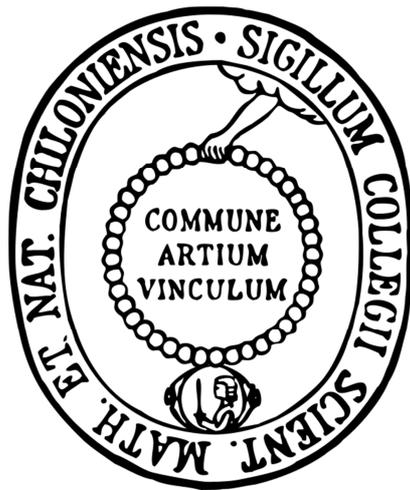


**Entwicklung
einer nanopartikulären Formulierung
zur Vakzinierung
über den Respirationstrakt**



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

vorgelegt von
Andrea Edit Diedrich
Kiel 2015

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Hartwig Steckel

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung:

27. März 2015

Zum Druck genehmigt:

27. März 2015

Prof. Dr. Wolfgang Duschl
(Dekan)

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Hartwig Steckel an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Pharmazeutisches Institut, Abteilung für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, im Zeitraum Februar 2012 bis Dezember 2014 angefertigt.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Kongressbeiträge

1. Diedrich, A.; Scherließ, R.
„Chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery“
Controlled Release Society Germany Local Chapter Meeting, **2014**, Kiel, Deutschland
2. Diedrich, A.; Scherließ, R.
„Chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery“
9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, **2014**, Lissabon, Portugal
3. Diedrich, A.; Scherließ, R.
„Stability of a respirable dry powder vaccine“
25th Drug Delivery to the Lungs, **2014**, Edinburgh, Schottland
4. Baleeiro, R.; Rietscher, R.; Diedrich, A.; Scherließ, R.; Hanefeld, A.; Walden, P.
„Cross-presentation of the tumor antigen Her2/neu involves neither the canonical nor the endosomal pathway – A novel MHC class I cross-presentation compartment in DCs“
13th International Symposium on Dendritic Cells **2014**, Tours, Frankreich
5. Hanefeld, A.; Schiller, S.; Wolf, A.; Weigandt, M.; Scherließ, R.; Diedrich, A.; Janke, J.; Knolle, P.; Schröder, M.; Walden, P.; Baleeiro, R.; Lehr, C.M.; Rietscher, R.; Schneider, M.
„Dendritic cell-targeting cancer vaccine formulations for pulmonary and peroral delivery“
DPhG Annual Meeting **2014**, Frankfurt, Deutschland

Veröffentlichungen

1. Baleeiro, R.; Schweinlin, M.; Metzger, M.; Rietscher, R.; Lehr, C.M.; Diedrich, A.; Scherließ, R.; Hanefeld, A.; Walden, P.
“Nanoparticle-based mucosal vaccines targeting tumor-associated antigens to human dendritic cells” NanoACS, ready for submission **2014**

Patente

1. Steckel, H.; Scherließ, R.; Diedrich, A.; Schröder, M.; Knolle, P.; Walden, P.; Baleeiro, R.; Hanefeld, A.; Weigandt, M.; Wolf, M.
„Antigen-loaded chitosan nanoparticles for immunotherapy“
Anmeldetag: 06.06.2014

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

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Zielsetzung	3
2 THEORETISCHE EINFÜHRUNG	4
2.1 Lunge und Atemwege	4
2.1.1 Anatomie und Physiologie	4
2.1.2 Lungendeposition	5
2.2 Immunsystem	7
2.2.1 Einleitung und Überblick	7
2.2.2 Angeborenes Immunsystem	8
2.2.3 Adaptives Immunsystem	10
2.2.4 Mukosales Immunsystem im Respirationstrakt	11
2.2.5 Tumorimmunologie	12
2.2.6 Aufnahmemechanismen und Zelltargeting	13
2.3 Zusammenfassung und technologischer Ansatz	15
3 MATERIAL	17
3.1 Polymere	17
3.1.1 Chitosan	17
3.1.2 Carboxymethylcellulose (Tylose C30®)	18
3.2 Modellantigene	19
3.2.1 Ovalbumin	19
3.2.2 Cytochrom <i>c</i>	19
3.2.3 Her2/ <i>neu</i> Tumorantigen	20

3.3	Mannitol	20
3.4	Fluoreszenzfarbstoffe	21
3.4.1	Fluoreszein-Isothiocyanat.....	21
3.4.2	FEW-Farbstoff S0744	22
3.5	Puffersysteme	23
3.6	Cyclohaler	24
4	METHODEN	25
4.1	Präparative Methoden	25
4.1.1	Ionische Gelierung.....	25
4.1.2	Aufreinigungsmethoden	25
4.1.2.1	Zentrifugation.....	26
4.1.2.2	Dialyse	26
4.1.2.3	Ultrafiltration.....	27
4.1.3	Sprühtrocknung.....	27
4.1.4	Gefriertrocknung.....	29
4.1.5	Fluoreszenzmarkierung.....	29
4.1.5.1	Markierung mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)	29
4.1.5.2	Markierung mit S0744	30
4.1.6	Biotinylierung.....	31
4.2	Analytische Methoden	32
4.2.1	Partikelgrößenanalytik.....	32
4.2.1.1	Dynamische Lichtstreuung	32
4.2.1.2	Laserdiffraktometrie	33
4.2.1.3	Rasterelektronenmikroskopie.....	34
4.2.2	Proteinanalytik	35
4.2.2.1	BCA-Assay	37
4.2.2.2	Größenausschlusschromatographie	39
4.2.2.3	Gelelektrophorese	40
4.2.3	Freisetzungverhalten	41

4.2.4	Aerodynamische Charakterisierung	41
4.2.5	Endotoxinbestimmung	43
4.2.6	Zellkultur	44
4.2.6.1	Zytotoxizitätstests	44
4.2.7	Immunologische Methoden	45
4.2.7.1	Murine in-vitro Experimente	45
4.2.7.2	Murine in-vivo Experimente	47
4.2.7.3	Humane in-vitro Experimente	52
5	PRAKTISCHER TEIL.....	55
5.1	Formulierungsentwicklung.....	55
5.1.1	Nanopartikelformulierung.....	55
5.1.1.1	Einflussparameter auf den Herstellprozess.....	56
5.1.1.2	Skalierbarkeit	65
5.1.1.3	Eignung anderer Chitosanqualitäten	66
5.1.2	Einfluss der Sprühtrocknung auf die Redispergierbarkeit.....	67
5.1.2.1	Mannitolmatrix	67
5.1.2.2	Auslasstemperatur	69
5.1.2.3	Partikelwaschung	70
5.1.2.4	Zusammenfassung Sprühtrocknungsparameter.....	72
5.2	Mikropartikuläre Formulierung.....	74
5.2.1	Partikelgrößenverteilung	74
5.2.1.1	Trockendispergierung	74
5.2.1.2	Inhalatordispergierung	78
5.2.2	Aerodynamische Charakterisierung der trockenen Nano-in-mikropartikulären Formulierung.....	80
5.2.2.1	Entwicklung einer NGI-Methode	80
5.2.3	Einfluss der Sprühtrocknung auf die Partikelgrößenverteilung	86
5.2.3.1	Atomisierungsenergie.....	86
5.2.3.2	Trockenanteil der Suspension.....	89
5.2.3.3	Sprühdüsendurchmesser.....	91
5.2.3.4	Zusammenfassung.....	94

5.3	Antigen	95
5.3.1	Proteinbeladung.....	95
5.3.1.1	Abhängigkeit von der Zugabephase	95
5.3.1.2	Beladungseffizienz	97
5.3.1.3	Einfluss der Zugabegeschwindigkeit	99
5.3.1.4	Einfluss der gewählten Säure.....	100
5.3.1.5	Einfluss des Antigens.....	102
5.3.2	Methodenentwicklung für die Proteinbestimmung aus der Formulierung und Einflussfaktoren.....	104
5.3.2.1	Indirekte Bestimmung des Proteingehalts.....	105
5.3.2.2	Direkte Bestimmung des Proteingehalts.....	107
5.3.2.3	Vergleich der Bestimmungsmethoden.....	108
5.3.3	Antigenintegrität.....	109
5.3.4	Freisetzungsprofil.....	110
5.4	Lagerstabilitätsuntersuchungen	112
5.4.1	Redispergierbarkeit und Partikelgröße der Nanosuspension	113
5.4.2	Proteinintegrität.....	117
5.4.3	Partikelgrößenverteilung und Dispergierverhalten.....	119
5.4.4	Zusammenfassung Lagerstabilität.....	122
5.5	Zytotoxizitätsuntersuchungen mittels MTT Assay	123
5.5.1	Ausgangssubstanzen	123
5.5.2	Einfluss der Mannitolmatrix.....	123
5.5.3	Standardrezeptur.....	124
5.5.4	Fluoreszenzmarkierte Partikel.....	125
5.5.5	Zytotoxizität auf andere Zelltypen.....	125
5.5.6	Zusammenfassung Toxizitätsuntersuchungen	127
5.6	Immunologische Ergebnisse	127
5.6.1	Endotoxingehalt Ausgangsstoffe und Formulierung.....	127
5.6.2	Zelluläre Aufnahme der nanopartikulären Formulierung	129
5.6.2.1	Größenvariationen	129
5.6.3	Routing nanopartikuläre Formulierung.....	131

5.6.3.1	Cytochrom <i>c</i>	133
5.6.3.2	Biotinyliertes Ovalbumin.....	135
5.6.4	Aktivierung der Immunzellen in-vitro	136
5.6.4.1	Murine in-vitro Experimente mit der Ovalbumin Formulierung	136
5.6.4.2	Deacetylierungsgradvariation.....	139
5.6.4.3	Humane in-vitro Experimente mit dem Tumorantigen Her2/ <i>neu</i>	141
5.6.5	Aktivierung der Immunzellen in-vivo	147
5.6.5.1	Spezifischer in-vivo kill	147
5.6.5.2	In-vivo Studie.....	149
6	KURZFASSUNG DER ARBEIT	157
7	ABSTRACT	159
8	LITERATURVERZEICHNIS	161
	ANHANG.....	170
	LEBENS LAUF	1721
	ERKLÄRUNG.....	172

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

∅	Durchschnitt
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
BALT	<i>bronchial-associated lymphoid tissue</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BMDC	<i>bone marrow derived dendritic cells</i>
Calcein-AM	Calcein- Acetoxymethylester
CD	Cluster of Differentiation
CFDA-SE	Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CMC	Carboxymethylcellulose
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
d	Durchmesser
DC	dendritische Zelle
DDA	Deacetylierungsgrad
Deagg _{rel}	relative Deagglomeration
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPI	Trockenpulverinhalator
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	Fetales Bovines Serum
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
FPF _{geo}	geometrische Feinpartikelfraktion
FPF _{aero}	aerodynamische Feinpartikelfraktion
GSD	Geometrische Standardabweichung
HAc	Essigsäure

HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
Her2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
I.E.	internationale Einheit
i.v.	Intravenös
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LC	<i>Loading Capacity</i>
LE	<i>Loading Efficiency</i>
LSCM	<i>Laser scanning confocal microscopy</i>
MALT	<i>mucosal-associated lymphoid tissue</i>
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
m/V	Massenprozent (Masse pro Volumen)
MMAD	massenbezogener mittlerer aerodynamischer Durchmesser
MOC	<i>micro-orifice collector</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
N	Äquivalentkonzentration/ Normalität
NALT	<i>nasal-associated lymphoid tissue</i>
NGI	<i>Next Generation Pharmaceutical Impactor</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>

PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex
Ph. Eur.	<i>Pharmacopoea Europaea</i>
q3log	Verteilungsdichte
REM	Rasterelektronenmikroskop
rF	relative Luftfeuchte
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SD	<i>spray dried</i> (sprühgetrocknete Form)
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TCR	T-Zell-Rezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>
V/V	Volumenprozent (Volumen pro Volumen)

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

1.1 Einleitung

Etwa jeder Fünfte stirbt in den Industrieländern an einer Krebserkrankung. Somit zählt Krebs zu einer der häufigsten Todesursachen [1]. Dabei verändern sich somatische Zellen unter der Einwirkung von äußeren Faktoren derartig, dass sie sich der Kontrolle des Immunsystems entziehen. Als Folge kommt es in den betroffenen Geweben zu erhöhter Proliferation, häufig auch mit einer Unfähigkeit zur Zelldifferenzierung verbunden [2–4]. Ein besonderes Risiko für verbreitete Krebsarten stellen chronische Infektionen dar. Fast ein Viertel aller Tumorerkrankungen wird durch Viren verursacht [4]. Hier können ursächliche Therapieformen oder Impfungen, zu einer Senkung des Krebsrisikos beitragen. So konnte die Einführung der Impfung gegen Hepatitis Viren das Risiko für Leberkrebs reduzieren [5, 6]. Denselben Effekt erhofft man sich auch langfristig von HPV-Impfstoffen, die gegen die Hochrisiko-Arten 16 und 18 des humanen Papillomavirus schützen. Diese zwei Arten sind für 70% aller Zervixtumore verantwortlich [7]. Die aufgeführten Impfungen sind allerdings rein präventiv; das so geschulte Immunsystem erkennt die Entartung und kann sie eliminieren noch bevor ein Tumor daraus entsteht [8]. Bei manifesten Tumoren zielt ein Großteil der therapeutischen Maßnahmen darauf ab, die entarteten Zellen im Wachstum zu hemmen oder zu vernichten. Dabei werden sie operativ entfernt, bestrahlt oder durch zytostatische Chemotherapie behandelt. Diese Therapieformen sind aber meist mit hohen Risiken für den Organismus verbunden [1].

Neuere Ansätze zur Immunisierung umfassen die parenterale Gabe von monoklonalen Antikörpern, wie Trastuzumab (*Herceptin*, Roche), gegen den bei Brustkrebs überexprimierten epidermalen Rezeptor *Her2/neu* [9]. Die Injektion von Zytokinen soll Immunvorgänge stimulieren, so etwa bei *Proleucin* (Novartis), einem rekombinant hergestellten Interleukin-2, das erfolgreich in der Behandlung gegen Nierenzellkarzinome eingesetzt wird [4, 10]. Eine weitere Möglichkeit stellt die Gabe von Hemmstoffen der Angiogenese wie Sunitinib (*Sutent*, Pfizer) dar. Diese hemmen verschiedene Tyrosinkinase-Rezeptoren, die mit der Bildung von Metastasen in Verbindung gebracht werden [11, 12].

Seit dem 29. April 2010 ist mit Sipuleucel-T, *Provenge* (Dendreon), ein Immuntherapeutikum für den US-Markt zugelassen. Es wird zur Behandlung von

fortgeschrittenem, metastasierendem, hormonresistentem Prostatakarzinom angewendet [13]. Dabei besteht Sipuleucel-T aus körpereigenen dendritischen Zellen, die dem Patienten drei Tage vor der Behandlung entnommen werden. Sie werden in-vitro mit einem tumorspezifischen Antigen stimuliert, wodurch die dendritischen Zellen aktiviert werden und zu Effektorzellen ausreifen. Durch Rückführung der aktivierten Zellen wird das Immunsystem für das entsprechende Antigen sensibilisiert und kann so den Tumor eliminieren. Die 3-Jahre-Überlebensrate steigerte sich durch die Anwendung von *Provenge* um 38% [14, 15]. Diese Therapieform ist jedoch mit einem hohen apparativen, personellen und zeitlichen Aufwand verbunden. Sie ist nur in adäquat ausgestatteten, hygienischem Umfeld mit geschultem Personal durchführbar. Das bedeutet auch, dass eine solche Behandlung in Ländern mit weniger guter medizinischer Versorgung nicht möglich ist.

Allen immuntherapeutischen Ansätzen ist gemein, dass sie invasiv sind. Damit geht ein erhöhtes Infektionsrisiko einher. Die Präparate müssen ambulant von medizinischem Personal appliziert werden, was zusätzliche Kosten für die Gesundheitssysteme und Aufwand für den Patienten bedeutet. Eine Immunisierung über die Mukosa stellt eine nadelfreie, patientenfreundlichere und risikoreduzierte Applikationsvariante dar [16]. Die meisten Pathogene gelangen über die Mukosa in den Körper, sodass hier viele lokale Immunzellen vorhanden sind, die effiziente Immunantworten auslösen können [3]. Daher erscheint es logisch, dass auch Antigene über die Mukosa appliziert werden können und so eine lokale und systemische Immunantwort hervorgerufen wird [17]. Die Aufnahme des Antigens durch die dendritischen Zellen kann dabei durch eine Bindung des Antigens an Partikel gesteigert werden und somit die Immunantwort verstärken [18, 19]. Schleimhäute können auf oraler, vaginaler, rektaler, nasaler oder pulmonaler Route erreicht werden. Die Lunge vereint mehrere Vorzüge: Sie besitzt keine degradierenden Enzyme und ihr pH-Wert ist annähernd neutral [20]. Sie ist durch Inhalation leicht zugänglich und geschlechtsunabhängig vorhanden. Mit einer Oberfläche von mehr als 100 m², die zudem sehr dünne mukosale Wände in den Alveolen aufweist [21], stellt die Lunge eine optimale Umgebung für eine schnelle und effiziente Aufnahme dar. Aus dem Bereich der Antiasthmatika gibt es bereits kommerziell erhältliche Applikationshilfen, mit denen eine Inhalation auch von Laien durchgeführt werden kann [17].

1.2 Zielsetzung

Ziel ist die Entwicklung und Charakterisierung einer nanopartikulären Formulierung zur therapeutischen Vakzinierung über die Mukosa des Respirationstrakts. Dabei soll zunächst eine Methode zur Herstellung von Chitosanpartikeln, die von der Größe und Oberflächenbeschaffenheit Viren und Bakterien ähneln sollen, gefunden werden. In diese Partikel soll ein Modellantigen eingebracht werden, das in einer späteren Projektphase gegen ein klinisch relevantes Antigen ausgetauscht werden kann. Um Stabilitätsprobleme, die mit einer Flüssigvakzine einhergehen, zu umgehen, soll die Formulierung in eine trockene Form überführt werden. Das entstehende Pulver soll dabei über einen Trockenpulverinhalator inhalierbar sein. Durch Kontakt mit der Feuchtigkeit der Lunge soll die Formulierung in ihre ursprüngliche nanopartikuläre Form zurückgeführt werden. Nach Prozessierung und Präsentation auf den Oberflächenrezeptoren der phagozytierenden dendritischen Zellen, soll so die gewünschte systemische Immunantwort erzeugt werden.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des BMBF geförderten Projekts „Plattform für effizienten epithelialen Transport für pharmazeutische Applikation durch innovative partikuläre Trägersysteme“ (PeTra) erstellt.

2 THEORETISCHE EINFÜHRUNG

2.1 Lunge und Atemwege

Die entwickelte Formulierung soll pulmonal applizierbar sein. Zum Verständnis wird daher im Folgenden der Aufbau der Lunge, ihre Physiologie sowie die Bedingungen für eine pulmonale Deposition näher erläutert.

2.1.1 Anatomie und Physiologie

Der Atmungsvorgang ist ein komplexes Zusammenspiel zwischen Ventilation und Diffusion. Zur Einatmung wird das Volumen des Thorax durch Kontraktion der Zwischenrippenmuskulatur und des Zwerchfells vergrößert und Atemluft inspiriert. Das Atemzugvolumen beträgt in Ruhe etwa 0,5 Liter und kann bei Belastung oder willkürlich abhängig von Alter, Geschlecht und Körpergröße auf 3-6 Liter gesteigert werden [22].

Der menschliche Respirationstrakt ist in drei sukzessiv aufeinander folgende Regionen aufgeteilt. Der Atemstrom passiert zunächst den Nasen- und Rachenraum, dessen Funktion das Erwärmen und Befeuchten [23], sowie die Reinigung der eingeatmeten Luft von Fremdstoffen ist. Die unteren Atemwege, beginnend mit dem Kehlkopf, stellen das luftleitende System dar. Die Luftröhre zweigt sich über die beiden Hauptbronchien in den Bronchialbaum der Lungen immer weiter auf. Dabei nimmt der Durchmesser der Luftwege von oben nach unten ab, die Verzweigungen zu. Insgesamt kommt es zu ca. 23 Aufteilungen, die in den Lungenbläschen münden. Das Epithel der Atemwege ist mit einem 10 µm dünnen Film aus Mukus überzogen, der zu 95% aus Wasser, 1% aus Salzen und 1-2% Proteinen und Glykoproteinen (Mucin) besteht. Das Mucin wird dabei von den Becherzellen gebildet und enthält einen hohen Anteil von Threonin und Serin [21]. Die Lungen sind die gasaustauschenden Abschnitte, und bestehen aus den Bronchiolen und den Alveolen. Eine einzelne Alveole hat einen Durchmesser von etwa 0,2 mm und wird von zwei verschiedenen Zellarten ausgekleidet [22]. Den Pneumozyten vom Typ I, die 95% der Fläche des Epithels darstellen und den Pneumozyten vom Typ II, die den Surfactant bilden. Dieser stellt ein Gemisch aus Phospholipiden zur Herabsetzung der Oberflächenspannung dar [24]. In diesem unteren Lungenabschnitt sind die Epithel bzw. Endothelien so dünn (<0,6 µm), dass nur eine sehr geringe Diffusionsbarriere besteht. Sauerstoff wird aufgenommen, metabolisch anfallendes Kohlenstoffdioxid eliminiert

[22]. Während die Oberfläche in den oberen Atemwegen 4 m^2 in den beiden Bronchien misst, steigt sie auf $110 - 140 \text{ m}^2$ in den Alveolen [21].

2.1.2 Lungendeposition

Laut Arzneibuch sind pulmonale Darreichungsformen flüssig oder fest und können als Dampf oder Aerosol angewendet werden. Erreichen sie die Lunge, können lokale oder systemische Wirkung erzielt werden. Eine Zubereitung enthält dabei einen oder mehrere Wirkstoffe und kann zudem noch Hilfsstoffe, wie Treibmittel, Konservierungsstoffe oder Stabilisatoren, enthalten. Die Zubereitungen werden mit Hilfe eines Devices verabreicht. Das kann ein Inhalator mit Zerstäuber, ein Druckgas-Dosierinhalator oder ein Pulver-Inhalator, wie in dieser Arbeit verwendet, sein [25].

Die drei Hauptmechanismen der Deposition von inhalierten Partikeln im menschlichen Atemtrakt sind Impaktion, Sedimentation und Diffusion (Abbildung 2.1), [23]. Diese sind vom aerodynamischen Durchmesser abhängig, der wiederum durch Form, Masse und Dichte der Partikel bestimmt wird.

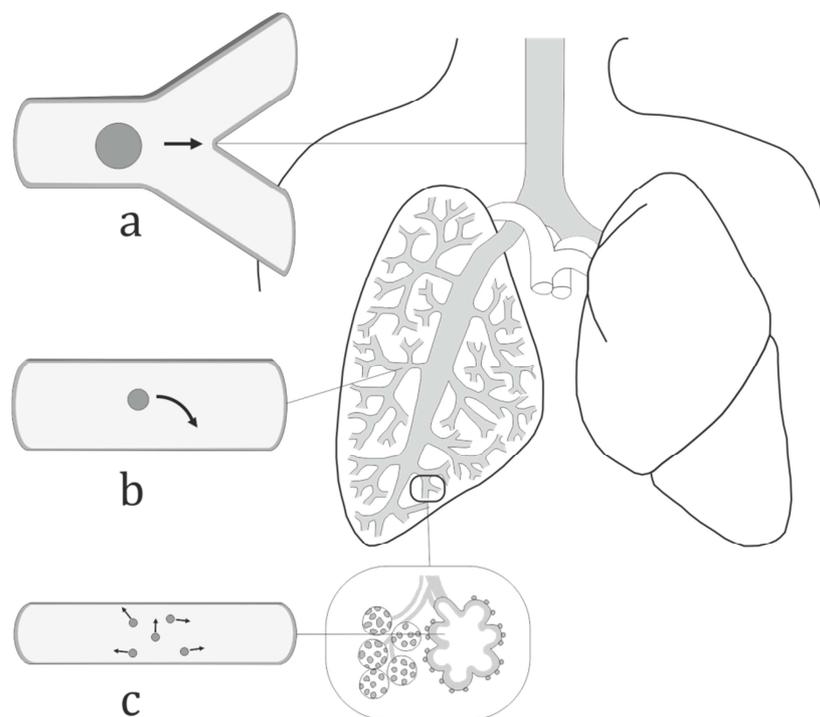


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der drei Hauptabscheidemechanismen von inhalierten Partikeln im Respirationstrakt (a: Impaktion; b: Sedimentation; c: Diffusion)

Durch Impaktion werden Partikel besonders an Stellen abgeschieden, wo die Atemwege und damit der Einatemstrom ihre Richtung ändern. Dieser Mechanismus dominiert vor

allem in den oberen Atemwegen. Gerade größere und dichtere Partikel können aufgrund ihrer Trägheit oder zu hohen Geschwindigkeit dem Luftstrom nicht folgen und werden abgeschieden.

In den luftleitenden bis unteren Atemwegen wird die Deposition der Partikel überwiegend durch die Sedimentation bestimmt. Die Wahrscheinlichkeit einer Deposition ist hierbei proportional zum Sedimentationsparameter $D_{\text{aero}}^2 \cdot \tau$, wobei D_{aero} den aerodynamischen Durchmesser und τ die Verweildauer darstellt [26].

Die Brown'sche Diffusion bestimmt in den Alveolen die Deposition und betrifft im wesentlichen Partikel, die kleiner als 1 μm sind. Im Gegensatz zu den zuvor erwähnten Abscheidemechanismen ist sie umso größer, je kleiner die Partikel sind. Die Wahrscheinlichkeit der Deposition durch die Sedimentation und Diffusion kann durch Luftanhalten nach Inhalation erhöht werden [23, 27, 28].

Es wird allgemein angenommen, dass Partikel, deren MMAD größer als 10 μm ist, bereits im Mund-Rachenraum abgeschieden werden. Die Partikel mit einer Größe zwischen 5 und 10 μm werden in den zentralen Atemwegen abgeschieden und solche mit einer Größe von 0,5 bis 5 μm in den unteren luftleitenden Atemwegen und Lungenbläschen. Für eine Anwendung, bei der die Lunge targetiert werden soll, ist dies daher der optimale Zielbereich [27].

Zurzeit sind in Deutschland pulmonale Darreichungsformen zur Therapie von Asthma und COPD zugelassen. Darunter fallen Glukokortikoide wie Fluticason (*Flutide, Viani*), Budesonid (*Budesonid Easyhaler*) und Beclometason (*Foster, Ventolair*), die lokal entzündungshemmend wirken, sowie Bronchodilatoren, wie das β -Sympathomimetikum Salbutamol (*Salbulair, Sultanol*) und Anticholinergika wie Ipratropiumbromid (*Atrovent, Berodual*). Diesen Formulierungen ist gemein, dass ihre Applikation auf eine lokale Wirkung abzielt. Der Versuch, einen Arzneistoff pulmonal systemisch verfügbar zu machen, gelang 2006 der Firma Pfizer durch *Exubera*, einer sprühgetrockneten Insulinformulierung in einer Mannitolmatrix [29]. Ende 2007 wurde das Produkt allerdings aufgrund von Dosierungenauigkeiten, schwankender Bioverfügbarkeit, Bedenken langfristiger Lungenverträglichkeit und aus Kostengründen wieder vom Markt genommen [30]. Im Juni 2014 wurde in den USA mit *Afrezza* (MannKind) eine neue inhalative Insulinzubereitung zugelassen [31]. Bei dieser liegt das Insulin an Fumaryl-Diketopiperazin gebunden, im Größenbereich von 2 bis 3 μm gefriergetrocknet formuliert, vor [32]. Dadurch soll die Absorption und die Bioverfügbarkeit im Vergleich zu *Exubera* gesteigert werden [31, 32]. Diese Beispiele

zeigen, dass ein Peptid so formuliert werden kann, dass es nach der Deposition in der Lunge systemisch wirkt.

2.2 Immunsystem

Erreicht die Formulierung die Lunge, so soll sie von den dort sitzenden Immunzellen aufgenommen und prozessiert werden. Im Folgenden wird der grundlegende Aufbau des Immunsystems erläutert und die Erregerabwehr der Lunge betrachtet. Im letzten Abschnitt wird im Speziellen auf die Tumorimmunologie mit den Abwehrmechanismen des Tumors gegen die Angriffe des Immunsystems eingegangen.

2.2.1 Einleitung und Überblick

Die Immunologie befasst sich mit der Abwehr von Krankheitserregern und körperfremden Stoffen. Darunter fallen Bakterien, Helminthen, Pilze, Protozoen, Viren und andere körperfremde Stoffe, wie biologische Gifte. Aber auch körpereigene Zellen, die ihre Funktionsfähigkeit verloren haben, müssen vom Immunsystem beseitigt werden. An diesen Prozessen sind eine Reihe von mobilen Immunzellen, löslichen Botenstoffen, spezifischen Antikörpern, Rezeptoren sowie immunmodellierenden Proteinen beteiligt [8]. Die körpereigenen Immunantworten lassen sich in zwei Typen unterscheiden, die angeborene und die adaptive Immunantwort. Beide basieren auf Aktivitäten der Leukozyten, die aus myeloiden Vorläuferzelle des Knochenmarks hervorgehen [3]. Dabei zählt die erste Abwehr von Krankheitserregern mit unspezifischen Mechanismen zu dem angeborenen Immunsystem, während sich das adaptive Immunsystem spezifisch auf den jeweiligen Erreger einstellt (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Aufbau des Immunsystems nach Rink et al. [8]

	Angeborene Immunität	Adaptive Immunität
Eigenschaften	Unspezifisch schnelle Reaktion kein Gedächtnis	Spezifisch Verzögerte Reaktion Gedächtnis, daher Immunität gegen Re-Infektion
Zellen	Granulozyten Dendritische Zellen Makrophagen/Monozyten Mastzellen Natürliche Killerzellen	T-Zellen B-Zellen
Lösliche Komponenten	Komplementsystem Interferone Akute Phase Proteine Defensine Lysozym	Antikörper

2.2.2 Angeborenes Immunsystem

Die angeborene Immunität stellt die erste Verteidigung der Immunabwehr dar: Gelangen pathogene Mikroorganismen oder Krankheitserreger in den Körper, werden diese innerhalb von Minuten durch angeborene Abwehrmechanismen bekämpft. Dabei erreichen die neutrophilen Granulozyten, die 55-75% der zirkulierenden Leukozyten ausmachen, mit als Erste den Infektionsort. Dort phagozytieren sie eingedrungene Erreger und töten diese in ihren intrazellulären Vesikeln durch bakterizide Substanzen ab. Eine Verbreitung der Bakterien im Körper kann so weitestgehend eingedämmt werden. Aber auch durch Apoptose entstehende Zellfragmente werden von den neutrophilen Granulozyten entsorgt. Bei beiden Vorgängen wird das Zytokin IL-8 ausgeschüttet, das chemotaktisch wirkt und weitere Zellen an den Infektionsort lockt. Im Blut zirkulierende Monozyten (2-7%) unterstützen die neutrophilen Granulozyten in der Infektionsbekämpfung, indem sie in das befallene Gewebe einwandern und zu Makrophagen ausdifferenzieren. Zum Erkennen von Pathogenen (z.B. durch PAMP für *pathogen-associated molecular pattern*) besitzen sie spezielle Mustererkennungsrezeptoren (PRR für *pattern recognition receptor*)(Tabelle 2.2), [8].

Tabelle 2.2: Erkennungsstrukturen für die Phagozytose auf Makrophagen und neutrophilen Granulozyten

Rezeptor auf der Immunzelle	Zielstruktur auf dem Pathogen
Mannose-Rezeptor	Erkennt Zuckerstrukturen aus Mannose und Fucose auf Pathogenoberfläche
CR1, CR3 und CR4 Komplementrezeptoren Fc-Rezeptoren	Durch Komplementspaltprodukte C3b, C4b opsonisierte Partikeloberfläche Durch Antikörper opsonisierte Partikeloberfläche
Scavenger-Rezeptoren	<i>Eat-me</i> -Signale auf apoptotischen Zellen z.B. Phosphatidylserin oder veränderte Glykosylierung auf der Membranaußenseite

Zu den phagozytierenden Zellen gehören auch die dendritischen Zellen (DC), die zusätzlich im hohen Maß zur Makropinozytose befähigt sind und somit extrazelluläre Flüssigkeiten mit freigesetzten Toxinen oder Viren aufnehmen können. Wie B-Zellen und Makrophagen sind die DCs in der Lage die aufgenommenen Pathogene zu prozessieren und einzelne Peptide fest an MHC-Moleküle gebunden an der Zelloberfläche zu präsentieren. Dabei unterscheidet man zwei Gruppen von DCs, die konventionellen und die plasmazytoiden DCs. Die konventionellen nehmen in peripheren Geweben Antigene auf und werden so aktiviert. Darauf wandern sie in die peripheren lymphatischen Gewebe ein, um dort als Stimulatoren der T-Zellantwort zu fungieren. Die Plasmazytoiden nehmen zwar auch Antigene auf und präsentieren diese, ihre Hauptfunktion bei einer Infektion besteht allerdings in der Produktion großer Mengen antiviraler Interferone [3, 8, 33].

Entartete und befallene Zellen können durch die natürlichen Killerzellen (NK) von dem angeborenen Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Dabei ist die NK in der Lage, gesunde von kranken Zellen durch ihre Kohlenhydratstruktur auf der Zelloberfläche zu unterscheiden. Eine Bindung an bestimmte Strukturen aktiviert die NK zum Töten der Zielzelle, wenn nicht gleichzeitig auch das hemmende Signal durch Bindung an MHC-I Moleküle ausgelöst wird. Die Summe der Signale entscheidet über die Abtötung der Zielzelle. Da auf infizierten Zellen oder Tumorgewebe MHC-I Moleküle oft herunterreguliert sind, können diese so erkannt und abgetötet werden [8].

2.2.3 Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist in der Lage körpereigene von körperfremden Strukturen zu unterscheiden und sich Krankheitserreger zu merken. Hierzu gehören B und T-Lymphozyten, sowie die von den B-Zellen sekretierten Antikörper, die spezifische Rezeptoren tragen und so fremde Substanzen (Antigene) aufspüren. Sie werden aktiv, wenn es den Zellen der angeborenen Immunabwehr nicht gelingt, Eindringlinge vollständig abzuwehren und zu eliminieren. Während B-Zellen bereits im Knochenmark ausdifferenzieren, zirkulieren Vorläuferzellen der T-Zellen zunächst im Blut und begeben sich gemäß einer chemotaktischen Spur in den Thymus, um dort zu reifen. Als naive T-Zellen verlassen sie den Thymus und werden bei Antigenkontakt aktiviert. Sie können Antigene nur als Peptidfragmente an den auf Körperzellen exprimierten MHC-Molekülen erkennen. Man unterscheidet zwei Klassen MHC-Moleküle: Das MHC-I wird von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und zeigt einen Querschnitt der im Zytosol der Zelle vorliegenden Proteinfragmente. Das können zelleigene Fragmente sein, aber auch die von Viren, im Zellplasma lebenden Bakterien oder Tumorantigene. MHC-I Moleküle werden von den zytotoxischen Zellen erkannt (CD8+); durch sie können entartete oder infizierte Zellen gefunden und abgetötet werden. MHC-II findet sich nur auf Oberflächen von antigenpräsentierenden Zellen und enthält Peptidfragmente von Substanzen, die extrazellulär aufgenommen wurden, beispielsweise aus gealterten, abgestorbenen Zellen, aber auch Mikroorganismen oder Tumorzellen. Sie werden durch die T-Helferzellen (CD4+) erkannt, die weitere Lymphozyten aktivieren [8].

Alle in den Körper eintretenden Fremdstoffe gelangen, frei über das Blut oder in Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, DCs), in das nächstgelegene periphere lymphatische Gewebe, das eine Art Antigensammelstelle darstellt (Tabelle 2.3). Während die Makrophagen sich überall im lymphatischen Gewebe verteilen, um freies Antigen zu phagozytieren, wandern die aktivierten DCs in die T-Zell-Zone, wo sie die Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen zu Effektorzellen stimulieren. Dabei geben die von der DC freigesetzten Zytokine Auskunft über die von den T-Zellen benötigte Immunantwort und stimulieren den jeweils benötigten T-Zell-Typ zur Proliferation. Durch die aktivierten T-Zellen werden auch B-Zellen zur Differenzierung angeregt und gehen in Plasmazellen über, die Antikörper bilden. Diese sind Bestandteil der humoralen Immunantwort und stellen Proteine dar, die spezifisch an eine bestimmte Substanz, das Antigen, binden können. Sie werden von Plasmazellen als

Reaktion auf eine Infektion erzeugt, neutralisieren Krankheitserreger und bereiten sie auf die Phagozytose durch Makrophagen vor. Am Ende einer Immunantwort werden Gedächtniszellen gebildet, die bei einer Re-Stimulierung erneut mit spezifischen Antikörpern auf den Eindringling reagieren können. Diese Eigenschaften macht sich auch die aktive Impfung zunutze [3, 8].

Tabelle 2.3: Überblick über die lymphatischen Organe des Körpers nach Rink et al.[8]

Primäre/Zentrale lymphatische Organe	Sekundäre/Periphere lymphatische Organe
Knochenmark	Lymphknoten
Thymus	Milz
	Knochenmark
	Mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT)

2.2.4 Mukosales Immunsystem im Respirationstrakt

Nahezu alle Viren, Bakterien und Parasiten gelangen durch die große Oberfläche der Mukosa in den Körper [34]. Erste Abwehrmechanismen im Atemtrakt sind biochemischer und physikalischer Art: Mikroorganismen und Fremdstoffe, die in die Bronchien gelangen, werden zunächst durch Schleime gebunden und anschließend über das Flimmerepithel nach außen transportiert. Zudem bildet das angeborene Immunsystem auf der Oberfläche der Lunge β -Defensive, die Bakterienwände zerstören [8]. In den Alveolaren, tiefer in der Lunge, wo die Zahl der Zilien und schleimproduzierenden Drüsen abnimmt, finden sich vor allem Alveolarmakrophagen, die Fremdstoffe durch Phagozytose beseitigen können [22]. Einen besonderen Schutz der Schleimhaut stellt das mukosale Immunsystem dar, das in allen inneren Oberflächen, wie im Darm, Urogenitaltrakt oder den Atemwegen vorkommt. Es umfasst alle lymphatischen Zellen in den Epithelien und der darunterliegenden Lamia propria [3]. Diese werden als MALT (Mucosa associated lymphoid tissue) zusammengefasst und stellen ein eigenes Kompartiment des Immunsystems dar. Das Immunsystem des Respirationstrakts setzt sich aus dem NALT (nose-associated-lymphoid tissue), LALT (larynx-associated lymphoid tissue) und BALT (bronchus-associated lymphoid tissue) zusammen. Diese besitzen, ähnlich den Peyer Plaques des Darms, Lymphozyten-

Aggregate [34]. Dabei handelt es sich um organisierte folliculäre Wölbungen aus zahlreichen B-Zellen, die von T-Zellen umgeben sind. Antigene werden durch spezialisierte Endothelzellen, den M-Zellen (Mikrofaltenzelle), aufgenommen und in Follikel geleitet. Dort werden sie von DCs aufgenommen und in die T-Zell-Zone zur Stimulierung der naiven T-Zellen transportiert. Auch ohne M-Zellen, können die in den Aggregaten vorliegenden DCs ihre Zellfortsätze durch das Epithel hindurchzwängen und Antigene direkt aufnehmen. Die B- und T-Zellen der Mukosa stellen eine besondere Untergruppe der Lymphozyten dar, denn sie gelangen über das Blut in die Plaques und verlieren dort durch Antigenkontakt ihre Präferenz für die peripheren lymphatischen Organe. Dadurch unterliegen sie nicht mehr den Rezirkulationsmechanismen der Lymphozyten des übrigen Körpers. Vielmehr wandern sie als Effektorzellen durch das lymphatische System in den Blutkreislauf, von wo sie immer wieder in das mukosale Immunsystem zurückgeleitet werden und ihre Effektoraktivitäten ausführen [3].

2.2.5 Tumorimmunologie

In der Regel liegt die Erfolgsquote des Immunsystems bei der Erkennung von fremden und entarteten Zellen bei 100 Prozent [8]. Da entartete Zellen aus Körperzellen entstehen, entspricht der Großteil ihrer Antigene denen des restlichen Körpers. Diese können aufgrund der Selbst-Toleranz nicht ohne Weiteres vom Immunsystem erkannt werden. Daneben gibt es Antigene, die tumorspezifisch sind und daher von Immunsystem wahrgenommen werden können. Tumorassoziierte Antigene bezeichnen Oberflächenstrukturen auf entartetem Gewebe, die auch auf körpereigenen Zellen zu finden sind, jedoch nur in leicht veränderter oder vermehrter Form. Hier bestehen daher Toleranzmechanismen, die eine Bekämpfung erschweren oder verhindern können. Tumorspezifische Antigene hingegen stammen aus onkogenen Viren oder von Antigenen, die aufgrund einer Genmutation exprimiert werden. Diese können vom Immunsystem wahrgenommen werden. Die Abwehr fällt daher auch ähnlich der Immunreaktion gegen intrazelluläre Erreger aus. Die Tumorantigene werden über die MHC-I-Moleküle zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) präsentiert, wodurch es zu einer Degranulierung dieser und anschließender Apoptose der Tumorzelle kommt. Auch die NK-Zellen sind von großer Bedeutung bei der Tumorabwehr. Denn viele Tumorzellen regulieren die MHC-I-Präsentation auf ihrer Oberfläche herunter, sodass sie durch die CTL nicht mehr erkannt werden. Die NK-Zellen erkennen dies jedoch und können einen

Angriff einleiten. Wird die Tumorzelle vom Immunsystem erkannt, tragen auch T-Helferzellen und die Antikörperproduktion der B-Zellen zur Bekämpfung bei, jedoch im geringeren Maße [3, 8, 35].

Nur Tumore, die den Angriffen des Immunsystems entgehen können, entwickeln sich soweit, dass sie klinisch relevant werden. Dabei wird von drei Phasen ausgegangen, die die Interaktion zwischen dem Tumor und dem Immunsystem beschreiben: Die Eliminierung stellt die erste Phase dar. In ihr werden Tumorzellen durch Zellen des Immunsystems erkannt und vernichtet. Die Gleichgewichtsphase beginnt, wenn keine vollständige Vernichtung der mutierten Zellen mehr möglich ist, das Immunsystem aber noch das Wachstum eindämmen kann. In der dritten Phase entkommt der Tumor der Überwachung des Immunsystems. Grund hierfür ist die schnelle Teilungs- und damit auch Mutationsrate des Tumors. Dabei können sich durch das instabile Genom zufällig Eigenschaften entwickeln, die sich dem Einfluss des Immunsystems entziehen; es kommt zu einer Vermehrung dieser Zellen und damit zu einer immunologischen Toleranz (Tabelle 2.4) [3, 8].

Tabelle 2.4: Abwehrmechanismen von Tumoren gegen das Immunsystem

Strategie	Effekt
Verminderung MHC-I	Fehlende Erkennungsstruktur für CTL
Ausschüttung von Zytokinen (TGF- β , IL-10)	Verminderung der Entzündungsreaktion, induzierte Toleranz in T-Zellen, Unterdrückung der DCs-Aktivierung
Erhöhte Expression Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)	Abbau von Tryptophan, dadurch Unterdrückung der T-Zell Proliferation
Exprimieren von FASL auf Zelloberfläche	Einleitung Apoptose bei T-Zelle nach Bindung an Ligand FAS (Physiologisch zur Reduzierung der T-Zellen nach Beendigung der Immunreaktion)

2.2.6 Aufnahmemechanismen und Zelltargeting

Zellmembranen sind für die meisten Partikel undurchlässig. Nur sehr kleine Partikel im Bereich zwischen 10-30 nm können sie überwinden [19]. Für die Aufnahme durch Zellen des Immunsystems gibt es drei Hauptmechanismen: die Phagozytose, die Pinozytose und die rezeptorvermittelte Endozytose. Werden opsonisierte partikuläre Substanzen aufgenommen, spricht man von Phagozytose. Dabei wirken Antikörper oder

Komplementfaktoren als Verstärker, denn sie binden an entsprechende Rezeptoren der phagozytotischen Zellen. Durch eine Umlagerung im Zytoskelett bilden sich Pseudopodien, die die Partikel umschließen. Bei der Pinozytose werden gelöste Substanzen und kleinere Partikel in größeren Flüssigkeitsvolumina aufgenommen, was ebenfalls die Ausbildung von Pseudopodien zur Folge hat. Dieser Prozess erfolgt konstitutiv in DCs und Makrophagen und benötigt weder Reize noch Rezeptoren. Bei der rezeptorvermittelten Endozytose kommt es nicht zu einer Umlagerung im Zytoskelett, sondern zu Einstülpungen der Membran durch die zellulären Proteine Clathrin und Caveolin. Beteiligte Komponenten sind hier Fc- und Komplementrezeptoren, Lektine, aber auch Scavenger- und B-Zell-Rezeptoren [8].

Partikulär gebundenes Antigen bindet aufgrund seiner Oberflächenbeschaffenheit an Zellrezeptoren phagozytierender Zellen. Durch die entstehende Bindung wird es im Vergleich zu löslichem Antigen vermehrt aufgenommen [19]. Welche Größe die Partikel für eine effektive Aufnahme vorzugsweise haben sollten, wird in der Literatur vielfach diskutiert. Dabei werden aus unterschiedlichen Polymeren Partikel in einem Bereich zwischen 50-1000 nm formuliert [36–39]. Auch pathologische Keime liegen in einem breiten Bereich (Tabelle 2.5) das Immunsystem ist also mit verschiedenen Größen vertraut. Fifies et al [40] haben herausgefunden, dass bei Einsatz von inerten Partikeln die Immunantwort von ihrer Größe abhängt. Als Richtwert wird eine 500 nm Grenze angegeben; Partikel aus Polystyrol mit einer Größe unterhalb von 500 nm sind besser in der Lage CD8+ und CD4+ T-Zellantworten zu induzieren, als Partikel die größer als 500 nm sind. Diese führen vorwiegend zu einer humoralen Immunantwort mit Antikörperbildung [41].

Tabelle 2.5: Größenverhältnisse ausgewählter Eukaryoten und Prokaryoten sowie Viren nach [42]

Art	Größe
Eukaryotenzelle	10000 nm
Zellkern	2800 nm
Prokaryotenzelle (<i>E.coli</i>)	2000 nm
Pockenvirus	250 nm
Tollwutvirus	150 nm
Influenzavirus	100 nm
Bakteriophage	95 nm
Poliovirus	27 nm

2.3 Zusammenfassung und technologischer Ansatz

Ein Tumor kann verschiedene Mechanismen ausbilden um dem Immunsystem zu entgehen (2.2.5). Ziel der therapeutischen Vakzinierung ist es durch Stimulierung der CTL-Proliferation und Präsentation von Oberflächenstrukturen als MHC-I-Komplex, das Immunsystem erneut zu sensibilisieren und so die Toleranz zu durchbrechen [43]. Erfolgt das Einbringen des Antigens in partikulärer Form, so wird es im Vergleich zum löslichen Antigen präferenziell von den phagozytotischen Zellen aufgenommen [19, 44]. Allerdings hängt der Erfolg einer pulmonalen Vakzine in erster Linie von der Fähigkeit der Formulierung ab, die lokal ansässigen Immunzellen überhaupt zu erreichen. Hier lässt sich die Deposition in der Lunge durch den aerodynamischen Durchmesser steuern. Dieser muss für eine quantitative Abscheidung nach Dispergierung mit einem Inhalator im Bereich von 0,5-5 μm liegen (s. 2.1.2). Die optimale Größe für die Aufnahme der Partikel durch die Zielzellen liegt jedoch im Größenbereich kleiner als 500 nm (Kapitel 2.2.6). Um dieses Problem zu umgehen, muss die Vakzine als mikropartikuläre Formulierung die Lunge erreichen und anschließend in eine nanopartikuläre Form zerfallen. Aber auch nach Erreichen des gewünschten Lungenareals muss die Formulierung über Eigenschaften verfügen, die es ihr ermöglichen, die physikalischen Abwehrmechanismen der Lunge zu umgehen. Eine Barriere stellt der dichte Mukus dar, den die Partikel überwinden müssen, um zum Lungenepithel zu gelangen. Partikel bleiben hier nach erfolgter Inhalation hängen und werden durch die mukoziliäre Clearance zurück in den Nasen-Rachenraum transportiert. Durch die chemische Beschaffenheit des Polymers kann eine Steigerung der Interaktion zwischen Partikeln und Mukus die Retention erhöhen. Als Mechanismen seien beispielhaft eine Erhöhung der Viskosität des Mukus oder die Beeinflussung der Zilienaktivität erwähnt [45]. Antigene, die zusammen mit mukoadhäsiven Polymeren, wie Chitosan, Hyaluronsäure oder Carboxymethylcellulose gegeben werden, weisen im Vergleich zur Applikation ohne Additive eine erhöhte Immunantwort auf [46].

Nach der Aufnahme durch Zellen muss das Antigen aus den Partikeln freigesetzt werden können. Hier ist der Einsatz von biodegradierbaren Polymeren nötig. Nach der Freisetzung soll das Antigen durch Prozessieren im Zellinneren über die MHC-Rezeptoren an die Oberfläche transportiert werden und eine zelluläre Immunantwort initiieren. Deren Endpunkt soll die Erkennung von körpereigenem, entartetem Gewebe sein, das infolgedessen eliminiert wird (Abbildung 2.2).

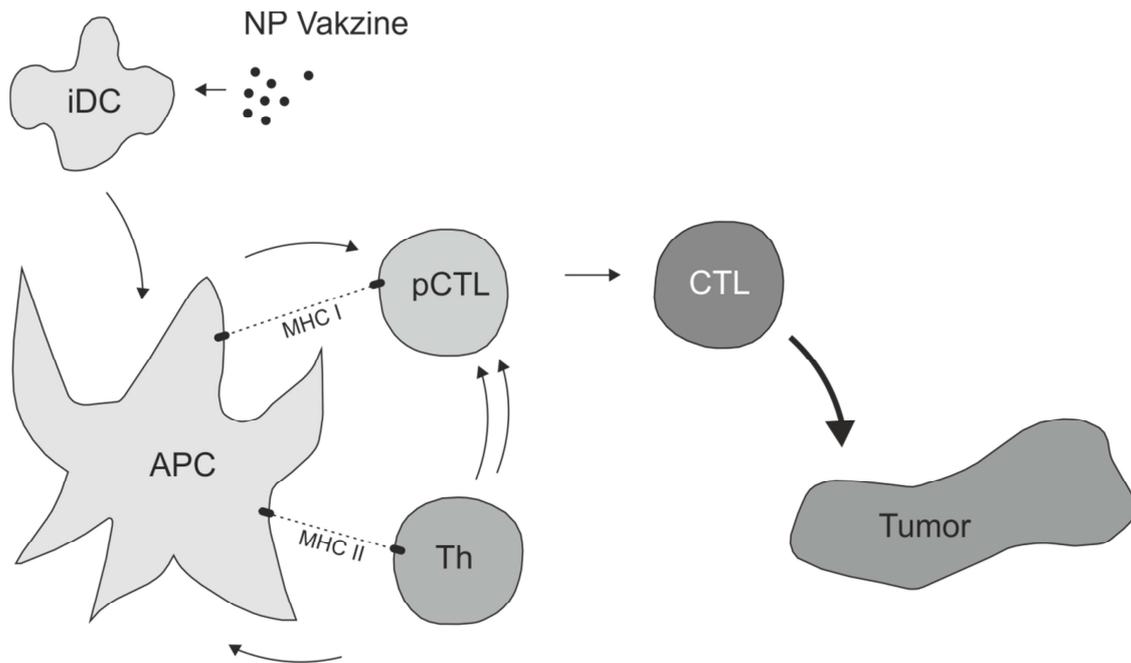


Abbildung 2.2: Schema der therapeutischen Vakzinierung durch eine nanopartikuläre Formulierung (adaptiert von der Charité Berlin); NP Vakzine: nanopartikuläre Formulierung, iDC: unreife dendritische Zelle, APC: Antigen-präsentierende Zelle (aktivierte dendritische Zelle), pCTL: unreife zytotoxische Zelle, CTL: aktivierte zytotoxische Zelle (CD8+), Th: T-Helferzelle (CD4+)

Zusammenfassend müssen für den Erfolg einer therapeutischen Vakzine Polymere ausgewählt werden, die als Vehikel das Antigen in die Immunzellen einschleusen. Im optimalen Fall weisen sie selbst adjuvante Eigenschaften auf, die die Effizienz der Vakzine positiv beeinflussen. Aus den Polymeren und dem Antigen muss eine nanopartikuläre Formulierung unterhalb einer Größe von 500 nm entwickelt werden, die von den dendritischen Zellen aufgenommen werden kann. Diese muss anschließend, um die Formulierung pulmonal verfügbar zu machen, in einen Größenbereich von 0,5-5 µm überführt werden. Das entstehende Produkt soll über einen kommerziell erhältlichen kapselbasierten Pulverinhalator applizierbar sein.

3 MATERIAL

3.1 Polymere

Chitosan und Carboxymethylcellulose bilden als Polymere die Ausgangssubstanzen für die in dieser Arbeit formulierten Nanopartikel.

3.1.1 Chitosan

Chitosan ist ein Aminopolysaccharid, das ein Copolymer aus Glukosamin und N-Acetylglukosamin darstellt. Es wird überwiegend durch eine partielle Deacetylierung von Chitin aus Krustentieren gewonnen, findet sich aber natürlicherweise auch in einigen Mikroorganismen, Hefe- und Pilzzellen [37]. Aufgrund seiner geringen Toxizität und guten Bioabbaubarkeit wird es über die letzten Jahrzehnte vermehrt als Hilfsstoff in der pharmazeutischen Industrie verwendet [47]. Da das Chitosan aus einem natürlichen Rohstoff hergestellt wird, ist dessen Ursprung für die Qualität und Eigenschaften des Polymers entscheidend und kann von Charge zu Charge variieren [48]. Durch die freiliegenden primären Aminogruppen (

Abbildung 3.1), die vor allem in organischen Säuren leicht protonierbar sind, bindet es stark an negativ geladenes Material. Darunter fallen Polymere, wie sie auch auf Zelloberflächen oder im Mukus vorkommen. Durch diese elektrostatischen Wechselwirkungen wirkt es mukoadhäsiv, weshalb es auch als Bestandteil vieler nasaler und oraler Formulierungen untersucht wird [49]. Durch die Interaktion mit dem Mukus wird nicht nur die Retention in dem Depositionsareal verlängert, sondern auch die Bioverfügbarkeit von zeitgleich applizierten Peptiden erhöht [50]. Dies lässt sich auf eine gestörte Barrierestruktur des Epithels gefolgt von einem temporären Öffnen von tight junctions zurückführen [51]. Das Chitosan stellt aufgrund dieser Eigenschaften ein sehr interessantes Polymer für die Vakzinierung dar [37, 52].

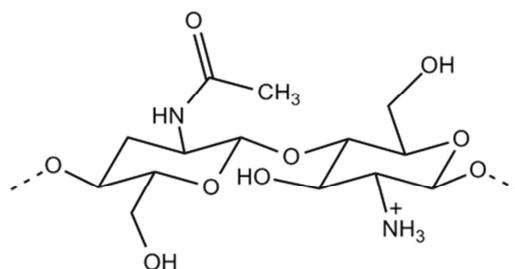


Abbildung 3.1: Ausschnitt Strukturformel Chitosan ((D)-Glukosamin und N-Acetyl-Glukosamin)

Kommerziell kann es in variierenden Deacetylierungsgraden (DDA) und Viskositäten bezogen werden, wobei letztere maßgeblich von dem Molekulargewicht beeinflusst werden. In dieser Arbeit werden Chitosane mehrerer Firmen verwendet (Tabelle 3.1), wobei der Hauptanteil der Versuche mit dem Chitoscience 90/10 (Heppe Medical Chitosan GmbH (HMC), Deutschland) durchgeführt wird. Bei Verwendung eines abweichenden Chitosans, ist dieses explizit gekennzeichnet.

Tabelle 3.1: Verwendete Chitosanqualitäten mit Hersteller und Kenngrößen

Chitosan	Hersteller	Viskosität (1% in 1% HAc)	DDA
Chitosan 90/10/A1	Biolog Heppe	8 mPas	91,2%
Chitopharm S	Cognis	48 mPas	83,5%
Chitopur XP/4.91	FishContract	12,5 mPas	93,5%
Chitopure	FishContract	14 mPas	92%
Chitosan	Fluka	88,5 mPas	89,5%
Chitoscience 75/10	HMC	11 mPas	75,0%
Chitoscience 85/10	HMC	10 mPas	84,8%
Chitoscience 90/10	HMC	15 mPas	90,1%
Chitoscience 95/10	HMC	15 mPas	96,1%
Chitoclear TM 615	Primex	7 mPas	95,0%
Chitoclear TM280	Primex	665 mPas	89,0%
Chitosan	Sigma	130 mPas	>75%

3.1.2 Carboxymethylcellulose (Tylose C30®)

Tylose C30 (Fa. Hoechst AG, Deutschland) ist ein niedrig substituierter Carboxymethylether der Cellulose (Abbildung 3.2). Die Kennzahl entspricht der Viskosität einer 2% wässrigen Lösung in mPas. Durch die Carboxylgruppe ist das Molekül in kaltem sowie warmem Wasser löslich und bildet in einem pH Bereich von 2-10 stabile viskose Lösungen. Carboxymethylcellulose wird in der pharmazeutischen Industrie als Emulgator und Verdickungsmittel eingesetzt [53, 54]. Durch die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit dem Mukus, besitzt es wie das Chitosan leicht mukoadhäsive Eigenschaften [46]; es wird in dieser Arbeit

allerdings vorwiegend wegen seiner negativen Ladung als Gegenion zu dem positiv geladenen Chitosan genutzt.

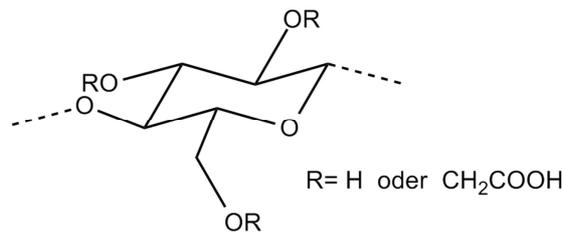


Abbildung 3.2: Ausschnitt Strukturformel Tylose C30(Carboxymethylcellulose)

3.2 Modellantigene

Zur Detektion der Zellaktivierung und Prozessierwege in-vitro und in-vivo, werden die Nanopartikel, je nach Fragestellung, mit einem Modellantigen beladen.

3.2.1 Ovalbumin

Als Standardmodellantigen wird das Ovalbumin (OVA) von Sigma-Aldrich (USA) als Lyophilisat mit einer Reinheit von über 98% verwendet. Ovalbumin ist das in Hühnereiklar massenmäßig am häufigsten vorkommende Protein, besteht aus 385 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 42,7 kDa [55]. Sein isoelektrischer Punkt liegt bei pH 4,5 [56]. Ovalbumin wird in dieser Arbeit als Standardantigen verwendet, da es im murinen System in der Lage ist eine T-Zell Antwort bei mukosaler Gabe (nasal, pulmonal und oral) zu induzieren [57]. Dafür konnte die Aminosäuresequenz 257-264 (SIINFEKL) als Epitop ausgemacht werden. Abhängig von Temperatur und pH-Wert lagert sich natives Ovalbumin in temperaturstabileres S-Ovalbumin um. Dies geschieht zum Beispiel, wenn nicht befruchtete Eier über mehrere Wochen bei 30°C gelagert werden [58]. Die Denaturierungstemperatur wird so von 78°C auf 86°C erhöht. Die Funktion des Ovalbumins im Hühnereiweiß ist noch nicht geklärt [59].

3.2.2 Cytochrom c

Cytochrom *c* ist ein aus 105 Aminosäuren bestehendes kleines basisches Protein, welches assoziiert an der Innenmembran der Mitochondrien aller Eukaryonten und aeroben Bakterien vorkommt. Es ist Bestandteil der Atmungskette, bei der Elektronen

über mehrere Stufen transportiert und final auf Sauerstoff übertragen werden. Dafür besitzt es ein kovalent gebundenes Häm *c*-Zentrum als prosthetische Gruppe, deren Eisenion durch seine räumliche Anordnung leicht reduziert und anschließend wieder oxidiert werden kann. Diese Eigenschaft wird physiologisch genutzt, indem Cytochrom *c* Elektronen von Komplex III auf Komplex IV überträgt. Die Atmungskette ist essentiell für die Energiegewinnung der Zellen. [4, 60]. In dieser Arbeit wird es genutzt, um den Ort der Antigenfreigabe genauer zu untersuchen. Vermehrtes Aufkommen freien Cytochrom *c* im Zytosol weist auf Zellschäden hin und induziert Apoptose [61]. Dadurch kann das intrazelluläre Routing der Partikel genauer untersucht werden

Das in dieser Arbeit verwendete Cytochrom *c* wurde aus Pferdeherzen gewonnen und über Sigma Aldrich (USA) mit einer Reinheit von über 95% bezogen.

3.2.3 Her2/*neu* Tumorantigen

Da für das menschliche Immunsystem Ovalbumin nicht immunogen ist, wird im humanen Zellmodell Her2/*neu* als Modelantigen verwendet. Das Her-Antigen (*human epidermal growth factor receptor*) ist ein Zellrezeptor, der in Geweben epithelialen, neuronalen und mesenchymalen Ursprungs exprimiert wird. Es ist an vielen regulatorischen Prozessen wie der Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose von Zellen beteiligt [62]. Bei Brustkrebs ist das Oberflächenantigen überexprimiert auf entarteten Zellen zu finden und spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Wachstumssignalen [63]. Bei dem verwendeten Her2/*neu* handelt es sich um einen von der Firma Biomatik (Kanada) rekombinant hergestellten Abschnitt der Aminosäuresequenz des Her2/*neu* Antigens. Dieser besteht aus 630 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 73 kDa und wurde mit einer Reinheit von über 90% bezogen. Die Herstellung erfolgte mithilfe einer *Escherichia coli* Art und wurde über eine Metallchelate-Matrix spezifisch aufgereinigt. Die Endotoxinbelastung liegt unter 2 I.E./ μg [33].

3.3 Mannitol

Mannitol (Pearlitol 200 SD, Roquette Pharma, Frankreich, Abbildung 3.3) wird als Matrixbildner in der Sprühtrocknung der Nanopartikel eingesetzt und bildet massenmäßig den Hauptbestandteil der trockenen Formulierung.

Es ist ein in der Pharmazeutischen und Lebensmittel-Industrie weitverbreiteter Zuckeralkohol mit einem Molekulargewicht von 182,17 g/mol. Das geruchslose, weiße, nicht hygroskopische Pulver löst sich gut in Wasser, wobei die Lösungsenthalpie positiv ist. In pharmazeutischen Formulierungen findet es vor allem als Füllstoff in Tabletten Anwendung, in denen es einem Massenanteil von bis zu 90% einnimmt [64].

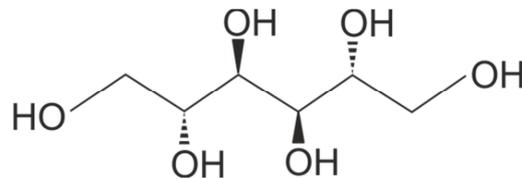


Abbildung 3.3: Strukturformel D-Mannitol

3.4 Fluoreszenzfarbstoffe

Um detektieren zu können, in welchen Zellkompartimenten die Nanopartikel nach Applikation aufgenommen werden, wird das Chitosan fluoreszenzmarkiert. Nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge, emittiert der Fluoreszenzfarbstoff Licht in einem für ihn charakteristischen Wellenlängenbereich [33].

3.4.1 Fluoreszein-Isothiocyanat

Fluoreszein-5-isothiocyanat (FITC) ist ein gelbgrüner Reaktivfarbstoff mit niedriger Molekularmasse, der in der Immunologie vielfach Anwendung findet. Bei hohen pH-Werten lässt sich das FITC leicht kovalent an Aminogruppen von Proteinen binden. Reaktive Gruppe ist hier der Thiocyanatrest. Das Absorptionsmaximum liegt bei neutralem pH-Wert bei 495 nm und kann daher gut mit Argonionenlasern angeregt werden. Das Fluoreszenzemissionsmaximum liegt bei 519 nm [33]. Das in dieser Arbeit verwendete Fluoreszein-Isothiocyanat Isomer I hat ein Molekulargewicht von 389,38 g/mol und wird in einer Reinheit von über 90% über Sigma Aldrich (USA) bezogen.

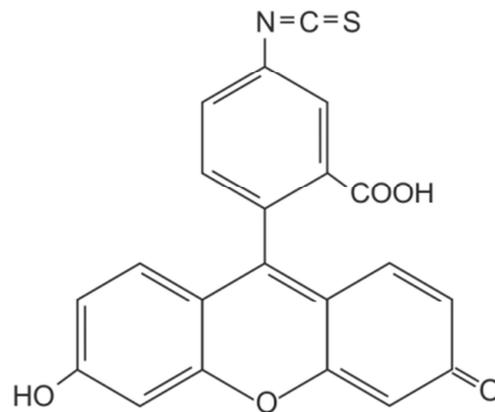


Abbildung 3.4: Strukturformel des Fluoreszein-5-isothiocyanats

3.4.2 FEW-Farbstoff S0744

Bei dem FEW Farbstoff S0744 (2-(5-(1-Carboxypentyl)-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-2H-indol-2-yliden)-propenyl)-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolhydroxid, Abbildung 3.5), handelt es sich um eine aminreaktive Verbindung, mit einem Molekulargewicht von 680,81 g/mol. Das Absorptionsmaximum liegt bei 533 nm und das Fluoreszenzmaximum bei 568 nm [65]. Durch die Differenz in der Elektronegativität zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffatomen und dem zusätzlichen Elektronendefizit auf Seiten des Stickstoffs, besitzt das Molekül eine CH-Acidität und kann mit nukleophilen Substanzen reagieren [66]. Der Farbstoff wird über die FEW Chemicals GmbH (Deutschland) bezogen.

