Verfahrens.

Wie in Abb. 3-1 dargestellt wurde BSA als Modell-Antigen in der inneren wässrigen Phase (W_1 -Phase) gelöst und mit Hilfe eines Ultraschallstabs in der organischen Lösungsmittelphase (O-Phase), bestehend aus dem Polymer PLGA gelöst in DCM, emulgiert und es bildete sich eine W_1/O -Emulsion (Primäremulsion). Diese wurde mit Hilfe des Rotor-Stator-Homogenisators Ultra Turrax® in eine äußere wässrige Phase (W_2 -Phase), welche als Stabilisator PVA enthielt, eingearbeitet. Die sich bildende $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsion (Sekundäremulsion) wurde bei RT gerührt, wobei das leicht flüchtige Lösungsmittel aus der O-Phase in die W_2 -Phase und dann in die Luft überging (*solvent evaporation*). Durch den Verlust an organischem Lösungsmittel präzipitierte das Polymer PLGA im Idealfall um die

innere wässrige Phase und schloss das darin enthaltene Modell-Antigen in die entstehenden MP ein.

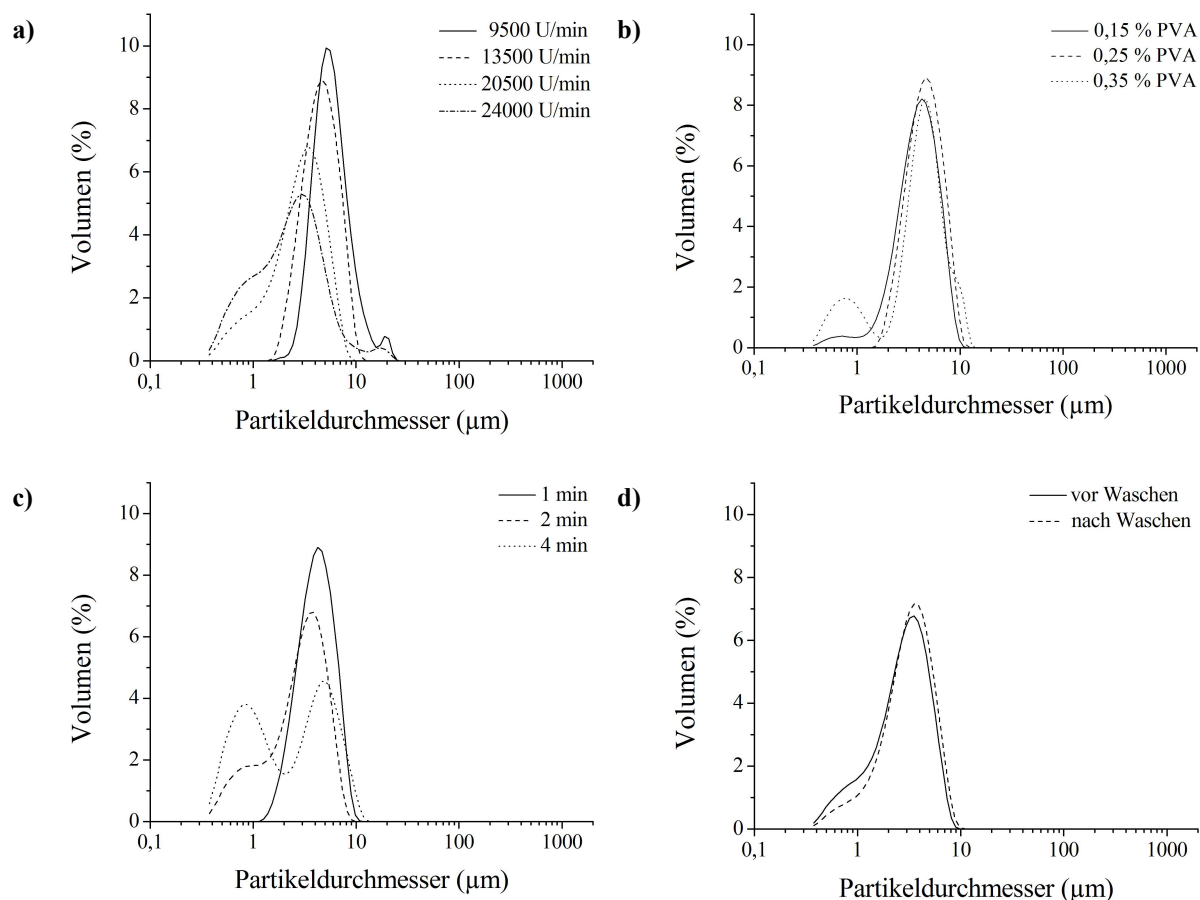


Abb. 3-2. Volumen-Partikelgrößenverteilung von BSA-beladenen PLGA-MP [W_1 -Phase: 200 μ l 1%ige (m/V) BSA-Lösung in PBS, O-Phase: 4 g 5%ige (m/m) Resomer[®] RG 503 H-Lösung in DCM, W_2 -Phase: 150 ml PVA-Lösung] in Abhängigkeit von folgenden Faktoren. - **a)** Ultra Turrax[®]-Geschwindigkeit bei der Sekundäremulsionsbildung v_{UT} (W_2 -Phase: 0,25%ige PVA-Lösung); **b)** PVA-Konzentration (m/V) in der W_2 -Phase (v_{UT} : 13500 U/min); **c)** Homogenisationszeit bei der Sekundäremulsionsbildung (W_2 -Phase: 0,25%ige PVA-Lösung, v_{UT} : 13500 U/min); **d)** Dreimaliges Waschen mit Aqua dem. (W_2 -Phase: 0,25%ige PVA-Lösung, v_{UT} : 20500 U/min).

In Abb. 3-2 wird der Einfluss verschiedener Parameter auf die durch LD gemessene volumengewichtete Partikelgrößenverteilung dargestellt. Berechnet wurde diese aus den Laserbeugungsdaten nach der Mie-Theorie anhand der von Schalper 2002 verwendeten Parameter. Dabei wurden als W_1 -Phase 200 μ l einer 1%igen BSA-Lösung (m/V) und als O-Phase 4 g einer 5%igen (m/m) Lösung von Resomer[®] RG 503 H verwendet.

Zunächst wurde der Einfluss der Ultra Turrax[®]-Geschwindigkeit bei der Sekundäremulsionsbildung untersucht (Abb. 3-2a). Eine Steigerung der Geschwindigkeit bei der einminütigen Emulsionsbildung führte zu einer Verkleinerung des mittleren

volumengewichteten Partikeldurchmessers $D[4,3]$. Bei 9500 U/min betrug dieser $6,57 \pm 3,22 \mu\text{m}$, sank bei 13500 U/min auf $5,02 \pm 1,87 \mu\text{m}$, verringerte sich bei 20500 U/min auf $3,20 \pm 1,71 \mu\text{m}$ und bei 24000 U/min auf $3,14 \pm 3,02 \mu\text{m}$ (MW \pm SD, $n = 3$). Die niedrigste Geschwindigkeit führte zur Bildung von Partikeln mit Durchmessern über $10 \mu\text{m}$, d. h. 10,2 % der Partikel lagen über diesem Durchmesser. Mit steigender Geschwindigkeit erfolgte ab 20500 U/min eine erhöhte Bildung von NP, so befanden sich 9,61 % der Partikel bei 20500 U/min unter $1 \mu\text{m}$ und 17,2 % bei 24000 U/min. Auch der Anteil größerer Partikel stieg von 20500 U/min auf 24000 U/min an, d. h. über einem Durchmesser von $10 \mu\text{m}$ lagen bei ersterem ca. 0,004 % und bei zweitem 3,24 %. Die mit 13500 U/min hergestellten MP zeigten die engste Partikelgrößenverteilung, wobei sich 10 % der Partikel unter einem Durchmesser von $2,785 \mu\text{m}$ ($d_{0,1}$) und 95 % unter $8,565 \mu\text{m}$ ($d_{0,95}$) befanden. Somit waren mit 13500 und 20500 U/min hergestellte MP hinsichtlich der Partikelgrößenverteilungen am geeignetsten für eine Aufnahme durch phagozytierende APC. Der hier gezeigte Einfluss der Homogenisator-Geschwindigkeit bei der Sekundäremulsionsbildung auf die Partikelgröße bestätigt die Beobachtungen von Ogawa *et al.* 1988, die bei der Herstellung von PLA-MP nach dem W/O/W-Verfahren eine Verringerung der Partikelgröße mit zunehmender Homogenisator-Geschwindigkeit feststellten.

Eine Veränderung der Konzentration (m/V) von PVA in der W_2 -Phase von 0,15 % bis hin zu 0,35 % (Abb. 3-2b) bei gleichbleibender Ultra Turrax[®]-Geschwindigkeit führte hingegen kaum zu einer Veränderung des Hauptpeaks der Partikelgrößenverteilungen. Bei der Erhöhung der Konzentration von 0,25 % auf 0,35 % war eine Zunahme von NP beobachtbar. Höhere PVA-Konzentrationen waren aufgrund der Schaumbildung mit dem hier angewandten Verfahren nicht möglich. Die Partikelgrößenverteilungen zwischen 0,15 und 0,25 % PVA waren wenig verschieden, allerdings führte die niedrigere Konzentration zu einer erhöhten Aggregatbildung beim Waschen der MP. Daher wurde für weitere Versuche eine PVA-Konzentration von 0,25 % gewählt. Ein wesentlicher Einfluss der PVA-Konzentration auf die Partikelgröße, wie er beispielsweise von Jeffery *et al.* 1993 beobachtet wurde, konnte bei den hier vorliegenden PVA-Konzentrationen nicht gezeigt werden. Dies ist v. a. auf die geringen Konzentrationsunterschiede von 0,1 % zurückzuführen. Hingegen war die kleinste von Jeffery *et al.* (1993) untersuchte Erhöhung der PVA-Konzentration von einem auf zwei Prozent, was eine Reduktion der Partikelgröße um ca. zwei Mikrometer verursachte.

Bei einer Erhöhung der Homogenisationszeit für die Sekundäremulsionsbildung von einer Minute auf zwei bzw. vier Minuten zeigte sich hinsichtlich der Partikelgrößenverteilung eine Zunahme des nanopartikulären Anteils von 1,11 % auf 12,7 bzw. 27,5 %, während der Anteil im Mikrometerbereich absank (Abb. 3-2c). Daher war eine Erhöhung der Homogenisationszeit nicht für eine Reduktion der Partikelgröße im Mikrometerbereich brauchbar.

Das dreimalige Waschen der MP führte zu keiner wesentlichen Veränderung des Hauptpeaks der Partikelgrößenverteilungen (Abb. 3-2d). Allerdings erfolgte eine geringe Reduktion des nanopartikulären Anteils von 9,61 auf 6,24 %.

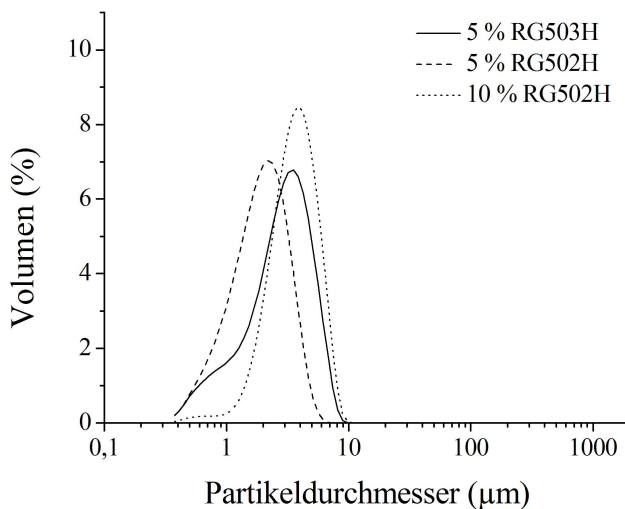


Abb. 3-3. Einfluss der Polymerart und -konzentration in der O-Phase auf die Volumen-Partikelgrößenverteilung von BSA-beladenen PLGA-MP (W₁-Phase: 200 µl 1%ige BSA-Lösung in PBS, W₂-Phase: 150 ml 0,25%ige PVA-Lösung, v_{UT}: 20500 U/min).

Im Weiteren wurde der Einfluss des Polymers auf die Partikelgrößenverteilung untersucht (Abb. 3-3). Dafür wurde das Polymer Resomer[®] RG 503 H, welches eine logarithmische Viskositätszahl von 0,32-0,44 dl/g (0,1 % in Chloroform, 25 °C) aufweist, gegen das kurzkettigere Polymer Resomer[®] RG 502 H ausgetauscht, welches eine logarithmische Viskositätszahl von 0,16-0,24 dl/g hat. Als weitere feststehende Parameter wurden eine Ultra Turrax[®]-Geschwindigkeit von 20500 U/min, eine PVA-Konzentration von 0,25 % (m/V) und eine Homogenisationszeit für die Bildung der Sekundäremulsion von einer Minute gewählt. Der Austausch der 5%igen (m/m) Lösung von Resomer[®] RG 503 H gegen Resomer[®] RG 502 H führte zu einer Verringerung des D[4,3] von $3,20 \pm 1,71 \mu\text{m}$ auf $2,19 \pm 1,71 \mu\text{m}$ (MW \pm SD, n = 3). Der nanopartikuläre Anteil lag für Resomer[®] RG 503 H bei 9,61 % und für RG 502 H bei 13,3 %. Durch eine Verdopplung der Resomer[®] RG 502 H-Polymerkonzentration in der O-Phase auf 10 % (m/m) wurden ein D[4,3] von $3,98 \pm 1,64 \mu\text{m}$ (MW \pm SD, n = 3) und eine Reduktion der NP auf 1,55 % erreicht. Die Erhöhung der Polymerkonzentration führte zu einer Vergrößerung der PLGA-MP, was v. a. auf die höhere

Viskosität der O-Phase und die damit verbundene erschwerte Bildung von kleinen W_1/O -Tröpfchen bei gleichbleibendem Energieeintrag durch den Homogenisator zurückzuführen war (Yan *et al.* 1994). Die Verringerung der Partikelgröße nach Austausch des Polymers beruhte ebenfalls auf der Viskositätserniedrigung. Die nach dem letzten Verfahren hergestellten MP dienten als Ausgangspunkt für alle weiteren Versuche und dieses wird im Weiteren als Standard-Verfahren bezeichnet.

Zur abschließenden Beurteilung der Partikelgrößenverteilung wurden die nach dem Standard-Verfahren hergestellten MP auf zwei verschiedenen Geräten, die nach dem Prinzip der statischen Lichtstreuung (Laserbeugung) arbeiten, und auf einem Gerät, welches ein Impedanz-Messverfahren nutzt, analysiert (Tab. 3-1). Hierbei wird letzteres als Goldstandard verwendet, da es ein Einzelmessverfahren ist, keine optischen Eigenschaften der MP benötigt sowie unabhängig von der Form der MP anwendbar ist. Gleichwohl werden mit der verwendeten Kapillaröffnung von 30 μm nur Partikel zwischen 0,611 und 18 μm erfasst.

Tab. 3-1. Vergleich verschiedener Geräte zur Bestimmung der volumetrischen Partikelgrößenverteilung von BSA-beladenen PLGA-MP, die nach dem Standard-Verfahren hergestellt wurden.

| Gerät | optisches Modell | Brechungsindex der Probe | | D[4,3] (μm) | d _{0,1} (μm) | d _{0,5} (μm) | d _{0,9} (μm) | d _{0,95} (μm) |
|--------------------------------|----------------------|--------------------------|------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | | real | imaginär | | | | | |
| | | Beckmann Coulter LS230 | Fraunhofer | | | | | |
| | PLGA ^{a)} | 1,44 | 0,01 | 3,984 | 2,036 | 3,792 | 6,277 | 7,026 |
| | Polystyren Latex | 1,60 | 0,00 | 4,182 | 2,195 | 3,707 | 6,463 | 7,429 |
| Malvern Mastersizer 2000 | Fraunhofer | 0,00 | 0,00 | 3,826 | 1,541 | 3,407 | 6,505 | 7,655 |
| | Polystyren Latex | 1,59 | 0,00 | 4,728 | 2,082 | 4,182 | 8,171 | 9,574 |
| Beckmann Coulter Multisizer™ 4 | - (Impedanz-Messung) | - | - | 3,872 | 1,636 | 3,451 | 6,236 | 8,579 |

^{a)} Modell nach Schalper 2002 (Mie-Theorie)

Das Impedanz-Messverfahren zeigte eine gute Übereinstimmung zu den berechneten Partikelgrößen beider Laserdiffraktometer, wenn diese mit Hilfe der Fraunhofer-Näherung ausgewertet wurden. Streng genommen gilt diese allerdings nur für Teilchen, die mehr als vier bis fünfmal so groß wie die Wellenlänge des verwendeten Lasers sind und einen starken Unterschied zwischen den Brechungsindices von Suspensionsmittel und Probe aufweisen (Keck 2006, S. 47-50). Im Falle des Beckmann Coulter LS230, welches einen 750 nm-Laser verwendet, über 3-3,75 μm , beim Mastersizer 2000, welcher über einen Helium-Neon-Laser

(633 nm) verfügt, über ca. 2,5-3,2 μm . Auch die Auswertung nach der Mie-Theorie mit Hilfe der von Schalper (2002) ermittelten Parameter für das optische Modell zeigte eine gute Näherung zum Impedanz-Messverfahren, wohingegen die optischen Modelle für Polystyren Latex-Partikel die geringsten Übereinstimmungen aufwiesen.

3.1.2 Oberflächenstruktur und Lagerung

Die Ultrastruktur der PLGA-MP wurde nachfolgend mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Dabei sollte herausgefunden werden, welchen Einfluss das in der W_1 -Phase enthaltene Protein BSA auf die Oberflächenstruktur der PLGA-MP hat. Da der Zusatz von BSA die Osmolarität der W_1 -Phase erhöht, ist ein Einstrom von W_2 -Phase und eine Destabilisierung (Porenbildung, Zerreißen) der Partikeloberfläche denkbar. BSA besitzt aber auch oberflächenaktive Eigenschaften, die eine Stabilisierung der PLGA-MP durch Anlagerung an die W_1/O - bzw. O/W_2 -Phasengrenzfläche bewirken könnten.

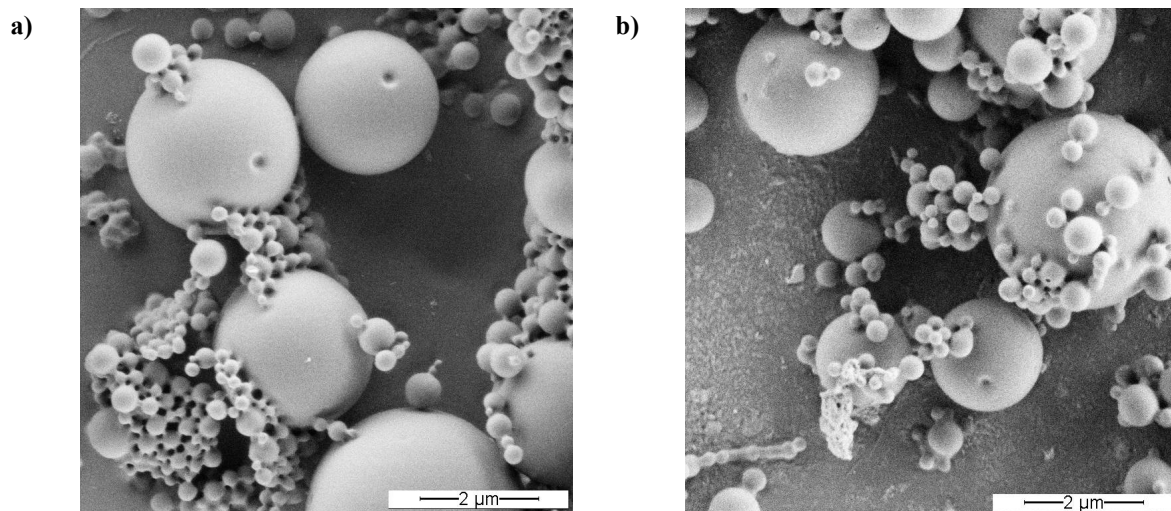


Abb. 3-4. Rasterelektronenmikroskopische Bilder von MP aus dem Polymer Resomer[®] RG 502 H (10000fache Vergrößerung). - **a)** ohne BSA in der W_1 -Phase, **b)** mit BSA in der W_1 -Phase.

Verglichen wurden nach dem Standard-Verfahren hergestellte PLGA-MP mit und ohne BSA in der W_1 -Phase (Abb. 3-4). Dabei konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen BSA-freier (Abb. 3-4a) und BSA-haltiger W_1 -Phase (Abb. 3-4b) ermittelt werden. Beide Formulierungen zeigten MP mit Durchmessern von ca. ein bis fünf Mikrometern, die eine einzelne porenartige Vertiefung aufwiesen. Die Oberfläche der MP war ansonsten glatt. Des Weiteren wurde ein relativ hoher Anteil an NP, d. h. von Partikeln mit einem Durchmesser

von unter einem Mikrometer, beobachtet. Diese zeigten zumeist keine Vertiefungen und waren über nicht näher charakterisierte brückenförmige Strukturen miteinander verbunden.

Die Lagerung der BSA-beladenen PLGA-MP erfolgte in PBS bei 2-8 °C. Die niedrigen Temperaturen verlangsamten den hydrolytischen Abbau der MP, dieser findet aber dennoch statt. Durch die Untersuchung der Oberflächenstruktur nach einem und nach drei Monaten Lagerung, sollten Aussagen über den Zeitpunkt der hydrolytischen Zerstörung der Partikeloberfläche gewonnen werden, um die Lagerungszeit ggf. zu begrenzen (Abb. 3-5).

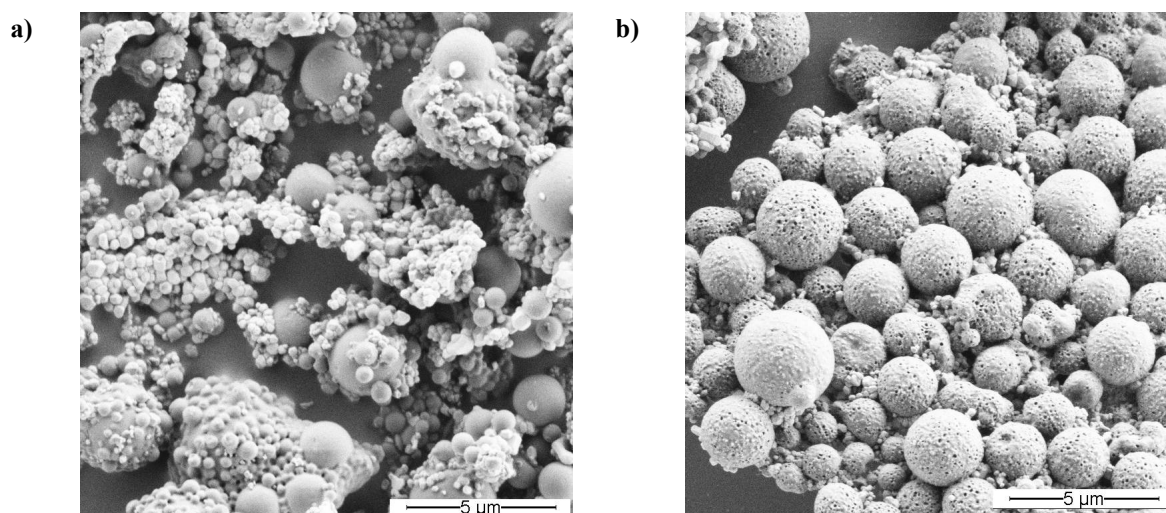


Abb. 3-5. Rasterelektronenmikroskopische Bilder von BSA-beladenen MP aus dem Polymer Resomer[®] RG 502 H (5000fache Vergrößerung) nach Lagerung in PBS bei 2-8 °C. - **a)** 1 Monat, **b)** 3 Monate.

Dabei wiesen die für einen Monat gelagerten MP noch eine weitgehend intakte Struktur auf (Abb. 3-5a). Allerdings verhinderten die im PBS enthaltenen Salze eine genauere Charakterisierung der NP, da diese nur aufgrund ihrer eckigen Struktur von den NP zu unterscheiden waren. Trotz der störenden Salze zeigten vereinzelt erkennbare NP eine glatte Oberfläche und intakte Struktur. Nach einer Lagerung über drei Monate erfolgte eine deutliche Porenbildung und teilweise Verformung der MP (Abb. 3-5b). Die sichtbare Oberfläche wurde zudem rau. Somit war die strukturelle Integrität der MP nicht mehr gegeben. Soweit erkennbar, war auch der Anteil an NP vermindert. Generell sollte eine Lagerung der MP bei 2-8 °C in PBS nur bis zu einem Monat erfolgen, wobei in den hier durchgeführten Versuchen die MP nach der Herstellung zeitnah lyophilisiert wurden, um einem hydrolytischen Abbau vorzubeugen. Im Gegensatz hierzu konnten Dunne *et al.* 2000 keine Veränderung der Form oder eine Koaleszenz von unmodifizierten PLGA-MP nach 175 Tagen Inkubation bei 5 °C in PBS feststellen. Weitgehend unverändert blieb dabei auch

die gewichtsmittlere Molmasse der MP sowie deren Gesamtmasse. Allerdings wurde als Polymer das höhermolekulare Resomer[®] RG 504 verwendet, welches eine gewichtsmittlere Molmasse von ca. 44000 aufweist, während die Molmasse für das hier verwendete Resomer[®] RG 502 H ca. 9000 beträgt. Des Weiteren sind die Endgruppen des Resomers[®] RG 504, im Vergleich zu denen des Resomers[®] RG 502 H, verestert und die PLGA-MP waren nicht mit einem Wirkstoff beladen. Aufgrund dieser Unterschiede sind die von Dunne *et al.* verwendeten PLGA-MP deutlich hydrophober und für einen hydrolytischen Abbau weniger anfällig als die hier untersuchten MP.

3.1.3 Verkapselungseffizienz und Freisetzung

Die Verkapselungseffizienz des Modell-Antigens BSA und dessen Freisetzung aus den PLGA-MP bestimmen, wie viel Protein in welcher Zeit von den APC aufgenommen wird. Deshalb wurden die Verkapselungseffizienz und das Freisetzungsprofil der nach dem Standard-Verfahren hergestellten BSA-beladenen PLGA-MP ermittelt. Ebenfalls sollte der Einfluss einer Änderung der Polymerkonzentration in der O-Phase und des Volumens der BSA-haltigen W₁-Phase auf die Verkapselungseffizienz untersucht werden. Ziel war es die größtmögliche Verkapselungseffizienz bei geringem Materialeinsatz zu erreichen.

Dafür wurden die lyophilisierten MP zur Abtrennung des Polymers vom Protein BSA einer Acetonfällung unterzogen und der Proteingehalt der gereinigten Proben mit einem BCA-Assay bestimmt. MP, die mit dem Standard-Verfahren hergestellt wurden, erzielten eine Verkapselungseffizienz von $91,69 \pm 13,66$ % (MW \pm SD, n = 16). Die Wiederfindung des Verfahrens betrug $94,11 \pm 24$ % (MW \pm SD, n = 11). Durch eine Verringerung der Konzentration des Polymers Resomer[®] RG 502 H in DCM von 10 % auf 5 % (m/m) änderte sich die Verkapselungseffizienz nicht wesentlich auf $88,04 \pm 13,49$ % (MW \pm SD, n = 3). Innerhalb dieser Grenzen beeinflusste die Polymerkonzentration die Verkapselungseffizienz nur in geringem Maße. Damit weichen die hier gefundenen Ergebnisse teilweise von der generellen Aussage verschiedener Arbeitsgruppen ab, die bei einer Reduktion der Polymerkonzentration eine deutlich geringere Verkapselungseffizienz fanden (Mehta *et al.* 1996, Rafati *et al.* 1997). Die Autoren machten die geringere Viskosität der O-Phase und damit verbunden eine schnellere Diffusion der W₁-Tröpfchen durch die O-Phase in die W₂-Phase sowie eine langsamere Aushärtung der MP für die verminderte Verkapselungseffizienz verantwortlich. Yan *et al.* 1994 zeigten aber, dass ab einer

Grenzkonzentration von ca. 15 % (m/V) PLGA in DCM die Verkapselungseffizienz durch eine höhere Polymerkonzentration nicht mehr wesentlich beeinflusst wird. Zudem führten die höheren Polymerkonzentrationen zu größeren MP, was durch eigene Versuche bestätigt wurde (siehe 3.1.1).

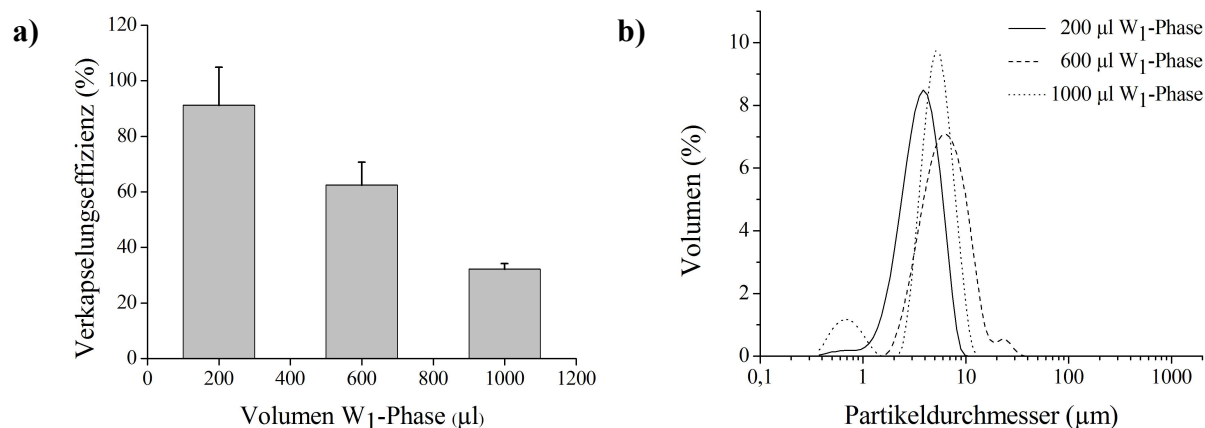


Abb. 3-6. Einfluss des Volumens der W₁-Phase (10 mg/ml BSA) bei der Herstellung von PLGA-MP auf folgende Parameter. - **a)** Verkapselungseffizienz; **b)** Volumen-Partikelgrößenverteilung.

Wie in der Abb. 3-6a dargestellt, führte dagegen eine Erhöhung des Volumens der W₁-Phase zu einer Reduktion der Verkapselungseffizienz. Wurde die W₁-Phase verdreifacht und damit das Verhältnis von W₁- zu O-Phase von 1:20 auf ca. 1:7 verändert, führte dies zu einem Absinken der Verkapselungseffizienz auf $62,44 \pm 8,21$ % (MW \pm SD, n = 3). Noch deutlicher verringerte sich diese, wenn die W₁-Phase verfünffacht wurde und damit ein Verhältnis zwischen W₁- und O-Phase von 1:4 resultierte. Die Verkapselungseffizienz betrug dann mit $32,09 \pm 2,1$ % (MW \pm SD, n = 3) ca. ein Drittel der durch das Standard-Verfahren erreichten.

Die Erhöhung des Volumens der W₁-Phase beeinflusste auch die beobachtbare Partikelgröße (Abb. 3-6b). Bei einer Verdreifachung des Volumens von 200 auf 600 µl stieg der D[4,3] von $3,98 \pm 1,64$ µm auf $7,47 \pm 4,30$ µm (MW \pm SD, n = 3). Allerdings betrug der D[4,3] bei einer weiteren Erhöhung der inneren wässrigen Phase auf 1000 µl $5,31 \pm 2,35$ µm (MW \pm SD, n = 3) und lag somit zwischen den anderen beiden Werten. Zusätzlich konnte eine Zunahme des nanopartikulären Anteils beobachtet werden, der sich mit 8,36 % deutlich über 1,55 % bei 200 µl W₁-Phase befand. Bei Verwendung von 600 µl W₁-Phase konnten keine NP gemessen werden.

Jeffery *et al.* zeigten 1993 ebenfalls eine Erhöhung der Partikelgröße bei zunehmender W_1 -Phase. Allerdings stellten sie gleichzeitig eine Zunahme der Verkapselungseffizienz von Ovalbumin (OVA) fest, was konträr zu den hier gefundenen Ergebnissen ist. Im Vergleich zu den hier durchgeführten Versuchen setzten sie eine 40fach höhere Konzentration des Stabilisators PVA in W_2 -Phase ein und das Volumen der W_2 -Phase war 7,5mal geringer. Die Verhältnisse von W_1 - zu O-Phase betragen ca. 1:10; 1:5; 1:3,3 und 1:2,5. Die Verkapselungseffizienzen stiegen bei gleichbleibender Menge an OVA (60 mg) von 24,6 auf 52,2 % an. Crotts und Park (1995) erklärten den Sachverhalt durch eine schnellere Entfernung des organischen Lösungsmittels aus den MP mit kleinerem W_1/O -Verhältnis, was zu einer höheren Viskosität der O-Phase und der schnelleren Bildung einer stabilen Hülle führt. Durch die stabile Hülle kann keine weitere Diffusion der proteinhaltigen W_1 -Tröpfchen erfolgen. Jedoch zeigten Crotts und Park, dass ein höheres Volumen der W_1 -Phase zu MP mit porösen Hüllen führt. Eine längere Aggitation der MP in der W_2 -Phase führte damit zu einer deutlich höheren Freisetzung von BSA, was sich mit den hier gefundenen Ergebnissen deckt.

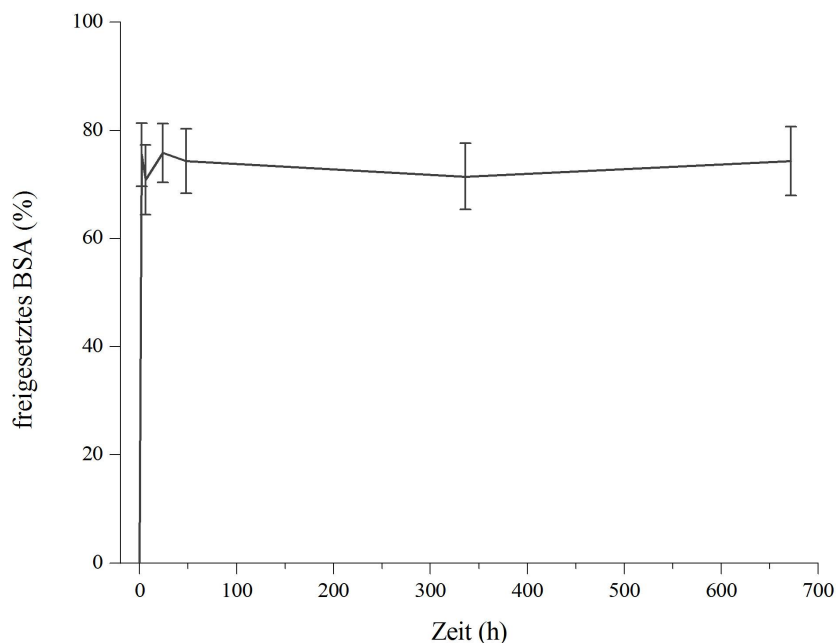


Abb. 3-7. Freisetzungsprofil von BSA-beladenen PLGA-MP, die nach dem Standard-Verfahren hergestellt wurden. MW \pm SD. n = 4.

Für die Bestimmung des Freisetzungsprofils der nach dem Standard-Verfahren hergestellten MP wurden diese bei 37 °C in PBS ständig bewegt. Die Probennahme erfolgte nach 2, 6, 24 und 48 h sowie nach 14 und 28 d. Der Proteingehalt der Proben wurde nach TCA-Fällung mit der BCA-Methode bestimmt. Die MP zeigten, wie in Abb. 3-7 dargestellt, einen deutlichen *burst release* und setzten bereits nach zwei Stunden $75,48 \pm 5,84$ %

(MW \pm SD, n = 4) BSA frei. Im weiteren Verlauf wurde keine nennenswerte Freisetzung von BSA beobachtet. Eine Freisetzung des restlichen BSA nach 28 d wurde nicht bestimmt, da die Lebenszeit der huMoDC unterhalb dieses Zeitraums liegt (Waeckerle-Men und Groettrup 2005) und damit eine spätere Freisetzung von BSA nicht mehr relevant ist.

Die Freisetzung von Stoffen aus PLGA-MP kann generell durch vier Freisetzungsmechanismen erfolgen: Diffusion durch wassergefüllte Poren (I), Diffusion durch das Polymer (II), Freisetzung durch eine osmotische Pumpe (III) sowie Freisetzung durch die Erosion des Polymers (IV) (Fredenberg *et al.* 2011). Dabei spielen II und III bei makromolekularen Proteinen, wie BSA, und bei kurzen Freisetzungswegen unter 60 μ m in PLGA-MP eine untergeordnete Rolle (Fredenberg *et al.* 2011). Bei Protein-beladenen PLGA-MP wird, wie auch hier beobachtet wurde, häufig ein Großteil der Proteine in kurzer Zeit freigesetzt (*burst release*). Im Anschluss an diese erste Freisetzungsphase wird das Protein über längere Zeit meist sehr langsam oder gar nicht freigesetzt (Phase II) und schließlich erfolgt die Freisetzung des restlichen Proteins (Phase III). Die anfängliche schnelle Freisetzung kann durch nicht-verkapselte Proteine auf der MP-Oberfläche oder Proteine, die sich nahe der Oberfläche befinden und nach der Hydratation des Polymers schnell aus den PLGA-MP diffundieren, erfolgen (Wang *et al.* 2002). Zudem findet die Freisetzung schneller statt je kleiner die PLGA-MP sind, weshalb der *burst release* teilweise auch auf die Freisetzung der Proteine aus NP, die durch das Herstellungsverfahren ebenfalls entstehen und bei volumengewichteten Teilchengrößenverteilungen unterrepräsentiert sind (siehe 3.1.1 und 3.1.2), zurückzuführen ist (Berkland *et al.* 2003). Der ausgeprägte *burst release* verhindert eine verlängerte BSA-Freisetzung und kann sich somit nachteilig auf eine fortwährende Präsentation der Antigene auf den DC auswirken (Waeckerle-Men *et al.* 2006). Inwiefern eine Aufnahme von noch BSA-enthaltenden PLGA-MP durch die schnelle Freisetzung verhindert wird, soll später in dieser Arbeit durch Phagozytose-Studien mit FITC-BSA-beladenen PLGA-MP und deren Auswertung mittels FACS und CLSM geklärt werden. Ein Vorteil der hier beobachteten anfänglichen Freisetzung des Modell-Antigens BSA aus PLGA-MP für den Einsatz als Antigen-Trägersystem ist die höhere Proteinstabilität bei schnellerer Freisetzung. Nach erfolgter Wasseraufnahme in die PLGA-MP wird der *burst release* meist durch den Verschluss von Oberflächenporen (*pore closing*), durch die die Proteine aus den PLGA-MP diffundieren können, beendet (Wang *et al.* 2002). Die noch in den PLGA-MP enthaltenen Proteine sind in dieser wasserhaltigen Umgebung anfällig für Agglomeration und Aggregation

untereinander und für ionische Wechselwirkungen mit den unveresterten Carboxylgruppen des PLGA. Die fortschreitende Erosion des Polymers kann ein saures Mikroklima verursachen, welches nicht-kovalente Aggregation, Denaturation und kovalente Aggregation, beispielsweise durch Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen (Crotts und Park 1998), fördert (Giteau *et al.* 2008). Aufgrund dieser Vorgänge wird häufig keine vollständige Freisetzung von Proteinen, trotz voranschreitender Auflösung der PLGA-MP (Phase III), beobachtet, was ein Grund für die bei den hier durchgeführten Versuchen nicht erfolgte finale Proteinfreisetzung sein kann.

3.1.4 Proteinverteilung

Um die Ursache des *burst release* zu klären, sollte die Proteinverteilung von FITC-BSA-beladenen PLGA-MP mittels Fluoreszenzmikroskopie und CLSM bestimmt werden. Diese Verfahren ermöglichen es die fluoreszierenden Proteine auf oder in den PLGA-MP zu lokalisieren. In Abb. 3-8 dargestellt sind PLGA-MP nach dem dritten Waschen bei RT. Mit Hilfe des Phasenkontrastes wurde eine Beobachtungsebene für die PLGA-MP ausgewählt, welche in diesem Bild weiß leuchtend dargestellt sind (Abb. 3-8a). Durch Abschalten der Weißlichtquelle wurden dann die fluoreszierenden Proteine und deren Verteilung in den PLGA-MP sichtbar (Abb. 3-8b). Man erkennt eine heterogene Verteilung der Proteine in den MP. Teilweise sind runde Bereiche mit höherer Fluoreszenzintensität sichtbar, die auf verkapselte W_1 -Tröpfchen zurückzuführen sind. Die diffuse Gesamtfluoreszenz der PLGA-MP lässt eine Oberflächenlokalisierung von FITC-BSA vermuten, die ursächlich für den hohen *burst release* mitverantwortlich sein könnte. Eine schnelle Porenbildung und Freisetzung aus verkapselten, oberflächennahen Proteindepots lässt sich aber nicht völlig ausschließen. In den elektronenmikroskopischen Bildern wurde häufig eine einzelne Pore in der ansonsten glatten Oberfläche der PLGA-MP beobachtet. Befinden sich die Proteindepots darunter, könnten diese unter den Freisetzungsbedingungen (höhere Temperatur von 37 °C, PBS, durchgehende Aggitation) mit zum *burst release* beitragen. Des Weiteren sind ebenfalls PLGA-NP sichtbar, die FITC-BSA deutlich schneller freisetzen können als PLGA-MP.

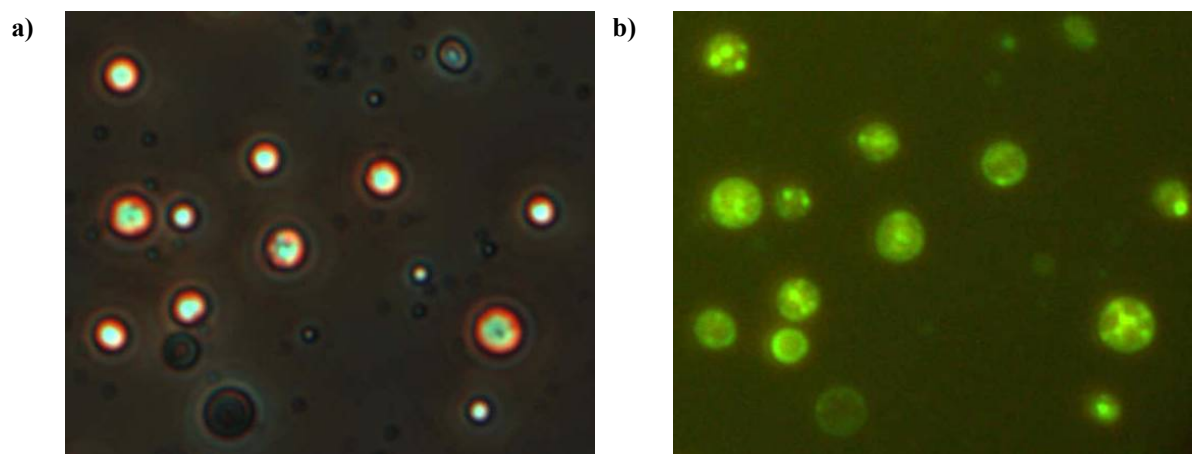


Abb. 3-8. Phasenkontrast- (a) und fluoreszenzmikroskopische (b) Bilder von FITC-BSA-beladenen PLGA-MP nach dem dritten Waschen.

Die zweidimensionale Darstellung der 3D-Struktur von FITC-BSA-beladenen PLGA-MP in fluoreszenzmikroskopischen Bildern führt zu Überlappung mehrerer Ebenen von fluoreszierenden Proteinen, was eine genaue Bestimmung der Lokalisation der Proteine verhindert. So könnte die diffuse Fluoreszenz der PLGA-MP von verkapselten, feinverteilten Proteinen oder oberflächenlokalisierten Proteinen herrühren. Eine genauere Bestimmung ist mit Hilfe der CLSM möglich, die einzelne 2D-Ebenen darstellen kann.

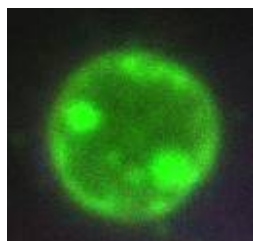


Abb. 3-9. Overlay CLSM eines PLGA-MP.

In Abb. 3-9 dargestellt ist das Overlay aus mehreren Ebenen übereinander. Dieses bestätigt die heterogene Verteilung der Proteine in den PLGA-MP. Sowohl verkapselte runde Bereiche mit Proteinen als auch oberflächenlokalisiertes FITC-BSA, sichtbar durch die höhere Fluoreszenzintensität am Rand des PLGA-MP, konnten beobachtet werden, was die vorher getroffenen Aussagen zur Proteinverteilung verifiziert.

3.1.5 Glasübergangstemperatur

Die Glasübergangstemperatur T_g kennzeichnet den Übergang eines amorphen bzw. teilmamorphen Polymers bei Erwärmen vom glasartigen, spröden in den weichen gummielastischen Zustand. Bei einem Überschreiten der T_g kann sowohl die Stabilität als

auch die Wirkstoff-Freisetzung deutlich beeinflusst werden. Deshalb wurde hier die T_g von reinem Polymer Resomer[®] RG502 H, PLGA-MP ohne BSA und PLGA-MP mit BSA mit Hilfe der DSC bestimmt (Tab. 3-2).

Tab. 3-2. Glasübergangstemperaturen (T_g) ermittelt durch DSC-Messungen.

| Probe | T_g (°C) |
|-------------------------------|------------|
| Resomer [®] RG 502 H | 37,3 |
| unbeladene PLGA-MP | 37,1 |
| BSA-beladene PLGA-MP | 37,5 |

Dabei konnte keine wesentliche Abweichung der T_g zwischen den Proben festgestellt werden. Die T_g lagen für alle Proben zwischen 37,0 und 37,5 °C und befanden sich damit unterhalb von 40 °C, was der von Mehta *et al.* 1996 bestimmten T_g für Resomer[®] RG502 H entspricht. Die Differenz von ca. 3 K ist wahrscheinlich auf eine Adsorption von Wasser aus der Luft zurückzuführen, da dieses als Weichmacher dient und die T_g erniedrigt (Blasi *et al.* 2005). Zudem ist die ermittelte T_g in geringem Maße abhängig von den verwendeten Messverfahren bzw. -parametern, beispielsweise der Heizrate bei der DSC, so dass entsprechende Unterschiede auch daher resultieren können. Eine Veränderung des Ausgangspolymers durch die Einflüsse während der Herstellung der PLGA-MP, welche v. a. Lösung und Präzipitation des Polymers, Ultraschall-Einwirkung während der W/O-Emulsionsbildung und mechanischen Energieeintrag durch den Ultra Turrax[®] bei der Dispersion zur W/O/W-Emulsion umfassen, wurde nicht beobachtet. Bei ineffizienter Lyophilisation der PLGA-MP wäre aufgrund des verbliebenen Restlösungsmittels die T_g vermindert. Auch eine von Park 1994 beobachtete Degradation von PLGA zu Oligomeren durch Ultraschallwellen, würde bei höherer Oligomer-Konzentration zu einer Absenkung der T_g führen (Schliecker *et al.* 2003).

Die Verkapselung des Proteins BSA führte gegenüber unbeladenen PLGA-MP sowie reinem Polymer zu keiner Erniedrigung der T_g . Conway und Alper beschrieben hingegen 1996 eine Reduktion der T_g um 3 °C bei einer Verkapselung von 5 % BSA in PLGA-MP. Allerdings sind die hier verwendeten MP theoretisch mit 0,5 % (m/m) BSA beladen und die hier gemessene Proteinverkapselung der Probe betrug nur 0,41 %. Somit ist eine deutliche Erniedrigung der T_g erst bei höheren Beladungen zu erwarten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die hier verwendete Herstellungsmethode für PLGA-MP und die Verkapselung des Modell-Proteins BSA keinen nachteiligen Einfluss auf

die T_g ausübten. Allerdings sind Temperaturen um 37 °C, wie sie auch bei Experimenten in der Zellkultur oder *in vivo* auftreten, kritisch für die Stabilität und das Freisetzungverhalten der PLGA-MP, da sie der gemessenen T_g entsprechen und somit die Mobilität des Polymers in diesem Temperaturbereich erhöht ist. Daher kann die niedrige T_g für den beobachteten hohen *burst release* mitverantwortlich sein.

3.1.6 Restlösungsmittel-Gehalt

Aufgrund des verwendeten W/O/W-Lösungsmittel-Evaporations-Verfahrens zur Herstellung von Protein-beladenen PLGA-MP besteht die Gefahr eines Restgehalts des toxischen Lösungsmittels DCM in den MP. Neben der Toxizität kann vorhandenes Restlösungsmittel auch die Eigenschaften des Polymers verändern und so das Freisetzungverhalten beeinflussen. Des Weiteren ist eine Beeinträchtigung der Stabilität des verkapselten Modell-Antigens BSA denkbar. Deshalb sollte der Gehalt an Restlösungsmittel in den hergestellten PLGA-MP limitiert werden.

