

Polymere Mikropartikel mit unterschiedlichen Oberflächenladungen als  
Adjuvans-Plattform für die aktive Vakzinierung

Formulierungsentwicklung und *in-vitro/in-vivo* Charakterisierung

Kumulative Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Markus Riehl

geboren am 06.01.1988 in Köthen/Anhalt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Karsten Mäder
2. Prof. Dr. Lea Ann Dailey
3. Prof. Dr. Achim Aigner

Tag der öffentlichen Verteidigung: 25.03.2019 in Halle (Saale)



*„Dicebat Bernardus Carnotensis nos esse quasi nanos gigantum umeris insidentes, ut possimus plura eis et remotiora videre, non utique proprii visus acumine, aut eminentia corporis, sed quia in altum subvehimur et extollimur magnitudine gigantea“*

*„Bernhard von Chartres sagte, wir seien gleichsam Zwerge, die auf den Schultern von Riesen sitzen, um mehr und Entfernteres als diese sehen zu können – freilich nicht dank eigener scharfer Sehkraft oder Körpergröße, sondern weil die Größe der Riesen uns emporhebt.“*

*– Johannes von Salisbury: Metalogicon 3,4,46-50*

*Meiner Familie und meinen Freunden.*

## Inhalt

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1 Aktive Vakzinierung: bewährtes Mittel gegen Infektionskrankheiten und potentielle Therapieoption in der Onkologie	10
1.2 Adjuvantienentwicklung und -charakterisierung als Forschungsfeld der pharmazeutischen Technologie	14
1.3 Zielstellung der Arbeit	19
2. Kumulativer Teil	20
2.1 Investigation of the stabilizer elimination during the washing step of charged PLGA microparticles utilizing a novel HPLC-UV-ELSD method	23
2.2 Combining <i>R</i> -DOTAP and a particulate antigen delivery platform to trigger dendritic cell activation: Formulation development and <i>in-vitro</i> interaction studies	24
2.3 Dual dye <i>in-vivo</i> imaging of differentially charged PLGA carriers reveals antigen-depot effect, leading to improved immune responses in preclinical models	25
2.4 Acid-induced degradation of widely used imaging label DiR causes hypsochromic shift in fluorescence properties	26
3. Diskussion des kumulativen Teils	27
4. Zusammenfassung und Ausblick	42
5. Literaturverzeichnis	46
6. Anhang	53

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: „Rational vaccine design“ als Wechselspiel aus Antigen, Adjuvans und zugrundeliegender Immunologie der gewählten Indikation. Aus [4]	13
Abbildung 2: Klassifikation der verschiedenen Adjuvantensysteme.	15
Abbildung 3: Repräsentative SEM Aufnahmen.	28
Abbildung 4: HPLC-Chromatogramm (ELS-Detektor), welches die klare Basislinientrennung der Bestandteile der geladenen MP zeigt. Modifiziert nach [79].	29
Abbildung 5: Abbildung aus Wischke et al. [82], welche den Reifungsprozess von iDCs zu ausgereiften dendritischen Zellen veranschaulicht.	31
Abbildung 6: Einfluss der Partikelkonzentration auf die Überlebensrate von humanen iDCs (MTT Zellversuch, n=6 außer Gruppe R-DOTAP MP: n=4; Mittelwert + Standardabweichung). Modifiziert nach [83].	32
Abbildung 7: Konfokale Aufnahmen der intrazellulären Lokalisation getesteter PLGA MP nach Aufnahme durch humane iDCs.	33
Abbildung 8: Ergebnisse Maturationsexperimente an humanen unreifen dendritischen Zellen mit unbeladenen MP.	34
Abbildung 9: Fluoreszenzbildgebung der verwendeten Moleküle CF660C-OVA (Protein) & DiR (MP) über den Beobachtungszeitraum von 42 Tagen. Dargestellt: Maus M51 (R-DOTAP Verum). Aus [75].	36
Abbildung 10: Fluoreszenzbildgebung des verwendeten Moleküls CF660C-OVA zur Proteinvisualisierung über den Beobachtungszeitraum von 42 Tagen. Dargestellt: Maus M3 (OVA in Lösung). Aus [75].	36
Abbildung 11: Normalisierte Fluoreszenzkinetiken der OVA-Signale (Durchschnittswerte von n=8 je Gruppe) der Gruppen OVA in Lösung (schwarze Kreise) und R-DOTAP OVA MP (weiße Kreise) und die abgeleiteten Regressionsfunktionen. Modifiziert nach [75].	37
Abbildung 12: OVA- Antikörper Titer an den Tagen d28 (A) & d42 (B).	38
Abbildung 13: Absorptionsspektren von DiR in saurer (linke Spalte) sowie neutraler wässrig-ethanolischer Umgebung.	39
Abbildung 14: MS Daten der neutralen Referenzprobe sowie der Probe mit pH=2 in der Wasserphase.	40
Abbildung 15: Strukturvorschlag für die Entität mit m/z= 412 aus der pH=2 Probe nach 42 Tagen. Molekülmasse =412,7 Da; exakte Masse = 412,394 Da; Formel: C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> N.	41

Tabelle 1: Ausgewählte Onkoviren und assoziierte Neoplasien. Verändert & erweitert nach [3].	11
Tabelle 2: Übersicht zu den Fachzeitschriften.	20
Tabelle 3: Darlegung des Eigenanteils, A: eigener Anteil an der Planung, der Durchführung, der Auswertung der Experimente und der Anfertigung der zugehörigen Abbildungen, B: eigener Anteil an der Anfertigung des Manuskripts.	21
Tabelle 4: Eigenschaften beispielhafter Partikelchargen, aus [75].	27
Tabelle 5: Änderung des Zetapotentials nach OVA Beladung.	27
Tabelle 6: Ergebnis HPLC-UV-ELSD Analytik gewaschener Partikel, modifiziert nach [79].	30

## Abkürzungsverzeichnis

<b>APC</b>	<i>Antigen presenting cell</i>
<b>CpG</b>	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
<b>DC-LAMP</b>	<i>Dendritic cell lysosomal associated membrane glycoprotein</i>
<b>DiR</b>	<i>1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanine Iodide</i>
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>DOSS</b>	<i>dioctyl sulfosuccinate</i>
<b>DOTAP</b>	<i>1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
<b>ELISPOT</b>	<i>Enzyme-linked immuno spot assay</i>
<b>ELSD</b>	<i>evaporative light scattering detection/detector</i>
<b>EMA</b>	<i>European Medicines Agency</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>GPC</b>	Gelpermeationschromatographie
<b>HPLC</b>	<i>high performance liquid chromatography</i>
<b>(i)DC</b>	<i>(immature) dendritic cell</i>
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IL</b>	Interleukin
<b>i.m.</b>	intramuskulär
<b>LOD</b>	<i>Limit of detection</i>
<b>MHC</b>	<i>major histology complex</i>
<b>MP</b>	Mikropartikel
<b>MTT</b>	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
<b>NP</b>	Nanopartikel
<b>ODN</b>	Oligodesoxynukleotid
<b>OVA</b>	Ovalbumin
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
<b>PAP</b>	<i>prostatic acid phosphatase</i>
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PLGA</b>	<i>Poly(lactide-co-glycolide)</i>
<b>Poly-I:C</b>	<i>Poly(riboinosinic acid)–poly(ribocytidylic acid)</i>

<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptor</i>
<b>PSA</b>	Prostata-spezifisches Antigen
<b>PVA</b>	Polyvinylalkohol
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i>
<b>SEM</b>	<i>Scanning electron microscopy</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like-receptor</i>
<b>s.c.</b>	<i>subcutaneous</i>
<b>T<sub>H</sub></b>	T-Helfer-Zelle
<b>UV</b>	ultraviolett (synonym: UV-detektor)

# 1. Einleitung

## 1.1 Aktive Vakzinierung: bewährtes Mittel gegen Infektionskrankheiten und potentielle Therapieoption in der Onkologie

Aktive Impfungen sollen eine Immunantwort des behandelten Lebewesens gegen das verabreichte Antigen auslösen. Ziel dieser Intervention ist es, den Organismus gegen (übertragbare) Krankheiten zu schützen. Vakzinierungen haben die Inzidenz zahlreicher Infektionskrankheiten des Menschen reduziert; beispielhaft seien hier Masern, Mumps, Röteln, Pocken, Tetanus und Diphtherie genannt [1]. Weiterhin wurden die Mortalitätsraten ehemals letaler Krankheiten gesenkt [2]. Das Ziel der medizinischen Intervention ist die Etablierung einer effektiven Immunreaktion auf die verabreichte Vakzine [3]. Damit sprechen Impfungen vornehmlich das adaptive Immunsystem an. Je nach Applikationsweise, Antigen und weiteren Bestandteilen der Vakzine, den Adjuvantien, kann die resultierende adaptive Immunantwort primär zellulären (T-Helfer-Zell Typ 1,  $T_H1$ ) oder humoralen Ursprungs sein (T-Helfer-Zell Typ 2,  $T_H2$ ). Bei der zellulären Immunantwort werden zytotoxische T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (hauptsächlich reife dendritische Zellen) über den Haupthistokompatibilitätskomplex 1 (auch: MHC-1) aktiviert. Zytotoxische T-Zellen vermitteln ihre toxische Wirkung über die Enzyme Perforin und Granzym B, welche bei der als fremd identifizierten Zelle Apoptose auslösen. Auch natürliche Killerzellen können ähnliche Effekte bei abnormalen Zellen hervorrufen, werden jedoch aufgrund der Abwesenheit von Antigenrezeptoren zur angeborenen Immunantwort gezählt. Die humorale Immunantwort hingegen beginnt mit der Antigenprozessierung über den Haupthistokompatibilitätskomplex 2 (auch: MHC-2). In dieser Aktivierungsphase werden  $T_H2$ -Zellen aktiviert, welche nachgeschaltet die Differenzierung und Expansion von B-Lymphozyten in B-Plasmazellen und B-Gedächtniszellen anregen (Differenzierungsphase). Als Resultat bilden die B-Plasmazellen lösliche Antikörper gegen das verabreichte Antigen, während die B-Gedächtniszellen bei Sekundärkontakt für eine schnellere und potentiell stärkere Immunantwort sorgen. Durch die Bindung von mehreren Antikörpern an die pathogen-assoziierten Antigene werden in der Effektorphase Immunkomplexe gebildet, welche eine Aktivierung des Komplementsystems hervorrufen. Schlussendlich können durch Komplementaktivierung Makrophagen zur weiteren Bekämpfung der antigenexprimierenden Zellen rekrutiert werden.

Während für Hepatitis, Diphtherie und Tetanus gewisse Antikörper-Titer zur Bestimmung des Impfschutzes existieren, sind ähnliche immunologische Korrelationen für eine Vielzahl anderer Krankheiten noch nicht bekannt [4]. Als konkretes Beispiel ist das humane Immundefizienz-Virus zu nennen, bei dessen Infektion es neben eines gewissen Levels an Antikörpern auch eine Präsenz zytotoxischer T-Zellen zu benötigen scheint, um eine Ausbreitung des Virus im menschlichen Wirt zu stoppen [3;5]. Auch für Vakzine gegen körpereigene Strukturen, wie sie in der Onkologie von Bedeutung sind, wird eine starke  $T_H1$ - Immunreaktion als vorteilhaft postuliert [6]. Die Antigene bei der Krebsvakzinierung werden in tumor-assoziierte Antigene sowie tumor-spezifische Antigene (auch als Neo-Antigene bezeichnet [7]) unterteilt. Beiden Gruppen gemein ist, dass die Antigenprozessierung vor allem über MHC-1 stattfindet, wodurch oben beschriebene Notwendigkeit der  $T_H1$ -basierten Immunantwort deutlich wird.

Für die nähere Auseinandersetzung mit dem als „Impfen gegen Krebs“ umschriebenen Konzept erscheint eine Unterscheidung zwischen prophylaktischem und therapeutischem Impfen als sinnvoll. Beim prophylaktischen Impfen gegen Onkoviren wird ein Schutz gegen solche Virusarten angestrebt, von denen nachgewiesen wurde beziehungsweise angenommen wird, dass sie die Entstehung diverser

Tumore begünstigen oder auslösen können. Eine beispielhafte Übersicht über verschiedene Onkoviren und die potentielle Verfügbarkeit einer Vakzine findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Ausgewählte Onkoviren und assoziierte Neoplasien. Verändert & erweitert nach [3].

Virus	Assoziierte Erkrankung	Impfung vorhanden?
Humanes Papillomavirus	Zervixkarzinom [8]	Ja (Gardasil®/ Cervarix®)
Epstein–Barr Virus	Lymphome und Nasopharynxkarzinome	In klinischer Entwicklung [9]
Humanes Herpesvirus 8	Kaposi-Sarkom	Nein [10]
Hepatitis B & C Viren	Hepatozelluläres Karzinom	Hepatitis B: Ja (z.B. Twinrix®, Engerix B®) Hepatitis C: nein* [11]
Humanes T-lymphotropes Virus 1 (Humanes T-Zell Leukämie Virus 1)	T-Zell-Leukämien	Nein [12]

\*keine Impfung, jedoch verschiedene Wirkstoffe zur Eradikation verfügbar (z.B. Sofosbuvir, Elbasvir)

Mit der FDA-Zulassung von Sipuleucel-T (Handelsname: Provenge®) im Jahr 2010 wurde erstmals eine therapeutische Impfung gegen ein onkologisches Krankheitsbild verfügbar [13]. Sipuleucel-T beinhaltet das tumor-assoziierte Antigen prostataspezifische saure Phosphatase (PAP), welches autologen Immunzellen des Patienten präsentiert wird. In kombinierter Form mit dem Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor als Fusionsprotein wird eine Expansion der entnommenen und beimpften peripheren mononukleären Zellen des Patienten angestrebt. Nach dieser immunstimulierenden Behandlung werden die expandierten Zellen ambulant re-infundiert. Damit soll das Immunsystem des Patienten unterstützt werden, gegen PAP-exprimierende Zellen vorzugehen.

Diese Vakzinierungsstrategie führte in der zulassungsrelevanten IMPACT-Studie zu einer Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens von 4,1 Monaten (Behandlungsgruppe: 25,8 Monate versus 21,7 Monate in der Kontrollgruppe) [14]. In den vorangegangenen Phase III Studien D9901 und D9902A, waren ähnlich positive Effekte bezüglich des Gesamtüberlebens festgestellt worden [15]. Obwohl eine Wirkung für Sipuleucel-T belegt werden konnte und es sich beim Krankheitsbild Prostatakarzinom um den am meisten verbreiteten soliden Krebstypus bei Männern handelt, wurde die Zulassung für das Präparat 2015 zurückgenommen. Laut Mitteilung der European Medicines Agency (EMA) erfolgte die Rücknahme auf Antrag des Zulassungsinhabers aus kommerziellen Gründen [16].

Auch wenn die genauen Hintergründe für die Zulassungsrücknahme unbekannt sind, könnte die Komplexität der patientenindividuellen Herstellung – bestehend aus Entnahme von weißen Blutzellen, deren Beimpfung und Expansion sowie abschließender Re-Infusion – ein nicht zu vernachlässigender Einflussfaktor gewesen sein. Diese Einschätzung wird zumindest auch von Strauss & Madan insoweit gestützt, dass die Aufnahme von Provenge® in den klinischen Alltag durch logistische und finanzielle Einschränkungen begrenzt gewesen sei [17]. Dennoch bleibt der Firma Dendreon unbestritten die Erstzulassung einer therapeutische Krebsvakzine. Diesem initialen Proof-of-Concept in der Indikation Prostatakrebs folgten weitere Krebsvakzine in der klinischen Entwicklung [17].

DCVAC als zweite Generation der autologen zellbasierten Vakzine folgt in der Herstellung einem ähnlichen Ansatz wie Provenge®. Hierbei wird jedoch gegen das prostataspezifische Antigen (PSA) geimpft. Bemerkenswert ist vor allem die Verwendung von *Poly(riboinosinic acid)–poly(ribocytidylic acid)*

(Poly-I:C) als zusätzliche Immunstimulanz, welches in einer Vielzahl von klinischen Studien zur Tumorthherapie untersucht wurde und teilweise weiterhin wird [18-22]. Unverändert nachteilig ist die patientenindividuelle Herstellung und damit verbundene Herausforderungen an Logistik und Planung – so ist für DCVAC eine Herstellungsdauer von vier Wochen angegeben, beginnend mit dem Zeitpunkt der Entnahme der Leukozyten des Patienten [23].

Prostvac als weitere Vakzine gegen PSA hat den Vorteil, kein Patientenblut zu benötigen und damit verbunden den logistischen und auch finanziellen Aufwand zu senken. Basis hierfür ist ein viraler Pocken-Vektor, welcher eine patientenunabhängige Herstellung und Freigabe des Arzneimittels erlaubt. Als Adjuvanz ist TRICOM enthalten (*Triad of costimulatory molecules*, bestehend aus drei ko-stimulatorischen Molekülen) [24]. Auch das Adjuvanz TRICOM befindet sich in weiteren onkologischen Indikationen in klinischer Prüfung [25].

Die aufgeführten Beispiele der therapeutischen Tumorstimmung zeigen, dass es diverse Ansätze gibt, um die erwünschte Reduzierung der Tumormasse zu erreichen: die verwendeten Applikationswege, die Wahl des Antigens sowie der verschiedenen Adjuvantien und Vektoren offenbaren ein umfangreiches Forschungsfeld.

Darüber hinaus war in der klassischen Infektiologie mit dem Übergang von Lebendimpfstoffen über attenuierte Erreger hin zu hochaufgereinigten rekombinanten Proteinen, Virusuntereinheiten oder synthetischen Oligosacchariden/-peptiden auch ein Rückgang der Immunogenität der verabreichten Antigene zu beobachten [4;26-28]. Ein weiterer Aspekt ist die potentiell niedrigere Stabilität der besagten modernen Antigene, welche einen Schutz vor Degradation notwendig macht [29]. Dies rückt die Adjuvantien als weiteren Bestandteil von Impfstoffen in den Fokus.

Adjuvantien können bei rationaler Auswahl die Antigenität und Stabilität der Vakzine durch verschiedene Mechanismen verbessern. Ein weiterer, nicht zu vernachlässigender Effekt kann das „*dose sparing*“ sein, welcher es erlaubt, aufgrund eines effektiven Adjuvans die Dosis des zu verabreichenden Antigens bedeutend zu verringern [30;31]. Dieser Aspekt ist in Fällen von Relevanz, bei denen binnen kürzester Zeit eine große Menge an Dosen Antigen zur Verfügung stehen müssen, wie zum Beispiel bei einer Influenza-Pandemie [32;33].

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass leistungsstarke, verträgliche und idealerweise vielseitig einsetzbare Adjuvantien weiterhin gefragt sind [34-36], um Antigene unterschiedlichsten Typs (Proteine, Peptide, DNA, RNA etc.) zu formulieren. Diesem Ansatz folgend wird auch von einem „*rational vaccine design*“ gesprochen, welches anstrebt die Wechselwirkungen zwischen zugrundeliegender Krankheit, daraus abgeleitetem Antigen und einem passenden Adjuvans zu verstehen und entsprechend in die Entwicklung des Impfstoffes einfließen zu lassen (Abbildung 1) [4;37].