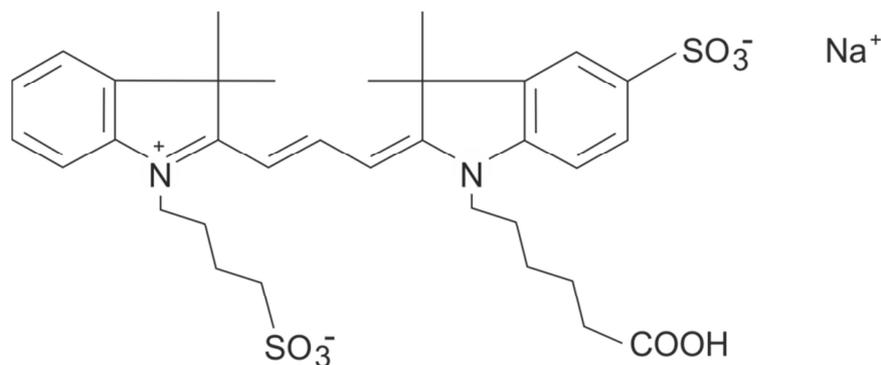


Abbildung 3.5: Strukturformel des FEW S0744 Farbstoffs

3.5 Puffersysteme

Für Freisetzungsversuche, zum Redispergieren und zur Auflösung der Nanopartikel, sowie zur Bestimmung des Endotoxingehalts werden verschiedene Puffersysteme nach dem Europäischen Arzneibuch [25] hergestellt und modifiziert (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Verwendete Puffersysteme mit Zusammensetzung nach Art und Menge

Puffersystem		Inhaltstoff	Menge
I:	Phosphatpuffer pH 7,4 10-fach konzentriert	Na_2HPO_4	23,8 g
		KH_2PO_4	1,90 g
		NaCl	80,0 g
		H_2O	ad 1,0 L
Ia:	Phosphat-Pufferlösung pH 7,4, natriumchloridhaltige R	Pufferlösung I	100 ml
		H_2O	ad 1,0 L
Ib:	Modifizierter Phosphatpuffer	Citronensäure	10 g
		Pufferlösung I	ad 1,0 L
II:	Phosphat Puffer pH 5,0 R	KH_2PO_3	2,72 g
		KOH	q.s.
		H_2O	ad 1,0 L
III:	Phosphat-Pufferlösung pH 6,0	KH_2PO_3	1,70 g
		NaOH	0,23 g
		H_2O	ad 1,0 L
IV:	Phosphat-Pufferlösung pH 8,0 (0,02 mol/L) R	KH_2PO_4	0,52 g
		K_2HPO_4	16,73 g
		H_2O	ad 1,0 L
V:	Acetatpuffer pH 3,9	Natriumacetat	0,66 g
		HAc (4 N)	28 g
		H_2O	ad 1,0 L
VI:	Trometamol-Pufferlösung pH 7,4 R	Trometamol	60,6 g
		Salzsäure (1N)	366 ml
		H_2O	ad 1,0 L

3.6 Cyclohaler

Der Cyclohaler ist ein kommerziell erhältlicher einzeldosierter Pulverinhalator (Dry Powder Inhaler (DPI)), über den das Pulver dispergiert und so pulmonal appliziert werden kann. Abbildung 3.6 zeigt schematisch den Querschnitt. Vor dem Inhalationsvorgang wird eine wirkstoffgefüllte Kapsel in die Kapselkammer im unteren Teil des Inhalators eingebracht und dieser verschlossen. Durch Drücken der beiden seitlich angebrachten Druckknöpfe wird die Kapsel mit je vier Nadeln mittig an den Enden der Kapsel angestochen. Bei der nachfolgenden Inhalation hebt sich die Kapsel aus der Kammer in die Inhalationskammer, wo sie durch den Luftstrom zu rotieren beginnt und das enthaltene Pulver freigibt. Eine Siebplatte im Mundstück hält die Kapsel und potentielle Bruchstücke zurück und stellt so sicher, dass nur das Pulver dem Luftstrom folgt [67].

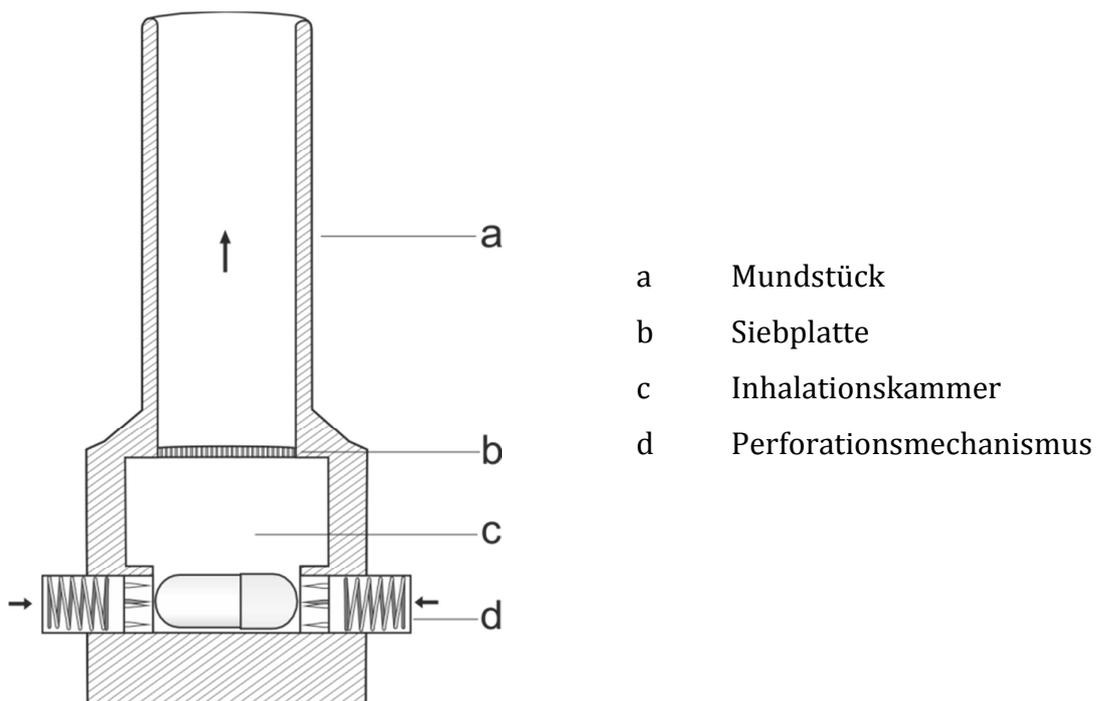


Abbildung 3.6: Schematischer Querschnitt durch den Cyclohaler

4 METHODEN

4.1 Präparative Methoden

4.1.1 Ionische Gelierung

Die Herstellung der Nanopartikel erfolgt nach dem Prinzip der ionischen Gelierung. Hierbei handelt es sich um eine Ladungsausgleichreaktion zwischen zwei entgegengesetzt geladenen Polymeren [68]. Dafür wird Chitosan in verdünnter Essigsäure gelöst. CMC wird separat in destilliertem Wasser gelöst und unter Rühren auf dem Magnetrührer (IKAMAG RET-GS, IKA-Werke, Deutschland), bei 800-1000 U/min langsam zu der Chitosanlösung gegeben. Die entstehende Suspension wird weitere 10 Minuten gerührt. Die Standardrezeptur der Nanosuspension ist in Tabelle 4.1 aufgeführt. Der Einfluss verschiedener Herstellungsparameter sowie Rezepturabwandlungen werden in dem Kapitel 5.1.1 näher erläutert.

Tabelle 4.1: Standardrezeptur der Chitosan-CMC-Nanosuspension

Chitosanlösung	
Chitosan (Chitoscience 90/10)	0,1 T
Essigsäure 99%	2 T
Aqua bidest	98 T
Carboxymethylcelluloselösung	
Carboxymethylcellulose (Tylose C30)	0,1 T
Aqua bidest	100 T
Zusammensetzung der resultierenden Nanosuspension	
Chitosan-CMC Nanopartikel	0,1 T
Essigsäure 99%	1 T
Aqua bidest	99 T

4.1.2 Aufreinigungsmethoden

Zur Entfernung störender hydrophiler Substanzen, wie zum Beispiel nicht eingekapseltem Antigen, Salzen oder Reaktionsprodukten, werden diverse Aufreinigungsmethoden verwendet.

4.1.2.1 Zentrifugation

Hierbei werden unlösliche Partikel, die sich in einer Dispersion befinden, durch das anliegende Kraftfeld eines rotierenden Zentrifugationsrotors zur Sedimentation gebracht [33]. Die Proben werden nach Dichte und Größe aufgetrennt [69]. In der vorliegenden Arbeit wird die Eppendorf Centrifuge 5430 R verwendet, die über eine Drehzahl von bis zu $20\,817 \times g$ ($14\,000$ U/min) verfügt und bis zu 6×50 ml zeitgleich zentrifugieren kann.

Die Zentrifugation wird nach der Herstellung der beladenen Partikel genutzt, um nicht eingekapseltes Antigen aus der Suspension abzutrennen. Um ein Verkleben der Partikel zu verhindern, wird die Zentrifuge auf 15°C vortemperiert und die Suspension anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen nach den in Tabelle 4.2 definierten Parametern gewaschen, wobei die Zentrifugationsintensität über die Zeit zunimmt. Nach jedem Zentrifugationsschritt, wird der Überstand abgenommen und dieser erneut zentrifugiert. Die entstandenen Pellets werden auf einem Schüttler (Schüttelapparatur Typ B1, Edmund Bühler GmbH, Deutschland) bei mittlerer Geschwindigkeit in einem verbleibenden Tropfen Ausgangssuspension resuspendiert und mit 1%iger Essigsäure auf das gewünschte Volumen aufgefüllt.

Tabelle 4.2: Schema der Zentrifugation zur Partikelwaschung

Zeitpunkt	Dauer	Drehzahl
1	5 min	6000 U/min
2	10 min	6000 U/min
3	5 min	7000 U/min
4	10 min	7000 U/min
5	15 min	7500 U/min
6	15 min	7830 U/min
7	30 min	7830 U/min

4.1.2.2 Dialyse

Bei der Dialyse wird die aufzureinigende Lösung in einen Schlauch gefüllt, der aus einer Dialysemembran besteht. Dieser wird in ein Gefäß mit einem Puffer oder destilliertem Wasser gehängt. Während kleine Moleküle die Membran ungehindert, gemäß ihrem Konzentrationsgradienten, per Diffusion passieren können, werden größere Moleküle durch die Membran zurückgehalten. Entscheidend für die Abtrennung ist die Wahl der Dialysemembran, die mit variierender Molekulargewichtsausschlussgröße (MWCO) bezogen werden kann und so bestimmt, bis zu welcher Größe die Moleküle im Schlauch

zurückgehalten werden [69]. In dieser Arbeit werden die in Tabelle 4.3 aufgeführten Dialyseschläuche genutzt, um unreaktierten Fluoreszenzfarbstoff (Kapitel 4.1.5) oder Ausgangssubstanzen der Biotinylierung (Kapitel 4.1.6) abzutrennen.

Tabelle 4.3 Verwendete Dialysedevice mit Hersteller, MWCO und Material

Dialyseschlauch	Hersteller	MWCO	Material
Float-A-Lyzer G2	Spectrum Europe (NL)	3.5-5 kDa	Cellulose Ester
ZelluTrans	Carl Roth (D)	3,5; 6; 12 kDa	Regenerierte Cellulose
Slide-A-Lyzer Mini	Thermo Scientific (USA)	3,5 kDa	Regenerierte Cellulose

4.1.2.3 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration wird genutzt, um Proben zu konzentrieren, zu ent-oder umzusalzen. Dabei wird die Probelösung per Überdruck, Vakuum oder Zentrifugation durch eine Filtermembran mit definierter Ausschlussgrenze gepresst. Die Moleküle unterhalb der Ausschlussgrenze, wie Wasser oder Salze, können den Filter passieren und werden dem System so entzogen [69]. Der hier verwendete Vivaspin 6 (Sartorius Stedim biotech, Deutschland) hat eine Filtermembran mit 5 kDa MWCO und wird verwendet, um das Her2neu Antigen vom Lagerpuffer zu trennen und aufzukonzentrieren (Kapitel 5.6.4.3).

4.1.3 Sprühtrocknung

Die hergestellte Nanosuspension wird durch Sprühtrocknung in ein trocknes Pulver überführt. Dabei handelt es sich um ein kontinuierliches Verfahren, das für die Trocknung von Flüssigkeiten bis hin zu niedrigviskosen Pasten geeignet ist. [70]. Dabei entstehen in der Regel sphärische Hohlkugeln, die eine geringe Dichte aufweisen [71]. Abbildung 4.1 zeigt den schematischen Aufbau des verwendeten Sprühtrockners Büchi B-290 (Büchi, Schweiz). Die zu trocknende Flüssigkeit wird mithilfe einer Schlauchpumpe in den Sprühtrockner gefördert und durchläuft dort die drei grundlegenden Phasen des Trocknungsprozesses: die Atomisierung, die Trocknung und die Abscheidung als trockenes Produkt. Bei der Atomisierung wird das zugeführte Ausgangsprodukt durch eine Zweistoffdüse zerstäubt. Im zweiten Schritt werden die Flüssigkeitstropfen durch die umströmende Heißluft im Gleichstromprinzip getrocknet.

Das Produkt wird dabei während des Trocknungsvorgangs auch bei hohen Einlasstemperaturen vor großer thermischer Belastung geschützt, denn durch die Verdunstungskälte des Lösungsmittels kühlt das System ab. Die Auslasstemperatur lässt sich durch die Zuführgeschwindigkeit des Produktes steuern und entspricht der Maximaltemperatur, der das Produkt ausgesetzt ist. Nach der Trocknung wird das Pulver im Zyklon vom Luftstrom getrennt [68]. Die Sprühtrocknung der Nanosuspension erfolgt nach den in Tabelle 4.4 aufgeführten Parametern. Kapitel 5.1.2 und 5.2.3 zeigen welche Auswirkung ein Variieren der Parameter auf die Eigenschaften des Produkts hat.

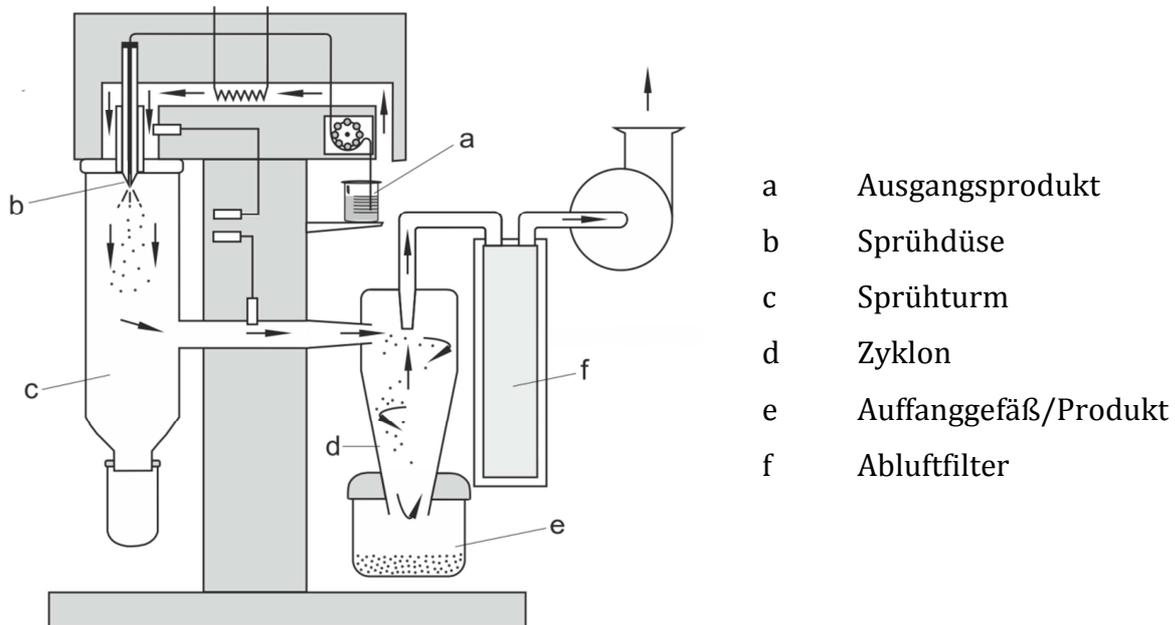


Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau eines Sprühtrockners (Pfeile symbolisieren den Luftstrom)

Tabelle 4.4: Standardparameter Sprühtrocknung

Parameter	
Durchflussrate Aspirator	35 m ³ /h (= 100%)
Einlasstemperatur	80°C
Auslasstemperatur	35°C (+/- 1°C)
Düsendurchmesser	1,4 mm
Atomisierungsenergie	470 L/h (= 40 mm)

4.1.4 Gefriertrocknung

Um Zwischenprodukte wie fluoreszenzmarkiertes Chitosan oder biotinyliertes Ovalbumin in eine trockene Form zu überführen, wird eine Gefriertrocknung an die jeweiligen Syntheseschritte (s. Kapitel 4.1.5 u. 4.1.6) angeschlossen.

Die Gefriertrocknung stellt ein besonders schonendes Verfahren zur Trocknung von thermolabilen und hydrolyseempfindlichen Stoffen dar. Klassischerweise läuft sie in drei Phasen ab: Einfrieren, Primärtrocknung und Sekundärtrocknung [71]. Bei dem Einfrieren, welches bei Normaldruck geschieht, wird das im Gut befindliche Wasser möglichst schnell eingefroren. Dies verhindert ein Kristallwachstum und hilft so die native Struktur des Ausgangsstoffes zu bewahren. Beim zweiten Schritt, der Primärtrocknung, wird der Hauptteil des gefrorenen Wassers durch Sublimation entzogen. Die abschließende Sekundärtrocknung dient der Entfernung von Restfeuchte aus dem Trockengut und wird im Vakuum und mit erhöhter Temperatur durchgeführt [68, 71].

Hierfür wird der Alpha 1-4 (Christ, Deutschland), ein Gefriertrockner im Labormaßstab, verwendet. Die Stellfläche wird zunächst auf eine Temperatur von -20°C vortemperiert, anschließend wird das zu trocknende Material auf dieser platziert und für eine halbe Stunde eingefroren. Dann wird ein Vakuum von 2,560 mbar eingestellt, die Temperatur für die Primärtrocknung auf -10°C erhöht und diese Parameter für 24 h konstant gehalten. Die Sekundärtrocknung erfolgt bei 0,0001 mbar mit erhöhter Temperatur von 10°C für weitere 48 h.

4.1.5 Fluoreszenzmarkierung

Zur Visualisierung der Partikel in Zelltests, wird das Chitosan vor der Partikelbildung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kovalent gekoppelt. Eine kovalente Bindung hat den Vorteil, dass der Farbstoff, anders als bei miteingekapseltem Farbstoff, nicht aus den zu untersuchenden Partikeln herausdiffundieren kann. Auf diese Weise kann Chitosan in den Zellen lokalisiert werden.

4.1.5.1 Markierung mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)

Die Fluoreszenzmarkierung von Chitosan erfolgt mit FITC durch Abwandeln der von Colonna et al beschriebenen Methode [72]. Dazu werden 1% (m/V) Chitosan in 1 N

Essigsäure gelöst und das gleiche Volumen an Methanol zu der Lösung hinzugefügt. 2% (m/V) FITC werden in Methanol gelöst und so zu der Chitosan-Lösung gegeben, dass sich ein FITC:Chitosan-Verhältnis von 1:10 einstellt. Das Gemisch wird im Dunkeln über mindestens 12 Stunden gerührt, wobei das FITC kovalent an die Aminogruppe des Chitosans gebunden wird. Mit 1 N NaOH Lösung wird die Lösung anschließend auf einen pH-Wert von über 10 gebracht, wodurch das markierte Chitosan aus der Lösung ausfällt. Der Niederschlag wird durch Zentrifugation bei 7800 U/min für 10 min bei 15°C gewonnen und 10-mal mit einer Mischung aus Methanol/Wasser 70:30 (V/V) gewaschen. Das gewaschene Pellet wird in 1 N Essigsäure gelöst, im Dunkeln für 3 Tage gegen bidestilliertes Wasser dialysiert, um Edukte zu entfernen, und gefriergetrocknet. Die Reaktionsgleichung ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

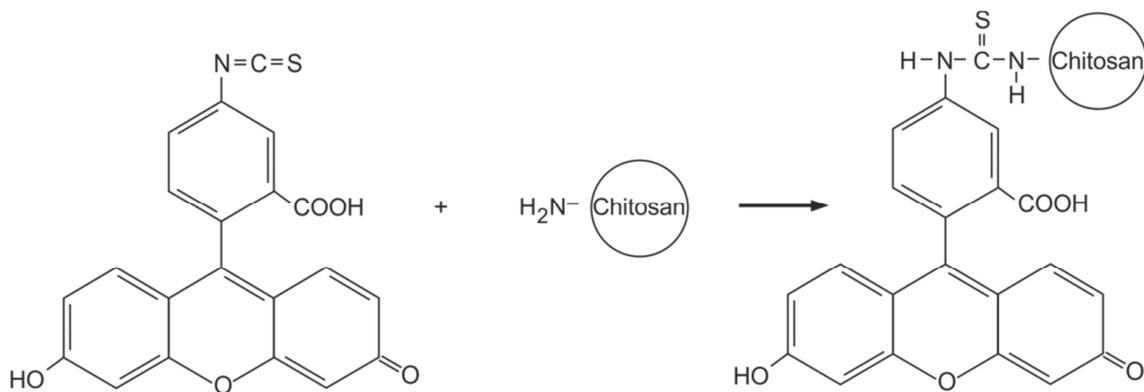


Abbildung 4.2: Reaktionsgleichung der kovalenten Fluoreszenzmarkierung mit FITC

4.1.5.2 Markierung mit S0744

In Anlehnung an die FITC-Chitosan-Synthese erfolgt die kovalente Bindung des FEW Farbstoffs S0744 an Chitosan. Dabei wird eine 2%ige (m/V) Lösung des Farbstoffs in Methanol hergestellt, der, zur Verbesserung der CH-Acidität des Farbstoffes, eine geringe Menge Triethylamin hinzugefügt wird. Chitosan wird separat in einer Konzentration von 1,8% (m/V) in Wasser suspendiert und anschließend mit dem gleichen Volumen an Methanol versetzt. Der Farbstoff wird zu der Chitosansuspension gegeben, und bei 70°C für 6 h im Wasserbad unter Rühren erhitzt. Die Mischung wird anschließend abgekühlt und für 24 h bei Raumtemperatur gelagert. Das Produkt wird per Zentrifugation gewonnen und anschließend mit einer Methanol/Wassermischung 70:30 (V/V) 10 mal gewaschen. Das so erhaltene Produkt wird in 1% Essigsäure gelöst,

im Dunkeln für 3 Tage gegen bidestilliertes Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

4.1.6 Biotinylierung

Biotin ist ein sehr kleines Molekül, das hochspezifisch an die Proteine Avidin aus dem Hühnereiweiß und Streptavidin aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* bindet. Diese beiden Stoffe sind mit allen gängigen Enzymen kommerziell erhältlich und können durch eine Fluorochromkopplung eine Antigen-Antikörper-Interaktion mit Biotin indirekt nachweisen [33]. Durch die Beladung der Partikel mit biotinyliertem Ovalbumin kann per Westernblot die Anwesenheit des Ovalbumins in Organellen der Zelle detektiert werden.

Dafür wird Biotin kovalent an Ovalbumin gebunden (Abbildung 4.3). Dies erfolgt mit Hilfe des EZ-Link NHS-LC-Biotin Markierungskits der Firma Thermo Scientific (USA). Dabei wird N-Hydroxysuccinimidbiotin in Dimethylformamid gelöst, zu einer PBS-gepufferten Ovalbumin-Lösung gegeben und über 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Da NHS-Ester sehr schnell und effektiv mit Aminogruppen reagieren, reicht diese kurze Zeitspanne aus, um das Ovalbumin effektiv zu biotinylieren [73]. Anschließend wird die Mischung über einen Tag dialysiert und gefriergetrocknet.

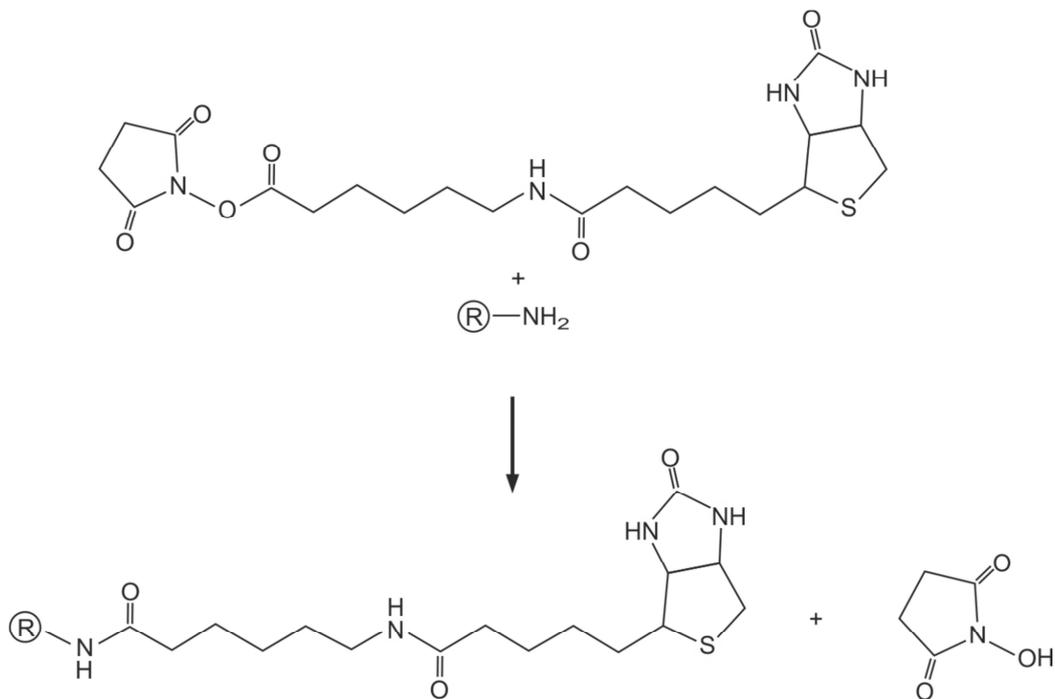


Abbildung 4.3: Biotinylierungsreaktion eines Proteins (R-NH_2)

4.2 Analytische Methoden

4.2.1 Partikelgrößenanalytik

Da die in dieser Arbeit hergestellten Nanopartikel für das menschliche Auge nicht sichtbar sind, wird eine geeignete Messmethode benötigt, um eine Aussage zur Größe der Partikel und deren Größenverteilung machen zu können.

Des Weiteren ist eine Charakterisierung des Pulvers nach der Sprühtrocknung notwendig, um Informationen über Form, Größe und Dispergierverhalten im Luftstrom zu erhalten.

4.2.1.1 Dynamische Lichtstreuung

Die Dynamische Lichtstreuung (auch PCS, *Photon Correlation Spectroscopy*) misst die Brown'sche Molekularbewegung von in einer Flüssigkeit dispergierten Partikeln und berechnet daraus die Partikelgröße. Dafür wird die Probe in einen Laserstrahl eingebracht und die Intensitätsschwankungen des rückgestreuten Lichtes in einem Winkel von 173° analysiert. Die Intensitätsschwankungen des Streulichtes über die Zeit sind bei großen Partikeln klein, bei kleinen hingegen groß. Über den Abfall der gemessenen Korrelationsfunktion kann die Partikelgrößenverteilung errechnet werden. Der Berechnung liegt die Stokes-Einstein-Gleichung zugrunde, durch die die unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten großer und kleiner Partikel beschrieben werden (Formel 1): Die Geschwindigkeit mit der sich die Partikel durch das umgebende Medium bewegen ist abhängig von ihrem Radius, der Viskosität des Mediums und der Temperatur. Bei bekannter Viskosität und Temperatur, kann so die Partikelgröße berechnet werden [74, 75].

Formel 1: Stokes-Einstein-Gleichung

$$D = \frac{k_B \times T}{6\pi \times \eta \times r}$$

k_B	Boltzmann Konstante
T	Temperatur
η	Viskosität
r	Radius
D	Diffusionskoeffizient

Zur Messung der Partikelgrößenverteilung der Nanosuspensionen wird der Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) verwendet. Vor der Messung werden die Viskosität

und die Temperatur der Suspension mit dem Vibro-Viskosimeter SV-10 (A&D, Japan) bestimmt und in die Messmethode der Software (Zetasizer Software 7.03, Malvern, UK) übertragen. Die Suspension wird unverdünnt in eine Polystyrol-Küvette gefüllt und in der Halterung im Inneren des Zetasizers platziert. Alle Messungen starten mit einer Equilibrierungszeit von 2 min, in der die Probe auf die zuvor definierte Temperatur gebracht wird, die über den gesamten Messvorgang konstant bleibt. Ein Messvorgang besteht aus drei Durchläufen, die sich wiederum aus 15 Einzelmessungen zusammensetzen. Im Ergebnisteil wird jeweils der Mittelwert aus mindestens drei Messungen angegeben.

Die gemessenen Werte sind zum einen der z-Average, im Folgenden als Partikelgröße bezeichnet, der den mittleren hydrodynamischen Partikeldurchmesser in nm angibt, sowie der Polydispersitätsindex (PDI), der ein Maß für die Breite der Verteilung darstellt und eine dimensionslose Zahl ist. Mit der PCS kann man Partikel bis zu einer Größe von 1 μm zuverlässig ermitteln [71].

4.2.1.2 Laserdiffraktometrie

Für größere Partikel im Bereich von 0,1 μm bis 8750 μm eignet sich die Messung der Laserbeugung [76]. Diese Methode wird durch die Fraunhofer-Näherung beschrieben und beruht auf der charakteristischen Laserbeugung in den Lichtstrahl eingebrachter Partikel. Kleinere Partikel beugen den Strahl stärker als größere Partikel, was zu großen Beugungsringen mit geringer Intensität bei kleinen Partikeln und kleinen Ringen mit hoher Intensität bei großen Partikeln führt [71]. Diese Beugungsringe werden am Detektor erfasst und das Signal durch die Computersoftware in eine Partikelgrößenverteilung umgerechnet.

Für alle Messungen wurde das Laserdiffraktometer HELOS der Firma Sympatec (Deutschland) mit einem eingebauten Helium-Neon-Laser und die dazugehörige Computer Software WINDOX 5 (ebenfalls Sympatec) verwendet. Durch den modularen Aufbau können je nach Versuch verschiedene Aufgabesysteme verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit kommen vorwiegend das RODOS Modul zur Bestimmung der Primär-Partikelgrößenverteilung des sprühgetrockneten Produkts und das INHALER Modul zur Beurteilung der Pulverdispergierung durch ein DPI-Device zum Einsatz. Alle Module liefern als Ergebnis sowohl die Summenverteilung als auch die Dichteverteilung (q3log) der Partikelgrößen. Charakteristische Kenngrößen sind die x_{10} , x_{50} und x_{90}

Werte, sowie die Fraktion $<5,25 \mu\text{m}$, die aufgrund ihrer geometrischen Größe theoretisch die Lunge erreichen würde.

Beim RODOS Modul handelt es sich um einen Trockendispergierer, der die Pulverprobe durch Anlegen von Druckluft vor dem Vermessen effektiv in einzelne Partikel aufteilt. Als Mechanismus agieren Prallvorgänge zwischen den einzelnen Partikel, den Partikeln und dem Instrument, sowie Zentrifugalkräfte. Alle Messungen werden bei einem Dispergierdruck von 3 bar mit der Linse R2 (Brennweite 50 mm, Messbereich $0,25 \mu\text{m}$ - $87,5 \mu\text{m}$) durchgeführt. Vor jeder Messung wird zudem für 10 s eine Referenzmessung durchgeführt. Die darauffolgende Messung beginnt bei einer optischen Konzentration von $>1\%$.

Für die Messung mit dem INHALER Modul werden HPMC-Kapseln der Größe 3 mit je 10 mg Pulverformulierung befüllt. Diese werden mit dem Cyclohaler dispergiert und über das Modul durch den Laserstrahl hindurchgeführt. Dabei wird über Anlegen eines Vakuums ein Luftstrom von 100 L/min eingestellt. Vor der Messung wird auch hier eine Referenzmessung mit Leerkapsel gemacht. Für die eigentliche Messung wird die Kapsel im Inhalator angestochen und über eine Gummilippe am Modul befestigt. Durch Starten der Messung beginnt die Kapsel im Inhalator zu rotieren und gibt das enthaltene Pulver frei. Ist eine optische Konzentration $>0,5\%$ erreicht, startet die Messung.

Wird das Pulver mit beiden Modulen vermessen, kann anschließend die relative Deagglomeration berechnet werden (Formel 2). Der prozentual berechnete Wert setzt die erhaltenen Fraktionen $<5,25 \mu\text{m}$ aus der Trockendispergierung und dem Inhalermodul ins Verhältnis und kann als Maß benutzt werden, um die Dispergierfähigkeit des Inhalators zu beurteilen. Dabei ist die Annahme, dass das Pulver durch die Trockendispergierung vollständig dispergiert vorliegt. Je höher der erhaltene Wert, desto geeigneter ist der Inhalator die im Pulver enthaltenen Primär-Partikel im Luftstrom freizusetzen.

Formel 2: Berechnung der relativen Deagglomeration

$$\text{Rel. Deagglomeration} = \frac{\Sigma (\text{Partikel} < 5,25 \mu\text{m Dispergierung Inhalator})}{\Sigma (\text{Partikel} < 5,25 \mu\text{m Trockendispergierung})} \times 100\%$$

4.2.1.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ist ein oberflächenabbildendes Verfahren. In dieser Arbeit wird es verwendet, um die Partikel vor und nach der Sprühtrocknung zu

visualisieren. Die Aufnahmen werden mit dem Smart SEM™ Supra 55VP Rasterelektronenmikroskop und dem Zeiss DSM 940 (beide Carl Zeiss AG, Deutschland) gemacht. Zur Vorbereitung werden die Proben auf eine leitfähige Polycarbonat-Folie (Leit-Tabs, Plano GmbH, Deutschland) aufgetragen und im Sputter-Coater (SCD 005, Bal-Tec AG, Liechtenstein) für 65 Sekunden bei 50 mA unter Argonbegasung mit Gold beschichtet. Für die Aufnahmen im Mikroskop wird eine Spannung von 2-5 kV angelegt. Der Mikroskopierabstand liegt bei allen Aufnahmen zwischen 6-8 mm, die Vergrößerung wird zwischen 250 - 5000 x variiert. Zur Detektion wird der SE-Detektor verwendet, der die rückgestreuten Sekundärelektronen registriert [69].

4.2.2 Proteinanalytik

Einen weiteren wichtigen Schritt stellt die Bestimmung der Proteinmenge dar, die sich nach Einkapselung in den Nanopartikeln befindet. Besonders für Zelltests ist es wichtig, die Menge des Proteins zu definieren, um sie später mit der gleichen Menge an löslichem Antigen vergleichen zu können. Zur Quantifizierung stehen diverse Methoden aus den Bereichen der Spektroskopie, Radiomarkierung oder durch kolorimetrische Tests zur Verfügung (Tabelle 4.5), wobei in dieser Arbeit überwiegend mit BCA Assays der Firma Thermo Scientific gearbeitet wurde (Kapitel 4.2.2.1). Ein weiteres wichtiges Qualitätsmerkmal der Formulierung ist die Sicherstellung der Proteinintegrität, um ausschließen zu können, dass das Protein durch den Herstellprozess degradiert wurde. Gerade der Sprühtrocknungsprozess stellt eine thermische Belastung dar [77]. Aber auch über die Lagerzeit der Formulierung soll ausgeschlossen werden, dass es zu einer Degradierung des Proteins kommt. Instabilitäten können vor allem dann ein Problem sein, wenn das immunologisch aktive Epitop diskontinuierlich codiert ist. Das heißt, dass die Region, die vom Immunsystem erkannt wird (Determinante), nicht durch die Primärstruktur, sondern durch die räumliche Anordnung weiter entfernter Abschnitte dargestellt wird. Hier können Änderungen in der Struktur dazu führen, dass das Antigen seine immunogene Wirkung ganz verliert [78]. Da die verwendeten Antigene Her2/*neu* und Ovalbumin Epitope aufweisen, die auf einem kontinuierlichen Strang codiert sind, ist ein Verlust der Antigenität durch Strukturänderungen nicht zu erwarten.

Tabelle 4.5: Quantitative Proteinbestimmungsmethoden im Überblick [69]

Proteinanalytik	Messprinzip
Spektroskopische Methoden	
Messungen im UV-Bereich	UV-Absorption bei 280 nm durch die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin; Absorption bei 205 nm durch Peptiddoppelbindungen (C=O, C=C)
Fluoreszenz-Messung	Eigenfluoreszenz von Tryptophan
Quantitative Bestimmungen durch Färbetests	
Biuret-Assay	Rotvioletter Kupferkomplex aus Biuretreagenz und mit zwei CO-NH-Gruppen des Proteins; Messung bei 550 nm
Lowry-Assay	Tiefblauer Komplex aus Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz und Cu ⁺ ; Messung bei 750 nm, 650 nm oder 540 nm
Bicinchoninsäure-Assay	Violetter Komplex aus BCA Reagenz und Cu ⁺ ; Messung bei 562 nm
Bradford	Unspezifische Färbung mit Coomassie-Brilliantblau durch Bindung an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten
Radioaktive Markierung von Peptiden und Proteinen	
Iodierungen	Einführung eines radioaktiv markierten Isotops z.B. elektrophile Addition an Tyrosin oder Imidazol, Quantifizierung der Radioaktivität mit Szintillationszähler

Da Proteine eine sehr komplexe räumliche Struktur besitzen, ist es unmöglich, mit einer Methode alle möglichen Instabilitäten zu erfassen. Mögliche Veränderungen der Primärstruktur beispielsweise können durch eine Änderung des Molekulargewichts mittels SDS-PAGE erfasst werden (Kapitel 4.2.2.3).

4.2.2.1 BCA-Assay

Der BCA-Assay stellt eine einfache Methode zur Quantifizierung des Gesamtproteinanteils in einer Lösung dar. Der Assay macht sich die Farbentwicklung zunutze, die bei der Komplexbildung zwischen Cu^+ Ionen und Bicinchoninsäure (BCA) entsteht (Abbildung 4.4). Dieser Chelatkomplex ist durch seine starke Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gut detektierbar [79]. Smith et al. [80] haben beobachtet, dass sich diese Reaktion aus zwei Teilschritten zusammensetzt. Im ersten Schritt oxidieren die in den Proteinen enthaltenen Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan temperaturunabhängig durch das alkalische Mileu. Im zweiten, temperaturabhängigen Schritt, reagiert das in dem Reagenz enthaltene Cu^{2+} mit den von den Peptidverbindungen abgegebenen Elektronen und es entsteht Cu^+ [81]. Der BCA-Assay weist eine hohe Kompatibilität mit diversen Substanzen wie Puffersystemen oder Detergenzien auf. Störungen lassen sich vorwiegend darauf zurückführen, dass die zu untersuchende Probe das Cu^{2+} ebenfalls reduzieren oder komplexieren kann.

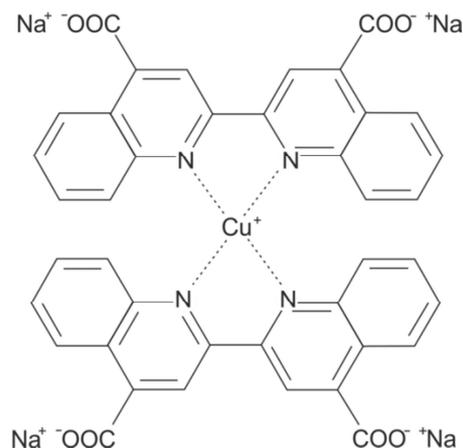


Abbildung 4.4: Violetter Bicinchoninsäure-Kupferkomplex

In dieser Arbeit werden zwei verschiedene BCA-Assays der Firma Thermo Scientific (USA) verwendet, die sich vor allem in ihrer Sensitivität unterscheiden. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 4.6 aufgeführt. Die Proben werden in vierfach-

Bestimmung analog der Herstellerangaben in 96-Well-Platten pipettiert und mit frisch hergestelltem BCA-Reagenz versetzt. Die Messung der Absorption erfolgt mit einem Plattenreader (Spectra Thermo Reader, Männedorf, Schweiz) und dazugehöriger Software easyWINfitting V 6.0a bei einer Wellenlänge von 570 nm. Da die entstehende Absorption proteinabhängig ist, wird bei jeder Versuchsreihe das jeweilige Protein für eine 5-Punkt-Kalibrierung mitvermessen. Die Auswertung erfolgt innerhalb des angegebenen Messbereichs durch Berechnen einer linearen Regressionsgrade.

Tabelle 4.6: Zusammensetzung der wässrigen BCA Reagenzien mit Mischverhältnissen und linearem Messbereich

Assay-Kit	Inhaltstoffe	Mischverhältnis Reagenzien	Linearer Messbereich
BCA			
Reagenz A	Na ₂ BCA Na ₂ CO ₃ Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ NaOH NaHCO ₃	50 Teile	20 - 2000 µg/ml
Reagenz B	CuSO ₄	1 Teil	
Micro BCA			
Reagenz A	Na ₂ CO ₃ Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ NaOH NaHCO ₃	25 Teile	0,5 – 40 µg/ml
Reagenz B	Na ₂ BCA	24 Teile	
Reagenz C	CuSO ₄	1-2 Teile	

Probenaufbereitung: Indirekte Bestimmung

Der nach dem Waschschrift der Nanosuspension anfallende Überstand wird aufbewahrt und der Anteil ungebundenen Proteins mittels BCA Protein Assay Kit bestimmt. Dazu werden die Proben zunächst mit 1 N Natronlauge neutralisiert (> pH 7). Anschließend werden die Proben bei 10000 U/min bei 20°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand 1:2 mit Phosphat-Puffer pH 7,4 verdünnt. Die Proben werden in eine 96-Well-Platte pipettiert, mit dem BCA-Reagenz versetzt, bei 37°C für 30 min inkubiert und bei 562 nm vermessen.

Probenaufbereitung: Direkte Bestimmung

Zur direkten Bestimmung der Beladung werden die Nanopartikel nach dem Sprühtrocknen komplett gelöst und die gebundene Proteinmenge direkt aus der Lösung ermittelt. Zum Lösen der Partikel wird ein modifizierter Phosphatpuffer (nach Tabelle 3.2) benutzt. Die freigesetzte Menge Protein wird mit dem Micro BCA-Assay Kit bestimmt.

Berechnung Proteingehalt

Sowohl die Proteinbeladung (auch LC für *Loading Capacity*) als auch die Einkapslungseffizienz (auch LE für *Loading Efficiency*) werden in Prozent angegeben. Die LC gibt den prozentualen Anteil Protein an, aus dem der Nanopartikel besteht, während die LE beschreibt, wieviel von dem eingesetzten Protein verkapselt werden konnte. Die Berechnung erfolgt nach Formel 3 und 4 [36].

Formeln 3 und 4: Berechnungen der Proteinbeladung (LC) und Beladungseffizienz(LE)

$$LC(\%) = \frac{m(\text{Protein gebunden})}{m(\text{Nanopartikel})} \times 100 \%$$

$$LE(\%) = \frac{m(\text{Protein gebunden})}{m(\text{Protein gesamt})} \times 100 \%$$

4.2.2.2 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography, SEC*) handelt es sich um eine flüssigchromatographische Trennmethode, bei der gelöste Stoffe über eine Säule mit porösem Feststoff ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Trennung erfolgt per Diffusion, das heißt die Probenmoleküle dringen gemäß ihrer Größe mit unterschiedlicher Dauer und Tiefe in die Poren der Säule ein. Moleküle, die zu groß sind, um in die Poren einzudringen, werden ausgeschlossen und eluieren als Erstes. Kleine Moleküle durchdringen die Poren und werden so zeitweise aus dem Eluentenstrom entfernt. Durch Diffusion durchwandern sie die Poren und eluieren später. Je kleiner das Molekül ist, desto stärker ist dieser Effekt ausgeprägt [82]. In dieser Arbeit wird die SEC zur Quantifizierung der Beladungsrate der Nanopartikel mit Cytochrom *c* genutzt. Die verwendeten Einstellungen und Materialien sind in Tabelle 4.7 aufgeführt.

Tabelle 4.7 Verwendete Einstellungen und Materialien für die Größenausschlusschromatographie

Parameter	
Säule	Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWxl
Fließmittel	Essigsäure 1%
Flussrate	0,4 ml/min
Detektion	UV-Detektion bei 369 nm

4.2.2.3 Gelelektrophorese

Durch die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfonate - polyacrylamide gel electrophoresis*) kann das Molekulargewicht von Proteinen bestimmt werden und damit auch Informationen über Fraktionierung von in den Partikeln enthaltenen Proteinen erhalten werden.

Polyacrylamidgele sind stabil und chemisch inert. Sie entstehen bei Polymerisation von Acrylamidmonomeren durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED). Man erhält ein klares, durchsichtiges Gel, dessen Porengröße durch die eingesetzte Polyacrylat- und Vernetzermenge gesteuert werden kann [69].

Die für die Probenpräparation notwendige Partikelauflösung und die Herstellung des Standards erfolgt durch Zugabe von modifiziertem Phosphatpuffer (Tabelle 3.2). Zur Aufbereitung der Proben wird SDS als anionischer oberflächenaktiver Stoff zur Proteinlösung gegeben. Dieser kann die Eigenladung der Proteine effektiv überdecken und so zu einer nach außen hin konstanten negativen Ladung führen. Dafür werden die Proteine mit SDS und β -Mercaptoethanol für 10 min auf 90°C erhitzt, wodurch Wasserstoff- und Schwefelbrücken aufgespalten werden und es zusätzlich zu einer Streckung des Moleküls kommt. Dieses liegt nun in der Primärstruktur vor und wandert, nach Auftragung auf das Gel, im elektrischen Feld Richtung Anode [69].

Für die Durchführung der SDS-PAGE wird ein Mini Protean Tetra Cell System der Firma BIO-RAD Laboratories Inc. (USA) verwendet. Zur Trennung wird ein diskontinuierliches Verfahren angewandt, bei dem die Proben zunächst in einem pH-neutralen Sammelgel aufkonzentriert (120 V für 10 min) werden und anschließend durch ein basisches Trenngel wandern (200 V für 45 min). Das dafür genutzte Gel wird nach der in Tabelle 4.8 aufgeführten Rezeptur selbst gegossen. Zur Orientierung läuft parallel ein MW-Marker (PAGE-Ruler™, Thermo Scientific, USA) mit. Die Proteine werden im Gel nach Beendigung der Elektrophorese mit Coomassie Brilliant Blau G 250 (Carl Roth GmbH, Deutschland) angefärbt.

Tabelle 4.8: Rezeptur für das diskontinuierliche Polyacrylamidgel

Trenngel	Sammelgel
5,0 ml Aqua bidest	2,4 ml Aqua bidest
3,0 ml Trenngelpuffer (TRIS-Puffer pH 8,8 mit 0,4% SDS)	1 ml Sammelgelpuffer (TRIS Puffer pH 6,8 mit 0,4% SDS)
4,0 ml 30% (m/V) Acrylamidlösung	0,6 ml 30% (m/V) Acrylamidlösung
10 µl TEMED	6 µl TEMED
80 ml 10% APS-Lösung	25 µl 10% APS-Lösung

4.2.3 Freisetzungsverhalten

Das Freisetzungsverhalten der Partikel wird in verschiedenen Freisetzungsmedien bei Raumtemperatur untersucht. Dazu werden für jeden Probeentnahmezeitpunkt jeweils 10 mg der getrockneten Formulierung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) eingewogen und in 1000 µl des jeweiligen Mediums redispergiert. Zu den definierten Probeentnahmezeiten wird ein Probegefäß entnommen, aufgeschüttelt und bei 14000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der partikelfreie Überstand wird in ein neues Gefäß überführt und der Proteingehalt jedes Überstandes am Ende per BCA-Assay vierfach bestimmt.

4.2.4 Aerodynamische Charakterisierung

Um sicherzustellen, dass der Wirkstoff in den Respirationstrakt gelangen kann, wird eine aerodynamische Charakterisierung mit dem *Next Generation Pharmaceutical Impactor* (NGI) nach der Arzneibuchmonographie der 2.9.18, Ph.Eur 7.0, durchgeführt (Abbildung 4.5).

Zur Vorbereitung werden HPMC Kapseln der Größe 3 mit 20 mg trockener Formulierung befüllt. Der verwendete Cyclohaler ist ein Inhalator mit geringem Widerstand, bei dem der Druckabfall von 4 kPa, die das Arzneibuch fordert, in dem kalibrierten Flussratenbereich des NGIs nicht erreicht werden kann [83]. Die Vakuumpumpe wird daher vor der Messung auf die maximale Luftflussrate von 100 L/min eingestellt. Damit die Partikel während der Messung nach dem Impaktieren auf der entsprechenden Prallplatte verbleiben, müssen diese gecoatet werden. Um

Störungen in der Analytik auszuschließen (Kapitel 5.2.2) werden hier befeuchtete, inerte, 120 µm dünne Celluloseacetatfilter (Ø 50 mm und 90 mm, Sartorius stedim biotech, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe einer Pinzette werden diese auf die Prallplatten gelegt und mit einer definierten Menge 1% (V/V) DMSO in bidestilliertem Wasser benetzt. Der NGI wird geschlossen und der Cyclohaler mit Kapsel über eine Gummilippe an dem NGI angebracht. Die Triggerbox wird auf 2,4 Sek. eingestellt, was einem Luftvolumen von 4 L entspricht. Die Kapsel im Cyclohaler wird angestoßen und die Triggerbox ausgelöst, wodurch das Pulver mit dem eingestellte Inspirationsvolumen durch den Impaktor geleitet wird. Der NGI wird geöffnet und die Prallplatten, der Cyclohaler und das Rachenstück mit 1% (V/V) DMSO gespült. Die Lösung jeder Prallplatte wird mit Filter in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Alle Proben werden mittels Micro BCA vermessen. Dafür wird der Assay abweichend vom Standardverfahren bei 60°C für 1,5 h inkubiert und der Assay im Anschluss mindestens eine halbe Stunde auf Raumtemperatur gekühlt.

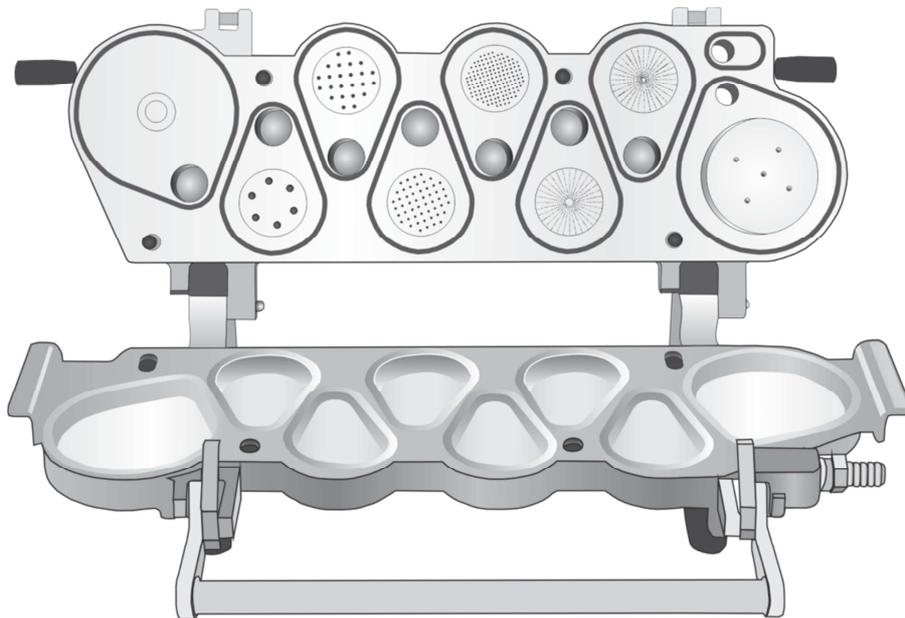


Abbildung 4.5: Geöffneter NGI (Gerät E gemäß Ph.Eur.)

Die Auswertung erfolgt anschließend über die Copley-Software CITDAS (UK, Version 3.10), die aus den im BCA Assay ermittelten Ovalbumingehalt des Pulvers die dazugehörigen Kenngrößen berechnet. Der massenbezogene mittlere aerodynamische Durchmesser (MMAD; D_{50}) stellt die durchschnittliche Partikelgröße im Pulver dar. Die aerodynamische Feinpartikelfraktion (FPF_{aero}) ist der Anteil an Partikeln der $< 5 \mu\text{m}$ ist.

Die geometrische Standardabweichung (GSD) ist ein dimensionsloser Wert, der sich nach Formel 5 berechnet und ein Maß für die Breite der Verteilung darstellt.

Formel 5: Berechnung der GSD

$$GSD = \sqrt{(D_{84,1}/D_{15,9})}$$

Dabei stellen $D_{84,1}$ und $D_{15,9}$ die aerodynamischen Partikelgrößen dar, die 84,1% bzw. 15,9% der Partikel aufweisen. Je kleiner die GSD, desto enger ist die Verteilung des Pulvers. Ein monodisperses System weist eine GSD $<1,22$ auf, während die GSD pharmazeutischer heterodisperser Aerosole typischerweise zwischen 1,5 und 2,5 liegt [23].

4.2.5 Endotoxinbestimmung

Endotoxine sind Zellwandbestandteile von gramnegativen Bakterien und wirken schon im Nanogrammbereich durch Induktion der Ausschüttung von IL-1 fiebererzeugend [71]. Dabei stellen die gut wasserlöslichen Lipopolysaccharide den wesentlichen Anteil des pyrogenen Komplexes dar. Im Vergleich zu gramnegativen Bakterien sind Endotoxine hitzestabil und lassen sich erst bei hoher Temperatur mit entsprechender Einwirkzeit entfernen, wodurch Wirk- und Hilfsstoffe Schaden nehmen können. Ein übliches Verfahren zur Entpyrogenisierung stellt die Ultrafiltration dar, bei der die Endotoxine quantitativ abgetrennt werden [68]. In dieser Arbeit ist die Endotoxinquantifizierung notwendig, um bei anschließenden immunologischen Testungen in Zellen zwischen einem Effekt durch eine mögliche Ausgangskontamination (bezüglich der Endotoxine) und der nanopartikulären Formulierung unterscheiden zu können.

Die Prüfung auf Bakterienendotoxine erfolgt nach Ph.Eur. 7.0 Methode A, die eine Grenzwertprüfung mittels Gelbildung darstellt. Der Nachweis wird mit Hilfe von Amöbozyten-Lysat aus dem Pfeilschwanzkrebs durchgeführt (*Limulus polyphemus* oder *Tachypleus tridentatus*), das in Anwesenheit von Endotoxinen ein Gel bildet [25].

Die zur Bestimmung benötigten hitzebeständigen Materialien werden im Trockenschrank bei 160°C für 2 h entpyrogenisiert. Alle weiteren Materialien werden endotoxinfrei bezogen (Sarstedt, Deutschland).

500 mg Ausgangssubstanz oder 20 mg Trockenformulierung werden in 5 ml sterilem LAL-Wasser (Acila®LRW, Acila AG, Deutschland) über 4 h bei 65°C extrahiert und

anschließend abgekühlt. Die Suspensionen werden bei 6000 U/min und 20°C für 15 min zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Analyse abpipettiert. Die so gewonnenen Probelösungen werden mit 0,2 M endotoxinfreiem TRIS-Puffer (pH 7,4) in einen pH-Bereich zwischen 6,0 und 8,0 gebracht und Verdünnungsreihen hergestellt. Diese werden mit dem LAL-Reagenz Limusate® (Empfindlichkeit 0,03 I.E./ml, Wako Chemicals, USA) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Proben auf Gelbildung untersucht. Aus der Verdünnung der letzten gelbildenden Probe, sowie der Empfindlichkeit des Reagenzes lässt sich der Endotoxingehalt halbquantitativ berechnen.

4.2.6 Zellkultur

Um den Einfluss der Partikel auf das Lungengewebe einordnen zu können wird ein Zellmodell benötigt. Dafür werden menschliche Lungenadenokarzinomzellen (Calu-3) von der American Type Culture Collection (ATCC, USA) bezogen und bis zu einer Passagenummer von 58 verwendet. Die Calu-3 Zellen sind eine adhärente Zelllinie, die in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 2 x 10⁶ Zellen pro Flasche in 12 ml Medium kultiviert wird. Das Medium wird im 3-4 Tageturnus gewechselt und die Zellen wöchentlich passagiert. Nährmedien und Pufferlösungen werden über Biochrom (Merck Millipore, Deutschland) anwendungsfertig bezogen. Diese werden nach Tabelle 4.9 modifiziert.

Tabelle 4.9: In der Zellkultur verwendete Nährmedien und Pufferlösungen

Lösung	Modifizierung (%=V/V)/ Besonderheit
Minimal Essential Media +Eagle(MEM)	10% fetales bovines Serum, 1% nicht essentielle Aminosäuren (100x) 1% Natrium-Pyruvat (100 mM)
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	+3% HEPES
Phosphatpuffer	Ohne Calcium- und Magnesiumionen

4.2.6.1 Zytotoxizitätstests

Das Prinzip der Zytotoxizitätsmessung beruht auf der Reduktion eines gelben Tetrazoliums Salzes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, MTT) in ein violettes, kristallines Formazan. Diese Reaktion wird über Dehydrogenasen in den Mitochondrien der Zellen katalysiert, und kann daher nur in stoffwechselaktiven Zellen

ablaufen. Die Menge des gebildeten Farbstoffes kann bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch gemessen werden und variiert je nach Zellviabilität [33].

Vor der Testung werden die zu untersuchenden Substanzen in definierter Konzentration in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) dispergiert. Im Fall der Nano-in-Mikroformulierung löst sich dabei die Mannitolmatrix und die enthaltenen Nanopartikel werden freigegeben. Die in einer 96-Well-Platte ausgesäten Zellen (3×10^4 pro Vertiefung in je 200 μ l Medium) werden dem Inkubator entnommen. Das Medium im Überstand wird verworfen und die jeweiligen Probelösungen in einer Vierfach-Bestimmung aufgetragen. Die Platte wird für vier Stunden mit den Probelösungen bei 37°C inkubiert, anschließend werden die Testlösungen durch 25 μ l MTT-Reagenz (0,5% (m/V) in HBSS) ersetzt und für weitere zwei Stunden in den Brutschrank gestellt. Daraufhin werden die Zellen mit Hilfe einer Lyse-Lösung aus 5% (m/V) SDS in einer 50:50 Mischung aus Dimethylformamid und Wasser (pH 4,7) aufgelöst und die Absorption bei 570 nm im Plattenreader vermessen. Die Negativkontrolle stellt HBSS-Puffer dar, dessen resultierende Zellviabilität auf 100% gesetzt wird, während die Positivkontrolle (5 mM SDS-Lösung) eine Viabilität von 0% widerspiegelt. Durch diese Zweipunkt-Kalibrierung kann anschließend die Zytotoxizität der getesteten Formulierungen berechnet werden. Eine Viabilität von über 80% wird dabei als nicht toxisch angenommen [84].

4.2.7 Immunologische Methoden

Die immunologischen Ergebnisse entstanden in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Bonn, dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig (murine Zelltests) und der Charité Berlin (humane Zelltests) im Rahmen des PeTra Projekts.

4.2.7.1 Murine in-vitro Experimente

Für die immunologischen Tests werden C57BL6 und OTI Mäuse verwendet, die unter spezifischen pathogenfreien Konditionen gehalten werden. Dabei stellt die Bezeichnung C57BL6 eine spezielle Zuchtlinie dar, die zu genetisch homogenen Versuchstieren führt. Sie ist als Standardmodell weit verbreitet und ihr Genom ist vollständig entschlüsselt [85]. Die OTI-Mäuse sind transgene Mäuse, die spezielle zytotoxische T-Zellen ausbilden und das SIINFEKL-Peptid des Ovalbumins auf dem MHC-I erkennen

[86]. Alle Tierversuche werden nach den Auflagen des deutschen Tierschutzgesetzes und den *Principles of Laboratory Animal Care* Richtlinien [87] durchgeführt.

4.2.7.1.1 Kultivierung von murinen Makrophagen und dendritischen Zellen

Die verwendeten Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs) werden aus dem Knochenmark der Hinterläufe isoliert und in RPMI Medium kultiviert. RPMI enthält einen Zusatz von 10% FBS (V/V), 100 I.E./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50 µM β-Mercaptoethanol und entweder 100 nm M-CSF oder GM-CSF zur Stimulierung der Zelldifferenzierung der Makrophagen bzw. DCs. Die Zellen werden im Inkubator (5% CO₂, 37°C) in einer Konzentration von 0,8 x 10⁶ Zellen/ml in einer Petrischale für vier Tage kultiviert und daraufhin auf zwei Petrischalen aufgeteilt. Für weitere sechs Tage wird mit frischem Medium und Wachstumsfaktoren kultiviert. Anschließend werden die adhärenenten Zellen für Aufnahme- und Aktivierungsexperimente genutzt.

4.2.7.1.2 Isolierung von CD 8+ T-Zellen (Zytotoxische Zellen)

Native CD8+ T-Zellen werden aus der Milz der OTI-Mäuse gewonnen und durch einen automatischen Zellseparator autoMACS (Miltenyi Biotec, Deutschland) isoliert. Anschließend werden sie gezählt und mit den Makrophagen bzw. DCs als Co-Kultur im in-vitro Test verwendet.

4.2.7.1.3 Fluorescent activated cell sorter (FACS)

Die Zellen werden vor der Analyse, in Anwesenheit eines Fc-Rezeptor-Blockers (CD16-CD32, monoklonal, 10 µg/ml), mit Antikörpern markiert. Zur Analyse werden ein FACSCanto II oder Fortessa (BD Biosciences, USA) mit der FlowJo Software (Treestar, USA) verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 (10 µg/ml; Sigma-Aldrich, USA) wird verwendet, um tote Zellpopulationen zu detektieren.

Tabelle 4.10: Verwendete Antikörper (eBioscience) mit konjugiertem Farbstoff

Antikörper	Farbstoffkonjugat
Anti-CD11c	Allophycocyanin Alexa Fluor 488
Anti-CD19	Phycoerythrin
Anti-CD69	Phycoerythrin
Anti-CD80	Phycoerythrin

4.2.7.1.4 In-vitro Experimente

Für die Aufnahmestudien der Nanopartikel werden 5×10^4 Makrophagen bzw. DCs in 96-Well-Platten ausgesät. 100 μ l der redispergierten Nanopartikel werden hinzugefügt und bis zu definierten Zeitpunkten inkubiert. Anschließend werden die Zellen abgelöst, zweimal mit PBS gewaschen, um gegebenenfalls anhaftende Partikel zu entfernen, und fürs FACS vorbereitet (Kapitel 4.2.7.1.3).

Für die in-vitro Evaluation der Ovalbumin-beladenen Partikel, werden den 96 Well-Platten zusätzlich 1×10^5 frisch isolierte CD8⁺ OTI-T-Zellen hinzugefügt und anschließend mit beladenen bzw. unbeladenen Partikeln der gleichen Konzentration für 24 h inkubiert. Danach wird der Überstand isoliert und bei -20°C bis zur Zytokinbestimmung mittels ELISA (IL-2, Th1/Th2, 10plex eBioscience(USA)) aufbewahrt. Die übrigen Zellen werden mittels FACS analysiert.

4.2.7.2 Murine in-vivo Experimente

4.2.7.2.1 Durchführung des in-vivo Experiments zur Untersuchung der humoralen Immunantwort

Für die in-vivo-Kontrollstudie zur Untersuchung der humoralen Immunantwort kommen C57BL6-Mäuse zum Einsatz. Diese haben zu Beginn der Studie ein Alter von 6-8 Wochen. Die Versuchstiere werden in zehn Gruppen geteilt (Tabelle 4.11). Dabei stellen die pulmonale Applikation von PBS und unbeladenen Chitosan-Nanopartikeln die Kontrollgruppen dar. Zum Vergleich mit dem partikulären Ovalbumin, wird das Antigen in seiner löslichen Form alleine, sowie zusammen mit den Adjuvanzen CTB, CpG und c-di-AMP pulmonal verabreicht. Diese Adjuvanzen haben sich zur Verstärkung mukosaler Immunantworten als besonders geeignet herausgestellt [88–90]. Die Chitosan-Partikel mit Ovalbumin werden subkutan und per Microsprayer pulmonal (Kapitel 4.2.7.2.3) verabreicht. Dabei stellt die subkutane Gabe eine Positivkontrolle mit 100% Bioverfügbarkeit dar, denn die Partikel kommen direkt in Kontakt mit den lokalen Immunzellen ohne Barrieren, wie den Mukus oder das Epithel, überwinden zu müssen. Bei der pulmonalen Applikation, die die präferierte mukosale Route darstellt, werden zudem drei Versuchsgruppen mit Adjuvanzen untersucht, die eine potentiell vorhandene Immunantwort verstärken können. Es finden jeweils vier Immunisierungen an den Tag 0, 14, 28 und 48 statt, die Proben werden an Tag 68 zur Analyse entnommen.