DCM gehört nach der Leitlinie CPMP/ICH/283/95 der EMA (European Medicines Agency) für Restlösungsmittel, welche die Grundlage für die Bestimmung der Lösungsmittel-Rückstände nach Ph. Eur. ist, zu den Lösungsmitteln der Klasse 2, deren Gehalt in pharmazeutischen Produkten begrenzt werden soll. Die Grenzkonzentration für DCM liegt bei 600 ppm und die zulässige tägliche Aufnahme (*permissible daily exposure*) bei 6,0 mg/Tag.

Die Bestimmung des DCM-Gehalts in den MP erfolgte mittels Gaschromatografie und gekoppelter Detektion durch ein Massenspektrometer (GC/MS). Zur Extraktion des DCM wurden die Proben einer Headspace-SPME unterzogen. Dabei wurde die Probe durchmischt und erhitzt, wobei das DCM in die Gasphase überging. Aus dieser adsorbierte es an eine beschichtete Quarzglasfaser. Nach erfolgter Adsorption wurde die Quarzglasfaser in den GC-Injektor eingebracht und das DCM dort bei hoher Temperatur (250 - 300 °C) von dieser desorbiert und auf die Kapillartrennsäule aufgegeben.

Die Detektion erfolgte durch das Massenspektrometer aufgrund der höheren Empfindlichkeit im SIM-Modus, wobei anstelle aller Ionenströme nur Ionen mit den m/z 84 und 49 detektiert wurden. Ein m/z von 84 entspricht dabei einem durch Ionisation einfach positiv geladenen DCM-Molekül, m/z 49 einem ionisierten Fragment von DCM nach dem Verlust eines Chloratoms ($M_r = 35$).

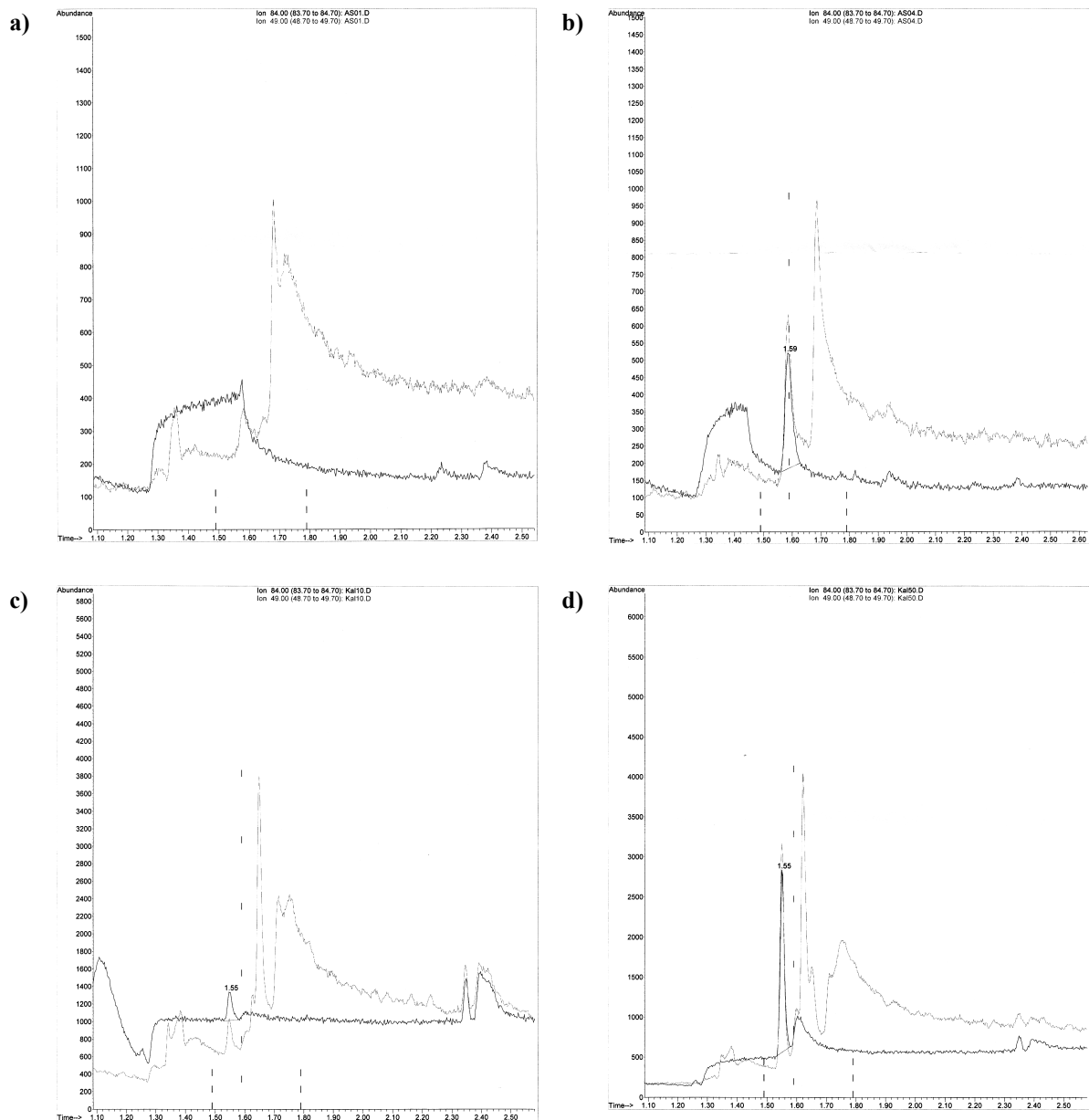


Abb. 3-10. Ausgewählte GC/MS-SIM-Chromatogramme der Bestimmung des DCM-Gehalts. Grau dargestellt sind die Häufigkeiten für Ionen mit m/z 49, schwarz dargestellt die Häufigkeiten für Ionen mit m/z 84. - **a)** PLGA: Resomer[®] RG 502 H (24,50 mg); **b)** BSA-beladene PLGA-MP (16,77 mg); **c)** 10 ng DCM; **d)** 50 ng DCM.

Für die erhaltenen Chromatogramme (Abb. 3-10) wurden die AUC für das m/z 84 berechnet, da weniger störende Peaks in unmittelbarer Nähe des DCM-Peaks detektiert wurden. Die Retentionszeit für DCM lag bei den verwendeten DCM-Standards und den untersuchten MP-Proben zwischen 1,54 und 1,59 min. Dabei zeigte reines Polymer Resomer[®] RG 502 H keinen auswertbaren Peak (Abb. 3-10a) und somit kein detektierbares DCM (Tab. 3-3).

Tab. 3-3. Restgehalt an DCM von BSA-beladenen PLGA-MP. Die Bestimmung erfolgte aus den erhaltenen SIM-Chromatogrammen (m/z 84) nach Extraktion des DCM aus den Proben durch Headspace-SPME und Analyse mittels GC/MS.

| Probe | Einwaage (mg) | AUC _{korr} ^{a)} | errechneter DCM-Gehalt (ppm) |
|-------------------------------|---------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Resomer [®] RG 502 H | 24,50 | n. d. | n. b. |
| PLGA-MP (1) | 31,49 | 15077 | 1,06 |
| PLGA-MP (2) | 13,67 | 2651 | 0,96 |
| PLGA-MP (3) | 16,77 | 4683 | 0,98 |

^{a)} Fläche unter der Kurve (AUC) der Probe abzüglich der AUC des Leerwerts (Wasser).
Abkürzungen: n. b.: nicht bestimmbar, n. d.: nicht detektiert

Der Gehalt an DCM wurde mit Hilfe einer Kalibrierfunktion (Abb. 3-11) errechnet. Dafür wurden die um den Leerwert (Wasser) korrigierten Flächen unter den Kurven für DCM gegen die in der jeweiligen wässrigen Standard-Lösung enthaltene absolute Masse an DCM aufgetragen.

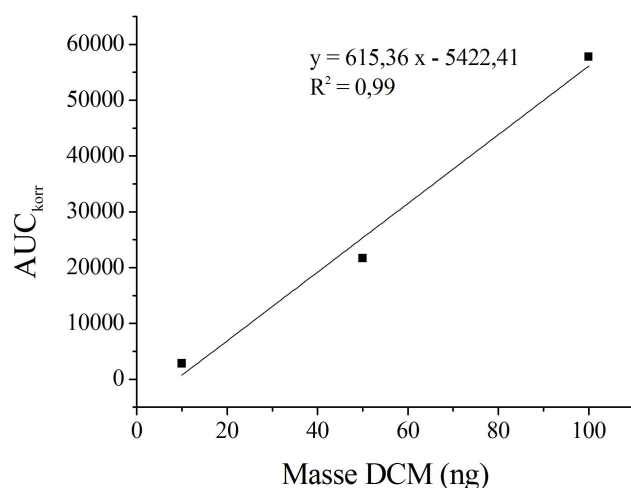


Abb. 3-11. Kalibrierfunktion zur Bestimmung des DCM-Gehalts. Dargestellt sind die um den Leerwert (Wasser) korrigierten Flächen unter den Kurven (AUC_{korr}) gegen die absolute Masse an DCM. Berechnungsgrundlage waren erhaltene SIM-Chromatogramme (m/z 84) nach DCM-Extraktion mittels Headspace-SPME und Analyse durch GC/MS.

Der errechnete Restlösungsmittelgehalt für drei lyophilisierte MP-Proben lag unter 1,1 ppm (Tab. 3-3) und somit ca. 550mal niedriger als die nach Ph. Eur. geforderte Grenzkonzentration von 600 ppm. Die nach dem Standard-Verfahren hergestellten BSA-beladenen PLGA-MP sind also hinsichtlich des Gehalts an Restlösungsmittel für eine weitere pharmazeutische Anwendung geeignet. Maßgeblich für den niedrigen DCM-Gehalt ist u. a. die Herstellung nach dem W/O/W-Verfahren, wobei ein Verhältnis der O-Phase zur W₂-Phase von ca. 1:40 verwendet wurde. Durch den deutlichen Überschuss der W₂-Phase wird die Extraktion des DCM aus der O-Phase begünstigt. Einen weiteren entscheidenden Einfluss hat die Trocknung der MP, wobei die hier verwendete Lyophilisation für 24 h ein adäquates Verfahren darstellt, um den Restgehalt an DCM zu begrenzen. Zudem sind die hergestellten

PLGA-MP mit Teilchengrößen von unter zehn Mikrometern relativ klein, was aufgrund der höheren Oberfläche im Vergleich mit größeren MP sowohl die Extraktion als auch die Verdunstung des DCM aus den MP fördert (Spenlehauer *et al.* 1986).

3.1.7 Endotoxin-Gehalt

Die nach dem Standard-Verfahren hergestellten PLGA-MP wurden in weiteren Versuchen mit TLR-Agonisten modifiziert, die eine Reifung von iDC bewirken sollten. Um die Auswirkungen der TLR-Agonist-modifizierten PLGA-MP auf iDC zu untersuchen, durften die für die Modifizierung verwendeten Ausgangs-MP selbst keinen Einfluss auf die Reifung von iDC haben. Eine Verunreinigung mit Endotoxinen kann zu einer Reifung von iDC führen und sollte deshalb vermieden werden. Zudem war ein niedriger Endotoxin-Gehalt der PLGA-MP eine Kontrollmöglichkeit für die erfolgreiche aseptische Herstellungstechnik.

In den hier durchgeführten Versuchen wurde für PLGA-MP ein Endotoxin-Gehalt von unter 0,015 EU/mg ermittelt, der unter den von Wischke *et al.* 2006 (< 0,06 EU/mg) und Jilek *et al.* 2004 (< 5 EU/mg) beobachteten Werten lag. Der von Wischke *et al.* 2006 beobachtete Endotoxin-Gehalt führte nicht zur Reifung von iDC. Obwohl die genaue Endotoxin-Konzentration aufgrund des Grenzwert-Verfahrens nicht zu ermitteln war, sind die hier getesteten PLGA-MP hinsichtlich der Endotoxinbelastung ein geeignetes Ausgangsmaterial für die Oberflächenmodifizierung mit reifungsinduzierenden TLR-Agonisten.

Für die Bestimmung des Endotoxin-Gehalts mit Hilfe der Festgel-Methode wurden die PLGA-MP in endotoxinfreiem Wasser suspendiert und mit LAL gemischt. Nachfolgend wurde das Gemisch bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Daher konnten durch das Verfahren nur Endotoxine bestimmt werden, die unter diesen Bedingungen schnell aus den PLGA-MP freigesetzt wurden, was v. a. oberflächenassoziierte Endotoxine betrifft. Verkapselte Endotoxine konnten mit diesem Verfahren nicht erfasst werden. Die Bestimmung von verkapseltem Endotoxin ist diffizil, da bei der Zerstörung der PLGA-MP, z. B. durch Behandlung mit Lauge, auch die Endotoxine zerstört werden (Wischke 2006, S. 134). Allerdings zeigten die hier untersuchten PLGA-MP einen *burst release* des in der W_1 -Phase enthaltenen BSA, der zum Teil auf oberflächenlokalisiertes Protein zurückzuführen ist. Deshalb sollten sich in der W_1 -Phase enthaltene Endotoxine zu einem gewissen Grad auch auf den PLGA-MP befinden und durch den vorliegenden Test erfasst werden.

3.2 TLR2-Agonist-modifizierte PLGA-Mikropartikel

3.2.1 Oberflächenmodifizierung

In den nachfolgend dargestellten Versuchen wurde die Bindung zweier LP an die Oberfläche von BSA-beladenen PLGA-MP untersucht. Verwendet wurden das diacylierte LP FSL1, ein TLR2/6-Agonist, und das triacylierte LP BAS, ein TLR2/1-Agonist. Die Modifizierung der MP-Oberfläche ermöglicht die direkte Interaktion der TLR-Agonisten mit den entsprechenden Rezeptoren auf bzw. nach erfolgter Aufnahme in den APC.

Zudem wurde in orientierenden Versuchen die Verkapselung des Modell-Lipoproteins FSL2 untersucht. Eingesetzt wurden 50 µl einer 0,01%igen (m/V) FSL2-Lösung als W₁-Phase. Die Verkapselung führte zur Herstellung von zerstörten und deformierten MP, was wahrscheinlich auf die oberflächenaktiven Eigenschaften des LP zurückzuführen ist, wodurch die W/O/W-Emulsion destabilisiert wurde. Das zu verkapselnde LP wurde vollständig in der W₂-Phase und den Waschüberständen wiedergefunden (HPLC-Bestimmung des LP-Gehalts).

Ebenfalls untersucht wurde die Zugabe von 10 µl einer 0,1%igen (m/V) FSL1-Lösung in DMSO zur polymerhaltigen O-Phase. Die entstehenden MP waren gleichermaßen deformiert bzw. zerstört und das eingesetzte FSL1 wurde in der W₂-Phase und den Waschüberständen wiedergefunden. Somit waren der Zusatz der LP zur W₁- und zur O-Phase ungeeignet für die Bildung von LP-modifizierten PLGA-MP. Die Verankerung der LP in der PLGA-MP-Oberfläche durch Zusatz der LP zur W₂-Phase bei der MP-Herstellung wurde aufgrund des vergleichsweise großen Volumens der W₂-Phase und dem damit verbundenen erhöhten Einsatz an teurem LP aus monetären Gründen verworfen. Für die Herstellung von LP-modifizierten PLGA-MP schien deshalb die nachträgliche Assoziation der LP an die MP-Oberfläche zweckmäßig zu sein.

Die Assoziation an die Oberfläche der MP sollte einerseits kovalent erfolgen, andererseits wurde auch die Adsorption untersucht. Für eine kovalente Kopplung wurden, wie in Abb. 3-12 dargestellt, die freien Carboxylgruppen des PLGA Resomer® RG 502 H durch Einstellen eines leicht sauren pH-Werts in ihrer Dissoziation zurückgedrängt. Dadurch erfolgte eine leichtere Reaktion der Carboxylgruppen mit dem wasserlöslichen Carbodiimid EDAC zum instabilen O-Acylisoharnstoffester (Abb. 3-13, Hoare und Koshland 1966, Williams und Ibrahim 1981)

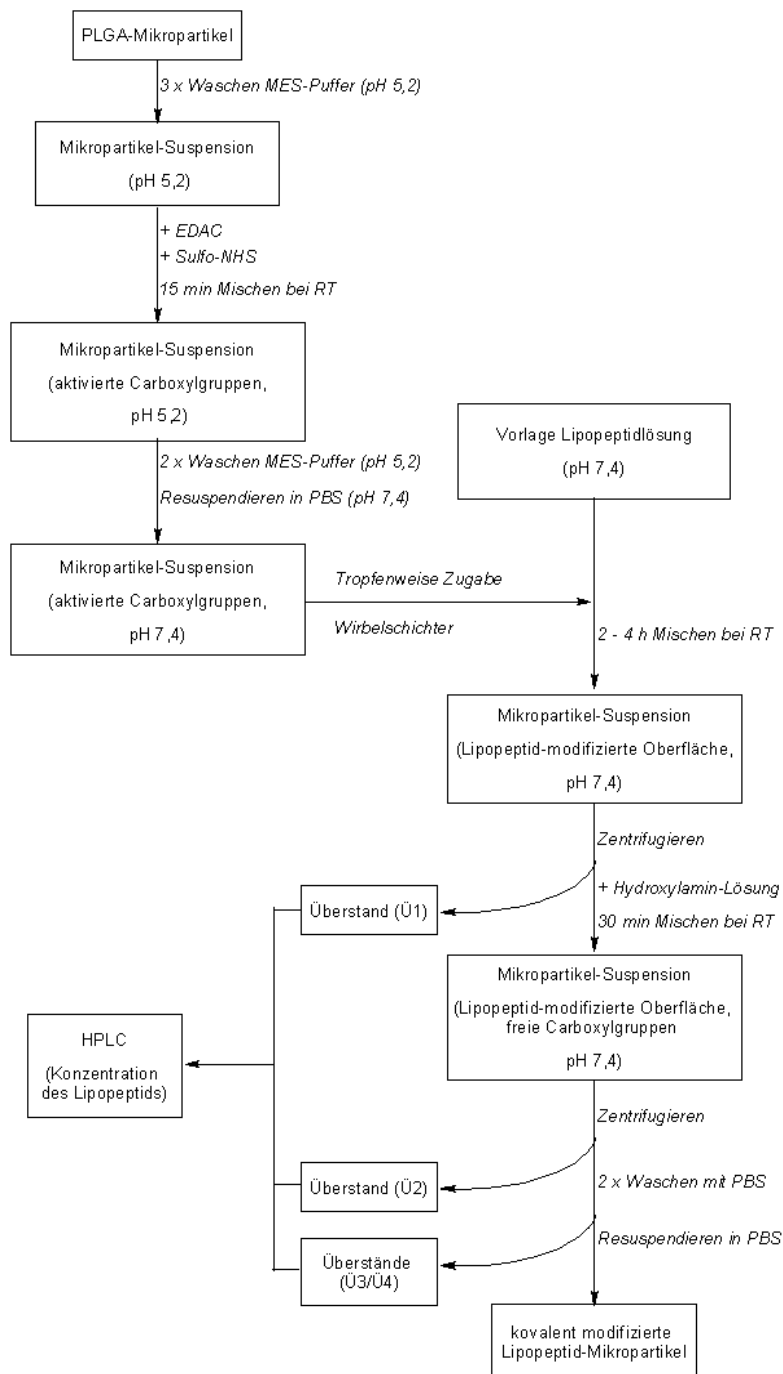


Abb. 3-12. Schematischer Arbeitsablauf der kovalenten Oberflächen-Modifizierung von PLGA-MP mit LP (TLR2-Liganden).

Die so aktivierten Carboxylgruppen hydrolysieren sehr schnell (Gilles *et al.* 1990), so dass als weiteres Kopplungsreagenz das wasserlösliche Succinimid Sulfo-NHS hinzugefügt wurde, welches an die Stelle des O-Acylisoharnstoffs trat und einen weniger hydrolyselabilen Sulfo-NHS-Ester bildete (Abb. 3-13, Staros *et al.* 1986). Die überschüssigen Kopplungsreagenzien wurden durch Zentrifugieren und Waschen entfernt, um eine Quervernetzung bzw.

Polymerisation der später hinzugefügten LP untereinander zu vermeiden. Die PLGA-MP-Suspension wurde bei annähernd neutralem pH-Wert zu einer LP-Lösung hinzugefügt, wobei die Sulfo-NHS-Ester auf der MP-Oberfläche mit den Amin-Funktionen des Peptidanteils des LP (beispielsweise in Lysin-Resten) reagierten. Der neutrale pH-Wert begünstigt die Reaktion, da im Vergleich zum leicht sauren pH-Wert mehr Amin-Funktionen deprotoniert vorliegen, welche die reagierende Form darstellen. Die Reaktion führt zu stabilen Amidbindungen zwischen LP und PLGA-MP. Aktivierte Carboxylgruppen, die nicht mit LP reagierten, wurden im Anschluss durch Inkubation mit Hydroxylamin wieder in ihre Ursprungsform überführt.

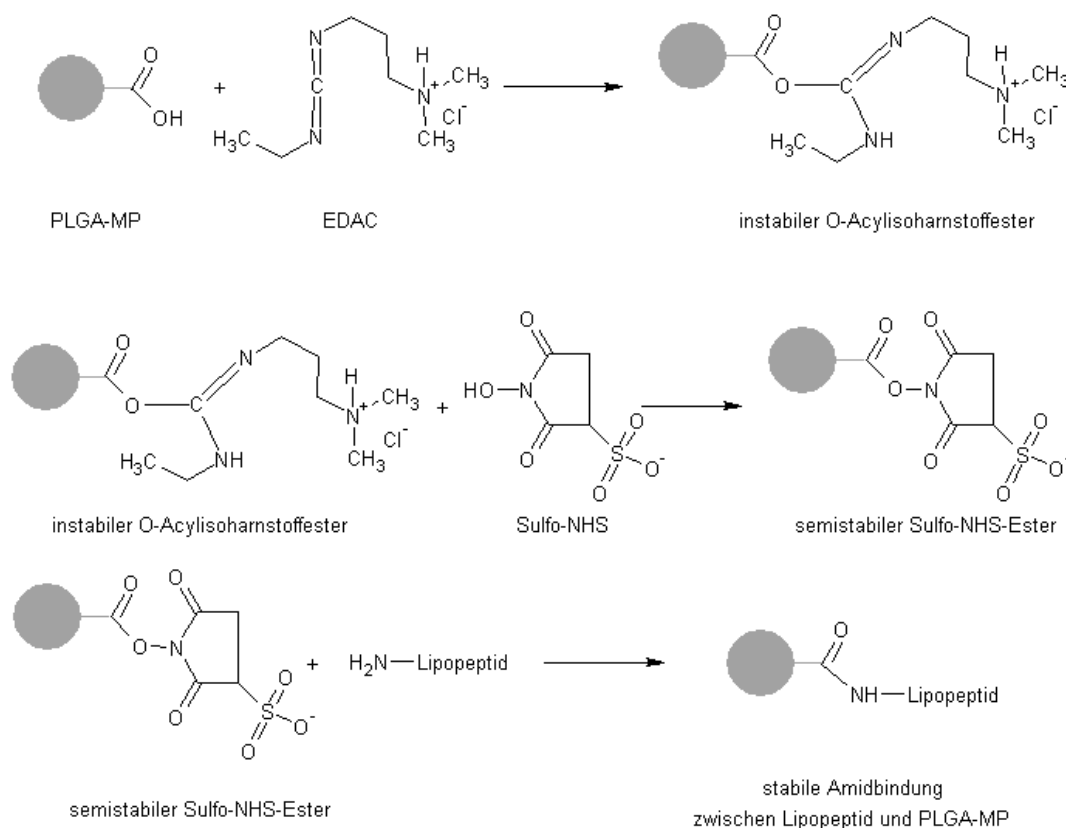


Abb. 3-13. Postulierter Reaktionsverlauf der kovalenten Kopplung von LP mit PLGA-MP mittels einer modifizierten Carbodiimidmethode. (Abgespaltene Reaktionspartner wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen.)

Für die adsorptive Oberflächenmodifizierung wurden lediglich die Kopplungsreagenzien EDAC und Sulfo-NHS weggelassen, ansonsten erfolgte die Beschichtung analog zu dem in Abb. 3-12 dargestellten Arbeitsablauf. Zur Herstellung von Kontroll-MP (Negativ-Kontrolle) wurden diese wie die MP bei der kovalenten Kopplung behandelt, die LP-Lösung wurde aber durch Puffer ersetzt. Eine MP-freie Lösung mit LP wurde als Positiv-Kontrolle eingesetzt.

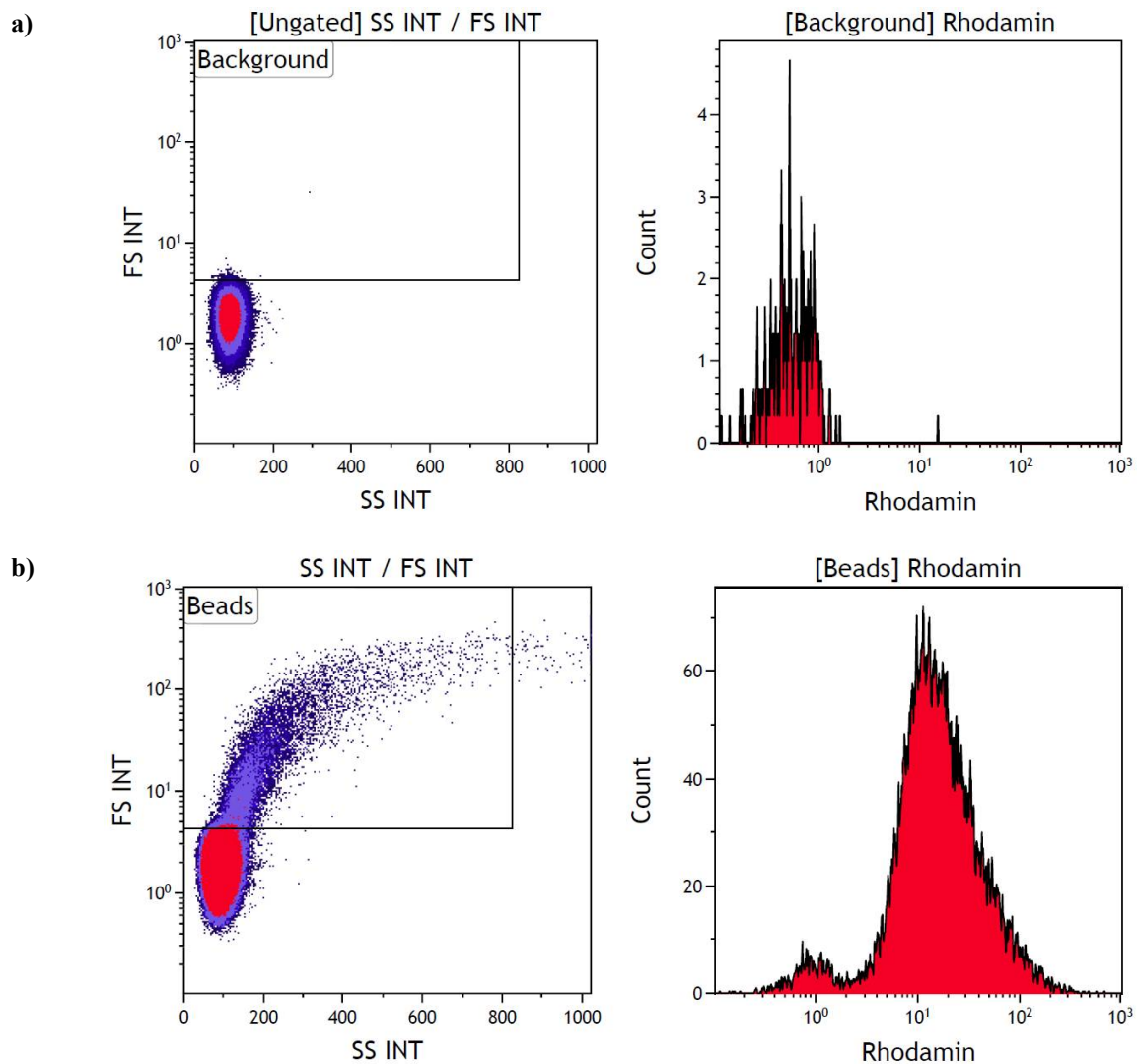


Abb. 3-14. FACS-Untersuchung der kovalenten Modifizierung von PLGA-MP mit FSL1-Rho. Dargestellt sind auf der linken Seite die Dot Plots der Vorwärts- (FS INT) und Seitwärtsstreuungsintensitäten (SS INT) und das für die Einzelparameteranalyse gewählte Gate. Auf der rechten Seite sind die Histogramme der Fluoreszenzintensitäten von Rhodamin für das gewählte Gate dargestellt. - **a)** Hintergrundmessung ohne MP; **b)** kFSL1-Rho-MP.

Die qualitative Assoziation von LP an die MP-Oberfläche wurde mittels FACS untersucht. Dazu wurden PLGA-MP kovalent mit fluoreszierendem FSL1-Rho modifiziert. Die kFSL1-Rho-MP wurden gegenüber der Hintergrundfluoreszenz anhand der Vorwärts- und Seitwärtsstreuungsintensitäten identifiziert und für die weitere Analyse als Gate ausgewählt (Abb. 3-14). Die Vorwärtsstreuung entspricht der Partikelgröße und die Seitwärtsstreuung der Partikelgranularität. Innerhalb des Gates zeigten die Histogramme für die Rhodamin-Fluoreszenz von kFSL1-Rho-MP einen deutlich höheren Anteil an fluoreszenzpositiven

Messergebnissen verglichen mit der Hintergrund-Messung (Abb. 3-14), was auf eine Bindung von FSL1-Rho an die MP-Oberfläche schließen lässt.

Die quantitativ an die MP gebundene Menge an LP wurde aus der Konzentrationsdifferenz des LP aus dem ersten Überstand (Ü1) von Positiv-Kontrolle und MP-Ansatz errechnet. Die Konzentration des LP wurde dabei mittels HPLC bestimmt. Zusätzlich wurden auch die LP-Konzentrationen in den Waschüberständen (Ü2 bis Ü4) bestimmt und evtl. abgelöstes LP bei der Berechnung des LP-Gehalts der MP berücksichtigt. Die Konzentrationsbestimmungen der Überstände der Negativ-Kontrolle zeigten keine störenden Peaks im Bereich der LP, die Retentionszeiten von 1,8-2,3 min aufwiesen. Zudem konnte in den vierten Überständen aller Ansätze kein LP mehr nachgewiesen werden.

Die Gehaltsbestimmung von BAS-modifizierten PLGA-MP (Tab. 3-4) ergab für adsorptiv modifizierte MP (aBAS-MP) einen Gehalt von 17,71 ng/mg und für kovalent modifizierte (kBAS-MP) einen geringfügig höheren Gehalt von 20,95 ng/mg. FSL1-modifizierte PLGA-MP (Tab. 3-4) zeigten einen Gehalt von 22,78 ng/mg für die adsorptive (aFSL1-MP) und von 30,51 ng/mg für die kovalente Modifizierung (kFSL1-MP).

Tab. 3-4. LP-Gehalt von Oberflächen-modifizierten BSA-beladenen PLGA-MP (n = 3, MW \pm SD).

| PLGA-MP | LP-Gehalt | |
|------------------------|------------------------|--------------------------|
| | (ng mg ⁻¹) | (pmol mg ⁻¹) |
| aBAS-MP ^{a)} | 17,71 \pm 1,48 | 6,36 \pm 0,53 |
| kBAS-MP ^{b)} | 20,95 \pm 2,50 | 7,53 \pm 0,90 |
| aFSL1-MP ^{c)} | 22,78 \pm 4,45 | 13,67 \pm 2,67 |
| kFSL1-MP ^{d)} | 30,51 \pm 9,95 | 18,31 \pm 5,97 |

a) adsorptiv modifizierte BAS-MP; b) kovalent modifizierte BAS-MP; c) adsorptiv modifizierte FSL1-MP; d) kovalent modifizierte FSL1-MP.

Bei beiden LP lag der Wert für die kovalente Kopplung höher als der für die adsorptive Oberflächen-Modifizierung. Daraufhin durchgeführte Zwei-Stichproben-t-Tests für unverbundene Stichproben zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Modifizierungsarten (p = 0,05). Normalverteilung nach Shapiro-Wilk (p = 0,01) und Varianzhomogenität (F-Test, p = 0,05) lagen vor. Allerdings ist das Ergebnis angesichts der geringen Stichprobenanzahl (n = 3) kritisch zu bewerten. Zudem ist eine zumindest teilweise adsorptive Bindung der LP auch bei der kovalenten Methode denkbar. Aufgrund der geringen Menge an gebundenem LP und der proteinhaltigen PLGA-Matrix, konnte der Nachweis einer kovalenten Bindung (Amidbindung) zwischen LP und Carboxylendgruppen des PLGA, z. B.

mittels Röntgenphotoelektronen-, Massen-, FTIR- oder NMR-Spektroskopie, nicht geführt werden.

Generell konnte durch das hier vorgestellten Verfahren sowohl eine adsorptive als auch kovalente Oberflächenmodifizierung von PLGA-MP mit zwei verschiedenen TLR2-Agonisten gezeigt werden. Der Gehalt an LP wurde dabei mittels HPLC bestimmt und lag in einem Bereich von 17 bis 31 ng LP pro Milligramm MP (Tab. 3-4). Brandhonneur *et al.* verwendeten 2009 ebenfalls eine Carbodiimid-Methode zur kovalenten Kopplung von Heptapeptiden ($M_w \sim 720\text{-}730$ g/mol) und von größeren Proteinen, wie WGA ($M_w \sim 38000$ g/mol) und BSA ($M_w \sim 66000$ g/mol), an PLGA-MP (D[4,3]: 2,5 μm ; Resomer[®] RG 503H). Die hier verwendeten LP BAS (M_w 2783 g/mol) und FSL1 (M_w 1666 g/mol) liegen hinsichtlich der molaren Masse zwischen den dort verwendeten Peptiden bzw. Proteinen. Die molaren Gehalte der LP, welche zwischen 6-19 pmol/mg liegen, sind niedriger als die von Brandhonneur *et al.* 2009 ermittelten Gehalte für kleinere Heptapeptide (220-230 pmol/mg) sowie für WGA (43 pmol/mg) und BSA (43 pmol/mg). Eine Ursache für die geringeren Gehalte der LP kann deren amphiphile Struktur sein, wobei der hydrophobe Fettsäure-Anteil des LP eine Interaktion zwischen dem hydrophilen Peptid-Anteil des LP mit den Carboxylgruppen auf der MP-Oberfläche sterisch hindern könnte. Weiterhin sind die verwendeten Kopplungsverfahren unterschiedlich, so verwendeten Brandhonneur *et al.* 2009 z. B. kein Sulfo-NHS und trennten auch das Kopplungsreagenz EDAC vor der Zugabe der Proteine bzw. Peptide nicht ab, was eine Polymerisation der Proteine aneinander auf der Oberfläche begünstigen kann. Zudem unterscheiden sich die verwendeten MP hinsichtlich der Größe und somit auch hinsichtlich der für die Kopplung notwendigen spezifischen Oberfläche (*specific surface area*, SSA). Die von uns verwendeten PLGA-MP sind ca. 3-5 μm groß (D[4,3]), haben eine SSA zwischen 1,9 und 2,3 m^2/g (bestimmt mittels LD, kalkuliert über den oberflächengewichteten Durchmesser D[3,2], Dichte der PLGA-MP wird mit 1 g/cm^3 angenommen) und sind größer als die von Brandhonneur *et al.* 2009 verwendeten (D[4,3] 2,5 μm). Obwohl Brandhonneur *et al.* 2009 keine Angabe zur SSA macht, kann aufgrund der geringeren Größe von einer größeren Oberfläche für die Interaktion zwischen Ligand und PLGA-MP ausgegangen werden, was einen höheren Gehalt ermöglicht.

3.2.2 Charakterisierung von THP-1-Zellen

Die Zelllinie THP-1 diente als Modell für APC bei den Untersuchungen zur Aufnahme und zur immunstimulatorischen Wirkung von TLR-Agonist-modifizierten PLGA-MP. Die monozytoiden Zellen wurden aus dem peripheren Blut eines einjährigen Jungen mit akuter myeloischer Leukämie gewonnen (Tsuchiya *et al.* 1980). Der Einfluss von extrazellulären und aufgenommenen TLR2- und TLR4-Agonist-modifizierten PLGA-MP auf APC sollte untersucht und dafür die intra- und extrazelluläre Expression der Rezeptoren bestimmt werden. Neben den von der DSZM angegebenen immunologischen Markern wurden bei einer laborinternen weiterführenden Untersuchung weitere immunologische Charakteristika der Zelllinie mittels FACS überprüft (Tab. 3-5).

Die Zellen zeigten typische Marker myeloider Zellen. Der Differenzierungsmarker CD33 war mit ca. 89 % stark ausgeprägt. Der Fc γ -Rezeptor I (CD64) und der LPS-Rezeptor (CD14) als typische Oberflächenmoleküle myeloider Zellen waren ebenfalls vorhanden, wenn auch letzterer nur schwach ausgeprägt war.

Die für die Präsentation von extrazellulären Antigenen wichtigen MHC-Moleküle vom Typ II, hierunter fällt der Oberflächenmarker HLA-DR, kommen mit hoher Expression ausschließlich auf APC vor und wurden auf über 90 % der Zellen positiv detektiert. Zudem waren auch MHC-Moleküle vom Typ I, d. h. HLA-ABC und der Isotyp HLA-A2, welche für die Antigenpräsentation von zytoplasmatischen Antigenen verantwortlich sind und auf allen kernhaltigen Zellen vorkommen, stark ausgeprägt.

Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sind auf APC zu finden, die durch Kontakt mit Pathogenen oder proinflammatorischen Zytokinen aktiviert wurden. Die hier untersuchten Zellen zeigten eine geringe Expression dieser Moleküle, wobei CD86 auf ca. 9 % der Zellen vorhanden war. Eine gewisse Präaktivierung ist somit nicht auszuschließen. Die Erkennung verschiedener Pathogene erfolgt anhand der auf ihnen vorhandenen PAMP. Die dafür erforderlichen PRR sind u. a. auf den APC vorhanden. Von diesen wurden hier der LPS-Rezeptor (CD14), der TLR2 (CD282) und der TLR4 (CD284) auf der Oberfläche der Zellen detektiert. Da die beiden TLR Zielstrukturen für den Einsatz der TLR-Agonist-modifizierten PLGA-MP darstellen, kann eine Aktivierung der Zellen prinzipiell über diese Rezeptoren erfolgen.

Ergebnisse und Diskussion

Tab. 3-5. FACS-Charakterisierung von monozytoiden THP-1-Zellen ohne PMA-Behandlung unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen.

| Zielstruktur | Synonym | Expression ^{a)} | Fluoreszenz -positive Zellen ^{b)} (%) | Zielstruktur | Synonym | Expression ^{a)} | Fluoreszenz -positive Zellen ^{b)} (%) |
|--------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------|---|---|---|
| CD2 | LFA2 | NK, T, Thy | 1,10 | CD105 | Endoglin | Endo, aktivierte Mono/MΦ, BM-Sub | 19,34 |
| CD11b | Mac1 | Mye, NK | 3,42 | CD117 | c-Kit, SCFR | Häm VZ | 0,39 |
| CD14 | LPS-R | Mono, MΦ | 5,06 | CD124 | IL4R | B, Häm VZ, T | 0,44 |
| CD16 | FcγRIII | Mono, N, NK | 0,36 | CD133 | AC133 | Häm SZ/VZ | 0,28 |
| CD19 | B4 | B, DC | 1,47 | CD166 | ALCAM, BEN, DM- GRASP, SCI, KGCAM | aktivierte Mono/MΦ/T, B, Endo, Epi | 91,47 |
| CD24 | BBA1, HSA | B, G | 0,34 | CD184 | CXCR4 | unreife CD34 ⁺ - Häm SZ, T- Sub, DC, Mono, MΦ | 7,40 |
| CD29 | Platelet GPIIa, β1- Integrin | Leu | 99,67 | CD195 | CCR5, CKR5, CMKBR5 | G, Mono, MΦ, T | 0,26 |
| CD33 | P67 | Mye VZ, Mono | 88,51 | CDw197 | CCR7, EB/1, BLR2 | Leu, DC | 0,22 |
| CD34 | Mucin, gp 105-120 | Häm VZ, Endo | 0,18 | CD206 | MRC1, MMR | DC, Mono, MΦ, Endo | 0,89 |
| CD44 | Hermes- Antigen, PGP1, HCAM | Leu, Ery | 87,07 | CD282 | TLR2 | Mono, MΦ, DC, N | 92,76 |
| CD64 | FcγRI | Mono, MΦ, DC | 37,23 | CD284 | TLR4 | Mono, MΦ, DC, T | 98,02 |
| CD66b | früher CD67 | G | 2,22 | CD326 | Ep-CAM | Epi | 0,73 |
| CD80 | B7.1 | B, aktivierte DC/Mono | 0,58 | HLA-ABC | MHCI | kernhaltige Zellen | 99,73 |
| CD86 | B7.2 | aktivierte B, Mono, DC | 8,93 | HLA-A2 | MHCI, Serotyp A2 | | 99,91 |
| CD90 | Thy1 | CD34 ⁺ - Prothymozyten | 1,45 | HLA-DR | MHCII | APC | 91,61 |

^{a)} Abkürzungen. - APC: Antigen-präsentierende Zellen; B: B-Zellen; BM: Knochenmark-Zellen; DC: Dendritische Zellen; Endo: Endothelzellen; Epi: Epithelzellen; Ery: Erythrozyten; G: Granulozyten; Häm: hämatopoietische Zellen; Leu: Leukozyten; MΦ: Makrophagen; Mono: Monozyten; Mye: myeloide Zellen; NK: natürliche Killerzellen; N: neutrophile Granulozyten; SZ: Stammzellen; Sub: Subpopulationen; T: T-Zellen; VZ: Vorläuferzellen.

^{b)} Die Fluoreszenz-positiven Zellen wurden gegenüber einer entsprechenden Isotypenkontrolle bestimmt.

Des Weiteren wurde der Chemokin-Rezeptor CXCR4 mit schwacher Ausprägung auf den Zellen gefunden. Stark ausgeprägt hingegen waren die Adhäsionsmoleküle HCAM (CD44) und ALCAM (CD166).

Zur Abgrenzung der myeloiden Zellen gegen andere Zelltypen wurden verschiedene weitere Differenzierungsmarker bestimmt. Typische Marker hämatopoetischer Vorläuferzellen, darunter CD34, CD117, CD124 und CD133, waren negativ, d. h. die vorliegenden Zellen hatten sich nicht entdifferenziert.

Ebenfalls negativ waren typische T-Zell-Marker, wie CD2 und CD124, und B-Zell-Marker, wie CD19, CD24 und CD124. Der Epithelzell-Marker CD326 und ein typischer Marker von Granulozyten (CD66b) sowie ein Marker von CD34⁺-Prothymozyten (CD90) waren ebenfalls negativ. Zudem wiesen die Zellen die Chemokinrezeptoren CCR5 (CD195) und CCR7 (CDw197) sowie den Fc γ -Rezeptor III (CD16) nicht auf.

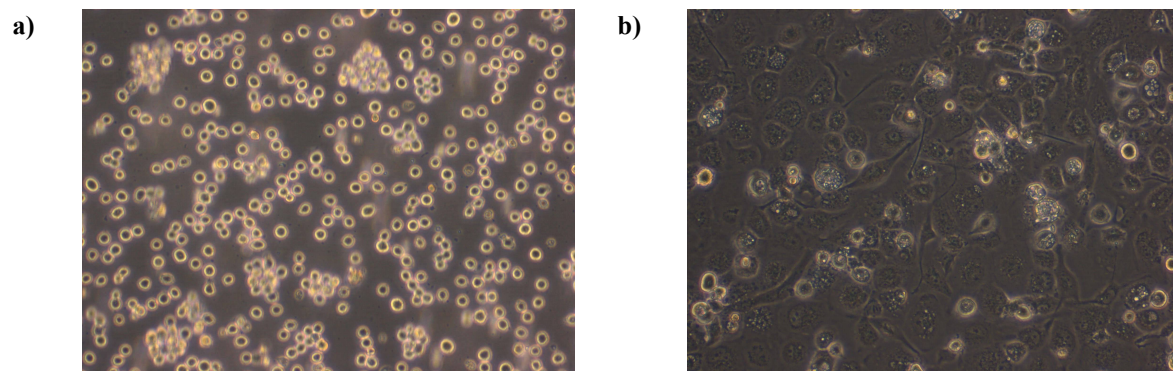


Abb. 3-15. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen (10-fache Vergrößerung) von THP-1-Zellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. - **a)** ohne PMA; **b)** mit PMA.

Für die Testung der MP hinsichtlich der Phagozytose und Immunstimulation wurden die oben beschriebenen monozytoiden Zellen mit dem Phorbol ester PMA für 48 h inkubiert. Dadurch differenzierten die in Suspensionskultur wachsenden, runden, monozytoiden Zellen in makrophagenartige Zellen. Letztere zeigten einen lang gestreckten, flachen Phänotyp und wurden adhären (Abb. 3-15).

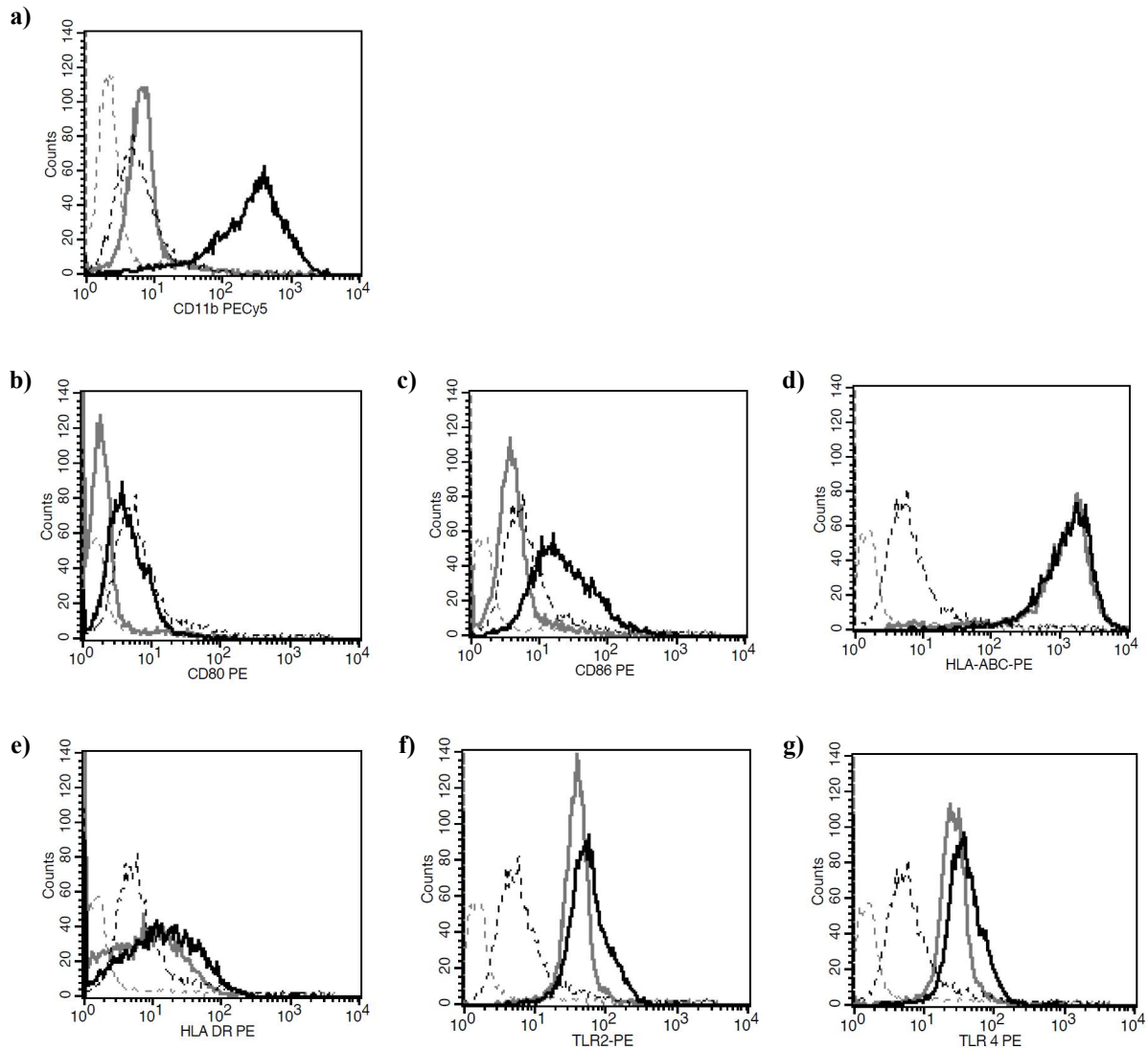


Abb. 3-16. FACS-Overlays von verschiedenen Oberflächenmarkern auf THP-1-Zellen vor (grau) und nach (schwarz) 48stündiger Stimulation mit PMA gegen die jeweilige Isotypen-Kontrolle (gestrichelte Linien). - a) CD11b; b) CD80; c) CD86; d) HLA-ABC; e) HLA-DR; f) TLR2; g) TLR4.