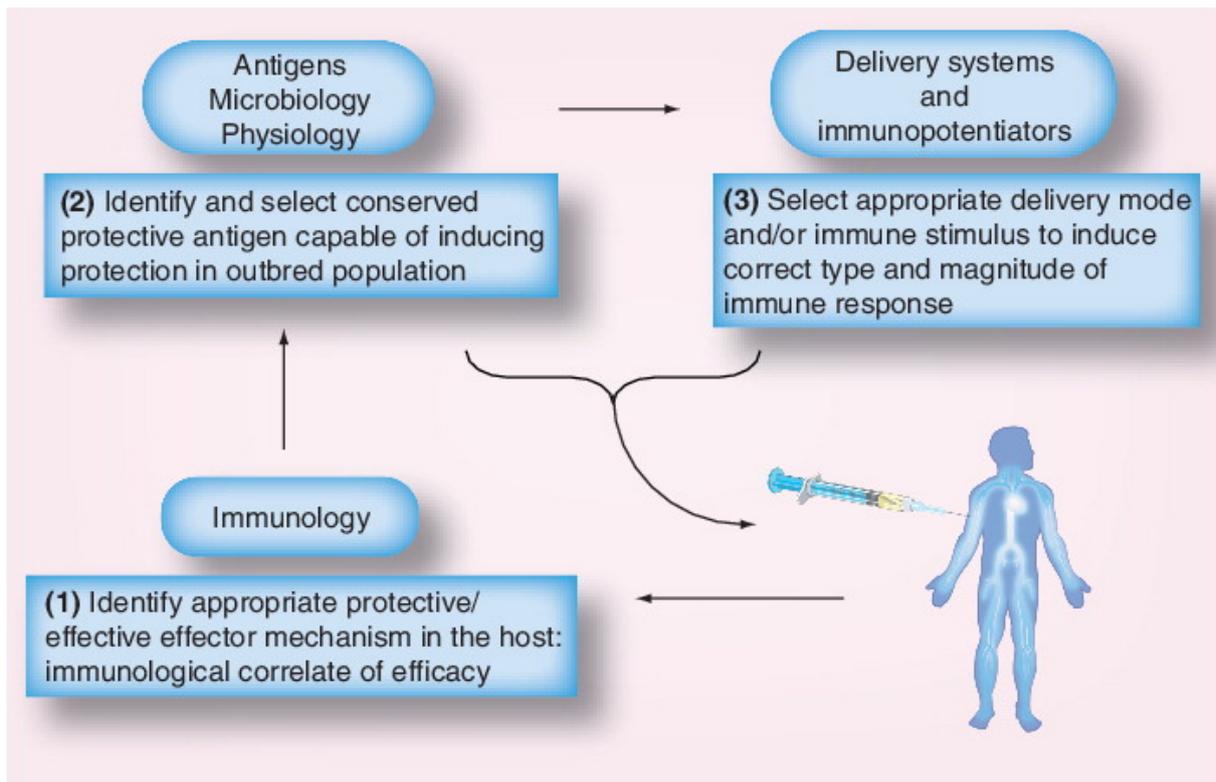


Abbildung 1: „Rational vaccine design“ als Wechselspiel aus Antigen, Adjuvans und zugrundeliegender Immunologie der gewählten Indikation. Aus [4]

## 1.2 Adjuvantienentwicklung und -charakterisierung als Forschungsfeld der pharmazeutischen Technologie

Adjuvantien werden dazu eingesetzt, die Immunantwort auf das verabreichte Antigen zu steigern. Es gibt viele Möglichkeiten, Adjuvantien zu klassifizieren [38]. Für diese Arbeit soll grundlegend zwischen Adjuvantien, die das Immunsystem über Rezeptoren aktivieren (Immunstimulatoren) und solchen, die primär physikalisch wirken (Vehikel), unterschieden werden.

Auch wenn teilweise nicht alle zugrundeliegenden Mechanismen erforscht sind und manche Adjuvantien gleichzeitig physikalisch wirkende Systeme sowie Aktivator der angeborenen Immunantwort sein könnten [4], ist diese Einteilung gerade unter pharmazeutisch-technologischen Aspekten weiterhin zweckmäßig und in der Literatur etabliert [31;34].

Vehikel als Adjuvantien können die Präsentation des Antigens an die relevanten Immunzellen verlängern oder verstärken (Signal 1). Dies kann beispielsweise durch Bildung eines Depots am Applikationsort, durch Schutz vor abbauenden Enzymen oder durch Targeting von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) geschehen. Ihr Wirkmechanismus ist entsprechend primär physikalischer Art. In Abbildung 2 sind diese Systeme unter „Type B: Delivery Systems“ zu finden.

Im Gegensatz zu den physikalisch wirkenden Adjuvantien wirken Immunstimulatoren über Rezeptoren [4]. Der angeborene Teil des menschlichen Immunsystems identifiziert diese Moleküle über *Pattern Recognition Receptors* (PRR) als fremd oder gefährlich. In den molekularen Strukturen finden sich *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs); Muster, welche besagte „Stranger“ oder „Danger“-Signale auslösen. Diese Signale werden teilweise auch als Signal 0 bezeichnet [34].

Immunstimulatoren sind entweder mikrobieller Herkunft (z.B. Lipopolysaccharide, bakterielle oder virale DNA/RNA) oder stellen (halb-)synthetische Analoga dieser Stoffe dar. Als Beispiele sind hier 3-O-desacyl-4'-monophosphoryl Lipid A (MPL A), Poly-I:C oder Cytosin-Guanin-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) zu nennen. Eine Unterfamilie der PRR sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR), deren Agonisten intensiv untersuchte Adjuvantien darstellen. Die DNA/RNA Mimetika Poly-I:C (TLR-3 Liganden) oder CpG-ODN (TLR-9 Liganden) sind als starke Induktoren einer  $T_H1$ -geprägten Immunantwort bekannt [4]. Eine systemische Gabe ist aufgrund der Gefahr einer Überstimulation des Immunsystems nicht indiziert; jedoch wurden Kombinationen mit partikulären Adjuvantien zum Zweck einer kontrollierten Freisetzung in Nähe der anvisierten Immunzellen beschrieben [6;28;39]. Auch kleine Moleküle wie Imiquimod und das als Nachfolgesubstanz klassifizierte Resiquimod können TLR Agonisten darstellen. Diese Substanzen wirken über TLR-7 sowie TLR-8 Agonismus und weisen antivirale und antitumorale Eigenschaften auf [40]. Imiquimod ist für den Menschen in Form einer Creme zur Behandlung von HPV-verursachten Warzen zugelassen (Aldara® [41]). Ebenso wie bei Poly-I:C oder CpG-ODN wurde hier der Ansatz verfolgt, mittels Verkapselung in partikuläre Drug Delivery Systeme die Signale 0 & 1 zu vereinen [42-44]. Zur graphischen Veranschaulichung der Wirkungsweise von Immunstimulatoren siehe auch Abbildung 2, „Type A: PAMPs“.

Anhand dieser Betrachtung bleibt abschließend festzuhalten, dass ein Trend zur Kombination von Vehikeln mit Immunstimulatoren als Adjuvantien-systeme in der wissenschaftlichen Literatur zu beobachten ist.

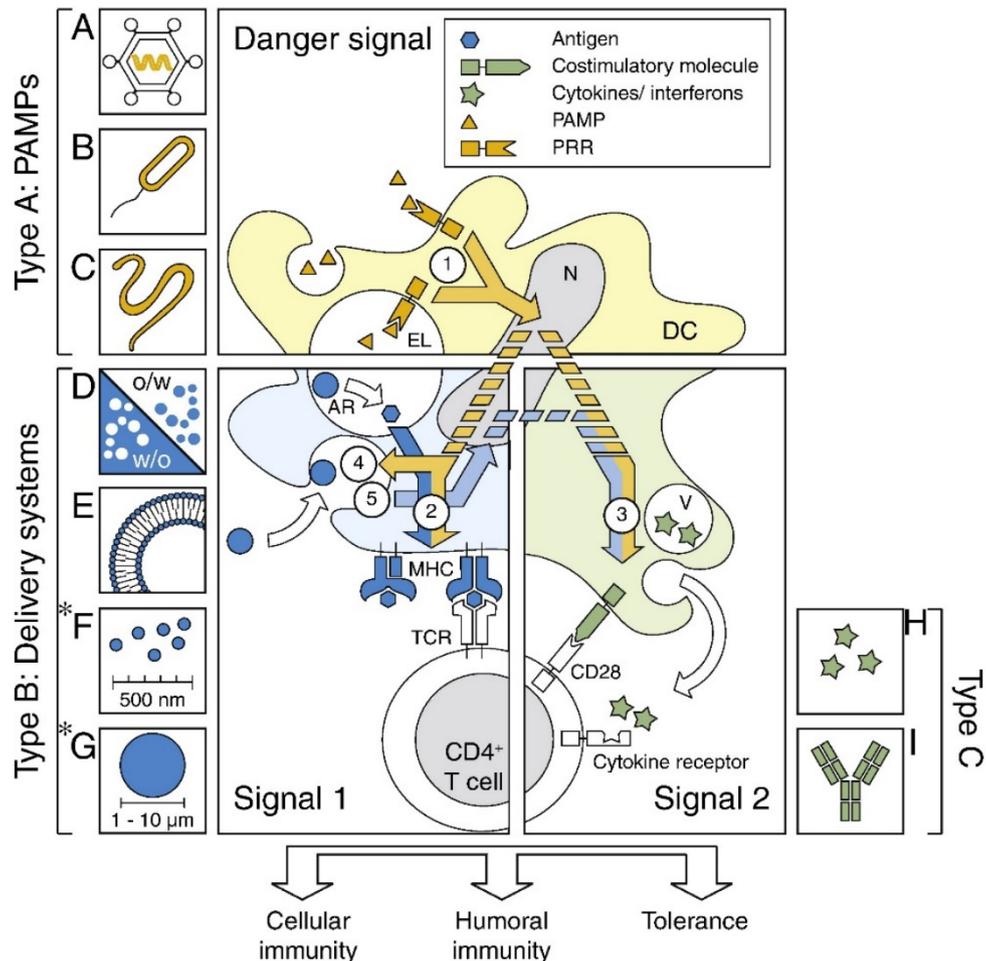


Abbildung 2: Klassifikation der verschiedenen Adjuvantensysteme.

„Type A“ Adjuvantien beinhalten PAMPs z.B. von Viren (A), Bakterien (B) und Würmern (C). Diese PAMPs können ein „danger“ Signal (auch als Signal 0 bezeichnet [34]) bei Immunzellen wie der hier abgebildeten dendritischen Zelle (DC) auslösen. Als Konsequenz kann sowohl Signal 1 (Antigenpräsentation) als auch Signal 2 (Ko-Stimulation) verstärkt werden.

„Type B“ Adjuvantien sind primär physikalisch wirkende Systeme wie Emulsionen (D), Liposomen (E), Nanopartikel (F) oder Mikropartikel (G), welche vor allem Signal 1 verstärken. Der Stern (\*) bei F&G indiziert den eine Besonderheit von soliden Partikeln in einem bestimmten Größenbereich (0.5 -10 µm), unter Umständen auch zu Signal 2 beitragen zu können.

„Type C“ Adjuvantien stellen sich als Zytokine (H) oder monoklonale Antikörper (I), welche direkt T<sub>H</sub>-Zellen via Signal 2 aktivieren können, ohne eine vorherige Reifung der APC zu bedingen. Aus [8].

Im Folgenden werden einige zugelassene sowie experimentelle Vehikel beziehungsweise „Type B“ Adjuvantien genauer dargestellt. Da durch gezielte Formulierungsentwicklung (zum Beispiel Größeneinstellung bei partikelbasierten Systemen) die resultierende Immunantwort modifiziert werden kann, ist die pharmazeutische Technologie hier in der Lage, dem in Kapitel 1.1. zitierten „rational vaccine design“ Rechnung zu tragen und einen Beitrag zur Entwicklung neuer Vakzine zu leisten.

Besonderer Fokus wurde bei folgender Auflistung auf den parenteralen Applikationsweg der subkutanen (s.c.) oder intramuskulären (i.m) Injektion gelegt. Es ist unstrittig, dass bei mukosaler Vakzinierung (beispielsweise nasal oder pulmonal) andere Mechanismen greifen und entsprechend andere Adjuvantensysteme das Mittel der Wahl darstellen können [38].

### *Aluminiumbasierte Adjuvantien (Alum)*

Die in der Regel Aluminiumphosphat, -oxid oder -hydroxid beinhaltenden [45], im Folgenden unter dem Begriff Alum zusammengefassten Systeme sind die am weitesten verbreiteten Adjuvantien in humanen Vakzinen [46;47]. Antigene werden durch Adsorption an die große Oberfläche des Alum-Depots gebunden. Alum-basierte Adjuvantien zeichnen sich besonders durch eine starke Induktion von Antikörpertitern aus, liefern jedoch kaum zellulär-basierten ( $T_H1$ ) Schutz [4]. Damit sind sie nicht für jedes Antigen bzw. jede Krankheit geeignet. Unerwünschte klinische Symptome von Schmerzen an der Injektionsstelle, Fieber und Schüttelfrost bis hin zu Myalgien und kognitiver Dysfunktion sind für Alum beschrieben, was vor allem eine Nutzung bei Kindern nicht unproblematisch macht [48]. Zusammengefasst ist es daher in der Fachwelt schon länger Konsens, sicherere und dennoch effektive Alum-Alternativen zu entwickeln [49].

### *Ölhaltige Adjuvantien und liposomale Zubereitungen*

Emulsionen haben eine lange Tradition in der Vakzinologie. Die ersten Wasser-in-Öl (W/O) Emulsionen wurden bereits 1916 von Le Moignic und Pinoy beschrieben [50]. Obwohl W/O-Emulsionen in der Lage sind, starke, vor allem  $T_H2$ -basierte Immunreaktionen hervorzurufen, kamen sie aufgrund teilweise starker lokaler Unverträglichkeiten nicht zur breiten Anwendung [47]. Vertreter dieser Adjuvantien-Gruppe sind die Freundschens Adjuvantien, welche aufgrund des Risikos von Granulombildungen jedoch nicht zur Anwendung am Menschen zugelassen sind [51]. Das komplette Freundschsche Adjuvans kann jedoch als Kombination eines Signal 1- (Paraffinölkomponente zur Depotbildung) und immunstimulatorischen Adjuvans interpretiert werden (abgetötete Mykobakterien, welche unter anderem Toll-like-Rezeptor-Agonisten enthalten).

Als verträgliche Alternative zu den W/O Emulsionen wurden die O/W-Emulsionen und liposomale Zubereitungen entwickelt. Mit Flud<sup>®</sup> existiert ein Marktprodukt gegen Influenza, welches auf dem Squalen-in-Wasser Adjuvans MF59 als Nanoemulsion basiert [34]. Liposomen können aufgrund ihrer unterschiedlichen Phasen (innere wässrige Phase, Lipid-Doppelschicht sowie Grenzschicht zwischen diesen beiden Kompartimenten) verschiedenste Moleküle verkapseln. Damit eignen sie sich prinzipiell für eine Vielzahl an Antigenen sowie Immunstimulatoren.

Kationische Lipide können inhärente adjuvante Wirkung entfalten. Besonders für 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan (DOTAP) wurde die Fähigkeit beschrieben, unreife dendritische Zellen zu aktivieren [52-54]. Eine Kombination aus DOTAP mit den MF59-Komponenten wurde für DNA- & RNA-basierte Vakzine in verschiedenen Indikationen und präklinischen Spezies untersucht [26;55;56]. Die Verwendung von DOTAP in kationischen Liposomen ist in der präklinischen Adjuvantienforschung weit verbreitet, daher sind die angegebenen Referenzen nur als Auswahl zu verstehen [26;27;57-60]. Nicht unerwähnt bleiben sollen die von Christensen *et al.* zusammengefassten Studien, dass DOTAP allein nur eine niedrige bis moderate Adjuvans-Wirkung aufweist, was wiederum Kombinationen mit anderen Adjuvantien sinnvoll macht [26].

Ein inhärenter Nachteil von O/W Emulsionen und wässrigen liposomalen Formulierungen ist die Anfälligkeit für mikrobiellen Verderb sowie Koaleszenz. Die Einhaltung der Kühlkette ist daher meistens obligat, alternativ kann die Laufzeit von O/W Emulsionen sowie Liposomen durch Gefrier- oder Sprühtrocknung verlängert werden [1;61].

## Polymerbasierte Trägersysteme

Die Effektivität von soliden, partikulären Systemen liegt in der Verlängerung der Halbwertszeit des applizierten Antigens durch Depotbildung respektive Schutz vor Abbau. Weiterhin können sie die Eigenschaft haben, Antigen und ein potentiell Ko-Adjuvans (Immunstimulator) zur selben antigenpräsentierenden Zelle zu befördern und nach erfolgter Aufnahme eine Immunantwort zu begünstigen [3;39;62]. Bei partikulären Adjuvantien besteht überdies die Möglichkeit, nach Prozessierung durch APCs via „cross-presentation“ des Antigens den T<sub>H</sub>1-Weg auch für exogene Antigene zu eröffnen und somit eine zellbasierte Immunantwort auszulösen [1]. Gerade für die Entwicklung von Krebsvakzinen beziehungsweise gegen intrazelluläre Pathogene kann eine T<sub>H</sub>1-favorisierende Immunantwort vorteilhaft sein.

Je nach Größe imitieren polymerbasierte Partikel entweder Viren (Nanopartikel, NP) oder Bakterien (Mikropartikel, MP) und erhöhen so die Reaktion auf das applizierte Antigen, da das menschliche Immunsystem darauf geprägt ist, auf Entitäten dieser Größenordnungen schnell zu reagieren [1]. Die Frage, ob für Partikel als Adjuvantien die Größe eher im Nano- oder Mikrometerbereich liegen sollte, lässt sich nicht pauschal beantworten. Für NP wurde beschrieben, dass sie nach Aufnahme durch APC in die ableitenden Lymphknoten gelangen und so eine starke Immunantwort auslösen können. Kehrseite dieses Mechanismus ist die leichtere Auswaschung und entsprechend eine kaum vorhandene Depotbildung nach s.c. oder i.m. Applikation. Für Letzteres sind größere Mikropartikel Mittel der Wahl. Weiterhin können Partikel im einstelligen Mikrometerbereich durch passives Targeting von APCs eine Aufkonzentrierung des etwaigen zugesetzten Immunstimulanz erreichen und verhindern damit eine übermäßige Auswaschung in das umgebende Gewebe bzw. in die systemische Zirkulation [28;28]. Kombinationen mit Signal O/2- beziehungsweise „Type A“ Adjuvantien sind daher Gegenstand intensiver präklinischer Forschungen [6;28;39]. Es gibt Hinweise, dass für diesen Zweck gewisse Größenbereiche der verabreichten Partikel anderen Größen überlegen sein könnten. So wurde für 1 µm Polystyren-Partikel eine stärkere IL-1β Sekretion nach Stimulation mit LPS gefunden als für Nanopartikel (430 nm) oder größere Mikropartikel aus demselben Material (10 µm, 32 µm) [63]. Auch wenn sich Polystyren aufgrund der fehlenden Bioabbaubarkeit nicht für die Anwendung am Menschen eignet, lassen sich doch Anhaltspunkte für einen geeigneten Größenbereich zur Adjuvantienentwicklung entnehmen. So wurde unter anderem von Newman *et al.* gezeigt [64], dass Partikel im Größenbereich bis 5 µm Mediangröße effizient von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (z.B. dendritische Zellen, Makrophagen) aufgenommen werden können.

Als Matrixpolymer für partikuläre Adjuvantien wird sehr häufig *Poly(lactide-co-glycolide)* (PLGA) verwendet. Aufgrund seiner langen klinischen Historie – das erste Marktprodukt, Lupron Depot®, wurde bereits 1989 von der FDA zugelassen [65] – kann die Sicherheit dieses bioabbaubaren Polymers als erwiesen angesehen werden. Besonders die Zulassung am menschlichen Auge [66] spricht für eine hohe Biokompatibilität dieses Polymers auch in empfindlichen Organen und verschafft PLGA so einen Vorteil gegenüber anderen Polymeren wie etwa Polyanhydriden.

Weit verbreitet sind (Doppel-)Emulsionsmethoden zur PLGA-Partikelherstellung. Nachteilig kann bei diesen Protokollen die Degradation vor allem von Protein-Antigenen durch Scherstress oder O/W Grenzflächen sein [67]. Auch für die Freisetzung aus den Partikeln heraus wurden Instabilitäten beschrieben [68]. Um diese Effekte zu umgehen, stehen Polyethylenglykol (PEG)-modifizierte Polymere wie PEG-PLGA zur Verfügung, welche die Oberflächenhydrophobizität des PLGAs mit hydrophilen PEG-Ketten abmildern sollen [69]. Auch der pH-Abfall durch entstehende saure Monomere nach PLGA-Hydrolyse kann durch Einbringung von PEG verringert werden [70]. Dies ist vor allem für säurelabile Antigene oder verkapselte Immunstimulatoren von Bedeutung.

