

PLGA-NANOPARTIKEL FÜR DIE INHALATIVE VAKZINIERUNG



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

JULIA JANKE

Kiel 2014

Erster Gutachter: Prof. Dr. Hartwig Steckel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Marc Schneider

Tag der mündlichen Prüfung: 26. September 2014

Zum Druck genehmigt: 26. September 2014

gez. Prof. Dr. Wolfgang Duschl, Dekan

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Janke, J. und Scherließ, R. (2012). PLGA nanoparticles for vaccine delivery to the respiratory tract. *Drug Delivery to the Lungs 23*, Edinburgh.

Janke, J. und Scherließ, R. (2013). Aerodynamic characterisation of PLGA nanoparticulate dry powder formulation for vaccine delivery via the respiratory tract. *Drug Delivery to the Lungs 24*, Edinburgh.

Janke, J. und Scherließ, R. (2014). Porous PLGA nanoparticles for a better antigen release in the respiratory tract. *Local Chapter Meeting 2014 der Controlled Release Society Germany*, Kiel.

Janke, J. und Scherließ, R. (2014). Vaccination via the respiratory tract – porous PLGA-nanoparticles for a better antigen release. *9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology 2014*, Lissabon.

Meiner Familie gewidmet

*Um klar zu sehen,
genügt oft ein Wechsel
der Blickrichtung.*

Antoine de Saint-Exupéry

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG & ZIELSETZUNG	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielsetzung.....	3
2	THEORETISCHE EINFÜHRUNG.....	4
2.1	Anatomie und physiologische Funktion der Lunge	4
2.2	Vorteile der Lunge für Applikation von Antigenen.....	5
2.3	Immunabwehrmechanismen der Lunge.....	6
2.3.1	Alveolarmakrophagen	6
2.3.2	Dendritische Zellen (DC).....	7
2.3.3	Primäre Immunantworten	9
2.3.4	Sekundäre Immunantworten	11
2.4	Vakzinierung	12
2.4.1	Einführung	12
2.4.2	Prinzip der Vakzinierung	12
2.4.3	Applikationsorte der Vakzine.....	14
2.5	Pulmonale Applikation	15
2.5.1	Pulmonale Wirkstoffapplikation	15
2.5.2	Pulmonale Applikationssysteme.....	16
2.6	Anforderungen an die Vakzinformulierung	18
2.6.1	Generierung einer Immunreaktion.....	18
2.6.2	Pulmonale Applikation	19
2.6.3	Anforderungen an den Inhalator.....	20
3	MATERIAL	21
3.1	PLGA	21
3.2	Ovalbumin	21

3.3	Stabilisatoren	22
3.4	Organische Lösungsmittel	24
3.5	Bidestilliertes Wasser	24
3.6	Trehalose	25
3.7	L-Leucin	25
3.8	Pufferlösungen	26
3.9	Fluoreszenzfarbstoffe	27
3.10	Inhalatoren	28
3.10.1	Cyclohaler	28
3.10.2	Unihaler.....	29
4	METHODEN	31
4.1	Präparative Methoden	31
4.1.1	Nanopartikelherstellung	31
4.1.2	Mischsysteme	32
4.1.3	Fluoreszenzmarkierung	35
4.1.4	Sprühtrocknung	37
4.2	Analytische Methoden	39
4.2.1	Partikelgrößenanalytik	39
4.2.2	Aerodynamische Charakterisierung	44
4.2.3	BCA-Assay	49
4.2.4	Freisetzung.....	50
4.2.5	Partikelvisualisierung	51
4.2.6	Endotoxinbestimmung	53
4.2.7	Immunologische Methoden	54
4.2.8	Zellkultur	55
4.2.9	Zytotoxizitätstests	57
4.3	Statistische Methoden	61

5	PRAKTISCHER TEIL	63
5.1	Solvent Change Präzipitation.....	63
5.1.1	Nanopartikelherstellung	63
5.1.2	Einflussfaktoren auf die Partikelbildung	65
5.1.3	Ovalbuminadsorption	74
5.1.4	Sprühtrocknung	77
5.1.5	Optimierung des Herstellungsverfahrens	78
5.1.6	Partikelgrößenbestimmung des sprühgetrockneten Produkts	80
5.1.7	Partikelvisualisierung	83
5.1.8	Möglichkeiten der Methodenautomatisierung	84
5.1.9	Fluoreszenzmarkierung	88
5.1.10	Immunologische Untersuchungen	89
5.1.11	Fazit	90
5.2	Doppelemulsionsmethode.....	92
5.2.1	Nanopartikelherstellung	92
5.2.2	Einflussfaktoren	94
5.2.3	Übertragung der Methode auf HPMC als Stabilisator	98
5.2.4	Entfernung des unverkapselten Ovalbumins	99
5.2.5	Sprühtrocknung	100
5.2.6	Partikelgrößenbestimmung des sprühgetrockneten Produkts	100
5.2.7	Aerodynamische Charakterisierung	105
5.2.8	Vergleichende Betrachtung der Inhalatoren	108
5.2.9	Optimierung der Formulierung durch L-Leucin-Zusatz.....	109
5.2.10	Freisetzung.....	114
5.2.11	Partikelvisualisierung	117
5.2.12	Ermittlung der Restlösemittelmenge.....	119
5.2.13	Untersuchung der Langzeitstabilität	121
5.2.14	Endotoxinbestimmung	131
5.2.15	Immunologische Untersuchungen	132
5.2.16	Möglichkeiten der Methodenautomatisierung	139
5.2.17	Fazit	141

5.3	Poröse Partikel	143
5.3.1	Nanopartikelherstellung	143
5.3.2	Ovalbumin-Beladung	145
5.3.3	Sprühtrocknung	148
5.3.4	Variation der eingesetzten Trehalosemenge	153
5.3.5	Aerodynamische Charakterisierung	157
5.3.6	Partikelvisualisierung	160
5.3.7	Endotoxinbestimmung	162
5.3.8	Fazit	162
5.4	Zytotoxizitätsuntersuchungen	164
5.4.1	MTT-Assay	164
5.4.2	Vialight-Assay.....	167
6	ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	169
7	ABSTRACT	172
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	174
9	LITERATURVERZEICHNIS	177

1 EINLEITUNG & ZIELSETZUNG

1.1 Einleitung

Im Juni 2014 veröffentlichten Wissenschaftler der Universität Heidelberg und des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg, dass es ihnen gelungen sei, einen Impfstoff zu entwickeln, der das Wachstum eines Gehirntumors bei Mäusen stoppe (Schumacher, 2014; gemeinsame Pressemitteilung, 25.06.2014).

Bei dieser Art der Impfung spricht man von einer therapeutischen Vakzinierung und nicht zuletzt die oben genannte Meldung zeigt, dass diese Form der Vakzinierung seit Jahren ein zunehmendes Interesse weckt. Dennoch handelt es sich bei den meisten gegenwärtig durchgeführten Impfungen um präventive Vakzinierungen, bei denen man sich das körpereigene Antigengedächtnis zunutze macht: Der Körper wird dazu mit attenuierten oder abgetöteten Krankheitserregern in Kontakt gebracht. Das hat zur Folge, dass eine spezifische Immunabwehrreaktion gegen das Antigen ausgelöst wird, ohne dass jedoch die Krankheit selbst ausbricht. Diese spezifische Immunabwehr bleibt über Jahre bestehen und führt bei einem Sekundärkontakt zu einer schnellen und effektiven Bekämpfung des Antigens. In den meisten Fällen kann dadurch das Ausbrechen der Krankheit komplett verhindert oder andernfalls der Verlauf stark abgemildert werden.

Nach einem ähnlichen Prinzip erfolgt auch die therapeutische Vakzinierung: Hierbei wird zum Beispiel ein spezifisches Tumorantigen verwendet. Nach der Applikation soll es von körpereigenen Immunzellen präsentiert werden, sodass eine spezifische Immunabwehr gegen das präsentierte Tumorantigen entwickelt wird. Die Zellen der spezifischen Immunabwehr spüren dann Tumorzellen im Gewebe auf, die dieses Antigen auf ihrer Oberfläche präsentieren, und können die Tumorzellen danach zielgerichtet zerstören.

Damit jedoch eine solche therapeutische Vakzine Erfolg hat, ist eine geeignete Formulierung notwendig. Diese soll die Vakzine zum einen vor äußeren Einflüssen schützen und sie zum anderen gezielt und effektiv zum Ort der immunkompetenten Zellen bringen. Üblicherweise werden für diesen Zweck flüssige Zubereitungen ausgewählt, die allerdings parenteral appliziert werden

müssen. Das bringt einige Nachteile mit sich, wie beispielsweise die Gefahr einer Infektion durch den invasiven Eingriff oder auch die Notwendigkeit der Applikation durch geschultes Personal. Durch die Entwicklung neuer innovativer Applikationssysteme besteht daher Potential, Verbesserungen herbeizuführen.

Einen sehr interessanten Applikationsort stellt die Lunge dar. Sie ist der Haupteintrittsort partikulärer Antigene aus der Luft in den menschlichen Körper, weshalb, über den gesamten Bronchialbaum verteilt, immunkompetente Zellen lokalisiert sind. Zusammen mit der enorm großen Oberfläche bietet die Lunge außerordentliche Möglichkeiten für die Interaktion zwischen inhaliertem Antigen und körpereigenem Immunsystem. Eine zytotoxische T-Zell-Antwort, die für die therapeutische Vakzinierung benötigt wird, kann besonders gut über die mukosale Route ausgelöst werden. Die pulmonale Applikation bietet dabei den großen Vorteil, dass sie nicht-invasiv erfolgt und damit die Gefahr von Sekundärinfektionen minimiert wird. Der Impfstoff kann zum Beispiel als Pulver mittels eines Trockenpulverinhalators appliziert werden, wobei kein speziell geschultes Personal notwendig ist. Der Patient könnte diesen Impfstoff sogar eigenständig applizieren. Ein trockenes Pulver bietet darüber hinaus den Vorteil, dass es länger stabil bleibt als eine flüssige Zubereitung.

Um eine erfolgreiche pulmonale Applikation einer Vakzine zu erreichen, muss eine Formulierung entwickelt werden, die sowohl in die Lunge appliziert werden, als auch von immunkompetenten Zellen aufgenommen werden kann, um daran anschließend eine Immunreaktion auszulösen. Die Entwicklung einer solchen Formulierung erfolgte im Rahmen dieser Arbeit.

Eine erfolgreiche therapeutische Vakzinierung über die Lunge würde eine minimalinvasive Therapieform bedeuten, die den Patienten womöglich aufwendige Operationen erspart und zugleich eine unkomplizierte Applikationsart darstellt.

1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer partikulären Impfstoffformulierung für die pulmonale Applikation. Die Formulierung soll final als trockenes Pulver mittels eines Trockenpulverinhalators applizierbar sein. Dabei wird Ovalbumin als Modellantigen verwendet, das *in vitro* und *in vivo* im murinen Modell immunologisch charakterisiert und später durch ein anderes Antigen ersetzt werden kann.

Um das Ziel dieser Arbeit zu erreichen, muss eine Herstellungsmethode entwickelt werden, die es ermöglicht, das Antigen in partikulärer Form zu applizieren. Dafür wird PLGA als biodegradierbares und biokompatibles Polymer verwendet. Der partikuläre Antigenträger soll eine Zielgröße im Bereich von 200-400 nm besitzen, da Partikel mit dieser Größe besonders gut durch dendritische Zellen aufgenommen werden können. Allerdings sind Partikel dieser Größe nicht für eine Applikation über den Respirationstrakt geeignet. Daher sollen die entwickelten Nanopartikel in eine trockendispergierbare mikropartikeluläre Form mit einer aerodynamischen Größe zwischen 0,5 und 5 µm überführt werden. In Kontakt mit der Feuchtigkeit in der Lunge sollen diese Mikropartikel zerfallen und das nanopartikeluläre Antigen freisetzen, woraufhin dieses durch die dendritischen Zellen aufgenommen wird. Eine Voraussetzung für eine adäquate Immunisierung ist eine möglichst schnelle Freisetzung des Antigens nach erfolgter partikulärer Aufnahme.

Die entwickelte Formulierung soll hinsichtlich Partikelgröße, aerodynamischen Eigenschaften sowie der Freisetzung eingehend charakterisiert werden. Aus den damit gewonnenen Erkenntnissen soll die Formulierung so optimiert werden, dass eine möglichst große Feinpartikelfraktion, Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser unter 5 µm, sowie möglichst hohe Antigenfreisetzung resultieren. Weiterhin soll die Stabilität der Formulierung über eine Lagerzeit von sechs Monaten untersucht und eine Möglichkeit für die industrielle Umsetzbarkeit der Herstellungsmethode evaluiert werden.

2 THEORETISCHE EINFÜHRUNG

Bereits seit Jahrzehnten wird die Lunge als Applikationsort von Wirkstoffen genutzt (Newman, 2009). Dabei steht vor allem die lokale Behandlung von COPD und Asthma im Vordergrund. Aber zusätzlich zu diesen lokalen Behandlungsformen ist auch eine systemische Applikation von Wirkstoffen möglich (Ungaro, 2012). Selbst Proteine können systemisch appliziert werden. Ein Beispiel dafür ist das aktuell (Juni 2014) von der FDA zugelassene Afrezza[®] der Firma MannKind Corporation. Dabei handelt es sich um ein schnellwirksames inhalierbares Insulinpräparat (Pressemitteilung FDA, 2014).

Die Lunge ist aufgrund ihrer großen Oberfläche von 80-90m² und dem physiologischen pH-Wert von 7,4 ein aussichtsreiches Target für die Applikation von Proteinen. Durch eine Vielzahl immunkompetenter Zellen, die über den gesamten Bronchialbaum verteilt sind, bietet die Lunge zudem Potential für die Applikation von Antigenen.

2.1 Anatomie und physiologische Funktion der Lunge

Die Lunge gliedert sich in einen linken und einen rechten Lungenflügel. Dabei setzt sich der linke Flügel aus einem oberen und einem unteren Lungenlappen zusammen. Der rechte Flügel besitzt zusätzlich einen mittleren Lungenlappen. Die Luftröhre teilt sich in die zwei Hauptbronchien auf, die die Luft in die Lunge leiten. In der Lunge verästeln sich die Bronchien weiter zu Bronchiolen, an dessen Ende der Alveolargang mit den Alveolen sitzt. Die Alveolen sind von einem dichten Kapillarnetz umgeben, durch das venöses Blut aus der Arteria pulmonalis fließt. Das alveoläre Epithel ist so dünn, dass hier der Atemgasaustausch stattfinden kann. Durch Diffusion findet der Austausch von Kohlenstoffdioxid gegen Sauerstoff aus der eingeatmeten Umgebungsluft statt. Die Alveolen besitzen eine Gesamtoberfläche von ca. 80-90 m², welche den Gasaustausch stark begünstigt.

Die Oberfläche der Alveolen ist mit einem Oberflächenfilm, dem sogenannten Surfactant, bedeckt. Dieser besteht zum Großteil aus einem Gemisch aus Phospholipiden. Er schützt die Lungenbläschen vor einem Kollabieren am Ende

des Ausatmens, ermöglicht eine homogene Belüftung und verbessert den Schleimtransport.

Die Trachea sowie die Bronchien enthalten an ihrer Innenseite ein Bronchialepithel, das die Flimmerhaare trägt. Diese dienen dazu, eingeatmete Partikel und Bronchialsekret aus der Lunge zu befördern. Dieser Vorgang wird auch als mukoziliäre Clearance bezeichnet. Unter dem Bronchialepithel befinden sich Drüsen, die das Bronchialsekret absondern. Das Bronchialsekret dient zur Befeuchtung der Atemwege (Mutschler, 2008).

2.2 Vorteile der Lunge für Applikation von Antigenen

Bisher müssen die meisten Antigene parenteral appliziert werden, um den Kontakt mit Proteasen und extremen pH-Werten im Gastrointestinaltrakt zu umgehen. Diese würden zu physiko-chemischer Degradation und dem Verlust der biologischen Aktivität führen (Depreter, 2013). Diese genannten Nachteile treten bei der pulmonalen Applikation nicht auf. Weiterhin sind in der Lunge weniger Wechselwirkungen zu erwarten, wie sie zum Beispiel im Gastrointestinaltrakt mit Mahlzeiten auftreten (Byron, 1994). Eine pulmonale Applikation solcher Biomoleküle stellt dabei eine interessante Alternative zur parenteralen Applikation dar (Depreter, 2013). Ein großer Vorteil der pulmonalen Applikation ist, dass die Lunge ein weltweit akzeptiertes Target ist (Newman, 2009), da die Applikation unkompliziert und schmerzfrei erfolgen kann. Ferner bietet sie neben der guten Zugänglichkeit die Vorteile einer einfachen, sowie nicht-invasiven Antigen-Applikation. Auf diesem Weg lässt sich ein mukosales Netzwerk antigenpräsentierender Zellen erreichen (siehe Abschnitt 2.3). Die große Oberfläche der Lunge bietet außerordentliche Möglichkeiten für die Interaktion zwischen inhaliertem Antigen und dem Immunsystem (Blank, 2011).

Da die Lunge der Haupteintrittsort für partikuläre Antigene aus der Luft in den menschlichen Körper ist, stellt dies eine interessante Route dar, den Impfstoff auf dem gleichen Weg zu applizieren. Allerdings ist bei der Antigenapplikation darauf zu achten, dass der Kontakt mit einem Antigen über die Luftwege Toleranz, Immunität oder auch Allergien auslösen kann (Blank, 2011). Dieser Effekt ist jedoch auch bei anderen mukosalen Routen zu beobachten (Holmgren,

2005). Ob eine Toleranz induziert wird, ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie der Antigenmenge, der Form und der Häufigkeit des Kontakts (Blank, 2011).

2.3 Immunabwehrmechanismen der Lunge

Da partikuläre Antigene aus der Luft hauptsächlich durch die Lunge in den menschlichen Körper eindringen, weist der Körper unterschiedliche Abwehrmechanismen gegen diese Antigene auf. Zu den ersten Abwehrmechanismen zählen das Surfactantsystem, das Lungenepithel mit den tight junctions und die dünnflüssige Schleimschicht auf der Epitheloberfläche, sowie die mukoziliäre Clearance. Passiert ein Antigen alle diese Mechanismen, greifen die nachgeordneten Abwehrmechanismen des adaptiven und des angeborenen Immunsystems, die über den gesamten Bronchialbaum verteilt sind. Dabei sind vor allem Alveolarmakrophagen und dendritische Zellen (DC) von Relevanz. Die Alveolarmakrophagen sind auf dem Epithel und die dendritischen Zellen im Epithel zu finden. Das adaptive Immunsystem lässt sich weiter in das zelluläre und das humorale Immunsystem unterteilen. Da das zelluläre Immunsystem für die therapeutische Vakzinierung entscheidend ist, wird dieses hier nachfolgend genauer erläutert.

2.3.1 Alveolarmakrophagen

Die größte Zahl an Alveolarmakrophagen ist im Lungenparenchym der tiefen Lunge zu finden, dem Gewebe, an dem der Gasaustausch stattfindet (Blank, 2011). Die Hauptaufgabe der Makrophagen ist die Phagozytose von Pathogenen. Diese Pathogene weisen üblicherweise eine spezifische molekulare Struktur (PAMP für pathogen-associated molecular pattern) auf. Dabei handelt es sich unter anderem um Proteine. Makrophagen können mit einem spezifischen Rezeptor (PRR für pattern recognition receptor) an ihrer Oberfläche an die PAMP binden. Diese Bindung führt zu einer Aktivierung und Ausreifung der Makrophagen, gefolgt von einer gesteigerten Phagozytose und der Produktion von Zytokinen. Nach phagozytotischer Aufnahme des Pathogens erfolgen im Inneren der Makrophagen zuerst die Abtötung durch lysosomale Kompartimente und anschließend der Abbau. Aufgenommene Antigene können die Makrophagen an ihrer Oberfläche präsentieren, dabei erfolgt die Präsentation allerdings weniger effektiv als bei den dendritischen Zellen (DC,

Abschnitt 2.3.2). Vermutlich dient diese Präsentation der Aktivierung von T_H1-Zellen, die den Makrophagen bei der Eliminierung von Pathogenen helfen. Weiterhin wird angenommen, dass Makrophagen, wie auch die dendritischen Zellen, T-Zellen aktivieren, wobei dies in einer viel geringeren Weise als bei den dendritischen Zellen geschieht. Die Makrophagen wandern im Vergleich zu den dendritischen Zellen in deutlich geringerem Umfang zu den Lymphknoten, um dort Antigene an naive T-Zellen zu präsentieren (Rink, 2012).

2.3.2 Dendritische Zellen (DC)

Der gesamte Respirationstrakt ist mit einem engen Netzwerk dendritischer Zellen überzogen, die zu den wichtigsten Zellen des Immunsystems gehören. Wie die Makrophagen gehören auch die DC zu den antigenpräsentierenden Zellen. Neben ihrer Hauptaufgabe, Antigene an T-Zellen zu präsentieren, dienen sie ebenfalls als Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Der Grund hierfür ist, dass sie genaue Informationen über Ort, Art und Stärke der Infektion geben und entscheiden, welche Immunantwort aufgebaut wird.

Ihren Ursprung haben die dendritischen Zellen in hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Nach Freisetzung aus dem Knochenmark zirkulieren sie als Vorläufer-DC in der Blutbahn. Durch chemotaktische Signale wandern sie ins periphere Gewebe ein, wo sie als unreife DC verbleiben. Sie strecken ihre Ausläufer in das umgebende Gewebe und auch durch tight junctions der Epithelien. Dadurch sind die dendritischen Zellen in der Lage, überall Antigene aufzufinden. Charakteristisch für die unreifen DC sind eine große Aufnahmefähigkeit für Antigene aus der Umgebung und eine geringe Präsentation von MHC-Molekülen und costimulierenden Molekülen auf der Oberfläche. Die Aufnahme von Antigenen erfolgt dabei auf drei unterschiedliche Arten: Durch Phagozytose, Makropinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose. Durch Phagozytose können partikuläre Antigene und größere Partikel, mit einer Größe über 1 µm, aufgenommen werden. Die Makropinozytose dient zur Aufnahme von extrazellulären Flüssigkeiten und darin gelösten Antigenen. Bei der rezeptorvermittelten Endozytose kommt es hingegen zu einer Bindung von einem Antigen an einen Zellrezeptor, wodurch sich die Plasmamembran einstülpt und das Antigen in ein endozytotisches Vesikel aufgenommen wird. Bei

einer Aktivierung der DC erfolgt eine gesteigerte Antigenaufnahme durch Makropinozytose. Makrophagen zeichnen sich im Gegensatz dazu durch eine besonders ausgeprägte Phagozytosefähigkeit aus. Sie können in einem Vorgang bis zu 50% ihrer Oberfläche internalisieren.

Über die drei oben genannten Aufnahmewege werden im Normalzustand ständig Antigene aus der Umgebung aufgenommen. Dabei handelt es sich sowohl um eigene Antigene als auch um solche, die von Pathogenen und infizierten oder toten Zellen stammen. Im Inneren der Zellen wird das aufgenommene Antigen degradiert, Bruchstücke werden an MHC-Moleküle gebunden und an die Zelloberfläche transportiert, wo das Bruchstück präsentiert wird. Allerdings erfolgt diese Präsentation im unreifen Zustand nur wenig effektiv. Dies ändert sich, wenn die DC zusätzliche Aktivierungssignale bekommen. Solche Aktivierungssignale sind zum einen proinflammatorische Zytokine und zum anderen Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMP). Diese Aktivierung löst die Ausreifung der DC aus und induziert die Wanderung aus dem peripheren Gewebe in die Lymphknoten, wo die ausgereiften DC mit T-Zellen interagieren. Auf diesem Weg kommt es zu einer verstärkten Produktion der mit Antigenen beladenen MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle. Es werden dadurch immer mehr MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle zusammen mit weiteren T-Zell-stimulierenden Molekülen auf der Zelloberfläche der DC präsentiert. Durch diese Kaskade differenzieren sich zuvor unreife DC zu effektiven T-Zell-Aktivatoren aus, die eine wichtige Funktion bei der Regulierung der körpereigenen Immunreaktion haben. Charakteristisch für die ausgereifte dendritische Zelle sind eine nur noch geringe Antigenaufnahme und eine Vielzahl von MHC- und costimulierenden Molekülen auf der Zelloberfläche (Rink, 2012).

Die Targetierung von DC in den zuführenden Atemwegen, also den Bronchien und Bronchiolen, stellt eine interessante Möglichkeit dar, eine Immunität gegen respiratorische Pathogene zu erreichen. Dabei besteht die Möglichkeit unterschiedliche respiratorische und immunologische Kompartimente durch eine Anpassung der aerodynamischen Partikelgröße zu targetieren (Blank, 2011).

2.3.3 Primäre Immunantworten

Nach Aktivierung der dendritischen Zellen im peripheren Gewebe setzt ein Differenzierungsprozess ein. Als Folge dessen wird die Phagozytoseaktivität vermindert. Bereits aufgenommene Antigene werden prozessiert, in MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Moleküle eingebaut und zusammen mit den costimulierenden Molekülen CD80 und CD86 an der Oberfläche präsentiert. Durch diese Differenzierung ist eine professionell antigenpräsentierende Zelle entstanden.

Im Lymphknoten treffen die ausgereiften dendritischen Zellen auf naive T-Zellen, die über die Blutbahn in die peripheren lymphatischen Gewebe gelangen. Die reifen dendritischen Zellen sind nun zum einen in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren und zum anderen produzieren sie nun selbst Zytokine, die naive T-Zellen direkt zu ihnen locken.

Die T-Zellen lassen sich in $CD4^+$ -T-Zellen, die an MHC-Klasse-II-Moleküle binden, und $CD8^+$ -T-Zellen, die an MHC-Klasse-I-Moleküle binden, unterscheiden. Im Gegensatz zu den MHC-Klasse-II-Molekülen, die sich ausschließlich auf professionell antigenpräsentierenden Zellen befinden, kommen die MHC-Klasse-I-Moleküle auf praktisch allen kernhaltigen Körperzellen vor.

Die $CD8^+$ -T-Zellen sind zytotoxische T-Zellen, die infizierte Zellen töten. Sie erkennen mithilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) fremde Antigene in MHC-Klasse-I-Komplexen unabhängig von welcher Art von Zelle die Präsentation ausgeht. Die $CD4^+$ -T-Zellen sind hingegen T-Helferzellen. Sie koordinieren die Immunantwort und erkennen fremdes Antigen auf professionell antigenpräsentierenden Zellen, die dieses über den MHC-Klasse-II-Komplex präsentieren.

Der weitere Ablauf der Signale kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen, abhängig davon, ob ein Antigen durch MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert wird (Rink, 2012). Da der Signalweg über den MHC-Klasse-I-Komplex für therapeutische Impfungen wichtiger ist, wird auf den MHC-Klasse-II-Signalweg nur kurz eingegangen und hauptsächlich der MHC-Klasse-I-Signalweg erläutert.

2.3.3.1 MHC-Klasse-I-Signalweg

MHC-Klasse-I-Moleküle kommen auf praktisch allen kernhaltigen Zellen des Körpers vor. Sie präsentieren die intrazelluläre Proteinzusammensetzung einer Zelle. Das bedeutet, dass bei einer Virusinfektion oder im Falle einer Tumorzelle ebenfalls virale oder veränderte körpereigene Peptide über den MHC-Klasse-I-Komplex präsentiert werden. Weiterhin präsentieren sie im Zuge der Kreuzpräsentation, die allerdings nur durch dendritische Zellen erfolgen kann, ebenfalls exogen aufgenommenes Antigen über den MHC-Klasse-I-Komplex. Wenn naive $CD8^+$ -T-Zellen das präsentierte Peptid als fremd erkennen, werden diese aktiviert und eine T-Zell-Antwort ausgelöst. Die Auslösung einer T-Zell-Antwort im peripheren lymphatischen Gewebe wird als Priming bezeichnet. Bei erfolgreichem Priming wandelt sich die naive T-Zelle in eine zytotoxische T-Zelle, auch Effektorzelle genannt, um, die in der Lage ist, infizierte Zellen oder Tumorzellen abzutöten. Um ein falsches Priming zu verhindern, wird dieser Vorgang von zwei Schritten kontrolliert. Zuerst muss eine Bindung zwischen dem MHC-Klasse-I-Komplex und dem T-Zell-Rezeptor erfolgen. Als zweites Signal dienen die costimulierenden Moleküle CD80 und CD86 auf der Oberfläche der dendritischen Zellen. Diese lösen eine klonale Expansion der T-Zelle aus. Die aktivierten T-Zellen sezernieren zusätzlich Interleukin-2 (IL-2), was zu einer weiteren T-Zell-Proliferation führt. Auf diese Weise kann innerhalb kurzer Zeit eine große Anzahl zytotoxischer T-Zellen entstehen. Auf der Oberfläche der zytotoxischen T-Zellen werden Aktivierungsmarker exprimiert. Einer dieser Marker ist CD69, welcher später in den immunologischen Untersuchungen als Marker für die Stärke der T-Zell-Aktivierung bestimmt wird.

Die auf diese Weise entstandenen T-Effektorzellen wandern ins Gewebe, wo sie virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen töten, indem sie einen programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren. Dafür nehmen die zytotoxischen T-Zellen zuerst Kontakt zur Zielzelle auf. Dabei überprüfen sie mit ihrem Rezeptor, ob sie das im MHC-Klasse-I-Komplex präsentierte Peptid erkennen. Wenn dies der Fall ist, erfolgt die Bindung durch Ausbildung einer immunologischen Synapse. Durch diese gibt die T-Zelle zytotoxische Granula in die Zielzelle ab. Die Granula enthalten ein Gemisch aus Perforinen, Granzymen und Granulysin, was zielgerichtet auf die infizierte Zelle einwirkt.

Nach erfolgter Apoptose löst die zytotoxische T-Zelle ihren Kontakt zur Zielzelle und wendet sich benachbarten Zellen zu. Es erfolgt erneut das Überprüfen des im MHC-Klasse-I-Komplex präsentierten Peptids. Erst wenn kein Fremdpeptid mehr zu finden ist und damit Signale ausbleiben, tritt auch bei der zytotoxischen T-Zelle die Apoptose ein. Die apoptotischen Zellen werden durch ihre veränderte Zellmembran von Makrophagen und Phagozyten erkannt und beseitigt.

2.3.3.2 MHC-Klasse-II-Signalweg

MHC-Klasse-II-Moleküle befinden sich sowohl auf dendritischen Zellen, wie auch auf Makrophagen. Sie präsentieren Peptide, die von extrazellulären Substanzen stammen. Dabei kann es sich zum Beispiel um abgestorbene körpereigene Zellen, Viren oder Tumorzellen handeln. Die präsentierten Peptide zeigen dem körpereigenen Immunsystem, ob Krankheitserreger in den Körper gelangt sind und sich außerhalb von Zellen aufhalten. CD4⁺-T-Helferzellen erkennen, wenn fremde Peptidstrukturen auf dem MHC-Klasse-II-Molekül präsentiert werden, und koordinieren die Immunantwort über Zytokine (Rink, 2012).

2.3.4 Sekundäre Immunantworten

Durch die oben genannte Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (Abschnitt 2.3.3.1) werden üblicherweise keine Gedächtniszellen ausgebildet. Dies geschieht erst durch Hilfe von CD4⁺-T-Helferzellen, die mit derselben dendritischen Zellen in Kontakt standen. Sie fördern die Proliferation, Differenzierung sowie Generierung von CD8⁺-T-Gedächtniszellen. Diese T-Gedächtniszellen treten in den ersten vier Wochen nach Auslösung einer primären Immunreaktion auf. Zu Beginn liegen sie in einer sehr hohen Zahl vor, die sechs Monate nach der Infektion wieder abnimmt und dann auf einem konstanten Level bleibt. Diese Gedächtniszellen reagieren bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Erreger besonders schnell und effektiv, sodass die Erkrankung kein zweites Mal auftritt beziehungsweise deutlich schwächer verläuft. Diese Immunreaktionen werden sekundäre Immunantworten genannt.

Im Falle von präventiven Impfungen macht man sich die Fähigkeit des Körpers zunutze, mithilfe des Immunsystems ein Gedächtnis für Antigene anzulegen und somit eine Immunität des Körpers zu erreichen (Rink, 2012).

2.4 Vakzinierung

2.4.1 Einführung

Laut dem Robert-Koch-Institut gehören Impfungen zu den wichtigsten und wirksamsten präventiven Maßnahmen, die der Medizin zur Verfügung stehen. Das allein zeigt bereits die Bedeutung der Impfung in der heutigen Zeit. Durch konsequentes Impfen ist es beispielsweise bereits gelungen, die Pocken-erkrankung weltweit zu eliminieren (Robert Koch Institut, 2013).

2.4.2 Prinzip der Vakzinierung

2.4.2.1 Präventive Vakzinierung

Bei der klassischen präventiven Impfung werden abgeschwächte (attenuierte) oder abgetötete Erreger oder nur deren Antigene appliziert, wodurch im Geimpften eine Immunantwort gegen die Erreger oder das Antigen ausgelöst wird, allerdings die Krankheit selbst nicht ausbricht. Bei einer Sekundärinfektion kommt es zur oben genannten Sekundärantwort (Abschnitt 2.3.4), die den Ausbruch der Erkrankung ganz verhindert oder den Krankheitsverlauf deutlich abmildert. Durch die Impfung wird ein langanhaltender Schutz aufgebaut, den erst das immunologische Gedächtnis möglich macht (Rink, 2012).

2.4.2.2 Therapeutische Vakzinierung

Einen alternativen Ansatz stellt die therapeutische Impfung dar. Dabei ist die Erkrankung, z.B. ein Tumor, bereits im Körper und soll hier mithilfe einer Vakzine bekämpft werden (Giarelli, 2007). Bei dieser Art der Vakzinierung ist es das Ziel, eine zytotoxische T-Zellantwort auszulösen (Palucka, 2011). Dieses kann besonders gut über die mukosale Route erfolgen, wozu neben der Lunge beispielsweise ebenfalls Nase, Rektum und der weibliche Genitaltrakt zählen (Holmgren, 2005).

Um eine erfolgreiche therapeutische Vakzinierung durchzuführen, sind die dendritischen Zellen das wichtigste Target (Silva, 2012). Dabei stehen für die Targetierung der dendritischen Zellen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, wobei hier drei beispielhaft aufgeführt werden:

- 1) Vorläufer der dendritischen Zellen werden einem Krebspatienten entnommen, in-vitro mit Tumorantigen beladen und zur Ausreifung gebracht und

anschließend demselben Patienten wieder injiziert. Die dendritischen Zellen sollen das Tumorantigen im Körper effektiv präsentieren und damit eine Tumorantigen-spezifische T-Zellreaktion hervorrufen (Schijns, 2014).

- 2) Ein spezifisches Peptidfragment eines Tumorantigens wird in den Körper eingebracht, von den dendritischen Zellen aufgenommen, prozessiert und anschließend von der dendritischen Zelle an der Oberfläche präsentiert, sodass auch in diesem Fall spezifische zytotoxische T-Zellen gegen das Tumorantigen generiert werden.

Dabei gibt es zwei unterschiedliche Ansätze: Den autologen, bei dem das Tumorantigen vom selben Patienten stammt, und den allogenen, bei dem es sich um das Tumorantigen eines fremden Patienten handelt (Giarelli, 2007).

- 3) Neben der Vakzinierung mit einem spezifischen Fragment des Tumorantigens, besteht eine weitere Möglichkeit der Vakzinierung mit einer kompletten Tumorzelle. Dabei kann es sich um eine autologe oder allogene Zellen handeln. Die Tumorzelle enthält eine Vielzahl verschiedener Antigene, die nach Applikation ebenfalls eine Immunreaktion stimulieren sollen (Giarelli, 2007).

Bei den drei aufgeführten Ansätzen wird jeweils das Ziel verfolgt, dass Tumorantigene von dendritischen Zellen präsentiert werden. Die Antigenpräsentation führt zu einem Priming von T-Zellen, gefolgt von einer klonalen Expansion der zytotoxischen T-Zellen. Diese suchen zielgerichtet das Gewebe nach dem präsentierten Antigen ab (Abschnitt 2.3.3). Wenn eine Tumorzelle im Körper das durch die DC präsentierte Antigen an ihrer Oberfläche zeigt, kommt es zur Bekämpfung der Tumorzellen durch die zytotoxischen T-Zellen. Im Idealfall gelingt es den Tumor komplett zu zerstören. Um solch eine immunologische Destruktion eines bestehenden Tumors zu erreichen, müssen drei Bedingungen erfüllt werden:

- 1) In-vivo muss eine ausreichende Zahl an Immunzellen generiert werden, die das Tumorantigen jeweils sehr zuverlässig erkennen.
- 2) Die Immunzellen müssen zum Tumor gelangen und diesen infiltrieren.

- 3) Die Immunzellen müssen am Ort des Tumors in aktivierter Form vorliegen, damit ein geeigneter Mechanismus, wie z.B. die direkte Lyse oder die Sekretion von Zytokinen, die fähig sind einen Tumor zu zerstören, ausgelöst werden kann (Rosenberg, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit geht es um die Entwicklung einer geeigneten Formulierung für die Vakzinierung durch Applikation eines Tumorantigen-fragments.

2.4.3 Applikationsorte der Vakzine

Da es sich bei den Antigenen meistens um empfindliche Peptide handelt, können diese bis auf wenige Ausnahmen nicht peroral appliziert werden. Anderenfalls würde es zur Degradation durch den sauren pH-Wert im Gastrointestinaltrakt kommen. Daher ist derzeit die parenterale Route der gebräuchlichste Applikationsweg. Dieser hat aber einige Nachteile. Da es sich um einen invasiven Eingriff handelt, besteht, besonders in Ländern mit niedrigen Hygienestandards, die Gefahr von Infektionen. Zudem ist für die Applikation geschultes Personal notwendig (Jain, 2011). Ein weiterer Nachteil ist, dass der Impfstoff, um injiziert werden zu können, in Form einer Lösung, Suspension oder Emulsion vorliegen muss. Damit ist die Stabilität im Vergleich zu einem trockenen Pulver reduziert (Huang, 2004).

Aufgrund der genannten Nachteile bietet die pulmonale Applikation dem gegenüber viele Vorteile. Die Lunge bietet, wie bereits in Abschnitt 2.2 beschrieben, eine sehr große Oberfläche und ist mit einem dichten Netzwerk immunkompetenter Zellen bedeckt. Die Applikation kann nicht-invasiv erfolgen, sodass die Gefahr von Sekundärinfektionen minimiert wird. Im besten Fall kann der Patient die Vakzine selbst applizieren, sodass kein geschultes Personal benötigt wird. Weiterhin kann die Formulierung als trockenes Pulver mithilfe eines Inhalators appliziert werden, wodurch die Stabilität günstig beeinflusst wird.

2.5 Pulmonale Applikation

2.5.1 Pulmonale Wirkstoffapplikation

Für die pulmonale Applikation eines Wirkstoffes muss dieser die Form eines Aerosols haben. Dabei können sowohl feste Partikel als auch Flüssigkeitströpfchen, dispergiert in der Gasphase, vorliegen (Newman, 2009). Die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche pulmonale Wirkstoffapplikation ist die aerodynamische Partikelgröße (Depreter, 2013). Abhängig von dieser können die Partikel die Lunge erreichen oder bereits vorher impaktieren. Daher stellt die Bestimmung der aerodynamischen Partikelgröße das am besten geeignete Verfahren für die Charakterisierung eines Aerosols dar. Dabei kann die aerodynamische Partikelgröße, die von Größe, Form und Dichte des Partikels festgelegt wird, durchaus von der geometrischen Partikelgröße abweichen. Ein Partikel mit einem kleinen geometrischen Durchmesser, aber hoher Dichte, kann vergleichbare aerodynamische Eigenschaften besitzen wie ein Partikel mit einem großen geometrischen Durchmesser, aber zugleich poröser Struktur. Letztlich ist die aerodynamische Größe entscheidend für die Deposition der Aerosolpartikel, da das dynamische Partikelverhalten im Luftstrom von dieser abhängig ist. Dabei wird die Deposition der Partikel hauptsächlich von zwei Kräften beschrieben: Zum einen der Sedimentation aufgrund von Gravitation und zum anderen der Impaktion, der Prallabscheidung von Partikeln, aufgrund ihrer Massenträgheit (Telko, 2005).

Abbildung 2.1 stellt die unterschiedlichen Depositionsmechanismen im Respirationstrakt in Abhängigkeit von der aerodynamischen Größe dar. Durch Impaktion werden Partikel mit einer aerodynamischen Partikelgröße über 15 μm bereits im Mund und Rachenraum abgeschieden (Peek, 2008). Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser über 5 μm gelangen hingegen noch in die oberen Atemwege, wo sie hauptsächlich ebenfalls durch Impaktion abgeschieden werden. Die Impaktion erfolgt vor allem an Verzweigungen der Atemwege, an Stellen mit schneller Luftströmung, sowie dort, wo sich die Strömungsrichtung abrupt ändert. Größere Partikel können dem Luftstrom in diesen Fällen aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften, wie z.B. einer großen Dichte, nicht folgen und werden infolge ihrer Trägheit abgeschieden. Partikel zwischen 1 und 5 μm erreichen üblicherweise den unteren Respirationstrakt und

werden dort hauptsächlich durch Sedimentation abgeschieden. Die Sedimentation erfolgt überwiegend an Stellen, an denen die Strömungsgeschwindigkeit der Luft abnimmt, und ist umso höher, je länger die Verweildauer ist. Partikel, die einen kleineren aerodynamischen Durchmesser als $0,5 \mu\text{m}$ aufweisen, können durch Diffusion aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung in den kleinen Luftwegen und Alveolen abgeschieden werden. Jedoch werden Partikel dieser Größe meistens mit dem expiratorischen Fluss wieder ausgeatmet.

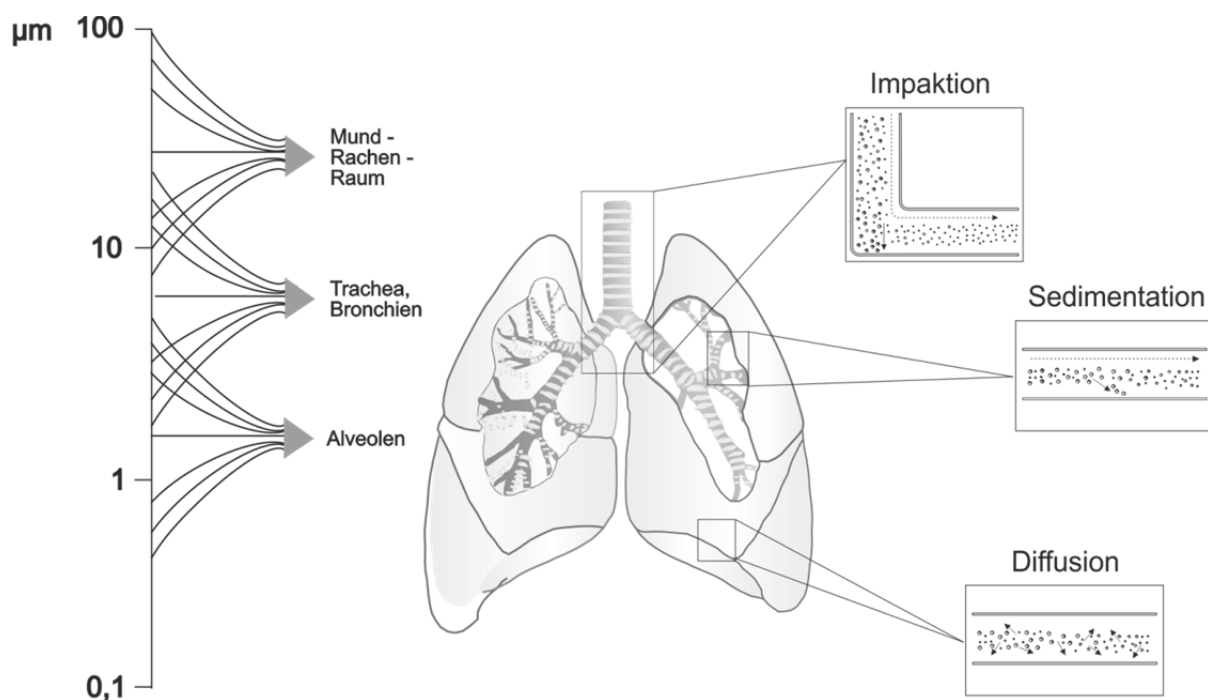


Abbildung 2.1: Depositionsmechanismen im Respirationstrakt in Abhängigkeit von der Partikelgröße (modifiziert nach Meier, 1981)

Grundsätzlich lässt sich folglich feststellen, dass Aerosole eine aerodynamische Partikelgröße zwischen $0,5$ und $5 \mu\text{m}$ aufweisen sollten, um in den unteren Respirationstrakt zu gelangen und dort eine systemische Absorption zu bewirken (Depreter, 2013).

2.5.2 Pulmonale Applikationssysteme

Um einen Wirkstoff in die Lunge zu applizieren, werden Inhalatoren verwendet. Dabei unterscheidet man zwischen Verneblern, druckgasbetriebenen Inhalatoren (pMDI für pressurized Metered Dose Inhaler) sowie Trockenpulverinhalatoren (DPI für Dry Powder Inhaler). Da in dieser Arbeit ausschließlich mit Trockenpulverinhalatoren gearbeitet wurde, wird nur auf diese Form des Inhalators

eingegangen. Es werden Mehrdosen-DPI und Einzeldosis-DPI unterschieden. Bei einem Mehrdosenbehältnis können die Dosen entweder einzeln verblister (z.B. Diskus[®]) oder auch in einem Reservoir vorliegen, von dem eine bestimmte Menge der Formulierung abgeteilt wird (z.B. Turbohaler[®]). Häufig werden Einzeldosisinhalatoren verwendet, bei denen eine pulverförmige Formulierung in Kapseln verpackt und anschließend verblister wird. Somit kann ein effektiver Schutz vor Feuchtigkeit gewährleistet werden. Vor der Inhalation entnimmt der Patient eine Kapsel aus dem Blister, legt sie in den Inhalator ein und kann die Inhalation durchführen.

Die Trockenpulverinhalatoren lassen sich in zwei Arten unterteilen: die passiven und die aktiven. Bei den bisher aufgeführten Inhalatoren handelt es sich um passive Inhalatoren. Hier wird die Formulierung durch den Atemzug des Patienten freigegeben. Der Atemzug bewirkt eine Fluidisierung des Pulvers. Dieser Strom passiert ein Gitter im Inhalator, an dem größere Agglomerate aufgebrochen werden, und erreicht anschließend die Lunge des Patienten. Eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung eines passiven Inhalators ist, dass der Patient kräftig einatmen und ein ausreichendes Atemvolumen aufbringen kann, um die Formulierung bis in die Lunge zu transportieren. Häufig können Kinder aber auch einige Erwachsene, diese Voraussetzung nicht erfüllen. Für diese Personengruppen bieten sich aktive Inhalatoren an, bei denen die Formulierung mithilfe von Druckluft zu einer geeigneten Partikelgröße dispergiert wird und der Patient lediglich die entstandene Aerosolwolke einatmen muss, um die Partikel in die Lunge zu transportieren. Allerdings birgt dieses Prinzip die Schwierigkeit, dass das Auslösen des Inhalators mit dem gleichzeitigen Einatmen zu koordinieren ist, da nur so eine erfolgreiche Inhalation erfolgen kann. Diese Schwierigkeit lässt sich jedoch durch die Verwendung eines Spacers umgehen. Dabei wird das Aerosol in eine Expansionskammer, die direkt an den Inhalator anschließt, abgegeben und kann dann vom Patienten in mehreren Atemzügen aus dieser Kammer abgeatmet werden.

Der wohl bekannteste aktive DPI ist der Nektar Pulmonary Inhaler[™], der für das mittlerweile wieder vom Markt genommene inhalative Insulinpräparat Exubera[®] eingesetzt wurde. Die Formulierung wird dabei mithilfe von Druckluft in ein Reservoir dispergiert, aus dem der Patient anschließend die dispergierte

Formulierung langsam und tief inhalieren kann, wodurch keine Koordination zwischen Auslösen des Inhalators und Einatmen erfolgen muss (Newman, 2009).

2.6 Anforderungen an die Vakzinformulierung

Im Folgenden wird erörtert, welche Anforderungen Formulierungen erfüllen und welche Herausforderungen überwunden werden müssen, damit eine erfolgreiche Vakzinierung über die Lunge erfolgen kann. Dabei wird zuerst auf Anforderungen zur Generierung einer Immunreaktion eingegangen, im Weiteren erfolgt die Betrachtung, welche Eigenschaften eine Formulierung besitzen muss, um in der Lunge appliziert zu werden. Zuletzt wird erläutert, welche Anforderungen ein Inhalator erfüllen muss.

2.6.1 Generierung einer Immunreaktion

In den vorherigen Abschnitten wurde bereits beschrieben, dass die dendritischen Zellen eine entscheidende Funktion beim Auslösen einer Immunreaktion haben. Daher sollte in dieser Arbeit eine Möglichkeit gefunden werden, die dendritischen Zellen gezielt mit einem Antigen zu targetieren. Es wurde bereits beschrieben, dass partikuläres im Vergleich zu gelöstem Antigen besser von dendritischen Zellen aufgenommen werden kann. In einer Größe ab wenigen hundert Nanometern haben Partikel eine ähnliche Größe wie Pathogene und können effektiv von Zellen des Immunsystems aufgenommen werden (Temmermann, 2011). Joshi (2012) beschrieb, dass Partikel mit einer Größe von 300 nm am besten von dendritischen Zellen aufgenommen wurden. Auf Grundlage unter anderem dieser Veröffentlichungen werden in der vorliegenden Arbeit antigen-beladene Polymerpartikel aus PLGA mit einer Größe zwischen 200 und 400 nm erzeugt. Nach der Aufnahme der Partikel durch dendritische Zellen soll das Antigen im Inneren der Zelle effektiv freigesetzt werden und nach Prozessierung auf der Oberfläche der dendritischen Zelle präsentiert werden, sodass ein Priming von CD8⁺-T-Zellen erreicht wird.

Damit ergeben sich folgende Anforderungen an die Formulierung: Nanopartikel mit einer Größe zwischen 200 und 400 nm, effektive Beladung mit dem Antigen, wobei dieses während der Herstellung und Applikation vor schädlichen

Einflüssen geschützt sein soll, sowie eine effiziente Freisetzung des Antigens im Inneren der Zellen.

2.6.2 Pulmonale Applikation

Die Vorteile der pulmonalen Applikation wurden bereits in Abschnitt 2.2 erwähnt. Allerdings stellt die Lunge einige Anforderungen an die Formulierung, wie der vorangegangene Abschnitt darstellt. Eine davon betrifft die Partikelgröße. Um die Lunge zielgerichtet mit einer therapeutischen Vakzine zu targetieren, müssen die Partikel einen aerodynamischen Partikeldurchmesser zwischen 0,5 und 5 µm aufweisen. Auf der anderen Seite muss die Vakzine in nanopartikulärer Form mit einer Zielgröße zwischen 200 und 400 nm vorliegen, um durch dendritische Zellen aufgenommen zu werden. Die Freisetzung der Vakzine soll im Inneren der dendritischen Zellen erfolgen, um damit eine Immunreaktion hervorzurufen.

Die Bildung der Nanopartikel kann durch unterschiedliche Polymere erfolgen, wobei die Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit zwei wichtige Aspekte für die Auswahl eines geeigneten Polymers sind. In der Literatur werden unter anderem synthetische Polymere wie Polymilchsäure und Poly(laktid-co-glykolid) (Alpar, 2004), sowie natürliche und halbsynthetische Polymere, beispielsweise Chitosan und Natriumalginat, beschrieben (Sharma, 2007), die sich für die Herstellung von Nanopartikeln eignen. Die Nanopartikelherstellung kann dabei auf unterschiedliche Weisen erfolgen, zum Beispiel durch die Herstellung von O/W-, O/O- oder auch W/O/W-Emulsionen, sowie mittels Präzipitation (Jain, 2000). Um die Nanopartikel in eine trockene Formulierung mit einer für die Inhalation geeigneten Partikelgröße zu überführen, kann die Sprühtrocknung genutzt werden (Maa, 1999).

Nach der Applikation sollen in der Lunge Nanopartikel vorliegen. Daher bietet sich die Einbettung der Nanopartikel in eine feuchtigkeitslösliche Matrix an. In der Lunge muss sich diese Matrix bei Kontakt mit der Feuchtigkeit auflösen und die Nanopartikel freigeben, die anschließend noch eine geeignete Größe für die Aufnahme durch dendritische Zellen haben sollen.

Damit ergeben sich folgende Anforderungen an eine Formulierung, die pulmonal appliziert werden soll: Partikel mit einer aerodynamischen Größe zwischen 0,5 und 5 µm, geeignetes Matrixmaterial, das eine Einbettung der Nanopartikel für

die Applikation und die Nanopartikelfreigabe nach erfolgter Applikation gewährleistet, ein Herstellungsverfahren, das das Antigen nicht stark belastet, Antigenfreisetzung aus den Nanopartikeln im Inneren der dendritischen Zellen.

2.6.3 Anforderungen an den Inhalator

Um eine trockene Formulierung in die Lunge zu applizieren, ist ein Inhalator notwendig. Dieser sollte die Formulierung möglichst vollständig dispergieren, sodass mögliche Agglomerate, die zum Beispiel während der Trocknung oder auch Lagerung entstehen können, aufgebrochen werden und die Partikel möglichst in Form von Primärpartikeln die Lunge erreichen. Weiterhin soll die Abgabe der Formulierung zum einen vollständig, das bedeutet mit einem möglichst geringen Rückstand im Inhalator, und zum anderen mit der gleichen Dosis bei jeder Inhalation abgegeben werden, um reproduzierbare Antigenmengen in die Lunge zu applizieren. Während die Applikation eines prophylaktischen Impfstoffs selten oder nur einmalig erfolgt, wird eine therapeutische Vakzinierung mehrfach hintereinander durchgeführt. Beispielsweise wird in der Stimuvax-Studie die Vakzine einmal wöchentlich über acht Wochen appliziert (Butts, 2014). Daher ist die Verwendung eines kapselbasierten Einzeldosis-Inhalators sinnvoll. Der Patient könnte den Inhalator samt Kapseln mit nach Hause nehmen und die Vakzine selbst, beispielsweise einmal die Woche, applizieren. Die Kapseln bieten den Vorteil, dass die Formulierung durch Verblistern vor äußeren Einflüssen geschützt wird. Wenn die Kapseln erst direkt vor der Inhalation aus dem Blister entnommen und in den Inhalator platziert werden, kann die Formulierung nicht durch beispielsweise eine hohe Luftfeuchtigkeit in ihren Eigenschaften negativ beeinflusst werden.

Damit ergeben sich folgende Anforderungen an den Inhalator: Möglichst vollständige Dispergierung der Formulierung, Abgabe reproduzierbarer Wirkstoffmengen, möglichst geringer Rückstand in Kapsel und Inhalator, möglichst kapselbasiert, um die Formulierung gut vor äußeren Einflüssen zu schützen.

3 MATERIAL

3.1 PLGA

Bei PLGA handelt es sich um Poly(laktid-co-glykolid), was ein Copolymer aus D,L-Milchsäure- und Glykolsäureeinheiten ist (Abbildung 3.1). Für die Nanopartikelherstellung wurde Resomer[®] RG 503 H (Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland) verwendet. Dieses besteht aus einer Mischung aus racemischem Laktid sowie Glykolid. Die dreistellige Zahlenfolge „503“ bezeichnet das Monomerverhältnis, in diesem Fall besteht das PLGA zu 50% aus Laktid-einheiten, sowie das Maß für die inhärente Viskosität, welche ein indirektes Maß für die Molekülgröße ist. Für das Resomer 503 H beträgt die inhärente Viskosität einer 0,1%igen Lösung in Chloroform bei 25°C 0,32-0,44 dl/g. Das Molekulargewicht wird mit einem Bereich zwischen 24.000 und 38.000 g/mol angegeben. Aus dem Kennbuchstaben „H“ am Ende des Handelsnamens leitet sich ab, dass dieses PLGA als freie Säure vorliegt. Die Glasübergangstemperatur des verwendeten PLGA liegt im Bereich von 44 bis 48°C.

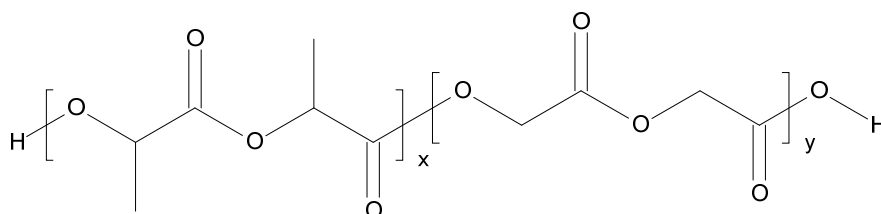


Abbildung 3.1: Poly(D,L)-laktid-co-glykolid

Ein besonderes Interesse an PLGA ergibt sich aus seiner Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit (Jain, 2000).

3.2 Ovalbumin

Mit 60-65% ist Ovalbumin (OVA) das am häufigsten im Hühnereiklar vorkommende Protein. Es besteht aus 386 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 45 kDa. Ovalbumin gehört zu den Serpinen, allerdings ist es im Gegensatz zu den meisten anderen Serpinen nicht in der Lage, Proteasen zu inhibieren. Die Funktion des Ovalbumins im Hühnerei ist allerdings bisher nicht geklärt (Huntington, 2001). Neben der nativen Form des Ovalbumins existiert eine stabilere Form, das S-Ovalbumin. Dieses entsteht zum einen in-vitro bei

Erhöhung von Temperatur und pH-Wert einer Ovalbuminlösung und zum anderen in vivo im Hühnerei bei längerer Lagerung. Dabei findet eine irreversible Umwandlung des nativen Ovalbumins in das S-Ovalbumin statt, was allerdings zu keinem Verlust an Aminosäuren führt (Smith und Back, 1965). Das S-Ovalbumin ist deutlich stabiler gegenüber dem nativen Ovalbumin, so steigt die Denaturierungstemperatur von 78°C auf 86°C für das S-Ovalbumin (Huntington, 2001).

Als Modellantigen ist Ovalbumin bereits weit verbreitet, da es, z.B. im murinen System, nach inhalativer, aber auch nach oraler und nasaler, Applikation die Bildung zytotoxischer T-Zellen induziert (Hänninen, 2001).

Das hier verwendete Ovalbumin wurde von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) als Lyophilisat bezogen und hatte eine Reinheit > 98%. In dieser Arbeit wurde es als Modellantigen verwendet, das später durch ein anderes Antigen ersetzt werden kann.

3.3 Stabilisatoren

Verschiedene Stabilisatoren wurden in dieser Arbeit zur Stabilisierung der erzeugten Nanopartikel während der Herstellung verwendet. Es handelte sich dabei um Polysorbat 80, Hydroxypropylmethylcellulose, Poloxamer 188 und Polyvinylalkohol.

Polysorbat 80 (Abbildung 3.2) ist ein O/W-Emulgator, der bei Raumtemperatur dickflüssig vorliegt und leicht in Wasser löslich ist. Der Index „80“ gibt an, dass dieses Sorbitan hauptsächlich mit Ölsäure verestert und jedes Mol Sorbitan mit 20 Mol Ethylenoxid ethoxyliert ist. In den Ansätzen wurde das Handelspräparat Tween[®] 80 (Croda, Nettetal, Deutschland) verwendet.

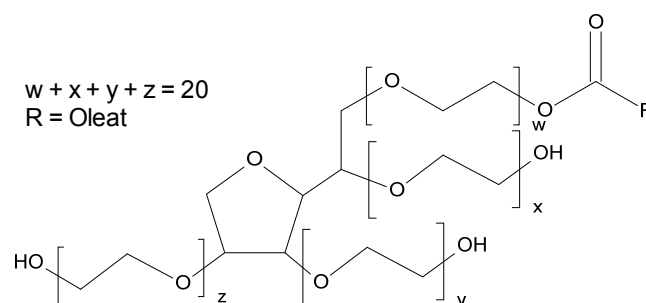


Abbildung 3.2: Polysorbat 80

Als weiterer O/W-Emulgator für die Solvent change Präzipitation wurde Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC, Abbildung 3.3) eingesetzt. HPMC ist ein nichtionischer Celluloseether, der aufgrund seiner Oberflächenaktivität verwendet wird. Es lagert sich an die Oberfläche der Nanopartikel an, was zu einer Stabilisierung der Partikel führt. In dieser Arbeit wurde Metolose 60SH 50 (Shin-Etsu, Tokyo, Japan) eingesetzt. Der Index „60SH“ gibt die Substitutionsart an. In diesem Fall handelt es sich um eine Cellulose mit Hydroxypropyl- und Methylsubstituenten. Die Endziffer definiert die Viskosität einer 2%igen Lösung bei 20°C, hier beträgt sie also 50 mPa*s.

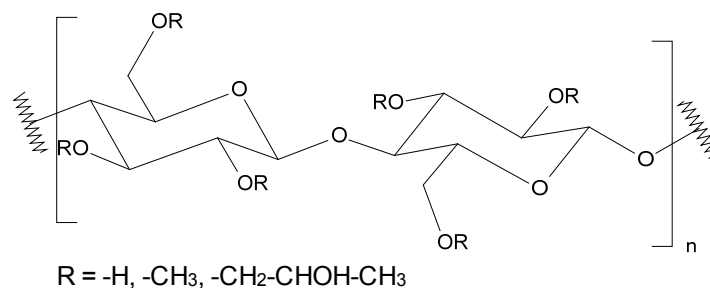


Abbildung 3.3: Hydroxypropylmethylcellulose

Bei Raumtemperatur liegt HPMC pulverförmig vor, daher eignet es sich gut für die Sprühtrocknung. Um eine HPMC-Lösung herzustellen, wurde HPMC auf Aqua bidest. aufgestreut und bis zur vollständigen Lösung gerührt.

Poloxamer 188 (Abbildung 3.4) ist ein Blockcopolymer aus Ethylenoxid und Propylenoxid. Es zählt zu den nichtionischen Tensiden und wird aufgrund seiner emulgierenden Wirkung eingesetzt. Bei Raumtemperatur liegt es fest vor und zeichnet sich durch eine gute Wasserlöslichkeit aus. In dieser Arbeit wurde Lutrol F68 (BASF, Ludwigshafen, Deutschland) verwendet. Der Index „188“ steht für die Anzahl der Ethylenoxid- und Propylenoxid-Einheiten. In diesem Fall sind 75-85 Ethylenoxid-Einheiten (a) und 25-30 Propylenoxid-Einheiten (b) enthalten.

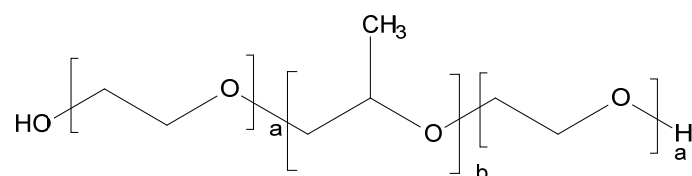


Abbildung 3.4: Poloxamer 188

Polyvinylalkohol (PVA, Abbildung 3.5) ist ein wasserlösliches Polymer mit emulgierenden Eigenschaften. In dieser Arbeit wurde Mowiol 4-88 (Hoechst, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Die „4“ im Namen gibt die Viskosität einer 4%igen Lösung bei 20°C an. In diesem Fall beträgt diese 4 mPa*s. Der Index „88“ steht für einen Hydrolysegrad von 88 Mol%.

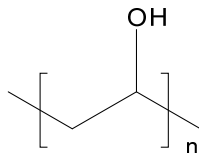


Abbildung 3.5: Polyvinylalkohol

Zur Herstellung einer PVA-Lösung wurde PVA mit Aqua bidest. versetzt, auf ca. 100°C erwärmt, um das Lösen zu beschleunigen, und solange gerührt bis es vollständig gelöst war. Die Lösung wurde anschließend bis zum Abkühlen auf Raumtemperatur gerührt. PVA liegt, wie auch HPMC, bei Raumtemperatur fest vor und eignet sich daher ebenfalls für die Sprühtrocknung. Das sprühgetrocknete PVA lässt sich, aufgrund der größeren Oberfläche im Vergleich zum Ausgangsprodukt, leicht im kalten Wasser lösen.

3.4 Organische Lösungsmittel

Aceton, Methanol (beide von J.T.Baker, Deventer, Niederlande) und Ethylacetat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurden für das Lösen von PLGA verwendet. Acetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) wurde bei der Fluoreszenzmarkierung von PLGA eingesetzt. Als weiteres Lösungsmittel wurde Dimethylformamid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zur Herstellung der Lyse-Lösung für die Zytotoxizitätstests genutzt. Bis auf Dimethylformamid wurden alle verwendeten Lösungsmittel in HPLC-Qualität eingesetzt. Dimethylformamid lag in analysenreiner Qualität vor.

3.5 Bidestilliertes Wasser

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Wasser handelte es sich ausschließlich um bidestilliertes Wasser (Aqua bidestillata, Aqua bidest.). Dieses wurde in der hauseigenen Anlage FinnAqua 75-E-4 (San Asalo Sohlberg Corp., Helsinki, Finnland) gewonnen und für die Verwendung immer frisch entnommen.

3.6 Trehalose

Trehalose (British sugar plc, Peterborough, Großbritannien) (Abbildung 3.6) wurde bei der Herstellung der porösen Nanopartikel als Porenbildner eingesetzt. Es handelt sich dabei um ein Disaccharid aus zwei glykosidisch verbundenen Glucosemolekülen und zählt zu den nicht-reduzierenden Zuckern (Richards, 2002). Trehalose ist wasserlöslich und kann daher während der Herstellung der Partikel ausgewaschen werden.

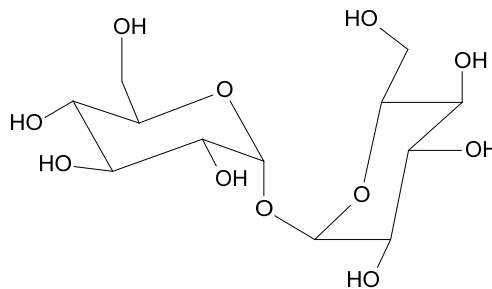


Abbildung 3.6: Trehalose

3.7 L-Leucin

L-Leucin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Abbildung 3.7) zählt zu den essentiellen Aminosäuren.

