

Aus der Klinik für Geflügel
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Entwicklung und Charakterisierung eines kontrollierten
Freisetzungssystems für die *in ovo*-Vakzinierung
beim Huhn**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER VETERINÄRMEDIZIN
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Lieselotte Peiser
aus Bad Mergentheim

Hannover 2006

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Silke Rautenschlein, PhD

1. Gutachterin(nen)/Gutachter: Prof. Dr. Silke Rautenschlein, PhD
2. Gutachterin(nen)/Gutachter: Prof. Dr. Nina Baltes

Tag der mündlichen Prüfung: 22. November 2006

Gefördert mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft

Für Jeremy

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Grundsätze der Vakzinierung	3
2.1.1. Epizootiologische Situation	3
2.1.2. Vakzinierungsverfahren	4
2.1.2.1. Passive Immunisierung	4
2.1.2.2. Aktive Immunisierung	4
2.2. Applikationsmöglichkeiten für Impfstoffe beim Geflügel	5
2.2.1. Parenterale Applikation	6
2.2.2. Orale, intranasale und konjunktivale Applikation	6
2.2.3. Embryovakzinierung	6
2.3. Vakzintypen	8
2.3.1. Inaktivatvakzinen	8
2.3.2. Lebendvakzinen	8
2.3.3. Immunkomplexvakzinen	9
2.3.4. Spaltvakzinen, <i>syn.: Subunit-Vakzinen</i>	10
2.3.5. Vektorvakzinen	10
2.3.6. Nukleinsäurevakzinen	11
2.4. Kontrollierte Freisetzungssysteme (Controlled Release Systems, CRS)	13
2.4.1. Anforderungen an kontrollierte Freisetzungssystemen zur Vakzinierung	13
2.4.2. Mikrosphären als Applikationssystem für Plasmidvakzinen	15
2.4.2.1. Ausgangssubstanzen der Trägermatrix	16
2.4.2.1.1. Polymere	16
2.4.2.1.2. Lösungsmittel	18
2.4.2.1.3. Oberflächenaktive Substanzen, Surfactant (engl.: <i>surface active agent</i>)	19
2.4.2.2. Der Werkstoff poly(lactide-co-glycolide)	20
2.4.2.2.1. Biokompatibilität	21

2.4.2.2.2.	Eigenschaften von Mikrosphären aus PLG	22
2.4.2.2.3.	Applikationsmöglichkeiten von Mikrosphären aus PLG	24
2.4.2.2.4.	Lagerstabilität	25
2.4.2.2.5.	Einkapselungsfähigkeit von Antigenen und Therapeutika	26
2.4.2.3.	Herstellungsverfahren für CRS	26
2.4.2.3.1.	Doppelmulsionsverfahren	27
2.4.2.3.2.	Sprühtrocknungsverfahren	27
2.4.2.3.3.	Herstellung von Granulaten, Filmen, Fasern und Implantaten	28
2.5.	Möglichkeiten des Einsatzes von PLG-Mikrosphären als Träger für Nukleinsäurevakzinen beim Geflügel	28
3. Ziel der Studie		30
4. Material		32
4.1.	Hühner und Hühnereier	32
4.2.	Zelllinien	32
4.2.1.	Küken-Embryo-Fibroblasten (Chicken embryo fibroblasts, CEF)	32
4.2.2.	Hühnermakrophagenzelllinie HD11	33
4.2.3.	Hühnermakrophagenzelllinie MQ-NCSU	33
4.3.	Bakterien	34
4.4.	Plasmide	34
4.4.1.	pCR [®] 3.1/CAT-Vektor (Invitrogen [®] life technologies)	34
4.4.2.	pEGFP-Vektor (BD Biosciences Clontech)	35
4.5.	Zellkulturmedien	35
4.6.	Bakterienkulturmedien	37
4.7.	Puffer und Lösungen	37
4.8.	Antikörper	39
4.8.1.	Kaninchen- α -CAT-Antikörper	39
4.8.2.	FITC-konjugierte Antikörper	39
4.9.	Verwendete Analysekits	40

4.10.	Transfektionsreagenz	40
4.11.	Polymere	40
4.11.1.	Lactel [®] BP-0100 (Sigma)	40
4.11.2.	Lactel [®] 50DG040 (Birmingham)	41
4.11.3.	Lactel [®] 50DG065 (Birmingham)	41
4.11.4.	Resomer [®] RG 503H	41
4.12.	Lösungsmittel	42
4.13.	Oberflächenaktive Substanz	42
4.14.	Chemikalien	42
5.	Methoden	44
5.1.	Zellkulturtechnik	44
5.1.1.	Herstellung von Hühnerembryofibroblasten (CEF)	44
5.1.2.	Kultivierung der permanenten Zelllinien	44
5.1.3.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	45
5.2.	Molekularbiologische Methoden	46
5.2.1.	Bestimmung der Größe von DNS-Molekülen mittels Agarosegel- Elektrophorese	46
5.2.2.	Bestimmung der Konzentration von DNS-Präparationen durch UV-Absorptionsmessung (OD-Wertmessung)	46
5.2.3.	Transformation von chemisch kompetenten Zellen	47
5.2.4.	Vermehrung eines positiv transformierten Klones	47
5.2.5.	Kontrolle der Aufnahme des korrekten Plasmids	48
5.2.6.	Plasmidvermehrung und -isolierung	48
5.3.	Transfektion von eukaryotischen Zellen	49
5.4.	Nachweis der Proteinexpression bei transfizierten Zellen	50
5.4.1.	Nachweis der Expression von CAT im Immunfluoreszenztest	50
5.4.2.	Nachweis der Expression von GFP	50
5.5.	Mikrosphären	51
5.5.1.	Herstellung der Mikrosphären	52
5.5.1.1.	Standardprotokoll	53
5.5.1.2.	Modifizierung des Standardprotokolls	54
5.5.1.2.1.	Untersuchung des Einflusses der Homogenisierungs-	

	geschwindigkeit auf die Größe der Mikrosphären	55
5.5.1.2.2.	Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Polymere formulierungen auf die Mikrosphärenpräparation	56
5.5.1.2.3.	Effekt des organischen Lösungsmittels auf die Mikrosphärenpräparation	57
5.5.1.2.4.	Untersuchung des Einflusses der Konzentration der PVA-Lösung bei der Bereitung der w/o/w-Emulsion auf die Morphologie der Mikrosphären	58
5.5.1.2.5.	Einfluß des Volumens der PVA-Surfactantlösung auf die Einkapselungsrate	58
5.5.1.2.6.	Einfluß von stabilisierenden Zusätzen zur pDNS auf die Einkapselungsrate	59
5.5.2.	Charakterisierung der Mikrosphären	61
5.5.2.1.	Morphologie der Mikrosphären	61
5.5.2.2.	Untersuchung des Degradierungsverhaltens von Mikrosphären	62
5.5.2.3.	Degradierungsverhalten und Freisetzungsdynamik in PBS	62
5.5.3.	Untersuchung des Effektes von Prozessparametern auf in Mikrosphären eingekapselte pDNS	63
5.5.3.1.	Chloroformextraktion	63
5.5.3.2.	Ethanolpräzipitation	64
5.5.3.3.	Bestimmung des pDNS-Gesamtgehaltes von Mikrosphären	64
5.5.3.4.	Bestimmung der Menge eingekapselter pDNS nach DNase-Verdau	65
5.5.3.5.	Bestimmung der DNS-Integrität nach Einkapselung in Mikrosphären	65
5.5.4.	Untersuchung von Mikrosphären in Zellkultur	66
5.5.4.1.	Toxizität der Mikrosphären	67
5.5.4.2.	Degradierung und Phagozytose der Mikrosphären in Zellkultur	67
5.5.4.3.	Nachweis der Aktivierung von Makrophagen durch Mikrosphären mittels des Stickoxidtests	68

5.6.	<i>In vivo</i> -Untersuchung von Mikrosphären	70
5.6.1.	<i>In ovo</i> -Vakzinationstechnik	71
5.6.2.	Einfluß der Mikrosphären auf die Embryonalentwicklung nach <i>in ovo</i> -Applikation	71
5.6.3.	<i>In vivo</i> -Untersuchung zur Verträglichkeit von Mikrosphären bei Küken	72
6.	Ergebnisse	73
6.1.	Herstellung von Mikrosphären	73
6.1.1.	Einfluß von Homogenisierungsgeschwindigkeit und Konzentration der Surfactantlösung auf das Größenspektrum von Mikrosphären	73
6.1.2.	Einfluß des Polymers auf die Mikrosphärengroße und DNS-Einkapselungskapazität	75
6.1.3.	Einfluß des Lösungsmittels auf Mikrosphärenbeschaffenheit, DNS-Einkapselungskapazität und Toxizität in Zellkultur	78
6.1.4.	Effekt des Lösungsmittels und des Volumenverhältnisses der Surfactantlösung zur Erstellung der Emulsion 1 und Emulsion 2 auf die Einkapselungsrate	83
6.1.5.	Effekt von Zusätzen zur Stabilisierung der pDNS auf den Herstellungsvorgang von Mikrosphären, die Einkapselungsrate und die pDNS-Integrität	84
6.2.	Morphologische und funktionelle Integrität der pDNS	86
6.2.1.	Nachweis der Expression von pCR [®] 3.1/CAT bzw. pEGFP in Zellkultur	86
6.2.2.	Morphologische und funktionelle Integrität der pDNS nach Einkapselung	87
6.3.	pDNS-Gehalt von Mikrosphären ohne und mit Verdau mit DNase I	91
6.4.	Degradierungsverhalten von Mikrosphären in PBS und pDNS-Freisetzungsdynamik	92
6.5.	Phagozytose und Degradierung von Mikrosphären nach Aufbringen auf Zellkulturen	93
6.6.	Aktivierung von MQ-NCSU-Makrophagen durch Mikrosphären	96
6.7.	Untersuchungen zur <i>in ovo</i> - und <i>in vivo</i> -Applikation von	

	Mikrosphären	101
6.7.1.	Effekt von Mikrosphären auf die Vitalität und Schlupfrate nach <i>in ovo</i> -Inokulation	101
6.7.2.	Effekte der oralen und i.m.-Applikation von Mikrosphären	102
	7. Diskussion	103
7.1.	Zielsetzung und Zusammenfassung der Ergebnisse	103
7.2.	Bewertung der Ergebnisse	105
7.2.1.	Anforderungen an pDNS-beladene Mikrosphären	105
7.2.2.	Eignung der verwendeten Polymere	105
7.2.3.	Bewertung des Herstellungsverfahrens	106
7.2.4.	Effekte unterschiedlich konzentrierter Surfactantlösungen	107
7.2.5.	Einkapselungskapazität und pDNS-Integrität	107
7.3.	Charakterisierung der Mikrosphären	109
7.3.1.	Morphologie der Mikrosphären	109
7.3.2.	Beladung der Mikrosphären mit pDNS	109
7.3.3.	Integrität der eingekapselten pDNS	110
7.4.	Untersuchungen zum Phagozytoseverhalten	111
7.4.1.	Phagozytose von Mikrosphären durch Hühnermakrophagen	112
7.4.2.	Stimulierung von Makrophagen durch PLG-Mikrosphären	112
7.5.	Untersuchungen zur <i>in ovo</i> und <i>in vivo</i> -Applikation von Mikrosphären	114
7.5.1.	Untersuchungen nach <i>in ovo</i> -Applikation von Mikrosphären	114
7.5.2.	Untersuchung von Mikrosphären nach oraler bzw. i.m.-Applikation	115
7.6.	Schlußfolgerung	117
	8. Zusammenfassung	118
	9. Summary	120
	10. Literaturverzeichnis	122
	11. Anhang	135
11.1.	Abkürzungsverzeichnis	135
11.2.	Abbildungsverzeichnis	139
11.3.	Tabellenverzeichnis	141
11.4.	Liste der Mikrosphärenpräparationen	143

1. Einleitung

Infektiöse Erkrankungen stellen bei Menschen und Tieren eine andauernde Gefährdung der Gesundheit und bei Nutztierpopulationen darüber hinaus der ökonomischen Rentabilität dar. Zur Erzeugung einer aktiven Immunität werden hauptsächlich Vakzinen verabreicht, die abgetötete oder lebende attenuierte Erreger enthalten. Zunehmend stoßen jedoch diese herkömmlichen Impfstrategien in der Massentierhaltung bei vielen Krankheiten an ihre Grenzen.