Die eingesetzte PMA-Konzentration war vergleichbar mit der von Park *et al.* 2007 eingesetzten, die einerseits ausreichend für die Differenzierung der Zellen ist, andererseits aber keine unerwünschte Expression von Genen verursacht und eine weitere immunologische Reaktion der Zellen auf schwache Reifungsstimuli zulässt. Die Veränderung wichtiger Oberflächenmarker nach der Differenzierung ist in Abb. 3-16 dargestellt. Zur Überprüfung der Differenzierung wurde der von Schwende *et al.* (1996) beschriebene Marker CD11b verwendet. Dieser wurde bei der Stimulation der THP-1-Zellen mit PMA deutlich hochreguliert (Abb. 3-16a). Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 zeigten auch bei den makrophagenartigen Zellen keine deutliche Expression, d. h. CD80 war verglichen

mit der Isotypen-Kontrolle negativ (Abb. 3-16b) und CD86 (Abb. 3-16c) leicht erhöht. Somit erfolgte keine Aktivierung der Zellen durch den Einsatz des Phorbolesters. Die für die Antigenpräsentation nötigen MHC-Moleküle vom Typ I HLA-ABC (Abb. 3-16d) und vom Typ II HLA-DR (Abb. 3-16e) waren nach der PMA-Behandlung auf den Zellen vorhanden, die Expression von letzteren war leicht vermindert. Ebenfalls vorhanden waren die PRR TLR2 (Abb. 3-16f) und TLR4 (Abb. 3-16g), deren Expression durch den Einsatz des PMA nicht deutlich verändert wurde.

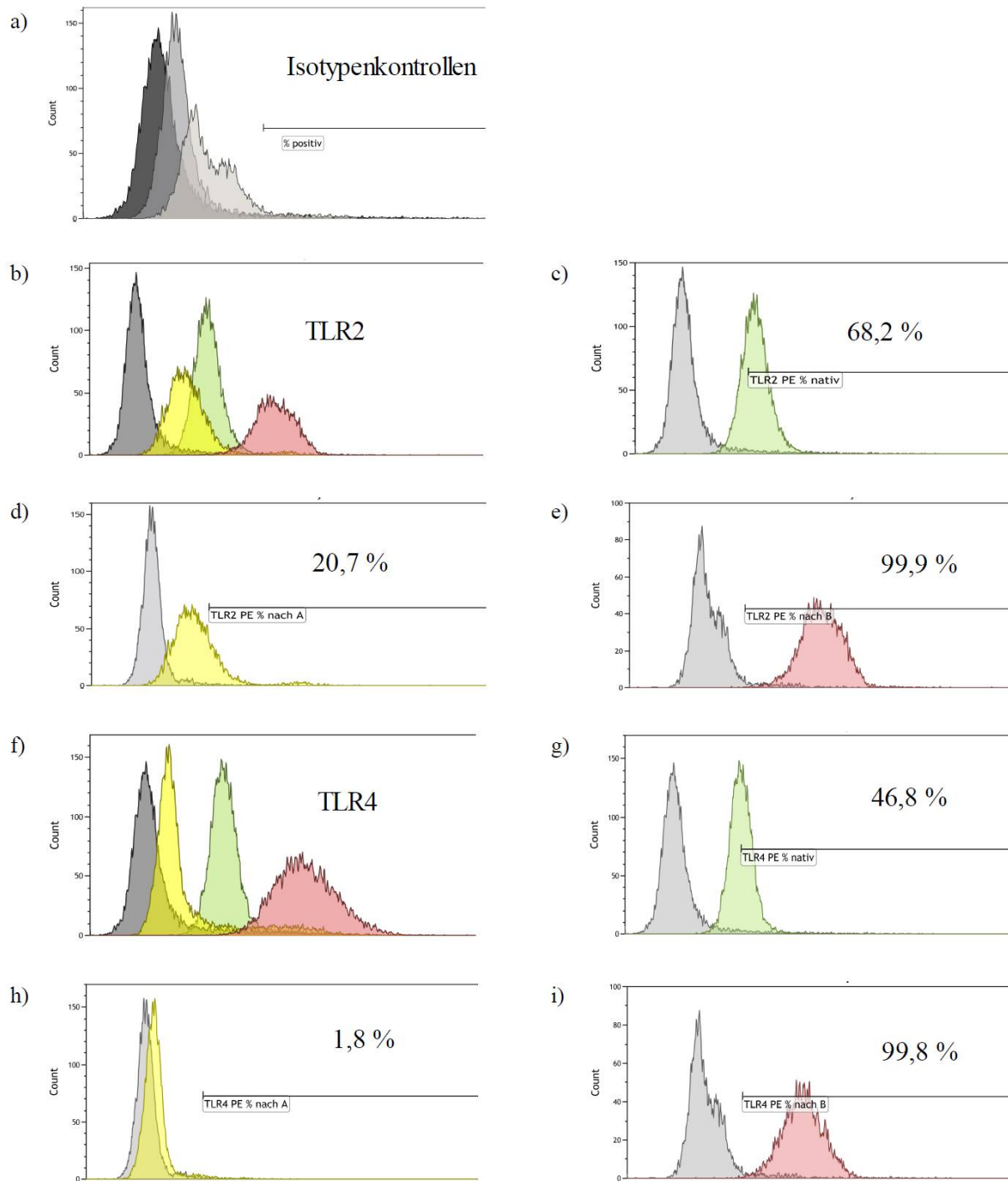


Abb. 3-17. Extra- und intrazelluläre Lokalisation von TLR2 und TLR4 bei undifferenzierten THP-1-Zellen bestimmt durch FACS-Messung nach Antikörperfärbung vor der Fixierung (extrazellulär/nativ), nach der Fixierung mit IntraStain A (nach A) sowie nach der Permeabilisierung mit IntraStain B und anschließender Antikörperfärbung (intrazellulär/nach B). - **a)** Isotypenkontrollen nativ (dunkelgrau), nach A (grau) und nach B (hellgrau); **b)** Overlay: Isotypenkontrolle (grau), anti-TLR2-Antikörper nativ (grün), nach A (gelb) und nach B (rot); **c)** TLR2 extrazellulär; **d)** TLR2 nach Fixierung; **e)** TLR2 intrazellulär; **f)** Overlay: Isotypenkontrolle (grau), anti-TLR4-Antikörper nativ (grün), nach A (gelb) und nach B (rot); **g)** TLR4 extrazellulär; **h)** TLR4 nach Fixierung; **i)** TLR4 intrazellulär.

Da die in dieser Arbeit untersuchten MP durch die THP-1-Zellen aufgenommen werden sollen und damit prinzipiell auch intrazellulär wirken können, wurde die intrazelluläre Expression der Zielrezeptoren TLR2 und TLR4 untersucht. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit einem anti-TLR2- bzw. anti-TLR4-Antikörper gefärbt und die Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche mittels FACS bestimmt (grün in Abb. 3-17 und Abb. 3-18). Wie bereits in den vorhergehenden Untersuchungen festgestellt, zeigten sowohl undifferenzierte als auch mit PMA differenzierte THP-1-Zellen eine deutliche Expression der PRR TLR2 und TLR4. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und erneut im FACS vermessen (gelb in Abb. 3-17 und Abb. 3-18). Die Fixierung führte zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenz-positiven Zellen, welche bei PMA-behandelten Zellen deutlicher ausgeprägt war als bei unbehandelten. Danach erfolgte die Permeabilisierung der fixierten Zellen und eine Antikörperfärbung der intrazellulär vorhandenen TLR2 bzw. TLR4. Sowohl unbehandelte als auch mit PMA-behandelte THP-1-Zellen zeigten eine intrazelluläre Expression von TLR2 und TLR4 (rot in Abb. 3-17 und Abb. 3-18). Daher sind PMA-differenzierte, makrophagenartige THP-1-Zellen als Modell für die Untersuchung von TLR2- und TLR4-Agonist-modifizierten PLGA-MP geeignete, da sie die Zielrezeptoren extra- und intrazellulär exprimieren.

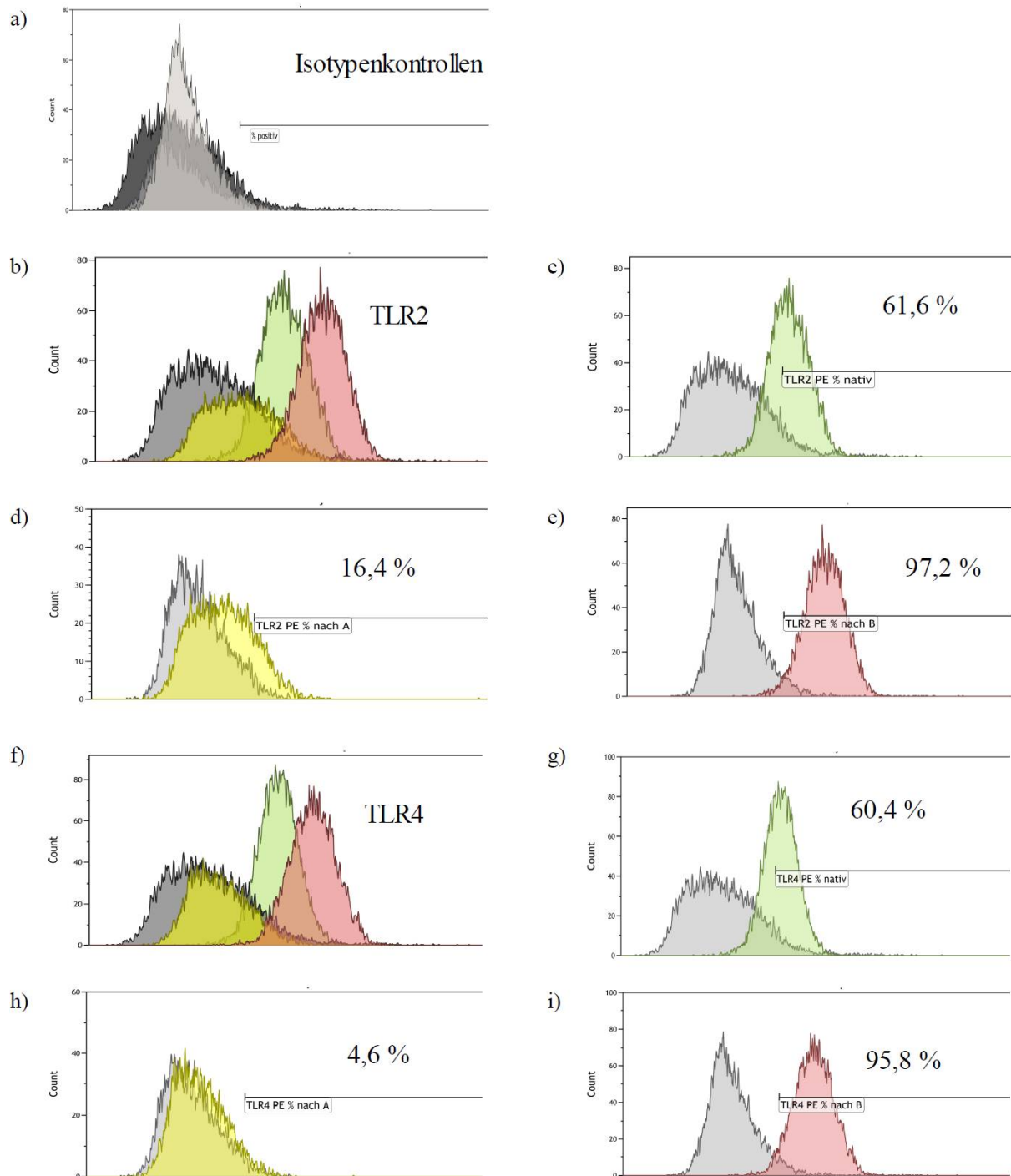


Abb. 3-18. Extra- und intrazelluläre Lokalisation von TLR2 und TLR4 bei PMA-differenzierten THP-1-Zellen bestimmt durch FACS-Messung nach Antikörperfärbung vor der Fixierung (extrazellulär/nativ), nach der Fixierung mit Intrastain A (nach A) sowie nach der Permeabilisierung mit Intrastain B und anschließender Antikörperfärbung (intrazellulär/nach B). - **a)** Isotypenkontrollen nativ (dunkelgrau), nach A (grau) und nach B (hellgrau); **b)** Overlay: Isotypenkontrolle (grau), anti-TLR2-Antikörper nativ (grün), nach A (gelb) und nach B (rot); **c)** TLR2 extrazellulär; **d)** TLR2 nach Fixierung; **e)** TLR2 intrazellulär; **f)** Overlay: Isotypenkontrolle (grau), anti-TLR4-Antikörper nativ (grün), nach A (gelb) und nach B (rot); **g)** TLR4 extrazellulär; **h)** TLR4 nach Fixierung; **i)** TLR4 intrazellulär.

3.2.3 Phagozytose durch THP-1-Zellen

In den nachfolgend präsentierten Experimenten wurde der Einfluss von MP-Konzentration und -Modifizierung mit dem TLR2-Agonisten FSL1 auf die Aufnahme der MP durch THP-1-Zellen untersucht. Die Phagozytose der LP-modifizierten PLGA-MP ist einerseits eine wichtige Voraussetzung für die Präsentation der verkapselten Antigene über MHC-I- (Kreuzpräsentation) und MHC-II-Moleküle sowie die nachfolgende Aktivierung von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen (Burgdorf und Kurts 2008). Andererseits können intrazelluläre TLR2 durch die phagozytierten MP stimuliert werden. Dabei konnten verschiedene Arbeitsgruppen eine erhöhte Empfindlichkeit des TLR2 nach der Phagozytose von partikulären Pathogenen zeigen (Ip *et al.* 2008, 2010, Underhill *et al.* 1999, Wolf *et al.* 2011). Des Weiteren zeigten Blander und Medzhitov 2004, dass MyD88^{-/-} und TLR2x4^{-/-} murine Makrophagen, deren TLR-Signaltransduktion unterbunden wurde, Bakterien in vermindertem Ausmaß und mit einer reduzierten Rate phagozytierten. Deshalb sollte in den nachfolgenden Versuchen geklärt werden, ob eine Modifizierung von PLGA-MP mit TLR2-Agonisten zu einer vermehrten Phagozytose führt.

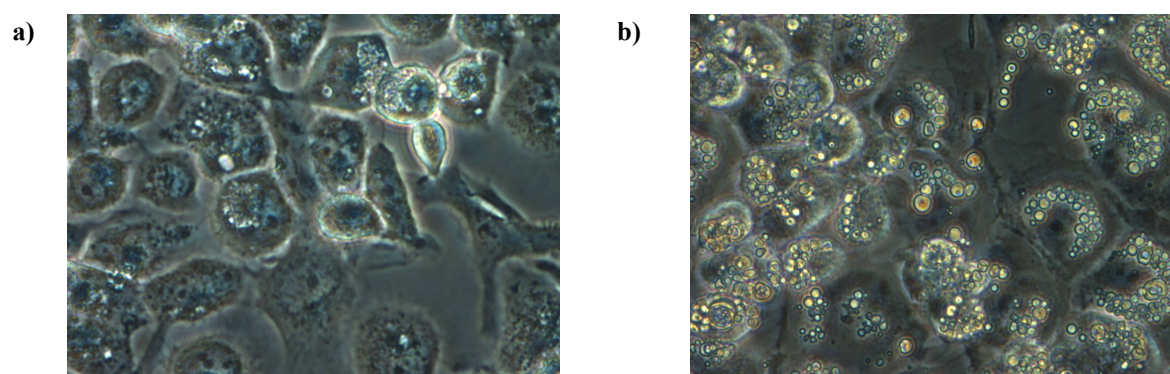


Abb. 3-19. Phasenkontrast-Mikroskopie (40-fache Vergrößerung) von THP-1-Zellen nach zweistündiger Inkubation. - **a)** Zellen ohne MP; **b)** Zellen mit unmodifizierten FITC-BSA-beladenen PLGA-MP (200 µg 10⁶ Zellen).

Dazu wurden monozytoide THP-1-Zellen für zwei Tage mit PMA stimuliert, wobei diese zu makrophagenartigen Zellen differenzierten. Die so erhaltenen THP-1-Zellen wurden zwei Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von FITC-markierten MP-Formulierungen inkubiert. Die Ermittlung der aufgenommenen MP erfolgte anhand der FITC-Fluoreszenz der Zellen, welche durch FACS bestimmt wurde. Um durch die Zellen aufgenommene MP von an den Zellen adsorbierten zu unterscheiden, wurden ansonsten identische Ansätze einmal mit

und einmal ohne Cytochalasin D behandelt. Cytochalasin D hemmt die Aktin-Polymerisation und damit eine Veränderung des Zytoskeletts, welches für eine phagozytotische Aufnahme der MP vonnöten ist (Phagozytose-Inhibitor).

In Abb. 3-19 werden phasenkontrastmikroskopische Bilder von THP-1-Zellen nach der Inkubation ohne (Abb. 3-19a) oder mit (Abb. 3-19b) unmodifizierten FITC-BSA-beladenen PLGA-MP miteinander verglichen. Sichtbar in b) ist eine Konzentrierung der MP in bzw. an den THP-1-Zellen, welche auf eine Aufnahme der MP durch die Zellen schließen lässt.

Die Verifizierung der Partikel-Aufnahme erfolgte wie oben beschrieben durch den Vergleich von Cytochalasin-gehemmten und ungehemmten Zellen. In Abb. 3-20 ist zum einen die Aufnahme FITC-markierter Zymosan-MP als Positiv-Kontrolle dargestellt (Abb. 3-20a), zum anderen die Aufnahme unmodifizierter FITC-BSA-beladener PLGA-MP (Abb. 3-20b). Sowohl bei Zymosan-MP als auch bei PLGA-MP kam es durch den Einsatz von Cytochalasin D zu einer deutlichen Reduktion der fluoreszierenden Zellen, was auf eine phagozytotische Aufnahme der MP schließen lässt. Dennoch fluoreszierten auch die Cytochalasin-behandelten Zellen nach der MP-Inkubation stärker als unbehandelte Zellen. Der entsprechende Unterschied stellt an die Zellen adhärenzte MP dar.

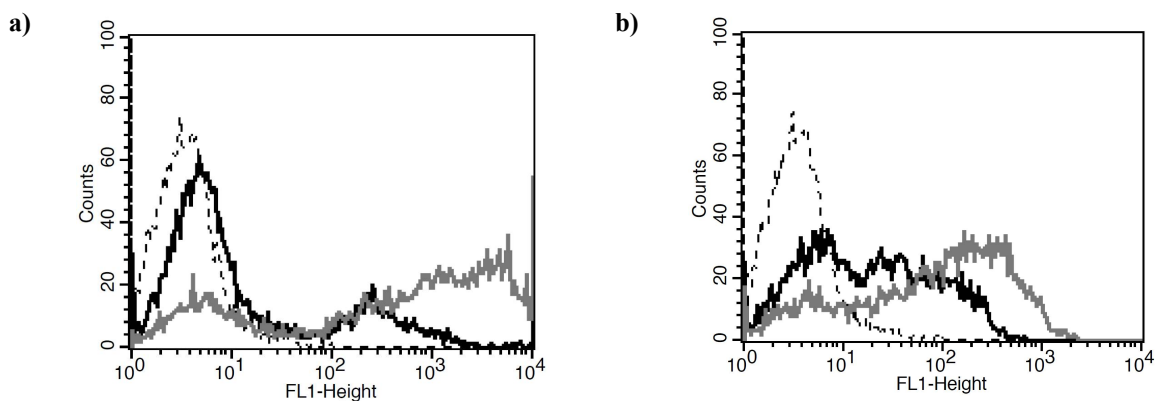


Abb. 3-20. Phagozytose verschiedener FITC-MP-Formulierungen durch THP-1-Zellen dargestellt als FACS-Overlays. Die FITC-Fluoreszenz (FL1-Height) auf der Abszisse ist gegen die Anzahl der detektierten Zellen (Counts) auf der Ordinate aufgetragen. Verglichen werden Zellen ohne MP (schwarze gestrichelte Linie) sowie Zellen mit FITC-MP ohne (graue Linie) und mit (schwarze Linie) Zusatz von Cytochalasin D als Phagozytose-Inhibitor. - **a)** Zymosan-MP ($200 \mu\text{g } 10^{-6}$ Zellen); **b)** FITC-BSA-beladene PLGA-MP ($200 \mu\text{g } 10^{-6}$ Zellen).

Steigende Konzentrationen von unmodifizierten FITC-BSA-beladenen PLGA-MP zeigten bis zu $200 \mu\text{g}/10^6$ Zellen, wie in Tab. 3-6 dargestellt, eine erhöhte Aufnahme in, aber auch eine stärkere Adsorption der MP an die THP-1-Zellen. Bei einer Verdopplung der Partikelkonzentration auf $400 \mu\text{g}/10^6$ Zellen erhöhte sich der Anteil adhärenzte MP deutlich,

während der Gesamtanteil fluoreszierender Zellen ohne Cytochalasin-Behandlung lediglich leicht erhöht wurde. Deshalb wurden im Vergleich bei 200 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen prozentual mehr MP durch Phagozytose in die THP-1-Zellen aufgenommen.

Aufgrund dessen wurden weiterhin nur MP-Konzentrationen von 200 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen miteinander verglichen. Um den Einfluss des TLR2-Agonisten FSL1 auf die Phagozytose durch THP-1-Zellen zu ermitteln, wurden unmodifizierte FITC-BSA-beladene PLGA-MP mit fünf und 200 ng FSL1 pro 10^6 Zellen während der Inkubation versetzt. Der Einfluss auf die Phagozytose war marginal. Auch adsorptiv und kovalent mit FSL1 modifizierte FITC-BSA-beladene PLGA-MP sowie Zymosan-MP, welche mit 200 ng FSL1 pro 10^6 Zellen versetzt wurden, zeigten keine deutliche Erhöhung der Phagozytose (Tab. 3-6).

Tab. 3-6. Phagozytose verschiedener FITC-MP-Formulierungen durch THP-1-Zellen in Abhängigkeit von der MP- und FSL1-Konzentration.

| Probenbeschreibung | MP ($\mu\text{g } 10^{-6} \text{ Z}$) | FSL1 (ng 10^{-6} Z) | | FITC-positive Zellen ^{b)} (%) | | |
|-----------------------------------|--|-----------------------------------|---------------------------------|---|----------------------|--|
| | | frei | MP- assoziiert ^{a)} | mit Cytochalasin | ohne Cytochalasin | intrazellulärer Anteil (Differenz) |
| Negativkontrolle | - | - | - | 1,97 | 0,01 | -1,96 |
| Zymosan-MP | 200 | - | - | 17,59 | 74,13 | 56,54 |
| Zymosan-MP + FSL1 | 200 | 200 | - | 12,74 | 53,11 | 40,37 |
| Unmodifizierte MP | 50 | - | - | 4,65 | 30,37 | 25,72 |
| | 100 | - | - | 8,50 | 41,53 | 33,03 |
| | 200 | - | - | 16,53 | 59,14 | 42,61 |
| | 400 | - | - | 25,45 | 62,14 | 36,69 |
| Adsorptiv modifizierte FSL1-MP | 200 | - | 3,76 | 5,21 | 32,27 | 27,06 |
| Kovalent modifizierte FSL1-MP | 200 | - | 7,05 | 11,78 | 56,52 | 44,74 |
| Unmodifizierte MP + FSL1 | 200 | 5 | - | 17,65 | 56,09 | 38,44 |
| | 200 | 200 | - | 8,20 | 52,15 | 43,95 |

^{a)} Die MP-assoziierte Menge an FSL1 wurde aus dem FSL1-Gehalt und der MP-Konzentration errechnet.

^{b)} Der Prozentsatz an fluoreszierenden FITC-positiven Zellen wurde mittels FACS bestimmt. Dargestellt sind die gegateten Zellen.

Die hier hergestellten PLGA-MP wurden durch THP-1-Zellen phagozytiert und erfüllen somit die Voraussetzungen für eine effektive Präsentation der Antigene über MHC-Moleküle und eine intrazelluläre TLR2-Stimulation. Ein Einfluss der TLR2-Stimulation auf das Ausmaß der Phagozytose von PLGA-MP konnte hingegen nicht gezeigt werden.

3.2.4 TLR2-vermittelte Aktivierung und Zellviabilität von THP-1-Zellen

Im Folgenden wurde der Einfluss von verschiedenen Stimuli auf die Zellviabilität und Zytokinproduktion von THP-1-Zellen untersucht. Die TLR2-vermittelte Aktivierung der Zellen wurde anhand der Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF α (ELISA und ELISPOT, Remer *et al.* 2006) und IL6 (ELISPOT) gemessen. Dabei sollte die Frage geklärt werden, ob mit TLR2-Agonisten Oberflächen-modifizierte PLGA-MP eine stärkere Aktivierung bewirken als gelöste TLR2-Agonisten und unmodifizierte PLGA-MP. Da TLR2-Agonist-modifizierte PLGA-MP durch THP-1-Zellen phagozytiert wurden (siehe 3.2.3) und TLR2 intrazellulär (siehe 3.2.2) in THP-1-Zellen vorhanden war, wurde eine stärkere bzw. längere Interaktion der modifizierten MP mit den TLR2-Heterodimeren vermutet. Zudem wurde eine erhöhte Empfindlichkeit von intrazellulären TLR2 in Makrophagen gegenüber Bakterien gezeigt (Ip *et al.* 2008, 2010, Underhill *et al.* 1999, Wolf *et al.* 2011), die für TLR2-Agonist-modifizierte PLGA-MP noch nicht nachgewiesen wurde. Des Weiteren sollten Unterschiede in der Zellaktivierung zwischen adsorptiv und kovalent modifizierten MP aufgedeckt werden. Denkbar war eine Ablösung der adsorbierten TLR2-Agonisten vor der Phagozytose, was eine geringere Interaktion mit intrazellulären TLR2 und eine verminderte Aktivierung zur Folge hätte. Unterschiede in der Aktivierung zwischen dem TLR2/1-Agonisten BAS und dem TLR2/6-Agonisten FSL1 sollten ebenfalls detektiert werden. In Abhängigkeit von der eingesetzten Partikelkonzentration war zusätzlich die Zellviabilität zu bestimmen, da diese den limitierenden Faktor für die maximal einsetzbare Menge an Partikeln darstellte.

Makrophagenartige THP-1-Zellen wurden für zwei Stunden mit TLR2-Agonist-modifizierten MP, unmodifizierten MP mit und ohne Zugabe von TLR2-Agonist sowie freiem TLR2-Agonist inkubiert. Danach wurden die Stimuli entfernt und die Zellen für 14 bis 16 Stunden unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Die resultierenden Überstände wurden entnommen und mit Hilfe eines ELISA auf das proinflammatorische Zytokin TNF α getestet. Die Zellviabilität wurde nach Abnahme der Überstände mittels des MTT-Tests bestimmt.

In einem orientierenden Versuch sollte die Potenz der gelösten LP BAS und FSL1 mit gelöstem LPS 0111:B4 verglichen werden (Abb. 3-21). Es konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den freien Substanzen über einen Konzentrationsbereich von

0,2-2000 ng/10⁶ Zellen gefunden werden. Ab einer Konzentration von 200 ng/10⁶ Zellen war eine geringfügig höhere Potenz der LP zu beobachten (FSL1 > BAS > LPS).

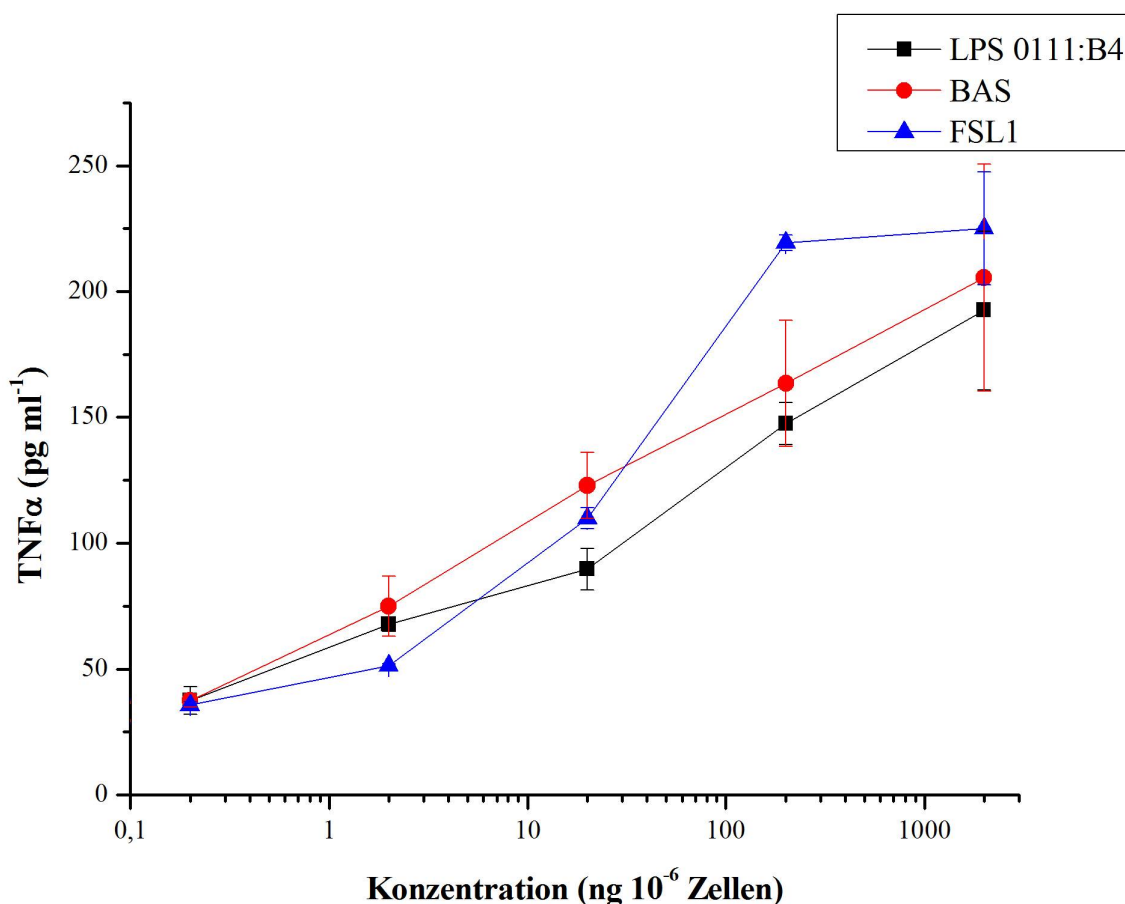


Abb. 3-21. TNF α -Ausschüttung von PMA-differenzierten THP-1-Zellen in Abhängigkeit der gelösten LP FSL1 (n = 2) und BAS (n = 2) sowie des LPS 0111:B4 aus *E. coli* (n = 4). MW \pm SD.

Im Anschluss sollte der Einfluss von mikropartikulär gebundenen LP evaluiert werden. In Abb. 3-22 dargestellt ist der Einfluss von BSA-beladenen PLGA-MP, die mit dem TLR2/6-Agonisten FSL1 modifiziert wurden. Die MP wurden zum einen adsorptiv mit FSL1 modifiziert (Abb. 3-22d, aFSL1-MP), zum anderen wurde das LP kovalent an die MP gebunden (Abb. 3-22e, kFSL1-MP). Die MP-assoziierte Menge an FSL1 wurde aus dem FSL1-Gehalt der MP und ihrer Konzentration errechnet. Als Kontrolle dienten unmodifizierte MP (Abb. 3-22a, uMP), welche, bis auf den LP-Zusatz, dem gleichen Beschichtungsprozess wie kovalent modifizierte MP unterzogen wurden. Weitere Kontrollen beinhalteten freies FSL1 in einer vergleichbaren Konzentration wie auf den modifizierten MP (Abb. 3-22b) und eine Mischung aus uMP und freiem FSL1 (Abb. 3-22c, uMP/FSL1). Es wurden jeweils vier

Ergebnisse und Diskussion

verschiedene Konzentrationen der Stimuli eingesetzt und mit unstimulierten Zellen verglichen.

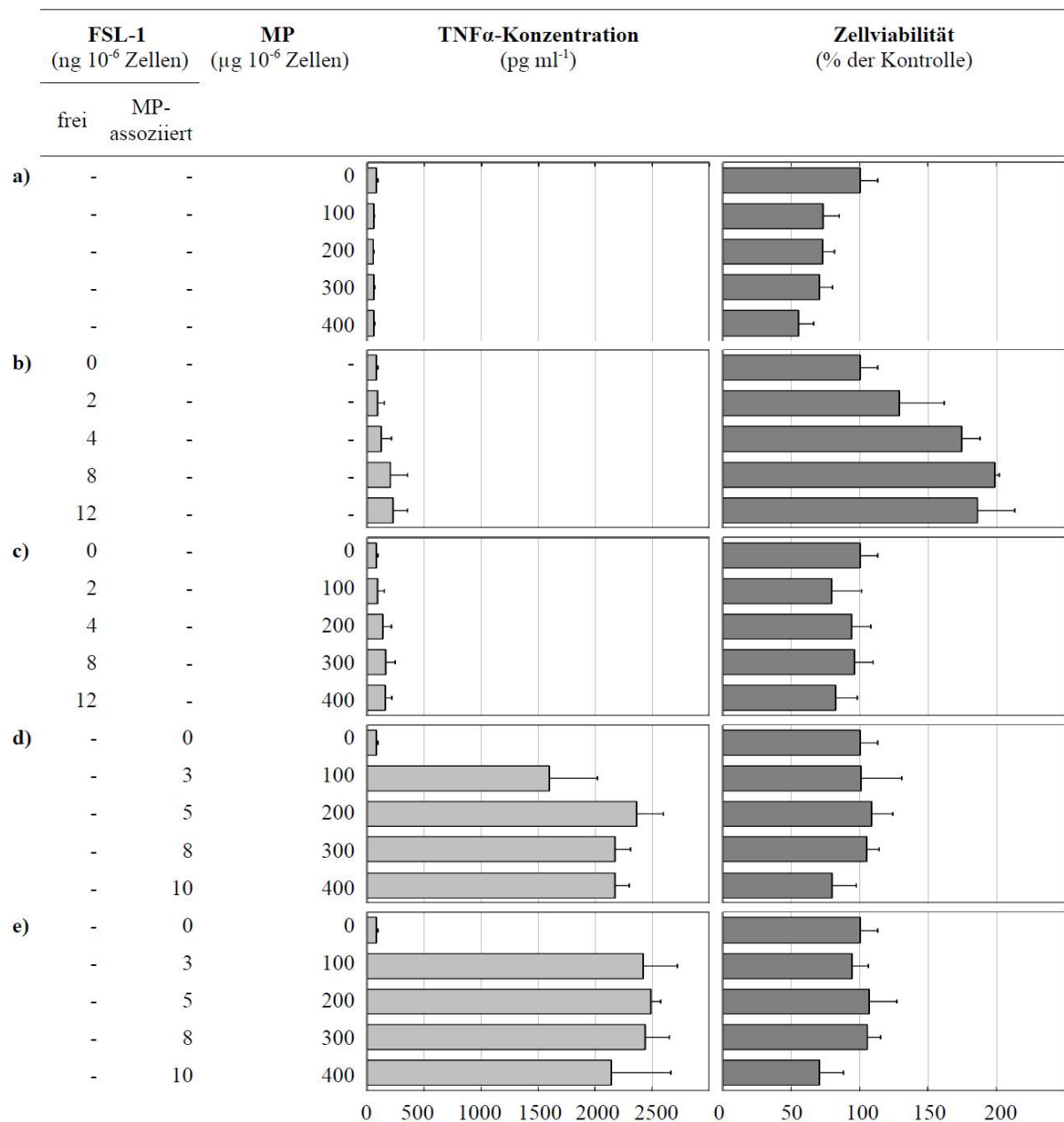


Abb. 3-22. TNFα-Ausschüttung und Zellviabilität (MTT-Test) von THP-1-Zellen in Abhängigkeit von folgenden Stimuli. - **a)** uMP; **b)** freies FSL1; **c)** uMP/FSL1; **d)** aFSL1-MP; **e)** kFSL1-MP. MW + SD; n = 4.

Jedes Konzentrations-Level wurde mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA auf Unterschiede hinsichtlich der TNFα-Ausschüttung untersucht. Alle Proben waren normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p < 0,05$). Zuerst erfolgte ein Vergleich zwischen unstimulierten Zellen, MP-Formulierungen in einer Konzentration von 100 μg/10⁶ Zellen (uMP, aFSL1-MP, kFSL1-MP), freiem FSL1 (2 ng/10⁶ Zellen) und der Mischung uMP/FSL1.

Da keine Varianzhomogenität zwischen den Gruppen mit Hilfe des Tests nach Levene festgestellt werden konnte ($p < 0,001$), wurde zur Auswertung der Unterschiede zwischen den Gruppen die Berechnung nach Welch verwendet. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen gefunden, $F(5; 7,62) = 45,38$; $p < 0,001$. Zur Aufklärung, welcher Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen signifikant war, wurde der multiple Post-Hoc-Test nach Dunnett-T3 durchgeführt. Dieser ist für eine kleine Stichprobenanzahl geeignet und benötigt keine Varianzhomogenität als Voraussetzung für die Durchführung. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den unstimulierten Zellen (78 pg/ml) und uMP (54 pg/ml, $p = 0,282$), freiem FSL1 (86 pg/ml, $p = 1,000$) sowie uMP/FSL1 (90 pg/ml, $p = 1,000$) gefunden werden. Sowohl kFSL1-MP (2418 pg/ml) als auch aFSL1-MP (1596 pg/ml) waren signifikant unterschiedlich zu den übrigen Gruppen ($p < 0,05$). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden FSL1-MP gezeigt werden ($p = 0,177$).

Der Vergleich im nächsten Konzentrations-Level (MP-Konzentrationen $200 \mu\text{g}/10^6$ Zellen, freies FSL1 $4 \text{ ng}/10^6$ Zellen) erfolgte analog. Es wurde keine Varianzhomogenität festgestellt ($p < 0,01$). Die Auswertung nach Welch ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, $F(5; 7,27) = 494,055$; $p < 0,001$. Der Test Dunnett-T3 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen unstimulierten Zellen und uMP ($p = 0,184$), freiem FSL1 ($p = 0,973$) sowie der Mischung aus beidem ($p = 0,881$). Adsorptiv modifizierte und kovalent modifizierte MP waren signifikant unterschiedlich zu den anderen Gruppen ($p < 0,01$), aber nicht im Vergleich zueinander ($p = 0,977$).

Die Versuchsansätze der beiden nächsthöheren Konzentrations-Level zeigten keine Varianzhomogenität (Levene-Test, $p < 0,01$) und Unterschiede bei der Auswertung nach Welch mit $F(5; 7,72) = 219,641$; $p < 0,001$ für das dritthöchste und $F(5; 7,73) = 165,305$; $p < 0,001$ für das höchste Level. Signifikante Unterschiede bestanden bei adsorptiv und kovalent modifizierten FSL1-MP gegenüber den anderen Gruppen (Dunnett-T3, $p < 0,05$). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen aFSL1-MP und kFSL1-MP bei Konzentrationen von $300 \mu\text{g}/10^6$ Zellen ($p = 0,525$) sowie $400 \mu\text{g}/10^6$ Zellen ($p = 1,000$) gefunden werden. Sowohl adsorptiv als auch kovalent modifizierte FSL1-MP zeigten bei einer Konzentration von $200 \mu\text{g}/10^6$ Zellen die höchste Ausschüttung an TNF α , welche in einem Bereich von 2360 bis 2490 pg/ml lag und somit ca. 20fach höher war als die durch eine

vergleichbare Menge freies FSL1 (122 pg/ml) oder die Mischung uMP/FSL1 (131 pg/ml) ausgelöste.

Bei der Überprüfung der Zellviabilität mittels MTT-Test wurde ein zytotoxischer Einfluss der MP festgestellt, welcher bei uMP am stärksten ausgeprägt war. Eine deutliche Reduktion auf ca. 55 % der Kontrolle erfolgte bei der höchsten getesteten MP-Konzentration von 400 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen. Freies LP hatte einen stimulierenden Einfluss auf die Zellviabilität. Diese stieg rechnerisch im Vergleich zur Kontrolle bis auf Werte von ca. 200 % an. Durch Mischung der uMP mit FSL1 wurde der zytotoxische Effekt der MP gemindert, d. h. die Zellviabilität sank nicht unter 80 %. Auch MP-gebundenes LP zeigte diesen Effekt. Hervorzuheben ist, dass bei kFSL1-MP und aFSL1-MP eine Konzentration von 200 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen zur höchsten Zellviabilität führte. Wurde die Partikelkonzentration weiter erhöht, kam es zu einem Absinken dieser. Um eine Reduktion des MTT durch eine eventuell auftretende mikrobielle Verunreinigung auszuschließen, wurden alle MP-Formulierungen (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ entspricht 400 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen) und freies FSL1 (4 ng/mL entspricht 8 ng/ 10^6 Zellen) ohne THP-1-Zellen mit MTT versetzt. Alle Werte entsprachen der Negativkontrolle (Zellkulturmedium).

Die Abb. 3-23 zeigt den Einfluss von BSA-beladenen PLGA-MP, die mit dem synthetischen LP BAS modifiziert wurden, auf die Produktion des proinflammatorischen Zytokins $\text{TNF}\alpha$ und die Zellviabilität von THP-1-Zellen. Verglichen wurden adsorptiv (Abb. 3-23d, aBAS-MP) und kovalent (Abb. 3-23e, kBAS-MP) modifizierte MP sowie die entsprechenden Kontrollen, d. h. uMP (Abb. 3-23a), freies BAS (Abb. 3-23b) und die Mischung aus beiden (Abb. 3-23c, uMP/BAS).

Der Vergleich der einzelnen Gruppen auf einem Konzentrations-Level gegeneinander hinsichtlich der $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung erfolgte analog zu den oben besprochenen FSL1-MP mit Hilfe der einfaktoriellen ANOVA. Alle Stichproben waren normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p < 0,05$) und zeigten keine Varianzhomogenität innerhalb der getesteten Konzentrations-Level (Levene-Test, $p < 0,001$). Deshalb wurden die ANOVA nach Welch ausgewertet und eventuelle Unterschiede zwischen den Gruppen mit Hilfe des Dunnett-T3-Tests überprüft.

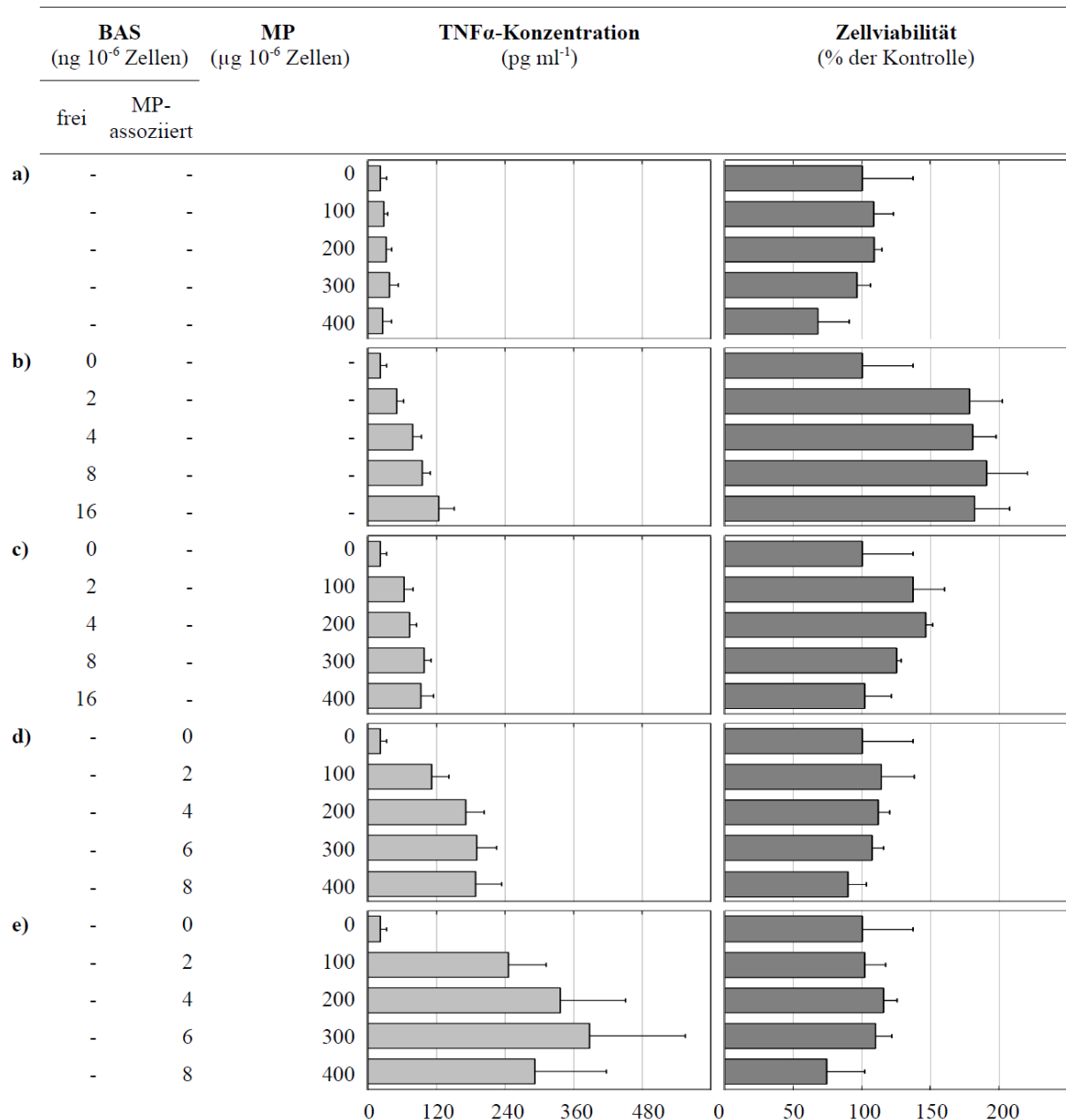


Abb. 3-23. TNFα-Ausschüttung (n = 6) und Zellviabilität (MTT-Test; n = 4) von THP-1-Zellen in Abhängigkeit von folgenden Stimuli. - a) uMP; b) freies BAS; c) uMP/BAS; d) aBAS-MP; e) kBAS-MP. MW + SD.

Der Vergleich von unstimulierten Zellen, uMP (100 μg/10⁶ Zellen), freiem BAS (2 ng/10⁶ Zellen), der Mischung uMP/BAS sowie adsorptiv und kovalent modifizierten BAS-MP (100 μg/10⁶ Zellen) ergab signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, $F(5; 13,49) = 23,839$; $p < 0,001$. Unstimulierte Zellen waren mit 22 pg/ml TNFα signifikant unterschiedlich zu allen anderen Gruppen ($p < 0,05$), außer zu uMP (28 pg/ml, $p = 0,976$). Freies BAS (50 pg/ml) zeigte keinen signifikanten Unterschied gegenüber uMP/BAS (63 pg/ml, $p = 0,794$), aber sowohl aBAS-MP ($p < 0,05$) als auch kBAS-MP ($p < 0,01$)

zeigten signifikant höhere Ausschüttungen von TNF α . Kein signifikanter Unterschied ($p = 0,093$) konnte zwischen aBAS-MP und uMP/BAS aufgedeckt werden, weiterhin waren aBAS-MP (112 pg/ml) signifikant unterschiedlich zu den anderen Gruppen ($p < 0,05$). Die höchste gemessene Konzentration von TNF α (246 pg/ml) innerhalb dieses Konzentrations-Levels wurde durch kBAS-MP verursacht. Der Unterschied zu den übrigen Gruppen war signifikant ($p < 0,05$).

Der Vergleich der verschiedenen Gruppen auf dem nächsthöheren Konzentrations-Level (MP-Konzentrationen 200 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen, freies BAS 4 ng/ 10^6 Zellen) zeigte signifikante Unterschiede, $F(5; 13,69) = 38,380$; $p < 0,001$. Unter den einzelnen Gruppen konnte jeweils kein relevanter Unterschied zwischen unstimulierten Zellen und uMP ($p = 0,718$), freiem BAS und uMP/BAS ($p = 0,999$) sowie zwischen aBAS-MP und kBAS-MP ($p = 0,132$) festgestellt werden. Alle übrigen Unterschiede waren signifikant ($p < 0,05$), wobei die höchste gemessene TNF α -Konzentration (337 pg/ml) durch Stimulation mit kBAS-MP erzielt wurde. Danach folgten aBAS-MP (171 pg/ml), freies BAS (78 pg/ml), uMP/BAS (73 pg/ml), uMP (32 pg/ml) und unstimulierte Zellen (21 pg/ml).