Ein anderer Ansatz zur Vermeidung von Proteininstabilitäten in PLGA-Partikeln besteht darin, das Antigen nicht während der Partikelherstellung zu verkapseln, sondern auf die Oberfläche des bereits geformten Partikels zu adsorbieren. Durch gegensätzliche Ladungen von Proteinantigen und Partikeloberfläche und entsprechenden elektrostatischen Interaktionen lassen sich hohe Proteinbeladungen mit verschiedenen Antigenen erreichen. Vor allem die Gruppe um O'Hagan *et al.* veröffentlichte grundlegende und entsprechend vielzitierte Studien über geladene Partikel als Antigen-Träger [67;71-73].

### 1.3 Zielstellung der Arbeit

Trotz der bemerkenswerten Fortschritte in den letzten Jahren sind potente und gut charakterisierte Adjuvantien weiterhin gefragt, gerade auch durch den neuartigen Ansatz der therapeutischen Krebsvakzinierung. Es war erklärtes Ziel der vorliegenden Arbeit, ein Adjuvantien-System zu entwickeln und zu charakterisieren, welches sich idealerweise für eine Vielzahl von einzuarbeitenden Antigenen eignet und dementsprechend für verschiedene Indikationen anwendbar ist. Wie in Kapitel 1.2 ausgeführt, können hierfür partikuläre Träger herangezogen werden. Dieser im Weiteren auch als Plattform-Ansatz benannte Prozess soll gleichzeitig eine möglichst schonende Beladung erlauben, um der Diversität an denkbaren Antigen-Typen (Proteine/Proteinbruchstücke, DNA, (m)RNA etc.) und potentiell auch zusätzlich einzuarbeitenden Aktivatoren der angeborenen Immunantwort gerecht zu werden.

Um diese recht breite Zielstellung zu fokussieren, sollte das entwickelte Adjuvantien-System möglichst auf bekannten und entsprechend charakterisierten Polymeren basieren. Aufgrund der guten Verträglichkeit von PLGA wurde diesem Polymer der Vorzug gegeben. Bezüglich Größenbereich der zu entwickelnden PLGA-Partikel wurde definiert, dass der Median der Partikelgrößenverteilung unter 5  $\mu\text{m}$  liegen soll. Eine Entwicklung im nanopartikulären Größenbereich wurde ausgeschlossen, da ein Depot-System gefordert war.

Die gezielte Oberflächenmodifikation durch verschiedene bei der Herstellung eingearbeitete Stabilisatoren bei gleichzeitiger Konstanz der Partikelgrößen bzw. der Partikelgrößenverteilung war explizites Ziel der Arbeit. Durch diesen Ansatz wird die zur Verfügung stehende Partikel-Oberfläche annähernd konstant gehalten, was eine mögliche Ursache für *in-vitro/in-vivo* Varianz reduziert. Damit kann der Einfluss verschiedener Oberflächenladungen, welche durch die Stabilisatoren eingebracht werden, auf biologische Testsysteme ohne Verzerrungen untersucht werden. Ein systematischer Vergleich, welcher den Ladungszustand der Partikel (positiv, neutral oder negativ) bei gleichzeitiger Konstanz der Partikelgröße und des verwendeten Antigens untersucht, ist wünschenswert. Die Immobilisierung verschiedener Antigene auf bereits hergestellte Partikel mit verschiedenen Oberflächenladungen durch elektrostatische Wechselwirkungen trägt gleichzeitig dem oben angesprochenen Plattform-Ansatz Rechnung.

Die gezielte Charakterisierung dieser Partikel-Plattform sowohl mit als auch ohne Antigen sollte in der gebotenen Tiefe erfolgen, um einerseits eine möglichst gleichbleibende Qualität bei der Herstellung zu garantieren und andererseits eine etwaige adjuvante Wirkung der Partikelplattform festzustellen. Weiterführend wurde Ovalbumin (OVA) als weit verbreitetes Modellantigen gewählt, da es sich durch eine breite kommerzielle Verfügbarkeit auszeichnet und in der Impfstoffforschung gut etabliert ist. Dadurch steht eine große Auswahl an immunologischen Protokollen & Modellen bereit.

Abschließend sollten die entwickelten MP *in-vivo* auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, eine gezielte Immunantwort gegenüber dem verwendeten Modellantigen OVA im Mausmodell hervorzurufen.

## 2. Kumulativer Teil

Tabelle 2: Übersicht zu den Fachzeitschriften.

*Übersicht zu den allgemeinen Daten der Fachzeitschriften*

<i>Titel</i>	European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics (EJPB)	International Journal of Pharmaceutics (IJP)	European Journal of Pharmaceutical Sciences (EJPS)
<i>Impact Factor 2016</i>	4.159	3.649	3.756
<i>5-year Impact Factor 2016</i>	4.506	4.224	3.866
<i>Herausgeber</i>	Elsevier	Elsevier	Elsevier

Im Folgenden sind 4 Publikationen aufgeführt, welche entweder als *Research Articles* oder *Notes* dem anerkannten *Peer Review* Verfahren unterzogen und bei oben aufgeführten Journalen akzeptiert wurden. Diese Publikationen bilden den Schwerpunkt der im Rahmen der Promotion ausgeführten Experimente und fassen die erzielten Ergebnisse zusammen.

Die Publikationen stellen verschiedene Aspekte der durchgeführten physikalisch-chemischen, *in-vitro* und *in-vivo* Charakterisierungen der Mikropartikelplattform vor.

Tabelle 3: Darlegung des Eigenanteils, A: eigener Anteil an der Planung, der Durchführung, der Auswertung der Experimente und der Anfertigung der zugehörigen Abbildungen, B: eigener Anteil an der Anfertigung des Manuskripts.

Darlegung des Eigenanteils an den aufgeführten Veröffentlichungen		
Publikation I	M. Riehl, M. Harms, A. Hanefeld and K. Mäder: <i>Investigation of the stabilizer elimination during the washing step of charged PLGA microparticles utilizing a novel HPLC-UV-ELSD method</i> European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 94 (2015) 468–472	Eigenanteil A= ca. 90 % B= ca. 80 %
Publikation II	M. Riehl, M. Harms, A. Hanefeld, R.B. Baleeiro, P. Walden and K. Mäder: <i>Combining R-DOTAP and a particulate antigen delivery platform to trigger dendritic cell activation: Formulation development and in-vitro interaction studies</i> International Journal of Pharmaceutics 532 (2017) 37–46	Eigenanteil A= ca. 60 % B= ca. 60 %
Publikation III	M. Riehl, M. Harms, H. Lucas, T. Ebsen, C.A. Guzmán and K. Mäder: <i>Dual dye in-vivo imaging of differentially charged PLGA carriers reveals antigen-depot effect, leading to improved immune responses in preclinical models</i> European Journal of Pharmaceutical Sciences 117 (2018) 88–97	Eigenanteil A= ca. 50 % B= ca. 70 %
Publikation IV	M. Riehl, M. Harms, B. Göttel, H. Kubas, D.Schiroky and K. Mäder: <i>Acid-induced degradation of widely used imaging label DiR causes hypsochromic shift in fluorescence properties</i> European Journal of Pharmaceutical Sciences 132 (2019) 27–33	Eigenanteil A= ca. 65 % B= ca. 80 %

Publikation I beschreibt die Entwicklung einer neuartigen instrumentellen analytischen Methode, welche es erlaubt, via HPLC-UV-ELSD sowohl PLGA als auch die geladenen Stabilisatoren *R-DOTAP* und *dioctyl sulfosuccinate* (DOSS) in einem zu analysieren. Als Anwendungsbeispiel wurde anhand dieser Methode die Waschkinetik der Stabilisatoren nach der Produktion der geladenen MP untersucht. Dabei wurde gefunden, dass sich der negative und wasserlösliche Stabilisator DOSS (HLB-Wert von ca. 40 [74]) entsprechend den theoretischen Verdünnungen, welche durch das Waschen mit Wasser eingeführt werden, abreichert. Im Gegensatz dazu wurde für den positiv geladenen öllöslichen Stabilisator *R-DOTAP* (HLB-Wert von ca. 10, Berechnungsmethode nach Davies) eine partielle Einlagerung in die hydrophobe PLGA Matrix gezeigt. Für die folgenden Studien konnte die entwickelte Methode erfolgreich zur Qualitätskontrolle angewandt werden, um physiko-chemisch hinreichend charakterisierte PLGA MP näher im Zusammenspiel mit biologischen System zu erforschen.

Publikation II beinhaltet die Formulierungsentwicklung und Herstellung der verschiedenen Partikel-spezies (positiv, neutral und negativ geladen) unter der Prämisse einer möglichst einheitlichen Partikelgröße. Dabei wurde ein Größenfenster von Median ( $D_{50}$ ) = 2-3  $\mu\text{m}$  angestrebt, da bereits Publikationen existierten, welche eine Aufnahme in kompetente antigenpräsentierende Zellen (v.a. unreife dendritische Zellen und Makrophagen) von PLGA-Partikeln dieser Größenordnung beschreiben. Diese Partikel wurden ohne Antigenbeladung charakterisiert hinsichtlich Toxizität, Aufnahme/Routing sowie ihrer Fähigkeit, in unreifen dendritischen Zellen einen Reifungsprozess auszulösen. Besonderer Fokus wurde auf die positiv geladenen Partikel bestehend aus PLGA und R-DOTAP gelegt, da für R-DOTAP allein besagte Maturierungseffekte *in-vitro* gezeigt werden konnten. Interessanterweise konnte dies für die hier verwendete Matrix aus PLGA/R-DOTAP nicht bestätigt werden.

Die Beladung der Partikelplattform mit einem Modellantigen sowie das *in-vivo* Verhalten wird in Publikation III beschrieben. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Partikel mit unterschiedlichen Oberflächenladungen differierende Bindungskapazitäten für das Modellantigen OVA haben. Entsprechend wurden verschiedene Partikelkonzentrationen subkutan verabreicht, um eine einheitliche OVA Dosis zu applizieren. Fluoreszenzfarbstoffe verschiedener Wellenlänge erlaubten das Tracking sowohl von Partikeln als auch Modellantigen nach Applikation. Für die Gruppe R-DOTAP Verum konnte klar eine Verlängerung der Halbwertszeit in Vergleich mit löslichem OVA gezeigt werden. Das verwendete Protokoll erlaubte gleichzeitig die Entnahme von Blut und Milz zu definierten Zeitpunkten, um etwaige humorale und zelluläre Immunantworten zu untersuchen. Es wurde festgestellt, dass die proteinbeladenen MP der Gruppen R-DOTAP und PVA in der Lage waren, nach einmaliger Gabe der Versuchsvakzine starke und andauernde Antikörperantworten hervorzurufen. Im Gegensatz dazu konnten für die DOSS Verum MP nur schwache Antikörpertiter bestimmt werden.

Abschließend wurde basierend auf einer Beobachtung aus Publikation III eine kombinierte *in-silico* / *in-vitro* Studie aufgesetzt, welche in Publikation IV veröffentlicht wurde. Das instabile Verhalten des verwendeten Fluoreszenzlabels DiR im sauren Milieu, welches bereits in Publikation III andiskutiert wurde, konnte hier *in-silico* simuliert und anschließend *in-vitro* mittels verschiedener analytischer Methoden verifiziert werden.

2.1 Investigation of the stabilizer elimination during the washing step of charged PLGA microparticles utilizing a novel HPLC-UV-ELSD method

Link Artikel: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.06.025>

Link Supporting Information:

<http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0939641115002854-mmc1.docx>

Zitat: Markus Riehl, Meike Harms, Andrea Hanefeld, Karsten Mäder:

*Investigation of the stabilizer elimination during the washing step of charged PLGA microparticles utilizing a novel HPLC-UV-ELSD method*

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 94 (2015) 468–472

2.2 Combining R-DOTAP and a particulate antigen delivery platform to trigger dendritic cell activation: Formulation development and *in-vitro* interaction studies

Link Artikel: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.119>

Link Supporting Information:

<http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0378517317308360-mmc1.docx>

Zitat: Markus Riehl, Meike Harms, Andrea Hanefeld, Renato B. Baleeiro, Peter Walden, Karsten Mäder:

*Combining R-DOTAP and a particulate antigen delivery platform to trigger dendritic cell activation: Formulation development and in-vitro interaction studies*

International Journal of Pharmaceutics 532 (2017) 37–46

2.3 Dual dye *in-vivo* imaging of differentially charged PLGA carriers reveals antigen-depot effect, leading to improved immune responses in preclinical models

Link Artikel: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.01.040>

Link Supporting Information: <https://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S092809871830054X/1-s2.0-S092809871830054X-mmc1.docx/>

Zitat: Markus Riehl, Meike Harms, Henrike Lucas, Thomas Ebensen, Carlos A. Guzmán, Karsten Mäder:

*Dual dye in-vivo imaging of differentially charged PLGA carriers reveals antigen-depot effect, leading to improved immune responses in preclinical models*

European Journal of Pharmaceutical Sciences 117 (2018) 88–97

## 2.4 Acid-induced degradation of widely used imaging label DiR causes hypsochromic shift in fluorescence properties

Link Artikel: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.02.031>

Zitat: Markus Riehl, Meike Harms, Benedikt Göttel, Holger Kubas, Dirk Schiroky, Karsten Mäder:

*Acid-induced degradation of widely used NIR dye DiR causes hypsochromic shift in fluorescence properties*

European Journal of Pharmaceutical Sciences 132 (2019) 27–33

### 3. Diskussion des kumulativen Teils

Am Beginn der Arbeit stand die Formulierungsentwicklung der unbeladenen PLGA Partikel, um MP mit verschiedenen Oberflächenladungen, jedoch möglichst gleichen Partikelgrößenverteilungen zu erhalten.

*Tabelle 4: Eigenschaften beispielhafter Partikelchargen, aus [75].*

<i>Partikelgattung/ verwendeter Stabilisator</i>	<i>Median nach Herstel- lung [<math>\mu\text{m}</math>, Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung]</i>	<i>Span [D90-D10/Me- dian, Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung]</i>	<i>Zetapotential nach Herstellung [mV, Mittelwert <math>\pm</math> Stan- dardabweichung]</i>
R-DOTAP (n=4 Chargen)	2.34 $\pm$ 0.18	1.13 $\pm$ 0.27	+ 68.25 $\pm$ 1.98
PVA (n=8 Chargen)	2.37 $\pm$ 0.15	1.07 $\pm$ 0.16	- 0.63 $\pm$ 0.16
DOSS (n=3 Chargen)	2.16 $\pm$ 0.02	0.87 $\pm$ 0.05	- 100.10 $\pm$ 1.81

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, ähneln sich die verschiedenen MP-Spezies bezüglich Mediengröße und Größenverteilung (Span) sehr, während das Zetapotential in identischem Dispergiermedium (verdünnte phosphatgepufferte Saline) der unbeladenen MP erwartungsgemäß differiert.

Nach Beladung mit dem Modellantigen OVA änderten sich die Zetapotentiale gemäß Tabelle 5. Die Abschirmung der Oberflächenladungen durch adsorbiertes OVA wird vor allem bei den R-DOTAP und DOSS MP deutlich.

*Tabelle 5: Änderung des Zetapotentials nach OVA Beladung.*

*Anmerkung: die Partikelchargen sind nicht identisch mit jenen aus Tabelle 3, wurden jedoch mit demselben Herstellungsverfahren produziert. Aus [75], Suppl. Inf.*

<i>Partikelgattung/ verwendeter Stabilisator</i>	<i>Zetapotential nach Herstellung [mV, Mittelwert aus n=3 <math>\pm</math> Standardab- weichung]</i>	<i>Zetapotential nach OVA-Beladung [mV, Mittelwert aus n=3 <math>\pm</math> Stan- dardabweichung]</i>
R-DOTAP	+ 54.4 mV $\pm$ 3.0 mV	- 18.6 mV $\pm$ 1.9 mV
PVA	- 3.0 mV $\pm$ 0.1 mV	- 2.7 mV $\pm$ 0.4 mV
DOSS	- 99.2 mV $\pm$ 2.5 mV	- 45.4 mV $\pm$ 5.8 mV

Zur Veranschaulichung wurden Rasterelektronenaufnahmen von unbeladenen und beladenen Partikeln angefertigt (Abbildung 3). Auffällig ist, dass die beladenen R-DOTAP Verum MP (Abbildung 3 B) eine deutlich andere Erscheinung verglichen mit den anderen Spezies aufweisen. Die unebene Oberfläche könnte das Resultat einer deutlichen höheren OVA-Beladung im Vergleich zu den anderen Partikeln sein (3 % vs. 0,5 % bzw. 1 %, alle m/m).

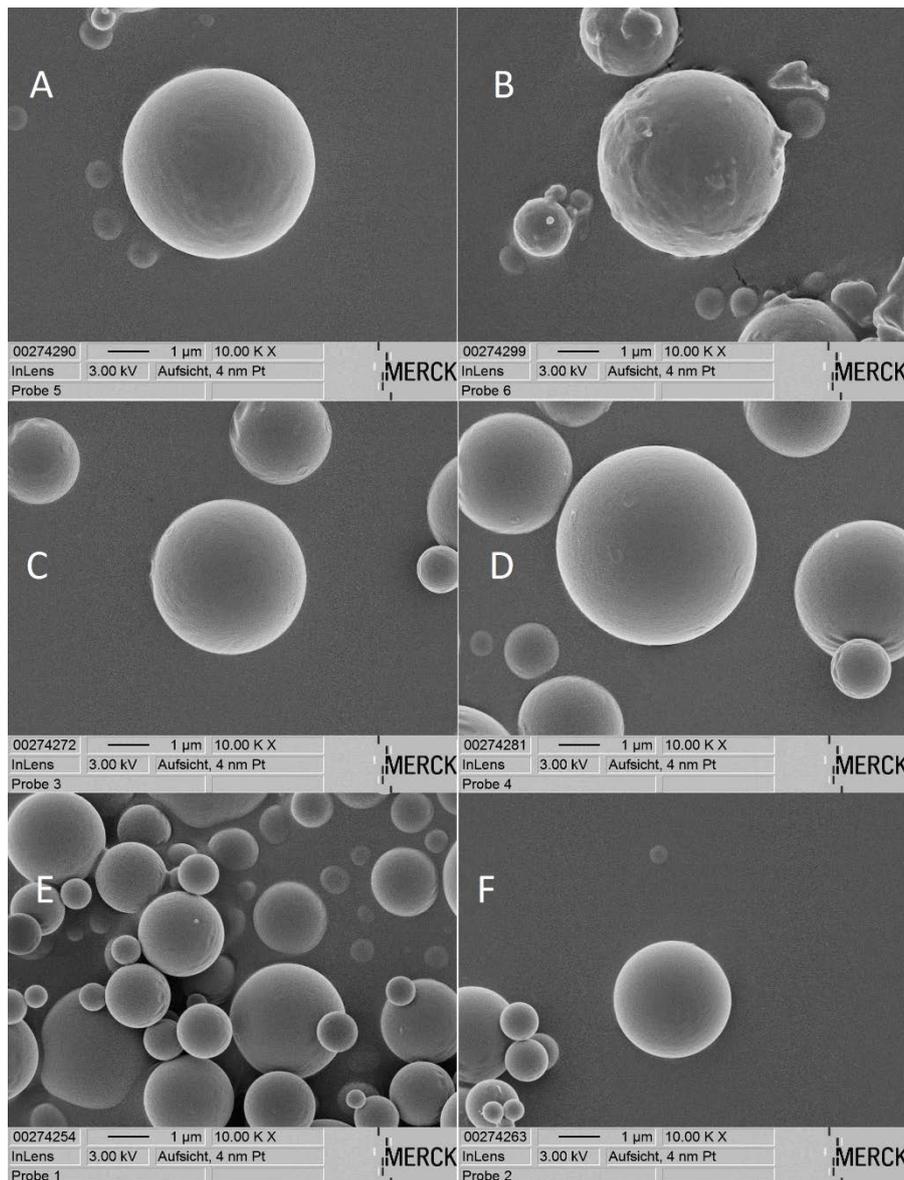


Abbildung 3: Repräsentative SEM Aufnahmen.

A) R-DOTAP Placebo MP, B) R-DOTAP Verum MP, C) PVA Placebo MP, D) PVA Verum MP, E) DOSS Placebo MP, F) DOSS Verum MP. Aus [75].