Eine Reihe moderner, auf molekularbiologischen Labormethoden beruhender Vakzinen wurde in den letzten Jahren weltweit in Forschungslaboren entwickelt. Dabei konnten auf experimenteller Basis gute Ergebnisse in der Immunitätserzeugung beobachtet werden. Besondere Beachtung verdienen hierbei die Erfolge in der Anwendung von Nukleinsäure-Vakzinen. Diese Vakzinen vereinigen eine hohe Sicherheit, breites Spektrum der Applikationsrouten und sehr gute Lagerstabilität mit einer relativ kostengünstigen Herstellung. Nachteilig für einen kommerziellen Einsatz bei großen Tierzahlen ist bisher die Notwendigkeit der Einzeltierapplikation, die im experimentellen Ansatz meistens intramuskulär oder subkutan erfolgt. Auch sind aufgrund der raschen Elimination aus dem Organismus verhältnismäßig große Vakzinemengen erforderlich.

Um dieses Problem zu lösen, d. h. eine Tier schonende und arbeitsexensive, idealerweise orale Applikation zu ermöglichen, wurde die Einkapselung von DNS-Vakzinen in biologisch abbaubare Substanzen, erprobt. Dadurch kann die DNS vor der Degradierung im Organismus geschützt werden. Bei geeigneter Konfektionierung ist eine gezielte Hinführung solcher eingekapselter Vakzinen an immunologisch aktive Gewebe und Zellen möglich.

Im Hinblick auf die spezielle Entwicklungssituation beim Vogel bietet sich eine Embryovakzinierung an, um die Küken bereits zum Zeitpunkt des Schlupfes mit einer belastbaren Immunität gegen frühe Infektionen auszustatten.

In der vorliegenden Studie soll untersucht werden, ob eine in Mikropshären eingekapselte DNS-Vakzine für das Huhn unschädlich und zur *in ovo*-Inokulation geeignet ist.

Verschiedene Mikrosphärenpräparationen sollen hergestellt, charakterisiert und auf Mikrosphärengröße, pDNS-Einkapselungskapazität, pDNS-Freisetzungsverhalten, pDNS-Integrität nach Einkapselung, Eignung zur Aufnahme durch Hühnermakrophagen, Stimulation von Hühnermakrophagen und *in vitro*-Expression des Modellantigens Chloramphenicolaminotransferase (CAT) verglichen werden. Die *in vivo*-Verträglichkeit soll nach Applikation ins embryonierte Hühnerei und bei Küken nach dem Schlupf untersucht werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Grundsätze der Vakzinierung

Die Notwendigkeit, Impfungen durchzuführen ergibt sich aus der Empfänglichkeit der Tiere für Infektionen und den Erregerdruck in der jeweiligen Population.

2.1.1. Epizootiologische Situation

Bedingt durch die Zunahme von großen Nutztierhaltungen, vor allem auch im Geflügelbereich, sind Impfungen als Immunprophylaxe eine bedeutende Maßnahme zur Gesunderhaltung der Tiere. In der Geflügelproduktion trifft dies sowohl für die Tiere der Fleisch- als auch der Eierzeugung zu. Oft konzentrieren sich große Tierbestände auf engem Raum, wodurch eine rasche Verbreitung von pathogenen Erregern im Bestand begünstigt wird (SHARMA, 1999). Auch die vermehrten Kontakte der Betriebe untereinander durch den Handel mit Tieren, Produkten und Futtermitteln erhöhen die Gefahr der regionalen Erregerverschleppung ebenso wie auch über Länder- und Kontinentgrenzen hinweg (FLENSBURG et al., 2002). Pathogene Erreger können somit unvermittelt auf voll empfängliche Populationen treffen, mit der Folge der Vernichtung ganzer Herden, Existenz gefährdender ökonomischer Verluste und internationaler Handelsbeschränkungen.

Je nach Erregereigenschaften reichen oft zur Erregereindämmung Hygienemaßnahmen nicht aus, um den Infektionsdruck soweit zu reduzieren, daß keine Erkrankungen auftreten. Deshalb ist es in vielen Fällen unerlässlich, die Herden vorbeugend zu impfen. Die hohe Variabilität einiger viraler Erreger erfordert eine Immunprophylaxe mit wirksamen, laufend an die veränderte Virulenz der Erreger angepassten Vakzinen, zur Erzeugung einer möglichst lang andauernden, belastbaren Immunität.

2.1.2. Vakzinationsverfahren

Zwei Verfahren sind in der Impfpraxis zur Gesunderhaltung der Tierbestände seit Jahrzehnten üblich:

- passive Immunisierung
- aktive Immunisierung

2.1.2.1. Passive Immunisierung

Bei dieser Form der Immunisierung werden Antikörper, die im Serum von immunisierten Individuen nach Antigenkontakt gebildet wurden, auf nichtimmune Empfänger übertragen.

Die passive Immunisierung wird angewendet, wenn bei einer akuten Infektionsgefahr ein rascher Schutz erfolgen soll oder immuntolerante oder immunsupprimierte Individuen geschützt werden sollen. Der passive Impfschutz ist allerdings nur kurzfristig wirksam und sollte rasch von einer aktiven Immunisierung gefolgt werden.

Unter den Begriff der passiven Immunisierung ist auch die Ausstattung von Nachkommen mit maternalen Antikörpern zu fassen, die Jungtiere in den ersten Lebenstagen vor Infektionen schützen (NAQI et al., 1983; KOWALZCYK et al., 1985).

Im Rahmen der Grundimmunisierung der Küken kann eine Interaktion der matAk mit den Vakzineantigenen jedoch die Entwicklung einer protektiven aktiven Immunität vollkommen verhindern, wenn hohe Titer von matAk das Impfantigen neutralisieren (VAN DEN BERG, 2000).

Experimentell kann passive Immunität auch durch die Übertragung von Immunzellen und Gedächtniszellen erfolgen. Dies ist jedoch für die Geflügelpraxis unbedeutend.

2.1.2.2. Aktive Immunisierung

Die aktive Immunisierung wird durch die Exposition eines Organismus gegenüber Antigenen entweder durch natürliche Infektion oder durch Impfung erreicht. Die Immunantwort umfaßt die Reaktion von antigenspezifischen Lymphozyten auf das

betreffende Antigen, sowie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (JANEWAY und TRAVERS, 1997). Meist handelt es sich bei den Antigenen um Proteinstrukturen, die in der Lage sind, sowohl eine systemische als auch eine lokale Antigenantwort hervorzurufen.

Die Ziele einer Impfung zur Erzeugung einer aktiven Immunisierung sind:

- ein lang anhaltender belastbarer Schutz
- eine Verbesserung und Verlängerung des Impfschutzes durch die Aktivierung von Gedächtniszellen nach Wiederholungsimpfung
- eine Übertragung des Impfschutzes auf die Nachkommen durch maternale Antikörper

2.2. Applikationsmöglichkeiten für Impfstoffe beim Geflügel

Die Applikation von Impfstoffen in großen Tierbeständen, wie z. B. dem Geflügel, erfolgt bevorzugt oral über das Tränkesystem oder aerogen über Versprühen oder Vernebeln des Impfstoffes (SHARMA, 1999). Ein Nachteil solcher Vakzineanwendungen besteht darin, daß die Aufnahme einer ausreichenden Dosis nicht bei jedem Tier gewährleistet ist.

Eine Einzeltiervakzinierung wird beim Geflügel in der Regel dann angewendet, wenn Inaktivatimpfstoffe zum Einsatz kommen. Die Einzeltiervakzinierung wird bei Kleinbeständen, Hobbyhaltungen und bei Elterntierherden sowie im Legehennenbereich eingesetzt. Bei Mastgeflügel gelangt sie aus arbeitstechnischen Gründen selten zum Einsatz (REDMANN et al., 1992). Einzeltierimpfungen als Augentropfen oder Injektion stellen eine gleichmäßige Vakzineapplikation sicher, sind aber mit erheblichem Streß für die Tiere und mit hohen Arbeitskosten verbunden (SHARMA, 1999).

2.2.1. Parenterale Applikation

Subkutane, intrakutane (*wing web*) oder intramuskuläre Injektion von Vakzinen regt das zelluläre und humorale Immunsystem an. Dadurch wird die Produktion von Antikörpern der Klassen IgG und IgM stimuliert. Dagegen werden sehr wenige Antikörper der Klasse IgA produziert, welche für den Schutz von Schleimhautoberflächen wichtig sind. Meist werden zur parenteralen Administration Inaktivatvakzinen verwendet, die keine sehr effektive zellmedierte Immunität erzeugen (ROTH, 2002).

2.2.2. Orale, intranasale und konjunktivale Applikation

Diese Applikationsrouten sind gut geeignet, wenn es wichtig ist, eine mukosale Immunität zu erzeugen, denn einige Organismen, die über mukosale Oberflächen in den Körper gelangen, können nur schlecht durch systemische IgG- und IgM-Antikörper oder T-zellvermittelte Immunität bekämpft werden. Durch die Exposition mukosaler Oberflächen gegenüber den Impfantigenen wird die Produktion von sekretorischen IgA-Antikörpern stimuliert.

Die Applikation der Vakzinen kann oral durch Futter oder Wasser, direkt in die Mundhöhle, über die Nase oder die Konjunktiven oder als Aerosol durch Inhalation oder Spray erfolgen (SHARMA, 1999; ROTH, 2002).

2.2.3. Embryovakzinierung

Die Embryovakzinierung ist eine Möglichkeit, ungeborene Individuen zu immunisieren. Diese Art der Impfstoffapplikation ist beim Säugetier nur experimentell durchgeführt worden, hat sich hier jedoch nicht durchgesetzt, weil die Abortrate signifikant steigt (GERDTS et al., 2000). Durch die extrakorporale Ontogenese bietet sich diese Applikationsform als *in ovo*-Vakzinierung beim Vogel jedoch an (RICKS et al., 1999; RICKS et al., 2003).

Die *in ovo*-Vakzinierung beeinflusst die Lebensfähigkeit der Embryonen und die Schlupfrate nicht negativ (SHARMA und BURMESTER, 1982; JOHNSTON et al., 1997; SHARMA und RICKS, 2002). *In ovo* vakzinierte Embryonen können neutralisierende Antikörper entwickeln und sind so gegen eine Belastungsinfektion geschützt (SHARMA, 1986).