Zielparameter sind die Bildung von antigenspezifischen IgG-Antikörpern, die Ausschüttung von Zytokinen (Kapitel 4.2.7.2.4) und die Proliferation von Immunzellen (Kapitel 4.2.7.2.5).

Tabelle 4.11: Immunisierungsprotokoll der Tierstudie 1 zur pulmonalen Vakzinierung

Gruppe	Applikation	Anzahl Tiere	Dosis pro Tier (OVA/Adjuvans)
Kontrolle	pulmonal	5	-
Chitosan-Partikel + CTB	pulmonal	5	0 µg / 10 µg
Gelöstes OVA	pulmonal	5	30 µg /-
OVA + CTB	pulmonal	10	30 µg / 10 µg
OVA + c-di-AMP	pulmonal	5	30 µg / 10 µg
Chitosan-Partikel-OVA	subkutan	10	30 µg /-
Chitosan-Partikel-OVA	pulmonal	10	30 µg /-
Chitosan-Partikel-OVA + CTB	pulmonal	10	30 µg / 10 µg
Chitosan-Partikel-OVA + CpG	pulmonal	5	30 µg / 10 µg
Chitosan-Partikel-OVA + c-di-AMP	pulmonal	5	30 µg / 10 µg

4.2.7.2.2 Durchführung des in-vivo Experiments zur Untersuchung der zellulären Immunantwort

Zur Untersuchung der zellulären Immunantwort werden C57BL6 Mäuse für eine adoptive Transferstudie nach Tabelle 4.12 immunisiert. Dabei werden den Versuchstieren einen Tag vor der Immunisierung CFSE-markierte CD8⁺ Zellen aus OTI-Mäusen intravenös (i.v.) injiziert. An Tag 4 der Versuchsreihe werden den Mäusen die Zielorgane entnommen. Die Zielzellen aus Milz, zervikalen Lymphknoten und aus der Lungen werden mittels FACS analysiert. Durch die vorangegangene Fluoreszenzmarkierung der CD8⁺ Zellen mit CFSE, kann deren Proliferation über den Verlust an CFSE detektiert werden, wobei sich mit jedem Teilungsschritt sich auch deren Fluoreszenzsignal halbiert [91]. Sich nicht teilende Zellen können so von stark proliferierenden Zellen durch die Analyse über das FACS unterschieden werden.

Tabelle 4.12: Immunisierungsprotokoll der Tierstudie 2 zur pulmonalen Vakzinierung

Gruppe	Applikation	Anzahl Tiere	Dosis pro Tier (OVA/Adjuvans)
Negativkontrolle (C57BL6)	-	1	-
Chitosan-OVA-Partikel	pulmonal	5	30 µg
Chitosan-Partikel-OVA + c-di-AMP	pulmonal	3	30 µg / 7,5 µg
Chitosan-Partikel-OVA + c-di-AMP	pulmonal	3	3 µg / 7,5 µg
Chitosan-Partikel	pulmonal	3	0 µg / 0µg
Gelöstes OVA	pulmonal	5	30 µg /-
Chitosan-Partikel-OVA	subkutan	3	30µg /-
Gelöstes OVA + c-di-AMP	pulmonal	3	30 µg / 7,5 µg
Gelöstes OVA + c-di-AMP	pulmonal	3	3 µg / 7,5 µg

4.2.7.2.3 Applikation der Formulierung mittels MicroSprayer

Um die Formulierung in die Lunge der Mäuse zu applizieren, wird der MicroSprayer MSA 250-M Mouse (Penn-Century Inc., USA) verwendet (Abbildung 4.6). Das präklinische Device besteht aus einer gebogenen Stahlkanüle mit abgerundeter Spitze, die in die Trachea der Maus eingeführt wird. Der Spritzenaufsatz wird zusammen mit einer Hochdruckspritze (FMJ-250 High Pressure Syringe, Penn-Century) verwendet und dient dazu, die zu applizierende Substanz zu zerstäuben. Das resultierende Aerosol hat eine mittlere Tropfengröße von 16-22 µm. Es können Volumen von bis zu 250 µl Flüssigkeit appliziert werden [92].

Um die Formulierung mit dem MicroSprayer verwenden zu können, muss sie zuvor in eine flüssige Darreichungsform überführt werden. Dazu werden 6,3 mg Pulver in 75 µl Phosphatpuffer pH 7,4 dispergiert (Kapitel 5.6.5.2.), dies entspricht einer Menge von 298 µg Nanopartikeln und 30 µg Ovalbumin.

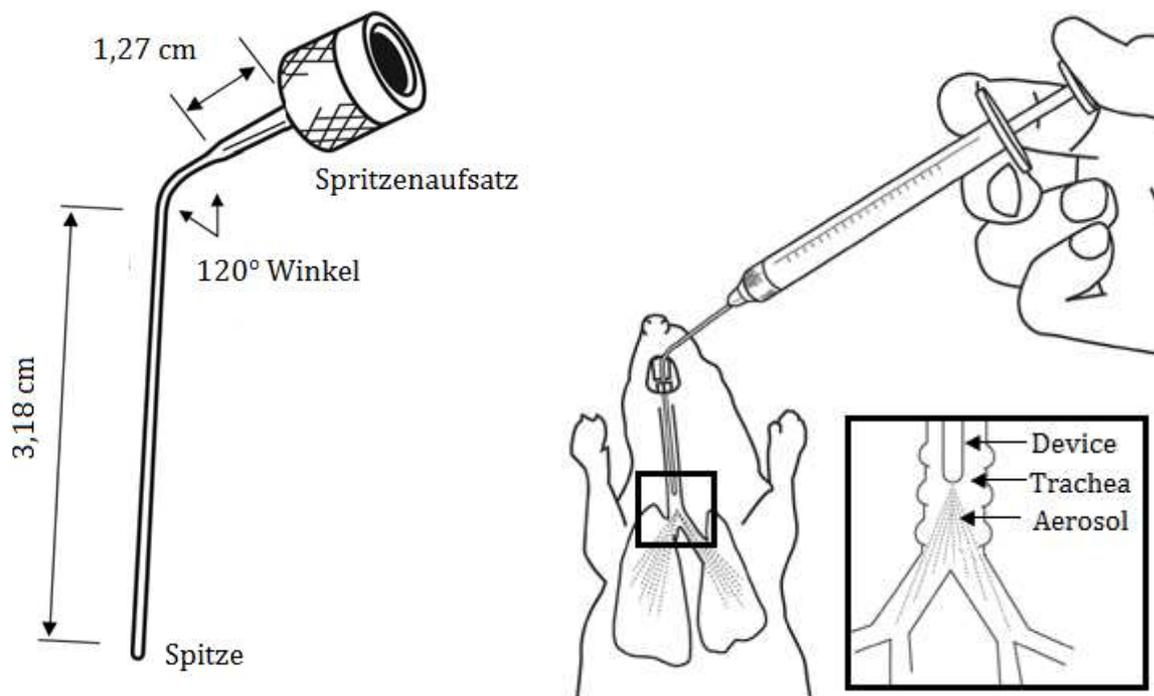


Abbildung 4.6: links: MicroSprayer-Aufsatz zum Erzeugen eines Aerosols für die präklinische Testung; rechts: Anwendung des Micro Sprayers (Quelle: Penn-Century Inc. [92], modifiziert)

4.2.7.2.4 ELISPOT-Assay

Durch den Enzyme-linked-Immunospot-Assay (ELISPOT-Assay) können antigenspezifische T-Zellen anhand ihrer Sekretion von IFN- γ , IL-2 und IL-4 detektiert werden.

Dazu werden 96-Well-Platten ELISPOT Kits entsprechend den Anweisungen des Herstellers (BD Bioscience, Deutschland) verwendet. Die aus der Milz extrahierte Einzelzellsuspension mit CD4+ und CD8+ T-Zellen wird in einer Konzentration von 1×10^6 oder 0.5×10^6 Zellen pro Vertiefung in dreifach-Bestimmung auf der 96-Well-Platte ausgesät. Anschließend werden sie mit Ovalbumin bzw. dem CD8-Peptid (SIINFEKL) erneut stimuliert. Bindet das Antigenpeptid an den entsprechenden T-Zell-Rezeptor, so sezernieren die T-Zellen spezifische Zytokine. Nach der Inkubationszeit von 24 h (INF- γ) bzw. 48 h (IL-2, IL-4) werden die Zellen durch Waschen der Platte mit PBS entfernt und der biotinylierte Detektionsantikörper hinzugegeben. Nach erneutem Waschen wird Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase hinzugefügt, welche spezifisch an das Biotin bindet. Nach Zugabe des kolorimetrisch detektierbaren Substrats AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) kann dieses durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase

gespalten und so als farbige Punkte im ELISPOT Reader detektiert werden. Die Auswertung erfolgt mit der C.T.L.-Immunospot-Bildanalysesoftware v 3.2.

4.2.7.2.5 Proliferations-Assay: DNA-Markierung mit [³H]-Thymidin

Eine klassische Methode zum Quantifizieren neusynthetisierter DNA ist der Einbau von radioaktiv markierten [³H]-Thymidin. Dieses stellt einen schwachen β -Strahler dar, dessen β -Partikel in der Luft etwa 0,5 cm weit strahlen können [33]. Dazu wird die Milz unter aseptischen Bedingungen isoliert und mechanisch zerkleinert, bis eine Zellsuspension entsteht. Die Erythrozyten werden durch Zugabe eines Lysepuffers (0,15 N NH₄Cl, 1,0 N KHCO₃, 0,1 mM EDTA; pH 7,2) aufgelöst. Die Zellen werden anschließend zweimal gewaschen und mit RPMI-Medium (mit 10% (V/V) fetalem Rinderserum, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin) auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wird in einem Volumen von 100 μ l pro Well auf 96-Well-Platten ausgesät (4-fach Bestimmung). Die Proben werden über 4 Tage unter Zusatz von verschiedenen Konzentrationen OVA kultiviert. 18 h vor Ende der Kultivierung werden 1 μ Ci [³H]-Thymidin (Amersham International, Deutschland) in jede Vertiefung gegeben und mitinkubiert. Am Ende der Kultivierung werden die Zellen mit einem Zellerntegerät (Inotech, Schweiz) gewonnen und die Menge des eingebauten [³H]-Thymidins in die DNA der proliferierenden Zellen über einen Szintillationszähler (Wallac 1450, Micro-Trilux, USA) bestimmt. Die Ergebnisse werden als das Verhältnis zwischen dem Durchschnittswert der Zählungen pro Minute aus stimulierter im Vergleich zur nicht stimulierten Probe (Stimulationsindizes, SI) ausgedrückt.

4.2.7.2.6 CFSE-Markierung

Um Informationen über die Proliferation einer bestimmten Zellpopulation zu erhalten, wird eine CFSE-Färbung der Zielzellen vorgenommen. Dabei wird CFSE, die acetylierte, reaktive Form des Farbstoffes mit den zu untersuchenden Zellen inkubiert. Der Farbstoff gelangt aufgrund seiner Membranpermeabilität schnell in die Zellen, in denen er zu dem fluoreszierenden CFSE deacetyliert wird. Durch die Deacetylierung ist der Farbstoff weniger membrangängig, durch eine weitere Reaktion wird er außerdem an intrazelluläre Proteine gebunden, wodurch die Zellen dauerhaft fluoreszenzmarkiert vorliegen [93]. Mit jeder Zellteilung kommt es zu einer Halbierung des Fluoreszenz-

signals, daher kann über die Abnahme der Fluoreszenzintensität erfasst werden, ob es durch die Stimulation zu einer Proliferation der Zielzellen kommt [94].

Dafür werden die Zellen, deren Proliferation untersucht werden soll, in einer Konzentration von $0,5 - 3 \times 10^7$ Zellen/ml in Phosphatpuffer suspendiert und das gleiche Volumen $2 \mu\text{M}$ CFDA-SE in Phosphatpuffer hinzugefügt. Die Zellen werden lichtgeschützt für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das gleiche Volumen FCS hinzugegeben und die Zellen für weitere 5 Minuten inkubiert. Die markierten Zellen werden durch Zentrifugation gewonnen und mit Medium gewaschen und suspendiert.

4.2.7.3 Humane in-vitro Experimente

4.2.7.3.1 Generierung humaner DCs und Durchführung von in-vitro Experimenten

Die DCs werden in-vitro aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) gesunder Spender gewonnen. Diese werden durch Isolierung aus Leukozytendepletionsfiltern oder Zentrifugation aus der Interphase zwischen roten Blutkörperchen und Plasma gewonnen. Die Inkubation erfolgt in 75 cm^2 Zellkulturflaschen für zwei Stunden; in dieser Zeit adhären die Monozyten auf der Plastikoberfläche und die restlichen Zellen können durch Spülen mit PBS entfernt werden. Die adhären Zellen werden unter Zusatz von RPMI 1640 GlutaMax Medium mit einem Zusatz von entweder 10% (V/V) FBS (Invitrogen, USA) oder 1% (V/V) Humanserum (Pan Biotech, Deutschland) bei 37°C und 8% CO_2 weiter kultiviert. Dabei werden an Tag 0 und 4 jeweils 50 ng/ml rekombinanter GM-CSF (Genzyme, USA) und IL-4 (PromoCell GmbH, Deutschland) hinzugesetzt. An Tag 5 werden der Zellkultur die Nanopartikel hinzugefügt und für Aufnahmestudien und Zellviabilität 24 h, für Zellstimulierung 48 h weiter inkubiert.

4.2.7.3.2 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM)

Um die Nanopartikel in den Zellen sichtbar zu machen wird die TEM angewendet. Dazu werden die Zellen zunächst mit 2,5% Glutaraldehyd in Na-Cacodylat Puffer pH 7,5 fixiert und bei 4°C mit 100 mM Na-Cacodylat und 2% Osmiumtetroxid versetzt. Die Proben werden anschließend drei Mal mit Puffer gewaschen, mit aufsteigenden Alkoholreihen dehydriert und in Glycidylether Harz eingebettet. Schnitte mit einer Dicke von 70 nm

werden mit dem Leica Ultracut S (Leica, Deutschland) hergestellt und dem mit Zeiss EM906 TEM (Zeiss, Deutschland) visualisiert.

4.2.7.3.3 Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM)

Um die Aufnahmekinetik der Nanopartikel in die Zellkompartimente zu beobachten, werden DCs mit fluoreszenzmarkierten Partikel zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, für 20 Minuten in 4% Paraformaldehyd (V/V) in PBS fixiert und anschließend mit Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Um unspezifische Bindungen zu blocken, werden die Zellen vor der Zugabe des monoklonalen IgG1-Antikörpers (murin gegen humanes *Early Endosome Antigen 1* (Santa Cruz Biotechnology, USA)) für 45 min in 2% BSA (m/V) PBS inkubiert. Der Antikörper wird mit den Zellen für eine Stunde inkubiert, bevor ein zweiter Antikörper, ein mit Alexa Fluor 647 gekoppelter lepiner Antikörper gegen den murinen Antikörper (Invitrogen, USA) in das System eingebracht wird.

Um das Routing der Partikel in die frühen und späten Endosomen zu untersuchen, werden nicht fixierte Zellen mit 50-100 nM LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen, USA) für 30 min inkubiert und daraufhin wieder mit 4% Paraformaldehyd für 20 min fixiert. Die Färbung der Zellmembran erfolgt mit Alexa-Fluor 647 gekoppelten anti-HLA-A,B,C (BioLegend, USA) für weiter 25 min bei 4°C. Zusätzlich wird eine Gegenfärbung zur Visualisierung des Zellkerns mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) durchgeführt. Die interzelluläre Lokalisierung der Partikel wird mit den LSCM (Leica TCS SP2) analysiert.

4.2.7.3.4 T-Lymphozyten-Assays

Die humanen T-Lymphozyten (CD3 positive Zellen) werden aus den PBMCs isoliert. Dazu werden alle Zellen, die keine T-Zellen sind, aus der Probe entfernt. Monozyten und B-Zellen werden durch eine Kopplung an FITC-markierte Antikörper gegen CD14 und CD19 (BD Bioscience, USA) und anschließendem Einsatz von magnetischen Beads mit Antikörpern gegen das FITC quantitativ entfernt. Natürliche Killerzellen werden analog dazu mit PE-markiertem Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD56 und magnetischen Beads mit anti-PE Antikörpern (beide Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland) entfernt. Die übriggebliebenen CD3 positiven Zellen stellen die T-Lymphozyten dar und werden mit 10 mM CFSE (Invitrogen, USA) für 10 min bei 37°C und 5 min bei 4°C markiert, dreimal mit PBS gewaschen und 2×10^5 markierte Zellen zusammen mit 2×10^4 autologe DCs in 96 Well-Platten für 7 Tage co-kultiviert. Dabei

werden autologen DCs verwendet, da es sonst zu einer unspezifischen Aktivierung durch fremde Oberflächenantigene kommen kann. Die anknüpfende Analyse erfolgt mit dem FACS.

4.2.7.3.5 Analyse FACS und ELISA

Für die Analyse mit dem FACSCalibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson, USA) können die Zellen durch Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern (BD Bioscience, USA) phänotypisiert werden. Die Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen wird anschließend durch Analyse im FACS bestimmt.

Die Sekretion von IL-12p70 wird mit dem ELISA bestimmt. Dafür wird der Zellüberstand der DCs nach 48 h Inkubation, der der Co-Kultur aus DCs und T-Zellen nach 7 Tagen entnommen und bei -20°C bis zur Analyse mit ELISA Max Standard Kit (BioLegend, USA) gelagert.

4.2.7.3.6 Zellviabilitäts-Assay

Inkubierten DCs werden zur Überprüfung ihrer Viabilität mit einem kommerziell erhältlichen LIVE/DEAD Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) gefärbt. Dieses enthält Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM), einen Fluoreszenzfarbstoff der in lebendigen Zellen durch Esterasen zu Calcein verstoffwechselt werden kann. Ethidiumbromid-Homodimer-1, das ebenfalls enthalten ist, kann durch zerstörte Zellwände in das Innere von Zellen diffundieren und dort bei Anlagerung an Nukleinsäuren sein Absorptionsmaximum ändert. Es wird von intakten Zellen nicht aufgenommen und färbt so selektiv nekrotische Zellen an [95, 96]. Die Auswertung erfolgt durch eine Analyse mit dem FACS.

5 PRAKTISCHER TEIL

5.1 Formulierungsentwicklung

Ein Hauptteil der in der vorliegenden Arbeit verwendeten präparativen und analytischen Methoden musste zunächst entwickelt werden. Im Folgenden wird auf die Entwicklung der Herstellmethode für die Nanosuspension und den anschließenden Trocknungsschritt zur Überführung in ein inhalierbares Produkt eingegangen. Die Herstellung wird zudem mit verschiedenen Chitosanqualitäten durchgeführt und der Prozess auf Skalierbarkeit untersucht.

5.1.1 Nanopartikelherstellung

Ausgangspunkt der Partikelherstellung stellt Chitosan dar, welches zur Partikelbildung verwendet werden soll. Die meisten Arbeitsgruppen nutzen hier Natriumtriphosphat zur ionischen Gelierung; dabei wird das Chitosan durch das gegensinnig geladene Ion quervernetzt und fällt aus [36, 38, 47, 97]. Basierend auf diesem Prinzip wird in der vorliegenden Arbeit eine Carboxymethylcellulose-Lösung (CMC, Tylose C30) zur angesäuerten, wässrigen Chitosanlösung gegeben. Die Nanopartikelherstellung ist in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt. Die im Säuren vorhandenen positiv geladenen Aminogruppen des Chitosans reagieren mit den negativ geladenen Carboxylgruppen der CMC. Die Reaktion ist hier stark vereinfacht dargestellt, denn je Polymer gibt es, dem Dissoziationsgrad entsprechend, viele dieser funktionellen Gruppen. Das entstehende Partikel ist dementsprechend aus zahlreichen miteinander vernetzten Polymerketten aufgebaut.



Abbildung 5.1: Schema der Partikelbildung

Um die Ergebnisse beurteilen zu können, werden der Zielbereich für die Partikelgröße und der PDI definiert. Die resultierende Partikelgröße soll hier im Bereich von 200-400 nm liegen, um den optimalen Aufnahmebereich der Zellen abzudecken. Die

Verteilung soll dabei monodispers sein, was durch einen PDI kleiner als 0,2 sichergestellt wird.

5.1.1.1 Einflussparameter auf den Herstellprozess

Die Versuche zur Evaluierung der Herstellparameter werden mit Chitopur XP/4,91, einem Chitosan mit einer Viskosität von 12,5 mPas und einem Deacetylierungsgrad von 93,5%, im Labormaßstab (Ansatzgrößen von 30 ml) durchgeführt.

5.1.1.1.1 Reaktionsverhältnis

Für diesen Versuch werden die beiden Reaktanten in einer Konzentration von 0,1% (m/V) separat gelöst und unter Rühren eines Magnetrührers zusammengefügt, wobei die Volumen so variiert werden, dass sich ein Reaktionsverhältnis von 2:1, 1:1 und 1:2 von Chitosan zur CMC ergibt. Die Partikelgröße in der Suspension wird über die PCS gemessen (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Einfluss des Chitosan-CMC-Massenverhältnisses auf die durchschnittliche Partikelgröße und Verteilung (n=3)

Verhältnis	1:2	1:1	2:1
Ø Größe	206 ± 1 nm	270 ± 2 nm	273 ± 1 nm
PDI	0,153 ± 0,005	0,160 ± 0,010	0,163 ± 0,022

Das Verhältnis der beiden Reaktionspartner kann nur begrenzt variiert werden. Bei einem CMC-Chitosan-Verhältnis von 2:1 kommt es zu einer irreversiblen Aggregation innerhalb der Lösung. Die Partikel, die nicht aus der Lösung ausfallen sind zwar klein und eng verteilt, jedoch wird durch die Aggregation der größte Teil des Feststoffs aus der Suspension entzogen. Ein Überschuss an Chitosan ist zwar möglich, führt aber zu einer verminderten Partikelbildung, was sich in einer ausbleibenden Turbidität der Lösung äußert. Grund dafür ist, dass zu wenig negative Carboxylgruppen zur Partikelbildung zur Verfügung stehen.

Dies ist über die Molekülgröße der beiden Polymere zu erklären. Das Chitosan hat nach Herstellerangaben ein Molekulargewicht von ungefähr 20 kDa, die Carboxymethylcellulose (CMC) von etwa 90 kDa und ist dementsprechend größer. Bei der Zugabe der CMC zur Chitosanlösung lagern sich, da mehr Carboxylgruppen vorhanden sind, als

durch ein einzelnes Chitosanmolekül abgesättigt werden können, demnach mehrere Chitosanmoleküle an ein CMC-Molekül an (Abbildung 5.2). Es entstehen so zunächst kleine Partikel die wenig untereinander vernetzt sind. Diese Molekül ASSOZIATE sind so klein, dass die Lösung noch keine Opaleszenz zeigt. Erst durch weitere Zugabe von CMC-Lösung können diese untereinander vernetzt werden (Abbildung 5.3). Es kommt dabei zu einem schnellen Wachstum der Partikelgröße. Übersteigt die CMC Konzentration jedoch das kritischen Reaktionsverhältnis von 1,2:1 so kommt es durch die weitere Vernetzung der Partikel zu großen Partikeln, die sedimentieren.

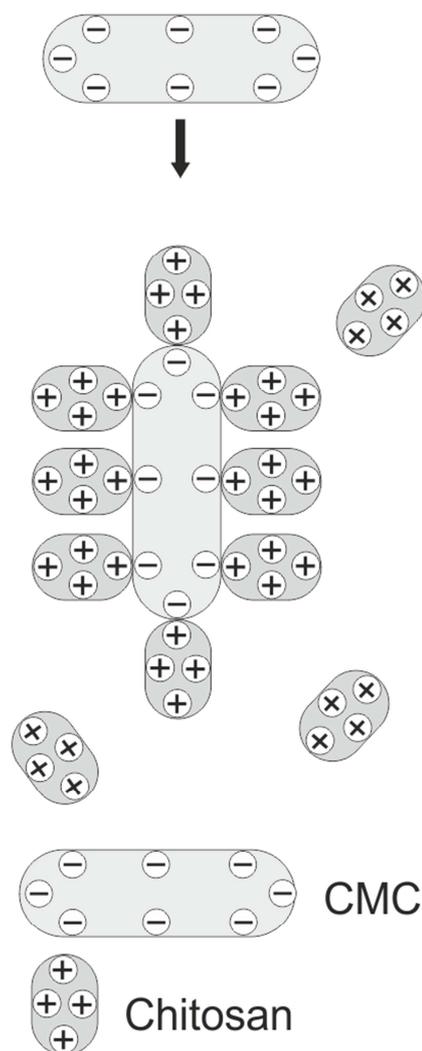


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der primären Anlagerungsreaktion nach Zugabe von Carboxymethylcellulose in eine Chitosanlösung (Pfeil symbolisiert Zugabevorgang)

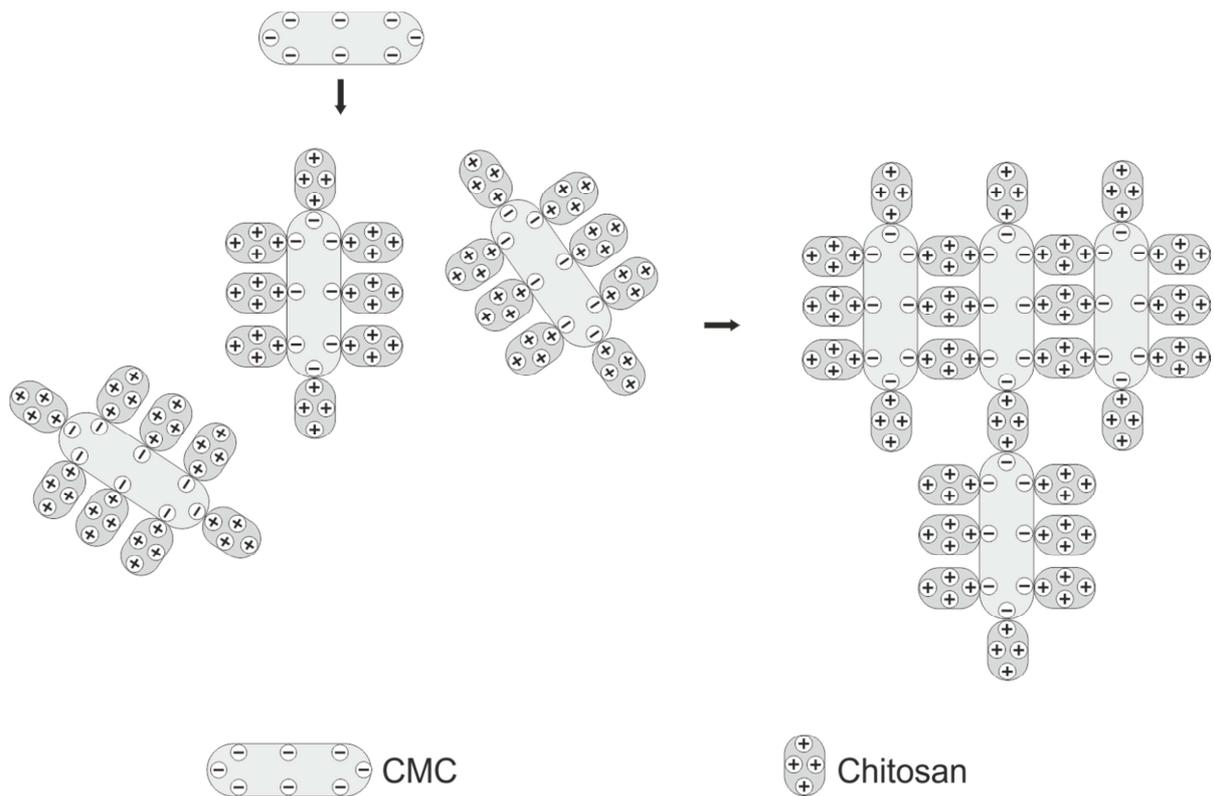


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung des Partikelwachstums bei gesteigerter Carboxymethylcellulose-Zugabe zur abgesättigten Chitosan-CMC-Lösung (Pfeile symbolisieren Zugabevorgänge)

Optimal ist ein Massenverhältnis von 1:1, da hier eine homogene eng-verteilte Nanosuspension ohne Agglomerate entsteht. Zu erkennen ist dies am resultierenden PDI, der unterhalb der gesetzten Grenze von 0,2 liegt.

5.1.1.1.2 Feststoffanteil

Für die Findung des optimalen Feststoffanteils werden Polymerlösungen in den Konzentrationen 0,05%, 0,1%, 0,2% und 0,3% (m/V) hergestellt. Diese werden unter Rühren zusammen gegeben und vermessen (Tabelle 5.2).

Die Partikelgröße kann bis zu einer Größe im oberen Nanometerbereich durch Verändern der Konzentration der Reaktionspartner gesteuert werden. Durch gleichzeitiges Erhöhen des Feststoffanteils beider Komponenten kommt es durch Viskositätszunahme zu größeren Nanopartikeln, welche jedoch auch eine breitere Partikelgrößenverteilung aufweisen. Je höher die Konzentrationen gewählt werden, desto stärker kommt es neben der Partikelbildung zu einer zusätzlichen Agglomeration

Tabelle 5.2: Einfluss der Feststoffkonzentration auf die durchschnittliche Partikelgröße und Verteilung ($n=3$)

Konzentration	0,05%	0,1%	0,2%	0,3%
Ø Größe	182 ± 2 nm	270 ± 2 nm	428 ± 4 nm	548 ± 20 nm
PDI	$0,162 \pm 0,018$	$0,160 \pm 0,010$	$0,250 \pm 0,018$	$0,441 \pm 0,052$

Durch die Viskositätszunahme ist die Diffusion der Polymere behindert. Die erhöhte Konzentration führt zudem dazu, dass mehr reaktive Gruppen im selben Volumen vorhanden sind. Diese zwei Umstände verursachen, dass die Polymere sich untereinander mehr vernetzen können, wodurch die Partikelgröße ansteigt. Die primäre Reaktion besteht aus zwei Teilschritten (Abbildung 5.4).

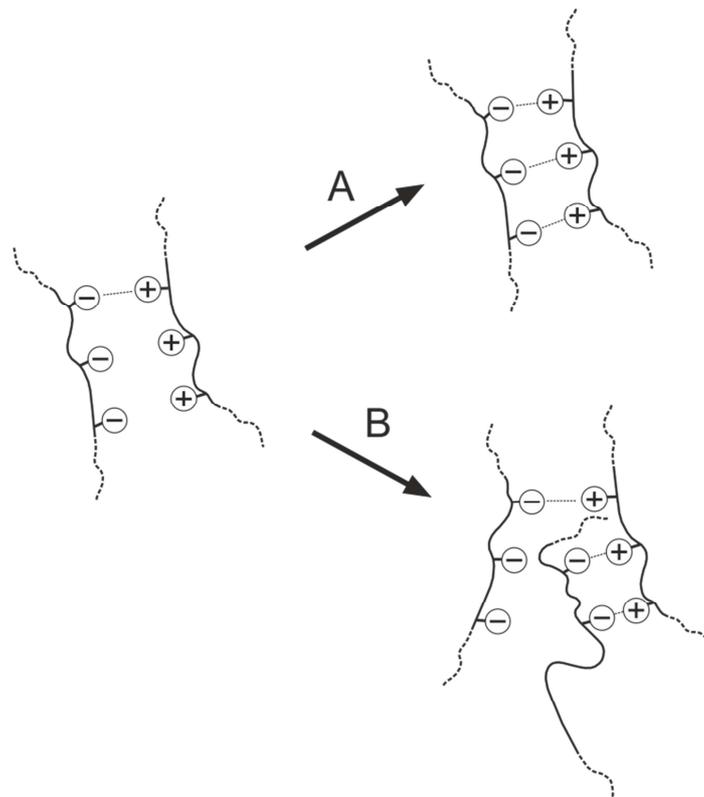


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der Partikelbildung. Polymere als Linie, funktionelle Gruppen als Ladung dargestellt. Positive Ladung entspricht Aminogruppe (Chitosan), negative Ladung entspricht Carboxylgruppe (CMC). Reaktion bei niedriger Polymerkonzentration (A) und hoher Polymerkonzentration (B).

Im ersten Schritt nähern sich die Polymere räumlich an, es kommt vereinzelt zur Komplexierung von reaktiven Gruppen. Ist die Feststoffkonzentration der Lösung hoch, so reagieren freie reaktive Gruppen mit denen von weiteren umliegenden gelösten

Polymeren (B). In diesem Fall wächst der Partikel. Ist die Konzentration der Polymere hingegen niedrig, ist die räumliche Distanz der einzelnen Moleküle größer und es kommt zu einer intrapartikulären Komplexierung der Gruppen innerhalb der schon verbundenen Polymerketten (A). Hier kommt es zu einer Stagnation des Partikelwachstums. Diese beiden Reaktionen laufen zeitgleich ab. Die Herstellung mit 0,1% Feststoffanteil stellt das Optimum dar, da hier engverteilte Partikel im Bereich von 270 nm entstehen.

5.1.1.1.3 Zugabereihenfolge

Der Partikelbildungsprozess und die Partikelgröße werden durch die Auswahl der vorgelegten Lösung beeinflusst, in welche die andere Lösung zur Partikelbildung gegeben wird. Bei der Zugabe von Chitosan in die CMC-Lösung entstehen deutlich größere, breiter verteilte Partikel als bei umgekehrter Vorgehensweise (Tabelle 5.3). Dies kann über die Molekülgröße der beiden Polymere erklärt werden. Das Chitosan hat bei einer Viskosität von 12,5 Pas nach Herstellerangaben ein Molekulargewicht von ungefähr 20 kDa, die Tylose C30 etwa 90 kDa und ist dementsprechend größer. Titriert man das Chitosan zur CMC, so reagieren die positiven Gruppen des Chitosans sofort mit umliegenden Carboxylgruppen der CMC; es wirkt als Quervernetzer für die CMC-Moleküle. Ändert man Titrand und Titrator und wird die CMC zu dem Chitosan gegeben, so werden die negativen Carboxylgruppen durch Chitosanmoleküle abgesättigt, es entsteht daher kein vergleichbar ausgeprägtes Polymernetzwerk (Abbildung 5.5). Daher wird für die Herstellung festgelegt, dass die CMC-Lösung zu der Chitosanlösung gegeben wird, denn hier entstehen kleinere und enger verteilte Partikel.

Tabelle 5.3: Einfluss der Herstellmethode auf die durchschnittliche Partikelgröße und Verteilung (n=3)

Vorgehen	CMC in Chitosan	Chitosan in CMC
Ø Größe	270 ± 2 nm	452 ± 6 nm
PDI	0,160 ± 0,010	0,409 ± 0,042

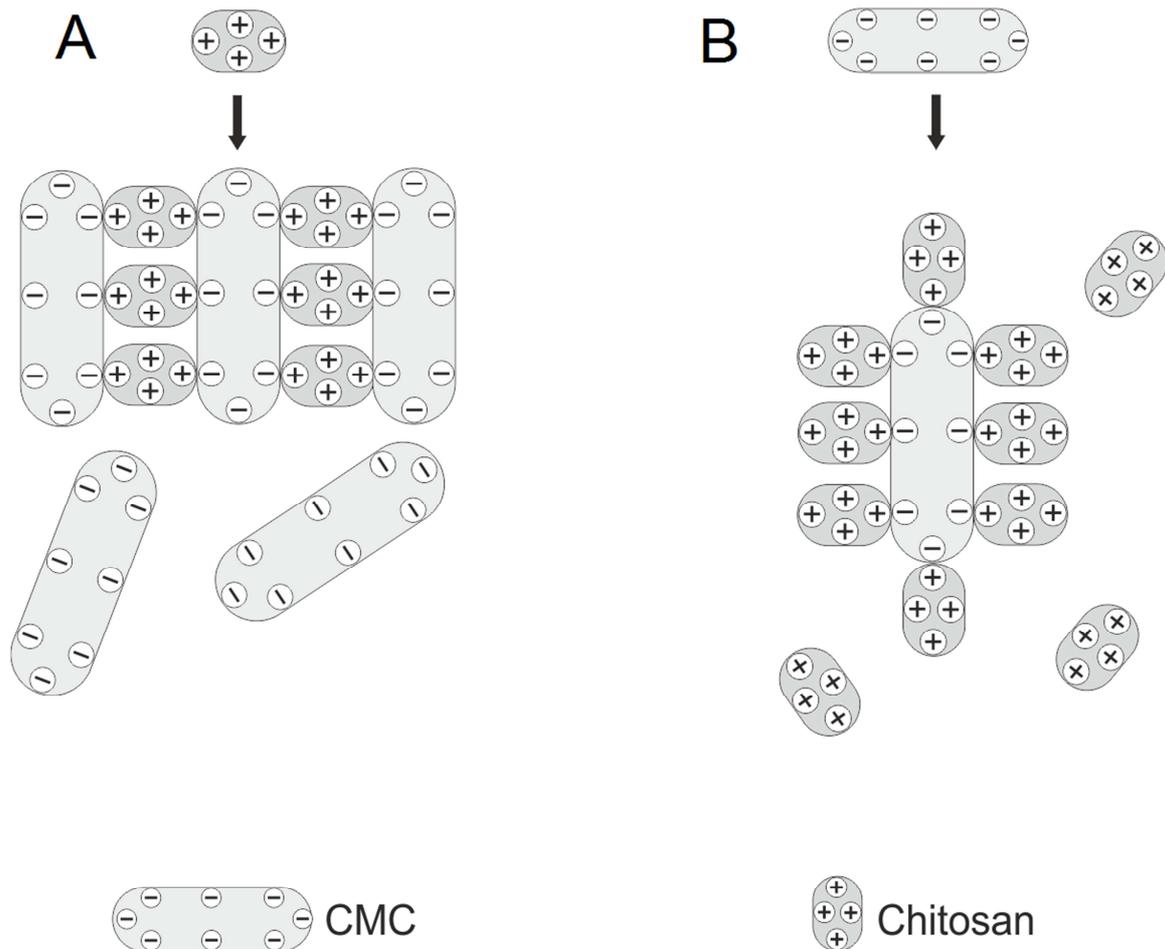


Abbildung 5.5: Schematische Darstellung der Partikelbildung in Abhängigkeit der Zugabereihenfolge. A: Zugabe von Chitosanlösung in CMC-Lösung; B: Zugabe von CMC-Lösung in Chitosanlösung

5.1.1.1.4 Zugabegeschwindigkeit

Die Zugabe der CMC-Lösung kann entweder sehr langsam oder schlagartig erfolgen. Zur Untersuchung des Einflusses wird die Reaktionslösung innerhalb weniger Sekunden (schnell), sowie über mehrere Minuten tropfenweise per Pasteurpipette (langsam) zur Chitosanlösung gegeben. Beide Extreme führen dabei zu vergleichbaren Ergebnissen (Tabelle 5.4). Das Ergebnis lässt vermuten, dass der Prozess der Partikelbildung sehr schnell abläuft und die Zugabegeschwindigkeit daher als Parameter vernachlässigt werden kann.

Tabelle 5.4: Einfluss der Zugabegeschwindigkeit der CMC-Lösung zur Chitosanlösung auf die durchschnittliche Partikelgröße und Verteilungsbreite (n=3)

Zugabegeschwindigkeit	schnell	langsam
ø Größe	254 ± 1nm	258 ± 5 nm
PDI	0,153 ± 0,024	0,151± 0,017

5.1.1.1.5 Temperatur

Die Reaktionstemperatur hat nur einen untergeordneten Einfluss auf die Partikelgröße (Tabelle 5.5). Tendenziell entstehen mit steigender Temperatur kleinere Partikel. Dies lässt sich auf die gesteigerte Molekularbewegung bei Wärme zurückführen, die sowohl zu einer schnelleren Reaktion, also auch zu einer verringerten Viskosität der Lösung führen. Eine Herstellung im Kalten (4°C) führt nicht zur Ausbildung von Nanopartikeln. Da in späteren Schritten mit hitzeempfindlichen Proteinen gearbeitet wird und der Effekt auf die Partikelgröße gering ist, wird die Herstellung bei Raumtemperatur als Methode der Wahl durchgeführt.

Tabelle 5.5: Einfluss der Temperatur auf die durchschnittliche Partikelgröße und Verteilung (n=3)

Temperatur	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C	4°C
ø Größe	254 nm	227 nm	222 nm	217 nm	209 nm	2180 nm
PDI	0,176	0,186	0,196	0,185	0,168	1,000

5.1.1.1.6 Homogenisierung

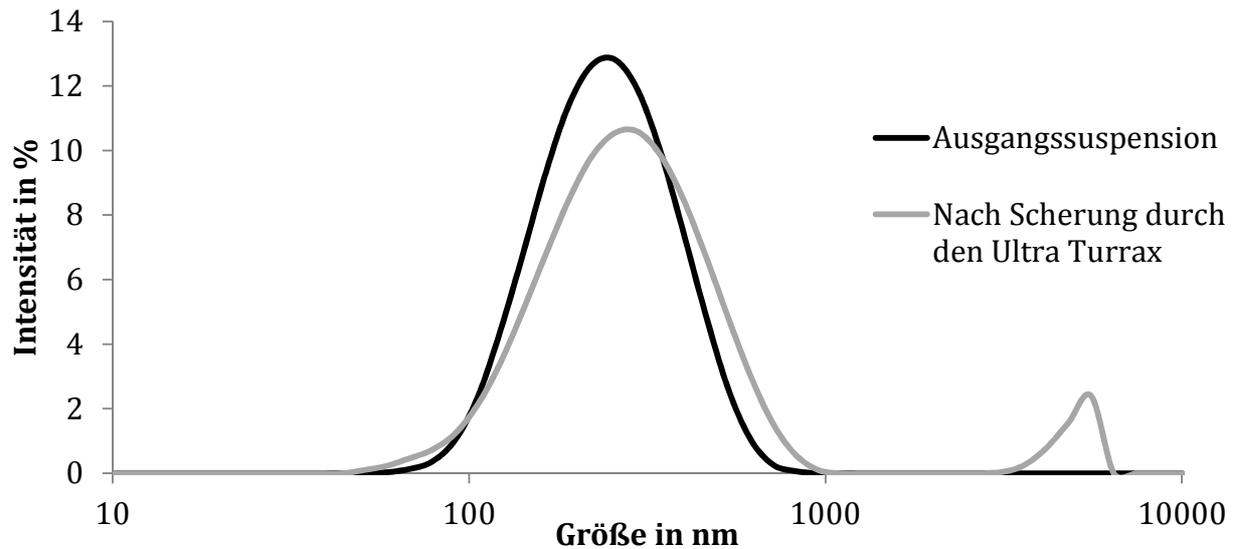
Um eine gleichmäßige Partikelentwicklung im Ansatzgefäß zu erhalten, muss eine ausreichende Vermischung während der Zugabe sichergestellt werden. Diese kann entweder mit einem Magnetkern und einem Magnetrührer ablaufen oder durch deutlich stärkere Verwirbelung über einen Rotor-Stator-Homogenisator (Ultra-Turrax-T25, IKA Labortechnik, Deutschland). Es ist zu erwarten, dass es durch die stärkere Vermischung der beiden Reaktanten zu einer schnelleren Absättigung der Reaktion kommt, da die reaktiven Gruppen räumlich stärker aufeinander treffen. Die resultierende Partikelgröße sollte mit der intensiveren Dispergierung demnach abnehmen. Im ersten Versuch wird die Homogenisierungsintensität untersucht, die zwischen 9500 U/min,

13500 U/min und 20500 U/min für jeweils 5 min variiert wird. Im zweiten Versuch wird die CMC-Lösung unter Rühren mit einem Magnetprüher bei 800 U/min hinzugefügt. Die Ergebnisse aus Tabelle 5.6 zeigen, dass es zwischen den gewählten Intensitäten mit dem Ultra-Turrax keinen Unterschied in der Partikelgröße oder deren Verteilung gibt. Tendenziell sind die Partikel, die bei geringer Intensität entstehen, enger verteilt. In einem zweiten Versuch werden die beiden Lösungen über das Rühren eines Magnetkerns auf einem Magnetprüher zusammen gegeben.

Tabelle 5.6 Einfluss der Homogenisierung auf durchschnittliche Partikelgröße und Verteilung (n=3)

Dispergierung	Ultra-Turrax			Magnetprüher
Intensität	9500 U/min	13500 U/min	20500 U/min	800 U/min
Ø Größe	279 ± 2 nm	278 ± 3 nm	288 ± 7 nm	253 ± 1 nm
PDI	0,160 ± 0,010	0,180 ± 0,018	0,175 ± 0,008	0,158 ± 0,024

Die resultierenden Partikel durch Herstellung mit dem Magnetprüher haben eine Größe von 253 nm und einen PDI von 0,158. Sie liegen somit im selben Größenbereich, wie die Partikel, die durch den Ultra-Turrax hergestellt werden. Dieser Versuch unterstützt das Modell der Partikelbildung, bei dem die CMC-Moleküle zunächst durch das Chitosan abgesättigt werden und anschließend durch weitere Zugabe der CMC wachsen. Da diese Reaktionen schnell ablaufen, können durch die Verwirbelung des Ultra-Turrax die primären Partikelassoziate aufgebrochen werden und so die Quervernetzung unter den einzelnen Partikeln gefördert werden. Dadurch steigen die Größe und der PDI im Vergleich zum niedrigen Energieeintrag an. Dieses Modell lässt sich durch einen weiteren Versuch bestätigen: Eine, über den Magnetprüher hergestellte, Nanosuspension wird für 5 Minuten bei 20500 U/min mit einem Ultra-Turrax geschert. Die Partikelgrößen in der Ausgangssuspension und der entstehenden Suspension werden im Zetasizer vermessen (Abbildung 5.6). Die Ausgangssuspension hat eine mittlere Partikelgröße von 207 nm und einen PDI von 0,207. Makroskopisch ist nach Scherung bereits eine deutliche Trübung der Suspension zu erkennen. Die Partikelgröße steigt auf 264 nm an, der PDI auf 0,359. Anhand der Messdaten kann man erkennen, dass es vor allem zu einer Bildung größerer Agglomerate im Mikrometerbereich kommt.



	Größe	PDI
Ausgangspartikel	207 ± 1 nm	0,207 ± 0,002
Nach Scherung	264 ± 1 nm	0,359 ± 0,013

Abbildung 5.6: Entwicklung der Partikelgröße und Partikelverteilung durch Scherung eines Ultra-Turrax ($n=3$)

Diese Versuche zeigen, dass mit wenig Energie eine engere Größenverteilung erreicht werden kann als über eine intensive Dispergierung. Da zudem der präparative Aufwand, sowie die Scherbelastung des Guts durch den Magnetprüher minimiert werden, wird diese Methode im weiteren Verlauf genutzt.

5.1.1.1.7 Zusammenfassung der Herstellungsmethode für die Nanosuspension

Die Parameter zur Herstellung der Nanosuspension sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst. Die so entstehenden Nanopartikel können durch das Rasterelektronenmikroskop sichtbar gemacht werden (Abbildung 5.7).

Tabelle 5.7: Optimierte Parameter der ionischen Gelierung

Parameter	Einstellung
Verhältnis Chitosan zu CMC	1 Teil : 1 Teil
Feststoffanteil	0,1%
Zugabereihenfolge	CMC-Lösung zur Chitosanlösung
Zugabegeschwindigkeit	variabel
Temperatur	Raumtemperatur
Homogenisierung	Magnetprüher

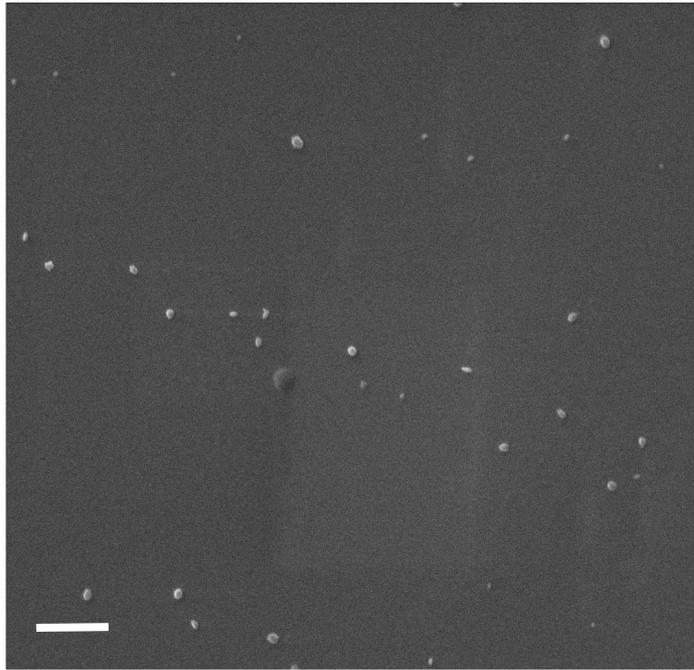


Abbildung 5.7: REM Aufnahme der nanopartikulären Formulierung (Balken entspricht 5 µm)

5.1.1.2 Skalierbarkeit

Partikel um 270 nm (PDI 0,160) sind im Labormaßstab in einer Ansatzgröße von 30 ml nach den im vorangehenden Kapitel festgelegten Parametern herstellbar. Ein Scale-up Versuch soll zeigen, ob auch im größeren Maßstab die Zielgrößen beibehalten werden können. Dazu werden je 500 ml Nanosuspension mit dem Magnetrührer (30 min bei 800 U/min) und dem Ultra-Turrax (1 min bei 24000 U/min) hergestellt.

Tabelle 5.8: Vergleich der durchschnittlichen Partikelgröße und Verteilung des Scale-up Versuchs in Abhängigkeit der gewählten Herstellmethode (n=3)

Dispergierung	Ultra-Turrax	Magnetrührer
∅ Größe	289 ± 1 nm	319 ± 5 nm
PDI	0,146 ± 0,026	0,220 ± 0,015

Die in Tabelle 5.8 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass ein Scale-up mit beiden Herstellmethoden möglich ist und Partikel im gleichen Größenbereich erhalten werden. Die Herstellung mit dem Ultra-Turrax führt durch die stärkere Verwirbelung im Ansatzgefäß zu einer engeren Partikelverteilung mit insgesamt auch kleineren Partikeln. Diese ist daher, eine ausreichende Stabilität aller Komponenten bei gewählter

Scherbeanspruchung vorausgesetzt, für größere Ansätze ideal und als Methode vorzugsweise anzuwenden.

5.1.1.3 Eignung anderer Chitosanqualitäten

Da die entwickelte Herstellmethode zunächst nur an einem Chitosan getestet wurde, wird in dem anschließenden Versuch evaluiert, ob sich durch das angegebene Chitosan monodisperse Partikel < 500 nm formulieren lassen. Dafür werden 0,1% Lösungen von verschiedenen Chitosanen hergestellt und der bisherigen Herstellmethode entsprechend, mit 0,1% CMC zur Partikelbildung gebracht. Wie zuvor in Kapitel 3.1.1 beschrieben, werden bei Chitosan vor allem DDA und Viskosität zur Charakterisierung herangezogen. In Tabelle 5.9 sind diese Kenngrößen aufgeführt, ebenso wie das Ergebnis der Prüfung auf Übertragbarkeit der jeweiligen Qualität. Generell lassen sich mit der entwickelten Methode die niedrigviskosen Chitosane gut formulieren, was auf die Beweglichkeit der Reaktanten im System, sowie deren damit korrespondierende geringe Molekülgröße und Kettenlänge zurückzuführen ist. Der DDA hat keinen Einfluss auf die Größe der gebildeten Partikel.

Tabelle 5.9: Übertragbarkeit der Herstellmethode auf verschiedene Chitosane (+=übertragbar; -=nicht übertragbar), Einfluss auf die entstehende durchschnittliche Partikelgröße (n=3)

Chitosan	Viskosität (1% in 1% HAc)	DDA	Übertrag- barkeit Methode	Ø-Partikel- größe
Chitopur XP/4.91	12,5 mPas	93,5%	Standard	270 nm
Chitosan 90/10/A1	8 mPas	91,2%	+	209 nm
Chitopharm S	48 mPas	83,5%	-	743 nm
Chitopure	14 mPas	92,0%	+	270 nm
Chitosan Fluke	88,5 mPas	89,5%	-	1150 nm
Chitoscience 75/10	11 mPas	75,0%	+	270 nm
Chitoscience 85/10	10 mPas	84,8%	+	228 nm
Chitoscience 90/10	15 mPas	90,1%	+	227 nm
Chitoscience 95/10	15 mPas	96,1%	+	238 nm
Chitoclear TM 615	7 mPas	95,0%	+	285 nm
Chitoclear TM280	665 mPas	89,0%	-	976 nm
Chitosan Sigma	130 mPas	>75%	-	1266 nm

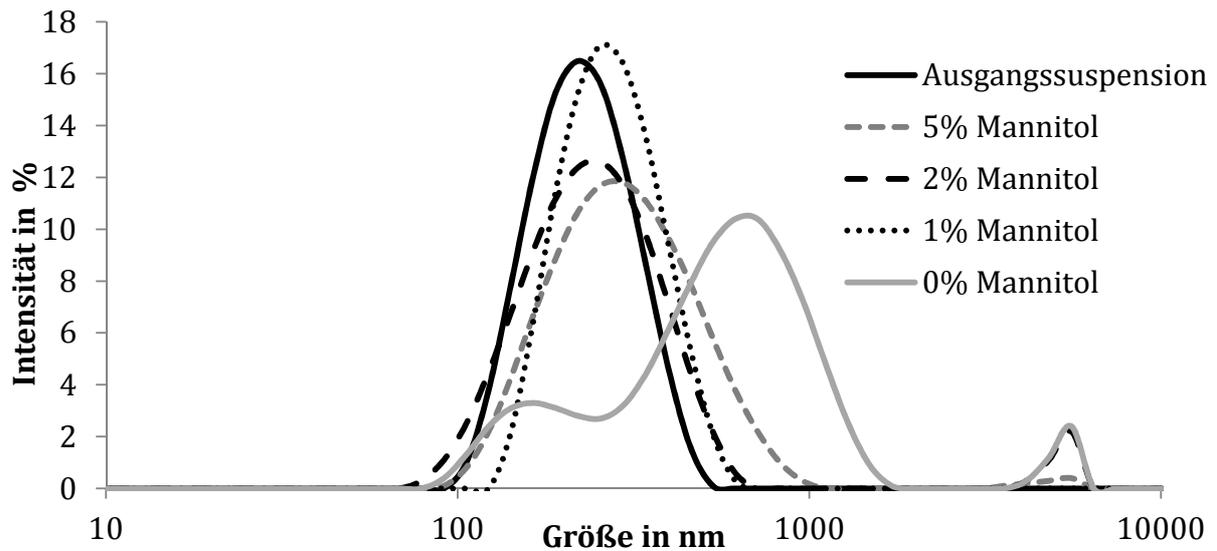
5.1.2 Einfluss der Sprühtrocknung auf die Redispergierbarkeit

Um mikrobiellem Wachstum und Hydrolyse der Inhaltsstoffe vorzubeugen wird die Suspension nach Herstellung in einen trockenen Zustand überführt. Dabei muss jedoch sichergestellt werden, dass sich die Ausgangssuspension nach der Trocknung wieder in den ursprünglichen Zustand rekonstituieren lässt. Im Folgenden wird der Einfluss der Variation einiger Sprühtrocknungsparameter auf die Redispergierbarkeit der Nanopartikel evaluiert.

5.1.2.1 Mannitolmatrix

Die Formulierung wird bei 80°C Einlasstemperatur und einer Auslasstemperatur von 40°C unter variierendem Zusatz von Mannitol getrocknet. Das Mannitol fungiert als Matrix, denn es kristallisiert durch Entzug des Wasser schnell aus und bildet feste sphärische Partikel, die leicht dem Luftstrom folgen [98], in welche die Nanopartikel eingebettet sind. Zur Beurteilung der Redispergierbarkeit wird das erhaltene Pulver nach der Sprühtrocknung in 1%iger Essigsäure redispergiert und im Zetasizer vermessen, die Ergebnisse sind in Abbildung 5.8 dargestellt.

Durch die gute Wasserlöslichkeit kann das Mannitol in der Probe leicht gelöst werden und so die eingebetteten Nanopartikel wieder freigeben. Die Redispergierbarkeit der Partikel sowie deren Sprühtrocknungsausbeute steigen in Abhängigkeit der eingesetzten Mannitolmenge. Der Einsatz von 5% Mannitol führt zu gut redispergierbaren Partikeln und einer hohen Ausbeute von bis zu 80% der eingesetzten Feststoffmenge. Ein Reduzieren des Matrixanteils auf 1% führt zu einer vergleichbaren Partikelverteilung, jedoch fällt die Ausbeute stark ab, was sich im Prozess durch ein vermehrtes Abscheiden des Produkts im Hochleistungszyklon bemerkbar macht. Dies kann auch bei einer Trocknung ohne Mannitolzusatz beobachtet werden. Die Ausbeute sinkt auf unter 5%. Die redispergierten Partikel sind mit fast 500 nm auf mehr als das Doppelte der Ausgangsgröße angewachsen. Der Einsatz einer ausreichenden Menge Mannitol ist daher nötig, um die Produktausbeute zu erhöhen und ein Verkleben der Partikel durch eine räumliche Trennung zu verhindern.



	Größe (nm)	PDI	Ausbeute SD
Ausgangssuspension	203	0,166	-
5% Mannitolmatrix	250	0,240	70-80%
2% Mannitolmatrix	247	0,296	60-70%
1% Mannitolmatrix	256	0,143	20-30%
0% Mannitolmatrix	484	0,413	<5%

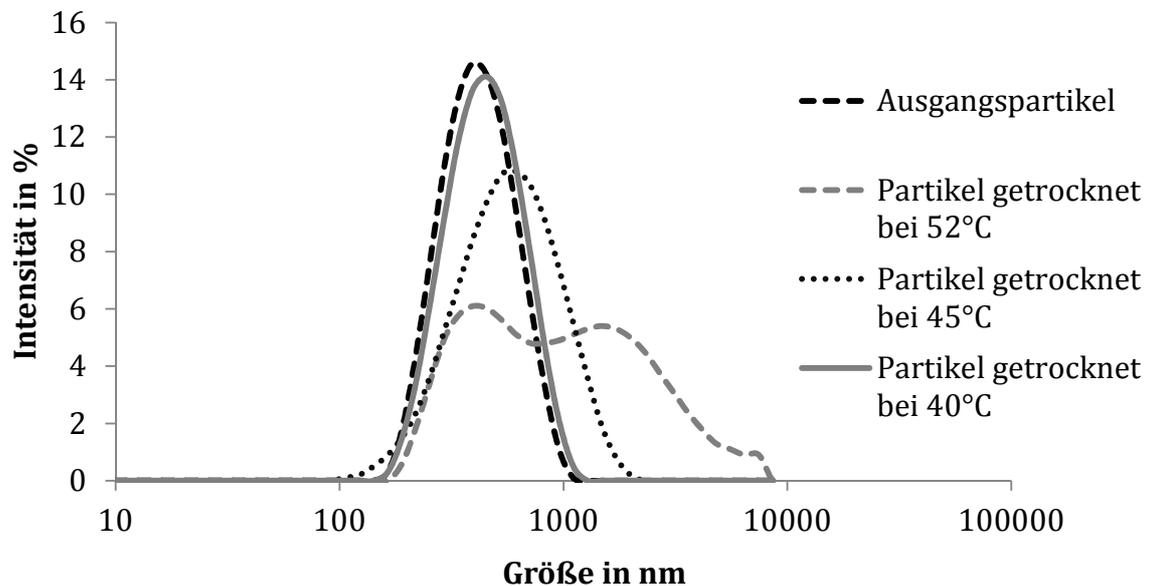
Abbildung 5.8: Durchschnittliche Partikelgröße und Verteilung in Abhängigkeit der gewählten Matrixkonzentration (n=3)

Die so erhaltenen Partikel sind im Vergleich zu den Ausgangspartikeln im Durchschnitt etwa 50 nm größer. Dies ist durch den Waschschriff der Partikel vor der Sprühtrocknung zu begründen, bei der es zu einer leichten Verschiebung der Partikelgrößenverteilung kommt (Kapitel 5.1.2.3). Der Peak im Mikrometerbereich, den einzelne Messungen aufweisen, deutet auf Agglomerate hin, die durch Temperaturschwankungen im Trocknungsprozess entstehen (Kapitel 5.1.2.2) oder beim Redispergiervorgang nicht vollständig von einander gelöst werden können.

Um eine hohe Nanopartikel- und damit Antigenkonzentration in der Formulierung zu erhalten, sollte die Mannitolmatrix einen möglichst geringen Anteil ausmachen. Andererseits sollte der Verlust durch die Sprühtrocknung gering gehalten werden. Da Ausbeuten unter 30% nicht wirtschaftlich sind, wird ein Anteil von 2% Matrix für die Standardformulierung festgesetzt.

5.1.2.2 Auslasstemperatur

Zur Evaluierung der optimalen Sprühtrocknungstemperatur wird die Suspension mit 5% (m/V) Mannitol versetzt und bei konstanter Einlasstemperatur von 80°C getrocknet. Lediglich die Pumprate, die die Zufuhrgeschwindigkeit der Suspension steuert, wird variiert, sodass sich Auslasstemperaturen von 52°C, 45°C und 40°C ergeben. In Abbildung 5.9 sieht man, dass sich durch Reduzierung der Trocknungstemperatur das Redispergierverhalten der Partikel verbessern lässt. Bei 52°C verkleben die Partikel zu größeren Agglomeraten, die sich auch durch Ultraschallbehandlung (30 min) nicht aufbrechen lassen. Ein Absenken um 12°C reicht allerdings bereits aus, um die ursprüngliche Partikelgröße zu wahren. Einen weiteren Vorteil des Absenkens der Temperatur stellt der sekundenschnelle Redispergiervorgang durch Schütteln dar, der keine intensive Redispergiermethode wie Vortexen oder Ultraschall benötigt. Um Schwankungen der Temperatur, die am Trocknungsbeginn eintreten, auszugleichen und so Temperaturspitzen abzumildern, wird die Sprühtrocknung im Folgenden bei einer Auslasstemperatur von 35°C durchgeführt.

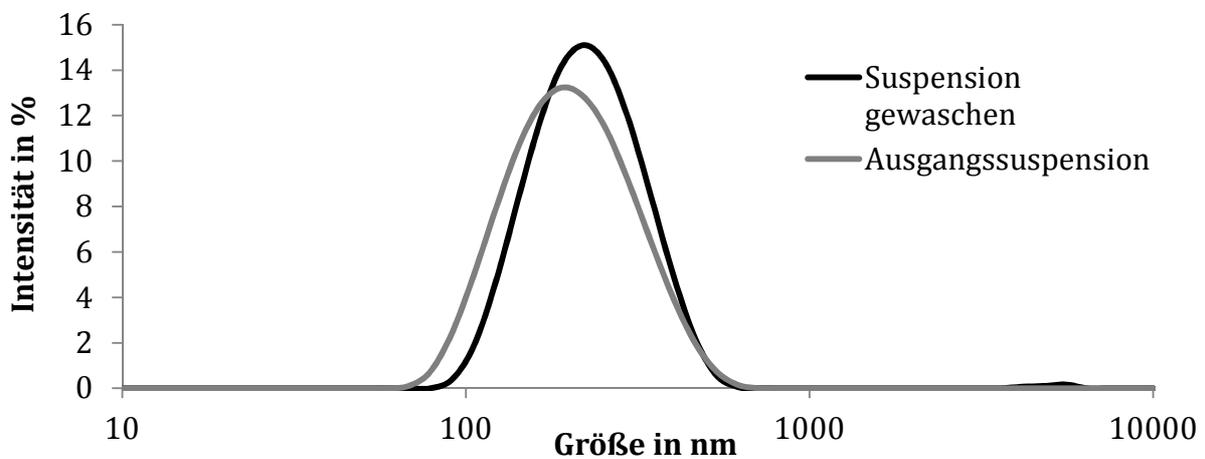


	Größe (nm)	PDI
Ausgangspartikel	277	0,166
Partikel getrocknet bei 52°C	513	0,468
Partikel getrocknet bei 45°C	367	0,259
Partikel getrocknet bei 40°C	291	0,180

Abbildung 5.9: Durchschnittliche Partikelgröße und deren Verteilung in Abhängigkeit der gewählten Auslasstemperatur (n=3)

5.1.2.3 Partikelwaschung

Die Partikel werden vor der Sprühtrocknung durch Zentrifugation gewaschen (4.1.2.1), da sich nach erfolgter Nanopartikelbildung durch ionische Gelierung noch gelöste Anteile der Polymere in der Gleichgewichtsphase befinden. Der Waschschrift entfernt diese vor der Sprühtrocknung, und macht so das sprühgetrocknete Produkt weniger anfällig gegenüber pH-Wert-Einflüssen und Elektrolyten. Durch diese Aufbereitung der Suspension verschiebt sich die Partikelgrößenverteilung minimal zu größeren Partikelgrößen, der PDI wird geringer (Abbildung 5.10). Dies lässt sich damit erklären, dass sehr kleine Partikel durch das angelegte Kraftfeld nicht abgetrennt werden können.