Publikation I beschrieb erstmals die technische Möglichkeit, PLGA zusammen mit den geladenen Stabilisatoren R-DOTAP und DOSS mittels einer analytischen Methode (HPLC-UV-ELSD) zu analysieren (Abbildung 4). Bisher beschriebene Methoden zur PLGA Quantifizierung hatten sich vornehmlich auf Gelpermeationschromatographie (GPC) gestützt, welche jedoch die Einschränkung hat, kleine Moleküle (wie die erwähnten Stabilisatoren) nicht sauber trennen zu können. Die Stabilisatoren würden gemeinsam mit allen anderen kleinen Molekülen, welche in alle Poren des Gels permeieren, eluiert werden, was eine Quantifizierung unmöglich macht.

Mit der publizierten Methode gelang es, über eine handelsübliche C<sub>18</sub>-Säule (Umkehrphasen-HPLC) die benannten Komponenten der geladenen MP zu trennen und anschließend über verschiedene Detektoren zu quantifizieren. Ein weiterer Vorzug der präsentierten Methode liegt in der einfachen Probenzubereitung: eine Auflösung der geladenen MP in Acetonitril genügt – alle Komponenten sind hinreichend in diesem Solvens löslich.

Während für *R*-DOTAP aufgrund der Ölsäure-Doppelbindungen eine UV-Detektion bei niedriger Wellenlänge (200 nm) möglich und empfindlich genug war, konnte dieses Verfahren für die Verbindungen PLGA und DOSS nicht angewandt werden. Daher wurde für diese Moleküle ohne jegliches Chromophor ein *evaporative light scattering* (ELS-) Detektor eingesetzt, dessen Verwendung in der Lipidanalytik schon vorher beschrieben wurde [76]. Auch wenn ELS-Detektoren bereits in Verbindung mit GPC zur PLGA Analytik eingesetzt wurden [77;78], ist die Kombination mit einer HPLC Methode neuartig. Ein beispielhaftes Chromatogramm mit allen Analyten ist in Abbildung 4 gezeigt.

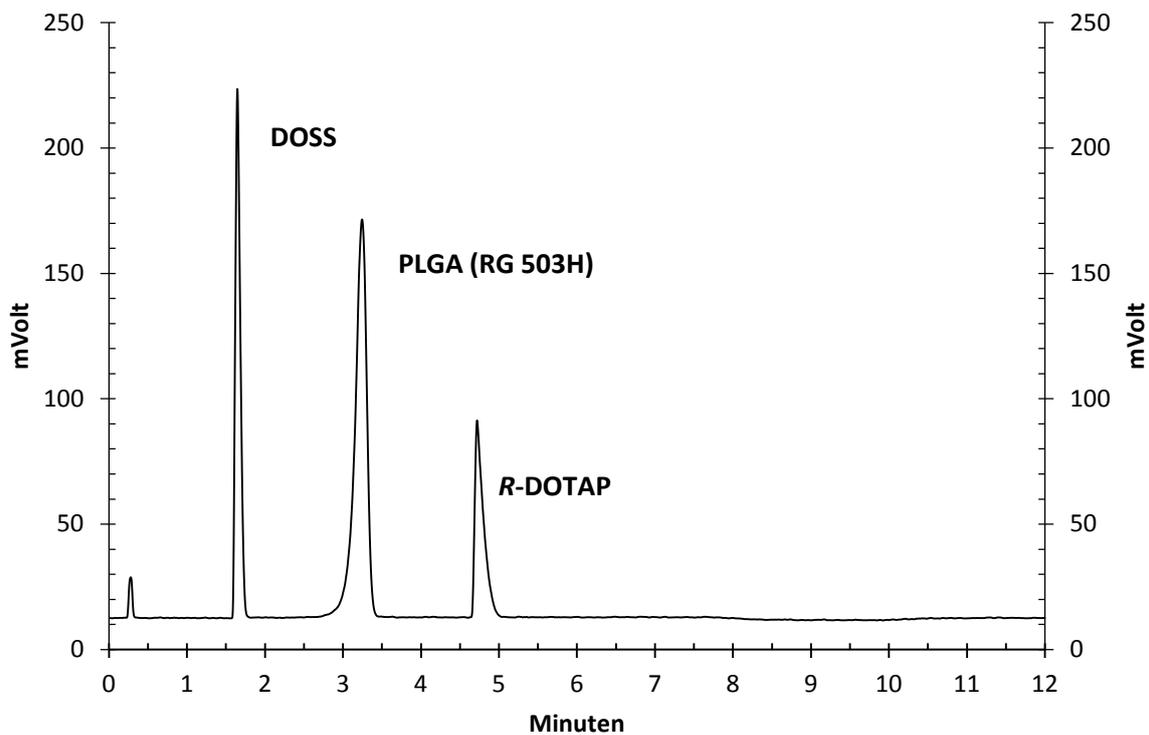


Abbildung 4: HPLC-Chromatogramm (ELS-Detektor), welches die klare Basislinientrennung der Bestandteile der geladenen MP zeigt. Modifiziert nach [79].

Als praktisches Anwendungsbeispiel der entwickelten Methode wurde die Kinetik der Waschprozesse der unterschiedlich geladenen MP erfasst. Da MP vor dem weiteren Prozessieren weitgehend von überschüssigem Stabilisator befreit werden sollten, um ein definiertes Trägersystem zu erhalten (oder um negative Folgen einer zu hohen Stabilisatorkonzentration, wie etwaige Zelltoxizität, zu mindern), existieren verschiedenste Waschprotokolle. Ein auch in dieser Arbeit angewandtes Prinzip besteht in der Zugabe von deionisiertem Wasser und anschließendem Mischen, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt und Dekantieren des Überstandes; bei Bedarf kann das beschriebene Prozedere wiederholt werden. Wie in Publikation I beschrieben ist, stellte sich dabei heraus, dass sich der hydrophile Stabilisator DOSS erwartungsgemäß verhält, d.h. dass die gemessenen Konzentrationen nach insgesamt vier Waschschritten der jeweils eingebrachten Verdünnung in das System entsprachen. Für das kationische Lipid *R*-DOTAP hingegen wurde eine nichtlineare Waschkinetik beobachtet. Auch nach vier Waschgängen konnte weiterhin *R*-DOTAP analysiert werden, was auf eine Freisetzung des Lipids aus den MP nach erneutem Kontakt mit Wasser schließen lässt. Dies wurde durch eine Analyse komplett gewaschener und getrockneter MP bestätigt, welche zeigten, dass das Verhältnis von *R*-DOTAP zu Partikeltrockenmasse bei 10,8 % lag (m/m, Mittelwert aus drei individuellen Chargen, Tabelle 6). DOSS

konnte mit der vorgestellten Methode nicht mehr in den getrockneten Partikeln nachgewiesen werden (unterhalb der Nachweisgrenze). Allerdings wiesen die gewaschenen DOSS-Partikel weiterhin negative Oberflächenladungen auf (Zetapotential stärker negativ als -100 mV, Tabelle 6). Dies bestätigt, dass der überwiegende Teil dieses anionischen Stabilisators durch das angewandte Waschprotokoll entfernt werden kann, jedoch eine geringe Fraktion DOSS auf den MP verbleibt. Die Quantifizierung verbleibender Fraktionen eines negativ geladenen Stabilisators ist insofern von Relevanz, da bekannt ist, dass freie Moleküle von anionischen Tensiden nicht unerhebliche Zelltoxizität verursachen können [80;81].

Tabelle 6: Ergebnis HPLC-UV-ELSD Analytik gewaschener Partikel, modifiziert nach [79].

Mikropartikel-Charge	Zetapotential vor Waschprozedere [mV]	Zetapotential nach vier Waschsritten [mV]	Verhältnis Stabilisator/Partikeltrockenmasse [%] #	Mittelwert Verhältnis Stabilisator/Partikeltrockenmasse
R-DOTAP 1	+ 68.2	+ 61.6	11.8	10.8 %
R-DOTAP 2	+ 70.8	+ 46.2	9.2	
R-DOTAP 3	+ 70.1	+ 64.9	11.4	
DOSS 1	- 119	- 105	- *	- *
DOSS 2	- 118	- 104	- *	
DOSS 3	- 119	- 107	- *	

# Verhältnis berechnet wie folgt:  $\% = \frac{\text{Masse Stabilisator}}{\text{Masse Stabilisator} + \text{Masse PLGA}} * 100$

\* kein DOSS in den getrockneten Partikeln detektierbar (< Nachweisgrenze)

Die Charakterisierung der MP *in-vitro* sowie die dazugehörigen Studien zur Formulierungsentwicklung sind in Publikation II beschrieben. Alle in dieser Studie präsentierten MP Chargen hatten eine Median-Größe von < 5 µm und entsprachen somit der in der Zielstellung dieser Arbeit gesetzten Spezifikation. Die entwickelten MP wurden als Placebo (ohne adsorbiertes Antigen) auf unreife dendritische Zellen (immature dendritic cells, iDCs) von humanen Spendern gegeben und die Parameter Toxizität, Aufnahme/Routing sowie eine mögliche Proliferation der unreifen Zellen erfasst. Besonderer Fokus wurde auf die positiv geladenen Partikel bestehend aus PLGA und R-DOTAP gelegt, da für R-DOTAP in Form von Liposomen oder Lipoplexen auch ohne Antigene Reifungseffekte von iDCs zu ausgereiften DCs *in-vitro* gezeigt werden konnten [52-54]. Eine graphische Darstellung des zugrundeliegenden Mechanismus ist in Abbildung 5 gegeben.

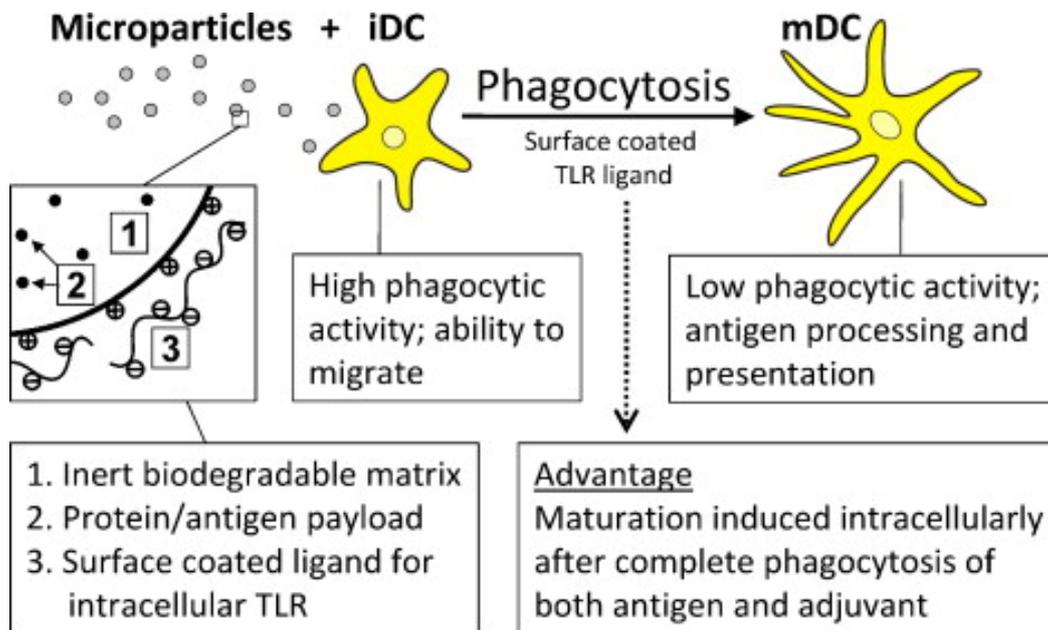


Abbildung 5: Abbildung aus Wischke et al. [82], welche den Reifungsprozess von iDCs zu ausgereiften dendritischen Zellen veranschaulicht.

Anmerkung: für Publikation II wurden Placebo MP ohne Antigen oder Ko-Stimulatoren getestet.

Um den Einfluss der Partikelmatrix bzw. der jeweiligen Stabilisatoren zu erfassen, wurden die Partikel in Publikation II ohne Antigen (Punkt 2 in Abbildung 5) sowie ohne TLR-Stimulatoren (Punkt 3 in Abbildung 5) auf die Zellen gegeben.

Alle Placebo MP zeigten akzeptable Toxizität (Abbildung 6), wobei die ungeladenen MP die beste Verträglichkeit zeigten. Wechselwirkungen zwischen den geladenen Stabilisatoren und den Zellmembranen könnten ein Grund für leicht erhöhte, aber dennoch akzeptable Toxizität der R-DOTAP bzw. DOSS MP sein.

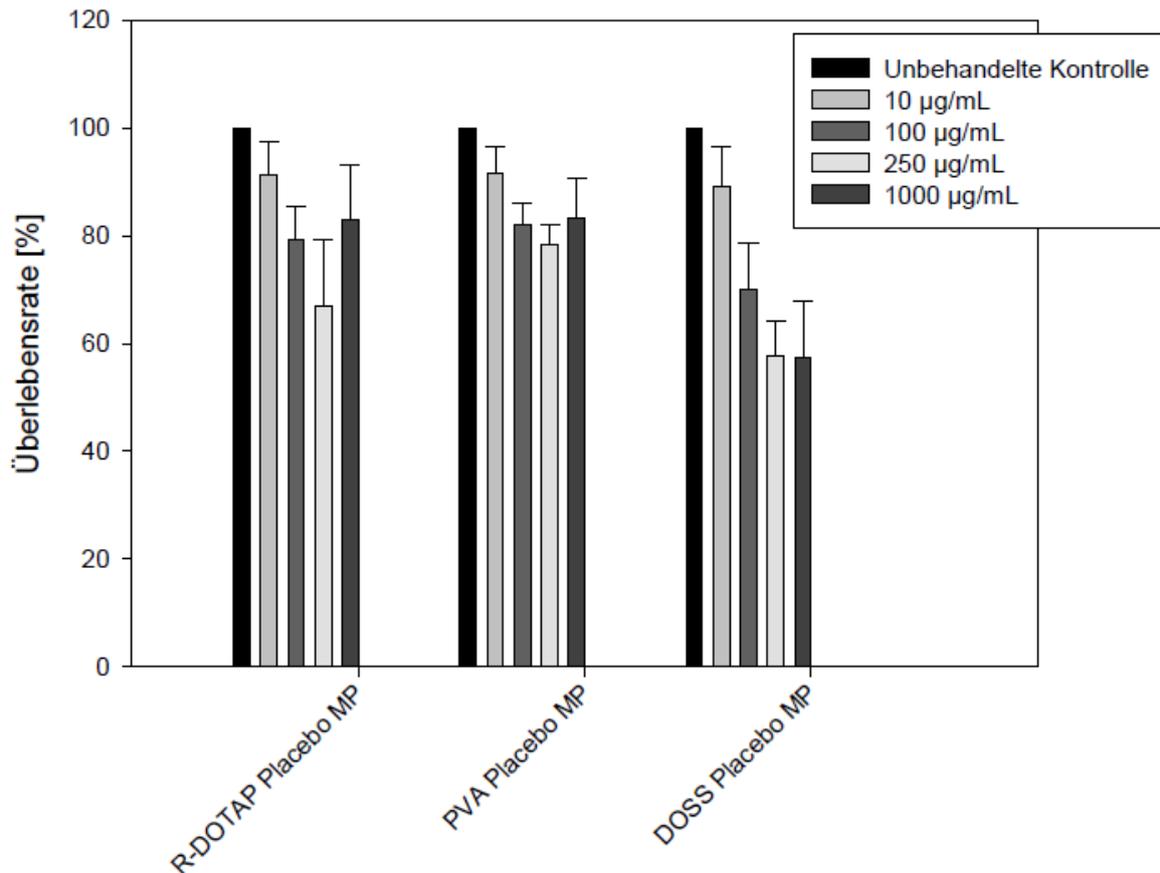


Abbildung 6: Einfluss der Partikelkonzentration auf die Überlebensrate von humanen iDCs (MTT Zellversuch,  $n=6$  außer Gruppe R-DOTAP MP:  $n=4$ ; Mittelwert + Standardabweichung). Modifiziert nach [83].

Bezüglich Verträglichkeit der hydrophilen Stabilisatoren ohne zugrundeliegende MP Matrix konnte gezeigt werden, dass das verwendete PVA allein annähernd untoxisch ist, während DOSS nur bei niedriger Konzentration (0,0016 % m/V) nicht toxisch auf die iDCs wirkte. Schon bei einer effektiven Konzentration von 0,008 % (m/V) von DOSS im Zellkulturmedium sank die Überlebensrate der iDCs auf < 5 % herab. Dieses Ergebnis unterstreicht die Notwendigkeit der umfassenden Charakterisierung des MP Systems inklusive der Waschkinetiken der verwendeten Stabilisatoren. Damit kann ausgeschlossen werden, dass größere Mengen freies DOSS (zum Beispiel durch ungeeignete Waschprotokolle) in das biologische System gelangen.

Alle getesteten MP-Typen wurden unabhängig von ihrer Oberflächenladung effizient aufgenommen und in saure Zellkompartimente eingeschlossen (saures Endosom, rot angefärbt in Abbildung 7, Bildserie A). Dieser Weg wurde nicht über ein frühes Endosomenstadium beschränkt, da der Marker EEA1 (early endosome antigen 1) angefärbt wurde, jedoch keine Ko-Lokalisation mit den MP aufwies. Eine partielle Ko-Lokalisation mit dem *Dendritic cell lysosomal associated membrane glycoprotein* (DC-LAMP, auch: CD208) ist in Abbildung 7, Bildserie B zu erkennen. Auch wenn dieser Marker nur in reifen dendritischen Zellen zu finden ist, reicht die partielle Ko-Lokalisation mit den MP nicht aus, um einen Reifungsprozess durch die getesteten MP anzunehmen.

Ähnliche Beobachtungen wurden für PLGA Nanopartikel im selben Assay gemacht [84], was die Vermutung nahelegt, dass das Routing eher vom verwendeten Material der Partikel abhängig ist als von den eingebrachten Oberflächenladungen, welche zusätzlich durch Bestandteile des Zellkulturmediums überdeckt werden können. So ist es wahrscheinlich, dass sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* eine Protein-

Korona entsteht, welche die Partikel bedeckt [85] und damit eingebrachte Oberflächenladungen verändert.

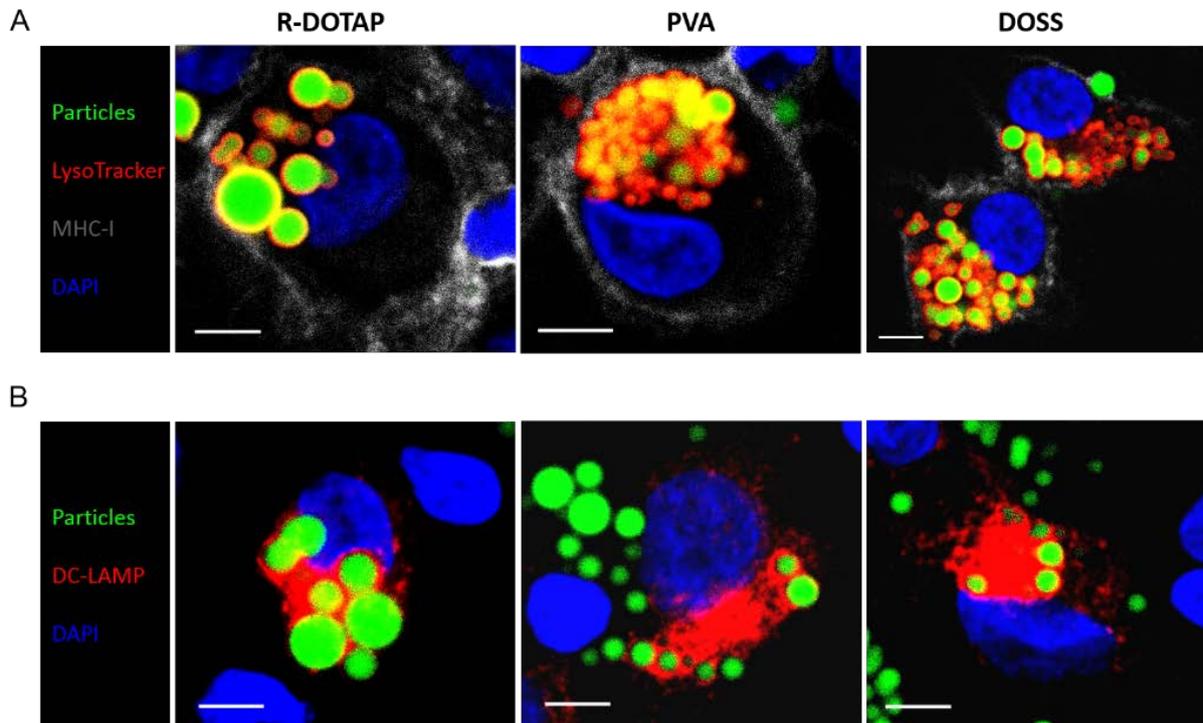


Abbildung 7: Konfokale Aufnahmen der intrazellulären Lokalisation getesteter PLGA MP nach Aufnahme durch humane iDCs.