Die Embryovakzinierung ins Brutei als sogenannte *in ovo*-Technologie ist ein relativ neues Konzept der Vakzineapplikation (SHARMA und BURMESTER, 1982). Sie wird beim Wirtschaftsgeflügel auch als Massenimmunisierung vorgenommen werden (RICKS et al., 1999). Diese Art der Impfstoffapplikation ist in der US-Broilerproduktion als Impfung gegen die Marek'sche Krankheit bereits gut etabliert (JOHNSTON et al., 1997; RICKS et al., 1999). Experimentell erwies sich die *in ovo*-Vakzinierung beim Huhn auch gegen andere Virusinfektionen, wie das Virus der Infektiösen Bursitis (*engl.*: Infectious bursal Disease, IBD) oder Pockenviren als wirksam (SHARMA, 1985; SHARMA, 1986; RICKS et al., 1999; OSHOP et al., 2003). Eine Multiplex-Vakzine gegen Marek'sche Krankheit und IBD in Verbindung mit einer rekombinanten Geflügelpockenvakzine mit den HN- und F-Genen des Newcastle Disease-Virus wurde *in ovo* von GAGIC et al. (1999) getestet. Die *in ovo*-Vakzinierung ist im Tierversuch auch bei der Pute erfolgreich durchgeführt worden (AHMAD und SHARMA, 1993; RAUTENSCHLEIN et al., 2000).

Die *in ovo*-Vakzinierung bietet gegenüber der Impfung nach dem Schlupf einige Vorteile:

- Durch die Exposition gegenüber einem Antigen - am 17. oder 18. Bebrütungstag beim Hühnerembryo - verfügt das Küken bereits beim Schlupf über einen Schutz gegen die entsprechenden Erreger. Nach Applikation von Lebendvakzinen erfolgt eine rasche und intensive Replikation des Impfvirus in den embryonalen Geweben (SHARMA und BURMESTER, 1982; SHARMA, 1986; NEGASH et al., 2004).
- Die Belastung der Tiere und der Aufwand an Arbeitszeit und Kosten für die Einzeltierapplikation können vermieden werden (SHARMA und BURMESTER, 1982). Der Einsatz von vollautomatischen Injektionsmaschinen ermöglicht es, bis zu 50 000 Eier pro Stunde zu beimpfen (JOHNSTON et al., 1997; RICKS et al., 1999; SHARMA und RICKS, 2002).

- Jedes Ei wird, im Gegensatz zur Trinkwasservakzinierung, mit einem definierten Vakzinevolumen inokuliert. Die Injektionsnadel wird nach jeder Injektion automatisch desinfiziert und gereinigt, wogegen bei der Massenapplikation nach dem Schlupf in der Regel eine Injektionsnadel für viele Tiere verwendet wird (SHARMA, 1999; RICKS et al., 1999).

2.3. Vakzinetypen

Die für die aktive Immunisierung zur Verfügung stehenden verschiedenen Impfstoffklassen unterscheiden sich in Wirkungsweise und Herstellung (DUNHAM, 2002).

2.3.1. Inaktivatvakzinen

Inaktivierte Vakzinen sind technologisch einfach herzustellen. Inaktivatvakzinen werden kommerziell in der Nutztierhaltung in großem Stil eingesetzt, sind relativ sicher und können mehrere antigene Epitope enthalten. Allerdings können auch wichtige antigene Epitope während des Herstellungsprozesses zerstört werden (WALKER, 1994). Inaktivatvakzinen müssen systemisch per Einzeltierapplikation verabreicht werden. Ihre Anwendung ist daher kostenintensiv und mit Stress für die Tiere verbunden. Meist werden zur Erzeugung einer protektiven Immunität wiederholte Inokulationen größerer Antigenmengen und der Zusatz eines Adjuvans benötigt (SILVA, 2002; DUNHAM, 2002). Inaktivatvakzinen werden hauptsächlich in Elterntierbeständen und bei Legehennen eingesetzt.

2.3.2. Lebendvakzinen

Lebendvakzinen werden beim Geflügel kommerziell meist als Aerosol oder im Trinkwasser eingesetzt, können jedoch auch parenteral (z.B. Puten-Herpes-Viren oder Geflügelpockenviren) appliziert werden. Sie sind somit bei technisch einwandfreien

Voraussetzungen tierschonend und arbeitsextensiv anzuwenden und gut wirksam. Sie enthalten meist avirulente oder schwach virulente, in Ausnahmen auch virulente Stämme. Attenuierte Impfstoffe werden durch Passage in Zellkultur, im embryonierten Ei oder durch Passagen in Tieren anderer Spezies hergestellt. Lebende attenuierte Vakzinestämme replizieren im Wirtsorganismus und stellen dem Immunsystem über eine längere Zeitspanne Antigen zur Verfügung. Sie können mehrere antigene Epitope enthalten und erzeugen nach einer oder mehreren Dosen eine humorale und zellvermittelte Immunität (WALKER, 1994; JEURISSEN et al., 2000; SILVA, 2002). Lebendvakzinen können nach oraler Applikation mit intestinalen M-Zellen interagieren, von diesen aufgenommen und an professionelle antigenpräsentierende Zellen weitergegeben werden. Mukosal appliziert erzeugen sie eine lokale und disseminierte Immunität. Lebende Vakzinen können preisgünstig und technologisch einfach hergestellt werden, bedürfen bei der Aufbewahrung jedoch einer Kühlung (DUNHAM, 2002). Lebendvakzinen werden beim Geflügel in großem Maßstab eingesetzt.

2.3.3. Immunkomplexvakzinen

Immunkomplexvakzinen werden durch Mischen von Antikörper enthaltenden Hyperimmunseren und lebenden Vakzineviren hergestellt (WHITFILL et al., 1995; JEURISSEN et al., 1998). Mit dieser Herstellungsweise wird die Bildung von Immunkomplexen im Verlauf von natürlichen Infektionen nachgeahmt. Im Gegensatz zu attenuierten Virusvakzinen ist die Virusreplikation bei Verwendung von Immunkomplexvakzinen deutlich verzögert (IVAN et al., 2005). Immunkomplexe sind über einen längeren Zeitraum in B-Zellfollikeln nachweisbar. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung von B-Gedächtniszellen und der Affinitätsreifung (JEURISSEN et al., 1998). Immunkomplexvakzinen werden beim Geflügel *in ovo* angewendet (KELEMEN et al., 2000).

2.3.4. Spaltvakzinen, syn.: Subunit-Vakzinen

Subunit-Vakzinen gegen Viruskrankheiten werden aus virulenten Viren durch chemische Auftrennung der Virusproteine hergestellt, mit anschließender Aufreinigung und Konzentrierung der gewünschten immunogenen Segmente. Sie repräsentieren meist nur ein einziges immunogenes Antigen des Pathogens. Wegen fehlender adhäsiver und partikulärer Eigenschaften werden sie kaum von M-Zellen aufgenommen und induzieren keine zellvermittelte Immunität (WALKER, 1994). Die Konstruktion von rekombinante *Subunit*-Vakzinen erfolgt durch Einklonierung der immunogenen Segmente in Bakterien, z. B. *E. coli*, und können nach i.m. oder oraler Applikation eine schützende Immunität erzeugen (ROGEL et al., 2003; RONG et al., 2005). Spaltvakzinen müssen in mehreren großen Dosen verabreicht werden und benötigen zur Induktion einer Immunantwort ein Trägersystem oder zugesetzte Adjuvantien. Sie können genetisch und biochemisch maßgeschneidert werden und erfordern deswegen oft hohe Entwicklungs- und Herstellungskosten und eine spezialisierte Technologie. Der Einsatz von Spaltvakzinen beschränkt sich beim Geflügel derzeit auf den experimentellen Einsatz.

2.3.5. Vektorvakzinen

Vektorvakzinen sind eine neue Art von gentechnisch hergestellten Lebendimpfstoffen, bei denen die Fähigkeit des Wirtsorganismus zur Expression von fremden Genen genutzt werden kann. In vermehrungsfähige, nicht oder schwach pathogene Viren oder Mikroorganismen werden Genomsequenzen eines pathogenen Erregers kloniert, welche für ein oder mehrere immunogene Proteine kodieren und im Wirtsorganismus exprimiert werden (ROGEL et al., 2003; MOTA et al., 2006). Vektorvakzinen bewirken eine gute Stimulierung des Immunsystems und bieten eine hohe Sicherheit (SHAW und DAVISON, 2000, SILVA, 2002, BUTTER et al., 2003). Vektorvakzinen sind in den USA z. T. für die Anwendung beim Geflügel zugelassen, z. B. als FPV-NDV-Vakzine.

2.3.6. Nukleinsäurevakzinen

Anfang der 90iger Jahre beobachtete man, dass die Inokulation von nackter DNS *in vivo* zur Expression der kodierten Proteine führte (WOLFF et al., 1990). Daraus schloß man, daß gegen ein fremdes Protein, welches *in vivo* exprimiert wird, eine Immunantwort hervorgerufen werden kann.

Aufschluß über die vermutete Wirkungsweise von DNS-Vakzinen erhielt man durch experimentelle Transfektion von antigenpräsentierenden Zellen (APCs), meist dendritischen Zellen. Die Expression der DNS in den Zellen des geimpften Wirtes erzeugt das immunogene Protein, welches im Wirtsorganismus als fremd erkannt und gegen das eine Immunantwort sowohl mit zellmedierten als auch humoralen Komponenten gebildet werden kann (TANG et al., 1992; CHEN, 2000, GERDTS u. METTENLEITER, 2001). Die Expression der kodierenden Gene im Wirtsorganismus ist transient.

Experimentell wurden DNS-Vakzinen bereits gegen eine Vielzahl von Infektionen bei unterschiedlichen Tierarten erprobt (DUNHAM, 2002; ROGEL et al., 2003; CAO et al., 2005; 2005; RONG et al., 2005; MOTA et al., 2006). Eine schützende Immunisierung konnte z. B. durch die Applikation von Tollwut-, Polio- und Hepatitis-B-DNS-Vektorvakzinen erzielt werden (BLOOM, 1989; ROBINSON, 1997).

Zur Konstruktion einer DNS-Vakzine werden spezifische Anteile des Genoms, die für die hauptsächlich antigenen Epitope kodieren, in nicht vermehrungsfähige Vektoren, wie Plasmide, eingebaut. Nach Einschleusung der Plasmid-DNS (pDNS) in Zellen des Impflings werden durch wirtseigene Mechanismen die immunogenen Proteine gebildet. Diese können eine Immunantwort induzieren (TANG et al., 1992; DUNHAM, 2002). Zusätzlich zu den Gensequenzen, die für die immunogenen Proteine kodieren, können weitere Sequenzen, die z. B. für immunstimulierende Proteine kodieren, in die Konstrukte kloniert werden. Hervorzuheben sind dabei besonders sog. CpG-Motive. Es handelt sich hierbei um Oligodeoxynukleotide, die unmethylierte CpG-Dinukleotide enthalten. Diese repetitiven Gensequenzen, die in bakterieller Plasmid-DNS vorkommen, verstärken die Expression der Fremdgene und können die Immunantwort modulieren (CHEN, 2000; JØRGENSEN et al., 2003).

Gegenüber anderen Impfstoffgruppen treten bei DNS-Vakzinen keine lokalen Impfreaktionen an der Injektionsstelle auf, wie sie häufig nach der Applikation von Adsorbatimpfstoffen beobachtet werden. Ein wichtiger Vorteil von DNS-Vakzinen besteht darin, dass zwar die Antigenität des verwendeten Virus erhalten ist, eine Rückentwicklung zu infektiösen Viruspartikeln jedoch nach heutigem Wissensstand nicht möglich ist, da notwendige Anteile zur Replikation des kompletten Virus nicht übertragen werden. Dadurch besteht kein Krankheitsrisiko, wie es nach Verwendung von lebenden, unzureichend attenuierten Viren auftreten kann (DUNHAM, 2002; SILVA, 2002). Darüber hinaus bieten DNS-Vakzinen weitere Vorteile gegenüber konventionellen Impfstoffen, wie chemische und physikalische Stabilität, relativ einfache Produktion und Handhabbarkeit sowie gute Lagerfähigkeit (DUNHAM, 2002).