	Größe (nm)	PDI
Ausgangspartikel	176 nm	0,197
Suspension gewaschen	205 nm	0,167

Abbildung 5.10: Einfluss des Waschschrifts auf die durchschnittliche Partikelgröße und deren Verteilung ($n=3$)

In gängigen physiologischen Puffern und Zellmedien sind die Nanopartikel nach anschließend erfolgter Sprühtrocknung gut redispergierbar. Anhand von Tabelle 5.10 lässt sich der Effekt durch den Aufbereitungsschritt gut erkennen. Die Partikelgrößen liegen ohne Waschung im Mikrometerbereich, wohingegen sie sich durch die Aufreinigung mit durchschnittlich 358 nm wieder im Bereich für eine zelluläre Aufnahme befinden.

Tabelle 5.10: Einfluss des Waschschriffs auf die Redispergierbarkeit der Partikel in Phosphatpuffer pH 7,4 (n=3)

Redispergierung	ohne Waschschrift	mit Waschschrift
ø Größe	4448 nm	358 nm
PDI	0,489	0,278

Allein im Bereich von pH 5-6 kommt es zu einer Partikelaggregation. Messungen des Zetapotentials (Abbildung 5.11) zeigen, dass in diesem Bereich das Potential vom Positiven ins Negative übergeht. Es wird beschrieben, dass die Schwelle zur Agglomeration abhängig von der betrachteten Suspension im Bereich von +20 mV bis -20 mV liegt [99]. Ist der Wert außerhalb dieses Bereiches, so ist die Suspension stabil, tendiert er gegen null ist die Agglomeration maximal. Die Ausgangssuspension liegt mit einem Zetapotential von 50,1 mV ($\pm 1,15$ mV) im Bereich einer stabilen Suspension. Im Phosphatpuffer pH 5,5 liegt dieser Wert bei -17,3 mV ($\pm 2,40$ mV) und damit unter der Schwelle, weshalb es zur Agglomeration der Nanopartikel kommt.

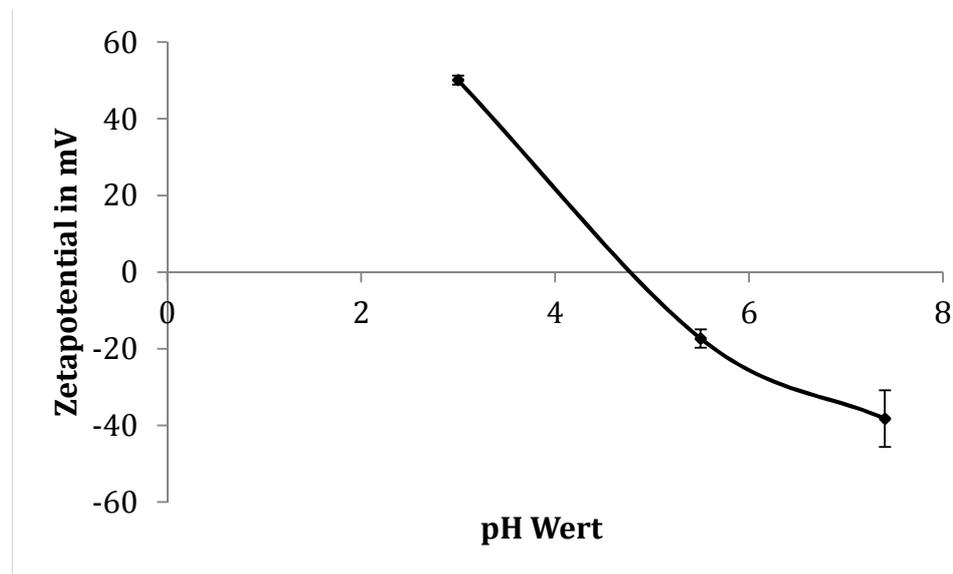


Abbildung 5.11: Zetapotential der Ausgangssuspension (pH 3), in Phosphatpuffer pH 5,5 und Phosphatpuffer pH 7,4 jeweils 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. (Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung, n=3)

Auch auf die Partikelgröße hat der pH-Wert einen Einfluss. Unter einem Wert von pH 5 kommt es mit der Zeit zur Quellung und damit einer Vergrößerung der Nanopartikel,

während die Partikelgröße im neutralen und leicht alkalischen Milieu weitestgehend erhalten bleibt (Tabelle 5.11). Dies kann über die die Chitosangruppen erklärt werden, die nach Redispergierung im sauren Medium den Protonen zugänglich sind. Sie fangen durch Protonierung freier Aminogruppen an zu quellen, wodurch die Partikelgröße über einen längeren Zeitraum kontinuierlich ansteigt. Daher sollten die Partikeln nach Redispergieren zeitnah verwendet werden.

Tabelle 5.11: Partikelgröße Chitoscience 90/10 (OVA-beladen) in verschiedenen Redispergierungsmedien (n=3, t= Zeitpunkt der bestimmten Partikelgröße, n.b.: nicht bestimmt)

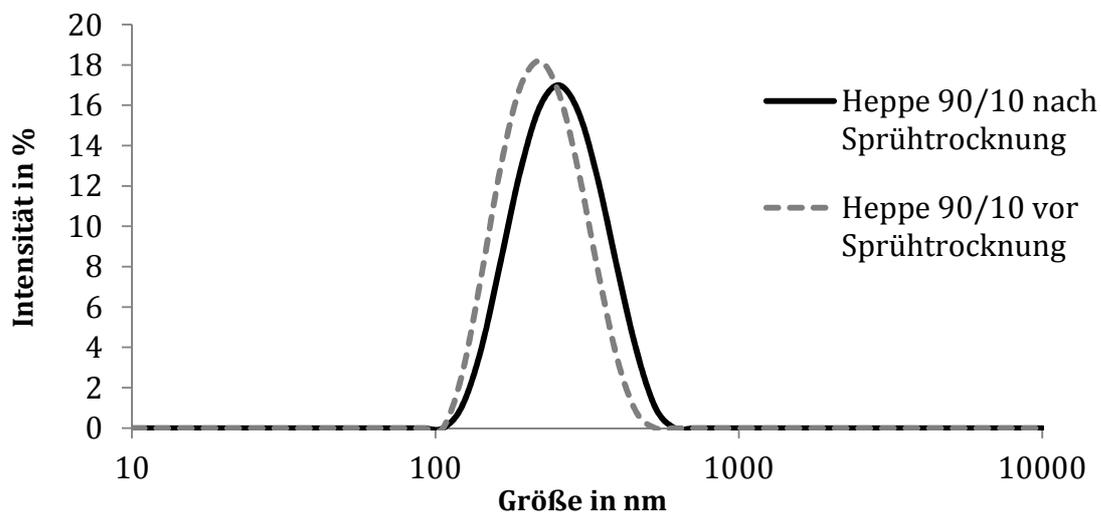
Medium	Größe (t=0h)	Größe (t=7h)
Ausgangsmedium (1% Essigsäure)	241 nm	konstant
HCl 1N	357 nm	422 nm
Acetatpuffer pH 3,9	318 nm	408 nm
PBS pH 7,4	358 nm	343 nm
PBS pH 8,0	447 nm	418 nm
MEM Medium	438 nm	n.b.
HBSS Medium	288 nm	n.b.
PBS pH 5,0	1172 nm	2531 nm
PBS pH 6,0	1031 nm	n.b.

5.1.2.4 Zusammenfassung Sprühtrocknungsparameter

Die nach den Kapiteln 5.1.2.2 bis 5.1.2.3 optimierten Parameter (Tabelle 5.12) führen zu einem gut redispergierbaren Produkt, dessen Partikelgrößenverteilung der des Ausgangsprodukts entspricht (Abbildung 5.12). Nach der Trocknung können die Partikel auch in physiologischem Medium rekonstituiert werden, wobei sich die Partikelgröße in dem für die Phagozytose interessanten Bereich befindet (Kapitel 5.6.2.1). Kritisch anzumerken ist, dass die Partikel sich stark von dem umgebenden Medium beeinflussen lassen. Die Partikelgröße schwankt je nach eingesetztem Medium und Messzeitpunkt. Idealerweise sollte man daher die Partikel für Zelltests nach dem Redispergieren immer nach definierten Zeitpunkten verwenden, um Schwankungen in der Partikelgröße auszugleichen. Als Dispergiermedium der Wahl sollte dafür HBSS-Medium oder neutraler Phosphatpuffer verwendet werden, da hier die Partikelgröße am wenigsten von der Ausgangsgröße abweicht.

Tabelle 5.12: Optimierte Sprühtrocknungsparameter

Parameter	Einstellung
Einlasstemperatur	80°C
Auslasstemperatur	35°C
Mannitolmatrix	2% (m/V) vom Ausgangsvolumen
Probenvorbereitung	Waschen per Zentrifugation
Zusammensetzung des sprühgetrockneten Produkts	20 Teile Mannitol 1 Teil Nanopartikel



	Größe	PDI
Ausgangspartikel	233 nm	0,119
Nach Sprühtrocknung	247 nm	0,296

Abbildung 5.12: Partikelgrößenverteilung der Nanopartikel vor und nach Sprühtrocknung (n=3)

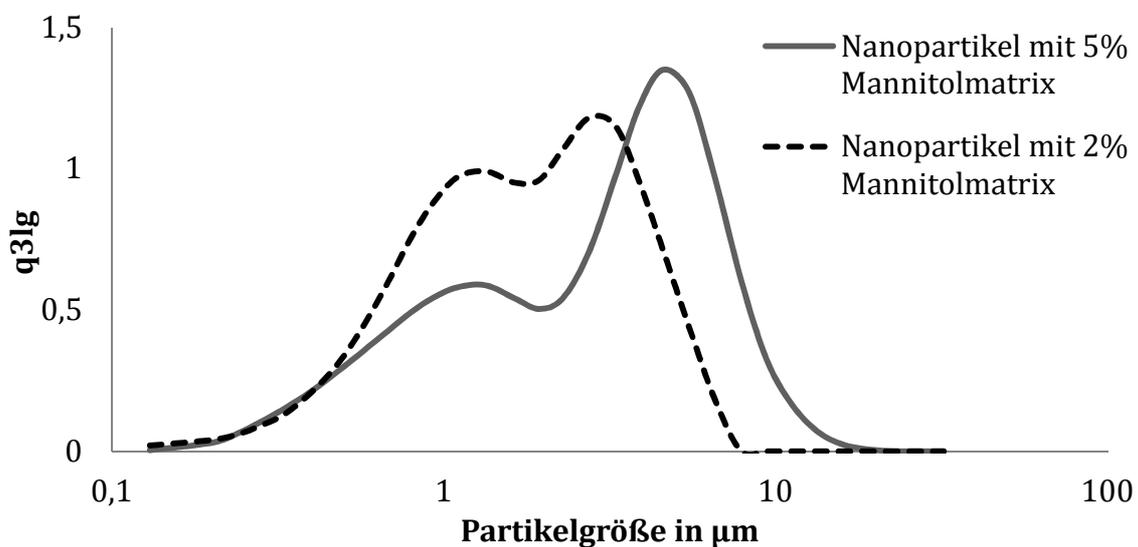
5.2 Mikropartikuläre Formulierung

5.2.1 Partikelgrößenverteilung

Um sicherzustellen, dass das getrocknete Produkt nicht nur gut in Nanopartikel redispersierbar ist, sondern auch potentiell die Lunge erreichen kann, wird auch das trockene Pulver hinsichtlich seiner Partikelgrößenverteilung untersucht. Eine schnelle Möglichkeit zur Beurteilung bietet die Laserdiffraktometrie (Kapitel 4.2.1.2). Sie gibt Informationen über den geometrischen Durchmesser des Produkts und damit einen Anhaltspunkt für die spätere pulmonale Deposition [100]. Der aerodynamische Durchmesser hingegen liefert ein Bild über das Verhalten des Pulvers im Luftstrom, wie er bei Inspiration erzeugt wird (Kapitel 4.2.4).

5.2.1.1 Trockendispergierung

Die Trockendispergierung wird mit dem RODOS-Modul des HELOS Laserdiffraktometers durchgeführt. Dabei wird angenommen, dass bei der Dispergierung mit 3 bar alle Agglomerate aufgebrochen und die Partikel effektiv vereinzelt werden. Sie stellt somit die tatsächliche Partikelgrößenverteilung im untersuchten Pulver dar.



Formulierung	X ₁₀	X ₅₀	X ₉₀	FPF _{geo}
Mannitol 2%	0,61 µm	1,78 µm	4,25 µm	95,1%
Mannitol 5%	0,64 µm	3,23 µm	7,07 µm	73,2%

Abbildung 5.13: Partikelgrößenverteilung des sprühgetrockneten Pulvers bei Trockendispergierung mit 3 bar, 5% Matrix verglichen mit 2% Matrix, n=3

Abbildung 5.13 zeigt den Kurvenverlauf für zwei Formulierungen mit variierendem Mannitolanteil von 2% und 5%, sowie die dazugehörigen x_{10} , x_{50} und x_{90} -Werte. Der x_{50} stellt den Median der volumenbezogenen mittleren Partikelgrößenverteilung dar; x_{10} bzw. x_{90} beschreiben entsprechend die Partikelgrößen die 10 bzw. 90% des Pulvers beschreiben.

Sowohl die Nanopartikel mit 2% als auch mit 5% Matrix weisen nach Druckluftdispergierung eine mittlere Partikelgröße unter 5 μm auf, wodurch das Pulver in dem gewünschten Größenbereich zur pulmonalen Anwendung liegt. Die Partikel mit geringerem Matrixanteil haben einem x_{50} -Wert von 1,78 μm und damit einen viel kleineren Durchmesser als jene, die mit mehr Matrix getrocknet werden, deren x_{50} bei 3,23 μm liegt. Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der geometrischen Feinpartikelfraktion wieder (FPF_{geo}), die den Anteil aller im Pulver vorhandenen Partikel $\leq 5 \mu\text{m}$ beschreibt. Der Unterschied lässt sich durch den Sprühtrocknungsprozess erklären [101, 102]: Einem Tropfen einer wässrigen Lösung eines Feststoffs wird im Trocknungsluftstrom kontinuierlich Lösungsmittel entzogen, wobei die gelöste Substanz aufkonzentriert wird. Um das entstehende Konzentrationsgefälle zwischen Oberfläche und Inneren des Tropfens auszugleichen, diffundieren Matrixmoleküle nach innen [102]. Auf diese Weise schrumpft der Tropfen, bis die Löslichkeit der Substanz überschritten wird und sie sich als Wandmaterial abscheidet. Je höher die Lösung konzentriert ist, desto schneller kommt es auf diese Weise zur Partikelwandbildung. Da alle übrigen Sprühtrocknungsparameter beibehalten werden, ist auch die Größe der durch die Zerstäubung entstehenden Primärtropfen beider Mannitollösungen zunächst gleich, nimmt im Verlauf der Trocknung aber bis zum Überschreiten der Löslichkeitsgrenze ab. Bei der höheren Mannitolkonzentration muss weniger Lösungsmittel entzogen werden, um eine Partikelbildung zu erreichen, während die Tropfen der niedriger konzentrierten Lösung weiter schrumpfen, bis es zur Feststoffabscheidung kommt. Die entstehenden Partikel sind also um so größer, je höher die Konzentration des Matrixmaterials in der Lösung ist (Abbildung 5.14).

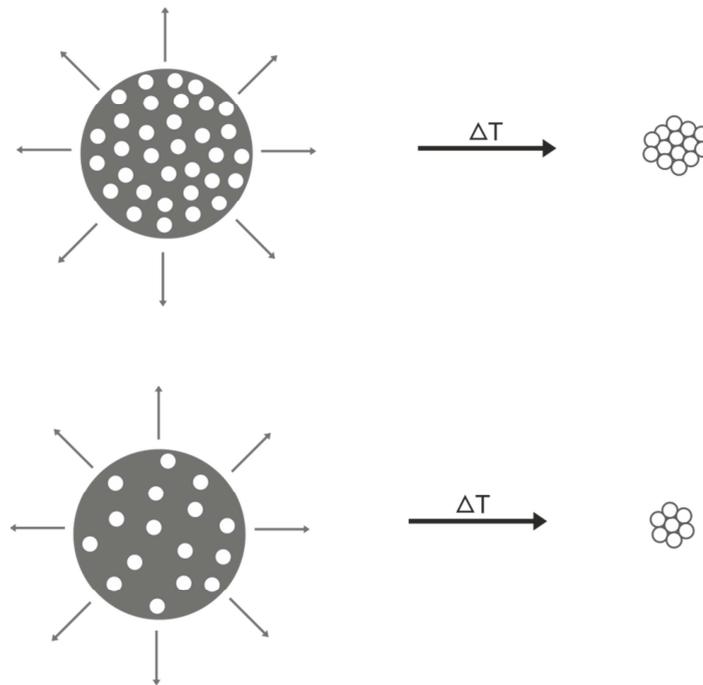
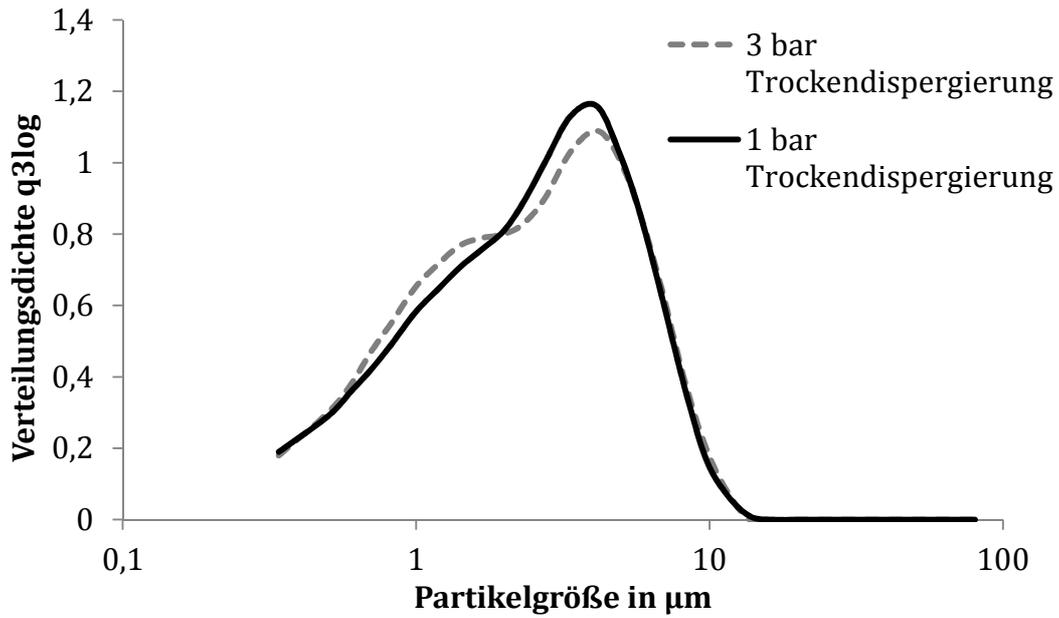


Abbildung 5.14: Modell zur Partikelbildung in Abhängigkeit der eingesetzten Feststoffkonzentration, dunkle Fläche entspricht Lösungsmittel, weiße Kreise entsprechen gelöster bzw. getrockneter Substanz. Oben: Hohe Feststoffkonzentration, unten: niedrige Feststoffkonzentration

Bei beiden Pulvern kann ein leicht bimodaler Verlauf (Abbildung 5.13) ausgemacht werden. Erniedrigt man das angelegte Vakuum von 3 bar auf 1 bar, so wird die Peakschulter im unteren μm -Bereich kleiner (Abbildung 5.15). Dies kann ein Indiz für eine Fragmentierung der sprühgetrockneten Hohlkugeln durch zu hohe Prallkräfte sein. Oder es handelt sich um Agglomerate von kleinen Partikeln, die nur durch den erhöhten Dispergierdruck vereinzelt werden können. Im REM-Bild (Abbildung 5.16) zeigen sich diese Agglomerate von kleineren Partikeln deutlich, obwohl die Proben zur Präparation mit Druckluft (5 bar) zum Entfernen überschüssigen Pulvers behandelt wurden. Die REM-Daten bestätigen daher, dass es sich bei den in der Laserdiffraktometrie gemessenen Partikeln nicht um Bruchstücke der Partikel handelt, sondern um kleinere Partikel. Das Pulver weist daher eine bimodale Partikelgrößenverteilung auf.



Dispergierung	X_{10}	X_{50}	X_{90}
3 bar	0,65 μm	2,46 μm	6,30 μm
1 bar	0,65 μm	2,58 μm	6,20 μm

Abbildung 5.15: Kurvenverlauf einer Formulierung bei Trockendispergierung mit 3 bar und 1 bar ($n=3$)

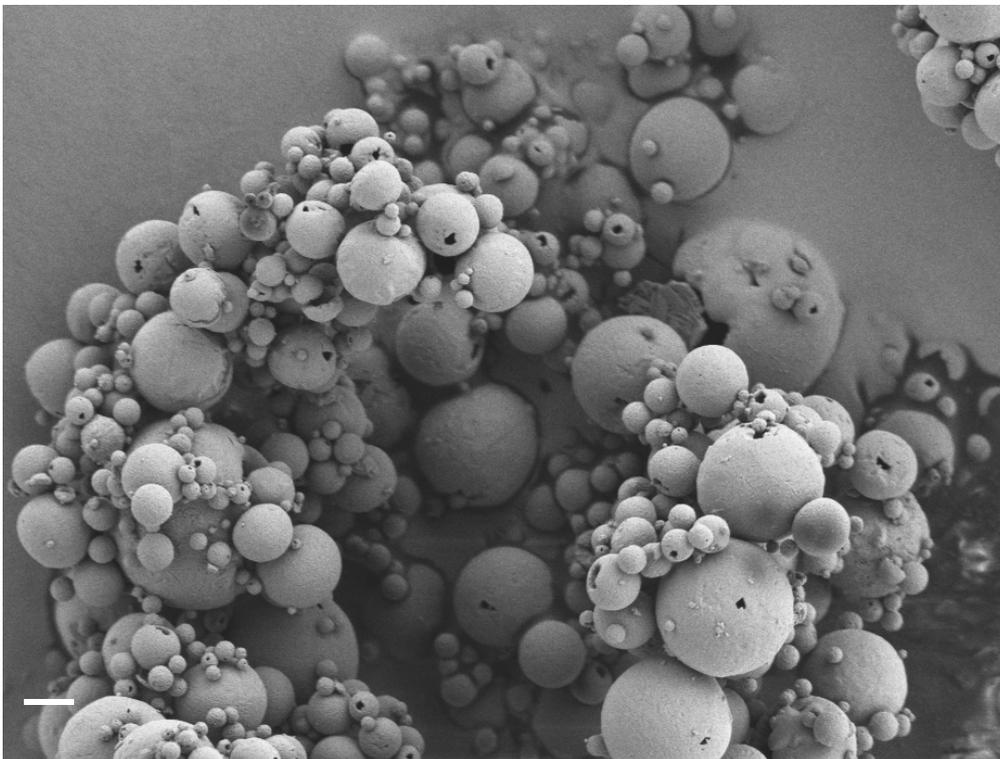
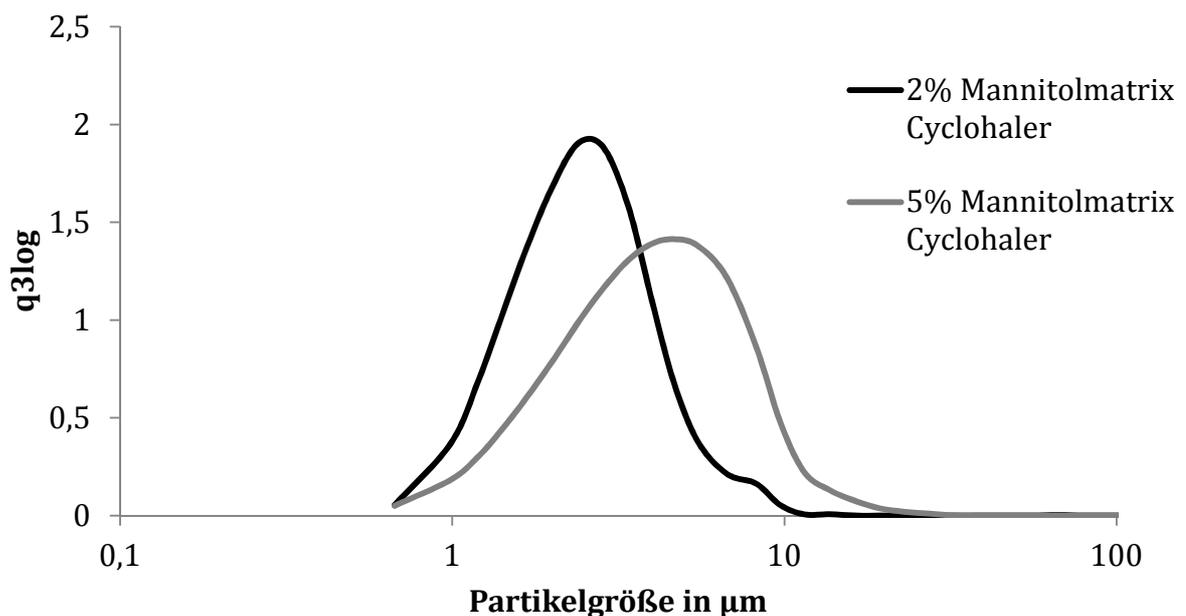


Abbildung 5.16: REM-Aufnahme der Formulierung aus Abbildung 5.15 (Balken entspricht 2 μm)

5.2.1.2 Inhalatordispersierung

Das gleiche Pulver kann zusätzlich zur Trockendispersierung mittels RODOS-Modul mit dem INHALER-Modul des HELOS vermessen werden. Hier wird das Pulver nicht durch einen Druckluftstoß dispersiert, sondern durch den Cyclohaler. Durch den Vergleich der erhaltenen Werte können Rückschlüsse auf die Fähigkeit des Inhalators zur Dispersierung des Pulvers gemacht und so eine Aussage über dessen Eignung und Effektivität getroffen werden. Auch hier werden wieder die zwei Formulierungen mit 2% und 5% Mannitolmatrix vermessen.

Die durchschnittliche geometrische Partikelgröße liegt bei beiden Formulierungen bei vollständiger Dispersierung unterhalb von 5 μm , was vorteilhaft für eine pulmonale Applikation sein müsste. Auch die Dispersierung über einen Inhalator zeigt eine hohe Fraktion unter 5 μm (Abbildung 5.17). Die Partikel der 2% Mannitolformulierung sind mit 2,47 μm auch bei dieser Messung kleiner, als die mit der erhöhten Mannitolmatrix (4,02 μm).

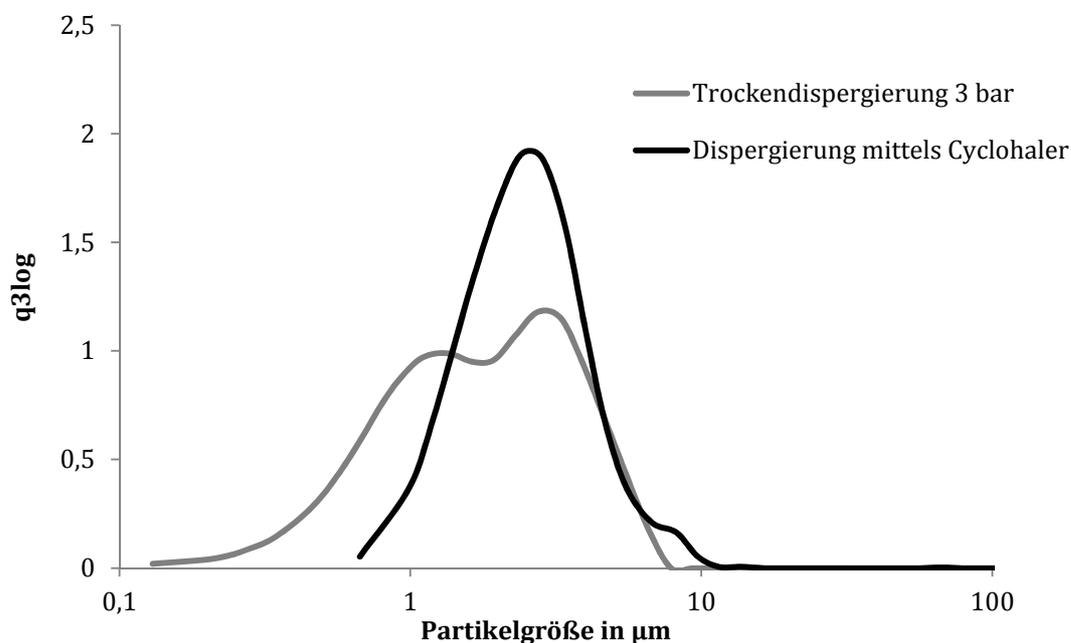


Formulierung	X ₁₀	X ₅₀	X ₉₀
Mannitol 2%	1,31 μm	2,47 μm	4,47 μm
Mannitol 5%	1,62 μm	4,02 μm	8,32 μm

Abbildung 5.17: Partikelgrößenverteilung durch Dispersierung mit dem Cyclohaler 100 L/min, 2% und 5% Mannitolmatrix (n=3)

Vergleicht man die durchschnittliche Partikelgröße der Trockendispersierung mit der der Inhalerdispersierung anhand der 2% Mannitolformulierung in Abbildung 5.18, so fällt auf, dass die gemessenen Partikel bei Vereinzelnung im Inhalator etwa 0,5 μm größer

sind. Die Trockendispergierung ist also effektiver als die Dispergierung über den Inhalator. Gerade bei der x_{10} -Fraktion ist eine deutliche Verschiebung zu größeren Partikeln zu erkennen: der Durchmesser liegt bei $1,31 \mu\text{m}$ statt $0,61 \mu\text{m}$. Auch die Schulter der Partikelgrößenverteilung ist damit nicht mehr vorhanden. Wie im vorherigen Kapitel erläutert, liegen besonders die kleinen Partikeln in starken Agglomeraten vor. Diese können durch die reduzierte Dispergierfähigkeit des Inhalators nicht aufgebrochen werden. Die größeren Partikel können hingegen ebenso dispergiert werden, was sich darin äußert, dass die x_{90} -Fraktion mit $4,47 \mu\text{m}$ einen vergleichbaren Wert zu dem der Trockendispergierung mit $4,25 \mu\text{m}$ aufweist.



Formulierung	x_{10}	x_{50}	x_{90}
Trockendispergierung	$0,61 \mu\text{m}$	$1,78 \mu\text{m}$	$4,25 \mu\text{m}$
Inhalerdispergierung	$1,31 \mu\text{m}$	$2,47 \mu\text{m}$	$4,47 \mu\text{m}$

Abbildung 5.18: Vergleich der Dispergierungen der 2% Mannitol-Formulierung; 3 bar Trockendispergierung gegen Cyclohaler ($n=3$)

Um die Deagglomeration durch den Inhalator weiter einschätzen zu können, werden die durch die unterschiedlichen Dispergierverfahren bestimmten Partikelfraktionen unter $5 \mu\text{m}$ (FPF_{geo}) in Tabelle 5.13 miteinander verglichen. Dies sind die Partikel, die aufgrund ihrer Geometrie in der Lage wären, die Lunge bei einer Inhalation zu erreichen. Die relative Deagglomeration setzt die durch den Inhalator erhaltene Fraktion mit der der Trockendispergierung ins Verhältnis. Der erhaltene Wert sagt aus, inwiefern

die potentiell lungengängigen Partikel, die in dem trockenen Pulver enthalten sind, durch den Inhalator dispergiert werden können.

Tabelle 5.13: Fraktionen unter 5 µm bei unterschiedlicher Dispergierung und errechnete relative Deagglomeration

Formulierung	Partikel < 5 µm (3 bar)	Partikel < 5 µm (Cyclohaler)	Rel. Deagglomeration
Mannitol 5%	73,2%	63,5%	86,8%
Mannitol 2%	95,1%	93,1%	97,9%

Das Pulver mit 5% Mannitol besteht zu 73,2% aus Partikeln, die kleiner als 5 µm sind, durch die Dispergierung mit dem Cyclohaler liegt diese Fraktion bei 63,5%; das entspricht einer relativen Deagglomerationsrate von 86,8%. Dieser Wert ist bei der 2% Mannitol-Formulierung mit 97,9% noch besser. Mit 95,1% theoretisch inhalierbaren Partikeln ist diese Formulierung insgesamt noch besser zur Inhalation geeignet.

5.2.2 Aerodynamische Charakterisierung der trockenen Nano-in-mikropartikelären Formulierung

5.2.2.1 Entwicklung einer NGI-Methode

Der geometrische Durchmesser berücksichtigt alleine die Größe der Partikel, was eine Schwachstelle dieser Methode darstellt. Mittels Analyse mit dem NGI kann ein noch genaueres Bild über die aerodynamischen Eigenschaften geschaffen werden. Durch die Bestimmung des Feinanteils der Dosis können Rückschlüsse auf den voraussichtlich in die Lunge gelangenden Anteil der Formulierung gezogen werden. Es handelt sich hierbei um eine Arzneibuchmethode [25], deren Aufbau wenig Variation zulässt. Einzig das Stage-Coating, das die Prallplatten benetzt und verhindert, dass die Partikel von der einen Prallplatte zur nächsten weitergetragen werden, wird in dem Aufbau angepasst. Dabei wird initial eine Lösung aus 50% Isopropanol und 50% Propylenglykol verwendet, von der bekannt ist, dass sie normalerweise kein Störsignal in der anschließenden Methode zur Proteinbestimmung ergibt. Die auf den jeweiligen Prallplatten abgeschiedene Pulvermenge wird separat in einer definierten Menge Lösemittel aufgenommen und die enthaltene Proteinmenge mittels BCA-Assay

quantifiziert. Die gesamt im NGI applizierbare Menge ist, da es sonst zu einer Überladung der Prallplatten kommt, auf 20 mg Trockenformulierung begrenzt. Dies entspricht einer enthaltenen Proteinmenge von etwa 100 µg für die hier entwickelte Formulierung. Diese Menge ist sehr gering und, über den gesamten NGI-Aufbau verteilt, nah am Detektionslimit des Micro-BCA-Assays liegend. Daher musste die Analytik auf diese extrem niedrigen Proteinmengen angepasst werden.

Da der Analyse später modifizierter Phosphatpuffer zur Auflösung der Partikel hinzugefügt wird, wird auch das Ovalbumin zur Kalibrierung darin gelöst. Dabei werden dieselben Lösungen mit und ohne eine definierte Menge Coating vermessen. Abbildung 5.19 zeigt die Absorption des entstehenden Farbkomplexes durch die Kalibrierlösungen des Ovalbumins im BCA-Assay. Eine Zugabe von Coating führt zu einer erhöhten Farbentwicklung mit dem BCA Reagenz. Diese ist in den niedrigen Konzentrationsbereichen des Assays stärker ausgeprägt. Die Steigung des Graphen ist flacher und der Korrelationskoeffizient fällt, verglichen mit der Kalibrierung ohne Coating, schlechter aus. Die Messempfindlichkeit wird durch das Coating herabgesetzt. Generell liegt die Absorption bei beiden Lösungen durch den Citronensäurezusatz im Phosphatpuffer am unteren Rand des Lambert-Beer'schen Bereiches.

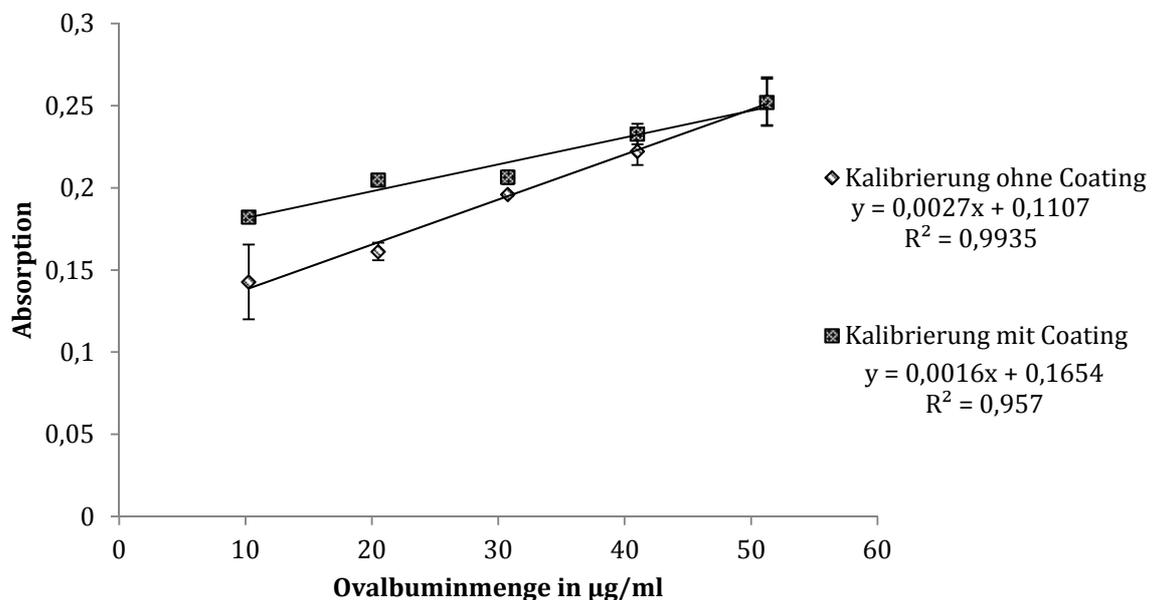


Abbildung 5.19: Kalibriergerade des Micro-BCA-Assays ohne und mit Verwendung von Stage Coating ($n=4$, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung)

Um zu evaluieren, ob das Stage-Coating überhaupt zur Anwendung im BCA-Assay geeignet ist, wird überprüft, ob sich dessen Einfluss auf die Farbentwicklung des BCA-

Reagenzes linear verhält. Dazu werden einem pH 7,4 Phosphatpuffer geringe Volumen Coating hinzugefügt und deren Absorption vermessen. In Abbildung 5.20 ist die Absorption gegen die eingesetzte Menge Coating aufgetragen. Es ist am Korrelationskoeffizienten deutlich zusehen, dass kein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Menge und der Absorption besteht. Um Störungen der Methode zu minimieren, muss das Coating durch eine inerte Alternative ersetzt werden.

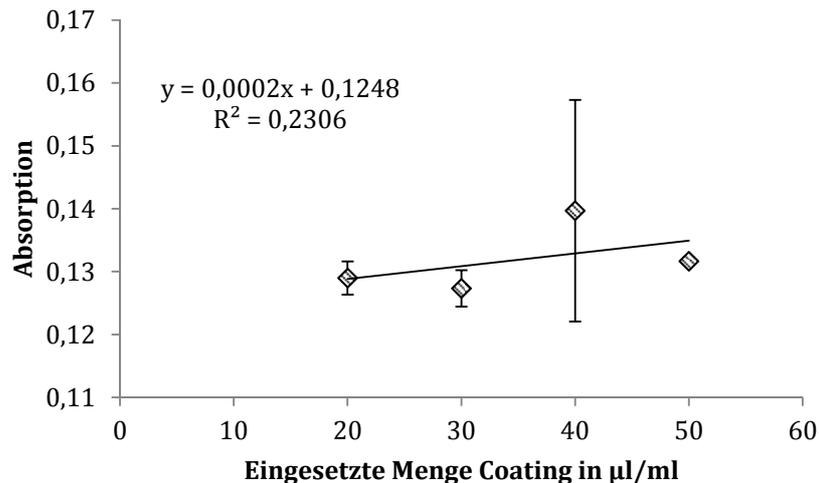


Abbildung 5.20: Absorptionsänderung des BCA-Reagenzes in Abhängigkeit der eingesetzten Coatingmenge ($n=3$, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung)

Als ersten Schritt wird der modifizierte Phosphatpuffer, der zum Auflösen der Partikel genutzt wird, durch 2% DMSO-Wasser ersetzt. In diesem Medium lösen sich die Partikel nahezu vollständig und geben einen Großteil der enthaltenen Proteinmenge frei. Die beim BCA-Assay entstehende Absorption fällt im Vergleich zum Puffersystem stärker aus, denn im Gegensatz zu diesem greift das DMSO nicht in den alkalischen pH-Wert des Reagenzes ein. Dadurch kann die Sensitivität erhöht werden. Eine weitere Änderung liegt in der Inkubation des Assays, die nach der von Olson et al. [79] beschriebenen Methode abgeändert wird. Dort wird empfohlen, durch Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 60°C die Nachweisgrenze anzuheben und so die Empfindlichkeit des Assays zu steigern. Bei der herkömmlichen Inkubation bei 37°C steigt die Absorption nach Abschluss der Reaktion alle 10 min um weitere ~2,3%. Im Gegensatz dazu ist bei einer Inkubation mit 60°C die Farbentwicklung im Anschluss abgeschlossen.

Die Parameter werden für die weiteren Versuche wie folgt gewählt: Vor der Vermessung wird der Assay für 1,5 h bei 60°C inkubiert und für 0,5 h auf Raumtemperatur abgekühlt.

Des Weiteren wird der Einsatz von dünnen Filtermembranen als Alternative für das Stage Coating erprobt. Dazu werden die verschiedenen Filter mit der 2% DMSO-Wasserlösung und definierter Ovalbuminmenge benetzt und der Einfluss der Filter auf die quantifizierte Proteinmenge mittels BCA-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der Versuchsreihe sind in Tabelle 5.14 zusammengefasst. Nur der Celluloseacetatfilter bleibt intakt und führt zu keinem Störsignal im Assay, weshalb das bisherige Coating durch diesen ersetzt werden kann. Dafür werden die Filter auf den Prallplatten des NGIs ausgelegt und, mit einem definierten Volumen DMSO-Lösung benetzt, verwendet. Impaktieren die Partikel in der anschließenden aerodynamischen Untersuchung auf den Filtern, so lösen sich die Mannitolmatrix und die Partikel durch den vorhandenen Flüssigkeitsfilm auf, wodurch eine Verschleppung der Partikel unterbunden wird.

Tabelle 5.14: Verwendete Filtermembranen als Alternative zum Stage Coating

Filtermaterial	Ergebnis
Papier	Hohe Proteinausgangskontamination mit schwankendem Gehalt
Glasfaser	Desintegriert, entstehende Fasern behindern Messung, Proteine adsorbieren an Fasern
Cellulosenitrat	Nicht lineares Störsignal
Celluloseacetat	Kein Eigensignal

Eine weitere Versuchsreihe soll zeigen, dass die so optimierte Methode zum gewünschten Ergebnis führt. Dazu wird Ovalbuminstandard für die Kalibrierung in 2% DMSO-Wasser gelöst. Zudem werden drei geringe Mengen der trockenen Formulierung mit den Celluloseacetatfiltern in jeweils einem Zentrifugenröhrchen ebenfalls mit dieser Lösung versetzt, wodurch sich das Pulver auflöst. Die Lösungen werden nach den definierten Parametern inkubiert und anschließend vermessen. Abbildung 5.22 (A) zeigt die Kalibrierung nach Inkubation bei 60°C. Man sieht, dass die Absorptionen trotz gleichem Konzentrationsbereich nun vollständig im Lambert Beer'schen Bereich liegen. Der Korrelationskoeffizient ist mit 0,9975 besser als in der zuvor verwendeten Methode.

In Abbildung 5.22 (B) sind die bestimmten Partikelbeladungen dargestellt. Hier ist festzuhalten, dass sich auch geringe Proteinkonzentrationen gut nachweisen lassen, die Messwertschwankungen aber größer werden, je weiter man die nachzuweisende Menge reduziert. Trotz der unterschiedlichen, sehr geringen Einwaagen können mit dieser Methode die Beladungen vergleichbar bestimmt werden, sodass im nächsten Schritt eine Bestimmung im NGI durchgeführt wird. In Abbildung 5.21 sind die Ergebnisse zusammengefasst, dabei liegt der MMAD (massenbezogene mittlere aerodynamische Durchmesser) bei 2,064 μm . Dieser liegt im Bereich des durch die Laserdiffraktometrie bestimmte x_{50} (RHODOS 1,78 μm , INHALER 2,47 μm). Die Feinpartikelfraktion (FPF_{aero}) fällt mit 73,5% niedriger aus, was daran liegt, dass im Device und im Rachen bereits Pulver abgeschieden wird, das dementsprechend nicht zur Feinpartikelfraktion beitragen kann. Die GSD (geometrische Standardabweichung) weist mit 3,035 auf ein heterodisperses System hin und bestätigt so die bimodal gemessene Verteilung der Laserdiffraktometrie und des REM.

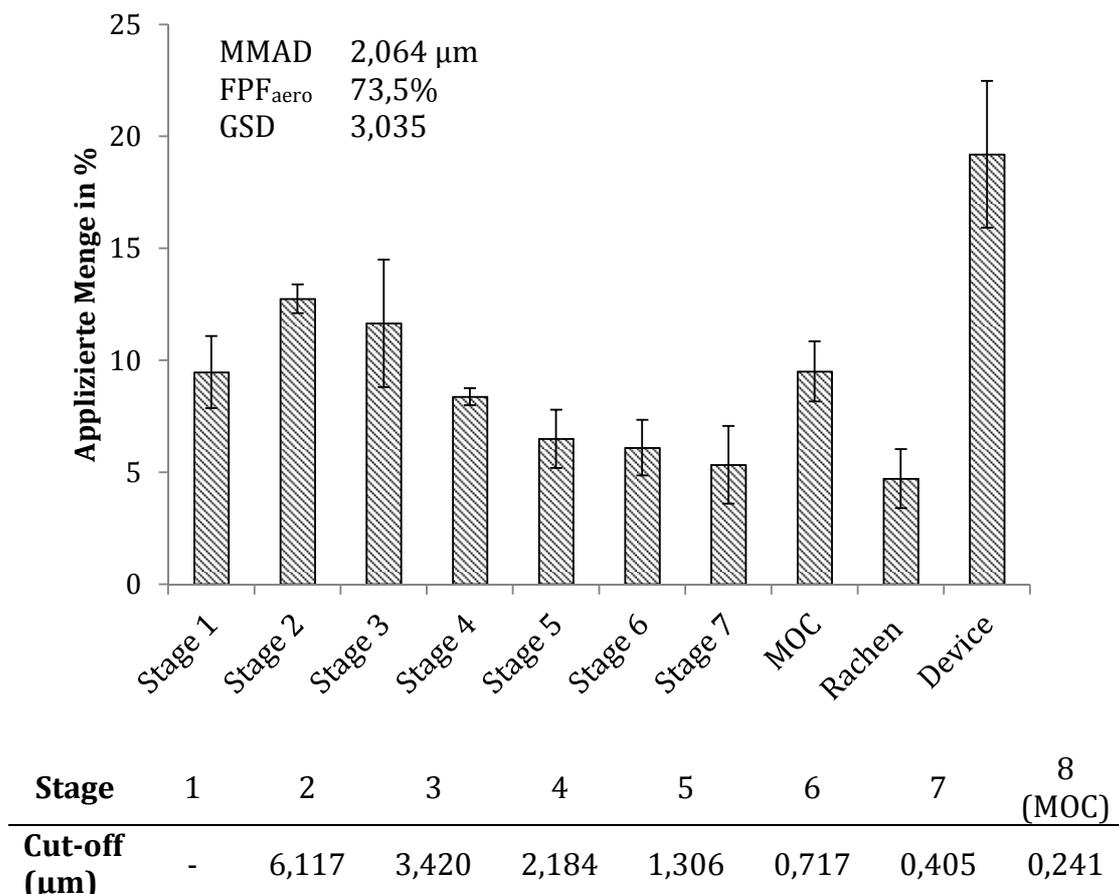
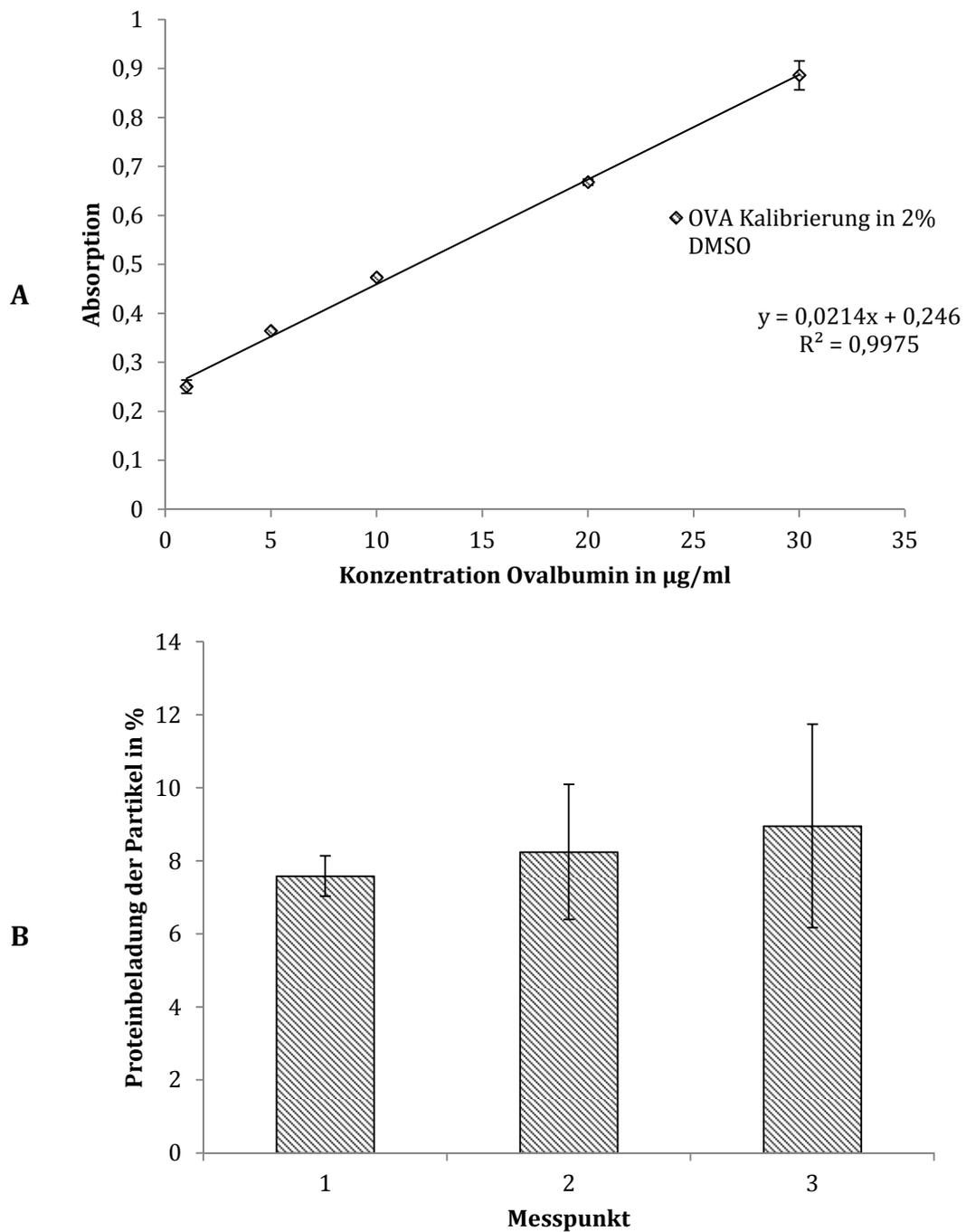


Abbildung 5.21: Depositionsprofil der Standardformulierung im NGI mit den jeweiligen Cut-Off-Durchmessern der Düsen bei 100 L/min ($n=2$; Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung)



Messpunkt	Einwaage/ml	c(Protein)	Proteinbeladung
1	1,73 mg	6,20 µg/ml	7,58 ± 0,56%
2	0,87 mg	3,38 µg/ml	8,25 ± 1,85%
3	0,46 mg	1,93 µg/ml	8,96 ± 2,79%

Abbildung 5.22: Ergebnisse der neuen Messmethode. A) Kalibriergerade, B) Einwaage und bestimmte Proteinbeladung in Anwesenheit eines Celluloseacetatfilters (jeweils $n=3$, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung)

5.2.3 Einfluss der Sprühtrocknung auf die Partikelgrößenverteilung

Um zu untersuchen, ob sich die aerodynamische Partikelgröße und damit die pulmonale Deposition im Sprühtrocknungsprozess steuern lassen, werden die Sprühtrocknungsparameter variiert und das entstehende Produkt analysiert. Dabei bleiben Auslasstemperatur und Mannitol-Nanopartikel-Verhältnis (20:1) unverändert, um die Redispergierbarkeit des Pulvers zu gewährleisten (s. Kapitel 5.1.2).

5.2.3.1 Atomisierungsenergie

Die Atomisierung ist der Abschnitt des Herstellungsprozesses, in dem die Flüssigkeit in viele kleine Tropfen zerrissen wird. Beim verwendeten Büchi B-290 geschieht dies durch komprimierte Luft, die neben dem Produkt durch die Zweistoffdüse geleitet wird. Durch Einstellen des Verhältnisses von Luft zu Flüssigkeit kann die an der Düse entstehende Tröpfchengröße variiert werden [70]. Je höher der Lufteintrag, desto kleiner sind die entstehenden Flüssigkeitstropfen (Abbildung 5.23).

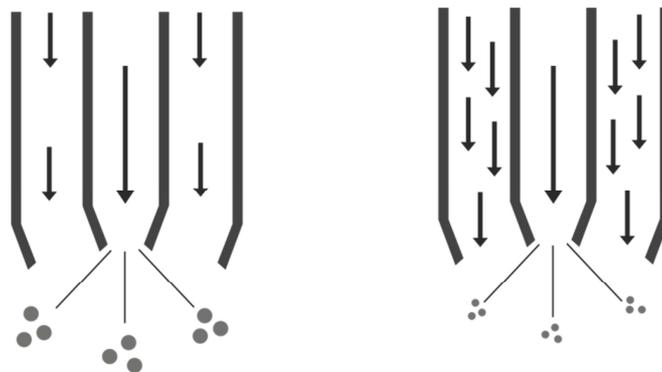
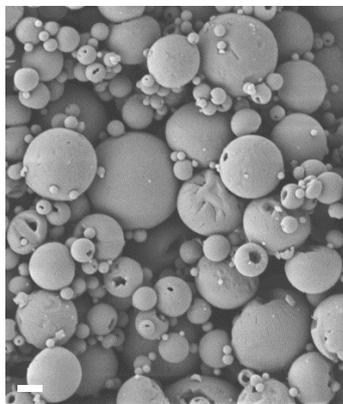
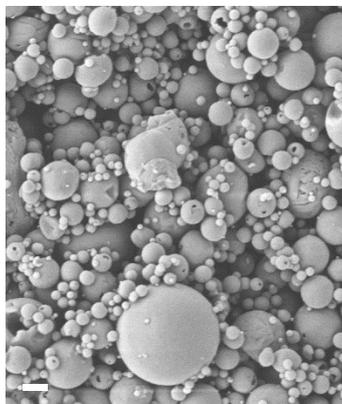
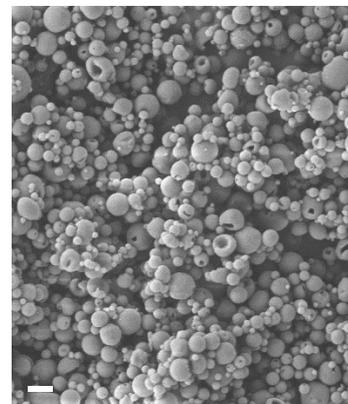


Abbildung 5.23: Modell zur Partikelbildung in Abhängigkeit der eingestellten Atomisierungsenergie anhand einer Zweistoffdüse; außen Luftstrom, innen Produktführung. Links: niedrige Atomisierung mit großen Flüssigkeitstropfen, rechts: hohe Atomisierung mit feiner Tropfenbildung

Die Flussrate der Atomisierungsluft des Büchi B-290 kann im Bereich von 0 L/h bis 710 L/h eingestellt werden. Dabei wird in dem durchgeführten Versuch die Trocknung bei maximaler und minimaler Atomisierung sowie mit dem Standard von 470 L/h durchgeführt. Alle weiteren Parameter werden nicht variiert. Die minimale Atomisierung liegt bei der entwickelten Trocknungsmethode bei 300 L/h. Bei geringerer Energie kommt es nicht zur ausreichenden Zerstäubung der Ausgangssuspension und

somit zu übermäßiger Feuchtigkeit im Sprühturm. Da das feuchte Produkt dem Luftstrom nicht folgen kann, gibt es unterhalb von 300 L/h keine Ausbeute.

Die Ergebnisse der Trocknung mit unterschiedlichem Zerstäuberluftstrom sind in Abbildung 5.24 zusammengefasst. Anhand der REM-Bilder kann eine Abnahme der Partikelgröße von links nach rechts mit zunehmendem Zerstäuberluftstrom ausgemacht werden. Dies wird auch durch die erhaltenen Daten der Laserdiffraktometrie bestätigt. Der x_{50} -Wert bei der niedrigen Atomisierung liegt bei 4,48 μm , während der x_{50} bei den Standardeinstellungen von 470 L/h auf 1,70 μm sinkt und bei 710 L/h sogar bei nur 1,34 μm liegt. Die FPF_{geo} steigt dementsprechend von 58,3% bei der niedrigen auf 96,3% bei der hohen Atomisierungsenergie. Vergleicht man die erhaltenen Daten der Laserdiffraktometrie mit denen, die sich aus der aerodynamischen Analyse ergeben, so ist dieser Trend für die FPF_{aero} weit weniger stark ausgeprägt. Der massenbezogene aerodynamische Durchmesser liegt bei allen Proben im selben Bereich (zwischen 1,56 μm und 1,77 μm) und scheint keinem Trend zu folgen. Die Feinpartikelfraktion steigt durch erhöhte Zerstäubung der Produktlösung von 65,4% auf 75,1%.

A: 300 L/h**B: 470 L/h****C: 710 L/h**

Atomisierung	Laserdiffraktometrie		NGI	
	x_{50}	FPF_{geo}	MMAD	FPF_{aero}
300 L/h	4,48±0,05 μm	58,3±0,6%	1,57±0,48 μm	65,4±2,4%
470 L/h	1,70±0,02 μm	93,9±0,3%	1,77±0,87 μm	75,8±4,5%
710 L/h	1,34±0,02 μm	96,3±0,6%	1,56±0,24 μm	75,1±2,3%

Abbildung 5.24: Einfluss der Atomisierung auf die Partikelgröße und Feinpartikelfraktion. Oben: REM-Bilder der Partikel, die mit variierender Atomisierungsenergie getrocknet wurden (A-C, Balken entsprechen 2 μm). Unten: Dazugehörige x_{50} -Werte, $\text{FPF}_{\text{geo/aero}}$ und MMAD.

Um eine potentielle Deposition in-vivo genauer zu beschreiben, wird das im Luftstrom fraktionierte Pulver in vier Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe beinhaltet alle Partikel die größer als 5 μm sind. Sie gelangen nicht in die Lunge, sondern werden in den oberen Atemwegen abgeschieden. Hier könnten die Partikel von im Rachenraum sitzenden Immunzellen des NALT aufgenommen werden. Alle kleineren Partikel gelangen in das luftleitende System der Lunge. Hier kann die Fraktion von 2-5 μm bei einer Inhalation aufgrund ihrer Trägheit nicht folgen und wird abgeschieden, wobei sie am Mukus hängen bleibt. Durch die Zilien wird sie zurück in die oberen Atemwege transportiert. Die Fraktion zwischen 0,5-2 μm gelangt potentiell in die Bronchiolen und bis tief in die gasaustauschenden Regionen der Lunge [103]. Hier sitzen die alveolaren Makrophagen und respiratorischen DCs, die die Partikel aufnehmen können, aber auch der direkte Kontakt zu Immunzellen des Bluts ist durch die dünne Barriere möglich. Die letzte Fraktion stellt alle Partikel dar, die kleiner als 0,5 μm sind, diese Partikel sind so klein, dass sie dem Atemstrom beim Ausatmen folgen können und so die Lunge wieder verlassen.

In Abbildung 5.25 sind die drei mit unterschiedlichem Zerstäuberluftstrom erzeugten Pulver nach ihrer Deposition in diese vier Gruppen aufgetragen. Man sieht ein recht homogenes Bild, bei dem jede der vier Fraktionen etwa ein Viertel der Pulver ausmacht. Dabei sind die beobachteten Unterschiede nicht signifikant. Die Pulver werden etwa alle zur Hälfte in den oberen Bereichen der Lunge abgeschieden, ein Viertel gelangt in die tieferen Areale und der Rest wird potentiell wieder abgeatmet. Da im gesamten Respirationstrakt immunkompetente Zellen verteilt sind, ist die gleichmäßige Deposition des Pulvers in der Lunge positiv einzuschätzen. Es gibt keine Studien, die beschreiben in welchem Areal der Lunge nanopartikuläre Formulierungen bevorzugt aufgenommen und prozessiert werden. Ein spezifisches Targeting wird als eher nachrangig eingeschätzt.

Die Lungendeposition der sehr kleinen Partikel unter 0,5 μm kann durch Anhalten der Atemluft nach dem Inhalationsvorgang erhöht werden. Durch das verlängerte Zeitintervall wird die Wahrscheinlichkeit der Deposition des Pulvers durch Diffusion der Partikel erhöht [23].

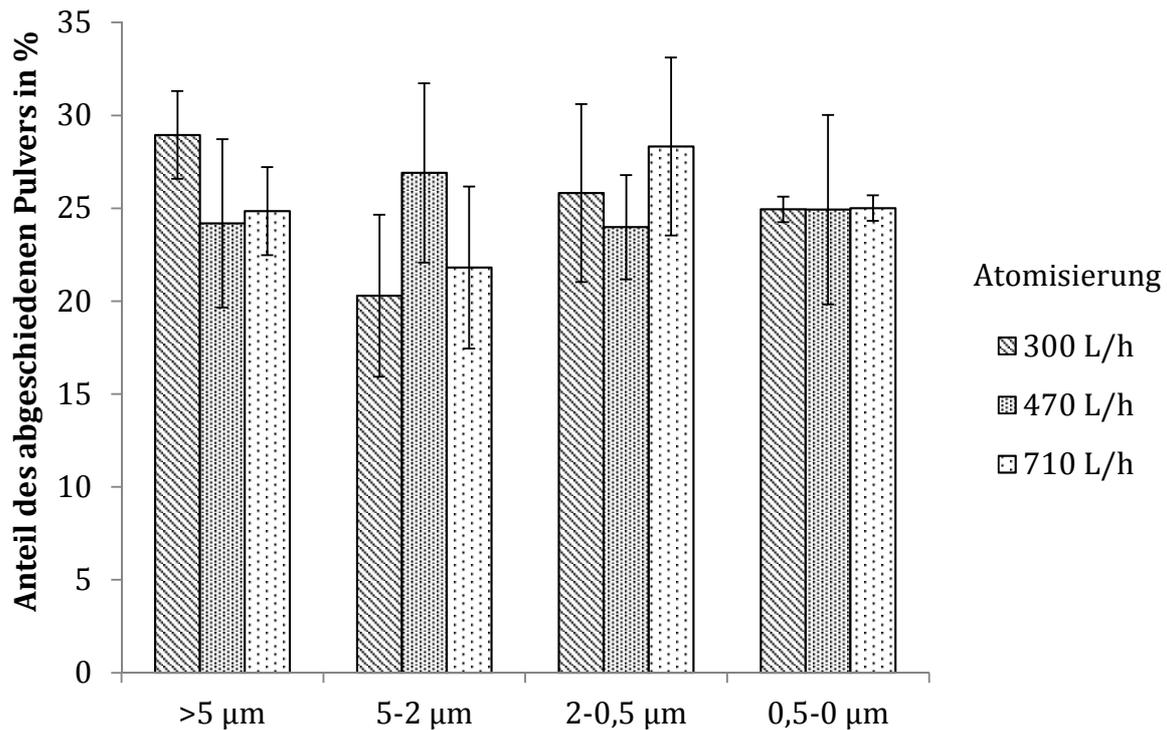


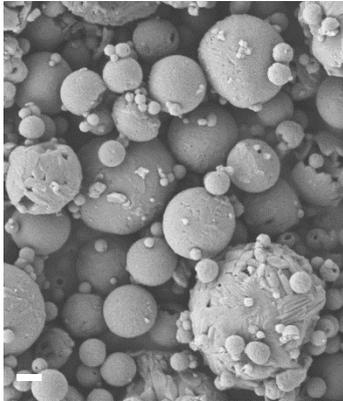
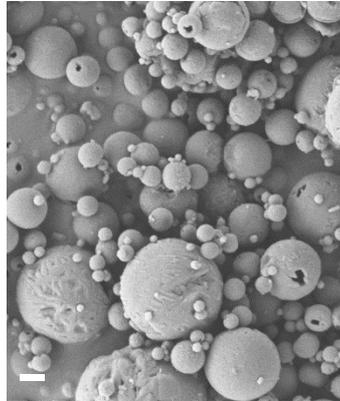
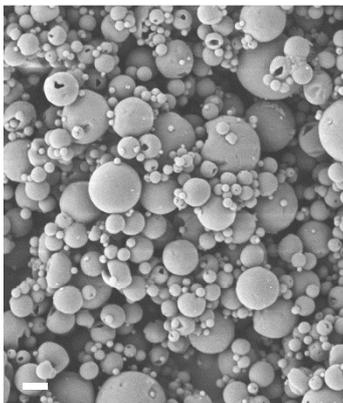
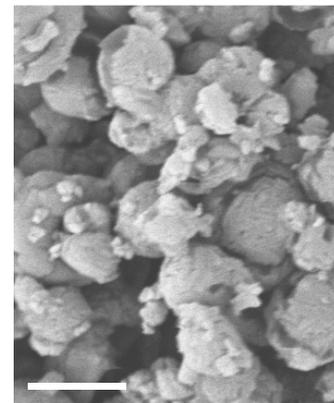
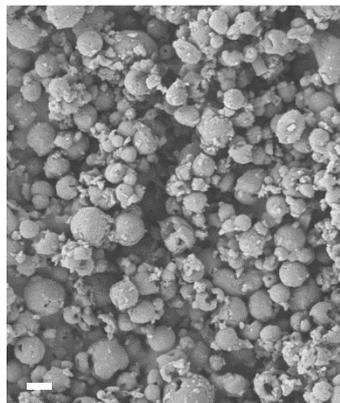
Abbildung 5.25: Depositionsprofil NGI der sprühgetrockneten Formulierung mit variierender Atomisierung (Mittelwert aus drei Messungen, $n=3$, Fehlerbalken)

5.2.3.2 Trockenanteil der Suspension

Im nächsten Versuch wird das Flüssigkeitsvolumen der Suspension nach der Partikelwaschung mit 1%iger Essigsäure variiert. So können verschiedene Feststoffkonzentrationen in der sprühzutrocknenden Suspension erzielt werden, wobei das Verhältnis zwischen Mannitol und Nanopartikel jedoch konstant gehalten wird. Je höher die Konzentration ist, desto schneller wird die Sättigungslöslichkeit des Mannitols beim Entzug des Lösungsmittels überschritten (s. Kapitel 5.2.1.1) und desto größer ist die resultierende Partikelgröße.