Der Vergleich der Gruppen des dritthöchsten Konzentrations-Levels (MP-Konzentrationen 300 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen, freies BAS 8 ng/ 10^6 Zellen) zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen diesen, $F(5; 13,71) = 48,513$; $p < 0,001$. Unstimulierte Zellen und uMP wiesen keinen signifikanten Unterschied zueinander auf ($p = 0,506$), jedoch waren sie signifikant verschieden von den anderen Gruppen ($p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der TNF α -Ausschüttung wurden zwischen kBAS-MP (388 pg/ml) und aBAS-MP (190 pg/ml, $p = 0,254$), uMP/BAS (98 pg/ml, $p = 0,069$) sowie zwischen kBAS-MP und freiem BAS (95 pg/ml, $p = 0,066$) festgestellt. Zu beachten ist zum einen die hohe Standardabweichung der kBAS-MP von 168 pg/ml, zum anderen die um 2 ng/ 10^6 Zellen höhere Konzentration des freien BAS gegenüber der MP-assoziierten. Adsorptiv modifizierte BAS-MP waren gegenüber allen anderen Gruppen, außer kBAS-MP, signifikant unterschiedlich ($p < 0,01$).

Die Gruppen des höchsten Konzentrations-Levels (MP-Konzentrationen 400 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen, freies BAS 16 ng/ 10^6 Zellen) wiesen signifikante Unterschiede auf, $F(5; 13,39) = 33,018$; $p < 0,001$. Unstimulierte Zellen waren nicht signifikant unterschiedlich zu uMP ($p = 1,000$), jedoch verschieden zu allen anderen Gruppen ($p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede wiesen kBAS-MP (292 pg/ml) im Vergleich zu aBAS-MP

(188 pg/ml, $p = 0,617$), freiem BAS (124 pg/ml, $p = 0,165$) und uMP/BAS (92 pg/ml, $p = 0,091$) auf. Die Standardabweichung für die durch kBAS-MP induzierten TNF α -Werte war mit 125 pg/ml groß. Allerdings war die eingesetzte Konzentration an freiem BAS doppelt so hoch wie die MP-gebundene. Adsorptiv modifizierte BAS-MP unterschieden sich neben den schon besprochenen Situationen noch von uMP/BAS signifikant ($p < 0,05$).

Hinsichtlich der Zellviabilität konnte bei uMP ein zytotoxischer Effekt beobachtet werden. Dieser war ab einer MP-Konzentration von $400 \mu\text{g}/10^6$ Zellen ausgeprägt (68 % der Kontrolle). Stimulierend auf die Zellviabilität wirkte das LP BAS, welches die Zellviabilität rechnerisch auf ca. 180 % der Kontrolle erhöhte. Ein Zusatz von uMP verminderte den stimulierenden Effekt, wobei die Zellviabilität nicht auf Werte unter 100 % sank. Eine zytotoxische Wirkung der BAS-MP-Formulierungen, d. h. ein Absinken der Zellviabilität unter 100 %, konnte erst bei MP-Konzentrationen von $400 \mu\text{g}/10^6$ Zellen festgestellt werden. Eine Verfälschung des MTT-Tests durch eine mikrobielle Verunreinigung konnte durch Prüfung der MP-Formulierungen ($1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ entspricht $2000 \mu\text{g}/10^6$ Zellen) und von freiem BAS ($1000 \text{ ng}/\text{ml}$ entspricht $2000 \text{ ng}/10^6$ Zellen) ohne THP-1-Zellen ausgeschlossen werden, da sie der Negativkontrolle (Zellkulturmedium) entsprachen.

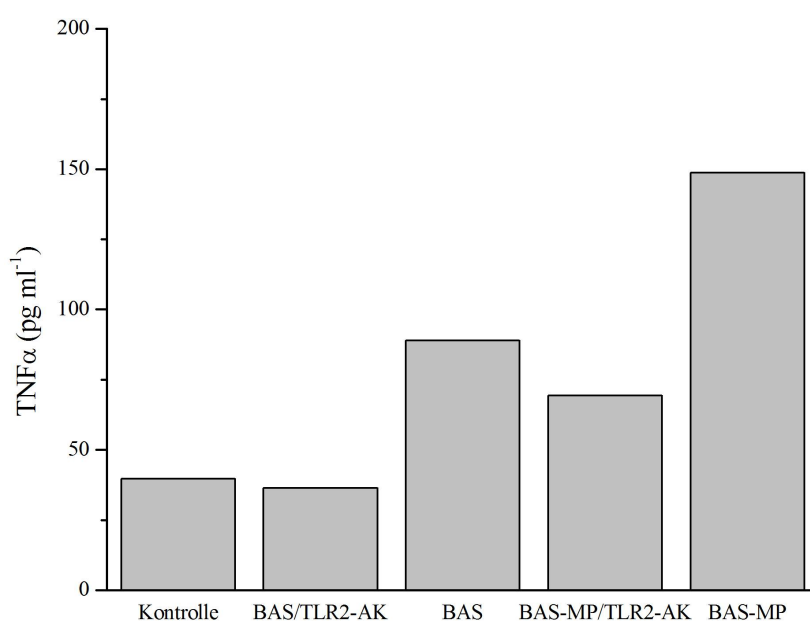


Abb. 3-24. TNF α -Ausschüttung von BAS- und kBAS-MP-stimulierten THP-1-Zellen mit und ohne TLR2-AK-Inkubation.

Der in Abb. 3-24 dargestellte Versuch sollte die Wirkung der aufgenommenen kBAS-MP auf die Ausschüttung von TNF α näher beleuchten. Dazu wurden THP-1-Zellen mit einem anti-TLR2-Antikörper (TLR2-AK) vor der Stimulation inkubiert und dieser auch während

und nach der Einwirkung von BAS und kBAS-MP auf den Zellen belassen. Die durch freies BAS ($10 \text{ ng}/10^6 \text{ Zellen}$) ausgelöste $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung von 89 pg/ml konnte durch Einsatz des TLR2-AK vollständig gehemmt werden. Allerdings ließ sich die durch kBAS-MP ($300 \mu\text{g}/10^6 \text{ Zellen}$ entspricht $6 \text{ ng BAS}/10^6 \text{ Zellen}$) ausgelöste Zytokinproduktion von 149 pg/ml durch den TLR2-AK nur auf 69 pg/ml mindern, was eine Wirkung des MP-assoziierten BAS an intrazellulären TLR2 nahe legt.

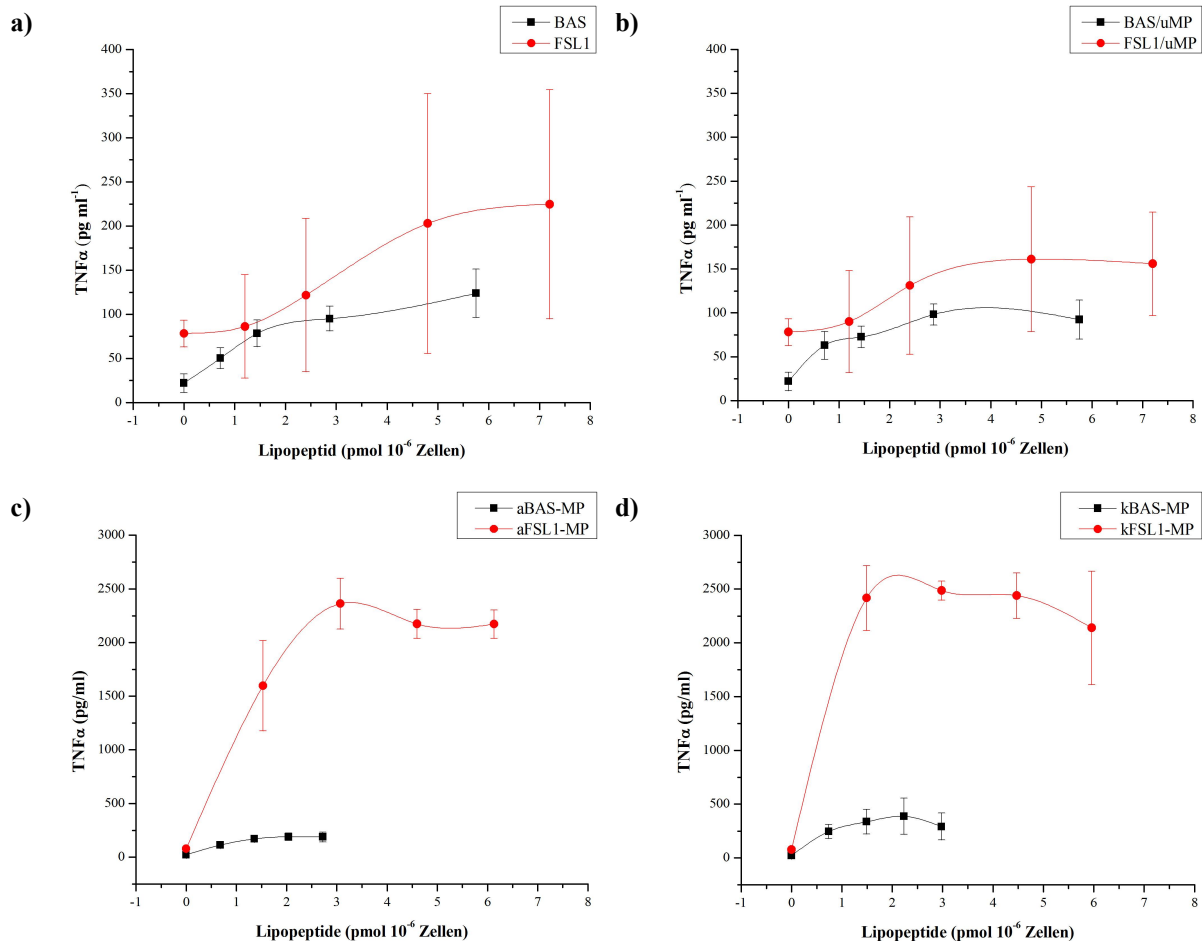


Abb. 3-25. Vergleich zwischen dem TLR2/1-Agonisten bzw. triacylierten LP BAS (schwarze Quadrate) und dem TLR2/6-Agonisten bzw. diacylierten LP FSL1 (rote Kreise). - **a)** gelöste LP; **b)** Mischung LP/uMP; **c)** aLP-MP; **d)** kLP-MP. MW \pm SD; BAS: n = 6; FSL1: n = 4.

Der Vergleich von BAS und FSL1 hinsichtlich der $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung zeigte für die freien LP (Abb. 3-25a) sowie für die Mischung aus LP und uMP (Abb. 3-25b) nur geringe Abweichungen, wobei die Werte für FSL1 hohe Standardabweichungen aufwiesen. Der Unterschied bei MP-assoziierten LP war deutlicher ausgeprägt, was sowohl für die adsorptiv (Abb. 3-25c) als auch für die kovalent (Abb. 3-25d) modifizierten LP-MP galt. Hier bewirkte

der TLR2/6-Agonist FSL1 über den gesamten Konzentrationsbereich von 0,6-6 pmol/10⁶ Zellen eine vielfach höhere TNF α -Sekretion als der TLR2/1-Agonist BAS.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass sowohl adsorptiv als auch kovalent mit TLR2-Agonisten modifizierte MP eine bis zu 20fach höhere Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF α durch THP-1-Zellen bewirkten, verglichen mit freiem Agonist alleine oder der Mischung aus freiem Agonisten und uMP. Auch konnte gezeigt werden, dass uMP nicht zu einer signifikant erhöhten Freisetzung führten. Die kovalente Modifizierung der MP zeigte gegenüber der adsorptiven eine erhöhte TNF α -Ausschüttung, die aber nur für 100 μ g/10⁶ Zellen BAS-MP signifikant war ($p < 0,05$). Das mikropartikulär assoziierte BAS zeigte eine geringere Potenz als das mikropartikulär assoziierte FSL1. Dabei waren aFSL1-MP verglichen mit aBAS-MP ca. 9-13fach potenter und kFSL1-MP verglichen mit kBAS-MP ca. 7-9fach stärker wirksam.

Die Zellviabilität wurde durch die freien LP deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht, wobei der Zusatz von uMP zu einer Hemmung der Viabilität führte. Allerdings führten MP-Konzentrationen zwischen 100-300 μ g/10⁶ Zellen zu noch tolerierbaren Zellviabilitäten von über ca. 80 %, wohingegen Konzentrationen von 400 μ g/10⁶ Zellen zytotoxischer waren.

Zusätzlich zu den oben besprochenen Versuchen zur TNF α -Ausschüttung, welche auf einer Bestimmung des Zytokins im Überstand der THP-1-Zellen mittels ELISA beruhten, wurden ELISPOTs durchgeführt, die die Ausschüttung der Zytokine pro Zelle bestimmen. Vorteil dieser Methode ist neben der erhöhten Empfindlichkeit, dass die Zytokine nach der Sekretion direkt an die Fänger-Antikörper binden können und somit vor einem Abbau im Zellüberstand geschützt sind.

Makrophagenartige THP-1-Zellen wurden hier ebenfalls für zwei Stunden mit den verschiedenen Stimuli inkubiert. Nach der Stimulation wurden die Zellen in die ELISPOT-Platten überführt und dort für weitere 16 Stunden serumfrei inkubiert. Danach erfolgte die Entwicklung der Platten. Neben TNF α wurde auch das proinflammatorische Zytokin IL6 bestimmt.

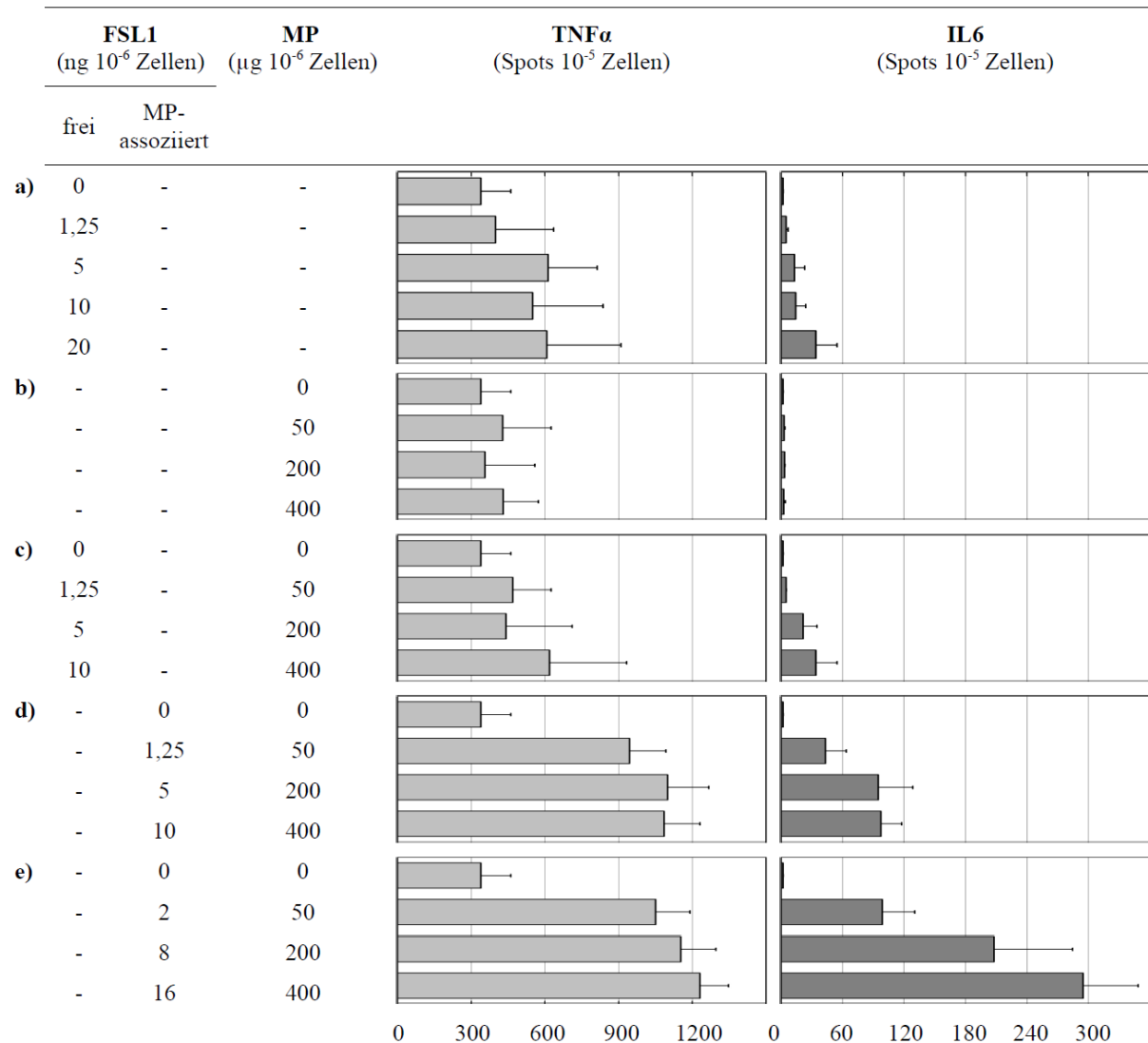


Abb. 3-26. TNFα- und IL6-ELISPOT von THP-1-Zellen in Abhängigkeit von folgenden Stimuli. - **a)** freies FSL1; **b)** uMP; **c)** uMP/FSL1; **d)** aFSL1-MP; **e)** kFSL1-MP. MW + SEM. Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Messwiederholungen pro Experiment.

Da sich FSL1-MP hinsichtlich der TNFα-Produktion (ELISA) potenter als BAS-MP erwiesen, wurden die ELISPOT-Versuche nur mit FSL1-MP durchgeführt. In Abb. 3-26 werden unstimulierte Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von freiem FSL1 (a), uMP (b), der Mischung aus freiem FSL1 und uMP (c), aFSL1-MP (d) sowie kFSL1-MP (e) hinsichtlich der Anzahl Zytokin-produzierender Zellen verglichen.

Bei dem Vergleich fällt die erhöhte Zellzahl an TNFα-sezernierenden unstimulierten Zellen (339 Spots/10⁵ Zellen) auf, während wenige Zellen IL6 ausschütteten (2 Spots/10⁵ Zellen). Aufgrund dessen sind die Effekte der Stimuli auf die IL6-Produktion deutlicher zu beobachten als der Einfluss auf die TNFα-Sezernierung.

Die ELISPOT-Versuche bestätigen die bei der Auswertung der ELISA-Versuche getroffenen Aussagen. Unmodifizierte MP zeigten für Konzentrationen von 50-400 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen im Mittel 357 bis 430 Spots/ 10^5 Zellen, was vergleichbar mit der TNF α -Sekretion durch unstimulierte Zellen war. Freies FSL1 oder uMP/FSL1 wiesen mit steigender Konzentration einen moderaten Anstieg an TNF α -sezernierenden Zellen auf, der 620 Spots/ 10^5 Zellen im Mittel nicht überschritt. Sowohl aFSL1-MP als auch kFSL1-MP führten zu einer Steigerung der Zytokin-produzierenden Zellen, die zwischen 940 und 1240 Spots/ 10^5 Zellen lag. Bei aFSL1-MP war im Vergleich mit kFSL1-MP die Anzahl der TNF α -ausschüttenden Zellen geringer, allerdings waren diese mit einer geringeren Menge an FSL1 assoziiert.

Hinsichtlich der IL6-Produktion durch THP-1-Zellen zeigten unstimulierte Zellen und uMP in allen drei Konzentrationen (50, 200 und 400 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen) eine vergleichbar niedrige Ausschüttung von ein bis vier Spots pro 10^5 Zellen. Die Stimulation der Zellen mit steigenden Konzentrationen an freiem FSL1 sowie der Mischung uMP/FSL1 führte jeweils zu einem Anstieg der IL6-sezernierenden Zellen, welcher 34 Spots/ 10^5 Zellen für die jeweils höchste getestete Konzentration, d. h. 20 ng/ 10^6 Zellen freies FSL1 sowie 10 ng/ 10^6 Zellen freies FSL1 plus 400 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen uMP, nicht überstieg. Bereits in der kleinsten getesteten Konzentration von 50 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen zeigten aFSL1-MP (43 Spots/ 10^5 Zellen) und kFSL1-MP (99 Spots/ 10^5 Zellen) einen höheren Anteil an IL6-produzierenden Zellen. In allen drei getesteten MP-Konzentrationen induzierten kFSL1-MP eine höhere IL6-Produktion als aFSL1-MP. Dieser Unterschied war für eine MP-Konzentration von 400 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen besonders deutlich, dabei zeigten kFSL1-MP mit 295 Spots/ 10^5 Zellen eine ca. dreifach höhere Zytokin-Ausschüttung als aFSL1-MP und eine neunfach höhere als die höchste getestete Konzentration von freiem FSL1 und von uMP/FSL1. Zu beachten ist die im Vergleich mit aFSL1-MP ungefähr zweifach höhere Beladung der kFSL1-MP mit FSL1.

Insgesamt bestätigen die ELISPOT-Versuche die ELISA-Versuche und zeigen neben TNF α auch für die Produktion eines weiteren proinflammatorischen Zytokins (IL6) eine Überlegenheit des MP-gebundenen LP FSL1 im Vergleich mit löslichem LP oder der Mischung aus freiem LP und uMP.

Diskussion

Die hier eingesetzten di- und triacylierten LP zeigten eine deutliche Steigerung der errechneten Zellviabilität im MTT-Test, die zum Teil das doppelte der Kontrolle erreichte. Der Test beruht auf der Umsetzung des gelben MTT zu violetten Formazankristallen, was durch mitochondriale Dehydrogenasen des Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems katalysiert wird (Mosmann 1983). Fotometrisch bestimmt werden die gelösten Formazankristalle bei ca. 550 nm. Da die Dehydrogenasen nur in lebenden Zellen aktiv sind, ist die Menge des gebildeten Formazans ein Maß für die Vitalität und Proliferation der Zellen. Die hier festgestellte Erhöhung der Zellviabilität ist wahrscheinlich auf den mitogenen Effekt von bakteriellen Lipoproteinen und ihren synthetischen Analoga zurückzuführen (Hoffman *et al.* 1988), der u. a. durch die Aktivierung von MAP-Kinasen vermittelt wird (Müller *et al.* 2001). Eine Reduktion der Zellviabilität durch LP-modifizierte PLGA-MP im Vergleich zu den gelösten LP ist vermutlich auf die Zytotoxizität der PLGA-MP zurückzuführen, die bei hohen Dosen für unmodifizierte PLGA-MP hier beobachtet wurde. Diese Vermutung wurde durch die Tatsache unterstützt, dass auch die Mischung aus gelösten LP und unmodifizierten PLGA-MP eine Reduktion der Zellviabilität verglichen mit gelösten LP verursachte.

Bisher sind nur wenige Studien zu TLR2-Agonist-modifizierten partikulären Antigen-Trägersystemen veröffentlicht, die deren Einfluss auf humane APC untersuchen (Bal *et al.* 2011, Espuelas *et al.* 2005, Heuking *et al.* 2009, Wessinger 2010). Bei den untersuchten Trägersystemen handelte es sich entweder um Liposomen (Bal *et al.* 2011, Espuelas *et al.* 2005, Wessinger 2010) oder Chitosan-NP, deren mittlere Teilchendurchmesser vorwiegend im Nanometer-Bereich lagen, wohingegen die hier verwendeten TLR2-Agonist-modifizierten PLGA-MP im unteren Mikrometer-Bereich anzusiedeln sind. In keiner der angeführten Untersuchungen konnte eine signifikante Überlegenheit hinsichtlich der Immunstimulation der TLR2-Agonist-modifizierten Trägersysteme im Vergleich mit gelöstem Agonisten gezeigt werden. Im Folgenden werden die diskussionsrelevanten Ergebnisse dargestellt, wobei auf Ergebnisse von DC-Versuchen erst in 3.2.5 eingegangen wird.

Heuking *et al.* (2009) verwendeten als Polymer partialsynthetisches 6-*O*-Carboxymethyl-*N,N,N*-trimethylchitosan an das der TLR2/1-Agonist Pam₃Cys über einen PEG-Spacer (NH₂-PEG-Pam₃Cys) kovalent gekoppelt wurde (CM25-TMC35-g-PEG-Pam₃Cys). Das nanopartikelartige Trägersystem wurde durch die Komplexierung des positiv geladenen Polymers mit negativ geladener Plasmid-DNA im Verhältnis 3:1 hergestellt. Die immunstimulatorische

Wirkung wurde anhand der IL8-Ausschüttung von PMA-differenzierten, makrophagenartigen THP-1-Zellen gemessen. Der gelöste Agonist NH₂-PEG-Pam₃Cys (2,6 µg/ml) verursachte in äquimolarer Menge eine ca. 4fach höhere Ausschüttung an IL8 (46,8 ng/ml) als das Polymer CM25-TMC35-g-PEG-Pam₃Cys (11,9 ng/ml). Das nanopartikuläre TLR2-Agonist-modifizierte Trägersystem bewirkte eine stärkere IL8-Ausschüttung (19 ng/ml) als das Polymer, die aber nicht an die des gelösten Agonisten heranreichte.

Wessinger (2010) modifizierte Liposomen mit dem TLR2/1-Agonist FSL1 und dem TLR2/6-Agonist BAS und untersuchte deren Einfluss auf die TNF α -Ausschüttung von PMA-differenzierten, makrophagenähnlichen THP-1-Zellen. Dabei verglich er FSL1-modifizierte Liposomen mit gelöstem FSL1, wobei die partikelgebundene Konzentration an FSL1 der freien entsprach (100 ng/ml). Gelöstes FSL1 bewirkte eine ca. 3,4fach höhere TNF α -Ausschüttung (465,83 pg/ml) als liposomal verkapseltes FSL1 (138,27 pg/ml). Ebenfalls verglichen wurden gelöstes BAS (10 ng/ml) und liposomal verkapseltes BAS in 10fach höherer Konzentration (100 ng/ml). Beide Proben zeigten eine gleichartige Ausschüttung von TNF α zwischen 104 bis 131 pg/ml. Eine Zytotoxizität der eingesetzten Formulierungen wurde nicht festgestellt.

Bal *et al.* (2011) inkorporierten das Antigen OVA und den TLR2/1-Agonisten PAM₃CysSK₄ in kationische Liposomen und untersuchten die TLR2-Aktivierung an CD14/TLR2-transfizierten HEK293-Zellen anhand der IL8-Ausschüttung. Liposomal verkapseltes PAM₃CysSK₄ musste in ca. 15fach höherer Konzentration eingesetzt werden, um eine mit gelöstem Agonisten vergleichbare IL8-Ausschüttung zu erreichen.

Im Gegensatz zu den nanopartikulären TLR2-Agonist-modifizierten Antigen-Trägersystemen, zeigten die in dieser Arbeit eingesetzten mikropartikulären TLR2-Agonist-modifizierten Antigen-Trägersysteme eine deutlich höhere TLR2-Aktivierung im Vergleich zu gelösten TLR2-Agonisten sowie zu der Mischung aus TLR2-Agonist und Antigen-Trägersystem. Ein Grund hierfür könnte eine Sedimentation der MP und damit eine höhere Konzentration der partikelgebundenen LP an den THP-1-Zellen auf dem Plattenboden sein. Nanopartikuläre Trägersysteme und gelöste LP hingegen verteilen sich aufgrund der Brownschen Molekularbewegung gleichmäßig im Überstand über den Zellen. Zudem werden die hier verwendeten PLGA-MP phagozytiert, während nanopartikuläre Trägersysteme unter 0,5 µm vorwiegend pinozytiert werden. Die intrazelluläre Prozessierung unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Aufnahme wesentlich, weshalb eine unterschiedliche intrazelluläre

„Verarbeitung“ zwischen nanopartikulären und mikropartikulären Trägersystemen anzunehmen ist, welche immunologisch auf die unterschiedlichen Reaktionen des Immunsystems gegenüber sehr kleinen Pathogenen, wie Viren, im Vergleich zu größeren Pathogenen, wie Bakterien, zurückzuführen ist (Burgdorf und Kurts 2008). So zeigten Rettig *et al.* 2010, dass nanopartikuläre Partikel aus ssRNA und Protamin unter 220 nm bei PBMC zu einer deutlich niedrigeren TNF α -Ausschüttung führten als 500 nm und 1200 nm große Partikel. Weiterhin ist TLR2 auch in Phagosomen von Makrophagen vorhanden bzw. wird nach der Bildung der Phagosomen dorthin rekrutiert (Ozinsky *et al.* 2000, Underhill *et al.* 1999), weshalb die phagozytierten TLR2-Agonist-modifizierten PLGA-MP auch nach der Internalisierung mit TLR2 interagieren können. Gestützt wird diese These durch die hier gezeigte Aktivierung von TLR2 durch TLR2/1-Agonist-modifizierte PLGA-MP bei gleichzeitigem Einsatz eines anti-TLR2-Antikörpers. Hingegen wurde die TLR2-Aktivierung bei gelöstem TLR2/1-Agonist durch den Antikörper vollständig inhibiert. Ferner zeigten Ip *et al.* 2010, dass für eine optimale Aktivierung von TLR2 in Makrophagen (TNF α -Ausschüttung) durch grampositive *Staphylococcus aureus* eine vorhergehende Phagozytose nötig ist. Im Gegensatz dazu benötigten gramnegative *Escherichia coli*, welche vorwiegend die TLR4-Agonisten LPS auf der Oberfläche tragen, und gelöste TLR-Agonisten keine Phagozytose für die Aktivierung. Allerdings wurde der freie TLR2-Agonist (LTA aus *S. aureus*) mit 2 μ g/ml in sehr hoher Konzentration eingesetzt (die maximale Arbeitskonzentration nach InVivogen beträgt 1 μ g/ml) und der Gehalt bzw. die Aktivität der TLR2-Agonisten in *S. aureus* war nicht bekannt, weshalb kein direkter Vergleich zwischen partikelgebundenen und freien TLR2-Agonisten möglich war. Nichtsdestotrotz demonstrierten Ip *et al.* (2010), dass für die bestmögliche TLR2-Aktivierung durch *S. aureus* eine Ansäuerung und Reifung der Phagosomen nötig ist, die eine Digestion der phagozytierten Bakterien und eine Freisetzung von TLR-Agonisten bewirken sollten.

Die hier durchgeführten Experimente mit TLR2-Agonist-modifizierten PLGA-MP belegen auch für synthetische Antigen-Trägersysteme, dass ein Teil der TLR2-Aktivierung auf die phagosomale Interaktion zwischen partikelgebundenen TLR2-Agonisten und intrazellulären TLR2 zurückzuführen ist. Zudem wurde hier erstmals gezeigt, dass MP-assoziierte TLR2/6-Agonisten (FSL1) eine deutlich höhere TLR2-Aktivierung bewirken als MP-assoziierte TLR2/1-Agonisten (BAS), während bei den gelösten Agonisten hinsichtlich der Wirksamkeit nur ein geringer Unterschied besteht. Dies lässt eine stärkere phagosomale

Expression oder eine erhöhte intrazelluläre Empfindlichkeit von TLR2/6 gegenüber TLR2/1 in makrophagenartigen THP-1-Zellen vermuten.

Aufgrund der Versuche mit THP-1-Zellen wurden für weiterführende Experimente an huMoDC vorwiegend mit diacylierten LP (TLR2/6-Agonisten) modifizierte PLGA-MP als Antigen-Trägersysteme ausgewählt, deren Nutzen in der DC-Immuntherapie im Folgenden näher untersucht wurde.

3.2.5 Versuche an huMoDC

Differenzierung, Reifung, TLR2-Expression und Zytokinprofil von huMoDC

Für die im Folgenden präsentierten Versuche wurden iDC *in vitro* aus Monozyten durch Inkubation mit GM-CSF und IL4 gewonnen und der Einfluss von TLR2-Agonisten bzw. TLR2-Agonist-modifizierten PLGA-MP auf die Reifung der iDC zu mDC untersucht, da mDC für eine effektive T-Zellstimulation und immunologische Eliminierung von Tumorzellen benötigt werden. Bei der Differenzierung werden die rundlichen Monozyten adhären und bilden Membranausstülpungen aus, die ein Kennzeichen der erhöhten Makropinozytose- und Phagozytoserate der iDC sind (Abb. 3-27). Nach der Reifung zu mDC wird die Aufnahme von extrazellulären Bestandteilen deutlich reduziert und es bilden sich charakteristische dendritische Ausläufer für die Interaktion mit T-Zellen. Zur Unterscheidung zwischen Monozyten, iDC und mDC wurde die Expression charakteristischer Oberflächenmarker auf den Zellen mittels FACS bestimmt (Abb. 3-27).

Aus peripherem Blut isolierte Monozyten weisen den Oberflächenmarker CD14 auf, welcher bei der Differenzierung zu iDC deutlich herunter reguliert wird und auf mDC fast vollständig verloren geht. Im Gegenzug dazu ist ein charakteristischer Marker von DC, der Oberflächenmarker CD209 oder DC-SIGN, auf Monozyten nicht vorhanden, wird aber auf iDC und mDC gleichermaßen exprimiert. Zur Beurteilung des Reifungszustandes der DC wurden das kostimulatorische Molekül CD86 und der Reifungsmarker CD83 bestimmt. CD86 wird auf Monozyten und iDC in geringem Maße exprimiert und ist nach der Reifung der DC verstärkt auf der Zelloberfläche zu finden. Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sind für die Bereitstellung des zweiten Signals bei der Aktivierung von T-Zellen nötig und daher auf mDC vorhanden (siehe 1.2.3). Zudem wird bei mDC der Reifungsmarker CD83 exprimiert, während er auf Monozyten und iDC fehlt.

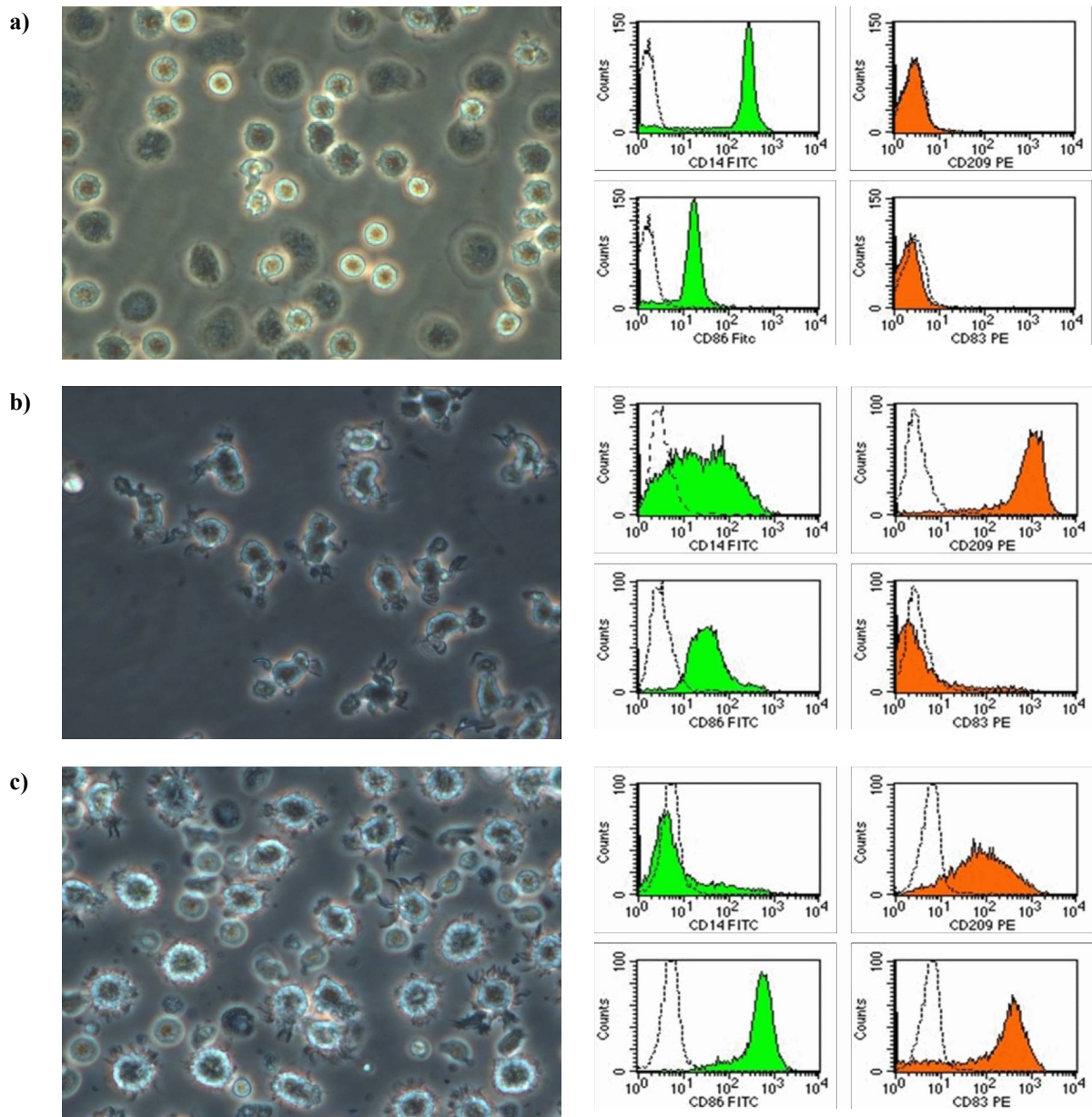


Abb. 3-27. Phänotypische Differenzierung von Monozyten **(a)** über iDC **(b)** zu mDC **(c)**. Links dargestellt sind die phasenkontrastmikroskopischen Bilder: Monozyten erscheinen rundlich und sind nicht adhären. Die Differenzierung mit GM-CSF/IL4 über 6 Tage zu iDC führt zur Adhärenz, Abflachung und Ausbildung von Membranausstülpungen (erhöhte Makropinozytose-Rate). Der Einsatz von Reifungsstimulanzen (Zytokincocktail) bewirkt die Einstellung der Makropinozytose und die Bildung der charakteristischen dendritischen Ausläufer für die Interaktion mit T-Zellen.

Rechts dargestellt sind die Veränderungen von charakteristischen Oberflächenmarkern anhand von FACS-Overlays. Gestrichelt dargestellt sind die Isotypenkontrollen, gefüllt dargestellt sind die Häufigkeitsverteilungen und Fluoreszenzintensitäten der Antikörper-markierten Zellen [Fluoreszenzmarker FITC (grün) und PE (orange)]: Monozyten sind CD14-positiv, zeigen eine niedrige Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 und exprimieren weder CD209 (DC-SIGN) noch den DC-Reifungsmarker CD83. Bei der Differenzierung zu iDC wird CD14 herunter und CD209 herauf reguliert. Die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD83 bleibt weiterhin niedrig und der DC-Reifungsmarker CD83 wird nicht auf der Zelloberfläche ausgebildet. Reife DC sind CD14-negativ und exprimieren CD209, CD86 und CD83, wobei CD86 im Vergleich zu iDC deutlich erhöht und CD209 geringfügig erniedrigt ist.

Gegebenenfalls wurden auch die Oberflächenmoleküle HLA-DR und CD1a bestimmt. Das MHC-II-Molekül HLA-DR ist mitverantwortlich für die Präsentation von Proteinantigenen an T-Zellen und stellt bei Übereinstimmung von präsentem Antigenfragment und antigenspezifischen T-Zellrezeptor das erste Signal für die T-Zellaktivierung bereit (siehe 1.2.3). CD1a ist hingegen für die Präsentation von Lipid- oder Glykolipidantigenen an T-Zellen verantwortlich und wird bei der Reifung der DC häufig herunter reguliert. Chang *et al.* zeigten 2000, dass CD1a⁺-mDC eine für die Tumorummuntherapie gewünschte T_H1-Polarisation bewirkten, während CD1a⁻-mDC eine hier unerwünschte T_H0/T_H2-Polarisation initiierten.

Der Oberflächenmarker CCR7 wird ebenfalls bei der Reifung vermehrt exprimiert und ist für die Wanderung von DC aus der Peripherie zu den T-Zellzonen der sekundären lymphatischen Gewebe mitverantwortlich.

TLR2 stellt die Zielstruktur für die hier untersuchten TLR2-Agonist-modifizierten PLGA-MP dar. Dieser wird bei der Differenzierung von Monozyten zu iDC nur noch vermindert auf der Zelloberfläche und fast ausschließlich intrazellulär exprimiert (Chua *et al.* 2008; Wessinger 2010, S. 102-105). Uronen-Hansson *et al.* (2004a) zeigten, dass sowohl intrazellulärer TLR4 als auch intrazellulärer TLR2 in iDC vorwiegend perinukleär exprimiert werden. Dabei befanden sich die Rezeptoren in unmittelbarer Nähe zum Golgi-Apparat und zum Zentrosom. Die TLR waren mit den Mikrotubuli assoziiert, was einen Transport von TLR-haltigen Vesikeln in der Zelle nahelegte. Eine Depolymerisation der Mikrotubuli durch ColcemidTM führte ebenfalls zur Zerstörung der TLR-haltigen Vesikel und zu einer verminderten IL12-Ausschüttung, die durch *Neisseria meningitidis* ausgelöst wurde. Die Phagozytose von TLR2- und TLR4-Agonist-haltigen *Neisseria meningitidis* war für eine optimale Ausschüttung von IL12 und TNF α nötig (Uronen-Hansson *et al.* 2004b). Allerdings wurde das Zellkompartiment für die TLR2-Agonist-TLR2-Interaktion nicht genau bestimmt. Bei Makrophagen ist die Rekrutierung von TLR2 in Phagosomen nach der Phagozytose von Pathogenen hingegen bereits bekannt (Ozinsky *et al.* 2000, Underhill *et al.* 1999). Daher wurde eine stärkere Reifung der DC durch partikelgebundene TLR2-Agonisten, welche intrazellulär mit TLR2 interagieren können, im Vergleich zu gelösten Agonisten vermutet, was in den folgenden Experimenten evaluiert werden sollte. Zudem sollte die intrazelluläre Expression von TLR2, die Assoziation des TLR2/6-Agonisten FSL1-bio auf der MP-

Oberfläche und die Aufnahme von kovalent mit FSL1-bio modifizierten PLGA-MP (kFSL1-bio-MP) mit Hilfe der CLSM untersucht werden.

Weiterhin sollte das Zytokinprofil der huMoDC nach Inkubation mit TLR2-Agonist-modifizierten PLGA-MP mittels ELISPOT bestimmt werden, da u. a. Zytokine das dritte Signal für die Aktivierung von T-Zellen bereitstellen und die Ausprägung der Immunantwort beeinflussen (siehe 1.2.5). Hierbei waren v. a. der Einfluss der huMoDC auf die T-Zellpolarisation anhand des Verhältnisses von IL12p70 zu IL10 zu ermitteln. Eine IL12-Ausschüttung bewirkt hierbei eine T_H1 -Polarisation während IL10 eine T_H2 - bzw. T_{reg} -Polarisation vermittelt (siehe 1.2.5). Zudem wurde die $TNF\alpha$ -Ausschüttung gemessen, da dieses Zytokin für die Entzündungsreaktion nach TLR2-Aktivierung durch Bakterien mitverantwortlich ist und über die nachgeschaltete Aktivierung von CTL und die Ausschüttung von IL6 die T_H1 -Antwort unterstützen kann (Pasare und Medzhitov 2003).

BAS-modifizierte PLGA-MP

Der Einfluss von kBAS-MP auf iDC wurde im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle, iDC), uMP (Kontroll-MP), freiem BAS in äquimolarer Konzentration zu MP-gebundenem BAS sowie zu BAS in höherer Konzentration (10 nM) bestimmt. Nach einer sechsstündigen Primärstimulation erfolgte ggf. eine Sekundärstimulation der Zellen mit LPS R60 und $IFN\gamma$, um die Reifungsfähigkeit zu überprüfen.

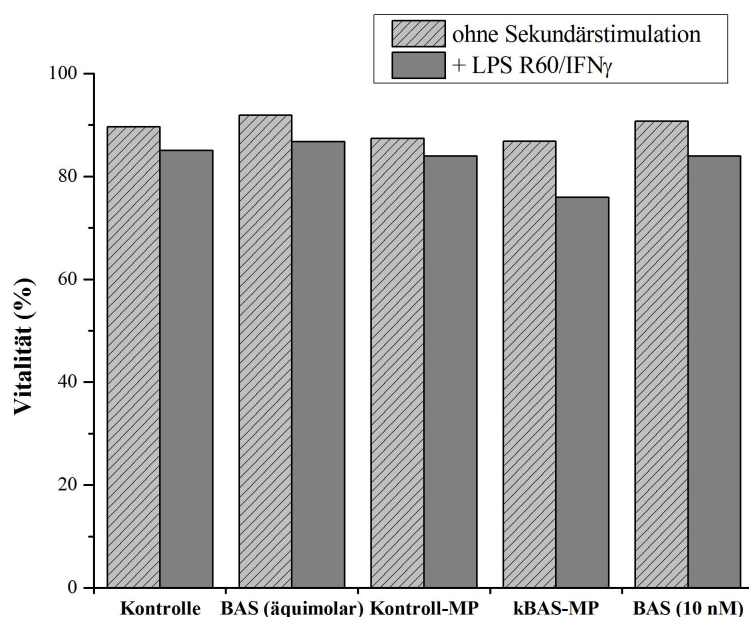


Abb. 3-28. Prozentualer Anteil an vitalen huMoDC (bezogen auf die Gesamtzellzahl) nach Primärstimulation mit BAS (äquimolar: 1,2 ng/ml), Kontroll-MP (50 μ g/ml), kBAS-MP (50 μ g/ml) oder BAS (10 nM: 28 ng/ml). Nach sechs Stunden Primärstimulation erfolgte entweder keine (hellgrau, gestreift) oder eine Sekundärstimulation mit LPS R60 und $IFN\gamma$ (dunkelgrau).

Keiner der Versuchsansätze zeigte eine ausgeprägte Zytotoxizität oder einen stimulierenden Einfluss auf die Zellviabilität (Abb. 3-28), wie er im ersten Fall für hohe uMP-Konzentrationen und im zweiten Fall für LP bei THP-1-Zellen zu beobachten war (vergleiche 3.2.4).

Die Phänotypisierung der Zellen zeigte, dass eine Differenzierung von Monozyten zu huMoDC erfolgt war, da CD14 bei allen Versuchsansätzen deutlich erniedrigt war (Abb. 3-29a) und CD209 in hohem Maße exprimiert wurde (Abb. 3-29b). Eine Rückdifferenzierung der Zellen nach der Behandlung mit BAS-haltigen Formulierungen sowie mit uMP konnte somit ausgeschlossen werden. Nach der Primärstimulation zeigten kBAS-MP (7,0 %) und in hoher Konzentration eingesetztes BAS (7,5 %) eine ca. halb so große Expression von CD14 wie unbehandelte iDC (16,8 %), während für äquimolares BAS (14,8 %) und uMP (12,2 %) der Unterschied niedriger ausfiel. Die geringe Expression von CD14 auf huMoDC wurde durch die Sekundärstimulation mit LPS R60 und IFN γ nochmals in allen Versuchsansätzen erniedrigt (≤ 1 %).

Die Reifung der iDC zu mDC wurde anhand der Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 (Abb. 3-29c) und des Reifungsmarkers CD83 (Abb. 3-29d) beurteilt. CD86 wurde in allen Versuchsansätzen nach der Primärstimulation in geringem Maße exprimiert (≤ 10 %). Mikropartikuläre Formulierungen zeigten dabei eine mit unbehandelten Zellen (3,8 %) vergleichbare Expression. Hingegen zeigten äquimolares (7,0 %) und in hoher Konzentration eingesetztes gelöstes BAS (8,5 %) eine ca. doppelt so hohe CD86-Expression wie die Kontrolle. Durch die Sekundärstimulation mit LPS R60 und IFN γ wurde in allen Versuchsansätzen die Ausprägung von CD86 deutlich auf Werte zwischen 55-70 % erhöht. Die behandelten Zellen besaßen also die Fähigkeit zur vermehrten Expression des kostimulatorischen Moleküls. Dies konnte aber durch die eingesetzten LP-haltigen Formulierungen nicht bzw. nur ungenügend erreicht werden.