Obwohl an Vakzinen, die auf der Verwendung von pDNS basieren, weltweit von zahlreichen Forschungsgruppen und auch Impfstoffherstellern gearbeitet wird, ist ihre Anwendung in der Tiermedizin bislang über den experimentellen Einsatz kaum hinausgekommen. Eine umfangreiche Auflistung von DNS-Vakzinen mit veterinär-medizinischer Relevanz geben BABIUK et al. (2000). Ein Hindernis für den kommerziellen Einsatz besteht bisher darin, daß die applizierte DNS in ungeschützter Form meist im Organismus nicht sehr stabil und daher nicht sonderlich effektiv ist. Wenngleich durch DNS-Vakzinen eine lokale Schleimhautimmunität am Applikationsort erzeugt werden kann, wie GERDTS et al. (2000) beim Schafembryo zeigen konnten, unterliegt die DNS vor allem den destruktiven Bedingungen während der Magendarmpassage. Ebenso erfolgt nach parenteraler Applikation von Nukleinsäurevakzinen im Organismus ein rascher Abbau durch ubiquitäre Nukleasen, bevor eine ausreichende Aufnahme durch professionelle Antigen präsentierende Zellen erfolgen kann (CHEN et al., 1998; CAPAN et al., 1999; KANEKO et al., 2000; MCKEEVER et al., 2002). Nach BABIUK et al. (2000) werden 90 % der *in vivo* verabreichten Plasmide abgebaut, bevor sie in Zellen aufgenommen werden, den Zellkern erreichen und transkribiert werden können. HULSE und ROMERO (2002) stellten allerdings einen raschen Transport von intramuskulär verabreichten DNS-Vakzinen in primäre und sekundäre lymphatische Gewebe fest.

2.4. Kontrollierte Freisetzungssysteme (Controlled Release Systems, CRS)

Kontrollierte Freisetzungssysteme (engl.: controlled release systems, CRS) können bei geeigneter Konfektionierung als Applikationssysteme zur Vakzination eingesetzt werden. Es handelt sich hierbei um eine Technik, deren Anfänge in den 50er Jahren des vorigen Jahrhunderts liegen und bei der anfänglich vor allem Proteine als Immunogene in polymere Substanzen eingearbeitet wurden, um sie vor Schädigungen im Empfängerorganismus zu schützen oder gezielt in bestimmten Kompartimenten abzusetzen. Das Wirkprinzip basiert auf der Freisetzung der integrierten Immunogene auf physikalischem, chemischem oder biochemischem Weg (COWSAR et al., 1985; LANGER et al., 1985; JONES et al., 1996).

In der Folgezeit wurden auf der Basis kontrollierter Freisetzungssysteme zahlreiche Produkte mit einer Reihe von unterschiedlichen Wirkstoffgruppen, wie Hormonen, Proteinen, Peptiden und Nukleinsäuren, entwickelt. Die Untersuchungen zur Wirksamkeit wurden meist an kleinen Labortieren, überwiegend Mäusen, durchgeführt. Einige CRS sind von der World Health Organisation (WHO) zugelassen und bereits bei Menschen für spezielle Indikationen, vor allem in der Hormonsubstitution und der Krebstherapie, im Einsatz (BLOOM, 1989; LANGER, 1990).

Je nach Anwendungszweck werden CRS in unterschiedlicher Form als Mikropartikel, Granulate, Filme und Implantate hergestellt (LANGER et al., 1985, MORRIS et al., 1994). Die bisher meisten Untersuchungen wurden jedoch mit speziellen Mikropartikeln, sog. Mikrosphären, durchgeführt. Diese können sowohl oral appliziert als auch durch Injektion verabreicht werden.

2.4.1. Anforderungen an kontrollierte Freisetzungssysteme zur Vakzinierung

Entsprechend der Thematik wird im Folgenden hauptsächlich auf die Charakteristika von CRS in Form von Mikrosphären mit eingekapselter pDNS eingegangen. Kontrollierte Freisetzungssysteme, die zur Impfung eingesetzt werden sollen, weisen gegenüber

herkömmlichen Vakzinen einige Besonderheiten auf und sollten bestimmte Anforderungen erfüllen:

- Induktion einer humoralen und zellvermittelten Immunität: Die Applikation von eingekapselter pDNS kann zu einer Expression der kodierenden Gene im Wirtsorganismus führen sowie die Bildung von protektiven Antikörpern stimuliert werden. Durch Präsentation der an MHC-I gebundenen pDNS kann die Stimulation einer zytotoxischen T-Zell-Antwort erfolgen (KANEKO et al., 2000; LUZARDO-ALVAREZ et al., 2005; WANG et al., 2005).
- Erzeugung einer mukosalen Immunität: Oral verabreichte, mit pDNS beladene Mikrosphären können eine lokale und disseminierte Schleimhautimmunität induzieren (KANEKO et al., 2000).
- Keine Interferenz mit maternalen Antikörpern: Durch Einkapselung werden die Impfantigene im Fall von Subunit- oder Vollantigenvakzinen vor der Neutralisierung durch maternale Antikörper geschützt (MORRIS et al., 1994).
- Verbessertes Schutz vor Feldinfektionen: Durch die Einkapselung von Plasmiden, die für antigene Epitope von Viren unterschiedlicher Pathogenitätstypen kodieren, kann, wie bei der Verwendung von Multiplexvakzinen, der Veränderung von Feldstämmen besser begegnet werden (MORRIS et al., 1994).
- Reduzierung von Nebenwirkungen: Entzündungsreaktionen am Applikationsort, wie sie nach Injektion von Adsorbat-vakzinen auftreten können, können durch CRS mit eingekapselter pDNS vermieden werden (MCGHEE et al., 1992; MORRIS et al., 1994).
- Reduzierung der Anzahl von Impfungen: Durch Steuerung der Freisetzungsrates des Plasmids oder der Proteine durch CRS kann die Immunantwort gegenüber dem Antigen durch eine verlängerte Exposition gesteigert und der Effekt einer Wiederholungsimpfung erzielt werden (LANGER, 1990; LUZARDO-ALVAREZ et al., 2005; WANG et al., 2005).

- Einfache Applikationsmethode: Mikrosphären können arbeitstechnisch einfach oral appliziert oder parenteral verabreicht werden (MORRIS et al., 1994; JIANG et al., 2005).
- Geringe Lagerhaltungskosten: Lyophilisierte Mikrosphären sind ohne aufwendige Kühlung lagerfähig.

2.4.2. Mikrosphären als Applikationssystem für Plasmidvakzinen

Mikrosphären sind kleine sphärische Partikel, die sich während des Herstellungsprozesses unter Einfluß von physikalischen und chemischen Bedingungen bilden. Sie können in monolithischer Form vorliegen, wobei die eingeschlossene pDNS gleichmäßig in der Matrix verteilt ist. Als kleine kapsuläre Strukturen enthalten sie die pDNS eingeschlossen in einem Reservoir (MORRIS et al., 1994).

Mikrosphären werden von den Abwehrzellen als Fremdkörper erkannt und aufgenommen (JILEK et al., 2005). Dadurch gelangen die eingekapselten Plasmide ins Zytoplasma. Nach Expression der kodierten Proteine werden diese prozessiert und an Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Moleküle gekoppelt auf der Zelloberfläche präsentiert. Diese effektive Antigenpräsentation induziert eine zellvermittelte und fördert eine humorale Immunantwort (HEDLEY et al., 1998).

Nach Untersuchungen von ELDRIDGE et al. (1991), AHSAN et al. (2002) und DUVVURI et al. (2006) ist die Intensität der Aufnahme durch phagozytoseaktive Zellen, z. B. Makrophagen, abhängig von der Größe, der Beschaffenheit und der chemischen Zusammensetzung der Mikrosphären. Mikropartikel bis 5 µm Durchmesser werden von Makrophagen aufgenommen und im Lymphstrom an immuninduktive Stellen transportiert. Mikropartikel bis zu einer Größe von 10 µm verbleiben nach oraler Applikation längere Zeit in den Peyerschen Platten des Dünndarms (ELDRIDGE et al., 1990). Durch Applikation von Mikrosphären unterschiedlicher Größe kann die Phagozytoserate gegenüber monodispersen

Mikrosphären gesteigert werden. Stärker hydrophobe Mikrosphären werden in einem größeren Ausmaß phagozytiert als solche aus hydrophilerem Material (HOSHI et al., 1999).

Bereits mit einer einmaligen oralen oder parenteralen Applikation von pDNS enthaltenden Mikrosphären kann eine Immunität erzeugt werden. Die protrahiert oder phasisch verlaufende Freisetzung bewirkt eine Exposition des Abwehrsystems gegenüber den Antigenen ähnlich dem Verlauf einer chronischen Infektion und stimuliert auf diese Weise das Immunsystem über einen längeren Zeitraum. Dadurch wird sowohl eine gute Induktion der Antikörperproduktion und Affinitätsreifung von B-Zellen erzielt, als auch eine Förderung der Bildung von Gedächtniszellen. (LANGER, 1990; MORRIS et al., 1994).

2.4.2.1. Ausgangssubstanzen der Trägermatrix

Die Trägersubstanz für CRS besteht aus den Komponenten Polymer, Lösungsmittel und Surfactant.

2.4.2.1.1. Polymere

Die meisten Untersuchungen zu CRS wurden an Mikrosphären aus poly(lactide-co-glycolide) (PLG) wegen der guten Produkteigenschaften dieses Polymers durchgeführt. Daneben finden sich Veröffentlichungen zum experimentellen Einsatz von CRS aus α -Aminosäure, Chitosan, Polyacrylat, Polystyren u. a. (Tabelle 1).

CRS können zur Reduktion der Anzahl von Applikationen so konfektioniert werden, daß sie die eingekapselten Substanzen in vorbestimmten Mengen und über definierte Zeitspannen entlassen. Die Freisetzungsdauer kann Tage, Wochen, Monate und sogar mehr als ein Jahr betragen (BLOOM, 1989; WOO et al., 2001; YUN et al., 2005). Freisetzungssysteme in Form von Mikropartikeln geben die eingekapselten Stoffe meist in einem initialen Schub mit nachfolgender verzögerter Freisetzung ab, die zeitlich an die Degradierungsrate der Matrix gekoppelt ist (LANGER, 1990; CHALLACOMBE et al., 1992).