Beide Serien: Coumarin-6 angefärbte MPs sind in grün sichtbar. Blaue DAPI-Färbung zeigt Zellkerne.

A) Rote Farbe zeigt saure Zellkompartimente via LysoTracker, graue Farbe MHC-1 Moleküle auf Zellmembranen.

B) DC-LAMP ist rot angefärbt.

Maßstab bei beiden Bildserien= 5  $\mu$ m. Aus [83].

Entgegen der ursprünglich aufgestellten Hypothese, dass R-DOTAP in Verbindung mit partikulärem PLGA einen Reifungsprozess auslösen könnte, konnte kein signifikanter Anstieg der Maturierungsmarker CD80/83/86 sowie HLA-DR mittels Durchflusszytometrie gemessen werden (Abbildung 8). Auch wenn vereinzelt Erhöhungen der Markersignale gegenüber der Negativkontrolle gemessen wurden, so ist das Ergebnis nicht konsistent über alle Marker und Konzentrationen. Die Positivkontrolle Lipopolysaccharid indiziert jedoch einen funktionierenden Assay.

Mögliche Erklärungsansätze für dieses überraschende Ergebnis bestehen einerseits in der Verkapselung von R-DOTAP innerhalb der soliden PLGA Partikel und andererseits in einer sehr starken Bindung von R-DOTAP an die Oberfläche der PLGA-MP, was die Interaktion mit den dendritischen Zellen erschweren könnte.

Ersteres bewirkt eine Reduktion des an der Partikeloberfläche zur Verfügung stehenden R-DOTAP wodurch eine hypothetische minimale Wirkkonzentration (welche für dieses System unbekannt ist) unterschritten würde. Man könnte diese Hypothese durch Spiking-Experimente verifizieren oder falsifizieren, indem z.B. zusätzliches R-DOTAP zu den getesteten MP hinzugegeben würde. Allerdings stellt sich hier aufgrund der amphiphilen Struktur des R-DOTAP Moleküls die Frage, in welcher Form das

zusätzliche R-DOTAP in das biologische Testsystem eingebracht werden sollte. Denkbar wären verschiedene Formulierungen wie z.B. als Liposomen (was jedoch wiederum die Frage nach der Partikelgröße der Liposomen nach sich zieht), was dieses Experiment sehr umfangreich gestalten würde. Darüber hinaus gilt zu bedenken, dass ein solcher Spiking-Ansatz für eine potentielle Humanvakzine nicht trivial in Herstellung und (klinischer) Handhabung wäre.

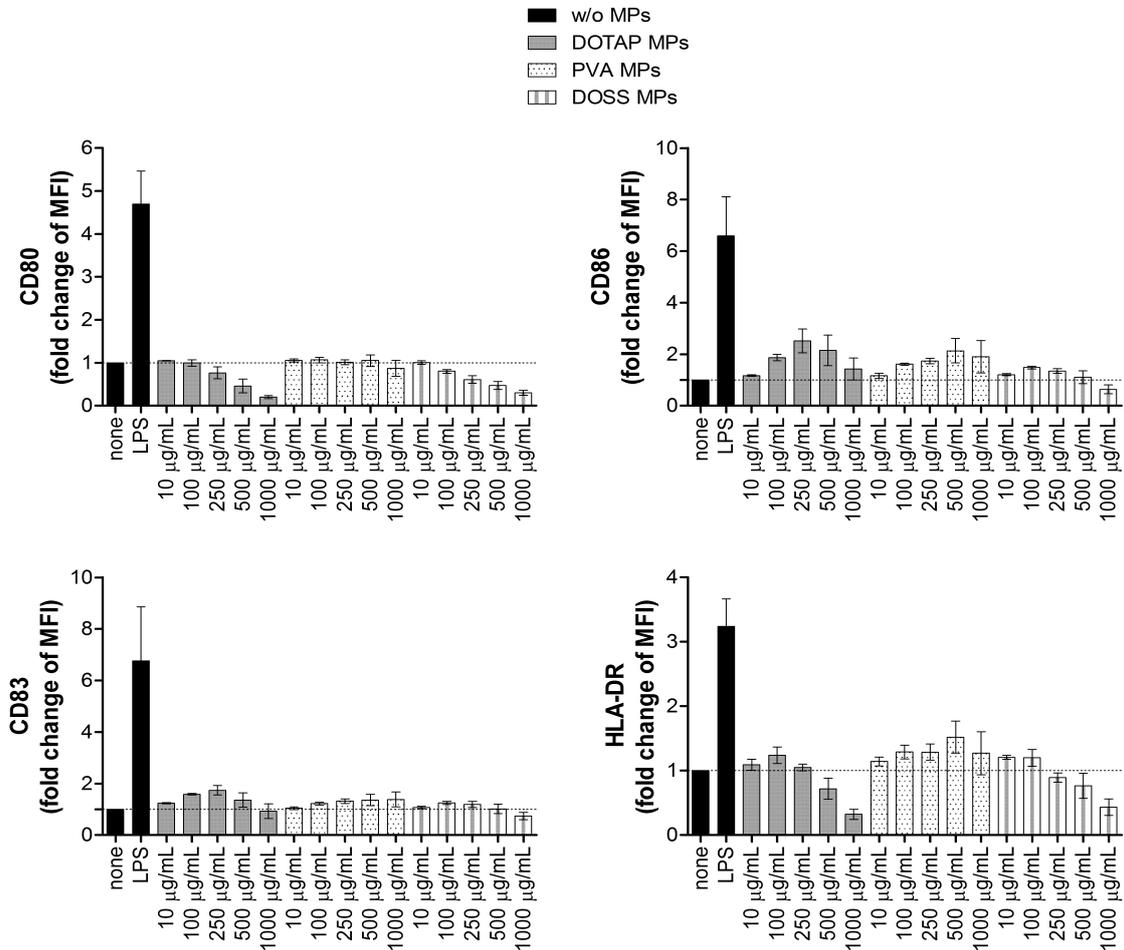


Abbildung 8: Ergebnisse Maturationsexperimente an humanen unreifen dendritischen Zellen mit unbeladenen MP.

Der zweite schwarze Balken („LPS“) zeigt die Reaktion auf die Positivkontrolle mit Lipopolysaccharid und bestätigt die korrekte Durchführung der Experimente. Aus [83].

Es wurde versucht, die Konzentration von R-DOTAP pro MP zu erhöhen, indem mehr kationisches Lipid zu Beginn der Herstellung verwendet wurde (resultierend in einem annähernden Faktor von drei höheren Verhältnis von R-DOTAP zu Gesamtpartikelmasse). Diese theoretisch denkbare Erhöhung des Gehaltes an R-DOTAP pro Partikelmasse war jedoch nicht zielführend. Die zusätzlichen Mengen Lipid wurden während des etablierten Waschprozederes ausgewaschen, sodass nach dem 1. Waschvorgang keine signifikant größeren Gehalte an R-DOTAP im Waschwasser der Testgruppe im Vergleich zu parallel hergestellten Referenzpartikeln gemessen werden konnten ( $p=0.781$ , für statistische Signifikanz wurde  $p<0.05$  gesetzt). Analog dazu waren die Unterschiede im Verhältnis R-DOTAP zu Gesamtpartikelmasse nicht signifikant ( $p=0.073$ ). Die analytischen Ergebnisse aus beiden Ansätzen erlaubten eine Näherung der R-DOTAP zu Partikel-Verhältnisse von  $\sim 10\%$  (m/m). Daher wurde entschieden, nur die

Referenzpartikel *in-vitro* zu untersuchen und den Weg der Erhöhung des *R*-DOTAP Gehaltes während der Herstellung nicht weiter zu beschreiten. Indirekt kann dieses Ergebnis als Hinweis gesehen werden, dass die Aufnahme von *R*-DOTAP in die hydrophobe PLGA-Matrix limitiert ist. Weiteres, überschüssiges *R*-DOTAP verbleibt kolloidal in der Wasserphase und wird durch Waschen entfernt.

Von Fischer *et al.* wurde gezeigt [86], dass PLGA Mikropartikel mit verschiedenen positiv geladenen Oberflächenmolekülen keine Reifung bei iDCs hervorrufen konnten. Insofern verifizieren die hier gewonnenen Erkenntnisse diese Studie, bei welcher u.a. auch Chitosan auf PLGA MP aufgebracht wurde. Es liegt der Schluss nahe, dass PLGA MP zwar sehr gut von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen werden, sich dann jedoch nach Aufnahme weitestgehend neutral verhalten. Auch die Oberflächendekoration mit bekannten Immunstimulatoren (*R*-DOTAP/ Chitosan) ändert dieses Verhalten nicht bedeutsam.

Die Beladung der Partikelplattform mit fluoreszenzmarkiertem OVA sowie das *in-vivo* Verhalten nach subkutaner Applikation werden in Publikation III beschrieben. Es stellte sich heraus, dass die mit den geladenen Stabilisatoren *R*-DOTAP und DOSS hergestellten MP teilweise deutlich bessere Antigenbindungseigenschaften als die neutral geladenen PVA MP aufwiesen (3 % & 1 % im Vergleich zu 0,5 %, alle m/m). Da die Größen- und somit Oberflächenverhältnisse über alle MP Spezies vergleichbar waren (Tabelle 4), kann hieraus die Aussage abgeleitet werden, dass die geladenen MP eine höhere Antigenbeladungskapazität für OVA als die ungeladenen MP besitzen. Bei einer elektrostatisch getriebenen Adsorption scheint dies nicht unerwartet, jedoch ist vor allem der hohe Beladungsgrad für die *R*-DOTAP MP bemerkenswert. Auch auf SEM Bildern von allen MP Spezies war die *R*-DOTAP Verum MP Gruppe auffällig (Abbildung 3). Während alle anderen Gruppen eine glatte, ebene Oberfläche aufzuweisen scheinen, haben MP aus dieser Gruppe eine eher unebene und unregelmäßig geformte Oberfläche. Ein Zusammenhang mit der hohen OVA-Beladung liegt nahe, wurde aber experimentell nicht weiter untersucht. Denkbar wäre hier beispielsweise SEM in Verbindung mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie, um Schwefel nachzuweisen, welcher nur im OVA vorhanden ist. Ein Partikel-Querschnitt könnte so Auskunft über die Dicke einer etwaigen OVA-Schicht geben.

Nach subkutaner Applikation der Partikel in SKH1-Elite Mäuse (Crl:SKH1-*Hr<sup>hr</sup>*) wurden ausgewählte Individuen gemäß Protokoll nach Tag 2 getötet, um mögliche Akut-Phase-Reaktionen näher untersuchen zu können. Die verbliebenen Individuen durchliefen die Studie über den vollen Beobachtungszeitraum von 42 Tagen. Bezüglich der untersuchten Faktoren Verhalten, Körpergewicht und histologischer Bewertung der Milz sowie proximalen und distalen Lymphknoten wurden keine Auffälligkeiten entdeckt. Dies bestätigt erneut die gute Biokompatibilität von PLGA.

Über den Beobachtungszeitraum wurden die Intensitäten der verwendeten Fluoreszenzmoleküle CF660C (Protein-Markierer) und DiR (MP-Markierer) gemessen, um Verweilzeiten des markierten Proteins bzw. der PLGA MP *in-vivo* bestimmen zu können (Abbildung 9).

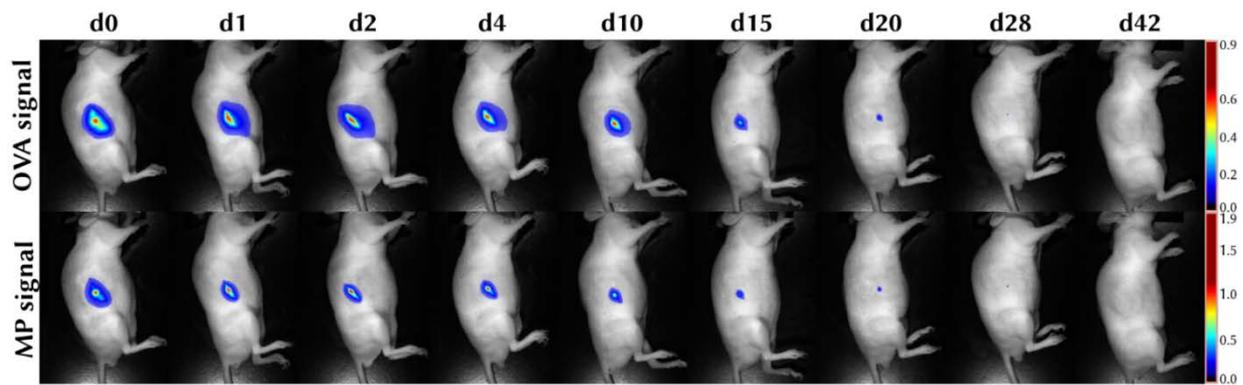


Abbildung 9: Fluoreszenzbildgebung der verwendeten Moleküle CF660C-OVA (Protein) & DiR (MP) über den Beobachtungszeitraum von 42 Tagen. Dargestellt: Maus M51 (R-DOTAP Verum). Aus [75].

Als Referenz diente CF660C-OVA in Lösung, entsprechend ohne DiR (Abbildung 10).

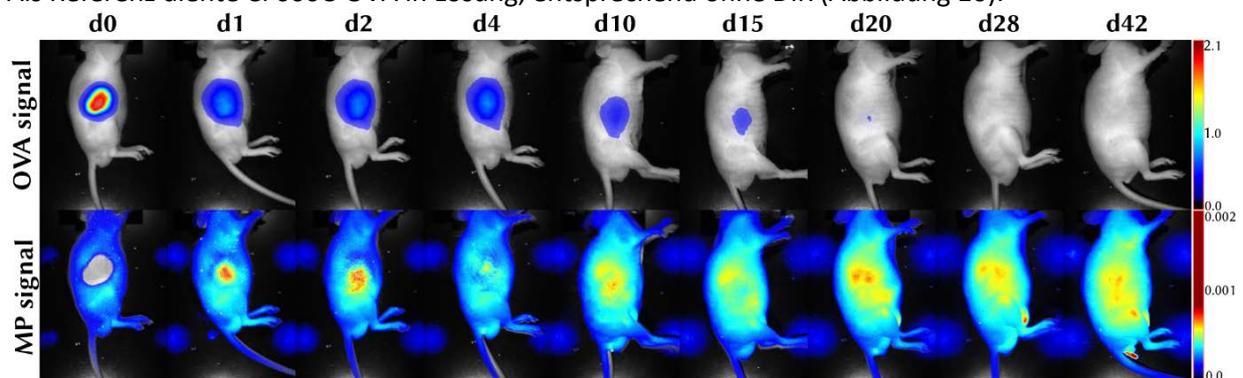


Abbildung 10: Fluoreszenzbildgebung des verwendeten Moleküls CF660C-OVA zur Proteinvisualisierung über den Beobachtungszeitraum von 42 Tagen. Dargestellt: Maus M3 (OVA in Lösung). Aus [75]. Es wurden keine MP verabreicht, daher sind die resultierenden DiR-Signale annähernd null. Die verbleibende, falsch-positiv zugeordnete (Auto)Fluoreszenz ist messtechnisch bedingt.

Anhand der R-DOTAP Verum Gruppe konnte ein Retentionseffekt des Modellantigens OVA festgestellt werden. Die Halbwertszeit des CF660C-OVA-Fluoreszenzsignals wurde annähernd um den Faktor zwei erhöht (Abbildung 11). Der schlechtere Korrelationsparameter R der Regressionskurve für die R-DOTAP Verum Gruppe lässt sich damit erklären, dass die Plateauphase bis Tag 10 nicht angemessen durch die aufgeführte Funktion beschrieben wird.

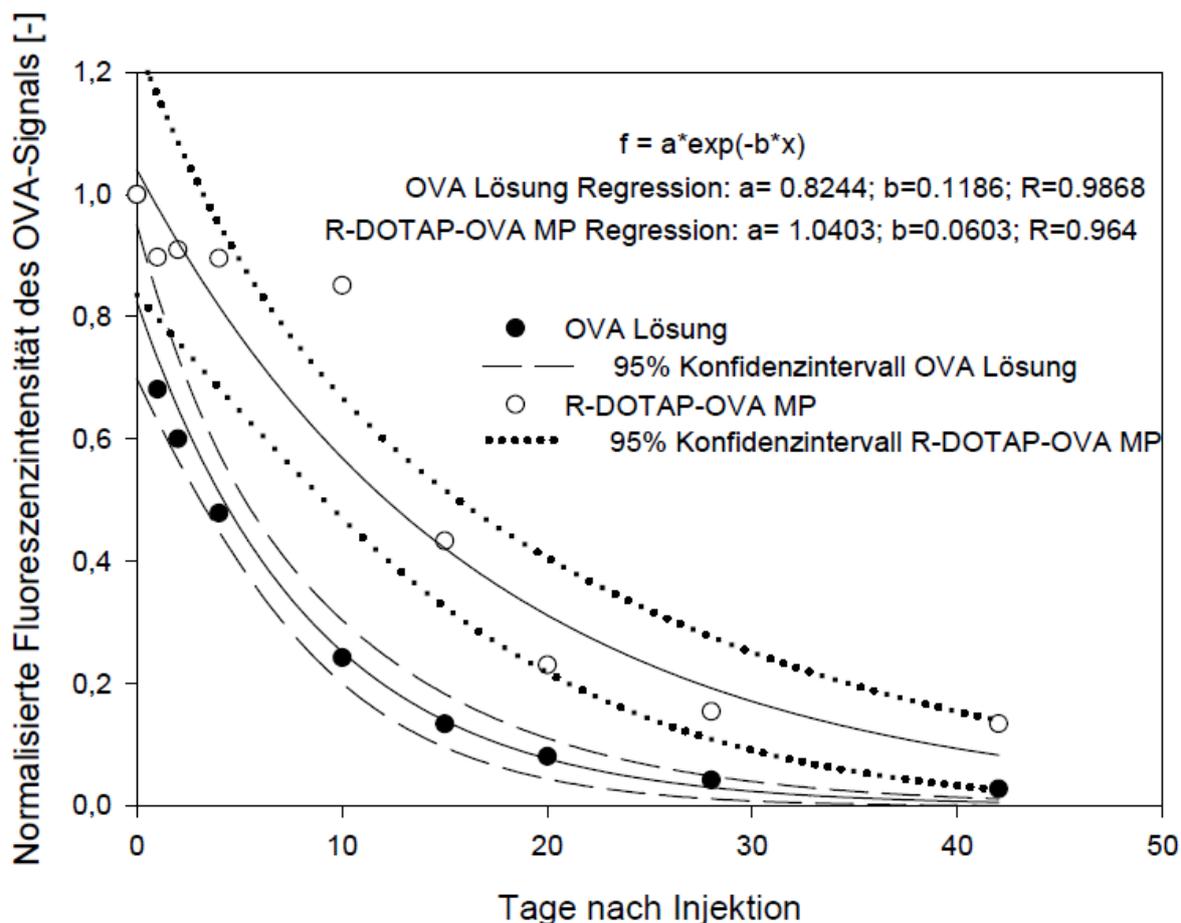


Abbildung 11: Normalisierte Fluoreszenzkinetiken der OVA-Signale (Durchschnittswerte von  $n=8$  je Gruppe) der Gruppen OVA in Lösung (schwarze Kreise) und R-DOTAP OVA MP (weiße Kreise) und die abgeleiteten Regressionsfunktionen. Modifiziert nach [75].