Ergebnisse und Diskussion

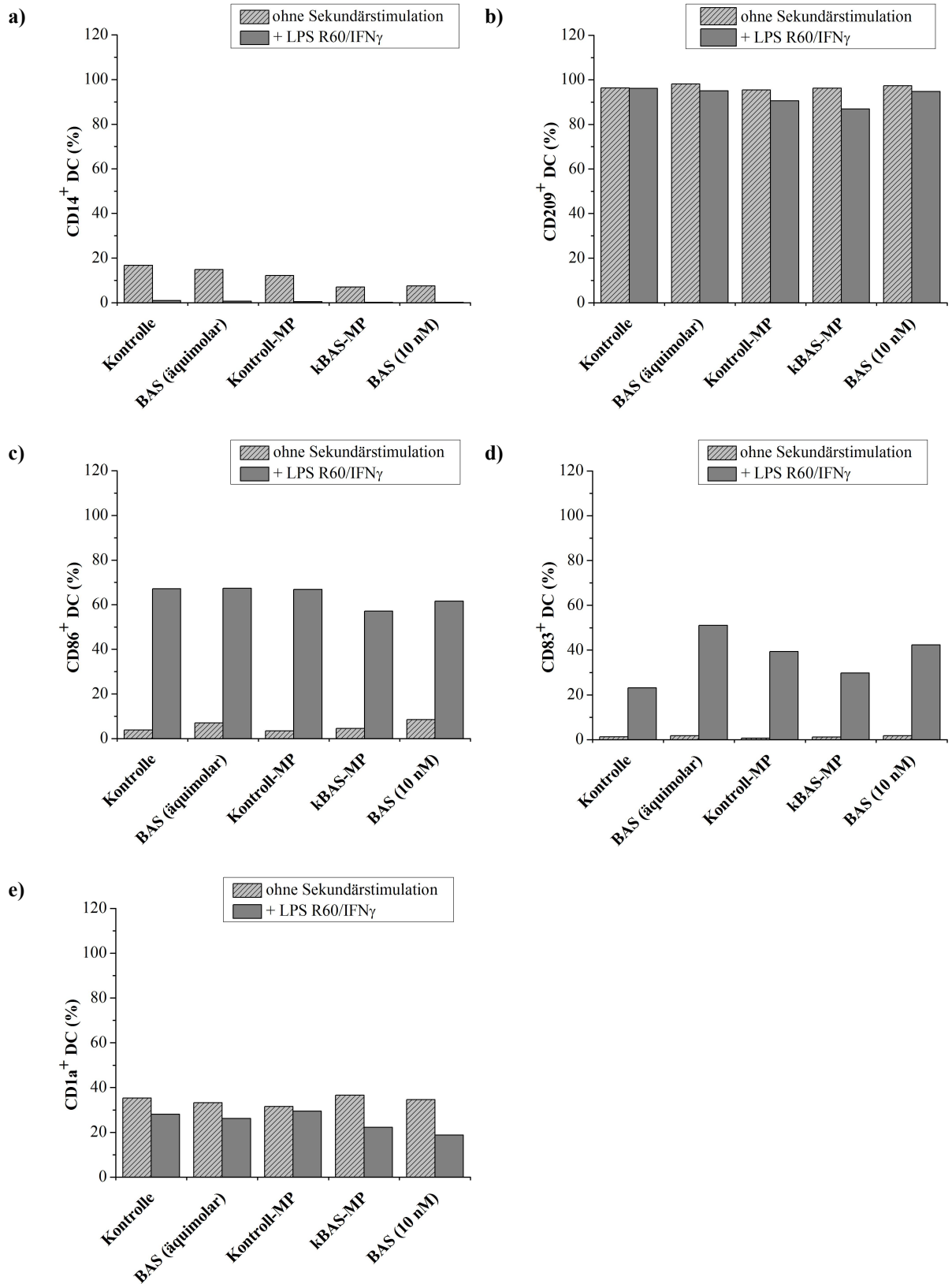


Abb. 3-29. Expression charakteristischer Marker von huMoDC nach Primärstimulation mit BAS (äquimolar: 1,2 ng/ml), Kontroll-MP (50 μ g/ml), kBAS-MP (50 μ g/ml) oder BAS (10 nM: 28 ng/ml). Nach sechs Stunden Primärstimulation erfolgte entweder keine (hellgrau, gestreift) oder eine Sekundärstimulation mit LPS R60 und IFN γ (dunkelgrau). - **a)** CD14; **b)** CD209; **c)** CD86; **d)** CD83; **e)** CD1a.

Die CD83-Expression war in allen Versuchsansätzen nach der Primärstimulation ebenfalls gering ($\leq 2\%$). Die Sekundärstimulation führte zu einem Anstieg der Expression auf 23-51 %. Dabei zeigten mit LPS R60 und IFN γ behandelte iDC den geringsten Anstieg (23 %), was eine niedrige Reifungsfähigkeit der iDC vermuten lässt. Gelöstes BAS in äquimolarer (51 %) und hoher Konzentration (42 %) zeigten im Vergleich zu Kontroll-MP (39 %) und kBAS-MP (30 %) eine höhere CD83-Expression nach Sekundärstimulation. Die Primärstimulation mit gelösten LP führte somit zu einem höheren Reifungsgrad nach der Sekundärstimulation.

CD1a wurde gleichermaßen in allen Versuchsansätzen exprimiert (30-40 %, Abb. 3-29e) und durch die Sekundärstimulation lediglich bei kBAS-MP und gelöstem BAS (10 nM) um ca. 15 % gesenkt, während bei allen anderen Ansätzen die Reduktion niedriger ausfiel (Senkung um 2-7 %).

Insgesamt zeigten die mit BAS durchgeführten Versuche an huMoDC keine Überlegenheit des mikropartikelgebundenen Agonisten gegenüber der gelösten Form. BAS alleine war in keiner Formulierung in der Lage eine Reifung der iDC zu mDC zu bewirken. Die Differenzierung von Monozyten zu huMoDC blieb durch die Behandlung mit LP-haltigen Formulierungen erhalten und diese zeigten, ebenso wie uMP, keine zytotoxischen Eigenschaften. Die Reifungsfähigkeit der iDC wurde durch die eingesetzten Formulierungen nicht beeinträchtigt. Mit gelöstem BAS behandelte iDC wiesen einen höheren Reifungsgrad als unbehandelte Zellen nach der Sekundärstimulation auf.

FSL2-modifizierte PLGA-MP

FSL2 ist ein diacyliertes LP und ein Agonist an TLR2/6. Da in Versuchen mit THP-1-Zellen MP-assoziiertes FSL1 deutlich potenter als MP-assoziiertes BAS war (vergleiche 3.2.4), sollte v. a. der Einfluss von diacylierten LP auf huMoDC untersucht werden. Hierfür wurden kovalent mit FSL2 modifizierte PLGA-MP (kFSL2-MP) mit unbehandelten Zellen (Kontrolle, iDC), uMP (Kontroll-MP), freiem FSL2 in äquimolarer Konzentration zu MP-assoziiertem FSL2 und einem Zytokincocktail, der eine Reifung von iDC zu mDC bewirkte, verglichen. Gegebenenfalls erfolgte nach der Primärstimulation eine Sekundärstimulation mit LPS R60 und IFN γ , um die Reifungsfähigkeit und die Induktion einer Zytokinausschüttung zu überprüfen.

Alle untersuchten Formulierungen waren nicht zytotoxisch (Abb. 3-30). Dabei war es unerheblich, ob nur eine Primär- oder auch einer Sekundärstimulation erfolgte.

Die Phänotypisierung der behandelten Zellen zeigte eine deutliche Expression von CD209 ($\geq 89\%$) in allen Versuchsansätzen, die auch nach der Sekundärstimulation erhalten blieb (Abb. 3-31a). Somit konnte eine Entdifferenzierung der huMoDC durch die Behandlung mit LP, uMP oder durch eine zusätzliche Reifungsstimulation mit LPS R60 und $\text{IFN}\gamma$ ausgeschlossen werden. Der Oberflächenmarker CD1a (Abb. 3-31b) wurde ebenfalls bei allen Versuchsansätzen von den DC exprimiert (43-50%). Der Abfall durch die nachträgliche Reifung mit LPS R60 und $\text{IFN}\gamma$ war vernachlässigbar gering.

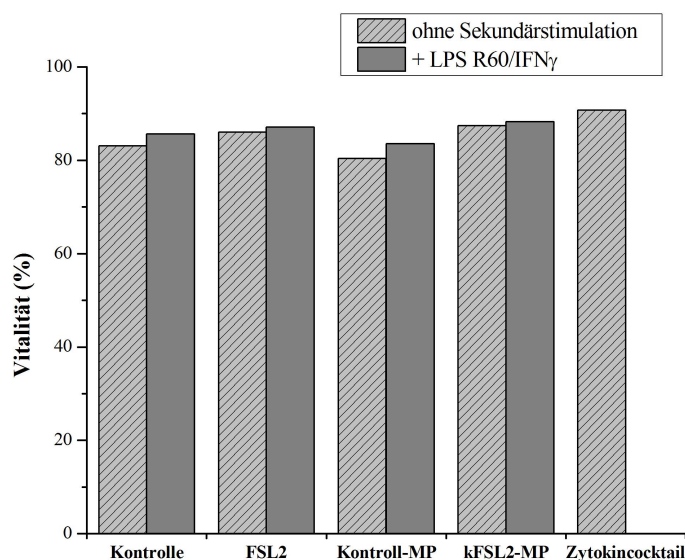


Abb. 3-30. Prozentualer Anteil an vitalen huMoDC (bezogen auf die Gesamtzellzahl) nach Primärstimulation mit FSL2 (2,47 ng/ml), Kontroll-MP (100 $\mu\text{g/ml}$), kFSL2-MP (100 $\mu\text{g/ml}$) oder einem Zytokincocktail (Jonuleit + $\text{IFN}\gamma$). Nach sechs Stunden Primärstimulation erfolgte entweder keine (hellgrau, gestreift) oder eine Sekundärstimulation mit LPS R60 und $\text{IFN}\gamma$ (dunkelgrau). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Versuchen.

Die Expression des Reifungsmarkers CD83 (Abb. 3-31c) war bei allen mikropartikulären und FSL2-haltigen Formulierungen sehr gering ($< 2\%$). Hierbei zeigten kFSL2-MP (1,9%) eine ca. zweifach höhere Expression verglichen mit unbehandelten Zellen (1,1%). Die durch einen Zytokincocktail gereiften DC (Positiv-Kontrolle) exprimierten zu ca. 57% CD83. Eine Reifung der iDC zu mDC durch gelöstes FSL2 und kFSL2-MP erfolgte nicht. Die Reifungsfähigkeit der behandelten Zellen blieb erhalten, da durch die Sekundärstimulation in allen untersuchten Versuchsansätzen 75-82% der DC CD83 exprimierten, wobei kein wesentlicher Unterschied zwischen FSL2-haltigen Ansätzen und unbehandelten sowie mit Kontroll-MP behandelten Zellen gefunden wurde.

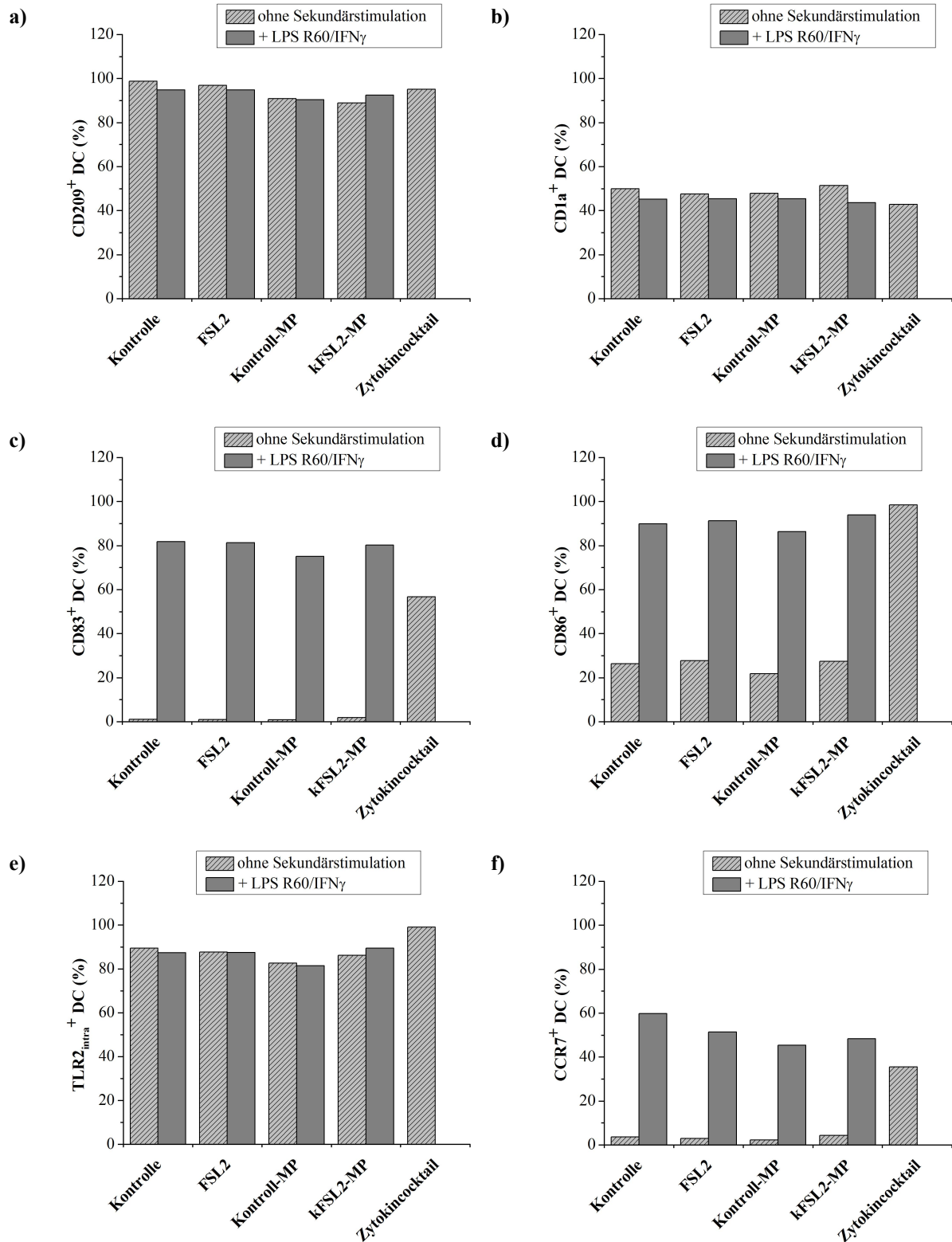


Abb. 3-31. Expression charakteristischer Marker von huMoDC nach Primärstimulation mit FSL2 (2,47 ng/ml), Kontroll-MP (100 µg/ml), kFSL2-MP (100 µg/ml) oder einem Zytokincocktail (Jonuleit + IFN_γ). Nach sechs Stunden Primärstimulation erfolgte entweder keine (hellgrau, gestreift) oder eine Sekundärstimulation mit LPS R60 und IFN_γ (dunkelgrau). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Versuchen. - a) CD209; b) CD1a; c) CD83; d) CD86; e) intrazellulärer TLR2; f) CCR7.

Eine Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 (Abb. 3-31d) erfolgte in allen Versuchsansätzen, wobei unbehandelte sowie mit gelöstem FSL2, Kontroll-MP und kFSL2-MP behandelte Zellen nur ca. 22-28 % CD86⁺-DC aufwiesen, während die Positiv-Kontrolle (Zytokincocktail) ca. 99 % CD86⁺-DC zeigte. Durch eine Sekundärstimulation mit LPS R60 und IFN γ war aber in Zellen mit niedriger CD86-Expression eine hohe Expression von 86-94 % auslösbar.

Da sowohl BAS-haltige als auch FSL2-haltige Formulierungen eine ungenügende Reifung von iDC zu mDC bewirkten, sollte die Zielstruktur TLR2 in den DC vor und nach der Reifung bestimmt werden (Abb. 3-31e). Dabei zeigten alle Zellen eine intrazelluläre Expression des TLR2 von über 82 % unabhängig vom Reifungsgrad oder den eingesetzten Formulierungen. Somit war TLR2 in den Zellen vorhanden und konnte als Ursache für die ungenügende Reifung ausgeschlossen werden.

Die Expression des Chemokin-Rezeptors CCR7 (Abb. 3-31f), welcher bei der Reifung herauf reguliert wird, lag sowohl bei unbehandelten Zellen als auch mit Kontroll-MP, gelöstem FSL2 und kFSL2-MP behandelten Zellen unter 5 %. Hingegen zeigte die Positiv-Kontrolle (Zytokincocktail) ca. 36 % CCR7⁺-DC. Die CCR7-Expression war durch eine Sekundärstimulation induzierbar und lag dann zwischen 45 und 60 %.

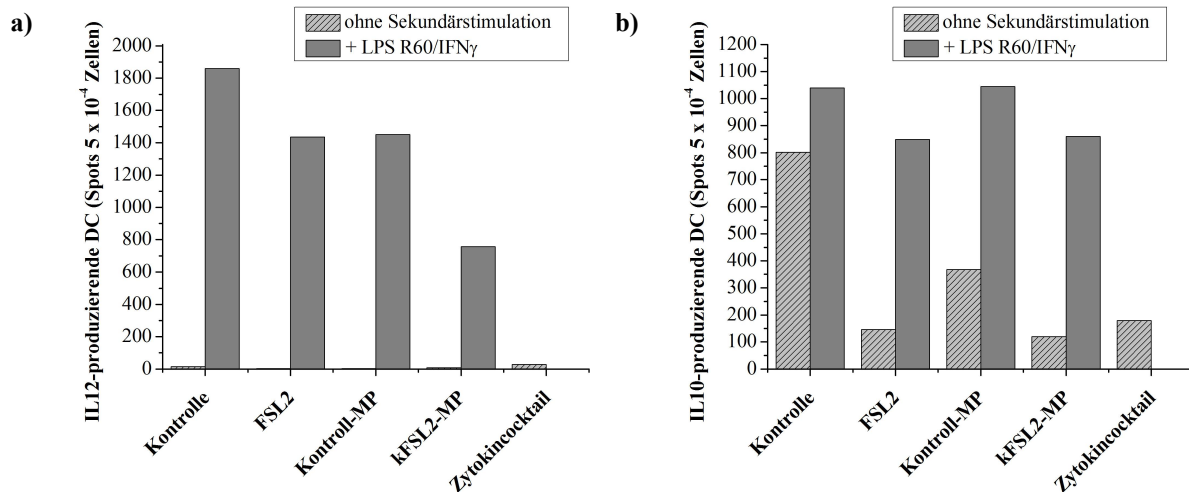


Abb. 3-32. Zytokinprofil von huMoDC nach Primärstimulation mit FSL2 (2,47 ng/ml), Kontroll-MP (100 μ g/ml), kFSL2-MP (100 μ g/ml) oder einem Zytokincocktail (Jonuleit + IFN γ). Nach sechs Stunden Primärstimulation erfolgte entweder keine (hellgrau, gestreift) oder eine Sekundärstimulation mit LPS R60 und IFN γ (dunkelgrau). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Versuchen. - **a)** IL12p70; **b)** IL10.

Da die DC nach der Inkubation mit FSL2-haltigen Formulierungen ihre Reifungsfähigkeit behielten und somit eine Sekundärstimulation zu den für die Immuntherapie gewünschten

mDC führte, sollte im Folgenden der Einfluss der Formulierungen auf das Zytokinprofil der DC vor und nach der Sekundärstimulation untersucht werden (Abb. 3-32).

Hierbei zeigten alle Versuchsansätze ohne Sekundärstimulation eine niedrige IL12-Produktion von unter 30 Spots/10⁴ Zellen (Abb. 3-32a). Die IL12-Ausschüttung blieb durch LPS R60/IFN γ induzierbar, wobei Ansätze mit gelöstem FSL2 (1436 Spots/10⁴ Zellen), Kontroll-MP (1452 Spots/10⁴ Zellen) und kFSL2-MP (757 Spots/10⁴ Zellen) eine im Vergleich zu unbehandelten Zellen (1860 Spots/10⁴ Zellen) verminderte IL12-Produktion zeigten. Dieser Effekt war für kFSL2-MP am ausgeprägtesten und führte zu einer um das 2,5fache erniedrigten IL12-Produktion.

Die IL10-Produktion wurde durch Kontroll-MP, Zytokincocktail, gelöstes FSL2 und kFSL2-MP im Vergleich zu unbehandelten Zellen gesenkt (Abb. 3-32b). Dabei zeigten FSL2-haltige Formulierungen die stärkste Hemmung der IL10-Ausschüttung. Gelöstes FSL2 verminderte diese um das ca. 5,5fache und kFSL2-MP um das 6,7fache. Durch die Sekundärstimulation nahm die IL10-Ausschüttung zu, der hemmende Effekt der FSL2-haltigen Formulierungen blieb aber erhalten. In Abb. 3-33 dargestellt ist die IL10-Produktion von DC nach Sekundärstimulation im ELISPOT mit LPS R60/IFN γ in Abhängigkeit von der Kontroll- und kFSL2-MP-Konzentration. Hier zeigten kFSL2-MP mit ansteigender Konzentration von 3,3-100 μ g/ml eine zunehmende Hemmung der IL10-Ausschüttung, während Kontroll-MP eine vergleichsweise geringere IL10-Hemmung zeigten, die nicht konzentrationsabhängig war.

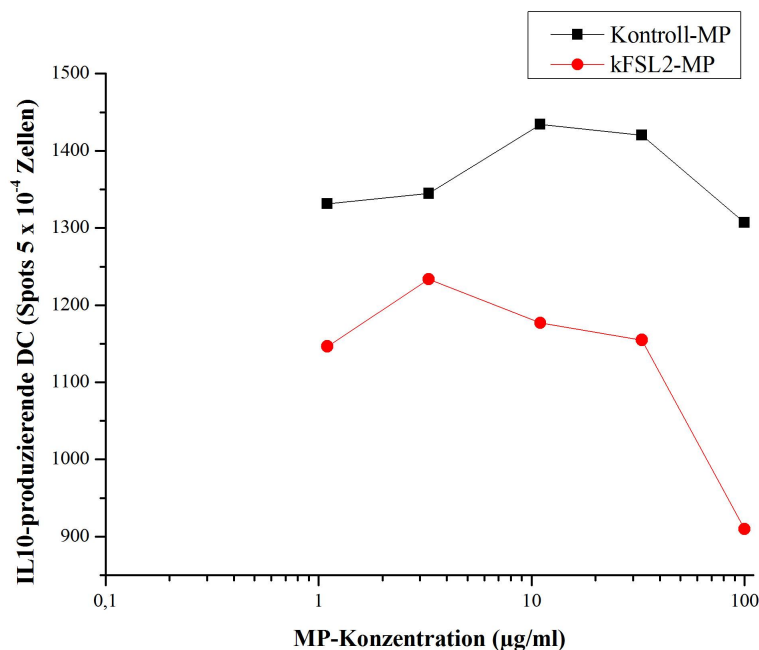


Abb. 3-33. Hemmung der LPS-induzierten IL10-Produktion von huMoDC durch kFSL2-MP (rote Kreise) im Vergleich zu Kontroll-MP (schwarze Quadrate). Nach der Primärstimulation mit MP erfolgte im ELISPOT eine Sekundärstimulation mit LPS R60/IFN γ .

Das Zytokinprofil der primärstimulierten DC wurde ebenfalls nach einer Sekundärstimulation mit $\text{IFN}\gamma$ im ELISPOT bestimmt (Abb. 3-34). Hierbei fehlt der reifungstimulierende Effekt des LPS und es wird nur das Potenzial der behandelten DC zur Zytokinausschüttung nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation erhalten. Die Ausschüttung von $\text{IFN}\gamma$ kann *in vivo* z. B. durch aktivierte $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen erfolgen. Dadurch kann die Zytokinausschüttung von DC gefördert werden. In den hier durchgeführten Versuchen sollte evaluiert werden, ob die DC nach der Primärstimulation noch in der Lage sind Zytokine, v. a. IL12, auszuschütten oder ob die Zytokinausschüttung nicht mehr induzierbar ist („Paralyse“, vergleiche 1.2.5).

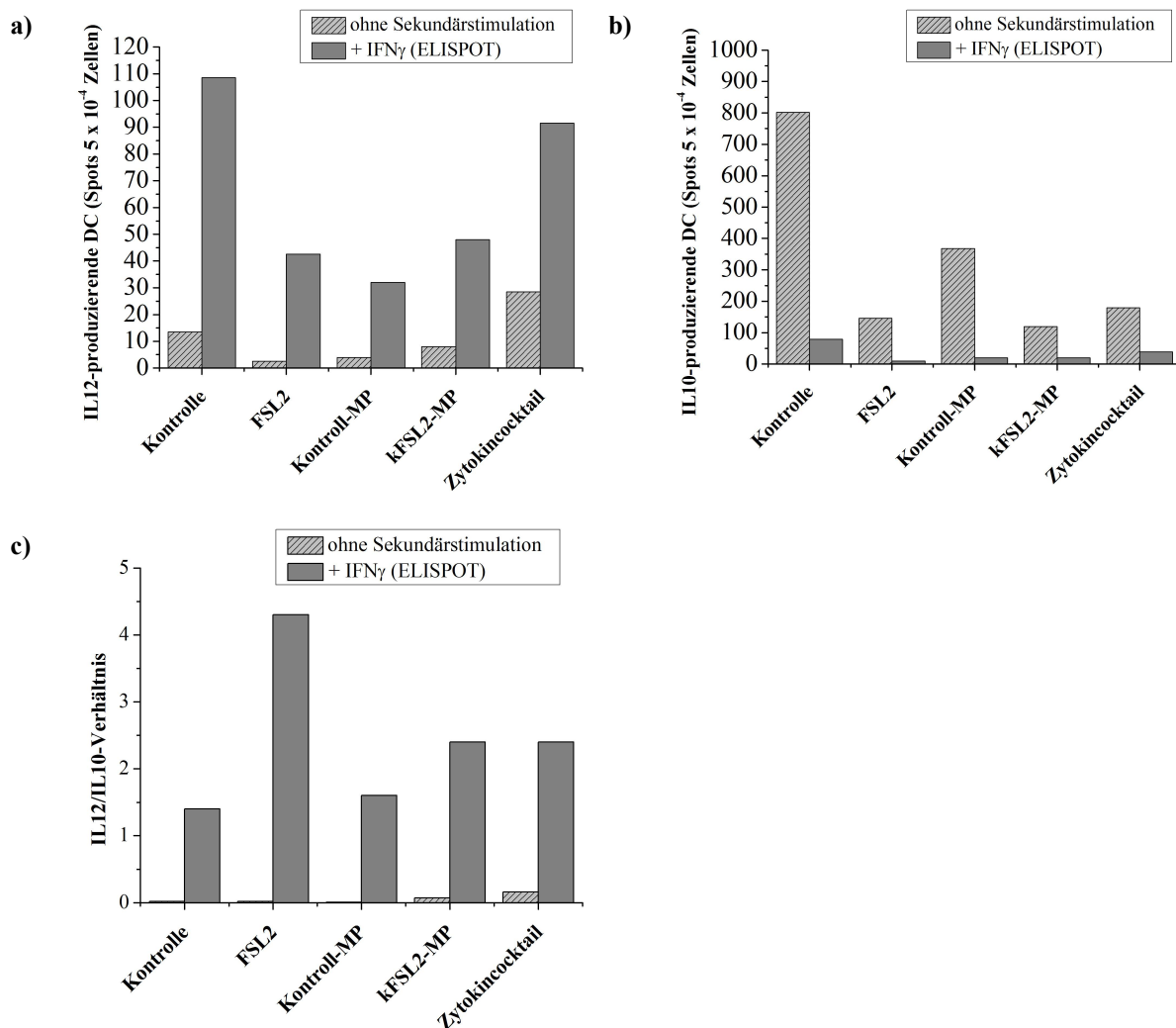


Abb. 3-34. Zytokinprofil von huMoDC nach Primärstimulation mit FSL2 (2,47 ng/ml), Kontroll-MP (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), kFSL2-MP (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder einem Zytokincocktail (Jonuleit + $\text{IFN}\gamma$). Nach der Primärstimulation erfolgte im ELISPOT entweder keine (hellgrau, gestreift) oder eine Sekundärstimulation mit $\text{IFN}\gamma$ (dunkelgrau). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Versuchen. - **a)** IL12p70; **b)** IL10; **c)** IL12/IL10-Verhältnis.

Die Ausschüttung von IL12 blieb durch die Sekundärstimulation mit IFN γ induzierbar (Abb. 3-34a). Allerdings sprachen mit Kontroll-MP und FSL2-haltigen Formulierungen behandelte DC weniger stark als unbehandelte oder mit einem Zytokincocktail behandelte Zellen auf die IFN γ -Stimulation an. Besonders ausgeprägt war der Effekt für Kontroll-MP, die eine ca. 3,4fach niedrigere IL12-Ausschüttung zeigten als die unbehandelte Kontrolle. Die IL10-Produktion wurde durch die IFN γ -Stimulation in allen Versuchsansätzen gehemmt (Abb. 3-34b), wobei die vorher beobachtete Hemmung der IL10-Produktion durch FSL2-haltige Formulierungen auch nach der IFN γ -Stimulation vorhanden war. Das IL12/IL10-Verhältnis (Abb. 3-34c) war somit für gelöstes FSL2 (4,3) aufgrund der effektiven IL10-Hemmung am höchsten und betrug ca. das dreifache der Kontrolle (1,4). Mit einem Zytokincocktail und kFSL2-MP behandelte Zellen zeigten nach der IFN γ -Stimulation ein analoges IL12/IL10-Verhältnis von 2,4. Kontroll-MP (1,6) waren vergleichbar mit unbehandelten Zellen.

Zusammengefasst konnte in den hier durchgeführten Versuchen mit huMoDC keine Überlegenheit von MP-assoziiertem FSL2 gegenüber der gelösten Form gefunden werden. Formulierungen mit FSL2 führten nicht zur Reifung von iDC und zeigten dementsprechend keine Unterschiede zu Formulierungen mit BAS. In unbehandelten sowie in behandelten Zellen wurde die intrazelluläre Expression von TLR2 nachgewiesen, weshalb die ungenügende Wirksamkeit der LP nicht auf ein Fehlen des Zielrezeptors zurückzuführen war. Die Reifungsfähigkeit der primärstimulierten DC blieb erhalten und eine Reifung zu mDC konnte durch die Sekundärstimulation mit LPS R60 und IFN γ erreicht werden. Die Untersuchung des Zytokinprofils nach der Sekundärstimulation ergab eine verminderte Ausschüttung von IL12 gegenüber der Negativ- und Positiv-Kontrolle bei Einsatz von FSL2-haltigen Formulierungen, wobei Kontroll-MP eine vergleichbar niedrige Sekretion zeigten. Für die IL10-Ausschüttung wurde eine Hemmung durch gelöstes und partikelgebundenes FSL2 nachgewiesen, die auch bei einer Sekundärstimulation mit LPS R60/IFN γ erhalten blieb. Die mit FSL2-haltigen Formulierungen behandelten DC zeigten auch nach alleiniger Stimulation mit IFN γ die Fähigkeit zur IL12-Ausschüttung, d. h. eine „Paralyse“ oder „Auszehrung“ der Zellen konnte nicht festgestellt werden. In Zusammenhang mit der Hemmung der IL10-Sekretion zeigten mit FSL2-haltigen Formulierungen behandelte Zellen ein T_H1-polarisierendes Zytokinprofil (IL12/IL10-Verhältnis), das für gelöstes FSL2 am ausgeprägtesten war.

FSL1-modifizierte PLGA-MP – CLSM-Untersuchungen

Da sowohl tri- als auch diacylierte LP unabhängig von der Formulierung zu keiner Reifung von iDC geführt hatten, sollte in den nachfolgenden Versuchen mit gelöstem FSL1-bio und FSL1-bio-modifizierten PLGA-MP die Aufnahme des LP und die Expression des TLR2 in Monozyten, iDC und mDC mit Hilfe der CLSM untersucht werden. Dazu wurden die Zellen zunächst mit gelöstem FSL1-bio oder kFSL1-bio-MP inkubiert, dann fixiert, permeabilisiert und geblockt. Danach wurde das FSL1-bio durch Streptavidin-Atto 590 (SAV-Atto 590) fluoreszenzmarkiert (rot dargestellt) und die Zellen mit einem Primärantikörper gegen TLR2 inkubiert, der mit einem Alexa Fluor® 488-gelabeltem Sekundärantikörper (Alexa 488-SA, grün dargestellt) fluoreszenzmarkiert wurde, um die Expression des Rezeptors im Vergleich zum LP zu zeigen.

In Abb. 3-35 dargestellt sind Monozyten, wobei Abb. 3-35a die Kontrollfärbung ohne FSL1-bio und Primärantikörper zeigt. Der Zellkern wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt (blau dargestellt). Die unspezifische Bindung von SAV-Atto 590 und Alexa 488-SA war gering. Die Monozyten in Abb. 3-35b wurden mit gelöstem FSL1-bio inkubiert. Eine Aufnahme des LP in die Zelle ist anhand der diffusen Rotfärbung um den Zellkern herum sichtbar, während die TLR2 vorwiegend auf der Zelloberfläche lokalisiert sind.

Die Inkubation der Monozyten mit kFSL1-bio-MP (Abb. 3-35c) führte zur Konzentration der MP in der Nähe des Zellkerns. Auf den kFSL1-bio-MP sind stärker konzentrierte Bereiche mit FSL1-bio anhand der hohen Fluoreszenzintensität von SAV-Atto 590 sowie eine diffuse Oberflächenlokalisierung des LP zu erkennen. Da die Emissionen des fluoreszenzmarkierten FITC-BSA ($\lambda_{em} \sim 518$ nm) und des Alexa 488-SA ($\lambda_{em} \sim 519$ nm) sehr nahe beieinander liegen, erfolgte keine eindeutige Zuordnung der grün dargestellten Fluoreszenz zur Lokalisation des TLR2 oder des FITC-BSA, wobei die grüne Fluoreszenz innerhalb der Partikel wohl hauptsächlich FITC-BSA zuzuordnen ist. Da aber die Proteinverteilung in den FITC-BSA-beladenen PLGA-MP heterogen ist (vgl. 3.1.4), können Punkte mit hoher Fluoreszenzintensität nicht eindeutig als TLR2 identifiziert werden. Jedoch wurde die Lokalisation des TLR2 bereits in den MP-freien Darstellungen gezeigt.

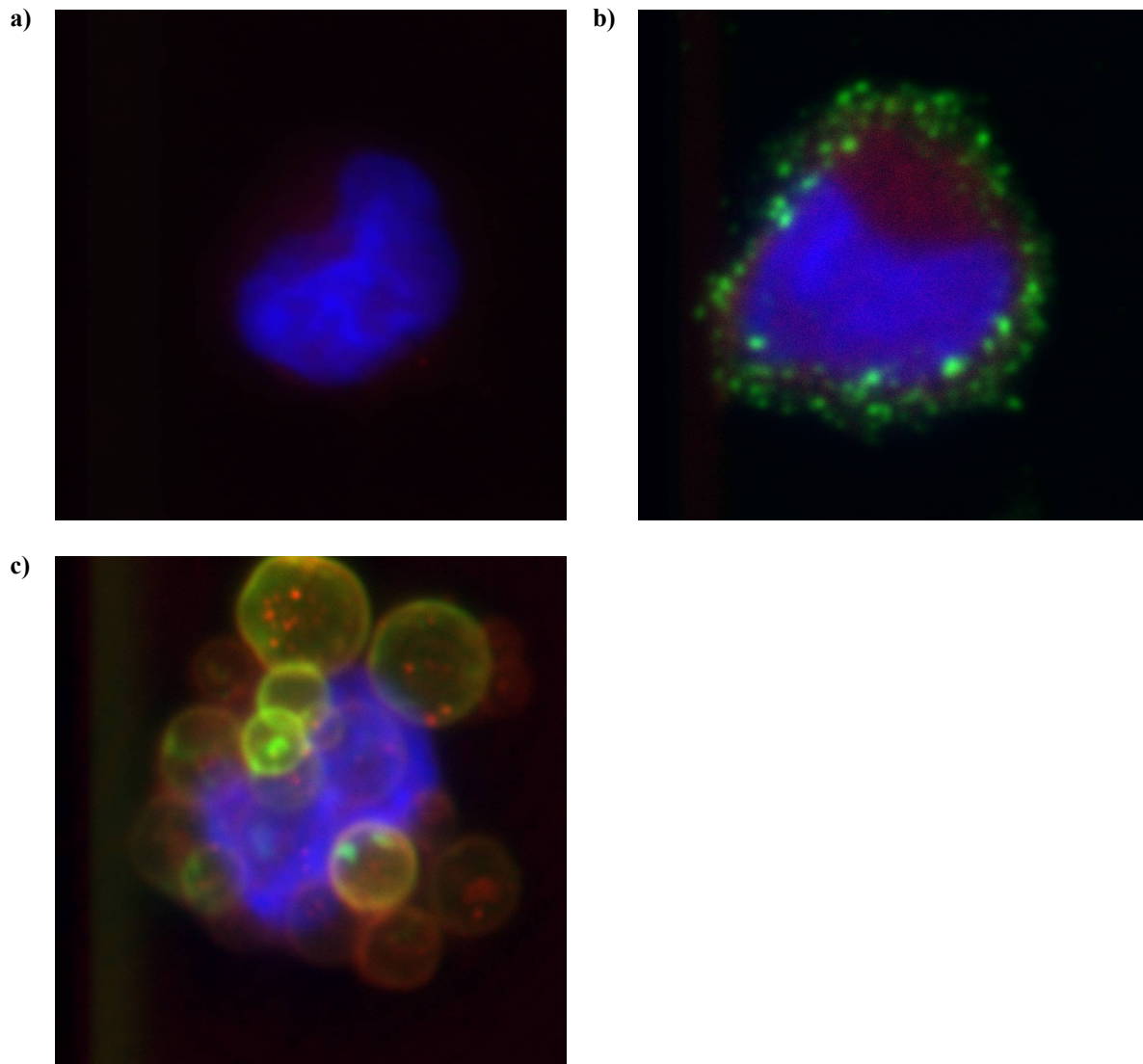


Abb. 3-35. CLSM-Overlays von Monozyten mit blau dargestelltem Zellkern (Fluoreszenz-Farbstoff DAPI) und weiteren Fluoreszenz-Färbungen. - **a)** Kontrollfärbung: Alexa 488-SA (grün), SAV-Atto 590 (rot); **b)** TLR2 in grün (primärer anti-TLR2-Antikörper und Alexa 488-SA), TLR2/6-Ligand FSL1-bio in rot (gefärbt mit SAV-Atto 590); **c)** FITC-BSA beladene kFSL1-bio-MP: FITC-BSA in grün, partikelgebundenes FSL1-bio in rot (gefärbt mit SAV-Atto 590).

In Abb. 3-36a sind mit gelöstem FSL1-bio inkubierte iDC dargestellt. Das gelöste FSL1-bio hat sich gleichmäßig in der Zelle verteilt, während die TLR2 vorwiegend in der Nähe des Zellkerns lokalisiert sind. Einige der Rezeptoren sind nahe der Oberfläche der iDC und im Zytoplasma zu finden. Die Expression der TLR2 war im Vergleich zu Monozyten verringert. Eine verstärkte Akkumulation des LP an bestimmten Punkten in unmittelbarer Nähe zu den TLR2, wie bei einer Interaktion in Zellkompartimenten, beispielsweise Phagosomen oder Endosomen, zu erwarten gewesen wäre, wurde hier nicht beobachtet. Gleichwohl konnte eine

Zerstörung der Kompartimente durch das Formalin-haltige Fixierungsreagenz und die Permeabilisierungslösung nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Pichon *et al.* 1999).

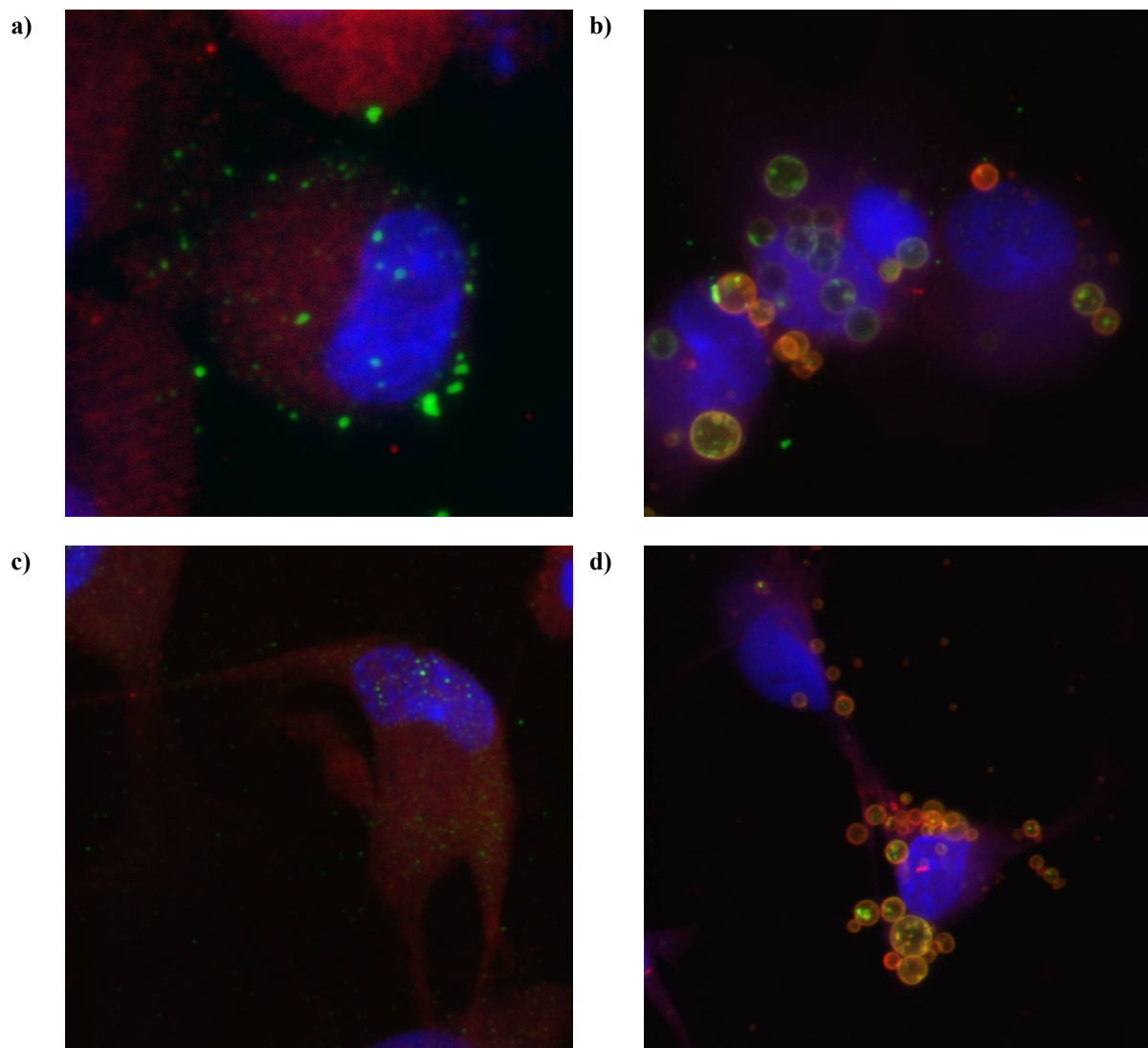


Abb. 3-36. CLSM-Overlays mit blau dargestelltem Zellkern, rot dargestelltem Liganden FSL1-bio (vorherige Inkubation in gelöster Form und MP-assoziiert), grün dargestelltem TLR2, ebenfalls grün dargestelltem FITC-BSA (mikropartikulär verkapselt). - **a)** iDC ohne kFSL1-bio-MP, **b)** iDC mit kFSL1-bio-MP; **c)** mDC ohne kFSL1-bio-MP; **d)** mDC mit kFSL1-bio-MP.

Die Inkubation von iDC mit kFSL1-bio-MP führte zu einer perinukleären Konzentrierung der MP (Abb. 3-36b). FSL1-bio war hauptsächlich auf der Oberfläche der MP assoziiert, was an der rot dargestellten Fluoreszenz erkennbar ist. Das von den MP abgelöste FSL1-bio war gleichmäßig im Zytoplasma verteilt.

In Abb. 3-36c dargestellt sind mDC, die mit FSL1-bio inkubiert wurden. FSL1-bio war gleichmäßig im Zytoplasma verteilt und TLR2 vorwiegend in der Nähe des Zellkerns und teilweise im Zytoplasma zu finden. TLR2 war nicht mehr nahe der Zelloberfläche vorhanden,

wie dies partiell bei iDC der Fall war. Durch die intrazelluläre Verteilung von FSL1-bio und TLR2 sollte eine Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor möglich sein. Auch kFSL1-bio-MP wurden in den mDC nahe des Zellkerns gefunden (Abb. 3-36d). Abgelöstes FSL1-bio verteilte sich auch hier im Zytoplasma, wenngleich eine geringere Verteilung im Vergleich zu gelöstem FSL1-bio stattfand.

Generell zeigten die CLSM-Aufnahmen, dass TLR2 in Monozyten, iDC und mDC vorhanden sind, wobei diese in Monozyten v. a. auf der Zelloberfläche befindlich sind und bei der Differenzierung in iDC vorwiegend intrazellulär exprimiert werden. Reife DC zeigten praktisch keine Oberflächenlokalisation von TLR2 mehr. Bei iDC und mDC wurde tendenziell eine kernnahe Expression der TLR2 beobachtet, obgleich TLR2 auch zytoplasmatisch zu finden war. Die Inkubation mit gelöstem FSL1-bio führte zur Aufnahme des LP in Monozyten, iDC und mDC sowie zu einer gleichmäßigen Verteilung desselben im Zytoplasma. Eine Anreicherung in bestimmten Zellkompartimenten wurde nicht beobachtet, wobei eine Zerstörung der Kompartimente durch Fixierung und Permeabilisierung nicht ausgeschlossen werden konnte. Monozyten, iDC und mDC, die mit kFSL1-bio-MP behandelt wurden, zeigten eine Lokalisation der MP in der Nähe des Zellkerns. Das FSL1-bio war hauptsächlich auf der Oberfläche der MP assoziiert, wobei ein Teil des LP auch abgelöst im Zytoplasma gefunden wurde. FITC-BSA war v. a. in den MP lokalisiert. Somit transportierten kFSL1-bio-MP sowohl den TLR2-Agonisten als auch das Modell-Antigen FITC-BSA zusammen in die Zellen, wo aufgrund der TLR2-Lokalisierung eine Interaktion zwischen TLR2 und seinem Liganden prinzipiell möglich sein sollte.

FSL1-modifizierte PLGA-MP – Aufnahme, Reifung und Zytokinprofil

In den folgenden Versuchen sollte der Einfluss des im Vergleich zu FSL2 potenteren LP FSL1 auf huMoDC untersucht werden. Dabei wurden neben kFSL1-MP auch aFSL1-MP eingesetzt und die Aufnahme der MP in Zusammenhang mit der Reifung analysiert. Für das Zytokinprofil der huMoDC wurde neben IL12 und IL10 auch TNF α bestimmt.

Die Vitalität der mit FSL1-haltigen Formulierungen behandelten Zellen war ca. 10 % höher als die Vitalität von unbehandelten Zellen (Kontrolle) oder mit Kontroll-MP behandelten huMoDC (Abb. 3-37). Ein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der Vitalität zwischen adsorptiv oder kovalent MP-assoziiertem FSL1 sowie gelöstem FSL1 in einer der

MP-assoziierten Menge entsprechenden Konzentration (äquimolar, 2 nM) oder einer höheren Konzentration (5 nM) bestand nicht.

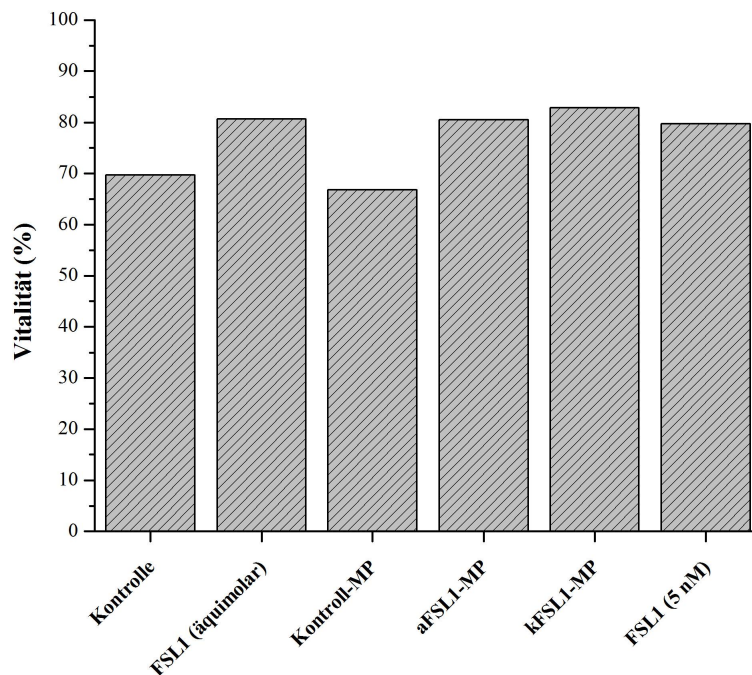


Abb. 3-37. Prozentualer Anteil an vitalen huMoDC (bezogen auf die Gesamtzellzahl) nach Primärstimulation mit FSL1 (äquimolar, 3,35 ng/ml), Kontroll-MP (100 µg/ml), aFSL1-MP (100 µg/ml), kFSL1-MP (100 µg/ml) oder FSL1 (5nM: 8,33 ng/ml). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Versuchen.