Tabelle 1: Übersicht über kontrollierte Freisetzungssysteme, verwendete Polymere und eingekapselte Substanzen (Auswahl)

Polymer	Antigen/Plasmid	CRS	Versuchstierart	Autoren
PLG	IgY	Mikrosphären	Schwein	Torche et al., 2006
PLG	Malaria-Ag	Mikrosphären	Maus	Luzardo-Alvarez et al., 2005
PLG	DNS	Mikrosphären	Maus	Wang et al., 2005
PLG	DNS	Mikrosphären	Ratte	Yun et al., 2005
PLG	5-FU	Mikrosphären	in vitro	Lee et al., 2004
PLG	6-Coumarin	Nanopartikel	Kaninchen	Qaddoumi et al., 2004
PLG	Lysozym	Mikrosphären	Ratte	Jiang et al., 2002
PC	Piroxicam	Mikrosphären	Kaninchen	Joseph et al., 2002
PLG	Integrilin™	Film	in vitro	Schachter u. Kohn, 2002
PLA	TT	Nanopartikel	Maus	Vila et al., 2002
CS	Insulin	Nanopartikel	Maus	Vila et al., 2002
PLG	DNS	Mikrosphären	in vitro	Walter u. Merkle, 2002
PLG	LZ, CA, BSA	Mikrosphären	in vitro	Sandor et al., 2001
PLG	Leuprolide	Mikrosphären	Ratte	Woo et al., 2001
PLG	pDNS	Mikrosphären	Maus	Kaneko et al., 2000
PEG	Diltiazem	Hydrogel	in vitro	Peppas et al., 1999
PLA	HSA	Nanopartikel	in vitro	Zambaux et al., 1999
PLG	BSA	Mikrosphären	Maus	Igartua et al., 1998
PLG	pDNS	Mikrosphären	Maus	Jones et al., 1997
Poly(FA:SA)	Insulin	Mikrosphären	Ratte	Mathiowitz et al., 1997
Poly(FA:SA)	Dicumarol	Mikrosphären	Ratte	Mathiowitz et al., 1997
α -AS	OVA	Mikrosphären	Maus	Haas et al., 1996
Polystyrol	Poloxamer	Mikrosphären	Ratte	Florence et al., 1995
Alginat	RV-pDNS	Mikrosphären	Maus	Offit et al., 1994
Polyacrylat	RV-pDNS	Mikrosphären	Maus	Offit et al., 1994
Cellulosesulfat	RV-pDNS	Mikrosphären	Maus	Offit et al., 1994
PLG	OVA	Mikrosphären	Maus	Challacombe et al., 1992
p(BCA)	OVA	Mikropartikel	Ratte	O'Hagan et al., 1989
PA	OVA, AD, TG	Mikropartikel	Ratte	O'Hagan et al., 1989

PLG = Poly(D,L-lactide-co-glycolide), Ag = Antigen, α -AS = α -Aminosäure, PC = Polycarbonat, Poly (FA:SA) = Poly-(fumaric:sebacic acid), p(BCA) = poly(butyl-2-cyanoacrylat), PEG = Poly(ethylen glycol), LZ = Lysozym, AD = Alkohol-Dehydrogenase, TG = Thyreoglobulin, BSA = Bovines Serum Albumin, CA = Carbonanhydrase, PAS = Poly(acryl starch), PLA = poly(lactic acid), 5-FU = 5-Fluorouracil; TT = Tetanus Toxoid, CS = Chitosan, HSA = Humanes Serum Albumin, pDNS = Plasmid-DNS, RV-pDNS = Rotavirus-pDNS

Die Freisetzung der eingekapselten Stoffe aus polymeren Materialien erfolgt durch

- Diffusion bei Systemen, die als Reservoir oder als Matrix vorliegen,
- chemische Reaktion nach Polymerdegradierung oder Abspaltung des eingekapselten Stoffes,
- Lösung durch Schwellen des Polymers oder osmotische Effekte

(LANGER, 1990).

Bei den meisten Präparationen erfolgt die Freisetzung durch Diffusion, indem die eingekapselten Substanzen sich langsam in Wasser, welches das Polymer zum Quellen bringt, lösen und aus der Matrix in das umgebende Gewebe diffundieren.

Bei der Verwendung von Polymeren, die nicht oder nur sehr langsam degradieren, sinkt die Freisetzungsrage dadurch, daß der Diffusionsweg für die eingekapselten Moleküle länger wird. Entsprechend kann eine gleichmäßige Abgabe durch die Verwendung von solchen Polymeren erreicht werden, die passend zur erwünschten Freisetzungsrage degradieren. Bei Mikrosphären, die während der Degradierung in kleine Fragmente zerbrechen, ist durch kurze Diffusionswege eine nahezu konstante Freisetzung zu erwarten (LANGER, 1990; YUN et al., 2005).

2.4.2.1.2. Lösungsmittel

Zur Herstellung von Mikrosphären aus PLG muß das Polymer zunächst in einem organischen Lösungsmittel aufgelöst werden. Geeignete Lösungsmittel sind z. B. Aceton, Methylenchlorid, Ethylacetat, Ethylformat.

Das gewählte Lösungsmittel soll

- das Polymer restlos in Lösung bringen
- die zugesetzte therapeutische Substanz nicht schädigen
- nicht mischbar mit der Surfactantlösung (Kap. 2.5.2.1.3.) sein

- einen geringeren Siedepunkt als die Surfactantlösung besitzen
- eine geringe Toxizität aufweisen.

Von den verschiedenen geeigneten Lösungsmitteln ist die Verwendung von Methylenchlorid (CH_2Cl_2 , Aldrich) und Ethylacetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, Sigma) bei der Herstellung von Mikrosphären am weitesten verbreitet. Beide Lösungsmittel sind pharmakologisch anerkannt.

Methylenchlorid und Ethylacetat werden bei der Herstellung von PLG eingesetzt und sind daher auch als Lösungsmittel zur Erzeugung der organischen Phase geeignet. Es handelt sich dabei um hochflüchtige Stoffe, die nach Herstellung der Mikrosphären leicht von diesen durch Verdunsten bei Raumtemperatur oder unter Vakuum abgetrennt werden können (COWSAR et al., 1985; WATTS et al., 1990; TINSLEY-BOWN et al., 2000).

Beide Lösungsmittel können entzündliche Reaktionen hervorrufen und müssen zusätzlich nach dem Verdampfen durch mehrere intensive Waschvorgänge vollständig von den Mikrosphären abgetrennt werden. Bei guter Herstellungspraxis und in der großtechnischen Produktion können negative Auswirkungen des Fertigproduktes vermieden werden (BENDIX, 1997).

2.4.2.1.3. Oberflächenaktive Substanzen, Surfactant (engl.: *surface active agent*)

Oberflächenaktive Substanzen umgeben bei der Herstellung von Mikrosphären die Oberfläche der Partikel mit einem Film, damit diese nicht aneinanderkleben. Durch die Wahl des Surfactant kann die Bereitschaft von Makrophagen, die Mikropartikel zu phagozytieren, beeinflusst werden (VILA et al., 2002).

Oberflächenaktive Substanzen werden als wässrige Lösung eingesetzt und stellen die äußere wässrige Phase beim Doppelemulsionsverfahren (Kap. 5.5.1.1.) dar. Durch die Verwendung eines großen Volumens an Surfactantlösung zur Evaporierung, etwa das 10 - 20fache des Volumens der Polymerlösung, wird der Übertritt des organischen Lösungsmittels aus den Mikrosphären in die Surfactantlösung erleichtert (COWSAR et al., 1985).

Das am häufigsten zur Herstellung von CRS verwendete Surfactant ist Polyvinylalkohol (PVA). Daneben existieren zahlreiche Untersuchungen zu den oberflächenaktiven und phagozytosefördernden Eigenschaften von Chitosan, Polyethylenglycol, Polyvinylpyrrolidon, Phosphatidylcholin, humanem oder bovinem Serumalbumin (ZAMBAUX et al., 1998; CAPAN et al., 1999; STURESSON u. WIKINGSSON, 2000; PEREZ et al., 2001; VILA et al., 2002).

Im Folgenden sollen die Eigenschaften von CRS auf der Basis von poly(lactide-co-glycolide) Polymeren näher betrachtet werden.

2.4.2.2. Der Werkstoff poly(lactide-co-glycolide)

Das synthetische Polymer wird durch Polymerisation der zyklischen Monomere Laktid und Glykolid nach Spaltung der Acylbindungen hergestellt.

Laktid ist der zyklische Diester von Laktat. Laktat liegt in zwei optisch aktiven Stereoisomeren vor und kann deshalb drei unterschiedliche Laktidformen bilden: L(-)-Laktid, D(+)-Laktid und das optisch inaktive meso-Laktid. Die racemische 1:1 - Mischung von L- und D- Laktid wird D,L-Laktid genannt. Für die Produktion von Polymeren wird meistens L- oder D,L-Laktid verwendet. L-Laktid hat gute mechanische Eigenschaften und eine hohe Belastungsfähigkeit und wird deshalb bei der Herstellung von orthopädischen Implantaten verwendet. D,L-Laktid kann mechanisch weniger belastet werden als L-Laktid und degradiert wesentlich schneller als dieses. Aus D,L-Laktid werden hauptsächlich Produkte für die minimalinvasive Knochenchirurgie und Gesichtschirurgie hergestellt.

Glykolid ist der zyklische Diester von Glykolsäure und das wichtigste Monomer zur Herstellung von biokompatiblen Polymeren. Die meisten resorbierbaren Nahtmaterialien sind entweder aus reinem poly(glycolide) oder aus Glykolid-reichen Copolymeren.

Copolymere aus D,L-Laktid und Glykolid können mit einem Glykolidanteil bis zu 70 % hergestellt werden. Das Verhältnis von Laktid zu Glykolid und das Molekulargewicht sind

entscheidend für die Eigenschaften der Copolymere (im Folgenden als Polymere bezeichnet). Dabei besteht kein linearer Zusammenhang zwischen der Polymerzusammensetzung und deren mechanischen Eigenschaften und Degradierungcharakteristik. So degradiert beispielsweise ein 50:50 poly(lactide-co-glycolide) schneller als jeweils das Homopolymer.

Die Copolymerisierungsrate beider Monomere ist sehr unterschiedlich, wobei Glykolid heftiger reagiert als D,L-Laktid. Die Herstellung eines Copolymers ist aufgrund der hohen Reaktivität der Bestandteile der sehr aufwendig, weshalb die Polymere zur Herstellung von Mikrosphären als Fertigprodukt von spezialisierten chemischen Laboren bezogen werden (BENDIX, 1997; MIDDLETON und TIPTON, 2000).

Polymere aus Laktid und Glykolid werden fast ausschließlich für die Herstellung von Mikropartikeln zur kontrollierten Freisetzung von bioaktiven Substanzen verwendet.

2.4.2.2.1. Biokompatibilität

Nach der Applikation und Freisetzung der eingekapselten Substanz, z. B. eines Impfstoffes, soll der Trägerstoff aus dem Organismus eliminiert werden, ohne Rückstände zu hinterlassen.