Dies lässt sich gut anhand der aufgenommenen REM-Bilder bestätigen (Abbildung 5.26). Die Partikelgröße nimmt mit abnehmender Feststoffkonzentration ebenfalls ab. Mit abnehmender Konzentration nimmt allerdings auch die Oberflächenrauigkeit zu, sodass die Partikel mit dem geringsten Feststoffanteil (7 mg/ml) viele nicht sphärische Anteile enthalten. Durch die großen Kontaktflächen der einzelnen Pulverpartikel kommt es zu einer erhöhten, auch makroskopisch erkennbaren, Agglomeration. Messbar ist dies durch die Laserdiffraktometrie: der x_{50} -Wertes ist mit 3,63 µm deutlich höher, als die

Partikel im REM erscheinen. Eine Dispergierung mit 3 bar ist nicht ausreichend, um die Partikel zu deagglomerieren.

A: 210 mg/ml**B: 84 mg/ml****C: 21 mg/ml****D: 7 mg/ml**

Trockenanteil	Laserdiffraktometrie		NGI	
	x₅₀	FPF_{geo}	MMAD	FPF_{aero}
210 mg/ml	3,72±0,31 µm	65,1±3,2%	1,11±0,02 µm	74,5±0,4%
84 mg/ml	3,49±0,39 µm	69,4±3,8%	1,65±0,48 µm	73,2±1,5%
21 mg/ml	1,70±0,02 µm	93,9±0,3%	1,77±0,87 µm	75,8±4,5%
7 mg/ml	3,63±0,05 µm	71,5±1,2%	1,42±0,14 µm	76,4±0,6%

Abbildung 5.26: Einfluss der Feststoffkonzentration auf die Partikelgröße und Feinpartikelfraktion. Oben: REM-Bilder der Partikel, die mit variierendem Feststoffanteil getrocknet wurden (A-D, Balken entsprechen 2 µm). Unten: Dazugehörige x₅₀-Werte, FPF_{geo/aero} und MMAD.

Auch hier wird das Pulver aerodynamisch charakterisiert. Der MMAD liegt, wie schon bei den Partikeln mit variierender Atomisierungsenergie, im Bereich von 1-2 µm, die Feinpartikelfraktion liegt bei etwa 75%. Erstaunlicherweise liegt auch der MMAD der niedrigsten Konzentration mit 1,42±0,14 µm deutlich niedriger als durch die Laserdiffraktometrie bestimmt (3,63±0,05 µm). Dies liegt allerdings nicht an einer besseren Dispergierung durch den Inhalator als durch 3 bar Druckluft. Vielmehr ist dies durch die

ähnlichen Dichten der sprühgetrockneten Partikel zu erklären. Vergleicht man den MMAD der 7 mg/ml-Konzentration-Probe mit dem einer Probe, die einen ähnlichen x_{50} -Wert aufweist, so fällt auf, dass der MMAD dieser ebenfalls im Bereich von 1-2 μm liegt. Auch die Aufteilung in die verschiedenen Fraktionen zur genaueren Bestimmung der Lungendeposition zeigt nur minimale Abweichungen in Abhängigkeit der Herstellmethode (Abbildung 5.27): Die Hälfte des Pulvers ist im Bereich der oberen Atemwege zu erwarten, der Rest erreicht die tiefen Abschnitte der Lunge, wovon potentiell die Hälfte die Lunge mit dem Atemstrom wieder verlässt.

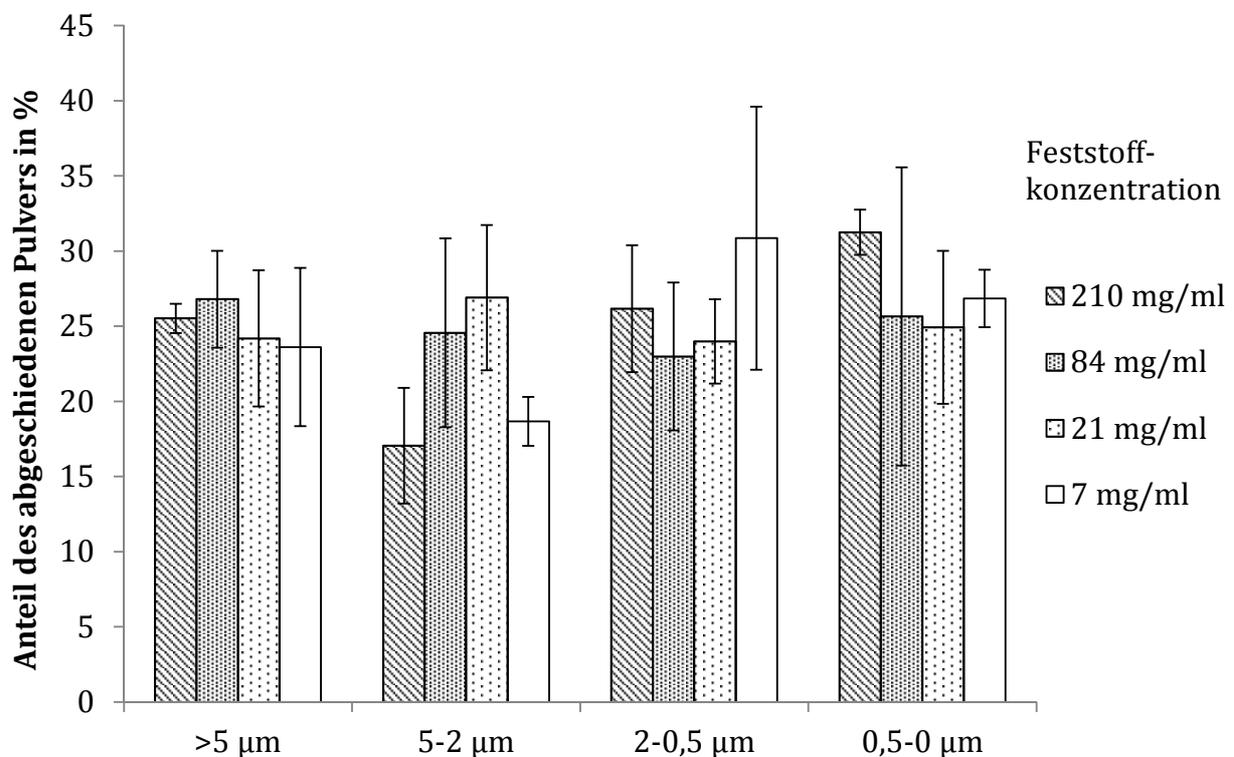


Abbildung 5.27: Depositionsprofil der sprühgetrockneten Formulierung mit variierender Feststoffkonzentration im NGI (Mittelwert aus drei Messungen, $n=3$, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung)

5.2.3.3 Sprühdüsendurchmesser

Zudem wird der Einsatz von verschiedenen Sprühdüsendurchmessern untersucht. Dabei wird vermutet, dass sich mit steigendem Düsendurchmesser auch die Primärtropfen und daraus resultierende Partikelgröße vergrößern müssten (Abbildung 5.28).

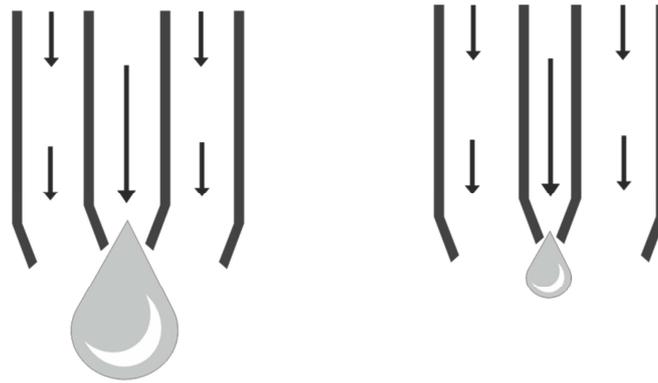
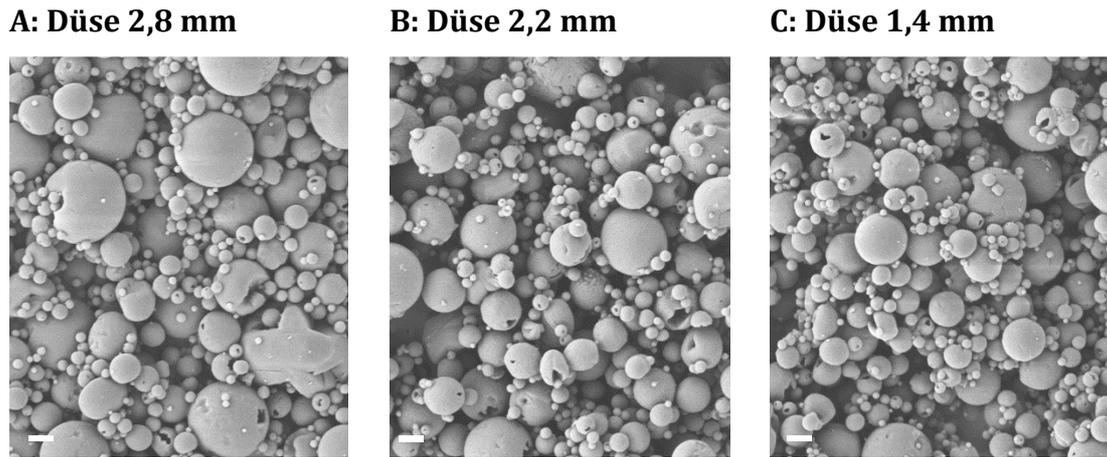


Abbildung 5.28: Modell zur Partikelbildung mit variierendem Düsendurchmesser anhand einer Zweistoffdüse; außen Luftstrom, innen Produktführung. Links: Düse mit großem Durchmesser und großer Tropfenbildung, rechts: Düse mit geringem Durchmesser und feinerer Tropfenbildung

Hier werden alle Standardparameter nach Kapitel 4.1.3 beibehalten; jedoch ist es bei der 2,8 mm großen Düse nicht möglich mit einer Atomisierungsenergie von 470 L/h zu trocknen. Es kommt zu unzureichendem Abriss der entstehenden Flüssigkeitstropfen. Die Trocknung mit der 2,8 mm Düse wird daher mit einer Zerstäubungsenergie von 600 L/h Zuluft durchgeführt. Generell ist die Erwartung, dass die bei der Zerstäubung der Suspension entstehenden Tropfen mit zunehmendem Düsendurchmesser ebenfalls größer werden, die entstehenden Partikel also auch wachsen. Dies lässt sich durch Betrachtung der REM-Bilder und der dazugehörigen Laserdiffraktometriedaten in Abbildung 5.29 bestätigen. Der x_{50} nimmt mit abnehmendem Düsendurchmesser von 2,37 μm bei der 2,8 mm Düse auf 1,70 μm mit der 1,4 mm Düse ebenfalls ab. Der Effekt ist nur schwach ausgeprägt.

Auch hier ist die FPF_{aero} im ähnlichen Bereich wie bei den anderen Herstellvarianten zuvor. Sie liegt zwischen 75,8% und 77,5%, der dazugehörige MMAD liegt im guten Bereich von 1-2 μm und folgt dem Trend der laserdiffraktometrischen Daten, denn er nimmt mit abnehmenden Düsendurchmesser ebenfalls ab.

Die Depositionen in Abbildung 5.30 zeigen das gleiche Profil wie zuvor.



Sprühdüse	Laserdiffraktometrie		NGI	
	x50	FPF _{geo}	MMAD	FPF _{aero}
2,8 mm	2,37±0,02 µm	86,9±0,4%	1,48±0,08 µm	76,8±3,3%
2,2 mm	2,07±0,02 µm	88,1±0,2%	1,70±0,29 µm	77,5±1,7%
1,4 mm	1,70±0,02 µm	93,9±0,3%	1,77±0,87 µm	75,8±4,5%

Abbildung 5.29: Einfluss des Düsendurchmessers auf die Partikelgröße und Feinpartikelfraktion. Oben: REM-Bilder der Partikel, die mit unterschiedlichem Sprühdüsendurchmesser getrocknet wurden (A-C, Balken entsprechen 2 µm). Unten: Dazugehörige x50-Werte, FPF_{geo/aero} und MMAD.

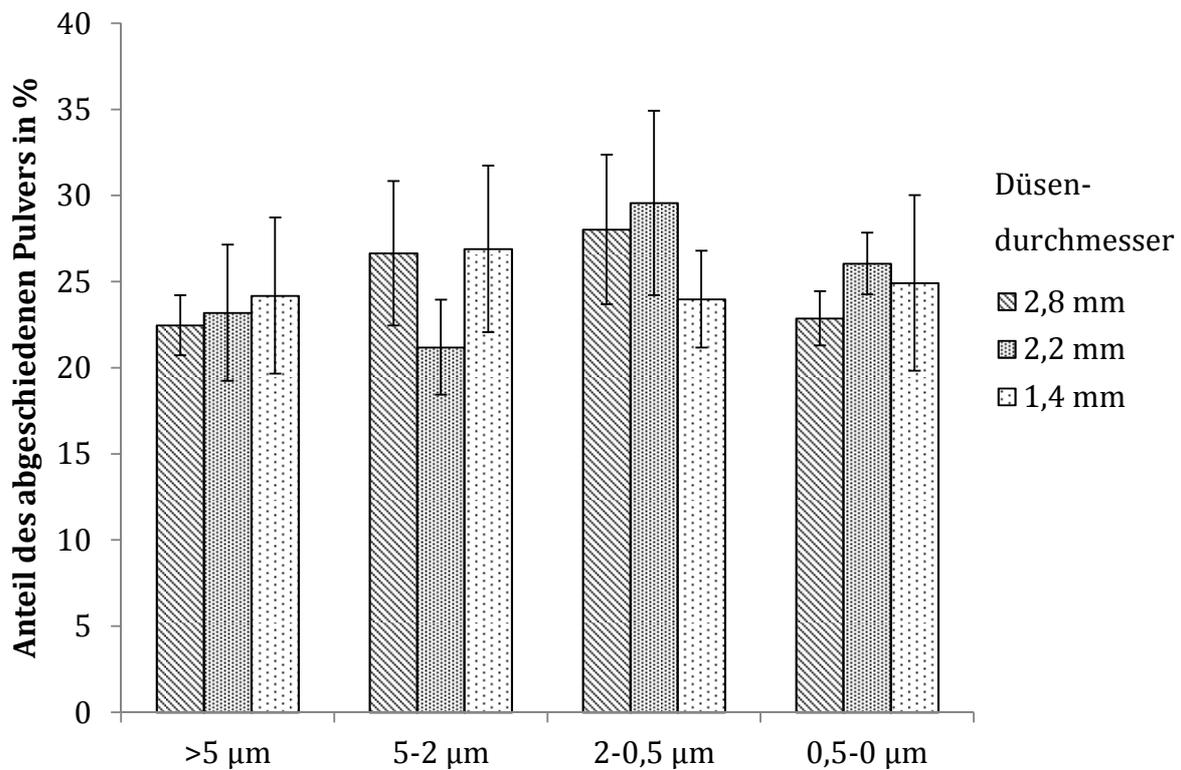


Abbildung 5.30: Depositionsprofil der sprühgetrockneten Formulierung mit variiertem Düsendurchmesser im NGI (Mittelwert aus drei Messungen, n=3)

5.2.3.4 Zusammenfassung

Die Partikelgrößenverteilung des sprühgetrockneten Produkts kann gut über die Parameter Atomisierungsluftstrom und Feststoffkonzentration gesteuert werden. Die über ein Variieren der Atomisierung entstehenden Oberflächen sind sehr glatt und die Partikel sind sphärisch, weshalb sie wenig Kontaktfläche für Wechselwirkungen untereinander bilden. Die durchschnittliche Partikelgröße kann im Bereich von 4,5 μm bis 1,4 μm ohne weitere Aufbereitungsmaßnahmen variiert werden, wodurch eine schnelle Prozessanpassung an das gewünschte Produkt möglich ist. Die Partikelgröße lässt sich zwar auch durch Einstellen der Feststoffkonzentration steuern, jedoch kommt es dabei zu umso größeren Pulveragglomeraten je kleiner die Partikel sind; die Partikel sind insgesamt unregelmäßiger geformt und bieten untereinander daher auch mehr Interaktionsfläche. Durch die Änderung des Düsendurchmessers kann die Partikelgröße - zumindest mit dem Büchi B-290 - nicht ausreichend gesteuert werden.

Dieser Versuch zeigt auch, dass der geometrische Durchmesser der Partikel gut variiert werden kann, während die aerodynamische Feinpartikelfraktion und die Deposition weitestgehend konstant bleiben. Das liegt daran, dass die durch Sprühtrocknung entstehenden Hohlkugeln eine geringe Dichte aufweisen. Sie können dem Luftstrom daher besser folgen, als vergleichsweise dichtere Materialien. Eine Änderung der Partikelgröße im untersuchten Bereich hat dementsprechend kaum Einfluss auf die Deposition in der Lunge. Dies zeigt, dass der Prozess über den Büchi B-290 trotz möglicher Prozessschwankungen sehr robust zur gleichen Lungendeposition führt.

Eine Steuerung der Partikelgröße zum Targeting eines definierten Lungenbereiches ist über den Büchi B-290 ohne Modifikation nicht möglich. Durch die begrenzte Höhe des Sprühturms und die milden Trocknungsbedingungen muss die Atomisierung sehr hoch gewählt werden, da es sonst zu keiner ausreichenden Trocknung des Lösungsmittels über die Strecke kommt. Die entstehenden Primärtropfen fallen so generell sehr klein aus, was dazu führt, dass auch die Maximalgröße der entstehenden Partikel begrenzt ist.

5.3 Antigen

5.3.1 Proteinbeladung

5.3.1.1 Abhängigkeit von der Zugabephase

Das Antigen Ovalbumin wird während der Erzeugung der Nanopartikel in die Partikel inkorporiert. Dabei ist es möglich, das Ovalbumin in der CMC-Phase oder in der Chitosanphase zu lösen, um es so dem Prozess hinzuzuführen. Die Partikelformung kann nach dem Lösen des Antigens in der jeweiligen Phase analog zur Standardformulierung durchgeführt werden. Dabei wird in diesem Versuch das Ovalbumin in einer Konzentration von 1000 µg/ml der Chitosanlösung zugegeben. Tabelle 5.15 zeigt den Einfluss auf die resultierende Partikelgröße und ihre Verteilung in Abhängigkeit der Zugabephase des Ovalbumins.

Tabelle 5.15: Durchschnittliche Partikelgrößen in Abhängigkeit der Zugabephase von Ovalbumin (n=3)

Formulierung	Partikelgröße	PDI
Unbeladene Partikel	270 nm	0,160
OVA-beladene Partikel (Chitosanphase)	208 nm	0,143
OVA-beladene Partikel (CMC-Phase)	224 nm	0,165

Generell sind die Partikel die aus der Lösung mit Antigen entstehen um 50-70 nm kleiner als die unbeladenen Partikel. Die aus der Zugabe des Ovalbumins in die Chitosanphase resultierenden Partikel weisen eine geringere Größe und einen engeren PDI auf, als Partikel denen das Ovalbumin zur CMC-Phase hinzugefügt wurde. Das Ovalbumin liegt, wie das Chitosan, in der sauren Lösung (pH 2,8) vorwiegend positiv geladen vor, denn sein isoelektrischer Punkt liegt bei pH 4,6. Wie auch das Chitosan kann es mit negativ geladenen Polymeren Assoziationen eingehen. In der Chitosanphase gelöst, könnte es sich so ebenfalls in dem primär entstehenden Komplex an die CMC anlagern (Abbildung 5.31, A). Ovalbumin enthält 20 Lysingruppen, die funktionelle NH₂-Reste tragen. Von diesen Lysingruppen zeigen nur drei in der nativen Form des Ovalbumins eine Reaktivität [104]. Das heißt, dass die positive Ladungsdichte des Ovalbumins, verglichen mit dem stark deacetyliertem Chitosan, als geringer einzustufen ist. Lagert sich ein Ovalbumin anstelle eines Chitosanmoleküls an die CMC an, so ist eine

weitere Reaktion durch Abnahme der lokalen Reaktivitätsverminderung unwahrscheinlicher, sodass die entstehenden Partikel kleiner ausfallen.

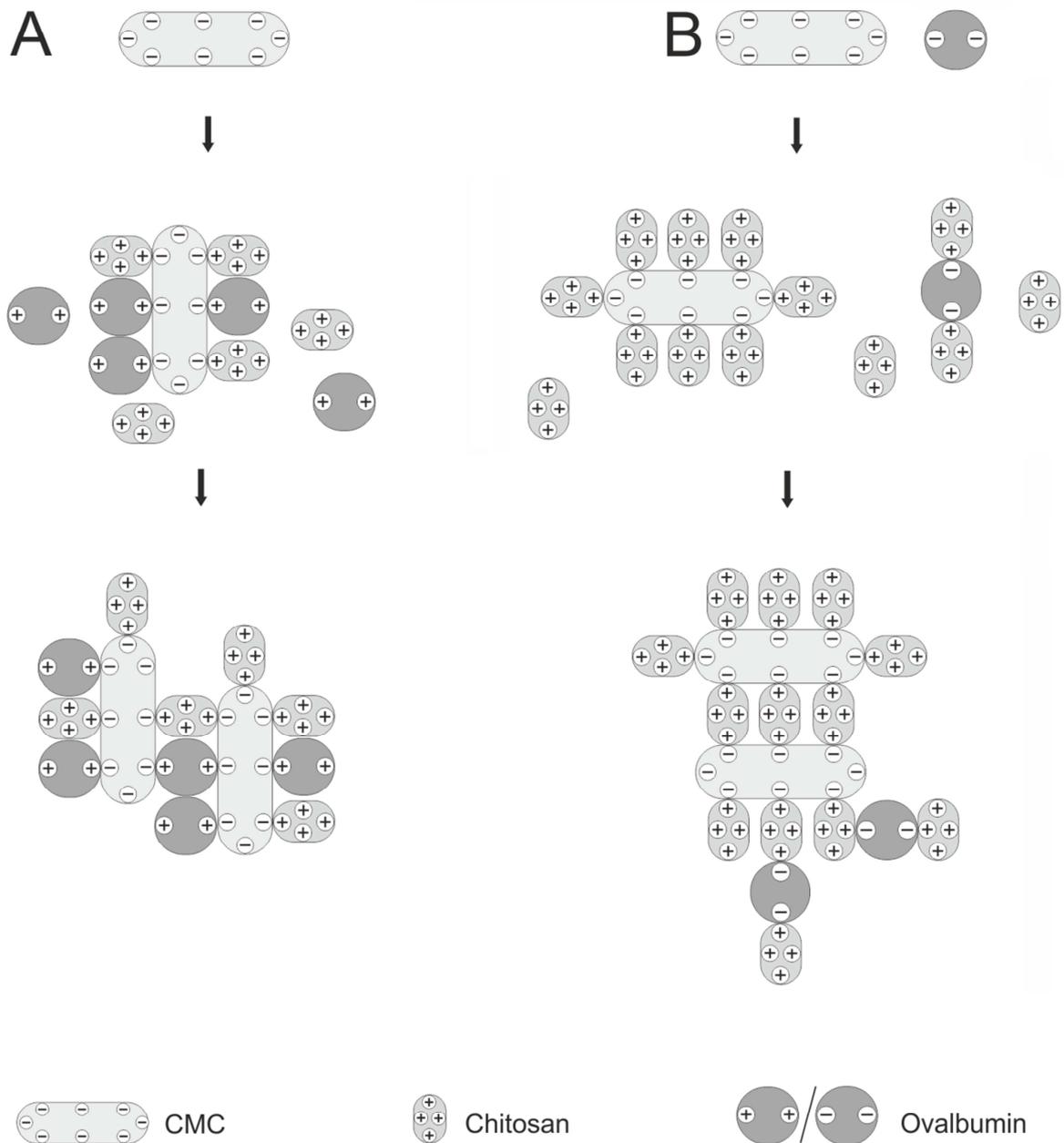


Abbildung 5.31: Schematische Darstellung der Partikelformung und Einkapselung von Ovalbumin. A) Ovalbumin liegt in der Chitosanphase gelöst positiv geladen vor, CMC wird der Phase zur Komplexbildung hinzugegeben; B) Zugabe des gelösten, negativ geladenen Ovalbumins über die CMC-Phase, diese Phase wird zur Chitosanlösung gegeben (Pfeile symbolisieren fortschreitende Zugabe der CMC-(OVA)-Lösung)

Durch Zugabe von CMC zu den entstehenden Primärpartikeln aus Chitosan, CMC und Ovalbumin wird, durch die Assoziation des Ovalbumins mit der CMC das Protein gleichmäßig in die Partikel eingebaut (Abbildung 5.31, A). Durch Einführen des

Ovalbumins über die CMC-Phase bilden sich hingegen neben den überwiegend entstehenden CMC-Chitosan-Primärpartikeln ebenfalls Ovalbumin-Chitosan-Primärpartikel aus (Abbildung 5.31, B). Diese werden durch weitere Zugabe von CMC schrittweise in die Partikel eingebaut.

Dies kann man auch an der in Abbildung 5.33 dargestellten Proteinbeladung sehen: Die Ovalbuminkonzentration in den Partikeln, denen das Antigen in der Chitosanphase hinzugefügt wird, besitzt eine mehr als doppelt so hohe Beladung wie die Partikel, bei denen das Ovalbumin in der CMC-Phase gelöst wird. Daher wird das Antigen zum Erreichen einer möglichst hohen Beladung über die Chitosanlösung zugeführt.

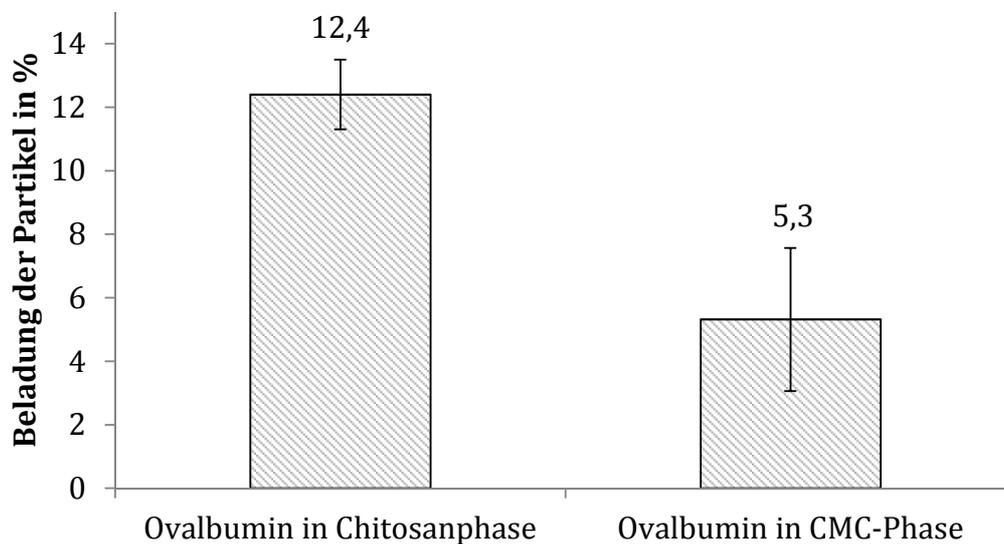
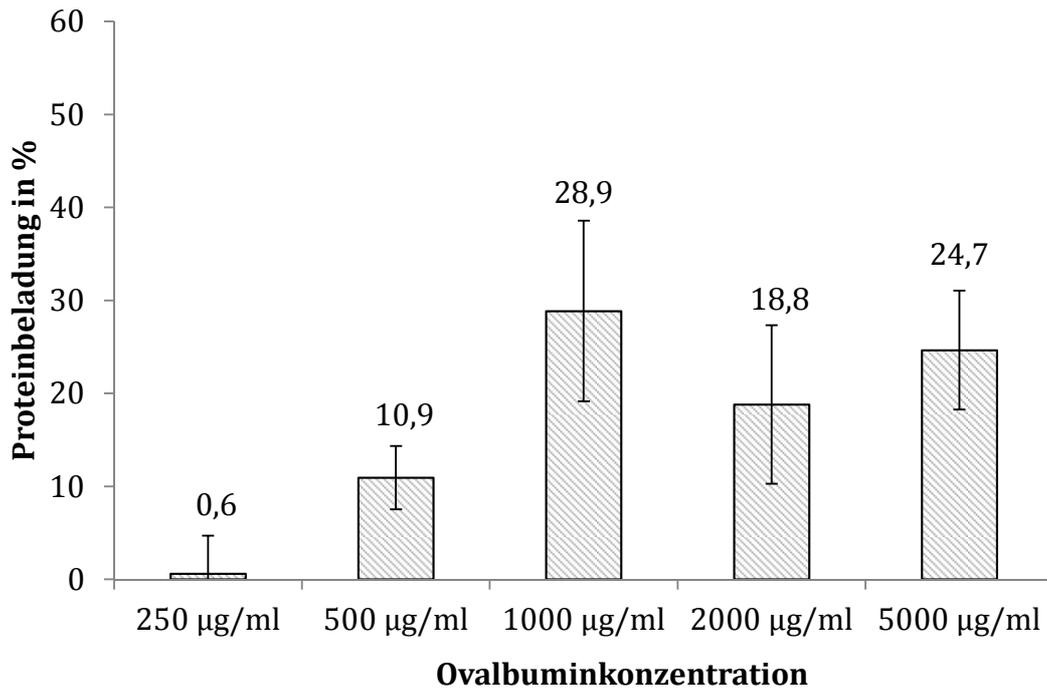


Abbildung 5.32: Proteinbeladung der Nanopartikel in Abhängigkeit von der Zugabephase vom Ovalbumin ($n=4$, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung)

5.3.1.2 Beladungseffizienz

Um die Beladungseffizienz der Partikel zu evaluieren, wird der Chitosanlösung ein steigender Anteil Ovalbumin zugesetzt und die Lösung anschließend mit der CMC-Lösung zur Partikelbildung versetzt. Die in Abbildung 5.33 aufgetragenen Konzentrationen beziehen sich auf die in der Nanosuspension enthaltene Gesamtkonzentration an Ovalbumin.



c(Ovalbumin)	Größe (nm)	PDI
250 µg/ml	182	0,174
500 µg/ml	187	0,196
1000 µg/ml	164	0,173
2000 µg/ml	144	0,231
5000 µg/ml	126	0,224

Abbildung 5.33: Proteinbeladung und Partikelgrößenverteilung in Abhängigkeit der eingesetzten Ovalbuminkonzentration ($n=4$, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung)

Dabei lässt sich feststellen, dass die Menge Ovalbumin, die von den Partikeln gebunden wird, zunächst mit zunehmender Konzentration steigt. Während die Beladung bei einem Einsatz von 250 µg/ml Ovalbumin bei einer LC von 0,6% (LE 2,4%) liegt, verzehnfacht sie sich durch eine Verdopplung der Konzentration (LC 10,9%, LE 21,8%). Das Maximum ist bei 1000 µg/ml Ovalbumin mit 28,9% Proteinbeladung (LE von 28,9%) erreicht. Danach deutet sich ein Plateau an, jedoch sind die Standardabweichungen der erhaltenen Messergebnisse ab 1000 µg/ml sehr hoch. Grund hierfür ist, dass die Proben vor der Vermessung stark verdünnt werden müssen, um in den Messbereich des BCA-Assays zu gelangen, sodass durch den Verdünnungsschritt eine weitere potentielle Fehlerquelle hinzugefügt wird. Mit steigendem Einsatz von Ovalbumin nimmt zudem die Partikelgröße ab. So liegt diese bei 182 nm beim Einsatz von 250 µg/ml Ovalbumin und sinkt auf 126 nm bei 5000 µg/ml Ovalbumin. Dies passt zu der im vorherigen Kapitel

diskutierten lokalen Reaktivitätsabnahme durch Einbau des Ovalbumins in die Partikel: Entstehende Partikel weisen mit zunehmender Ovalbumin Konzentration zunächst auch einen erhöhten Einbau des Proteins in die entstehenden Primärpartikel auf, da sie durch ihre hohe Konzentration das Chitosan mengenmäßig von den Bindungsstellen der CMC verdrängen. Durch den Einbau wird eine weitere Reaktion, und damit ein weiteres Partikelwachstum, aufgrund der geringen Reaktivität des Ovalbumins unwahrscheinlicher. Die Partikelformung schließt so mit steigendem Ovalbumineinsatz schneller ab. Die absolut inkorporierte Menge an Ovalbumin in den Partikeln ist, durch Abnahme der Partikelgröße vergleichbar; die Einkapselungseffizienz nimmt ab, da die Partikelbildung schneller abgeschlossen ist.

Aufgrund der geringsten Messwertschwankung, der guten Einkapselungseffizienz von über 20% und der Partikelgröße werden im weiteren Verlauf alle Partikel mit einer Antigenkonzentration von 500 µg/ml in Chitosan hergestellt.

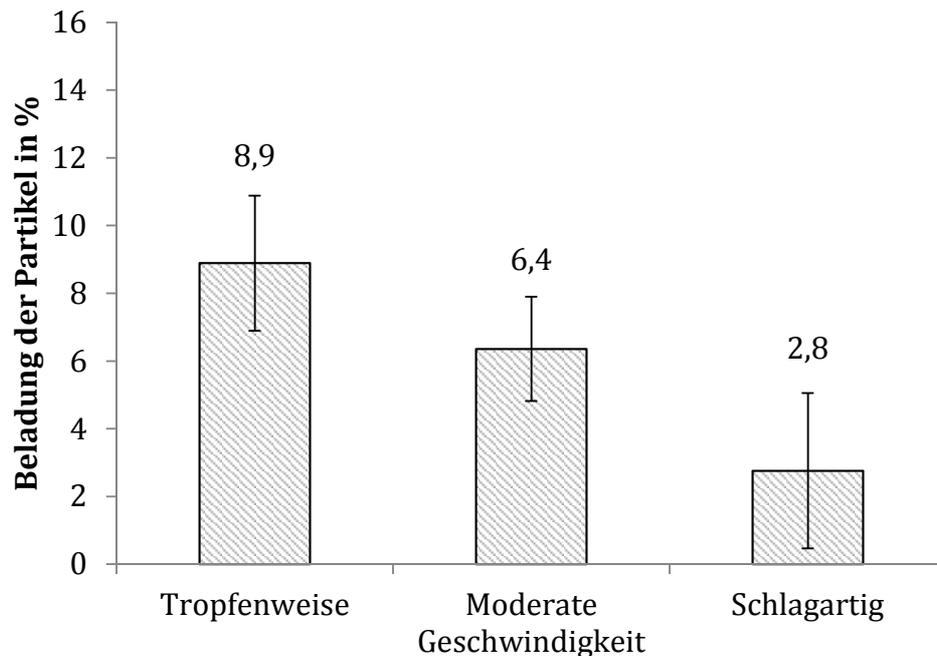
5.3.1.3 Einfluss der Zugabegeschwindigkeit

Wie in Kapitel 5.1.1.1.4 beschrieben gibt es keinen Einfluss der Zugabegeschwindigkeit auf die resultierende Partikelgröße und deren Verteilung. In dieser Versuchsreihe soll überprüft werden, ob dies auch auf beladene Nanopartikel zutrifft. Zudem wird untersucht, ob sich die Beladung der Partikel durch die Geschwindigkeit der Zugabe des Gegenions steuern lässt. Abbildung 5.34 vergleicht die Herstellung von drei Suspensionen mit einer Ansatzgröße von 20 ml.

Bei der Ersten wird die CMC tropfenweise über eine Pasteurpipette zu der Chitosan-Ovalbumin-Lösung gegeben. Die Zweite stellt die Herstellung mit einer moderaten Geschwindigkeit dar, bei der die CMC-Lösung durch kontinuierliches, langsames Gießen hinzugefügt wird. Bei der letzten Herstellmethode wird die CMC-Lösung schlagartig innerhalb weniger Sekunden überführt. Dabei ist folgender Trend zu erkennen: Je langsamer die Gegenionenlösung zu der Chitosan-Antigen-Lösung gegeben wird, desto höher ist die Partikelbeladung. Im Gegensatz dazu wird die Partikelgröße, wie auch bei den unbeladenen Partikeln, nur wenig von der Zugabegeschwindigkeit beeinflusst. Wird die die CMC sehr langsam zu der proteinhaltigen Chitosanlösung gegeben, so sind die resultierenden Partikel etwas größer. Die Beladungsrate deutet darauf hin, dass das Ovalbumin mehr Zeit braucht, um an die Partikel zu binden, als das Chitosan, sodass letzteres präferenziell eingebaut wird. Indem die CMC-Lösung langsam zu der Chitosan-

Ovalumin-Lösung gegeben wird, kann die Bindung des Proteins an die Primärpartikel deutlich erhöht werden. Dies kann zum Beispiel durch ein Assoziieren des Proteins an den Grenzflächen zwischen dem Partikel und der Lösung geschehen.

Um eine hohe Beladungsrate zu erzielen, sollte die CMC-Lösung möglichst langsam der Chitosan-Ovalbumin-Phase hinzugefügt werden.



Zugabegeschwindigkeit	Partikelgröße	PDI
Tropfenweise	230 ± 6 nm	0,179 ± 0,016
Moderate Geschwindigkeit	214 ± 2 nm	0,092 ± 0,017
Schlagartig	216 ± 5 nm	0,152 ± 0,017

Abbildung 5.34: Beladung der Partikel in Abhängigkeit von der Zugabegeschwindigkeit des Genions ($n=4$, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung)

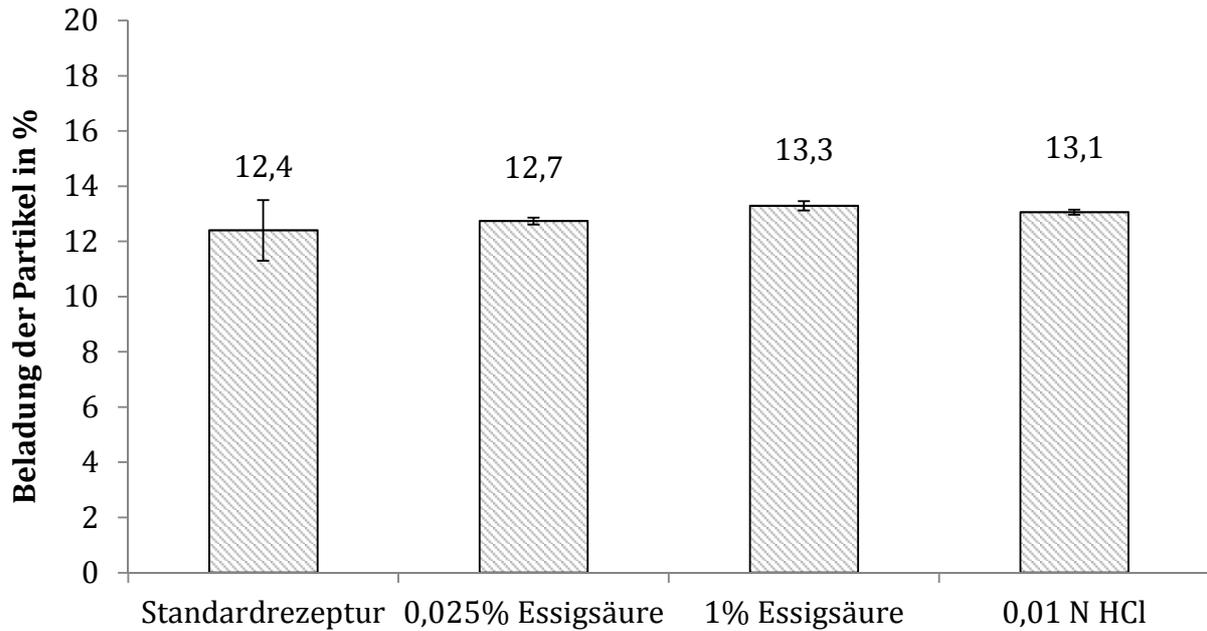
5.3.1.4 Einfluss der gewählten Säure

Im Folgenden wird überprüft, ob die verwendete Säure und ihre Konzentration einen Einfluss auf die Beladung der Partikel haben. Dafür wird das Chitosan in 2% (Standardrezeptur), 1% oder 0,025% Essigsäure, sowie in 0,01 N und 0,1 N Salzsäure gelöst und anschließend die ionische Gelierung durchgeführt (Tabelle 5.16).

Tabelle 5.16: pH-Werte der variierten Nanosuspensionen

Säure zum Lösen des Chitosans	pH-Wert Chitosanlösung	pH-Wert Nanosuspension
2% Essigsäure	2,78	2,99
1% Essigsäure	3,05	3,21
0,025% Essigsäure	3,53	3,85
0,01N Salzsäure	2,45	2,92
0,1 N Salzsäure	1,00	1,23

Dabei entstehen in allen Lösungen Nanopartikel im Bereich von 170-220 nm (PDI <0,2) mit Ausnahme der 0,1 N Salzsäure (Abbildung 5.35), bei der Partikel um 12 nm und mit einer breiten Verteilung entstehen. Vergleicht man die pH-Werte der eingesetzten Lösungen, so ist die 0,1 N Salzsäure mit einem pH Wert von 1,0 bzw. 1,23 nach Zugabe der CMC sehr sauer. Eine Partikelbildung mit der gesetzten Zielgröße um 200 nm ist erst ab einem pH-Wert von 2,45 (bzw. 2,92) möglich. CMC bildet im Bereich zwischen 2-10 stabile Lösungen [53]. Die freien Carboxylgruppen liegen unterhalb von pH 2 fast ausschließlich protoniert vor [105], wodurch kaum Reaktion mit den positiven Gruppen möglich ist. Die entstehenden Partikel weisen unabhängig von der Art der Säure sehr ähnliche Größen auf. Interessanterweise ist auch der resultierende Proteingehalt (Abbildung 5.35) mit 12-13% in allen geprüften Nanopartikeln vergleichbar. Die Proteinbeladung ist daher unabhängig von der Anzahl der protonierten Aminogruppen des Chitosans. Es ist davon auszugehen, dass die entstehenden Primärpartikel aus Chitosan, Ovalbumin und CMC im untersuchten pH-Bereich mit einer ähnlichen Zusammensetzung aufgebaut werden. Abweichungen können auf Unterschiede in der Zugabegeschwindigkeit der CMC-Lösung zurückzuführen sein, da der Prozess nicht automatisiert ist.



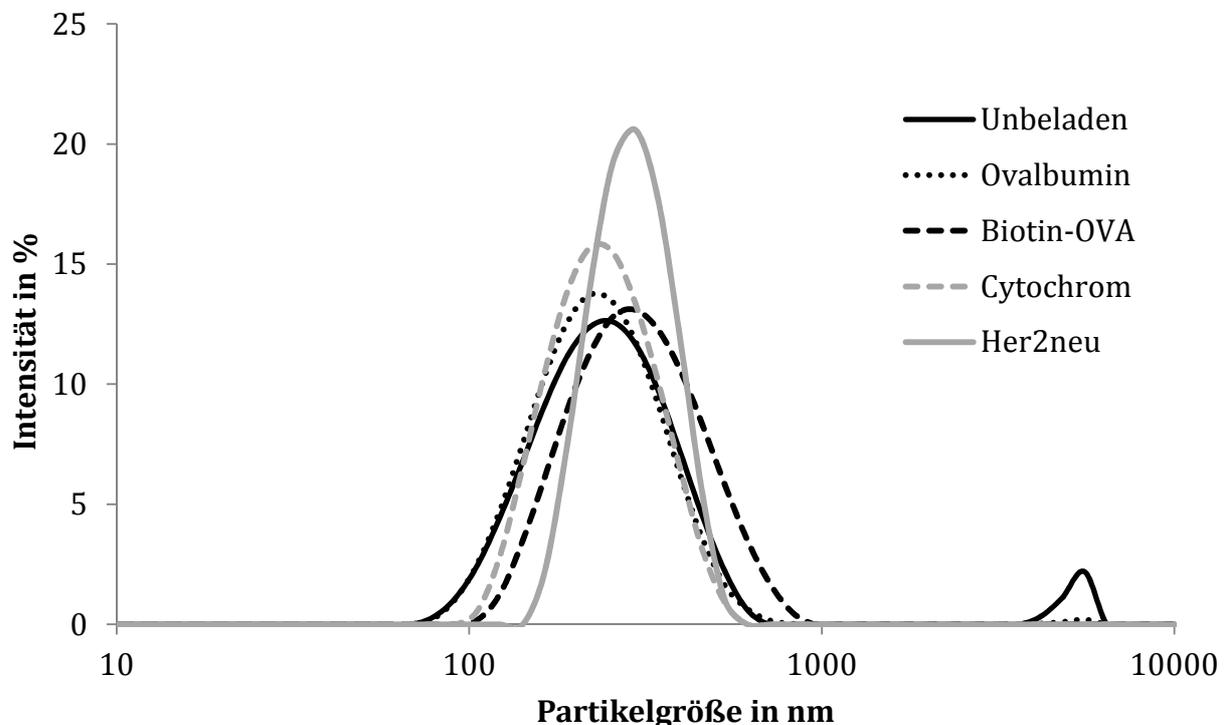
Formulierung	Partikelgröße	PDI
Standardrezeptur	214 nm	0,092
0,025% Essigsäure	173 nm	0,169
1% Essigsäure	171 nm	0,146
0,01 N Salzsäure	184 nm	0,180
0,1 N Salzsäure	12 nm	0,370

Abbildung 5.35: Proteinbeladung und Partikelgröße in Abhängigkeit von der eingesetzten Säure und -konzentration ($n=4$, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen)

5.3.1.5 Einfluss des Antigens

Alle bisherigen Optimierungen der Methode wurden mit dem Modellantigen Ovalbumin durchgeführt. Bestenfalls eignet sich die entwickelte Formulierung als Plattformtechnologie, in die auch andere Antigene eingebaut werden können. Beim Ersetzen durch ein anderes Antigen sollten die entstehenden Partikel auch in der gewünschten Größe von 200-400 nm anfallen, sowie sich mit einer möglichst hohen Beladung in die Partikel einbauen lassen. Die im Folgenden verwendeten Modellsubstanzen werden jeweils in einer Konzentration von 500 μ g/ml eingesetzt und über die Chitosanphase zugeführt. In Abbildung 5.36 sind die Partikelgröße, die Breite der Verteilung, die Proteinbeladung sowie die Einkapselungseffizienz bei Verwendung der verschiedenen Antigene aufgelistet. Die Partikelgröße nach der Sprühtrocknung und Redispergierung in 1% Essigsäure liegt bei allen getesteten Antigenen im Bereich von 200-300 nm. Die Partikelgröße wächst mit der Größe des Antigens, dieser Effekt ist

jedoch wenig ausgeprägt. Interessanter ist die Proteinbeladung, die ein substanzspezifischer Parameter ist. Bei Verwendung von Ovalbumin liegt die Beladung im Durchschnitt bei 9-13 %, durch Kopplung mit Biotin steigt sie auf etwa das Doppelte, 23,2%, an. Am Höchsten ist die Beladung mit Her2/*neu*, diese liegt bei 26,1%, während sie beim Cytochrom *c* lediglich 4,3 % erreicht. Betrachtet man die Größe des einzukapselnden Antigens, so fällt auf, dass mit zunehmender Größe, die Beladung in den Partikeln ansteigt. Da Proteine aufgrund ihrer Seitenketten Ladungen besitzen, nehmen diese mit wachsender Kettenlänge zu, sodass mehr Interaktionsmöglichkeiten mit den Polymeren bestehen. Durch die zunehmende Molekülgröße können die Antigene auch sterisch besser in den Partikeln gehalten werden, da kleine Moleküle eher aus dem Partikel diffundieren können, als große.



Formulierung	Partikelgröße	PDI	LC	LE	Anzahl Aminosäuren
Unbeladen	246 nm	0,296	-	-	-
Ovalbumin	215 nm	0,172	10%	20%	385
Biotin-Ova	272 nm	0,152	23,2%	46,4%	385*
Cytochrom <i>c</i>	217 nm	0,126	4,3%	8,6%	105
Her2/ <i>neu</i>	291 nm	0,334	26,1%	52,2%	630

Abbildung 5.36: Einfluss des Antigens auf die Partikelgröße und Beladung der Partikel (*= zzgl. Biotinanteil)

5.3.2 Methodenentwicklung für die Proteinbestimmung aus der Formulierung und Einflussfaktoren

Der Proteingehalt der Nanopartikel lässt sich durch zwei Methoden bestimmen: Bei der Ersten quantifiziert man *direkt* die in den Partikeln gebundene Proteinmenge. Für die zweite Methode bestimmt man diese *indirekt*, indem man die Menge an Protein quantifiziert, die nicht gebunden wurde (Abbildung 5.37). Anschließend wird die gebundene Menge als Differenz mit Hilfe der eingesetzten Menge an Protein berechnet. Für die direkte Bestimmung ist entscheidend, ein Lösungsmittel zu verwenden, in dem sich die Partikel vollständig lösen. Danach erfolgt die Quantifizierung des gelösten Proteins. Für die indirekte Bestimmung entfällt dieser Schritt: Man ermittelt den ungebundenen Anteil an Protein direkt aus dem Überstand der Lösung. Zwar ist der hier verwendete BCA-Assay im Gegensatz zu anderen Methoden, wie der Proteinbestimmung nach Lowry, weniger störungsanfällig, jedoch müssen bei der Anwendung dieses kommerziell erhältlichen Bestimmungskits mögliche Störfaktoren in den eigenen Proben berücksichtigt werden, um am Ende die Richtigkeit zu gewährleisten. Für die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche werden Ovalbumin-beladene Nanopartikel verwendet.

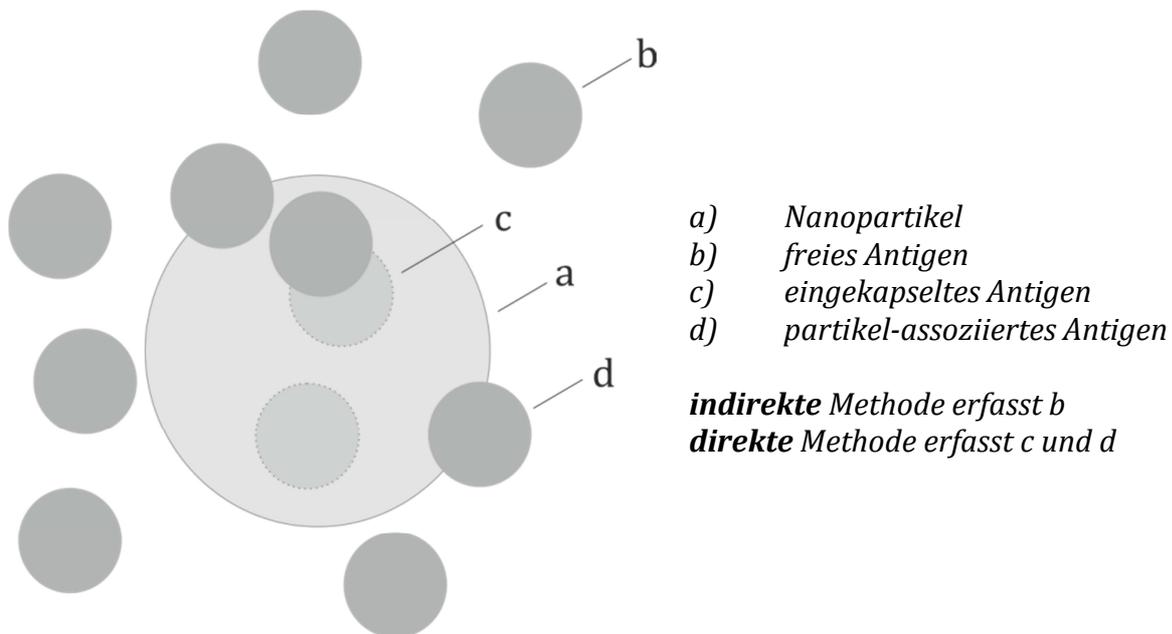


Abbildung 5.37: Lokalisation des Antigens in der Nanosuspension

5.3.2.1 Indirekte Bestimmung des Proteingehalts

Die ersten Versuche, aus dem Überstand der Suspension die Proteinmenge zu quantifizieren, führten zu nicht-reproduzierbaren Ergebnissen. Da das Chitosan durch seine Aminogruppen eine proteinähnliche Struktur aufweist, wird zunächst vermutet, dass es durch die noch in der Lösung befindlichen Chitosanreste zu einer Störung des Assays kommt. Zur Entstörung wird die Suspension mit einer definierten Menge Natronlauge alkalisiert. Da Chitosan im Alkalischen nicht löslich ist, können so Reste aus der Lösung entfernt werden. Das gefällte Chitosan und die Nanopartikel werden anschließend durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand vermessen. In Publikationen, die sich ebenfalls mit der Quantifizierung des Proteingehalts aus Chitosanpartikeln befassen, werden die Kalibrierlösungen zudem mit unbeladenden Nanopartikelsuspensionen versetzt, um den Effekt des Chitosans zu minimieren [106]. Da auch dieses Verfahren zu einer großen Streuung der Messergebnisse führt, werden die einzelnen Verfahrensschritte detaillierter betrachtet, wodurch die Testbedingungen genauer definiert werden können (Tabelle 5.17).

Vor allem der pH-Wert hat einen sehr hohen Einfluss auf das Testergebnis. Je höher dieser in der Probe ist, desto stärker entwickelt sich der farbige Kupferkomplex. Es ist daher nötig, den pH-Wert bei Probe- und Kalibrierlösungen exakt gleich einzustellen. Dieser Faktor kann als Hauptfehlerquelle für die breite Streuung der Messergebnisse ausgemacht werden. Durch eine 1:2 Verdünnung der Prüflösung mit konzentriertem PBS pH 7,4 ist es möglich, Schwankungen auszugleichen und eine geringere Streuung der Einzelmessungen zu erzielen.

Tabelle 5.17: Evaluierte Einflussfaktoren in der Durchführung des BCA-Assays

Verfahrensschritt	Variierter Parameter	Einfluss	Optimierung Methode	Ergebnis
Neutralisation und Fällung des freien Chitrosans mit NaOH	NaOH-Menge	Je höher der pH-Wert in der Probe, desto schneller reagieren die Reagenzien (Absorption nimmt zu)	Nanosuspension wird mit 1/10 des Probenvolumens 1 N Natronlauge versetzt	Freies Chitrosan wird aus dem System entfernt
Abtrennung des gefällten Chitrosans und der Nanopartikel durch Zentrifugation	Zentrifugationsintensität	Kein Einfluss auf den quantifizierten Proteingehalt in dem getesteten Bereich (6000-14000 U/min, 10 min)	Zentrifugation bei 14000 U/min für 10 min	Chitrosan und Nanopartikel werden abgetrennt
pH-Wert Angleichung	Verdünnung mit Pufferlösung	Minimierung des pH-Einflusses auf die Farbentwicklung des Assays	1:2 Verdünnung der Probe und Kalibrierlösungen mit Phosphat-Puffer pH 7,4 (10x)	pH-Wert ist in Probe- und Kalibrierlösung identisch; Farbentwicklung durch pH-Unterschiede werden minimiert
Inkubieren und Abkühlen des Assays	Abkühlzeit	Werte schwanken, bis die Platte vollständig von 37°C (Inkubation) auf Raumtemperatur abgekühlt ist (15-20 min)	Ablesezeitpunkt 15-20 min nach Inkubation bei 37°C	Temperatur ist in allen Proben identisch, somit konstanteres Messergebnis

5.3.2.2 Direkte Bestimmung des Proteingehalts

Um die eingekapselte Proteinmenge zu quantifizieren, müssen die Partikel zunächst aufgelöst werden. Da selbst die Zugabe von starken Säuren (1 N HCl, 1 N H₂SO₄) und verschiedenen Puffersystemen im pH-Bereich von 3,9-8,0 nicht dazu führt, dass sich der CMC-Chitosan-Komplex wieder auflöst, wird der pH-Wert als weniger relevanter Faktor zur Auflösung angenommen. Daher wird das Einbringen eines stärkeren Gegenions zum Chitosan erprobt. Durch Zugabe von Citronensäure zu konzentriertem (10x) Phosphatpuffer pH 7,4 erfolgt eine Auflösung. Als Auflösungsmechanismus wird angenommen, dass die Citronensäure, als kleines Molekül mit drei Carboxylresten, die CMC aus dem ionischen Komplex verdrängen kann (Abbildung 5.38).

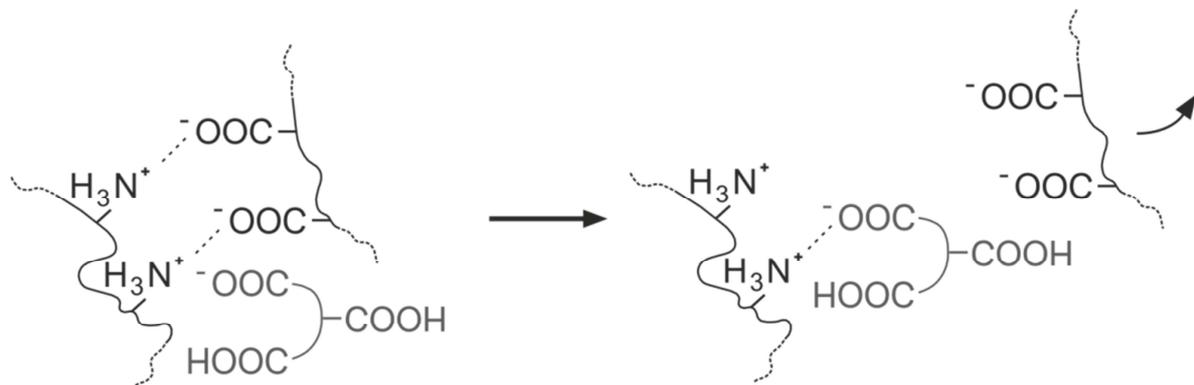


Abbildung 5.38: Schematische Auflösung der Nanopartikel durch Citronensäure.

Da es im Gegensatz zur CMC keine lange Polymerstruktur aufweist, entstehen aus diesem Komplex keine weiteren Nanopartikel. Dabei wird mit steigendem Anteil Citronensäure mehr Protein aus den Partikeln gelöst, bis sie sich schließlich komplett auflösen und die gesamte Proteinmenge freigesetzt wird (Tabelle 5.18). Diese Auflösung findet innerhalb von Sekunden statt. Der pH-Wert des konzentrierten Puffers bleibt dabei auch durch die Zugabe der Säure im neutralen bis leicht sauren Bereich (pH 5,8). Da die Farbentwicklung im anschließenden BCA Assay durch das eingesetzte Citronensäure-Puffer-System weniger stark ausfällt, wird die Menge des Reagenzes C (CuSO₄) verdoppelt und die Inkubationszeit von 2 Stunden auf 3 Stunden erhöht.

Tabelle 5.18 Freigesetzte Proteinmenge aus den Nanopartikeln in Abhängigkeit von der Citronensäurekonzentration

Medium	Prozentual freigesetzte Menge an Protein
PBS 7,4	31,0%
PBS 7,4 + 100 µg/ml Citronensäure	44,6%
PBS 7,4 + 1 mg/ml Citronensäure	51,4%
PBS 7,4 + 5 mg/ml Citronensäure	57,5%
PBS 7,4 + 10 mg/ml Citronensäure	100%

5.3.2.3 Vergleich der Bestimmungsmethoden

Die direkte und indirekte Bestimmung der Proteinmenge führen zu vergleichbaren Ergebnissen (Abbildung 5.39). Die direkte Methode ist vorzuziehen, wenn das Produkt in die sprühgetrocknete Form überführt wird, da sie die weniger aufwendige Methode darstellt. Zentrifugations- und Verdünnungsschritte entfallen, zudem gibt das erhaltene Ergebnis den Proteingehalt in einer definierten Menge trockenen Pulvers an, wodurch auch Berechnungs- und Verdünnungsfehler im Gegensatz zur indirekten Methode entfallen. Eine Schwachstelle stellt die Übertragung auf ungetrocknete Partikel dar, die als Pellet abzentrifugiert vorliegen. Das Pellet ist durch seine dichte Struktur nicht vollständig für die Citronensäure zugänglich. Abhilfe kann der Einsatz einer übersättigten Mannitollösung schaffen, bei dem das unlösliche Mannitol mit den Partikeln bei der Zentrifugation zusammen als Pellet anfällt. Dadurch erhöht sich der Abstand zwischen den einzelnen Nanopartikeln, die so ohne großen Aufwand in dem Citronensäure-Phosphatpuffer gelöst werden können. Die im Pellet zurückbleibende Restflüssigkeit variiert allerdings stark und bringt zudem noch gelöstes Protein in die Analyse mit ein. Eine gute Alternative für alle Proben, die nicht getrocknet werden, bietet die indirekte Methode. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn die Herstellung variiert wird und der Einfluss auf den Proteingehalt überprüft werden soll. Nachteil ist hier, dass die Proben relativ schnell nach Herstellung vermessen werden müssen, da das in Lösung befindliche Protein ungeschützt vorliegt und somit seine räumliche Struktur verändern kann. Dadurch kann es zu einer veränderten Farbentwicklung des Kupferkomplexes kommen, was das Ergebnis des BCA-Assays beeinflussen würde. Da im BCA-Assay eine Konzentration gemessen wird, müssen zudem alle Volumina in der

Herstellung möglichst genau überführt werden, ansonsten kann es gerade bei kleineren Chargen schnell zu falsch bestimmten Beladungsraten kommen.

Mit beiden Methoden kann der Proteingehalt der Partikel gut bestimmt werden; mit der indirekten aus der Nanosuspension, mit der direkten aus dem sprühgetrockneten Produkt. Im Zweifel lassen sich beide Methoden miteinander kombinieren, um ein noch genaueres Ergebnis zu erhalten.

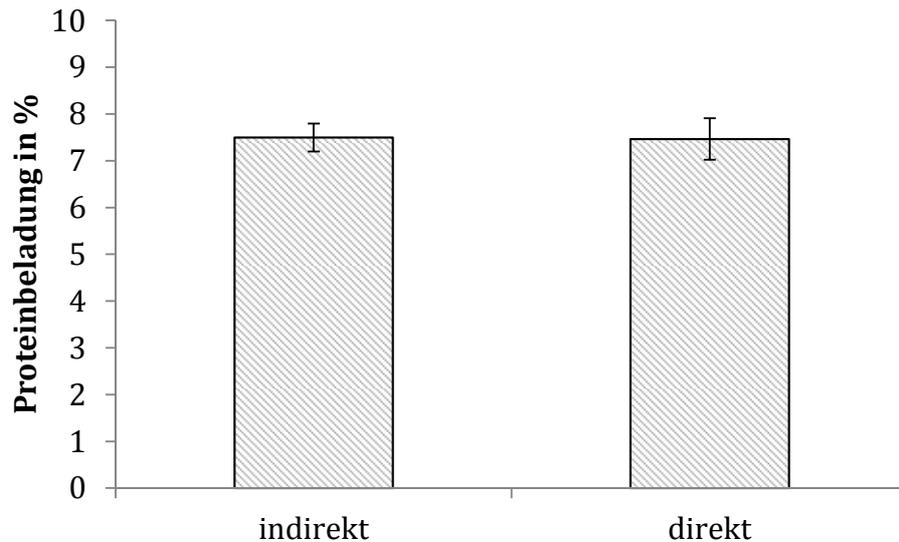


Abbildung 5.39: Ergebnisse aus einer indirekten und direkten Proteinbestimmung ($n=4$, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung)

5.3.3 Antigenintegrität

Mit der SDS-PAGE lassen sich Veränderungen in der Primärsequenz des Ovalbumins durch eine Änderung des Molekulargewichts nachweisen. So kann überprüft werden, ob das Antigen nach der Herstellung noch intakt ist. Dabei stellen vor allem das Lösen des Proteins im Säuren vor Partikelbildung und die thermische Belastung durch die Sprühtrocknung Prozesse dar, in denen das Protein degradieren kann [107]. Eine Fragmentierung des immunologisch relevanten Epitops im Bereich der Aminosäuren 257-264 wäre fatal, da hierbei die Aktivität des Proteins verloren gehen würde. Dies wäre durch Banden im unteren MW-Bereich sichtbar.