In Abb. 3-38 dargestellt ist auf der linken Seite die Aufnahme von mikropartikulären Formulierungen in huMoDC anhand der FITC-Fluoreszenz gegenüber der Seitwärtsstreuung (Maß für die Zellgranularität). Eine Aufnahme der FITC-BSA-beladenen MP hatte eine Zunahme der FITC-Fluoreszenz und der Zellgranularität zur Folge, wobei Kontroll-MP, aFSL1-MP und kFSL1-MP (nicht dargestellt) eine vergleichbare Aufnahme von ca. 85 % aufwiesen. Unbehandelte Zellen, gelöstes FSL1 [5 nM (nicht dargestellt) und äquimolar] und als Reifungskontrolle eingesetztes sMPLA zeigten erwartungsgemäß keine erhöhte FITC-Fluoreszenz. Auf der rechten Seite dargestellt ist die Reifung der huMoDC als Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 gegenüber dem Reifungsmarker CD83. Hierbei zeigten unbehandelte Zellen (4,57 %) und Kontroll-MP (1,44 %) keine Reifung. Gelöstes FSL1 in äquimolarer (7,03 %) und höherer Konzentration (5,15 %, nicht dargestellt) wiesen eine leichte „Anreifung“ auf, die bei aFSL1-MP (8,49 %) und kFSL1-MP (11,23 %, nicht dargestellt) deutlicher ausgeprägt war. Nichtsdestotrotz konnte durch FSL1-haltige Formulierungen keine vollständige Reifung erzielt werden, wie sie beispielsweise durch Einsatz von sMPLA (93,31 %) erhalten wurde.

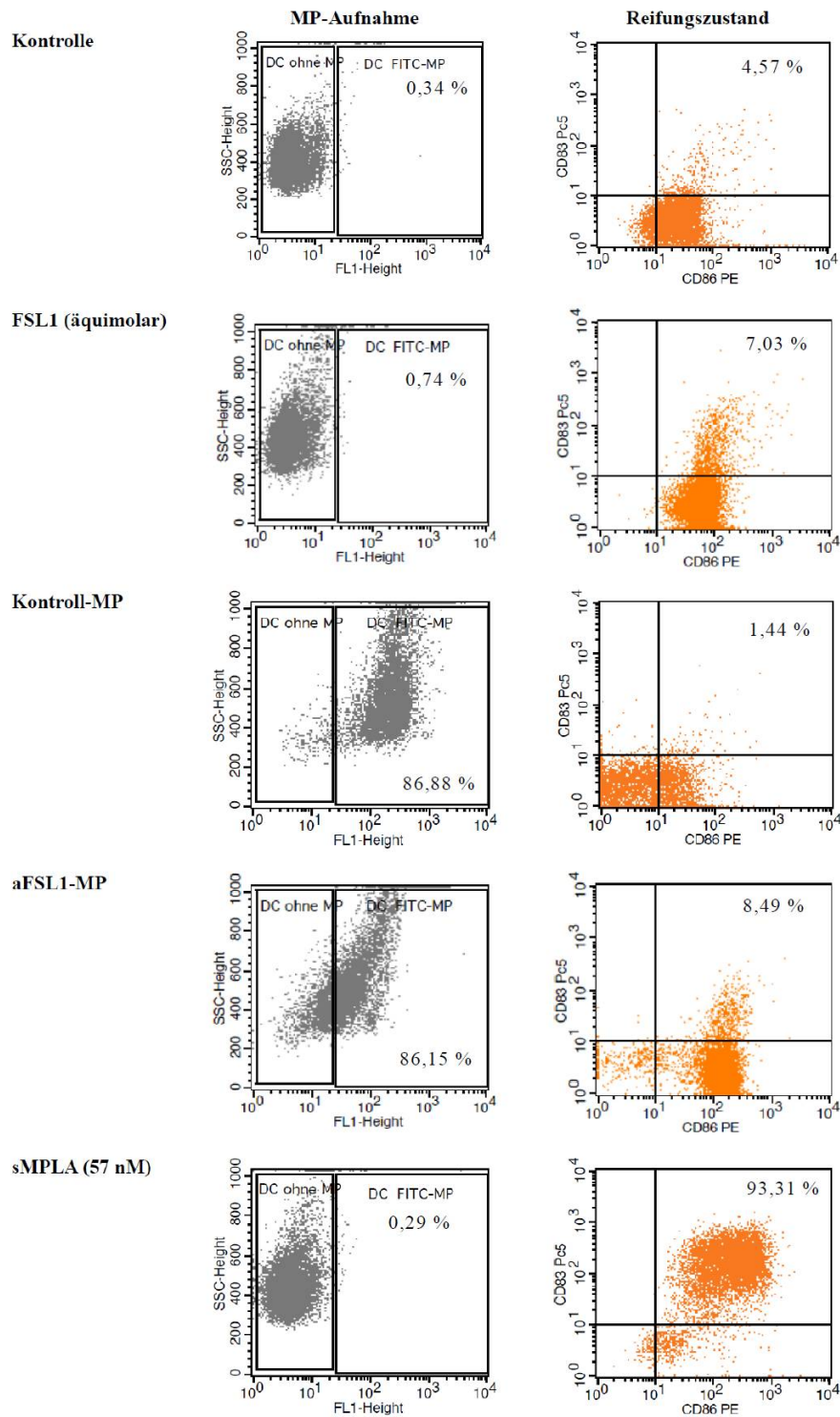


Abb. 3-38. DotPlots von unbehandelten huMoDC sowie nach Inkubation mit FSL1 (äquimolar, 3,35 ng/ml), Kontroll-MP (100 µg/ml), aFSL1-MP (100 µg/ml) und sMPLA (Positivkontrolle, 100 ng/ml). Links dargestellt ist die MP-Aufnahme in huMoDC anhand der FITC-Fluoreszenz der Zellen (x-Achse, FL1-Height) in Abhängigkeit von ihren Seitwärtsstreuungscharakteristika (y-Achse, SSC-Height). Rechts dargestellt ist der Reifungszustand der huMoDC als Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 (x-Achse, CD86 PE) in Zusammenhang mit der Expression des Reifungsmarkers CD83 (y-Achse, CD83 Pc5). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei gleichartigen Experimenten.

Das Zytokinprofil der huMoDC wurde von unbehandelten Zellen (Kontrolle) und nach der Primärstimulation mit FSL1 (5 nM), Kontroll-MP, aFSL1-MP, kFSL1-MP und sMPLA (57 nM) bestimmt (Abb. 3-39). Durch Sekundärstimulation mit IFN γ alleine oder in Kombination mit LPS R60 wurde die Induktion einer Zytokinsekretion überprüft.

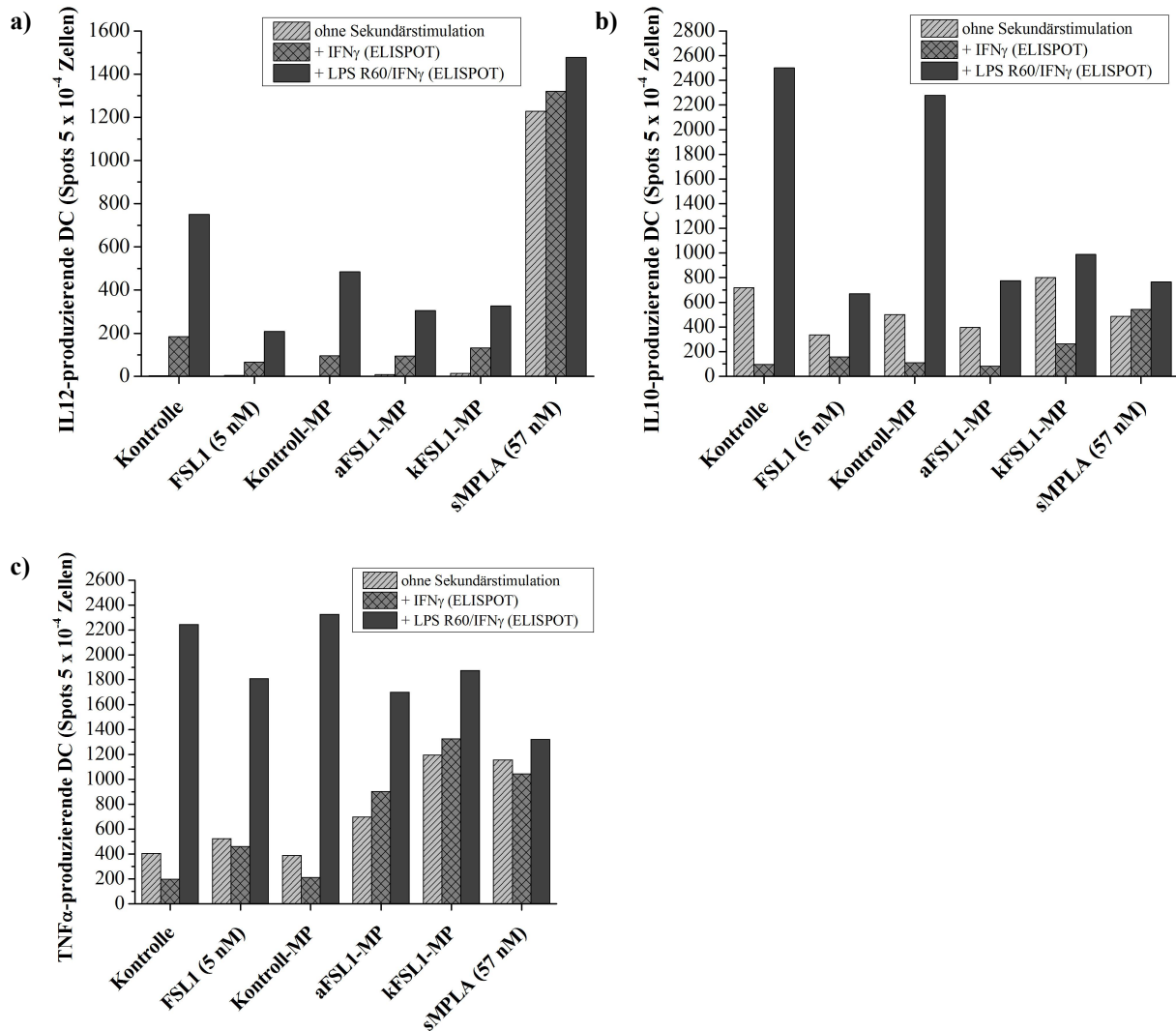


Abb. 3-39. Zytokinprofil von huMoDC nach Primärstimulation mit FSL1 (5 nM), Kontroll-MP (100 μ g/ml), aFSL1-MP (100 μ g/ml), kFSL1-MP (100 μ g/ml) oder sMPLA (57 nM). Nach der Primärstimulation erfolgte im ELISPOT entweder keine (hellgrau, gestreift) oder eine Sekundärstimulation mit IFN γ (grau, kariert) bzw. mit LPS R60 und IFN γ (dunkelgrau). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Versuchen. - a) IL12p70; b) IL10; c) TNF α .

Unbehandelte und mit Kontroll-MP oder FSL1-haltigen Formulierungen primärstimulierte huMoDC zeigten eine Produktion des T_H1-polarisierenden IL12 von unter 15 Spots/ 5×10^4 Zellen, wobei kFSL1-MP mit 14 Spots/ 5×10^4 Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine vierfach höhere IL12-Sekretion bewirkten (Abb. 3-39a). Mit sMPLA behandelte Zellen zeigten eine im Vergleich zur Kontrolle ca. 350fach höhere Ausschüttung.

Durch Sekundärstimulation mit IFN γ konnte in allen Versuchsansätzen eine Steigerung der IL12-Produktion erreicht werden. Wurde zusätzlich LPS R60 eingesetzt, steigerte sich diese nochmals deutlich. Dennoch zeigten Zellen, die mit FSL1-haltigen Formulierungen oder Kontroll-MP behandelt wurden, eine um 28-64 % geringere Sekretion von IL12 als die Kontrolle. Besonders ausgeprägt war die IL12-Hemmung für gelöstes FSL1 nach Sekundärstimulation mit LPS R60/IFN γ (208 Spots/5 x 10⁴ Zellen), während Kontroll-MP (486 Spots/5 x 10⁴ Zellen) die geringste Hemmung verglichen mit unbehandelten Zellen (750 Spots/5 x 10⁴ Zellen) auslösten. Der TLR4-Agonist sMPLA zeigte von allen Versuchsansätzen die höchste IL12-Ausschüttung unabhängig von der Sekundärstimulation.

Die IL10-Ausschüttung konnte durch Primärstimulation mit Kontroll-MP, FSL1-haltigen Formulierungen und sMPLA gehemmt werden, ausgenommen kFSL1-MP, welche keine Hemmung zeigten (Abb. 3-39b). Hierbei halbierten gelöstes FSL1 und aFSL1-MP die IL10-Produktion im Vergleich zur Kontrolle. Durch Sekundärstimulation mit IFN γ wurde die IL10-Sekretion in allen Versuchsansätzen, außer den mit sMPLA behandelten Zellen, nochmals vermindert. Die LPS-induzierte IL10-Produktion konnte durch alle FSL1-haltigen Formulierungen gehemmt werden. Im Vergleich zur Kontrolle reduzierten gelöstes FSL1 und aFSL1-MP die IL10-Sekretion um das drei- bis vierfache. Ebenso zeigten mit sMPLA behandelte Zellen eine geringere LPS-induzierte IL10-Ausschüttung.

Die TNF α -Produktion von unbehandelten iDC konnte durch den Einsatz von FSL1-haltigen Formulierungen gesteigert werden (Abb. 3-39c). Gelöstes FSL1 verursachte nur eine geringe Erhöhung des ausgeschütteten TNF α um 29 %, während aFSL1-MP und kFSL1-MP die Ausschüttung um 72 bzw. 195 % erhöhten. Die bei THP-1-Zellen beobachtete Steigerung der TNF α -Sekretion durch MP-assoziiertes FSL1 wurde somit auch bei DC festgestellt. Kontroll-MP zeigten eine mit unbehandelten Zellen vergleichbare TNF α -Produktion. Mit sMPLA behandelte Zellen wiesen eine ähnlich hohe Sekretion wie kFSL1-MP auf. Durch Sekundärstimulation mit IFN γ konnte die TNF α -Ausschüttung lediglich in den mit FSL1-modifizierten PLGA-MP behandelten Ansätzen gesteigert werden. Alle anderen Versuchsansätze zeigten eine verminderte Ausschüttung. Die Sekundärstimulation mit LPS R60/IFN γ führte in allen Versuchsansätzen zu einer Steigerung der TNF α -Sekretion, wobei diese am deutlichsten bei Zellen ausfiel, die nach der Primärstimulation wenig TNF α sezernierten (Kontrolle, Kontroll-MP). Dies kann man u. a. darauf zurückführen, dass in den

anderen Ansätzen bereits TNF α während der Primärstimulation ausgeschüttet wurde, welches im ELISPOT nicht erfasst wurde.

Diskussion

Die hier an huMoDC untersuchten LP und LP-modifizierten PLGA-MP zeigten keine zytotoxischen Eigenschaften im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings konnte kein oder nur ein geringer mitogener Effekt festgestellt werden, wie er für die LP nach der Inkubation mit THP-1-Zellen beobachtet wurde. Wessinger (2010) stellte nach der Inkubation von huMoDC mit FSL1 ebenfalls eine marginal höhere Zellvitalität im Vergleich zur Kontrolle fest.

Sowohl BAS-, FSL2- und FSL1-modifizierte MP als auch die gelösten LP bewirkten in den hier durchgeführten Versuchen lediglich eine „Anreifung“ der huMoDC, konnten aber keine vollständige Reifung, wie sie hier durch den Einsatz eines Zytokincocktails oder sMPLA gezeigt wurde, vermitteln. Für die hier eingesetzten LP konnte bisher auch keine Reifung von huMoDC gezeigt werden, was durch Versuche von Wessinger (2010) für FSL1 bestätigt wurde. Allerdings konnte für eine Vielzahl von ähnlichen LP eine Reifung von huMoDC beobachtet werden (Chua *et al.* 2008, Hertz *et al.* 2001). Die Inkubation der huMoDC mit den LP erfolgte in diesen Experimenten in deutlich höheren Konzentrationen und für einen längeren Zeitraum im Vergleich zu den hier durchgeführten Versuchen. Trotzdem zeigten die LP-behandelten huMoDC einen geringeren Reifungsgrad als LPS-behandelte.

LP-modifizierte Liposomen waren ebenfalls in der Lage eine Reifung von huMoDC zu induzieren (Bal *et al.* 2011, Espuelas *et al.* 2005). Espuelas *et al.* (2005) konnten für das liposomal verkapselte LP Pam₃CAG (10 μ g/ml) aber nur eine „Anreifung“ anhand einer 60 %igen Expression von CD83 beobachten, während die Positiv-Kontrolle LPS eine 93 %ige Expression bewirkte. Zudem konnten sie einen Dosis-abhängigen Effekt des liposomal verkapselten Pam₃CAG auf die CD83-Expression nach 24stündiger Inkubation finden. So exprimierten huMoDC, die mit 0,1 μ g/ml (ca. 1 μ M) liposomal verkapselten Pam₃CAG behandelt wurden, nur noch zu 25 % CD83. In den hier durchgeführten Versuchen wurden die gelösten LP in einer geringeren, vom Hersteller empfohlenen Arbeitskonzentration von maximal 10 nM eingesetzt. Der Einfluss der LP in diesem Konzentrationsbereich führte nur zu einer „Anreifung“ der huMoDC, wobei aber ein deutlicher Effekt auf die

Zytokinausschüttung beobachtet werden konnte. Eine höhere Dosierung der MP-assoziierten LP wurde aufgrund der möglichen Zytotoxizität von PLGA-MP bei Konzentrationen über 100 µg/ml nicht gewählt (Wischke 2006, S. 143). Zudem ließen die Vorversuche an THP-1-Zellen eine stärkere Wirksamkeit von MP-assoziierten LP gegenüber freien LP vermuten, was sich für die DC-Reifung nicht bestätigen ließ. Ein Grund hierfür könnte die fast ausschließlich intrazelluläre Lokalisation von TLR2 in huMoDC im Vergleich zu Monozyten und THP-1-Zellen sowie die damit verbundene Unzugänglichkeit für das LP sein. In den hier durchgeführten Untersuchungen mit CLSM konnte aber eine Aufnahme von FSL1-bio und FSL1-bio-modifizierten PLGA-MP in huMoDC gezeigt werden, wobei sich das gelöste FSL1-bio gleichmäßig in den huMoDC verteilte. Eine Akkumulierung der freien LP in bestimmten Zellkompartimenten, wie Khan *et al.* (2007) sie nach der Clathrin-abhängigen Endozytose eines kovalent mit einem OVA-Peptid verbundenen LP in murinen DC beobachteten, konnte hier nicht gezeigt werden. Die von Uronen-Hansson *et al.* (2004a) festgestellte intrazelluläre, vorwiegend perinukleäre Expression von TLR2 in huMoDC konnte in den hier durchgeführten Experimenten ebenfalls beobachtet werden. Prinzipiell sollte eine Interaktion zwischen den MP-assoziierten LP und den TLR2 also möglich sein. Die eingesetzten LP-modifizierten PLGA-MP verhinderten eine nachträgliche Reifung der huMoDC durch LPS R60 und IFN γ nicht, weshalb für weitere Experimente eine Kombination von LP-modifizierten PLGA-MP und weiteren Reifungsstimulanzien, vorzugsweise in einem Antigen-Trägersystem, erwogen werden sollte.

Sowohl freie als auch partikelgebundene LP beeinflussten das Zytokinprofil der huMoDC im Vergleich zu unbehandelten und mit Kontroll-MP behandelten Zellen. Hierbei zeigte FSL2 eine ausgeprägte Hemmung der IL10-Sekretion, wobei die IL12-Produktion aber ebenfalls inhibiert wurde. Jedoch zeigten sowohl freies als auch partikelgebundenes FSL2 ein deutlich höheres IL12/IL10-Verhältnis bei Restimulation mit IFN γ und somit tendenziell eine stärkere T_H1-Polarisation. Re und Strominger zeigten 2001, dass die durch den TLR4-Agonisten LPS ausgelöste IL12p70-Ausschüttung vor und nach Sekundärstimulation mit IFN γ deutlich höher war als die durch Pam₃CAG verursachte. Dies wurde in unseren Untersuchungen mit den TLR2-Agonisten FSL2 und FSL1 sowie dem TLR4-Agonisten sMPLA bestätigt. Re und Strominger schlossen daher auf eine T_H2-polarisierende Wirkung von TLR2-Agonisten. Die IL10-Hemmung untersuchten sie jedoch nicht. Daher konnten wir in unseren Untersuchungen tendenziell einen T_H1-polarisierenden Einfluss der TLR2-Agonisten aufgrund des im

Vergleich zur Kontrolle erhöhten IL12/IL10-Verhältnisses beobachten, wenngleich dieses für den TLR4-Agonisten sMPLA deutlich stärker ausgeprägt war. Da in unseren Versuchen die IL10-Hemmung durch TLR2-Agonisten auch bei Restimulation mit dem TLR4-Agonisten LPS erhalten blieb, erscheint eine Kombination von TLR2- und TLR4-Agonisten in einem Antigen-Trägersystem für eine starke T_H1-Polarisation sinnvoll.

MP-assoziiertes FSL1 erhöhte im Vergleich zur Negativ-Kontrolle, Kontroll-MP und freiem FSL1 die Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF α durch huMoDC. Dabei war die durch kFSL1-MP verursachte TNF α -Sekretion vergleichbar mit der durch den TLR4-Agonisten sMPLA ausgelöst und ca. 2,3fach höher als bei gelöstem FSL1. Dowling *et al.* (2008) konnten für den gelösten TLR2-Agonisten Peptidoglykan eine ca. 3,3fach geringere TNF α -Ausschüttung durch murine DC im Vergleich zu dem TLR4-Agonisten LPS zeigen. Die Verstärkung der TNF α -Sekretion durch partikelgebundene diacylierte LP, die in 3.2.4 bereits bei THP-1-Zellen beobachtet wurde, ist somit auch bei huMoDC vorhanden. Auslöser dafür könnten eine andere oder verstärkte Signaltransduktion nach der Phagozytose und/oder eine länger anhaltende Stimulation von TLR2 durch die zellassoziierten MP sein.

Da die hier durchgeführten Versuche eine Kombination von TLR2- und TLR4-Agonisten in einem Antigen-Trägersystem nahe legen, sollte in den folgenden Experimenten zunächst einmal die nachträgliche Oberflächenmodifizierung von PLGA-MP mit dem TLR4-Agonisten sMPLA und deren Einfluss auf huMoDC untersucht werden.

3.3 TLR4-Agonist-modifizierte PLGA-Mikropartikel

Da TLR2-Agonisten und TLR2-Agonist-modifizierte MP eine unzureichende Reifung von huMoDC bewirkten, sollte in den hier beschriebenen orientierenden Versuchen die Herstellung von TLR4-Agonist-modifizierten FITC-BSA-beladenen PLGA-MP und deren Einfluss auf huMoDC näher beleuchtet werden.

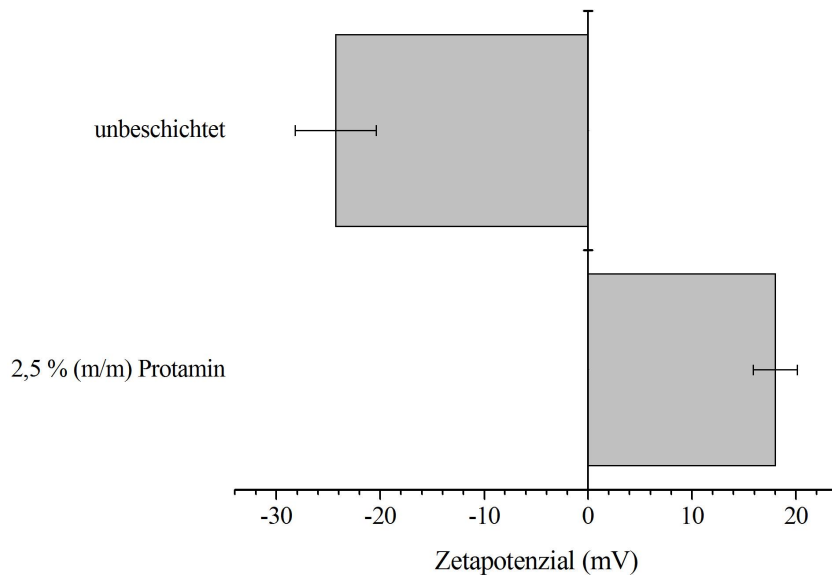


Abb. 3-40. Zetapotenzial von FITC-BSA-beladenen PLGA-MP ohne und mit Beschichtung mit 2,5 % (m/m) Protamin für eine Stunde bei 2-8 °C. n = 2. Median ± Spannweite.

Als TLR4-Agonist wurde sMPLA verwendet. Da dieses über eine bei neutralem pH-Wert vorwiegend negativ geladene Phosphatgruppe verfügt, wurde zur Modifizierung der PLGA-MP eine elektrostatische Assoziation ausgewählt. Dafür wurden die negativ geladenen PLGA-MP mit dem positiv geladenen Protein Protamin beschichtet. Dessen Assoziation führte zu einer Umladung der MP, welche daraufhin ein positives Zetapotenzial aufwiesen (Abb. 3-40). Die positiv geladenen MP wurden mit sMPLA beschichtet und die sMPLA-Konzentration des Überstand mit Hilfe eines LAL-Tests (kinetisch-chromogene Methode) bestimmt, woraus der sMPLA-Gehalt der MP ermittelt wurde. Als Kontrolle dienten negativ geladene PLGA-MP. Sowohl negativ geladene als auch positiv geladene PLGA-MP zeigten eine Assoziation von sMPLA. Allerdings war die Assoziation an positiv geladene PLGA-MP effizienter und führte zu einer ca. 1,6fach höheren Beladung der MP mit sMPLA von 459 ng/mg (Abb. 3-41). Die beschichteten MP wurden dreimal gewaschen und es konnte kein sMPLA oder Endotoxin im letzten Waschüberstand detektiert werden.

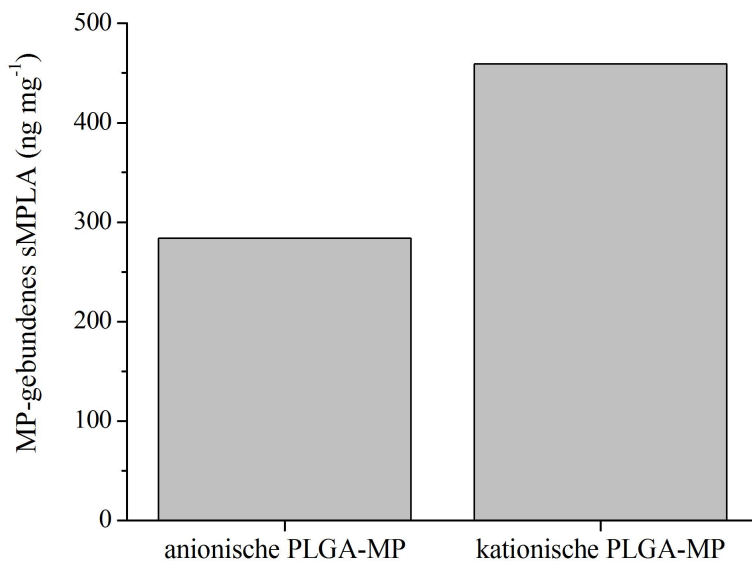


Abb. 3-41. Gehalt von MP-gebundenem sMPLA nach Beschichtung von anionischen oder kationischen FITC-BSA-beladenen PLGA-MP.

Im Anschluss wurde der Einfluss der sMPLA-modifizierten MP auf iDC untersucht. Die untersuchten MP-Formulierungen und freies sMPLA waren nicht zytotoxisch (Abb. 3-42).

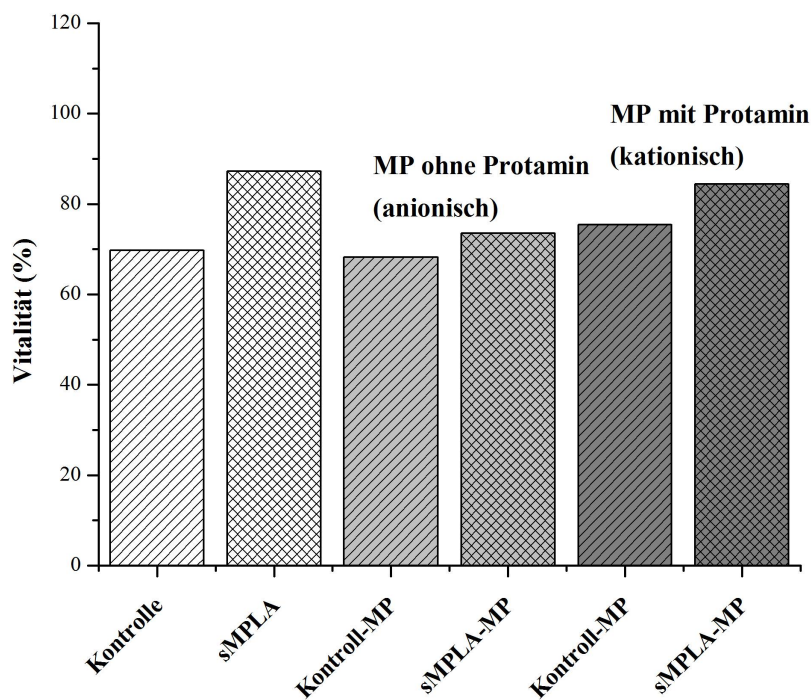


Abb. 3-42. Prozentualer Anteil an vitalen huMoDC (bezogen auf die Gesamtzellzahl) nach Stimulation mit sMPLA (100 ng/ml), Kontroll-MP (100 µg/ml) und sMPLA-MP (100 µg/ml), wobei die MP-Oberfläche vor der sMPLA-Adsorption entweder unbeschichtet (anionisch, hellgrau) oder mit Protamin beschichtet war (kationisch, dunkelgrau). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei Versuchen.

Sowohl anionische als auch kationische PLGA-MP, die mit sMPLA modifiziert wurden, zeigten eine Aufnahme in bzw. Adsorption an die iDC von über 90 % (Abb. 3-43) und waren vergleichbar mit unmodifizierten negativ geladenen oder positiv geladenen Kontroll-MP. Die

Ladung der PLGA-MP als auch die Modifizierung mit dem TLR4-Liganden hatten keinen deutlichen Einfluss auf die Partikelaufnahme bzw. -adsorption.

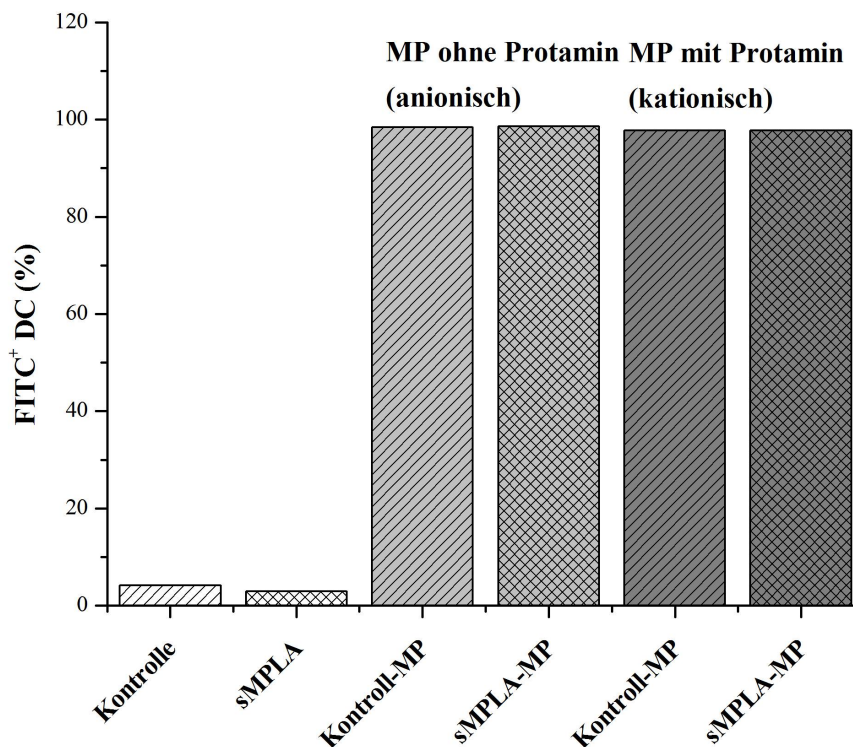


Abb. 3-43. Aufnahme bzw. Adsorption verschiedener FITC-BSA-beladener PLGA-MP-Formulierungen in bzw. an huMoDC. Gemessen wurde die FITC-Fluoreszenz gegenüber einer Isotypenkontrolle nach 18 h Inkubation der Zellen mit den MP-Formulierungen (100 µg/ml). Dargestellt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten.

Die Wirkung der sMPLA-modifizierten PLGA-MP auf iDC wurde durch die Detektion verschiedener Oberflächenmarker nach der Inkubation der Zellen mit diesen untersucht (Abb. 3-44). Der Oberflächenmarker CD209 (DC-SIGN) zeigt das Vorhandensein von huMoDC an. Dabei wird er sowohl auf unreifen als auch auf reifen DC exprimiert. Die Inkubation der iDC mit den verschiedenen Stimuli führte zu keiner verminderten Expression von CD209 (Abb. 3-44a). Eine Rückdifferenzierung der Zellen wurde durch die Inkubation mit Kontroll-MP, sMPLA-MP und freiem sMPLA nicht ausgelöst.

Die Präsentation von Antigenfragmenten an T-Helferzellen erfolgt über MHC-Moleküle vom Typ II, u. a. HLA-DR. Deren Expression wurde durch kationisch-modifizierte sMPLA-MP und freies sMPLA hoch reguliert während alle anderen MP-Formulierungen zu einer verminderten Expression führten (Abb. 3-44b). Das für die T-Zellaktivierung wichtige zweite Signal in Form des kostimulatorischen Moleküls CD86 wurde ebenfalls nach Behandlung der huMoDC mit freiem sMPLA und kationisch-modifizierten sMPLA-MP verstärkt exprimiert, während alle anderen MP-Formulierungen eine verminderte Expression verursachten (Abb. 3-44c).

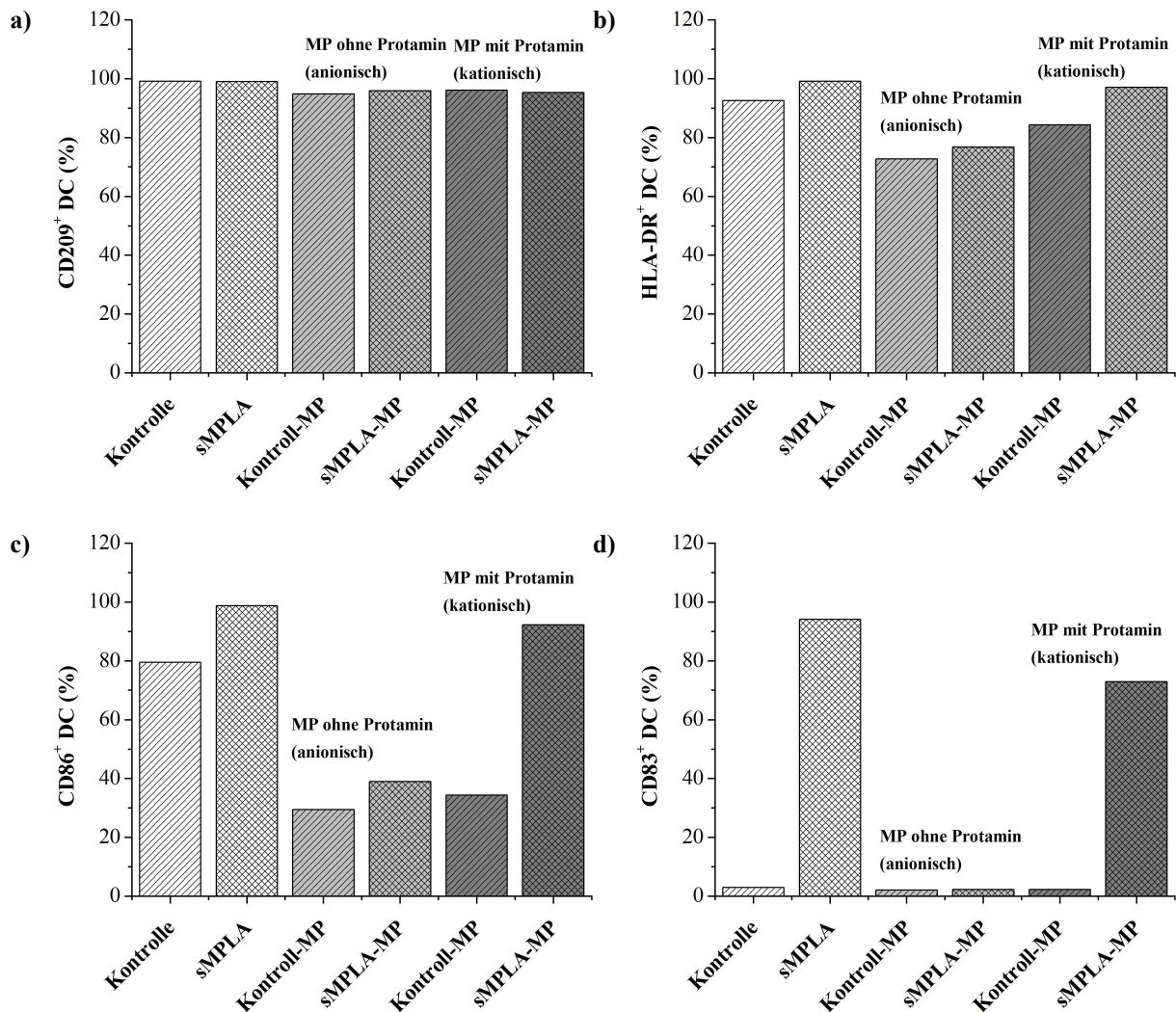


Abb. 3-44. Expression charakteristischer Oberflächenmarker von unstimulierten huMoDC (Kontrolle) oder nach 18stündiger Stimulation mit sMPLA (100 ng/ml), Kontroll-MP (100 µg/ml) oder sMPLA-MP (100 µg/ml), wobei die MP vor der sMPLA-Adsorption entweder unbeschichtet (anionisch, hellgrau) oder mit Protamin beschichtet (kationisch, dunkelgrau) waren. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Versuchen. - **a)** CD209; **b)** HLA-DR; **c)** CD86; **d)** CD83.

Die Reifung der iDC zu mDC, welche die Antigenpräsentation an und Aktivierung von T-Zellen in den sekundären lymphatischen Geweben bewirken, wird anhand des Oberflächenmarkers CD83 festgestellt. Dieser war nur bei kationisch-modifizierten sMPLA-MP und freiem sMPLA deutlich erhöht (Abb. 3-44d). Alle anderen MP-Formulierungen darunter anionische und kationische Kontroll-MP als auch anionisch-modifizierte sMPLA-MP zeigten keine deutliche Reifung der iDC zu mDC. Somit sind kationisch-modifizierte sMPLA-MP ein geeignetes Trägersystem für Proteine, welche eine Reifung von huMoDC bewirken können.

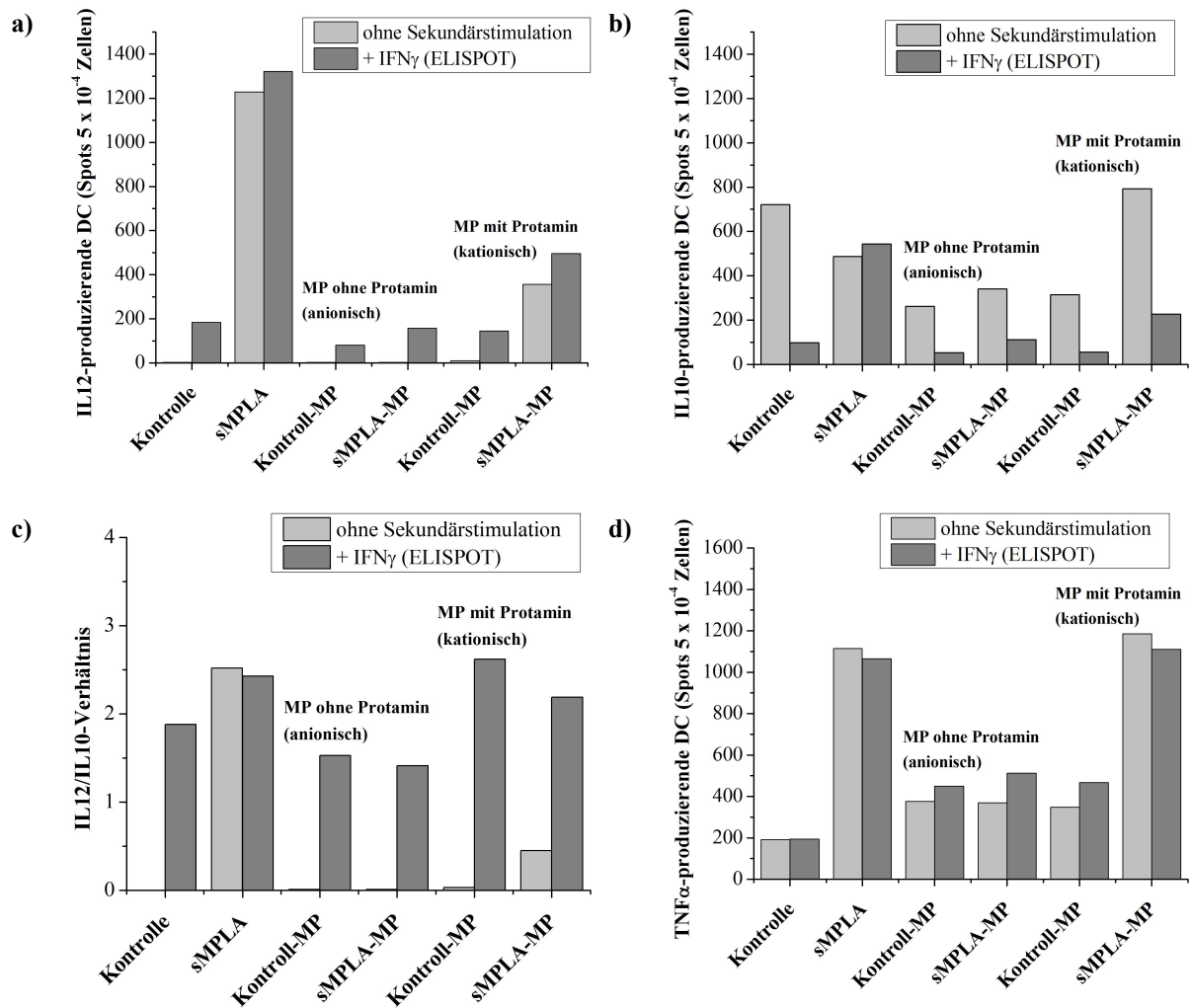


Abb. 3-45. Zytokinprofil von huMoDC nach Primärstimulation mit sMPLA (100 ng/ml), Kontroll-MP (100 μ g/ml), sMPLA-MP (100 μ g/ml), wobei die MP-Oberfläche vor der sMPLA-Adsorption entweder unbeschichtet (anionisch) oder mit Protamin beschichtet war (kationisch). Nach der Primärstimulation erfolgte im ELISPOT entweder keine (hellgrau) oder eine Sekundärstimulation mit IFN γ (dunkelgrau). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Versuchen. - **a)** IL12p70; **b)** IL10; **c)** IL12/IL10-Verhältnis; **d)** TNF α .

Des Weiteren wurde der Einfluss der verschiedenen MP-Formulierungen auf die Ausschüttung von IL12 und IL10 untersucht. Für eine effektive Immuntherapie mit DC sollte IL12 im Verhältnis zu IL10 überwiegen, da IL12 als immunstimulierendes Interleukin zu einer ausgeprägten T_H1-Antwort führen kann, während immunsuppressives IL10 diese unterdrückt. Von den getesteten Stimuli führte freies sMPLA zu einer starken Ausschüttung von IL12 (Abb. 3-45a). An kationisch-modifizierte PLGA-MP assoziiertes sMPLA zeigte eine Ausschüttung von IL12, die ca. 3,4fach niedriger war. Alle anderen MP-Formulierungen führten zu einer sehr geringen Ausschüttung von IL12. Wurden die Zellen im ELISPOT mit IFN γ restimuliert, so verhinderten die MP-Formulierungen eine IL12-Ausschüttung nicht.

Dabei waren kationisch-modifizierte sMPLA-MP allen anderen MP-Formulierungen überlegen, konnten aber nicht die Ausschüttung von IL12 erreichen, die durch freies sMPLA ausgelöst wurde. Allerdings war die Menge an MP-assoziiertem sMPLA (46 ng/ml) nur ungefähr halb so groß wie die Menge an freiem sMPLA (100 ng/ml).

Die durch kationisch-modifizierte sMPLA-MP ausgelöste Ausschüttung von IL10 entsprach der von unbehandelten Zellen, wohingegen alle anderen MP-Formulierungen und freies sMPLA eine Reduktion der IL10-Sekretion bewirkten (Abb. 3-45b). Die Restimulation der behandelten huMoDC mit IFN γ führte in allen Versuchsansätzen zu einer deutlichen Reduktion der IL10-Ausschüttung, ausgenommen die mit freiem sMPLA behandelten Zellen, bei denen eine Steigerung zu verzeichnen war. Dennoch zeigten mit sMPLA behandelte Zellen aufgrund der hohen IL12-Sekretion von allen Versuchsansätzen das stärkste T_H1-polarisierende IL12/IL10-Verhältnis (Abb. 3-45c). Hiernach folgten die kationisch-modifizierten sMPLA-MP, während alle anderen Versuchsansätze aufgrund der geringen IL12-Ausschüttung keine T_H1-Polarisation zeigten. Die Restimulation mit IFN γ führte zu einer stärkeren T_H1-Polarisation bei kationisch-modifizierten Kontroll- und sMPLA-MP, die vergleichbar mit freiem sMPLA war.

Zusätzlich wurde die TNF α -Sekretion bestimmt (Abb. 3-45d). Dabei bewirkten freies sMPLA und kationisch-modifizierte sMPLA-MP eine deutlich höhere Ausschüttung als andere MP-Formulierungen und unbehandelte Zellen.

Generell sind kationische FITC-BSA-beladene PLGA-MP, die mit dem TLR4-Liganden sMPLA modifiziert wurden, ein geeignetes Trägersystem für Proteine. Sie wurden effektiv von huMoDC aufgenommen und führten zu deren Reifung sowie zu einer Hochregulation der für die Antigenpräsentation wichtigen MHC-Moleküle vom Typ II. Zudem führten sie zur Ausschüttung des immunstimulierenden IL12, welches für die Induktion einer T_H1-Immunantwort mitverantwortlich ist, und zeigten damit die Voraussetzungen als Antigenträgersystem für eine effektive Immuntherapie von Tumorerkrankungen.

Diskussion

Die hier entwickelte Methode ermöglicht die nachträgliche elektrostatische Oberflächenmodifizierung von bereits hergestellten BSA-beladenen PLGA-MP mit dem TLR4-Agonisten sMPLA. Sie beruht auf der Beschichtung von negativ geladenen PLGA-MP

mit dem Polykation Protamin, was zu einer Ladungsinversion der MP führte. Die positiv-geladenen MP konnten das negativ geladene sMPLA auf der Oberfläche effektiv binden. Vorteilhaft ist die universelle Einsetzbarkeit der Methode, da schon hinsichtlich der Antigenbeladung, -freisetzung, -stabilität und Partikelgröße optimierte PLGA-MP-Formulierungen mit geringem Aufwand im Nachhinein mit sMPLA modifiziert werden können. Im Vergleich zu der Oberflächenverankerung von Polykationen durch Zusatz zur äußeren wässrigen Phase bei der MP-Herstellung (Fischer *et al.* 2006, 2007) wird bei der hier angewandten Methode ein deutlich kleineres Volumen für die Beschichtung benötigt und somit eine geringere Menge an Polykationen. Ebenfalls wird durch die Modifizierung der Oberfläche mit sMPLA eine direkte Interaktion von TLR4 mit seinem Agonisten ermöglicht, während bei der Verkapselung von MPLA ein Anteil in den MP vorhanden ist, der nicht freigesetzt wird und nicht mit TLR4 interagieren kann. So beobachteten Sarti *et al.* 2011 nur eine anfängliche Freisetzung von 1,5 % MPLA aus PLGA-NP und eine Gesamtfreisetzung von lediglich 10 % MPLA nach 4 Wochen Inkubation in PBS bei 37 °C. Da die gleichzeitige Aufnahme des Antigens in das Phagosom und die Stimulation der TLR einer DC für die Induktion einer effektiven Immunantwort nötig sind (Blander und Medzhitov 2006, Kazzaz *et al.* 2006, Schlosser *et al.* 2008), sollte bereits bei der Aufnahme des Antigens die gleichzeitige TLR-Stimulation gewährleistet sein.