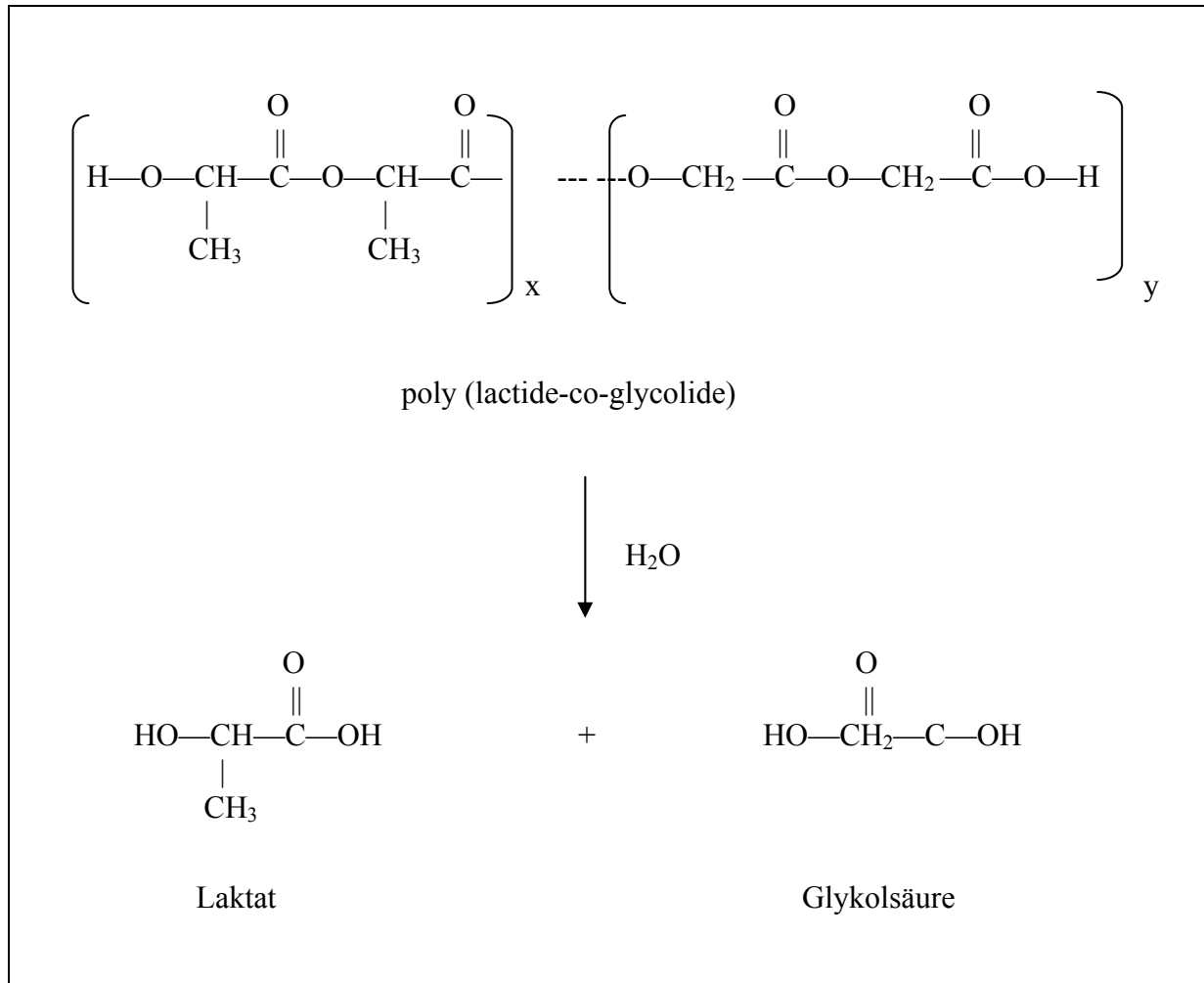
Der biologische Abbau von poly(lactide-co-glycolide) erfolgt *in vivo* durch zufällige, nicht enzymatische Hydrolyse der Verbindungen des Esterrückgrades der aliphatischen Moleküle. Nach Aufspaltung in Monomere wird das Polymer rückstandsfrei aus dem Körper eliminiert.

Die einzelnen Metabolisierungsschritte laufen wie folgt ab:

- Polylaktid: hydrolysiert zu Laktat, einem physiologischen Produkt der Muskelkontraktion. Das anfallende Laktat wird im Tricarboxylsäure-Zyklus weiter metabolisiert und als Kohlendioxid und Wasser ausgeschieden.
- Polyglykolid: wird durch Hydrolyse und Esterasen zu Glykolsäure degradiert. Glykolsäuremonomere können über die Niere ausgeschieden werden oder zu Glycin

verstoffwechselt werden. Glycin ist Baustein der Serinsynthese und wird anschließend in Pyruvat umgewandelt, als welches es in den Tricarboxylsäure-Zyklus eingeschleust wird (BENDIX, 1997; MIDDLETON und TIPTON, 2000).

Abbildung 1: Struktur von poly(lactide-co-glycolide) und hydrolytische Degradierung



2.4.2.2.2. Eigenschaften von Mikrosphären aus PLG

Neben der Fähigkeit zum rückstandslosen Abbau weist PLG als Trägerstoff weitere Vorteile auf. Diese beinhalten einerseits das Fehlen eines toxischen und allergenen Potentials, andererseits die werkstoffimmanente Fähigkeit zur Verstärkung der Immunogenität der eingekapselten Substanzen. Die polymeren Partikel können je nach Konfektionierung über

längere Zeit am Ort der Applikation oder in bestimmten Körperkompartimenten verbleiben und die eingekapselten Stoffe dort freisetzen.

Aufgrund des völligen Fehlens von Toxizität wurde PLG von der *Food and Drug Association* (FDA) zur Anwendung beim Menschen lizenziert. Resorbierbare Fäden aus PLG haben in der Chirurgie eine jahrzehntelange Historie als sicheres Material (MORRIS et al., 1994; BENDIX, 1997). O'HAGAN et al. (1995) untersuchten die Verträglichkeit von PLG-Mikropartikeln an verschiedenen Säugetierarten nach oraler Verabreichung. Sie konnten keine Hinweise auf toxische oder pyrogene Effekte feststellen. Ebenso wenig hatten *in vitro* untersuchte Mikrosphären einen negativen Einfluß auf die Vitalität von Zellen, die zusammen mit einer Mikrosphärensuspension inkubiert wurden (PRIOR et al., 2002).

Keinerlei Immunreaktion konnten MCKEEVER et al. (2002) feststellen, nachdem sie im Tierversuch unbeladene Mikrosphären aus PLG verabreicht hatten. Mit Plasmid-DNS (pDNS) beladene Mikrosphären aus demselben Polymer erzeugten dagegen eine deutliche Immunantwort gegen das von der pDNS kodierte Protein.

Nach Applikation von Mikrosphären aus PLG mit eingekapseltem Antigen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine gesteigerte Immunantwort im Vergleich mit ungeschütztem Antigen beobachtet (O'HAGAN et al., 1989; ELDRIDGE et al., 1991; O'HAGAN et al., 1991; CHALLACOMBE et al., 1992; JONES et al., 1996; MATHIOWITZ et al., 1997; IGARTUA et al., 1998; KANEKO et al., 2000; STURESSON und WIKINGSSON, 2000; WANG et al., 2005).

Für den Mechanismus, der zu der beobachteten Potenzierung der Immunreaktion führt, gibt es unterschiedliche Erklärungen:

- Es kann ein Depoteffekt auftreten, wie er bei der Verwendung von Adjuvantien in Adsorbatimpfstoffen auftritt.
- Die direkte Aufnahme von Antigen beladenen Mikrosphären durch antigenpräsentierende Zellen, wie Makrophagen oder dendritische Zellen, kann eine T-Zellaktivierung hervorrufen und dadurch eine humorale Immunantwort induzieren.

- Die verzögerte Freisetzung von Antigenen stimuliert das Immunsystems über einen längeren Zeitraum.

Vergleichende Untersuchungen zu den immunologischen Effekten nach Applikation von pDNS in Injektionslösung bzw. eingekapselt in Mikrosphären aus PLG ergaben, daß die Immunantwort nach Applikation von Mikrosphären stärker ausfiel bzw. geringere Antigenmengen notwendig waren (ELDRIDGE et al., 1991; JONES et al., 1996; IGARTUA et al., 1998; STURESSON und WIKINGSSON, 2000; WANG et al., 2005). O'HAGAN et al. (1991) führten dies auf einen Adjuvanseffekt des Polymers zurück, wobei dieser allerdings als geringer eingeschätzt wird, als derjenige von Freund's complete adjuvant (FCA). Die verlängerte Antigenpräsentation durch Makrophagen kann zu einer stärkeren Immunität führen und spricht für die Eignung von CRS für die Vakzineherstellung (LUZARDO-ALVAREZ et al., 2005)

2.4.2.2.3. Applikationsmöglichkeiten von Mikrosphären aus PLG

Biologisch abbaubare Polymerpartikel eignen sich zur oralen, intranasalen oder parenteralen Applikation. Bei geeigneter Konfektionierung ist auch eine Anwendung als Aerosol möglich.

Bei oral applizierten CRS in mikropartikulärer Form erfolgt die Aufnahme vor allem durch spezialisierte Zellen in den darmassoziierten lymphatischen Geweben (engl.: **gut associated lymphoid tissue, GALT**). Hier sind phagozytoseaktive Zellen, sog. M- (**microfold**) Zellen im Bereich der Peyer'schen Platten (PP) in Assoziation zu intraepithelialen Leukozyten angeordnet. Die M-Zellen nehmen partikuläre Substanzen aus dem Darmlumen auf und transportieren sie zu den darunterliegenden Lymphozyten weiter (ELDRIDGE et al., 1990; MATHIOWITZ et al., 1997; JEURISSEN et al., 1999). Die spezifische Interaktion zwischen einer eingekapselten Vakzine und den immuninduktiven Geweben im GALT macht die mukosale Immunisierung besonders interessant bei der Bekämpfung von Krankheitserregern, die über die Darmschleimhaut in den Organismus eindringen (WALTER et al., 1999).

Auch bei parenteraler Applikation sind die Zielzellen für die Mikrosphären phagozytoseaktive Zellen (JILEK et al., 2005). Die Vakzinierung kann subkutan (s.c.) oder intramuskulär (i.m.) erfolgen, wobei sich zeigte, daß eine s.c.-Applikation eine stärkere Immunitätsantwort erzeugt als eine i.m.-Applikation. In Untersuchungen an Mäusen erfolgte die Applikation auch häufig durch intraperitoneale Injektion, wobei die Aufnahme und Verteilung der Mikrosphären dann durch Peritonealmakrophagen erfolgte (OFFIT et al., 1994; CHEN et al., 1998; HEDLEY et al., 1998; WALTER et al., 1999).

Versuche mit Mikrosphären aus PLG wurden beim Huhn bisher kaum durchgeführt. Eine Untersuchung des *in vivo*-Verhaltens von Polystyrol-Latex- und PLG-Mikrosphären führten HOSHI et al (1999) nach oraler Applikation bei sieben bis neun Wochen alten Küken durch. Sie beobachteten eine vermehrte Aufnahme von Polystyrol-Latex-Partikeln und von Mikrosphären aus höhermolekularem PLG in die Peyer'schen Platten. Dagegen war die Aufnahme von Mikrosphären aus niedermolekularem PLG in die Peyer'schen Platten geringer.

Erkenntnisse zur *in ovo*-Applikation von Mikrosphären aus PLG gibt es bisher noch nicht. JOCHEMSEN und JEURISSEN (2002) untersuchten die Eignung von partikulären Substanzen für die *in ovo*-Applikation beim Huhn an kolloidalen Kohlepartikeln und Polystyrol-Latex-Partikeln. Sie applizierten die Partikel als Suspension am 16. bzw. 18. Bruttag in die Amnionhöhle. Die Partikel wurden von den Embryonen mit der Amnionflüssigkeit über die Schnabelhöhle aufgenommen und konnten in Lunge und Bronchen sowie im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden.

2.4.2.2.4. Lagerstabilität

Produkte aus PLG und die daraus hergestellten Mikrosphären reagieren hygroskopisch. Lyophilisierte Mikrosphären können in luftdichten Glasröhrchen bei -20 °C aufbewahrt werden, ohne durch Wasseraufnahme zu degradieren. In speziellen luft- und wasserdampfdichten Verpackungsmaterialien oder zusammen mit Trocknersubstanzen können Produkte aus PLG auch bei Raumtemperatur gelagert werden (MIDDLETON und TIPTON, 2000).

2.4.2.2.5. Einkapselungsfähigkeit von Antigenen und Therapeutika

In Polymere kann eine Vielzahl von unterschiedlichen Stoffen mit einem weiten Molekülgrößenbereich ohne negative Beeinflussung ihrer biologischen Wirksamkeit eingekapselt werden (s. Tabelle 1). Darunter befinden sich:

- Proteine und Peptide
- Bakterientoxine und -toxioide
- Chemotherapeutika
- Hormone
- Nukleinsäuren

Wichtige Eigenschaften, welche die Einkapselungs- und Freisetzungsraten beeinflussen, sind die inherente Viskosität (iV) bzw. das Molekulargewicht (M_w), während die Hydrophobizität des verwendeten Polymers vor allem die Phagozytoserate durch Makrophagen beeinflusst (AHSAN et al., 2002; DUVVURI et al., 2006).