In Abbildung 5.40 sieht man die Gelpenetration eines Ovalbumin-Standards und die des Ovalbumins, welches aus den Partikeln freigesetzt wurde. Beide Proteinbanden

migrieren im elektrischen Feld identisch, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Primärstruktur des Antigens durch den Herstellprozess erhalten bleibt.

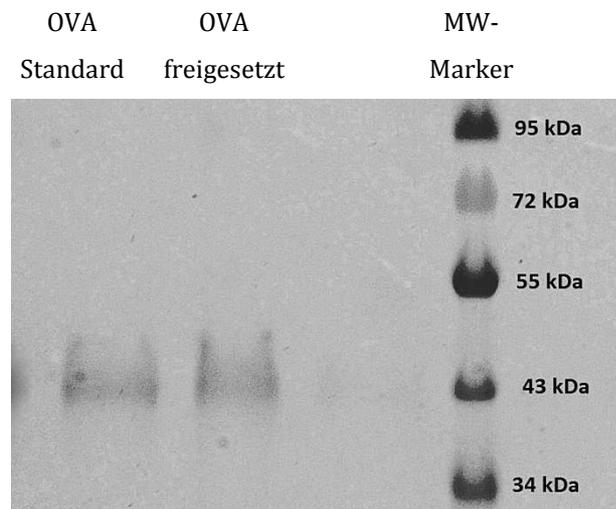


Abbildung 5.40: SDS PAGE; OVA-Standard, OVA aus Partikeln freigesetzt, MW-Marker (PageRuler™)

Es gibt verschiedene Thesen, wie die Sprühtrocknung ein Protein in einen stabilen Zustand überführen kann. Die Gängigste ist, dass die zugesetzte Zuckermatrix die Wasserstoffbrückenbindungen des verdunsteten Wassers ersetzen kann und so verhindert, dass es während der Trocknung zu einer Entfaltung des Proteins kommt [108]. Das Einbetten in eine Matrix führt zudem zu einer physikalischen Immobilisierung, die das Protein in seiner nativen Form fixiert [109]. Das es zu keiner Degradierung des Ovalbumins kommt, liegt aber auch daran, dass bei sehr milden Konditionen mit einer Auslasstemperatur von 35°C getrocknet wird. Die Denaturierungstemperatur des Ovalbumins liegt mit 84,5°C [110] deutlich höher.

5.3.4 Freisetzungsprofil

Die Freisetzung wurde in unterschiedlichen Medien mit Ovalbumin-beladenen Nanopartikeln durchgeführt. Im optimalen Fall setzen die Partikel innerhalb von 24 Stunden die gesamte Antigenmenge frei, um einen Immuneffekt auszulösen. Da die Partikel nach ihrer Aufnahme in unterschiedliche Zellkompartimente gelangen können, wird die Freisetzung des Antigens in verschiedenen Medien untersucht. Die Partikel quellen über die Zeit in saurem Medium, daher wird vermutet, dass hier die

Bedingungen für eine vollständige Antigenfreisetzung am günstigsten sind. Die beiden Freisetzungsverläufe der Partikel in 0,01 N HCl, pH 2,45, als Beispiel für ein saures Medium, und in Phosphatpuffer, pH 7,4, als Beispiel für ein neutrales Medium, sind in Abbildung 5.41 dargestellt.

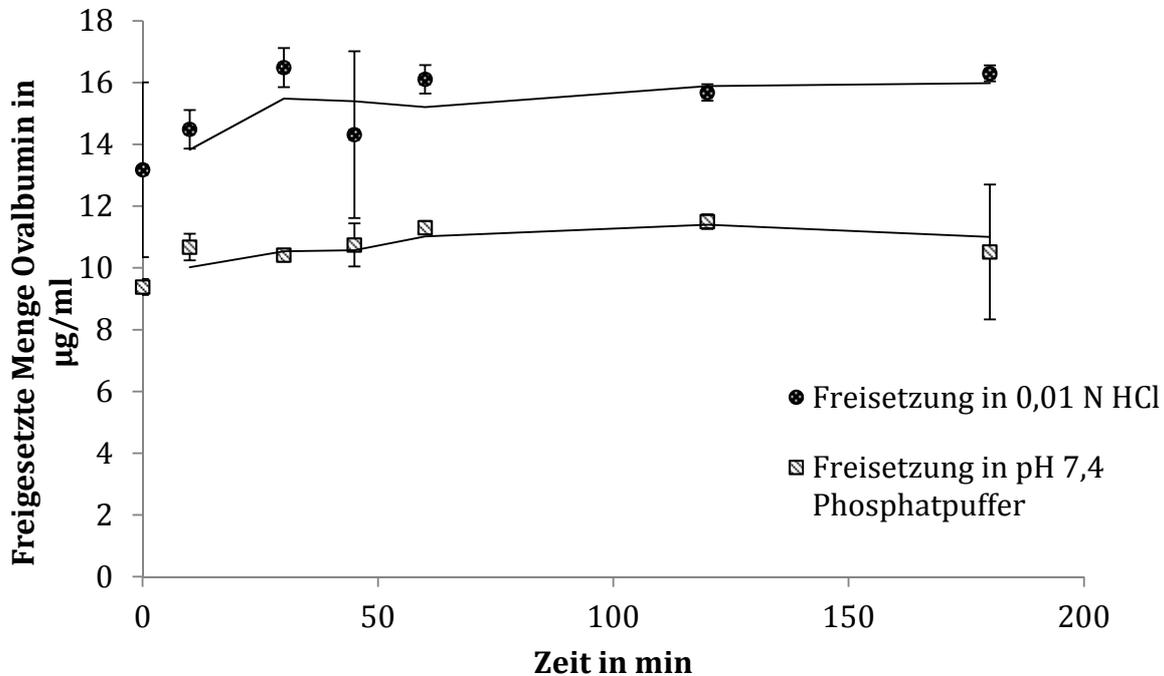


Abbildung 5.41: Freisetzungskinetik von Chitoscience 90/10 in 0,01N HCl und Phosphatpuffer pH 7,4 bei Raumtemperatur, Gesamt-Proteinmenge 45 µg/ml (n=4, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung)

Auf dem ersten Blick fällt auf, dass im Vergleich zum Phosphatpuffer die Partikel in 0,01 N Salzsäure mehr Ovalbumin freisetzen. Dies liegt an der Quellung der Partikel im Sauren, wodurch das Antigen besser aus den Partikeln diffundieren kann. Allerdings ist das erreichte Maximum von etwa 16 µg/ml (29,3%) deutlich unter der in den Partikeln enthaltenen Antigenmenge von 45 µg/ml (100%). Auch fällt auf, dass sich die Freisetzungskinetik in beiden Medien stark ähnelt: Nach den ersten 30 Minuten ist ein Plateau erreicht, das sich über den gesamten Freisetzungsverlauf nicht mehr ändert. Eine Messung der freigesetzten Menge nach 24 Stunden zeigt, dass keine weitere Freisetzung stattfindet (Tabelle 5.18). Dies lässt vermuten, dass nur das Ovalbumin aus den äußeren Schichten der Nanopartikel herausgelöst werden kann. Dazu passt, dass die prozentual freigesetzte Menge an Ovalbumin bei allen Freisetzungsvorläufen in der gleichen Größenordnung liegt.

Tabelle 5.19: Prozentual freigesetzte Mengen Ovalbumin aus den Nanopartikeln in Abhängigkeit vom gewählten Medium

Medium	Prozentual freigesetzte Menge des Gesamtgehalts an Protein nach 24 h
HCL 0,1 N	23,5%
HCl 0,01 N	29,3%
Phosphatpuffer pH 5,0	26,3%
Phosphatpuffer pH 6,0	14,9%
Phosphatpuffer pH 7,4	24,3%

Dieses Verhalten kann deutlich anders sein, wenn im Freisetzungsmedium intrazellulär vorhandene Enzyme oder Elektrolyte präsent sind, die zu einem Abbau der Chitosanpartikel beitragen [111]. In-vivo soll vor allem das in allen Geweben vorkommende Lysozym, eine unspezifische Protease, für den Abbau des Chitosans verantwortlich sein. Dabei ist die Abbaukinetik abhängig von der Anzahl und der Verteilung vorhandener Acetylreste, sowie dem Molekulargewicht des Chitosans. Je höher das Chitosan deacetyliert ist und je länger seine Kettenlänge, desto langsamer der Abbau [48]. Hinweise auf einen enzymatischen Abbau in-vivo geben auch die gemessenen Aktivierungen von immunkompetenten Zellen (Kapitel 5.6.4 und 5.6.5).

5.4 Lagerstabilitätsuntersuchungen

Zur Überprüfung der Stabilität werden drei Chargen der Standardformulierung mit Ovalbumin hergestellt. Jede Charge wird unter zwei verschiedenen Bedingungen eingelagert: Im Kühlschrank (2-8°C) bei Umgebungsfeuchte und bei 25°C und 60% relativer Luftfeuchtigkeit (rF). Als Einlagerungsgefäß werden Vials aus Glas gewählt, die mit einem Gummistopfen verschlossen und anschließend mit einer Aluminiumkappe gekrimpt sind. Als Beurteilungskriterien der Lagerstabilität werden die Redispergierbarkeit der Partikel, der Proteingehalt und die Integrität (BCA-Assay, SDS-PAGE), die Partikelgrößenverteilung und die Dispergierbarkeit des Pulvers mit dem Cyclohaler (Laserdiffraktometrie) definiert.

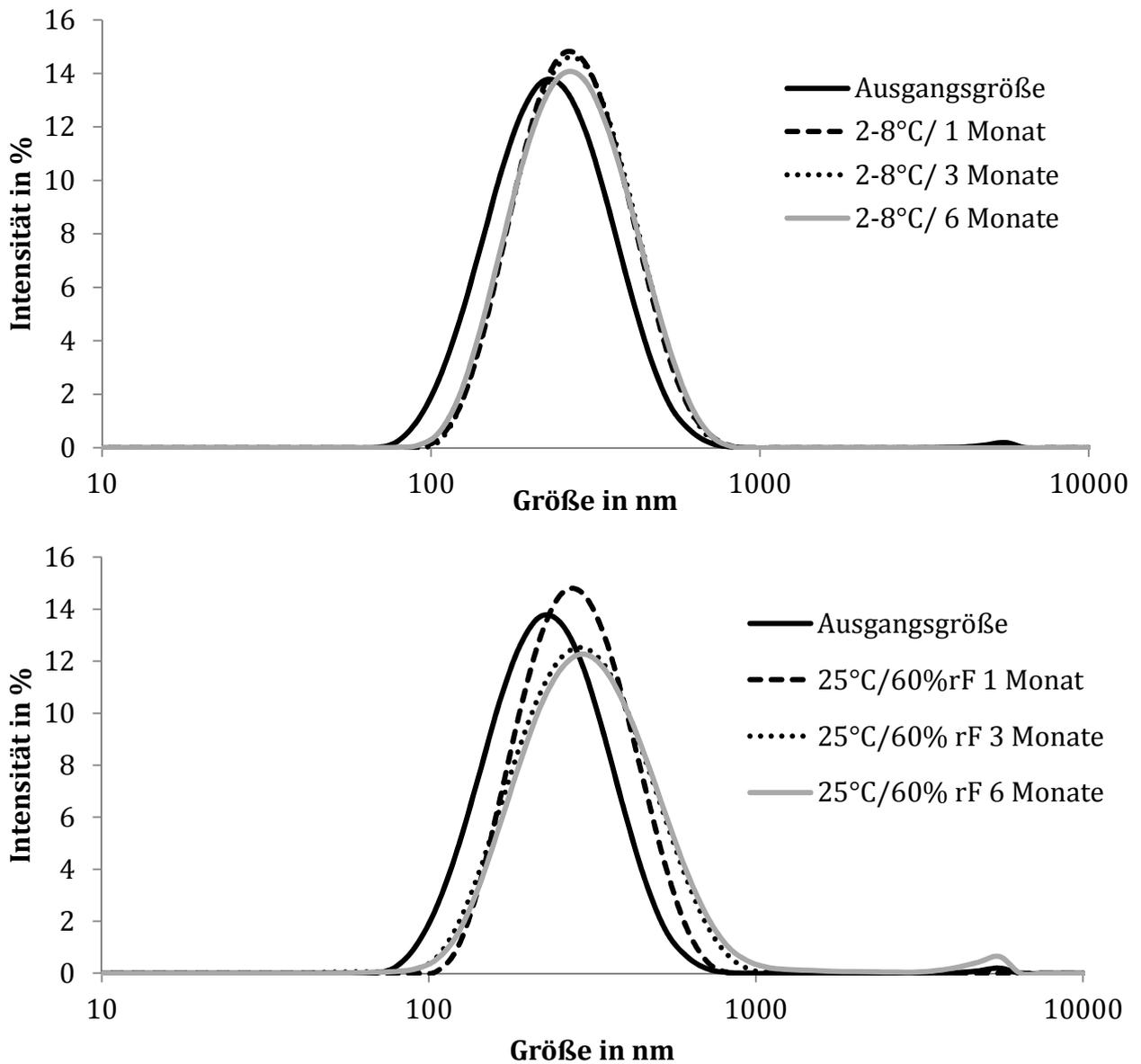
5.4.1 Redispergierbarkeit und Partikelgröße der Nanosuspension

Die Redispergierbarkeit und die anschließend gemessene Partikelgröße werden überprüft, um sicherzustellen, dass die Partikel nach der Lagerzeit von 6 Monaten weiterhin in den Größenbereich für eine zelluläre Aufnahme überführbar sind. Dazu wird das Pulver mit 1%iger Essigsäure (HAc) oder Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS) versetzt, kurz geschüttelt und die Partikelgröße bestimmt. Die Änderung der Primärpartikelgröße über die Lagerzeit ist in Abbildung 5.42 für die Redispergierung in 1% Essigsäure und in Abbildung 5.43 in PBS als Intensitätsverteilung dargestellt.

Man sieht eine initiale Partikelvergrößerung innerhalb des ersten Monats unabhängig von den Lagerungskonditionen. Des Weiteren lässt sich vor allem bei der Lagerung bei 25°C/60% rF eine Agglomeratbildung beobachten; erkennbar an dem über die Zeit wachsenden Peak im unteren Mikrometerbereich. Durch diesen bimodalen Verlauf kommt es zu einer scheinbaren Erhöhung der durchschnittlichen Partikelgröße und des PDIs. Tatsächlich ist die Aussagekraft der beiden Werte als begrenzt anzusehen. Hier sei auf Tabelle 5.20 verwiesen, die die Partikelgröße in Abhängigkeit der aufgewandten Dispergierungsenergie betrachtet. Verwendet man zur Dispergierung unterstützend ein Ultraschallgerät, so lassen sich die Agglomerate wieder dispergieren; die gemessene Größe und der PDI nehmen ab.

Tabelle 5.20: Partikelgröße und -verteilung der Charge 2 in PBS pH 7,4 in Abhängigkeit von der aufgewandten Dispergierungsenergie

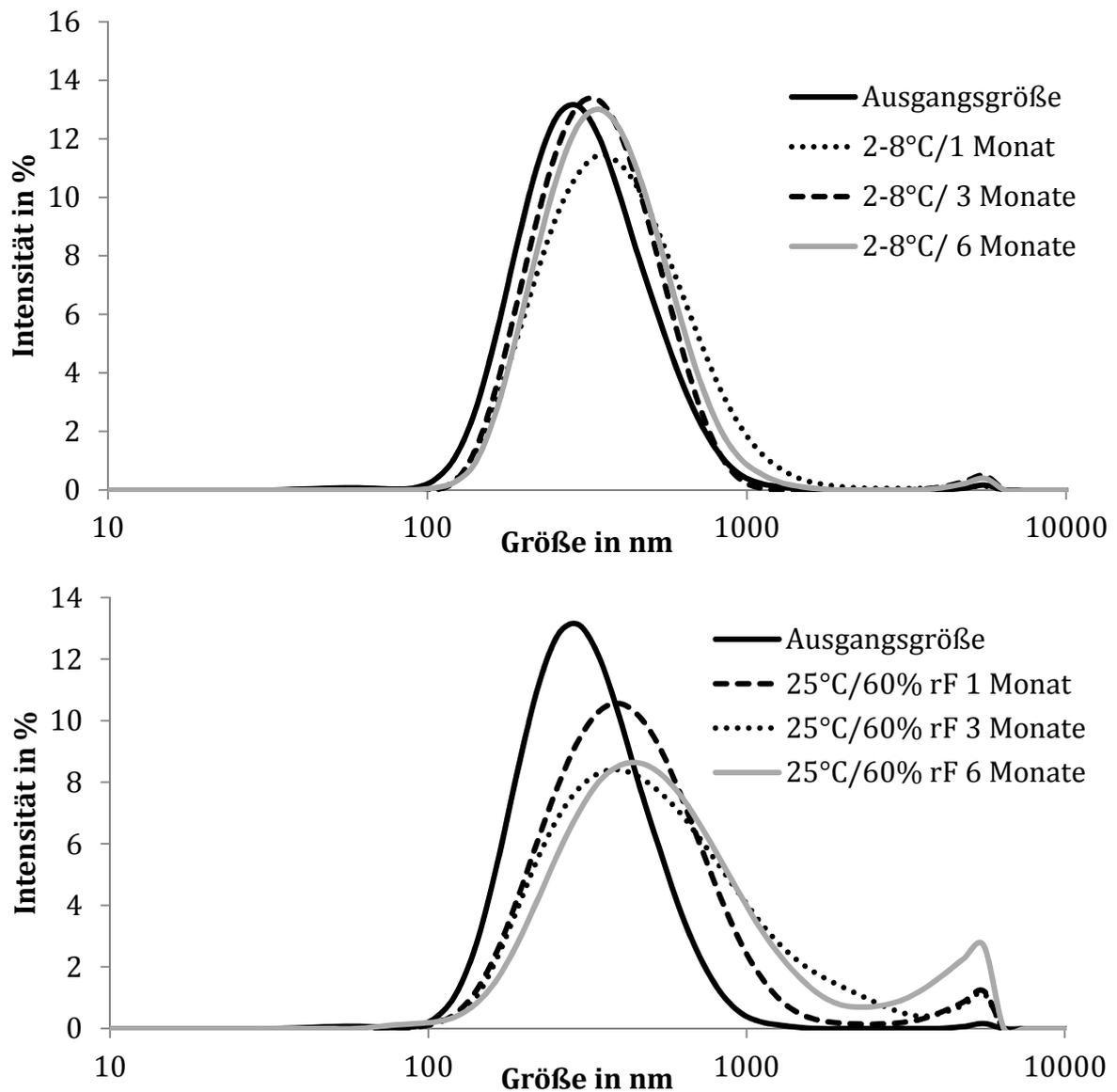
Probe	redispergiert	+10 min Ultraschall	+15 min Ultraschall
Charge 2	448 nm	408 nm	396 nm
25°C/60rF (3 Monate)	PDI 0,408	PDI 0,272	PDI 0,305



2-8°C	Größe (nm)	PDI
Ausgangsgröße	215 ± 20	0,172 ± 0,028
1 Monat	248 ± 2	0,158 ± 0,022
3 Monate	247 ± 4	0,151 ± 0,013
6 Monate	244 ± 9	0,172 ± 0,004

25°C/60% rF	Größe (nm)	PDI
Ausgangsgröße	215 ± 20	0,172 ± 0,028
1 Monat	254 ± 3	0,159 ± 0,009
3 Monate	261 ± 2	0,200 ± 0,005
6 Monate	279 ± 5	0,245 ± 0,015

Abbildung 5.42: Größe der Nanopartikel redispergiert in 1% HAc in Abhängigkeit der Lagerzeit. Oben: Partikel bei 2-8°C gelagert, unten: Partikel bei 25°C/60% rF (n=3, Mittelwert aus drei Chargen)



2-8°C	Größe (nm)	PDI
Ausgangsgröße	290 ± 14	0,258 ± 0,042
1 Monat	338 ± 6	0,215 ± 0,014
3 Monate	312 ± 9	0,209 ± 0,009
6 Monate	333 ± 15	0,222 ± 0,006

25°C/60% rF	Größe (nm)	PDI
Ausgangsgröße	290 ± 14	0,258 ± 0,042
1 Monat	380 ± 3	0,292 ± 0,020
3 Monate	425 ± 20	0,358 ± 0,047
6 Monate	477 ± 33	0,406 ± 0,022

Abbildung 5.43: Größe der Nanopartikel redispergiert in PBS pH 7,4 in Abhängigkeit der Lagerzeit. Oben: Partikel bei 2-8°C gelagert, unten: Partikel bei 25°C/60% rF (n=3, Mittelwerte aus drei Chargen)

Agglomerate, die durch Lagerung entstehen, lassen sich durch Essigsäure besser redispergieren als durch PBS; dies ist erkennbar an dem Peak im Mikrometerbereich, der nach Dispergieren im Säuren kleiner ausfällt als bei pH 7,4 und unabhängig von den Lagerbedingungen ist. Dies kann auf Assoziationen von räumlich nah zusammenliegenden Nanopartikeln zurückzuführen sein. Da ein Teil der Polymerladungen auch nach der ionischen Gelierung frei vorliegt, können diese freien Ladungen interpartikulär in Wechselwirkung treten. Die über die Lagerung ausgebildeten Verknüpfungen müssen von der Aminogruppe des Chitosans ausgehen, da sie sich durch Ansäuern des Redispergiermediums infolge einer Protonierung wieder lösen können.

Zur zusätzlichen Visualisierung wurden lichtmikroskopischen Aufnahmen der Pulverproben (nach 6 Monaten Lagerung) beider Lagerbedingungen, redispergiert in PBS, gemacht (Abbildung 5.44). Auch in diesen ist die vermehrte Agglomeratbildung bei 25°C/60%rF sichtbar.

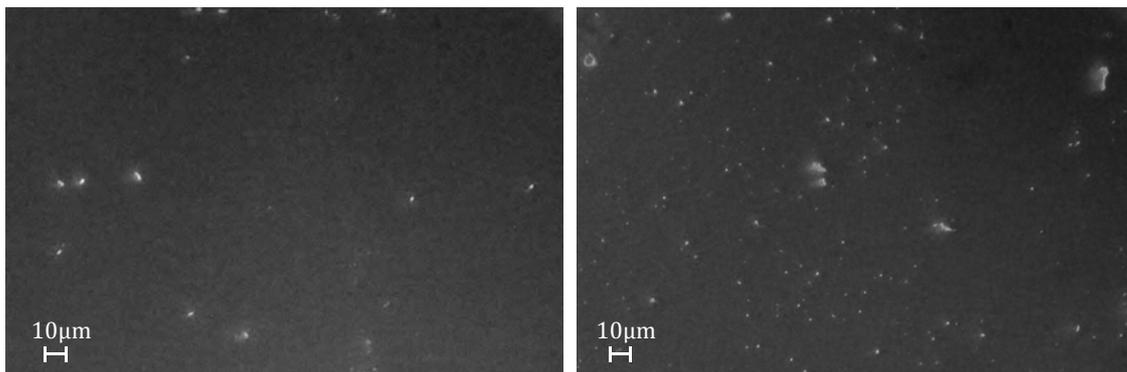


Abbildung 5.44: Lichtmikroskopische Aufnahme der Nanopartikel nach 6 Monaten Lagerzeit dispergiert in PBS pH 7,4 (Keyence VHX-500 digital, 1000x Vergrößerung, polarisiertes Licht), links: Partikel aus 2-8°C Lagerung, rechts: Partikel aus 25°C/60% rF dispergiert in Phosphatpuffer pH 7,4

In den REM-Aufnahmen der trockenen Mikropartikel (Abbildung 5.45) lassen sich hingegen keine Unterschiede der Proben erkennen: Es sind überwiegend sphärische Hohlkugeln vorhanden, die ein für die Sprühtrocknung charakteristisches Ausblasloch aufweisen.

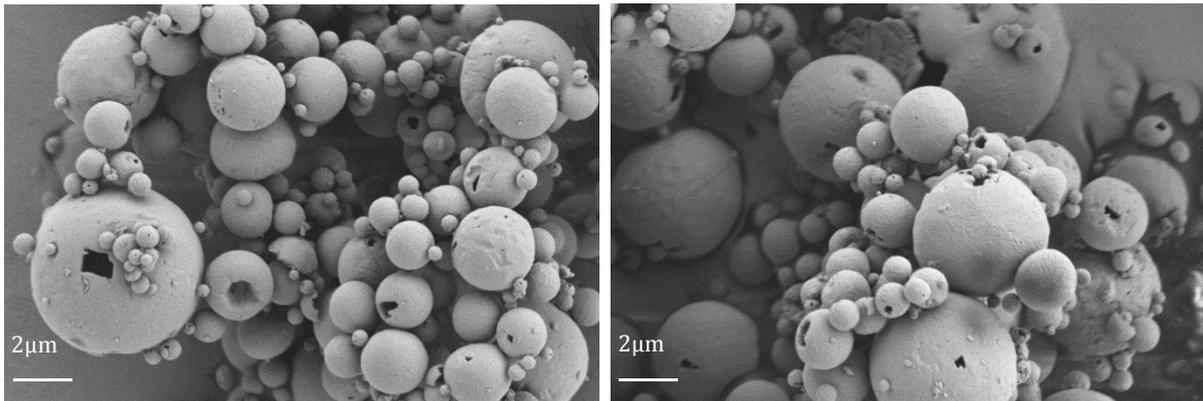


Abbildung 5.45: REM-Aufnahmen der Formulierung nach 6 Monaten Lagerzeit, links: Partikel gelagert bei 2-8°C, rechts: Partikel gelagert bei 25°C/60% rF

5.4.2 Proteinintegrität

Zur Beurteilung der Antigenintegrität wird zunächst überprüft, ob die Primärstruktur des Antigens während der Lagerung intakt bleibt. Die erhaltenen Banden in der SDS-PAGE werden mit denen eines frisch hergestellten Ovalbuminstandards verglichen. Bei den Proben kann auch nach 6 Monaten keine Fragmentierung des Ovalbumins beobachtet werden, die Primärstruktur des Antigens bleibt intakt (Abbildung 5.46).

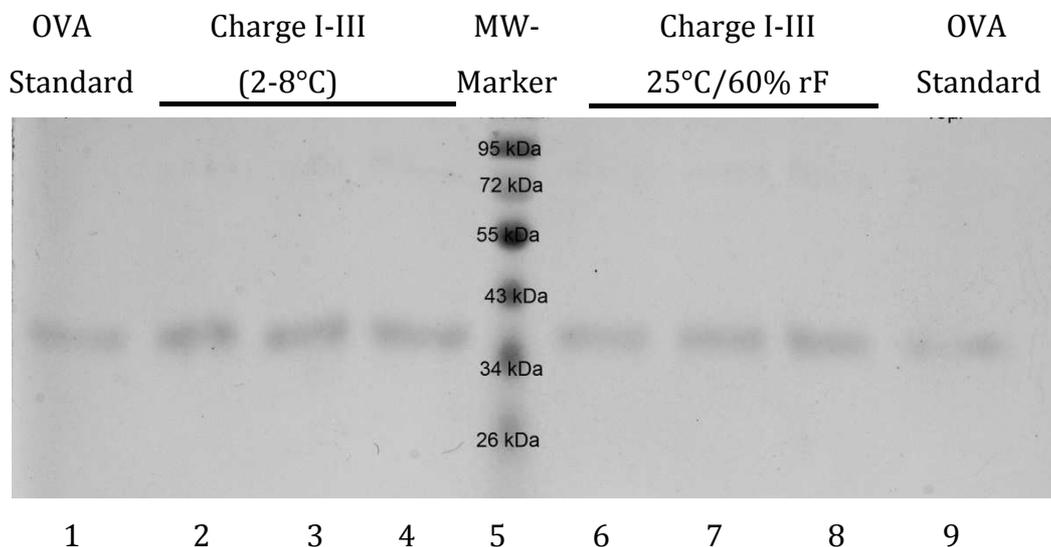


Abbildung 5.46: SDS-PAGE der eingelagerten Proben nach 6 Monaten; Standardlösungen OVA (Bande 1 und 9), OVA aus Nanopartikeln gelöst (Bande 2-4: Charge I-III bei 2-8°C gelagert, Bande 6-8: Charge I-III bei 25°C/60% rF gelagert), Bande 5: PageRuler™ MW-Marker)

Ein anders Indiz für die Integrität des Proteins stellt die Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Assay dar. Hier reagieren Cystein-, Cystin-, Tryptophan- und Tyrosin-Reste mit den im Reagenz enthaltenen Kupferionen. Vor allem die Aminosäure Cystein reagiert in dieser Reaktion und trägt damit zur Farbigkeit bei [79]. Für die untersuchten Proben bedeutet das: Kommt es zu einer Änderung in der räumlichen Anordnung des Antigens über die Lagerung und werden Aminosäuren wie Cystein dem Reagenz zugänglicher, kann der bestimmte Proteingehalt in der Probe scheinbar ansteigen. Wird das Protein stark fragmentiert oder einzelne Aminosäuren, die zur Farbigkeit des Kupferkomplexes beitragen, abgespalten, so kann es zu einem verminderten Signal kommen. Erst ein Peptid mit einer Kettenlänge von mindestens vier Aminosäuren trägt zur Absorption des Kupferkomplexes bei [112]. Sieht man sich den Proteingehalt der 2-8°C gelagerten Probe über den Zeitraum von 6 Monaten an (Abbildung 5.47), so fallen Schwankungen im Proteingehalt auf, die allerdings in dem für den BCA-Assay üblichen Bereich der Messabweichungen liegen. Im Gegensatz dazu steigt der Proteingehalt in den 25°C/60% rF gelagerten Proben von 6,8% auf 11,3% an, was auf eine Änderung in der Struktur des Proteins hinweist.

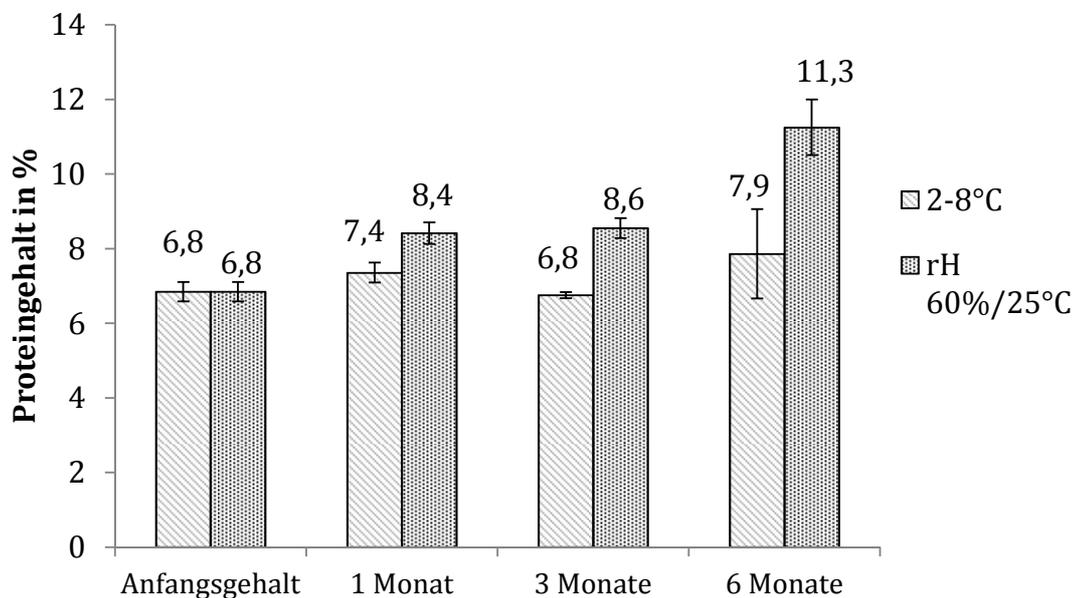


Abbildung 5.47: Proteingehalt über den Zeitraum von 6 Monaten bei unterschiedlichen Lagerbedingungen: 2-8°C und 25°C/60% rF Mittelwerte aus Charge 1-3, (n=4, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung)

5.4.3 Partikelgrößenverteilung und Dispergierverhalten

Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung werden die eingelagerten Proben mit 3 bar trocken dispergiert und im Laserdiffraktometer vermessen (RODOS-Modul). Zielgrößen sind hier der x_{50} -Wert, welcher die durchschnittliche Partikelgröße beschreibt, sowie die Fraktion unter $5,25 \mu\text{m}$, die theoretisch die Lunge erreicht.

In Abbildung 5.48 ist die Veränderung bei $2\text{-}8^\circ\text{C}$ Lagerung, in Abbildung 5.49 die bei $25^\circ\text{C}/60\% \text{ rF}$ dargestellt.

Nach Herstellung liegt die Durchschnittsgröße der drei Chargen bei $2,55 \mu\text{m}$ und die FPF_{geo} bei $83,38\%$. Über den Lagerzeitraum nimmt die Größe innerhalb des ersten Monats unabhängig von den Lagerungsbedingungen signifikant um etwa 200 nm ab. Dies kann an einem Abbau von elektrostatischen Wechselwirkungen, die durch den Trocknungsprozess entstehen können [113], zurückzuführen sein. Der x_{50} bleibt im Bereich von $2 \mu\text{m}$. Die Fraktion der Partikel, die kleiner als $5,25 \mu\text{m}$ sind steigt dementsprechend leicht von $83,38\%$ auf $85,94\%$ ($2\text{-}8^\circ\text{C}$) bzw. $85,77\%$ ($25^\circ\text{C}/60\% \text{ rF}$) an.

Mit dem Inhalermodul wird die Partikelgrößenverteilung des Pulvers nach Dispergierung mit dem Cyclohaler gemessen und dessen relative Deagglomerationsfähigkeit berechnet. Über die Lagerung bleibt der Wert über 90% , was darauf schließen lässt, dass sich der Cyclohaler auch nach Lagerung gut zum Dispergieren eignet. Dies könnte noch genauer überprüft werden, indem das Pulver in Kapseln und verblistert gelagert wird. Es wird davon ausgegangen, dass kein Effekt durch die Lagerung in einer Kapsel zu erwarten ist, da HPMC-Kapseln im Vergleich zu Gelatine-Kapseln nicht feuchtigkeitsempfindlich sind und zudem kein Cross-Linking mit den verkapselten Wirkstoffen zeigen [114].

Die Ergebnisse der Laserdiffraktometrie zeigen, dass die Lagerung wenig Einfluss auf Partikelgrößenverteilung hat.

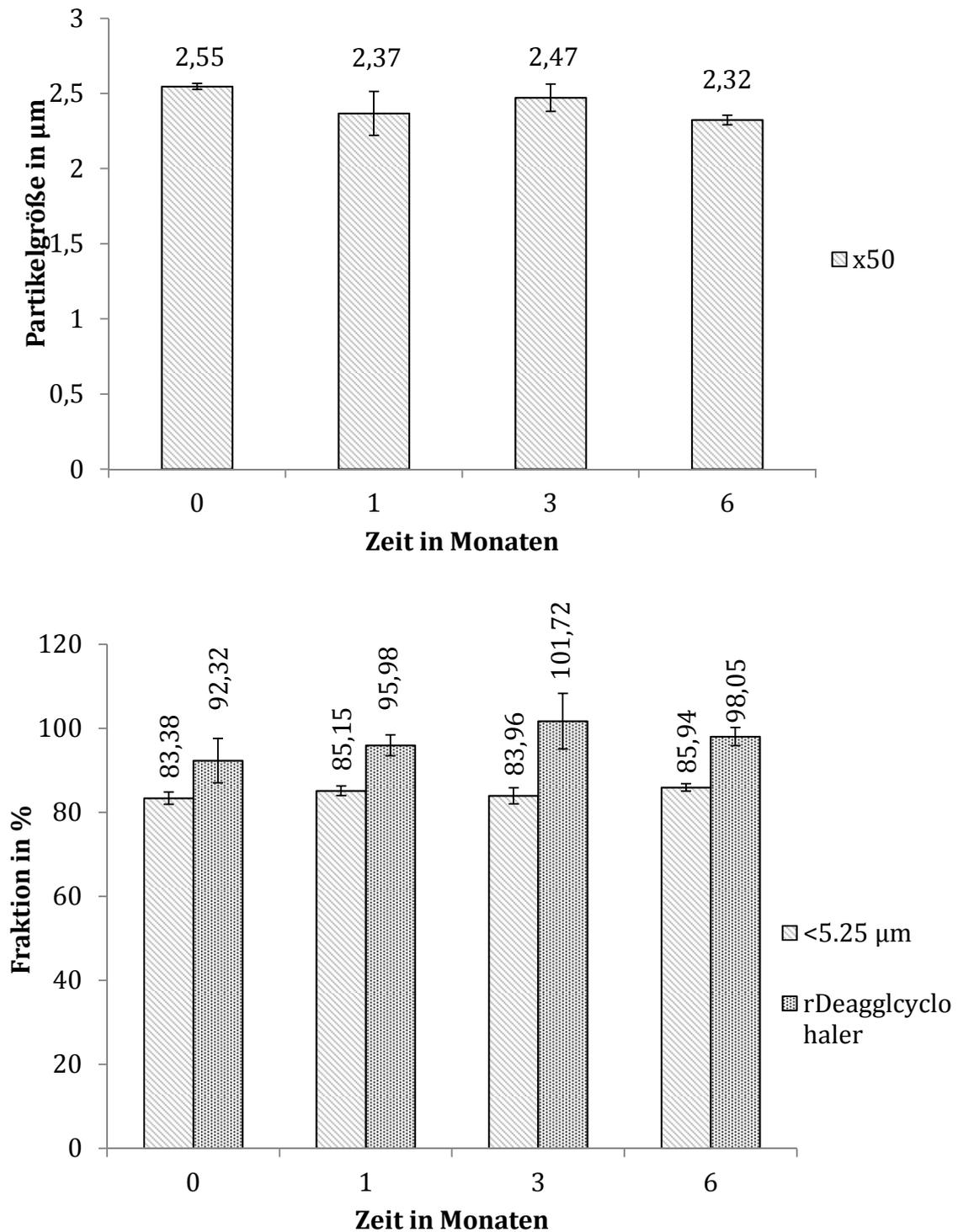


Abbildung 5.48: Stabilitätsprüfung der 2-8°C gelagerten Proben; oben: x_{50} in Abhängigkeit vom Lagerzeitraum; unten: FPF_{geo} und $Deaggl_{rel}$ (Cyclohaler) ($n=3$, Messwerte aus drei Chargen, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung)

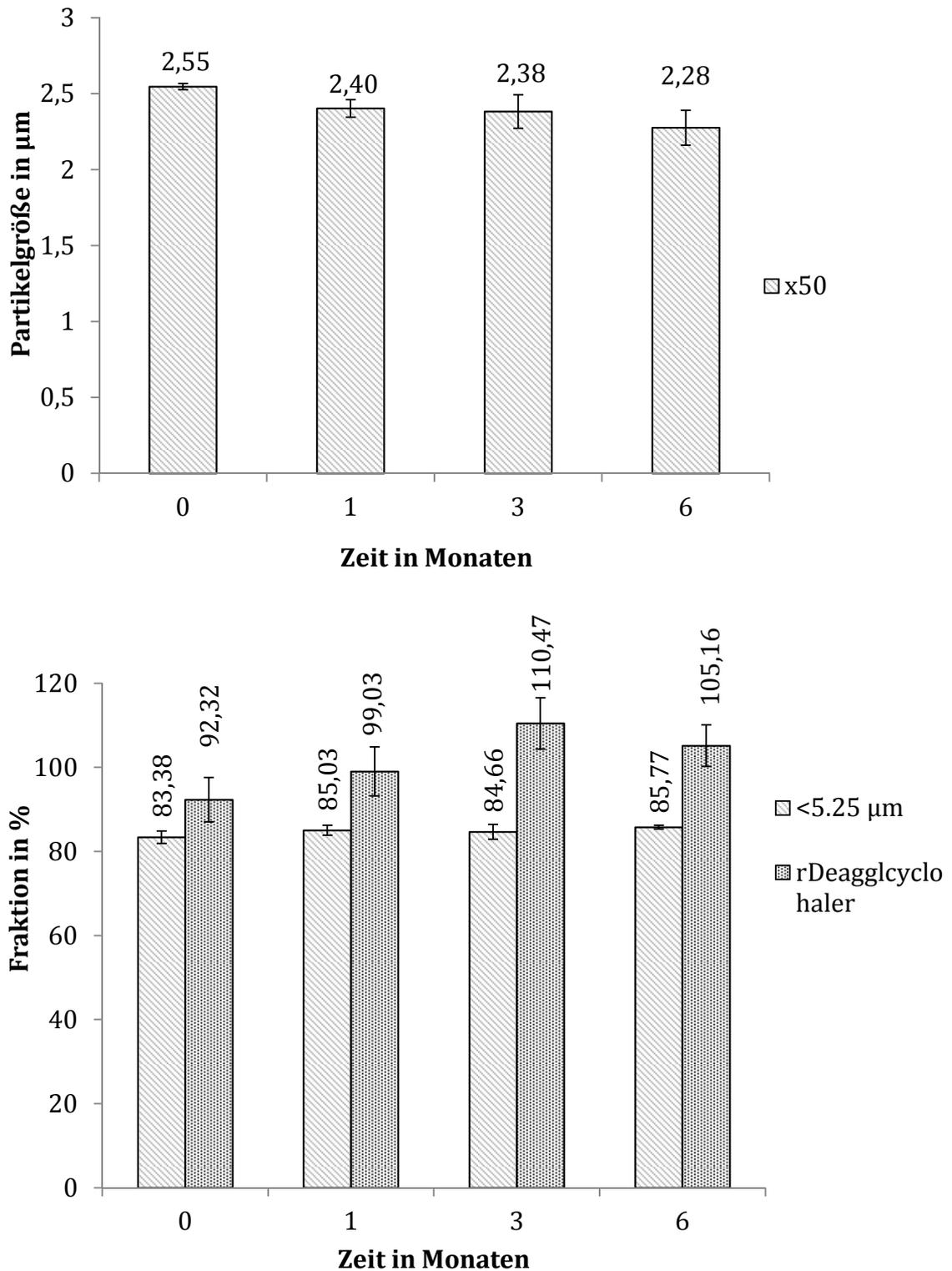


Abbildung 5.49: Stabilitätsprüfung der 25°C/60%rF gelagerten Proben; oben: x_{50} in Abhängigkeit vom Lagerzeitraum; unten: FPF_{geo} und $\text{Deaggl}_{\text{rel}}$ (Cyclohaler) ($n=3$, Messwerte aus drei Charge, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung)

5.4.4 Zusammenfassung Lagerstabilität

Durch die Lagerung bei unterschiedlichen Bedingungen sind kleinere Unterschiede nach einem Zeitraum von 6 Monaten festzustellen. Aufgrund der Messungen mit der Laserdiffraktometrie ist eine Verschlechterung der Applizierbarkeit nicht zu erwarten. Dies deckt sich auch mit den gewonnenen Erkenntnissen aus Kapitel 5.2.3, das sich mit dem Einfluss der Partikelgröße auf die pulmonale Deposition befasst. Da das Pulver eine sehr geringe Dichte aufweist, hat eine kleine Änderung der Partikelgröße wenig Einfluss auf dessen aerodynamische Eigenschaften. Wird das Pulver inhaliert, trifft es auf physiologisches Medium. In diesem lässt sich eine progressive Verschlechterung der Dispergierfähigkeit über die Lagerzeit erkennen, wenn das Pulver über längere Zeit bei 25°C/60% rF gelagert wird. Im untersuchten Zeitraum ist allerdings der größte Teil der Partikel ohne viel Energie aus der löslichen Matrix redispergierbar und es handelt sich nur um wenige Agglomerate, die bei der Lagerung entstehen. Die Partikel liegen daher, auch in Hinblick auf das initiale Wachstum im ersten Lagermonat, in einer für die Zellaufnahme geeigneten Partikelgröße vor (s. Kapitel 5.6.2.1). Kleinere Veränderungen in der Struktur sind weniger relevant, da ein Antigen mit einem kontinuierlichen Epitop verwendet wird. Sollte das Antigen in der Formulierung ausgetauscht werden, muss der Einfluss der Lagerung erneut untersucht werden. Eine Lagerung bei 2-8°C ist dann in jedem Fall der Lagerung 25°C/60% rF vorzuziehen, da hier keine Änderungen detektiert werden konnten.

5.5 Zytotoxizitätsuntersuchungen mittels MTT Assay

Um die Zytotoxizität der Formulierung abschätzen zu können werden die Nanopartikel als Dispersion und die zur Herstellung der Formulierung verwendeten Ausgangssubstanzen, als Suspension oder Lösung, auf Calu-3 Zellen gegeben.

5.5.1 Ausgangssubstanzen

Getestet werden die für die Formulierung eingesetzten Ausgangssubstanzen. CMC, Chitosan, Ovalbumin und Mannitol zeigen keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen (Abbildung 5.50). Lediglich die 1%ige Essigsäure führt zu einem Absterben der Zellen. Diese wird jedoch aufgrund des hohen Dampfdrucks [115] durch die Sprühtrocknung aus dem Produkt entfernt, sodass keine zellschädigende Wirkung zu erwarten ist.

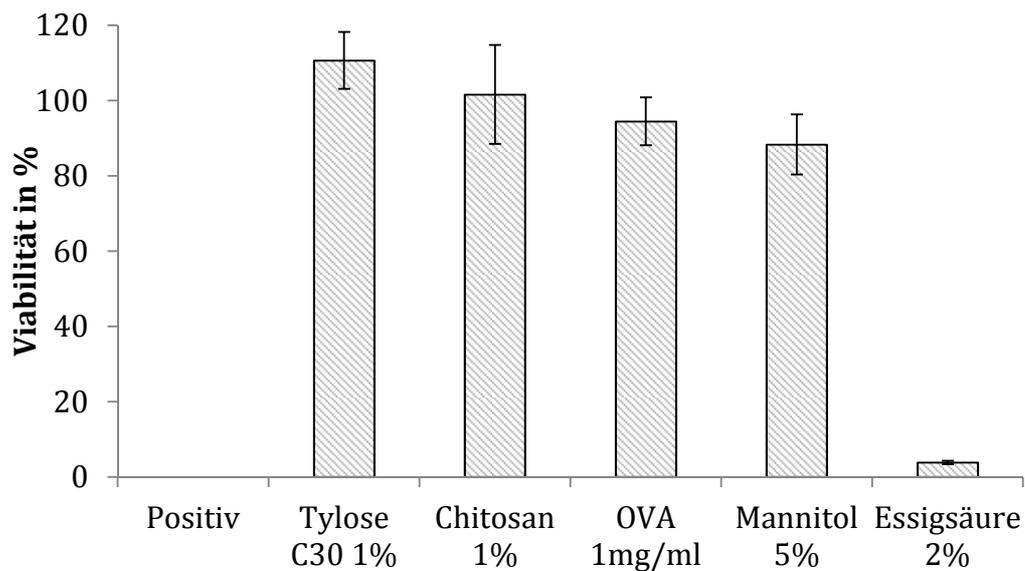


Abbildung 5.50: MTT Assay Ausgangssubstanzen ($n=4$, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung)

5.5.2 Einfluss der Mannitolmatrix

Um den Einfluss der Mannitolmatrix auf Zytotoxizität zu untersuchen, werden zwei unbeladene sprühtrocknete Formulierungen in den Konzentrationen 10-1000 $\mu\text{g/ml}$ Nanopartikel mit 5% und 1% Mannitolmatrix eingesetzt. Festzuhalten ist, dass mit steigendem Mannitolgehalt die Viabilität moderat abnimmt, was auf die Hydroxylgruppen und den damit verbundenen osmotischen Druck zurückzuführen ist

[116]. Jedoch ist auch hier die Toxizität als gering einzustufen, da stets 80% der Zellen überleben (Abbildung 5.51).

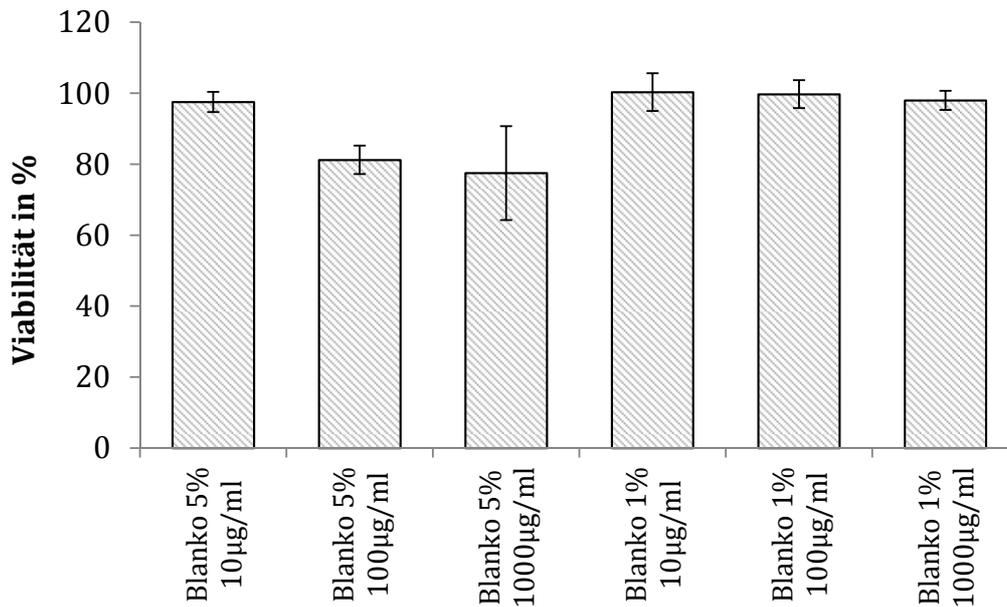


Abbildung 5.51: MTT Assay: Unbeladene Nanopartikel mit 5% und 1% Mannitolmatrix ($n=4$, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung), angegebene Konzentration entspricht der Gesamtpolymerkonzentration

5.5.3 Standardrezeptur

Untersucht wird das Standard-Trockenprodukt mit Ovalbuminbeladung und 2% Mannitolmatrix in einem Konzentrationsbereich von 10-1000 µg/ml. Die Zellviabilität ist in dem getesteten Bereich von der eingesetzten Polymerkonzentration weitestgehend unbeeinflusst; toxische Effekte sind daher nicht zu erwarten (Abbildung 5.52).

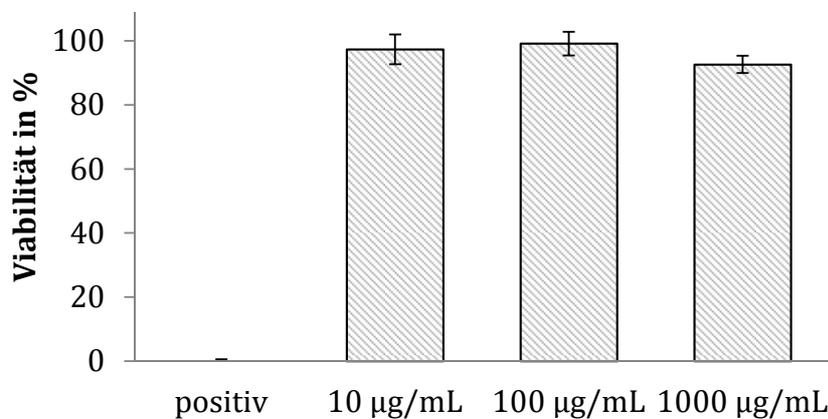


Abbildung 5.52: MTT Assay der Standardformulierung: Mannitol 20T, Nanopartikel 1T, Ovalbumin 0,1T ($n=4$, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen), angegebene Konzentration entspricht der Gesamtpolymerkonzentration

5.5.4 Fluoreszenzmarkierte Partikel

Getestet wird der Einfluss auf die Toxizität bei Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Chitosan. Dabei werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC), sowie mit dem für die in-vivo Studien angedachten FEW-Farbstoff S0744 (FEW) markierte Chitosannanopartikel untersucht. Die Proben wurden in einer Konzentration zwischen 10 und 1000 μg Polymermenge pro ml auf die Zellen aufgebracht. Auch die hier bestimmten Zellviabilitäten deuten keine Toxizität an; lediglich im hohen Konzentrationsbereich der FITC-markierten Partikel ist ein leichter Rückgang der Zellviabilität festzustellen, dieser ist aufgrund der hohen Standardabweichungen allerdings nicht signifikant. Eine geringere Toxizität scheint der Einsatz von dem Fluoreszenzfarbstoff FEW mit sich zu bringen (Abbildung 5.53).

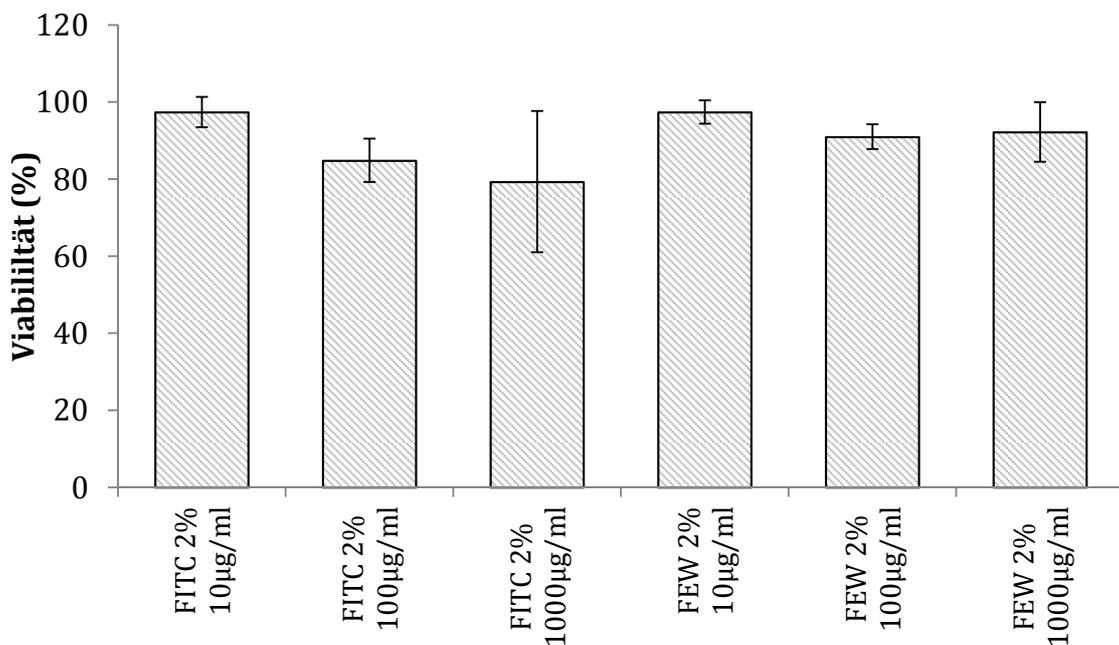


Abbildung 5.53: MTT-Assay Fluoreszenzfarbstoffe; unbeladene, sprühgetrocknete, fluoreszenzmarkierte Nanopartikel mit 2% Mannitolmatrix ($n=4$, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen), angegebene Konzentration entspricht der Gesamtpolymerkonzentration

5.5.5 Zytotoxizität auf andere Zelltypen

Ergänzend zur Calu-3 Zelllinie werden unreife humane dendritische Zellen, murine APCs und T-Zellen untersucht. Dabei zeigt sich analog zu den Calu-3-Zellen kein Einfluss von

Nanopartikelkonzentrationen bis 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf die Viabilität der Zellen (Abbildung 5.55 und Abbildung 5.54).

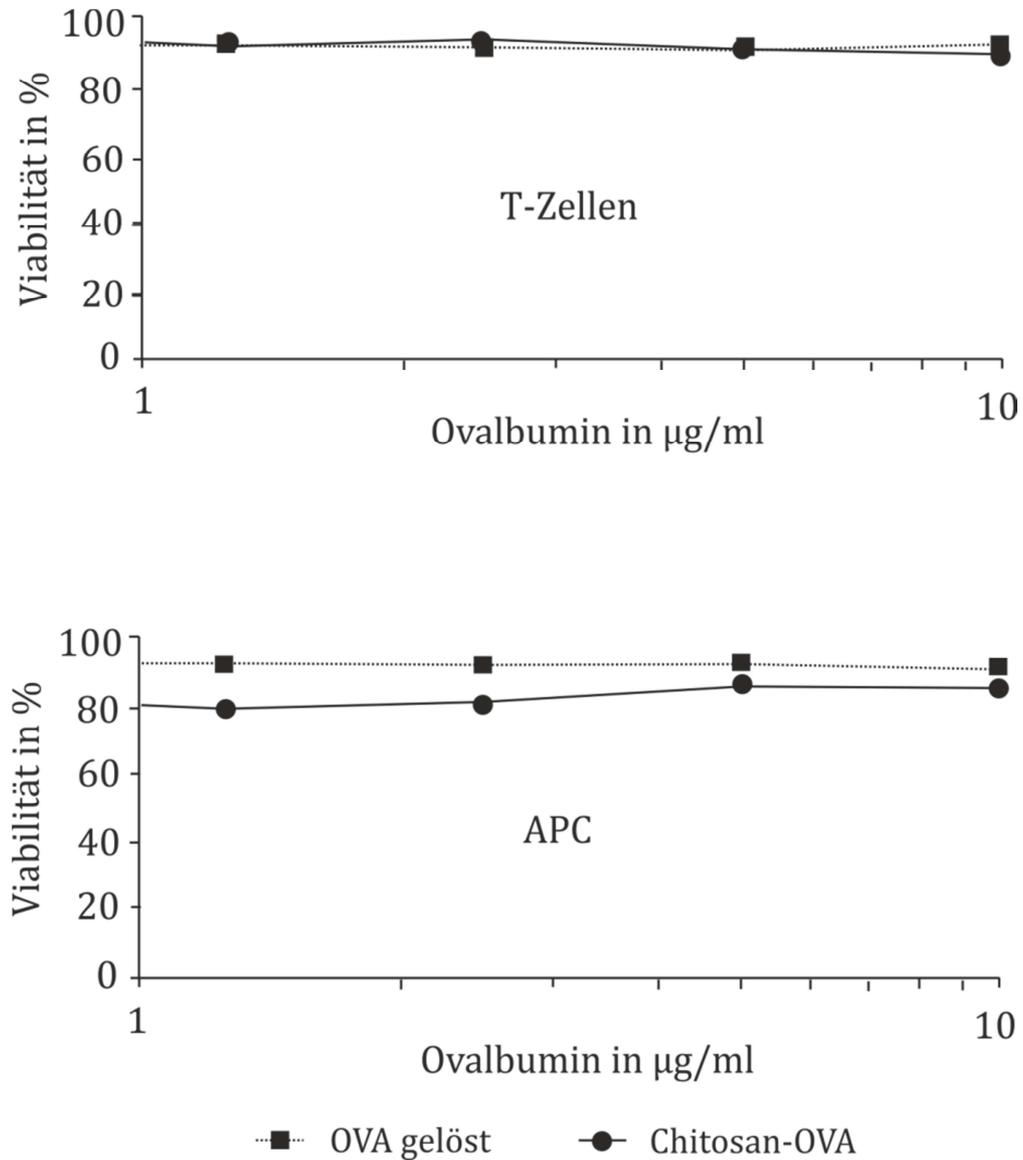


Abbildung 5.54: Effekt von Nanopartikeln und gelöstem Ovalbumin auf die Viabilität von murinen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen, normiert auf Ovalbuminmenge (10 μg Ovalbumin entsprechen einer Polymermenge von 100 μg).

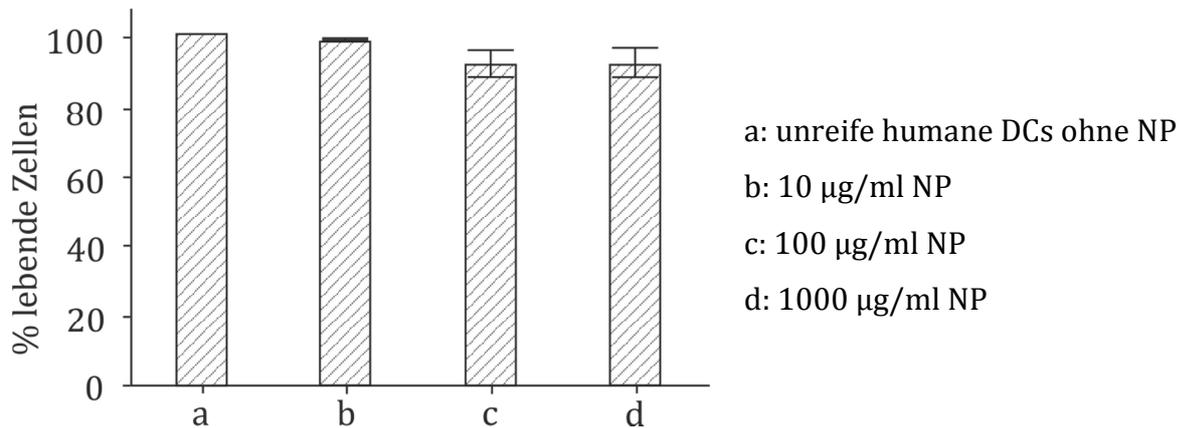


Abbildung 5.55: Effekt der Nanopartikel auf unreife humane dendritische Zellen (Anzahl der Spender $n=5$, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung), angegebene Konzentration entspricht der Gesamtpolymerkonzentration

5.5.6 Zusammenfassung Toxizitätsuntersuchung

Eine Toxizität der geprüften Substanzen ist in-vitro nicht gegeben. Die Standardformulierung sowie die Ausgangsprodukte sind aufgrund der Zellexperimente als nicht toxisch einzustufen. Lediglich die Formulierung der FITC-markierten Partikel zeigt in hoher Konzentration ein zytotoxisches Potential. Diese ist allerdings exklusiv für die Visualisierung in immunologischen Experimenten hergestellt und besitzt keine in-vivo-Relevanz.

5.6 Immunologische Ergebnisse

Nachdem die Formulierung technologisch optimiert ist, kann im Zellmodell überprüft werden, inwiefern sie zu der gewünschten Aktivierung von Immunzellen führt.

5.6.1 Endotoxingehalt Ausgangsstoffe und Formulierung

Endotoxine in den verwendeten Substanzen und der Formulierung können das angeborene Immunsystem aktivieren [3], daher wird vor den immunologischen Testungen die Ausgangskontamination bestimmt. Die gemessenen Zellaktivitäten können später so eindeutiger der antigenbeladenen Formulierung zugeordnet werden (Kapitel 5.6.4). Da Chitosan aus einem natürlichen Rohstoff stammt, ist der Endotoxineintrag durch ebendies am wahrscheinlichsten. Alle Chitosane, die immunologisch getestet werden, werden daher vorher auf Endotoxine untersucht.

Der gemessene Endotoxingehalt schwankt je nach verwendeter Chitosanqualität zwischen $< 0,78$ I.E./g und $50,7$ I.E./g (Tabelle 5.21). Dies sind sehr geringe Werte, denn der Grenzwert für nicht-intrathekale Arzneiformen liegt nach USP [117] und Ph. Eur. [25] bei 5.0 I.E. pro Kilogramm Körpergewicht. Um diesen Wert zu erreichen, müssten mehrere Gramm Chitosan appliziert werden. Eine pulmonal applizierbare Dosis von 20 mg Formulierung enthält in etwa $0,95$ mg Chitosan. Dies entspricht weniger als einem Tausendstel des angegebenen Endotoxinwertes.

Tabelle 5.21: Verschiedene Chitosanqualitäten mit dazugehörigem Endotoxingehalt

Chitosanqualität	Endotoxingehalt
Chitopur XP/ 4.91	$1 < 1.2$ I.E./g
Chitoscience Heppe 75/10	$< 0,78$ I.E./g
Chitoscience Heppe 90/10	$46,8 < 50,7$ I.E./g
Chitoscience Heppe 95/10	$23,4 < 27,3$ I.E./g
Biolog 90/10/A1	$15,6 < 19,5$ I.E./g
Sprühgetrocknete Formulierung (Chitoscience 90/10 mit Mannitol und OVA)	$6-7$ I.E./20 mg

Die trockene Formulierung mit eingekapseltem Ovalbumin wird ebenfalls untersucht und enthält $6-7$ I.E. pro 20 mg Dosis. Dieser Wert ist immer noch so gering, dass kein immunologischer Effekt durch die Ausgangskontamination zu erwarten ist (s. dazu auch die Ergebnisse aus Kapitel 5.6.4.2). Jedoch ist der Wert höher als durch die Ausgangskontamination des Chitosans erwartet. Dies liegt sowohl an einer Kontamination durch den Prozess, denn die Herstellung erfolgt nicht aseptisch, als auch an dem Einsatz von Ovalbumin. Das Protein aus dem Hühnereiweiß weist ebenfalls Lipopolysaccharid-ähnliche Strukturen auf, die denen von Salmonellen ähneln [118]. Ein Einsatz von speziell aufgereinigtem endograde-Ovalbumin sowie eine aseptische Herstellung können den Endotoxingehalt reduzieren.

5.6.2 Zelluläre Aufnahme der nanopartikulären Formulierung

Eine effektive Vakzine aktiviert nach Aufnahme durch DCs vor allem die zytotoxischen T-Zellen, da diese in der Lage sind, den Tumor zu eliminieren [43]. Dies kann anhand der exprimierten Rezeptoren und Zytokine, die in Tabelle 5.22 aufgeführt sind, detektiert werden, die in den folgenden Experimenten näher untersucht werden.