Aufgrund höherer Partikelkonzentrationen in den DOSS und PVA Verum MP Gruppen (aufgrund der niedrigeren Beladung und der Dosis-Normierung auf verabreichtes Antigen) und entsprechend größerer DiR-Mengen im System konnte dieser Effekt nicht zweifelsfrei auf diese Gruppen übertragen werden. Interessanterweise wurde im Verlauf der Studie anhand der Placebogruppen (unabhängig von der initial vorhandenen Partikelladung) ein zunehmendes Signal im Proteinfilter des Bildgebungs-Gerätes gemessen, obwohl in diesen Gruppen mangels markierten Proteins nur Signalrauschen messbar sein dürfte. Die Vermutung lag nahe, dass der verwendete Partikelmarker DiR in kürzere Wellenlängenbereiche abstrahlt. Durch die höhere Menge an DiR aufgrund der höheren Partikelkonzentration in den DOSS- und PVA-MP Gruppen konnte das eigentliche Proteinsignal nicht zweifelsfrei ausgewertet werden. Daher wurde für diese Gruppen auf eine detaillierte Auswertung der Halbwertszeiten verzichtet.

Wie unter anderem von de Temmerman und Hafner zusammengefasst [1;28], können Polymerpartikel adjuvante Wirkung durch effektive Retention des Antigens ausüben, siehe dazu auch Abbildung 2. Zumindest für die R-DOTAP Verum MP Gruppe konnte dies auch für das vorliegende System gezeigt werden.

Da das gewählte Studienprotokoll die gleichzeitige Entnahme von immunologischen Proben an den Bildgebungs-Zeitpunkten erlaubte, wurden humorale und zelluläre Immunantworten untersucht. Mit-

tels ELISA wurden Antikörper im Serum bestimmt und gegen die Kontrollgruppen unbehandelt/CF660C-OVA in Lösung bzw. die jeweilige Partikelplacebogruppe verglichen. Interessanterweise konnte das markierte OVA in Lösung keinerlei messbaren Antikörpertiter induzieren (Abbildung 12). Im Gegensatz dazu wurden in den Verum Gruppen der R-DOTAP & PVA MP teilweise statistisch signifikante Antikörpertiter im Vergleich zur Gruppe OVA in Lösung gemessen. Warum eine nennenswerte Immunreaktion auf die DOSS Verum MP ausblieb, konnte nicht abschließend beantwortet werden. Eine Folgestudie mit normierten Antigenbeladungen (das heißt, die geringste mögliche Beladung der drei Partikelspezies) würde eventuell weitere Einsichten bringen können, war jedoch nicht im Studienprotokoll vorgesehen.

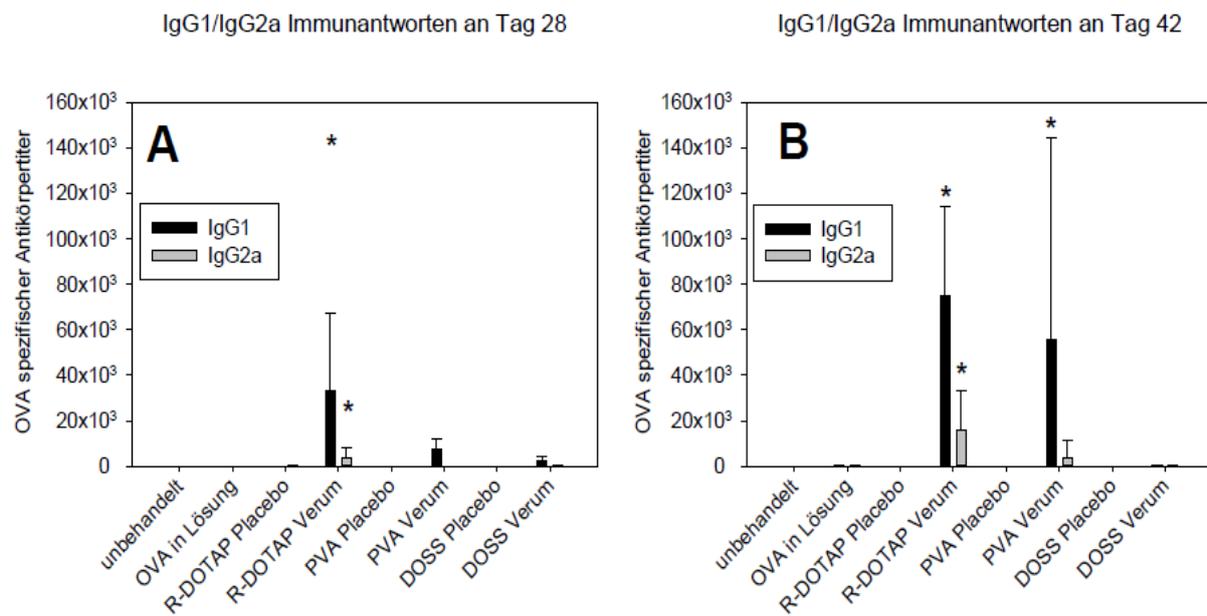


Abbildung 12: OVA- Antikörper Titer an den Tagen d28 (A) & d42 (B).

Daten dargestellt als Mittelwert + Standardabweichung.  $n=6$  (unbehandelt);  $n=8$  (OVA Lösung/ R-DOTAP Placebo/R-DOTAP Verum/DOSS Placebo/DOSS Verum);  $n=7$  (PVA Placebo/PVA Verum). Sternchen (\*) indiziert statistische Signifikanz ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe OVA in Lösung. Modifiziert nach [75]

Für die getesteten Partikelspezies wurden bei der Analyse der zellulären Immunantwort mittels ELISPOT weder signifikante Ergebnisse detektiert, noch waren Trends erkennbar. Die Fragestellung, ob die entwickelte Partikelplattform in der Lage ist, eine  $T_H1$ -dominierte Immunantwort hervorzurufen, muss nach dieser Orientierungsstudie vorläufig negativ beantwortet werden. Es gilt dabei jedoch zu bedenken, dass den Mäusen gemäß Protokoll nur eine Immunisierung verabreicht wurde. Weitere Optionen liegen in der Anwendung eines Immunisierungsschemas mit wiederholter Gabe der entwickelten Vakzine, welches bei Bedarf in oben angesprochene Folgestudie eingebaut werden und eine entsprechende zelluläre Antwort auslösen könnte.

Publikation IV beinhaltet die Untersuchung der in Publikation III notierten Beobachtung, dass das häufig genutzte NIR Label DiR im Laufe der *in-vivo* Studie zunehmend in Fluoreszenzfiltern für niedrigere Wellenlängen messbar wurde. Hiermit einhergehend muss eine Veränderung im fluorophoren System des DiR-Moleküls aufgetreten sein. Da in der Literatur beschrieben ist [87], dass während des Abbaus von PLGA Partikeln im Partikelinneren teilweise pH-Werte von bis zu pH=2 auftreten können, wurde ein säurekatalysierter Abbau des DiR-Moleküls postuliert. Um diese Annahme weiter zu untersuchen, wurde eine *in-vitro* Studie aufgesetzt, welche denselben Beobachtungszeitraum wie die *in-vivo* Studie umfasste (42 Tage, Inkubation bei 37°C). Mittels Messungen von Absorption (Abbildung 13) und Fluoreszenz konnten die Beobachtungen aus der *in-vivo* Studie verifiziert werden.

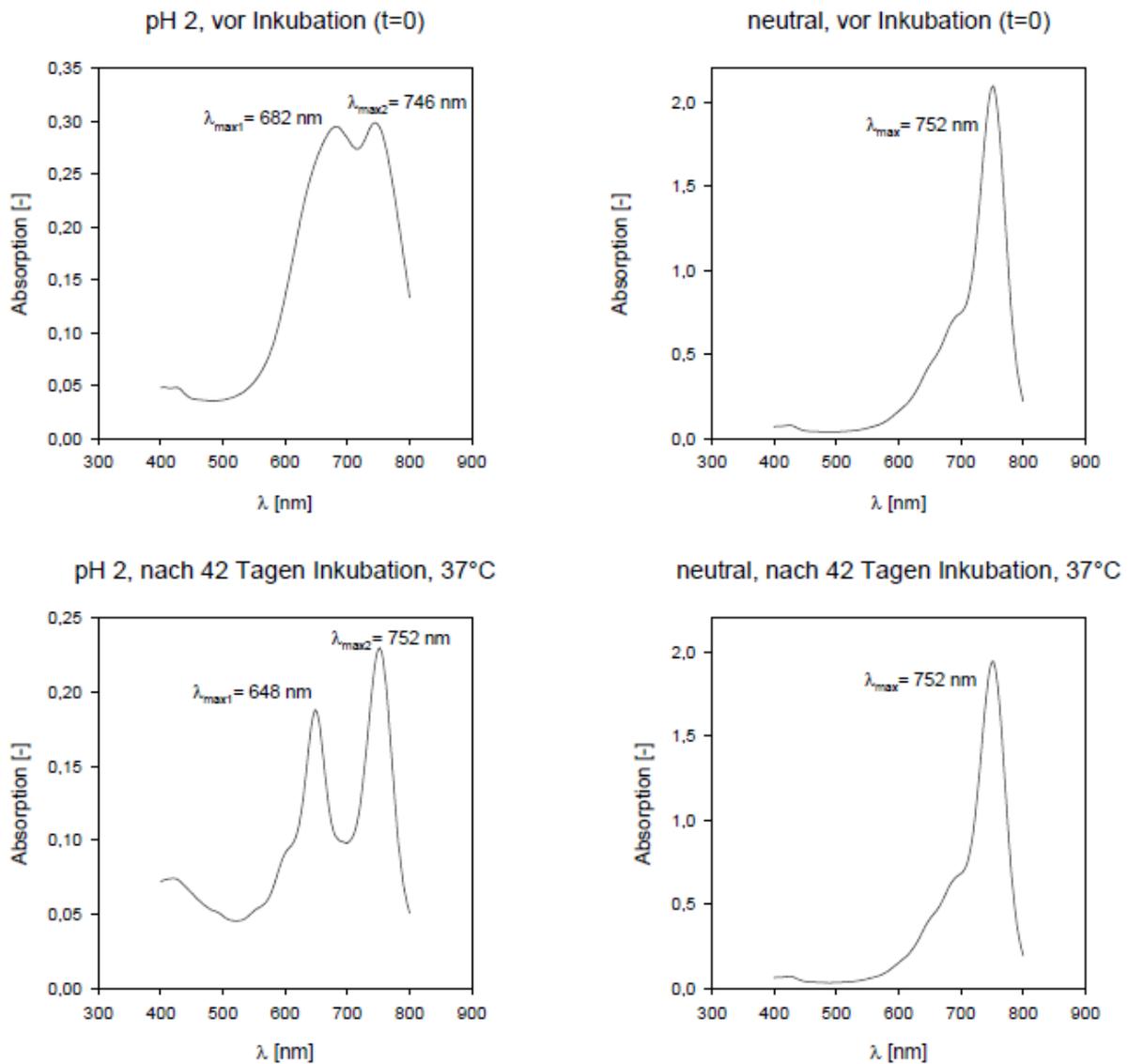


Abbildung 13: Absorptionsspektren von DiR in saurer (linke Spalte) sowie neutraler wässrig-ethanolischer Umgebung.

Auffällig für die Probe im sauren Milieu ist die starke Abschwächung der Absorption beim Wellenlängenmaximum von 752 nm schon vor der Inkubation (obere Zeile). Des Weiteren lässt sich für diese ein zweites Maximum bei  $\lambda = 682 \text{ nm}$  messen. Über 42 Tage (untere Zeile) bleibt die Absorptionskurve für die neutrale Probe praktisch unverändert, während für die saure Probe das zweite Maximum weiter in den blauen Wellenlängenbereich verschoben ist. Adaptiert nach [88].

Durch Massenspektrometrie (Abbildung 14) konnte tatsächlich ein Abbau des DiR Moleküls zu Entitäten mit kleinerer Molekülmasse beobachtet werden. Damit einhergehen sollte eine Verkleinerung des fluorophoren Systems, wenn man die relative Stabilität der C<sub>18</sub>-Seitenketten im DiR-Molekül bedenkt.

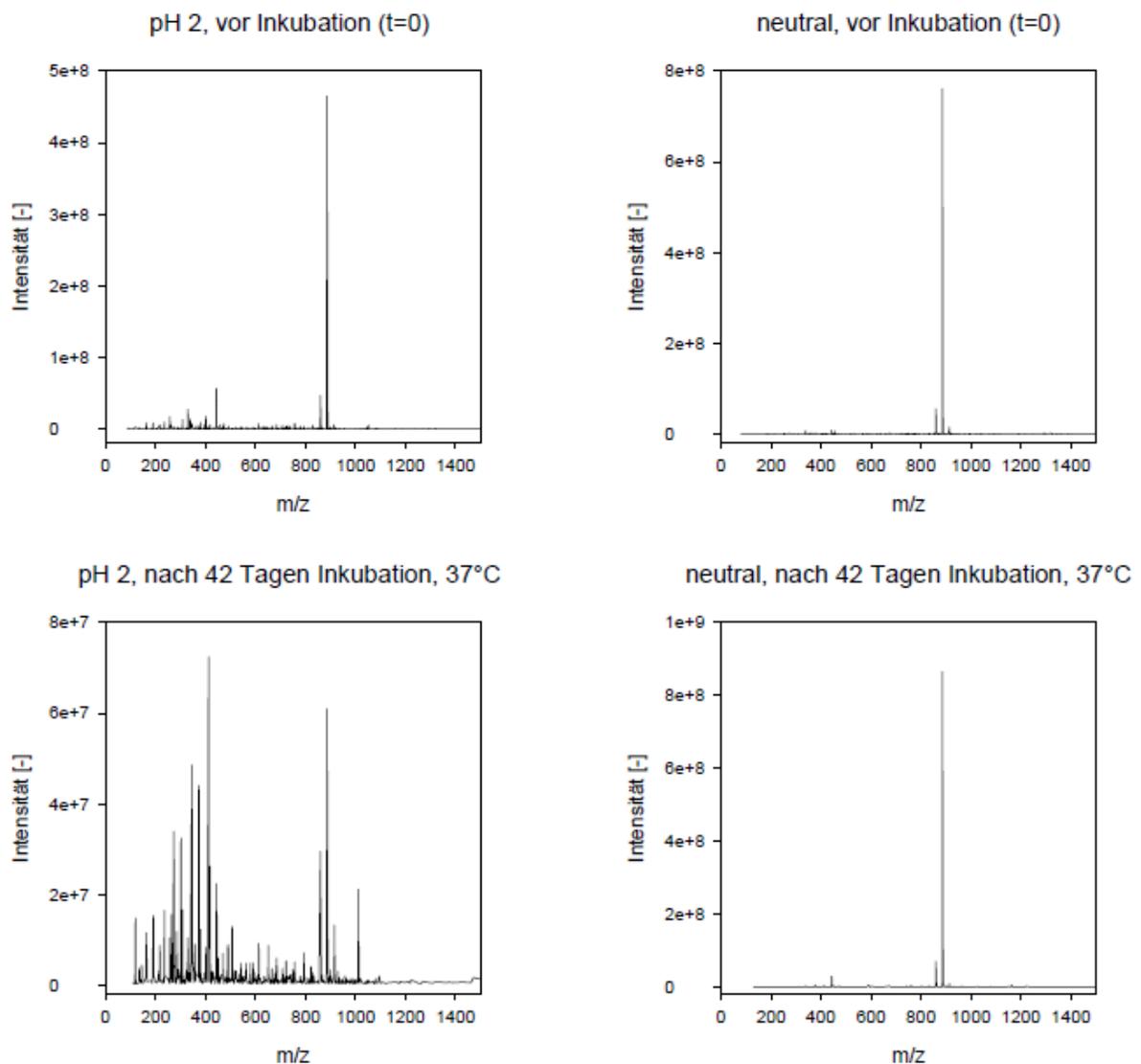


Abbildung 14: MS Daten der neutralen Referenzprobe sowie der Probe mit pH=2 in der Wasserphase. DiR ohne Gegenion verursacht den Peak bei m/z=886. A&B: Startanalytik bei t0. C&D: Analytik nach 42 Tagen, welches für die pH=2 Probe deutliche Fragmentierungen im Bereich von 200-450 m/z aufweist.

Eine Entität mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von  $m/z = 412$  erzeugte für die Probe  $\text{pH}=2$  nach 42 Tagen die größte Intensität während der MS-Messung. Ein Strukturvorschlag ist in Abbildung 15 gegeben und zeigt die Aufhebung des ehemals konjugierten Fluorophors des DiR Moleküls. Somit ist ein Erklärungsansatz für die Beobachtungen aus Publikation III gegeben.

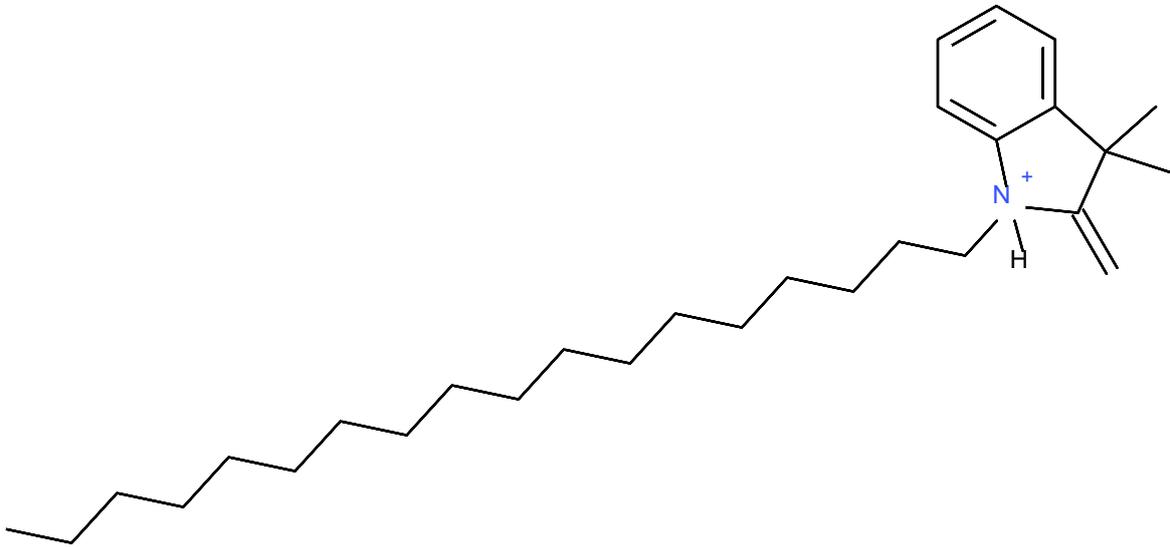


Abbildung 15: Strukturvorschlag für die Entität mit  $m/z = 412$  aus der  $\text{pH}=2$  Probe nach 42 Tagen. Molekülmasse = 412,7 Da; exakte Masse = 412,394 Da; Formel:  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{N}$ .

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

Für die Entwicklung eines potentiellen Adjuvans zur Anwendung am Menschen ist es unabdingbar, eine möglichst gleichbleibende pharmazeutische Qualität sicherzustellen und durch angemessene Kontrollen zu prüfen. Neben sorgfältig ausgewählten physiko-chemischen Parametern wie zum Beispiel Partikelgröße/-größenverteilung, Zeta-Potential oder der verbleibenden Stabilisatormenge im System ist es von Bedeutung, das System auch ohne Antigen zu charakterisieren, um später potentielle Immuneffekte möglichst sauber trennen zu können.

Die hier entwickelte MP-Plattform auf PLGA-Basis wurde sowohl physiko-chemisch als auch in-vitro umfassend untersucht, bevor in einer in-vivo Studie eine mögliche Immunantwort auf das Modellantigen OVA untersucht wurde.

Im Folgenden sollen die wichtigsten Ergebnisse der für die Dissertation relevanten Publikationen zusammengefasst werden.