Viele Studien befassen sich mit der Einkapselung von Proteinen, vor allem BSA oder OVA als Modellantigen und der anschließenden Charakterisierung der Mikrosphären (CHALLACOMBE et al., 1992; IGARTUA et al., 1998). Nukleinsäuren wurden von mehreren Forschungsgruppen in PLG eingekapselt (JONES et al., 1996; KANEKO et al., 2000; STURESSON und WIKINGSON, 2000; WANG et al., 2005; YUN et al., 2005). CAPAN et al. (1999) erzielten bei Polymeren, die ein höheres M_w aufwiesen und stärker hydrophob waren, eine signifikant höhere Einkapselungsrate von pDNA.

2.4.2.3. Herstellungsverfahren für CRS aus PLG

Kontrollierte Freisetzungssysteme können nach unterschiedlichen Methoden hergestellt werden.

2.4.2.3.1. Doppelemulsionsverfahren

Das Doppelemulsionsverfahren ist diejenige Technologie, welche im Labor am häufigsten angewandt wird, um Mikrosphären zu herzustellen. Es ist identisch mit dem Verfahren, welches in der englischsprachigen Literatur mit *emulsification/solvent evaporation* bezeichnet wird. Die für dieses Verfahren erforderlichen technischen Einrichtungen sind wenig aufwendig.

Die Herstellung erfolgt in mehreren Schritten. Aus dem in Lösungsmittel gelösten Polymer und dem einzukapselnden Stoff in wässriger Lösung wird eine Öl in Wasser (o/w)-Emulsion erstellt, welche anschließend in eine Surfactantlösung einemulgiert wird. Die so hergestellte Wasser in Öl in Wasser (w/o/w)-Emulsion wird rasch in ein größeres Volumen einer Surfactantlösung gegossen, in welche das Lösungsmittel übertritt. Durch diesen Prozess erhärten die anfangs noch weichen Mikrosphären. Die ausgehärteten Mikrosphären werden anschließend gesammelt und lyophilisiert. Sie sind als fertige Mikrosphären gut lagerfähig (COWSAR et al., 1985; WATTS et al. 1990; FREITAS et al., 2005).

Die Größe von Mikrosphären, die mittels des Doppelemulsionsverfahrens hergestellt werden können, ist abhängig von dem verwendeten Polymer, dem Polymer-Lösungsmittel-Verhältnis, der Emulgiergeschwindigkeit und der Konzentration der Surfactantlösung (WATTS et al., 1990).

2.4.2.3.2. Sprühtrockungsverfahren

Die Herstellung von Mikrosphären kann auch im Sprühtrockungsverfahren erfolgen. Dieses in der pharmazeutischen und biochemischen Industrie etablierte Verfahren erfordert einen höheren technischen Aufwand und ist daher für größere Herstellungsmengen geeignet. Es ist für hitzetolerante und hitzesensible, wasserlösliche und unlösliche Substanzen und hydrophobe sowie hydrophile Polymere anwendbar.

Im Sprühtrockungsverfahren können Mikrosphären in einem weiten Größenbereich hergestellt werden, auch für Präparationen, die *per injectionem* verabreicht werden können (WALTER et al., 1999; MU et al., 2001; PRIOR et al. 2002).

2.4.2.3.3. Herstellung von Granulaten, Filmen, Fasern und Implantaten

Verfahren zur Herstellung von CRS in Form von Granulaten, Filmen und Fasern sind in der neueren Literatur seltener vertreten. COWSAR et al. (1985) stellten in einer Publikation eine Reihe von unterschiedlichen Methoden zur Herstellung von CRS vor, darunter auch Granulate aus einer monolithischen Masse aus Polymer und den zu untersuchenden Substanzen. Dieses Granulate können nach Aushärtung auf die gewünschte Kornstärke vermahlen werden. In einem modifizierten Verfahren pressten NAKAOKA et al. (1995) eine w/o-Emulsion aus gelöstem Polymer und OVA zu Strängen und verarbeiteten diese nach Aushärtung weiter zu injizierbaren Partikeln. SCHACHTER und KOHN (2002) beschreiben die Herstellung und das Freisetzungsverhalten von Polymerfilmen.

Nur der Vollständigkeit halber sollen Implantate aus Polymeren als CRS erwähnt werden. Sie werden vor allem beim Menschen in der Knochenchirurgie eingesetzt (WEIHE et al., 2001). In die Implantate können therapeutisch wirksame Komponenten eingearbeitet werden. Ihre Herstellung ist auf spezialisierte Firmen beschränkt (MIDDLETON und TIPTON, 2000).

2.5. Möglichkeiten des Einsatzes von PLG-Mikrosphären als Träger für Nukleinsäurevakzinen beim Geflügel

Während die Applikation von Mikrosphären aus abbaubaren Polymeren im Säuger bereits gut erforscht und dokumentiert ist, sind beim Geflügel kaum Untersuchungen durchgeführt worden. PORTER et al. (1997) untersuchten die Aufnahme von Latexpartikeln unterschiedlicher Größe in intestinale Epithelien an ligierten Darmabschnitten bei acht Wochen alten Küken. Untersuchungen zum Absorptionsverhalten im Darm nach oraler Applikation im Huhn stellten auch HOSHI et al. (1999). Sie applizierten Mikrosphären aus PLG unterschiedlichen Molekulargewichtes sowie Polystyrol-Latex-Partikeln und stellten eine größere Aufnahme von Mikrosphären mit höherem Molekulargewicht in Epithelzellen des Darmes fest.

JOCHEMSEN und JEURISSEN (2002) applizierten kolloidale Kohlepartikel bzw. fluoreszierende Mikrosphären am 16. bzw. 18. Embryonierungstag ins Hühnerei. Sie

konnten eine Verteilung der Mikropartikel im Respirations- sowie Gastrointestinaltrakt der Embryonen feststellen, wenn die Applikation am 18., nicht jedoch am 16. Embryonierungstag erfolgte.

Im Gegensatz zu der spärlich vorhandenen Literatur zur Applikation von Mikropartikeln im Huhn existieren zahlreiche Veröffentlichungen über den experimentellen Einsatz von Nukleinsäuren zur Erzeugung einer Immunität gegen virale Erreger beim Geflügel. Dabei erstreckt sich das Spektrum der molekulargenetisch hergestellten Vakzinen auf fast alle wichtigen Viruserkrankungen beim Huhn, wie Aviäre Influenza, Marek'sche Krankheit, Newcastle Disease, Infektiöse Bursitis und Geflügelpocken (FODOR et al., 1999; GAGIC et al., 1999; SHAW und DAVISON, 2000; CHANG et al., 2002; DUNHAM, 2002; HULSE und ROMERO, 2002; SILVA, 2002; BUTTER et al., 2003; CHANG et al., 2003; CAO et al., 2005; RONG et al., 2005). Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mit DNS-Vakzinen ein guter Schutz vor Feldinfektionen erreicht werden könnte.

Im Säugetiermodell konnte mit DNS-Vakzinen, die in Mikrosphären aus PLG eingekapselt wurden, schon nachgewiesen werden, dass dieses Applikationssystem geeignet, ist eine Immunität gegen virale Erreger zu erzeugen. Entsprechende Erkenntnisse beim Geflügel fehlen bislang. Zwar haben JOCHEMSEN und JEURISSEN (2002) gezeigt, dass partikuläre Substanzen, *in ovo* appliziert, von den Embryonen vertragen werden, *in ovo*-Untersuchungen zur Eignung von PLG-Mikrosphären wurden jedoch noch nicht durchgeführt. PORTER et al. (1997) wiesen die Aufnahme von PLG-Mikrosphären in darmassoziierte Gewebe bei älteren Küken nach. Die Übertragung der Ergebnisse auf Hühnerembryonen und Eintagsküken steht noch aus. Studien zur Applikation von ungeschützter pDNS beim Huhn existieren zwar bereits (CHANG et al., 2002; CHANG et al., 2003). Allerdings sind mehrfache Injektionen großer pDNS-Mengen erforderlich, um eine schützende Immunität zu erreichen, was für große Tierbestände unpraktikabel ist.

3. Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie ist es, mit der Entwicklung eines CRS zur DNS-Vakzinierung eine neue Impfstoffformulierung für die orale bzw. *in ovo*-Applikation beim Huhn auf der Basis eines CRS zu entwickeln. Den Erfordernissen der Geflügelproduktion entsprechend soll die konzipierte Modellvakzine zur Massenapplikation geeignet sein, d. h. sie sollte den technischen Anforderungen vollautomatischer Injektionsmaschinen entsprechen. Andererseits sollte sie auch zur individuellen Injektion ins Tier geeignet sein.

Der Impfstoff soll sowohl sicher für den Hühnerembryo als auch für das Küken nach dem Schlupf sein. Als Grundlage soll daher kein Lebendimpfstoff, sondern pDNS eingesetzt werden. Mit der Entwicklung von DNS-Vakzinen wurden in den letzten Jahren nicht nur experimentell, sondern auch im kommerziellen Einsatz gute Erfolge erzielt. DNS-Vakzinen haben sich zwar als sicher, gut verträglich und effektiv erwiesen, ein Nachteil dieser Vakzinen liegt jedoch darin, daß sie meist parenteral als Einzeltierapplikation verabreicht werden. Oral verabreichte Nukleinsäurevakzinen verlieren während der Magendarmpassage und im Gewebe rasch an Wirksamkeit.

Um Infektionserregern am Ort der Invasion in den Wirtsorganismus zu begegnen, soll durch die neue Impfstoffformulierung eine lokale Stimulation der intestinalen Schleimhaut erfolgen und eine Darmimmunität erzeugt werden. Damit die pDNS während der Passage des Magendarmtraktes vor Degeneration geschützt ist, soll sie in eine Matrix aus PLG eingebettet werden.

Durch die Verwendung von unterschiedlichen PLG-Spezifitäten soll herausgefunden werden, welche PLG-Formulierung am besten geeignet ist, ein CRS in Form von Mikrosphären für eine pDNS beladene Vakzine herzustellen.

Neben der morphologischen Charakterisierung der Mikrosphären soll die Verträglichkeit in lebenden Zellkulturen nachgewiesen werden. Es soll untersucht werden, ob eine *in vitro*-Aufnahme der Mikrosphären durch Hühnermakrophagen erfolgt. Insbesondere soll untersucht werden, ob durch die Inkubation von Makrophagenzellkulturen mit den erzeugten

Mikrosphären eine Aktivierung der Makrophagen erfolgt. Die Stabilität der pDNS und ihre Integrität nach dem Herstellungsvorgang soll durch die Expression der eingekapselten Modell-pDNS durch zelleigene Mechanismen nachgewiesen werden.

Untersuchungen zur *in vivo*-Verträglichkeit der Mikrosphären sollen durch Injektion in embryonierte Hühnereier am 18. Bebrütungstag erfolgen. Weiterhin soll am Eintagsküken einerseits die Eignung der Mikrosphären als injizierbare Vakzine, andererseits ihre Verträglichkeit nach oraler Applikation überprüft werden.

Als Modell-pDNS für die Einkapselung in PLG wird der eukaryotische Expressionsvektor pCR[®]3.1/CAT eingesetzt.

4. Material

4.1. Hühner und Hühnereier

Für die Untersuchung der Verträglichkeit von *in ovo* verabreichten Mikrosphären wurden spezifisch-pathogenfreie (SPF*)-Valo®-Hühnerbruteier (Firma Lohmann, Cuxhaven) verwendet.

Sie wurden unter Standardbedingungen (Vorbrut: 37,8 °C, 60 % rel. Luftfeuchtigkeit; Schlupfbrut: 37 °C, 80 % rel., Luftfeuchtigkeit) bis zum 21. Embryonierungstag in einem Brutschrank (Fa. Grumbach, Wetzlar) an der Klinik für Geflügel der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover bebrütet.