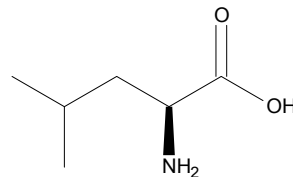


Abbildung 3.7: L-Leucin

L-Leucin hat hydrophobe Eigenschaften, wodurch es Adhäsion an der Inhalatorwand verringert. Ferner wurde gezeigt, dass L-Leucin die Dispergierbarkeit und die aerodynamischen Eigenschaften sprühgetrockneter Pulver für die pulmonale Applikation verbessern kann (Li, 2004 und Seville, 2007). Es wurde dafür in Aqua bidest. gelöst und die Nanopartikel wurden in dieser Lösung nach Zentrifugation, zum Entfernen überschüssigen Ovalbumins, redispersiert. Durch die Sprühtrocknung wurden die Nanopartikel in eine Matrix aus Stabilisator und L-Leucin eingebettet, sodass L-Leucin die Dispergierbarkeit der Mikropartikel beeinflussen konnte.

3.8 Pufferlösungen

Für die Untersuchungen der Antigenfreisetzung wurden Phosphat-Pufferlösungen (PBS) mit einem pH-Wert von 5,5 und 7,4 verwendet. Die Herstellung erfolgte in Anlehnung an Kapitel 4.1.3 im Europäischen Arzneibuch 7.0. Die Zusammensetzungen sind in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Phosphat-Pufferlösung pH 5,5

Substanz	Lieferant	Menge
Kaliumdihydrogenphosphat	Fagron GmbH & Co. KG, Barsbüttel, Deutschland	13,1 g
Natriummonohydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1,29 g
Aqua bidest.	frisch hergestellt	zu 1000 ml

Tabelle 3.2: Natriumchloridhaltige Phosphat-Pufferlösung pH 7,4

Substanz	Lieferant	Menge
Natriummonohydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	2,38 g
Kaliumdihydrogenphosphat	Fagron GmbH & Co. KG, Barsbüttel, Deutschland	0,195 g
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	8,0 g
Aqua bidest.	frisch hergestellt	zu 1000 ml

3.9 Fluoreszenzfarbstoffe

Vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe wurden genutzt, um die Nanopartikel für die immunologischen Aufnahmeuntersuchungen zu markieren. Die Methoden der Fluoreszenzmarkierung werden in Abschnitt 4.1.3 erläutert. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Isomer I des Fluoresceinamins, Cumarin 6, Rhodamin 6G (alle von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und CF568-Amin (Biotium, Hayward, CA, USA) verwendet (Abbildung 3.8 bis Abbildung 3.10). Die Struktur des CF568 ist nicht veröffentlicht.

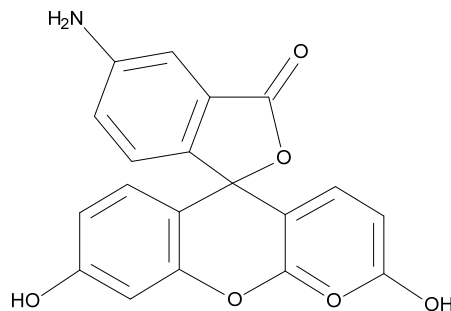


Abbildung 3.8: Fluoresceinamin, Isomer I

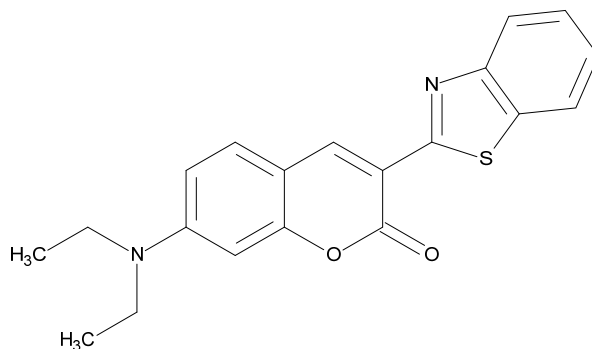


Abbildung 3.9: Cumarin 6

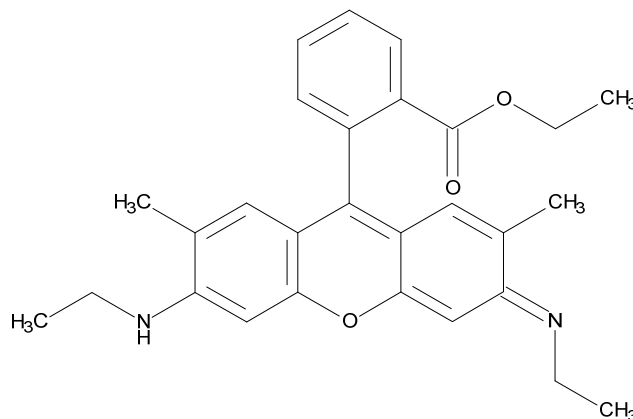


Abbildung 3.10: Rhodamin 6G

Die vier Farbstoffe unterscheiden sich in ihren Absorptionsmaxima, die in Tabelle 3.3 aufgeführt sind.

Tabelle 3.3: Absorptionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Absorptionsmaximum, nm
CF568	562
Cumarin 6	444
Fluoresceinamin, Isomer I	496
Rhodamin 6G	524

3.10 Inhalatoren

Die Formulierungen aus dieser Arbeit wurden mit zwei kapselbasierten passiven Trockenpulverinhalatoren dispergiert. Die beiden verwendeten Inhalatoren haben den Vorteil, dass sie nach der Wirkstoffabgabe ausgewaschen werden können, um die verbliebene Wirkstoffmenge im Inhalator zu quantifizieren. Nach anschließender Trocknung sind sie für die nächste Applikation bereit. Die passiven Trockeninhalatoren zeichnen sich darüber hinaus durch eine relativ einfache Handhabung aus. Die Verwendung der Kapseln bietet dabei die Vorteile der einfachen Befüllung und der frei zu variierenden Pulvermenge.

Für die Versuche wurden HPMC-Kapseln der Größe 3 (Quali-V, Qualicaps, Madrid, Spanien) gefüllt. Diese konnten für beide hier genutzten Inhalatoren, Unihaler und Cyclohaler[®], verwendet werden. Die Inhalatoren wurden für die Versuche zur Inhalerdispergierung, die aerodynamische Charakterisierung, sowie die Bestimmung der abgegebenen Dosis verwendet.

3.10.1 Cyclohaler

Der Cyclohaler (Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena, Deutschland) ist ein kapselbasierter Inhalator, der unter anderem für das Handelsprodukt Cyclocaps[®] Salbutamol 400 µg von PB Pharma GmbH (Meerbusch, Deutschland) eingesetzt wird. Es handelt sich dabei um einen Inhalator mit einem niedrigen Widerstand. Abbildung 3.11 zeigt einen Querschnitt durch den Cyclohaler.

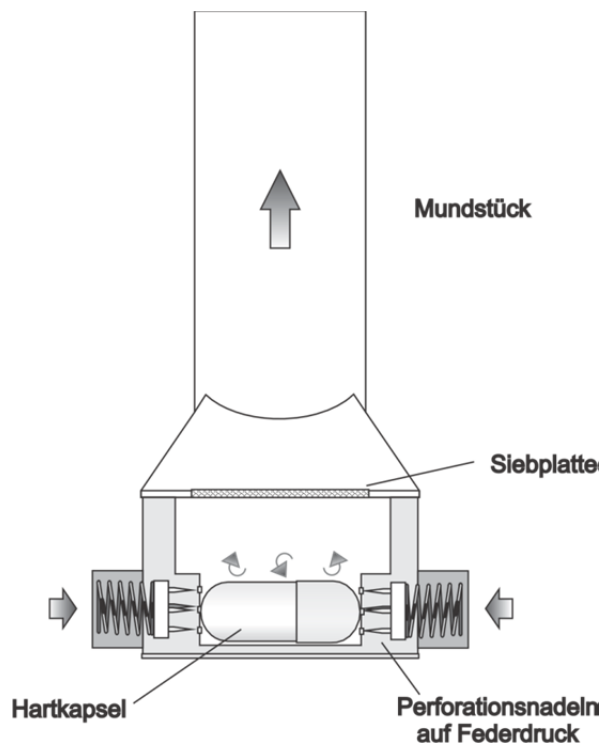


Abbildung 3.11: Querschnitt durch den Cyclohaler

An jeder Seite befinden sich jeweils vier Nadeln. Durch Betätigung der beiden seitlichen Bedienknöpfe werden die Nadeln in das Inhalatorinnere geschoben und die Kapsel, die in einer Aussparung im unteren Teil des Inhalators platziert ist, perforiert. Atemzuginduziert wird das Pulver anschließend aus der Kapsel freigegeben. Dabei sorgt der Luftstrom dafür, dass die Kapsel rotiert und auf diese Weise das Pulver vollständig freigegeben wird. Eine Siebplatte zwischen Kapsel und Mundstück verhindert einerseits, dass mögliche Kapselbruchstücke den Inhalator verlassen, andererseits bricht sie größere Agglomerate auf.

3.10.2 Unihaler

Der Unihaler ist ebenfalls ein kapselbasierter Inhalator (Friebel, 2012), der bisher nur als Prototyp vorliegt und zu den Inhalatoren mit einem mittleren Widerstand zählt. In Abbildung 3.12 ist der Unihaler im Querschnitt dargestellt.

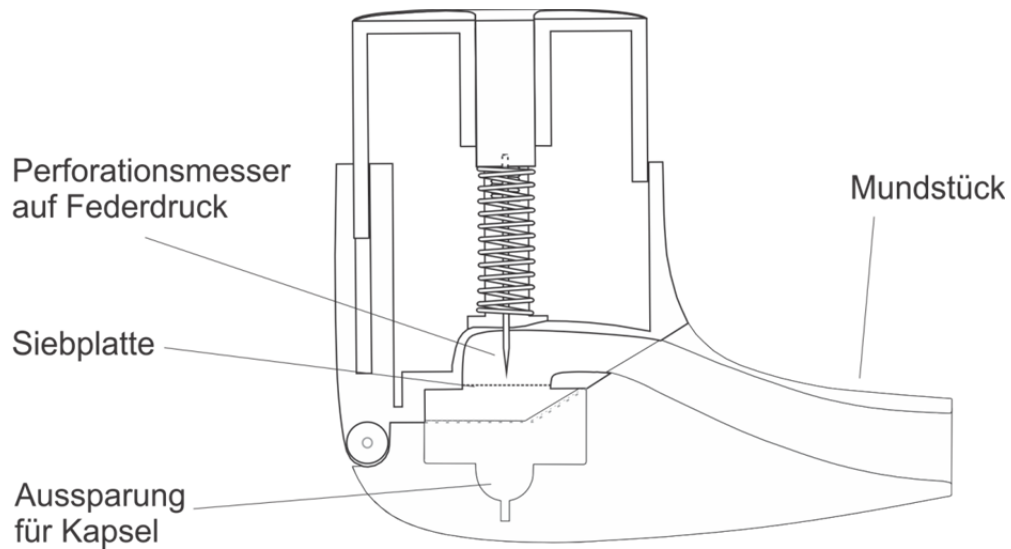


Abbildung 3.12: Querschnitt durch den Unihaler

Die Kapsel wird in der Ausparung platziert und der Inhalator durch Zuklappen des oberen Inhalatorteils verschlossen. Durch Druck auf diesen oberen Teil werden zwei Messer abgesenkt, die die Kapsel an beiden Enden einschneiden. Durch den Atemzug wird während der Inhalation eine turbulente Strömung im Inhalator erzeugt, die die Kapsel in Rotation versetzt und zu einer vollständigen Entleerung der Kapsel führt. Eine Siebplatte verhindert einerseits die Austragung von Kapselbruchstücken und sorgt andererseits für das Zerkleinern von Agglomeraten.

4 METHODEN

4.1 Präparative Methoden

4.1.1 Nanopartikelherstellung

Nanopartikel wurden mithilfe zweier unterschiedlicher Herstellungsmethoden erzeugt. Es wurden die Solvent Change Präzipitation und die Doppelemulsionsmethode verwendet. Ziel beider Methoden war die Herstellung von Partikeln mit einer Größe zwischen 200 und 400 nm Durchmesser, die zusätzlich dazu eine enge Partikelgrößenverteilung aufwiesen.

4.1.1.1 Solvent Change Präzipitation

Die Herstellung der Nanopartikel erfolgte in Anlehnung an die von Peek (2008) beschriebene Methode.

Das Polymer, aus dem sich die Nanopartikel formen, wird in einem organischen Lösungsmittel vollständig gelöst. Diese Lösung wird tropfenweise in ein Nichtlösemittel, häufig eine wässrige Stabilisatorlösung, überführt. Der Kontakt des gelösten Polymers mit dem Nichtlösemittel führt zu einer raschen Abnahme des Löslichkeitsprodukts des Polymers, wodurch dieses präzipitiert. Der Stabilisator lagert sich an der Oberfläche der erzeugten Nanopartikel an und verhindert damit, dass die entstehenden Partikel agglomerieren.

Um das Lösungsmittel zu entfernen, wird der Ansatz bei Raumtemperatur mehrere Stunden auf der Magnetührplatte gerührt, sodass das Lösungsmittel zuerst durch die umgebende Flüssigkeit extrahiert wird und anschließend aus dieser evaporieren kann. Das Antigen wird im Anschluss an den Herstellungsprozess an die Partikeloberfläche adsorbiert. Mithilfe der Sprühtrocknung wird die Nanopartikeldispersion in ein trockenes Pulver überführt.

4.1.1.2 Doppelemulsionsmethode

Die Doppelemulsionsmethode stellt neben der Solvent Change Präzipitation eine weitere Möglichkeit dar, Nanopartikel herzustellen. Dabei liegt der Unterschied zur Solvent Change Präzipitation darin, dass der Wirkstoff in die Partikel eingekapselt wird. Die Herstellung erfolgte in Anlehnung an die von Semete (2010) beschriebene Methode.

Eine erste hydrophile Phase bildet das Innere der Partikel und enthält das zu verkapselnde Antigen. Das Polymer, das die Nanopartikel formt, wird in einem organischen Lösungsmittel gelöst und repräsentiert die organische Phase. Mithilfe eines Ultra-Turrax wird die erste hydrophile Phase in die organische Phase einemulgiert und eine W/O-Emulsion erzeugt. Durch Zugabe einer zweiten hydrophilen Phase, die einen Stabilisator, beispielsweise PVA, enthält, wird eine Doppelemulsion (W/O/W) erzielt. Diese W/O/W-Emulsion wird in ein größeres Volumen Stabilisatorlösung überführt. Es kommt zum einen zur Partikelaushärtung, zum anderen wird dabei das organische Lösungsmittel in das umgebende wässrige Medium extrahiert und evaporiert anschließend aus dem Ansatz. Nach der Evaporation des Lösungsmittels lässt sich das unverkapselte Antigen mithilfe eines Waschschrattes aus dem Ansatz entfernen. Das Zentrifugieren des Ansatzes führt zu einem klaren Überstand mit freiem Ovalbumin, der verworfen wird. Der Rückstand wird in frischer Stabilisatorlösung vollständig redispergiert und anschließend in den Sprühtrocknungsprozess überführt.

4.1.2 Mischsysteme

Für die Nanopartikelherstellung wurden verschiedene Mischsysteme verwendet, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

4.1.2.1 Ultra-Turrax

Bei der Doppelemulsionsmethode wurde der Ultra-Turrax T25 von IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland) verwendet. Der Aufbau beruht auf dem Rotor-Stator-Prinzip, wobei sich ein Rotor im feststehenden Stator befindet. Dieses Prinzip ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt. Die Geschwindigkeit des Rotors lässt sich zwischen 8.000 und 24.000 rpm variieren und führt dazu, dass das zu verarbeitende Gut axial in den Stator eingesaugt wird. Die hohe Rotationsgeschwindigkeit und der geringe Abstand zwischen Rotor und Stator erzeugen Scherkräfte, die zu einer Homogenisierung des Gutes führen. Nach der Zerkleinerung fließt das Produkt durch schlitzförmige Öffnungen im Stator wieder aus dem Rührkopf hinaus (Bauer, Frömming, Führer, 2006).

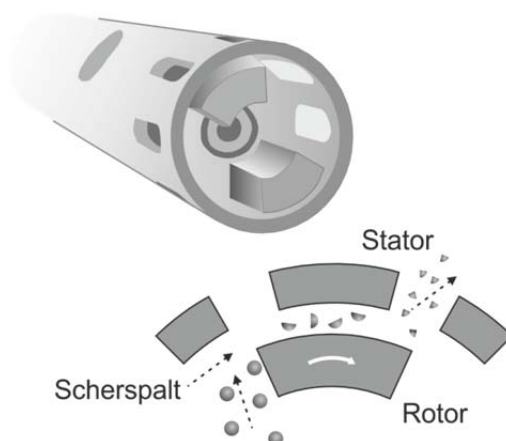


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Ultra-Turrax

4.1.2.2 *Magnetrührer*

Es wurde eine Magnetrührplatte IKAMAG RET der Firma IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland) verwendet. Damit ist ein gleichzeitiges Rühren und Heizen möglich. Die Rührgeschwindigkeit und die Temperatur lassen sich jeweils stufenlos zwischen 100 und 1200 rpm beziehungsweise zwischen 50 und 300°C einstellen. Um die Rührwirkung zu erreichen wurde dem Ansatz ein Magnetrührstäbchen zugegeben und dieses mittig auf der Magnetrührplatte platziert.

4.1.2.3 *Schlitz-Interdigitalmischer*

Der Schlitz-Interdigitalmischer (Abbildung 4.2) wurde beim Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH (IMM, Mainz, Deutschland) entwickelt. Aufgrund der sehr geringen Größe spricht man von einem Mikromischsystem. Dabei werden zwei HPLC-Pumpen (Smartline Pump 1000, Knauer, Berlin, Deutschland), mit einer individuell einstellbaren Förderrate zwischen 0,5 und 50 ml/min, genutzt, um zwei Flüssigkeiten von entgegengesetzten Seiten des Mischers in das Mischerinnere zu fördern. Im Inneren des Mischers befindet sich eine kammartige Mischeinheit, die aus 2x15 Mikrokanälen mit einer Breite von etwa 40 µm besteht. Diese etwa 300 µm tiefen Kanäle werden mithilfe der LIGA-Technologie (Lithographie, Galvanik und Abformung) in einen mit Silber beschichteten Kupfersockel eingebracht (Haverkamp, 1999). In der Mischeinheit (Abbildung 4.3) werden beide Flüssigkeiten durch die kammartige Struktur in dünne Lamellen aufgeteilt und liegen zunächst nebeneinander vor. Durch die Strömung werden sie weiter zum senkrecht angebrachten Austrittsspalt gefördert, wo eine intensive Vermischung der entgegengesetzt strömenden Flüssigkeiten durch

Diffusion stattfindet. Anschließend wird die Mischung durch den 60 µm schmalen Austrittsspalt ausgetragen.

Dieses Mischsystem birgt den Vorteil, dass in diesem kontinuierlichen Prozess eine sehr intensive Vermischung der beiden Flüssigkeiten stattfindet. Dabei können sowohl sehr kleine, als auch große Flüssigkeitsvolumina durch Numbering-up, paralleles Betreiben mehrerer Mischer, vermischt werden. Allerdings haben die geringen Dimensionen im Inneren des Mischers den Nachteil, dass selbst kleinste Mengen ausgefallener Substanz zu einem Verstopfen des gesamten Mischers führen.

Bei dem Mikromischer handelt es sich um einen passiven Mischer, da die Vermischung durch den Krafteintrag der Pumpen erfolgt und das Mischelement statisch ist (Hessel, 2005).

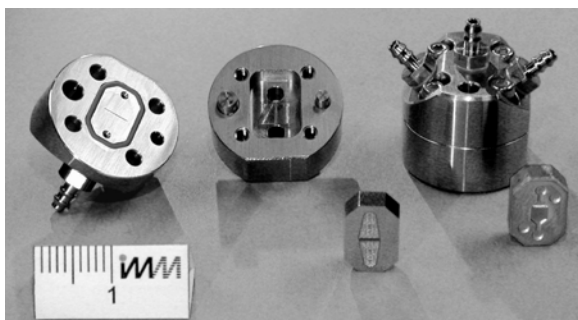


Abbildung 4.2: Offener und geschlossener Schlitz-Interdigitalmischer; Quelle: IMM

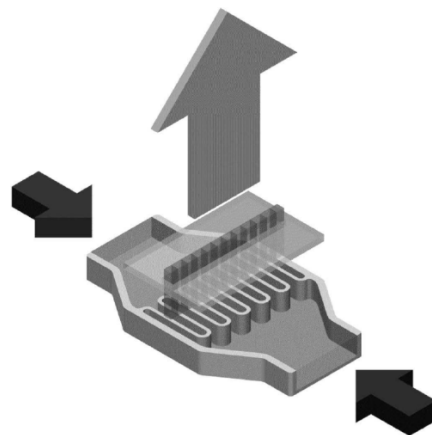


Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau des Mischelements; Quelle: IMM

4.1.2.4 Prallstrahlmischer

Der Prallstrahlmischer ist ein Mischsystem, das ebenfalls vom IMM entwickelt wurde. Das Prinzip beruht darauf, dass zwei Flüssigkeiten mithilfe von HPLC-Pumpen (Smartline Pump 1000, Knauer, Berlin, Deutschland) in den Mischer befördert werden und durch zwei definierte Bohrungen auf der Unterseite austreten (Abbildung 4.4). Die beiden Flüssigkeitsstrahlen prallen kurz unterhalb des Mischers Y-förmig aufeinander (Abbildung 4.5), wodurch eine starke Interaktion und somit Vermischung der beiden Flüssigkeiten erzeugt wird. Das Verfahren wurde in dieser Arbeit für die Präzipitation der Nanopartikel eingesetzt. Im Gegensatz zum Mikromischer hat der Prallstrahlmischer den Vorteil, dass der Mischprozess außerhalb des Mischers stattfindet, die Verstopfungsgefahr des Mischers ist folglich nicht gegeben. Wie auch beim

Mikromischer lassen sich durch ein Numbering-up größere Volumina herstellen. Der Nachteil dieses Systems ist allerdings, dass ein konstanter und Y-förmiger Strahl nur bei bestimmten Pumpraten und -verhältnissen entsteht. Daher sind die Volumenströme nicht ganz so frei zu variieren wie bei Verwendung des Mikromischers.

Der Prallstrahlmischer ist ebenfalls ein Vertreter der passiven Mischsysteme.

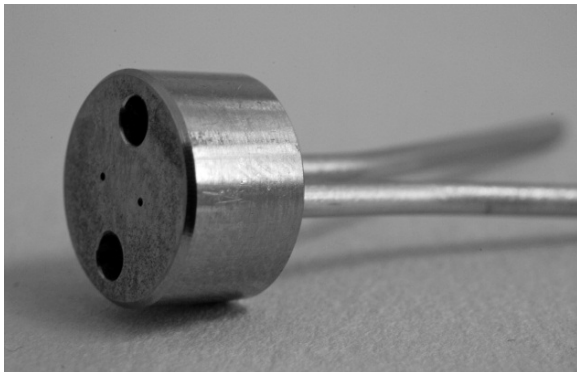


Abbildung 4.4: Prallstrahlmischer in der Seitenansicht

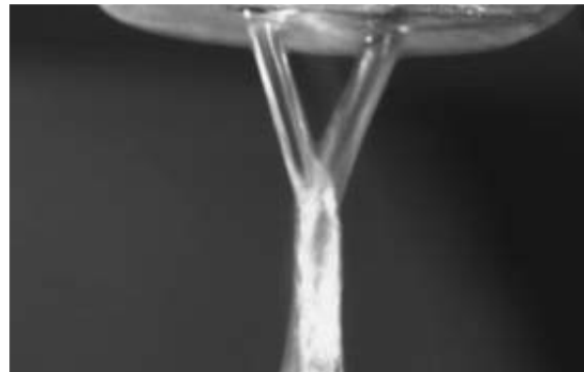


Abbildung 4.5: Y-förmiger Strahl nach Austritt der Flüssigkeit aus dem Mischer; Quelle: IMM

4.1.3 Fluoreszenzmarkierung

Die Nanopartikel wurden auf unterschiedliche Weise fluoreszenzmarkiert. Die Farbstoffe Fluoresceinamin und CF568 besitzen beide eine primäre Aminogruppe, die kovalent an die Carboxylgruppe des PLGA gebunden werden kann. Die kovalente Bindung hat den Vorteil, dass der Fluoreszenzfarbstoff fest an das Polymer gekoppelt ist. Durch diese starke Bindung kann der Verbleib der Nanopartikel mithilfe des Fluoreszenzmikroskops und des Durchflusszytometers sicher detektiert werden.

Die Herstellung des fluoreszenzmarkierten PLGA erfolgte in Anlehnung an eine von Weiss (2006) beschriebene Methode. Dazu wurde 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) als Kupplungsreagenz verwendet. Es wurde gemeinsam mit PLGA und dem Farbstoff Fluoresceinamin, beziehungsweise dem Amin des CF568 (Abschnitt 3.9), in Acetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gelöst und 24 Stunden unter Lichtschutz gerührt. Um das fluoreszenzmarkierte Polymer von nicht reagierten Edukten zu befreien, wurde es durch Wasserzugabe präzipitiert und anschließend abzentrifugiert (Centrifuge 5430 R, Eppendorf, Hamburg,

Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand in Aceton gelöst. Durch Zugabe von Ethanol wurde das Polymer erneut präzipitiert, durch Zentrifugation abgetrennt und in Aceton aufgelöst. Diese Schritte aus Lösen und Präzipitieren wurden solange wiederholt bis nach Zentrifugation ein ungefärbter Überstand zurückblieb. Die letzte Präzipitation des Polymers erfolgte mit Wasser. Anschließend wurde das fluoreszenzmarkierte Polymer dünn auf eine Kunststoffpetrischale (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aufgebracht und wie folgt gefriergetrocknet.

Der Gefriertrockner Alpha 1-4 (Christ, Osterode, Deutschland) wurde auf -18°C vortemperiert, das zu trocknende Polymer in einer Petrischale auf die Kühlfläche gestellt und eingefroren. Bei der anschließenden Primärtrocknung wurde die Temperatur auf -10°C erhöht, der Druck auf 2,56 mbar eingestellt und diese Bedingungen für 24 Stunden gehalten. Danach erfolgte die Sekundärtrocknung bei 10°C und einem eingestellten Druck von 0,0001 mbar. Auf diese Weise können noch Reste von Wasser, die stärker gebunden oder adsorbiert waren, entfernt werden. Nach der Gefriertrocknung konnte das PLGA für die Herstellung von Nanopartikeln verwendet werden.

Als weitere Fluoreszenzfarbstoffe wurden Cumarin 6 und Rhodamin 6G (Abschnitt 3.9) verwendet. Diese enthalten keine funktionellen Gruppen, mit denen eine kovalente Bindung an das PLGA möglich gewesen wäre. Daher wurden diese Farbstoffe in den Nanopartikeln verkapselt.

Das Cumarin 6 wurde in der Doppalemulsionsmethode verwendet. Die Herstellung erfolgte in Anlehnung an die Methode von Yang (2008). Dafür wurde das Cumarin 6 in der organischen Phase gelöst und während des Homogenisierens in die Partikel verkapselt. Um unverkapseltes Cumarin abzutrennen, schloss sich ein Zentrifugationsschritt an. Der Rückstand wurde in frischer Stabilisatorlösung redispergiert.

Bei der Solvent Change Präzipitation wurde Rhodamin 6G verwendet. Die Herstellung erfolgte wie von Semete (2010) beschrieben. Dabei wurde Rhodamin im organischen Lösungsmittel (hier Methanol) gelöst und anschließend mit Aceton und PLGA versetzt. Aus dieser Lösung wurden mit Rhodamin 6G markierte Nanopartikel hergestellt.

4.1.4 Sprühtrocknung

Die Sprühtrocknung ist ein Verfahren, mit dem eine Lösung, Emulsion oder Suspension durch Einbringen in einen Heißluftstrom sekundenschnell getrocknet wird. Die zu trocknende Flüssigkeit wird durch eine Düse oder rotierende Scheibe in kleinste Tröpfchen zerrissen und im Heißluftstrom getrocknet (Jensen, 2010). Dabei kann die Trocknung nach dem Gleich- oder Gegenstromprinzip erfolgen. Beim Gleichstromprinzip strömt die Luft in die gleiche Richtung wie der Sprühstrahl und beim Gegenstromprinzip ist der Luftstrom entgegen der Richtung des Sprühstrahls ausgerichtet. Das Gleichstromprinzip eignet sich besonders für thermisch labile Stoffe, wie beispielsweise Proteine. Die Verdunstung der Flüssigkeit führt zu Verdunstungskälte, die die entstehenden Partikel vor Erwärmung schützt. Im Gegensatz dazu, trifft bei dem Gegenstromprinzip die Luft mit der höchsten Temperatur auf das bereits trockene Produkt, was eine hohe thermische Belastung bedeutet und daher nicht für alle Produkte geeignet ist. Nach der Sprühtrocknung besteht das trockene Produkt typischerweise aus Hohlkugeln mit einer großen Oberfläche und geringen Dichte (Voigt, 2010).

In dieser Arbeit wurde der Mini-Sprühtrockner B-290 (Büchi, Flawil, Schweiz) eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen Sprühtrockner im Labormaßstab, der mit dem Gleichstromprinzip arbeitet. Abbildung 4.6 zeigt den schematischen Aufbau des Sprühtrockners.

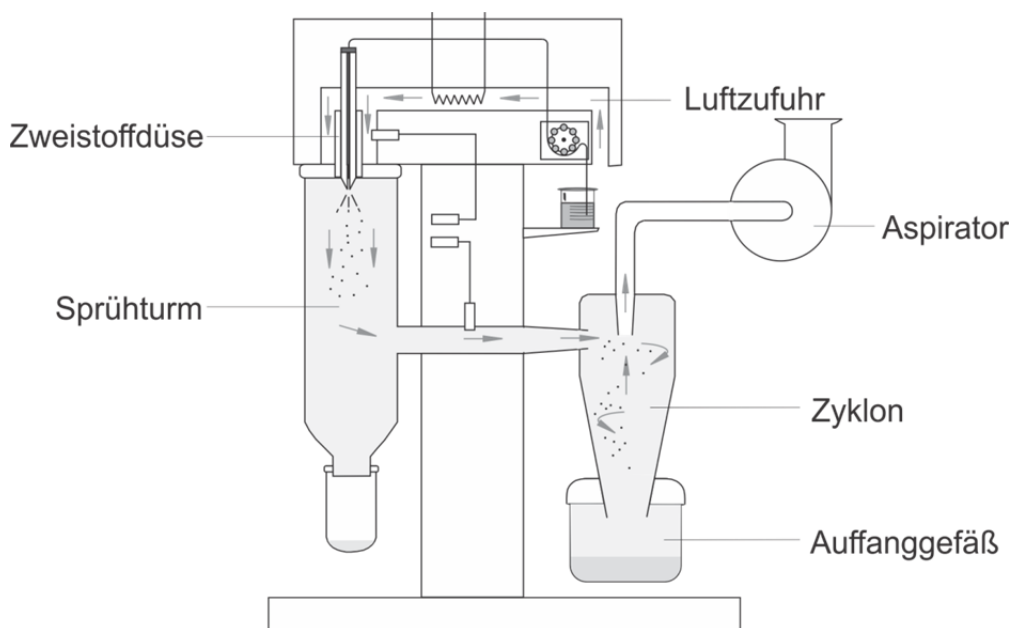


Abbildung 4.6: Schematischer Aufbau des Sprühtrockners

Die zu trocknende Flüssigkeit wurde mit einer Zweistoffdüse mit einem Durchmesser von 1,4 mm in den Heißluftstrom versprüht und dabei getrocknet. Dafür wurde zuvor die Einlasstemperatur (Inlet-T) festgelegt. Nachdem diese erreicht war, wurde Wasser gefördert, bis die gewünschte Auslasstemperatur (Outlet-T) eingestellt war. Dabei wird angenommen, dass die Auslasstemperatur die höchste Temperatur ist, mit der das Produkt in Kontakt kommt. Wenn Einlass- und Auslasstemperatur durch die Zugabe von Wasser passend eingestellt waren, wurde von Wasser auf die Nanopartikeldispersion gewechselt und diese im Luftstrom getrocknet. Das trockene Produkt folgte dem Luftstrom und wurde mit einem Hochleistungszyklon aus dem Luftstrom entfernt und in einem Sammelglas abgeschieden.

4.2 Analytische Methoden

4.2.1 Partikelgrößenanalytik

Ein wichtiges Charakteristikum für die in dieser Arbeit hergestellten Partikel ist die Partikelgröße. Zum einen ist diese für die aerodynamischen Eigenschaften des Partikels von Relevanz und zum anderen entscheidet sie, was mit dem Partikel im Körper geschieht. Beispielsweise gelangen inhalierte Partikel, deren aerodynamischer Durchmesser kleiner als 5 μm ist, in die Lunge, größere impaktieren hingegen bereits in den oberen Atemwegen. Für eine Phagozytose durch dendritische Zellen sollen hingegen Nanopartikel vorliegen, die für eine effektive Aufnahme idealerweise eine Größe von 200 bis 400 nm aufweisen. Daher war die Bestimmung der Partikelgröße durch Verwendung unterschiedlicher Verfahren während der Formulierungsentwicklung ein besonders wichtiger Aspekt. Die Partikelgrößenanalytik erfolgte auf unterschiedliche Weise: Die Partikelgrößen der Nanopartikel wurden mittels der dynamischen Lichtstreuung und die der Mikropartikel laserdiffraktometrisch, sowie mithilfe der Impaktion, charakterisiert.

4.2.1.1 Dynamische Lichtstreuung

Das Prinzip der, auch als Photonenkorrelationsspektroskopie bezeichneten, dynamischen Lichtstreuung beruht auf der Streuung eines Lichtstrahls durch Partikel. Sie eignet sich für die Bestimmung von Partikelgrößen in einem Bereich von 0,6 nm bis 6 μm . Die Partikel liegen dabei in einem Dispergiermedium vor und werden von einem monochromatischen Laserstrahl bestrahlt. Das Zusammentreffen von Laserstrahl und Partikel führt zu einer Lichtstreuung. Da sich die Partikel aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung in der Probe bewegen, verändert sich das Zentrum, von dem die Lichtstreuung ausgeht. Bei kleineren Partikeln erfolgt die Bewegung schneller als bei großen. Der Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Geschwindigkeit der Brown'schen Molekularbewegung wird durch die Stokes-Einstein-Gleichung definiert. Weiterhin streuen kleinere Partikel das Licht stärker als größere Partikel. Diese Veränderungen des Zentrums der Lichtstreuung können vom Detektor erfasst und anschließend mit dem hydrodynamischen Radius korreliert werden (User Manual zum Zetasizer, 2004).

Für die Untersuchungen wurde der Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Großbritannien) verwendet. Die Proben wurden in Polystyrol-Küvetten (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) eingefüllt und in den Strahlengang des Lasers platziert. Ein Detektor registrierte das zurückgeworfene Streulicht (backlight scattering) in einem Winkel von 173° zum einfallenden Lichtstrahl. Die Detektion des zurückgeworfenen Streulichts hat den Vorteil, dass der Lichtstrahl nicht die ganze Probe passieren muss, was zu einer multiplen Streuung durch mehrere Partikel führen könnte. Außerdem lässt sich damit auch der Einfluss möglicher Staubpartikel reduzieren. Diese sind relativ groß und große Partikel streuen hauptsächlich Licht in Vorwärtsrichtung.

Die Probe sollte für die Untersuchung nur leicht getrübt sein, um Partikel-Partikel-Wechselwirkungen zu vermeiden. Daher wurden die Proben vor der Messung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt. Im Zetasizer wurden die Proben vor jeder Messung auf 25°C temperiert und für 120 s equilibriert.

Jede Probe wurde dreifach vermessen, wobei mehrere runs von 10 s Dauer zu einer Messung zusammengefasst wurden. Die Software bestimmte die benötigte Anzahl an runs für die jeweilige Probe automatisch. Die Auswertung erfolgte mit dem „General Purpose Mode“. Bei Vermessung von Proben höherer Viskosität wurde die Viskosität mit dem Vibrio-Viskosimeter SV-10 (A&D, Tokyo, Japan) bestimmt. Der ermittelte Wert wurde in die Berechnung der Partikelgröße einbezogen.

Die Messung der dynamischen Lichtstreuung liefert Ergebnisse über den durchschnittlichen Partikeldurchmesser und den Polydispersitätsindex (PDI), welcher ein Maß für die Breite der Partikelgrößenverteilung ist. Zudem wird durch Auftragung der detektierten Signalintensität eine Verteilungskurve in Abhängigkeit von der Partikelgröße erhalten.

4.2.1.2 Laserdiffraktometrie

Die Laserdiffraktometrie eignet sich für die Bestimmung von Partikeln zwischen 0,1 und $8750\ \mu\text{m}$. Die Vorteile dieser Methode sind die schnelle und zuverlässige Bestimmung von Partikelgrößenverteilungen, wobei sowohl Pulver, Aerosole, Dispersionen, als auch Emulsionen analysiert werden können.

Pulver und Aerosole, die als Feststoffe oder Flüssigkeiten in einer gasförmigen Phase dispergiert vorliegen, werden dabei durch die Messzone hindurchgeführt. Dieses kann mithilfe von Druckluft, einer Vakuumpumpe oder auch, z.B. bei Druckgasaerosolen, durch das Treibgas selbst, erfolgen. Dispersionen und Emulsionen werden hingegen in eine Küvette gefüllt und im Messspalt fixiert. Dabei sind zuverlässige Messungen bis zu einer optischen Konzentration von 50% möglich.

Für die Partikelgrößenmessung wird ein Helium-Neon-Laser von 632,8 nm verwendet. Das Messprinzip der Laserdiffraktometrie ist in Abbildung 4.7 dargestellt: Der Laser wird an einer Linse aufgeweitet, sodass ein paralleler Strahlengang entsteht, der die Messzone passiert. Wenn sich dort eine Probe befindet, führt diese zu einer Beugung des Laserstrahls an der Partikeloberfläche, wobei kleinere Partikel das Licht stärker als große beugen.

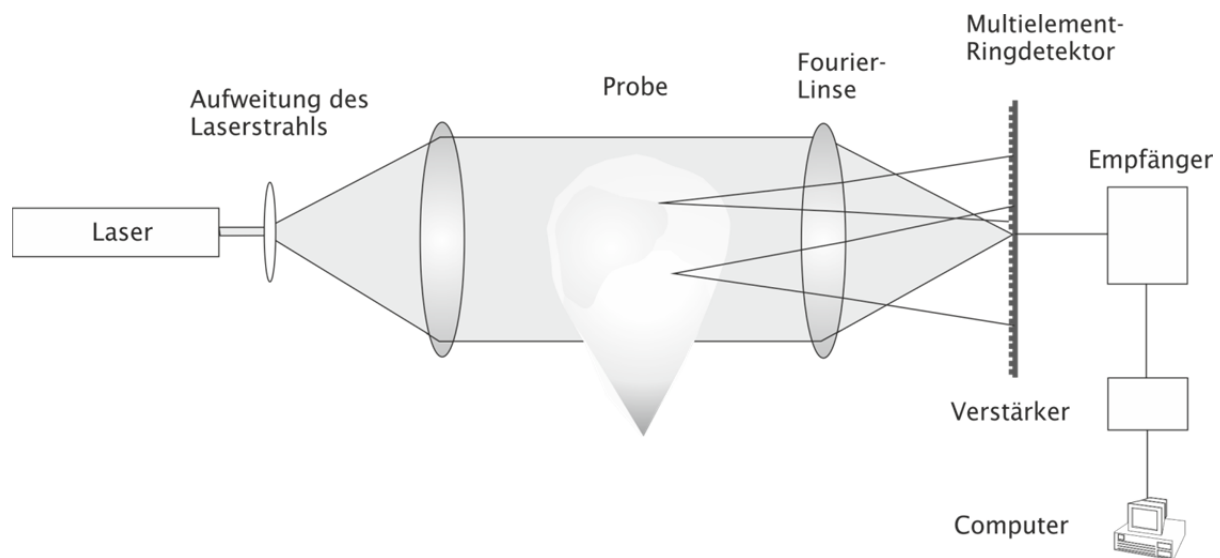


Abbildung 4.7: Messprinzip des Laserdiffraktometers

Eine Fourier-Linse, die sich hinter der Messzone befindet, sorgt dafür, dass eine exakte Berechnung der Partikelgröße unabhängig von der Position des Partikels in der Messzone erfolgen kann.

Der gebeugte Laserstrahl trifft nach Passieren der Fourier-Linse auf einen Multielement-Ringdetektor mit 31 Ringelementen. Abhängig von der Größe der Partikel, an denen die Beugung stattfand, entsteht ein charakteristisches Beugungsmuster, das auf den Ringelementen detektiert wird. Mithilfe der Software kann aus der ermittelten Signalintensität auf den einzelnen Ringen, die

Partikelgröße berechnet und mit der Verteilungsdichte korreliert werden. Dabei stehen zwei unterschiedliche mathematische Auswertungsmethoden zur Verfügung; zum einen die Auswertung nach der Fraunhofer-Theorie und zum anderen nach der Mie-Theorie.

Die Fraunhofer-Auswertung beschreibt ausschließlich die Beugung des Laserstrahls, sodass man keine Kenntnis der optischen Probeneigenschaften benötigt. Aus diesem Grund eignet sie sich besonders für Stoffgemische. Allerdings lassen sich transparente Proben und Proben $< 1 \mu\text{m}$ nicht zuverlässig bestimmen.

Bei der Mie-Auswertung müssen die optischen Eigenschaften, das heißt der komplexe Brechungsindex der Partikel, sowie der Brechungsindex des Suspensionsmediums bekannt sein, da bei dieser Berechnung ebenfalls die Lichtabsorption, -reflexion, -brechung und -beugung an der Partikeloberfläche einberechnet werden. Diese Auswertemethode eignet sich besonders für transparente Proben und Partikel unter $50 \mu\text{m}$ (Sympatec GmbH, 2013; ISO-Norm 13320, 1999).

Für die Untersuchungen wurde der Laserbeugungssensor HELOS (Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) verwendet, wobei unterschiedliche Module (Küvette, Rodos und Inhaler) für die einzelnen Messungen zur Verfügung standen. Die Auswertung erfolgte nach Fraunhofer, da es sich bei den untersuchten Proben um Stoffgemische und undurchsichtige Proben handelte.

Das Küvetten-Modul wurde für eine stichprobenweise Überprüfung der Nanopartikeldispersion auf das Vorhandensein von größeren Partikeln herangezogen. Zu Beginn wurde Aqua bidest., als Referenz, für 5 s vermessen. Die zu analysierende Nanopartikeldispersion wurde in eine 6 ml-Quarzküvette gefüllt und mit Wasser soweit verdünnt, dass eine optische Konzentration zwischen 10 und 20% erreicht wurde. Danach wurde die Küvette in der Messzone fixiert und die Partikelgrößenverteilung der Probe 5 s lang bestimmt. Jede Prüflösung wurde dreifach hergestellt und bestimmt, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Das „RODOS“-Modul wurde für die Bestimmung der Partikelgröße des sprühgetrockneten Pulvers genutzt. Dabei wurden die Partikel mit einem Druck von 3 bar dispergiert und an einer Linse vorbeigeführt.

Ein Druck von 3 bar bewirkt eine vollständige Dispergierung, da die Partikel sowohl miteinander als auch mit der Wand kollidieren. Dieses führt zu einem Aufbrechen von Agglomeraten, nicht aber zu einer Partikelzerkleinerung. Zu Beginn wurde eine Referenzmessung durchgeführt, bei der Umgebungsluft 10 s mit 3 bar angesogen und durch die Messzone geführt wurde. Für die Probenvermessung wurde festgelegt, dass die Messung startete, wenn die optische Konzentration $\geq 1,0\%$ betrug. Die Messung endete nach 3 s, sofern die optische Konzentration $\leq 0,1\%$ lag, oder nach spätestens 5 s. Jede Probe wurde dabei dreifach bestimmt.

Das „Inhaler“-Modul wurde für eine Partikelgrößenbestimmung nach Dispergierung aus den Inhalatoren verwendet. Mit dieser Untersuchung lässt sich feststellen, ob sich ein Inhalator eignet, eine Formulierung derart zu dispergieren, dass lungengängige Partikel resultieren.

Der zu testende Inhalator wird mithilfe einer Gummilippe fest am Modul angeschlossen und ein Luftstrom, der einen Druckabfall von 4 kPa über den Inhalator erzeugt, mithilfe einer Vakuumpumpe eingestellt. Für die Untersuchung wurden Kapseln mit jeweils 20 mg der zu testenden Formulierung befüllt und jede Formulierung mindestens dreifach bestimmt. Zu Beginn wurde auch hier eine Referenzmessung durchgeführt, indem eine leere Kapsel in den Inhalator gelegt und für 10 s Luft durch den Inhalator gesogen wurde. Bei der Vermessung der Proben wurden die gefüllten Kapseln in den Inhalator gelegt, angestoßen und durch den eingestellten Luftstrom dispergiert. Es wurde zuvor festgelegt, dass die Partikelgrößenbestimmung bei einer optischen Konzentration $\geq 0,5\%$ startet und nach 6 s endet.

Für die Messungen aller Module standen verschiedene Linsen mit unterschiedlicher Messbereichsabdeckung zur Verfügung, wobei üblicherweise die Linsen R2 (0,25 - 87,5 μm) und R3 (0,5 - 175 μm) verwendet wurden. Die Ergebnisse der Messungen sind in den Verteilungssummen (Q3/%) sowie Verteilungsdichten (q3 log) in Abhängigkeit von der Partikelgröße dargestellt.

4.2.2 Aerodynamische Charakterisierung

Die Bestimmung der aerodynamischen Eigenschaften ist ein wichtiger Bestandteil der Charakterisierung von inhalativen Produkten. Mit dieser werden Feinpartikelfraktion, aerodynamische Partikelgrößenverteilung, als auch abgegebene Wirkstoffmenge analysiert. Zur Ermittlung der Feinpartikelfraktion und der aerodynamischen Partikelgröße werden üblicherweise Kaskadenimpaktoren eingesetzt. Dabei gibt es verschiedene Impaktoren, wie zum Beispiel den Andersen-Kaskadenimpaktor, den Twin Stage Liquid Impinger oder auch den Next Generation Pharmaceutical Impactor. Diese unterscheiden sich zwar im Aufbau, haben aber alle den Zweck, das aerodynamische Verhalten einer Formulierung zu charakterisieren.

In dieser Arbeit wurde der Next Generation Pharmaceutical Impactor (NGI) verwendet, der sich durch eine geringe Umrüstzeit auszeichnet (Marple, 2003) und eine gute Aussage der Wirkstoffverteilung über die verschiedenen Stufen geben kann. Der Dosage Unit Sampling Apparatus (DUSA) B (gemäß USP 37, 2014) wurde für die Bestimmung der abgegebenen Dosis genutzt.

4.2.2.1 Impaktionsanalyse

Die Impaktionsanalyse wurde mit dem Next Generation Pharmaceutical Impactor (NGI) durchgeführt. Der NGI ist ein Gerät, das zur Bestimmung der aerodynamischen Partikelgröße genutzt wird. Es besteht aus mehreren hintereinander angeordneten Stufen. Dabei enthalten die Stufen eine oder mehrere Düsen. Mit zunehmendem Weg durch den Impaktor nimmt die Anzahl der Düsenöffnungen zu und der Düsendurchmesser ab. Das führt zu einer Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit. Kleinere Partikel mit einem geringen aerodynamischen Durchmesser können dem schnelleren Luftstrom besser folgen als größere, trägere Partikel. Die größeren Partikel werden daher früher durch Impaktion abgeschieden. Kleinere Partikel können bis auf die hinteren Stufen des NGI gelangen. Abhängig von der aerodynamischen Größe impaktieren die Partikel auf den unterschiedlichen Stufen des Kaskadenimpaktors (Newman, 2009).

Der in dieser Arbeit verwendete NGI (Copley Scientific, Nottingham, Großbritannien) wird in der 7. Auflage des Europäischen Arzneibuchs im Kapitel

2.9.18 als Gerät E aufgeführt. Der NGI besteht aus acht Prallplatten, auch als stages bezeichnet, mit darüber liegenden Düsen, sowie einem Vorabscheider, Preseparator genannt, und einem Rachenstück (Abbildung 4.8).

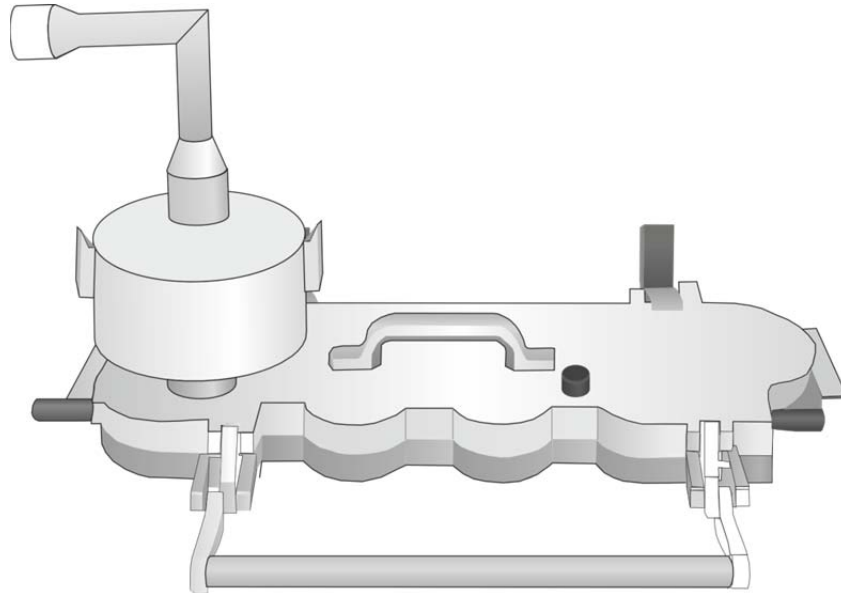


Abbildung 4.8: Geschlossener NGI

Abbildung 4.9 zeigt den geöffneten NGI: Auf der Oberseite des NGIs, über den Prallplatten, befinden sich die Düsen und jeweils eine Öffnung, durch die der Luftstrom die jeweilige Stufe wieder verlassen kann. Die acht Prallplatten befinden sich auf einem Einsatz, wodurch es möglich ist, diesen schnell auszutauschen. Die letzte Stufe wird als „micro-orifice collector“ bezeichnet und dient dazu, die kleinsten Partikel abzuscheiden.

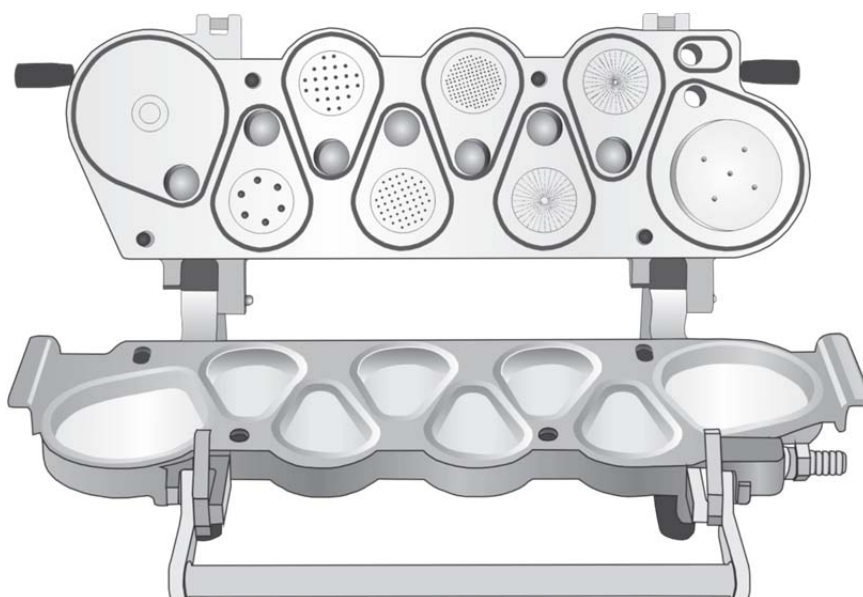


Abbildung 4.9: Geöffneter NGI

Zwischen der ersten Prallplatte und dem Rachenaufsatz befindet sich der Preseparator, der größere Partikel oder Agglomerate bereits vor Erreichen der ersten Stufe abfängt. Auf den Preseparator wird das Rachenstück aufgesetzt. Es simuliert mit seinem 90°-Winkel die natürliche Form des Rachens. Mithilfe eines Adapters und einer Gummilippe kann der Inhalator fest an den Rachen angeschlossen werden. Der NGI wird an eine Vakuumpumpe, sowie eine Triggerbox angeschlossen. Entsprechend der Anforderung des Ph. Eur. zur Untersuchung der Feinpartikeldosis wird ein Luftstrom eingestellt, der einem Druckabfall von 4 kPa über den Inhalator erzeugt. Über die Triggerbox wird die Zeit eingestellt, welche einem Volumen von 4 l entspricht. Bei Auslösung der Triggerbox wird ein entsprechender Luftstrom freigegeben und ein simuliertes Inspirationsvolumen von 4 l durch den Impaktor gezogen. Für den Unihaler wurden eine Flussrate von 59 l und eine korrespondierende Zeit von 4,1 s und für den Cyclohaler 100 l und 2,4 s eingestellt.

Der Inhalator (Cyclohaler oder Unihaler, Abschnitt 3.10) wurde mit einer Kapsel, die die Formulierung enthielt, bestückt und mittels eines passgenauen Mundstückes dicht am Rachen angebracht. Die Kapsel wurde durch Anstechen im Inhalator geöffnet und durch Auslösen der Triggerbox wurde das Inspirationsvolumen von 4 l durch den Inhalator gesaugt. Das Pulver verließ die Kapsel und gelangte durch Rachen und Preseparator in den Impaktor. Je nach aerodynamischer Größe impaktierten die Partikel auf den unterschiedlichen Prallplatten. Damit die Partikel auf der stage verblieben, auf der sie impaktiert waren, wurden die stages wie auch der Preseparator dünn mit einer Mischung aus Isopropanol und Propylenglycol (50:50) gecoatet.

Die NGI-Tests wurden in „runs“ durchgeführt. Ein run bestand aus dem simulierten Inhalationsvorgang und dem anschließendem Auflösen der impaktierten Partikel mit einem geeigneten Lösemittel auf den Stufen. Die Probelösungen wurden von den Stufen für die spätere Analyse in Glasgefäße überführt. Anschließend wurde der NGI mit Wasser gereinigt, getrocknet und konnte für den nächsten run verwendet werden.

Alle NGI-Versuche wurden in konditionierter Umgebung bei 21°C und einer Luftfeuchtigkeit von 45% durchgeführt, um äußere Einflüsse bei den Versuchen

möglichst gering zu halten. Als Probe wurden jeweils 20 mg sprühgetrocknetes Pulver in HPMC-Kapseln gefüllt und mit dem Cyclohaler oder Unihaler dispergiert. Je run wurde eine Kapsel verwendet.

Um die impaktierten Partikel aufzulösen, wurden Inhalator, Rachen und Preseparator mit jeweils 10 ml, die acht stages und die Kapsel mit jeweils 3 ml 0,1 M NaOH ausgespült. Die Kapseln wurden nur sehr kurz gespült, da sich diese andernfalls auflösen und zu einer Störung der Analytik führen können. Die Probelösungen von den jeweiligen Stufen wurden für die weitere quantitative Analyse in Schnappdeckelgläser überführt und anschließend ca. 8 h bei Raumtemperatur stehen gelassen, sodass sich die Partikel vollständig auflösten.

Der Ovalbumingehalt der einzelnen Probelösungen wurde mit dem BCA-Assay (Abschnitt 4.2.3) quantitativ bestimmt. Vor der Proteinbestimmung wurden die Proben mit 0,1 M HCl neutralisiert, da der BCA-Assay pH-sensitiv ist. Als Referenz wurden 20 mg des sprühgetrockneten Pulvers in 1 ml 0,1 M NaOH gelöst und mit 0,1 M HCl neutralisiert. Anschließend wurde diese Lösung noch 1:5 mit einer Mischung aus NaOH und HCl, der pH-Wert der Mischung betrug 8-9, verdünnt, um eine Absorption im Gültigkeitsbereich des Lambert-Beerschen-Gesetzes, zwischen 0,2 und 0,8, zu erreichen. Damit eine Verfälschung durch das Coating ausgeschlossen werden konnte, wurde Isopropanol und Propylen-glycol (50:50) in einer Menge, die dem Coating auf den stages entsprach, mit 3 ml NaOH verdünnt, neutralisiert und ebenfalls mit dem BCA-Assay analysiert. Die Herstellung der Ovalbuminlösungen für die Kalibrierung erfolgte auch in einer Mischung aus NaOH und HCl. Alle Probe- und Kalibrierlösungen wurden vierfach bestimmt.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Copley-Software „CITDAS“ (Copley Scientific, Nottingham, UK, Version 3.10). Damit konnten aus den Ergebnissen des BCA-Assays die Feinpartikelfraktion (FPF), also der Anteil an Partikeln mit einer aerodynamischen Größe $< 5 \mu\text{m}$, bezogen auf die eingewogene Partikelmenge, der massenbezogene mittlere aerodynamische Durchmesser (MMAD), sowie die geometrische Standardabweichung (GSD) bestimmt werden.

4.2.2.2 Bestimmung der abgegebenen Dosis

Die Gleichförmigkeit der abgegebene Dosis (Emitted dose) wurde mithilfe des Dosage Unit Sampling Apparatus B (DUSA) bestimmt. Für die Untersuchungen wurde der Apparatus B (Copley Scientific, Nottingham, Großbritannien) gemäß USP 37 verwendet (Abbildung 4.10).

Abbildung 4.10 zeigt den schematischen Aufbau des DUSA. Dieser besteht aus einem Sammelrohr, an dessen einen Seite der Inhalator mithilfe eines Mundstückadapters aus Gummi luftdicht angebracht wird. An der gegenüberliegenden Seite befindet sich ein Filter, hinter dem sich Triggerbox und Pumpe anschließen. Vor der ersten Messung wird mit der Triggerbox eine Flussrate eingestellt, die einem Druckabfall von 4 kPa über den Inhalator entspricht. Mithilfe des Flowmeters wird dabei die Flussrate überprüft.

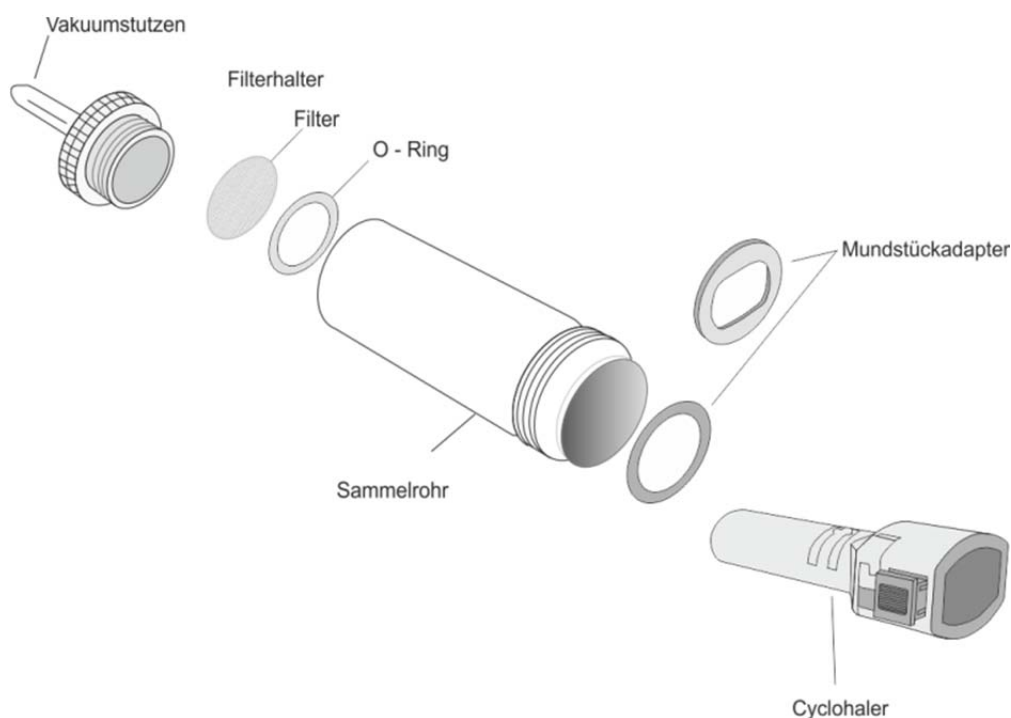


Abbildung 4.10: Schematischer Aufbau des Dosage Unit Sampling Apparatus B

Für die Quantifizierung der Emitted Dose, der abgegebenen Wirkstoffmenge, wird zu Beginn eine mit der Formulierung gefüllte Kapsel in den Inhalator eingelegt und angestochen. Anschließend wird der Inhalator fest an die Gummilippe des DUSA angeschlossen. Über die Triggerbox wird, wie auch beim NGI, eine Zeit eingestellt, die einem Inspirationsvolumen von 4 l entspricht. Durch das Auslösen der Triggerbox wird ein Luftstrom freigegeben, der die Formulierung

aus der Kapsel in den DUSA saugt. Hier scheidet sich die Formulierung an den Seitenwänden der Sammelröhre und auf dem Filter ab.

Die Sammelröhre wird anschließend mit 5 ml 0,1 M NaOH versetzt und mit Parafilm M (Bemis, Neenah, WI, USA) verschlossen. Durch leichtes Schütteln der Röhre wird bewirkt, dass das Pulver vollständig in der Flüssigkeit aufgenommen wird. Die Flüssigkeit wird für die weitere Quantifizierung aufgefangen. Die Filterfraktion, bestehend aus Filterhalter, Filter sowie O-Ring, wird in einem Becherglas ebenfalls mit 5 ml 0,1 M NaOH versetzt, leicht geschüttelt und auch diese Flüssigkeit aufgefangen. Die beiden Fraktionen, Sammelröhre und Filter, werden bei 37°C solange inkubiert bis eine klare Lösung entsteht. 1 ml der Probelösung wird mit 1 ml 0,1 M HCl neutralisiert und anschließend wird der Ovalbumingehalt der Probelösung mit dem BCA-Assay quantifiziert. Mit dieser Methode lässt sich bestimmen, ob bei jeder Inhalation reproduzierbar die gleiche Wirkstoffmenge abgegeben wird.

4.2.3 BCA-Assay

Der Wirkstoffgehalt stellt ein entscheidendes Kriterium einer pharmazeutischen Formulierung dar. Zur Bestimmung des Ovalbumingehalts wurde in dieser Arbeit das Micro BCATM Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) verwendet. Die Methode beruht auf der kolorimetrischen Detektion des Proteins. Einer wässrigen Probelösung wird dabei das BCA-Reagenz, das Bicinchoninsäure und Cu^{2+} enthält, zugesetzt. Wenn Proteine in der Probelösung enthalten sind, reduzieren diese, in alkalischer Umgebung, das Cu^{2+} zu Cu^+ . Nachfolgend kann das reduzierte Kupferion (Cu^+) mit zwei Molekülen der ebenfalls zugesetzten Bicinchoninsäure einen violett gefärbten Chelatkomplex bilden (Abbildung 4.11). Dieser wasserlösliche Komplex hat ein Absorptionsmaximum bei 562 nm. Mit einem Photometer kann die Absorption, die direkt proportional zur Proteinkonzentration ist, gemessen werden (Smith, 1985).

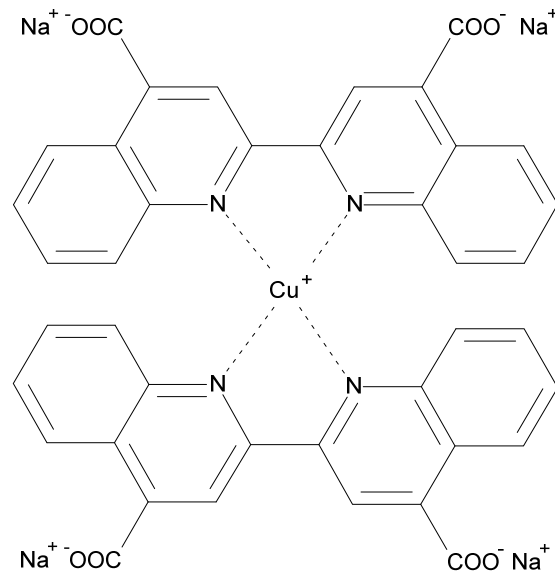


Abbildung 4.11: Violett gefärbter Kupfer-Bicinchoninsäure-Komplex

Die Tests werden auf 96-well-Platten (Zellkulturtestplatte 96F, TPP, Trasadingen, Schweiz) durchgeführt und nachfolgend die Absorption mit dem Plattenreader (Spectra Thermo Reader mit Software easyWINfitting V6.0a, Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm bestimmt. Jede Probe wird vierfach aufgetragen und untersucht.

Da es geringfügige Unterschiede zwischen den 96-well-Platten gibt, werden auf jeder Platte Kalibrierlösungen aufgetragen. Aus dieser Kalibrierung erhält man nach polynomischem Kurvenfit eine quadratische Polynomfunktion, die für die Auswertung des Proteingehaltes herangezogen wird.

Das BCA-Assay ist nicht spezifisch für Ovalbumin, sondern detektiert jegliche Proteine. Daher wird die Kalibrierung immer mit dem tatsächlich eingesetzten Protein durchgeführt.