Tabelle 5.22: Zielmarker der immunologischen in-vitro Zelltests

Zielmarker	Herkunft	Funktion bzw. Verwendung
CD 80	Aktivierte DCs	Co-Stimulierung für naive T-Zellen
CD 69	Aktivierte Lymphozyten	Aktivierungsmarker für Lymphozyten, weitere Aktivierung
IL-2	T-Zellen	T-Zellproliferation
IFN- γ	Th ₁ -Zellen NK-Zellen	Th ₁ -Zytokin, aktiviert Makrophagen, verstärkt Expression von MHC-Molekülen

5.6.2.1 Größenvariationen

Je nach Literaturquelle findet man Angaben zur Partikelgröße im Bereich von 50-1000 nm, die bei der Nanoeinkapslung von Proteinen zum Einsatz kommen [36–39]. Um genauere Informationen darüber zu gewinnen, welcher Größenbereich für die Vakzinierung mit den hier verwendeten Nanopartikeln optimal ist, wird die Aufnahme der Partikel im murinen System (murine Makrophagen und murine DCs) untersucht. Dafür werden Partikel unterschiedlicher Größe hergestellt. Die Größe kann gesteuert werden, indem die Polymer-Konzentrationen im Herstellungsprozess variiert werden (Tabelle 5.23, Kapitel 5.1.1.1.2). Die Partikel werden durch Sprühtrocknung in ein trockenes Pulver überführt, wobei die Matrixmenge so angepasst wird, dass das Verhältnis Nanopartikel zu Mannitol in allen Proben 1:20 beträgt.

Tabelle 5.23: Zusammensetzung und Partikelgröße (1% HAc) der eingesetzten FITC-Nanopartikel (SD=Sprühtrocknung)

	Chitosanlösung	CMC-Lösung	vor SD	nach SD
1	0,3% (10 ml HAc 2%)	0,3% (6 ml H ₂ O)	551 nm PDI 0,296	536 nm PDI 0,193
2	0,2% (10 ml HAc 2%)	0,2% (7 ml H ₂ O)	420 nm PDI 0,154	431 nm PDI 0,275
3	0,1% (10 ml HAc 2%)	0,1% (10 ml H ₂ O)	252 nm PDI 0,154	268 nm PDI 0,171
4	0,025% (40 ml HAc 2%)	0,025% (40 ml H ₂ O)	144 nm PDI 0,099	173 nm PDI 0,126

In Abbildung 5.56 ist die Aufnahme durch BMDCs in Abhängigkeit der Partikelgröße und eingesetzten Partikelkonzentration dargestellt. Dabei hat der Einsatz von Partikeln in einer Konzentration von 1 mg/ml fast alle Zellen bereits nach 2 h vollständig saturiert. Bei Verdünnung um eine log-Stufe, sieht man deutlich, dass sich ein Plateau ab einer Größe über 268 nm ergibt. Partikel, die kleiner sind, werden vergleichsweise schlechter aufgenommen. Da eine Herstellung von Chitosanpartikeln mit einer Größe von über 530 nm technologisch nicht möglich ist, kann leider nicht bestimmt werden, ob größere Partikel gleichermaßen effizient aufgenommen werden. Die Partikelgröße, die bei der Standardformulierung zum Einsatz kommt, liegt im Bereich von 250 nm und damit definitiv in einem Größenbereich, der zur Aufnahme durch die dendritischen Zellen geeignet ist.

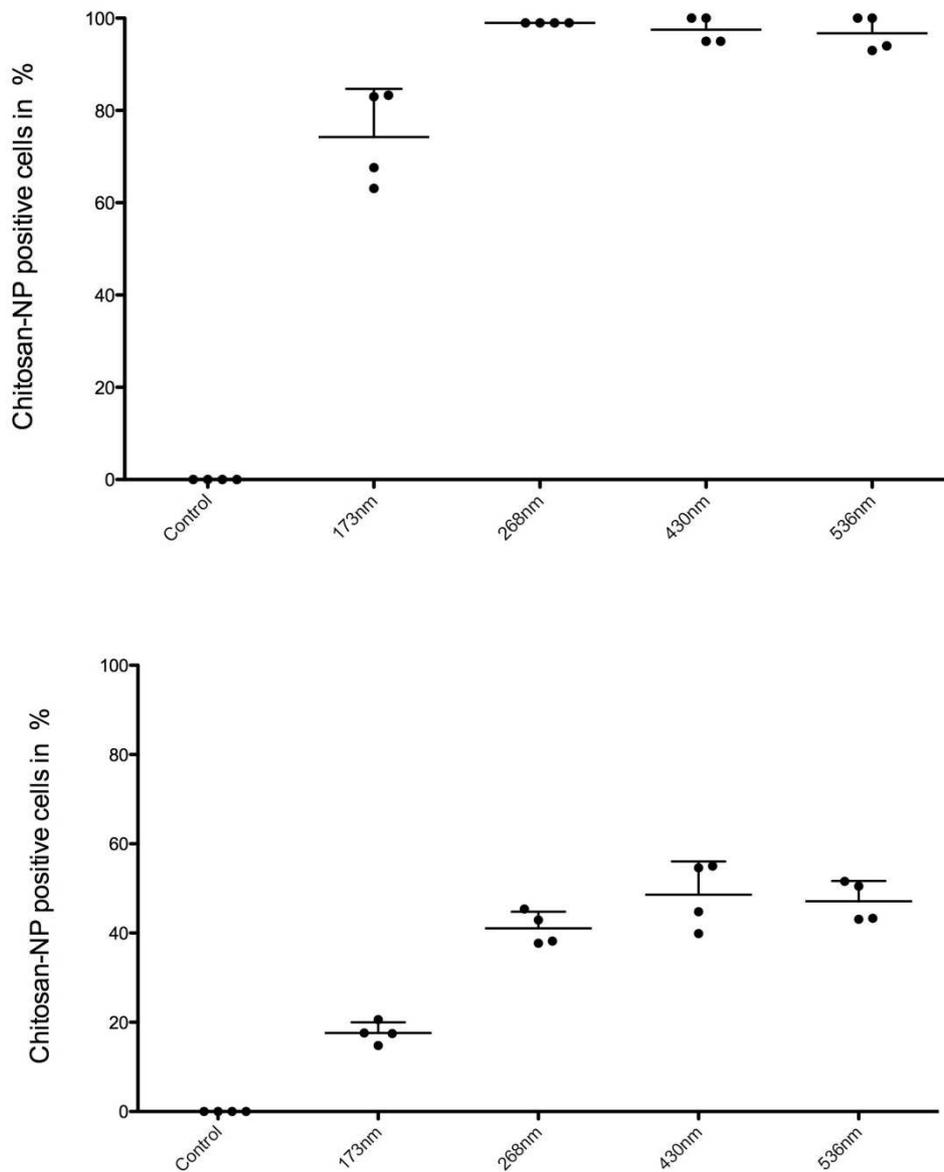


Abbildung 5.56: Aufnahme der FITC-markierten Chitosan Nanopartikel durch murine BMDC in Abhängigkeit ihrer Größe und eingesetzten Konzentration nach 2 h Inkubation (oben: verwendete Partikelkonzentration von 1 mg/ml; unten: verwendete Partikelkonzentration von 0,1 mg/ml)

5.6.3 Routing nanopartikuläre Formulierung

Abbildung 5.57 zeigt, dass die Nanopartikel effizient durch unreife humane DCs aufgenommen werden. Nach einer Inkubationszeit von 24 h finden sich die Partikel nahezu quantitativ in membranumschlossenen Kompartimenten wieder. Lösliches Antigen wird normalerweise in die frühen Endosomen geleitet und dort abgebaut, was

man über das membranspezifische Protein EEA1 (Early Endosom Antibody 1) nachweist [119]. Dabei zeigen die Messungen mit dem konfokalen Mikroskop in Abbildung 5.57, dass es nach 24 h zu keiner Überlappung von EEA1 und den Nanopartikeln kommt. Während saure Kompartimente der Endosomen rot dargestellt sind, sind die fluoreszenzmarkierten Partikel (grün) klar von diesem Bereich abgegrenzt. Diese werden demnach nicht über die Endosomen abgebaut.

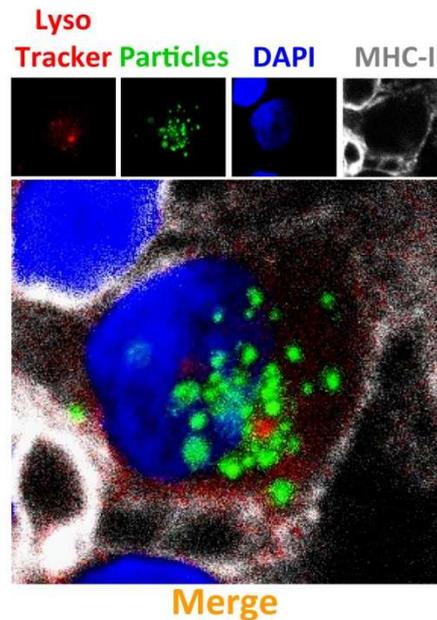


Abbildung 5.57: Lokalisation der Nanopartikel in humanen dendritischen Zellen nach 24 h, LSCM-Aufnahme, Nanopartikel: grün, saure Kompartimente: rot, Zellkern: blau, Zellmembran: weiß.

Durch die Oxidierung mit Osmiumtetroxid (Abbildung 5.58) können im TEM-Bild ebenfalls saure Kompartimente sichtbar gemacht werden: Sie erscheinen auf TEM-Bildern schwarz [120]. Dementsprechend wird die DNA des Zellkerns schwarz dargestellt, aber auch die Nanopartikel, da diese durch die Herstellung oxidierbare Acetatreste enthalten. Die Partikel finden sich in diesem Bild ebenfalls nicht in einem angesäuerten Bereich der Zelle. Vielmehr werden sie in vakuolären Strukturen von Zellmembranen umschlossen. Dies schließt aus, dass partikelassoziiertes Antigen in gleicher Weise prozessiert wird wie Lösliches, das über Pinozytose, Endozytose und Mannoserezeptoren [121] aufgenommen und endolysosomal abgebaut wird [122].

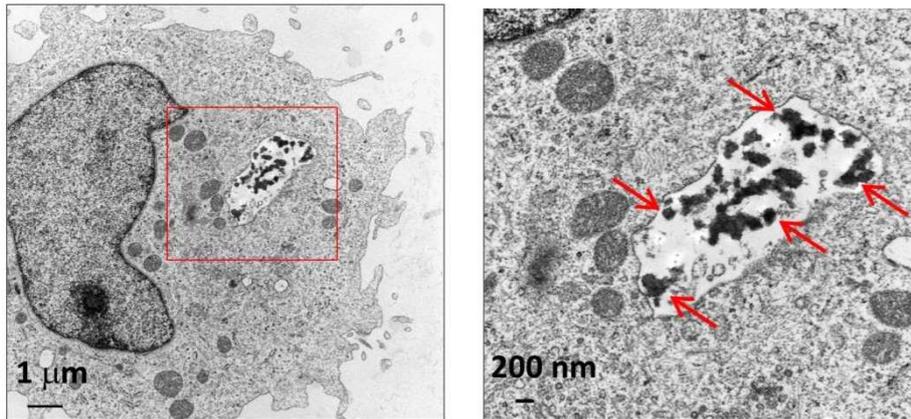


Abbildung 5.58: Lokalisation der Nanopartikel in humanen dendritischen Zellen, TEM Aufnahme mit Osmiumfärbung. Oben: Überblick über die Zelle (saure Strukturen schwarz), unten: Ausschnitt des Zellkompartiments indem sich die Chitosan Nanopartikel wiederfinden

5.6.3.1 Cytochrom c

Um zu evaluieren, ob das Antigen nach der Aufnahme durch die dendritische Zelle frei im Zytosol vorliegt, wird Cytochrom *c* in die Nanopartikeln inkorporiert. Vermehrtes Aufkommen freien Cytochrom *c* im Zytosol weist auf Zellschäden hin und induziert Apoptose. Die Herstellung der Partikelformulierung erfolgt analog zur Herstellung der Ovalbumin-beladenen Standardformulierung. Das Cytochrom *c* wird in der Chitosanphase gelöst wird und anschließend die ionische Gelierung durchgeführt. Es kann eine Cytochrom *c* Beladung von 4,3% (LE 8,6%) bezogen auf das Gesamtpolymer erreicht werden.

Die mit beladenen Nanopartikeln und freiem Antigen inkubierten humanen DCs werden mit Calcein-AM und Ethidium-Homodimer-1 inkubiert. Die Zellen, die sich durch Calcein anfärben lassen, werden als lebendige Zellen gezählt, denn sie sind stoffwechselaktiv und können Casein-AM zu Calcein umsetzen. Die Zellen, die mit Ethidium gefärbt sind werden als tote, nekrotische Zellen gezählt, denn ihre Zellmembran ist durchlässig. Sind Zellen negativ auf beide Farbstoffe, so gelten sie als apoptotisch (Abbildung 5.59).

In Abbildung 5.60 sind die Zellviabilitäten nach Inkubation mit freiem und verkapselten Cytochrom, sowie unbeladenen Nanopartikeln dargestellt.

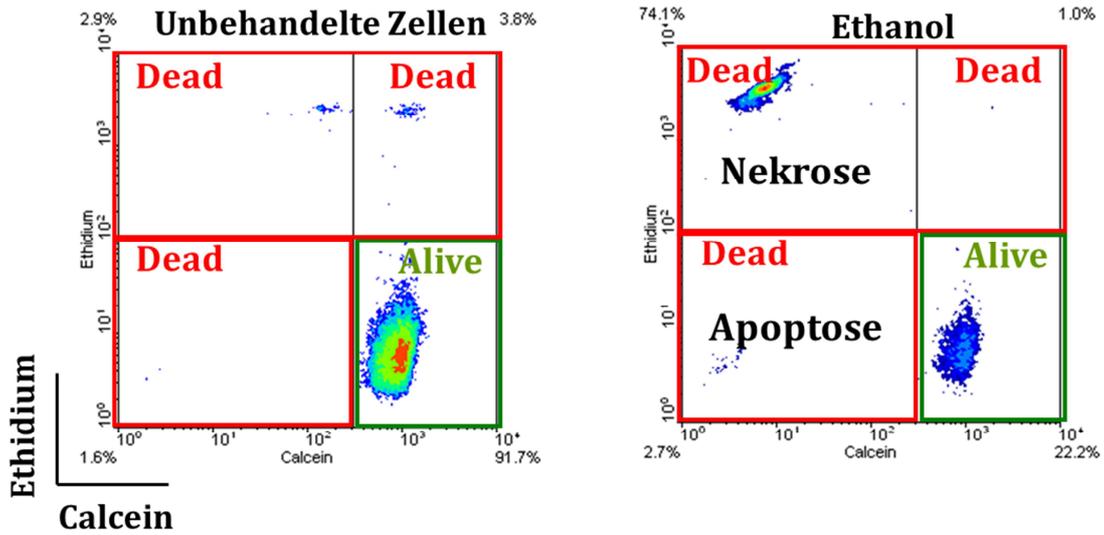


Abbildung 5.59: Beispiel für die Auswertung einer FACS-Analyse anhand einer Zellpopulation bestehend aus lebenden (Alive) und toten (Dead) Zellen. Links: unbehandelte Zellen, überwiegend lebendig; Rechts: Zellen nach Versetzen mit Ethanol, nekrotische Zellen (oben links) und Zellen die in die Apoptose übergehen (unten links).

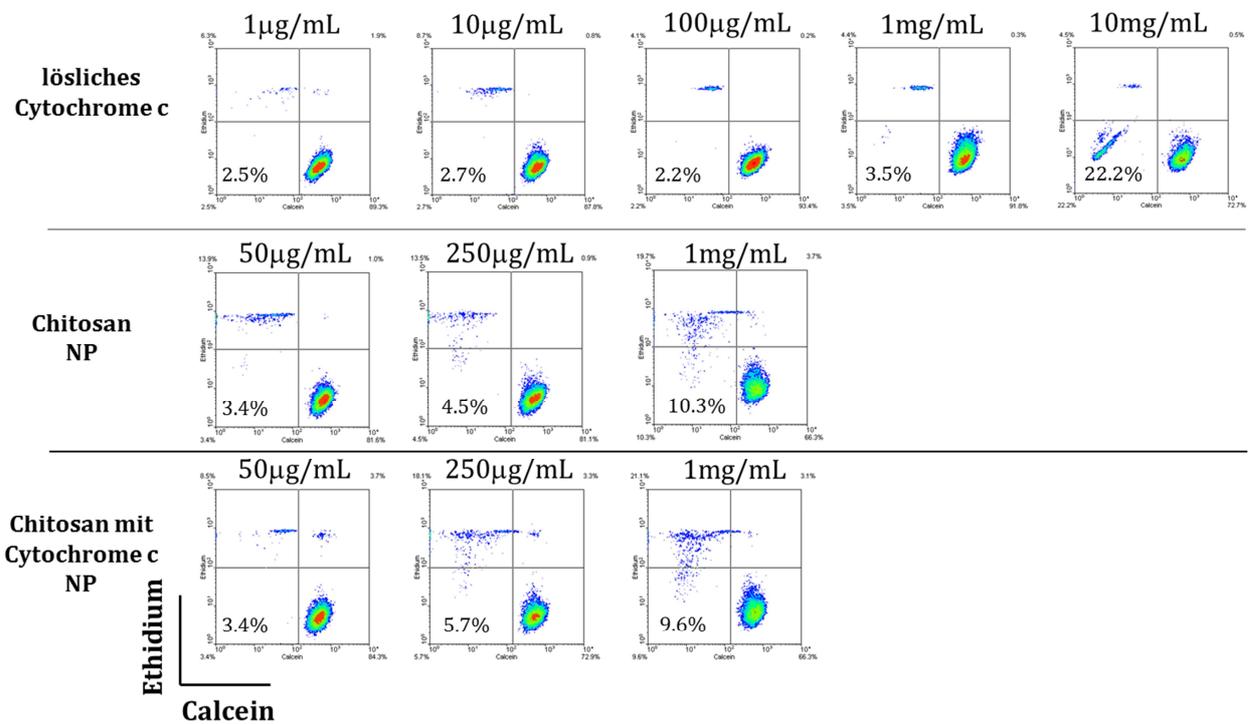


Abbildung 5.60: Auswertung der Zellviabilität nach Inkubation von humanen DCs durch Analyse mit dem FACS, oben: lösliches Cytochrom c, Mitte: unbeladene Chitosan NP, unten: Chitosan NP mit Cytochrom c Beladung.

Betrachtet werden die Zellpopulationen in den jeweils linken Bereichen unten, die negativ auf sowohl Calcein als auch Ethidium sind und apoptotische Zellen darstellen. Anhand der eingesetzten Menge an löslichem Cytochrom *c* (obere Reihe) lässt sich erkennen, dass eine Konzentration von 10 mg/ml Cytochrom *c* notwendig ist, um in 22,2% der analysierten Zellen eine Apoptose auszulösen. Durch die geringe Beladung der Nanopartikel mit Cytochrom *c* kann eine so hohe Konzentration nicht erreicht werden, da die Sättigungskonzentration der Mannitolmatrix überschritten wird. Das Experiment liefert daher keine verwendbaren Ergebnisse.

5.6.3.2 Biotinyliertes Ovalbumin

Um die Ovalbuminmenge im Zytosol der Zellen zu untersuchen, werden BMDCs mit Partikel, die mit biotinyliertem Ovalbumin (OVA-Biotin) beladenen wurden inkubiert und diese zu definierten Zeitpunkten per Zentrifugation in Zellen und Überstand getrennt. Die so erhaltenen Fraktionen werden anschließend per Gelelektrophorese aufgetrennt und das OVA-Biotin mit Anti-Biotin-Antikörpern detektiert.

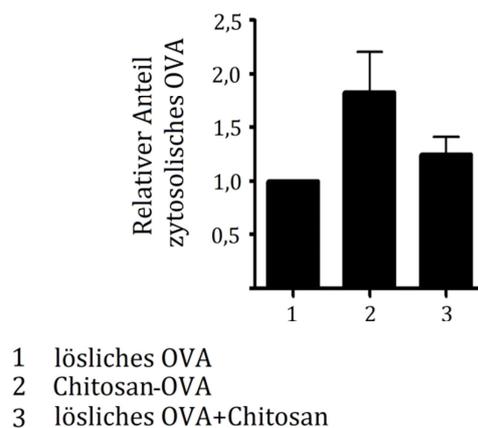


Abbildung 5.61: Relative gemessene Menge an Ovalbumin im Zytosol in Abhängigkeit von der Darreichung als Lösung, partikulär gebunden an Chitosan-Nanopartikeln oder co-administriert mit Chitosan-Nanopartikeln.

In Abbildung 5.61 ist die relative gemessene Menge an Ovalbumin im Zytosol dargestellt. Die Aufnahme von gelöstem Ovalbumin stellt die Referenz dar und wird durch den Wert 1 beschrieben. Ein Wert größer als 1 entspricht einer gesteigerten Aufnahme, ein Wert kleiner als 1 einer verminderten. Die Aufnahme der Ovalbuminlösung kann so mit der Gabe von eingekapseltem Ovalbumin und der Kombination aus gelöstem Ovalbumin und unbeladenen Nanopartikeln verglichen werden.

Durch die Gabe von Chitosan-OVA-Nanopartikeln kann im selben Zeitraum eine vermehrte Menge Antigen im Zytosol nachgewiesen werden. Im Vergleich zum gelösten Ovalbumin oder zeitgleich mit Nanopartikeln administriertem Antigen gelangt fast die doppelte Menge Antigen ins Zytosol. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die partikuläre Gabe von Ovalbumin vor allem zu einem effizienteren Transport des Antigens in die Zielzelle führt. Dadurch kann die Kreuzpräsentation schneller initiiert werden, was den erhöhten Effekt der Chitosan-Nanopartikel im Vergleich zu gelöstem Antigen erklärt.

5.6.4 Aktivierung der Immunzellen in-vitro

5.6.4.1 Murine in-vitro-Experimente mit der Ovalbumin-Formulierung

Um zu untersuchen, ob es zu einer verbesserten Immunantwort durch eine nanopartikuläre Bindung des Antigens kommt, werden dieses und lösliches Antigen mit murinen Immunzellen inkubiert.

In Abbildung 5.62 sind CD69 Expression und IL-2-Sekretion in Abhängigkeit der eingesetzten Menge an Ovalbumin aufgetragen. Dabei wird das lösliche Antigen gegen das partikulär-gebundene Antigen verglichen. Während bei letzterem die CD69-Expression bereits bei einer Dosis von 2,5 µg/ml die T-Zellen maximal stimuliert, wird dieser Wert mit dem freien Antigen erst bei Einsatz von etwa 100 µg/ml erreicht. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der IL-2-Sekretion, hier allerdings noch ausgeprägter; die Menge, die einer Sekretion an IL-2 durch 0,25 µg/ml nanopartikulär-gebundenen Ovalbumins entspricht, wird durch das freie Antigen erst beim Erhöhen der Menge um mehr als zwei log Stufen erreicht.

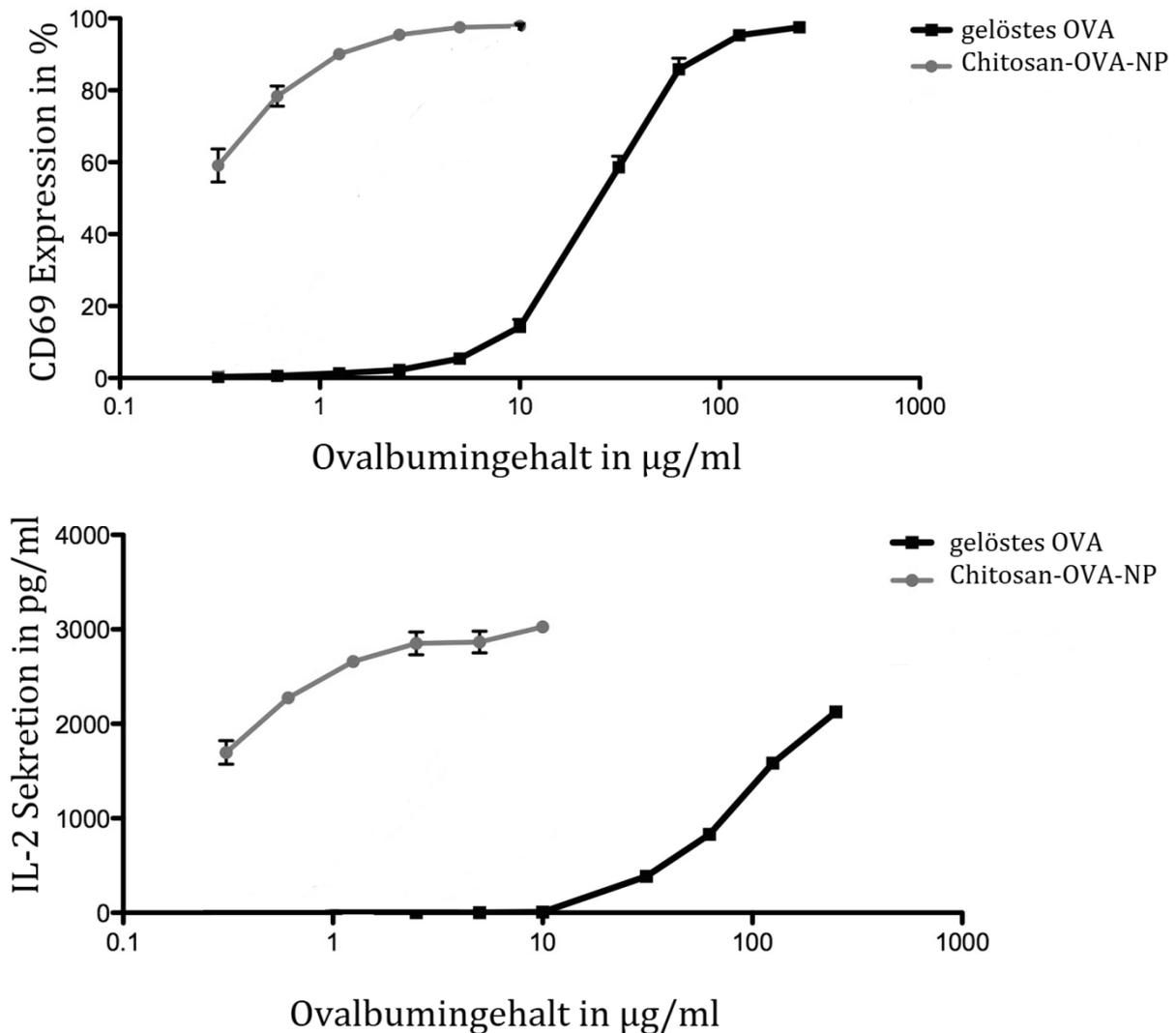


Abbildung 5.62: CD69-Expression auf OTI-T-Zellen und IL-2-Sekretion bei Inkubation von Ovalbumin-beladenen Chitosan-Nanopartikeln ($n=4$, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen)

Abbildung 5.63 zeigt die CD80-Expression; dieser Wert repräsentiert die Aktivierung von dendritischen Zellen, durch die Aufnahme von Antigen. Er ist durch die Aufnahme des partikulären Ovalbumins ebenfalls im Vergleich zum gelösten Antigen erhöht. Da das lösliche Antigen bereits zu einer relativ hohen CD80-Expression führt, ist der absolute Effekt weniger ausgeprägt als bei der CD69-Expression. Jedoch führt auch hier eine Menge von etwa 1 µg/ml eingekapseltem Ovalbumin zu einer maximalen Stimulation der dendritischen Zellen.

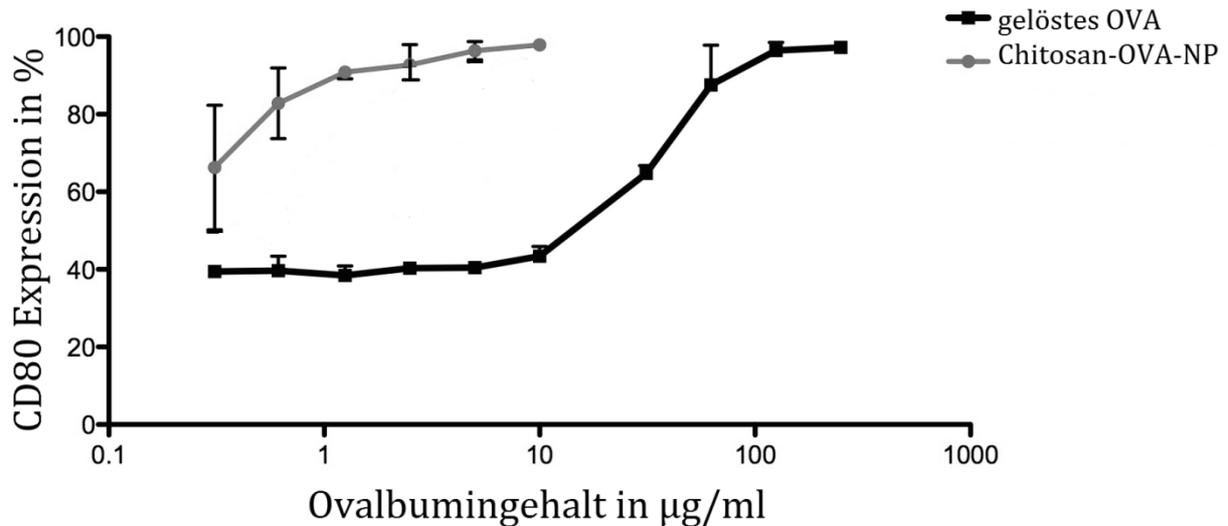


Abbildung 5.63: CD80-Expression auf OTI-DCs bei Inkubation von Ovalbumin beladenen Chitosan-Nanopartikeln ($n=4$; Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen)

Durch die Formulierung lassen sich sowohl die T-Zellen als auch die dendritischen Zellen in-vitro gut stimulieren. Im Vergleich zu einer Lösung mit Ovalbumin fällt die Immunantwort durch partikuläre Bindung deutlich höher aus. Die starke IL-2-Sekretion deutet auf eine hohe Proliferation der Zielzellen hin, was auf eine potentiell starke zytotoxische Immunantwort hindeutet. Dieser Effekt konnte mit allen getesteten Chargen reproduziert werden.

Die Ergebnisse passen zu dem, im vorherigen Kapitel erläuterten, effizienteren Transport der Nanopartikel in das Zytosol. Dieser kinetische Vorteil kann als ein Grund für die Verstärkung der Rezeptorexpression gegenüber dem freien Antigen angesehen werden. Bei den getesteten Nanopartikeln ist die β -Glukanstruktur des Chitosans chemisch verwandt mit den Peptidoglykanen auf gramnegativen Bakterien, sowie den β -Glukanen auf Pilzzellen. Diese sind in der Lage, über Rezeptoren mit den phagozytotischen Zellen zu interagieren. Unter anderem sind hier Dectin-1, TLR-, Scavenger- und Lactosylceramidrezeptoren beteiligt, bei deren Bindung die β -Glukanstruktur vermehrt aufgenommen wird [123]. Daher könnte auch die Aufnahme in DCs durch Interaktionen der Nanopartikeloberfläche und der Zellrezeptoren gesteigert sein und so die Immunantwort begünstigen.

5.6.4.2 Deacetylierungsgradvariation

Um den Einfluss des Deacetylierungsgrades (DDA) auf Aktivierung der Zielzellen zu untersuchen, werden Ovalbumin-beladene Chitosan-Nanopartikel mit variierenden DDAs hergestellt. Untersucht werden die Chitosane 75/10, 85/10, 90/10 und 95/10 Chitoscience der Firma Heppe Medical Chitosan GmbH, wobei die erste Zahl den jeweiligen DDA bezeichnet. Aranaz et al. [48] beschreiben, dass der DDA einen Einfluss auf die Toxizität haben kann. Je geringer der DDA, desto eher tritt eine dosisabhängige Toxizität auf, diese wird ab einem Wert unter 35% relevant. Desweiteren wird beschrieben, dass die Mukoadhäsion mit dem DDA zunimmt und somit die Bioverfügbarkeit von verkapselten und mitverabreichten Substanzen gesteigert werden kann. Auf Grund dieser Eigenschaften wäre der Einsatz eines möglichst hoch deacetylierten Chitosans wäre von den Eigenschaften daher interessant für die mukosale Vakzinierung, aber auch niedrig deacetylierte Chitosane haben in Studien immunologische Effekte erzielen können [124].

Die Verwendung verschiedener DDAs ist möglich ohne die Rezeptur der Formulierung abzuändern (Tabelle 5.24). Dabei entstehen Partikel mit vergleichbarer Größe und Beladung. Die Partikel werden mit den Standardsprühtrocknungsparametern (Tabelle 4.4) in ein trockenes Pulver überführt. Interessant ist, dass mit steigendem DDA die Größe der Partikel abnimmt. So liegt diese bei 75/10 bei 295 nm und bei dem 95/10 bei 203 nm. Mit steigendem DDA nimmt die Anzahl an Aminogruppen zu, sodass die ionische Gelierung mit CMC schneller abgeschlossen ist und kleinere Partikel entstehen. Dies wird so auch in der Literatur beschrieben [48]. Trotz der Größenabnahme kommt es jedoch zu keinem Unterschied in der Beladung der Partikel.

Tabelle 5.24: Partikelgröße und Proteinbeladung der in 1% HAc redispergierten Partikel nach Sprühtrocknung (SD)

Chitosan	Größe	PDI	Proteinbeladung
75/10	295 nm	0,132	8,3 ± 1,3%
85/10	230 nm	0,118	8,3 ± 2,3%
90/10	211 nm	0,151	8,1 ± 0,6%
95/10	203 nm	0,108	8,5 ± 0,7%

In Abbildung 5.64 sind die CD69-Expression und die IL-2-Sekretion von OTI-T-Zellen in Abhängigkeit des DDA und der eingesetzten Menge an Ovalbumin dargestellt. Die

unterbrochenen Linien stellen Nanopartikel ohne Antigenbeladung dar. Diese zeigen unabhängig vom DDA keinen Effekt auf die Zellen. Freies Ovalbumin (schwarze Linie) zeigt einen klassischen dosisabhängigen Verlauf; je mehr Ovalbumin auf die Zellen gegeben wird desto stärker fällt die Zellreaktion aus. Wird das Ovalbumin in partikulärer Form zu den Zellen gegeben, so zeigt sich eine gesteigerte CD69-Expression und IL-2-Ausschüttung (s. Kapitel 5.6.4.1). Dieser Effekt ist, wie die Abbildung zeigt, abhängig vom DDA des verwendeten Chitosans. So zeigt das Chitosan mit einem DDA von 90% den höchsten, während das 75%ige den niedrigsten Effekt hat. Da das 95%ige vom Effekt zwischen den beiden Formulierungen liegt, lässt sich keine direkte Korrelation zwischen DDA und Effekt herstellen. Die Formulierung mit dem Deacetylierungsgrad von 90% erweist sich als das Optimum der getesteten Formulierungen zur Stimulierung der T-Zellen und wird daher bevorzugt weiter verwendet.

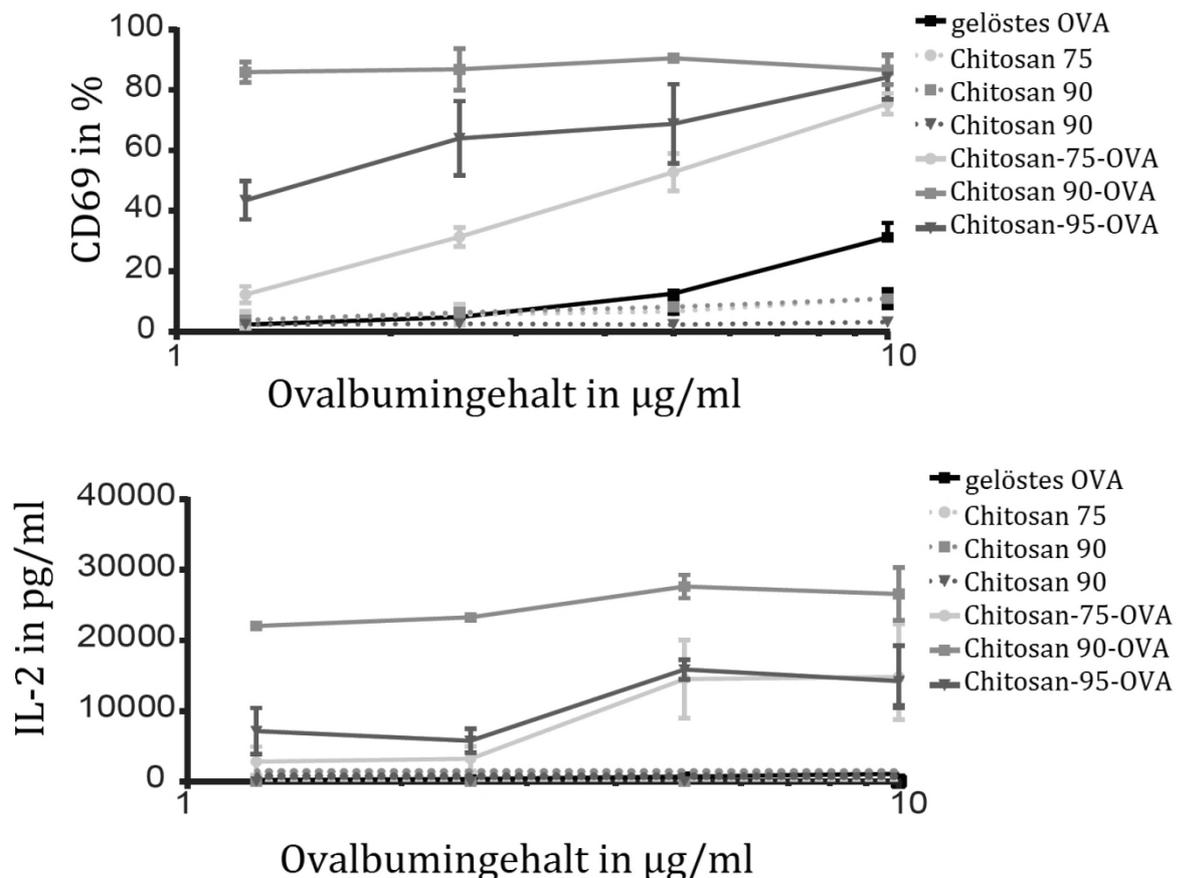
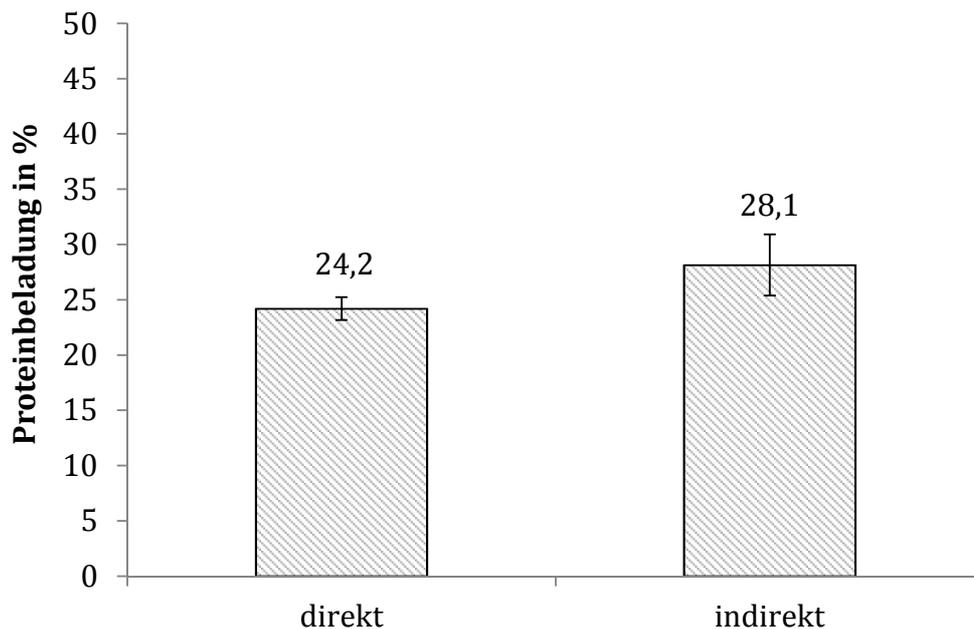


Abbildung 5.64: Vergleich der CD69-Expression und IL-2-Sekretion von OTI T-Zellen bei Verwendung von Chitosan Nanopartikeln mit unterschiedlichem DDA mit und ohne Beladung von Ovalbumin (n=3, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen)

5.6.4.3 Humane in-vitro Experimente mit dem Tumorantigen Her2/neu

5.6.4.3.1 Herstellung der verwendeten Formulierungen

Die unbeladenen Nanopartikel werden nach den Standardparametern hergestellt und getrocknet. Zur Herstellung der beladenen Partikel wird das Antigen Her2/neu, in einem 6 M-Guanidin-Puffer stabilisiert bezogen. Dieser muss vor der Herstellung entfernt werden, denn der Einfluss auf den Herstellprozess ist nicht einzuschätzen und aufgrund der geringen verfügbaren Menge nicht evaluierbar. Dafür wird eine Mikrofiltrations-einheit (Vivaspin 6, Sartorius, Deutschland) verwendet, bei der die Elektrolyte per Zentrifugation abgetrennt werden. Das Her2/neu wird daraufhin über die Chitosanlösung in den Herstellprozess eingebracht. Die entstehenden Partikel werden nach den Standardparametern gewaschen und getrocknet. Die Beladung wird mittels BCA-Assay nach direkter und indirekter Methode bestimmt und liegt bei 26,1%.



Her-2/neu	Partikelgröße
Vor Sprühtrocknung	152 nm PDI 0,179
Nach Sprühtrocknung	290 nm PDI 0,334

Abbildung 5.65: Proteinbeladung nach Proteinbestimmungsmethode und Partikelgrößenverteilung der Her2/neu beladenen Partikel; Charge 1, LC direkt: 24,2% (n=6); indirekt: 28,1% (n=12)

Außerdem wird die Antigenintegrität mittels SDS-PAGE nach der Herstellung mit dem unbehandelten Standard verglichen. Dabei kann in allen Proben dieselbe Bandenverteilung ausgemacht werden (Abbildung 5.66); die Primärstruktur des Antigens, mit der auch das Epitop kodiert wird, ist also durch den Herstellprozess erhalten geblieben.

Als Anmerkung sei hier kurz erwähnt, dass das Antigen in einer Reinheit von 90% bezogen wurde. Auf dem Gel sind folglich zusätzliche Banden mit kleineren Molekulargewichten zu erkennen (30 kDa, 17 kDa). Da diese auch in der nach Herstellerempfehlung gelagerten Referenz auftreten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um eine Degradation des Proteins sondern die Ausgangskontamination handelt.

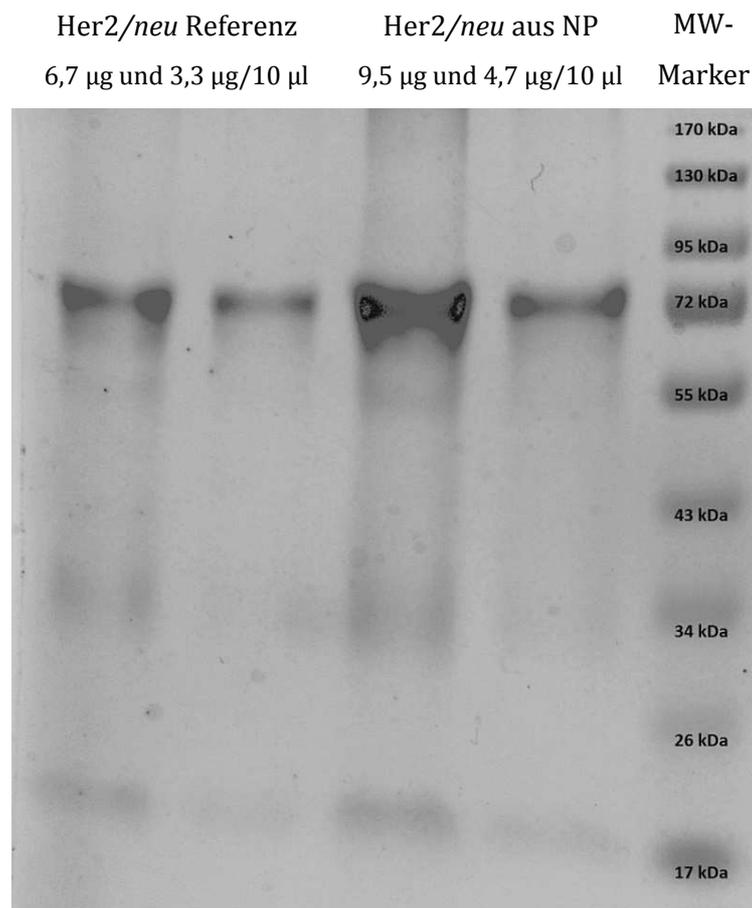


Abbildung 5.66: SDS-PAGE des Her2/neu Antigens nach Herstellung verglichen mit dem Standard, MW-Marker (PageRuler™)

5.6.4.3.2 Effekt der unbeladenen Nanopartikel auf die Aktivierung dendritischer Zellen

Die für die Experimente benötigten unreifen dendritischen Zellen werden, wie im Methodenteil beschrieben, gewonnen und inkubiert. An Tag 5 der Kultivierung werden die Nanopartikel in verschiedenen Konzentrationen für weitere zwei Tage Inkubation hinzugegeben. Als Positivkontrolle wird LPS (Lipopolysaccharid) verwendet, das die DCs stark stimuliert. An Tag 7 werden die Zellenoberflächen mit den Antikörpern gegen HLA-DR, CD80 und CD86 markiert und über das FACS analysiert. Die untersuchten Strukturen stellen dabei Marker für die Aktivierung der dendritischen Zellen dar (Tabelle 5.25).

Tabelle 5.25: Aktivierungsmarker aktivierter dendritischer Zellen nach [3, 8]

Zielstruktur	Funktion bzw. Verwendung
CD 80	Co-Stimulierung für naive T-Zellen
CD 83	Regulation T und B-Zellentwicklung
CD 86	Wichtigstes co-stimulierendes 2. Signal für naive T-Zellen
HLA-DR	MHC-Klasse-II Rezeptor, Aktivierung T und B Zellen

In Abbildung 5.67 ist der Effekt der unbeladenen Nanopartikel auf die Expression der untersuchten Zellrezeptoren dargestellt. Es kommt bei allen untersuchten Rezeptoren zu einer mehrfachen Erhöhung der Expression nach Zugabe der Nanopartikeln. Chitosan-Nanopartikel stimulieren demnach die Reifung der DCs. Eine Initiierung der DC-Reifung durch Chitosan, wird in der Literatur bereits beschrieben. Dabei wurde beispielsweise bei Lin et al. [125] Chitosanlösung benutzt, um 24-Well-Platten zu beschichten. Auf dem, durch Trocknen entstehenden, Film wurden BMDCs aus C57BL6-Mäusen ausgesät. Dieser Chitosanfilm war in der Lage eine DC-Reifung zu initiieren. Aber auch Nanopartikeln aus Trimethylchitosan zur nasalen Applikation konnten in vitro eine Reifung auslösen [126].

Generell ist dieser Effekt als positiv einzustufen, denn durch eine erhöhte Reifungsrate der DCs ist ebenfalls mit einer vermehrten Stimulation weiterer Immunzellen zu rechnen. Dies könnte sich positiv auf die Effizienz der Vakzine auswirken.

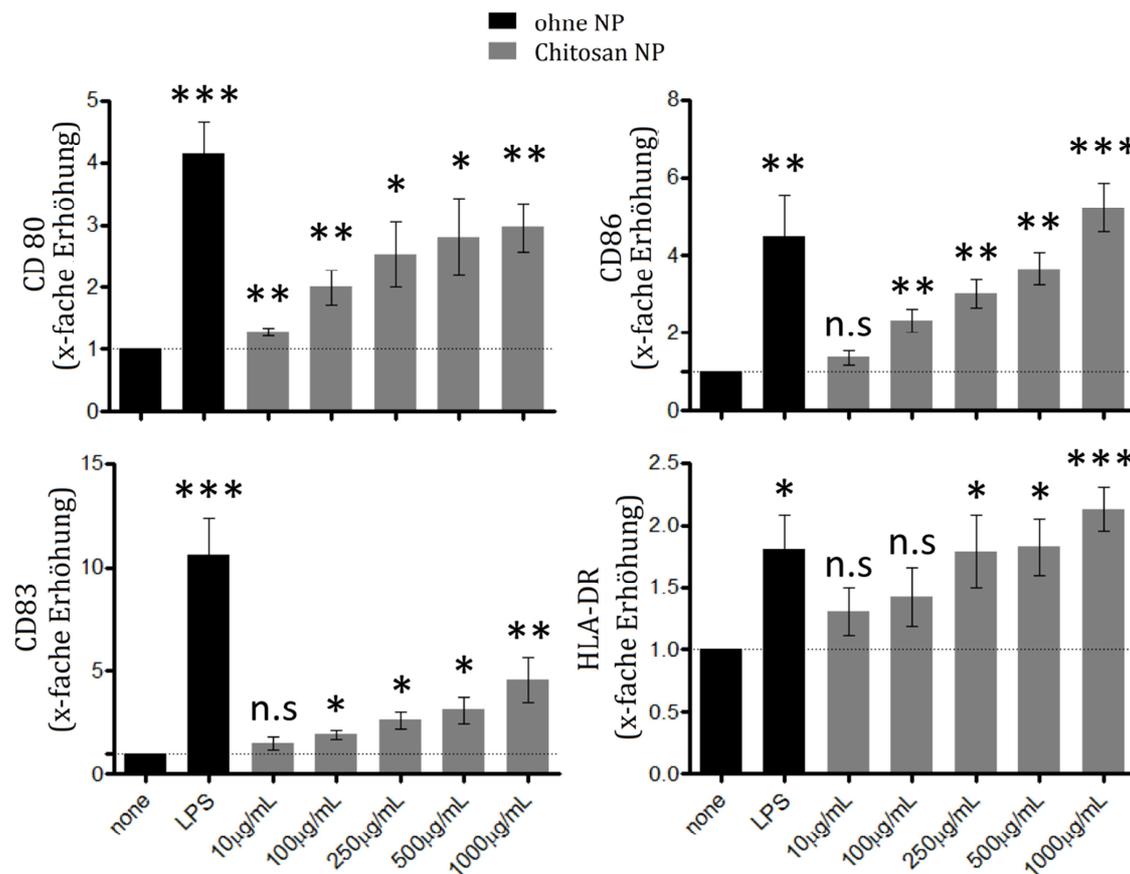


Abbildung 5.67: Effekt der unbeladenen Chitosan-Nanopartikel auf die Reifung der DCs ($n=9$); * $=p<0,05$; ** $=p<0,01$; *** $=p<0,001$ im Vergleich mit den unbehandelten DCs (= none), Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung

5.6.4.3.3 Effekt der antigenbeladenen Partikel auf humane dendritische Zellen

Um die Effektivität der Antigenpräsentation und der Cross-Präsentation durch die dendritischen Zellen zu bestimmen, werden diese an Tag 5 der Inkubation mit löslichem und nanopartikulär-eingekapseltem Antigen in verschiedenen Konzentrationen für weitere zwei Tage inkubiert. Die Präsentation von Antigenfragmenten auf MHC-I und II-Molekülen wird im Anschluss durch die Zugabe von autologen CFSE-markierten CD4+ und CD8+ T-Zellen gemessen. Proliferieren die Zielzellen, so zeigt sich eine Abnahme des CFSE-Signals. Der Anteil an proliferierenden Zellen (CFSE_{low}) ist in Abbildung 5.68 dargestellt. Bei der Auswertung weisen die DCs, die mit dem partikulär-gebundenen Antigen behandelt werden, im Vergleich zum löslichen Her2/neu eine verstärkte Stimulation von sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen auf

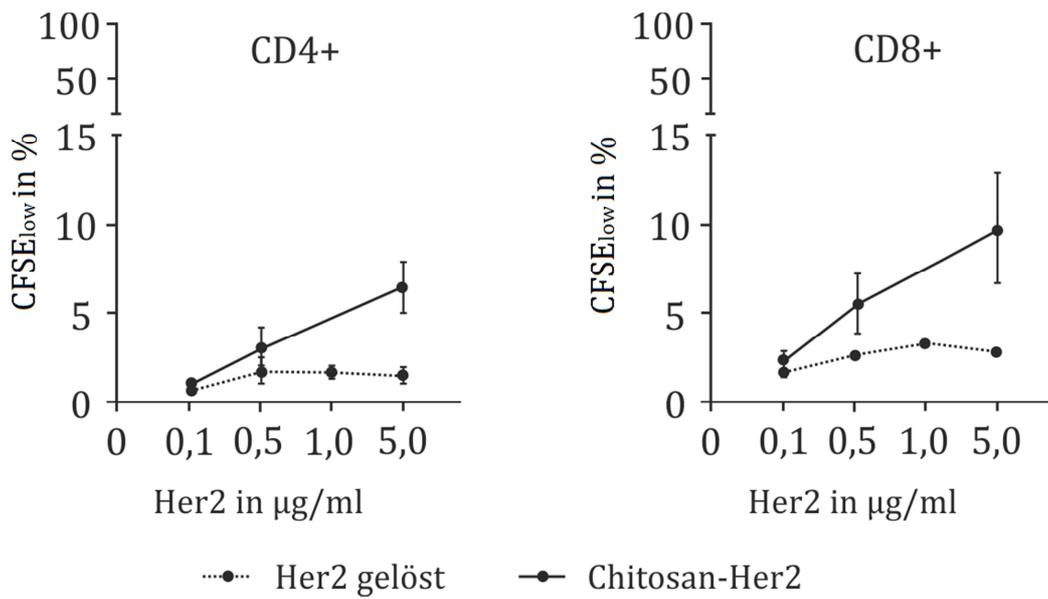


Abbildung 5.68: Vergleich von löslichem und partikulärem Antigen, dosisabhängige CD4+ und CD8+ T-Zellantworten (n=8, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung)

Gerade die Antigenpräsentation über MHC-II (entspricht der CD4-Expression) scheint hierbei stark von der Bindung des Antigens an einen Partikel zu profitieren (p=0,001), denn weder das lösliche Her2/neu noch eine gleichzeitige Gabe mit unbeladenen Nanopartikeln führen zu einer verstärkten Proliferation der T-Zellen (Abbildung 5.69).

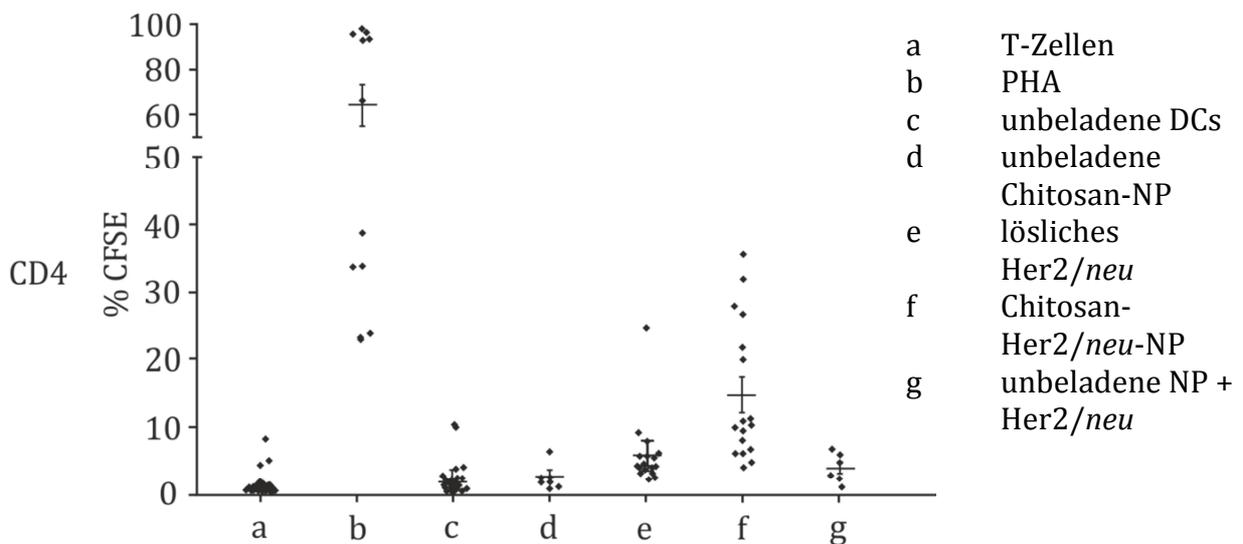


Abbildung 5.69: Proliferation von CD4+ T-Zellen durch proteinfreie NP, NP mit Her2/neu-Beladung und NP mit Her2/neu zeitgleich verabreicht (Menge Her2/neu 5µg/ml), PHA= Phytohemagglutinin (Positivkontrolle); Punkte entsprechen Einzelmesswerten, Kreuze entsprechen dem Mittelwert mit der Standardabweichung

Die Effizienz der Stimulation von CD8+ T-Zellen kann ebenfalls verbessert werden (Abbildung 5.70). Auch hier ist durch die Gabe von löslichem Antigen oder Antigen kombiniert mit unbeladenen Partikeln kein vergleichbarer Effekt zu erzielen.

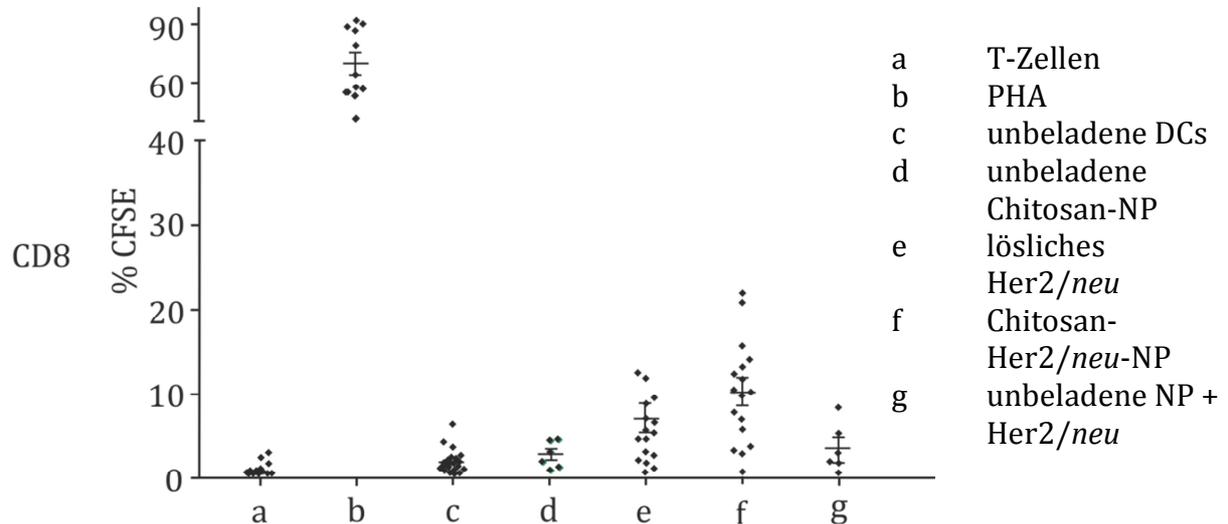


Abbildung 5.70: Proliferation von CD8+-T-Zellen durch proteinfreie NP, NP mit Her2/neu Beladung und NP mit Her2/neu zeitgleich verabreicht (Menge Her2/neu 5 µg/ml), PHA= Phytohemagglutinin (Positivkontrolle); Punkte entsprechen Einzelmesswerten, Kreuze entsprechen dem Mittelwert mit der Standardabweichung

Zudem wird die IL-12p70 Sekretion durch DCs quantifiziert; dieses stellt die aktive Form von IL-12 dar. Es ist an der Proliferation von T-Zellen in T_H1-Zellen, einer Unterart der CD4+ Zellen, beteiligt, durch die in Kombination mit IL-2 und INF-γ zytotoxische und antivirale Immunantworten stimuliert werden [127]. In Tiermodellen zeigt es effektive Antitumoreffekte, die auf die Aktivierung von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen zurückzuführen sind [128]. Es wird daher in einigen Impfstoffformulierungen experimentell zugesetzt um starke Immunantworten auch ohne zusätzliches Adjuvans auszulösen. In einer klinischen Studie soll so zum Beispiel der Zusatz von IL-12 bei einer Vakzine gegen Blasenkrebs erprobt werden [129].

In Abbildung 5.71 ist die IL-12p70-Sekretion durch die DCs nach ihrer Reifung dargestellt. T-Zellen, unbehandelte DCs und mit leeren Nanopartikeln inkubierte Zellen führen nur zu sehr geringer IL-12p70-Sekretion (unter 50 pg/ml). Durch Gabe von löslichem, wie auch partikulär gebundenem Antigen wird die Sekretion gesteigert. Dabei ergibt die Verkapselung des Antigens keinen Vorteil gegenüber einer Antigenlösung. Das partikulär angebotene Antigen kann aber fast ebenso gut die Sekretion steigern, was als

positiv einzuschätzen ist, denn IL-12 ist nötig, um eine vollständige und nachhaltige Immunantwort auszulösen.

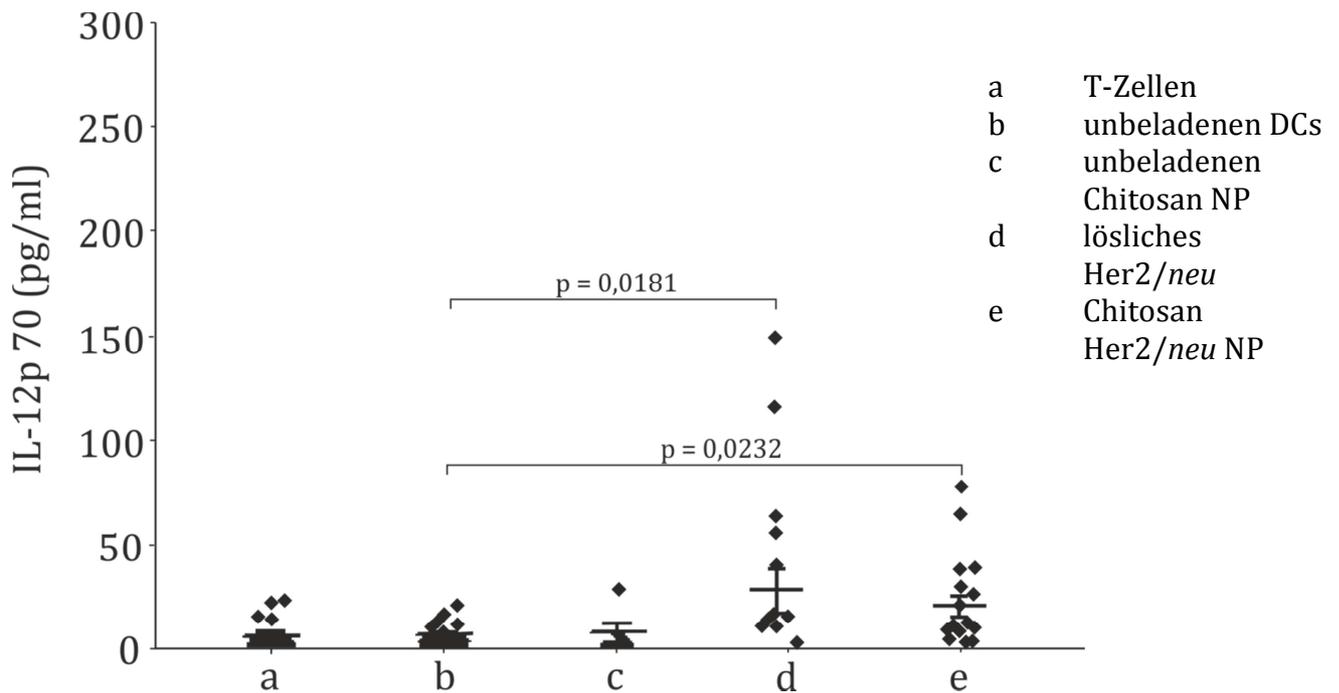


Abbildung 5.71: IL-12 Sekretion durch proteinfreie NP, NP mit Her2/neu-Beladung und NP mit Her2/neu zeitgleich verabreicht aus T-Zell Co-Kultur (Menge Her2/neu: 5 µg/ml), ELISA (n=16, Punkte entsprechen Einzelmesswerten, Kreuze entsprechen dem Mittelwert mit der Standardabweichung)

Die Partikel zeigen im murinen sowie auch im humanen System eine deutliche Stimulation des Immunsystems. Dabei kommt es sowohl zur Aktivierung von dendritischen Zellen (CD80), als auch zu einer Präsentation von Antigenfragmenten durch MHC-I und MHC-II (CD8, CD4) mit Sekretion von IL-12, welches zu einer weiteren Stimulierung des Immunsystems führt. Im Zuge dessen werden T-Zellen (CD69) aktiviert, die durch Sekretion von Zytokinen (IL-2) ebenfalls starke Stimulation zeigen.