1. In Publikation I wurde eine neuartige instrumentelle analytische Methode präsentiert, welche es mittels HPLC-UV-ELSD erlaubt, die verwendeten Bestandteile der geladenen MP schnell und sensitiv zu analysieren. PLGA sowie die verwendeten niedermolekularen Stabilisatoren DOSS und *R*-DOTAP können damit bei Bedarf in einem HPLC-Lauf analysiert werden; hierbei ist keine langwierige und potentiell fehleranfällige Probenvorbereitung notwendig.  
Als praktische Anwendung wurde das verwendete Protokoll der Partikelwaschung untersucht und die Stabilisatormengen sowohl in den Waschfluiden, als auch im gewaschenen und getrockneten Partikel untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass der hydrophile Stabilisator DOSS den Erwartungen folgend in dem Maße ausgewaschen wird, in welchem frisches Wasser als Waschmedium hinzugegeben wird. Für den lipophilen Stabilisator *R*-DOTAP hingegen wurde eine Abweichung von den rechnerisch ermittelten Kinetiken festgestellt. Messbare Konzentrationen auch nach dem zweiten Verdünnungsschritt (rechnerisch ist die erwartete Konzentration kleiner als das LOD) deuteten auf eine verlängerte *R*-DOTAP Freisetzung aus den Partikeln heraus hin. Eine Analyse der gewaschenen und getrockneten Partikel lässt vermuten, dass *R*-DOTAP teilweise auch in den Partikeln verkapselt vorliegt und sich nicht nur in die Grenzfläche einbaut. Das Verhältnis von *R*-DOTAP Masse zur Masse des gesamten Partikels (= *R*-DOTAP+ PLGA) kann mit 10% approximiert werden. Diese Art der physiko-chemischen Analyse kann gerade bei Verwendung von potentiell intrinsisch adjuvanten Hilfsstoffen wie *R*-DOTAP relevante Informationen liefern. Dennoch sind in der Literatur nur wenig systematische Untersuchungen dieser Art, eventuell aufgrund mangels schneller instrumenteller Methoden, vorhanden.  
Weiterhin würde es die Methode prinzipiell erlauben, auch weitere Moleküle (sowohl mit, als auch ohne Chromophor) zu analysieren, was eine weitere Verwendung für die Analyse von PLGA Partikeln, welche diese Moleküle entweder verkapselt oder adsorbiert tragen, denkbar macht. Beispielfhaft seien hier niedermolekulare Immunstimulatoren wie Imiquimod oder Resiquimod genannt.
2. Publikation II zeigte die Möglichkeit, mit verschiedenen Stabilisatoren PLGA MP zu modifizieren und gezielt Oberflächenladungen einzubringen. Dazu wurden die Stabilisatoren *R*-DOTAP (zeta-potential positive MP), PVA (neutrale MP) and DOSS (negative MP) verwendet. Um die Partikel später untereinander vergleichen zu können, wurden die Herstellungsmethoden entsprechend adaptiert, um einen Partikelgrößenmedian von 2,2 – 2,5 µm zu erhalten.

Um mögliche Effekte bei späterer Verwendung eines Antigens vorzugsweise auftrennen zu können, wurden die Partikel unbeladen mehreren *in-vitro* Assays unterworfen: Die Toxizität auf unreife dendritische Zellen wurde mit gut verträglich (*R*-DOTAP und PVA MP) bis akzeptabel (DOSS MP) bewertet. Für die wasserlöslichen Stabilisatoren PVA und DOSS wurde in Form von verschiedenen konzentrierten Lösungen Profile erstellt, welche belegten, dass das negativ geladene DOSS erwartungsgemäß ein deutlich höheres Irritationspotential als das neutrale PVA besitzt. Spuren von DOSS an den MP, welche unter dem Quantifizierungslimit der verwendeten HPLC-Methode liegen, könnten hier bereits für die Unterschiede in den Toxizitäten verantwortlich sein.

Alle Partikelspezies wurden von den unreifen dendritischen Zellen aufgenommen.

In den folgenden Maturierungsexperimenten wurde keine Aktivierung der eingesetzten unreifen dendritischen Zellen durch die getesteten MP festgestellt. Die Validität des verwendeten Assays wurde mit Lipopolysaccharid als Positivkontrolle gezeigt. Zumindest für die *R*-DOTAP MP war dieses Ergebnis überraschend, da in der Literatur mehrfach beschrieben wurde [52-54], dass dieses kationische Lipid mit und ohne Antigen dendritische Zellen aktivieren kann. Dabei sollte man jedoch bedenken, dass der Fokus dieser Studien auf der Applikation von *R*-DOTAP in lipoplexaler oder liposomaler Form lag. Wie in Publikation I gezeigt, liegt *R*-DOTAP zumindest teilweise verkapselt vor und steht somit für die Immunzellen nicht direkt zur Verfügung. Des Weiteren wäre auch denkbar, dass selbst nicht verkapseltes, d.h. oberflächenassoziiertes *R*-DOTAP nicht mit den Immunzellen interagieren kann, da es mit den lipophilen Ölsäure-Resten fest in der PLGA-Matrix verankert sein könnte.

Auch wenn der genaue Grund für die fehlende Aktivierung der unreifen dendritischen Zellen nicht bestimmt werden konnte (eine Erhöhung des *R*-DOTAP Gehalts während der Partikelherstellung war nicht zielführend), so lieferte diese Studie doch wertvolle Einsichten über die Interaktionen der MP-Plattform mit professionellen, antigen-präsentierenden Zellen. Für die Entwicklung einer Vakzine, welche zur vollen Wirksamkeit eine  $T_H1$  gesteuerte Immunantwort benötigt, sollte die Inklusion von potenten Immunstimulatoren via Verkapselung/Adsorption in Betracht gezogen werden.

3. Das *in-vivo* Verhalten der entwickelten MP Plattform war Untersuchungsgegenstand der dritten Publikation. Es wurde die grundlegende Möglichkeit präsentiert, eine gekoppelte Bildgebungs-/Immunologiestudie durchzuführen, was getrennte Studien überflüssig macht und daher auch die Zahl der benötigten Individuen reduziert. Die verwendeten Fluoreszenzlabel beeinträchtigten nicht die geplante Analyse der Immunantworten, da hohe und konsistente Antikörpertiter gegen OVA für zwei der drei Behandlungsgruppen gemessen wurden (*R*-DOTAP Verum MP & PVA Verum MP). Für DOSS Verum MP war dies nicht der Fall. Bei der Analyse wurde festgestellt, dass die humorale ( $T_H2$ -) Immunantwort dominierend war, da Antikörper der IgG1 Subklasse dominierend waren. Kongruent mit den Ergebnissen aus Publikation II konnten für zelluläre Immunantworten nur inkonsistente und schwache Reaktionen nachgewiesen werden.

Um zu klären, ob sich die erhaltene Immunreaktion mit einem variierten Dosierungsschema (eventuell „Prime-Boost“-Immunisierungen [89]) oder mit Ersatz von DiR durch ein niedermolekulares Immunstimulans zu einer balancierteren  $T_H1/T_H2$  Antwort verändern ließe, müsste eine Folgestudie durchgeführt werden.

Letztlich lässt sich festhalten, dass sich die entwickelte MP Plattform durch eine sehr gute Biokompatibilität auszeichnet und bereits in diesem Stadium als Adjuvans für Vakzine dienen könnte, welche starke humorale Immunantworten fordern.

Das verwendete Fluoreszenz-System auf Basis zweier Farbstoffe erlaubte die Nachverfolgung von sowohl dem Proteinantigen OVA als auch der MP nach s.c. Applikation. Mit diesem Ansatz

konnte eine verlängerte Verweilzeit für OVA an der Applikationsstelle für die Behandlungsgruppe R-DOTAP Verum MP festgestellt werden. Markiertes OVA in Lösung diente entsprechend als Vergleichsgruppe. Interessanterweise wurde auch für die proteinfreien Placebopartikel ein Anstieg im Proteinsignal um den Tag 20 nach Applikation beobachtet. Die Vermutung lag nahe, dass nach Applikation das verwendete Partikellabel DiR molekularen Veränderungen unterliegt. Eine separate *in-vitro* Studie wurde durchgeführt, um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen.

4. Publikation IV untersuchte somit tiefergehend die in Publikation III beobachtete spektrale Verschiebung des Fluoreszenzmarkers DiR. Nach Inkubation über 42 Tage stellte sich heraus, dass bei saurem pH ein Abbau des DiR-Moleküls stattfindet, was über MS und Fluoreszenz-Spektren gezeigt werden konnte. Da ein Abbau vor allem im fluorophoren Teil des DiR-Moleküls wahrscheinlich ist und damit das konjugierte  $\pi$ -Elektronen-System kleiner wird, ist hiermit ein Erklärungsansatz für die Beobachtungen aus der *in-vivo* Studie aus Publikation III gegeben.

Abschließend lässt sich sagen, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine in Bezug auf das zu verwendende Antigen modulare Mikropartikel-Plattform für die Verwendung als Adjuvans entwickelt und charakterisiert wurde. Durch eine annähernd identische Partikelgrößenverteilung entfällt für MP-aufnehmende Zellen (APC) ein differenzierender Faktor, was eine mögliche Unterscheidung nach den Oberflächenladungen erlauben könnte. Um verschiedenste Antigene effektiv an der Partikeloberfläche zu binden, sind alle drei möglichen Ladungszustände realisierbar. Die Untersuchung in einem relevanten Testsystem *in-vitro* zeigte gute bis akzeptable Toleranzen von unreifen dendritischen Zellen auf die unbeladenen Partikel. Nach erfolgter Aufnahme der Partikel erfolgte keine Aktivierung von unreifen dendritischen Zellen, was bei der Entwicklung einer Vakzine zur Aktivierung der zellulären Immunantwort bedacht werden sollte. Eine *in-vivo* Studie in Mäusen brachte den Nachweis, dass mit den verwendeten MP nicht nur die Halbwertszeiten des verwendeten Antigens OVA verlängert werden konnten (für R-DOTAP Verum MP), sondern auch starke und konstante Antikörpertiter gegen OVA induziert wurden (für R-DOTAP Verum sowie PVA Verum MP). Technische Limitationen verhinderten den genauen Nachweis der Verlängerung der Halbwertszeiten für PVA & DOSS Verum MP, diese können jedoch aufgrund des gleichen Antigen-Beladungsmechanismus angenommen werden.

Als Ausblick sind nachfolgend beispielhaft drei Ansätze aufgeführt, welche als Ausgangspunkt für eine Weiterführung dieser Arbeit dienen könnten.

Um die bereits im Mausmodell erzielte, vorrangig humoral ( $T_H2$ -) geprägte Immunantwort um Effekte auf zellulär vermittelter Ebene zu erweitern, könnten potente Immunmodulatoren anstelle des verwendeten Fluoreszenzmarkers DiR in die PLGA MP eingearbeitet werden. Erfolgreiche Stimulanzen einer zellvermittelten Immunantwort wurden bereits von anderen Gruppen beschrieben, teilweise auch in Verbindung mit PLGA-Partikeln. Hier ist vor allem CpG-ODN zu nennen, mit welchen beispielsweise Wang *et al.* [6] eine stärkere zelluläre ( $T_H1$ -beeinflusste) Immunantwort im Vergleich zu den Kontrollgruppen OVA+ PLGA-Mikropartikel sowie OVA+ CpG-ODN zeigen konnten. Das in Humanvakzinen zugelassene Adjuvans Alum wurde in dieser Studie als Referenz mitgetestet. Dieses erwies sich bezüglich IgG1-Antwort als ebenbürtig zu den OVA/CpG-ODN/MP, rief jedoch in Bezug auf IgG2b sowie IFN- $\gamma$  Sezernierung von entnommenen Milzzellen signifikant geringere Immunantworten hervor. Eine vollständige Übertragbarkeit der Ergebnisse der Studie von Wang *et al.* auf die hier vorgestellten Resultate kann nicht angenommen werden, da das verwendete Protokoll in der Wang *et al.* Studie eine OVA Dosis von 40  $\mu$ g pro Tier sowie eine andere Mausart vorgab. Allerdings wurde hier ein gangbarer Weg aufgezeigt, eine „unbalancierte“ Immunantwort mittels in die PLGA-Matrix eingearbeiteter Agenzien in Richtung eines Gleichgewichtes aus  $T_H1/T_H2$ -Antwort zu verschieben. Neben dem erwähnten

CpG-ODN sind an dieser Stelle weitere Toll-like-Rezeptor Aktivatoren wie Poly-I:C [28;28], zyklisches diGMP [90-92] oder Imiquimod und Resiquimod denkbar. Ein besonderer Weg wurde von Wischke *et al.* aufgezeigt: hier wurde das hydrophile Makromolekül Poly-I:C nicht in die hydrophobe PLGA-Matrix verkapselt, sondern positive, Aminodextran-modifizierte PLGA Partikel mit Poly-I:C „dekoriert“, also per Adsorption auf die Oberfläche der MP geladen [82]. Parallelen zu dem in dieser Arbeit verwendeten Antigen-Adsorptions-Prozedere sind evident. Wie in [82] gezeigt, konnten die derart modifizierten PLGA-Partikel *in-vitro* unreife humane dendritische Zellen auch ohne Antigen reifen lassen. Abschließend soll noch die Klasse der nicht zu den TLR-Aktivatoren zugehörigen PAMPs angesprochen werden: so sind z.B. in letzter Zeit Stimulatoren des RIG-I Signalweges in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses getreten. Sie weisen jedoch noch nicht den Entwicklungsstatus der hier angesprochenen TLR-Moleküle auf [93], welche sich teilweise schon in klinischer Prüfung am Menschen befinden [62]. Bei allen Kombinationsmöglichkeiten gilt es, möglicherweise synergistische, hier jedoch unerwünschte Effekte bezüglich Toxizität oder dem Auslösen von Autoimmunreaktionen zu bedenken.

Ein zweiter denkbarer Ansatz zur Weiterführung dieser Arbeit liegt darin, die hier entwickelte MP-Plattform für die Fluoreszenzbildgebung mit zwei Farbstoffen zu optimieren. Wie beobachtet wurde, überstrahlt der Partikelfarbstoff DiR unter Umständen das Proteinsignal des CF660C-OVA. Hier wäre eine Titration zu niedrigeren DiR-Gehalten pro MP sinnvoll, deren grundsätzliche Machbarkeit *in-vitro* gezeigt werden sollte, bevor eine bestätigende Studie *in-vivo* stattfindet. In dieser Studie könnte man auch simultan den Gehalt an Modellantigen OVA normalisieren (auf die niedrigste Beladung, d.h. 0,5 % m/m) mit dem Ziel, eine vergleichende Verweilzeitbestimmung für alle antigenbeladenen Partikel vorzunehmen.

Mit diesen Voraussetzungen wäre eine nachgeschaltete, weitere *in-vivo* Studie gerechtfertigt, welche die Hervorrufung einer kombinierten zellulären und humoralen Immunantwort (weiterhin auf das Modellantigen OVA) untersucht. In dieser Studie könnten gleichzeitig weit verbreitete Aluminium-basierte Adjuvantien als Kontrolle dienen. „Prime & boost“ Applikationsprotokolle wären eine Möglichkeit, eine stärkere zelluläre Immunantwort hervorzurufen [89]. Mit dieser Motivation sollten auch die bislang eher schwächer abschneidenden DOSS MP mitgetestet werden, um hier nicht die möglicherweise für andere Antigene hilfreichen negativ geladenen Partikel verfrüht auszuschließen.

Abschließend wäre im Falle einer potenten Immunantwort der Wechsel vom Modellantigen OVA auf ein krankheitsbezogenes Antigen denkbar. Hier gilt es, Indikationen aus der klassischen Infektiologie als auch die relativ neuen Ansätze der Krebsimmuntherapie zu bedenken, um eingangs beschriebener Vielfalt an zu behandelnden Krankheiten gerecht zu werden.

## 5. Literaturverzeichnis

- [1] De Temmerman ML, Rejman J, Demeester J, Irvine DJ, Gander B, De Smedt SC. Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discovery Today* 2011 Jul;16(13–14):569-82.
- [2] Smith JD, Morton LD, Ulery BD. Nanoparticles as synthetic vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* 2015;34:217-24.
- [3] Bramwell VW, Perrie Y. The rational design of vaccines. *Drug Discovery Today* 2005;10(22):1527-34.
- [4] Schijns VE, Lavelle EC. Trends in vaccine adjuvants. *Expert Review of Vaccines* 2011 Apr 1;10(4):539-50.
- [5] Spearman P, Lally MA, Elizaga M, Montefiori D, Tomaras GD, McElrath MJ, et al. A Trimeric, V2-Deleted HIV-1 Envelope Glycoprotein Vaccine Elicits Potent Neutralizing Antibodies but Limited Breadth of Neutralization in Human Volunteers. *The Journal of Infectious Diseases* 2011 Apr 15;203(8):1165-73.
- [6] Wang Q, Tan MT, Keegan BP, Barry MA, Heffernan MJ. Time course study of the antigen-specific immune response to a PLGA microparticle vaccine formulation. *Biomaterials* 2014 Sep;35(29):8385-93.
- [7] Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 2015 Apr 3;348(6230):69.
- [8] Cohen J. High Hopes and Dilemmas for a Cervical Cancer Vaccine. *Science* 2005 Apr 29;308(5722):618.
- [9] Smith C, Khanna R. The Development of Prophylactic and Therapeutic EBV Vaccines. In: Münz C, editor. *Epstein Barr Virus Volume 2: One Herpes Virus: Many Diseases*. Cham, Springer International Publishing, 2015: p. 455-73.
- [10] Wu TT, Qian J, Ang J, Sun R. Vaccine prospect of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Current Opinion in Virology* 2012;2(4):482-8.
- [11] Naderi M, Gholipour N, Zolfaghari MR, Moradi Binabaj M, Yegane Moghadam A, Motalleb G. Hepatitis C Virus and Vaccine Development. *Int J Mol Cell Med* 2014 May 23;3(4):207-15.
- [12] Yoshimitsu M, White Y, Arima N. Prevention of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. In: Chang MH, Jeang KT, editors. *Viruses and Human Cancer: From Basic Science to Clinical Prevention*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2014: p. 211-25.
- [13] Cheever MA, Higano CS. PROVENGE (Sipuleucel-T) in Prostate Cancer: The First FDA-Approved Therapeutic Cancer Vaccine. *Clin Cancer Res* 2011 Jun 1;17(11):3520.
- [14] Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2010 Jul 23;363(5):411-22.

- [15] Higano CS, Schellhammer PF, Small EJ, Burch PA, Nemunaitis J, Yuh L, et al. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* 2009 Aug 15;115(16):3670-9.
- [16] EMA/303072/2015, EMEA/H/C002513, Provenge- Withdrawal of the marketing authorisation in the European Union, (2015).
- [17] Strauss J, Madan RA. Therapeutic vaccines for prostate cancer: recent advances and future directions. *Expert Review of Vaccines* 2016 Jul 2;15(7):907-14.
- [18] Salazar AM, Erlich RB, Mark A, Bhardwaj N, Herberman RB. Therapeutic In Situ Autovaccination against Solid Cancers with Intratumoral Poly-ICLC: Case Report, Hypothesis, and Clinical Trial. *Cancer Immunol Res* 2014 Aug 1;2(8):720.
- [19] Zhu X, Fallert-Junecko BA, Fujita M, Ueda R, Kohanbash G, Kastenhuber ER, et al. Poly-ICLC promotes the infiltration of effector T cells into intracranial gliomas via induction of CXCL10 in IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  dependent manners. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2010;59(9):1401-9.
- [20] Rosenfeld MR, Chamberlain MC, Grossman SA, Peereboom DM, Lesser GJ, Batchelor TT, et al. A multi-institution phase II study of poly-ICLC and radiotherapy with concurrent and adjuvant temozolomide in adults with newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol* 2010 Oct 1;12(10):1071-7.
- [21] Salazar AM, Hilton BL, Steven O, Meir K, Barbara S, Douglas B, et al. Long-term Treatment of Malignant Gliomas with Intramuscularly Administered Polyinosinic-Polycytidylic Acid Stabilized with Polylysine and Carboxymethylcellulose: An Open Pilot Study. *Neurosurgery* 1996 Jun 1;38(6):1096-104.
- [22] Butowski N, Chang SM, Junck L, DeAngelis LM, Abrey L, Fink K, et al. A phase II clinical trial of poly-ICLC with radiation for adult patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma: a North American Brain Tumor Consortium (NABTC01-05). *Journal of Neuro-Oncology* 2008;91(2):175.
- [23] Podrazil M, Horvath R, Becht E, Rozkova D, Bilkova P, Sochorova K, et al. Phase I/II clinical trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget* 2015 Jul 20;6(20):18192-205.
- [24] DiPaola RS, Plante M, Kaufman H, Petrylak DP, Israeli R, Lattime E, et al. A Phase I Trial of Pox PSA vaccines (PROSTVAC-VF) with B7-1, ICAM-1, and LFA-3 co-stimulatory molecules (TRICOM) in Patients with Prostate Cancer. *Journal of Translational Medicine* 2006;4(1):1.
- [25] Levy B, Panicalli D, Marshall J. TRICOM: enhanced vaccines as anticancer therapy. *Expert Review of Vaccines* 2004 Aug 1;3(4):397-402.
- [26] Christensen D, Korsholm KS, Rosenkrands I, Lindenstrom T, Andersen P, Agger EM. Cationic liposomes as vaccine adjuvants. *Expert Review of Vaccines* 2007 Oct 1;6(5):785-96.