4.2.4 Freisetzung

Die Freisetzung des Antigens stellt einen wichtigen Parameter für eine erfolgreiche Immunisierung dar. In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen liefern dabei erste Erkenntnisse, wie sich die Formulierung später in vivo verhalten wird. Die Freisetzungstests wurden bei zwei unterschiedlichen pH-Werten, pH 5,5 und 7,4, durchgeführt, um die physiologischen Bedingungen zu simulieren. Der pH-Wert von 7,4 entspricht dem pH-Wert in der Lunge und der von 5,5 stimmt mit dem pH-Wert in den Endosomen überein (Geisow und Evans, 1984), in denen sich die Nanopartikel nach Aufnahme in die Zellen anreichern. Um einen

konstanten pH-Wert zu erreichen, wurden Phosphat-Pufferlösungen mit dem entsprechenden pH-Wert nach Kapitel 4.1.3 des Europäischen Arzneibuchs hergestellt (Abschnitt 3.8). Vor der Verwendung als Freisetzungsmedium wurde der Puffer auf 37°C vortemperiert.

Für die Freisetzungsuntersuchungen wurden 10 mg des sprühgetrockneten Produkts in 2 ml Polypropylen-Reaktionsgefäße (Eydam, Kiel, Deutschland) eingewogen und mit jeweils 1 ml des auf 37°C temperierten Freisetzungsmediums versetzt. Die Formulierung wurde bis zur vollständigen Redispergierung des Pulvers gevortext (Vortex 4 basic, IKA Werke GmbH, Staufen, Deutschland) und anschließend im Schüttelwasserbad (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) bei 37°C und 40 rpm inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Proben entnommen und 20 Minuten mit 14000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5430 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), um die Partikel abzutrennen. Der Überstand mit dem freigesetzten Protein wurde abgenommen und der Proteingehalt mit dem BCA-Assay (Abschnitt 4.2.3) quantifiziert. Für jeden Zeitpunkt wurden mindestens zwei Proben analysiert. Jede Probelösung wurde vierfach mit dem BCA-Assay bestimmt und aus den Ergebnissen Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

4.2.5 Partikelvisualisierung

4.2.5.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Oberfläche der Nano- und Mikropartikel wurde mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie (Supra 55 VP mit Software Smart SEMTM und DSM 940, Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland) visualisiert.

Das Prinzip der Rasterelektronenmikroskopie beruht darauf, dass ein gebündelter Elektronenstrahl zeilenweise über die Probenoberfläche geführt wird. Die Aufnahme der Probenoberfläche erfolgt dabei im Hochvakuum, um zu verhindern, dass der Elektronenstrahl durch Kollision mit Gasmolekülen von seiner Bahn abgelenkt wird. Die Wechselwirkung von Primärelektronenstrahl mit den Atomen der Probe induziert eine Vielzahl von Signalen, die Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der Partikeloberfläche ziehen lassen. Üblicherweise werden die Signale der Sekundär- und Rückstreuelektronen detektiert und mithilfe von Software in ein Bild umgewandelt (Reingruber, 2010).

Zur Visualisierung der trockenen mikropartikulären Formulierungen wurde eine kleine Menge des Pulvers auf ein doppelseitig klebendes Leit-Tab (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland), das auf den Aluminiumprobenhalter geklebt wurde, aufgetragen. Nicht anhaftende Partikel wurden mit Druckluft entfernt. Zur Visualisierung der Nanopartikel wurde das Pulver in Wasser redispergiert und ein Tropfen der Dispersion auf den Probenhalter platziert. Nach drei Minuten wurde überschüssige Flüssigkeit mit einem Kimwipe (Kimberley-Clark, Surrey, Großbritannien) entfernt und die noch feuchte nanopartikuläre Probe an der Luft getrocknet. Anschließend wurden sowohl Nanopartikel- wie auch Mikropartikelproben mit Gold gesputtert (SCD 005, Bal-Tec, Liechtenstein). Dazu wurden sie unter Argon-Atmosphäre (50 Pa) bei 50mA für 65 Sekunden mit einer dünnen Goldschicht überzogen, um die Probe leitfähig zu machen, was eine Voraussetzung für die Rasterelektronenmikroskopie ist.

4.2.5.2 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Proben der Nanopartikel wurden zusätzlich mit dem Rasterkraftmikroskop BioScope[®] mit Nanoscope IV Controller (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) aufgenommen und mit der NanoScope[®] Software ausgewertet.

Das Messprinzip beruht darauf, dass das Probenmaterial mit einer nanoskopisch kleinen Messspitze, die an einer beweglichen Blattfeder befestigt ist, rasterförmig abgetastet wird. Dadurch lässt sich im Vergleich zur Rasterelektronenmikroskopie ein detaillierteres Bild der Oberflächenbeschaffenheit erzeugen. Kräfte zwischen Probe und Spitze führen zu einer Auslenkung der Blattfeder, was Aufschluss über die Probenoberfläche gibt (Binnig, 1986). Ein Laserstrahl ist auf die Blattfeder gerichtet. Wenn die Blattfeder, aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit, ausgelenkt wird, ändert sich die Reflektion des Lasers. Die Änderung wird von einem Detektor registriert und anschließend durch die Software in ein topografisches Bild der Partikeloberfläche umgewandelt.

Die Nanopartikelprobe wird analog zu den REM-Aufnahmen auf den Proben-träger aufgebracht und aufbereitet.

4.2.6 Endotoxinbestimmung

Endotoxine sind Bruchstücke der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien und zählen chemisch zu den Lipopolysacchariden. Lipopolysaccharide werden wiederum den Pyrogenen zugeordnet, welche Stoffe sind, die in kleinster Menge, besonders bei parenteraler Applikation, Fieber auslösen.

Während sich Bakterien bereits ab 70°C abtöten lassen, sind die Endotoxine hingegen erheblich hitzestabiler und werden erst ab 200°C inaktiviert (Bauer, 2006).

Da Endotoxine immunogene Effekte auslösen können, ist es wichtig, dass die Formulierungen, die für die immunologischen Untersuchungen verwendet werden, möglichst geringe Endotoxinmengen enthalten. Sonst lassen sich immunologische Effekte nicht eindeutig der Formulierung zuordnen.

Um den Endotoxingehalt in der finalen Formulierung zu bestimmen, wurden 20 mg des sprühgetrockneten Pulvers in ein endotoxinfreies Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 5 ml LAL-Reagenz-Wasser (Acila, Weiterstadt, Deutschland) versetzt. Die Probe wurde solange gevortext, bis die Partikel vollständig redispergiert vorlagen. Anschließend wurde die Probe 60 Minuten auf der Schüttelapparatur bewegt, um möglicherweise enthaltene Endotoxine zu extrahieren. Danach wurden die Nanopartikel durch Zentrifugation bei 7800 rpm über 45 Minuten abgetrennt. Der klare Überstand wurde abgenommen und auf seinen Endotoxingehalt untersucht. Dazu wurde das LAL-Reagenz Limusate® (Empfindlichkeit 0,03 I.U./ml, Wako Chemicals, Richmond, VA, USA) verwendet, das bei Anwesenheit von Endotoxinen ein Gel ausbildet. Für den Test wurden verschiedene Verdünnungen der Probelösung angefertigt und das Reagenz zugesetzt. Die Proben wurden 60 Minuten bewegungslos bei 37°C inkubiert und anschließend wurde überprüft, ob sich ein Gel gebildet hatte. Aus der Verdünnung der Probe, sowie der Empfindlichkeit des Reagenz ließ sich der Endotoxingehalt halbquantitativ bestimmen.

4.2.7 Immunologische Methoden

Die immunologischen Untersuchungen stellen einen wichtigen letzten Schritt in der Charakterisierung der Formulierungen dar, da diese Untersuchungen zeigen, ob die Formulierungen die gewünschte immunologische Wirkung hervorruft.

Die immunologischen Untersuchungen wurden an murinen Knochenmark-abgeleiteten (BMD) Makrophagen durchgeführt. Dazu werden aus dem Knochenmark der Hinterbeine von Mäusen Monozyten gewonnen und in RPMI-Medium mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Steptomycin und 50 µg/ml β-Mercaptoethanol kultiviert. Durch die Zugabe von 100 nM M-CSF erfolgt die Ausdifferenzierung der Makrophagen.

Den Makrophagen wird das partikuläre Antigen in RPMI 1640-Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland) zugesetzt und inkubiert. Dabei wird das nanopartikelartige Antigen von den Makrophagen phagozytiert. Im Zytosol wird das Antigen fragmentiert und anschließend an der Oberfläche von Makrophagen über den MHC-I-Komplex präsentiert. Zusätzlich werden an der Oberfläche der Makrophagen Aktivierungsmarker exprimiert, solche sind beispielsweise CD80 und CD86. Bei Zugabe von naiven CD8⁺-T-Zellen, die aus der Milz von Mäusen isoliert werden, binden diese an den MHC-I-Komplex und erhalten durch die Aktivierungsmarker an der Oberfläche der Makrophagen einen co-stimulierenden Reiz. Diese Co-Stimulation führt zu einem Priming, die CD8⁺-T-Zellen differenzieren sich zu Effektor-T-Zellen aus, die für das präsentierte Antigen spezifisch sind. Die T-Zelle sezerniert daraufhin Zytokine, zum Beispiel Interleukin-2 (IL-2) und IFN-γ (Olazabal, 2008), was zu einer Proliferation von weiteren T-Zell-Klonen führt. Dieser Vorgang wird auch klonale Expansion bezeichnet. An der Oberfläche der aktivierten T-Zellen werden Aktivierungsmarker, wie beispielsweise CD25 und CD69 exprimiert (Olazabal, 2008).

Die Oberflächenmarker CD69 und CD80 sowie die IL-2-Sekretion werden in dieser Arbeit als Aktivierungsmarker für eine erfolgte Immunisierung bestimmt. CD80 zeigt die Aktivierung von Makrophagen und CD69 sowie IL-2 die Aktivierung der T-Zellen. Die Expression von CD69 und CD80 lässt sich durch Zugabe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu den Zellen detektieren. Diese binden an die Aktivierungsmarker. Ungebundene Antikörper werden hingegen durch einen zweifachen Waschschrift abgetrennt. Anschließend werden die

Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert, wobei die Konzentration an Aktivierungsmarker aus der Fluoreszenzintensität bestimmt werden kann. Der Gehalt an IL-2 wird im Überstand mittels ELISA-Test quantitativ ermittelt. Die Untersuchungen werden üblicherweise mit Formulierungen mit und ohne Antigen durchgeführt und mit den Ergebnissen des gelösten Ovalbumins verglichen.

Zusätzlich wird die Zytotoxizität der Formulierungen auf die Makrophagen untersucht. Dabei ist die Proliferation der Makrophagen der untersuchte Parameter. Nach Zugabe des partikulären Antigens werden die Makrophagen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) inkubiert. Das Prinzip ist, dass CFSE von den Makrophagen aufgenommen und mit jeder Zellteilung der Farbstoff auf zwei Zellen aufgeteilt wird. Dadurch nimmt die Fluoreszenzintensität über die Zeit ab. Wenn die Formulierung eine toxische Wirkung aufweist, findet keine Proliferation statt und die Fluoreszenz bleibt stark. Auf diese Weise kann die Toxizität ermittelt werden.

4.2.8 Zellkultur

In der Zellkultur wurden Calu-3-Zellen kultiviert und für zytotoxische Untersuchungen verwendet. Calu-3-Zellen sind Teil einer humanen Lungenkarzinomzelllinie und stammen von einem 25-jährigen Mann kaukasischer Herkunft (HTB-55, ATCC, Manassas, VA, USA). Es handelt sich dabei um eine adhärente Zelllinie, deren Zellen auf der Oberfläche von Kulturgefäßen einen Monolayer ausbilden. Calu-3-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Teilungsrate aus und stellen ein geeignetes Modell für den Respirationstrakt dar (Scherließ, 2011). Die Zellen wurden bis zu einer Passagenummer von 55 für die Zytotoxizitätsuntersuchungen verwendet.

Die Aussaat der Zellen erfolgte in 75 cm²-Flaschen (TPP, Trasadingen, Schweiz), an deren Oberfläche die Zellen adhärirten. Die Kultivierung fand in einem Minimalmedium statt, dem Earle's Salze, 1% (V/V) nicht-essentielle Aminosäuren (100x), 10% (V/V) fetales Kälberserum und 1% (V/V) Natriumpyruvat (100 mM) (alles von Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) zugesetzt wurden. Das so zusammengesetzte Medium wird im Folgenden nur noch als „Medium“ bezeichnet. Auf den Zusatz von Antibiotika konnte verzichtet werden.

Die Zellen wurden in einem Inkubator (Heracell 150, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt, damit die Zellen zu jedem Zeitpunkt optimal mit Nährstoffen versorgt waren. Alle zugesetzten Medien wurden vor der Verwendung im Temperierbad (TE 2, IKA, Staufen Deutschland) auf 37°C gebracht, um die Zellen nicht zu schädigen.

Nach etwa einer Woche war eine Konfluenz von 90% erreicht und die Zellen wurden passagiert. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit Phosphat-Pufferlösung (PBS Dulbecco, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mithilfe von Trypsin/EDTA (0,25%/0,02%) (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) enzymatisch von der Flaschenoberfläche abgelöst. Nach etwa 10 Minuten wurde der Prozess durch Zugabe eines Überschusses an Medium gestoppt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Biofuge 28RS, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland), 5 Minuten mit 5000 rpm bei 20°C, von der Trypsin/Medium-Mischung separiert. Das Zellpellet wurde in Medium dispergiert und die Zellsuspension für die Zellzählung verwendet. Dazu wurden 50 µl Zellsuspension mit 400 µl Medium und 50 µl Trypanblau (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) versetzt.

Trypanblau ist ein blauer Farbstoff mit der Eigenschaft, dass er von lebenden Zellen nicht aufgenommen wird. Tote Zellen werden hingegen blau angefärbt. Da Trypanblau eine zytotoxische Wirkung hat, wurde die Zellzählung direkt nach der Zugabe durchgeführt. Dafür wurde ein Teil der Zellsuspension in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland) eingefüllt und die Anzahl an lebenden Zellen in insgesamt sechs Großquadraten ermittelt. Aus dem Mittelwert ließ sich die Zellzahl pro Milliliter errechnen, sodass die Aussaat mit einer definierten Zellzahl möglich war. Je nach gewünschter Zellzahl wurde ein entsprechendes Volumen der Zellsuspension abgenommen.

Für die Aussaat in 75 cm²-Flaschen wurden 2×10^6 Zellen verwendet. Das entsprechende Volumen Zellsuspension wurde in die Flasche pipettiert und mit Medium auf 12 ml aufgefüllt. Diese Flasche wurde dann erneut bis zu einer Konfluenz von 90% bewachsen und die Zellen wiederum passagiert.

Für die Aussaat von Zellen auf eine 96-well-Platte (Zellkulturtestplatte 96F, TPP, Trasadingen, Schweiz) wurde ein Volumen von 200 μl , das 3×10^4 Zellen entsprach, in jedes well pipettiert. Die ausgesäten Zellen wurden für drei Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Es folgte eine optische Kontrolle, ob die einzelnen wells vollständig bewachsen waren. Wenn dies der Fall war, konnten die Zellen für den Zytotoxizitätstest verwendet werden.

4.2.9 Zytotoxizitätstests

Es wurden zwei unterschiedliche Assays zur Bestimmung der Zytotoxizität verwendet: MTT- und Vialight-Assay.

Der MTT-Assay beruht darauf, dass der gelbe Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) von lebenden Zellen aufgenommen und zu einem blauen Farbstoff reduziert werden kann (Abbildung 4.12).

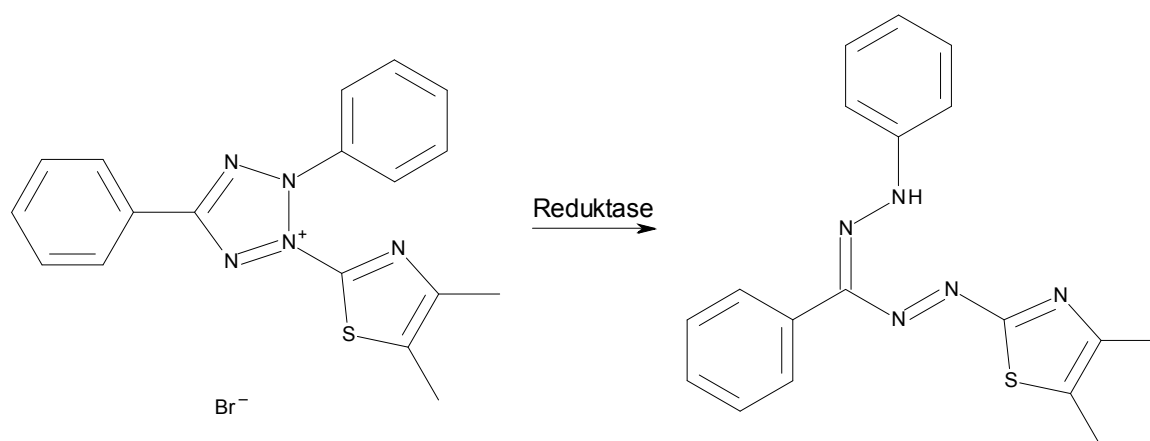


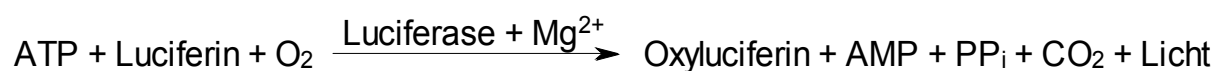
Abbildung 4.12: MTT-Reaktion – Reduktion des gelben Thiazols zum blauen Formazan

Diese Reduktion kann sowohl in den Mitochondrien der Zellen durch Succinatdehydrogenasen als auch, durch NADH oder NADPH vermittelt, außerhalb der Mitochondrien im Zellinneren erfolgen (Fotakis und Timbrell, 2006). Da tote Zellen diesen Farbstoff nicht umwandeln können, bleibt der Farbstoff gelb. Bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm lässt sich die Absorption des blauen Farbstoffs detektieren. Je nach Zellviabilität variieren die Intensität der Blaufärbung und abhängig davon die gemessene Absorption. Mithilfe einer Zweipunktkalibrierung kann eine Geradengleichung aufgestellt werden, in die die Absorptionsergebnisse für die einzelnen Proben

eingesetzt werden, sodass auf diese Weise das Ausmaß des toxischen Effekts berechnet werden kann.

Im Gegensatz zum MTT-Assay detektiert der Vialight-Assay die Viabilität von Zellen über die Biolumineszenz des zellulären ATP. Der Test wurde mit dem ViaLight Plus Cell Proliferation and Cytotoxicity BioAssay Kit (Lonza, Rockland, ME, USA) durchgeführt. Zellen, die durch die Proben nicht geschädigt werden, bleiben metabolisch aktiv und bilden, im Gegensatz zu den toten Zellen, ATP. Durch Zugabe des mitgelieferten Zelllysereagens werden die Zellen aufgelöst und das gebildete ATP freigesetzt. Um die Menge an ATP zu quantifizieren, wird ein ATP-Messreagenz (AMR) zugesetzt. Darin sind unter anderem Luciferin und Luciferase enthalten. Die Formel (4.1) zeigt, dass diese mit dem ATP reagieren, woraufhin Licht emittiert wird (Crouch, 1993).

(4.1): Erzeugung von Lichtemission durch Reaktion von ATP mit Luciferin und Luciferase



Die Intensität der Lichtemission lässt sich mithilfe eines Luminometers (FLUOstar Omega, BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland) quantifizieren und ist proportional zur ATP-Konzentration. Die Lumineszenz wurde von oben detektiert, dabei betrug die Messzeit je well eine Sekunde.

4.2.9.1 Durchführung der Zytotoxizitätstests

Es konnte beobachtet werden, dass die Zellen an den Außenseiten der 96-well-Platte im Vergleich zu den Zellen im Inneren etwas schlechter wuchsen. Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, wurden die Zellen in den äußeren wells nicht verwendet. Auf jeder Platte wurden eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle mit durchgeführt. Eine 5 mmolare SDS-Lösung diente dabei als Positivkontrolle. Da diese toxisch auf die Zellen wirkt, erhielt man eine Viabilität von 0%. Als Negativkontrolle wurde Hanks' balanced Salt solution (HBSS, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) mit 30 mM Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer (HEPES (1M), Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. In dieser finden die Zellen ideale Lebensbedingungen und die Viabilität beträgt 100%. Zur Herstellung der Probelösungen wurde ebenfalls HBSS + HEPES verwendet.

Vor Durchführung des Zytotoxizitätstests wurde aus den wells im Platteninneren das Medium entfernt. Danach wurden jeweils 200 µl der vorbereiteten Probelösungen aufgetragen, wobei immer eine Vierfachbestimmung durchgeführt wurde. Anschließend wurde die Platte für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

4.2.9.1.1 MTT-Assay

Nach vierstündiger Inkubation wurde die Platte dem Inkubator entnommen, die Probelösungen abgesaugt und in jedes well 25 µl MTT-Lösung pipettiert. Für die MTT-Lösung wurden 5 mg MTT in 1 ml HBSS + HEPES gelöst. Es erfolgte eine erneute Inkubation über 2 Stunden. Anschließend wurden 100 µl Lyselösung in jedes well ergänzt. Die Lyselösung bestand aus 5% SDS in einer 50:50-Mischung aus Dimethylformamid (DMF) (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Wasser, welche mit verdünnter Essigsäure auf einen pH-Wert von 4,7 eingestellt wurde. Die Lyselösung diente dazu, die Zellen aufzulösen, sodass der Farbstoff aus den Zellen freigesetzt werden konnte. Nach Zusatz der Lyselösung wurde die Platte einige Minuten auf den Plattenschüttler (MS 1 Minishaker, IKA, Staufen, Deutschland) platziert und mit 400 bis 600 rpm bewegt, damit die Zellen vollständig zerstört wurden und der Farbstoff in Lösung ging. Mit dem Plattenreader (Spectra Thermo Reader mit Software easyWINfitting V6.0a, Tecan, Männedorf, Schweiz) wurde die Absorption der einzelnen wells bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden auf die Negativkontrolle, deren Absorption einer Viabilität von 100% entsprach, bezogen. So erhielt man für jede Prüflösung die prozentuale Viabilität. Zur Bestimmung der LC₅₀ (Konzentration, bei der 50% der Zellen sterben) wurde die Konzentration der Prüflösung gegen die prozentuale Viabilität aufgetragen und die erhaltene Kurve mithilfe der Software Sigmaplot (Version 11.0, Systat Software Inc, Erkrath, Deutschland) in eine sigmoidale Funktion umgewandelt. Die Konzentration, bei der eine Viabilität von 50% der Zellen vorlag, konnte anhand der Sigmoidalfunktion, ermittelt werden. Der LC₅₀-Wert einer Testsubstanz wurde in mol/l oder, falls keine molare Masse bekannt war, als prozentualer Anteil in der Probelösung, in % (m/V), angegeben. Die LC₅₀-Konzentration eignet sich gut, um die Toxizitäten unterschiedlicher Substanzen miteinander zu vergleichen. Da in einigen Fällen auch die höchste getestete

Konzentration zu keiner Einschränkung der Viabilität auf 50% führte, wurde in diesen Fällen die höchste Konzentration, bei der eine Viabilität > 80% vorlag, in mol/l bzw. % (m/V) angegeben.

4.2.9.1.2 ViaLight-Assay

Während der vierstündigen Inkubationszeit der Zellkulturtestplatte wurden die im Kit mitgelieferten Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Das ATP-Messreagenz wurde im Assay-Puffer rekonstituiert und für 15 Minuten equilibrieren gelassen. Die Zellkulturplatte wurde aus dem Inkubator genommen, 5 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend jedem well 50 µl Zellyse-reagenz zugefügt. Nach 10 Minuten Inkubation wurden jedem well 100 µl abgenommen und auf die spezielle Lumineszenzplatte, die im Kit mitgeliefert wurde, pipettiert. Diese Platte hat weiße Wände, sodass es keine Störsignaleffekte aus den benachbarten wells gibt, sowie einen transparenten Boden, was Durchlichtmessungen möglich macht. Zu den Prüflösungen wurden in jedes well 100 µl des AMR gegeben und weitere zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lumineszenz mithilfe des Luminometers bestimmt. Die gemessene Lichtintensität wird als relative Lichteinheit (RLU) angegeben. Die Werte für die Prüflösungen können, wie auch beim MTT-Assay, prozentual auf die Werte der Negativkontrolle bezogen werden, sodass man die prozentuale Viabilität erhält. Die LC50-Konzentration kann, wie in Abschnitt 4.2.9.1.1 für das MTT-Assay beschrieben, ermittelt werden.

4.3 Statistische Methoden

Es wurden unterschiedliche Methoden verwendet, um die Ergebnisse zu beschreiben. Soweit nichts anderes angegeben ist, handelt es sich bei den Ergebnissen, um den arithmetischen Mittelwert aus drei Messungen. Dieser wurde mit Formel (4.2) berechnet. Die Fehlerbalken in den Grafiken zeigen entweder die Standardabweichung nach Formel (4.3) oder den Minimal- (4.4) und Maximalwert (4.5) von der Standardabweichung an. Dabei gibt n die Anzahl der Messungen und x_i den Einzelwert an. Der Span (4.6) beschreibt die Breite einer Partikelgrößenverteilung. D steht dabei jeweils für die Durchgangssumme.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (4.2)$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (4.3)$$

$$\mathbf{max} = \mathbf{Maximalwert} - \bar{x} \quad (4.4)$$

$$\mathbf{min} = \bar{x} - \mathbf{Minimalwert} \quad (4.5)$$

$$\mathbf{Span} = \frac{(D_{90} - D_{10})}{D_{50}} \quad (4.6)$$

Zur Überprüfung, ob zwischen den Mittelwerten von zwei Stichproben signifikante Unterschiede vorlagen, wurde der ungepaarte t-Test nach Student angewendet. Dabei wurde die Nullhypothese aufgestellt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen zwei Stichproben besteht. Damit ergab sich als Alternativhypothese, dass Unterschiede vorliegen. Eine Voraussetzung für den ungepaarten zweiseitigen t-Test ist eine nicht signifikante Varianz der Ergebnisse. Diese wurde mittels F-Test, Test auf Varianzhomogenität, überprüft. wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angenommen wurde (Wätzig, 2009). Ergab der F-Test, dass sich die Varianzen der beiden Stichproben nicht signifikant unterscheiden, wurde ein homoskedastischer t-Test durchgeführt. Bei signifikanten Unterschieden der Varianzen kam der heteroskedastische t-Test

zur Anwendung. Das Ergebnis der Auswertung war das Signifikanzniveau „p“. Dieses wurde wie in Tabelle 4.1 angegeben bewertet.

Tabelle 4.1: Bewertung verschiedener Signifikanzniveaus

Signifikanzniveau	Bewertung	Symbol
p > 0,05	Kein signifikanter Unterschied	-
p > 0,01	Mehr Daten für eine zuverlässige Aussage nötig	*
p > 0,001	Signifikanter Unterschied	**
p ≤ 0,001	Hoch signifikanter Unterschied	***

Die Auswertung erfolgte mit den Statistikfunktionen von Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

5 PRAKTISCHER TEIL

5.1 Solvent Change Präzipitation

In dieser Arbeit wurde die Solvent Change Präzipitation für die Nanopartikelherstellung genutzt. Im Anschluss an die Nanopartikelherstellung wurde das Antigen an die Oberfläche der Partikel adsorbiert. Der Einfluss einzelner Faktoren auf die Partikelbildung wie auch die Ovalbuminadsorption wurde evaluiert. Dabei wurde die Partikelgröße immer als wichtiges Charakteristikum der Formulierungen, sowohl für den Uptake der Nanopartikel als auch für die pulmonale Applikation untersucht. Die Nanopartikel sollten eine Größe zwischen 200 und 400 nm und die Mikropartikel einen aerodynamischen Durchmesser zwischen 0,5 und 5 µm aufweisen.

5.1.1 Nanopartikelherstellung

Die Herstellung der Nanopartikel erfolgte in Anlehnung an die von Peek (2008) beschriebene Methode.

Tabelle 5.1: Zusammensetzung der Formulierung (Solvent Change Präzipitation)

Phase	Menge	Material
Organische Phase	2,5 ml	Aceton
	0,5 ml	Methanol
	0,05 g	PLGA
Stabilisatorlösung	0,1 % (m/V)	Polysorbat 80
	25 ml	Aqua bidest.

Tabelle 5.1 zeigt die Zusammensetzung der Formulierung. Für die organische Phase wurde PLGA, aus welchem sich die Nanopartikel ausbilden, in einer Mischung der organischen Lösungsmittel Aceton und Methanol vollständig gelöst. Die Stabilisatorlösung bestand aus in Aqua bidest. gelöstem Polysorbat 80, das als Stabilisator diente. Die wässrige Phase wurde vorgelegt und mit 400 rpm auf der Magnetrührplatte gerührt. Die organische Phase wurde mithilfe einer Tropfpipette in die Stabilisatorlösung überführt. Der Kontakt des gelösten PLGA mit der Stabilisatorlösung führte zur Präzipitation des PLGA. Dabei wurden die entstehenden Nanopartikel durch Polysorbat 80 stabilisiert und

vor einer Agglomeration geschützt. Nachdem die organische Phase vollständig überführt war, wurde der Ansatz bei Raumtemperatur mehrere Stunden auf der Magnetrührplatte gerührt, sodass das Lösungsmittel zuerst durch die umgebende Flüssigkeit extrahiert werden und anschließend aus dieser evaporieren konnte. Falls größere Partikel oder Polymerfilme enthalten waren, wurde der Ansatz vor der weiteren Verwendung filtriert (Rundfilter 595 aus Papier, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland). Im Anschluss wurde die Partikelgrößenverteilung der Nanopartikeldispersion mittels dynamischer Lichtstreuung (Zetasizer) bestimmt.

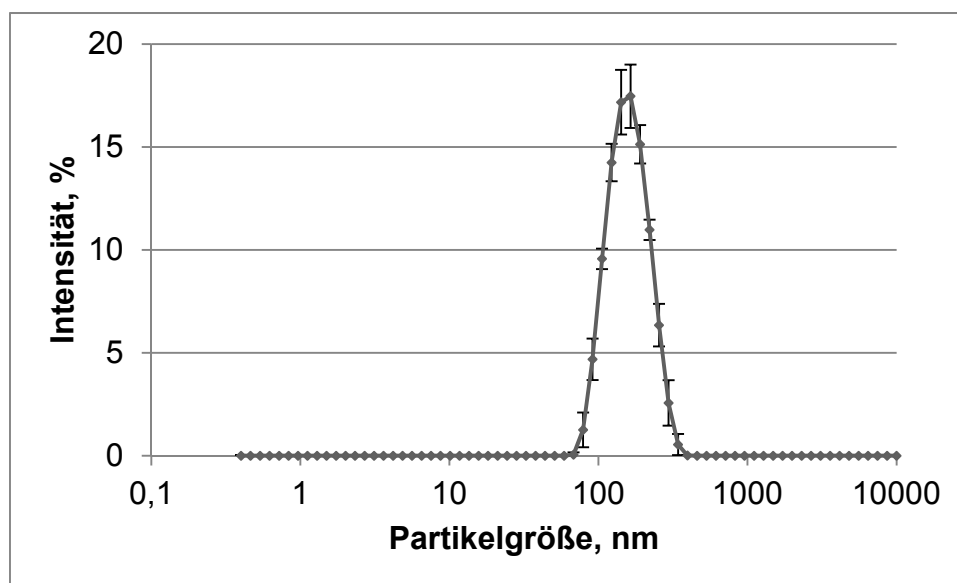


Abbildung 5.1: Partikelgrößenverteilung der Nanopartikeldispersion (Solvent Change Präzipitation, Zetasizer, n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Abbildung 5.1 zeigt ein Zetasizer-Ergebnis der Formulierung entsprechend Tabelle 5.1. Die Partikel wiesen eine Größe von $149 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ und einen PDI von $0,07 \pm 0,02$ auf.

Zusätzlich wurde mithilfe des Küvetten-Moduls des HELOS überprüft, ob größere Partikel im Ansatz enthalten waren. In Abbildung 5.2 ist dargestellt, dass dies nicht der Fall ist.

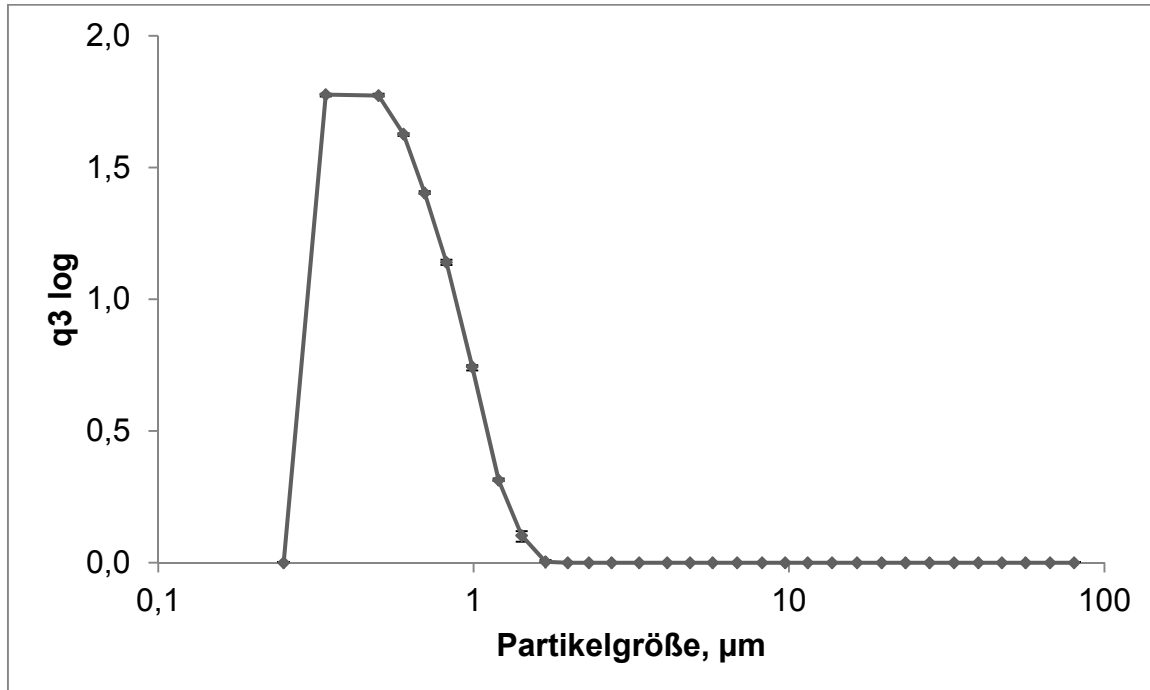


Abbildung 5.2: Ergebnis der Untersuchung der Formulierung auf größere Partikel (HELOS Küvetten-Modul, n=3, Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

5.1.2 Einflussfaktoren auf die Partikelbildung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Herstellung von engverteilten Nanopartikeln mit der Solvent Change Präzipitation möglich ist, wurde systematisch der Einfluss der unterschiedlichen Faktoren auf die Partikelbildung untersucht. Dabei wurde die in Tabelle 5.1 aufgeführte Formulierung als Standardformulierung definiert. Der Zetasizer wurde genutzt, um die Partikelgröße und -verteilung nach der Herstellung zu charakterisieren.

5.1.2.1 Stabilisatorart/-konzentration

Um den Effekt der Stabilisatorart sowie -konzentration auf die Nanopartikel zu ermitteln, wurden bei der Partikelherstellung die vier Stabilisatoren HPMC (Metolose 60SH 50), Poloxamer 188, Polysorbat 80 sowie PVA (Mowiol 4-88) in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Die in Tabelle 5.2 angegebene Konzentration bezieht sich immer auf die Masse des Stabilisators bezogen auf das Volumen der Stabilisatorlösung.

Die Herstellung der Partikel erfolgte immer gleich: PLGA wurde in den organischen Lösungsmitteln gelöst. Der Stabilisator wurde in der angegebenen Konzentration in Aqua bidest. gelöst. Diese erhaltene wässrige Stabilisatorlösung wurde vorgelegt und mit dem Magnetrührer gerührt. Die organische PLGA-Lösung wurde dieser tropfenweise mithilfe einer Pipette zugefügt. Nach Evaporation des Lösungsmittels wurde eine Probe der erhaltenen Nanopartikeldispersion mit Aqua bidest. verdünnt und mit dem Zetasizer vermessen. Die durchschnittliche Partikelgröße sowie die Partikelgrößenverteilung (PDI) wurden ermittelt.

Tabelle 5.2: Einfluss der Stabilisatorkonzentration auf Partikelgröße und PDI (Zetasizer, n=9 für HPMC, Poloxamer 188 und Polysorbat 80, n=3 für PVA, ± zeigt die Standardabweichung)

Stabilisator	Konzentration (m/V), %	Partikelgröße, nm	PDI
HPMC	0,01	171 ± 1,7	0,07 ± 0,01
	0,05	199 ± 2,9	0,08 ± 0,02
	0,10	208 ± 2,8	0,10 ± 0,02
	0,50	267 ± 15,8	0,10 ± 0,02
Poloxamer 188	0,01	206 ± 6,8	0,20 ± 0,02
	0,05	162 ± 10,0	0,10 ± 0,02
	0,10	153 ± 1,2	0,09 ± 0,02
	0,50	151 ± 2,6	0,08 ± 0,02
Polysorbat 80	0,01	172 ± 16,0	0,18 ± 0,05
	0,05	152 ± 5,8	0,06 ± 0,02
	0,10	150 ± 1,6	0,08 ± 0,02
	0,50	147 ± 1,2	0,08 ± 0,01
PVA	0,10	144 ± 0,3	0,04 ± 0,01
	0,50	165 ± 2,7	0,05 ± 0,03

Zusätzlich zu den in Tabelle 5.2 aufgeführten Daten, wurden die Ergebnisse der Untersuchung für eine bessere Übersicht in Abbildung 5.3 und Abbildung 5.4 grafisch dargestellt.

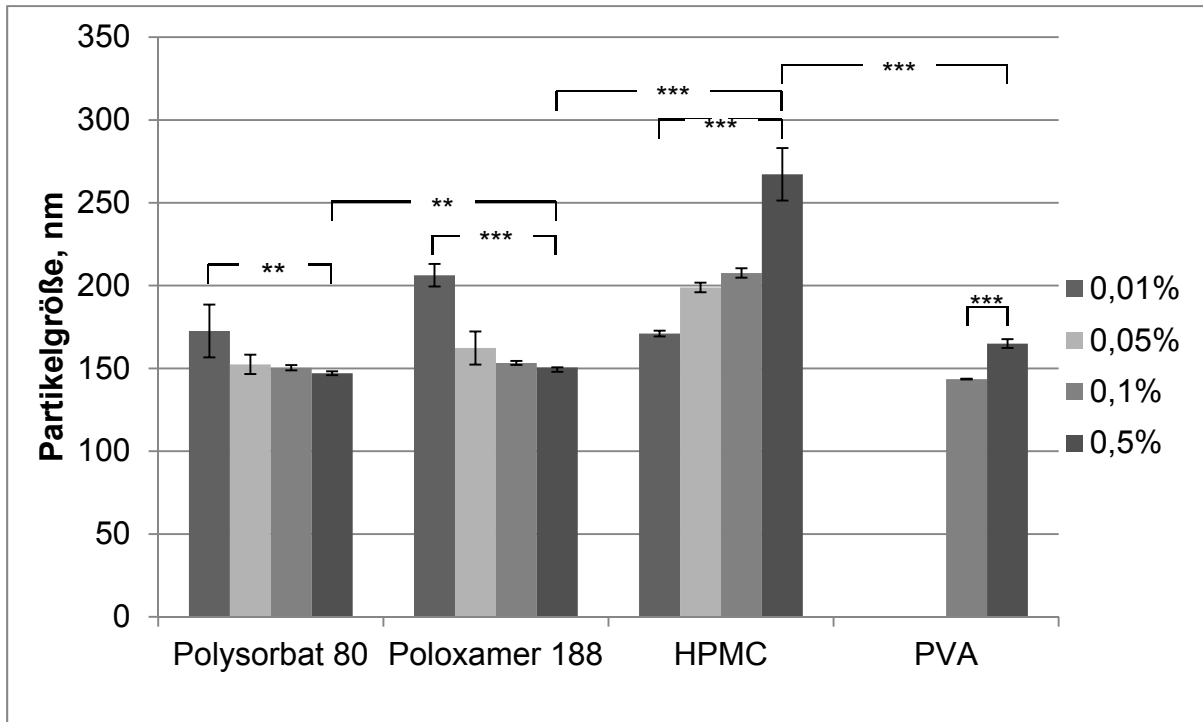


Abbildung 5.3: Einfluss der Stabilisatorart und -konzentration auf die Partikelgröße (Zetasizer, n=9 für HPMC, Poloxamer 188 und Polysorbat 80, n=3 für PVA, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Wie aus den Daten in Tabelle 5.2 und Abbildung 5.3 erkennbar ist, besteht eine Abhängigkeit zwischen eingesetzter Stabilisatorkonzentration und Partikelgröße. Für alle getesteten Stabilisatoren lässt sich eine signifikant unterschiedliche Partikelgröße zwischen der niedrigsten und der höchsten eingesetzten Stabilisatorkonzentration feststellen. Allerdings lässt sich aus den Daten nicht grundsätzlich ableiten, dass eine höhere Stabilisatorkonzentration zu kleineren Partikeln führt. Dieses könnte man annehmen, da eine höhere Stabilisatorkonzentration die Partikel in der Theorie besser stabilisieren kann. Das Beispiel HPMC zeigt, dass eine Erhöhung der Konzentration zu hoch signifikant größeren Partikeln (als *** in Abbildung 5.3 dargestellt) führt. Das lässt sich damit erklären, dass HPMC ein Makromolekül ist, das sich um die Partikel herum lagert. Diese Adsorption des HPMC an der Partikeloberfläche führt durch diese zusätzliche Schichtdicke zu einer Erhöhung des Partikeldurchmessers und somit der Größe. Der Vergleich der unterschiedlichen Stabilisatoren, von denen jeweils 0,5% (m/V) eingesetzt wurden, ergab signifikante Unterschiede in der Partikelgröße.

Während die Erhöhung der Poloxamerkonzentration von 0,1 auf 0,5% (m/V) keinen signifikanten Unterschied der Partikelgröße zeigte, wurde durch Erhöhung der Polysorbat 80-Konzentration von 0,1 auf 0,5% (m/V) eine kleine, aber signifikante, Verminderung der Partikelgröße festgestellt.

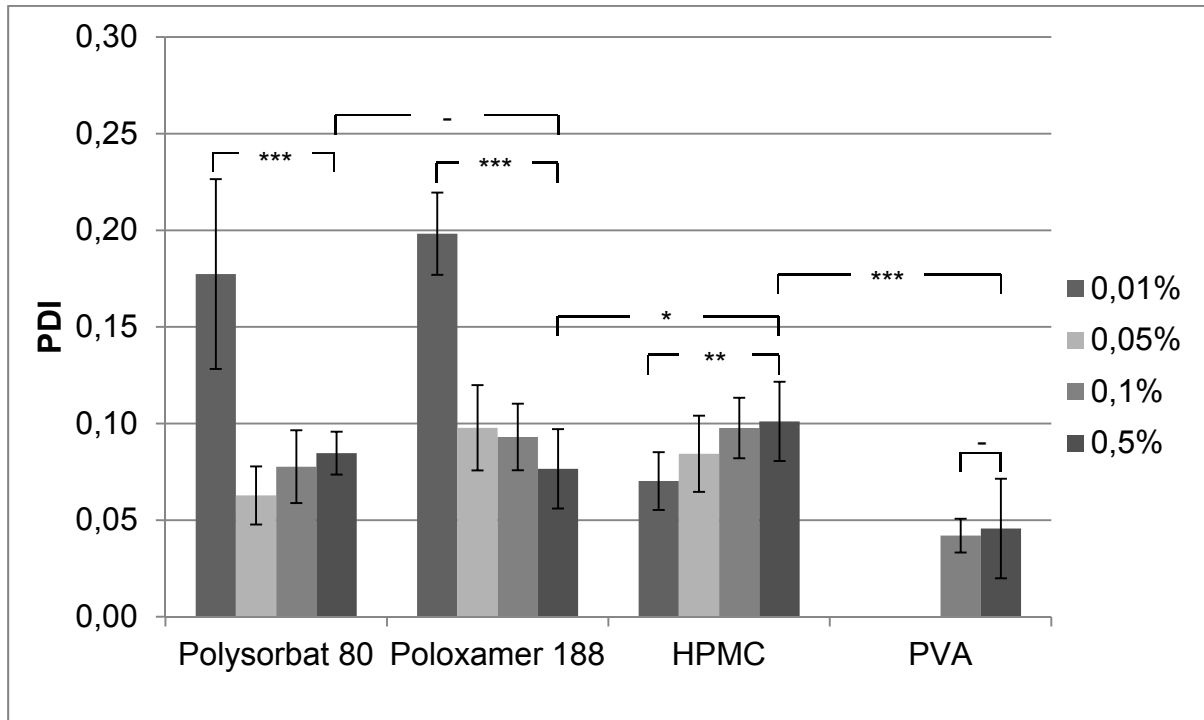


Abbildung 5.4: Einfluss der Stabilisatorart und -konzentration auf den PDI (Zetasizer, n=9 für HPMC, Poloxamer 188 und Polysorbat 80, n=3 für PVA, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Aus den Daten in Tabelle 5.2 und Abbildung 5.4 lässt sich ein signifikanter Unterschied des PDI zwischen der niedrigsten und der höchsten eingesetzten Konzentration erkennen. PVA stellt dabei eine Ausnahme dar, wobei in diesem Fall die Ergebnisse von 0,1 und 0,5% (m/V) miteinander verglichen wurden. Die Ergebnisse für Polysorbat 80 und Poloxamer 188 zeigen sehr deutlich, dass der Zusatz von 0,01% (m/V) für diese beiden Stabilisatoren nicht ausreichend ist, um die Partikel genügend zu stabilisieren. Ein Indiz dafür ist der relativ hohe PDI von ca. 0,2.

Der Vergleich zwischen 0,01 und 0,05% (m/V) Polysorbat 80 zeigt eine hoch signifikante Verringerung des PDI auf. Durch die relativ geringe Erhöhung der Konzentration gelang es, sehr eng verteilte Partikel herzustellen.

PVA zeichnet sich durch gute Stabilisierungseigenschaften aus, der PDI liegt mit 0,04 bei einer Konzentration von 0,1% (m/V) in einem sehr guten Bereich.

Letztlich zeigt der Vergleich der vier verschiedenen Stabilisatoren, dass die Partikel mit HPMC signifikant größer werden und Polysorbat 80 und PVA sehr eng verteilte Partikel erzeugen. Zudem lassen sich mit allen vier getesteten Stabilisatoren reproduzierbar Partikel im Nanometerbereich mit einer engen Partikelgrößenverteilung ($PDI < 0,1$) herstellen. Für die weiteren Arbeiten wurde HPMC ausgewählt, da mit diesem Stabilisator Partikelgrößen im gewünschten Bereich zwischen 200 und 400 nm erzielt wurden.

5.1.2.2 Lösungsmittelart/-menge

Dieser Abschnitt umfasst die Analyse des Einflusses des Lösungsmittels. Neben der Mischung aus Aceton und Methanol wurden ebenfalls Ethylacetat, Dichlormethan und Acetonitril getestet. Die reinen Lösungsmittel Aceton sowie Methanol wurden nicht verwendet, da sich das PLGA darin nicht vollständig löste. In jedem dieser organischen Lösungsmittel lässt sich das PLGA in einer Konzentration von 1,7% (m/V) lösen. In der Theorie besitzt Dichlormethan mit ca. 40°C einen relativ niedrigen Siedepunkt und einen recht hohen Dampfdruck von etwa 470 hPa, wodurch es rein von den physikalischen Eigenschaften her das geeignetste Lösungsmittel ist. Ein hoher Dampfdruck, sowie geringe Siedetemperatur führen zu einer schnellen Evaporation des Lösungsmittels, was für den in dieser Arbeit wichtigen Evaporationsschritt vorteilhaft ist. In der praktischen Anwendung zeichneten sich hingegen Ethylacetat und Aceton/Methanol aufgrund ihrer geringeren Toxizität aus.

Als Stabilisatorlösung wurden 0,1% (m/V) Polysorbat 80 in Aqua bidest. gelöst. Die wässrige Stabilisatorlösung wurde vorgelegt und mit dem Magnetrührer mit 400 rpm gerührt. Die organische PLGA-Lösung wurde der Stabilisatorlösung tropfenweise zugefügt. Auch hier wurde die Probe nach vollständiger Lösungsmittelvevaporation verdünnt und mit dem Zetasizer Partikelgröße und -verteilung bestimmt.

Dichlormethan und Ethylacetat stellten sich beide in diesem Zusammenhang als ungeeignete Lösungsmittel heraus. Es entstanden keine Partikel im Nanometerbereich, was sich mit der Hydrophobizität der beiden Lösungsmittel erklären lässt. Für Ethylacetat wurde in einem weiteren Ansatz die Konzentration an Polysorbat 80 in der Stabilisatorlösung auf 0,5% (m/V) erhöht. Allerdings ließen sich auch damit keine monomodalen Nanopartikel herstellen.

Mit Acetonitril ist die Herstellung von Nanopartikeln gelungen. Wie Abbildung 5.5 zeigt, wiesen diese eine Partikelgröße von 155 nm auf und waren mit einem PDI von 0,07 sehr eng verteilt. Damit unterschieden sich die Ergebnisse nicht signifikant von der Standardformulierung.

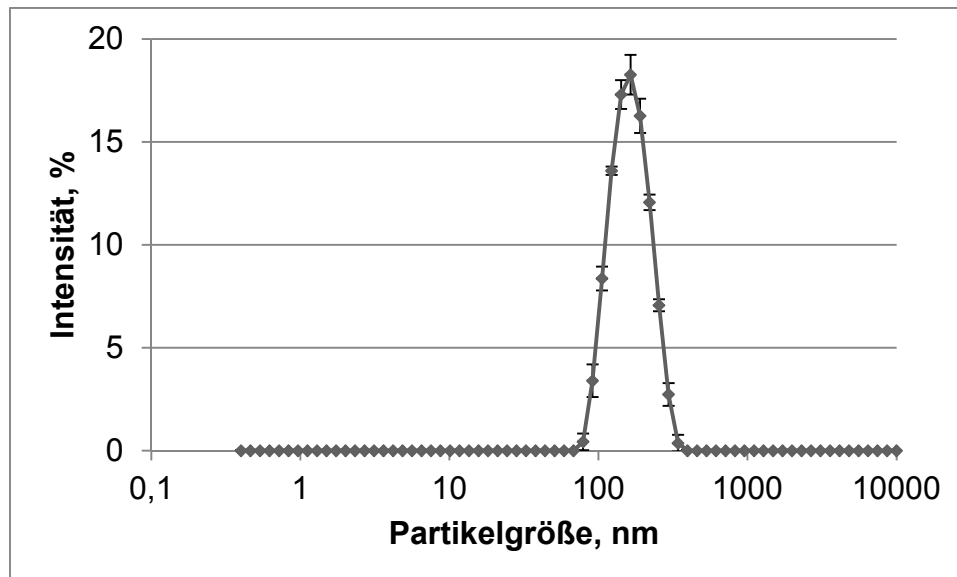


Abbildung 5.5: Partikelgrößenverteilung der Formulierung mit Acetonitril (Zetasizer, n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Ein vermutlicher Grund für die Eignung von sowohl Acetonitril wie auch der Mischung von Aceton und Methanol ist, dass sich diese, im Gegensatz zu Ethylacetat und Dichlormethan, uneingeschränkt mit Wasser mischen lassen.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss der Verdopplung der organischen Lösungsmittelmenge untersucht. Dies wurde beispielhaft mit der Mischung Aceton/Methanol durchgeführt. Dabei wurden 50 mg PLGA sowohl in einem Lösungsmittelvolumen von 3 als auch von 6 ml Aceton/Methanol gelöst und für die Nanopartikelherstellung verwendet. Tabelle 5.3 zeigt die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung in Abhängigkeit vom Lösungsmittelvolumen.

Tabelle 5.3: Einfluss des Lösungsmittelvolumens auf Partikelgröße und PDI (Zetasizer, n=3)

Acetonvolumen	Methanolvolumen	Partikelgröße, nm	PDI
2,5 ml	0,5 ml	150 ± 1,6	0,08 ± 0,02
5,0 ml	1,0 ml	113 ± 0,5	0,05 ± 0,02

Die Auswertung der Ergebnisse mithilfe des Student t-Tests ergab signifikante Unterschiede in der Partikelgröße. Die Unterschiede der PDI-Werte sind

hingegen nicht signifikant. Es ergeben sich mit doppeltem Lösungsmittelvolumen und der damit halbierten PLGA-Konzentration kleinere Partikel. Der Grund ist, dass damit in einem Tropfen der organischen Phase weniger PLGA gelöst ist und somit weniger PLGA für die Nanopartikelbildung zur Verfügung steht.

5.1.2.3 PLGA-Menge

Der Einfluss der PLGA-Menge auf die Nanopartikelgröße wurde ermittelt, indem drei verschiedene PLGA-Mengen (20, 50 und 70 mg) in dem Ansatz aus 2,5 ml Aceton und 0,5 ml Methanol gelöst wurden. Die Herstellung der Nanopartikel erfolgte wie unter 5.1.2.2 beschrieben.

Tabelle 5.4: Einfluss der PLGA-Menge auf Partikelgröße und PDI (Zetasizer, n=3)

PLGA-Menge	Partikelgröße, nm	PDI
20 mg	103 ± 0,5	0,07 ± 0,03
50 mg	150 ± 1,6	0,08 ± 0,02
70 mg	157 ± 1,4	0,07 ± 0,03

Der Vergleich der Ergebnisse in Tabelle 5.4 ergab signifikante Unterschiede bei der Partikelgröße. Dabei wurde, wie bereits zuvor bei Variation des Lösungsmittelvolumens, festgestellt, dass eine geringere PLGA-Konzentration zu kleineren Partikeln führt. Die zugesetzte PLGA-Menge hat hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung.

5.1.2.4 Volumen der Stabilisatorlösung

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob eine Volumenänderung der Stabilisatorlösung einen Einfluss auf Partikelgröße und -verteilung hat. Die Herstellung der Partikel erfolgte ebenfalls wie in 5.1.2.2 beschrieben. Die Konzentration des zugesetzten Polysorbat 80 betrug immer 0,1% (m/V) bezogen auf die Wasserphase.

Tabelle 5.5: Einfluss des Volumens der Stabilisatorlösung auf Partikelgröße und PDI (Zetasizer, n=3)

Volumen der Stabilisatorlösung	Partikelgröße, nm	PDI
10 ml	143 ± 1,0	0,05 ± 0,01
25 ml	150 ± 1,6	0,08 ± 0,02
50 ml	143 ± 1,1	0,07 ± 0,02

Die Auswertung der Ergebnisse in Tabelle 5.5 mit dem Student t-Test ergab keinen signifikanten Unterschied der Breite der Partikelgrößenverteilung. Die Partikelgröße des Ansatzes mit 25 ml Stabilisatorlösung unterschied sich jedoch signifikant von den anderen beiden Ansätzen. Zwischen 10 und 50 ml konnte hingegen keine signifikant unterschiedliche Partikelgröße festgestellt werden. Dennoch besitzen die Partikel, absolut gesehen, eine sehr ähnliche Partikelgröße, sodass von keinem entscheidenden Einfluss der Stabilisatorlösung auf Größe und Verteilungsbreite ausgegangen wird.

5.1.2.5 Ansatzvolumen

Hier wurde das Gesamtansatzvolumen verdoppelt, um zu untersuchen, ob dies einen Einfluss auf die Partikel hat. Die Zetasizer-Messung ergab Partikel mit einer Größe von 150 nm und einem PDI von 0,06. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Verdopplung ohne signifikante Auswirkungen auf die Partikelgröße und -verteilung möglich ist, so lassen sich innerhalb der gleichen Zeit größere Partikelmengen herstellen. Damit ist ein up-scaling möglich, was für eine spätere industrielle Umsetzbarkeit notwendig ist.

5.1.2.6 Veränderung des Dispergiersystems

Anstelle des bisher verwendeten Magnetrührers wurde untersucht, ob sich durch den Einsatz eines Ultra-Turrax kleinere Partikel mit einer engeren Verteilung herstellen lassen. Dafür wurde die Zusammensetzung der Standardformulierung (Tabelle 5.1) genutzt. Die Stabilisatorlösung wurde vorgelegt und mit 9.500 rpm dispergiert. Die organische Phase wurde tropfenweise hinzugegeben. Nach vollständiger Überführung der organischen Phase, wurde die Geschwindigkeit des Ultra-Turrax auf 14.000 rpm erhöht und der Ansatz 10 Minuten lang dispergiert. Anschließend wurde der Ultra-Turrax entfernt und durch einen Magnetrührer ersetzt, der den Ansatz bis zur Lösungsmittelveaporation mit 400 rpm rührte.

Das Ergebnis der Zetasizer-Vermessung war eine signifikant, aber absolut gesehen nur geringfügig, kleinere Partikelgröße von etwa 140 nm. Der PDI war mit 0,08 nicht signifikant anders als bei Verwendung des Magnetrührers. Da die mit dem Ultra-Turrax hergestellten Partikel nicht deutlich besser waren als nach Herstellung mit dem Magnetrührer, dafür aber etwas zeit- und energie-

aufwendiger, wurden die weiteren Ansätze mithilfe des Magnetrührers hergestellt.

5.1.2.7 Fazit

Durch Variation der Formulierungsbestandteile und von Herstellungsparametern wurden Erkenntnisse über die beeinflussenden Faktoren gewonnen. Es wurde ermittelt, dass sich alle vier getesteten Stabilisatoren grundsätzlich für die Nanopartikelherstellung eignen. Jedoch unterschieden sich die erhaltenen Partikelgrößen und -verteilungen zum Teil stark voneinander. Für das Ziel, Partikel mit einer Größe zwischen 200 und 400 nm herzustellen, ist der Zusatz von 0,5% (m/V) HPMC am geeignetsten, da damit Partikel von ca. 270 nm entstanden, während der PDI in einem akzeptablen Bereich lag. Mit allen anderen Stabilisatorkonzentrationen, sowie -arten, entstanden kleinere Partikel, die außerhalb des Zielbereiches von 200 bis 400 nm lagen. Die Verwendung von Ethylacetat oder Dichlormethan als Lösungsmittel für das Polymer war ungeeignet und auch Acetonitril zeigte gegenüber der Mischung Aceton/Methanol keinen Vorteil. Daher wurde weiterhin die Mischung Aceton/Methanol zum Lösen des PLGA eingesetzt. Für die Konzentration der PLGA-Lösung wurde ein Einfluss auf die entstehende Partikelgröße bestimmt, wobei eine niedrigere Konzentration im Vergleich zur Standardformulierung einen stärkeren Effekt hatte als eine höhere Konzentration. Da die höhere Konzentration zu unwesentlich größeren Partikeln führte, wurde die PLGA-Konzentration der Standardformulierung beibehalten.

Ein weiteres Ergebnis war, dass eine Möglichkeit zur Herstellung größerer Nanopartikelmengen besteht, indem das Gesamtansatzvolumen verdoppelt wird. Da für die nächsten Untersuchungen keine größeren Nanopartikelmengen notwendig waren, wurde das Gesamtansatzvolumen der Standardformulierung beibehalten. Dieses Ergebnis könnte aber für scale-up-Schritte, beispielsweise für die industrielle Verwendung, interessant sein.

Die sonstigen untersuchten Einflussfaktoren hatten keine entscheidenden Auswirkungen beziehungsweise Vorteile gegenüber der Standardformulierung, daher wurden diese Faktoren nicht geändert.

Aufgrund dieser Untersuchungen ergibt sich die in Tabelle 5.6 dargestellte optimierte Formulierung.

Tabelle 5.6: Optimierte Zusammensetzung der Formulierung (Solvent Change Präzipitation)

Phase	Menge	Material
Organische Phase	2,5 ml	Aceton
	0,5 ml	Methanol
	0,05 g	PLGA
Stabilisatorlösung	0,5 % (m/V)	HPMC
	25 ml	Aqua bidest.

5.1.3 Ovalbuminadsorption

Bei der Solvent Change Präzipitation besteht nicht die Möglichkeit, das Antigen bereits während der Partikelherstellung einzubringen, da es nicht in der organischen Phase löslich ist. Daher wird es an die Partikeloberfläche adsorbiert. Diese Adsorption könnte dadurch erfolgen, dass man das Antigen direkt in der Stabilisatorlösung löst, sodass es während der Präzipitation an die Partikeloberfläche adsorbiert. Jedoch bestünde bei dieser Vorgehensweise ein längerer Kontakt zum organischen Lösungsmittel, bis dieses aus dem Ansatz evaporiert ist. Aus dem Grund wurde in dieser Arbeit das Ovalbumin erst im Anschluss an die Partikelherstellung und nach Lösungsmittelveaporation an die Partikeloberfläche adsorbiert. Das hat den Vorteil, dass das Antigen nicht in Kontakt mit den organischen Lösungsmitteln kommt. Daher stellt dieses Verfahren eine sehr schonende Möglichkeit der Antigenbeladung dar.

Ziel dieser Versuche war die Evaluation, welche Faktoren die Ovalbuminadsorption beeinflussen. Dazu wurden Formulierungen mit den drei Stabilisatoren PVA, HPMC und Polysorbat 80 untersucht, sowie Dauer und Temperatur der Adsorption variiert. Die Durchführung der Adsorption wurde an die von Peek (2008) beschriebene Methode angelehnt. Dazu wurde vor der Adsorption eine Ovalbumin-Stammlösung hergestellt, indem Ovalbumin in einer Konzentration von 2 mg/ml in Phosphat-Pufferlösung (PBS) mit pH 7,4 gelöst wurde. Diese Konzentration wurde aus einer Publikation von Fifis (2004) übernommen.

Nach der Nanopartikelherstellung wurden für die Adsorptionsversuche jeweils 1 ml der Nanopartikeldispersion abgenommen, in ein Eppendorf-Tube überführt und mit 0,5 ml Ovalbumin-Stammlösung versetzt. Die Eppendorf-Tubes wurden in der Schüttelapparatur auf Stufe 3 bewegt. Zu definierten Zeiten wurden Proben entnommen, die Partikel 30 Minuten bei 14.000 rpm abzentrifugiert und das freie Ovalbumin im Überstand bestimmt. Die Ovalbuminbestimmung wurde mithilfe des UV-Meters (Lambda 40, PerkinElmer, Norwalk, CT, USA) durchgeführt. Dafür wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt. Vor jeder Ovalbuminbestimmung wurde eine Ovalbuminkalibrierung durchgeführt, auf die die Ergebnisse bezogen wurden. Bei jeder Untersuchung wurde eine Blank-Probe mitgeführt, bei der 1 ml der jeweiligen Nanopartikeldispersion mit reiner PBS-Lösung mit pH 7,4, anstelle der Ovalbuminlösung, versetzt wurde. Der Absorptionswert der Blankproben wurde von den Werten der Proben mit Ovalbumin abgezogen. Auf diese Weise konnten mögliche Störungen durch z.B. die Stabilisatoren ausgeschlossen werden. Die Untersuchung wurde mit Nanopartikeln, die mit unterschiedlichen Stabilisatoren hergestellt wurden, über verschiedene Zeiträume, sowie bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, um den Einfluss der einzelnen Faktoren zu evaluieren.

Tabelle 5.7 zeigt die Ergebnisse der Versuche zur Ovalbuminadsorption, wobei die Ansätze hinsichtlich ihrer Ovalbumin-Beladungsrate und -Beladungseffizienz verglichen werden. Bei den untersuchten Formulierungen handelt es sich um die Standardformulierung, sowie zwei Variationen des verwendeten Stabilisators. Die Adsorptionszeit wurde zwischen 2 und 6 Stunden variiert, der Temperatureinfluss wurde bei 4°C, 20°C und 37°C evaluiert. Die Erwartung war, dass mit einer zunehmenden Adsorptionszeit ebenfalls die adsorbierte Ovalbuminmenge zunimmt und keine Temperaturabhängigkeit vorliegt.

Die Standardformulierung zeigt, dass nach zwei Stunden bei 4°C bereits mehr Ovalbumin als nach vier Stunden bei 20°C adsorbiert wurde. Diese Ergebnisse sind mit denen der Formulierung mit 0,4% PVA und 0,2% HPMC als Stabilisator vergleichbar. Die Ergebnisse für die Formulierung mit PVA verdeutlichen zudem, dass die Beladungsrate bei einer längeren Adsorptionszeit abnimmt. Allerdings müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob es sich dabei um einen reproduzier-

baren Effekt handelt. Die Partikel, die mit HPMC hergestellt wurden, wiesen mit 2,4% die höchste Beladungsrate bei 37°C auf.

Tabelle 5.7: Ergebnisse der Ovalbuminadsorption

Stabilisator	Adsorptions-Zeit, h	Temperatur, °C	Beladungs-rate, %	Beladungs-effizienz,%
0,1% (m/V) Polysorbat 80	2	4	1,9	6,4
	2	20	1,5	5,0
	3	20	1,9	6,3
	4	20	1,9	6,3
0,4% (m/V) PVA	2	4	1,3	4,0
	4	4	1,4	4,2
	6	4	1,0	3,1
	2	20	1,2	3,6
	4	20	1,1	3,4
	6	20	0,7	2,3
0,2% (m/V) HPMC	3	4	1,8	6,4
	4	4	2,0	6,8
	3	20	1,6	5,6
	4	20	1,6	5,7
	3	37	2,3	8,0
	4	37	2,4	8,4

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass sowohl Stabilisator, Temperatur als auch die Zeit einen Einfluss auf Beladungsrate und Beladungs-effizienz haben. Aus den hier ermittelten Ergebnissen ergibt sich, dass die Adsorption über 4 Stunden bei 37°C durchgeführt werden sollte, um eine maximale Beladungsrate und -effizienz zu erzielen. Daher erfolgte bei den HPMC-Formulierungen, die später für die immunologischen Untersuchungen verwendet wurden, die Ovalbuminadsorption mit diesen Parametern. Eine Möglichkeit die Beladungsrate zu erhöhen, wäre die Verwendung einer höher konzentrierten Ovalbuminlösung.

Weiterhin wurde überprüft, ob die Ovalbuminadsorption die Partikelgrößenverteilung verändert.