Die hier hergestellten kationisch-modifizierten BSA-beladenen PLGA-MP waren nicht toxisch und wurden effektiv von huMoDC aufgenommen. Sie verursachten eine Reifung der DC, die vergleichbar mit der von gelöstem sMPLA in 2fach höherer Konzentration war. Die kationisch-modifizierten sMPLA-MP führten zu einer T_H1-Polarisation der DC und zu einer gesteigerten Ausschüttung von TNF α . Letzteres kann die Ausbildung einer T_H1-Antwort unterstützen und führt zur Induktion von CTL und einer IL6-Ausschüttung, die die T_{reg}-Entstehung verhindern kann (Pasare und Medzhitov 2003). Verschiedene Arbeitsgruppen modifizierten PLGA-MP und PLGA-NP bereits mit MPLA (Elamanchili *et al.* 2007, Kazzaz *et al.* 2006, Salvador *et al.* 2012, Sarti *et al.* 2011), wobei aber bisher noch keine Oberflächenmodifizierung der Partikel untersucht und zumeist ein Gemisch verschiedener MPLA anstelle von synthetisiertem MPLA eingesetzt wurden. Die Wirkungen von verkapseltem MPLA auf DC waren weitgehend konsistent mit den von uns beobachteten für oberflächenlokalisiertes sMPLA, wenngleich die Versuche an murinen DC durchgeführt wurden. So beobachteten Elmanchili *et al.* (2007) eine vermehrte Expression von CD86 und

CD40 nach Inkubation von murinen DC mit MPLA-NP sowie die erhöhte Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL12p70, IL6 und TNF α , die eine T_H1-Immunantwort unterstützen. Somit stellen kationisch-modifizierte sMPLA-MP auch für humane DC ein effektives bifunktionales Trägersystem dar, das den gleichzeitigen Transport des Antigens in sowie die Reifung und T_H1-Polarisation derselben DC bewerkstelligen.

3.4 Ausblick

In weiterführenden Studien sollte eine Kombination von TLR2- und TLR4-Agonisten in einem Antigen-Trägersystem entwickelt werden. Hierzu können die in dieser Arbeit vorgestellten Verfahren der Oberflächenmodifizierung von BSA-beladenen PLGA-MP genutzt werden. Die kovalent oder adsorptiv mit TLR2-Agonisten modifizierten PLGA-MP könnten nachträglich mit Protamin beschichtet werden und im Folgenden sMPLA elektrostatisch binden. Die durch die TLR2-Agonisten ausgelöste IL10-Hemmung in Verbindung mit der Reifungsstimulation und Auslösung einer starken IL12p70-Ausschüttung durch TLR4-Agonisten verspricht eine deutliche T_H1-Polarisation durch DC-Vakzine. Da die Aufnahme der TLR-Agonisten zusammen mit dem Antigen in dasselbe Phagosom der DC durch die modifizierten PLGA-MP sichergestellt wird, resultiert daraus eine verbesserte Präsentation der Antigenfragmente an CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. So hergestellte DC-Vakzine könnten in der Lage sein das durch den Tumor hervorgerufene immunsuppressive Milieu in Krebspatienten zu durchbrechen und eine langanhaltende antitumorale Immunantwort auszulösen. Weitere Schritte auf diesem Weg umfassen die Auswahl und Verkapselung eines geeigneten Tumorantigens, wobei eine Mischung verschiedener Tumor-assoziiierter Antigene aufgrund der Heterogenität der meisten Tumore erfolgversprechender erscheint als die Applikation eines einzelnen Antigens.

4 Zusammenfassung

Innerhalb dieser Arbeit wurden Mikropartikel aus dem bioabbaubaren Polymer Poly(D,L-milchsäure-co-glycolsäure) (PLGA-MP) als Antigen-Trägersystem für Antigen-präsentierende Zellen (APC) – z. B. Makrophagen und Dendritische Zellen (DC) – entwickelt. Ziel war eine verbesserte Immunantwort gegenüber Tumorantigenen im Rahmen einer DC-Immuntherapie. Hierfür wurden aus Monozyten gewonnene humane DC (huMoDC) eingesetzt. Die PLGA-MP sollten den Transport des Modell-Antigens bovines Serumalbumin (BSA) in die APC und deren zeitgleiche Reifung vermitteln, um eine effektive Antigenpräsentation und Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen zu bewerkstelligen. Da BSA-beladene PLGA-MP alleine keine Reifung der APC verursachten, wurden diese mit Reifungsstimuli aus der Gruppe der Toll-like-Rezeptor-(TLR-)Agonisten modifiziert. Hierfür wurden synthetische Analoga, konkret die synthetischen Lipopeptide BAS (TLR2/1-Agonist) und FSL1 (TLR2/6-Agonist) sowie das detoxifizierte LPS-Derivat sMPLA (TLR4-Agonist), an die PLGA-MP assoziiert und deren Wirkung auf APC bestimmt.

Mittels einer W/O/W-Doppelemulsions-Lösungsmittel-Evaporations-Methode konnten PLGA-MP mit einem volumetrischen Teilchendurchmesser von ca. vier Mikrometern hergestellt werden, die effektiv von makrophagenartigen THP-1-Zellen und huMoDC phagozytiert wurden. Das Modell-Antigen BSA wurde effizient verkapselt und schnell freigesetzt. Die PLGA-MP zeigten eine heterogene, vorwiegend oberflächennahe Proteinverteilung und wiesen eine glatte Oberfläche mit einer einzelnen porenartigen Vertiefung auf. Der Restlösungsmittelgehalt war ca. 550mal geringer als die vom europäischen Arzneibuch geforderte Grenzkonzentration. Der geringe Endotoxin-Gehalt von unter 0,015 EU/mg beeinflusste die untersuchten Zellen nicht nachteilig.

Die synthetischen Lipopeptide konnten sowohl kovalent, mit Hilfe einer Carbodiimid-Methode, als auch adsorptiv an die Oberfläche der PLGA-MP assoziiert werden. Sie führten zu einer TLR2-vermittelten Aktivierung von THP-1-Zellen, die anhand der TNF α - und IL6-Ausschüttung gemessen wurde. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass partikelassoziierte Lipopeptide eine deutlich stärkere Aktivierung bewirken als gelöste Lipopeptide, was auf eine Stimulation von intrazellulären TLR2 nach der Phagozytose der PLGA-MP zurückgeführt

wurde. Die Lipopeptid-modifizierten PLGA-MP führten zu einer marginalen Reifung und T_H1 -Polarisierung von huMoDC und waren nicht zytotoxisch. Die Reifung der behandelten huMoDC war jedoch durch eine Sekundärstimulation mit LPS R60 und $IFN\gamma$ induzierbar.

Für die Modifizierung von PLGA-MP mit sMPLA wurden zunächst positiv geladene PLGA-MP durch Beschichtung mit dem Polykation Protamin hergestellt. An deren Oberfläche wurde anionisches sMPLA über elektrostatische Wechselwirkungen assoziiert. Die sMPLA-modifizierten PLGA-MP waren nicht zytotoxisch und führten zu einer gesteigerten Expression von MHC-II- und kostimulatorischen Molekülen. Zusätzlich wurde die Ausschüttung des T_H1 -polarisierenden Zytokins IL12p70 erhöht. Damit wiesen die huMoDC die wesentlichen Parameter auf, welche für die Induktion einer gegen den Tumor gerichteten T_H1 -Immunantwort nötig sind. Daher sind die entwickelten sMPLA-modifizierten PLGA-MP ein geeignetes bifunktionales Trägersystem, welches den Transport der Antigene in die huMoDC und die gleichzeitige Reifung der DC-Vakzine vermittelt.

5 Summary

In the present study microparticles composed of the biodegradable polymer poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA-MP) were developed as an antigen delivery system for antigen-presenting cells (APC), such as macrophages or dendritic cells. The aim was to improve the immune response against tumor antigens within the scope of a dendritic cell-based immune therapy. Therefore human monocyte-derived dendritic cells (huMoDC) were applied. PLGA-MP should simultaneously carry the model antigen termed bovine serum albumin (BSA) into the APC and mature them as to accomplish an effective antigen-presentation and activation of antigen-specific T-cells. Since BSA-loaded PLGA-MP alone did not induce maturation of dendritic cells, they were modified with maturation stimuli, i. e. Toll-like receptor (TLR) agonists. For this purpose we used synthetic analogues, in particular the synthetic lipopeptides BAS (TLR2/1 agonist) and FSL1 (TLR2/6 agonist) as well as the detoxified LPS derivat sMPLA (TLR4 agonist). The TLR agonists were associated with the PLGA-MP and the effect on APC was determined.

PLGA-MP were prepared by using a w/o/w-double emulsion solvent evaporation technique. They exhibited a volumetric particle diameter of approximately four micrometers and were effectively phagocytised by macrophage-like THP-1 cells and huMoDC. The model antigen BSA was efficient encapsulated and released fast. The PLGA-MP showed a heterogeneous protein distribution and most of the proteins were localized near the surface being smooth with a single pore-like cavity. The residual solvent content was approximately 550 times below the allowed limit concentration set up by the European Pharmacopoeia. The low endotoxin content of less than 0.015 EU/mg did not adversely influence the investigated cells.

Besides the adsorption of the synthetic lipopeptides to the surface of the PLGA-MP, a covalent linkage using a carbodiimide method was applied. The lipopeptides induced a TLR2-mediated activation of THP-1 cells, as measured by the intensity of TNF α and IL6 secretion. For the first time it could be shown that particle-associated lipopeptides caused a much stronger activation as dissolved lipopeptides. This effect was attributed to a stimulation of intracellular TLR2 after phagocytosis of the PLGA-MP. The lipopeptide-modified PLGA-MP did not prove cytotoxic and induced a marginal maturation as well as a T_H1 polarization of

Summary

huMoDC. The maturation of the treated huMoDC could be improved by a secondary stimulation using LPS R60 and IFN γ .

To modify PLGA-MP with sMPLA, first positively charged PLGA-MP were prepared by coating them with the polycation protamine. In a second step anionic sMPLA was attached primarily by electrostatic interactions on the surface. The sMPLA-modified PLGA-MP did not prove cytotoxic and led to an increased expression of MHC-II and costimulatory molecules. In addition, the release of T_H1-polarizing cytokine IL12p70 was increased. Thus, the huMoDC had shown the essential parameters, which are necessary for the induction of an anti-tumor T_H1 immune response. Therefore, sMPLA-modified PLGA-MP definitely serve as suitable bifunctional carriers, which simultaneously mediate the transport of antigens inside the huMoDC and the maturation of the DC vaccine.

6 Literaturverzeichnis

- Abate G, Mshana RN, Miörner H. 1998. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2: 1011-1016.
- Ackerman AL, Cresswell P. 2004. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol.* 5: 678-684.
- Ackerman AL, Kyritsis C, Tampé R, Cresswell P. 2003. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 12889-12894.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124: 783-801.
- Albert ML, Kim JI, Birge RB. 2000. $\alpha_v\beta_5$ integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol.* 2: 899-905.
- Alexis F, Rath SK, Venkatraman SS. 2005. Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition. *J Control Release.* 102: 333-344.
- Alonso MJ, Gupta RK, Min C, Siber GR, Langer R. 1994. Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine.* 12: 299-306.
- Altin JG, Parish CR. 2006. Liposomal vaccines--targeting the delivery of antigen. *Methods.* 40: 39-52.
- Alving CR, Verma JN, Rao M, Krzych U, Amselem S, Green SM, Wassef NM. 1992. Liposomes containing lipid A as a potent non-toxic adjuvant. *Res Immunol.* 143: 197-198.
- Anderson JM, Shive MS. 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev.* 28: 5-24.
- Appay V, Douek DC, Price DA. 2008. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med.* 14: 623-628.
- Aspord C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, Su D, Marches F, Banchereau J, Palucka AK. 2007. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med.* 204: 1037-1047.
- Athie-Morales V, Smits HH, Cantrell DA, Hilkens CM. 2004. Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. *J Immunol.* 172: 61-69.
- Atuah KN, Walter E, Merkle HP, Alpar HO. 2003. Encapsulation of plasmid DNA in PLGA-stearylamine microspheres: a comparison of solvent evaporation and spray-drying methods. *J Microencapsul.* 20: 387-399.
- Bachmann MF, Jennings GT. 2010. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol.* 10: 787-796.
- Bal SM, Hortensius S, Ding Z, Jiskoot W, Bouwstra JA. 2011. Co-encapsulation of antigen and Toll-like receptor ligand in cationic liposomes affects the quality of the immune response in mice after intradermal vaccination. *Vaccine.* 29: 1045-1052.
- Barton GM, Kagan JC. 2009. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol.* 9: 535-542.

- Baudner BC, Ronconi V, Casini D, Tortoli M, Kazzaz J, Singh M, Hawkins LD, Wack A, O'Hagan DT. 2009. MF59 emulsion is an effective delivery system for a synthetic TLR4 agonist (E6020). *Pharm Res.* 26: 1477-1485.
- Bauer KH, Frömring KH, Führer C. 2002. *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie: mit einer Einführung in die Biopharmazie.* 7. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.; 361 p.
- Beck LR, Cowsar DR, Lewis DH, Cosgrove RJ Jr, Riddle CT, Lowry SL, Epperly T. 1979a. A new long-acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone. *Fertil Steril.* 31: 545-551.
- Beck LR, Cowsar DR, Lewis DH, Gibson JW, Flowers CE Jr. 1979b. New long-acting injectable microcapsule contraceptive system. *Am J Obstet Gynecol.* 135: 419-426.
- Beck LR, Pope VZ, Flowers CE Jr, Cowsar DR, Tice TR, Lewis DH, Dunn RL, Moore AB, Gilley RM. 1983. Poly(DL-lactide-co-glycolide)/norethisterone microcapsules: an injectable biodegradable contraceptive. *Biol Reprod.* 28: 186-195.
- Berger TG, Strasser E, Smith R, Carste C, Schuler-Thurner B, Kaempgen E, Schuler G. 2005. Efficient elutriation of monocytes within a closed system (Elutra) for clinical-scale generation of dendritic cells. *J Immunol Methods.* 298: 61-72.
- Berkland C, Kim K, Pack DW. 2001. Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distribution. *J Control Release.* 73: 59-74.
- Berkland C, Kim K, Pack DW. 2003. PLG microsphere size controls drug release rate through several competing factors. *Pharm Res.* 20: 1055-1062.
- Bessler WG, Cox M, Lex A, Suhr B, Wiesmüller KH, Jung G. 1985. Synthetic lipopeptide analogs of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes. *J Immunol.* 135: 1900-1905.
- Beutler B, Rietschel ET. 2003. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol.* 3: 169-176.
- Bilati U, Allémann E, Doelker E. 2005. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 59: 375-388.
- Bitz C, Doelker E. 1996. Influence of the preparation method on residual solvents in biodegradable microspheres. *Int J Pharm.* 31: 171-181.
- Bivas-Benita M, Romeijn S, Junginger HE, Borchard G. 2004. PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. *Eur J Pharm Biopharm.* 58: 1-6.
- Blander JM, Medzhitov R. 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science.* 304: 1014-1018.
- Blander JM, Medzhitov R. 2006. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature.* 440: 808-812.
- Blasi P, D'Souza SS, Selmin F, DeLuca PP. 2005. Plasticizing effect of water on poly(lactide-co-glycolide). *J Control Release.* 108: 1-9.
- Blasi P, Schoubben A, Giovagnoli S, Perioli L, Ricci M, Rossi C. 2007. Ketoprofen poly(lactide-co-glycolide) physical interaction. *AAPS PharmSciTech.* 8: Article 37.
- Bodmeier R, Chen H. 1988. Preparation of Biodegradable Poly(±)lactide Microparticles Using a Spray-Drying Technique. *J Pharm Pharmacol.* 40: 754-757.

- Borges O, Cordeiro-da-Silva A, Tavares J, Santarém N, de Sousa A, Borchard G, Junginger HE. 2008. Immune response by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate coated chitosan nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 69: 405-416.
- Borsutzky S, Kretschmer K, Becker PD, Mühlradt PF, Kirschning CJ, Weiss S, Guzmán CA. 2005. The mucosal adjuvant macrophage-activating lipopeptide-2 directly stimulates B lymphocytes via the TLR2 without the need of accessory cells. *J Immunol.* 174: 6308-6313.
- Boswell GA, Scribner RM, inventors. E. I. du Pont de Nemours and Company, assignee. 1973. Polylactide-drug mixtures. US Patent 3,773,919.
- Boury F, Ivanova T, Panaiotov I, Proust IE, Bois A, Richou J. 1995. Dynamic properties of poly(D,L-lactide) and polyvinyl alcohol monolayers at the air/water and dichlormethane/water interfaces. *J Colloid Interface Sci.* 169: 380-392.
- Bracci L, La Sorsa V, Belardelli F, Proietti E. 2008. Type I interferons as vaccine adjuvants against infectious diseases and cancer. *Expert Rev Vaccines.* 7: 373-381.
- Brady JM, Cutright DE, Miller RA, Barristone GC. 1973. Resorption rate, route, route of elimination, and ultrastructure of the implant site of polylactic acid in the abdominal wall of the rat. *J Biomed Mater Res.* 7: 155-166.
- Brandhonneur N, Chevanne F, Vié V, Frisch B, Primault R, Le Potier MF, Le Corre P. 2009. Specific and non-specific phagocytosis of ligand-grafted PLGA microspheres by macrophages. *Eur J Pharm Sci.* 36: 474-485.
- Briones M, Singh M, Ugozzoli M, Kazzaz J, Klakamp S, Ott G, O'Hagan D. 2001. The preparation, characterization, and evaluation of cationic microparticles for DNA vaccine delivery. *Pharm Res.* 18: 709-712.
- Bryant P, Ploegh H. 2004. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr Opin Immunol.* 16: 96-102.
- Burgdorf S, Kautz A, Böhnert V, Knolle PA, Kurts C. 2007. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science.* 316: 612-616.
- Burgdorf S, Kurts C. 2008. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* 20: 89-95.
- Caponetti G, Hrkach JS, Kriwet B, Poh M, Lotan N, Colombo P, Langer R. 1999. Microparticles of novel branched copolymers of lactic acid and amino acids: preparation and characterization. *J Pharm Sci.* 88: 136-141.
- Chakravarthi SS, Robinson DH. 2011. Enhanced cellular association of paclitaxel delivered in chitosan-PLGA particles. *Int J Pharm.* 409: 111-120.
- Chang CC, Wright A, Punnonen J. 2000. Monocyte-derived CD1a⁺ and CD1a⁻ dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation. *J Immunol.* 165: 3584-3591.
- Chang TMS. 1976. Biodegradable semipermeable microcapsules containing enzymes, hormones, vaccines, and other biologicals. *J Bioeng.* 1: 25-32.
- Chen X, Ooi CP, Lim TH. 2006. Effect of ganciclovir on the hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J Biomater Appl.* 20: 287-302.
- Chesko J, Kazzaz J, Ugozzoli M, O'Hagan DT, Singh M. 2005. An investigation of the factors controlling the adsorption of protein antigens to anionic PLG microparticles. *J Pharm Sci.* 94: 2510-2519.

Literaturverzeichnis

- Chong CS, Cao M, Wong WW, Fischer KP, Addison WR, Kwon GS, Tyrrell DL, Samuel J. 2005. Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery. *J Control Release*. 102: 85-99.
- Chow AY, Mellman I. 2005. Old lysosomes, new tricks: MHC II dynamics in DCs. *Trends Immunol*. 26: 72-78.
- Chua BY, Eriksson EM, Brown LE, Zeng W, Gowans EJ, Torresi J, Jackson DC. 2008. A self-adjuncting lipopeptide-based vaccine candidate for the treatment of hepatitis C virus infection. *Vaccine*. 26: 4866-4875.
- Chua BY, Healy A, Cameron PU, Stock O, Rizkalla M, Zeng W, Torresi J, Brown LE, Fowler NL, Gowans EJ, Jackson DC. 2003. Maturation of dendritic cells with lipopeptides that represent vaccine candidates for hepatitis C virus. *Immunol Cell Biol*. 81: 67-72.
- Chung TZ, Tsai YL, Hsieh JH, Tsai WJ. 2006. Different ratios of lactide and glycolide in PLGA affect the surface property and protein delivery characteristics of the PLGA microspheres with hydrophobic additives. *J Microencapsul*. 23: 15-27.
- Cluff CW. 2010. Monophosphoryl lipid A (MPL) as an adjuvant for anti-cancer vaccines: clinical results. *Adv Exp Med Biol*. 667: 111-123.
- Cohen Stuart MA, Flerer GJ, Lyklema J, Norde W, Scheutjens JM. 1991. Adsorption of ions, polyelectrolytes and proteins. *Adv Colloid Interface Sci*. 34: 477-535.
- Collin M, Bigley V, Haniffa M, Hambleton S. 2011. Human dendritic cell deficiency: the missing ID? *Nat Rev Immunol*. 11: 575-583.
- Conner SD, Schmid SL. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 422: 37-44.
- Conway BR, Alpar HO. 1996. Double emulsion microencapsulation of proteins as model antigens using polylactide polymers: Effect of emulsifier on the microsphere characteristics and release kinetics. *Eur J Pharm Biopharm*. 42: 42-48.
- Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU, Røsjø E, Omholt H, Hofgaard PO, Haraldsen G, Bogen B. 2005. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity*. 22: 371-383.
- Couvreux P, Blanco-Prieto MJ, Puisieux F, Roques B, Fattal E. 1997. Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides. *Adv Drug Deliv Rev*. 28: 85-96.
- Crotts G, Park TG. 1995. Preparation of porous and nonporous biodegradable polymeric hollow microspheres. *J Control Release*. 35: 91-105.
- Crotts G, Park TG. 1998. Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues. *J Microencapsul*. 15: 699-713.
- Crotty S. 2011. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 29: 621-663.
- Cui C, Schwendeman SP. 2001. Surface entrapment of polylysine in biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. *Macromolecules*. 34: 8426-8433.
- Cutright DE, Beasley JD 3rd, Perez B. 1971. Histologic comparison of polylactic and polyglycolic acid sutures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 32: 165-173.
- Cutright DE, Perez B, Beasley JD 3rd, Larson WJ, Posey WR. 1974. Degradation rates of polymers and copolymers of polylactic and polyglycolic acids. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 37: 142-152.

- Daniels AU, Chang MK, Andriano KP. 1990. Mechanical properties of biodegradable polymers and composites proposed for internal fixation of bone. *J Appl Biomater.* 1: 57-78.
- De Chastellier C, Thilo L. 1997. Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. *Eur J Cell Biol.* 74: 49-62.
- Decher G. 1997. Fuzzy Nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science.* 277: 1232-1237.
- De Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Schuitemaker JH, Tanaka Y, Wierenga EA, Yazdanbakhsh M, Kapsenberg ML. 2002. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol.* 168: 1704-1709.
- Delamarre L, Couture R, Mellman I, Trombetta ES. 2006. Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. *J Exp Med.* 203: 2049-2055.
- Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES. 2005. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science.* 307: 1630-1634.
- De Lusto F, Dasch J, Keefe J, Ellingsworth L. 1990. Immune responses to allogeneic and xenogeneic implants of collagen and collagen derivatives. *Clin Orthop Relat Res.* 260: 263-279.
- Demento SL, Eisenbarth SC, Foellmer HG, Platt C, Caplan MJ, Mark Saltzman W, Mellman I, Ledizet M, Fikrig E, Flavell RA, Fahmy TM. 2009. Inflammasome-activating nanoparticles as modular systems for optimizing vaccine efficacy. *Vaccine.* 27: 3013-3021.
- Demento SL, Siefert AL, Bandyopadhyay A, Sharp FA, Fahmy TM. 2011. Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines. *Trends Biotechnol.* 29: 294-306.
- De Monte L, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, Recalde H, Braga M, Di Carlo V, Doglioni C, Protti MP. 2011. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med.* 208: 469-478.
- De Nardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, Coussens LM. 2009. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell.* 16: 91-102.
- Deres K, Schild H, Wiesmüller KH, Jung G, Rammensee HG. 1989. In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature.* 342: 561-564.
- Descamps D, Hardt K, Spiessens B, Izurieta P, Verstraeten T, Breuer T, Dubin G. 2009. Safety of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine for cervical cancer prevention: a pooled analysis of 11 clinical trials. *Hum Vaccin.* 5: 332-340.
- De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 174: 915-924.
- De Vries IJ, Krooshoop DJ, Scharenborg NM, Lesterhuis WJ, Diepstra JH, Van Muijen GN, Strijk SP, Ruers TJ, Boerman OC, Oyen WJ, Adema GJ, Punt CJ, Figdor CG. 2003. Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res.* 63: 12-17.
- Ding L, Lee T, Wang CH. 2005. Fabrication of monodispersed Taxol-loaded particles using electrohydrodynamic atomization. *J Control Release.* 102: 395-413.

Literaturverzeichnis

- Doan TV, Olivier JC. 2009. Preparation of rifampicin-loaded PLGA microspheres for lung delivery as aerosol by premix membrane homogenization. *Int J Pharm.* 382: 61-66.
- Dougan M, Dranoff G. 2009. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol.* 27: 83-117.
- Dowling D, Hamilton CM, O'Neill SM. 2008. A comparative analysis of cytokine responses, cell surface marker expression and MAPKs in DCs matured with LPS compared with a panel of TLR ligands. *Cytokine.* 41: 254-262.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science.* 298: 850-854.
- Dunne M, Corrigan I, Ramtoola Z. 2000. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials.* 21: 1659-1668.
- Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G, McDonald DM. 1998. Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cell Immunol.* 186: 18-27.
- Elamanchili P, Lutsiak CM, Hamdy S, Diwan M, Samuel J. 2007. "Pathogen-mimicking" nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. *J Immunother.* 30: 378-395.
- Engering AJ, Cella M, Fluitsma DM, Hoefsmit EC, Lanzavecchia A, Pieters J. 1997. Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells. *Adv Exp Med Biol.* 417: 183-187.
- Ernst RK, Guina T, Miller SI. 1999. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *J Infect Dis.* 179 Suppl 2: S326-S330.
- Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 4: 837-851.
- Espuelas S, Roth A, Thumann C, Frisch B, Schuber F. 2005. Effect of synthetic lipopeptides formulated in liposomes on the maturation of human dendritic cells. *Mol Immunol.* 42: 721-729.
- Evora C, Soriano I, Rogers RA, Shakesheff KN, Hanes J, Langer R. 1998. Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Control Release.* 51: 143-152.
- Faisant N, Akiki J, Siepmann F, Benoit JP, Siepmann J. 2006. Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: experiment and theory. *Int J Pharm.* 314: 189-197.
- Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol.* 157: 541-548.
- Faraasen S, Vörös J, Csúcs G, Textor M, Merkle HP, Walter E. 2003. Ligand-specific targeting of microspheres to phagocytes by surface modification with poly(L-lysine)-grafted poly(ethylene glycol) conjugate. *Pharm Res.* 20: 237-246.
- Fischer EW, Sterzel HJ, Wegner G. 1973. Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions. *Kolloid-Z u Z-Polymer.* 251: 980-990.
- Fischer S, Foerg C, Ellenberger S, Merkle HP, Gander B. 2006. One-step preparation of polyelectrolyte-coated PLGA microparticles and their functionalization with model ligands. *J Control Release.* 111: 135-144.

- Fischer S, Schlosser E, Mueller M, Csaba N, Merkle HP, Groettrup M, Gander B. 2009. Concomitant delivery of a CTL-restricted peptide antigen and CpG ODN by PLGA microparticles induces cellular immune response. *J Drug Target*. 17: 652-661.
- Fischer S, Uetz-von Allmen E, Waeckerle-Men Y, Groettrup M, Merkle HP, Gander B. 2007. The preservation of phenotype and functionality of dendritic cells upon phagocytosis of polyelectrolyte-coated PLGA microparticles. *Biomaterials*. 28: 994-1004.
- Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. 2005. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm*. 298: 315-322.
- Fong JW, inventor. Sandoz Incorporation (E. Hanover, N. J.), assignee. 1979. US Patent 4,166,800.
- Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG. 2001. Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 8809-8814.
- Francis CL, Ryan TA, Jones BD, Smith SJ, Falkow S. 1993. Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature*. 364: 639-642.
- Frazza EJ, Schmitt EE. 1971. A new absorbable suture. *J Biomed Mater Res*. 5: 43-58.
- Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. 2011. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review. *Int J Pharm*. 415: 34-52.
- Freiberg S, Zhu XX. 2004. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm*. 282: 1-18.
- Freitas S, Merkle HP, Gander B. 2005. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J Control Release*. 102: 313-332.
- Gabrilovich D. 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature Rev Immunol*. 4: 941-952.
- Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L, Freudenberg M, Schade U, Imoto M, Yoshimura H, et al. 1985. Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem*. 148: 1-5.
- Garçon N, Leo O. 2010. Innate immunity and vaccine adjuvants: From concepts to the development of a unique adjuvant system AS04 used for the formulation of a human papillomavirus (HPV) vaccine. *Curr Cancer Ther Rev*. 6:126-137.
- Garçon N. 2010. Preclinical development of AS04. *Methods Mol Biol*. 626: 15-27.
- Gasparini G, Kosvintsev SR, Stillwell MT, Holdich RG. 2008. Preparation and characterization of PLGA particles for subcutaneous controlled drug release by membrane emulsification. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 61: 199-207.
- Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ. 2010. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 10: 453-460.
- Ghotbi Z, Haddadi A, Hamdy S, Hung RW, Samuel J, Lavasanifar A. 2011. Active targeting of dendritic cells with mannan-decorated PLGA nanoparticles. *J Drug Target*. 19: 281-292.
- Gilboa E. 2007. DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest*. 117: 1195-1203.
- Gilding DK, Reed AM. 1979. Biodegradable polymers for use in surgery – polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers: 1. *Polymer*. 20: 1459-1464.

- Gilles MA, Hudson AQ, Borders CL Jr. 1990. Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution. *Anal Biochem.* 184: 244-248.
- Giteau A, Venier-Julienne MC, Aubert-Pouëssel A, Benoit JP. 2008. How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *Int J Pharm.* 350: 14-26.
- Giunchedi P, Conti B, Scalia S, Conte U. 1998. In vitro degradation study of polyester microspheres by a new HPLC method for monomer release determination. *J Control Release.* 56: 53-62.
- Goddard JM, Hotchkiss JH. 2007. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Prog Polym Sci.* 32: 698-725.
- Gombotz WR, Pettit DK. 1995. Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery. *Bioconjug Chem.* 6: 332-351.
- Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, Katsumoto TR, Ma J, Wolf AJ, Bose N, Chan AS, Magee AS, Danielson ME, Weiss A, Vasilakos JP, Underhill DM. 2011. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature.* 472: 471-475.
- Grewal IS, Flavell RA. 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 16: 111-135.
- Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M. 1995. Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size-dependence. *Biomaterials.* 16: 305-311.
- Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature.* 425: 397-402.
- Gürsel M, Tunca S, Ozkan M, Ozcengiz G, Alaeddinoglu G. 1999. Immunoadjuvant action of plasmid DNA in liposomes. *Vaccine.* 17: 1376-1383.
- Guilliams M, Henri S, Tamoutounour S, Ardouin L, Schwartz-Cornil I, Dalod M, Malissen B. 2010. From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *Eur J Immunol.* 40: 2089-2094.
- Gursel I, Gursel M, Ishii KJ, Klinman DM. 2001. Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides. *J Immunol.* 167: 3324-3328.
- Hakkarainen M, Albertsson AC, Karlsson S. 1996. Weight losses and molecular weight changes correlated with the evolution of hydroxyacids in simulated in vivo degradation of homo- and copolymers of PLA and PGA. *Polym Degrad Stab.* 52: 283-291.
- Hamdy S, Haddadi A, Somayaji V, Ruan D, Samuel J. 2007. Pharmaceutical analysis of synthetic lipid A-based vaccine adjuvants in poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticle formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 44: 914-923.
- Hamdy S, Molavi O, Ma Z, Haddadi A, Alshamsan A, Gobti Z, Elhasi S, Samuel J, Lavasanifar A. 2008. Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8+ T cell-mediated anti-tumor immunity. *Vaccine.* 26: 5046-5057.
- Hausberger AG, DeLuca PP. 1995. Characterization of biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers and microspheres. *J Pharm Biomed Anal.* 13: 747-760.
- Hausberger AG, Kenley RA, DeLuca PP. 1995. Gamma irradiation effects on molecular weight and in vitro degradation of poly(D,L-lactide-CO-glycolide) microparticles. *Pharm Res.* 12: 851-856.

- Heffernan MJ, Kasturi SP, Yang SC, Pulendran B, Murthy N. 2009. The stimulation of CD8+ T cells by dendritic cells pulsed with polyketal microparticles containing ion-paired protein antigen and poly(inosinic acid)-poly(cytidylic acid). *Biomaterials*. 30: 910-918.
- Hermanson GT. 2008. *Bioconjugate techniques*. 2nd ed. London: Academic Press.
- Hernández-Caselles T, Villalaín J, Gómez-Fernández JC. 1990. Stability of liposomes on long term storage. *J Pharm Pharmacol*. 42: 397-400.
- Herre J, Marshall AS, Caron E, Edwards AD, Williams DL, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Reis e Sousa C, Gordon S, Brown GD. 2004. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood*. 104: 4038-4045.
- Hertz CJ, Kiertscher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, Modlin RL. 2001. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol*. 166: 2444-2450.
- Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM. 1994. Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. *N Engl J Med*. 331: 679-680.
- Heuking S, Adam-Malpel S, Sublet E, Iannitelli A, Stefano A, Borchard G. 2009. Stimulation of human macrophages (THP-1) using Toll-like receptor-2 (TLR-2) agonist decorated nanocarriers. *J Drug Target*. 17: 662-670.
- Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. 2000. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol*. 165: 618-622.
- Hoare DG, Koshland DE Jr. 1966. A Procedure for the Selective Modification of Carboxyl Groups in Proteins. *J Am Chem Soc*. 88: 2057-2058.
- Hoffmann P, Heinle S, Schade UF, Loppnow H, Ulmer AJ, Flad HD, Jung G, Bessler WG. 1988. Stimulation of human and murine adherent cells by bacterial lipoprotein and synthetic lipopeptide analogues. *Immunobiology*. 177: 158-170.
- Holgado MA, Cózar-Bernal MJ, Salas S, Arias JL, Alvarez-Fuentes J, Fernández-Arévalo M. 2009. Protein-loaded PLGA microparticles engineered by flow focusing: physicochemical characterisation and protein detection by reversed-phase HPLC. *Int J Pharm*. 380: 147-154.
- Hoyne GF, Dallman MJ, Lamb JR. 2000. T-cell regulation of peripheral tolerance and immunity: the potential role for Notch signalling. *Immunology*. 100: 281-288.
- Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. 1996. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 2: 52-58.
- Husebye H, Aune MH, Stenvik J, Samstad E, Skjeldal F, Halaas O, Nilsen NJ, Stenmark H, Latz E, Lien E, Mollnes TE, Bakke O, Espevik T. 2010. The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity*. 33: 583-596.
- Ignatius AA, Claes LE. 1996. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*. 17: 831-839.
- Ip WK, Sokolovska A, Charriere GM, Boyer L, Dejardin S, Cappillino MP, Yantosca LM, Takahashi K, Moore KJ, Lacy-Hulbert A, Stuart LM. 2010. Phagocytosis and phagosome acidification are required for pathogen processing and MyD88-dependent responses to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 184: 7071-7081.

- Ip WK, Takahashi K, Moore KJ, Stuart LM, Ezekowitz RA. 2008. Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome. *J Exp Med.* 205: 169-181.
- Ismaili J, Rennesson J, Aksoy E, Vekemans J, Vincart B, Amraoui Z, Van Laethem F, Goldman M, Dubois PM. 2002. Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J Immunol.* 168: 926-932.
- Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, Ozaki Y, Tomizawa H, Akira S, Fukuhara S. 2002. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med.* 195: 1507-1512.
- Jackson MR, Peterson PA. 1993. Assembly and intracellular transport of MHC class I molecules. *Annu Rev Cell Biol.* 9: 207-235.
- Jain RA. 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials.* 21: 2475-2490.
- Jain V, Sahu R, Misra-Bhattacharya S, Vyas SP, Kohli D. 2008. Enhancement of T-helper type I immune responses against hepatitis B surface antigen by LPS derivatives adjuvanted liposomes delivery system. *J Drug Target.* 16: 706-715.
- Jalil R, Nixon JR. 1990. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *J Microencapsul.* 7: 297-325.
- Jankovic D, Kullberg MC, Noben-Trauth N, Caspar P, Paul WE, Sher A. 2000. Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile. *J Immunol.* 164: 3047-3055.
- Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. 2001. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 31: 3388-3393.
- Jeffery H, Davis SS, O'Hagan DT. 1993. The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. II. The entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in-water emulsion solvent evaporation technique. *Pharm Res.* 10: 362-368.
- Jenkins SJ, Perona-Wright G, Worsley AG, Ishii N, MacDonald AS. 2007. Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo. *J Immunol.* 179: 3515-3523.
- Jensen PE. 1990. Regulation of antigen presentation by acidic pH. *J Exp Med.* 171: 1779-1784.
- Jensen PE. 1991. Enhanced binding of peptide antigen to purified class II major histocompatibility glycoproteins at acidic pH. *J Exp Med.* 174: 1111-1120.
- Jérôme V, Graser A, Müller R, Kontermann RE, Konur A. 2006. Cytotoxic T lymphocytes responding to low dose TRP2 antigen are induced against B16 melanoma by liposome-encapsulated TRP2 peptide and CpG DNA adjuvant. *J Immunother.* 29: 294-305.
- Jiang W, Schwendemann SP. 2001. Stabilization and controlled release of bovine serum albumin encapsulated in poly(D, L-lactide) and poly(ethylene glycol) microsphere blends. *Pharm Res.* 18: 878-885.
- Jilek S, Ulrich M, Merkle HP, Walter E. 2004. Composition and surface charge of DNA-loaded microparticles determine maturation and cytokine secretion in human dendritic cells. *Pharm Res.* 21: 1240-1247.

- Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H, Lee JO. 2007. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 130: 1071-1082.
- Johansen P, Men Y, Merkle HP, Gander B. 2000a. Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination. *Eur J Pharm Biopharm*. 50: 129-146.
- Johansen P, Merkle HP, Gander B. 2000b. Technological considerations related to the up-scaling of protein microencapsulation by spray-drying. *Eur J Pharm Biopharm*. 50: 413-417.
- Johnson AG. 1994. Molecular adjuvants and immunomodulators: new approaches to immunization. *Clin Microbiol Rev*. 7: 277-289.
- Johnston D, Zaidi B, Bystryjn JC. 2007. TLR7 imidazoquinoline ligand 3M-019 is a potent adjuvant for pure protein prototype vaccines. *Cancer Immunol Immunother*. 56: 1133-1141.
- Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol*. 27: 3135-3142.
- Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. 2012. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 30: 531-564.
- Joseph A, Louria-Hayon I, Plis-Finarov A, Zeira E, Zakay-Rones Z, Raz E, Hayashi T, Takabayashi K, Barenholz Y, Kedar E. 2002. Liposomal immunostimulatory DNA sequence (ISS-ODN): an efficient parenteral and mucosal adjuvant for influenza and hepatitis B vaccines. *Vaccine*. 20: 3342-3354.
- Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K, Akdis CA. 2000. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol*. 30: 1683-1690.
- Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol*. 9: 361-368.
- Kaliński P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. 1999a. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today*. 20: 561-567.
- Kaliński P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. 1999b. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol*. 162: 3231-3236.
- Kang J, Schwendeman SP. 2002. Comparison of the effects of Mg(OH)₂ and sucrose on the stability of bovine serum albumin encapsulated in injectable poly(D,L-lactide-co-glycolide) implants. *Biomaterials*. 23: 239-245.
- Kang JY, Lee JO. 2011. Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu Rev Biochem*. 80: 917-941.
- Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, Han SH, Lee H, Paik SG, Lee JO. 2009. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity*. 31: 873-884.
- Kapsenberg ML. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 3: 984-993.
- Kasturi SP, Sachaphibulkij K, Roy K. 2005. Covalent conjugation of polyethyleneimine on biodegradable microparticles for delivery of plasmid DNA vaccines. *Biomaterials*. 26: 6375-6385.

- Katou H, Wandrey AJ, Gander B. 2008. Kinetics of solvent extraction/evaporation process for PLGA microparticle fabrication. *Int J Pharm.* 364: 45-53.
- Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 11: 373-384.
- Kayser O, Olbrich C, Croft SL, Kiderlen AF. 2003. Formulation and biopharmaceutical issues in the development of drug delivery systems for antiparasitic drugs. *Parasitol Res.* 90 Suppl 2: S63-S70.
- Kazatchkine MD, Fearon DT. 1990. Deficiencies of human C3 complement receptors type 1 (CR1, CD35) and type 2 (CR2, CD21). *Immunodef Rev.* 2: 17-41.
- Kazzaz J, Neidleman J, Singh M, Ott G, O'Hagan DT. 2000. Novel anionic microparticles are a potent adjuvant for the induction of cytotoxic T lymphocytes against recombinant p55 gag from HIV-1. *J Control Release.* 67: 347-356.
- Kazzaz J, Singh M, Ugozzoli M, Chesko J, Soenawan E, O'Hagan DT. 2006. Encapsulation of the immune potentiators MPL and RC529 in PLG microparticles enhances their potency. *J Control Release.* 110: 566-573.
- Keck CM. 2006. Cyclosporine Nanosuspensions: Optimised Size Characterisation & Oral Formulations [Dissertation]. Berlin, Deutschland: Freie Universität Berlin.
- Keir ME, Sharpe AH. 2005. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunol Rev.* 204: 128-143.
- Kenley RA, Lee MO, Mahoney TR, Sanders LM. 1987. Poly(lactide-co-glycolide) decomposition kinetics in vivo and in vitro. *Macromolecules.* 20: 2398-2403.
- Kent JS, Lewis DH, Sanders LM, Tice TR, inventors. Syntex (USA) Incorporation, assignee. 1987. US Patent 4,675,189.
- Kerrigan AM, Brown GD. 2009. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology.* 214: 562-575.
- Khan S, Bijker MS, Weterings JJ, Tanke HJ, Adema GJ, van Hall T, Drijfhout JW, Melief CJ, Overkleeft HS, van der Marel GA, Filippov DV, van der Burg SH, Ossendorp F. 2007. Distinct uptake mechanisms but similar intracellular processing of two different toll-like receptor ligand-peptide conjugates in dendritic cells. *J Biol Chem.* 282: 21145-21159.
- Kissel T, Brich Z, Bantle S, Lancranjan I, Nimmerfall F, Vit P. 1991. Parenteral depot-systems on the basis of biodegradable polyesters. *J Control Release.* 16: 27-41.
- Kissel T, Hilbert AK, Kroneberg R, Bittner B. 1997. Microencapsulation of antigens for parenteral vaccine delivery systems. In: Gander B, Merkle P, Corradin G, eds. *Antigen delivery systems: Immunological and technological issues.* Amsterdam: OPA: 159-190. (Florence AT, Gregoriadis G, eds; Drug targeting and delivery; vol 8).
- Kissel T, Maretschek S, Packhäuser C, Schnieders J, Seidel N. 2006. Microencapsulation techniques for parenteral depot systems and their application in pharmaceutical industry. In: Benita S, ed. *Microencapsulation: Methods and industrial applications, second edition.* Boca Raton: CRC Press: 99-122. (Swarbrick J, ed; Drugs and pharmaceutical sciences; vol 158).
- Kocbek P, Obermajer N, Cegnar M, Kos J, Kristl J. 2007. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J Control Release.* 120: 18-26.
- Koch J, Tampé R. 2006. The macromolecular peptide-loading complex in MHC class I-dependent antigen presentation. *Cell Mol Life Sci.* 63: 653-662.

- Koopmann JO, Albring J, Hüter E, Bulbuc N, Spee P, Neefjes J, Hämmerling GJ, Momburg F. 2000. Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity*. 13: 117-127.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 27: 485-517.
- Kovacsovics-Bankowski M, Clark K, Benacerraf B, Rock KL. 1993. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 4942-4946.
- Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science*. 267: 243-246.
- Kranz H, Ubrich N, Maincent P, Bodmeier R. 2000. Physicomechanical properties of biodegradable poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) films in the dry and wet states. *J Pharm Sci*. 89: 1558-1566.
- Krause HJ, Schwarz A, Rohdewald P. 1985. Polylactic acid nanoparticles, a colloidal drug delivery system for lipophilic drugs. *Int J Pharm*. 27: 145-155.
- Kricheldorf HR, Kreiser-Saunders I, Boettcher C. 1995. Polylactones: 31. Sn(II)octoate-initiated polymerization of L-lactide: a mechanistic study. *Polymer*. 36: 1253-1259.
- Kricheldorf HR, Lee SR. 1995. Polylactones: 32. High-molecular-weight polylactides by ring-opening polymerization with dibutylmagnesium or butylmagnesium chloride. *Polymer*. 36: 2995-3003.
- Kuipers H, Heirman C, Hijdra D, Muskens F, Willart M, van Meirvenne S, Thielemans K, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. 2004. Dendritic cells retrovirally overexpressing IL-12 induce strong Th1 responses to inhaled antigen in the lung but fail to revert established Th2 sensitization. *J Leukoc Biol*. 76: 1028-1038.
- Kulkarni RK, Pani KC, Neuman C, Leonard F. 1966. Polylactic acid for surgical implants. *Arch Surg*. 93: 839-843.
- Kulkarni RK, Moore EG, Hegyeli AF, Leonard F. 1971. Biodegradable poly(lactic acid) polymers. *J Biomed Mater Res*. 5: 169-181.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 30: 16-34.
- Kurotaki T, Tamura Y, Ueda G, Oura J, Kutomi G, Hirohashi Y, Sahara H, Torigoe T, Hiratsuka H, Sunakawa H, Hirata K, Sato N. 2007. Efficient cross-presentation by heat shock protein 90-peptide complex-loaded dendritic cells via an endosomal pathway. *J Immunol*. 179: 1803-1813.
- Kwong AK, Chou S, Sun AM, Sefton MV, Goosen MFA. 1986. In vitro and in vivo release of insulin from poly(lactic acid) microbeads and pellets. *J Control Release*. 4: 47-62.
- Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. 2006. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell*. 124: 997-1009.
- Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*. 1: 311-316.
- Langerhans P. 1868. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Archiv*. 44: 325-337.

- Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussioutis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2: 261-268.
- Lathrop SL, Ball R, Haber P, Mootrey GT, Braun MM, Shadomy SV, Ellenberg SS, Chen RT, Hayes EB. 2002. Adverse event reports following vaccination for Lyme disease: December 1998-July 2000. *Vaccine.* 20: 1603-1608.
- Lavik EB, Hrkach JS, Lotan N, Nazarov R, Langer R. 2001. A simple synthetic route to the formation of a block copolymer of poly(lactic-co-glycolic acid) and polylysine for the fabrication of functionalized, degradable structures for biomedical applications. *J Biomed Mater Res.* 58: 291-294.
- Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. 2012. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol.* 12: 168-179.
- Lee HK, Lee J, Tobias PS. 2002. Two lipoproteins extracted from *Escherichia coli* K-12 LCD25 lipopolysaccharide are the major components responsible for Toll-like receptor 2-mediated signaling. *J Immunol.* 168: 4012-4017.
- Lee YH, Mei F, Bai MY, Zhao S, Chen DR. 2010. Release profile characteristics of biodegradable-polymer-coated drug particles fabricated by dual-capillary electrospray. *J Control Release.* 145: 58-65.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86: 973-983.
- Lennon-Duménil AM, Bakker AH, Maehr R, Fiebiger E, Overkleeft HS, Roseblatt M, Ploegh HL, Lagaudrière-Gesbert C. 2002. Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J Exp Med.* 196: 529-540.
- Lenz P, Thompson CD, Day PM, Bacot SM, Lowy DR, Schiller JT. 2003. Interaction of papillomavirus virus-like particles with human myeloid antigen-presenting cells. *Clin Immunol.* 106: 231-237.
- Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. 2001. IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol.* 166: 5530-5539.
- Li SM, Garreau H, Vert M. 1990a. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media Part 1: Poly(DL-lactic acid). *J Mater Sci Mater Med.* 1: 123-130.
- Li SM, Garreau H, Vert M. 1990b. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media Part 2 Degradation of lactide-glycolide copolymers: PLA37.5GA25 and PLA75GA25. *J Mater Sci Mater Med.* 1: 131-139.
- Li SM, Girod-Holland S, Vert M. 1996. Hydrolytic degradation of poly(DL-lactic acid) in the presence of caffeine base. *J Control Release.* 40: 41-53.
- Li SM. 1999. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *J Biomed Mater Res.* 48: 342-353.
- Lu L, Garcia CA, Mikos AG. 1999. In vitro degradation of thin poly(DL-lactic-co-glycolic acid) films. *J Biomed Mater Res.* 46: 236-244.