- [27] Soema PC, Willems GJ, Jiskoot W, Amorij JP, Kersten GF. Predicting the influence of liposomal lipid composition on liposome size, zeta potential and liposome-induced dendritic cell maturation using a design of experiments approach. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2015 Aug;94:427-35.
- [28] Hafner AM, Cortesy B, Merkle HP. Particulate formulations for the delivery of poly(I:C) as vaccine adjuvant. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2013 Oct 15;65(10):1386-99.
- [29] Benne N, van Duijn J, Kuiper J, Jiskoot W, Sluetter B. Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *Journal of Controlled Release* 2016;234:124-34.
- [30] Wee JLK, Scheerlinck J-PY, Snibson KJ, Edwards S, Pearse M, Quinn C, et al. Pulmonary delivery of ISCOMATRIX influenza vaccine induces both systemic and mucosal immunity with antigen dose sparing. *Mucosal Immunology* 2008 Sep 24;1:489.
- [31] Dubensky Jr TW, Reed SG. Adjuvants for cancer vaccines. *Seminars in Immunology* 2010 Jun;22(3):155-61.
- [32] Kieny MP, Costa A, Hombach J, Carrasco P, Pervikov Y, Salisbury D, et al. A global pandemic influenza vaccine action plan. *Vaccine* 2006;24(40):6367-70.
- [33] Friede M, Palkonyay L, Alfonso C, Pervikov Y, Torelli G, Wood D, et al. WHO initiative to increase global and equitable access to influenza vaccine in the event of a pandemic: Supporting developing country production capacity through technology transfer. *Vaccine* 2011;29:A2-A7.
- [34] Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology* 2009 Jan;30(1):23-32.
- [35] Correia-Pinto JF, Csaba N, Alonso MJ. Vaccine delivery carriers: Insights and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics* 2013 Jan 2;440(1):27-38.
- [36] Brito LA, O'Hagan DT. Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants. *Journal of Controlled Release* 2014 Sep 28;190:563-79.
- [37] Chen W, Yan W, Huang L. A simple but effective cancer vaccine consisting of an antigen and a cationic lipid. *Cancer Immunol Immunother* 2008 Apr;57(4):517-30.
- [38] Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 2004 Sep 28;82(5):488-96.
- [39] Schlosser E, Mueller M, Fischer S, Basta S, Busch DH, Gander B, et al. TLR ligands and antigen need to be coencapsulated into the same biodegradable microsphere for the generation of potent cytotoxic T lymphocyte responses. *Vaccine* 2008;26(13):1626-37.
- [40] Lee M, Park CS, Lee YR, Im SA, Song S, Lee CK. Resiquimod, a TLR7/8 agonist, promotes differentiation of myeloid-derived suppressor cells into macrophages and dendritic cells. *Archives of Pharmacal Research* 2014;37(9):1234-40.

- [41] Gibson SJ, Lindh JM, Riter TR, Gleason RM, Rogers LM, Fuller AE, et al. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cellular Immunology* 2002;218(1):74-86.
- [42] Duong AD, Sharma S, Peine KJ, Gupta G, Satoskar AR, Bachelder EM, et al. Electrospray Encapsulation of Toll-Like Receptor Agonist Resiquimod in Polymer Microparticles for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Mol Pharmaceutics* 2013 Mar 4;10(3):1045-55.
- [43] Zhang W, Wang L, Yang T, Liu Y, Chen X, Liu Q, et al. Immunopotentiator-Loaded Polymeric Microparticles as Robust Adjuvant to Improve Vaccine Efficacy. *Pharmaceutical Research* 2015;32(9):2837-50.
- [44] Bachelder EM, Beaudette TT, Broaders KE, Fréchet MJM, Albrecht MT, Mateczun AJ, et al. In Vitro Analysis of Acetalated Dextran Microparticles as a Potent Delivery Platform for Vaccine Adjuvants. *Mol Pharmaceutics* 2010 Jun 7;7(3):826-35.
- [45] Clements CJ, Griffiths E. The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. *Vaccine* 2002;20:S24-S33.
- [46] Lindblad EB. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol* 2004 Oct;82(5):497-505.
- [47] Garcon N, Chomez P, Van Mechelen M. GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Review of Vaccines* 2007 Oct 1;6(5):723-39.
- [48] Bansal V, Kumar M, Dalela M, Brahmne HG, Singh H. Evaluation of synergistic effect of biodegradable polymeric nanoparticles and aluminum based adjuvant for improving vaccine efficacy. *International Journal of Pharmaceutics* 2014;471(1):377-84.
- [49] Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998;32(3):155-72.
- [50] Sharp FA, Lavelle EC. Discovery of Vaccine Adjuvants. *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia*. John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- [51] ALLISON AC, Gregoriadis G. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* 1974 Nov 15;252(5480):252.
- [52] Vasievich E, Chen W, Huang L. Enantiospecific adjuvant activity of cationic lipid DOTAP in cancer vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60(5):629-38.
- [53] Vangasseri DP, Cui Z, Chen W, Hokey DA, Falo LD, Huang L. Immunostimulation of dendritic cells by cationic liposomes. *Mol Membr Biol* 2006 Jan 1;23(5):385-95.
- [54] Vasievich EA, Ramishetti S, Zhang Y, Huang L. Trp2 Peptide Vaccine Adjuvanted with (R)-DOTAP Inhibits Tumor Growth in an Advanced Melanoma Model. *Mol Pharmaceutics* 2012 Feb 6;9(2):261-8.
- [55] Brito LA, Chan M, Shaw CA, Hekele A, Carsillo T, Schaefer M, et al. A Cationic Nanoemulsion for the Delivery of Next-generation RNA Vaccines. *Mol Ther* 2014 Dec;22(12):2118-29.

- [56] Ott G, Singh M, Kazzaz J, Briones M, Soenawan E, Ugozzoli M, et al. A cationic sub-micron emulsion (MF59/DOTAP) is an effective delivery system for DNA vaccines. *Journal of Controlled Release* 2002 Feb 19;79(1–3):1-5.
- [57] Gregoriadis G, Saffie R, de Souza JB. Liposome-mediated DNA vaccination. *FEBS Letters* 1997 Jan 27;402(2-3):107-10.
- [58] Gregoriadis G, Bacon A, Caparros-Wanderley W, McCormack B. A role for liposomes in genetic vaccination. *Vaccine* 2002;20:B1-B9.
- [59] Ma Y, Zhuang Y, Xie X, Wang C, Wang F, Zhou D, et al. The role of surface charge density in cationic liposome-promoted dendritic cell maturation and vaccine-induced immune responses. *Nanoscale* 2011;3(5):2307-14.
- [60] Ishii N, Fukushima J, Kaneko T, Okada E, Tani K, Tanaka S-I, et al. Cationic Liposomes Are a Strong Adjuvant for a DNA Vaccine of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1997 Nov 1;13(16):1421-8.
- [61] LLADSER M, MEDRANO C, ARANCIBIA A. The use of supports in the lyophilization of oil-in-water emulsions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2011 Apr 12;20(6):450-5.
- [62] Heit A, Busch DH, Wagner H, Schmitz F. Vaccine protocols for enhanced immunogenicity of exogenous antigens. *International Journal of Medical Microbiology* 2008;298(1):27-32.
- [63] Sharp FA, Ruane D, Claass B, Creagh E, Harris J, Malyala P, et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009 Jan 20;106(3):870.
- [64] Newman KD, Elamanchili P, Kwon GS, Samuel J. Uptake of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by antigen-presenting cells in vivo. *J Biomed Mater Res* 2002 Jun 5;60(3):480-6.
- [65] Anselmo AC, Mitragotri S. An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 2014;190(Supplement C):15-28.
- [66] Pacella E, Vestri AR, Muscella R, Carbotti MR, Castellucci M, Coi L, et al. Preliminary results of an intravitreal dexamethasone implant (Ozurdex) in patients with persistent diabetic macular edema. *Clin Ophthalmol* 2013 Jul 16;7:1423-8.
- [67] Kazzaz J, Neidleman J, Singh M, Ott G, O'Hagan DT. Novel anionic microparticles are a potent adjuvant for the induction of cytotoxic T lymphocytes against recombinant p55 gag from HIV-1. *Journal of Controlled Release* 2000 Jul 3;67(2–3):347-56.
- [68] Determan AS, Wilson JH, Kipper MJ, Wannemuehler MJ, Narasimhan B. Protein stability in the presence of polymer degradation products: Consequences for controlled release formulations. *Biomaterials* 2006;27(17):3312-20.
- [69] Buske J, König C, Bassarab S, Lamprecht A, Mühlau S, Wagner KG. Influence of PEG in PEG-PLGA microspheres on particle properties and protein release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012;81(1):57-63.

- [70] Mäder K, Bittner B, Li Y, Wohlauf W, Kissel T. Monitoring Microviscosity and Microacidity of the Albumin Microenvironment Inside Degrading Microparticles from Poly(lactide-co-glycolide) (PLG) or ABA-triblock Polymers Containing Hydrophobic Poly(lactide-co-glycolide) A Blocks and Hydrophilic Poly(ethyleneoxide) B Blocks. *Pharm Res* 1998;15(5):787-93.
- [71] O'Hagan DT, Singh M, Ulmer JB. Microparticles for the delivery of DNA vaccines. *Immunological Reviews* 2004 Jun 1;199(1):191-200.
- [72] O'Hagan DT, Singh M, Dong C, Ugozzoli M, Berger K, Glazer E, et al. Cationic microparticles are a potent delivery system for a HCV DNA vaccine. *Vaccine* 2004 Dec 16;23(5):672-80.
- [73] Singh M, Kazzaz J, Chesko J, Soenawan E, Ugozzoli M, Giuliani M, et al. Anionic microparticles are a potent delivery system for recombinant antigens from *Neisseria meningitidis* serotype B. *J Pharm Sci* 2004 Feb 1;93(2):273-82.
- [74] Fahr A, Scherphof GL. *Voigt's Pharmaceutical Technology*. Wiley, 2018.
- [75] Riehl M, Harms M, Lucas H, Ebensen T, Guzmán CA, Mäder K. Dual dye in-vivo imaging of differentially charged PLGA carriers reveals antigen-depot effect, leading to improved immune responses in preclinical models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2018 May 30;117:88-97.
- [76] Zhong Z, Ji Q, Zhang JA. Analysis of cationic liposomes by reversed-phase HPLC with evaporative light-scattering detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010 Mar 11;51(4):947-51.
- [77] Zolnik BS, Leary PE, Burgess DJ. Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release* 2006 May 30;112(3):293-300.
- [78] Zolnik BS, Burgess DJ. Evaluation of in vivo-in vitro release of dexamethasone from PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release* 2008 Apr 21;127(2):137-45.
- [79] Riehl M, Harms M, Hanefeld A, Mäder K. Investigation of the stabilizer elimination during the washing step of charged PLGA microparticles utilizing a novel HPLC-UV-ELSD method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2015 Aug;94:468-72.
- [80] Cserhati T, Forgacs E, Oros G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International* 2002 Apr 22;28(5):337-48.
- [81] Sirisattha S, Momose Y, Kitagawa E, Iwahashi H. Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis. *Water Research* 2004 Jan;38(1):61-70.
- [82] Wischke C, Zimmermann J, Wessinger B, Schendler A, Borchert HH, Peters JH, et al. Poly(I:C) coated PLGA microparticles induce dendritic cell maturation. *International Journal of Pharmaceutics* 2009 Jan 5;365(1-2):61-8.
- [83] Riehl M, Harms M, Hanefeld A, Baleeiro RB, Walden P, Mäder K. Combining R-DOTAP and a particulate antigen delivery platform to trigger dendritic cell activation: Formulation development and in-vitro interaction studies. *International Journal of Pharmaceutics* 2017 Sep;532(1):37-46.

- [84] Baleeiro RB, Rietscher R, Diedrich A, Czaplewska JA, Lehr CM, Scherließ R, et al. Spatial separation of the processing and MHC class I loading compartments for cross-presentation of the tumor-associated antigen HER2/neu by human dendritic cells. *OncolImmunology* 2015 May 26;04(11):00.
- [85] Gossmann R, Fahrländer E, Hummel M, Mulac D, Brockmeyer J, Langer K. Comparative examination of adsorption of serum proteins on HSA- and PLGA-based nanoparticles using SDS-PAGE and LC-MS. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2015 Jun;93:80-7.
- [86] Fischer S, Uetz-von Allmen E, Waeckerle-Men Y, Groettrup M, Merkle HP, Gander B. The preservation of phenotype and functionality of dendritic cells upon phagocytosis of polyelectrolyte-coated PLGA microparticles. *Biomaterials* 2007;28(6):994-1004.
- [87] Mäder K, Gallez B, Liu KJ, Swartz HM. Non-invasive in vivo characterization of release processes in biodegradable polymers by low-frequency electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biomaterials* 1996;17(4):457-61.
- [88] Riehl M, Harms M, Göttel B, Kubas H, Schiroky D, Mäder K. Acid-induced degradation of widely used NIR dye DiR causes hypsochromic shift in fluorescence properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2019;132:27-33.
- [89] Ramshaw IA, Ramsay AJ. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunology Today* 2000;21(4):163-5.
- [90] Ebensen T, Schulze K, Riese P, Link C, Morr M, Guzmán CA. The bacterial second messenger cyclic diGMP exhibits potent adjuvant properties. *Vaccine* 2007;25(8):1464-9.
- [91] Ebensen T, Schulze K, Riese P, Morr M, Guzmán CA. The bacterial second messenger c-diGMP exhibits promising activity as a mucosal adjuvant. *Clinical and Vaccine Immunology* 2007;14(8):952-8.
- [92] Sanchez MV, Ebensen T, Schulze K, Cargnelutti D, Blazejewska P, Scodeller EA, et al. Intranasal delivery of influenza rNP adjuvanted with c-di-AMP induces strong humoral and cellular immune responses and provides protection against virus challenge. *PLoS one* 2014;9(8):e104824.
- [93] Alving CR, Peachman KK, Rao M, Reed SG. Adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology* 2012;24(3):310-5.

## 6. Anhang

### **Eidesstattliche Erklärung / Declaration under Oath**

Ich erkläre gemäß § 5 der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultäten I, II & III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertationsarbeit erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

*I declare according to § 5 of "Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultäten I, II & III der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg" under penalty of perjury that this thesis is my own work entirely and has been written without any help from other people. I used only the sources mentioned and included all the citations correctly both in word or content. Furthermore, I declare that this thesis has not been submitted to another faculty. This is my first application for a PhD title.*

---

Datum / Date

---

Unterschrift des Antragstellers / Signature of the applicant

# Apotheker Markus Riehl

## Persönliche Daten

Geburtsdatum: 06. Januar 1988  
Geburtsort: 06366 Köthen (Anhalt)  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: Bundesrepublik Deutschland  
Anschrift: Spessartring 73, 64287 Darmstadt

## Bildungsgang

Schulische Bildung: 2000 – 2007 Abitur am „Gymnasium an der Rüsternbreite“ in Köthen

Berufliche Bildung: Oktober 2007 – September 2011: Studium der Pharmazie an der MLU Halle-Wittenberg

August 2009: Erwerb des ersten Staatsexamens Pharmazie;

September 2011: Erwerb des zweiten Staatsexamens Pharmazie;

November 2011 – April 2012: Pharmazeut im Praktikum bei Merck Serono, CMC-Development, Abteilung Exploratory Development

Mai 2012 – November 2012: Pharmazeut im Praktikum in der Stadtapotheke Köthen

November 2012: Erwerb des dritten Staatsexamens Pharmazie;

Dezember 2012: Approbation zum Apotheker;

Dezember 2012: Beginn Promotion (Dr.rer.nat.) in pharmazeutischer Technologie bei Merck Serono, Chemical & Pharmaceutical Development, Gruppe Drug Delivery and Innovation

Thema: Polymere Mikropartikel mit unterschiedlichen Oberflächenladungen als Adjuvans-Plattform für die aktive Vakzinierung

universitäre Betreuung: Prof. Dr. Karsten Mäder (MLU Halle-Wittenberg)

seit September 2015: Principal Scientist, Drug Product Development & Life Cycle Management, Merck KGaA

## Veröffentlichungen

### Buchbeiträge

Februar 2013: "Der analytische Lebensweg eines Arzneistoffes", Buchkapitel in Imming, Arzneibuchanalytik- Grundlagen für Studium und Praxis (ISBN-10: 3804727875)

### Artikel (Peer-review)

M. Riehl, M. Harms, A. Hanefeld, K. Mäder: Investigation of the stabilizer elimination during the washing step of charged PLGA microparticles utilizing a novel HPLC-UV-ELSD method, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 94 (2015) 468–472

M. Riehl, M. Harms, A. Hanefeld, R.B. Baleeiro, P. Walden and K. Mäder: Combining R-DOTAP and a particulate antigen delivery platform to trigger dendritic cell activation: Formulation development and in-vitro interaction studies, International Journal of Pharmaceutics 532 (2017) 37–46

M. Riehl, M. Harms, H. Lucas, T. Ebensen, C.A. Guzmán and K. Mäder: Dual dye in-vivo imaging of differentially charged PLGA carriers reveals antigen-depot effect, leading to improved immune responses in preclinical models, European Journal of Pharmaceutical Sciences 117 (2018) 88–97

M. Riehl, M. Harms, B. Göttel, H.Kubas, D. Schiroky and Karsten Mäder: Acid-induced degradation of widely used NIR dye DiR causes hypsochromic shift in fluorescence properties, European Journal of Pharmaceutical Sciences 132 (2019) 27–33

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen Personen bedanken, welche mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Prof. Dr. Karsten Mäder gilt mein tiefer Dank für die fachliche und auch persönliche Anleitung während der Promotionszeit. Es hat mir sehr geholfen, jederzeit bei dir zu anrufen zu können – die räumliche Distanz Halle-Darmstadt ist dadurch gefühlt sehr gering gewesen.

Dr. Markus Weigandt aus der Abteilung Pharmaceutical Technologies danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit bei der Merck KGaA.

Dr. Meike Harms sowie Dr. Andrea Hanefeld bin ich dankbar für die fachliche Betreuung in Darmstadt und den damit verbundenen Input. Es war eine Bereicherung, die eigene Perspektive um gleich zwei weitere Blickwinkel erweitern zu können. Darüber hinaus möchte ich dir, Meike, besonderen Dank für deine Unterstützung über berufliche Aspekte hinaus aussprechen.

Dr. Henrike Lucas danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit. Henny, deine offene und positive Art hat unsere Kooperation wesentlich bereichert. Dank gebührt dir auch für das kritische Durchlesen dieser Dissertation.

Meinen Mitdoktoranden bei der Merck KGaA möchte ich für anregende Diskussionen und die vergnüglichen Stunden bei den diversen extracurricularen Aktivitäten danken. Stefan, unsere Gespräche über Partikel im Allgemeinen und solcher aus PLGA im Besonderen haben mir gerade am Anfang meiner Promotionszeit sehr geholfen.

Allen Kollegen aus den Laboren von RP und DDI sei an dieser Stelle für die permanente Bereitschaft gedankt, mir neben dem eigentlichen Tagesgeschäft mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, wenn einmal etwas von technischer Seite nicht ganz so funktioniert hat, wie es eigentlich sollte.

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle und mentale Unterstützung während des Studiums, welches meine Promotion überhaupt ermöglichte. Meiner gesamten Familie möchte ich für das entgegengebrachte Vertrauen danken; nicht ausschließlich, aber selbstverständlich auch für die Promotionszeit.

Carolin, danke für deine Unterstützung und dafür, dass du immer für mich da bist.