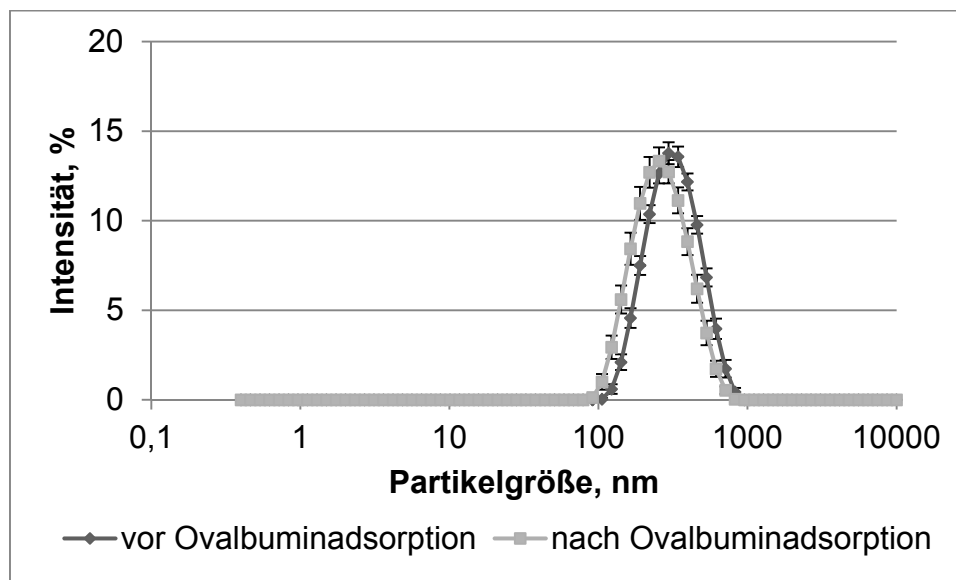


Abbildung 5.6: Partikelgrößenverteilung vor und nach Ovalbuminadsorption (Solvent Change Präzipitation, Zetasizer, n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Abbildung 5.6 zeigt, dass die Partikel nach Ovalbuminadsorption etwas kleiner werden. Eine Begründung ist, dass sich noch freies Ovalbumin im Ansatz befindet, das bei der Bestimmung mit dem Zetasizer ebenfalls erfasst wurde. Die somit zusätzlich ermittelten kleinen Partikelgrößen wurden ebenfalls in die Berechnung der mittleren Partikelgröße einbezogen, sodass das Endergebnis eine im Mittel leicht kleinere Partikelgröße aufzeigt. Da kleinere Partikelgrößen bei der dynamischen Lichtstreuung nicht so stark gewichtet werden wie große, resultierte nur eine geringfügige Reduzierung der Partikelgröße. Diese Begründung wird auch von einer tendenziell etwas breiteren Verteilung untermauert. Der PDI betrug vor der Adsorption 0,17 und danach 0,19.

5.1.4 Sprühtrocknung

Ein weiterer Formulierungsschritt umfasst die Sprühtrocknung. Mithilfe dieser soll die wässrige Nanopartikelformulierung in ein trockenes Produkt überführt werden, in dem das Antigen stabilisiert vorliegt und trocken in die Lunge appliziert werden kann. Die Temperatur, die auf das Produkt einwirkt, darf dabei nicht zu hoch sein, da PLGA, das einen Glasübergangsbereich zwischen 44 und 48°C hat, ansonsten ausfilmt als auch das verwendete Antigen, das eine

Denaturierungstemperatur von 78°C besitzt, durch zu hohe Temperaturen zerstört würde.

In einem Vorversuch wurden Ansätze mit unterschiedlichen Stabilisatoren gesprührocknet. Es wurden eine Einlasstemperatur von 60°C und eine Auslasstemperatur von 40°C gewählt. Die Formulierungen mit Polysorbat 80 und Poloxamer 188 erwiesen sich als ungeeignet. Polysorbat 80, das bei Raumtemperatur flüssig vorliegt, führte bei der Sprühtrocknung zu einem klebrigen Produkt. Poloxamer 188 bildete einen Film im Zyklon aus, sodass nur sehr wenig Produkt im Produktgefäß aufgefangen werden konnte. Die Formulierung mit HPMC wies hingegen sehr gute Sprühtrocknungseigenschaften auf. Es wurde relativ viel trockenes Produkt gewonnen, die Ausbeute lag bei ca. 40%.

Für die weiteren Versuche wurde die Einlasstemperatur von 60 auf 100°C angehoben und die Pumprate heraufgesetzt, um die Geschwindigkeit des Sprühtrocknungsprozesses zu erhöhen. Damit liegt die Einlasstemperatur zwar über dem Glasübergangsbereich von PLGA, aber die Evaporation von Wasser führt zu Verdunstungskälte, die die Partikel abkühlt, sodass auf das trockene Produkt maximal die Auslasstemperatur von etwa 40°C einwirkt.

Diese Optimierung bewirkte, dass die Sprühtrocknung erheblich schneller erfolgen konnte.

5.1.5 Optimierung des Herstellungsverfahrens

In den vorangegangenen Versuchen hat sich HPMC als der geeignetste Stabilisator herausgestellt. Durch den Zusatz von 0,5% (m/V) HPMC lassen sich Partikel mit einer Größe im gewünschten Bereich zwischen 200 und 400 nm herstellen. HPMC besitzt gute Sprühtrocknungseigenschaften, da es als trockenes Pulver anfällt. Daher kann es als „bulking agent“ eingesetzt werden.

Im Abschnitt 5.1.2.1 zeigten die Ergebnisse, dass die Partikelgröße durch die HPMC-Konzentration beeinflussbar ist. Allerdings nimmt mit zunehmender HPMC-Konzentration die Viskosität der Lösung zu, was die Verarbeitbarkeit erschwerte. Die Formulierung mit 0,5% (m/V) HPMC wies eine Viskosität von 2,6 mPa*s bei 21°C auf, wodurch der Magnetrührer den Ansatz nicht mehr effektiv durchmischen kann. Da dies aber für die gleichmäßige Präzipitation der PLGA-Partikel wichtig ist, wurde die Herstellung dieser Partikel wie folgt

angepasst: Die Stabilisatorlösung wurde vorgelegt und mit dem Ultra-Turrax mit 9.500 rpm dispergiert. Die organische Phase wurde tropfenweise zugegeben und anschließend wurde mit 13.500 rpm für drei Minuten dispergiert. Danach erfolgte die Lösungsmittelverdunstung wie zuvor mittels Magnetrührer. Abbildung 5.7 illustriert die Partikelgrößenverteilung einer derart hergestellten Formulierung.

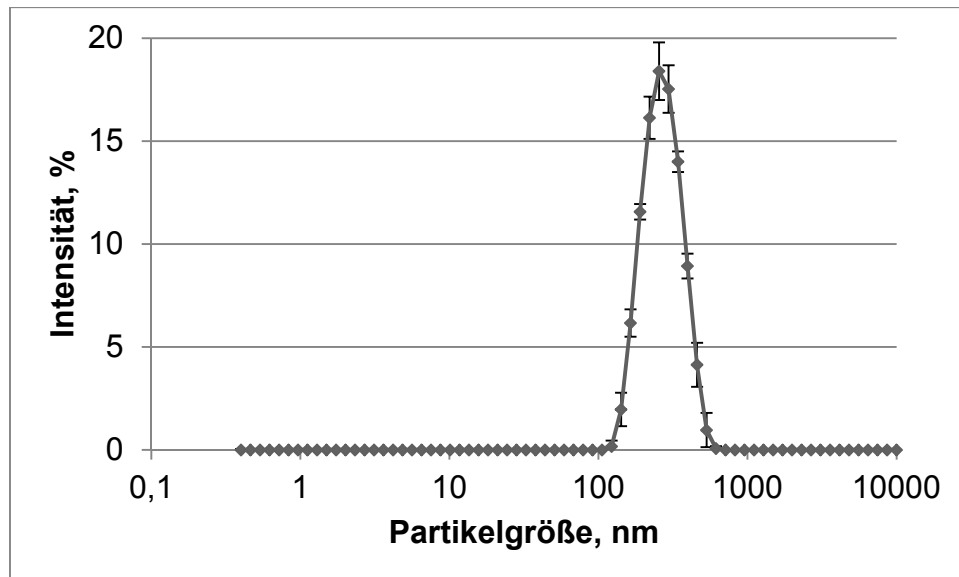


Abbildung 5.7: Partikelgrößenverteilung nach Optimierung des Herstellungsverfahrens (Zetasizer, n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Die mit dem Ultra-Turrax erzeugten Partikel sind mit durchschnittlich $250 \text{ nm} \pm 7 \text{ nm}$ kleiner als bei ausschließlicher Verwendung des Magnetrührers (270 nm) und zeigen mit einem PDI von $0,11 \pm 0,02$ eine enge Partikelgrößenverteilung.

5.1.6 Partikelgrößenbestimmung des sprühgetrockneten Produkts

Die Partikelgröße wird als wichtiges Qualitätsmerkmal der sprühgetrockneten Formulierung betrachtet. Da sich die Formulierung mit 0,5% (m/V) HPMC aufgrund der Sprühtrocknungseigenschaften und der entstehenden Partikelgröße als besonders geeignet herausstellte, wurde die Partikelgrößenbestimmung mit dieser durchgeführt. Dabei wurden die Nanopartikel mit der dynamischen Lichtstreuung und das sprühgetrocknete Pulver mit der Laserdiffraktometrie charakterisiert.

5.1.6.1 Redispergierbarkeit

Die optimierte Rezeptur mit 0,5% (m/V) HPMC wurde nach der Sprühtrocknung weitergehend charakterisiert. Für die Untersuchung der Redispergierbarkeit des sprühgetrockneten Pulvers wurde die getrocknete Formulierung mit Aqua bidest. versetzt und die Nanopartikel durch Vortexen redispergiert. Die erhaltene Dispersion wurde mit der dynamischen Lichtstreuung auf Partikelgröße und -verteilung untersucht und mit den Ergebnissen vor der Sprühtrocknung verglichen.

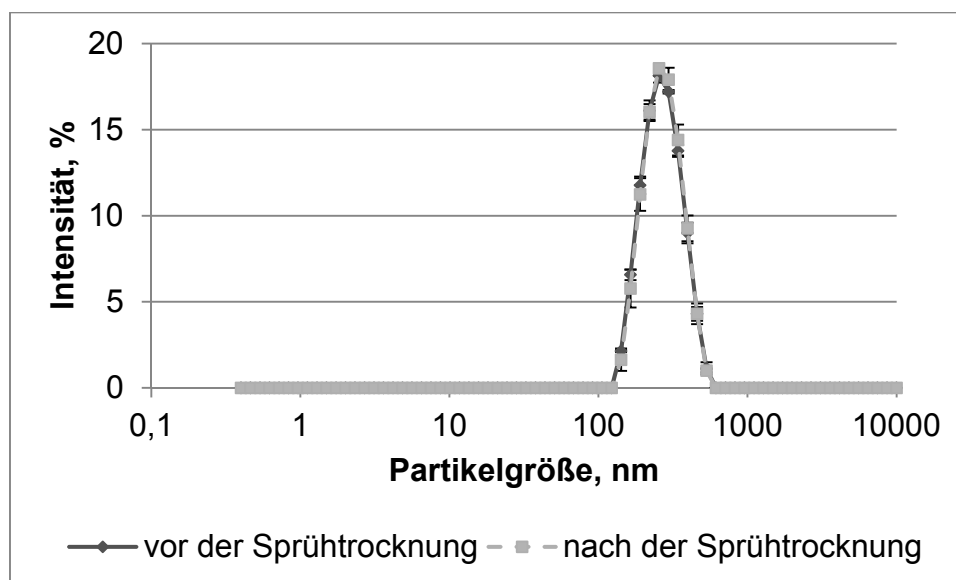


Abbildung 5.8: Partikelgrößenverteilung der Nanopartikeldispersion vor und nach der Sprühtrocknung redispergiert (Solvent Change Präzipitation, Zetasizer) n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Abbildung 5.8 zeigt, dass die Sprühtrocknung keinen Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung hatte. Die Partikel haben vor und nach Sprühtrocknung eine Größe von 250 nm und sind mit einem PDI von 0,1 eng verteilt.

5.1.6.2 Partikelgröße des sprühgetrockneten Produkts

Die trockene Formulierung mit 0,5% (m/V) HPMC wurde mit 3 bar trocken-dispergiert, um die Partikelgröße des Pulvers zu bestimmen. Abbildung 5.9 stellt das Ergebnis der Untersuchung dar. Die mittlere Partikelgröße x_{50} beträgt 2,4 μm , womit sich die Formulierung potentiell für die pulmonale Applikation eignet. Der Span, als Maß für die Breite der Partikelgrößenverteilung (Formel siehe Abschnitt 4.3), beträgt für diese Partikelgrößenverteilung 1,9, was eine enge Verteilung der Partikel bedeutet.

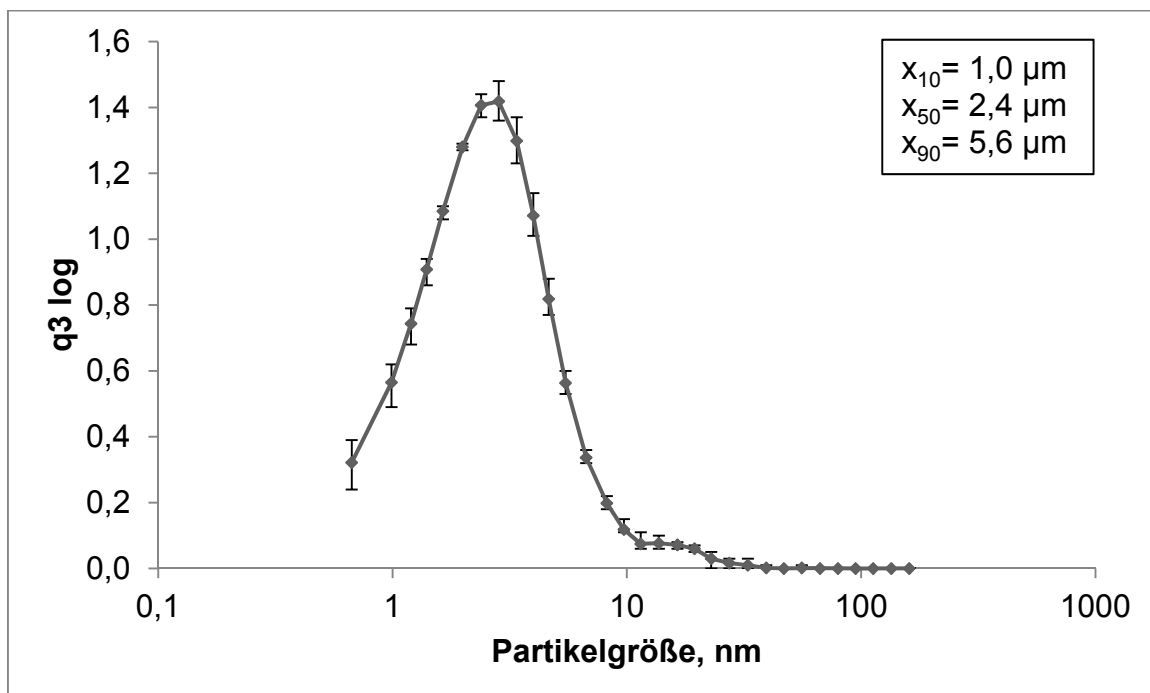


Abbildung 5.9: Partikelgrößenverteilung des sprühgetrockneten Pulvers (Solvent Change Präzipitation, Druckluftdispergierung mit 3 bar, $n=6$, Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Zusätzlich zur Druckluftdispergierung wurde die Formulierung sowohl mit dem Unihaler als auch dem Cyclohaler dispergiert und mithilfe des HELOS Inhaler-Moduls die Partikelgrößenverteilung bestimmt. Abbildung 5.10 zeigt den Vergleich der beiden Inhalatoren. Mit dem Unihaler lässt sich die Formulierung etwas besser dispergieren als mit dem Cyclohaler. Der niedrigere x_{90} -Wert weist darauf hin, dass Agglomerate vom Unihaler besser aufgebrochen werden. Dieser erzielte ebenfalls eine sehr enge Partikelgrößenverteilung mit einem Span von 1,2. Der Span der Partikelgrößenverteilung nach Cyclohaler-Dispergierung betrug 2,2, was auf eine etwas breitere Verteilung hinweist. Dennoch eignen sich beide Inhalatoren für die Dispergierung des sprühgetrockneten Pulvers.

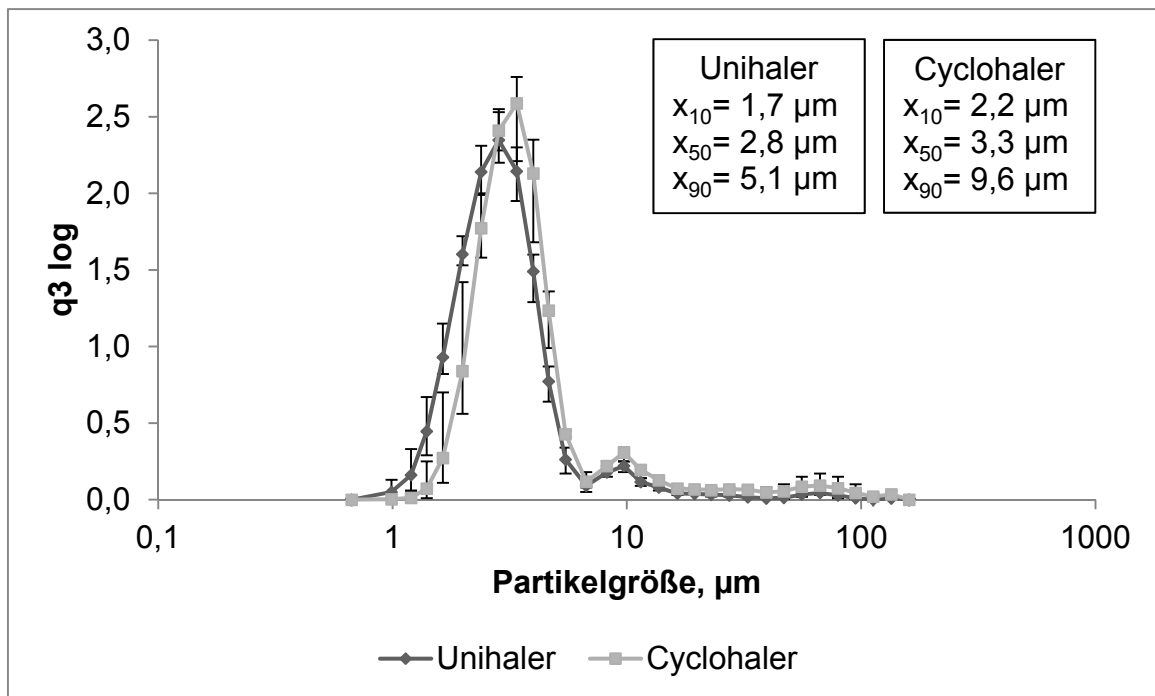


Abbildung 5.10: Partikelgrößenverteilung des sprühgetrockneten Pulvers (Solvent Change Präzipitation, Dispergierung aus Unihaler und Cyclohaler, n=4, Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung, dass sowohl der Cyclohaler als auch der Unihaler die sprühgetrocknete Formulierung zu Partikeln mit einer potentiell für die pulmonale Applikation geeigneten Größe dispergieren können. Der Test auf Redispergierbarkeit belegt, dass die Mikropartikel bei Kontakt mit Feuchtigkeit wieder die Nanopartikel freigeben, die die gleiche Größe wie vor der Sprühtrocknung besitzen.

5.1.7 Partikelvisualisierung

Die Nano- und Mikropartikel wurden mithilfe des Rasterelektronenmikroskops visualisiert. Zur Visualisierung der Nanopartikel wurde das sprühgetrocknete Pulver in Aqua bidest. redispergiert und die entstandene Nanopartikeldispersion auf den Probenträger aufgetragen. Die Nanopartikel sind in Abbildung 5.11 abgebildet. Sie zeigen alle eine sehr einheitliche Größe und Form, was mit den Ergebnissen für den PDI übereinstimmt.

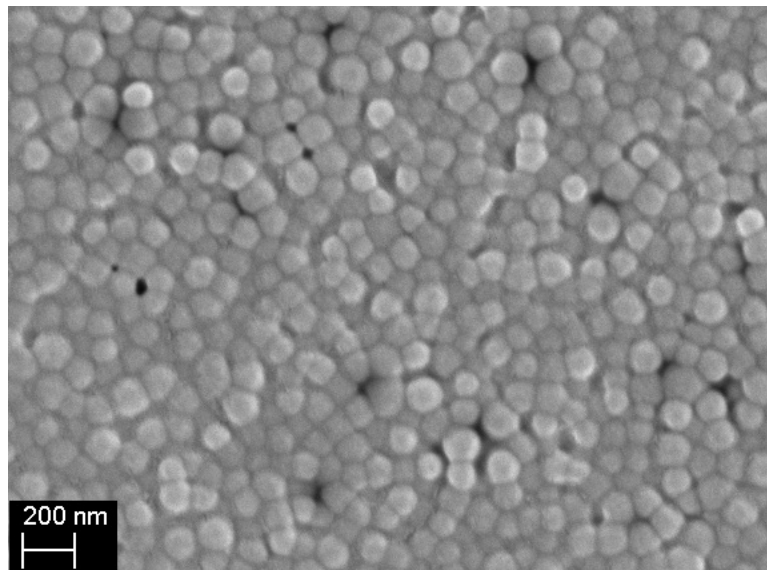


Abbildung 5.11: REM-Bild der Nanopartikel (Solvent Change Präzipitation, 74.000-fache Vergrößerung)

Abbildung 5.12 und Abbildung 5.13 zeigen die sprühgetrocknete Formulierung in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen.

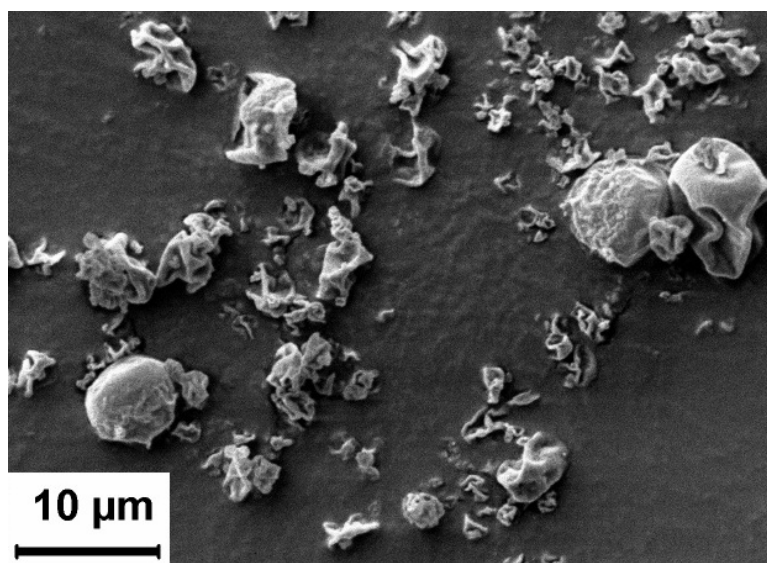


Abbildung 5.12: REM-Bild der sprühgetrockneten Formulierung (Solvent Change Präzipitation, 1000-fache Vergrößerung)

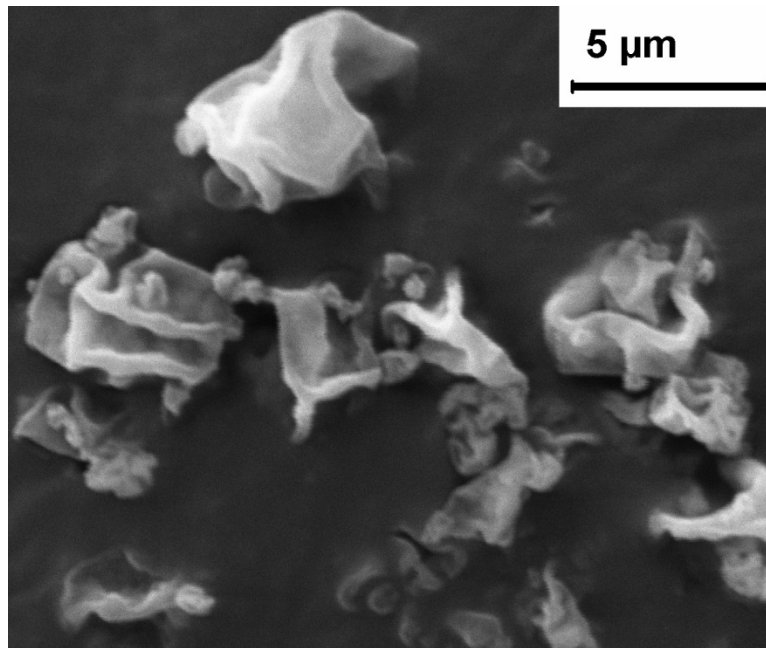


Abbildung 5.13: REM-Bild der sprühgetrockneten Formulierung (Solvent Change Präzipitation, 3000-fache Vergrößerung)

Abbildung 5.12 und Abbildung 5.13 verifizieren die bisherigen Partikelgrößenmessungen mittels Laserdiffraktometrie, die eine durchschnittliche Partikelgröße von ca. 3 µm detektierten. Das Sprühtrocknungsprodukt besteht aus kollabierten Kugeln, welche hauptsächlich aus HPMC bestehen. Die Nanopartikel sind in diesen Mikropartikeln eingebettet und nicht erkennbar.

5.1.8 Möglichkeiten der Methodenautomatisierung

Ziel dieser Evaluation war es, das manuelle Herstellverfahren durch ein automatisiertes Verfahren zu ersetzen, welches eine Einstellung der relevanten Parameter, sowie eine Skalierbarkeit der Ansatzgröße erlaubt. Dazu wurden zwei Mikromischer-basierte Ansätze verfolgt: Die Partikelherstellung mit dem Schlitz-Interdigital- sowie mit dem Prallstrahlmischer (Abschnitt 4.1.2).

5.1.8.1 Solvent Change Präzipitation mit dem Schlitz-Interdigitalmischer

Diesem Versuch wurde die in Abschnitt 5.1.1 erwähnte Standardformulierung zugrunde gelegt, wobei das Gesamtvolumen der Phasen erhöht wurde. Die organische Phase wurde mit 1 ml/min und die Stabilisatorlösung mit 10 ml/min gefördert. Damit sollte ein ähnliches Verhältnis wie bei der manuellen Herstellung erreicht werden.

Die Verwendung von 0,5% (m/V) HPMC in der Stabilisatorlösung führte jedoch zum Verstopfen des Mixers. Daher wurde die Konzentration auf 0,05% (m/V)

reduziert, allerdings ließen sich auch damit keine Nanopartikel erzeugen. Daher wurde zusätzlich zu 0,05% (m/V) HPMC bei einem weiteren Versuch 0,1% (m/V) Polysorbat 80 ergänzt. Damit ergaben sich Partikelgrößen von ca. 140 nm, die allerdings mit einem PDI von 0,22 vergleichsweise breit verteilt waren. In weiteren Versuchen wurde die Flussrate auf 1:5 und auch 1:1 eingestellt, wobei es allerdings jedes Mal zu einem nicht tolerierbaren Druckanstieg in den Pumpen kam, was vermutlich auf das unkontrollierte Präzipitieren von PLGA im Mikromischer zurückzuführen war, welches die engen Mischkanäle verstopfte. Auch die Verwendung von 5% (m/V) PVA als alternativen Stabilisator konnte ein unkontrolliertes Präzipitieren im Mischer nicht verhindern.

Es ist nicht gelungen, eine Methode zu etablieren, die die Herstellung von PLGA-Nanopartikeln mit dem Schlitz-Interdigitalmischer ermöglicht hätte. Die Problematik dabei war, dass das PLGA bereits in der Mischeinheit präzipitiert ist und damit der Mischer verstopfte.

5.1.8.2 Solvent Change Präzipitation mit dem Prallstrahlmischer

Im Gegensatz zum Schlitz-Interdigitalmischer findet beim Prallstrahlmischer die Präzipitation außerhalb des Mixers statt, sodass ein Verstopfen des Mischelements durch präzipitierendes PLGA, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben und aufgetreten, ausgeschlossen werden kann.

Auch hier wurde zu Beginn die oben genannte Standardformulierung verwendet, wobei die Konzentration an Polysorbat 80 auf 0,5% (m/V) erhöht wurde. Im Verlauf der Untersuchungen wurde die Formulierung weiter modifiziert. Organische und Stabilisatorlösung wurden mit einem Volumenstromverhältnis von 1:1 gefördert. Unter diesen Testbedingungen wurden erfolgreich Nanopartikel hergestellt. Die Partikelgröße betrug 100 nm und der PDI 0,11. Allerdings liegt die Partikelgröße von 100 nm außerhalb des Zielbereiches von 200-400 nm. Da dieser erste Versuch aussichtsreich verlaufen war, wurden verschiedene Verhältnisse der Pumpraten sowie unterschiedliche Stabilisatoren und Stabilisatorkonzentrationen verwendet. Ziel war es dabei, die Abhängigkeit der einzelnen Faktoren auf die Partikelgröße zu untersuchen, um so die Parameter zum Erhalt von Nanopartikeln mit einer Größe von 200 bis 400 nm und einem PDI unter 0,1 zu bestimmen und einzustellen.

Das Verhältnis der organischen (O) zur Stabilisatorlösung (W) wurde über die Flussrate eingestellt. Dabei wurden folgende Verhältnisse (O:W) getestet: 1:1 (je 12 ml/min), 1:1,5 (10:15 ml/min), 1:2 (10:20 ml/min) und 1,5:1 (15:10 ml/min). Die Auswertung der mittleren Partikelgröße (Z-Average) zeigte keine Abhängigkeit vom Volumenstromverhältnis. Allerdings stieg der PDI mit zunehmendem Unterschied der Flussraten. Tabelle 5.8 zeigt den Einfluss der unterschiedlichen Stabilisatoren auf Partikelgröße und -verteilung bei einem Flussratenverhältnis von 1:1. Die entstandenen Partikel sind unabhängig vom eingesetzten Stabilisator eng verteilt. Der Einsatz von 0,05% (m/V) Polysorbat 80 stabilisierte die Partikel nicht ganz so gut wie 0,5% (m/V) Polysorbat 80, sodass der PDI etwas höher war. Letztlich lässt sich hier, wie bereits im Abschnitt 5.1.2.1, ein Einfluss des Stabilisators auf die Partikelgröße erkennen (Tabelle 5.8). HPMC führt zu den größten Partikeln.

Tabelle 5.8: Ergebnisse der Prallstrahlmischeruntersuchung (Zetasizer, n=3)

Stabilisator	Partikelgröße, nm	PDI
0,05% (m/V) Polysorbat 80	90	0,12
0,5% (m/V) Polysorbat 80	100	0,10
0,1% (m/V) HPMC	140	0,14
1% (m/V) PVA	100	0,07

Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist mit dem Prallstrahlmischer, Nanopartikel herzustellen. Die Partikelgröße liegt allerdings unterhalb des Zielbereichs von 200-400 nm. Obwohl die manuelle Herstellung, beispielsweise für HPMC, Partikelgrößen im Zielbereich erzeugte, ist dies mit dem Prallstrahlmischer nicht gelungen. Die Ursache könnte sein, dass die starke Vermischung von organischer und wässriger Phase unterhalb des Prallstrahlmischers zu einer hohen Scherung führt, die kleinere Partikelgrößen bewirkt.

Da die Formulierung mit HPMC die bisher größten Partikel erzeugt hat, wurde diese Formulierung weiter modifiziert. Zum einen wurde der Einfluss der PLGA-Konzentration in der organischen Phase untersucht, und zum anderen wurde evaluiert, ob sich größere Partikel durch Erhöhung der HPMC-Konzentration bilden.

Abbildung 5.14 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Es wurden zwei HPMC-Konzentrationen, 0,1 und 0,5% (m/V), und drei verschiedene PLGA-Konzentra-

tionen, 9, 12 und 17 mg/ml, verwendet und von den entstehenden Partikeln die Größe und der PDI bestimmt. Mit zunehmender PLGA-Konzentration, die auf der Abszisse aufgetragen ist, werden die Partikel größer. Dabei führt die höhere HPMC-Konzentration von 0,5% (m/V) zu tendenziell größeren Partikeln, aber auch zu einer breiteren Verteilung.

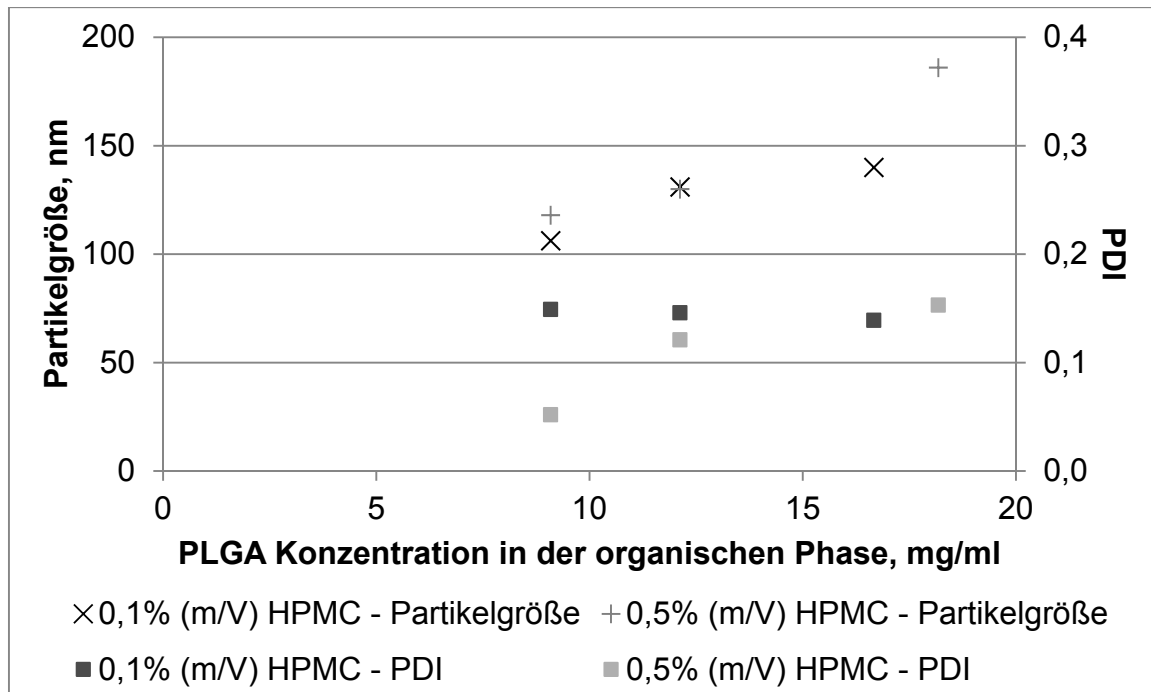


Abbildung 5.14: Auswirkung von PLGA- und HPMC-Konzentration auf Partikelgröße und PDI (Zetasizer, n=3)

Als weitere Modifikation wurde Acetonitril verwendet, da dieses bereits neben Aceton/Methanol in Abschnitt 5.1.2.2 als geeignetes Lösungsmittel identifiziert wurde. Dabei sollte ermittelt werden, ob es sich ebenfalls für die Nanopartikelherstellung mit dem Prallstrahlmischer eignet. HPMC wurde auch in diesem Fall als Stabilisator eingesetzt, wobei die Konzentrationen 0,1 und 0,5% (m/V) betragen. PLGA wurde in einer Konzentration von 12 mg/ml in der organischen Phase gelöst. Das Ergebnis mit Acetonitril ist im Vergleich zum Lösungsmittelgemisch Aceton/Methanol in Tabelle 5.9 dargestellt. Der Vergleich mit den Formulierungen, die mit Aceton und Methanol als Lösungsmittel hergestellt wurden, zeigt, dass sich mit Acetonitril größere Partikel ergeben, wobei sich auch die Verteilung verbreiterte. Theoretisch könnte man auch mit Acetonitril durch eine Erhöhung der PLGA-Konzentration in den Zielbereich einer Partikelgröße über 200 nm kommen. Doch vermutlich wird dadurch ebenfalls die

Partikelgrößenverteilung breiter, was in Abhängigkeit vom Anwendungsfall nicht zielführend sein kann.

Tabelle 5.9: Auswirkung von Lösungsmittel und HPMC-Konzentration auf Partikelgröße und PDI (Zetasizer, n=3)

HPMC, % (m/V)	Lösungsmittel	Partikelgröße, nm	PDI
0,1	Acetonitril	190	0,15
	Aceton/Methanol	130	0,15
0,5	Acetonitril	175	0,18
	Aceton/Methanol	130	0,12

Mithilfe von Prallstrahlmischerversuchen wurde die Abhängigkeit der Partikelgröße von Lösungsmittel, Stabilisatorart und -konzentration gezeigt. Mit diesem Verfahren lassen sich Nanopartikel erzeugen. Allerdings gelang es nicht, Partikel mit einer Größe zwischen 200 und 400 nm herzustellen.

5.1.9 Fluoreszenzmarkierung

Für die immunologischen Untersuchungen war eine Fluoreszenzmarkierung der Nanopartikel erforderlich. Auf diese Weise ist es möglich, den Verbleib der Partikel, z.B. in vitro in Zellen oder in vivo im Körper, zu analysieren.

Die Fluoreszenzmarkierung wurde mit Rhodamin 6G, einem roten Fluoreszenzfarbstoff, durchgeführt. Da Rhodamin 6G nicht kovalent an PLGA gebunden werden konnte, wurde es in die Partikel verkapselt. Dazu wurden 2% (m/m) Rhodamin 6G, bezogen auf die eingesetzte PLGA-Menge, in Methanol gelöst. Anschließend wurde Aceton ergänzt und PLGA darin gelöst. Die organische Phase wurde einer Stabilisatorlösung mit 0,5% (m/V) HPMC zugegeben und mit dem Ultra-Turrax dispergiert. Nach der Lösungsmittel- evaporation wurden die Nanopartikel mithilfe der Sprühtrocknung in ein trockenes Pulver überführt. Für die Herstellung der Ovalbumin beladenen Nanopartikel wurden 20 ml der Nanopartikeldispersion vor der Sprühtrocknung mit 10 ml einer Ovalbuminlösung (c= 2mg/ml) versetzt und vier Stunden bei 37°C in einem Temperierbecken geschüttelt. Danach erfolgte die Sprühtrocknung.

Es wurde beobachtet, dass die Partikel bei Rhodaminzusatz etwas größer und breiter verteilt waren. Die Partikelgröße wuchs auf etwa 270 nm an und der PDI betrug durchschnittlich 0,2.

5.1.10 Immunologische Untersuchungen

Für die immunologischen Untersuchungen, die Matthias Schröder an der Universität Bonn durchgeführt hat, wurden sprühgetrocknete Formulierungen verwendet. Dabei wurden Chargen mit und ohne Rhodamin sowie mit und ohne Ovalbumin verglichen. Dafür wurden diese Chargen in Medium redispergiert und den Makrophagen zugesetzt. Nach der Inkubation wurde die Viabilität der Makrophagen überprüft. Dazu wurden Makrophagen mit Carboxyfluorescein-succinimidylester (CFSE) gefärbt und nach bestimmten Inkubationszeiten mithilfe der FACS-Analyse die Fluoreszenz quantifiziert.

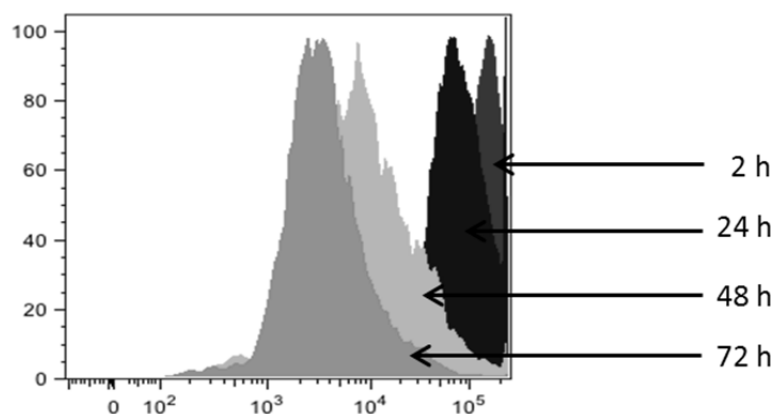


Abbildung 5.15: Kontrollprobe bei FACS-Untersuchung

Abbildung 5.15 zeigt das Ergebnis der Kontrollprobe. Auf der Ordinate ist die Signalintensität und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität dargestellt. Die vier Kurven zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen zu vier unterschiedlichen Zeiten. Mit zunehmender Inkubationszeit verschieben sich die Kurven aufgrund der Proliferation der Zellen zu einer geringeren Fluoreszenzintensität. Die beobachtete Abnahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit ist ein Zeichen von Viabilität.

Abbildung 5.16 stellt die Ergebnisse für die vier untersuchten Chargen mit unterschiedlicher Zusammensetzung dar. Es lässt sich deutlich erkennen, dass die Rhodamin-gefärbten Nanopartikel eine toxische Wirkung auf die Makrophagen haben, da die Zellen nicht mehr, wie in Abbildung 5.15 gezeigt, proliferieren und dementsprechend die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen nicht mehr abnimmt. Im Gegensatz dazu zeigen die PLGA-Nanopartikel selbst keine toxische Wirkung und auch der Ovalbumin-Zusatz beeinträchtigt die Proliferation nicht.

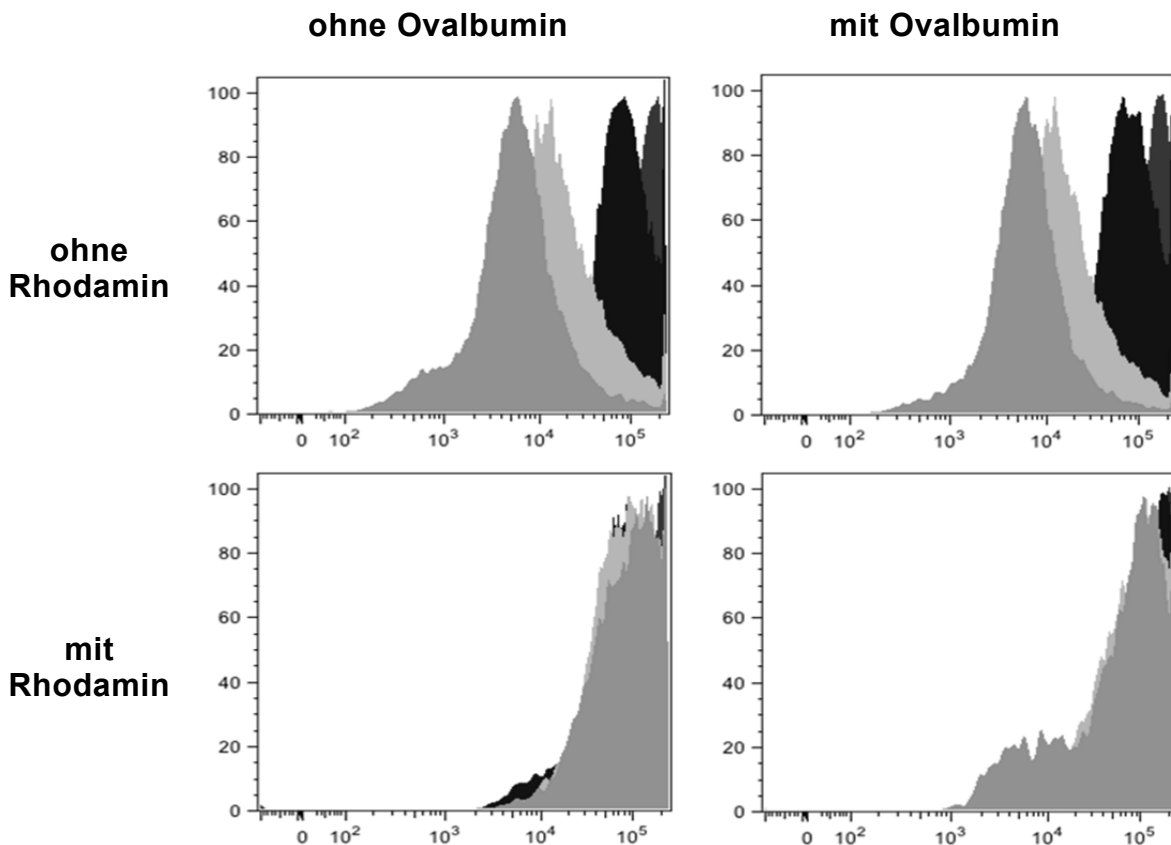


Abbildung 5.16: Ergebnis der FACS-Untersuchung

Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich Rhodamin 6G als ungeeigneter Fluoreszenzmarker heraus und wurde nicht weiter verwendet. Stattdessen wurden im weiteren Verlauf Fluoresceinamin, das sich kovalent an PLGA binden ließ, und Cumarin 6, das wie Rhodamin verkapselt wurde, als Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.

Die immunologischen Untersuchungen der durch Solvent Change Präzipitation hergestellten Partikel wurden nicht weiter fortgeführt. Diese Partikel hatten den Nachteil, dass sich nach der Antigen-Adsorption noch frei vorliegendes Antigen nicht vollständig aus dem Ansatz entfernen ließ. Dieses freie Antigen hätte die immunologischen Untersuchungen gestört, da beobachtete Effekte nicht eindeutig auf an die Partikel adsorbiertes Antigen zurückzuführen wären. Aus diesem Grund wurde ein alternatives Herstellverfahren gesucht, mit dem das Antigen eingekapselt und freies Antigen entfernt werden konnte.

5.1.11 Fazit

Die Solvent Change Präzipitation eignet sich für die Herstellung von Nanopartikeln. Durch Zusatz von 0,5% (m/V) HPMC als Stabilisator wurden

Partikel im gewünschten Größenbereich zwischen 200 und 400 nm hergestellt. Weiterhin zeigte der Ansatz mit HPMC hervorragende Eigenschaften während der Sprühtrocknung. Es wurde ein trockenes Produkt gewonnen, das nach Dispergierung mit sowohl Unihaler als auch Cyclohaler in einer für die pulmonale Applikation potentiell geeigneten Partikelgröße vorlag. Das Antigen wurde vor der Sprühtrocknung an die Partikeloberfläche adsorbiert, da allerdings freies Ovalbumin nicht aus dem Ansatz entfernt werden konnte, erwiesen sich diese Partikel als ungeeignet für nachfolgende immunologische Untersuchungen.

Die Herstellung mithilfe der Solvent Change Präzipitation hat den Vorteil, dass das Antigen keinen Kontakt zum Lösungsmittel hat, was die Proteinstrukturen schädigen könnte. Durch die Adsorption an der Oberfläche ist darüber hinaus eine schnelle Freisetzung möglich, die unabhängig von der Degradation des Polymers erfolgt. Von Nachteil ist hingegen, dass das Antigen durch seine Lokalisation auf der Oberfläche bereits vor Erreichen des Zielortes freigesetzt werden kann und während der Sprühtrocknung nicht so gut vor der erhöhten Temperatur geschützt ist, wie im Partikelinneren.

5.2 Doppalemulsionsmethode

Im vorangegangenen Abschnitt (Abschnitt 5.1) konnte gezeigt werden, dass sich die Solvent Change Präzipitation eignet, Nanopartikel zu erzeugen. Allerdings hat die Methode den Nachteil, dass das Antigen auf der Oberfläche adsorbiert ist. Dadurch ist es zum einen ungeschützt gegenüber äußeren Einflüssen und zum anderen wird es womöglich bereits bei Kontakt mit Feuchtigkeit in der Lunge, noch vor der Aufnahme der Partikel in Zellen, freigesetzt. In gelöster Form kann das Antigen hingegen nicht so effektiv durch antigenpräsentierende Zellen aufgenommen werden wie in partikulärer Form, die in ihrer Größe Pathogenen ähneln (Temmermann, 2011).

5.2.1 Nanopartikelherstellung

Eine alternative Herstellungsmethode zur Solvent Change Präzipitation stellt die Doppalemulsionsmethode dar. Diese hat den Vorteil, dass das Antigen in den Partikeln verkapselt wird, was das Antigen vor äußeren Einflüssen schützt und verhindert, dass dieses zu früh freigesetzt wird. Die Herstellung erfolgte in Anlehnung an die von Semete (2010) beschriebene Methode.

Tabelle 5.10: Zusammensetzung der Formulierung (Doppalemulsionsmethode)

Phase	Menge	Zusammensetzung
1. hydrophile Phase	400 µl	0,2% (m/V) OVA in Phosphatpuffer pH 7,4
Organische Phase	2 ml	2,5% (m/V) PLGA in Ethylacetat
2. hydrophile Phase	6 g	5% (m/m) PVA in Wasser
Stabilisatorlösung	20 g	1% (m/m) PVA in Wasser

Tabelle 5.10 führt die Zusammensetzung der Formulierung auf. Die erste hydrophile Phase enthält das zu verkapselnde Antigen. Es wurde Ovalbumin als Modellantigen verwendet, welches, zum Schutz des Antigens, in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 gelöst wurde. Für die Herstellung antigenfreier (Blank-) Partikel wurde auf das Antigen verzichtet und Aqua bidest. verwendet. Die organische Phase bestand aus PLGA, das in Ethylacetat gelöst wurde und nach Herstellung der W/O-Emulsion die innere hydrophile Phase umschloss. Um eine ausreichende Stabilisierung der gebildeten Nanopartikel zu erreichen,

wurde eine zweite hydrophile Phase, PVA gelöst in Aqua bidest., hergestellt. Für die Stabilisatorlösung wurde ebenfalls eine PVA-Lösung verwendet.

Zu Beginn der Herstellung wurde die organische Phase vorgelegt und die erste hydrophile Phase während Homogenisierung mit dem Ultra-Turrax bei 20.500 rpm für 1 Minute einemulgiert. Es entstand eine W/O-Emulsion, zu der die zweite hydrophile Phase hinzugefügt und mit dem Ultra-Turrax weitere zwei Minuten homogenisiert wurde. Anschließend wurde die entstandene W/O/W-Emulsion in die Stabilisatorlösung überführt und so lange auf der Magnetrührplatte mit 400 rpm gerührt, bis das Lösungsmittel evaporiert und der charakteristische Geruch des Ethylacetats nicht mehr olfaktorisch wahrzunehmen war.

Mit dieser Herstellungsmethode lassen sich Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 320 nm und einem PDI von 0,17 erzeugen (Abbildung 5.17)

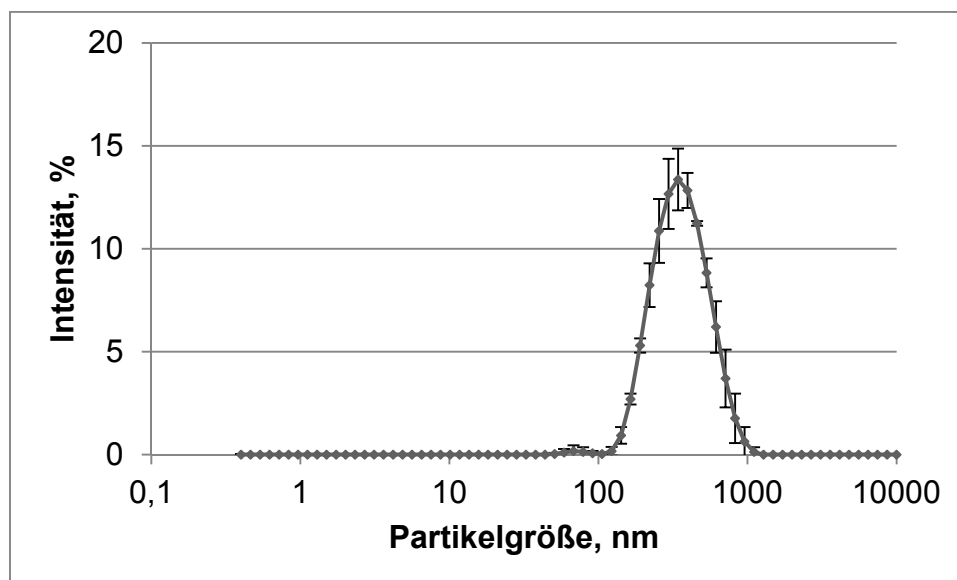


Abbildung 5.17: Partikelgrößenverteilung der Nanopartikeldispersion (Doppelemulsionsmethode, Zetasizer, n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Die Bildung von Nanopartikeln war damit erfolgreich. Es bestand jedoch noch Optimierungsbedarf im Hinblick auf die pro Ansatz hergestellte Nanopartikelmenge, die aufgrund des kleinen Ansatzvolumens nur gering war, und die Breite der Partikelgrößenverteilung, welche mit einem PDI von 0,17 relativ breit war.

5.2.2 Einflussfaktoren

Nachdem die Herstellung von Nanopartikeln mithilfe der Doppalemulsionsmethode gelungen war, wurde im Folgenden analog zur Solvent Change Präzipitation überprüft, welche Faktoren während der Herstellung einen Einfluss auf die entstehenden Nanopartikel haben. Die betrachteten Zielparameter waren die Partikelgröße sowie die Breite der Partikelgrößenverteilung. Dazu wurde die in Tabelle 5.10 angegebene Zusammensetzung als Standardformulierung festgelegt, auf die die erzielten Ergebnisse bezogen wurden.

Die erste Veränderung der Standardformulierung war die Verdopplung des Volumens der ersten hydrophilen Phase. Anstatt 400 µl wurden 800 µl verwendet. Die Zetasizermessung ergab eine mittlere Partikelgröße von 260 nm und einen PDI von 0,13. Obwohl die Erwartung war, dass die Verdopplung des Volumens zu größeren und breiter verteilten Partikeln führen würde, konnte durch eine Verdopplung der inneren, ersten hydrophilen Phase eine kleinere Partikelgröße erreicht werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Homogenisierung zu einem effektiven Dispergieren der Flüssigkeit in kleine Tröpfchen führt, die nachfolgend von einer PLGA-Schicht überzogen werden.

In einer weiteren Variation wurde das Gesamtansatzvolumen verdoppelt. Da die Verdopplung der ersten hydrophilen Phase einen positiven Effekt auf die Partikelgröße hatte, wurde dies beibehalten, wodurch ein vierfaches Volumen an erster hydrophiler Phase im Vergleich zur Standardformulierung verwendet wurde. Nach der Herstellung lag die durchschnittliche Partikelgröße bei 290 nm und die Partikel waren mit einem PDI von 0,11 eng verteilt. Damit wurde gezeigt, dass eine Vergrößerung des Ansatzvolumens keine negativen Auswirkungen auf Partikelgröße und -verteilung hatte.

Nachdem es gelungen war, sowohl das anteilige Volumen an Ovalbuminlösung als auch das Ansatzvolumen zu verdoppeln, wurde die Ovalbuminkonzentration in der ersten hydrophilen Phase erhöht. Eine höhere Konzentration hat den Vorteil, dass sich die Menge an verkapseltem Antigen anheben lässt. Dabei wurde untersucht, ob eine höher konzentrierte Ovalbuminlösung einen Einfluss auf Partikelgröße und -verteilung hat. Dazu wurden vier weitere Ovalbuminlösungen mit 10 bis 40 mg/ml hergestellt, indem Ovalbumin in Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst wurde. Die Ergebnisse stellt Abbildung 5.18 dar. Es lässt sich

keine direkte Abhängigkeit zwischen Ovalbuminkonzentration und Partikelgröße erkennen. Allerdings erhöht sich der PDI bei höherer Ovalbuminkonzentration, von 0,11 bei der Standardformulierung mit 2 mg/ml Ovalbumin auf 0,18 bei einer Ovalbuminkonzentration von 40 mg/ml. Da eine möglichst große Menge Ovalbumin verkapselt werden soll, wurde es vorgezogen, eine höher konzentrierte Ovalbuminlösung einzusetzen und dafür etwas breiter verteilte Partikel zu erhalten. Eine weitere Steigerung der Ovalbuminkonzentration war nicht möglich, da die maximale Löslichkeit von Ovalbumin bei etwa 40 mg/ml liegt (Sigma-Aldrich) und folglich erreicht war.

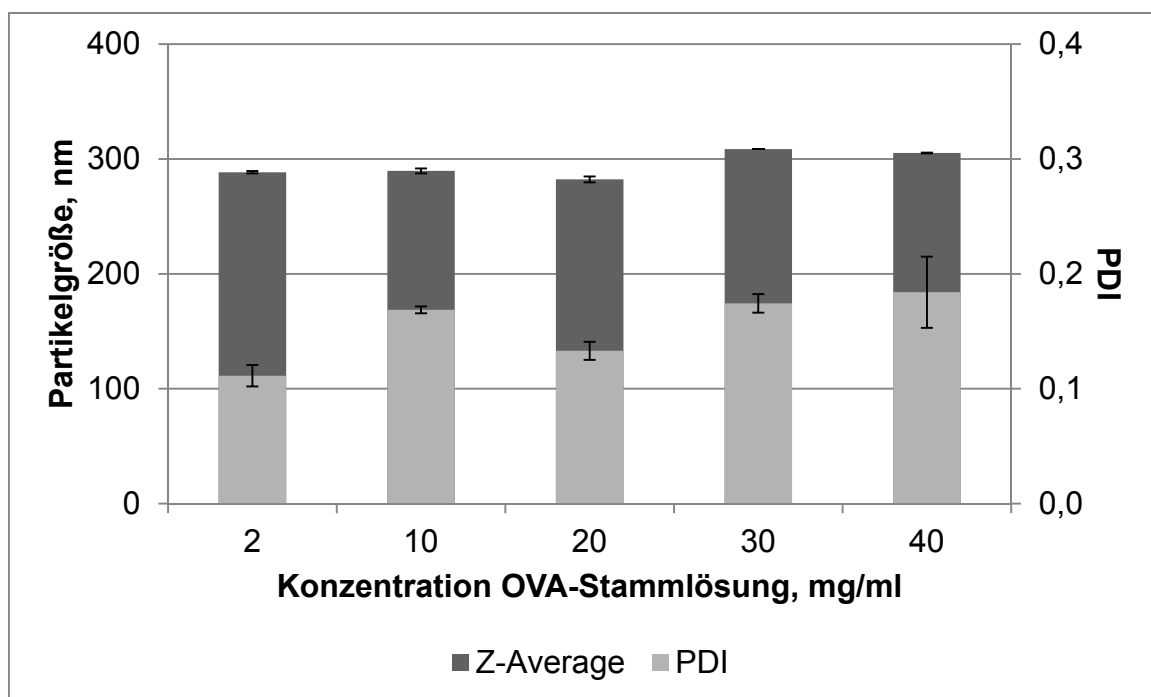


Abbildung 5.18: Einfluss der Ovalbuminkonzentration auf Partikelgröße und PDI (Zetasizer, n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Zusätzlich wurde bei den vier Ansätzen der Effekt der unterschiedlichen Ovalbuminkonzentrationen auf Beladungsrate sowie Verkapselungseffizienz überprüft. Tabelle 5.11 zeigt, dass durch den Einsatz einer Ovalbuminlösung mit einer höheren Konzentration eine höhere Beladungsrate erzielt wurde. Dabei nahm allerdings die Verkapselungseffizienz mit zunehmender Ovalbuminkonzentration ab.

Tabelle 5.11: Einfluss der Ovalbuminkonzentration auf Beladungsrate und Verkapselungseffizienz (n=3)

Ovalbuminkonzentration, %	Beladungsrate, µg OVA / mg PLGA	Verkapselungseffizienz, %
2	22,4	31,5
10	54,5	35,4
20	72,4	22,8
30	94,3	20,3
40	108,5	17,8

Da das Ziel die Verkapselung einer möglichst großen Antigenmenge war, wurde trotz der geringeren Verkapselungseffizienz entschieden bei weiteren Ansätzen Ovalbuminlösungen mit einer Konzentration von 40 mg/ml einzusetzen.

Nachdem der Einfluss der oben genannten Faktoren bestimmt war, wurde die optimierte Zusammensetzung der Formulierung festgelegt (siehe Tabelle 5.12). Mit dieser Zusammensetzung wurden die weiteren Nanopartikelchargen hergestellt.

Tabelle 5.12: Zusammensetzung der optimierten Formulierung (Doppelemulsionsmethode)

Phase	Menge	Zusammensetzung
1. hydrophile Phase	1600 µl	4,0% (m/V) OVA in Phosphatpuffer pH 7,4
Organische Phase	4 ml	2,5% (m/V) PLGA in Ethylacetat
2. hydrophile Phase	12 g	5% (m/m) PVA in Wasser
Stabilisatorlösung	40 g	1% (m/m) PVA in Wasser

Eine weitere Verbesserung, kleinere und enger verteilte Partikel, wurde erreicht, indem die Dispersion nach Zugabe der zweiten hydrophilen Phase statt einer Minute, zwei Minuten homogenisiert wurde. Dies führte mit der oben aufgeführten Formulierung zu Partikeln mit einer Partikelgröße von durchschnittlich 275 ± 20 nm und einem PDI $0,13 \pm 0,03$, im Vergleich zu einer Partikelgröße von 300 nm und einem PDI von 0,18 vor der Veränderung. Wenn man die Dispersion noch länger homogenisieren würde, könnte man vermutlich noch enger verteilte Nanopartikel erreichen. Allerdings würde damit auch die Scherbelastung für das Antigen zunehmen, sodass die Zeit des Homogenisierens auf maximal zwei Minuten festgelegt wurde.

Bei der Herstellung ovalbuminfreier Nanopartikel wurde festgestellt, dass das Ovalbumin einen deutlichen Einfluss auf die Verteilungsbreite hat. Die Partikel ohne Ovalbumin wiesen eine Größe von 260 nm und einen PDI von 0,06 auf, wohingegen die ovalbuminhaltigen Partikel mit 275 nm eine vergleichbare Größe hatten, mit einem PDI von 0,12 jedoch signifikant breiter verteilt waren. Als Grund wird angenommen, dass das freie Ovalbumin, das noch im Ansatz enthalten ist und eine Größe im unteren Nanometerbereich aufweist, bei der dynamischen Lichtstreuung ebenfalls erfasst wird. Kleine Partikel werden bei dieser Messung nicht so stark gewichtet wie große, sodass keine Änderung der Partikelgröße ermittelt wird, jedoch eine breite Verteilung resultiert.

Die optimierte Zusammensetzung (Tabelle 5.12) wurde ebenfalls für die Herstellung der fluoreszenzmarkierten Nanopartikel verwendet. Dabei wurden Partikel mit drei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert: Fluoresceinamin, CF568 sowie Cumarin 6.

Fluoresceinamin (FA) und CF568 wurden kovalent an das PLGA gebunden. Das auf diese Weise markierte PLGA ersetzte bei der Herstellung das unmarkierte PLGA. Das Cumarin 6 wurde gemeinsam mit PLGA in Ethylacetat gelöst. Der erste Versuch mit 1,25 mg Cumarin 6 je ml Ethylacetat ergab eine schlechte Cumarin 6-Löslichkeit, sodass weitere Ansätze mit nur noch 25 µg Cumarin 6 je ml Ethylacetat hergestellt wurden. Auch mit der reduzierten Cumarin 6-Menge konnte eine für die immunologischen Untersuchungen ausreichende Fluoreszenzmarkierung erreicht werden.

Mithilfe der dynamischen Lichtstreuung wurde überprüft, ob die Fluoreszenzmarkierung die Partikelgröße beeinflusst. Abbildung 5.19 zeigt die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung. Die Partikel mit FA-PLGA haben eine mittlere Partikelgröße von 290 nm und die Partikel mit Cumarin 6 von 260 nm; beide Chargen haben einen PDI von 0,11. Die mit CF568-gelabelten Partikel sind ca. 320 nm groß und mit einem PDI von 0,18 etwas breiter verteilt. Dieser Unterschied könnte darauf beruhen, dass in die Fluoresceinamin- und Cumarin-gefärbten Partikel, im Gegensatz zu den CF568-gefärbten Partikeln, kein Ovalbumin verkapselt war.

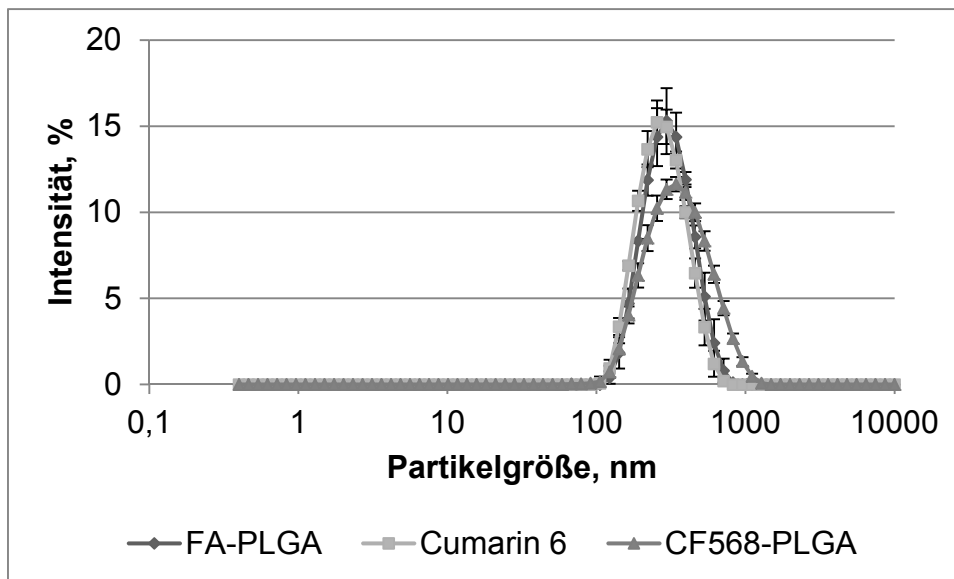


Abbildung 5.19: Partikelgrößenverteilung von Partikeln mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Zetasizer, n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

5.2.3 Übertragung der Methode auf HPMC als Stabilisator

HPMC konnte die mithilfe der Solvent Change Präzipitation erzeugten Nanopartikel gut stabilisieren und eignete sich sehr gut für die Sprühtrocknung. Daher wurde die Verwendung als Stabilisator für die Doppalemulsionsmethode evaluiert. Dazu wurde die Standardformulierung (Tabelle 5.12) genutzt und HPMC anstelle von PVA eingesetzt. Aufgrund seiner viskositätserhöhenden Eigenschaften wurde die Konzentration reduziert und es wurden nur 0,5% (m/m) HPMC der zweiten hydrophilen und der Stabilisatorlösung zugesetzt. Diese Formulierung zeigte eine multimodale Verteilung, wobei die meisten Partikel eine Größe im Bereich von 2 μm aufwiesen. Um die vermutete Ursache, die noch immer recht hohe Viskosität, zu verringern, wurde die HPMC-Konzentration in beiden Phasen auf 0,05% (m/m) reduziert und zusätzlich 0,05% (m/m) Polysorbat 80 ergänzt, um dadurch eine ausreichende Stabilisierung zu erreichen. Dennoch wurden auch mit dieser Zusammensetzung keine engverteilten Nanopartikel erzeugt. Diese Partikel wiesen einen durchschnittlichen PDI von 0,7 auf, womit keine Aussage über die wahre Partikelgröße zu treffen war, die allerdings im Durchschnitt bereits über 1 μm betrug. HPMC ist ein großes Molekül, das vermutlich die Partikel bei der Homogenisierung nicht schnell genug umschließen kann, um diese zu stabilisieren. Dadurch entstanden Partikelagglomerate mit einer Größe im unteren Mikrometerbereich.