5.6.5 Aktivierung der Immunzellen in-vivo

5.6.5.1 Spezifischer in-vivo kill

Der in-vivo kill untersucht die Effektivität der CD8+-Antwort in der Maus durch eine vorherige Immunisierung mit gelöstem und partikulärem Ovalbumin. Dazu werden C57BL6-Mäuse an Tag 0 und Tag 7 mit einer Menge von jeweils 75 µg Ovalbumin immunisiert (Abbildung 5.72). An Tag 13 werden den so immunisierten Mäusen CFSE-

markierte OVA-beladenen Milzzellen i.v. gegeben, auf welche die CD8⁺ Zellen in der Maus durch die vorangegangene Immunisierung sensibilisiert sind. Nach 4 h und nach 24 h wird die, durch die Sensibilisierung eingeleitete, zellspezifische Lyse der CFSE-markierten Zellen durch die CD8⁺ Zellen mittels der FACS-Analyse bestimmt [91].

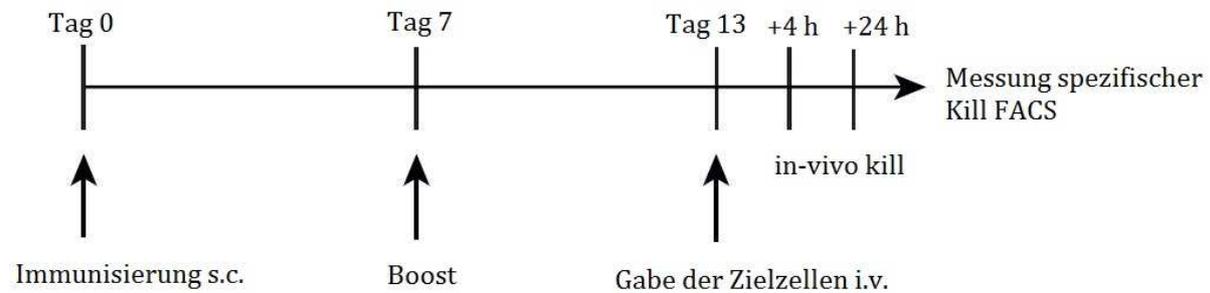


Abbildung 5.72: Immunisierungsschema in-vivo kill

Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.73 für die zwei Messzeitpunkte aufgeführt. Eine Immunisierung mit löslichem OVA ist weder in 4 h noch nach 24 h in der Lage, die Zellyse durch spezifische CD8⁺ Zellen zu induzieren. Nach einer Immunisierung mit Chitosan-Ovalbumin-Nanopartikeln hingegen kommt es zu einer spezifischen Lyse der injizierten Milzzellen, die zeigt, dass es zu einer effizienten Bildung von antigenspezifischen CD8⁺ Zellen in der Maus kommt. Dieser Test zeigt, dass die in-vitro beobachtete Proliferation von T-Zellen auch in in-vivo vorhanden ist. Interessanterweise ist nach der Immunisierung mit löslichem Ovalbumin keine spezifische Lyse zu beobachten, obwohl dieses für C57BL6-Mäuse eine immunogene Struktur darstellt. Eine mehrfache Gabe kann Immunität induzieren. Dies wird auch in Studien beschrieben, in denen Mäusen Ovalbumin über einen längeren Zeitraum oral oder nasal zugeführt wird [57, 130]. Als Grund hierfür wird die Zunahme von IL-10 sekretierenden T-Zellen diskutiert. IL-10 wirkt hemmend auf die Produktion von stimulierenden Zytokinen (u.a. IFN- γ , TNF- α und IL-6) aus der Milz, wodurch eine Immunantwort vermindert abläuft [130]. Bei der Gabe von partikulär gebundenem Antigen kann diese Toleranz nicht festgestellt werden. Dieser Effekt ist gewünscht; bei der therapeutischen Vakzinierung besteht bereits eine Toleranz und eine Resensibilisierung für das Antigen soll erzeugt werden.

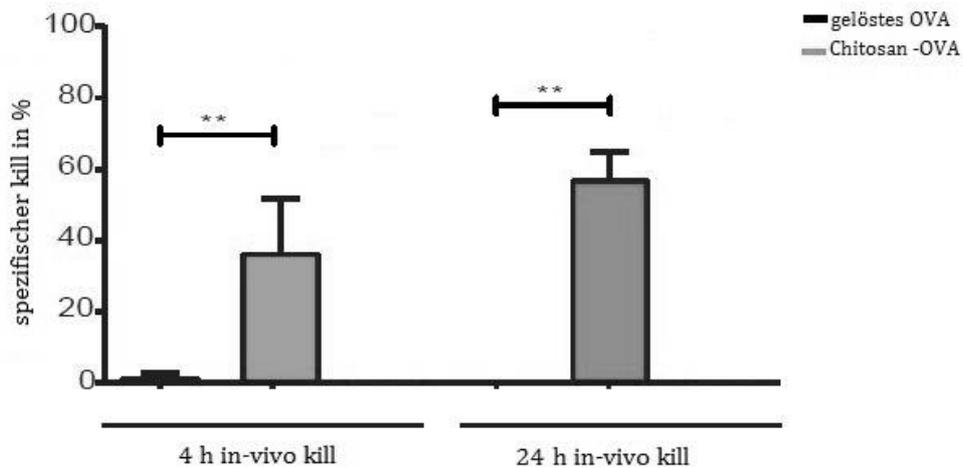


Abbildung 5.73: Ergebnisse der s.c. Immunisierung von C57BL6 Mäusen mit spezifischem CD8+-Kill ($n=4-5$, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)

5.6.5.2 In-vivo Studie

Um humorale und zelluläre Immunantworten durch die Formulierung in-vivo zu testen, wird zunächst überprüft, ob die Formulierung pulmonal an der Maus applizierbar ist. Anschließend wird mit der hergestellten Formulierung (5.6.5.2.1) die Proliferation von Immunzellen (5.6.5.2.2) und zytotoxischen T-Zellen (5.6.5.2.3) nach pulmonaler Gabe untersucht, sowie die Sekretion von spezifischen IgG-Antikörpern und Zytokinen gemessen (Kapitel 5.6.5.2.4).

5.6.5.2.1 Verwendete Formulierung und Applikation

Für die Tierstudie wird die Standardrezeptur mit Ovalbumin verwendet. Die Kenndaten sind in Tabelle 5.26 zusammengefasst

Tabelle 5.26: Kenndaten der Formulierung für die Tierstudien

Chitosan	Größe nach SD	PDI	Zusammensetzung	
90/10	252 nm	0,143	Mannitol	20 Teile
			Chitosan-CMC-NP	1 Teil
			Ovalbumin	0,106 Teile

Das Pulver sollte ursprünglich über einen Insufflator in der Mäuselunge appliziert werden. Da die höchste zu verwendende Einzeldosis auf 30 µg Ovalbumin festgelegt

wurde, werden insgesamt 6,3 mg trockener Formulierung pro Immunisierung benötigt. Eine solche Pulvermenge führt jedoch zur Schnappatmung der Tiere. Die Formulierung wird daher vor Gabe in Phosphatpuffer pH 7,4 redispergiert und als flüssiges Aerosol über den Mikrosprayer (Kapitel 4.2.7.2.2) appliziert.

5.6.5.2.2 Zellproliferation (^3H -Thymidin)

Für die Zellproliferation werden isolierte Milzzellen aus den mit der Formulierung stimulierten Mäusen gewonnen und mit dem Antigen restimuliert, wodurch vor allem B- und T-Zellen proliferieren. Durch Einbau der radioaktivmarkierten Base ^3H -Thymidin nimmt das mit dem Szintillationszähler gemessene Signal zu, woraus der Stimulationsindex errechnet werden kann (Kapitel 4.2.7.2.5). Diese Methode stellt eine rein quantitative Messung dar, denn sie erfasst die Proliferationen aller Zellen in der Probe, aber nicht deren Natur. In Abbildung 5.74 sieht man die Proliferation in Abhängigkeit der eingesetzten Antigenmenge und Zusatz ausgewählter Adjuvanzien aus C57BL6-Mäusen (Kontrollstudie, Kapitel 4.2.7.2.1).

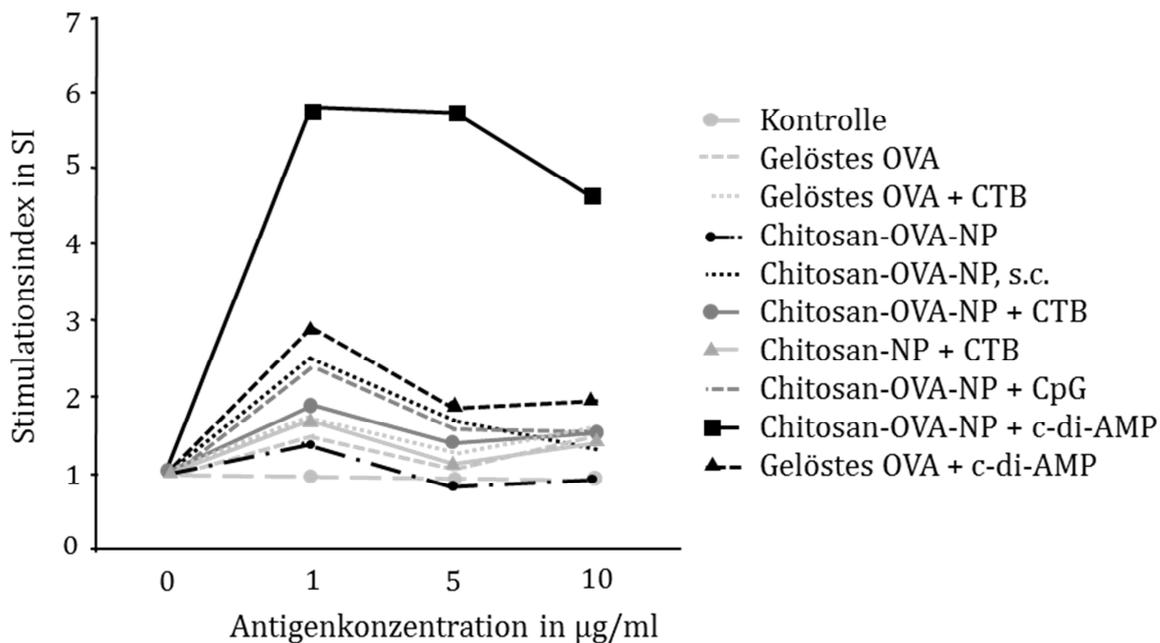


Abbildung 5.74: Zellproliferation ^3H -Thymidin-Assay in Abhängigkeit der eingesetzten Stimulanzen ($n=4$, Durchschnittswert der Zählungen pro Minute aus stimulierter versus der nicht stimulierten Probe (SI))

Alle Versuchsgruppen proliferieren beim Einsatz von 1 $\mu\text{g/ml}$ Ovalbumin im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS), bei dieser Dosis zeigen zudem alle Gruppen ein Maximum. Am stärksten proliferieren die Zellen, denen c-di-AMP als Adjuvans zugegeben wird. Der

Stimulationsindex (SI) der Standardrezeptur mit Zusatz von 10 µg c-di-AMP liegt bei etwa 6, entsprechend einer 6-fach höheren Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die Versuchsgruppe, die mit gelöstem OVA und c-di-AMP immunisiert wurde, proliferiert; das Maximum liegt hier bei einem SI von 3 und einem Einsatz von 1 µg/ml OVA.

5.6.5.2.3 Zelluläre Immunantwort

Zur Untersuchung der CD8⁺ Proliferation, werden C57BL6 Mäusen CFSE-gefärbte CD8⁺-OTI-T-Zellen intravenös injiziert. Anschließend werden die Mäuse immunisiert, wodurch es zu einer Proliferation der markierten CD8⁺ kommen soll. Um das Ausmaß der Proliferation der hinzugegebenen CFSE-markierten CD8⁺ Zellen zu quantifizieren, werden nach vier Tagen die Zielorgane (Lunge, Milz und zervikale Lymphknoten) zur Analyse entnommen. Durch die FACS-Analyse können die Zellen detektiert und die Intensitätsänderung des CFSE-Farbstoffes bestimmt werden.

In Abbildung 5.75 bis Abbildung 5.77 sind die Zellpopulationen aus den Hals-Lymphknoten, der Lunge und der Milz dargestellt. Die Negativ-Kontrolle stellt eine C57BL6-Maus dar, der nur die CFSE-markierten T-Zellen injiziert wurden. Verglichen werden die absoluten, detektierbaren Zellzahlen der proliferierenden und nicht proliferierenden Fraktion in den einzelnen Mäusen. Alle Abbildung zeigen ein ähnliches Bild der Kontrollgruppe: es kommt zu keiner Proliferation in den zentralen Lymphknoten, der Lunge oder in der Milz. Die detektierbare Zellanzahl ist sehr gering, was darauf hinweist, dass die transferierten Zellen sich im Organismus verteilt haben und sich nicht aufgrund eines Stimulus im lymphatischen Geweben anreichern. Unbeladene Chitosan Nanopartikel liefern dasselbe Ergebnis, es kommt zu keiner Proliferation. Die Gabe von Chitosan-OVA-Partikeln mit 30 µg Antigen ist hingegen durchgehend durch eine hohe Proliferationsrate gekennzeichnet. Die pulmonale Gabe der Standardformulierung zeigt den höchsten Anteil proliferierender Zellen innerhalb der Versuchsgruppen unabhängig von dem untersuchten Organ. Interessanterweise kann der Effekt durch die Zugabe eines Adjuvans (c-di-AMP) nicht weiter gesteigert werden, die Zellzahl ist sogar geringer. Dies ist auf die Natur des Adjuvans zurückzuführen, denn c-di-AMP ist ein sekundäres, bakterielles Signalpeptid. Durch dieses werden vor allem die CD4⁺ Subgruppen Th1 und Th2 stimuliert [131], die zwar auch DCs aktivieren, aber vor allem die Bildung spezifischer IgG-Antikörper einleiten.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die zelluläre Antwort durch das c-di-AMP zugunsten der humoralen Antwort verschoben wird. Die pulmonale Gabe von gelöstem Ovalbumin zeigt nur eine geringe Proliferationsrate, was sich auch schon in den in-vitro-Ergebnissen zeigte (Kapitel 4.2.7.2.). Bei der subkutanen Gabe der Formulierung ist in allen lymphatischen Geweben die proliferierende Zellanzahl unterhalb der nach mukosalen Gabe, zeichnet sich aber auch durch eine hohe Proliferationsrate aus. Die Daten unterstreichen, dass sich die mukosale Applikation der entwickelten Formulierung als sehr effektiv herausstellt.

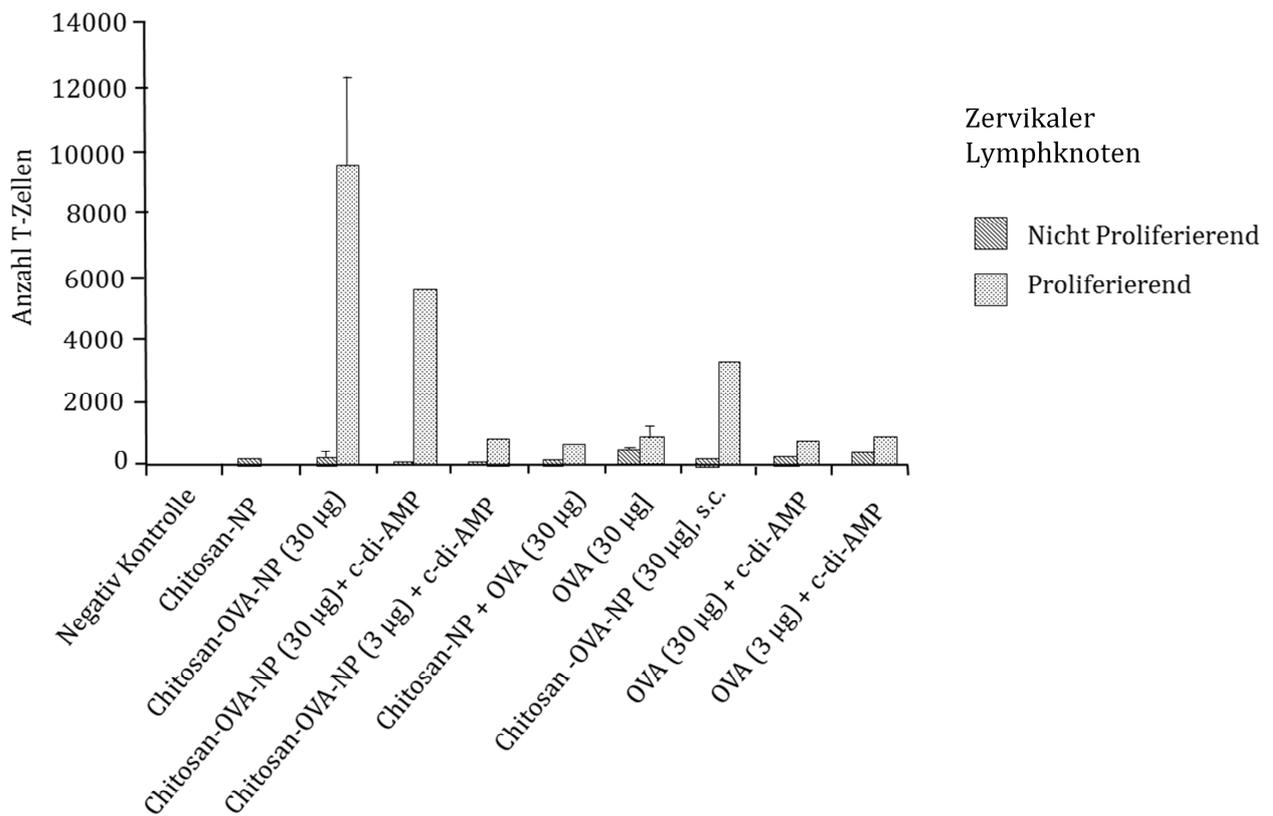


Abbildung 5.75: Anzahl der proliferierenden und nicht proliferierenden OTI-T-Zellen nach Stimulation im zervikalen Lymphknoten ($n=3-5$; Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung)

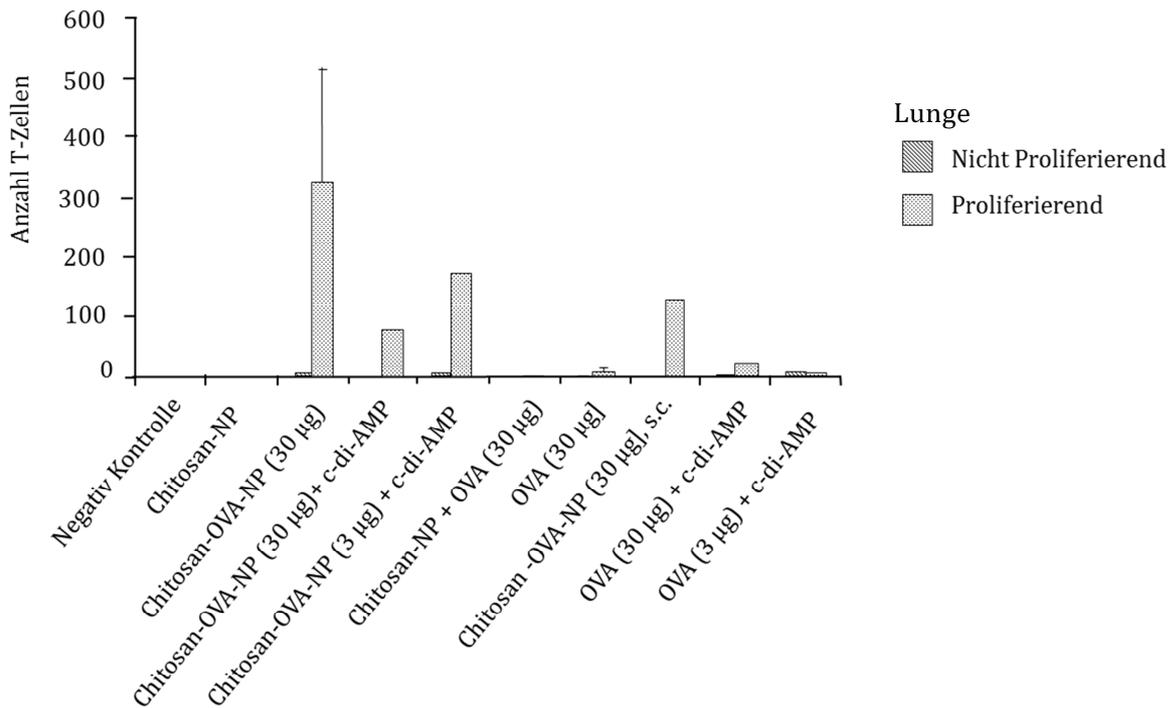


Abbildung 5.76: Anzahl der proliferierenden und nicht proliferierenden OTI-T-Zellen nach Stimulation in der Lunge (n=3-5; Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung)

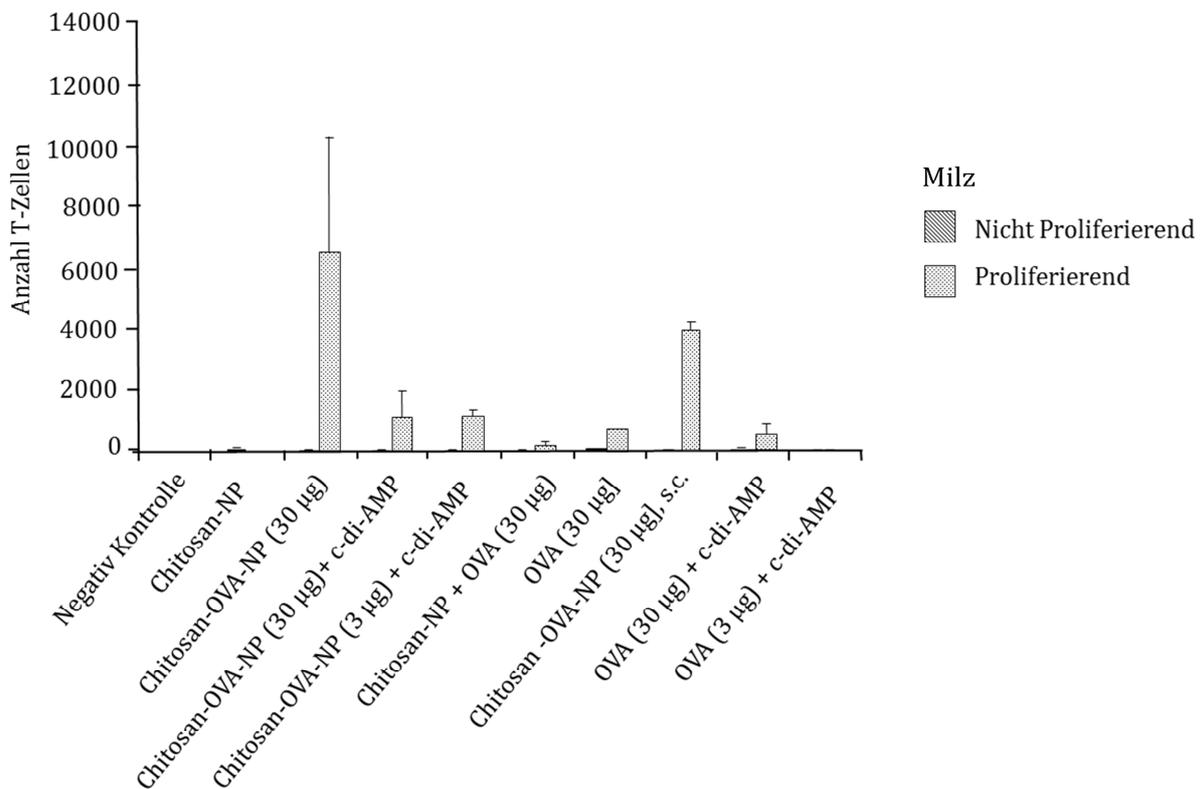


Abbildung 5.77: Anzahl der proliferierenden und nicht proliferierenden OTI-T-Zellen nach Stimulation in der Milz (n=3-5; Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung)

5.6.5.2.4 Humorale Immunantwort

In Abbildung 5.78 sind die Sekretion der Zytokine IL-2 und IL-4 dargestellt. Beide Interleukine stammen aus naiven stimulierten T-Zellen. IL-2 führt zu einer weiteren Stimulation von T-Zellen. IL-4 ist ein Marker für die humorale Immunantwort gegen extrazelluläre Erreger und führt zur Proliferation der Th2 Zellen [8].

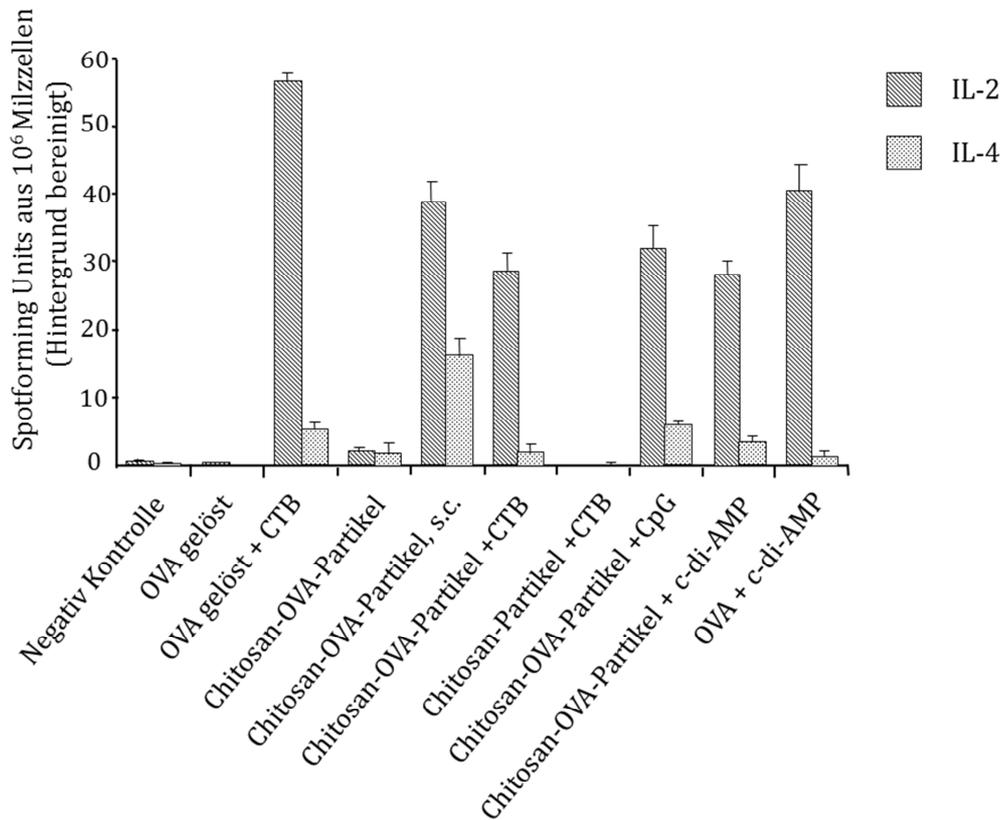


Abbildung 5.78: Sekretion von IL-2 und IL-4 nach Immunisierung in C57BL/6 Mäusen, ELISPOT (n=5-10, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung)

Weder die Kontrollgruppe, lösliches Ovalbumin noch unbeladene Chitosan Nanopartikel mit Adjuvans führen zu einer IL-2 und IL-4-Sekretion. Gelöstes Ovalbumin mit Adjuvans hingegen führt zu hohen IL-2 und IL-4-Spiegeln und stimuliert so die zelluläre Immunantwort in hohem Maße. Subkutan injizierte Chitosan Nanopartikel führen zu einer hohen Ausschüttung von IL-2 und IL-4, pulmonal sind die Effekte deutlich schwächer, jedoch durch Zugabe eines Adjuvans verstärkbar. Hier wirken CTB, CpG und c-di-AMP gleichermaßen gut. Die anschließend gemessenen IgG-Titer sind in Abbildung 5.79 aufgeführt und korrelieren mit den sekretierten Zytokinmengen. Gibt es eine

vorhergehende hohe Zytokinausschüttung, so werden auch erhöhte IgG-Spiegel gemessen.

Durch die Co-Administration eines Adjuvans wird über Zellsignale eine aufkommende bakterielle Infektion simuliert, die eine entsprechende Immunantwort hervorruft [3, 88]. Interessant hingegen ist, dass auch die subkutane Gabe der Formulierung zu einer hohen humoralen Immunantwort führt. Dendritische Zellen sitzen vorwiegend an den Grenzflächen zur Umwelt, wie der Haut oder den Schleimhäuten [132]. Da hier diese Grenzfläche durch Injektion umgangen wird, finden sich am Applikationsort nur wenige DCs. Die erste Abwehr stellen die neutrophilen Granulozyten dar, die durch die Gewebeverletzung und den in der Literatur beschriebenen adjuvanten Effekt des Chitosans an den Injektionsort gelockt werden. Dabei werden alle Fremdpartikel von den phagozytotisch aktiven Zellen beseitigt und eine entsprechende Immunantwort ausgelöst. Die β -Glukan-Struktur des Chitosans ähnelt chemisch der Oberfläche von gramnegativen und mykotischen Zellen, sodass es denkbar ist, dass eine Immunreaktion gegen derartige Erreger initiiert wird. Dadurch werden zusätzlich zur zellulären Immunantwort Antikörper gebildet.

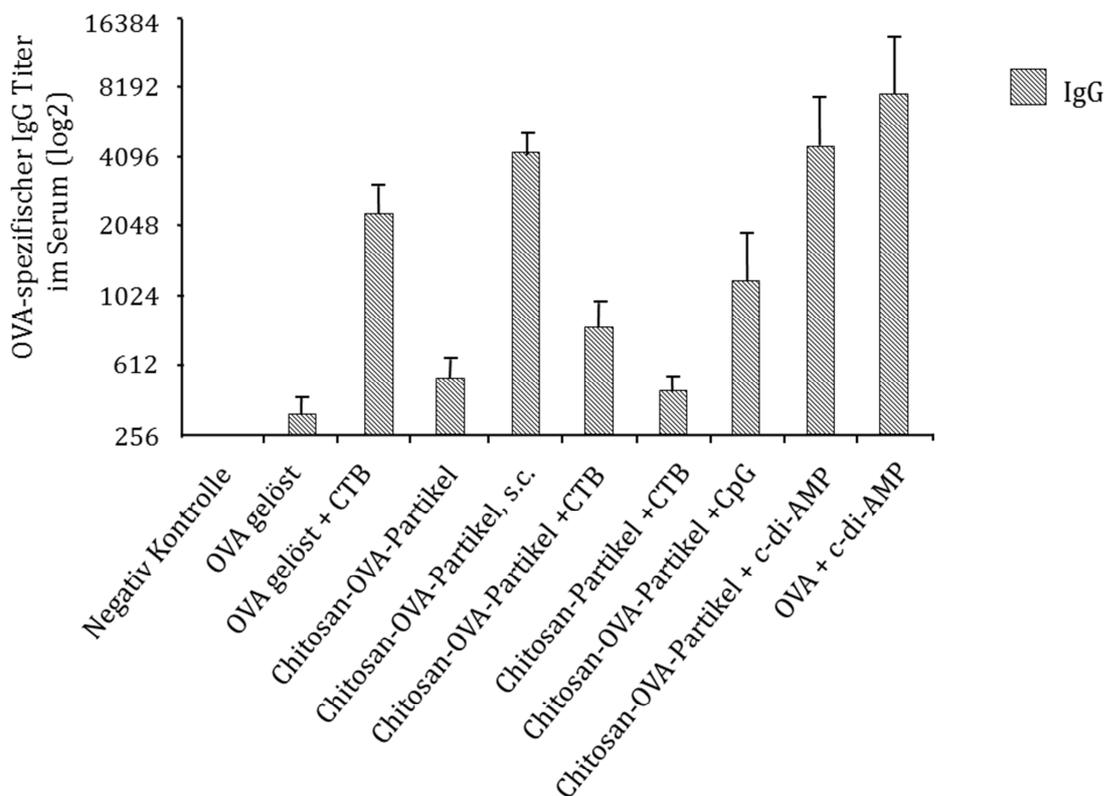


Abbildung 5.79: Sekretion von IgG nach Immunisierung in C57BL6-Mäusen, ELISPOT (n=5-10, Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung)

5.6.5.2.5 Zusammenfassung in-vivo Versuche:

Die Gabe der Formulierung kann in den untersuchten Mäusen eine humorale und zelluläre Immunantwort auslösen. Dabei kann durch die Zugabe eines Adjuvans und den Applikationsort die Zellantwort im gewissen Rahmen gelenkt werden. Werden keine Adjuvanzen hinzugefügt, wird bei der pulmonalen Gabe eine zytotoxische Immunantwort eingeleitet. Die Partikel werden aufgenommen und setzen das Antigen im Inneren frei, wodurch die Zelle ähnlich wie bei einer intrazellulären, viralen Infektion reagiert. Durch die kombinierte Gabe mit Adjuvans, werden überwiegend die CD4+ Zellen aktiviert, die dann eine humorale Immunantwort mit Antikörperbildung stimulieren. Dies ist auf die Natur der Adjuvanzen zurückzuführen, die eine bakterielle Infektion simulieren.

Für die Entwicklung einer therapeutischen Vakzine sollte daher, wenn nötig, auf Adjuvanzen zurückgreifen, die die zytotoxische Abwehr des Körpers unterstützen. Als solche werden zum Beispiel IL-12, zur Unterstützung der zellulären Immunantwort oder B7-1, ein co-stimulierendes Molekül, das an Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist, beschrieben [133]. Anhand der erhaltenen Ergebnisse ist neben einer subkutanen eine pulmonale Applikation denkbar, denn hier ist kein invasiver Eingriff nötig und es kommt es zu einer starken Proliferation der Zielzellen.

6 KURZFASSUNG DER ARBEIT

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung und Charakterisierung einer antigenhaltigen nano-in-mikropartikulären Formulierung (NiM) zur pulmonalen therapeutischen Vakzinierung. Dabei stellt die Lunge mit ihrer guten Durchblutung und vielen immunkompetente Zellen einen optimalen Applikationsort dar. Partikel zwischen 100 -500 nm können hier phagozytiert und prozessiert werden. Diese können zunächst als wässrige Nanosuspension formuliert und anschließend durch Sprühtrocknung in einen Größenbereich zwischen 0,5- 5 μm überführt werden, um eine optimale Inhalation bis in das alveolare System zu ermöglichen.

Als Ausgangsstoffe der Formulierung werden Chitosan und Carboxymethylcellulose verwendet, die beide mukoadhäsive Eigenschaften besitzen. Chitosan weist zudem eine adjuvante Wirkweise auf.

Zur Nanopartikelherstellung werden die Polymere in zwei separaten wässrigen Phasen gelöst, die zur Beladung ein Antigen enthalten können. Anschließend werden sie unter Rühren zusammengegeben und binden durch eine Ladungsausgleichsreaktion aneinander. Die Partikelgröße der so gebildeten Nanosuspension liegt unabhängig von der Beladung bei 200 – 300 nm. Sie kann durch die Konzentrationen und das Reaktionsverhältnis der Polymere gesteuert werden. Je nach Größe des Antigens variiert die Beladungsrate zwischen 5-27%. Um eine enge Verteilung der Partikelgröße zu erreichen, werden Chitosane mit geringer Viskosität (<15 mPas) verwendet.

Die anschließende Sprühtrocknung bestimmt die Größe und Gestalt der trockenen Formulierung. Die Atomisierungsenergie, die Feststoffkonzentration in der Suspension und der Düsendurchmesser sind die wesentlichen Determinanten dieses zweiten Verfahrensschrittes. Durch den Zusatz einer löslichen Mannitolmatrix und das Absenken der Trocknungstemperatur auf unter 40°C werden irreversible Verklebungen der Partikel im Trocknungsprozess vorgebeugt. So können Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von 1,3 bis 4,5 μm erzeugen werden. Diese sind durchgängig als Hohlkugeln mit einer geringen Dichte zu beschreiben und weisen daher trotz unterschiedlicher Größe ähnliche aerodynamische Eigenschaften auf. Alle getesteten Formulierungen können unter Verwendung eines Trockenpulverinhalators gut im Luftstrom dispergiert werden und bis tief in die Lunge gelangen. Nach der Trocknung wird durch Redispergieren in unterschiedlichen Medien sichergestellt, dass die Nanoformulierung rekonstituierbar ist.

Die finale Formulierung zeigt bei Experimenten mit verschiedenen murinen und humanen Zelltypen keine Anzeichen toxischer Effekte. In-vitro kommt es zur erwünschten Aktivierung dendritischer Zellen in beiden Systemen. In in-vivo Experimenten mit C57BL6 und OTI Mäusen bildet sich eine zelluläre Immunantwort aus. Diese kann durch den Einsatz von ausgewählten Adjuvanzen in Richtung einer humoralen Antwort verschoben werden, sodass neben der therapeutischen Vakzinierung auch der Einsatz als präventive Impfung denkbar ist.

Durch das Inkorporieren des Tumorantigens Her2/*neu* konnte die Wirksamkeit der Formulierung auch im humanen System in-vitro bestätigt werden. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, dass die Ergebnisse sich ebenfalls in-vivo erzeugen lassen und somit neue Möglichkeiten zur Vakzinierung eröffnen.

7 ABSTRACT

In this work, an antigen-containing nano-in-microparticulate (NiM) formulation for pulmonary therapeutic vaccination is developed and characterised. The lung provides an optimal region for administration due to its good blood circulation and high number of immunocompetent cells. Particles between 100-500 nm can be phagocytosed and processed easily. Such particles can be first formulated as an aqueous nanosuspension. Being spray dried they are converted to a size range between 0.5 and 5 microns, which allows an optimal inhalation into the deep lungs.

As starting materials in the formulation, chitosan and carboxymethyl cellulose are used. Both show mucoadhesive properties. Chitosan, in addition, also acts as an adjuvant.

To initiate the formation of nanoparticles, the two polymers are dissolved in two separate aqueous phases, which may also contain antigen for encapsulation. By adding one phase to the other while stirring they undergo a reaction due to charge-compensation. The resulting particle size is around 200-300 nm and mostly independent from the use of an antigen. The particle size can be influenced by adjusting concentration and ratio of the two polymers. Depending on the size of the antigen, the loading rate varies between 5-27 %. In order to obtain a narrow particle size distribution, chitosans with a low viscosity (<15 mPas) are used preferably.

The subsequent spray drying step with the Büchi B-290 defines size and shape of the dry formulation. Main determinants in this second process are atomizing energy, used concentration of solids in suspension and diameter of the drying nozzle. By addition of a soluble mannitol matrix and lowering the drying temperature below 40°C, irreversible gluing between particles can be avoided in the drying process. Thus, particles with an average size of 1.3 up to 4.5 microns can be produced. Consistently, they are all forming hollow spheres with a low density. Therefore, despite their differences in size, the aerodynamic properties are almost similar. Using a dry powder inhaler, all tested formulations can be dispersed in a size that is suitable to reach the depth of the lung. After drying, the reconstitution of the nanoformulation is ensured by redispersion in a variety of media.

The final formulation shows no signs of toxic effects in various tested murine and human cell types. In- vitro, the desired activation of dendritic cells in both systems using the developed formulation with a suitable antigen can be measured. With use of formulation, in the following in-vivo experiments with C57BL6 and OT-I mice, a cellular

immune response is initiated and can be shifted to humoral response due to the use of selected adjuvants. So, in addition to a therapeutic vaccination, the use as a preventive vaccine is also conceivable.

By incorporating the tumor antigen *Her2/neu* in-vitro efficacy of the formulation was confirmed. Further studies will have to state that these results can also be obtained in an in-vivo set-up which would offer highly promising possibilities for vaccination in the future.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 *Mutschler E.* Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie; 6. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.; 1991
- 2 *Forth W, Hrsg.* Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Für Studenten d. Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte u. Apotheker. 2. Aufl. Mannheim, Wien, Zürich: Bibliographisches Institut; 1977
- 3 *Murphy KM, Travers P, Walport M.* Janeway Immunologie. 7. Aufl. Berlin: Springer Berlin; 2014
- 4 *Löffler G, Löffler-Petrides, Petrides PE.* Biochemie und Pathobiochemie. Mit 218 Tabellen ; [mit Poster]. 7. Aufl. Berlin [u.a.]: Springer; 2003
- 5 *Krebsinformationsdienst, Krebsforschungszentrum D.* Zielgerichtete Verfahren gegen Brustkrebs (01.09.2014). Im Internet: <http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/brustkrebs/moderne-verfahren.php>; Stand: 03.11.2014
- 6 Krebs - Krebs gesamt. Im Internet: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html; Stand: 03.11.2014
- 7 About GARDASIL® | HPV Vaccine. Im Internet: <http://www.gardasil.com/about-gardasil/about-gardasil/>; Stand: 03.11.2014
- 8 *Rink L, Haase H, Kruse A.* Immunologie für Einsteiger. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl; 2012
- 9 Roche Pharma AG. Fachinformation Herceptin i.v. Juli 2014
- 10 *Novartis Vaccines & Diagnostics, Inc.* Metastatic Kidney Cancer Treatment | Proleukin (aldesleukin). Im Internet: <http://www.proleukin.com/mrcc/>; Stand: 04.11.2014
- 11 *Wong E, Rosen LS, Mulay M et al.* Sunitinib induces hypothyroidism in advanced cancer patients and may inhibit thyroid peroxidase activity. Thyroid : official journal of the American Thyroid Association 2007; 17: 351 – 355
- 12 Pfizer-Pharma GmbH. Gebrauchsinformationen Sutent Hartkapseln
- 13 *Cha E, Fong L.* Therapeutic vaccines for prostate cancer. Curr Opin Mol Ther 2010; 12: 77 – 85
- 14 Rethinking therapeutic cancer vaccines. Nature reviews. Drug discovery 2009; 8: 685 – 686
- 15 Advanced Prostate Cancer Treatment | PROVENGE (sipuleucel-T). Im Internet: <http://www.provenge.com/>; Stand: 03.11.2014

- 16 *Slütter B, Plapied L, Fievez V et al.* Mechanistic study of the adjuvant effect of biodegradable nanoparticles in mucosal vaccination. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2009; 138: 113 – 121
- 17 *Vujanic A, Sutton P, Snibson KJ et al.* Mucosal vaccination: lung versus nose. *Veterinary immunology and immunopathology* 2012; 148: 172 – 177
- 18 *Temmerman M de, Rejman J, Demeester J et al.* Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discov. Today* 2011; 16: 569 – 582
- 19 *Kettler K, Veltman K, van de Meent, Dik et al.* Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environ Toxicol Chem* 2014; 33: 481 – 492
- 20 *Effros RM, Chinard FP.* The in vivo pH of the extravascular space of the lung. *The Journal of clinical investigation* 1969; 48: 1983 – 1996
- 21 *Dombu CY, Betbeder D.* Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. *Biomaterials* 2013; 34: 516 – 525
- 22 *Bösch D.* Lunge und Atemwege. 1. Aufl. Berlin: Springer Berlin; 2013
- 23 *Newman S, Anderson P.* Respiratory drug delivery. Essential theory and practice
- 24 *Lüllmann-Rauch R.* Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 3. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme; 2009
- 25 *Europäisches Arzneibuch amtliche deutsche Ausgabe.* 7. Aufl. Stuttgart: Dt. Apotheker-Verl. [u.a.]; 2011
- 26 *Aerosols and the Lung. Chapter 3 – Physical properties and mechanisms of deposition of aerosols: Elsevier; 1984*
- 27 *Fernández Tena A, Casan Clarà P.* Deposition of Inhaled Particles in the Lungs. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)* 2012; 48: 240 – 246
- 28 *Labiris NR, Dolovich MB.* Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2003; 56: 588 – 599
- 29 *White S, Bennett DB, Cheu S et al.* EXUBERA: pharmaceutical development of a novel product for pulmonary delivery of insulin. *Diabetes technology & therapeutics* 2005; 7: 896 – 906
- 30 *Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Ärzteblatt RD.* Exubera® weltweit vom Markt: Kein Interesse an inhalativem Insulin. Im Internet: <http://www.aerzteblatt.de/nachrichten/30192/Exubera-weltweit-vom-Markt-Kein-Interesse-an-inhalativem-Insulin>; Stand: 20.11.2014
- 31 *Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Ärzteblatt RD.* USA: Inhalatives Insulin zugelassen. Im Internet: <http://www.aerzteblatt.de/nachrichten/59204/USA-Inhalatives-Insulin-zugelassen>; Stand: 20.11.2014

- 32 *Yang MY, Chan, John Gar Yan, Chan H.* Pulmonary drug delivery by powder aerosols. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2014
- 33 *Luttmann W, Bratke K, Küpper M et al.* *Der Experimentator: Immunologie. Der Experimentator: Immunologie* 2014
- 34 *Davis SS.* Nasal Vaccines. Institute of Pharmaceutical Sciences, University of Nottingham, Boots Science Building, Science Road, University Park, Nottingham NG7 2RD, UK. *advanced drug delivery reviews* 2001; 2001: 21 – 42
- 35 *Sznol M, Davis T.* Tumor antigens as targets for anticancer drug development. *Anticancer Drug Development: Elsevier*; 2002: 157 – 170
- 36 *Fernández-Urrusuno R, Calvo P, Remunán C et al.* Enhancement of Nasal Absorption of Insulin Using Chitosan Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 1999: 1576 – 1581
- 37 *Illum L, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M et al.* Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev* 2001; 51: 81 – 96
- 38 *Dyer AM, Hinchcliffe M, Watts P et al.* Nasal Delivery of Insulin Using Novel Chitosan Based Formulations: A Comparative Study in Two Animal Models between Simple Chitosan Formulations and Chitosan Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* July 2002: 998 – 1008
- 39 *Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro,, António J. et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2006; 2: 8 – 21
- 40 *Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B et al.* Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors. *The Journal of Immunology* 2004; 173: 3148 – 3154
- 41 *Xiang SD, Scholzen A, Minigo G et al.* Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? *Methods (San Diego, Calif.)* 2006; 40: 1 – 9
- 42 *Renneberg R, Berkling V.* *Biotechnologie für Einsteiger. 4. Aufl. Berlin; Springer Spektrum*; 2013
- 43 *Banchereau J, Palucka AK.* Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5: 296 – 306
- 44 *Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU.* Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnology* 2014; 12: 5
- 45 *de Souza Carvalho, Cristiane, Daum N, Lehr C.* Carrier interactions with the biological barriers of the lung: Advanced in vitro models and challenges for pulmonary drug delivery. Improving the efficacy of inhaled drugs for severe lung diseases: emerging pulmonary delivery strategies 2014; 75: 129 – 140

- 46 *Slütter B, Hageaars N, Jiskoot W.* Rational design of nasal vaccines. *Journal of drug targeting* 2008; 16: 1 – 17
- 47 *Vila A, Sánchez A, Janes K et al.* Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004; 57: 123 – 131
- 48 *Aranaz I, Mengíbar M, Harris R et al.* Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3, 203-230 2009: 203 – 230
- 49 *Bernkop-Schnürch A.* Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers. *advanced drug delivery reviews* 2005; 57: 1569 – 1582
- 50 *Lai SK, Wang Y, Hanes J.* Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *advanced drug delivery reviews* 2009; 61: 158 – 171
- 51 *Benediktsdóttir BE, Baldursson O, Másson M.* Challenges in evaluation of chitosan and trimethylated chitosan (TMC) as mucosal permeation enhancers: From synthesis to in vitro application. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2013
- 52 *van der Lubben, I.M, Verhoef J, Borchard G et al.* Chitosan for mucosal vaccination. *advanced drug delivery reviews* 2001; 52: 139 – 144
- 53 *ABDATA Pharma-Daten-Service, Hrsg.* Pharmazeutische Stoffliste. 19. Aufl.; 2014
- 54 *Editio Cantor Verlag, Hrsg.* Fiedler Encyclopedia of Excipients for Pharmaceuticals, Cosmetics and Related Areas; 6th Edition 2007
- 55 *Nisbet AD, Saundry RH, Moir AJ et al.* The Complete Amino-Acid Sequence of Hen Ovalbumin. *Eur J Biochem* 1981; 115: 335 – 345
- 56 *Savadkoohi S, Bannikova A, Mantri N et al.* Structural properties of condensed ovalbumin systems following application of high pressure. *Food Hydrocolloids* 2014
- 57 *Hanninen A, Braakhuis A, Heath WR et al.* Mucosal Antigen Primes Diabetogenic Cytotoxic T-Lymphocytes Regardless of Dose or Delivery Route. *Diabetes* 2001; 50: 771 – 775
- 58 *Covaciu M, Olaru F, Petrescu I.* Ovalbumin isoforms purification and denaturation/renaturation studies. *Analele Stiintifice ale Universitatii "Alexandru Ioan Cuza" din Iasi Sec. II a. Genetica si Biologie Moleculara* 2004
- 59 *Huntington JA, Patston PA, Gettins PG.* S-ovalbumin, an ovalbumin conformer with properties analogous to those of loop-inserted serpins. *Protein science : a publication of the Protein Society* 1995; 4: 613 – 621
- 60 *Antalík M, Fedunová D., Bágelová J.* Conformational Transition of Cytochrome c. *The Open Macromolecules Journal* 2010: 53 – 55

- 61 *Liu X, Kim CN, Yang J et al.* Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell* 1996; 86: 147 – 157
- 62 *Olayioye MA.* Update on HER-2 as a target for cancer therapy: Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 385
- 63 *Lee CM, Lee RJ, Hammond E et al.* Expression of HER2neu (c-erbB-2) and epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis. *Gynecologic oncology* 2004; 93: 209 – 214
- 64 *Rowe RC, Hrsg.* Handbook of pharmaceutical excipients. 6. Aufl. London: APhA (PhP) Pharmaceutical Press; 2009
- 65 *FEW Chemicals.* Produktinformation S0744 <http://www.few.de/fluoreszierende-farbstoffe/aminreaktive-farbstoffe/>; Stand: 04.09.2014
- 66 *Gorris HH, Saleh SM, Groegel, Dominik B M et al.* Long-wavelength absorbing and fluorescent chameleon labels for proteins, peptides, and amines. *Bioconjug. Chem.* 2011; 22: 1433 – 1437
- 67 *Nielsen KG, Skov M, Klug B et al.* Flow-dependent effect of formoterol dry-powder inhaled from the Aerolizerfi. *European Respiratory Journal* 1997; 10: 2105 – 2109
- 68 *Bauer KH, Lippold BC, Breitzkreutz J.* Pharmazeutische Technologie. Mit einer Einführung in die Biopharmazie. 9. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2012
- 69 *Lottspeich F.* Bioanalytik. 3. Aufl. Heidelberg.: Spektrum; 2012
- 70 *Parikh DM.* Handbook of pharmaceutical granulation technology. 3. Aufl. New York: Informa Healthcare USA; 2010
- 71 *Voigt R, Fahr A.* Pharmazeutische Technologie. Für Studium und Beruf ; mit 109 Tabellen. 10. Aufl. Stuttgart: Dt. Apotheker-Verl.; 2006
- 72 *Colonna C, Conti B, Perugini P et al.* Ex vivo evaluation of prolidase loaded chitosan nanoparticles for the enzyme replacement therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 70: 58 – 65
- 73 *ThermoFisher Scientific, Hrsg.* Instructions EZ-Link® NHS-Biotin Reagents. 21336 EZ-Link NHS-LC-Biotin; 2011
- 74 *Einstein A.* Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen [AdP 17, 549 (1905)]. *Ann. Phys.* 1905; 14: 182 – 193
- 75 *Malvern Instruments, Hrsg.* Zetasizer nano series, User Manual. 2. Aufl. 2004

- 76 *Sympathec GmbH, System-Partikel-Technik, Clausthal Zellerfeld, Deutschland, Hrsg.* Instrumenteportfolio. Helos& Co.: klassische Laserbeugung mit modularem Konzept, 0,1 µm-8750 µm; 2012
- 77 *Yang M, Velaga S, Yamamoto H et al.* Characterisation of salmon calcitonin in spray-dried powder for inhalation. Effect of chitosan. *Int J Pharm* 2007; 331: 176 – 181
- 78 *Benjamin DC, Berzofsky JA, East IJ et al.* The antigenic structure of proteins: a reappraisal. *Annu. Rev. Immunol.* 1984; 2: 67 – 101
- 79 *Olson, Bradley J S C, Markwell J.* Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Protein Sci* 2007; Chapter 3: Unit 3.4
- 80 *Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 1985; 150: 76 – 85
- 81 *Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD.* Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry* 1988; 175: 231 – 237
- 82 *Rücker G, Neugebauer M, Willems GG.* Instrumentelle pharmazeutische Analytik. Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden ; mit 81 Tabellen. 4. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.; 2008
- 83 *Zellnitz S, Schroettner H, Urbanetz NA.* Surface modified glass beads as model carriers in dry powder inhalers—Influence of drug load on the fine particle fraction. *Powder Technology* 2014; 268: 377 – 386
- 84 *Scherliess R.* The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. *Int J Pharm* 2011; 411: 98 – 105
- 85 *Daniel Engber.* The Trouble With Black-6. Im Internet: http://www.slate.com/articles/health_and_science/the_mouse_trap/2011/11/black_6_lab_mice_and_the_history_of_biomedical_research.html; Stand: 16.10.2014
- 86 *Braaten DC, Sparks-Thissen RL, Kreher S et al.* An optimized CD8+ T-cell response controls productive and latent gammaherpesvirus infection. *J. Virol.* 2005; 79: 2573 – 2583
- 87 *U.S. Department of Health and Human Services.* Institutional Administrator's Manual for Laboratory Animal Care and Use. 85. Aufl.; 1996 revision
- 88 *Libanova R, Ebensen T, Schulze K et al.* The member of the cyclic di-nucleotide family bis-(3', 5')-cyclic dimeric inosine monophosphate exerts potent activity as mucosal adjuvant. *Vaccine* 2010; 28: 2249 – 2258
- 89 *Herbáth M, Szekeres Z, Kövesdi D et al.* Coadministration of antigen-conjugated and free CpG: effects of in vitro and in vivo interactions in a murine model. *Immunology letters* 2014; 160: 178 – 185

- 90 *Lamichhane A, Azegami T, Kiyono H.* The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine* 2014
- 91 *Durward M, Harms J, Splitter G.* Antigen Specific In Vivo Killing Assay using CFSE Labeled Target Cells. *J Vis Exp* 2010
- 92 MicroSprayer®/Syringe Assembly – MSA-250-M for Mouse « Penn-Century, Inc. Im Internet: <http://penncentury.com/products/liquid-aerosol-devices/microsprayer-msa-250/model-msa-250-mouse/>; Stand: 31.10.2014
- 93 *Quah, BJC, Parish CR.* The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2010
- 94 *Tario JD, Humphrey K, Bantly AD et al.* Optimized staining and proliferation modeling methods for cell division monitoring using cell tracking dyes. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2012: e4287
- 95 *Le Pecq, J B, Paoletti C.* A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Analytical Biochemistry* 1966; 17: 100 – 107
- 96 Lifetechnologies-Thermo Fisher Scientific. LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit
- 97 *Harris R, Lecumberri E, Mateos-Aparicio I et al.* Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers* 2011; 84: 803 – 806
- 98 *Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* 2007; 40: 1107 – 1121
- 99 *Müller RH, Nitzsche R, Paulke B.* Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. Einführung in die Theorie, praktische Messdurchführung, Dateninterpretation ; Colloidal drug carriers (cdc) 1st expert meeting Berlin 15. - 17. 6 1995 ; mit 24 Tabellen. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.; 1996
- 100 *Mitchell JP, Nagel MW, Nichols S et al.* Laser diffractometry as a technique for the rapid assessment of aerosol particle size from inhalers. *J Aerosol Med* 2006; 19: 409 – 433
- 101 *Vehring R.* Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharmaceutical Research* 2008; 25: 999 – 1022
- 102 *Boraey MA, Vehring R.* Diffusion controlled formation of microparticles. *Journal of Aerosol Science* 2014; 67: 131 – 143
- 103 *Chrystyn H.* Methods to identify drug deposition in the lungs following inhalation. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2001; 51: 289 – 299
- 104 *Steven FS, Tristram GR.* The reactivity of free amino groups in native and denatured ovalbumin towards fluorodinitrobenzene. *Biochem J* 1958; 70: 179 – 182

- 105 Wang J, Somasundaran P. Adsorption and conformation of carboxymethyl cellulose at solid-liquid interfaces using spectroscopic, AFM and allied techniques. *Journal of colloid and interface science* 2005; 291: 75 – 83
- 106 Calvo P, Remunán-López C, Vila-Jato JL et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 1997; 63: 125 – 132
- 107 Ajmera A, Scherließ R. Stabilisation of proteins via mixtures of amino acids during spray drying. *Int J Pharm* 2014; 463: 98 – 107
- 108 Maltesen MJ, van de Weert, M. Drying methods for protein pharmaceuticals. *Drug Discov Today Technol* 2008; 5: e81-8
- 109 Chang LL, Pikal MJ. Mechanisms of protein stabilization in the solid state. *Journal of pharmaceutical sciences* 2009; 98: 2886 – 2908
- 110 Donovan JW, Mapes CJ. A differential scanning calorimetric study of conversion of ovalbumin to S-ovalbumin in eggs. *J. Sci. Food Agric.* 1976; 27: 197 – 204
- 111 Zeng Z. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *IJN* 2011: 765
- 112 ThermoScientific. Chemistry of Protein Assays. Im Internet: <http://www.piercenet.com/method/chemistry-protein-assays>; Stand: 15.12.2014
- 113 Karner S, Urbanetz AN. The impact of electrostatic charge in pharmaceutical powders with specific focus on inhalation-powders. *Journal of Aerosol Science* 2011; 42: 428 – 445
- 114 Podczeczek F, Jones BE. *Pharmaceutical capsules*. 2. Aufl. London, Chicago: Pharmaceutical Press; 2004
- 115 *Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung*. GESTIS-Stoffdatenbank- Essigsäure; Stand: 15.12.2014
- 116 O'Donnell K, Kearsley MW. *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*. 2. Aufl. Chichester, West Sussex, U.K., Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2012
- 117 USP 37 - NF 32 *The United States Pharmacopeia and National Formulary 2014*. Main edition plus Supplements 1 and 2. 1. Aufl. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2013
- 118 Watanabe J, Miyazaki Y, Zimmerman GA et al. Endotoxin contamination of ovalbumin suppresses murine immunologic responses and development of airway hyper-reactivity. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 42361 – 42368
- 119 Dumas JJ, Merithew E, Sudharshan E et al. Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. *Mol. Cell* 2001; 8: 947 – 958
- 120 Hayat MA. *Stains and cytochemical methods*. New York: Plenum Press; 1993

- 121 *Burgdorf S, Lukacs-Kornek V, Kurts C.* The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2006; 176: 6770 – 6776
- 122 *Fellermann K.* Immunosuppression in inflammatory bowel diseases. Standards, new developments, future trends : proceedings of Falk Symposium 119 held in Freiburg, Germany, October 3-4, 2000. Dordrecht, London: Kluwer Academic; 2001
- 123 *Chen J, Seviour R.* Medicinal importance of fungal beta-(1--3), (1--6)-glucans. *Mycological research* 2007; 111: 635 – 652
- 124 *Scherließ R, Buske S, Young K et al.* In vivo evaluation of chitosan as an adjuvant in subcutaneous vaccine formulations. *Vaccine* 2013; 31: 4812 – 4819
- 125 *Lin Y, Lou P, Young T.* Chitosan as an adjuvant-like substrate for dendritic cell culture to enhance antitumor effects. *Biomaterials* 2014; 35: 8867 – 8875
- 126 *Slütter B, Bal S, Keijzer C et al.* 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* 2010; 28: 6282 – 6291
- 127 *Hsieh C, Macatonia S, Tripp C et al.* Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260: 547 – 549
- 128 *Wang KS, Frank DA, Ritz J.* Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood* 2000; 95: 3183 – 3190
- 129 *Heffernan MJ, Zaharoff DA, Fallon JK et al.* In vivo efficacy of a chitosan/IL-12 adjuvant system for protein-based vaccines. *Biomaterials* 2011; 32: 926 – 932
- 130 *Thomé R, Fernandes, Luis Gustavo Romani, Mineiro MF et al.* Oral tolerance and OVA-induced tolerogenic dendritic cells reduce the severity of collagen/ovalbumin-induced arthritis in mice. *Cellular immunology* 2012; 280: 113 – 123
- 131 *Ebensen T, Libanova R, Schulze K et al.* Bis-(3',5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate: strong Th1/Th2/Th17 promoting mucosal adjuvant. *Vaccine* 2011; 29: 5210 – 5220
- 132 *Page G, Chevrel G, Miossec P.* Anatomic localization of immature and mature dendritic cell subsets in dermatomyositis and polymyositis: Interaction with chemokines and Th1 cytokine-producing cells. *Arthritis and rheumatism* 2004; 50: 199 – 208
- 133 *Rao JB, Chamberlain RS, Bronte V et al.* IL-12 is an effective adjuvant to recombinant vaccinia virus-based tumor vaccines: enhancement by simultaneous B7-1 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1996; 156: 3357 – 3365

ANHANG

Verwendete Lösungsmittel mit Hersteller und Verwendungszweck

Lösungsmittel	Hersteller	Verwendung
Dimethylformamid	Merck KGaA, Deutschland	Zellyse/ Biotinylierung
Dimethylsulfoxid	J.T.Baker, Niederlande	Auflösung Nanopartikel
Essigsäure	J.T.Baker, Niederlande	Lösemittel Chitosan
Methanol	J.T.Baker, Niederlande	Lösemittel Fluoreszenzfarbstoffe
Triethylamin	Sigma Aldrich, USA	Katalysator Kopplungsreaktion FEW S0744

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Andrea Edit Diedrich
Geburtsdatum	22.07.1987
Geburtsort	Wolgast
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

1993 bis 1997	Grundschule Hasenburger Berg, Lüneburg
1997 bis 1999	Orientierungsstufe Oedeme, Lüneburg
1999 bis 2006	Gymnasium Oedeme, Lüneburg
Juni 2006	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

Okt. 2006 bis Nov. 2010	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Dez. 2010 bis Mai 2011	Pharmaziepraktikum bei der Beiersdorf AG, Hamburg
Juni 2011 bis Dez. 2011	Pharmaziepraktikum in der Belvedere Apotheke, Kiel
Januar 2012	Erteilung der Approbation als Apothekerin

Promotion

seit Februar 2012	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmazeutischen Institut, Abteilung für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie 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.

Andrea Diedrich

DANKSAGUNG

Prof. Dr. Hartwig Steckel danke ich für die Aufnahme in seinem Arbeitskreis und der Überlassung des interessanten Promotionsthemas.

Bei Dr. habil. Regina Scherließ möchte ich mich für die Betreuung, die konstruktive Kritik, das geduldige Korrekturlesen und die vielen kleinen Ratschläge und Ideen bedanken.

Dr. Matthias Schröder, Dr. Renato Baleeiro und Dr. Thomas Ebensen sei hier, stellvertretend für alle Projektpartner, für die Erhebung von immunologischen Daten und konstruktive Gespräche gedankt. Ein großes Dankeschön gilt außerdem Dr. Andrea Hanefeld für die Projektkoordination, sowie der Firma Merck KGaA und dem BMBF für die finanzielle Unterstützung des PeTra-Projektes.

Regina Krehl, Hanna Rohwer, Simone Diekjobst, Maren Rohlf und Ann-Kathrin Muhs danke ich für das schnelle Beschaffen von Substanzen und Verbrauchsmaterialien, aber auch für ihre stets ansteckend gute Laune. Detlef Rödiger und Volkmar Kleppa danke ich für schnelle Hilfe bei Computerproblemen; Dirk Böhme und Kalle Bock für das Aufschrauben, Reparieren und Optimieren von Geräten. Dr. Franz Furkert möchte ich für die unkomplizierte und schnelle Durchführung des LAL-Tests danken.

Bei Fritzi Gütter möchte ich mich für ihr gutes Händchen bei der Auswahl des richtigen Feierabend-Films bedanken; bei Annika Heel für die Hilfe zur Findung meines Prüfungsrocks; bei Ann-Kathrin Menge für das Büro-Asyl in den Wochen vor meiner Prüfung; bei Kirsten Seidel für das Folienlayout; bei Thea Albold, Judith Heidland und Nancy Rhein für die aufmunternd gute Laune; bei Matthias Mönckedieck für die REM-Aufnahmen und den frischen Organisationswind im Arbeitskreis; bei Franz Gersonde für die Laufbegleitung an der Kieler Förde und das offene Ohr in den letzten Jahren.

Julia Janke möchte ich für das Korrekturlesen, die unzähligen Tipps und Tricks und die Begleitung bei den PeTra-Projektfahrten danken.

Danke an Ankur Ajmera für die familiäre Büroatmosphäre, das Überlassen des deutlich besseren Schreibtisches, das Korrigieren meiner englischen Korrespondenzen und das Näherbringen der indischen Kultur.

Danke an Gereon Rau für das Leihen sämtlicher Baumarkt-Werkzeuge, die ausdauernde spontane Hilfe bei allen Problemen praktischer Natur und die gemeinsame Schreibzeit am Ende der Promotion.

Rüdiger Smal möchte ich für die Grafiken danken, die zeitaufwendig erstellt oder von Farbverläufen befreit werden mussten. Danke außerdem für die historisch-kulturelle Weiterbildung, die vielen Anekdoten und die entgegengebrachte Empathie!

Danke an Phillip Arntz für das aufmerksame Lesen der ersten Rohfassung dieser Arbeit, für seine unendliche Geduld und die großartige Unterstützung auch abseits des Labors!

Bei meinen restlichen Freunden und Kollegen, auch arbeitskreisübergreifend, möchte ich mich ganz besonders für die wunderbare Zeit und die vielen schönen Momente bedanken, die über so einige Motivationslöcher hinweggeholfen haben.

Ganz herzlicher Dank gilt vor allem meinen Eltern und Geschwistern für die Unterstützung in den letzten Jahren. Danke für alles!