- Lutsiak ME, Robinson DR, Coester C, Kwon GS, Samuel J. 2002. Analysis of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanosphere uptake by human dendritic cells and macrophages in vitro. *Pharm Res.* 19: 1480-1487.
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. 2006. *Der Experimentator Immunologie*. 2. Aufl. München: Elsevier GmbH: 119-120.
- Ma GH, Nagai M, Omi S. 1999. Preparation of uniform poly(lactide) microspheres by employing the Shirasu Porous Glass (SPG) emulsification technique. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects.* 153: 383-394.
- Mahato RI, editor. 2005. *Biomaterials for delivery and targeting of proteins and nucleic acids*. Boca Raton, Florida: CRC Press: 1-7.
- Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML, Kirkwood JM, Storkus WJ, Kalinski P. 2004. alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res.* 64: 5934-5937.
- Maraskovsky E, Daro E, Roux E, Teepe M, Maliszewski CR, Hoek J, Caron D, Lebsack ME, McKenna HJ. 2000. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood.* 96: 878-884.
- Martínez Gómez JM, Csaba N, Fischer S, Sichelstiel A, Kündig TM, Gander B, Johansen P. 2008. Surface coating of PLGA microparticles with protamine enhances their immunological performance through facilitated phagocytosis. *J Control Release.* 130: 161-167.
- Mason N, Thies C, Cicero TJ. 1976. In vivo and in vitro evaluation of a microencapsulated narcotic antagonist. *J Pharm Sci.* 65: 847-850.
- Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol.* 171: 3154-3162.
- Matzinger P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 296: 301-305.
- McGee JP, Davis SS, O'Hagan DT. 1995. Zero order release of protein from poly(d,l-lactide-co-glycolide) microparticles prepared using a modified phase separation technique. *J Control Release.* 34: 77-86.
- McGuirk P, McCann C, Mills KH. 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med.* 195: 221-231.
- Means TK, Hayashi F, Smith KD, Aderem A, Luster AD. 2003. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol.* 170: 5165-5175.
- Mehta RC, Thanoo BC, DeLuca PP. 1996. Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly(d,l-lactide-co-glycolide). *J Control Release.* 41: 249-257.
- Mellman I, Turley SJ, Steinman RM. 1998. Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol.* 8: 231-237.
- Ménétrier-Caux C, Gobert M, Caux C. 2009. Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome. *Cancer Res.* 69: 7895-7898.
- Men Y, Audran R, Thomasin C, Eberl G, Demotz S, Merkle HP, Gander B, Corradin G. 1999. MHC class I- and class II-restricted processing and presentation of microencapsulated antigens. *Vaccine.* 17: 1047-1056.

- Messai I, Munier S, Ataman-Önal Y, Verrier B, Delair T. 2003. Elaboration of poly(ethyleneimine) coated poly(D,L-lactic acid) particles. Effect of ionic strength on the surface properties and DNA binding capabilities, *Colloids Surf B Biointerfaces*. 32: 293-305.
- Miller RA, Brady JM, Cutright DE. 1977. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *J Biomed Mater Res*. 11: 711-719.
- Miyajima M, Koshika A, Okada J, Kusai A, Ikeda M. 1998. The effects of drug physico-chemical properties on release from copoly (lactic/glycolic acid) matrix. *Int J Pharm*. 169: 255-263.
- Montagnoli C, Bacci A, Bozza S, Gaziano R, Mosci P, Sharpe AH, Romani L. 2002. B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J Immunol*. 169: 6298-6308.
- Morein B, Bengtsson KL. 1999. Immunomodulation by iscoms, immune stimulating complexes. *Methods*. 19: 94-102.
- Morein B, Sundquist B, Höglund S, Dalsgaard K, Osterhaus A. 1984. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*. 308: 457-460.
- Mosier DE. 1967. A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. *Science*. 158: 1573-1575.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65: 55-63.
- Mowat AM, Reid G. 2001. Preparation of immune stimulating complexes (ISCOMs) as adjuvants. *Curr Protoc Immunol*. May; Chapter 2: Unit 2.11.
- Mühlradt PF, Kiess M, Meyer H, Süßmuth R, Jung G. 1997. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J Exp Med*. 185: 1951-1958.
- Mühlradt PF, Schade U. 1991. MDHM, a macrophage-stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, leads to in vitro interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and prostaglandin production and is pyrogenic in rabbits. *Infect Immun*. 59: 3969-3974.
- Müller MR, Pfannes SD, Ayoub M, Hoffmann P, Bessler WG, Mittenbühler K. 2001. Immunostimulation by the synthetic lipopeptide P3CSK4: TLR4-independent activation of the ERK1/2 signal transduction pathway in macrophages. *Immunology*. 103: 49-60.
- Munier S, Messai I, Delair T, Verrier B, Ataman-Onal Y. 2005. Cationic PLA nanoparticles for DNA delivery: comparison of three surface polycations for DNA binding, protection and transfection properties. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 43: 163-173.
- Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, Paulos CM, Palmer DC, Touloukian CE, Ptak K, Gattinoni L, Wrzesinski C, Hinrichs CS, Kerstann KW, Feigenbaum L, Chan CC, Restifo NP. 2008. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*. 112: 362-373.
- Nam YS, Park TG. 1999 Protein loaded biodegradable microspheres based on PLGA-protein bioconjugates. *J Microencapsul*. 16: 625-637.
- Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 4: 328-332.

- Nishimura T, Nakui M, Sato M, Iwakabe K, Kitamura H, Sekimoto M, Ohta A, Koda T, Nishimura S. 2000. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother Pharmacol.* 46 Suppl: S52-61.
- Nixon DF, Hioe C, Chen PD, Bian Z, Kuebler P, Li ML, Qiu H, Li XM, Singh M, Richardson J, McGee P, Zamb T, Koff W, Wang CY, O'Hagan D. 1996. Synthetic peptides entrapped in microparticles can elicit cytotoxic T cell activity. *Vaccine.* 14: 1523-1530.
- Nobs L, Buchegger F, Gurny R, Allémann E. 2004. Poly(lactic acid) nanoparticles labeled with biologically active Neutravidin for active targeting. *Eur J Pharm Biopharm.* 58: 483-490.
- Ogawa Y, Yamamoto M, Okada H, Yashiki T, Shimamoto T. 1988. A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 36: 1095-1103.
- O'Hagan DT, Singh M, Ulmer JB. 2004. Microparticles for the delivery of DNA vaccines. *Immunol Rev.* 199: 191-200.
- Okada H, Ogawa Y, Yashiki T, inventors. Takeda Chemical Industries LTD, applicant. 1985. Method for producing Microcapsule. European Patent 0 142 240 (A2).
- Okada H, Ogawa Y, Yashiki T, inventors. Takeda Chemical Industries LTD, assignee. 1987. Prolonged release microcapsule and its production. US Patent 4,652,441.
- Okusawa T, Fujita M, Nakamura J, Into T, Yasuda M, Yoshimura A, Hara Y, Hasebe A, Golenbock DT, Morita M, Kuroki Y, Ogawa T, Shibata K. 2004. Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by toll-like receptors 2 and 6. *Infect Immun.* 72: 1657-1665.
- Oster CG, Kim N, Grode L, Barbu-Tudoran L, Schaper AK, Kaufmann SH, Kissel T. 2005. Cationic microparticles consisting of poly(lactide-co-glycolide) and polyethylenimine as carriers systems for parental DNA vaccination. *J Control Release.* 104: 359-377.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 13766-13771.
- Palucka K, Banchereau J. 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer.* 12: 265-277.
- Palucka K, Banchereau J. 2002. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol.* 14: 420-431.
- Palucka K, Ueno H, Roberts L, Fay J, Banchereau J. 2011. Dendritic cell subsets as vectors and targets for improved cancer therapy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 344: 173-192.
- Pardoll DM, Topalian SL. 1998. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol.* 10: 588-594.
- Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. 2007. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res.* 56: 45-50.
- Park TG. 1994. Degradation of poly(d,l-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. *J Control Release.* 30: 161-173.
- Park TG. 1995. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. *Biomaterials.* 16: 1123-1130.

Literaturverzeichnis

- Pasare C, Medzhitov R. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*. 299: 1033-1036.
- Paul WE, Zhu J. 2010. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*. 10: 225-235.
- Peters JH, Ruppert J, Gieseler RK, Najjar HM, Xu H. 1991. Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? *Pathobiology*. 59: 122-126.
- Pichon C, Monsigny M, Roche AC. 1999. Intracellular localization of oligonucleotides: influence of fixative protocols. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 9: 89-93.
- Pitt CG, Gratzl MM, Kimmel GL, Surlis J, Schindler A. 1981. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo. *Biomaterials*. 2: 215-220.
- Prior S, Gander B, Blarer N, Merkle HP, Subirá ML, Irache JM, Gamazo C. 2002. In vitro phagocytosis and monocyte-macrophage activation with poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Eur J Pharm Sci*. 15: 197-207.
- Pulapura S, Kohn J. 1992. Trends in the development of bioresorbable polymers for medical applications. *J Biomater Appl*. 6: 216-250.
- Raetz CR, Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 71: 635-700.
- Rafati H, Coombes AGA, Adler J, Holland J, Davis SS. 1997. Protein-loaded poly(dl-lactide-co-glycolide) microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics. *J Control Release*. 43: 89-102.
- Rafler G, Jobmann M. 1994. Controlled release systems of biodegradable polymers 1st Communication: Hydrolytic degradation of biodegradable aliphatic polyesters. *Pharm Ind*. 56: 565-570.
- Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Angeli V. 2005. Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances. *Springer Semin Immunopathol*. 26: 273-287.
- Ravetch JV, Bolland S. 2001. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 19: 275-290.
- Ravi Kumar MNV, Bakowsky U, Lehr CM. 2004. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*. 25: 1771-1777.
- Redding TW, Schally AV, Tice TR, Meyers WE. 1984. Long-acting delivery systems for peptides: inhibition of rat prostate tumors by controlled release of [D-Trp6]luteinizing hormone-releasing hormone from injectable microcapsules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81: 5845-5848.
- Reed AM, Gilding DK. 1981. Biodegradable polymers for use in surgery – poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo and copolymers: 2. In vitro degradation. *Polymer*. 22: 494-498.
- Re F, Strominger JL. 2001. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem*. 276: 37692-37699.
- Reis e Sousa C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*. 6: 476-483.
- Reis e Sousa C, Yap G, Schulz O, Rogers N, Schito M, Aliberti J, Hieny S, Sher A. 1999. Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. *Immunity*. 11: 637-647.

- Remer KA, Brcic M, Sauter KS, Jungi TW. 2006. Human monocytoïd cells as a model to study Toll-like receptor-mediated activation. *J Immunol Methods*. 313: 1-10.
- Rettig L, Haen SP, Bittermann AG, von Boehmer L, Curioni A, Krämer SD, Knuth A, Pascolo S. 2010. Particle size and activation threshold: a new dimension of danger signaling. *Blood*. 115: 4533-4541.
- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Di Padova F, et al. 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 8: 217-225.
- Robinson DS, O'Garra A. 2002. Further checkpoints in Th1 development. *Immunity*. 16: 755-758.
- Rock KL, Goldberg AL. 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol*. 17: 739-779.
- Rock KL, Shen L. 2005. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev*. 207: 166-183.
- Römisch K. 1999. Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J Cell Sci*. 112: 4185-4191.
- Roldão A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM. 2010. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 9: 1149-1176.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*. 180: 83-93.
- Rozen daal R, Carroll MC. 2007. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol Rev*. 219: 157-166.
- Roser M, Fischer D, Kissel T. 1998. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur J Pharm Biopharm*. 46: 255-263.
- Rothen-Weinhold A, Besseghir K, Gurny R. 1997. Analysis of the influence of polymer characteristics and core loading on the in vivo release of a somatostatin analogue. *Eur J Pharm Sci*. 5: 303-313.
- Ruiz JM, Tissier B, Benoit JP. 1989. Microencapsulation of peptide: a study of the phase separation of poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) copolymers 50/50 by silicone oil. *Int J Pharm*. 49: 69-77.
- Ruppert J, Schütt C, Ostermeier D, Peters JH. 1993. Down-regulation and release of CD14 on human monocytes by IL-4 depends on the presence of serum or GM-CSF. *Adv Exp Med Biol*. 329: 281-286.
- Sah H. 1999. Protein behavior at the water/methylene chloride interface. *J Pharm Sci*. 88: 1320-1325.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 179: 1109-1118.
- Salman HH, Irache JM, Gamazo C. 2009. Immunoadjuvant capacity of flagellin and mannosamine-coated poly(anhydride) nanoparticles in oral vaccination. *Vaccine*. 27: 4784-4790.
- Salvador A, Igartua M, Hernández RM, Pedraz JL. 2012. Combination of immune stimulating adjuvants with poly(lactide-co-glycolide) microspheres enhances the immune response of vaccines. *Vaccine*. 30: 589-596.

Literaturverzeichnis

- Samuel J, Budzynski WA, Reddish MA, Ding L, Zimmermann GL, Krantz MJ, Koganty RR, Longenecker BM. 1998. Immunogenicity and antitumor activity of a liposomal MUC1 peptide-based vaccine. *Int J Cancer*. 75: 295-302.
- Sanders LM, Kent JS, McRae GI, Vickery BH, Tice TR, Lewis DH. 1984. Controlled release of a luteinizing hormone-releasing hormone analogue from poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Pharm Sci*. 73: 1294-1297.
- Sangha R, Butts C. 2007. L-BLP25: a peptide vaccine strategy in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 13: 4652s-4654s.
- San Román B, Irache JM, Gómez S, Tsapis N, Gamazo C, Espuelas MS. 2008. Co-encapsulation of an antigen and CpG oligonucleotides into PLGA microparticles by TROMS technology. *Eur J Pharm Biopharm*. 70: 98-108.
- Sarti F, Perera G, Hintzen F, Kotti K, Karageorgiou V, Kammona O, Kiparissides C, Bernkop-Schnürch A. 2011. In vivo evidence of oral vaccination with PLGA nanoparticles containing the immunostimulant monophosphoryl lipid A. *Biomaterials*. 32: 4052-4057.
- Sasaki K, Pardee AD, Okada H, Storkus WJ. 2008. IL-4 inhibits VLA-4 expression on Tc1 cells resulting in poor tumor infiltration and reduced therapy benefit. *Eur J Immunol*. 38: 2865-2873.
- Sato T, Terai M, Tamura Y, Alexeev V, Mastrangelo MJ, Selvan SR. 2011. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res*. 51: 170-182.
- Schalper K. 2002. Herstellung hochdispenser Systeme mit kontinuierlichen Mikromischern [Dissertation]. Berlin, Deutschland: Freie Universität Berlin.
- Schendler A, Wessinger B, Wischke C, Borchert HH. 2008. Beschichtung von PLGA-Mikropartikeln mit doppelsträngiger RNA. [Poster]. DPhG Landesgruppe Berlin/Brandenburg – Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor.
- Schenk M, Belisle JT, Modlin RL. 2009. TLR2 looks at lipoproteins. *Immunity*. 31: 847-849.
- Schliecker G, Schmidt C, Fuchs S, Wombacher R, Kissel T. 2003. Hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) films: effect of oligomers on degradation rate and crystallinity. *Int J Pharm*. 266: 39-49.
- Schlosser E, Mueller M, Fischer S, Basta S, Busch DH, Gander B, Groettrup M. 2008. TLR ligands and antigen need to be coencapsulated into the same biodegradable microsphere for the generation of potent cytotoxic T lymphocyte responses. *Vaccine*. 26: 1626-1637.
- Schmidt J, Welsch T, Jäger D, Mühlradt PF, Büchler MW, Märten A. 2007. Intratumoural injection of the toll-like receptor-2/6 agonist 'macrophage-activating lipopeptide-2' in patients with pancreatic carcinoma: a phase I/II trial. *Br J Cancer*. 97: 598-604.
- Schmitt EE, Polistina RA, inventors. American Cynamid Company, assignee. 1969. Polyglycolic acid prosthetic devices. US Patent 3,463,158.
- Schneider SC, Sercarz EE. 1997. Antigen processing differences among APC. *Hum Immunol*. 54: 148-158.
- Scholes PD, Coombes AG, Illum L, Davis SS, Watts JF, Ustariz C, Vert M, Davies MC. 1999. Detection and determination of surface levels of poloxamer and PVA surfactant on biodegradable nanospheres using SSIMS and XPS. *J Control Release*. 59: 261-278.
- Schreibelt G, Tel J, Sliepen KH, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, de Vries IJ. 2010. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 59: 1573-1582.

- Schultze V, D'Agosto V, Wack A, Novicki D, Zorn J, Hennig R. 2008. Safety of MF59 adjuvant. *Vaccine*. 26: 3209-3222.
- Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Leukoc Biol*. 59: 555-561.
- Seifert R, Schultz G, Richter-Freund M, Metzger J, Wiesmüller KH, Jung G, Bessler WG, Hauschildt S. 1990. Activation of superoxide formation and lysozyme release in human neutrophils by the synthetic lipopeptide Pam3Cys-Ser-(Lys)₄. Involvement of guanine-nucleotide-binding proteins and synergism with chemotactic peptides. *Biochem J*. 267: 795-802.
- Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, Höfler G, Guthann E, Korthäuer U, Zlabinger G, Steinberger P, Pickl WF, Stockinger H, Knapp W, Stöckl J. 2003. B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. *J Immunol*. 170: 3637-3644.
- Seya T, Shime H, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M. 2010. Pattern recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. *Cancer Sci*. 101: 313-320.
- Shakesheff KM, Evora C, Soriano I I, Langer R. 1997. The Adsorption of Poly(vinyl alcohol) to Biodegradable Microparticles Studied by X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). *J Colloid Interface Sci*. 185: 538-547.
- Shakweh M, Besnard M, Nicolas V, Fattal E. 2005. Poly(lactide-co-glycolide) particles of different physicochemical properties and their uptake by peyer's patches in mice. *Eur J Pharm Biopharm*. 61: 1-13.
- Shen L, Sigal LJ, Boes M, Rock KL. 2004. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity*. 21: 155-165.
- Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL. 1997. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol*. 158: 2723-2730.
- Shin T, Kennedy G, Gorski K, Tsuchiya H, Koseki H, Azuma M, Yagita H, Chen L, Powell J, Pardoll D, Housseau F. 2003. Cooperative B7-1/2 (CD80/CD86) and B7-DC costimulation of CD4⁺ T cells independent of the PD-1 receptor. *J Exp Med*. 198: 31-38.
- Sica GL, Choi IH, Zhu G, Tamada K, Wang SD, Tamura H, Chapoval AI, Flies DB, Bajorath J, Chen L. 2003. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity*. 18: 849-861.
- Sims RB. 2012. Development of sipuleucel-T: Autologous cellular immunotherapy for the treatment of metastatic castrate resistant prostate cancer. *Vaccine*. 30: 4394-4397.
- Singh M, Briones M, Ott G, O'Hagan D. 2000. Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 811-816.
- Singh M, Ott G, Kazzaz J, Ugozzoli M, Briones M, Donnelly J, O'Hagan DT. 2001. Cationic microparticles are an effective delivery system for immune stimulatory cpG DNA. *Pharm Res*. 18: 1476-1479.
- Singh M, Ugozzoli M, Briones M, Kazzaz J, Soenawan E, O'Hagan DT. 2003. The effect of CTAB concentration in cationic PLG microparticles on DNA adsorption and in vivo performance. *Pharm Res*. 20: 247-251.
- Sinha VR, Trehan A. 2003. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release*. 90: 261-280.

Literaturverzeichnis

- Smits HH, de Jong EC, Schuitemaker JH, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y, Kapsenberg ML, Wierenga EA. 2002. Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 ligation favors human Th1 development. *J Immunol.* 168: 1710-1716.
- Spenlehauer G, Veillard M, Benoît JP. 1986. Formation and characterization of cisplatin loaded poly(D,L-lactide) microspheres for chemoembolization. *J Pharm Sci.* 75: 750-755.
- Spörri R, Reis e Sousa C. 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol.* 6: 163-170.
- Spohn R, Buwitt-Beckmann U, Brock R, Jung G, Ulmer AJ, Wiesmüller KH. 2004. Synthetic lipopeptide adjuvants and Toll-like receptor 2--structure-activity relationships. *Vaccine.* 22: 2494-2499.
- Stano A, van der Vlies AJ, Martino MM, Swartz MA, Hubbell JA, Simeoni E. 2011. PPS nanoparticles as versatile delivery system to induce systemic and broad mucosal immunity after intranasal administration. *Vaccine.* 29: 804-812.
- Staros JV, Wright RW, Swingle DM. 1986. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal Biochem.* 156: 220-222.
- Steinbrink K, Wöfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol.* 159: 4772-4780.
- Steinman RM, Banchereau J. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* 449: 419-426.
- Steinman RM, Cohn ZA. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 137: 1142-1162.
- Steinman RM. 2012. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol.* 30: 1-22.
- Steinman RM, Swanson J. 1995. The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med.* 182: 283-288.
- Stridsberg KM, Ryner M, Albertsson AC. 2002. Controlled Ring-Opening Polymerization: Polymers with designed Macromolecular Architecture. In: Albertsson AC, vol ed. *Degradable aliphatic polyesters.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag: 41-65. (Abe A, Albertsson AC, Dusek K, de Jeu WH, Kobayashi S, Lee KS, Leibler L, Long TE, Manners I, Möller M, Terentjev EM, Voit B, Wegner G, Wiesner U, Vicent MJ, Genzer J, eds; *Advances in Polymer Science*; vol 157).
- Sun JC, Bevan MJ. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science.* 300: 339-342.
- Suzuki Y, Nishimura Y, Tanihara M, Suzuki K, Nakamura T, Shimizu Y, Yamawaki Y, Kakimaru Y. 1998. Evaluation of a novel alginate gel dressing: cytotoxicity to fibroblasts in vitro and foreign-body reaction in pig skin in vivo. *J Biomed Mater Res.* 39: 317-322.
- Swain SL. 2001. Interleukin 18: tipping the balance towards a T helper cell 1 response. *J Exp Med.* 194: F11-14.
- Tabata Y, Ikada Y. 1988. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials.* 9: 356-362.
- Tabata Y, Ikada Y. 1990. Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages. *Adv Polym Sci.* 94: 107-141.
- Tacke PJ, de Vries IJ, Gijzen K, Joosten B, Wu D, Rother RP, Faas SJ, Punt CJ, Torensma R, Adema GJ, Figdor CG. 2005. Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood.* 106: 1278-1285.

- Tacke PJ, de Vries IJ, Torensma R, Figdor CG. 2007. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol.* 7: 790-802.
- Tafaghodi M, Jaafari MR, Sajadi Tabassi SA. 2006. Nasal immunization studies using liposomes loaded with tetanus toxoid and CpG-ODN. *Eur J Pharm Biopharm.* 64: 138-145.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 21: 335-376.
- Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Mühlradt PF, Akira S. 2000. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol.* 164: 554-557.
- Tang Y, Singh J. 2008. Controlled delivery of aspirin: Effect of aspirin on polymer degradation and in vitro release from PLGA based phase sensitive systems. *Int J Pharm.* 357: 119-125.
- Thiele L, Merkle HP, Walter E. 2003. Phagocytosis and phagosomal fate of surface-modified microparticles in dendritic cells and macrophages. *Pharm Res.* 20: 221-228.
- Thiele L, Rothen-Rutishauser B, Jilek S, Wunderli-Allenspach H, Merkle HP, Walter E. 2001. Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J Control Release.* 76: 59-71.
- Töpfer K, Kempe S, Müller N, Schmitz M, Bachmann M, Cartellieri M, Schackert G, Temme A. 2011. Tumor evasion from T cell surveillance. *J Biomed Biotechnol.* 2011: 918471.
- Tracy MA, Ward KL, Firouzabadian L, Wang Y, Dong N, Qian R, Zhang Y. 1999. Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres in vivo and in vitro. *Biomaterials.* 20: 1057-1062.
- Trimaille T, Pichot C, Delair T. 2003. Surface functionalization of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles with poly(ethylenimine) and plasmid DNA by the layer-by-layer approach. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects.* 221: 39-48.
- Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 3: 133-146.
- Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I. 2003. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science.* 299: 1400-1403.
- Trombetta ES, Mellman I. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol.* 23: 975-1028.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* 26: 171-176.
- Uchida T, Shiosaki K, Nakada Y, Fukada K, Eda Y, Tokiyoshi S, Nagareya N, Matsuyama K. 1998. Microencapsulation of hepatitis B core antigen for vaccine preparation. *Pharm Res.* 15: 1708-1713.
- Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. 2012. *Nat Rev Immunol.* 12: 492-502.
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 401: 811-815.
- Urban BC, Roberts DJ. 2002. Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells. *Curr Opin Immunol.* 14: 458-465.

- Uronen-Hansson H, Allen J, Osman M, Squires G, Klein N, Callard RE. 2004a. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 are present inside human dendritic cells, associated with microtubules and the Golgi apparatus but are not detectable on the cell surface: integrity of microtubules is required for interleukin-12 production in response to internalized bacteria. *Immunology*. 111: 173-178.
- Uronen-Hansson H, Steeghs L, Allen J, Dixon GL, Osman M, van der Ley P, Wong SY, Callard R, Klein N. 2004b. Human dendritic cell activation by *Neisseria meningitidis*: phagocytosis depends on expression of lipooligosaccharide (LOS) by the bacteria and is required for optimal cytokine production. *Cell Microbiol*. 6: 625-637.
- Vandepapelière P, Horsmans Y, Moris P, Van Mechelen M, Janssens M, Koutsoukos M, Van Belle P, Clement F, Hanon E, Wettendorff M, Garçon N, Leroux-Roels G. 2008. Vaccine adjuvant systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers. *Vaccine*. 26: 1375-1386.
- Veldhuis G, Gironès M, Bingham D. 2009. Monodisperse microspheres for parenteral drug delivery. *Drug Deliv Technol*. 9: 24-31.
- Vert M. 2009. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. *J Mater Sci Mater Med*. 20: 437-446.
- Vila A, Sánchez A, Tobío M, Calvo P, Alonso MJ. 2002. Design of biodegradable particles for protein delivery. *J Control Release*. 78: 15-24.
- Vlad G, Chang CC, Colovai AI, Berloco P, Cortesini R, Suci-Foca N. 2009. Immunoglobulin-like transcript 3: A crucial regulator of dendritic cell function. *Hum Immunol*. 70: 340-344.
- von Burkersroda F, Schedl L, Göpferich A. 2002. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*. 23: 4221-4231.
- Waeckerle-Men Y, Allmen EU, Gander B, Scandella E, Schlosser E, Schmidtke G, Merkle HP, Groettrup M. 2006. Encapsulation of proteins and peptides into biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres prolongs and enhances antigen presentation by human dendritic cells. *Vaccine*. 24: 1847-1857.
- Waeckerle-Men Y, Groettrup M. 2005. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*. 57: 475-482.
- Wang J, Wang BM, Schwendeman SP. 2002. Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Control Release*. 82: 289-307.
- Wang N, Wu XS, Li C, Feng MF. 2000. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: I. Synthesis and characterization. *J Biomater Sci Polym Ed*. 11: 301-318.
- Wassermann D, Versfelt CC, inventors. Ethicon Incorporation, assignee. 1974. Use of stannous octoate catalyst in the manufacture of L(-)lactide-glycolide copolymer sutures. US Patent 3,839,297.
- Watchmaker PB, Berk E, Muthuswamy R, Mailliard RB, Urban JA, Kirkwood JM, Kalinski P. 2010. Independent regulation of chemokine responsiveness and cytolytic function versus CD8+ T cell expansion by dendritic cells. *J Immunol*. 184: 591-597.
- Wattendorf U, Coullerez G, Vörös J, Textor M, Merkle HP. 2008. Mannose-based molecular patterns on stealth microspheres for receptor-specific targeting of human antigen-presenting cells. *Langmuir*. 24: 11790-11802.

- Weigt H, Mühlradt PF, Emmendörffer A, Krug N, Braun A. 2003. Synthetic mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 induces maturation and function of dendritic cells. *Immunobiology*. 207: 223-233.
- Wessinger B. 2010. Lipopeptidmodifizierte Liposomen und ihre Effekte auf Dendritische Zellen [Dissertation]. Berlin, Deutschland: Freie Universität Berlin.
- West MA, Prescott AR, Eskelinen EL, Ridley AJ, Watts C. 2000. Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr Biol*. 10: 839-848.
- West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG, Prescott AR, Watts C. 2004. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science*. 305: 1153-1157.
- Wiesmüller KH, Bessler WG, Jung G. 1992. Solid phase peptide synthesis of lipopeptide vaccines eliciting epitope-specific B-, T-helper and T-killer cell response. *Int J Pept Protein Res*. 40: 255-260.
- Williams A, Ibrahim IT. 1981. A new mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3'-dimethylamino)propyl)carbodiimide (EDC). *J Am Chem Soc*. 103: 7090-7095.
- Wischke C, Borchert HH, Zimmermann J, Siebenbrodt I, Lorenzen DR. 2006. Stable cationic microparticles for enhanced model antigen delivery to dendritic cells. *J Control Release*. 114: 359-368.
- Wischke C. 2006. Oberflächenmodifizierte proteinbeladene Mikropartikel für das Targeting Dendritischer Zellen. [Dissertation]. Berlin, Deutschland: Freie Universität Berlin.
- Wischke C, Zimmermann J, Wessinger B, Schendler A, Borchert HH, Peters JH, Nesselhut T, Lorenzen DR. 2009. Poly(I:C) coated PLGA microparticles induce dendritic cell maturation. *Int J Pharm*. 365: 61-68.
- Wise DL, McCormick GJ, Willet GP, Anderson LC. 1976. Sustained release of an antimalarial drug using a copolymer of glycolic/lactic acid. *Life Sci*. 19: 867-873.
- Wise DL, McCormick GJ, Willet GP, Anderson LC, Howes JF. 1978. Sustained release of sulphadiazine. *J Pharm Pharmacol*. 30: 686-689.
- Wolf AJ, Arruda A, Reyes CN, Kaplan AT, Shimada T, Shimada K, Arditi M, Liu G, Underhill DM. 2011. Phagosomal degradation increases TLR access to bacterial ligands and enhances macrophage sensitivity to bacteria. *J Immunol*. 187: 6002-6010.
- Wu XS, Wang N. 2001. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: biodegradation. *J Biomater Sci Polym Ed*. 12: 21-34.
- Xie J, Ng WJ, Lee LY, Wang CH. 2008. Encapsulation of protein drugs in biodegradable microparticles by co-axial electrospray. *J Colloid Interface Sci*. 317: 469-476.
- Xu Q, Hashimoto M, Dang TT, Hoare T, Kohane DS Whitesides GM, Langer R, Anderson DG. 2009. Preparation of monodisperse biodegradable polymer microparticles using a microfluidic flow-focusing device for controlled drug delivery. *Small*. 5: 1575-1581.
- Yamamoto M, Takada S, Ogawa Y, inventors. Takeda Chemical Industries LTD, applicant. 1986. Method for producing microcapsule. European Patent 0 190 833 (A2).

- Yan C, Resau JH, Hewetson J, West M, Rill WL, Kende M. 1994. Characterization and morphological analysis of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique. *J Control Release*. 32: 231-241.
- Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD. 2002. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 16168-16173.
- Yolles S, Leafé TD, Meyer FJ. 1975a. Timed-release depot for anticancer agents. *J Pharm Sci*. 64: 115-116.
- Yolles S, Leafé TD, Woodland JH, Meyer FJ. 1975b. Long acting delivery systems for narcotic antagonists II: release rates of naltrexone from poly(lactic acid) composites. *J Pharm Sci*. 64: 348-349.
- York IA, Rock KL. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol*. 14: 369-396.
- Yvon ES, Vigouroux S, Rousseau RF, Biagi E, Amrolia P, Dotti G, Wagner HJ, Brenner MK. 2003. Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells. *Blood*. 102: 3815-3821.
- Zähringer U, Lindner B, Inamura S, Heine H, Alexander C. 2008. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology*. 213: 205-224.
- Zaks K, Jordan M, Guth A, Sellins K, Kedl R, Izzo A, Bosio C, Dow S. 2006. Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *J Immunol*. 176: 7335-7345.
- Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, Granucci F, Kagan JC. 2011. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell*. 147: 868-880.
- Zarembek KA, Godowski PJ. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol*. 168: 554-561.
- Zhang N, Bevan MJ. 2011. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*. 35: 161-168.
- Zhang Y, Zale S, Sawyer L, Bernstein H. 1997. Effects of metal salts on poly(DL-lactide-co-glycolide) polymer hydrolysis. *J Biomed Mater Res*. 34: 531-538.
- Zobywalski A, Javorovic M, Frankenberger B, Pohla H, Kremmer E, Bigalke I, Schendel DJ. 2007. Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *J Transl Med*. 5: 18.
- Zolnik BS, Burgess DJ. 2007. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *J Control Release*. 122: 338-344.
- Zolnik BS, Leary PE, Burgess DJ. 2006. Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres. *J Control Release*. 112: 293-300.
- Zvonar A, Kristl J, Kerc J, Grabnar PA. 2009. High celecoxib-loaded nanoparticles prepared by a vibrating nozzle device. *J Microencapsul*. 26: 748-759.

7 Publikationen

7.1 Vorträge

Schendler A. 2010. Lipopeptide-modified microparticles for the stimulation of antigen-presenting cells. Seminar der Universität Tübingen vom 21-24. Februar, Oberjoch.

7.2 Zeitschriftenbeiträge

Schendler A, Lorenzen DR, Wessinger B, Wischke C, Borchert HH. TLR2 agonist modified PLGA microparticles: Influence on TNF α production in THP-1 cells. In Vorbereitung.

Wischke C, Zimmermann J, Wessinger B, Schendler A, Borchert HH, Peters JH, Nesselhut T, Lorenzen DR. 2009. Poly(I:C) coated PLGA microparticles induce dendritic cell maturation. *Int J Pharm.* 365: 61-68.

Brüsewitz C, Schendler A, Funke A, Wagner T, Lipp R. 2007. Novel poloxamer-based nanoemulsions to enhance the intestinal absorption of active compounds. *Int J Pharm.* 329:173-181.

7.3 Poster

Schendler A, Wessinger B, Borchert HH. 2009. Lipopeptide-modified PLGA microparticles induce production of tumor necrosis factor alpha in human monocytoïd cells. Internationale Doktorandentagung der DPhG vom 18.-21.11. in Pichlarn, Österreich.

Wessinger B, Schendler A, Borchert H-H. 2009. Liposomes as lipopeptide delivery systems: Influence of liposome preparation techniques on loading efficiency. Internationale Doktorandentagung der DPhG. 18.-21.11. in Pichlarn, Österreich.

Publikationen

Schendler A, Wessinger B, Borchert H-H. 2009. Synthetic lipopeptides as immunoadjuvants: Production of tumor necrosis factor in human monocytoïd cells. DPhG-Jahrestagung. 28.09.-01.10. in Jena.

Lorenzen DR, Schendler A, Wischke C, Wessinger B, Zimmermann J, Peters JH, Borchert H-H, Nesselhut T. 2008. Poly(I:C)-coated microparticles as bifunctional carrier for vaccines in dendritic cell-based cell therapies. 10th International Symposium on Dendritic Cells. 01.-05.10. in Kobe, Japan.

Schendler A, Wessinger B, Wischke C, Borchert HH. 2008. Beschichtung von PLGA-Mikropartikeln mit doppelsträngiger RNA. DPhG Landesgruppe Berlin/Brandenburg – Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor. 04.07. in Berlin.

8 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

9 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------|---|
| aBAS-MP | adsorptiv mit BAS modifizierte PLGA-MP |
| aFSL1-MP | adsorptiv mit FSL1 modifizierte PLGA-MP |
| Alexa 488-SA | mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor [®] 488 gelabelter Sekundär-antikörper |
| aLP-MP | adsorptiv mit LP modifizierte PLGA-MP |
| ANOVA | Varianzanalyse, engl. <i>analysis of variances</i> |
| AP | Assay-Puffer |
| AP1 | Aktivatorprotein 1, engl. <i>activator protein 1</i> ; Transkriptionsfaktor |
| APC | Antigen-präsentierende Zellen, engl. <i>antigen-presenting cells</i> |
| Aqua dem. | Aqua demineralisata |
| AS01 | Adjuvans aus MPL [®] , Liposomen und dem Saponin QS21 |
| AS02 | Adjuvans aus MPL [®] , einer O/W-Emulsion und dem Saponin QS21 |
| AS04 | Adjuvans aus MPL [®] , das an partikuläre Aluminiumsalze gebunden wurde |
| AS15 | Adjuvans aus MPL [®] , CpG-ODN und dem Saponin QS21 |
| AUC | Fläche unter der Kurve, engl. <i>area under the curve</i> |
| BAS | synthetisches Analogon des N-terminalen Teils eines Lipopeptids aus <i>Bacillus cereus</i> (<i>Bacillus anthracis</i> strain) |
| BCA | Bicinchoninsäure, engl. <i>bicinchonic acid</i> |
| BDCA | engl. <i>blood dendritic cell antigen</i> |
| BSA | bovines Serumalbumin, engl. <i>bovine serum albumine</i> |
| CCL | CC-Chemokinligand, engl. <i>CC chemokine ligand</i> |
| CCR | CC-Chemokinrezeptor, engl. <i>CC chemokine receptor</i> |
| CD | durch den Differenzierungscluster (<i>cluster of differentiation</i>) bestimmte Determinante, engl. <i>cluster determinant</i> |
| CLSM | Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie, engl. <i>confocal laser scanning microscopy</i> |
| CM25-TMC35-g-PEG-Pam3Cys | Polymer aus partialsynthetischem 6-O-Carboxymethyl-N,N,N-trimethyl-chitosan an das der TLR2/1-Agonist Pam ₃ Cys über einen PEG-Spacer (NH ₂ -PEG-Pam ₃ Cys) kovalent gekoppelt wurde |
| CpG-ODN | CpG-Oligodesoxynukleotide; einzelsträngige DNA-Oligonukleotide mit hohem Anteil an nicht-methylierten Cytosin-Phosphat-Guanin-Motiven |
| CSE | Kontroll-Standard-Endotoxin, engl. <i>control standard endotoxin</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| CTAB | Cetyltrimethylammoniumbromid |
| CTL | Zytotoxische T-Lymphozyten, engl. <i>cytotoxic T lymphocytes</i> , synonym zytotoxische T-Zellen/CD8 ⁺ -T-Zellen |
| D[4,3] | mittlerer volumengewichteter Partikeldurchmesser; <i>De Brouckere</i> -Durchmesser: $D[4,3] = \Sigma d^4 / \Sigma d^3$ |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DC | Dendritische Zellen, engl. <i>dendritic cells</i> |
| DCM | Dichlormethan |
| DC-SIGN | engl. <i>DC-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM3)-grabbing non-integrin</i> , synonym CD209 |
| DDS | Arzneistoff-Trägersysteme, engl. <i>drug delivery systems</i> |
| DEAE-Dextran | Diethylaminoethyl-dextran |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DPBS | Dulbecco's PBS |
| DSC | Dynamische Differenzkalorimetrie, engl. <i>differential scanning calorimetry</i> |
| DSZM | Deutsche Sammlung von Zellkulturen und Mikroorganismen |
| DZM | Differenzierungsmedium; SM mit 6 ng/ml PMA |
| EDAC | N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| ELISPOT | engl. <i>enzyme-linked immunosorbent spot</i> |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| EU | Endotoxin-Einheiten, engl. <i>endotoxin units</i> |
| FACS | Durchflusszytometer, engl. <i>fluorescence-activated cell sorter</i> |
| FAM | Fertigarzneimittel |
| FCS | fötales Kälberserum, engl. <i>fetal calf serum</i> |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FITC-BSA | mit Fluoresceinisothiocyanat markiertes bovines Serumalbumin |
| FSL1 | Fibroblasten-stimulierendes Lipopeptid 1, engl. <i>fibroblast-stimulating lipopeptide 1</i> ; synthetisches Lipopeptid, das den N-terminalen Teil eines 44 kDa schweren Lipopeptids aus <i>Mycoplasma salivarium</i> darstellt |
| FSL1-bio | FSL1-Biotin; mit Biotin markiertes FSL1 |
| FSL1-Rho | FSL1-Rhodamin; mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin markiertes FSL1 |

| | |
|----------------|--|
| FSL2 | Fibroblasten-stimulierendes Lipoeptid 2, engl. <i>fibroblast-stimulating lipopeptide 2</i> ; Derivat von FSL1, bei dem die C-terminale Aminosäure von FSL1 durch Arginin ersetzt wurde |
| FTIR | Fourier-Transformations-Infrarot |
| GC | Gaschromatografie |
| GC/MS | mit einem Massenspektrometer gekoppelte GC |
| GM-CSF | Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender-Faktor, engl. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> |
| GMP | Gute Herstellungspraxis, engl. <i>good manufacturing practice</i> |
| GMV | engl. <i>giant multilamellar vesicles</i> |
| HAV | Hepatitis A-Virus |
| HBV | Hepatitis B-Virus |
| HEP | L-Glycero-D-Mannoheptose |
| HLA | humanes Leukozytenantigen, engl. <i>human leukocyte antigen</i> |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatografie, engl. <i>high performance liquid chromatography</i> |
| HPV | Humane Papillomaviren |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase, engl. <i>horseradish peroxidase</i> |
| huMoDC | aus humanen Monozyten gewonnene Dendritische Zellen, engl. <i>human monocyte-derived dendritic cells</i> |
| huTNF α | humaner TNF α |
| ICAM1 | Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1, engl. <i>intercellular adhesion molecule 1</i> |
| iDC | unreife Dendritische Zellen, engl. <i>immature dendritic cells</i> |
| IFN | Interferon |
| Ii | unveränderliche Kette, engl. <i>invariant chain</i> |
| IL | Interleukin |
| IRF | engl. <i>interferon-regulatory factor</i> ; Gruppe von Transkriptionsfaktoren |
| ISCOM | immunstimulierende Komplexe, engl. <i>immune-stimulating complexes</i> |
| kBAS-MP | kovalent mit BAS modifizierte PLGA-MP |
| KDO | 2-Keto-3-desoxyoctonsäure, syn. 3-Desoxy-D-manno-oct-2-ulosonsäure |
| kFSL1-bio-MP | FITC-BSA-beladene, kovalent mit FSL1-bio modifizierte PLGA-MP |
| kFSL1-MP | kovalent mit FSL1 modifizierte PLGA-MP |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| kFSL1-Rho-MP | kovalent mit FSL1-Rho modifizierte PLGA-MP |
| kFSL2-MP | kovalent mit FSL2 modifizierte PLGA-MP |
| kLP-MP | kovalent mit Lipopeptid modifizierte PLGA-MP |
| LAL | <i>Limulus</i> -Amöbozyten-Lysat |
| LBP | LPS-bindendes Protein, engl. <i>LPS-binding protein</i> ; Kofaktor für TLR4 |
| LC | Langerhans-Zellen, engl. <i>langerhans cells</i> |
| LD | Laserdiffraktometrie |
| LP | Lipopeptid |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LRW | LAL-Reagenzwasser |
| LTA | Lipoteichonsäure, engl. <i>lipoteichoic acid</i> |
| LUV | engl. <i>large unilamellar vesicles</i> |
| MALP2 | 2 kDa schweres Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid, engl. <i>macrophage-activating lipopeptide of 2 kDa molecular mass</i> |
| MAPK | mitogenaktivierte Proteinkinasen, engl. <i>mitogen-activated protein kinases</i> |
| MD2 | engl. <i>myeloid differentiation protein 2</i> ; synonym LY96, Kofaktor für TLR4 |
| mDC | reife Dendritische Zellen, engl. <i>mature dendritic cells</i> |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| MF59 | engl. <i>microfluidized emulsion 59</i> |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. <i>major histocompatibility complex</i> |
| MP | Mikropartikel |
| MPL® | Adjuvans aus verschiedenen 3-O-Desacyl-4'-monophosphoryl-Lipiden A, die aus LPS von <i>Salmonella minnesota</i> -Stamm R595 gewonnen wurden |
| MPLA | Monophosphoryl-Lipid A |
| mRNA | engl. <i>messenger RNA</i> |
| MTP | Mikrotiterplatte |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid |
| MyD88 | engl. <i>myeloid differentiation primary response protein 88</i> ; Adapterprotein für TLR-Signaltransduktion |
| m/z | Masse-Ladungs-Verhältnis |
| NfκB | engl. <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> ; Transkriptionsfaktor |

| | |
|----------------------|--|
| NMR | Kernspinresonanz, engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> |
| NP | Nanopartikel |
| O-Phase | Öl-Phase bzw. organische Lösungsmittelphase, engl. <i>oil phase</i> |
| OspA | engl. <i>outer surface protein A</i> |
| OVA | Ovalbumin |
| Pam ₂ Cys | S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cystein |
| Pam ₃ Cys | N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cystein |
| PAMP | Pathogen-assoziierte molekulare Muster, engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i> |
| PBMC | aus dem peripheren Blut gewonnene mononukleäre Zellen, engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i>phosphate buffered saline</i> |
| pDC | Plasmazytoide Dendritische Zellen, engl. <i>plasmacytoid dendritic cells</i> |
| PE | Phycoerythrin |
| PE/Cy5 | Phycoerythrin-Cyanin-5-Tandem-Konjugat |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PEI | Polyethylenimin |
| PGA | Polyglycolsäure, engl. <i>poly(glycolic acid)</i> |
| PGE ₂ | Prostaglandin E ₂ |
| PGLA | Poly(glycol-co-L-milchsäure), engl. <i>poly(glycolic-co-L-lactic acid)</i> ; synonym L-PLGA |
| Ph. Eur. | Europäisches Arzneibuch, lat. <i>Pharmacopoea Europaea</i> |
| PIDS | engl. <i>Polarization Intensity Differential Scattering</i> |
| PLA | Polymilchsäure, engl. <i>poly(lactic acid)</i> |
| PLG | Poly(DL-lactid-co-glycolid), engl. <i>poly(DL-lactide-co-glycolide)</i> |
| PLGA | Poly(D,L-milch-co-glycolsäure), engl. <i>poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)</i> |
| PMA | Phorbol-12-myristat-13-acetat; synonym TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) |
| Poly(I:C) | Polyinosin-Polycytidin-Säure, engl. <i>polyinosine-polycytidylic acid</i> |
| PRR | Mustererkennungsrezeptoren, engl. <i>pattern recognition receptors</i> |
| PVA | Polyvinylalkohol |
| RAD-Peptid | Peptid mit der Aminosäuresequenz Arginin-Alanin-Aspartat |
| RGD-Peptid | Peptid mit der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartat, das bevorzugt an Integrine binden |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| RT | Raumtemperatur |
| SAV-Atto 590 | mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto 590 markiertes Streptavidin |
| SDS | Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| SIM | engl. <i>selected ion monitoring</i> |
| siRNA | engl. <i>small interfering RNA</i> |
| SM | Standard-Medium; RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaHCO ₃ , 10 % (V/V) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin |
| sMPLA | synthetisches Monophosphoryl-Lipid A |
| S-Phase | feste Phase, engl. <i>solid phase</i> |
| SPME | Festphasenmikroextraktion, engl. <i>solid phase microextraction</i> |
| SSA | spezifische Oberfläche, engl. <i>specific surface area</i> |
| Strep-HRP | Streptavidin-Myeloperoxidase |
| Sulfo-NHS | N-Hydroxysulfosuccinimid |
| SUV | engl. <i>small unilamellar vesicles</i> |
| TAP | engl. <i>transporter associated with antigen processing</i> |
| TCA | Trichloressigsäure, engl. <i>trichloroacetic acid</i> |
| T _g | Glasübergangstemperatur |
| TGFβ | Transformierender Wachstumsfaktor beta, engl. <i>transforming growth factor beta</i> |
| THP-1 | humane monozytoide Zelllinie, die aus dem peripheren Blut eines Einjährigen mit akuter Monozyten-Leukämie gewonnen wurde; Differenzierung zu Makrophagen-artigen Zellen mittels PMA möglich |
| TIR | Toll-Interleukin-1-Rezeptor |
| TIRAP | engl. <i>TIR domain-containing adaptor protein</i> , synonym Mal; Adapterprotein für TLR-Signaltransduktion |
| TLR | Toll-like-Rezeptoren, engl. <i>toll-like receptors</i> |
| TLR2-AK | anti-TLR2-Antikörper |
| TNFα | Tumornekrosefaktor-alpha, engl. <i>tumor necrosis factor-alpha</i> |
| TRAM | engl. <i>TRIF-related adaptor molecule</i> , synonym TICAM2; Adapterprotein für TLR-Signaltransduktion |
| T _{reg} | regulatorische T-Zellen |
| TRIF | engl. <i>TIR domain-containing adaptor protein inducing IFNβ</i> , synonym TICAM1; Adapterprotein für TLR-Signaltransduktion |
| uMP | unmodifizierte PLGA-MP, Kontroll-MP |
| VLP | virusartige Partikel, engl. <i>virus-like particles</i> |
| v _{UT} | Ultra Turrax®-Geschwindigkeit |

| | |
|-----------------------|---|
| W ₁ -Phase | innere wässrige Phase bei einer W/O/W-Emulsion |
| W ₂ -Phase | äußere wässrige Phase |
| WGA | Weizenkeim-Agglutinin, engl. <i>wheat germ agglutinin</i> |
| W/O/W-Emulsion | Wasser-in-Öl-in-Wasser-Doppelemulsion |
| WP | Wasch-Puffer |
| Z | Zellen |

Der Singular, Plural und Kasus der Abkürzungen ist aus dem Textzusammenhang abzuleiten.