5.2.4 Entfernung des unverkapselten Ovalbumins

Ovalbumin, das während der Nanopartikelherstellung nicht verkapselt wurde, wurde mithilfe eines Waschschriffs vor der Sprühtrocknung aus dem Ansatz entfernt. Dies diente dazu, das freie Ovalbumin möglichst vollständig aus der Formulierung zu entfernen, um die immunologischen Ergebnisse nicht zu beeinflussen. Auf diese Weise konnten die auftretenden immunologischen Effekte auf das in den Partikeln befindliche Ovalbumin zurückgeführt werden.

Der Waschschrift wurde wie folgt durchgeführt: Die Partikel wurden 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und eine weitere Stunde bei 7850 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand, der das freie Ovalbumin enthielt, wurde verworfen. Um eine vergleichbare Zusammensetzung wie vor der Zentrifugation zu erreichen, wurde der verworfene Überstand durch das gleiche Volumen 1%iger (m/m) PVA-Lösung ersetzt. Die Rückstände samt Redispergierung wurden auf einer Schüttelapparatur (Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland) auf Stufe 2 solange bewegt, bis der Rückstand vollständig redispergiert vorlag. Im Anschluss wurde überprüft, ob die Zentrifugation die Partikelgröße oder -verteilung veränderte. Abbildung 5.20 zeigt die Partikelgrößenverteilung vor und nach dem Waschschrift am Beispiel einer Blank-Formulierung.

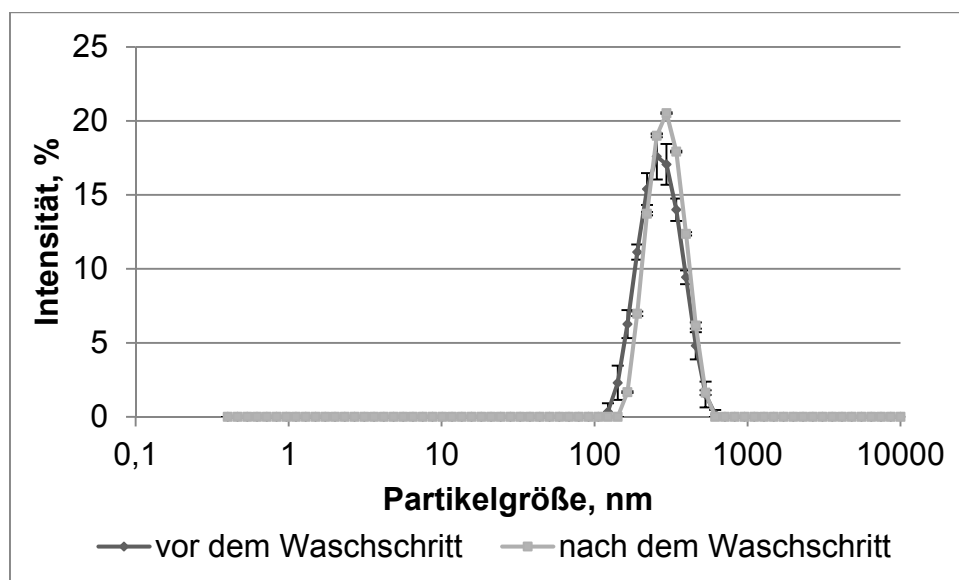


Abbildung 5.20: Partikelgrößenverteilung der Nanopartikeldispersion vor und nach dem Waschschrift, (Doppelemulsionsmethode, Zetasizer, n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Vor dem Waschschrift lag die durchschnittliche Partikelgröße bei 260 nm und der PDI bei 0,07. Nach dem Waschschrift betrug die durchschnittliche Partikelgröße 280 nm und der PDI 0,06. Damit stieg die Partikelgröße leicht an und die Verteilung blieb nahezu konstant. Daher konnte im nachfolgenden Fortschritt dieser Arbeit auf das Waschen der Blank-Formulierungen verzichtet werden. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass ein Abzentrifugieren und Redispergieren der Partikel möglich ist. Somit können die Ansätze vor dem Sprühtrocknen von unverkapseltem Ovalbumin befreit und selektiv der Effekt des verkapselten Antigens in immunologischen Untersuchungen bestimmt werden.

5.2.5 Sprühtrocknung

Nach dem Waschschrift schloss sich die Sprühtrocknung an, die dazu diente, die Nanopartikeldispersion in ein trockenes Pulver zu überführen. Die Nanopartikeldispersion wurde durch die kleinste verfügbare Düse, Düsendurchmesser 1,4 mm, versprüht. Diese Düse wurde ausgewählt, da die entstehende Tropfengröße vom Düsendurchmesser abhängig ist und mit einem Durchmesser von 1,4 mm kleine Mikropartikel erzeugt werden können. Die Trocknung erfolgte mit einer Einlasstemperatur von 100°C und einer Auslasstemperatur von 41-43°C. Das Produkt wurde mittels eines Hochleistungszyklons vom Luftstrom abgetrennt und aufgefangen. PVA stellte sich hierbei als besonders geeigneter Stabilisator heraus, da es zu einem trockenen Produkt führte, dem keine weiteren Matrixbestandteile zugesetzt werden mussten. Das Produkt bestand am Ende aus PLGA-Nanopartikeln, die in eine PVA-Matrix eingebettet waren. Dabei lag ein Verhältnis von 20% Nanopartikeln zu 80% PVA-Matrix im sprühgetrockneten Pulver vor.

5.2.6 Partikelgrößenbestimmung des sprühgetrockneten Produkts

Von dem sprühgetrockneten Pulver, sowie den redispergierten Nanopartikeln wurde die Partikelgrößenverteilung bestimmt. Dabei sollten sowohl für Nano- als auch Mikropartikel enge monomodale Verteilungen erzielt werden. Für die Partikelgrößenbestimmung wurden zwei Methoden eingesetzt: Mit der dynamischen Lichtstreuung wurde die Nanopartikelgröße nach der Redispergierung und mit der Laserbeugung die Partikelgröße des trockenen Pulvers bestimmt.

5.2.6.1 Dynamische Lichtstreuung

Die PVA-Matrix soll sich nach Kontakt mit Feuchtigkeit, z.B. unter physiologischen Bedingungen in der Lunge, auflösen, sodass die Mikropartikel zu Nanopartikel redispergieren. Die Größe der Nanopartikel soll dabei der Größe, die vor der Sprühtrocknung ermittelt wurde, entsprechen. Um zu überprüfen, ob sich die Nanopartikel während der Sprühtrocknung in ihrer Größe verändert haben und sie sich redispergieren lassen, wurden 10 mg des trockenen Pulvers in 1 ml Aqua bidest. redispergiert. 100 µl dieser Dispersion wurden mit Aqua bidest. auf 1 ml verdünnt und mit dem Zetasizer untersucht. Abbildung 5.21 zeigt das Ergebnis der Partikelgrößenbestimmung einer Formulierung mit einer eingesetzten Ovalbuminkonzentration von 40 mg/ml. Es sind die Partikelgrößenverteilungen vor und nach der Sprühtrocknung dargestellt.

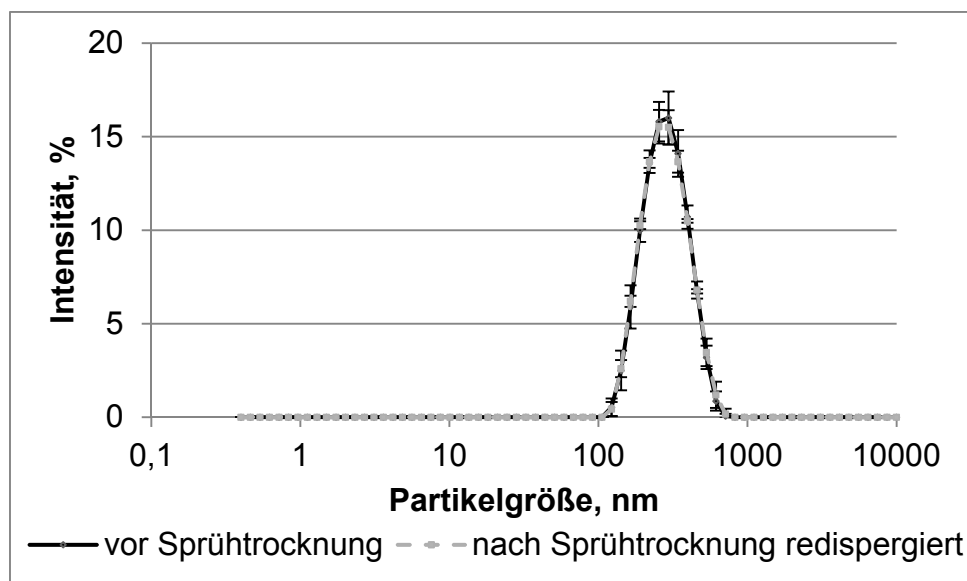


Abbildung 5.21: Partikelgrößenverteilung der Nanopartikeldispersion vor und nach der Sprühtrocknung redispergiert (Doppelemulsionsmethode, Zetasizer, n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Vor der Sprühtrocknung betrug die durchschnittliche Partikelgröße $275 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ und der PDI $0,13 \pm 0,03$. Nach der Sprühtrocknung blieb die Partikelgröße mit $275 \text{ nm} \pm 12 \text{ nm}$ konstant, die Verteilung war mit einem PDI von $0,16 \pm 0,03$ etwas breiter. Das sind sehr gute Ergebnisse, welche beweisen, dass die Mikropartikel sich im Kontakt mit Feuchtigkeit auflösen, die Nanopartikel freigeben und dass die Nanopartikel durch die Sprühtrocknung nicht verändert werden.

5.2.6.2 Laserdiffraktometrie

Die Partikelgröße der trockenen Formulierung wurde mithilfe der Laserdiffraktometrie analysiert. Dabei wurden zwei Methoden verwendet: Die Druckluftdispergierung mit 3 bar und die Dispergierung mithilfe eines Inhalators.

Formulierungen, die mit oben beschriebenen Verfahren erzeugt und mit 3 bar trocken dispergiert, sowie mit dem HELOS-Rodos-Modul vermessen wurden, ergaben die in Abbildung 5.22 dargestellte Partikelgrößenverteilung. Diese Partikelgrößenverteilung ist beispielhaft für eine Formulierung, die mit der optimierten Zusammensetzung (Tabelle 5.12) hergestellt wurde. Die mittlere Partikelgröße (x_{50}) der untersuchten Formulierungen betrug im Durchschnitt $3,3 \mu\text{m} \pm 0,5 \mu\text{m}$. Damit wiesen die Partikel eine für die pulmonale Applikation potentiell geeignete Partikelgröße auf. Der Span betrug im Mittel $3,3 \pm 0,4$, was bedeutet, dass die Partikel relativ breit verteilt waren.

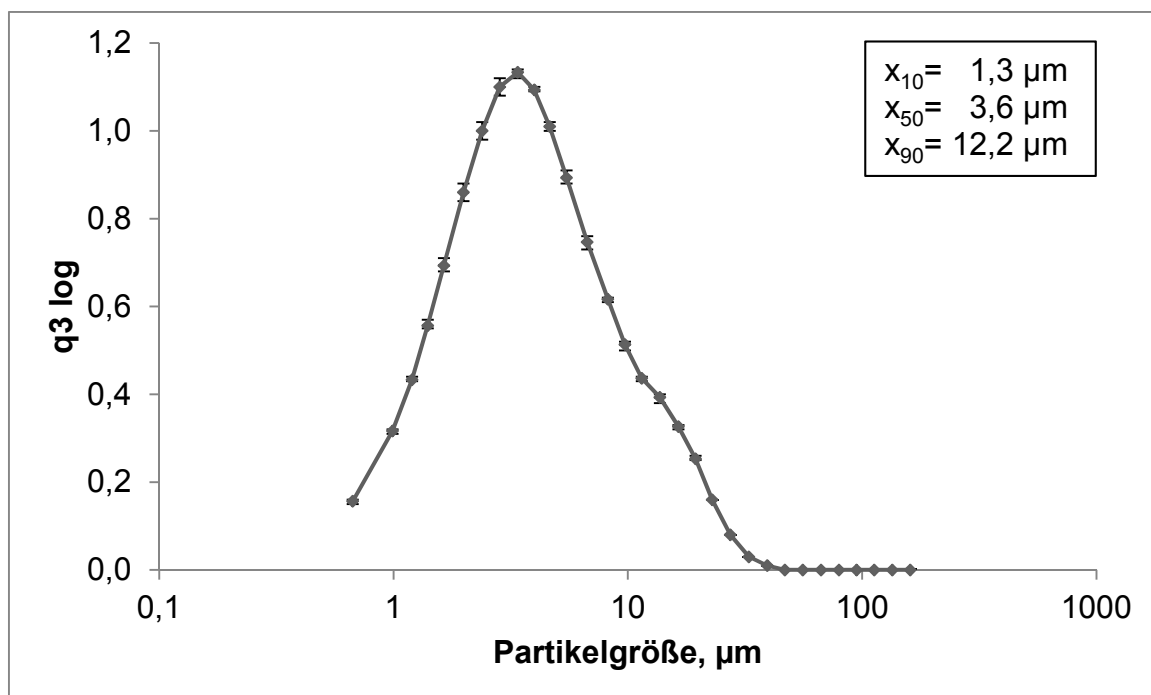


Abbildung 5.22: Partikelgrößenverteilung des sprühgetrockneten Pulvers (Doppelemulsionsmethode, Druckluftdispergierung mit 3 bar, $n=3$, Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Des Weiteren wurde untersucht, ob die verwendeten Inhalatoren geeignet sind, Agglomerate aufzubrechen und die Formulierung so zu dispergieren, dass Primärpartikel vorliegen. Dazu wurden Kapseln mit ca. 20 mg der sprühgetrockneten Formulierung befüllt und anschließend sowohl mit dem Cyclohaler als auch mit dem Unihaler dispergiert. Die nach Inhalatordispergierung

resultierende Partikelgrößenverteilung wurde mit dem HELOS-Inhaler-Modul bestimmt.

Abbildung 5.23 stellt beispielhaft den Vergleich für eine Formulierung, die mit den beiden oben genannten Inhalatoren dispergiert wurde, dar.

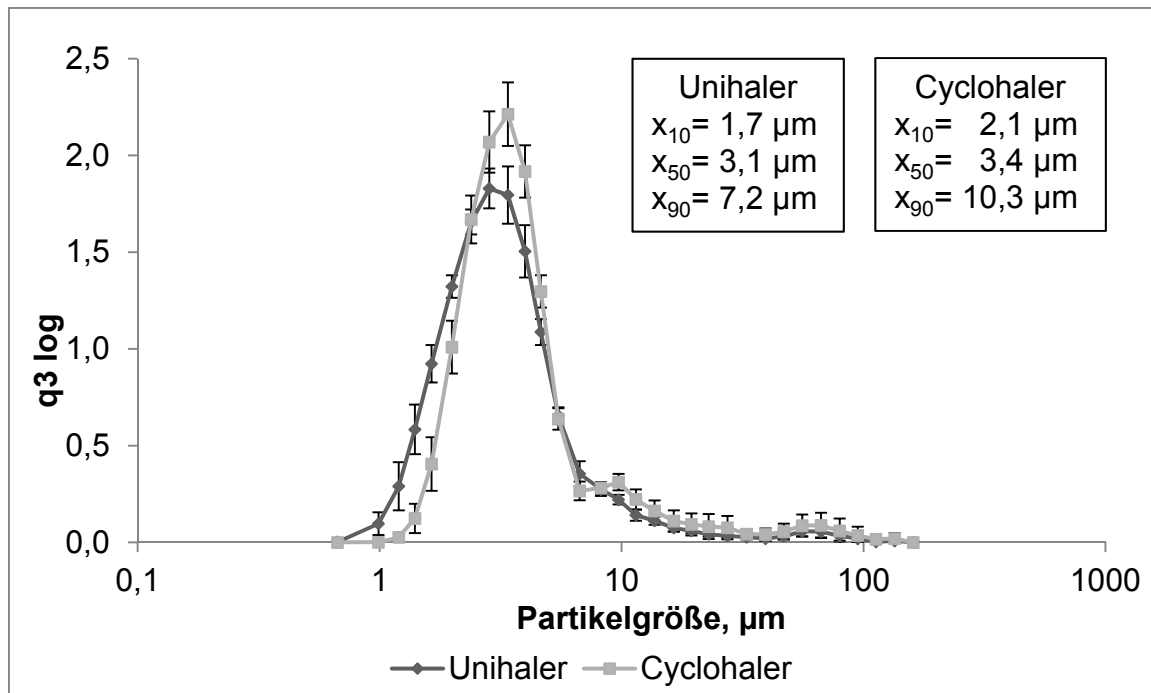


Abbildung 5.23: Partikelgrößenverteilung des sprühgetrockneten Pulvers (Doppelemulsionsmethode, Dispergierung aus Unihaler und Cyclohaler, n= jeweils 10, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Bei Dispergierung mit dem Unihaler betrug die mittlere Partikelgröße im Durchschnitt $3,0 \mu\text{m} \pm 0,1 \mu\text{m}$. Bei Verwendung des Cyclohalers war die mittlere Partikelgröße mit $3,7 \mu\text{m} \pm 0,3 \mu\text{m}$ signifikant größer, was eine etwas schlechtere Dispergierwirkung des Cyclohalers zeigt. Weiterhin lassen sich in der Grafik noch einige Agglomerate erkennen, die von beiden Inhalatoren nicht vollständig aufgebrochen werden konnten. Die Ermittlung der Verteilungsbreite ergab einen durchschnittlichen Span von $1,8 \pm 0,2$ nach Unihalerdispergierung und einen signifikant höheren Span von $2,8 \pm 0,8$ nach Cyclohalerdispergierung, womit die Partikel nach Dispergierung aus dem Unihaler sehr eng verteilt sind. Aber auch das Ergebnis der Cyclohalerdispergierung liegt in einem akzeptablen Bereich.

Um die Ergebnisse der Inhalatordispergierung mit denen der Druckluftdispergierung zu vergleichen, wurden die relativen Feinpartikelfraktionen (FPF_{rel}) berechnet. Dazu wurde die Summe der Partikel $< 5,25 \mu\text{m}$ nach

Druckluftdispergierung mit 3 bar als vollständig dispergiert (100%) angenommen. Darauf wurde die Summe der Partikel $< 5 \mu\text{m}$ nach Inhalatordispergierung bezogen. Der Unterschied zwischen $5,25 \mu\text{m}$ bei Druckluftdispergierung und $5 \mu\text{m}$ bei Inhalatordispergierung ergibt sich durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Linsen, die sich leicht in den Ringelementen unterscheiden. Da bei der Linse, die für die Druckluftdispergierung verwendet wurde, kein Ring, der $5 \mu\text{m}$ entsprach, existiert, wurde der am nächsten liegende Ring für die Berechnung ausgewählt. Das Ergebnis war eine FPF_{rel} von $96\% \pm 2\%$ für den Unihaler und eine FPF_{rel} von $91\% \pm 7\%$ für den Cyclohaler. Damit zeigen beide Inhalatoren hervorragende Dispergiereigenschaften. Sie können die sprühgetrocknete Formulierung fast vollständig dispergieren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung, dass die Formulierung nach der Sprühtrocknung potentiell für die pulmonale Applikation, sowie für die Dispergierung, sowohl mit Cyclohaler als auch Unihaler, geeignet war. Der Test auf Redispergierbarkeit belegte, dass die Mikropartikel bei Kontakt mit Feuchtigkeit wieder Nanopartikel freigaben, die die gleiche Größe wie vor der Sprühtrocknung besaßen.

Um eine vollständige Aussage über die Eignung der Formulierung für die pulmonale Applikation treffen zu können, muss zusätzlich zur Bestimmung des geometrischen Durchmessers eine aerodynamische Charakterisierung der Formulierung durchgeführt werden. Auf diese wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

5.2.7 Aerodynamische Charakterisierung

Als Zielparame-ter für die aerodynamische Charakterisierung wurden die Feinpartikelfraktion, der aerodynamische Partikeldurchmesser, sowie die abgegebene Dosis definiert. Eine gute Formulierung sollte dabei eine möglichst hohe Feinpartikelfraktion und abgegebene Dosis aufweisen und einen aerodynamischen Partikeldurchmesser zwischen 0,5 und 5 µm besitzen.

5.2.7.1 Bestimmung von Feinpartikelfraktion und aerodynamischem Durchmesser

Das sprühgetrocknete Produkt wurde mithilfe des NGI untersucht. Dabei wurde es sowohl mit Unihaler als auch Cyclohaler dispergiert und anschließend die Feinpartikelfraktion (FPF), der mittlere massenbezogene aerodynamische Durchmesser (MMAD) und die geometrische Standardabweichung (GSD) ermittelt.

Für beide Inhalatoren wurde eine Flussrate gewählt, die einem Druckabfall von 4 kPa über den Inhalator entsprach. Damit ergaben sich für den Unihaler 59 l/min und für den Cyclohaler 100 l/min. An der Triggerbox wurde die Zeit eingestellt, mit der ein Inspirationsvolumen von 4 l durch den NGI gezogen wurde. Diese Zeit betrug für den Unihaler 4 Sekunden und für den Cyclohaler 2,4 Sekunden. Abbildung 5.24 zeigt die Ovalbuminverteilung in den einzelnen Fraktionen.

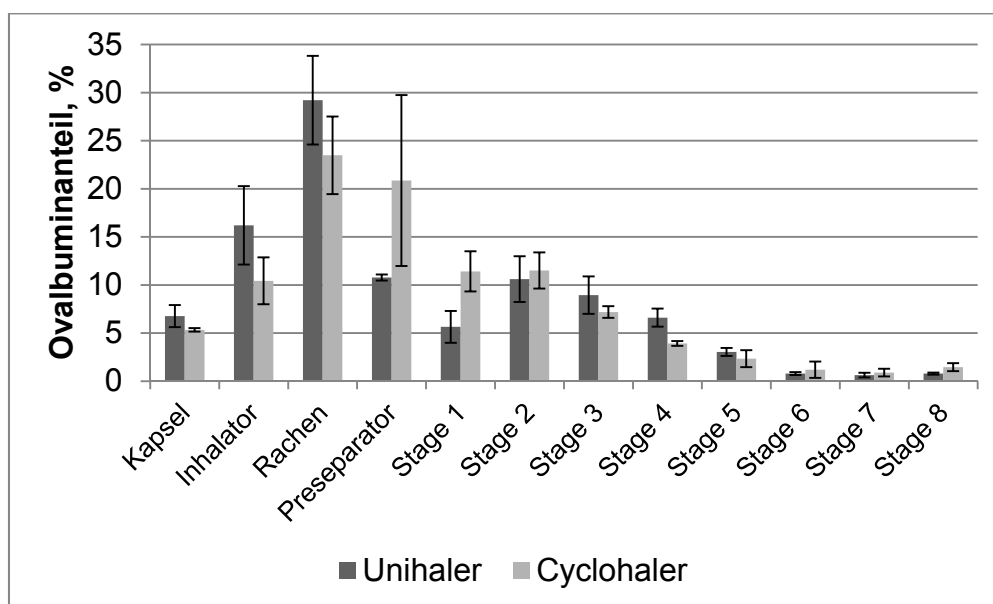


Abbildung 5.24: Ergebnis der NGI-Untersuchung (Doppelemulsionsmethode, Unihaler und Cyclohaler, n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Aus dem Balkendiagramm lässt sich erkennen, dass das Ovalbumin bei beiden Inhalatoren ähnlich über die einzelnen Fraktionen verteilt vorliegt. Es ist jeweils ein großer Anteil an Formulierung im Rachen impaktiert und auch im Unihaler verblieb eine größere Partikelmenge. Beim Cyclohaler war der Ovalbuminanteil im Inhalator nicht ganz so hoch. Allerdings wurde mehr auf dem Preseparator und dem Stage 1 abgeschieden. Der geringere Ovalbuminanteil im Cyclohaler kann sich mit der Form des Mundstücks erklären lassen. Dieses ist beim Cyclohaler gerade, während es beim Unihaler gekrümmt ist. Die Krümmung führt zu einem stärkeren Kontakt mit dem Mundstück, mit der Folge, dass größere Partikel bereits dort impaktieren. Beim Cyclohaler folgen die größeren Partikel dem Luftstrom noch etwas weiter und werden auf dem Preseparator abgeschieden. Rechnet man die Werte für Inhalator, Rachen und Preseparator zusammen, ergibt sich für beide Inhalatoren ein Ovalbuminanteil von etwa 55% auf diesem Stufen.

Die Auswertung der Ergebnisse mit der CITDAS-Software ergab die in Tabelle 5.13 aufgeführten Ergebnisse. Dabei bezieht sich die Feinpartikelfraktion auf die in die Kapsel eingewogene Dosis. Für beide Inhalatoren wurden dabei vergleichbare Ergebnisse erzielt.

Tabelle 5.13: Ergebnisse der NGI-Untersuchung (Doppelemulsionsmethode, Unihaler und Cyclohaler, n=3)

	Unihaler	Cyclohaler
FPF, %	30	29
MMAD, μm	4,0	3,9
GSD	2,1	3,0

Zusammengefasst bedeuten diese Ergebnisse, dass Unihaler und Cyclohaler das sprühgetrocknete Pulver in ähnlicher Weise dispergieren können. Die Feinpartikelfraktion und der MMAD waren für beide Inhalatoren ähnlich. Allerdings bietet eine Feinpartikelfraktion von 30% noch Potential für Optimierungen, welches in dieser Arbeit durch den Zusatz von L-Leucin erfolgte (Abschnitt 5.2.9). Weiterhin ließ der Vergleich der Inhalatoren kleinere Abweichungen auf den verschiedenen Stages erkennen. Solche Unterschiede sind relevant, wenn man zielgerichtet bestimmte Regionen oder auch Zellen in der Lunge targetieren möchte. Für eine Targetierung des oberen Lungenbereiches bietet sich der

Cyclohaler an, da hier mehr Partikel auf den vorderen Stages als beim Unihaler abgeschieden werden. Der Unihaler dispergiert die Partikel hingegen besser als der Cyclohaler in eine Größe, die sich für die Applikation in der tiefen Lunge eignet.

5.2.7.2 Bestimmung der abgegebenen Dosis

Die Emitted dose, die abgegebene Wirkstoffmenge, wurde sowohl mit dem Unihaler als auch mit dem Cyclohaler bestimmt. Dafür wurden je Inhalator drei HPMC-Kapseln mit möglichst exakt 20 mg Formulierung gefüllt und mit dem Dosage Unit Sampling Apparatus (DUSA) bestimmt. Um die Ergebnisse untereinander vergleichen zu können, wurde die abgegebene Dosis prozentual auf die in die Kapsel eingewogene Ovalbuminmenge bezogen. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 5.14 aufgeführt.

Tabelle 5.14: Ergebnisse der Emitted dose Untersuchung für Unihaler und Cyclohaler

Messung	Emitted dose in % zur eingewogenen Menge	
	Unihaler	Cyclohaler
1	91,9	93,7
2	80,4	81,8
3	97,7	70,4
Mittelwert	90,0	82,0
Standardabweichung	8,8	11,7

Die Bestimmung der Emitted dose ergab, dass aus dem Unihaler 90% des eingewogenen Ovalbumins abgegeben wurden. Beim Cyclohaler waren es mit im Mittel 82% etwas weniger. Damit waren die Ergebnisse für den Unihaler etwas höher als erwartet, wobei angenommen wurde, dass wie bei der NGI-Untersuchung etwa 20% der Formulierung in Kapsel und Inhalator verbleiben und damit die abgegebene Dosis bei ca. 80% liegt. Für den Cyclohaler wurde eine abgegebene Dosis von etwa 85% erwartet. Dieser Erwartung entsprach der Mittelwert von 82% sehr gut.

Die Auswertung mit dem Student t-Test ergab allerdings, dass diese Unterschiede zwischen den Inhalatoren nicht signifikant ist, was auch an der in beiden Fällen hohen Standardabweichung liegt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich der Unihaler sehr gut und der Cyclohaler gut für Applikation einer Trockenpulverformulierung eignen. Die Standardabweichung sollte jedoch noch reduziert werden, um eine Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis zu erreichen. Eine Möglichkeit, das zu erzielen, ist die verbleibende Formulierungsmenge im Inhalator zu reduzieren, womit gleichzeitig die abgegebene Menge steigen würde. In dieser Arbeit wird die Eignung von L-Leucin für diesen Zweck untersucht.

5.2.8 Vergleichende Betrachtung der Inhalatoren

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Inhalatoren hinsichtlich ihrer Eignung für die Dispergierung der sprühgetrockneten Formulierung untersucht. Es handelt sich um zwei kapselbasierte Inhalatoren, die sich jedoch in einigen Eigenschaften unterscheiden (siehe Tabelle 5.15).

Tabelle 5.15: Unterschiede zwischen Cyclohaler und Unihaler

	Cyclohaler	Unihaler
Widerstand	niedrig	mittel
Flussrate bei 4 kPa Druckabfall	100 l/min	59 l/min
Kapselposition beim Inhalieren	um 90° gekippt	wie beim Einlegen
Kapselöffnungsmechanismus	Nadeln	Messer
Produkttyp	im Handel	Prototyp
Mundstück	geradlinig	gekrümmt

Der Widerstand korreliert mit der Flussrate, die benötigt wird, einen Druckabfall von 4 kPa über den Inhalator zu erreichen. Bei einem niedrigen Widerstand muss eine höhere Flussrate aufgebracht werden, als bei einem Inhalator mit größerem Widerstand. Dieser größere Widerstand erschwert eine Inhalation, sodass am Ende die respiratorische Anstrengung des Patienten für die Inhalation bei beiden Inhalatoren vergleichbar ist (de Boer, 1996). Allgemein gibt es jedoch keine klaren Hinweise, dass ein großer Widerstand einem niedrigen Widerstand überlegen ist oder andersherum (Newman, 2009).

Eine höhere Flussrate, wie im Fall des Cyclohalers, generiert auf der einen Seite mehr Feinpartikel, birgt aber auf der anderen Seite den Nachteil, dass ein größerer Anteil der Partikel bereits im Mund- und Rachenraum abgeschieden wird (de Boer, 1996). Dieses belegen ebenfalls die Ergebnisse in dieser Arbeit in

Abschnitt 5.2.7.1: Der Vergleich zwischen Unihaler und Cyclohaler ergab bei der aerodynamischen Charakterisierung (siehe Abbildung 5.24) eine höhere abge-schiedene Wirkstoffmenge in Rachen und Preseparator für den Cyclohaler.

Die Positionsänderung der Kapsel beim Cyclohaler zwischen dem Einlegen und der Inhalation, sowie die unterschiedlichen Öffnungsmechanismen, scheinen keinen Einfluss zu haben. Der Rückstand in der Kapsel war bei beiden Inhalatoren vergleichbar gering. Das Mundstück könnte hingegen einen Einfluss auf die Menge an Rückstand im Inhalator haben: Das Mundstück des Cyclohalers hat die Form eines Zylinders mit elliptischer Grundfläche und befindet sich direkt über der Wirbelkammer, nur durch eine Siebplatte von dieser abgetrennt. Dahingegen hat das Mundstück des Unihalers eine gekrümmte Form, sodass der Luftstrom mitsamt der Formulierung hinter der Siebplatte noch einer 90°-Krümmung folgen muss, bevor das Aerosol den Inhalator verlassen kann (Materialteil: Abbildung 3.12). Mit dieser 90°-Krümmung lässt sich vermutlich der höhere Inhalatorrückstand bei der aerodynamischen Unter-suchung im Vergleich zum Cyclohaler erklären (Abbildung 5.24).

Letztendlich konnten beide Inhalatoren ihre Eignung für die Dispergierung eines trockenen Pulvers unter Beweis stellen. Der Unihaler bietet noch in der Hinsicht einen Vorteil, dass er als Prototyp vorliegt und daher, im Gegensatz zum Cyclohaler, noch Änderungen oder Anpassungen vorgenommen werden können.

5.2.9 Optimierung der Formulierung durch L-Leucin-Zusatz

Im Hinblick auf die Feinpartikelfraktion und den MMAD war die bisherige Formulierung noch nicht optimal. Der Span nach Druckluftdispergierung zeigte mit einem mittleren Wert von 3,3 noch eine ebenfalls nicht optimale Verteilungs-breite auf (Abschnitt 5.2.6.2). Die Feinpartikelfraktion mit bisher ca. 30% sollte erhöht und der MMAD, der bisher etwa 4 µm betrug, verringert werden. Daher wurde untersucht, ob sich diese beiden Parameter durch Zusatz von L-Leucin optimieren lassen. L-Leucin sollte die Adhäsion an der Inhalatorwand sowie die Kohäsion reduzieren und so zu einer höheren Feinpartikelfraktion beitragen. L-Leucin wurde in der Redispergierlösung für die Nanopartikel gelöst und der Formulierung vor der Sprühtrocknung zugesetzt. Da L-Leucin sehr lipophil und daher nur mäßig wasserlöslich ist (24 g/l, Pharmazeutische Stoffliste, 2013),

musste darauf geachtet werden, dass durch den Zusatz nicht die guten Redispersiereigenschaften der Formulierung reduziert wurden. Denn bereits nach Zusatz von 1% (m/V) L-Leucin wurde durch die Lipophilie des Leucins eine schlechtere Benetzbarkeit des sprühgetrockneten Pulvers festgestellt.

Als erster Ansatz wurde der Redispersierlösung 1% (m/V) L-Leucin zugesetzt. Das bedeutete, dass die Masse an Matrixbestandteilen, bisher 1% PVA, verdoppelt wurde, wodurch die Konzentration an Nanopartikeln in der Matrix halbiert wurde. Um diese Änderung auszugleichen, müsste man zur Applikation derselben Antigenmenge die doppelte Menge an Formulierung einsetzen. Trotz dieses offensichtlichen Nachteils wurde die Formulierung mit 3 bar trocken dispergiert.

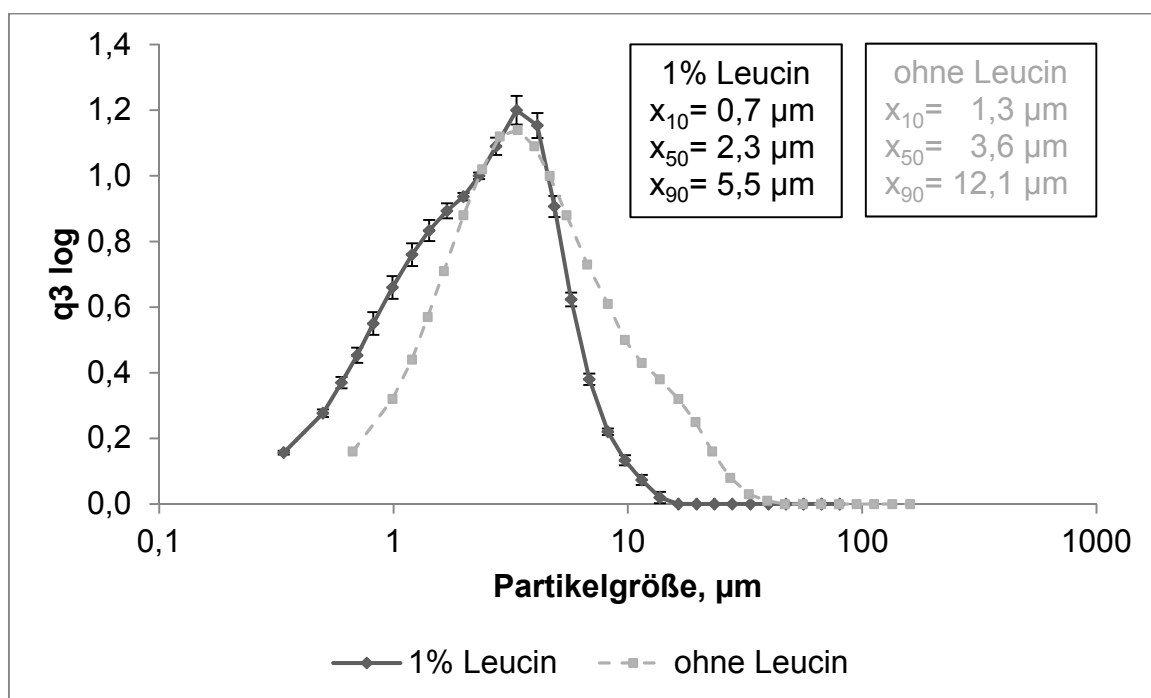


Abbildung 5.25: Partikelgrößenverteilung nach Zusatz von 1% (m/V) L-Leucin im Vergleich zu einer Formulierung ohne L-Leucin (Doppelemulsionsmethode, Druckluftdispergierung mit 3 bar, n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Abbildung 5.25 zeigt die erwartete Verbesserung der Partikelgrößenverteilung. Es wurden sowohl die mittlere Partikelgröße mit 2,3 µm im Vergleich zu 3,5 µm für die Formulierung ohne L-Leucin, als auch der Span mit 2,1 im Vergleich zu 3,3 (Abschnitt 5.2.6.2) deutlich reduziert und damit verbessert. Trotz der besseren Ergebnisse bei der Druckluftdispergierung hatte der Zusatz von 1% (m/V) L-Leucin den entscheidenden Nachteil, dass das Verhältnis von Nanopartikeln zu Matrixbestandteilen durch diesen Zusatz im Vergleich zu der

Formulierung ohne L-Leucin fast halbiert wurde. Da vor allem bei den aerodynamischen Charakterisierungen bereits mit der Formulierung ohne Leucin nur sehr geringe Antigenmenge zu detektieren waren, machte diese Verringerung der Antigenmenge eine zuverlässige Antigendetektion mit den genutzten Verfahren praktisch unmöglich. In Folge dessen wurde der Ansatz mit 1% (m/V) L-Leucin nicht weiter charakterisiert und stattdessen in einem neuen Formulationsansatz die L-Leucin-Konzentration auf 0,01% (m/V) in der Redispergierlösung reduziert. Damit hatte das L-Leucin praktisch keinen Einfluss mehr auf das Verhältnis von Nanopartikel zu Matrixbestandteilen.

Nach der Sprühtrocknung wurden die Partikelgrößenverteilungen nach Druckluftdispergierung mit 3 bar und nach Inhalerdispergierung bestimmt, sowie die Feinpartikelfraktion und der MMAD ermittelt. Abbildung 5.26 zeigt, dass der x_{50} -Wert bei der Formulierung mit 0,01% L-Leucin mit 2,6 μm etwas höher liegt als bei Zusatz von 1% L-Leucin. Der Span betrug für diese Formulierung 2,3. Damit wurde auch mit 0,01% Leucin gegenüber der Formulierung ohne L-Leucin eine deutlich engere Partikelgrößenverteilung erreicht.

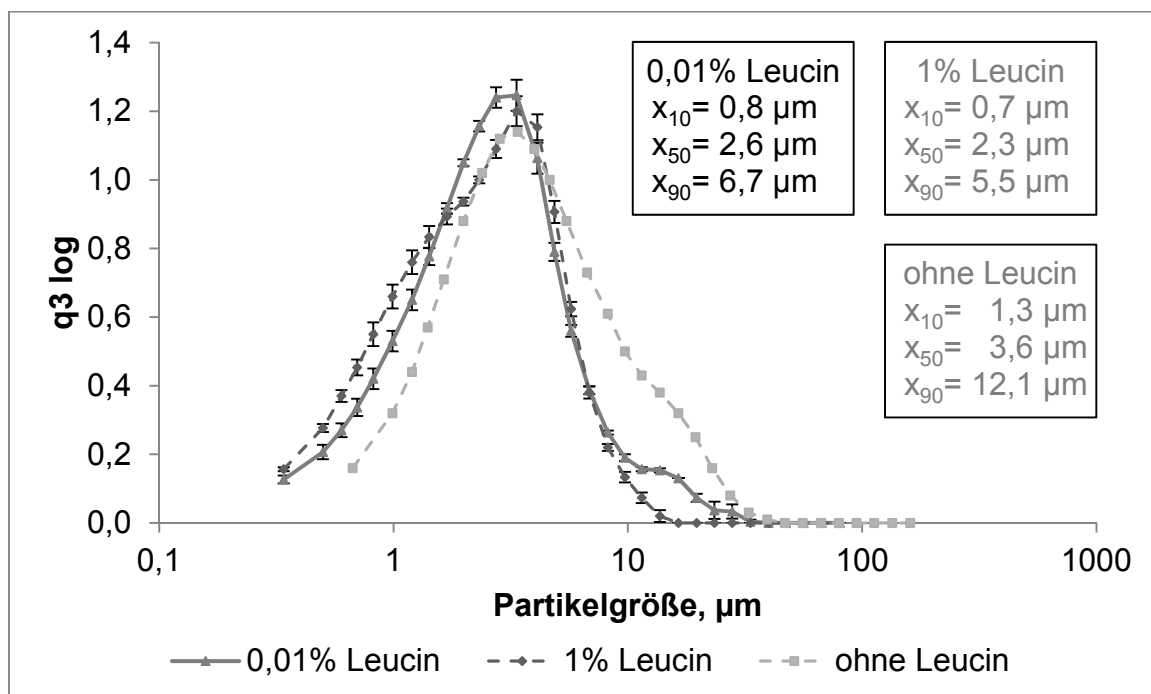


Abbildung 5.26: Partikelgrößenverteilung nach Zusatz von 0,01% (m/V) L-Leucin im Vergleich zu Formulierungen mit 1% (m/V) und ohne L-Leucin (Doppelemulsionsmethode, Druckluftdispergierung mit 3 bar, $n=3$, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung bei Inhalerdispergierung wurde der Cyclohaler verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.27 für einen Ansatz ohne L-Leucin und einen mit Zusatz von 0,01% L-Leucin dargestellt. Der x_{50} -Wert ist für die Formulierung mit 0,01% L-Leucin mit 4,0 μm deutlich höher als nach Druckluftdispergierung und etwas höher als für die Formulierung ohne Leucin. Der Span beträgt für die Formulierung mit 0,01% L-Leucin 2,3 und ist damit mit dem ermittelten Span von 2,4 für die Formulierung ohne Leucin vergleichbar. Diese Formulierung ist für die Cyclohalerdispergierung noch nicht optimal. Allgemein verschiebt sich zwar die Partikelgrößenverteilung nach Leucinzusatz zu etwas kleineren Werten, aber offensichtlich sind in der Formulierung noch größere Agglomerate enthalten, die vom Cyclohaler nicht aufgebrochen werden konnten.

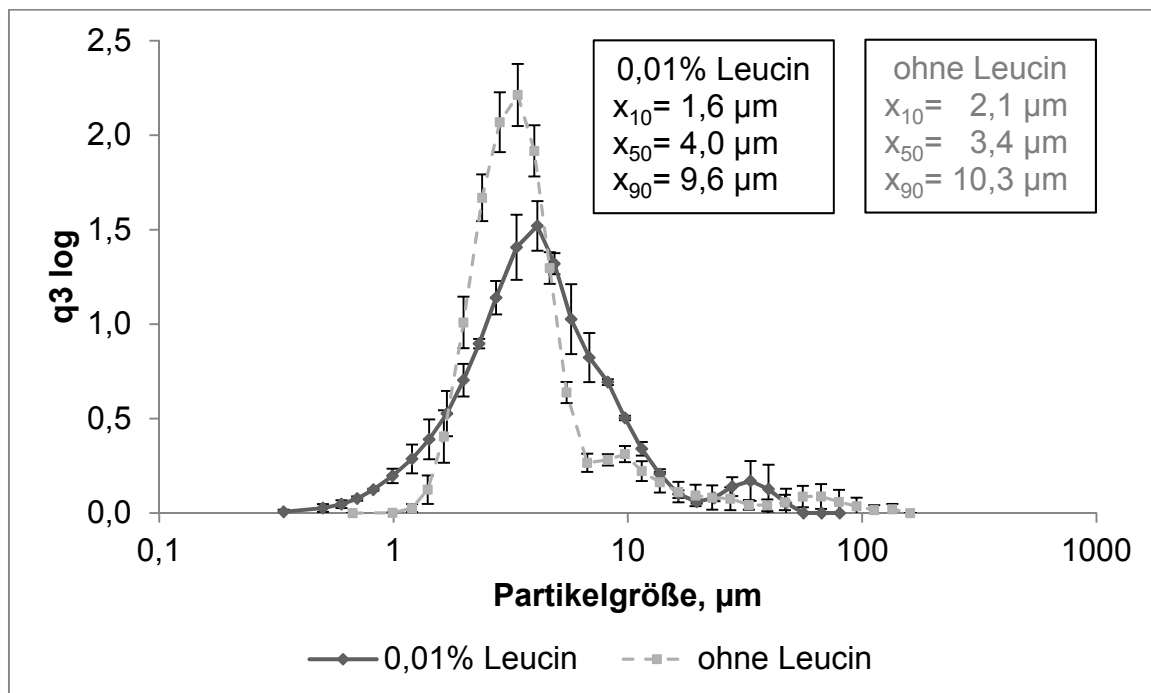


Abbildung 5.27: Partikelgrößenverteilung nach Zusatz von 0,01% (m/V) L-Leucin im Vergleich zu einer Formulierung ohne L-Leucin (Doppelemulsionsmethode, Cyclohalerdispergierung, $n=3$, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Als Nächstes wurde die Auswirkung des Leucin-Zusatzes auf die aerodynamischen Eigenschaften der Formulierung untersucht. Dafür wurde ebenfalls der Cyclohaler als Inhalator verwendet.

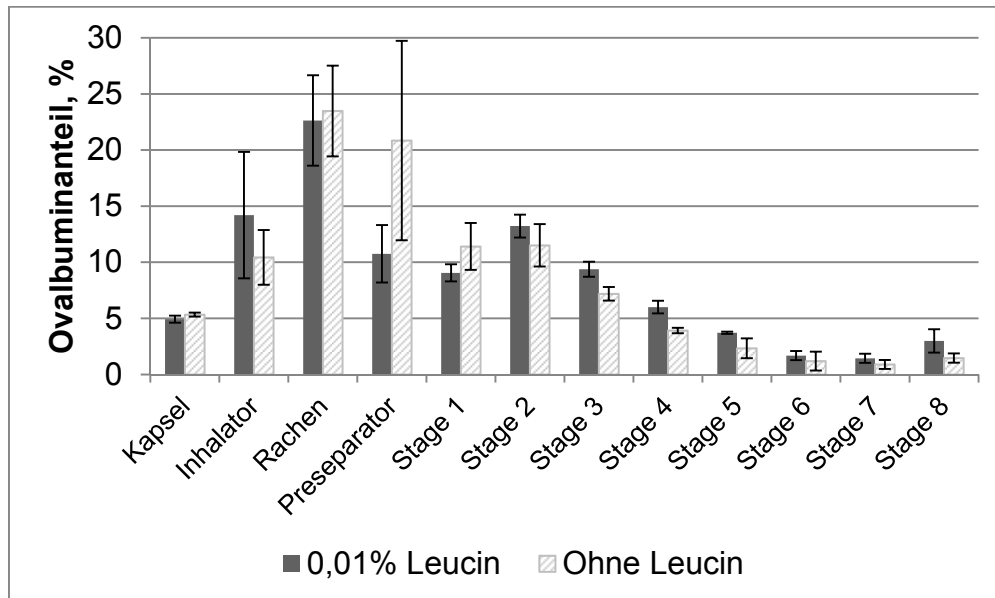


Abbildung 5.28: Ergebnis der NGI-Untersuchung nach Zusatz von 0,01% (m/V) L-Leucin im Vergleich zu einer Formulierung ohne L-Leucin (Doppelemulsionsmethode, Cyclohaler, n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Das Histogramm in Abbildung 5.28 stellt die Verteilung des Ovalbumins über die einzelnen Fraktionen dar. Der Vergleich mit der Formulierung ohne Leucin (Abschnitt 5.2.7.1) zeigt, dass deutlich weniger Ovalbumin im Preseparator impaktiert und dafür mehr auf die Stages gelangt ist. Dieses belegen auch die mit 44% statt 29% deutlich höhere Feinpartikelfraktion und der entsprechend kleinere MMAD von 3,1 μm statt 3,9 μm .

Somit führte der Zusatz von 0,01% (m/V) L-Leucin zur Redispergierlösung zu einer deutlich größeren Feinpartikelfraktion, einem kleineren MMAD, sowie einer engeren Partikelgrößenverteilung. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die erwünschte Reduktion des Inhalatorrückstands nicht erzielt werden konnte, da auch bei Zusatz von 0,01% (m/V) L-Leucin noch größere Partikel vorlagen, die bereits im Inhalator abgeschieden wurden. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass durch Zusatz von L-Leucin eine größere Antigenmenge die Lunge erreichen kann.

5.2.10 Freisetzung

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten, dass die entwickelte Formulierung eine geeignete Partikelgröße für die pulmonale Applikation aufweist. Ziel des nächsten Schritts war es, die Antigenfreisetzung aus der Formulierung zu untersuchen. Eine ideale Formulierung setzt möglichst viel Antigen innerhalb von 24 Stunden nach Aufnahme durch immunkompetente Zellen frei. Daher wurden die Proben ebenfalls über 24 Stunden, sowohl in Phosphatpuffer mit pH 5,5 als auch mit pH 7,4, freigesetzt.

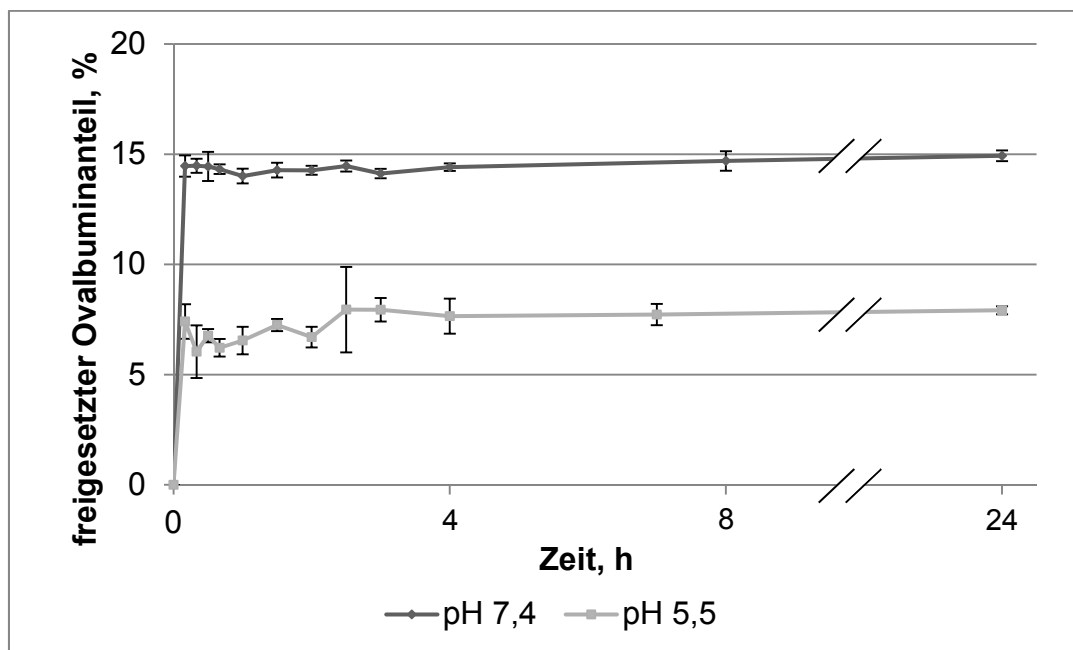


Abbildung 5.29: Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchung bei pH 7,4 und pH 5,5 (n=2, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Abbildung 5.29 zeigt den Vergleich der Freisetzung bei pH 5,5 und 7,4. Nach 24 Stunden wurden in PBS pH 7,4 ca. 15% und in pH 5,5 nur etwa 8% des verkapselten Ovalbumins freigesetzt. Bei pH 7,4 zeigte sich in den ersten zehn Minuten ein starker Bursteffekt bei dem etwa 14,5% des Ovalbumin freigesetzt wurden. Danach trat ein Plateau auf und es folgte nur eine minimale weitere Freisetzung. Bei pH 5,5 sind die Ergebnisse ähnlich. Auch hier waren bereits nach zehn Minuten etwa 6% des Ovalbumins freigesetzt. Die weitere Freisetzung fand innerhalb von drei Stunden statt, bevor ebenfalls ein Plateau erreicht wurde. Der Bursteffekt lässt sich auf an der Oberfläche der Partikel adsorbiertes oder auch direkt in der Oberfläche eingebautes Ovalbumin zurückführen. Durch den Waschschrift wurde freies Ovalbumin aus dem Ansatz entfernt. Dennoch ist weiterhin ein gewisser Anteil an der Partikeloberfläche adsorbiert. Dieses

adsorbierte Ovalbumin wird rasch von der Oberfläche gelöst. Da das PLGA nicht innerhalb von 24 Stunden degradiert, kann das in den Partikeln verkapselte Ovalbumin kaum freigesetzt werden und es tritt eine Plateauphase ein.

Um die Ergebnisse der Ovalbuminfreisetzung besser vergleichen zu können, wurden diese auf 100 mg Polymer normiert. Die Ergebnisse stellt Abbildung 5.30 dar.

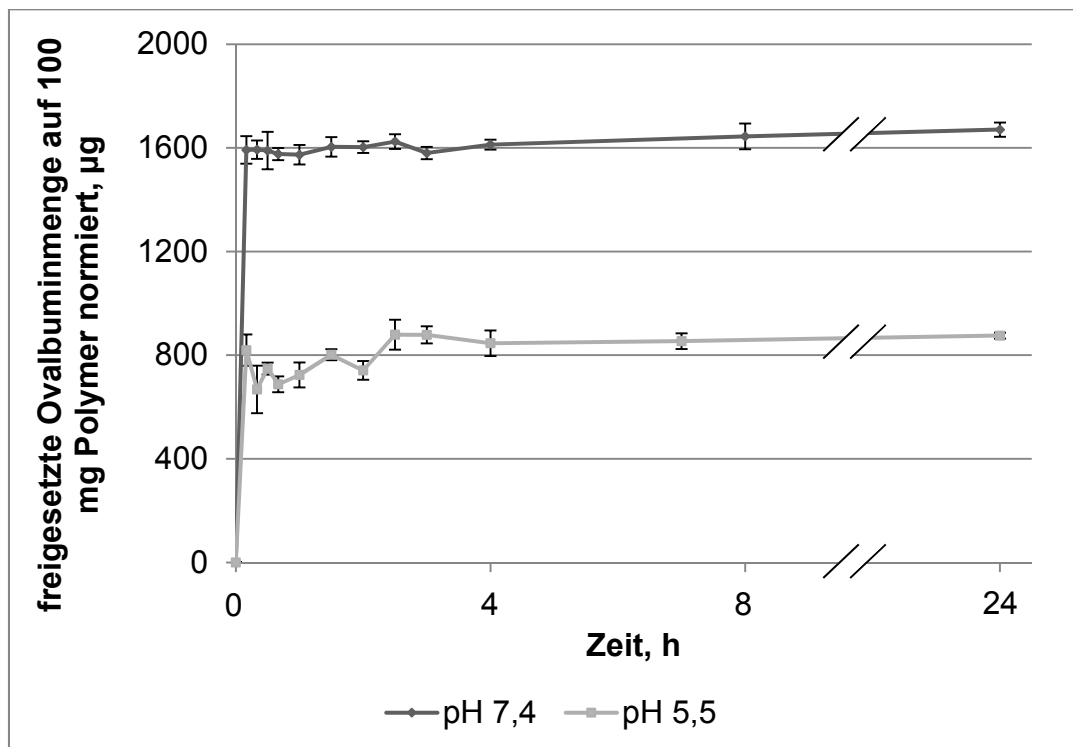


Abbildung 5.30: Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchung bei pH 7,4 und 5,5 (auf 100 mg Polymer normiert, n=2, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Die Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen sind deutlich zu erkennen. Innerhalb von 24 Stunden setzten die Partikel bei pH 7,4 etwa doppelt so viel Ovalbumin als bei pH 5,5 frei. Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied ist, dass das Ovalbumin bei pH 5,5 zum Teil ausfiel und durch Zentrifugation abgetrennt wurde. Somit konnte es nicht mehr im Überstand detektiert werden und führte zu einem geringeren Freisetzungsergebnis. Eine Möglichkeit, ein zu geringes Freisetzungsergebnis zu verhindern, wäre, die Probelösung nach der Freisetzung zu neutralisieren, sodass ausgefallenes Ovalbumin wieder in Lösung geht, und im direkten Anschluss daran die Partikel abzuzentrifugieren. Damit besteht die Möglichkeit das gesamte freigesetzte Ovalbumin zu erfassen.

Letztendlich sind diese Ergebnisse zwar für den Vergleich von Formulierungen wichtig, haben aber in-vivo weniger Relevanz, da dort weitere Faktoren, wie z.B. Enzyme, die Freisetzung positiv beeinflussen können.

In der Literatur sind ähnliche Freisetzungsprofile für PLGA-Partikel beschrieben. Silva (2013) erhielt ein ähnliches Profil, wobei ebenfalls PLGA-Nanopartikel, in denen Ovalbumin verkapselt war, in PBS 7,4 freigesetzt wurden. Slütter (2010) setzte in PLGA-Nanopartikel verkapseltes Ovalbumin über 25 Tage in PBS pH 7,4 mit 0,01% Tween 20 frei und konnte nach diesen 25 Tagen 80% des verkapselten Ovalbumins freisetzen. Daher wird mehr Zeit notwendig sein, um das PLGA zu degradieren und somit das verkapselte Ovalbumin freizusetzen.

Für eine erfolgreiche Immunisierung ist im Endeffekt die absolut freigesetzte Menge entscheidend. Butts (2013) publizierte eine Studie zum Einsatz von Stimuvax (Merck), eine ebenfalls therapeutische Vakzine, in einer Phase III-Studie zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms. Dabei wurden 806 µg des Lipopeptids Tecemotide subcutan appliziert. In einer anderen Studie wurde ermittelt, dass für eine mukosale Vakzinierung eine 10-fach höhere Dosis im Vergleich zur parenteralen Applikation benötigt wird (Drabrick, 1999). Daher ist es sehr wichtig, eine möglichst große Antigenmenge aus der Formulierung wieder freizusetzen. Denn dies bedeutet wiederum, dass bei einer Formulierung mit einer größeren Freisetzungseffizienz für den gleichen Effekt weniger Menge zu applizieren ist als bei einer Formulierung mit einer geringen Freisetzungseffizienz.

Zusammenfassend blieben die Freisetzungsergebnisse hinter den Erwartungen an eine gute Formulierung, bei der eine möglichst vollständige Freisetzung innerhalb von 24 Stunden erreicht werden sollte, zurück. Daher wurden die Nanopartikel hinsichtlich ihrer Freisetzung optimiert. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden in dieser Arbeit poröse Partikel entwickelt (Abschnitt 5.3). Poröse Partikel haben den Vorteil, dass das Freisetzungsmedium durch die Poren in das Innere der Partikel gelangen und dort das Ovalbumin herauslösen kann. Weiterhin kann die Degradation des PLGA beschleunigt werden, da ein Abbau des PLGA zeitgleich von Innen und Außen erfolgen kann.

5.2.11 Partikelvisualisierung

Für die Visualisierung der Nanopartikel ist ein Lichtmikroskop aufgrund der geringen Partikelgröße nicht geeignet. Daher wurden die Rasterelektronenmikroskopie (REM) und die Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM) eingesetzt. Mit der Rasterelektronenmikroskopie lassen sich die Partikelgröße und die Partikelmorphologie sehr gut visualisieren. Da die Partikel allerdings mit Gold gesputtert werden, lässt sich die Oberflächenstruktur nicht mehr im Detail erkennen. Für eine genauere Visualisierung der Oberfläche wurde diese mit der Rasterkraftmikroskopie untersucht. Mithilfe der beiden Methoden wurden die Partikel und ihre Oberflächenstruktur analysiert und die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung verifiziert.

Abbildung 5.31 zeigt eine REM-Aufnahme der Nanopartikel nach Redispergierung des trockenen Pulvers in Wasser. Es lässt sich erkennen, dass die größeren Partikel ca. 300 nm groß sind und dass einige kleinere Partikel mit einer Größe von etwa 150 nm vorhanden sind.

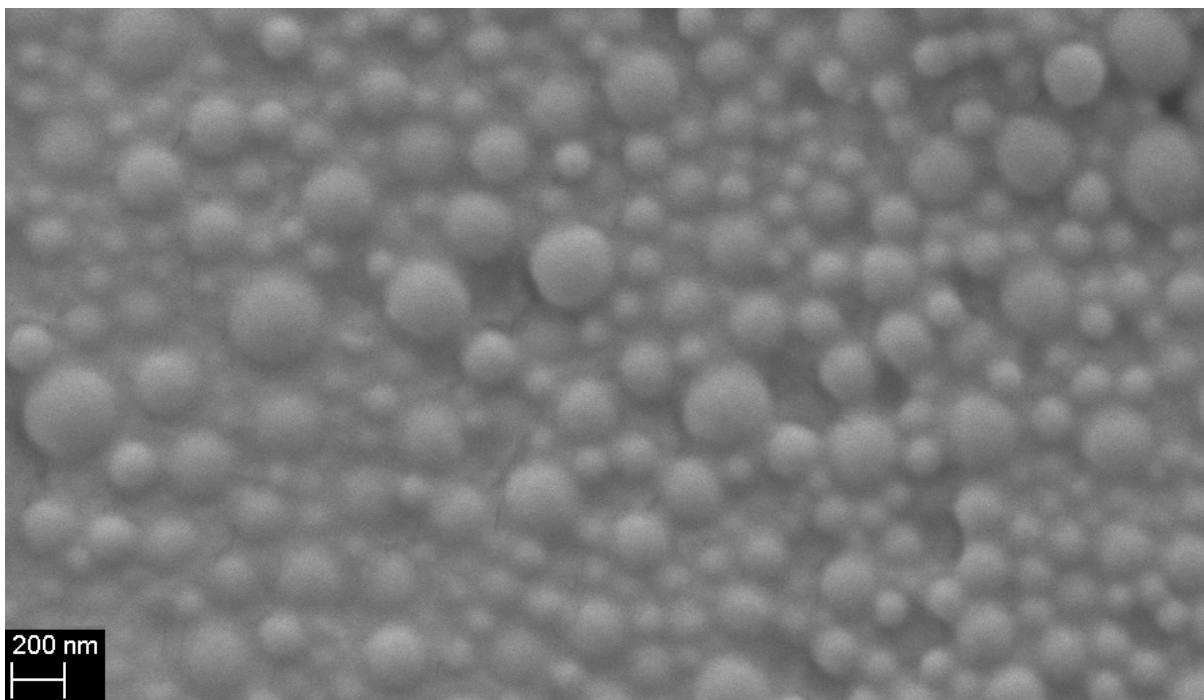


Abbildung 5.31: REM-Bild der Nanopartikel (Doppelemulsionsmethode, 74.000-fache Vergrößerung)

Zudem wurde das sprühgetrocknete Pulver mit der Rasterelektronenmikroskopie aufgenommen (Abbildung 5.32). Die auf dem Bild zu erkennenden Partikel besitzen alle eine sehr runde Form und weisen eine sehr gleichmäßige Oberfläche auf. Ihre Größe liegt in einem Bereich, der dem bei der Druckluftdispergierung ermittelten entspricht. Neben einigen größeren Partikeln mit einer Größe von etwa 4 μm im Durchmesser liegen auch etliche kleinere Partikel, mit einem Durchmesser unter 1 μm vor. Letztendlich zeigt die Aufnahme, wie auch die Ergebnisse der Druckluftdispergierung eine relativ breite Partikelgrößenverteilung.

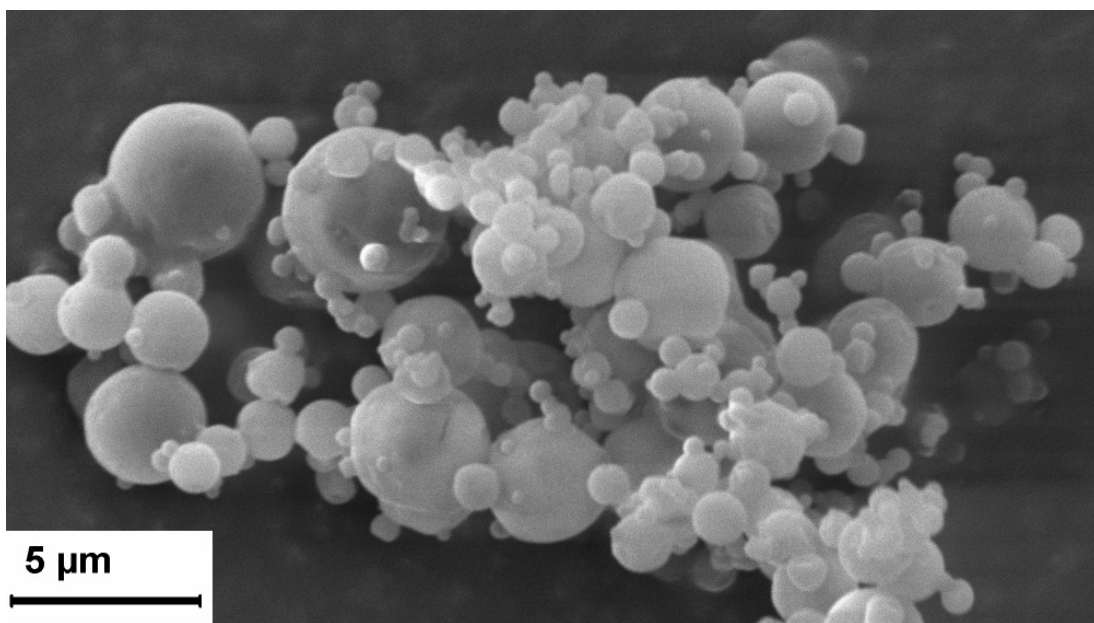


Abbildung 5.32: REM-Bild der sprühgetrockneten Formulierung (Doppelemulsionsmethode, 3000-fache Vergrößerung)

Die Oberfläche der Nanopartikel wurde zusätzlich mithilfe des Rasterkraftmikroskops (AFM) untersucht (Abbildung 5.33). Das Bild, das von Afra Torge (Phillips-Universität Marburg) aufgenommen wurde, zeigt, dass die Partikel eine glatte Oberfläche aufweisen und die Größe der mit dem REM ermittelten Größe entspricht.

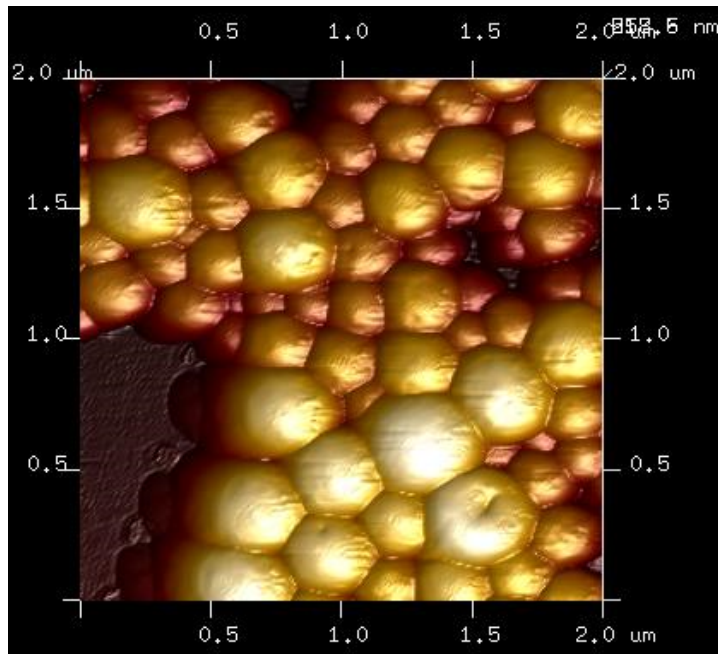


Abbildung 5.33: AFM-Bild der Nanopartikel (Doppelemulsionsmethode)

5.2.12 Ermittlung der Restlösemittelmenge

Ethylacetat ist für den menschlichen Körper schädlich. Daher wurde eine Formulierung nach der Herstellung über die Doppelemulsionsmethode auf Lösemittelreste untersucht. Die Analyse erfolgte mithilfe der Gaschromatographie (HP-5890 Series II Gas Chromatograph, Hewlett Packard, Wilmington, DE, USA).

Die Probe wurde mittels eines Splitinjektors im Verhältnis 1:3 injiziert und im Ofen verdampft. Die gasförmigen Bestandteile gelangten mit dem Trägergasstrom, Stickstoff 5.0 (Linde, Pullach, Deutschland), auf die Trennsäule (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland). Diese bestand aus Polyethylenglykol-2-nitroephtalsäureester, war 25 m lang und besaß einen Innendurchmesser von 0,25 mm, wobei die stationäre Phase eine Schichtdicke von 0,25 µm aufwies. Die Trennsäule wurde initial auf 45°C vorgeheizt und nach Injektion drei Minuten bei 45°C gehalten. Anschließend wurde mit 12°C/min auf 100°C aufgeheizt. Ein Flammenionisationsdetektor (FID) war der Trennsäule nachgeschaltet. Die organischen Substanzen wurden mit dem Trägergasstrom in die Knallgasflamme (Wasserstoff 5.0 und synthetische Luft, Linde, Pullach, Deutschland) des FID transportiert, dort thermisch ionisiert und die Veränderung der Leitfähigkeit der Knallgasflamme detektiert. Die Chromatogramme wurden mithilfe der Software ChemStation ausgewertet.

Für die Probenpräparation wurden 50 mg des sprühgetrockneten Pulvers in einer möglichst geringen Menge, 400 µl, Aqua bidest. suspendiert. Um möglicherweise enthaltenes Ethylacetat aus den Partikeln in die wässrige Phase zu extrahieren, wurde die Suspension zuerst zehn Minuten im Ultraschallbad beschallt und anschließend vier Stunden bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die Partikel abzentrifugiert und 3 µl des Überstands in die GC injiziert.

Als Kontrolle wurde reines Aqua bidest. injiziert. Dies diente dazu auszuschließen, dass Substanzen von der Säule gewaschen und detektiert werden.

Da zurückgebliebenes Ethylacetat detektiert werden sollte, wurde eine Ethylacetatlösung mit 2 ppm als Standard verwendet, sodass die Retentionszeit des Standards mit der Probe verglichen werden konnte. Zudem wurde eine Ethanolösung mit 2 ppm injiziert, um zu untersuchen, ob Ethanol, als Abbauprodukt des Ethylacetats in der Formulierung, enthalten war.

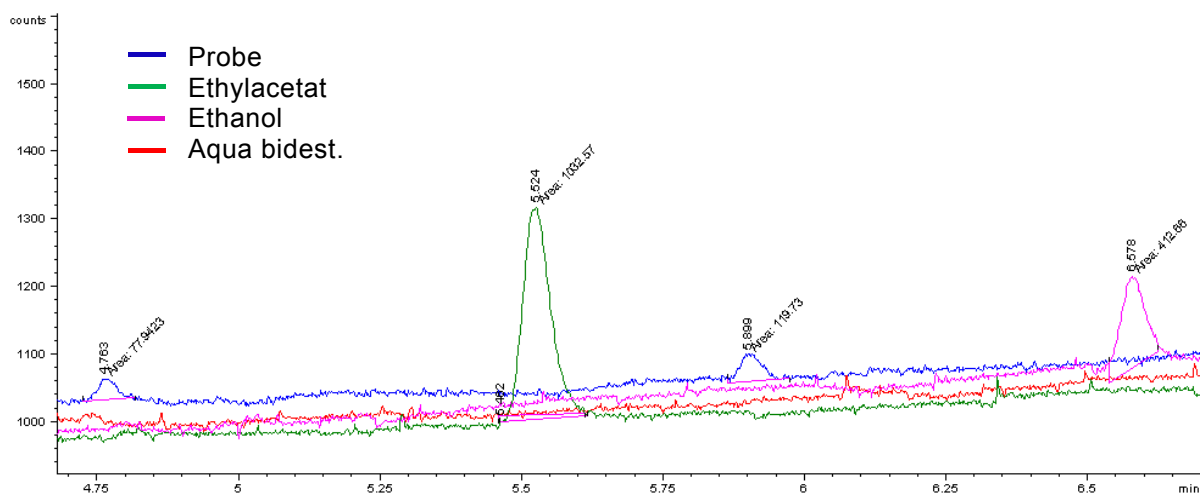


Abbildung 5.34: Ergebnis der GC-Untersuchung

Abbildung 5.34 stellt die Ergebnisse der GC-Untersuchung dar. Aqua bidest. zeigt bei dieser Untersuchung, wie erwartet, nur ein Rauschen und keine Peaks. Der Ethylacetatstandard weist bei einer Retentionszeit von 5,5 Minuten einen deutlichen Peak auf. Das Chromatogramm für den Ethanolstandard enthält bei einer Retentionszeit von 6,6 Minuten einen Peak. Das Chromatogramm der Probe zeigte hingegen weder bei einer Retentionszeit von 5,5 noch 6,6 Minuten einen Peak. Die Probe weist allerdings bei 4,8 und 5,9 Minuten Peaks auf, die jedoch keiner bestimmten Substanz zugeordnet werden können.

Infolge der gaschromatographischen Untersuchung kann die qualitative Aussage erfolgen, dass in der untersuchten Formulierung weniger als 1,6 ppb Ethylacetat

wie auch Ethanol enthalten sind. Da noch zu Beginn 6,4% (m/m) Ethylacetat in der Nanopartikeldispersion enthalten waren, konnte dieses durch die Herstellungsmethode erfolgreich entfernt werden.

5.2.13 Untersuchung der Langzeitstabilität

Nachdem die Formulierung in den vorangegangenen Versuchen optimiert und charakterisiert werden konnte, wurde eine Formulierung mit der in Tabelle 5.16 aufgeführten Zusammensetzung für die Untersuchung der Langzeitstabilität verwendet.

Tabelle 5.16: Zusammensetzung der eingelagerten Proben

Phase	Menge	Zusammensetzung
1. hydrophile Phase	1,6 ml	4% (m/V) OVA in Phosphatpuffer pH 7,4
Organische Phase	4 ml	2,5% (m/V) PLGA in Ethylacetat
2. hydrophile Phase	12 ml	5% (m/m) PVA in Wasser
Stabilisatorlösung	40 g	1% (m/m) PVA in Wasser
Redispergierlösung	50 g	1% (m/m) PVA in Wasser

Es wurden drei Chargen dieser Formulierung auf die gleiche Weise hergestellt und analog untersucht. Um ausreichend Probenmaterial zu erhalten, wurden pro Charge jeweils drei Ansätze hergestellt und direkt vor dem Sprühtrocknungsschritt vereinigt. Das sprühgetrocknete Pulver bestand zu ca. 17% (m/m) aus PLGA-Nanopartikeln und 83% (m/m) PVA. Nach der Sprühtrocknung wurden die Ansätze in je ein Schnappdeckelgefäß gefüllt, dicht verschlossen und bei Umgebungsbedingungen (Temperatur $21,0^{\circ}\text{C} \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ und relative Luftfeuchtigkeit von $32\% \pm 3\%$) eingelagert. Die Proben wurden zu vier definierten Zeitpunkten untersucht: direkt nach der Herstellung, nach 4 Wochen, 3 und 6 Monaten. Dabei wurden folgende Parameter analysiert: Die Redispergierbarkeit der Nanopartikel, die Partikelgröße sowohl bei Druckluftdispergierung mit 3 bar als auch aus dem Cyclohaler, die Feinpartikelfraktion und der massenbezogene mittlere aerodynamische Durchmesser (MMAD) sowie der Ovalbumingehalt der Formulierung. Für die Stabilitätsuntersuchungen wurde nur noch der Cyclohaler verwendet, da sich zwischen den Inhalatoren nur geringfügige Unterschiede gezeigt haben und der Cyclohaler nach dem Auswaschen leichter getrocknet werden konnte.

Die Ergebnisse wurden mit dem Student t-Test ausgewertet, um signifikante Veränderungen über die Lagerung zu ermitteln. Auf die Symbolik wird in Tabelle 4.1 im Methodenteil eingegangen.

5.2.13.1 Redispersierbarkeit der Nanopartikel

Dieser Test erfolgte analog zu Abschnitt 5.2.6.1. Die sprühgetrocknete Formulierung wurde in Aqua bidest. redispersiert und die Nanopartikelgröße und -verteilung mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelt.

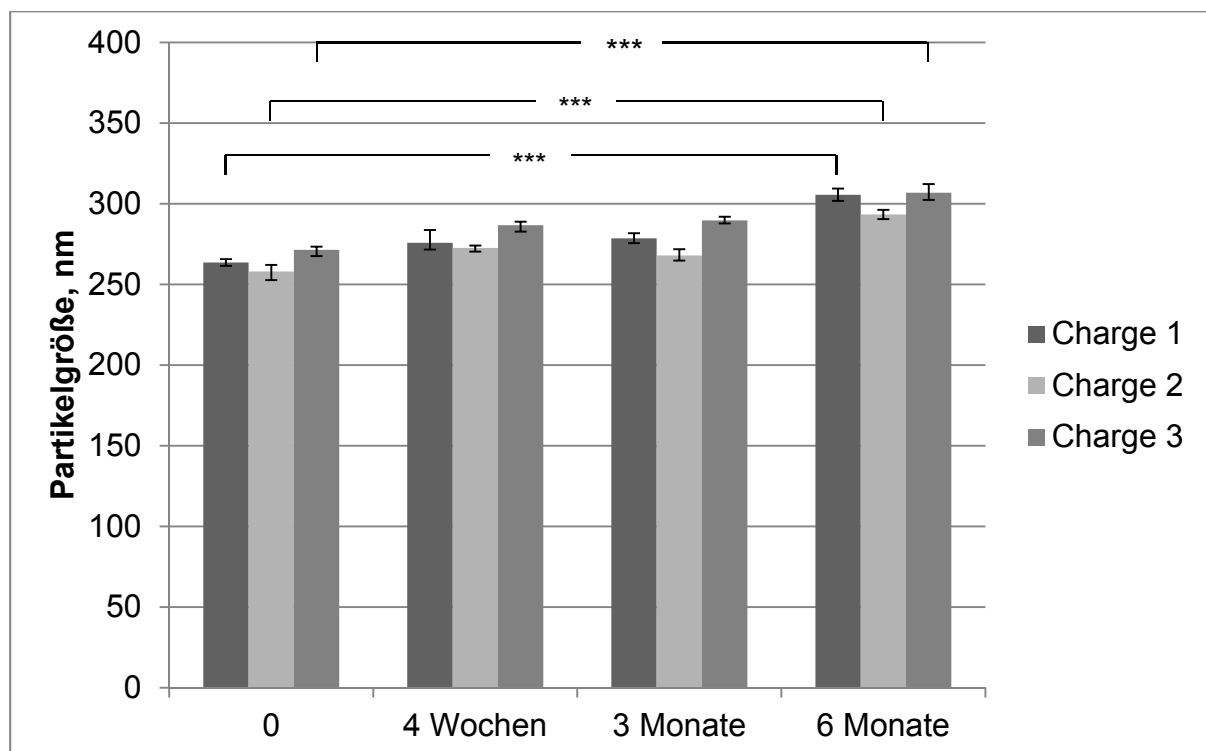


Abbildung 5.35: Nanopartikelgröße nach Redispersierung, Überprüfung der Langzeitstabilität (Doppelemulsionsmethode, Zetasizer, n=3, Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Abbildung 5.35 zeigt die mittleren Partikelgrößen der Nanopartikel nach Redispersierung aus dem sprühgetrockneten Pulver. Über den Zeitraum der Lagerung von 6 Monaten kam es für alle drei Chargen zu einer signifikanten Zunahme der Partikelgröße. Zu Beginn wiesen die Partikel eine Größe von im Mittel $265 \text{ nm} \pm 7 \text{ nm}$ auf, nach 6-monatiger Lagerung eine Größe von $300 \text{ nm} \pm 7 \text{ nm}$. Damit sind die Partikel auch nach 6 Monaten in einem Größenbereich, der sich für die Aufnahme durch dendritische Zellen eignet.

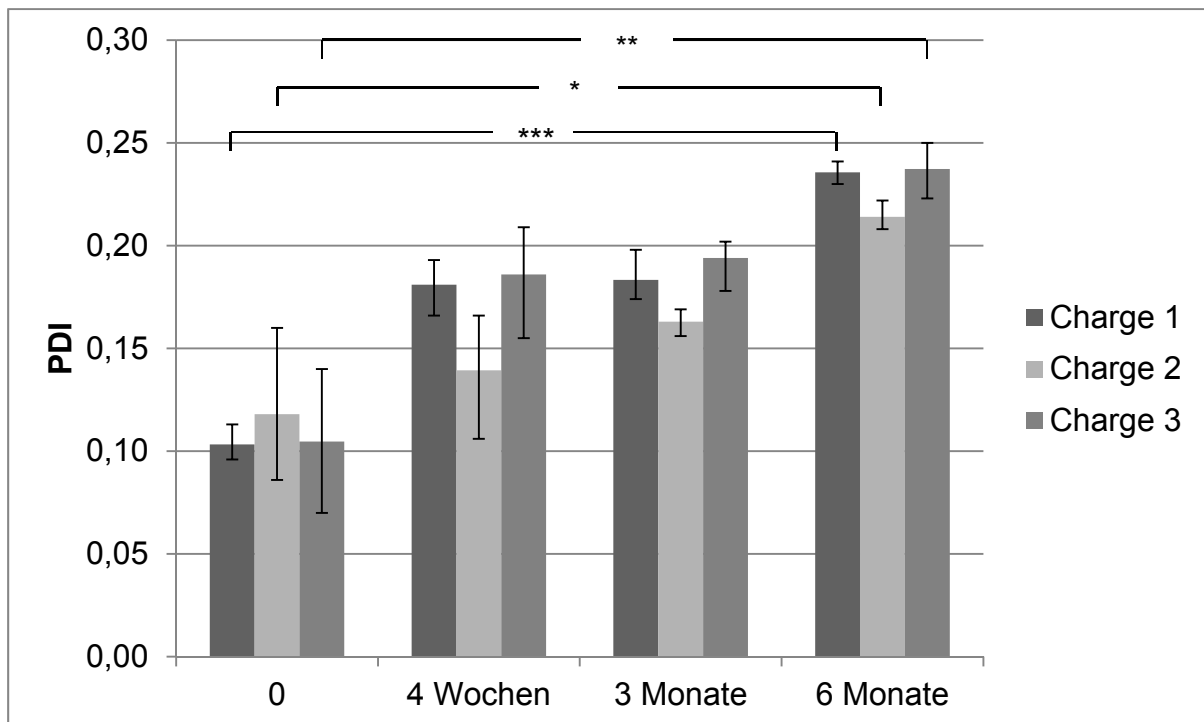


Abbildung 5.36: PDI nach Redispergierung, Überprüfung der Langzeitstabilität (Doppелеulsionsmethode, Zetasizer, n=3, Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Abbildung 5.36 stellt die Ergebnisse für den PDI dar. Analog zur Partikelgröße hat ebenfalls die Verteilungsbreite zugenommen. Zu Beginn lag der PDI im Mittel bei $0,11 \pm 0,03$, nach Lagerung über 6 Monate betrug er $0,23 \pm 0,01$. Die Zunahme ist für Charge 1 und 3 signifikant, für Charge 2 werden hingegen mehr Daten benötigt, um eine zuverlässige Aussage treffen zu können.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Redispergierbarkeit der Partikel über eine Lagerung von 6 Monaten im Vergleich zu den Daten zu Beginn abnimmt. Dennoch wurden auch nach 6 Monaten Nanopartikel erhalten, die eine für die Aufnahme durch dendritische Zellen geeignete Partikelgröße besitzen.

5.2.13.2 Partikelgrößenbestimmung des sprühgetrockneten Pulvers

Die Partikelgrößen wurden wie bereits in Abschnitt 5.2.6.2 mithilfe der Laserdiffraktometrie bestimmt. Dazu wurde die sprühgetrocknete Formulierung mit Druckluft und einem Druck von 3 bar dispergiert, was zu vollständig dispergierten Einzelpartikeln führt. Zum Vergleich wurde anschließend die Formulierung mit dem Cyclohaler dispergiert.

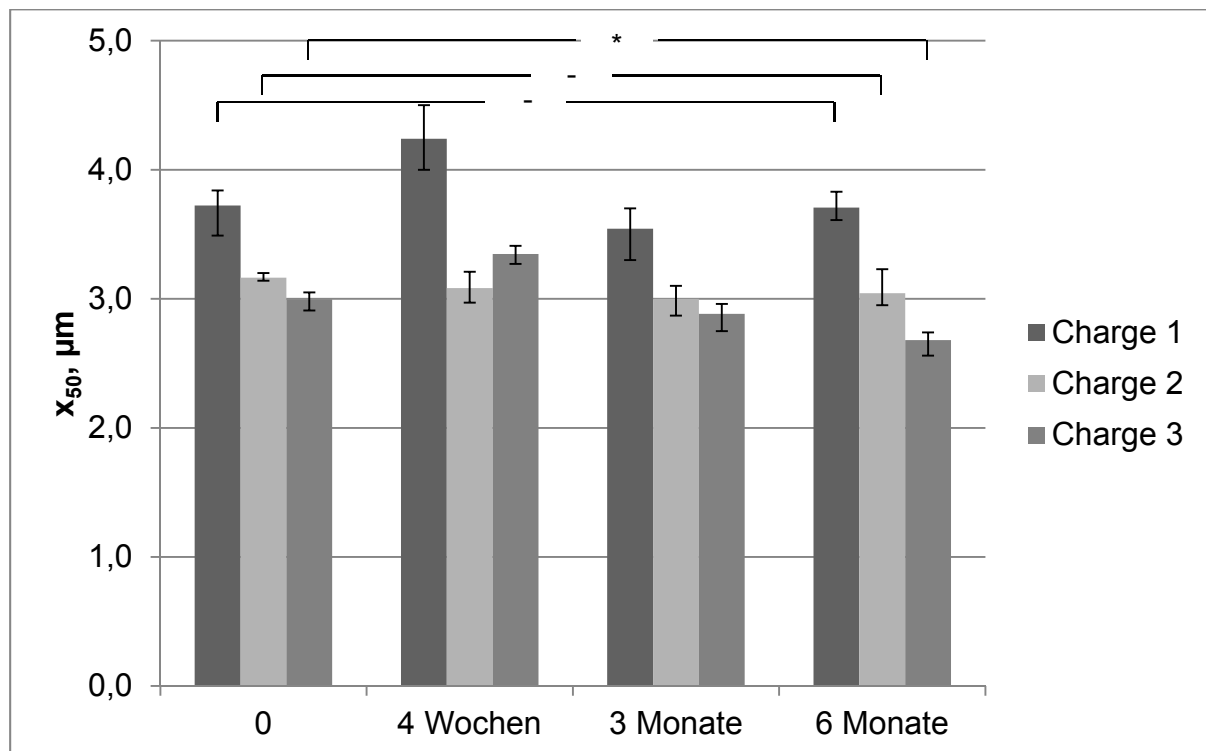


Abbildung 5.37: x_{50} -Werte nach Druckluftdispergierung mit 3 bar, Überprüfung der Langzeitstabilität (Doppelmulsionsmethode, $n=3$; Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Die Bestimmung der Partikelgrößen mittels Druckluft zeigte keine signifikante Änderung des x_{50} -Wertes über 6 Monate Lagerung (Abbildung 5.37). Die mittlere Partikelgröße betrug nach 6 Monaten zwischen 2,7 und 3,7 μm , zu Beginn waren es 3,0 bis 3,7 μm .

Aus den Ergebnissen der Partikelgrößenverteilung wurde der Span berechnet. Die Ergebnisse stellt Abbildung 5.38 dar. Wie zuvor bei den x_{50} -Werten ergaben sich durch die Lagerung keine signifikanten Veränderungen. Allerdings sind die Partikel mit einem Span von etwa 3,5 sehr breit verteilt. Durch Zusatz von L-Leucin vor der Sprühtrocknung ist eine Verbesserung der Verteilungsbreite zu erwarten.

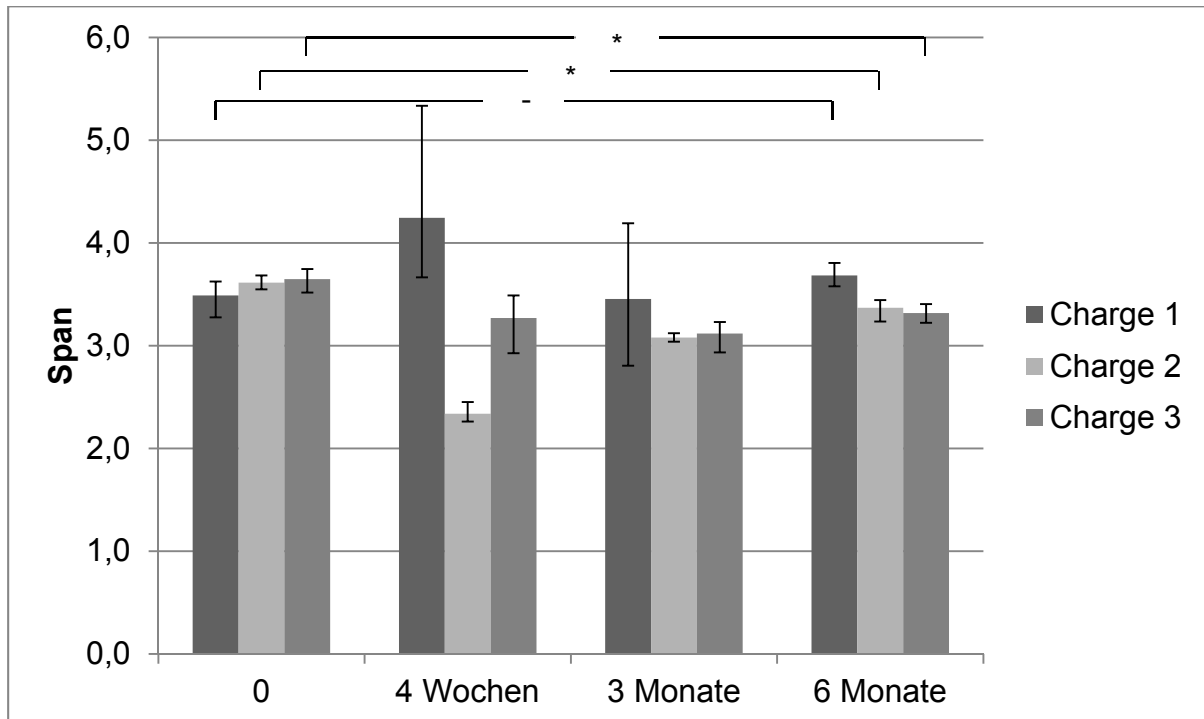


Abbildung 5.38: Span nach Druckluftdispergierung mit 3 bar, Überprüfung der Langzeitstabilität (Doppelemulsionsmethode, n=3; Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Um die mittlere Partikelgröße, sowie die Verteilungsbreite nach Inhalator-dispergierung zu bestimmen, wurden Kapseln mit 20 mg der sprühgetrockneten Formulierung gefüllt und mit dem Cyclohaler dispergiert. Die resultierenden Partikelgrößen wurden mit der Laserdiffraktometrie bestimmt und sind in Abbildung 5.39 und Abbildung 5.40 dargestellt.

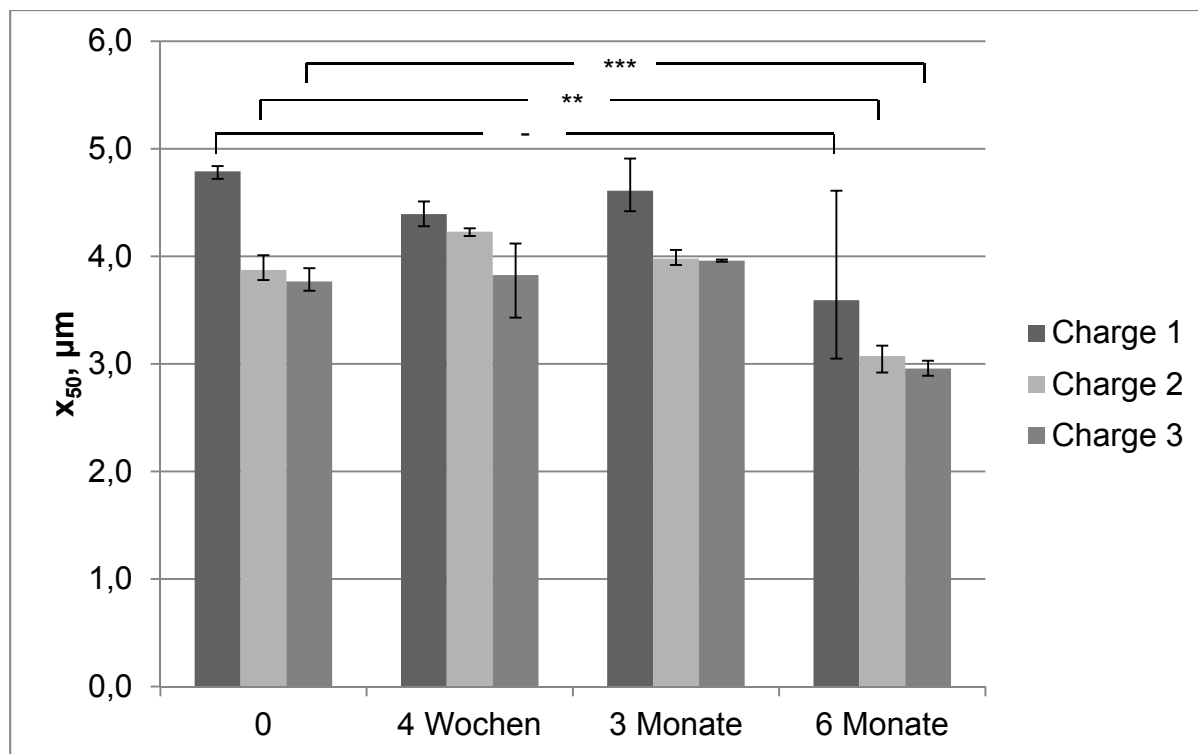


Abbildung 5.39: x_{50} -Werte nach Dispergierung aus dem Cyclohaler, Überprüfung der Langzeitstabilität (Doppelmulsionsmethode, $n=3$; Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Abbildung 5.39 zeigt die Ergebnisse für den x_{50} -Wert. Es wurde eine mittlere Partikelgröße ermittelt, die sich potentiell für die pulmonale Applikation eignet. Der Vergleich der Ergebnisse nach 6 monatiger Lagerung ergibt für die Charge 2 und 3 eine signifikante Abnahme der Partikelgröße. Für Charge 1 ist eine Tendenz zu kleineren Partikeln zu erkennen, allerdings ist diese nicht signifikant. Letztlich weisen die Partikel nach 6 Monaten Lagerung eine Größe, wie sie auch mittels Druckluftdispergierung ermittelt wurde, auf (Abbildung 5.37). Die Annahme, dass das Pulver nach einer Druckluftdispergierung mit 3 bar vollständig dispergiert vorliegt, bedeutet für die Cyclohalerdispergierung, dass das Pulver nach 6 Monaten ebenfalls vollständig vom Inhalator dispergiert wurde. Diese Abnahme der Partikelgröße, sowie das bessere Dispergierverhalten, können daraus resultieren, dass die Lagerung bei einer

Luftfeuchtigkeit von etwa 33% erfolgte. Dadurch kann noch Restfeuchtigkeit entzogen worden sein, sodass sich Agglomerate, die noch zu Beginn der Lagerung vorhanden waren, nach 6 Monaten besser aufbrechen lassen und damit die Formulierung besser zu dispergieren ist.

In der Abbildung 5.40 sind die Ergebnisse für den Span nach Cyclohalerdispergierung grafisch dargestellt. Auch hier lässt sich tendenziell eine Abnahme des Spans erkennen, was auf eine schmalere werdende Partikelgrößenverteilung hinweist. Allerdings ist dieser Effekt für alle drei Chargen nicht signifikant, da zu Beginn recht hohe Abweichungen ermittelt wurden. Nach 6 Monaten Lagerzeit sind die Abweichungen nur noch sehr gering und der Span liegt mit knapp 1,0 in einem hervorragenden Bereich. Die Partikel sind damit sehr gleichmäßig verteilt. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Druckluftdispergierung (Abbildung 5.38), bei denen ein Span nach 6 Monaten von etwa 3 ermittelt wurde, bedeutet dieses Ergebnis, dass der Cyclohaler zu gleichmäßigeren Partikelgrößen führte.

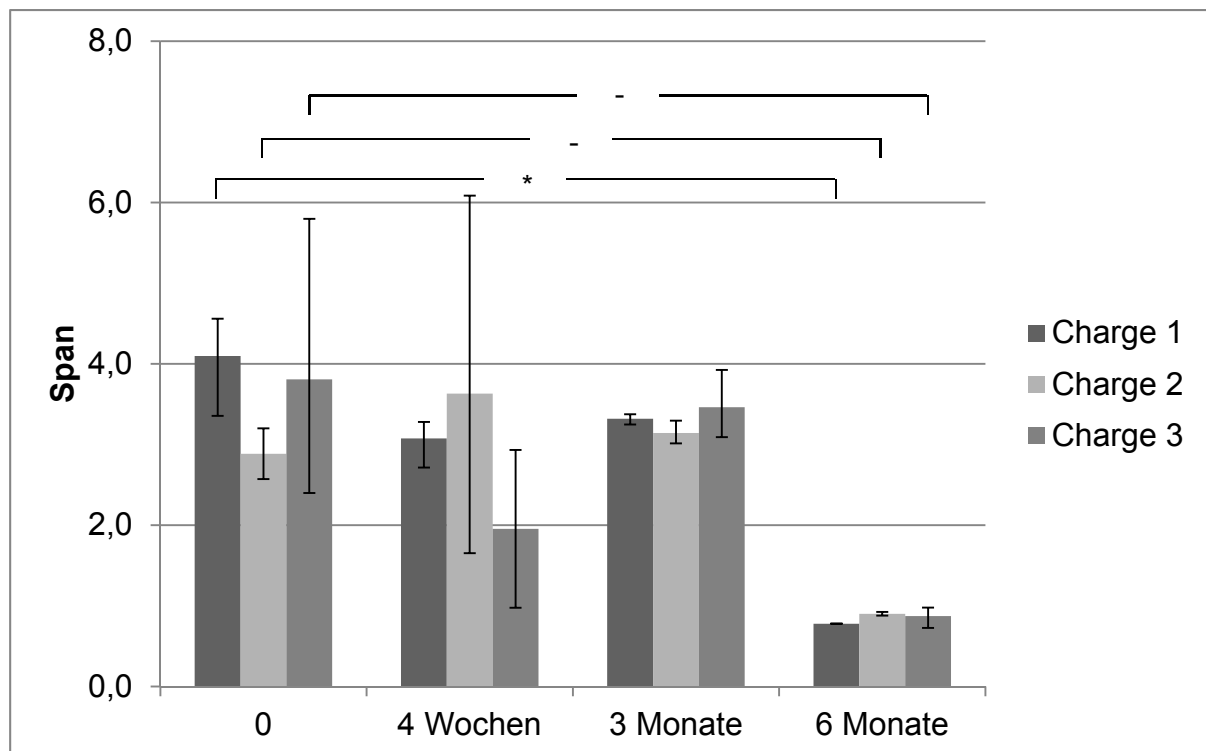


Abbildung 5.40: Span nach Dispergierung aus dem Cyclohaler, Überprüfung der Langzeitstabilität (Doppelemulsionsmethode, n=3; Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Die Ergebnisse der Cyclohalerdispergierung zeigen, dass die Partikel durch die Lagerung etwas kleiner werden und der Span abnimmt.

5.2.13.3 Aerodynamische Charakterisierung

Aerodynamische Charakterisierungen der Formulierungen wurden mithilfe des NGI durchgeführt. Dafür wurde das sprühgetrocknete Pulver nach den definierten Zeitpunkten in Kapseln gefüllt und mit dem Cyclohaler dispergiert. Anschließend wurde der Ovalbumingehalt auf den unterschiedlichen Stufen des NGI bestimmt und daraus die Feinpartikelfraktion (FPF) sowie der mittlere massenbezogene aerodynamische Durchmesser (MMAD) berechnet.

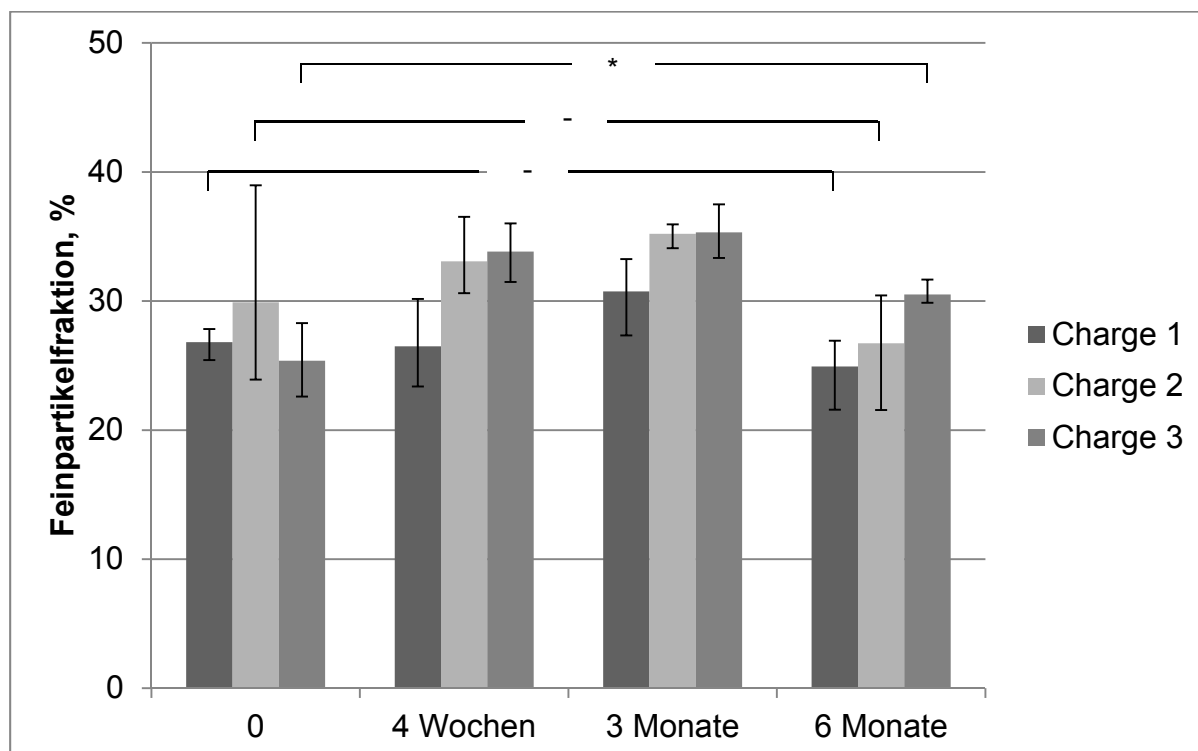


Abbildung 5.41: Feinpartikelfraktion, Überprüfung der Langzeitstabilität (Doppelemulsionsmethode, NGI, Cyclohaler, n=3, Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Abbildung 5.41 zeigt, dass sich die Feinpartikelfraktion für alle drei Chargen auch nach 6 Monaten Lagerung nicht signifikant verändert hat. Für Charge 1 beträgt sie nach 6 Monaten 25%, für Charge 2 27% und für Charge 3 31%. Die Unterschiede zwischen den drei Chargen sind nicht signifikant.

Die Feinpartikelfraktion zeigt mit einem Wert von durchschnittlich knapp 30% Verbesserungspotential, da somit 70% der Formulierung den Zielort nicht erreichen. Das Ergebnis war aber aufgrund der breiten Verteilung, die durch die Druckluftdispergierung festgestellt wurde, bereits zu erwarten. Eine durch L-Leucin-Zusatz erreichte schmalere Partikelgrößenverteilung hätte ebenfalls eine höhere Feinpartikelfraktion zur Folge.

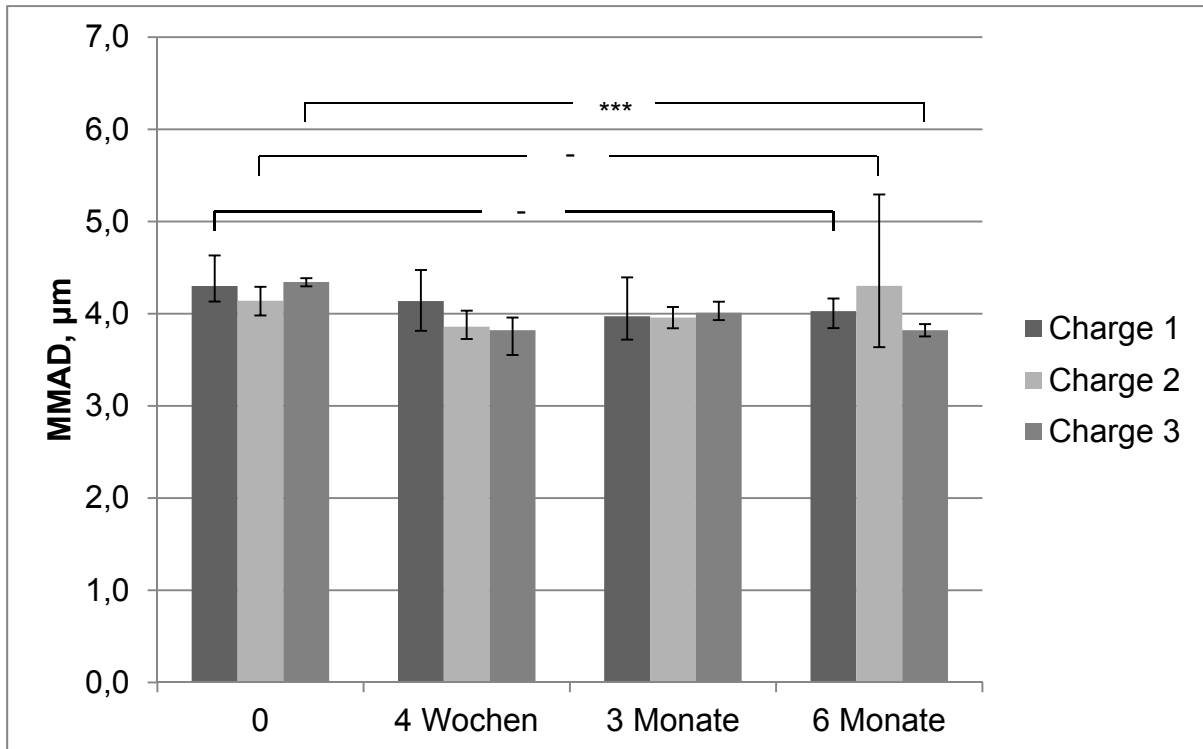


Abbildung 5.42: MMAD, Überprüfung der Langzeitstabilität (Doppelemulsionsmethode, NGI, Cyclohaler, n=3, Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

In Abbildung 5.42 sind die Ergebnisse für den MMAD dargestellt. Dieser hat sich ebenfalls für Charge 1 und 2 nicht signifikant geändert. Allerdings ergab sich für Charge 3 eine hoch signifikante, aber nur kleine, Änderung. Nach 6 Monaten Lagerzeit betrug der MMAD der Charge 1 4,0 µm, der Charge 2 4,3 µm und der Charge 3 3,8 µm. Damit weisen alle drei Chargen Partikel mit einem mittleren aerodynamischen Durchmesser auf, der sich für die pulmonale Applikation eignet.

Der Vergleich mit den Ergebnissen des x_{50} -Wertes nach Cyclohalerdispergierung (Abbildung 5.39) zeigt, dass der aerodynamische Durchmesser im Gegensatz zum geometrischen Durchmesser, der mittels Laserdiffraktion ermittelt wurde und über die Zeit etwas abnahm, konstant blieb.

Die Ergebnisse für Feinpartikelfraktion und MMAD zeigen, dass die Lagerung tendenziell keinen Einfluss auf die aerodynamischen Eigenschaften hat.

5.2.13.4 Ovalbumingehalt

Zur Ermittlung des Ovalbumingehalts wurden 20 mg der Formulierung aufgelöst, mit dem BCA-Assay bestimmt und der Ovalbumingehalt pro mg Formulierung berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.43 dargestellt. Dabei lässt sich für alle drei Chargen nach 6 Monaten eine Abnahme des Ovalbumingehalts feststellen. Für die erste und zweite Charge ist die Abnahme signifikant, bei der dritten Charge sind für eine zuverlässige Aussage mehr Daten notwendig.

Direkt nach der Herstellung wurde ein mittlerer Ovalbumingehalt über alle drei Chargen von $16,5 \mu\text{g} \pm 0,6 \mu\text{g}$ pro mg der Formulierung ermittelt, nach 6 Monaten betrug der mittlere Ovalbumingehalt über alle drei Chargen $13,6 \mu\text{g} \pm 0,5 \mu\text{g}$ pro mg der Formulierung.

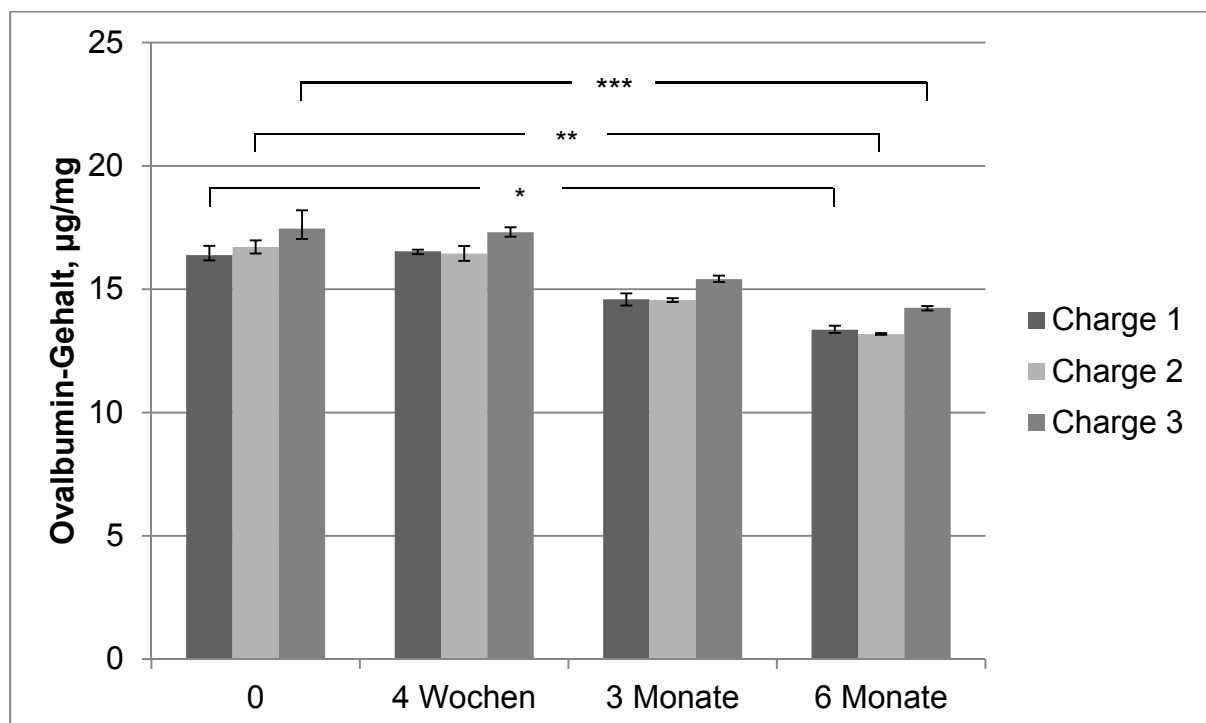


Abbildung 5.43: Ovalbumingehalt in den Formulierungen, Überprüfung der Langzeitstabilität (Doppелеmulsionsmethode, $n=3$, Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei der Formulierungsentwicklung besonderes Augenmerk auf den Ovalbumingehalt gelegt werden muss. Dabei sollte der Feuchtigkeitsgehalt in der Formulierung überwacht werden. Wenn dieser zu hoch ist, könnte es zur Degradation des Antigens kommen.

5.2.13.5 Fazit

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Lagerung über mehrere Monate grundsätzlich keinen Einfluss auf die Eigenschaften der Mikropartikel hat. Die mittlere Partikelgröße nach Druckluftdispergierung, die Feinpartikelfraktion und auch der MMAD veränderten sich bis auf wenige Ausnahmen nicht signifikant. Signifikante Unterschiede gab es hingegen bei der Redispergierbarkeit der Nanopartikel, der mittleren geometrischen Partikelgröße nach Cyclohalerdispergierung sowie beim Ovalbumingehalt. Bei künftigen Ansätzen ist es zu empfehlen, den Feuchtigkeitsgehalt im Pulver zu ermitteln, um zu überprüfen, ob dieser einen Einfluss auf Redispergierbarkeit, mittlere geometrische Partikelgröße und Ovalbumingehalt hat.

5.2.14 Endotoxinbestimmung

Der Endotoxingehalt wurde mithilfe des LAL-Tests bestimmt. Die erste getestete Formulierung, die mit der optimierten Zusammensetzung (Tabelle 5.12) und mit Zusatz von 0,01% (m/V) L-Leucin zur Redispergierlösung hergestellt wurde, ergab einen Gehalt von 1,9-2,2 I.U./mg Formulierung. Für eine zweite untersuchte Formulierung, die mit FA-PLGA aber ohne L-Leucin hergestellt wurde, wurde ein Endotoxingehalt von 2,6-3,0 I.U./mg Formulierung ermittelt. Diese Ergebnisse zeigen eine erste Tendenz, aber für eine zuverlässige Aussage müssen noch weitere Chargen untersucht werden. Dabei könnte zusätzlich erfasst werden, von welchen Faktoren der Endotoxingehalt beeinflusst wird. Zudem sollte der Endotoxingehalt des Ovalbumins getestet werden.

Gemäß Ph. Eur. 7.0 und USP 37 darf der Endotoxingehalt für eine intravenös zu applizierende Formulierung 5 I.U./kg Körpergewicht nicht überschreiten. Mit den hier getesteten Chargen ergibt sich damit, bei Applikation von 20 mg Formulierung, ein Endotoxingehalt von maximal 60 I.U. pro Gesamtkörpergewicht. Bei einer Person mit 50 kg Körpergewicht ergibt sich damit ein Endotoxingehalt von 1,2 I.U./kg Körpergewicht. Damit sind die ermittelten Werte in einem unbedenklichen Bereich, besonders unter dem Aspekt, dass eine nicht-intravenöse Applikation vorgesehen ist. Sollte dennoch ein geringerer Wert angestrebt werden, bietet sich die Verwendung von speziell aufgereinigtem, endotoxinfreiem Ovalbumin an.

5.2.15 Immunologische Untersuchungen

Es wurden ovalbuminhaltige und ovalbuminfreie Formulierungen auf ihre immunologische Wirkung untersucht. Da für einige Techniken, wie beispielsweise Aufnahmeuntersuchungen, eine Fluoreszenzmarkierung der Partikel erforderlich war, wurden Formulierungen, die Fluoresceinamin- oder Cumarin 6-gelabelte Nanopartikel enthielten, hergestellt.

Aufnahmeuntersuchungen mit PLGA-Nanopartikeln an der Charité Berlin konnten im Rahmen des Projekts eine Aufnahme der PLGA-Partikel durch humane dendritische Zellen belegen. Dabei reichert sich die Partikel nach der Aufnahme in angesäuerten Endosomen an (unveröffentlichte Ergebnisse). Der pH-Wert in solchen Endosomen liegt zwischen pH 5,2 und 5,5 (Geisow, 1984), wodurch sich ebenfalls die Freisetzung bei pH 5,5 empfiehlt.

Nach erfolgter Aufnahme kann die immunologische Reaktion an unterschiedlichen Aktivierungsmarkern nachvollzogen werden. Diese Tests wurden von Matthias Schröder von der Universität Bonn durchgeführt. Dabei wurden die Expression von CD80 (Aktivierungsmarker der Makrophagen) und CD69 sowie die IL-2-Sekretion (beides Aktivierungsmarker von T-Zellen) als Marker ausgewählt. Eine Expression oder Sekretion dieser Marker zeigte eine Aktivierung und damit eine Immunreaktion an. Um die Ergebnisse der Formulierungen in Kontext setzen und vergleichen zu können, wurden ebenfalls Kontrollproben, die keinen immunologischen Effekt haben, wie auch gelöstes Ovalbumin auf ihre Immunreaktion untersucht. Es wurde erwartet, dass das verkapselte Ovalbumin eine stärkere Immunreaktion hervorruft als das gelöste, da es in der partikulären Form effektiver aufgenommen werden kann (Abschnitt 2.6.1).

Tabelle 5.17 führt die Formulierungen auf, mit denen die Ergebnisse in Abbildung 5.44 bis Abbildung 5.46 erzielt wurden.

Tabelle 5.17: Zusammensetzung der getesteten Formulierungen

	ohne Ovalbumin	mit Ovalbumin
Ungelabelt	NPI	NP II
Fluoresceinamin	NP III	NP IV
Cumarin 6	NP V	NP VI

Für einen ersten Test wurden die Nanopartikel in einer Konzentration appliziert, die 100 (linke Grafik in Abbildung 5.44) beziehungsweise 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PLGA (rechte Grafik in Abbildung 5.44) entsprach. Die verkapselte Ovalbuminmenge pro mg PLGA war bekannt, sodass zur Kontrolle eine Ovalbuminlösung mit der gleichen Konzentration aufgetragen werden konnte. Da die Beladungsraten ein wenig voneinander abwichen, wurden Ovalbuminlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen als Kontrollen verwendet. Die Konzentration der verwendeten Ovalbuminlösung ist jeweils in der Abbildung unterhalb des entsprechenden Balkens auf der Abszisse angegeben und beträgt z.B. für die erste Ovalbuminlösung 1,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (zweiter Balken der linken Grafik in Abbildung 5.44).

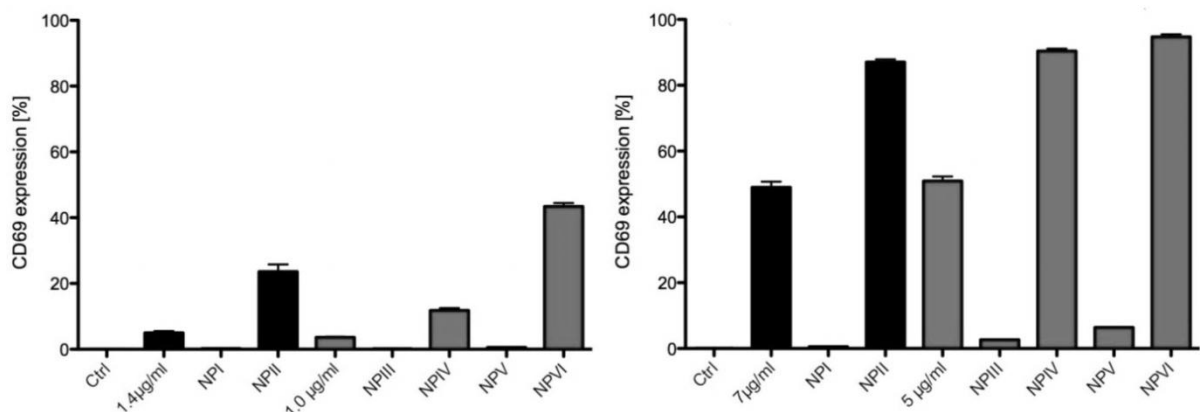


Abbildung 5.44: Immunologischer Effekt der Formulierungen auf die CD69-Expression (verwendete Polymerkonzentration: links – 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, rechts – 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Die linke Grafik in Abbildung 5.44 stellt den Effekt der Formulierungen, jeweils entsprechend einer PLGA-Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, auf die CD69-Expression der T-Zellen dar und ist damit ein Marker für die T-Zell-Aktivierung. Es lässt sich erkennen, dass in Nanopartikel verkapseltes Ovalbumin einen deutlich stärkeren Effekt auf die CD69-Expression hat, als die Ovalbuminlösung gleicher Konzentration. Auch eine gleiche Menge an ovalbuminfreien Partikeln führte nicht zu einer vergleichbaren Expression, obwohl eine gewisse Immunreaktivität zu erkennen ist. Möglicherweise können die im vorherigen Abschnitt ermittelten Endotoxine die Ursache für diese leichte Immunreaktion bei den ovalbuminfreien Formulierungen sein. Dennoch unterscheiden sich die Ergebnisse der ovalbuminhaltigen Formulierungen signifikant von denen der ovalbuminfreien. Ein Vergleich der unterschiedlichen Markierungen zeigt hingegen keine signifikanten Unterschiede. Durch Verfünffachen der applizierten PLGA-Konzentration auf 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (rechte Grafik Abbildung 5.44) wurde eine

deutlich stärkere CD69-Expression erreicht. Damit handelt es sich um einen konzentrationsabhängigen Effekt. Die höher konzentrierte Ovalbuminlösung ruft ebenfalls eine stärker ausgeprägte CD69-Expression hervor, wobei zwischen 5 und 7 µg/ml kein signifikanter Unterschied zu erkennen ist.

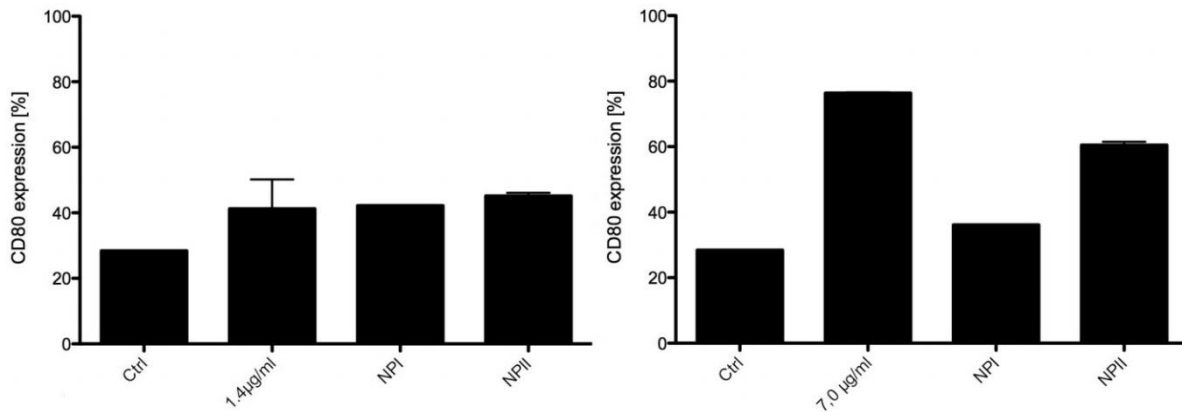


Abbildung 5.45: Immunologischer Effekt der ungelabelten Formulierungen auf die CD80-Expression (verwendete Polymerkonzentration: links – 100 µg/ml, rechts – 500 µg/ml)

Abbildung 5.45 zeigt die Effekte der ungelabelten Formulierungen auf die CD80-Expression. CD80 zeigt die Makrophagenaktivierung und damit, ob die antigen-präsentierende Zelle das Antigen als fremd erkannt hat und dieses nun präsentiert. Bei den höheren Konzentrationen erkennt man einen deutlichen Unterschied zwischen den Partikeln mit und ohne Ovalbumin. Allerdings bewirkt die reine Ovalbuminlösung in diesem Fall eine stärkere CD80-Expression. Die Ergebnisse der Cumarin 6-Formulierung auf die CD80-Expression konnten nicht ausgewertet werden, da die Fluoreszenz so stark war, dass davon die FACS-Analyse gestört wurde.

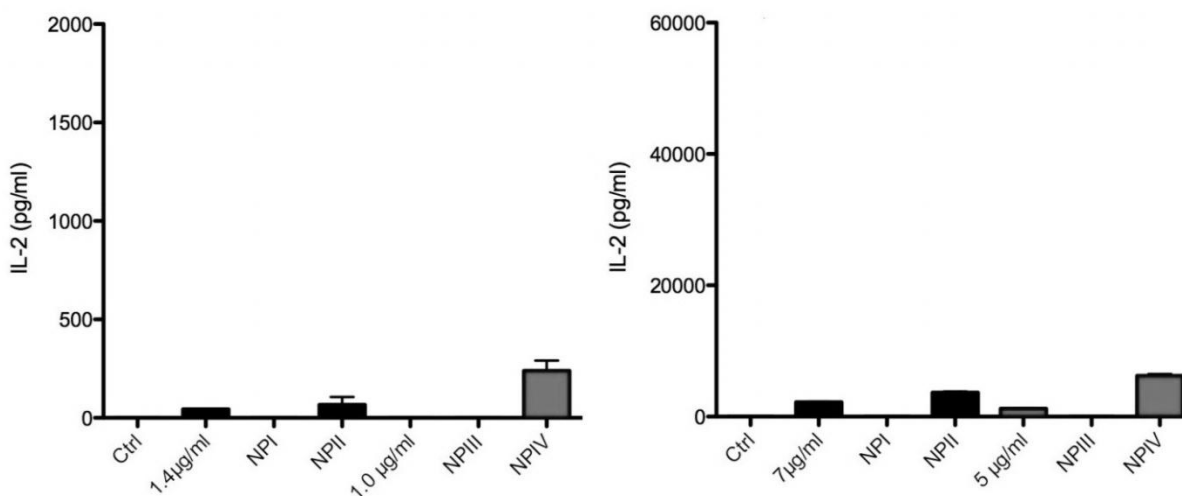


Abbildung 5.46: Immunologischer Effekt der Formulierungen auf die IL-2-Sekretion (verwendete Polymerkonzentration: links – 100 µg/ml, rechts – 500 µg/ml)

Abbildung 5.46 zeigt, dass das partikulär vorliegende Ovalbumin eine stärkere IL-2-Sekretion als gelöstes Ovalbumin hervorruft. Das bedeutet eine effektivere Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen.

In einem weiteren immunologischen Versuch wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse untersucht. Dafür wurden drei Chargen mittels Doppelemulsionsmethode hergestellt und jede Charge auf ihren Effekt auf CD69- und CD80-Expression sowie IL-2-Sekretion untersucht. Dabei war die Erwartung, dass alle drei Chargen die gleichen Effekte hervorrufen. Die Ergebnisse sind in den folgenden Grafiken aufgetragen. Die Abszisse stellt dabei die applizierte Menge, bezogen auf das in den Nanopartikeln befindliche Ovalbumin, dar.

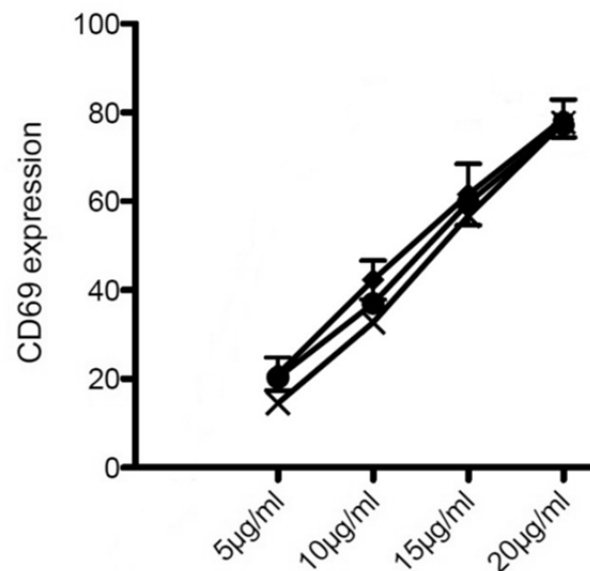


Abbildung 5.47: Immunologischer Effekt von drei identisch hergestellten Chargen auf die CD69-Expression

Abbildung 5.47 zeigt das Ergebnis für die CD69-Expression. Für alle drei Chargen wurden bei den vier getesteten Konzentrationen, wie erwartet, vergleichbare Ergebnisse erhalten.

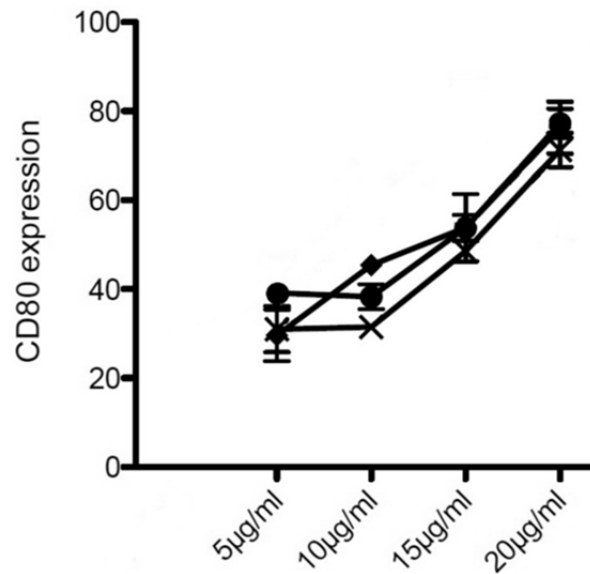


Abbildung 5.48: Immunologischer Effekt von drei identisch hergestellten Chargen auf die CD80-Expression

Abbildung 5.48 stellt den Effekt der drei Formulierungen auf die CD80-Expression dar. Wie bereits bei der CD69-Expression wurden hier ebenfalls sehr ähnliche Ergebnisse erhalten.

Auch der Effekt auf die IL-2-Sekretion, die Abbildung 5.49 darstellt, ist für die drei Formulierungen vergleichbar.

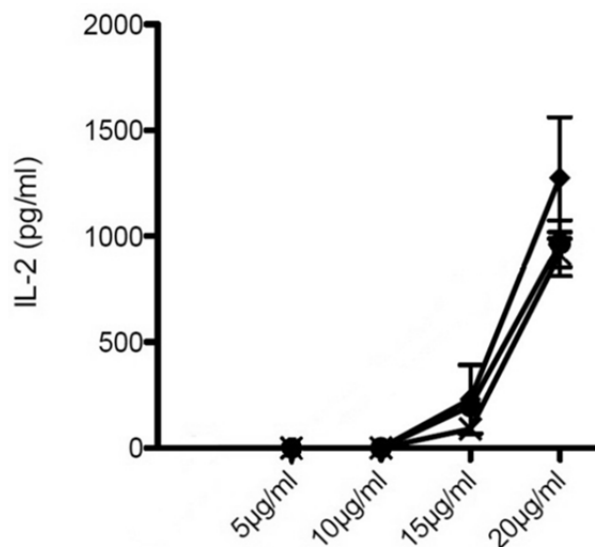


Abbildung 5.49: Immunologischer Effekt von drei identisch hergestellten Chargen auf die IL-2-Sekretion

Diese Ergebnisse beweisen, dass mithilfe der Doppalemulsionsmethode Partikel hergestellt werden können, die einen reproduzierbar immunologischen Effekt hervorrufen.

Darüber hinaus wurde die Abhängigkeit der immunologischen Marker von der eingesetzten Ovalbuminkonzentration genauer untersucht. Die Zellen wurden dabei mit sechs verschiedenen Nanopartikel- und zehn unterschiedlichen Ovalbuminkonzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Effekte auf CD69- und CD80-Expression sowie IL-2-Sekretion ermittelt. Da bereits beschrieben wurde, dass partikuläres Antigen besser als gelöstes aufgenommen wird (Temmermann, 2011), wurde bei diesen Untersuchungen ebenfalls ein besseres Ergebnis der Nanopartikelformulierung gegenüber dem gelösten Ovalbumin erwartet.

Abbildung 5.50 stellt den Effekt auf die CD69-Expression dar. Sowohl für die Nanopartikel (grau) als auch für das gelöste Ovalbumin (schwarz) lässt sich eine Konzentrationsabhängigkeit erkennen. Bei einer höheren eingesetzten Konzentration wird mehr CD69 exprimiert. Dabei sind die Nanopartikel effektiver, diese führen bei gleicher Konzentration zu einer deutlich höheren CD69-Expression, womit die Ergebnisse der Erwartung entsprechen.

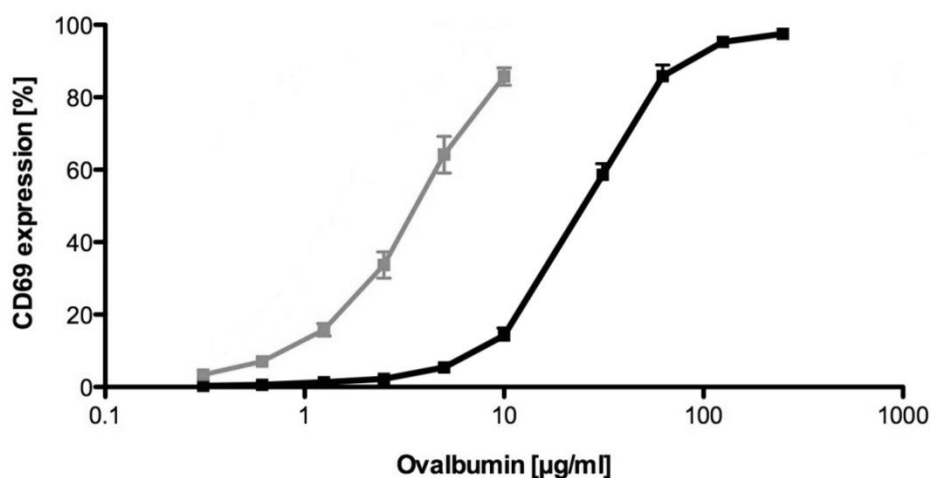


Abbildung 5.50: Konzentrationsabhängiger Effekt auf die CD69-Expression, Vergleich von PLGA-Nanopartikeln (grau) und Ovalbuminlösung (schwarz)

Abbildung 5.51 zeigt die Ergebnisse der CD80-Expression. Wie bereits für die CD69-Expression ermittelt wurde, liegt auch hier ein konzentrationsabhängiger Effekt vor. Dabei zeigt das partikuläre Antigen (graue Linie) erneut eine höhere Effektivität als das gelöste Ovalbumin (schwarze Linie).

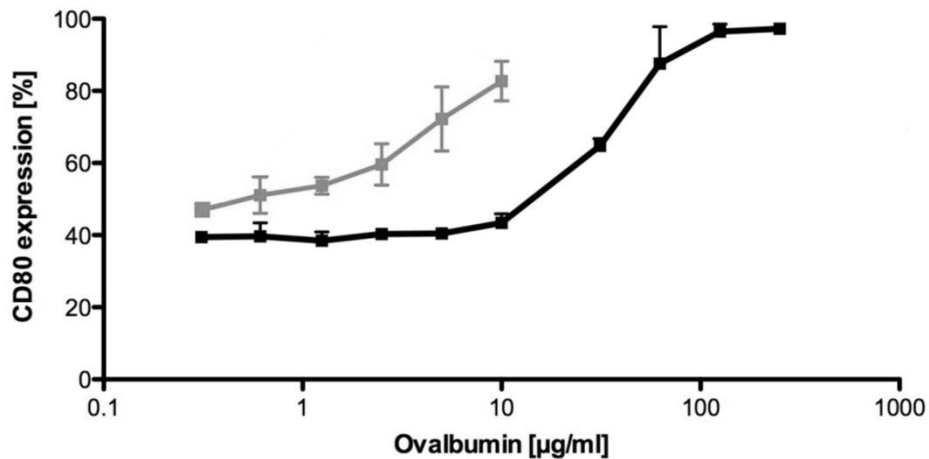


Abbildung 5.51: Konzentrationsabhängiger Effekt auf die CD80-Expression, Vergleich von PLGA-Nanopartikeln (grau) und Ovalbuminlösung (schwarz)

Die Abbildung 5.52 stellt die Ergebnisse für die IL-2-Sekretion dar. Es kann ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit, sowie eine größere Effektivität des partikulären Antigens, beobachtet werden.

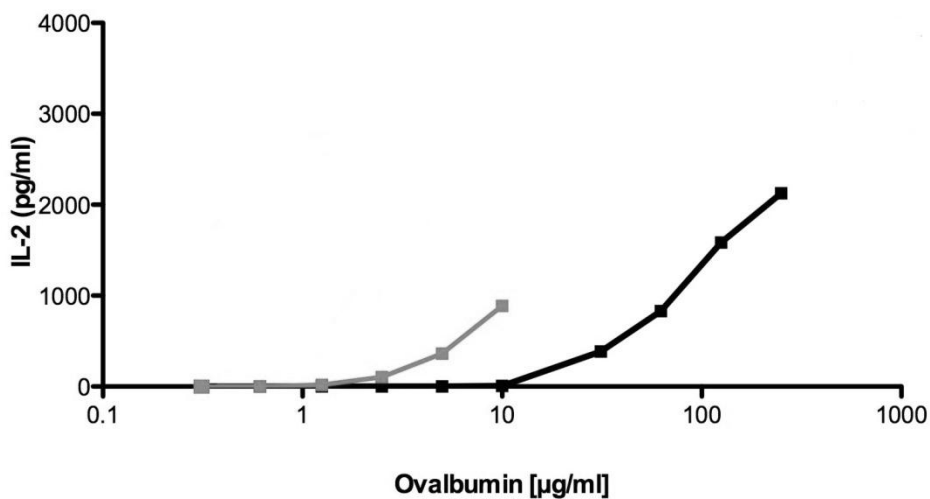


Abbildung 5.52: Konzentrationsabhängiger Effekt auf die IL-2-Sekretion, Vergleich von PLGA-Nanopartikeln (grau) und Ovalbuminlösung (schwarz)

Diese Untersuchungen bestätigen, dass partikulär vorliegendes Antigen effektiver ist als gelöstes.

Das Fazit der immunologischen Untersuchungen ist, dass die Ergebnisse der CD80-Expression eine erfolgreiche Aktivierung der Makrophagen durch die Nanopartikelformulierung belegen konnten. Die Ergebnisse der CD69-Expression und der IL-2-Sekretion zeigen, dass die Formulierung eine Aktivierung der naiven CD8⁺-T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen bewirkt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Nanopartikelchargen einen reproduzierbaren immunologischen Effekt bewirken. Bei allen drei getesteten Markern zeigte

das in die Nanopartikel verkapselte Ovalbumin gegenüber der Ovalbuminlösung stärkere Effekte. Somit zeigen diese Ergebnisse, dass es gelungen ist, eine Formulierung zu entwickeln, die in-vitro Makrophagen aktivieren und eine T-Zell-Antwort hervorrufen kann.

5.2.16 Möglichkeiten der Methodenautomatisierung

Mithilfe der Doppelemulsionsmethode können, wie zuvor gezeigt, Nanopartikel mit einer Größe von 275 nm und einer engen Partikelgrößenverteilung hergestellt werden. Um eine vom menschlichen Einfluss möglichst unabhängige Methode zu entwickeln, welche auch für ein industrielles upscaling geeignet ist, sollen die bisher manuell durchgeführten Prozessschritte durch einen automatisierten Prozess ersetzt werden.

Dabei stellen zum einen das Hinzugeben der einzelnen Komponenten während der Herstellung und zum anderen das Überführen der W/O/W-Emulsion in die Stabilisatorlösung zwei Möglichkeiten dar, den Prozess zu automatisieren. Ein weiterer Automatisierungsschritt ist die Verwendung eines Prallstrahlmischers, um eine kontinuierliche Partikelherstellung zu ermöglichen. Wichtige Anforderungen sind, dass Prozessparameter, wie beispielsweise Volumina oder Zeiten, genau eingehalten werden. Nur so kann der automatisierte Prozess weiterhin Partikelgrößen zwischen 200 und 400 nm garantieren.

Mithilfe von HPLC-Pumpen wird es möglich, dem Ansatz definierte Volumina einzelner Komponenten zuzufügen. Durch Verwendung eines Prallstrahlmischers wird das Ziel verfolgt, ein kontinuierliches Herstellungsverfahren als Prozessschritt zu etablieren.

Ein erster Schritt der Prozessautomatisierung umfasste die Herstellung einer Nanopartikeldispersion mit dem Prallstrahlmischer. Dazu wurden eine wässrige PVA-Phase und eine organische Phase (PLGA in Ethylacetat) durch HPLC-Pumpen in den Prallstrahlmischer gefördert und mithilfe dessen vermischt. Das Produkt wurde aufgefangen und mit einem Magnetrührer gerührt. Nachdem 4 ml der organischen Phase zugegeben waren, wurde anstelle der organischen Phase die aufgefangene Dispersion verpumpt und mit der PVA-Phase vermischt. Auf diese Weise sollte eine Doppelemulsion erreicht werden. Allerdings führte diese Methode nicht zur Ausbildung von Nanopartikeln. Die entstandenen

Partikel waren sehr breit und multimodal verteilt und wiesen eine gemittelte Partikelgröße über 1 μm auf. Daher wurde der Versuchsaufbau dahingehend geändert, dass die organische Phase vorgelegt und mit dem Ultra-Turrax mit 19.000 rpm dispergiert wurde. Es wurden 1,6 ml Aqua bidest. hinzupipettiert und für zwei Minuten homogenisiert. Dieses Homogenisat wurde mit der HPLC-Pumpe in den Prallstrahlmischer gefördert und mit der PVA-Lösung vermischt. Das Produkt wurde aufgefangen und auf der Magnetrührplatte bis zur vollständigen Lösungsmittlevaporation gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit dem Zetasizer charakterisiert. Das Ergebnis zeigte jedoch, dass auch dieser Methodenaufbau nicht zu einer Ausbildung von Nanopartikeln führte.

Der Prallstrahlmischer konnte keine ausreichende Homogenisierung von organischer und hydrophiler Phase bewirken. Daher wurde der Ultra-Turrax als Misch- und Homogenisiereinheit beibehalten und versucht, die manuelle Zugabe von erster und zweiter hydrophiler Phase durch Verwendung von HPLC-Pumpen zu ersetzen. Die Zusammensetzung des Ansatzes erfolgte wie in Tabelle 5.12, wobei die Ovalbuminlösung durch Aqua bidest. ersetzt wurde. Nachdem das pro Zeiteinheit geförderte Volumen der HPLC-Pumpe validiert war, wurde die organische Phase vorgelegt und mit dem Ultra-Turrax eine Minute mit 19.000 rpm dispergiert. Mithilfe der HPLC-Pumpe wurden 1,6 ml der ersten hydrophilen Phase zugefügt. Anschließend wurde für eine weitere Minute homogenisiert, ehe auch die zweite hydrophile Phase ergänzt wurde. Die Doppelemulsion wurde für weitere zwei Minuten homogenisiert, anschließend manuell in die Stabilisatorlösung überführt und auf der Magnetrührplatte bis zur Lösungsmittlevaporation gerührt. Danach erfolgte die Partikelgrößenbestimmung mit dem Zetasizer. Um den Einfluss der Flussrate auf die entstehenden Partikel zu analysieren, wurden unterschiedliche Flussraten getestet. Dabei wurden Kombinationen von 5, 10 und 15 ml/min für erste und zweite hydrophile Phase gewählt. Die verwendeten Kombinationen sind in Tabelle 5.18 dargestellt. Diese Tabelle zeigt zudem die erzielten Partikelgrößen sowie den PDI der Ansätze.

Tabelle 5.18: Verwendete Flussraten sowie Ergebnisse der Ansätze des Automatisierungsversuches (Zetasizer, n=3)

Ansatz	Flussrate, ml/min		Partikelgröße, nm	PDI
	1. hydrophile Phase	2. hydrophile Phase		
1	5	10	265	0,065
2	10	10	269	0,083
3	15	10	274	0,108
4	5	5	262	0,055
5	5	15	258	0,073
6	10	15	265	0,068

Mit allen Kombinationen der Flussraten ließen sich sehr eng verteilte Nanopartikel erzeugen. Die Ansätze 1-3 zeigen, dass mit zunehmender Flussrate der ersten hydrophilen Phase größere und weniger gleichmäßig verteilte Partikel gebildet wurden. Daher wurde für die Ansätze 4 und 5 die niedrige Flussrate der 1. hydrophilen Phase verwendet und dafür die Flussrate von der 2. hydrophilen Phase variiert. Der PDI deutet darauf hin, dass die Partikel bei einer niedrigeren Flussrate der 2. hydrophilen Phase, im Vergleich zu einer höheren Flussrate, etwas enger verteilt vorliegen. Der Vergleich von Ansatz 1 mit Ansatz 5 und von Ansatz 2 mit Ansatz 6 zeigt, dass die Erhöhung der Flussrate der 2. hydrophilen Phase zu einer leichten Abnahme der Partikelgröße führte.

Zusammenfassend ist es gelungen, die Doppelemulsionsmethode zu automatisieren. Durch Einsatz von HPLC-Pumpen ist es möglich, sehr engverteilte Nanopartikel herzustellen.

5.2.17 Fazit

Mithilfe der Doppelemulsionsmethode ist es gelungen, engverteilte Nanopartikel in einer Größe, die sich für die Aufnahme durch dendritische Zellen eignet, herzustellen. Ihr großer Vorteil gegenüber der Solvent Change Präzipitation besteht darin, dass das Antigen in den Partikeln verkapselt vorliegt und damit vor äußeren Einflüssen besser geschützt ist, als wenn es auf der Partikeloberfläche adsorbiert ist. Nach der Sprühtrocknung weisen die Partikel eine Größe auf, die sich für die Applikation in die Lunge eignet. Dabei kann die trockene Formulierung sowohl mit dem Unihaler als auch mit dem Cyclohaler dispergiert werden. Die Freisetzungsuntersuchungen ergaben jedoch, dass nur ein geringer

Anteil des Antigens nach 24 Stunden wieder freigesetzt wurde. Damit liegt im Vorteil des verkapselten Antigens zugleich der Nachteil einer schlechten Freisetzung, die von der Degradation des Polymers kontrolliert wird. Daher besteht im Hinblick auf das Freisetzungsverhalten noch Optimierungsbedarf. Die Untersuchung der Stabilität über 6 Monate ergab grundsätzlich wenige Änderungen. Eine Abnahme des Proteingehalts über die Zeitspanne der Lagerung wurde jedoch festgestellt, sodass bei weiteren Entwicklungen beispielsweise eine Stabilisierung des Antigens in Betracht gezogen werden sollte.

Die immunologischen Ergebnisse waren bereits in der Hinsicht erfolgsversprechend, dass das nanopartikuläre Ovalbumin stärkere Effekte als gelöstes Ovalbumin hatte. Daher ist die Erwartung, dass bei einer besseren Freisetzung auch die immunologischen Effekte noch stärker ausgeprägt sein werden.

5.3 Poröse Partikel

5.3.1 Nanopartikelherstellung

Mithilfe der Doppelemulsionsmethode wurden reproduzierbar engverteilte Nanopartikel hergestellt und sprühgetrocknet, sodass sie für die pulmonale Applikation geeignet waren. Ihr Nachteil bestand jedoch darin, dass nur ein geringer Teil des verkapselten Antigens freigesetzt wurde (Abschnitt 5.2.10). Daher sollte eine neue Methode gefunden werden, bei der die guten aerodynamischen Eigenschaften beibehalten werden und zudem eine verbesserte Antigenfreisetzung erzielt werden konnte.

Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz beinhaltete die Herstellung poröser Nanopartikel. Poren in den Partikeln sollten bewirken, dass das Freisetzungsmedium schneller in die Partikel eindringt und folglich das Antigen effektiver und schneller freisetzt. Die Herstellung von porösen Mikropartikeln wurde bereits beschrieben (Desai, 2012), wobei Trehalose als Porenbildner zugesetzt wurde. Diese Methode wurde auf die Herstellung von Nanopartikeln adaptiert. Da die Doppelemulsionsmethode erfolgreich bewiesen hatte, dass Nanopartikel mit der gewünschten Größe hergestellt werden können (Abschnitt 5.2.1), wurde diese Methode als Grundlage verwendet und der Porenbildner Trehalose der ersten hydrophilen Phase zugesetzt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur „Formulierung mit 3,5% Trehalose“ bedeutet, dass der ersten hydrophilen Phase und nicht dem Gesamtansatz 3,5% (m/V) Trehalose zugesetzt wurde.

Tabelle 5.19: Zusammensetzung der porösen Partikel

Phase	Menge	Zusammensetzung
1. hydrophile Phase	1,6 ml	3,5% (m/V) Trehalose in Aqua bidest.
Organische Phase	2 ml	2,5% (m/V) PLGA in Ethylacetat
2. hydrophile Phase	6 g	5% (m/m) PVA in Wasser
Stabilisatorlösung	20 g	1% (m/m) PVA in Wasser

Der Herstellung erfolgte mit der in Tabelle 5.19 aufgeführte Zusammensetzung. Der Herstellungsprozess der porösen Partikel ist in Abbildung 5.53 grafisch dargestellt.

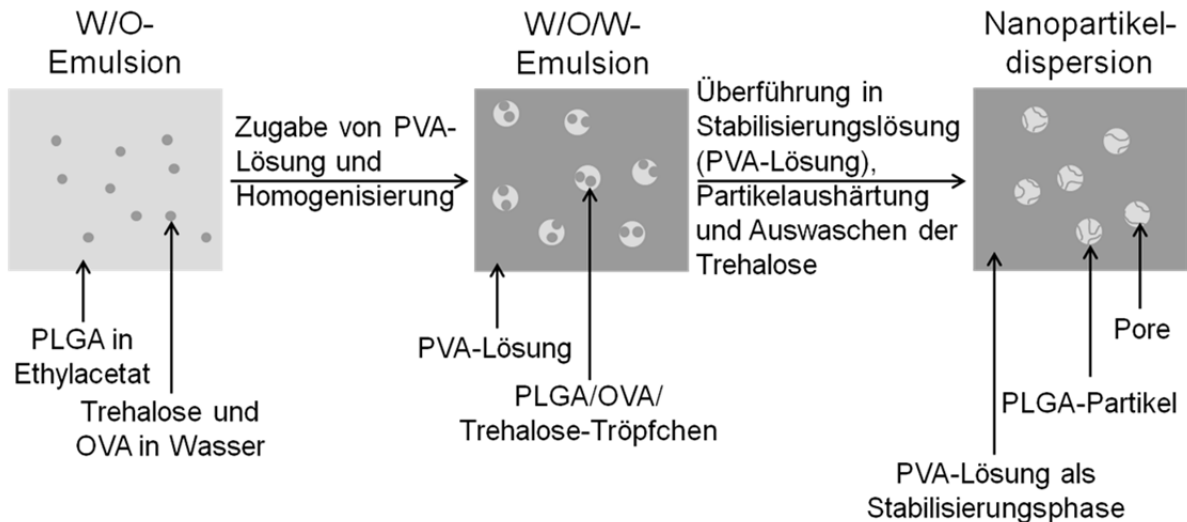


Abbildung 5.53: Herstellung der porösen Partikel

Zu Beginn wurde überprüft, ob sich der Trehalosezusatz auf die Partikelgröße und -verteilung auswirkt. Dafür wurde die Zusammensetzung aus Tabelle 5.19 für die Nanopartikelherstellung verwendet. Die Partikelgrößenverteilung der Nanopartikeldispersion wurde mit dem Zetasizer bestimmt und ist in Abbildung 5.54 dargestellt.

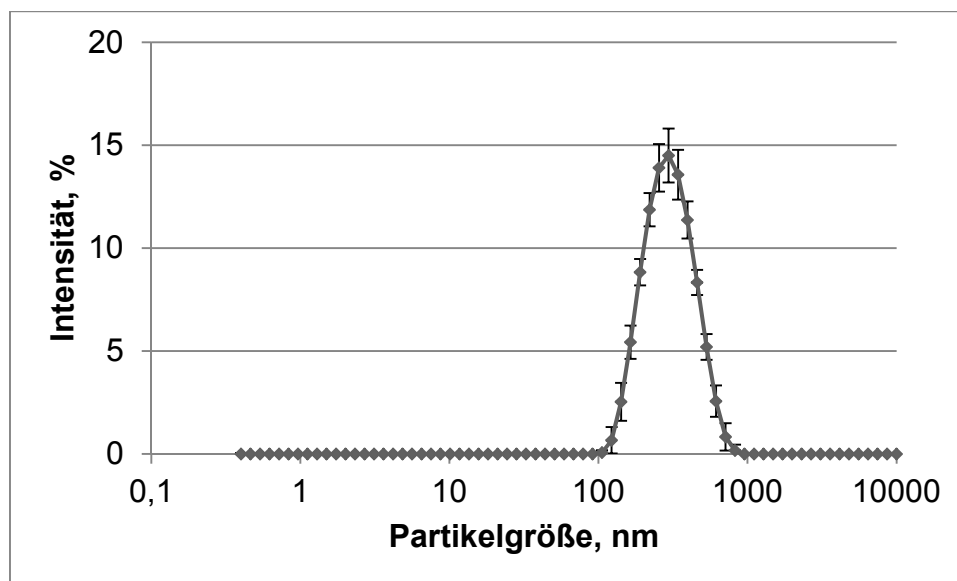


Abbildung 5.54: Partikelgrößenverteilung der Nanopartikeldispersion mit 3,5% Trehalose (Zetasizer, n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Die mittlere Partikelgröße beträgt 275 nm, der Polydispersitätsindex 0,14. Die Ergebnisse sind mit denen einer Formulierung ohne Trehalosezusatz vergleichbar, bei der die Partikelgröße ebenfalls 275 nm und der PDI 0,13 betrug. Damit liegen auch hier Partikel vor, die eine geeignete Größe für die Aufnahme durch dendritische Zellen aufweisen.

5.3.2 Ovalbumin-Beladung

Nachdem die Charakterisierung der Nanopartikel keine Veränderung der Partikelgröße und –verteilung im Vergleich zu den soliden Partikeln, Partikel ohne Trehalosezusatz, zeigte, wurde die Ovalbumin-Beladung untersucht. Es wurde zuerst, analog zur Solvent Change Präzipitation, die Adsorptionsmethode genutzt, da diese den Vorteil hat, dass das Ovalbumin in die Poren eindringen kann und daher sowohl innerhalb der Partikel als auch zusätzlich auf der äußeren Oberfläche adsorbieren kann. Für eine optimale Ovalbuminadsorption wurden unterschiedliche Einflussfaktoren auf die adsorbierte Ovalbuminmenge systematisch evaluiert. Dabei wurden Temperaturen von 4°C, 20°C und 37°C gewählt, Ovalbuminlösungen mit Konzentrationen zwischen 2 und 40 mg/ml eingesetzt und als weiterer Faktor die Adsorptionsdauer zwischen 11 und 33 Stunden variiert.

Dafür wurden je 2 ml Dispersion in 2 ml-Eppendorftubes überführt und die Nanopartikel 30 Minuten bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde danach möglichst vollständig entfernt und der Rückstand mit je 1 ml der Ovalbuminlösungen unterschiedlicher Konzentration versetzt. Nachdem die Nanopartikel vollständig redispergiert vorlagen, wurden die Proben bei entsprechender Temperatur für die festgelegte Dauer auf der Schüttelapparatur bewegt. Anschließend wurden die Proben entnommen, die Partikel 20 Minuten mit 14.000 rpm abzentrifugiert und das freie Ovalbumin im Überstand mithilfe des BCA-Assays bestimmt. Die Ergebnisse wurden grafisch aufgetragen und sind in Abbildung 5.55 bis Abbildung 5.57 dargestellt. Abbildung 5.55 zeigt eine starke Abhängigkeit der adsorbierten von der eingesetzten Ovalbuminmenge. Die Berechnung der prozentual adsorbierten Ovalbuminmenge ergibt, dass bei allen getesteten Ovalbuminmenge zwischen 10 und 20% des eingesetzten Ovalbumins an die Partikel adsorbiert wurden.

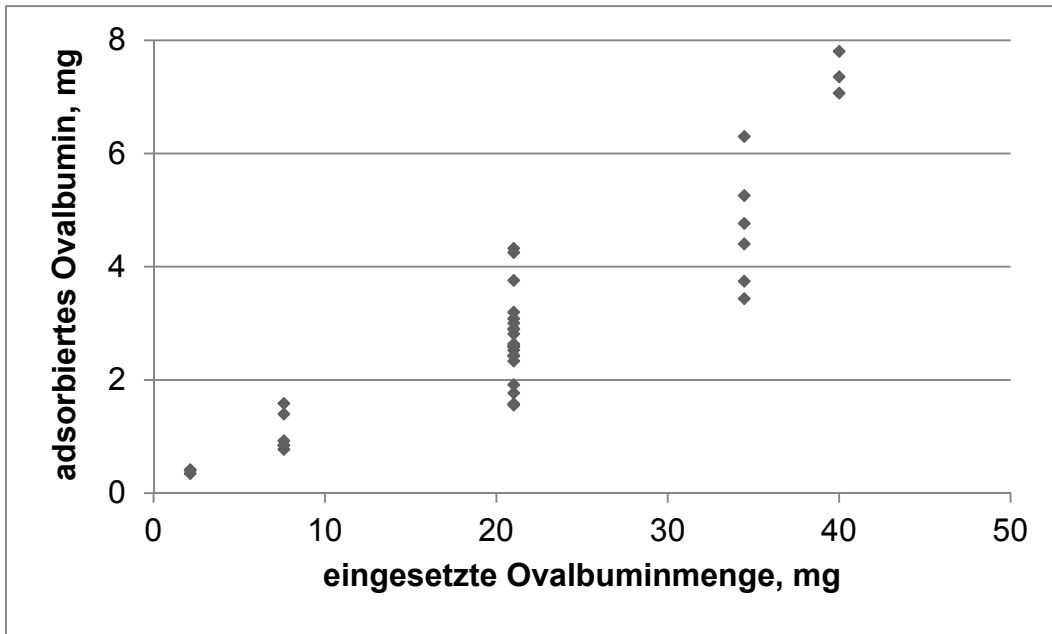


Abbildung 5.55: Adsorbiertes Ovalbumin in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge

In Abbildung 5.56 ist die adsorbierte Ovalbuminmenge in Abhängigkeit von der eingesetzten Temperatur dargestellt. Für die bessere Übersichtlichkeit werden die Ergebnisse der Proben, denen 21 mg Ovalbumin zugesetzt wurden, miteinander verglichen. Es zeigt sich dabei kein signifikanter Zusammenhang zwischen Temperatur und adsorbierter Ovalbuminmenge.

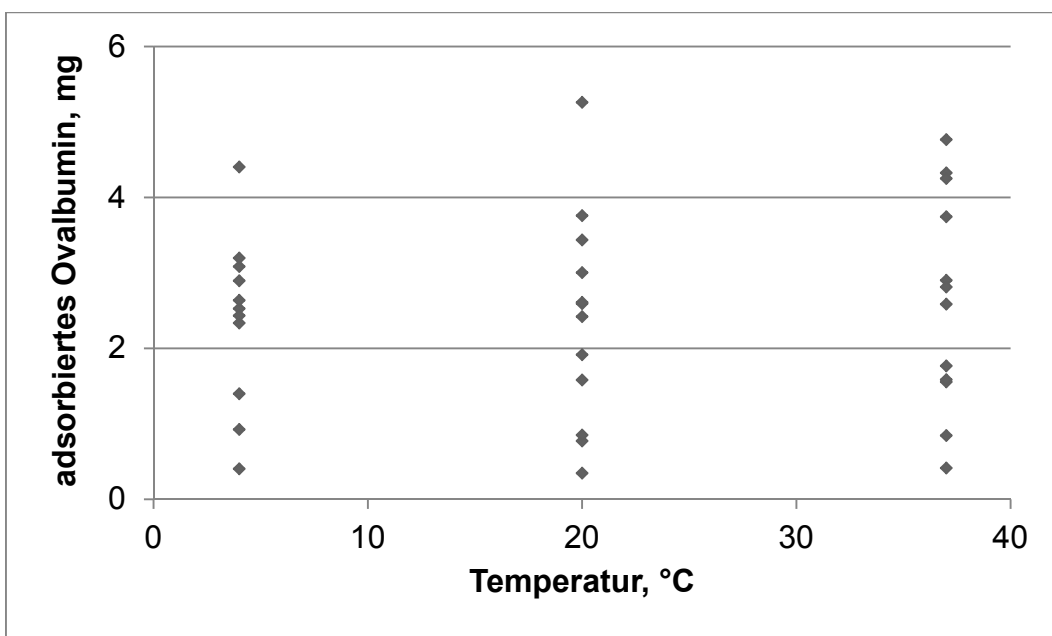


Abbildung 5.56: Adsorbiertes Ovalbumin in Abhängigkeit von der Temperatur

In Abbildung 5.57 wurden ebenfalls die Proben, denen 21 mg Ovalbumin zugesetzt wurde, verglichen. Es stellt sich eine Abhängigkeit zwischen der Dauer der Adsorption und der adsorbierten Menge dar. Dabei wird bei einer

Adsorptionszeit von 11 Stunden weniger adsorbiert als nach 17 Stunden. Allerdings zeigen die Ergebnisse, dass es nach 33 Stunden wieder zu einer Abnahme der adsorbierten Ovalbuminmenge kommt. Dieser Zusammenhang wurde durch die Resultate der Proben, die 12,5 und 25 Stunden adsorbiert wurden, bestätigt. Letztlich stellte sich die Adsorption über 17 Stunden als das Optimum der getesteten Zeiten heraus.

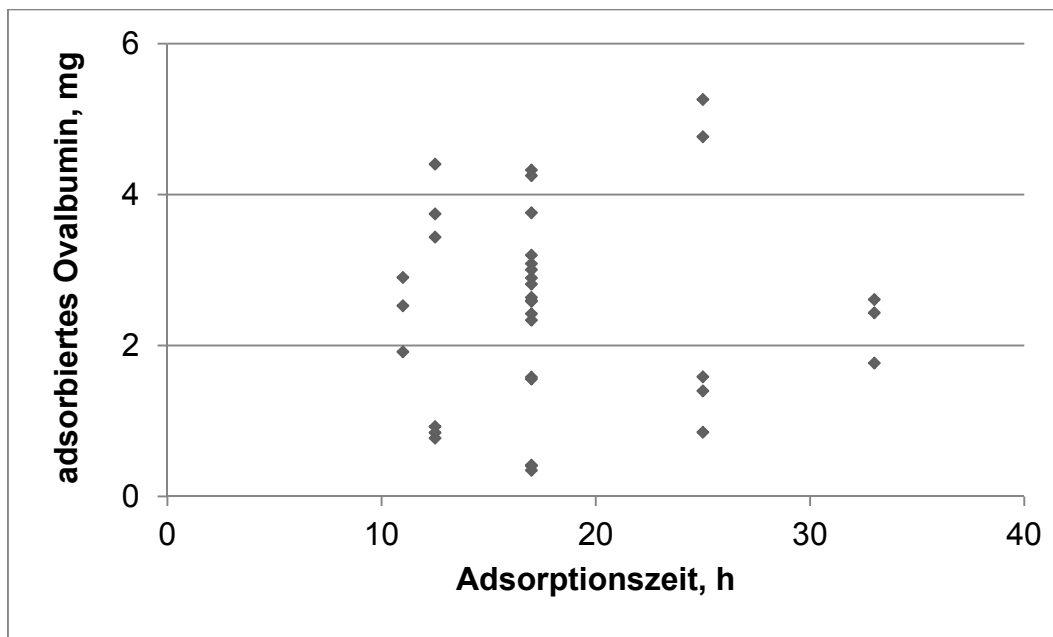


Abbildung 5.57: Adsorbiertes Ovalbumin in Abhängigkeit von der Adsorptionszeit

Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, Ovalbumin an die Partikel zu adsorbieren. Der Vergleich mit den Adsorptionsergebnissen aus der Solvent Change Präzipitation ergab, dass hier deutlich mehr Ovalbumin adsorbiert wurde. Bei der Solvent Change Präzipitation wurden zwischen 2,3 und 8%, im Fall der porösen Partikel zwischen 7,4 bis 20,9% des eingesetzten Ovalbumins adsorbiert. Der Nachteil dieser Methode liegt allerdings in der langen Dauer der Adsorption. Aus diesem Grund wurde ein alternatives Verfahren zur Beladung mit Ovalbumin untersucht. 40 mg/ml Ovalbumin wurden, analog zur Herstellung der soliden Partikel in Abschnitt 5.2.1, in der ersten hydrophilen Phase gelöst und während der Herstellung in die Partikel eingebracht. Der Nachteil ist, dass deutlich weniger Ovalbumin im Vergleich zur Adsorptionsmethode eingesetzt werden kann, da die erste hydrophile Phase zum einen nur ein kleines Volumen ausmacht und zum anderen mit 40 mg/ml die maximale Löslichkeit von Ovalbumin erreicht ist. Allerdings konnte damit die Herstellungszeit der Partikel

deutlich reduziert werden, sodass auch alle weiteren Partikel auf diese Art hergestellt wurden.

Durch die Ovalbuminverkapselung wurde mit der oben genannten Formulierung eine Beladungsrate der Partikel von 9% bei einer Verkapselungseffizienz von 14,5% erreicht. Damit sind diese Ergebnisse mit denen der soliden Partikel vergleichbar, die eine Beladungsrate von 11% und eine Verkapselungseffizienz von 17,8% aufwiesen.

5.3.3 Sprühtrocknung

Nachdem sowohl belegt werden konnte, dass der Trehalosezusatz keine Auswirkung auf die Partikelgröße und -verteilung hatte, als auch die Beladung der Partikel mit Ovalbumin gelungen war, schloss sich die Sprühtrocknung der Nanopartikeldispersion an. Dafür wurden die in dieser Arbeit bisher verwendeten Trocknungsparameter von 100°C Einlass- und 42°C Auslasstemperatur gewählt. Das Produkt wurde anschließend auf seine Dispergier- sowie Freisetzungseigenschaften hin untersucht.

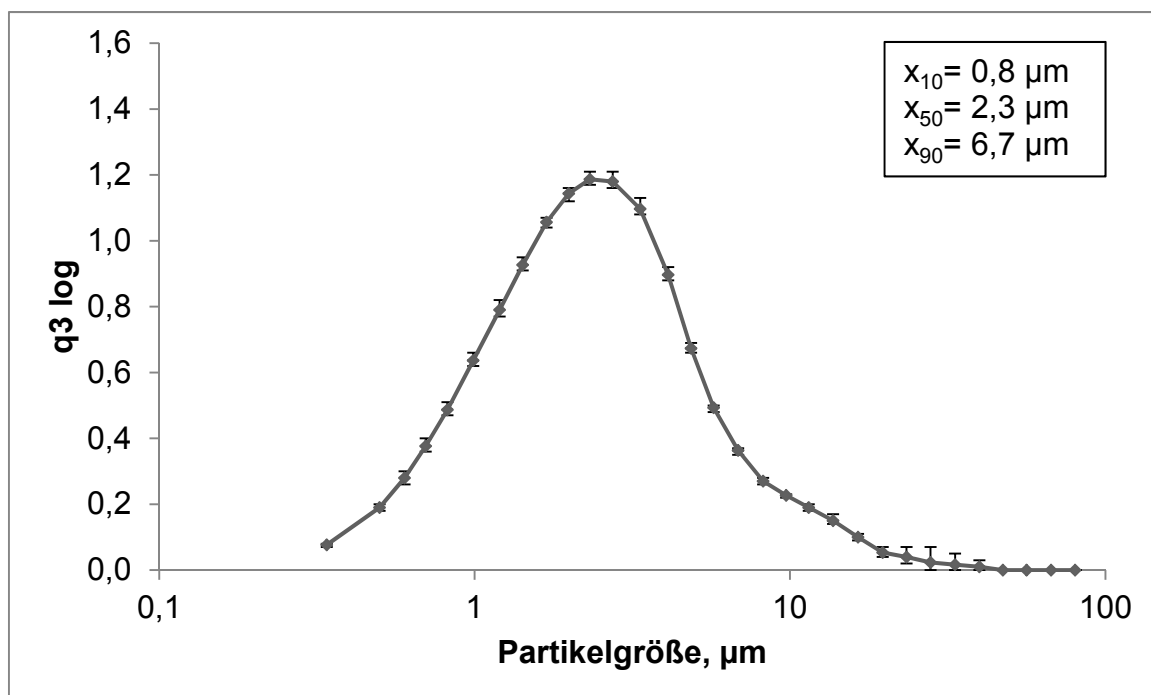


Abbildung 5.58: Partikelgrößenverteilung des sprühtrockneten Pulvers (poröse Partikel, Druckluftdispergierung mit 3 bar, n=3; Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Die Druckluftdispergierung mit 3 bar ergab eine mittlere Partikelgröße von 2,3 µm und einen Span von 2,5 (Abbildung 5.58). Damit wiesen die Partikel eine für die pulmonale Applikation potentiell geeignete Partikelgröße auf.

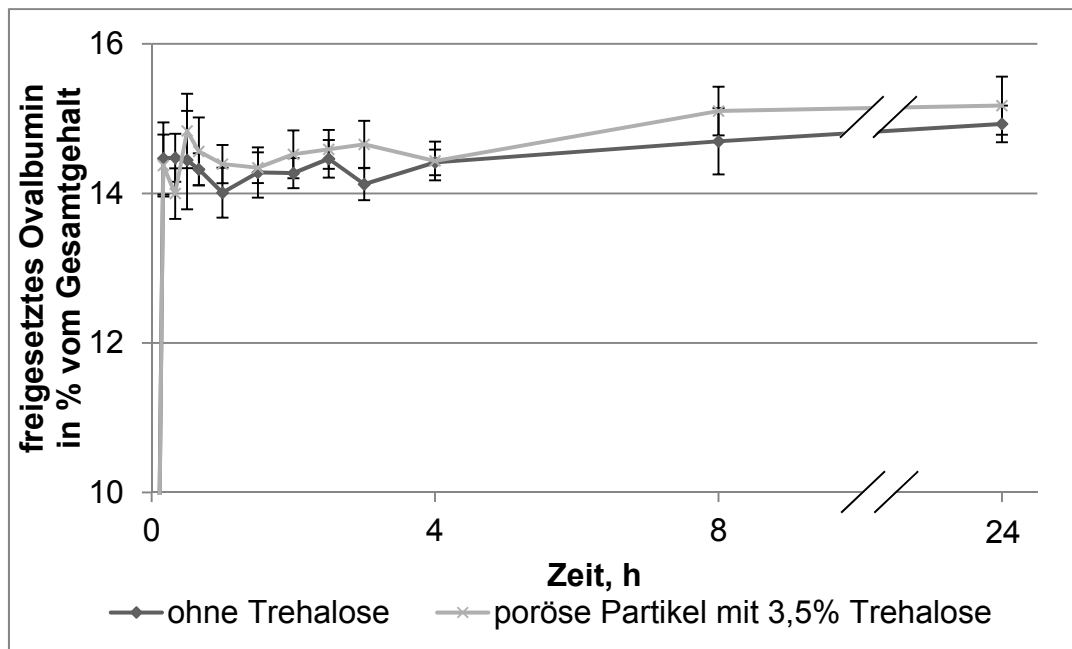


Abbildung 5.59: Ergebnis der Ovalbumin-Freisetzung aus porösen und soliden Partikeln bei pH 7,4 (n=2, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Die Ergebnisse der Freisetzungsforschung bei pH 7,4 (Abbildung 5.59) zeigen, dass der Zusatz von Trehalose, im Vergleich zu den soliden Partikeln, keinen nennenswerten Effekt auf das Freisetzungsverhalten hatte.

Eine Ursache für eine fehlende Veränderung des Freisetzungsverhaltens der porösen Partikel könnte eine „Selbstheilung“ der Poren durch die Auslasstemperatur von 42°C sein. Desai beschrieb bereits 2013, dass hohe Temperaturen zu einem Verschließen der Poren führen. Da diese Selbstheilung im Fall der porösen Partikel unerwünscht ist, wurde die Sprühtrocknung angepasst, indem die Einlasstemperatur auf 80°C und die Auslasstemperatur auf 35-37°C reduziert wurde. Auch mit diesen Parametern konnte ein trockenes Pulver erzeugt werden. Die Partikelgrößenverteilung des Pulvers sowie die Freisetzung wurden im Weiteren untersucht.

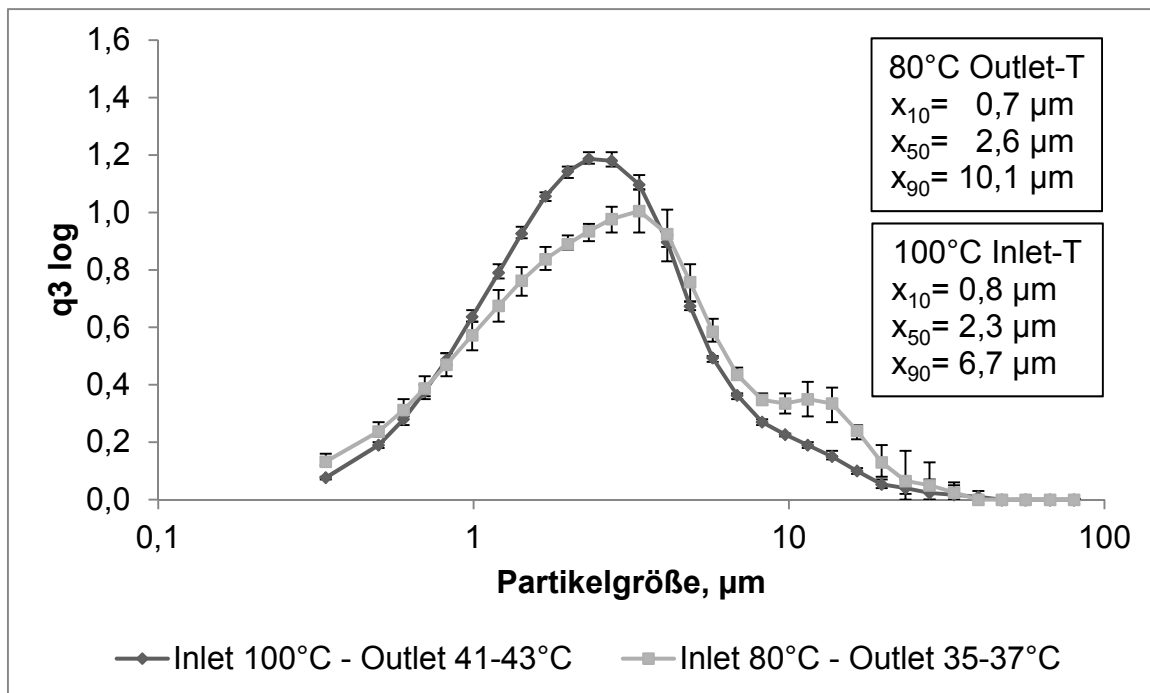


Abbildung 5.60: Partikelgrößenverteilung des sprühgetrockneten Pulvers bei Verwendung der alten und neuen Trocknungsparameter (poröse Partikel, Druckluftdispergierung mit 3 bar, $n=3$; Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Abbildung 5.60 zeigt den Vergleich der Partikelgrößenverteilung nach Druckluftdispergierung mit 3 bar mit alten und neuen Trocknungsparametern. Die Erwartung war, auch bei Verwendung der niedrigeren Trocknungstemperaturen eine ähnliche Partikelgrößenverteilung zu erhalten, da sich die Produkte visuell nicht voneinander unterschieden. Jedoch resultierten bei der niedrigeren Temperatur größere Partikel und Agglomerate. Für die Formulierung mit der höheren Trocknungstemperatur lag der x_{50} -Wert im Mittel bei 2,3 µm und der Span betrug 2,5. Bei der Formulierung, die bei niedrigerer Temperatur getrocknet wurde, wurden ein x_{50} -Wert von 2,6 µm und ein Span von 3,6 ermittelt. Vor allem die Breite der Verteilung ist damit deutlich angestiegen. Eine Ursache könnte sein, dass das Wasser nicht vollständig aus dem Produkt entfernt wurde und dieses zu Agglomeratbildung führte.

Andererseits konnte die folgende Charakterisierung des Freisetzungsverhaltens bestätigen, dass durch eine geringere Trocknungstemperatur eine höhere Freisetzung erreicht wurde.

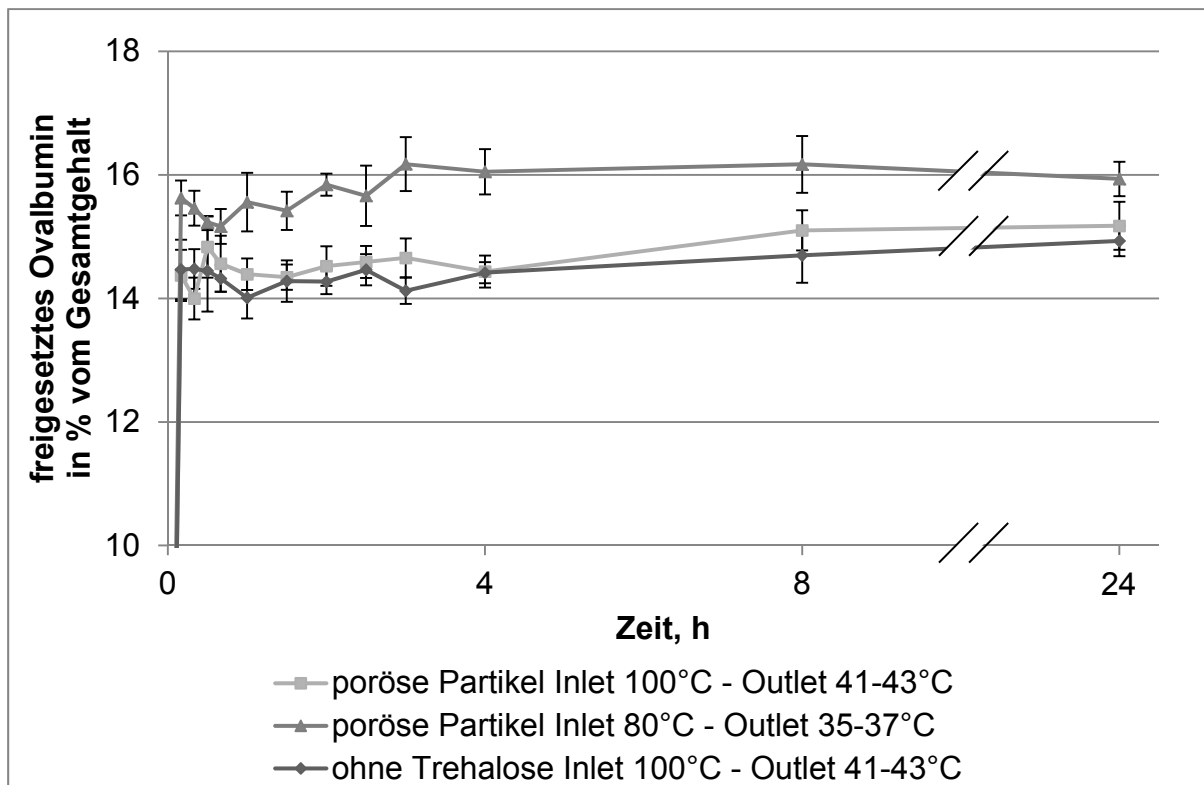


Abbildung 5.61: Vergleich der Ovalbumin-Freisetzung bei Verwendung der alten und neuen Trocknungsparameter sowie mit den soliden Partikeln, bei pH 7,4 (n=2, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Abbildung 5.61 zeigt den Vergleich zwischen soliden und porösen Partikeln mit höherer sowie niedrigerer Trocknungstemperatur. Nach 24 Stunden bei pH 7,4 unterschied sich die freigesetzte Ovalbuminmenge von Partikeln ohne Trehalose und denen mit einer Einlasstemperatur von 100°C nicht signifikant. Die Formulierung mit der niedrigeren Einlasstemperatur zeigte hingegen zu beiden anderen Formulierungen einen hoch signifikanten Unterschied. Der größere Ovalbuminanteil wurde aus den porösen Partikeln mit der niedrigeren Sprühtrocknungstemperatur freigesetzt. Damit konnte gezeigt werden, dass die Trocknungstemperatur einen Einfluss auf die Freisetzung sowie auf die Partikelgrößenverteilung hat.

Durch eine weitere Anpassung der Sprühtrocknungstemperatur wurde versucht, die Partikelgrößenverteilung des Pulvers zu verbessern. Dazu wurden eine Einlasstemperatur von 100°C und eine Auslasstemperatur von 39°C gewählt. Abbildung 5.62 zeigt die Ergebnisse der Partikelgrößencharakterisierung. Der x_{50} -Wert liegt für diese Formulierung bei 2,9 μm und der Span beträgt 1,8. Damit

sind die Partikel deutlich enger verteilt als bei Nutzung der geringeren Ein- und Auslasstemperatur.

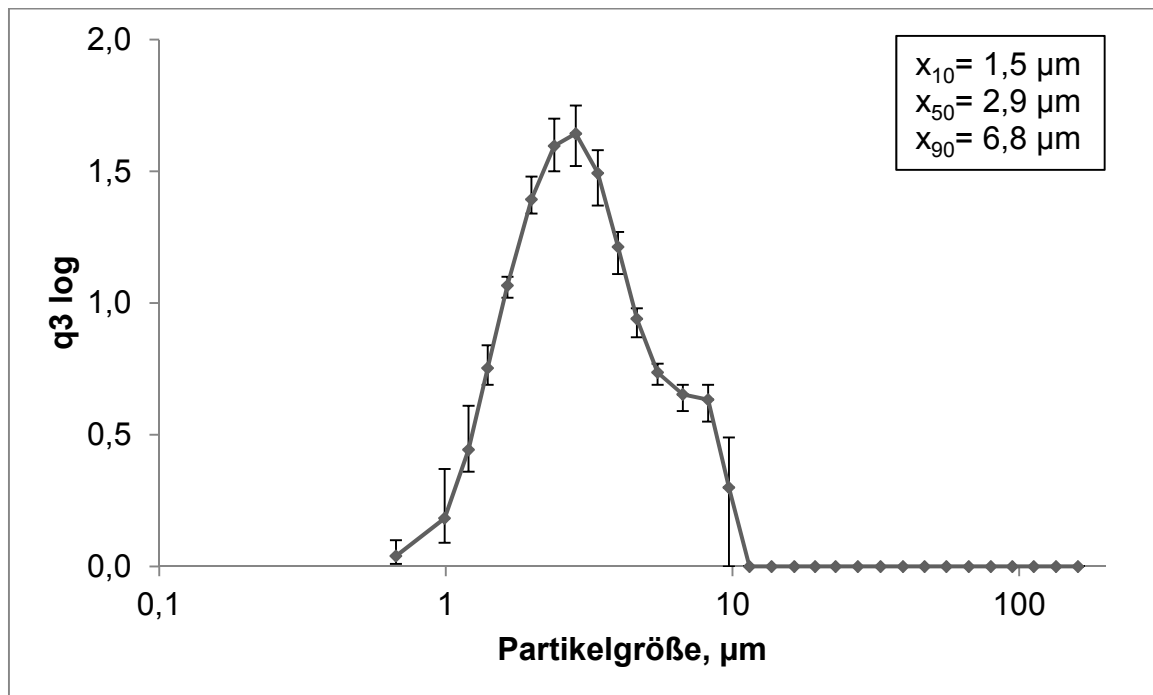


Abbildung 5.62: Partikelgrößenverteilung des Pulvers mit optimierte Sprühtrocknungs-temperatur (poröse Partikel, nach Druckluftdispergierung mit 3 bar, n=3, Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Für eine bessere Übersichtlichkeit werden die verwendeten Sprühtrocknungs-temperaturen mit den erzielten Partikelgrößen noch einmal in Tabelle 5.20 gegenüber gestellt.

Tabelle 5.20: Vergleich von Sprühtrocknungs-temperaturen und resultierenden Partikelgrößen (Druckluftdispergierung mit 3 bar, n=3)

Einlass-T, °C	Auslass-T, °C	x ₁₀ , µm	x ₅₀ , µm	x ₉₀ , µm	Span
100	42	0,8	2,3	6,7	2,2
100	39	1,5	2,9	6,8	1,8
80	36	0,7	2,6	10,1	3,6

Die Tabelle zeigt, dass bei der niedrigsten Auslasstemperatur die Partikel und der Span am größten waren und es durch Erhöhung der Einlasstemperatur auf 100°C sowie Anpassung der Auslasstemperatur auf 39°C gelungen ist, eng verteilte Mikropartikel zu erzeugen.

5.3.4 Variation der eingesetzten Trehalosemenge

Abbildung 5.61 zeigte, dass aus der Formulierung mit 3,5% Trehalose im Vergleich zu den soliden Partikeln nach 24 Stunden nur etwa 1% mehr Ovalbumin vom Gesamtgehalt freigesetzt wurde. Daher wurde untersucht, ob durch Zusatz einer größeren Menge Trehalose eine bessere Freisetzung zu erzielen ist. Dazu wurden weitere Nanopartikel mit 5, 10, 20 sowie 50% (m/V) Trehalose in der 1. hydrophilen Phase hergestellt. Mit dem Zetasizer wurde untersucht, ob dies eine Auswirkung auf die entstehende Partikelgröße hat.

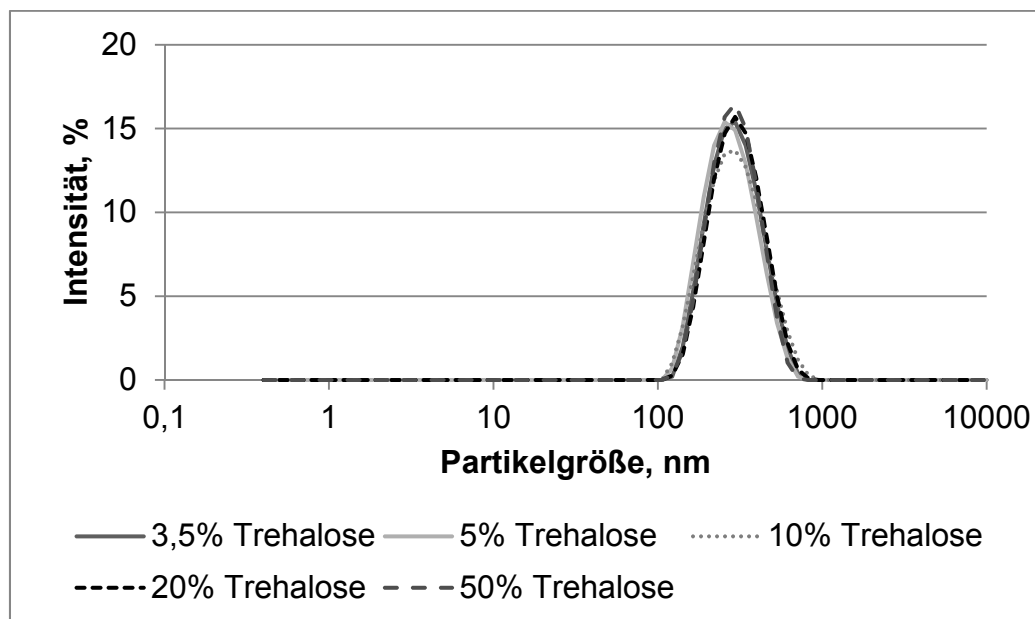


Abbildung 5.63: Partikelgrößenverteilung von Nanopartikeldispersionen mit unterschiedlicher Trehalosekonzentration (Zetasizer, n=3)

Die Zetasizermessung ergab, dass auch eine Erhöhung der Trehalosekonzentration keinen Einfluss auf die Nanopartikelgröße hat (Abbildung 5.63). Die Ansätze wurden gesprühgetrocknet und anschließend für die Freisetzungstests verwendet. Die Freisetzung wurde sowohl bei pH 5,5 als auch 7,4 durchgeführt.

5.3.4.1 Freisetzung in pH 7,4

In Abbildung 5.64 sind die Ergebnisse der Freisetzung in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 dargestellt. Zusätzlich zu den Formulierungen mit unterschiedlichem Trehaloseanteil ist das Ergebnis der Freisetzung von soliden Partikeln ohne Trehalose als Referenz hinzugefügt. Es lässt sich erkennen, dass mit steigender Trehalosekonzentration ein höherer Anteil an Ovalbumin aus den Partikeln freigesetzt wurde. Dabei sind die Unterschiede zwischen den

Formulierungen signifikant. Im Vergleich zu der Formulierung ohne Trehalose weisen alle Formulierungen mit Trehalose nach 24 Stunden eine hoch signifikant höhere Freisetzung auf.

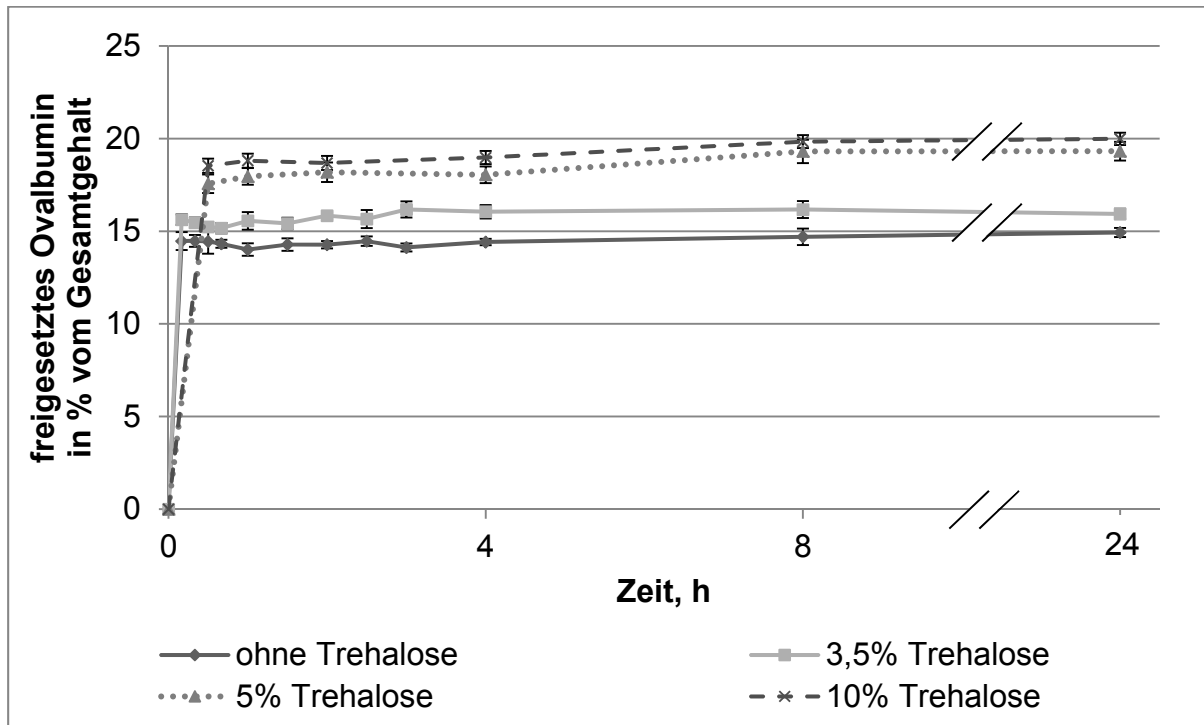


Abbildung 5.64: Ergebnis der Ovalbumin-Freisetzung aus Formulierungen mit unterschiedlicher Trehalosekonzentration bei pH 7,4 (n=2, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

5.3.4.2 Freisetzung in pH 5,5

Die Freisetzung in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 5,5 wurde darüber hinaus auch auf Formulierungen mit 20 und 50% Trehalose ausgedehnt. Dabei wurden die Proben mit 20 und 50% über 7 Tage freigesetzt, um zu überprüfen, ob der Anteil an freigesetztem Ovalbumin nach Erreichen des beobachteten Plateaus noch weiter zunimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.65 dargestellt.

Da die Formulierungen mit 20 und 50% Trehalose mit einer Einlasstemperatur von 100°C und einer Auslasstemperatur von 39°C getrocknet wurden, belegen diese Ergebnisse, dass diese Trocknungstemperaturen keinen negativen Einfluss auf die Freisetzung haben.

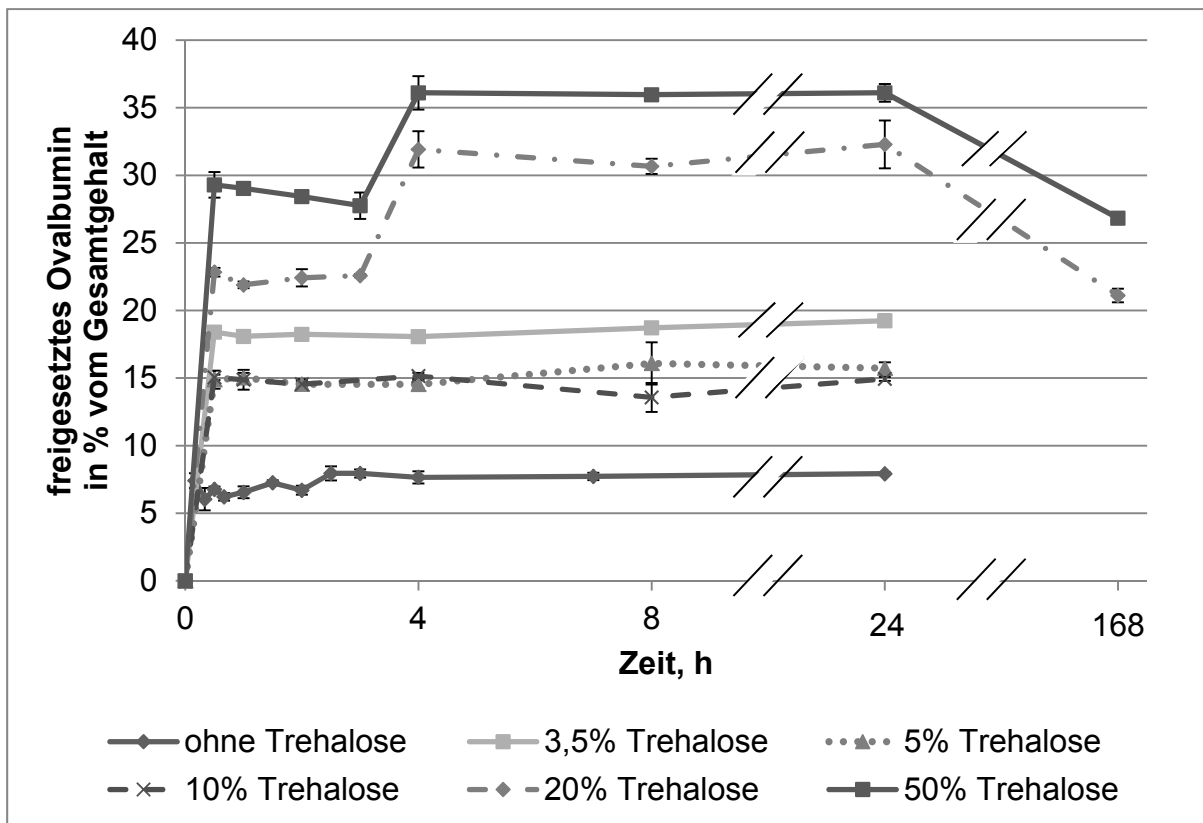


Abbildung 5.65: Ergebnis der Ovalbumin-Freisetzung aus Formulierungen mit unterschiedlicher Trehalosekonzentration bei pH 5,5 (n=2, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Die Abbildung zeigt eine deutliche Abhängigkeit von freigesetztem Ovalbumin und zugesetzter Trehalosemenge. Ein zusätzlich durchgeführter Student t-Test ergab, dass sich die ermittelten Ergebnisse für die Freisetzung nach 24 Stunden alle signifikant voneinander unterscheiden.

Aus der Freisetzungsuntersuchung resultierte, dass die Formulierungen mit 20 bzw. 50% im Vergleich zu den soliden Partikeln eine signifikante Verbesserung des freigesetzten Ovalbuminanteils aufwiesen. Als Grund für diese deutlich bessere Freisetzung wird die Erhöhung der Trehalosemenge angenommen. Im Vergleich zu pH 7,4 zeigen alle Formulierungen bei pH 5,5 eine etwas geringere Freisetzungsrage. Weiterhin konnte bei pH 5,5 beobachtet werden, dass während einer Freisetzung über sieben Tage ein Abfall des freigesetzten Ovalbuminanteils auftrat. Vermutlich degradierte das Ovalbumin in der sauren Lösung und fiel aus. Durch Zentrifugation wurde es mitsamt den Partikeln abgetrennt und konnte mittels BCA-Assay nicht mehr erfasst werden.

Um eine bessere Aussage über die Freisetzung zu erhalten, wurde die absolute Ovalbuminmenge, die nach 24 Stunden freigesetzt wurde, auf 100 mg Polymer

normiert und mit der Beladungsrate der jeweiligen Formulierung verglichen. Tabelle 5.21 zeigt die Ergebnisse bei einer Freisetzung in pH 5,5.

Tabelle 5.21: Vergleich von Beladungsrate und freigesetzter Ovalbuminmenge verschiedener Formulierungen bei pH 5,5

Formulierung	Beladungsrate, %	Freigesetztes Ovalbumin nach 24 h auf 100 mg Polymer normiert, µg
Ohne Trehalose	11,1	790
5% Trehalose	8,2	1283
10% Trehalose	10,0	1498
20% Trehalose	4,6	1120
50% Trehalose	3,7	1021

Bis zu einem Trehalosezusatz von 10% bleibt die Beladungsrate im Vergleich zu der Charge ohne Trehalose nahezu konstant. Bei einer Erhöhung auf 20 bzw. 50% nimmt die Beladungsrate hingegen ab. Es wird vermutet, dass Teile des verkapselten Ovalbumins die Partikel während der Herstellung durch die Poren verlassen haben und durch Zentrifugation abgetrennt wurden.

Die absolut freigesetzte Ovalbuminmenge nach 24 Stunden nimmt für 5 und 10% im Vergleich zu der Formulierung ohne Trehalose deutlich zu. Aus der Formulierung mit 10% Trehalose wurde nach 24 Stunden fast doppelt so viel Ovalbumin als aus der Formulierung ohne Trehalosezusatz freigesetzt. Für die Formulierungen mit 20 bzw. 50% Trehalose nimmt die freigesetzte Ovalbuminmenge im Vergleich zu der Formulierung mit 10% hingegen wieder ab. Auch mit der Formulierung mit 50% Trehalose wurde absolut gesehen mehr Ovalbumin als im Vergleich zu der Formulierung ohne Trehalose freigesetzt.

Aus den hier vorliegenden Ergebnissen resultiert, dass die Formulierung mit 10% Trehalose ein Optimum darstellt. Diese Formulierung zeigt sowohl eine gute Beladungsrate als auch die höchste Ovalbuminfreisetzung normiert auf 100 mg Polymer.

5.3.5 Aerodynamische Charakterisierung

Um die Formulierung aerodynamisch zu charakterisieren, wurden die Partikelgröße nach Inhalerdispergierung, die Feinpartikelfraktion, MMAD, GSD sowie die abgegebene Dosis bestimmt.

5.3.5.1 Dispergierverhalten

Die Formulierung mit 10% Trehalose, die mit 80°C Einlass- und 36°C Auslass-temperatur getrocknet wurde und die höchste, auf das Polymer normierte Freisetzung zeigte, wurde sowohl mit dem Cyclohaler als auch mit dem Unihaler dispergiert und mithilfe des HELOS die Partikelgrößenverteilung bestimmt.

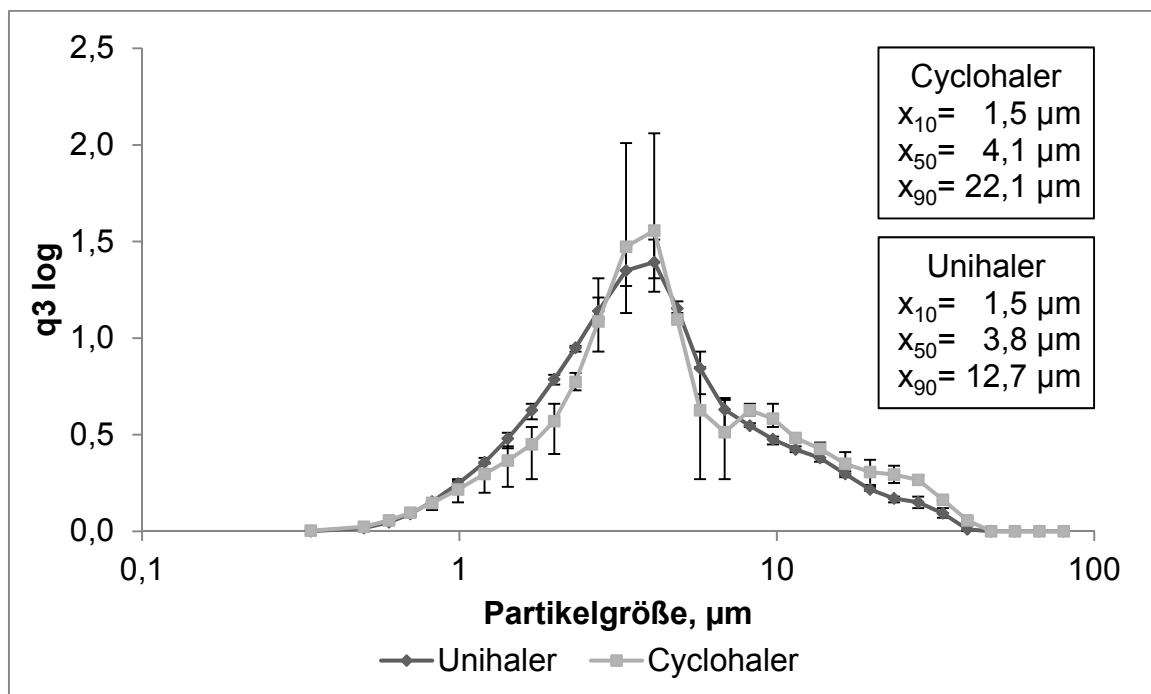


Abbildung 5.66: Partikelgrößenverteilung des sprühgetrockneten Pulvers (poröse Partikel mit 10% Trehalose, nach Dispergierung aus Cyclohaler und Unihaler, n= 3, Fehlerbalken zeigen die min-max-Werte)

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 5.66 dargestellt. Dabei lässt sich eine allgemein breite Verteilung der Partikel erkennen und die recht hohen x₉₀-Werte deuten auf eine Verlagerung zu größeren Partikeln hin. Die Ursache dafür ist vermutlich die niedrige Trocknungstemperatur, die die Feuchtigkeit nicht vollständig aus dem Ansatz entfernen konnte, sodass sich Agglomerate ausgebildet haben. Dennoch lässt sich erkennen, dass der Unihaler die Formulierung besser dispergieren konnte als der Cyclohaler. Dort blieben größere Agglomerate bestehen, was der hohe x₉₀-Wert von 22,1 µm belegt.

5.3.5.2 Bestimmung von Feinpartikelfraktion und aerodynamischem Durchmesser

Der Cyclohaler wurde für die Dispergierung einer Formulierung, die 5% Trehalose enthielt und mit einer Einlasstemperatur von 80°C und einer Auslasstemperatur von etwa 36°C gesprühtrocknet wurde, genutzt. Das Ergebnis ist im Histogramm in Abbildung 5.67 dargestellt.

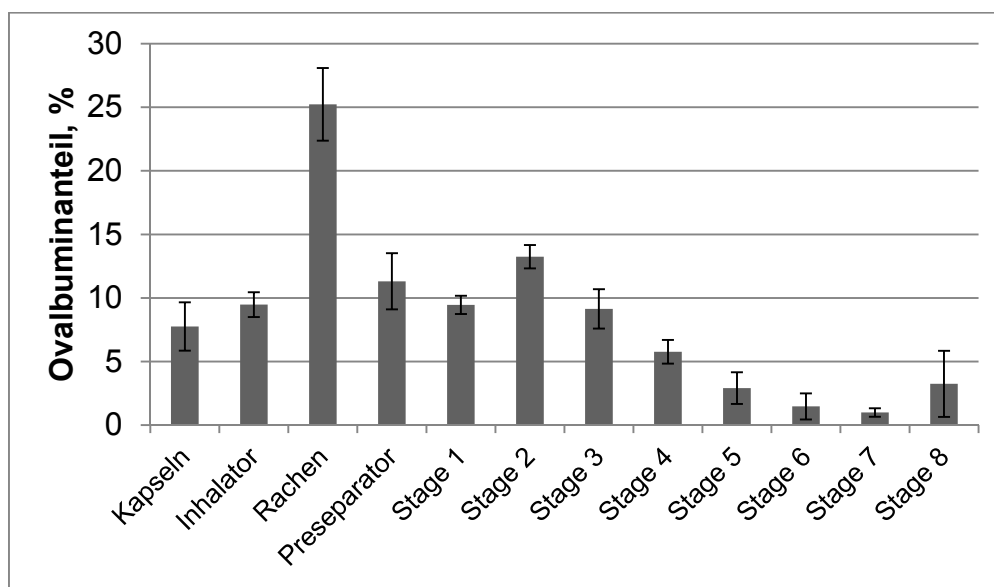


Abbildung 5.67: Ergebnis der NGI-Untersuchung (poröse Partikel mit 5% Trehalose, 80°C Einlass- und 36°C Auslasstemperatur, Cyclohaler, n=3, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Für diese Formulierung konnte eine Feinpartikelfraktion von 39% und ein MMAD von 3,4 µm ermittelt werden. Diese Ergebnisse sind sehr gut, vor allem unter Berücksichtigung dessen, dass die Partikelgrößenbestimmung mit diesen Trocknungsparametern eine sehr breite Partikelgrößenverteilung ergab. Die breite Partikelgrößenverteilung wird zudem durch die mit 3,9 recht hohe geometrische Standardabweichung wiedergespiegelt. Im Rachen ist, wie auch bei den soliden Partikeln, ein großer Anteil an Partikeln impaktiert. Dagegen fiel der Rückstand im Preseparator vergleichsweise gering aus. Der Zusatz von L-Leucin zu der Formulierung genauso wie eine höhere Einlasstemperatur bei der Sprühtrocknung stellen zwei Möglichkeiten dar, die Feinpartikelfraktion und die geometrische Standardabweichung zu optimieren.

5.3.5.3 Bestimmung der abgegebenen Dosis

Die Emitted dose wurde exemplarisch für zwei Formulierungen mit 5 und 10% Trehalose durchgeführt. Dabei wurden sowohl der Cyclohaler als auch der

Unihaler untersucht und die abgegebene Ovalbuminmenge ins Verhältnis zur eingewogenen Menge gesetzt.

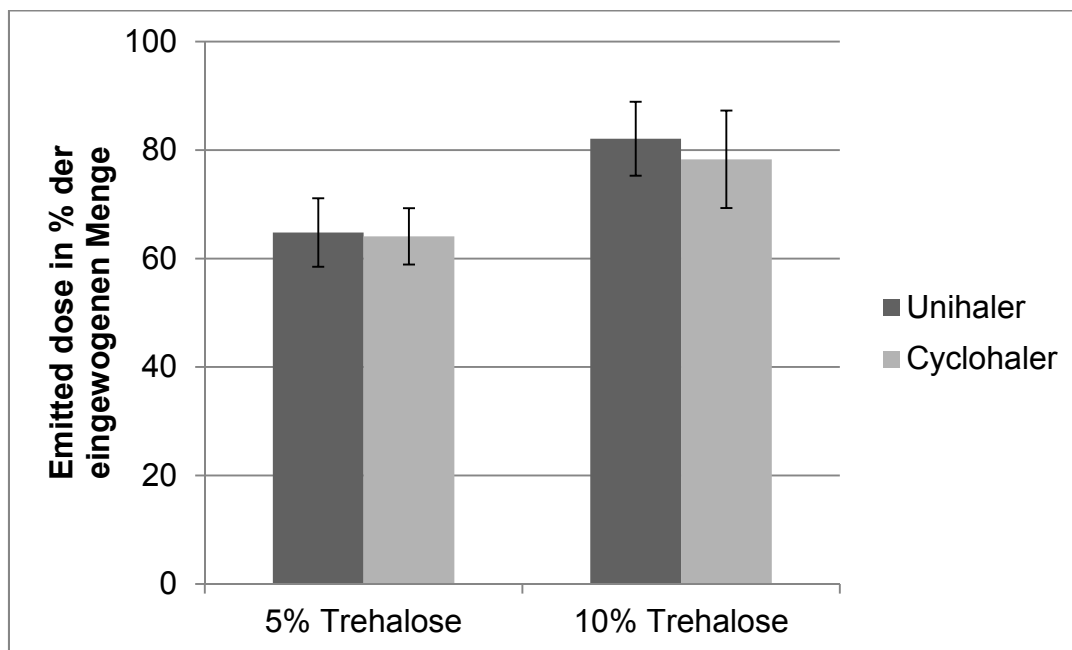


Abbildung 5.68: Ergebnis der Emitted dose-Untersuchung für Unihaler und Cyclohaler (poröse Partikel mit 5 und 10% Trehalose, n=3, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung)

Abbildung 5.68 zeigt vergleichend die Ergebnisse der Emitted dose, die prozentual auf die ursprünglich eingewogene Ovalbuminmenge bezogen wurden, für sowohl Unihaler als auch Cyclohaler. Es lässt sich zwischen beiden Inhalatoren kein signifikanter Unterschied feststellen. Der Vergleich der Formulierungen ergibt eine tendenziell etwas höhere Emitted dose für die 10%-Formulierung, dennoch ist dieser Effekt nicht signifikant. Im Mittel wurden von der 5%-Formulierung 62% und von der 10%-Formulierung 75% freigegeben. Diese Ergebnisse zeigen damit noch Verbesserungspotential. Die Standardabweichung liegt mit 5,2 bis 8,9% in einem akzeptablen Bereich. Die ermittelten relativ geringen abgegebenen Ovalbuminmengen waren aufgrund der breiten Partikelgrößenverteilungen (Abbildung 5.66), die durch Laserdiffraktometrie bestimmt wurden, bereits zu erwarten. Da es sich in diesem Fall, um Formulierungen handelte, die mit der geringen Auslasstemperatur von 36°C gesprühgetrocknet wurden, müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob durch eine Erhöhung der Auslasstemperatur oder auch durch den Zusatz von L-Leucin eine Verbesserung der prozentualen Emitted dose zu erzielen ist.

5.3.6 Partikelvisualisierung

Nachdem die Freisetzungsuntersuchungen eine verbesserte Freisetzung nach Zusatz von Trehalose ergaben, wurde angenommen, dass Poren entstanden waren, die eine effektivere Freisetzung bewirkten. Diese Poren sollten durch Visualisierung der Partikel nachgewiesen werden.

Dazu wurde das sprühgetrocknete Pulver in Aqua bidest. redispergiert und mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Partikel wurden mit 20.000-facher (Abbildung 5.69) und 50.000-facher Vergrößerung (Abbildung 5.70) visualisiert.

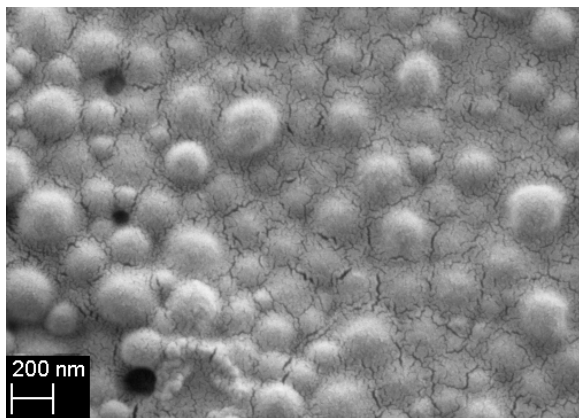


Abbildung 5.69: REM-Bild der Nanopartikel (poröse Partikel mit 50% Trehalose, 20.000-fache Vergrößerung)

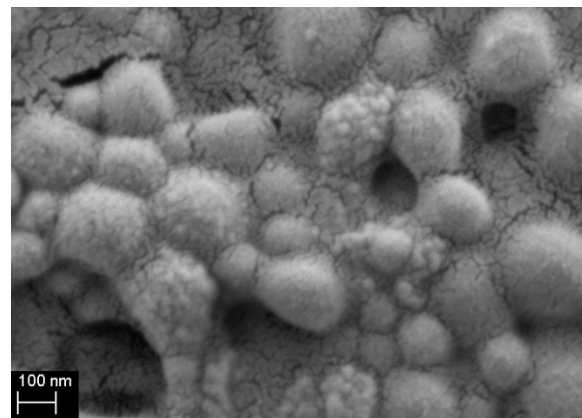


Abbildung 5.70: REM-Bild der Nanopartikel (poröse Partikel mit 50% Trehalose, 50.000-fache Vergrößerung)

Auf den Bildern lassen sich allerdings mit beiden Vergrößerungen keine Poren erkennen. Das Hindernis war, dass mit zunehmender Vergrößerung die Schärfe abnahm und möglicherweise vorhandene Poren aufgrund ihrer geringen Größe nicht detektiert werden konnten. Somit stellte sich die Partikelvisualisierung mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie als ungeeignet heraus.

Daher wurden die Proben mittels der Rasterkraftmikroskopie visualisiert. Dazu wurde erneut die sprühgetrocknete Formulierung in Aqua bidest. redispergiert und die Nanopartikel auf einen Probenträger aufgetragen. Es wurden Bilder von Partikeln, die mit unterschiedlicher Trehalosekonzentration hergestellt wurden, sowie ohne Trehalose aufgenommen. Abbildung 5.71 bis Abbildung 5.74 stellen die erhaltenen Bilder dar, die von Afra Torge (Phillips-Universität Marburg) angefertigt wurden. Abbildung 5.71 zeigt eine Formulierung ohne Trehalosezusatz. Es lässt sich eine glatte Oberfläche erkennen. In Abbildung 5.72 sind viele sehr raue Bereiche zu erkennen, welche zwischen den einzelnen

Nanopartikeln zu liegen scheinen. Dies sind Messartefakte, die für den Vergleich der Formulierungen außer Acht gelassen werden. Somit lässt sich zu den Nanopartikeln ohne Trehalose kein Unterschied erkennen. Auch die Oberfläche der Nanopartikel mit 20% Trehalose (Abbildung 5.73) zeigt keinen deutlichen Unterschied zu soliden Nanopartikeln. Allerdings zeigt Abbildung 5.74, dass die Formulierung mit 50% Trehalose eine deutlich erhöhte Oberflächenrauigkeit aufweist, was ein Hinweis auf Poren sein könnte.

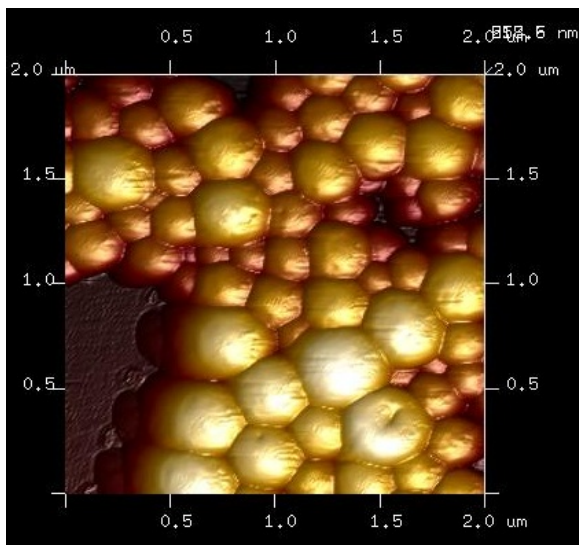


Abbildung 5.71: AFM-Bild der Nanopartikel ohne Trehalose

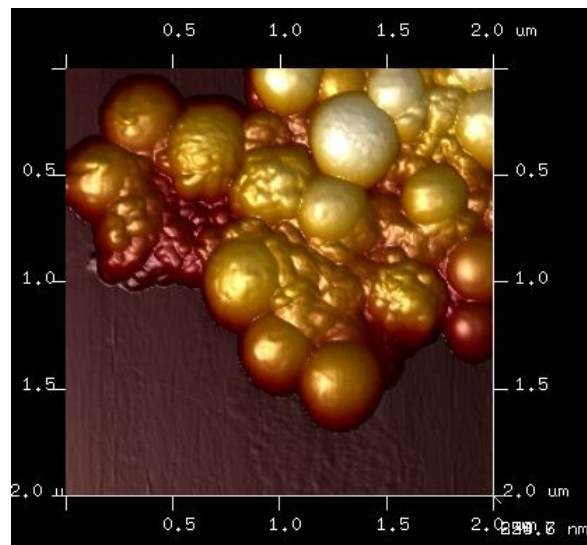


Abbildung 5.72: AFM-Bild der Nanopartikel mit 5% Trehalose

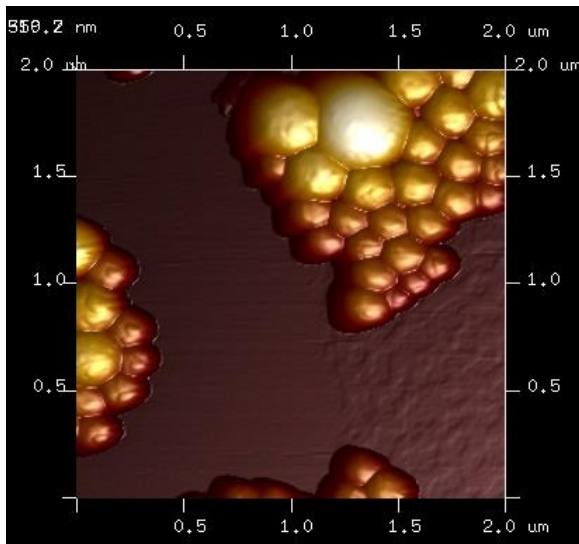


Abbildung 5.73: AFM-Bild der Nanopartikel mit 20% Trehalose

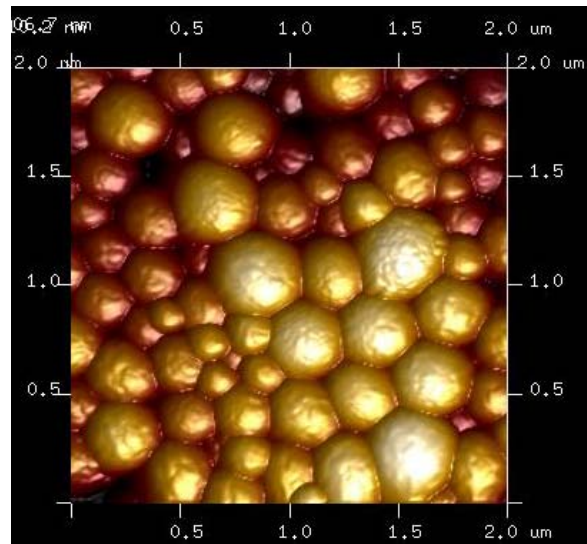


Abbildung 5.74: AFM-Bild der Nanopartikel mit 50% Trehalose

Anhand dieser Abbildungen lässt es sich nicht zweifelsfrei zeigen, dass Poren vorhanden sind. Dennoch deuten sie, in Kombination mit den Ergebnissen zu

Beladung und Freisetzung, darauf hin, dass durch den Zusatz von Trehalose PLGA-Nanopartikel mit einer gewissen Porosität erzeugt wurden.

Die Gefrierbruchtechnik könnte hier noch eine Methode darstellen, mit der sich mögliche Poren detektieren lassen.

5.3.7 Endotoxinbestimmung

Beispielhaft wurde der Endotoxingehalt für eine Formulierung poröser Partikel bestimmt. Es wurde ein Wert von 3-3,75 I.U./mg Formulierung ermittelt. Dieser ist etwas höher als der, der für die soliden Partikel erhalten wurde (Abschnitt 5.2.14). Ein Grund könnte die zugesetzte Trehalose sein, um das zu verifizieren, könnte der Endotoxingehalt der Trehalose bestimmt werden. Dennoch sind die Ergebnisse in einem unbedenklichen Bereich. Wenn man auch in diesem Fall von der Applikation von 20 mg Formulierung an eine Person mit 50 kg Körpergewicht ausgeht, ergibt sich ein maximaler Endotoxingehalt von 1,5 I.U./kg Körpergewicht. Dieser Wert liegt damit weit unter dem vom Ph. Eur. und USP geforderten Grenzwert von 5 I.U./kg Körpergewicht bei intravenöser Applikation. Dennoch stellt die Verwendung endotoxinfreien Ovalbumins eine Möglichkeit dar, den Endotoxingehalt zu reduzieren. Weiterhin könnte die Herstellung der Nanopartikel unter aseptischen Bedingungen erfolgen. Dazu könnten sterilisierte Gefäße und Geräte bei der Herstellung verwendet werden und die Evaporation könnte unter einer Werkbank mit Laminar Flow-Belüftung durchgeführt werden.

5.3.8 Fazit

Durch den Zusatz von Trehalose ist es gelungen, die freigesetzte Ovalbuminmenge im Vergleich zu den soliden Partikeln deutlich zu erhöhen. Die Freisetzungsuntersuchung ergab, dass die Formulierung mit 50% Trehalose den höchsten prozentualen Anteil an freigesetztem Ovalbumin aufwies. Allerdings zeigte der Vergleich der Beladungsrate, dass bei dieser Formulierung auch der geringste verkapselte Ovalbuminanteil vorlag. Die Freisetzungsergebnisse nach 24 Stunden wurden auf 100 mg Polymer normiert, wonach die Formulierung mit 10% die größte absolut freigesetzte Ovalbuminmenge ergab. Da diese Formulierung zudem eine Beladungsrate ähnlich zu den soliden Partikeln aufwies, stellt diese Formulierung das Optimum aller untersuchten Formulierungen dar. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Trehalosezusatz

die Partikelgröße von Nano- und Mikropartikeln nicht beeinflusst. Entscheidend bei der Herstellung der porösen Nanopartikel ist die Wahl der Sprühtrocknungstemperatur. Ist diese zu hoch, kommt es zu einer „Selbstheilung“ der Poren, sodass weniger Antigen freigesetzt wird. Bei zu niedriger Temperatur erfolgt die Trocknung hingegen unzureichend, wodurch größere Partikel und Agglomerate in der trockenen Formulierung enthalten sind. Als optimale Sprühtemperaturen stellten sich eine Einlasstemperatur von 100°C und eine Auslasstemperatur von 39°C heraus.

5.4 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Die Toxizität einer Formulierung sollte möglichst gering sein, damit dem Körper kein Schaden zugefügt wird. Eine Möglichkeit die Toxizität zu überprüfen, bietet die Zellkultur. Diese hat den Vorteil, dass die Tests relativ schnell erfolgen können, vergleichsweise günstig sind und dabei vorerst auf Tierversuche bzw. Versuche im Menschen verzichtet werden kann. Dennoch können diese in-vitro-Untersuchungen bisher nicht die in-vivo-Versuche ersetzen, sie helfen jedoch dabei, erste Erkenntnisse über das in-vivo-Verhalten einer Substanz bzw. Formulierung zu gewinnen.

Die Zytotoxizität der Formulierungen, wie auch der eingesetzten Substanzen, wurde an Calu-3-Zellen getestet. Calu-3-Zellen wurden als Zelllinie ausgewählt, da es sich um Lungenkarzinomzellen handelt, die sich durch eine hohe Teilungsrate auszeichnen. Damit stellen Calu-3-Zellen ein geeignetes Modell für den Respirationstrakt dar.

Die Formulierungen wurden als Dispersion und die eingesetzten Substanzen als Lösung oder Suspension jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Zellen aufgebracht. Die Zytotoxizität wurde mithilfe des MTT- und des Vialight-Assays analysiert.

5.4.1 MTT-Assay

5.4.1.1 Substanzen

Methanol wurde in dieser Arbeit als Lösungsmittel für PLGA bei der Solvent Change Präzipitation eingesetzt. Beispielhaft zeigt Abbildung 5.75 das Ergebnis des MTT-Assays für Methanol nach Auswertung mit der Software Sigmaplot. Dabei ist die prozentuale Viabilität der Calu-3-Zellen in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration aufgetragen. Durch das Logarithmieren der Abszisse ergibt sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf, aus dessen Funktion sich die LC_{50} -Konzentration, die Konzentration, bei der eine 50%ige Viabilität vorliegt, berechnen lässt. Diese beträgt $\ln c = 8,1$ mmol/l, was 3,2 mol/l entspricht. Da Methanol vor der Lösungsmittelveaporation in einer Konzentration von maximal 0,44 mmol/l vorlag, sind keine toxischen Effekte durch eine hohe Methanolkonzentration zu erwarten.

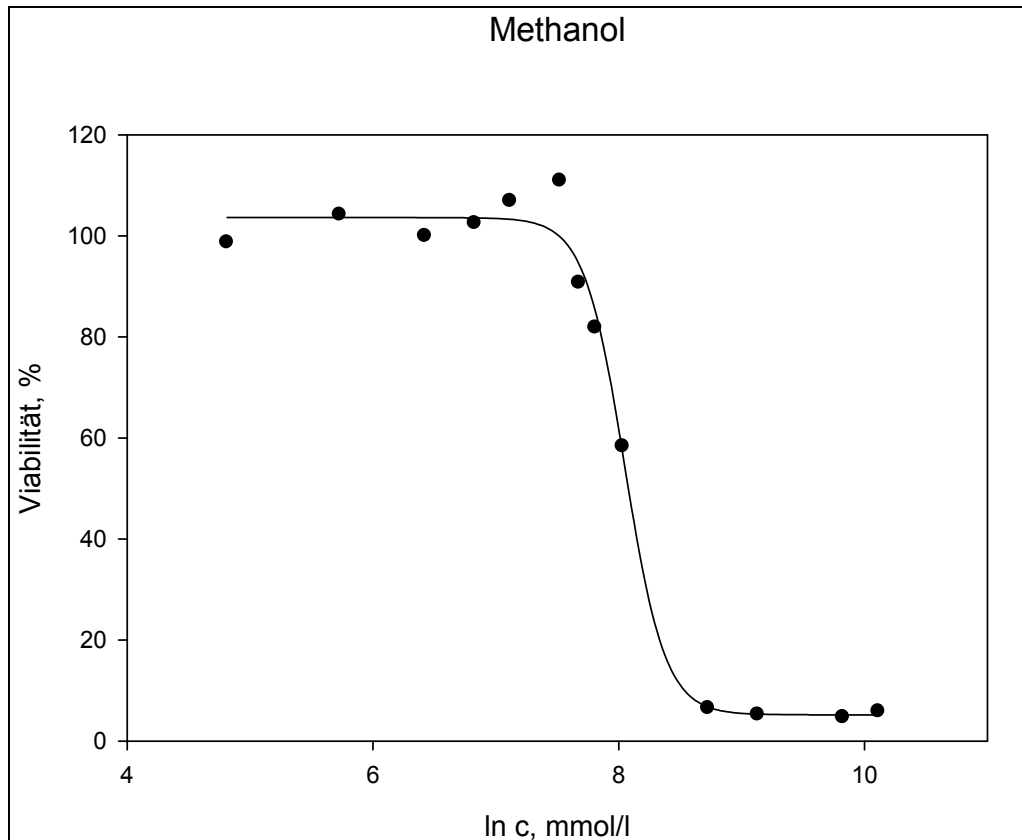


Abbildung 5.75: Sigmoidaler Kurvenverlauf aus der Software Sigmaplot am Beispiel von Methanol (n=4)

Aceton und Ethylacetat wurden ebenfalls als Lösungsmittel für PLGA eingesetzt. Im Zytotoxizitätstest wurde für Aceton eine LC_{50} -Konzentration von 1,5 mol/l und für Ethylacetat eine LC_{50} -Konzentration von 0,5 mol/l ermittelt. Die verwendete Ausgangskonzentration lag für Aceton mit 1,36 mol/l bereits unter der LC_{50} -Konzentration, für Ethylacetat mit 0,72 mol/l deutlich darüber. Es konnte festgestellt werden, dass der charakteristische Geruch des Ethylacetats nach dem Evaporationsprozess nicht mehr olfaktorisch wahrzunehmen war. Das deutete darauf hin, dass die größte Menge an Ethylacetat evaporiert war, und wurde schließlich auch durch die GC-Untersuchung (Abschnitt 5.2.12) belegt.

Zusätzlich zu den Lösungsmitteln wurden auch die verwendeten Stabilisatoren auf ihre zytotoxische Wirkung untersucht. Polysorbat 80 wies eine LC_{50} -Konzentration von 17 mmol/l auf. Allerdings wurde maximal eine Konzentration von 3,8 mmol/l eingesetzt, bei der in der Zellkultur keine toxischen Effekte detektiert wurden. PVA hatte sich bei der Doppalemulsionstechnik als besonders guter Stabilisator erwiesen. Für diesen wurde eine LC_{50} -Konzentration von 1,28 mmol/l ermittelt. Üblicherweise wurde das PVA bei der Nanopartikel-

herstellung in einer Konzentration von 0,3 mmol/l eingesetzt. Nach der Sprühtrocknung war die PVA-Konzentration deutlich höher. Sie machte 80% der Formulierung aus. Bei einer verwendeten Einzeldosis von 20 mg entspricht dies 0,5 µmol PVA. Da dieser Wert deutlich unter der ermittelten LC₅₀-Konzentration für PVA von 1,28 mmol/l liegt, werden keine toxischen Effekte durch das PVA erwartet.

Als weiterer Stabilisator wurde HPMC untersucht. Da HPMC kein definiertes Molekulargewicht hat, wurde hier die LC₅₀-Konzentration in % (m/V) angegeben, sie betrug 2,3% (m/V). Dieser Wert ist als hoch und HPMC damit als ungefährlich einzuschätzen, vor allem im Hinblick darauf, dass die für die aerodynamische Charakterisierung gefüllten Kapseln nur 20 mg der Formulierung enthielten und sich die Formulierung in der Lunge über eine große Oberfläche verteilen sollte.

Trehalose wurde als Porenbildner während der Herstellung der porösen Partikel verwendet. Es zeigte auch in einer Konzentration von 290 mmol/l keine toxische Wirkung auf die Zellen. Die Viabilität lag bei allen getesteten Lösungen über 90%. Vermutlich wurde bereits während der Herstellung der überwiegende Anteil der Trehalose ausgewaschen und abzentrifugiert, sodass keine Toxizität zu erwarten ist.

Das Ovalbumin wird zwar lediglich als Modellantigen verwendet, allerdings sollte auch hier die Toxizität überprüft werden, damit, falls toxische Effekte mit der finalen Formulierung auftreten, das Ovalbumin ausgeschlossen bzw. als Ursache angenommen werden könnte. Auch dieses zeigte bis zur getesteten Höchstkonzentration von 0,03 mmol/l keinerlei Toxizität, was bereits ein Vielfaches der eingesetzten Konzentration ist.

5.4.1.2 Sprühgetrocknete Formulierungen

Nachdem die Toxizität der einzelnen Ausgangssubstanzen überprüft wurde, galt es die Nanopartikelformulierungen zu untersuchen. Dabei wurden die sprühgetrockneten Formulierungen in HBSS dispergiert und auf die Zellen aufgebracht. Zuerst wurde eine Formulierung aus der Solvent Change Präzipitation geprüft. Dafür wurden Konzentrationen bis zu 2% (m/V) verwendet. Die 2%ige Probe-lösung enthielt dabei 12,5 mg/ml HPMC, 5 mg/ml PLGA und 2,5 mg/ml Ovalbumin. Es traten auch mit der höchsten getesteten Konzentration keine

zytotoxischen Effekte, Viabilität > 80%, auf. Weitere Formulierungen aus der Doppulemulsionsmethode wurden ebenfalls bis zu einer Konzentration von 2% (m/V) untersucht, wobei die 2%ige Probelösung aus 15,6 mg/ml PVA, 3,9 mg/ml PLGA und 0,5 mg/ml Ovalbumin bestand. Auch bei diesen Formulierungen traten keine toxischen Effekte ein.

Zuletzt wurden auch die porösen Partikel untersucht. Dabei wurden eine Formulierung mit 20% Trehalose-, sowie eine mit 50% Trehalosezusatz geprüft. Für beide Formulierungen wurden Konzentration bis zu 1% (m/V) getestet, womit sich eine Zusammensetzung von 7,9 mg/ml PVA, 2 mg/ml PLGA und 0,1 mg/ml Ovalbumin in der Probelösung mit der höchsten Konzentration ergab. Es wurde dabei keine Toxizität festgestellt.

Die MTT-Untersuchungen ergaben, dass bei einigen der verwendeten Ausgangssubstanzen in höheren Konzentration zytotoxische Effekte auftraten. Allerdings konnte die Untersuchung der finalen Formulierungen zeigen, dass bei den getesteten Konzentrationen keine Toxizität festzustellen war.

5.4.2 Vialight-Assay

In der Literatur (Wahl, 2008) wurde beschrieben, dass Nanopartikel grundsätzlich mit dem MTT-Reagenz interferieren, sowie Nanopartikel-dispersionen zu einer Veränderung der Absorptionswerte führen könnten, wodurch falsche Ergebnisse erhalten werden können. Um solche Interaktionen auszuschließen, wurden die Ergebnisse mithilfe des Vialight-Assays überprüft. Dazu wurde eine sprühgetrocknete Formulierung in HBSS redispergiert und sowohl mit dem Vialight-Assay, als auch vergleichend mit dem MTT-Assay untersucht. Dabei konnte mithilfe des Vialight-Assays belegt werden, dass die untersuchte Formulierung aus der Doppulemulsionsmethode (Zusammensetzung wie beim MTT-Assay) bis zur getesteten Konzentration von 2% (m/V) keine Toxizität aufwies. Da der Vialight-Assay zu keinem anderen Ergebnis kam, dafür sowohl zeit- als auch materialaufwändiger ist, wurde entschieden, den MTT-Assay weiterhin auch für die Bestimmung der Toxizität der Nanopartikel-formulierung durchzuführen.

Der Vialight-Assay ist aber bei stark getrübbten Proben, die die Absorption beeinflussen könnten, zu bevorzugen, da anstelle der Absorption die

Lichtemission ermittelt wird und damit durch die Partikel keine Störung zu erwarten ist. Weiterhin ist es sinnvoll die Ergebnisse des MTT-Assays mit dem Vialight-Assay zu überprüfen, um Fehler durch Interaktionen von Probe und Assay zu vermeiden.

6 ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Diese vorliegende Arbeit umfasst die Entwicklung und Charakterisierung einer Vakzinformulierung für die pulmonale Applikation.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden Nanopartikel aus dem Polymer PLGA hergestellt und mit dem Modellantigen Ovalbumin beladen. Durch Sprühtrocknung wurden die Nanopartikel in ein trockenes Produkt überführt, das sich nach Dispergierung mit einem Inhalator für die pulmonale Applikation eignete. Mithilfe von in-vitro Untersuchungen wurde ermittelt, ob die Formulierungen eine Immunreaktion auslösen. Zusätzlich wurde die Zytotoxizität an einer Lungenkarzinomzelllinie geprüft.

Die PLGA-Nanopartikel wurden mit zwei unterschiedlichen Verfahren hergestellt: Der Solvent Change Präzipitation und der Doppalemulsionsmethode. Dabei wurde das Ziel verfolgt, Partikel mit einer Größe zwischen 200 und 400 nm zu erzeugen. Damit besaßen die Partikel eine ähnliche Größe wie Bakterien, was eine effektive partikuläre Aufnahme durch immunkompetente Zellen der Lunge, wie zum Beispiel Alveolarmakrophagen und dendritische Zellen, ermöglicht.

Mit beiden Methoden ließen sich reproduzierbar Nanopartikel im Bereich von 300 nm herstellen. Allerdings hatte die Solvent Change Präzipitation den Nachteil, dass das Antigen ausschließlich auf der Oberfläche adsorbiert werden konnte und somit nicht vor äußeren Einflüssen geschützt war. Im Gegensatz dazu konnte das Antigen bei der Doppalemulsionsmethode effektiv in die Partikel verkapselt werden. Jedoch wurde eine ungenügende Freisetzung des verkapselten Antigens innerhalb von 24 Stunden beobachtet. Gelöst wurde dies durch die Entwicklung von porösen Nanopartikeln, die den Vorteil boten, dass das Antigen im Inneren verkapselt vorlag, aber durch die Poren effektiver als bei soliden Partikeln freigesetzt werden konnte. Die freigesetzte Antigenmenge konnte mit diesem Ansatz erfolgreich von etwa 8% auf 36% gesteigert werden.

Da sich die Nanopartikel selbst, aufgrund ihrer geringen Größe, nicht für die pulmonale Applikation eignen, wurden sie durch Sprühtrocknung in ein trockenes mikropartikuläres Pulver überführt. Dabei diente der Stabilisator, der bereits während der Nanopartikelherstellung genutzt wurde, als Matrix, in die die

Nanopartikel eingebettet wurden. HPMC und PVA waren für den Zweck der Stabilisierung und Sprühtrocknung besonders geeignet. Die Herstellung des sprühgetrockneten Pulvers wurde dahingehend optimiert, dass eine aerodynamische Partikelgröße zwischen 0,5 und 5 µm erzielt wurde. In diesem Größenbereich können Partikel in die Lunge gelangen und dort abgeschieden werden. Abgesehen von der Größe ist für eine erfolgreiche pulmonale Applikation die Verwendung eines Inhalators erforderlich. Zu diesem Zweck wurden Untersuchungen mit zwei kapselbasierten Trockenpulverinhalatoren, dem Cyclohaler und dem Unihaler, durchgeführt und die Dispergiereigenschaften der beiden Inhalatoren sowie die aerodynamischen Eigenschaften der dispergierten Formulierung ermittelt und miteinander verglichen.

Im Kontakt mit Feuchtigkeit, wie zum Beispiel in der Lunge, löste sich die Stabilisatormatrix auf und gab die Nanopartikel frei. Diese besaßen noch die gleiche Größe wie vor der Sprühtrocknung, womit sie potentiell für die Aufnahme durch immunkompetente Zellen der Lunge geeignet waren. Nach der Aufnahme ins Zellinnere soll das Antigen aus den Partikeln freigegeben und anschließend prozessiert werden, um eine Immunreaktion zu bewirken. Die immunologischen in-vitro-Untersuchungen bewiesen, dass es zur Aufnahme der Partikel kam und eine Immunreaktion ausgelöst wurde. Dabei lösten die partikulären Antigenformulierungen eine stärkere Immunreaktion als das gelöste Antigen aus.

In der Zellkultur wurde zusätzlich die Zytotoxizität sowohl der eingesetzten Formulierungsbestandteile als auch der finalen Formulierung an Calu-3-Zellen, einer Lungenkarzinomzelllinie, überprüft. Es wurde festgestellt, dass die finale Formulierung keine toxischen Effekte auf die Calu-3-Zellen auslöste und auch alle Formulierungsbestandteile in einer unbedenklichen Konzentration vorlagen.

Abschließend wurde die Stabilität der Formulierung bei Lagerung über 6 Monate unter Umgebungsbedingungen (21°C und 32% rF) getestet. Dabei kam es zu einer leichten Abnahme des Antigengehalts und einer geringfügigen Zunahme der durchschnittlichen Nanopartikelgröße. Die Nanopartikel besaßen aber weiterhin eine Größe, die die Aufnahme durch immunkompetente Zellen ermöglichte. Darüber hinaus blieben die Partikelgrößenverteilung wie auch die aerodynamischen Eigenschaften der Formulierung über die Lagerzeit unverändert.

Es gelang, eine Formulierung zu entwickeln, die geeignet ist, ein Antigen pulmonal zu applizieren. Damit stellt diese Formulierung eine Plattform dar, mit der nun unterschiedliche Antigene pulmonal appliziert werden können. Dabei wäre neben der therapeutischen, ebenfalls eine präventive Vakzinierung denkbar. Mithilfe von in-vivo-Studien sollte nun überprüft werden, ob die in-vitro festgestellten Effekte ebenfalls in-vivo zu detektieren sind.

7 ABSTRACT

This work describes the development and characterisation of a formulation which is suitable for vaccination via the respiratory tract. Nanoparticles were produced by using PLGA as polymer and loaded with ovalbumin as model antigen. By spray drying the nanoparticles were transferred to a dry powder which was suitable for inhaler dispersion and for application into the lung. In vitro tests were used to determine immunologic effects of the formulations. Furthermore, the cytotoxicity of the formulations was tested by using a bronchial adenocarcinoma cell line.

Two methods were used in this work for nanoparticle production, on the one hand a solvent change precipitation and on the other hand a double emulsion technique. Thereby nanoparticles in the size range between 200 and 400 nm should be achieved. This scale is similar to bacteria size ranges. Hence an effective particulate uptake by immune cells in the lung, for example alveolar macrophages and dendritic cells, was possible.

Both above mentioned methods were reproducibly applicable to produce particles of around 300 nm in diameter. In case of the solvent change precipitation the antigen was just adsorbed at the surface of the particles with the disadvantage of a poor protection against external influences. In contrast the double emulsion technique enabled an effective antigen encapsulation. However this included the disadvantage of a very low antigen release within the first 24 hours which was controlled by the degradation of the polymer. To address this issue porous nanoparticles were developed which comprise both the advantages of antigen encapsulation in the particle as well as a better antigen release. With this approach it was possible to increase the antigen release from 8% for solid up to 36% for porous particles.

The nanoparticles themselves were not suitable for application to the respiratory tract due to their small size. Therefore they were transferred by spray drying into a dry powder. The stabiliser which was used for particle production acted during spray drying as a bulking agent in which the nanoparticles were embedded. HPMC and PVA were both particularly suitable for nanoparticle stabilisation as

well as for spray drying. The spray dried powder production process was optimised to obtain particles in the aerodynamic size range between 0.5 and 5 μm which enables the particles to reach the lung. Application to the respiratory tract requires an inhalation device. Cyclohaler and Unihaler, both being capsule based dry powder inhalers, were used in order to determine the dispersion properties of the inhalers as well as the aerodynamic behaviour of the dispersed formulation.

In contact with moisture, as for example present inside the lung, the matrix dissolved and the nanoparticles were redispersed. These nanoparticles showed the same particle size as prior to the spray drying process step. This allows the uptake by immune cells of the lung. After nanoparticle uptake the antigen shall be released from the nanoparticles and be processed, followed by an immune response. The immunologic in-vitro tests demonstrated particle uptake by cells as well as the appearance of immune responses. Thereby the particulate antigen show an improved response compared to the dissolved antigen.

Furthermore, the cytotoxicity of the final formulations and the individual formulation components was tested by using Calu-3 cells which represent a bronchial adenocarcinoma cell line. No toxic effects were detected for the final formulations and the components were also found to exist only in harmless concentrations.

Finally, a stability test was performed during 6 months storage on ambient conditions (21°C and 32% rH) resulting in a minor decrease in antigen content and a slight increase in nanoparticle size. The nanoparticles were still in the suitable size range for uptake by dendritic cells and macrophages. Furthermore, microparticle size distribution and aerodynamic behaviour of the formulation showed no differences.

The development of a formulation for vaccination via the respiratory was successfully performed. The produced formulation represents a platform which is suitable for pulmonary application of different antigens. The use as a formulation for therapeutic as well as for preventive vaccination is conceivable. The next steps should comprise in-vivo studies for proofing the in-vitro results.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AFM	Rasterkraftelektronenmikroskopie
AMR	ATP-Messreagenz
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BMD	Aus dem Knochenmark abgeleitet
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
cP	Centipoise
DC	Dendritische Zelle
DMF	Dimethylformamid
DPI	Trockenpulverinhalator
DUSA	Dosage unit sampling apparatus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FA-PLGA	Fluoresceinamin-gelabeltes PLGA
FID	Flammenionisationsdetektor
FPF	Feinpartikelfraktion
FPF _{rel}	Relative Feinpartikelfraktion
GC	Gaschromatographie
GSD	Geometrische Standardabweichung
h	Stunde
HBSS	Hanks' balanced salt solution

HCl	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
I.U.	Internationale Einheit
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
l	Liter
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LC ₅₀	Konzentration, bei der 50% der Zellen sterben
M	Mol/Liter
m ²	Quadratmeter
m/V	Masse pro Volumen
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
MMAD	Massenbezogener mittlerer aerodynamischer Durchmesser
mmol	Millimol
mPa	Millipascal
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
NaOH	Natriumhydroxid
NGI	Next Generation Pharmaceutical Impactor
nm	Nanometer
OVA	Ovalbumin
Pa	Pascal
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Struktur
PDI	Polydispersitätsindex
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea

PLGA	Poly(D,L)-lactid-co-glycolid
PRR	Pattern recognition receptor
q3 log	Verteilungsdichte
REM	Rasterelektronenmikroskop
rF	Relative Luftfeuchte
rH	Relative humidity
RLU	Relative Lichteinheit
rpm	Rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCR	T-Zell-Rezeptor
USP	United States Pharmacopeia
V/V	Volumen pro Volumen

9 LITERATURVERZEICHNIS

ABDATA Pharma-Daten-Service (2013). Pharmazeutische Stoffliste 19. Auflage. ABDATA. Eschborn/Taunus.

ALPAR, H.; SOMAVARAPU, S.; ATUAH, K.; BRAMWELL, V.; Alpar, H. Oya; Atuah, K. N.; Bramwell, V. W. (2005). Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 3, 411–430.

Bauer, K. H.; Lippold, B. C.; Egermann, H. (2006). Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie. 8. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. Stuttgart.

Binnig, G.; Quate, C. F. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 9, 930–933.

Blank, F.; Stumbles, P.; Garnier, C. von (2011). Opportunities and challenges of the pulmonary route for vaccination. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5, 547–563.

Boer, A. H. de; Winter, H.M.I.; Lerk, C. F. (1996). Inhalation characteristics and their effects on in vitro drug delivery from dry powder inhalers Part 1. Inhalation characteristics, work of breathing and volunteers' preference in dependence of the inhaler resistance. *International Journal of Pharmaceutics*, 2, 231–244.

Boer, A. H. de; Gjaltema, D.; Hagedoorn, P. (1996). Inhalation characteristics and their effects on in vitro drug delivery from dry powder inhalers Part 2: Effect of peak flow rate (PIFR) and inspiration time on the in vitro drug release from three different types of commercial dry powder inhalers. *International Journal of Pharmaceutics*, 1, 45–56.

Butts, C.; Socinski, M. A.; Mitchell, P. L.; Thatcher, N.; Havel, L.; Krzakowski, M.; Nawrocki, S.; Ciuleanu, T.-E.; Bosquée, L.; Trigo, J. M. et al. (2014). Tecemotide (L-BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small-cell lung cancer (START): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 1, 59–68.

Byron, P. R.; Patton, J. S. (1994). Drug Delivery via the Respiratory Tract. *Journal of Aerosol Medicine*, 1, 49–75.

Crouch, S.P.M.; Kozlowski, R.; Slater, K. J.; Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 1, 81–88.

DE 102009037840 B4. Inhalationsvorrichtung und Verfahren zur Inhalation eines Wirkstoffs aus einer Kapsel. (2012). Friebel, C.; Müller, B. W.; Steckel, H.

Depreter, F.; Pilcer, G.; Amighi, K. (2013). Inhaled proteins: Challenges and perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*, 1-2, 251–280.

Desai, K.-G. H.; Schwendeman, S. P. (2013). Active self-healing encapsulation of vaccine antigens in PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*, 1, 62–74.

Drabick, J. J.; Brandt, B. L.; Moran, E. E.; Saunders, N. B.; Shoemaker, D. R.; Zollinger, W. D. (1999). Safety and immunogenicity testing of an intranasal group B meningococcal native outer membrane vesicle vaccine in healthy volunteers. *Vaccine*, 1-2, 160–172.

Europäisches Arzneibuch (2013). 7. Ausgabe. Deutscher Apotheker Verlag. Stuttgart.

FDA (30.06.2014). FDA approves Afrezza to treat diabetes. <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm403122.html>.

Fifis, T.; Gamvrellis, A.; Crimeen-Irwin, B.; Pietersz, G. A.; Li, J.; Mottram, P. L.; McKenzie, I. F. C.; Plebanski, M. (2004). Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *Journal of Immunology*, 5, 3148–3154.

Fotakis, G.; Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 2, 171–177.

Friebel, C.; Steckel, H.; Müller, B. W. (2012). Rational design of a dry powder inhaler: device design and optimisation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9, 1303–1315.

Geisow, M. J.; Evans, W. H. (1984). pH in the endosome. *Experimental Cell Research*, 1, 36–46.

Giarelli, E. (2007). Cancer vaccines: a new frontier in prevention and treatment. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 11, 11–17.

Hänninen, A.; Braakhuis, A.; Heath, W. R.; Harrison, L. C. (2001). Mucosal antigen primes diabetogenic cytotoxic T-lymphocytes regardless of dose or delivery route. *Diabetes*, 4, 771–775.

Haverkamp, V.; Ehrfeld, W.; Gebauer, K.; Hessel, V.; Löwe, H.; Richter, T.; Wille, C. (1999). The potential of micromixers for contacting of disperse liquid phases. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 7, 617–624.

Hessel, V.; Löwe, H.; Schönfeld, F. (2005). Micromixers—a review on passive and active mixing principles. *Chemical Engineering Science*, 8-9, 2479–2501.

Holmgren, J.; Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine*, 4, 45–53.

Huang, J.; Garmise, R. J.; Crowder, T. M.; Mar, K.; Hwang, C. R.; Hickey, A. J.; Mikszta, J. A.; Sullivan, V. J. (2004). A novel dry powder influenza vaccine and intranasal delivery technology: induction of systemic and mucosal immune responses in rats. *Vaccine*, 6, 794–801.

Huntington, J. A.; Stein, P. E. (2001). Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1-2, 189–198.

IMM Mainz (2009). Impinging Jet Micromixer.

http://www.microinnova.com/microreactorpdf/Impinging_Jet_Micromixer.pdf.

IMM Mainz (2009). Slit Interdigital Micromixer.

http://www.microinnova.com/microreactorpdf/Slit_Interdigital_Micromixer.pdf.

ISO 13320-1: Particle size analysis - Laser diffraction methods - Part 1: General principles (1999).

Jain, R. A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 23, 2475–2490.

Jain, S.; Khomane, K.; K. Jain, A.; Dani, P. (2011). Nanocarriers for Trans-mucosal Vaccine Delivery. *Current Nanoscience*, 2, 160–177.

Jensen, D. M. K.; Cun, D.; Maltesen, M. J.; Frokjaer, S.; Nielsen, H. M.; Foged, C. (2010). Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation. *Journal of Controlled Release*, 1, 138–145.

Joshi, V. B.; Geary, S. M.; Salem, A. K. (2013). Biodegradable Particles as Vaccine Delivery Systems: Size Matters. *The AAPS Journal*, 1, 85–94.

Li, H.-Y.; Neill, H.; Innocent, R.; Seville, P.; Williamson, I.; Birchall, J. C. (2003). Enhanced Dispersibility and Deposition of Spray-dried Powders for Pulmonary Gene Therapy. *Journal of Drug Targeting*, 7, 425–432.

Maa, Y.-F.; Nguyen, P.-A.; Sweeney, T.; Shire, S. J.; Hsu, C. C. (1999). Protein Inhalation Powders: Spray Drying vs Spray Freeze Drying. *Pharmaceutical Research*, 2, 249–254.

Malvern Instruments (2004). Zetasizer nano series. User Manual. 2.1 Auflage.

Marple, V. A.; Roberts, D. L.; Romay, F. J.; Miller, N. C.; Truman, K. G.; van Oort, M.; Olsson, B.; Holroyd, M. J.; Mitchell, J. P.; Hochrainer, D. (2003). Next generation pharmaceutical impactor (a new impactor for pharmaceutical inhaler testing). Part I: Design. *Journal of aerosol medicine: the official journal of the International Society for Aerosols in Medicine*, 3, 283–299.

Meier, J. (1981). Biopharmazie. Thieme. Stuttgart, New York.

Meyer, R. (2007). Deutsches Ärzteblatt: Kurz informiert. *Deutsches Ärzteblatt*, 104(44).

Mutschler, E. (2008). Mutschler Arzneimittelwirkungen. 9. Auflage. Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft. Stuttgart.

Newman, S.; Anderson, P. (2009). Respiratory drug delivery.

Olazabal, I. M.; Martin-Cofreces, N. B.; Mittelbrunn, M.; Martinez del Hoyo, G.; Alarcon, B.; Sanchez-Madrid, F. (2007). Activation Outcomes Induced in Naive CD8 T-Cells by Macrophages Primed via "Phagocytic" and Nonphagocytic Pathways. *Molecular Biology of the Cell*, 2, 701–710.

Palucka, K.; Ueno, H.; Banchereau, J. (2011). Recent Developments in Cancer Vaccines. *The Journal of Immunology*, 3, 1325–1331.

Peek, L. J.; Roberts, L.; Berkland, C. (2008). Poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticle agglomerates as carriers in dry powder aerosol formulation of proteins. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 17, 9775–9783.

Reingruber, H. (2010). Rasterelektronenmikroskopie. Vorbereitungsunterlagen zur Praktikumsübung. www.uni-ulm.de/physchempraktikum/media/literatur/Rasterelektronenmikroskop.pdf.

Richards, A. B.; Krakowka, S.; Dexter, L. B.; Schmid, H.; Wolterbeek, A. P. M.; Waalkens-Berendsen, D. H.; Shigoyuki, A.; Kurimoto, M. (2002). Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology*, 7, 871–898.

Rink, L.; Haase, H.; Kruse, A. (2012). Immunologie für Einsteiger. Spektrum, Akademischer Verlag. Heidelberg.

Robert Koch Institut Impfen (2013).

http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/Praevention/praevention_node.html.

Rosenberg, S. A.; Yang, J. C.; Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Medicine*, 9, 909–915.

Scherließ, R. (2011). The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 1-2, 98–105.

Schijns, V.; Tartour, E.; Michalek, J.; Stathopoulos, A.; Dobrovolskiené, N. T.; Strioga, M. M. (2014). Immune adjuvants as critical guides directing immunity triggered by therapeutic cancer vaccines. *Cytotherapy*, 4, 427–439.

Schumacher, T.; Bunse, L.; Pusch, S.; Sahm, F.; Wiestler, B.; Quandt, J. et al. (2014). A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. *Nature*, Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/nature13387>.

Semete, B.; Booyen, L.; Lemmer, Y.; Kalombo, L.; Katata, L.; Verschoor, J.; Swai, H. S. (2010). In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5, 662–671.

Seville, P. C.; Learoyd, T. P.; Li, H.-Y.; Williamson, I. J.; Birchall, J. C. (2007). Amino acid-modified spray-dried powders with enhanced aerosolisation properties for pulmonary drug delivery. *Powder Technology*, 1, 40–50.

Sharma, S.; Mukkur, T. K. S; Benson, H. A. E; Chen, Y. (2009). Pharmaceutical aspects of intranasal delivery of vaccines using particulate systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3, 812–843.

Sigma-Aldrich (2014). Product Specification Ovalbumin.

https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/A5/A5503/A5503-BULK____SIGMA____.pdf

Silva, A.L; Rosalia, R.A; Sazak, A.; Carstens, M.G; Ossendorp, F.; Oostendorp, J.; Jiskoot, W. (2013). Optimization of encapsulation of a synthetic long peptide in PLGA nanoparticles: Low-burst release is crucial for efficient CD8+ T cell activation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 3, 338–345.

Slütter, B.; Bal, S; Keijzer, C.; Mallants, R; Hagenaars, N.; Que, I.; Kaijzel, E.; van Eden, W.; Augustijns, P.; Löwik, C.; Bouwstra, J.; Broere, F.; Jiskoot, W. (2010). Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: Nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen. *Vaccine*, 38, 6282–6291.

Smith, M. B.; Back, J. F. (1965). Studies on Ovalbumin II. The Formation and Properties of S-Ovalbumin, a More Stable Form of Ovalbumin. *Australian Journal of Biological Sciences*, 2, 365–377.

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 1, 76–85.

Sympathec GmbH (2013). HELOS & Co. PM-Tour 2013 Begleitunterlagen.

Telko, M. J.; Hickey, A. J. (2005). Dry powder inhaler formulation. *Respiratory care*, 9, 1209–1227.

Temmerman, M.-L. de; Rejman, J.; Demeester, J.; Irvine, D. J.; Gander, B.; Smedt, S. C. de (2011). Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discovery Today*, 13-14, 569–582.

Ungaro, F.; Angelo, I. d'; Miro, A.; La Rotonda, M. I.; Quaglia, F. (2012). Engineered PLGA nano- and micro-carriers for pulmonary delivery: challenges and promises. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9, 1217–1235.

Universität Heidelberg und Deutsches Krebsforschungszentrum (25.06.2014). Erste Erfolge auf dem Weg zur Impfung gegen Hirntumoren.
<http://www.dkfz.de/de/presse/pressemitteilungen/2014/dkfz-pm-14-32-Erste-Erfolge-auf-dem-Weg-zur-Impfung-gegen-Hirntumoren.php>.

USP 37 - NF 32 (2013). The United States Pharmacopeia and National Formulary 2014. 37. Auflage. Deutscher Apotheker Verlag. Stuttgart.

Voigt, R.; Fahr, A. (2006). Pharmazeutische Technologie. 10. Auflage. Deutscher Apotheker Verlag. Stuttgart.

Wahl, B.; Daum, N.; Ohrem, H.-L.; Lehr, C.-M. (2008). Novel luminescence assay offers new possibilities for the risk assessment of silica nanoparticles. *Nanotoxicology*, 4, 243–251.

Wätzig, H.; Mehnert, W.; Bühler, W. (2009). Mathematik und Statistik kompakt. Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft. Stuttgart.

Weiss, B.; Schaefer, U. F.; Zapp, J.; Lamprecht, A.; Stallmach, A.; Lehr, C.-M. (2006). Nanoparticles made of Fluorescence-Labelled Poly(L-lactide-co-glycolide): Preparation, Stability, and Biocompatibility. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9, 3048–3056.

Yang, R.; Yang, S.-G.; Shim, W.-S.; Cui, F.; Cheng, G.; Kim, I.-W.; Kim, D.-D.; Chung, S.-J.; Shim, C.-K. (2009). Lung-specific delivery of paclitaxel by chitosan-modified PLGA nanoparticles via transient formation of microaggregates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3, 970–984.

Danksagung

Nach gut drei Jahren an der Uni Kiel möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Beginnen möchte ich mit meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Hartwig Steckel. Hardy, danke, dass Du mich in Deinen Arbeitskreis aufgenommen hast und es mir ermöglicht hast, regelmäßig an Konferenzen teilzunehmen und Unternehmen kennenzulernen. Es war eine schöne Zeit in Deinem Arbeitskreis!

Darüber hinaus danke ich Frau Dr. Regina Scherließ, dass ich Teil des PeTrA-Projekts werden durfte. Regina, ich danke Dir für die hervorragende fachliche Betreuung und dafür, dass Du mir mit Deinen Ratschlägen immer wieder auf den richtigen Weg geholfen hast! Ich habe sehr geschätzt, dass Du Dir immer Zeit genommen hast, wenn ich mit Fragen zu Dir kam.

Lieber Arbeitskreis, es war eine schöne Zeit bei Euch! Ich danke Euch für die nette Aufnahme und die gute Atmosphäre und werde unsere gemeinsamen Konferenzen, die Klassenfahrt und das gemeinsame Mittagessen sicher in Zukunft sehr vermissen! Besonders möchte ich Sven dafür danken, dass Du mir in meiner ersten Zeit am Institut alles so geduldig gezeigt und erläutert hast. Mit Nattakan habe ich die längste Zeit das Büro geteilt. Nattakan, danke für die schöne gemeinsame Zeit und die spannenden Einblicke in die thailändische Kultur! Nancy war mir in der Zeit des Schreibens eine ganz tolle Bürokollegin. Nancy, Du hast immer für gute Stimmung gesorgt, sodass ich trotz des Schreibens gar keine schlechte Laune bekommen konnte. Mathias und Gereon danke ich sehr für die Anfertigung der REM-Bilder! Danke, dass Ihr beide viel Zeit investiert habt! Mit Andrea verbinden mich viele PeTrA-Projekttreffen. Schön, dass Du immer mit dabei warst und ganz herzlichen Dank, dass Du dir Zeit für das Korrekturlesen genommen hast!

Was wäre das Institut bloß ohne die tollen technischen Mitarbeiter? Auf Anna, Denissa, Hanna, Maren, Regina und Simone konnte ich mich immer verlassen, wenn es um eine schnelle Bestellung ging, aber sie hatten auch immer Zeit für aufbauende Worte – vielen Dank an Euch! Besonderer Dank geht dabei an Regina, die meine Zellen während meiner Abwesenheit gepflegt hat. Rüdi hat,

nicht zuletzt in meiner Arbeit, sein kreatives Talent unter Beweis gestellt: Danke vielmals für die Bilder und Grafiken, die Du mit so viel Engagement für mich angefertigt hast! Dirk und Kalle waren immer die richtigen Ansprechpartner bei technischen Schwierigkeiten. Danke für Eure Unterstützung! Einen großen Dank möchte ich auch Detlef und Volkmar aus der IT-Abteilung für den unermüdlichen Einsatz bei allen Computerproblemen aussprechen.

Franz danke ich ganz herzlich für die schnelle und unkomplizierte Durchführung des LAL-Tests!

Herr Dr. Girreser hat mir mit viel Engagement bei der Bestimmung des Restlösemittelgehalts geholfen – vielen Dank dafür!

Dem PeTrA-Team danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre. Es war eine spannende und sehr lehrreiche Zeit. Besonderer Dank geht dabei an Frau Dr. Andrea Hanefeld, stellvertretend für die Firma Merck KGaA, für die ausgezeichnete Kooperation und die Finanzierung dieses Projekts! Nicht zuletzt haben alle PeTrA-Doktoranden dazu beigetragen, dass die Doktorandentage dank interessanter und offener Diskussionen jedes Mal zu einer gelungenen Veranstaltung geworden sind. Danke für die schöne gemeinsame Zeit!

Ein großes Dankeschön möchte ich ebenfalls an Dr. Matthias Schröder und Dr. Renato Brito Baleeiro für die Durchführung der immunologischen Untersuchungen an der Universität Bonn und der Charité Berlin aussprechen!

Afra Torge von der Philipps Universität Marburg möchte ich ganz herzlich für die schnelle Anfertigung der AFM-Aufnahmen danken.

Meinen Wahlpflichtfachstudentinnen Katharina, Fenja, Imke, Carolin und Nicole danke ich für Ihre Unterstützung. Es hat mir Spaß gemacht, mit Euch zu arbeiten!

Meiner Familie danke ich für Ihre Unterstützung und den Glauben an mich. Ohne Euch wäre ich jetzt nicht hier!

Einen ganz großen Dank möchte ich an Uli richten: Danke für Deine großartige Unterstützung während meiner Promotion! Ich bin froh Dich an meiner Seite zu haben!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Julia Janke
Geburtsdatum	16. September 1985
Geburtsort	Kiel
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1992 – 1996	Gorch-Fock-Grundschule, Kiel
1996 – 2005	Kieler Gelehrtenschule
06/2005	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

10/2005 – 10/2009	Pharmaziestudium an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
10/2009	2. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung

Praktische Ausbildung

11/2009 – 04/2010	Belvedere-Apotheke, Kiel
05/2010 – 10/2010	Merck KGaA, Darmstadt
11/2010	3. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung und Approbation zur Apothekerin

Promotion

Seit 08/2011	am Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
--------------	--

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 8 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden und wurde bisher bei keiner anderen Universität zur Begutachtung eingereicht.

Julia Janke