Für *in vivo*-Versuche nach dem Schlupf wurden SPF-Hühnerbruteier unter gleichen Bedingungen bis zum Schlupf erbrütet und die Tiere wurden anschließend in Isolatoren (Montaim Van Stratum, Sevenum, Kronsberg, NL) unter positivem Druck aufgezogen. Die Fütterung erfolgte mit handelsüblichem Alleinfuttermittel (all-masch Legemehl, Fa. Deuka). Futter und Wasser wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

4.2. Zelllinien

4.2.1. Hühner-Embryo-Fibroblasten (Chicken embryo fibroblasts, CEF)

Hühner-Embryo-Fibroblasten wurden aus zehn- Tage lang bebrüteten SPF-Hühnerembryonen gewonnen. Diese Zellen dienten in den Transfektionsversuchen mit Plasmid-DNS als Bestätigung für das Funktionieren des Systems.

*) Spezifisch-Pathogen-frei.

SPF-Status: frei von: Kükenanämievirus, Aviäre Adenoviren (Serotypen 1 – 12, EDS) Aviäres Encephalomyelitis-Virus, Geflügelleukose-Virus/RSV (inkl. Serotyp ALV-J), Aviäres Nephritis-Virus, Aviäre Reoviren, Hühnerpockenvirus, Infektiöses Bronchitis-Virus, Infektiöses Bursitis-Virus, Infektiöses Laryngotracheitis-Virus, Influenza-Virus Typ A, Marek's Disease-Virus, *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma synoviae*, Newcastle-Disease-Virus, Retikuloendotheliose-Virus, *Salmonella Pullorum*, andere Salmonellen, Aviäres Rhinotracheitis-Virus (ART), *Avibacterium paragallinarum*.

4.2.2. Hühnermakrophagenzelllinie HD11

Die Zellen der Linie HD11 wurden von Prof. Dr. B. Kaspers, Institut für Physiologie der Ludwig Maximilian Universität, München, zur Verfügung gestellt.

Es handelt sich hierbei um eine myelomonozytäre Hühnerzelllinie, welche durch Transformierung von Hühnerknochenmarkszellen mit dem replikationsdefizienten aviären Leukämievirus MC 29 entwickelt wurde (BEUG et al., 1979).

Diese transformierten Zellen haben Makrophageneigenschaften, exprimieren Fc-Rezeptoren und Makrophagenoberflächenantigene. Sie reagieren auf Monozyten-Makrophagen-aktivierende Signale, wie Lipopolysaccharid (LPS), welches ihre Phagozytoseaktivität verstärkt und die Produktion von Zytokinen und Metaboliten wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1 (IL-1) und Stickoxid (NO) induziert (BEUG et al., 1979). Die Zellen wachsen schwach adherent.

Diese Zellen wurden zu *in vitro*-Phagozytoseversuchen von Mikrosphären und für Transfektionen mit den Plasmiden pCR[®]3.1/CAT und pEGFP verwendet.

4.2.3. Hühnermakrophagenzelllinie MQ-NCSU

Als weitere Zelllinie wurde die Hühnermonozyten-Zelllinie MQ-NCSU verwendet. Diese Zelllinie entstammt transformierten Milzzellen einer Dekalb XL-Henne, die experimentell mit dem JM/102W-Stamm des Marek's Disease Virus infiziert worden war (QURESHI et al., 1990).

Die kulturellen, morphologischen und funktionalen Charakteristika der MQ-NCSU-Zelllinie weisen darauf hin, daß diese maligne veränderte Hühnerzelllinie zur Reihe der mononukleären Phagozyten gehört. Sie können ebenfalls durch aktivierende Signale stimuliert und zur Produktion von Zytokinen und reaktiven Metaboliten angeregt werden. Es handelt sich um eine adherent wachsende Zelllinie (QURESHI et al., 1990).

Die MQ-NCSU-Zellen wurden für *in vitro*-Phagozytoseversuche mit Mikrosphären und zu Transfektionsversuchen verwendet.

4.3. Bakterien

Zur Vermehrung der Vektoren pCR[®]3.1/CAT und pEGFP wurden One Shot[®] TOP 10F' ultrakompetente *Escherichia-Coli*-Bakterien (Invitrogen[®] life technologies) verwendet. Die *E. coli* wurden in LB-Brühe mit 1 % Ampicillinzusatz nach Transformation mit pCR[®]3.1/CAT bzw. mit 3 % Kanamycinzusatz nach Transformation mit pEGFP vermehrt (Kap. 4.6).

4.4. Plasmide

4.4.1. pCR[®]3.1/CAT-Vektor (Invitrogen[®] life technologies)

Als Modell-pDNS wurde das kommerziell erhältliche Plasmid pCR[®]3.1/CAT in Verbindung mit Kaninchen- α -CAT-Antikörpern (Invitrogen[®] life technologies) (Kap. 4.8.) eingesetzt. Dieses Plasmid mit einer Größe 5060 Basenpaaren (bp) trägt folgende, für die Expression von CAT notwendigen Eigenschaften:

- *Cytomegalovirus (CMV) immediate-early promotor* für eine hohe Expressionsrate der geklonten Gene
- *T7 promotor* und *priming site* für die Transkription von sense RNS und zur Sequenzierung des Inserts
- *TA Cloning[®] site* zur Insertion von Taq Polymerase generierten PCR-Produkten
- *Polylinker* als Restriktionsstellen zum Ausschneiden des PCR-Produktes bei Bedarf
- *BGH reverse priming site* zur möglichen Sequenzierung des Inserts
- *Bovine growth hormone polyadenylation signal* zur Stabilisierung und effektiven Terminierung der mRNS
- *SV 40 early promotor* zur Expression der Resistenzgene gegen Kanamycin
- *Ampicillin resistance gene* zur Selektion und Vermehrung in *E. coli*
- *pUC origin* für Replikation, Vermehrung und hohe Kopienanzahl in *E. coli*

Das CAT-Gen, kodierend für das Enzym Chloramphenicol-acetyltransferase (CAT), ist in die *multiple cloning site* inkloniert.

4.4.2. pEGFP-Vektor (BD Biosciences Clontech)

Das Plasmid pEGFP wurde in Transfektionsversuchen als unmittelbare positive Transfektionskontrolle eingesetzt, da transfizierte Zellen ohne weitere Detektionsschritte unter blauem Anregungslicht im Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden können.

Dieses 4700 bp große Plasmid schließt Gene ein, die für eine nach rot verschobene Variante des Wildtyp Green Fluorescent Proteins (GFP) der Meeresqualle *Aequorea victoria* kodieren. Das Exzitationsmaximum liegt bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 507 nm. Gegenüber dem Wildtyp-GFP bewirkt die Expression der mutierten Gene eine hellere Fluoreszenz (CHALFIE et al, 1994; CHALFIE, 1995).

4.5. Zellkulturmedien

Medium für CEF

Leibowitz's L-15 Medium ohne L-Glutamin	150 ml
McCoy's Medium	150 ml
hitzeinaktiviertes FBS	10 %
L-Glutaminlösung (200 mM)	1 %
Penicillin-Streptomycin (10.000 IE/10 mg/ml)	1 %

Medien für MQ-NCSU-Makrophagen

Vollmedium (zum Einfrieren und Anwachsen nach Lagerung bei -70°C)	
Leibowitz's L-15 Medium ohne Glutamin	150 ml
McCoy-Medium mit L-Glutamin	150 ml
L-Glutaminlösung (200 mM)	1 %
Tryptosephosphatbrühe	5 %

Hünerserum	20 %
hitzeinaktiviertes FBS	10 %
Penicillin-Streptomycin (10.000 IE/10 mg/ml)	1 %

Erhaltungsmedium

Leibowitz's L-15 Medium ohne Glutamin	150 ml
McCoy-Medium mit L-Glutamin	150 ml
L-Glutaminlösung (200 mM)	1 %
Tryptosephosphatbrühe	1,7 %
Hünerserum	5 %
hitzeinaktiviertes FBS	10 %
Penicillin-Streptomycin (10.000 IE/10 mg/ml)	1 %

Viertel-Medium

Leibowitz's L-15 Medium ohne Glutamin	150 ml
McCoy-Medium mit L-Glutamin	150 ml
L-Glutaminlösung (200 mM)	0,5 %
Tryptosephosphatbrühe	1,3 %
Hünerserum	1,7 %
hitzeinaktiviertes FBS	3 %
Penicillin-Streptomycin (10.000 IE/10 mg/ml)	1 %

Mager-Medium (für längere Kultivierung im selben Kulturgefäß)

Leibowitz's L-15 Medium ohne Glutamin	150 ml
McCoy-Medium mit L-Glutamin	150 ml
L-Glutaminlösung (200 mM)	0,5 %
Tryptosephosphatbrühe	0,7 %
Hünerserum	0,8 %
hitzeinaktiviertes FBS	1,7 %
Penicillin-Streptomycin (10.000 IE/10 mg/ml)	1 %

Medium für Transfektionen

OPTI-MEM[®] 1 Reduced Serum Medium (GIBCO BRL Life Technologies)

Tryptosephosphatbrühe (TBP)

Tryptosephosphat		29,5 g
A. bidest.	ad	1000 ml

sterilfiltriert, Aufbewahrung bei 4°C

4.6. Bakterienkulturmedien

Luria-Bertani (LB)-Medium, pH 7,0 (GIBCO BRL)

mit 1 % Ampicillin	für <i>E. coli</i> mit pCR [®] 3.1/CAT
mit 3 % Kanamycin	für <i>E. coli</i> mit pEGFP

Luria-Bertani (LB)-Agar (GIBCO BRL)

15 g Agar/l	
mit 1 % Ampicillin	für <i>E. coli</i> mit pCR [®] 3.1/CAT
mit 3 % Kanamycin	für <i>E. coli</i> mit pEGFP

SOC-Medium

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
Glucose	3,6 g
A. bidest.	ad 1000 ml

4.7. Puffer und Lösungen

Bromphenol-Blau-Saccharose-Ladepuffer

Bromphenol-Blau	0,25 % (w/v)
-----------------	--------------

Saccharose 40 % (w/v)
in A. bidest.

Mowiol®-Eindeckmedium

Mowiol® 4-88 2,4 g
Glycerol 6 ml
200 mM TRIS-HCl (pH 8,5) 12 ml
A. bidest. ad 25 ml

~ 3 h im Wasserbad bei 50 °C lösen

Lösung durch einen 0,45 µm Membranfilter filtrieren

in Aliquots bei -20 °C aufbewahren

Lösungen für den Stickoxid-Test

Standard-Lösung 1 mM NaNO₂ in A. bidest., bei 4 °C aufbewahren

Griess-Reagenz A 1 % Sulfanilamid in A. bidest.

Griess-Reagenz B 0,1 % N-(1-Naphtyl)ethylendiamindihydrochlorid
5 % H₃PO₄ in A. bidest.

beide Reagenzien getrennt bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahren

und erst kurz vor der Verwendung 1:1 mischen

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung), pH 7,4

NaCl 137 mM
KCl 2,7 mM
NaHPO₄ 10 mM
KH₂PO₄ 2 mM
A. bidest. ad 1000 ml

TNE-Puffer pH 8,0

NaCl 100 mM
TRIS-HCl 10 mM
EDTA 1 mM
A. bidest ad 1000 ml

Trisacetat-EDTA (TAE)

Trisacetat	40 mM
EDTA	1 mM
A. bidest.	ad 1000 ml

Tris-EDTA (TE), 10-fache Lösung

Tris-Cl	100 mM
EDTA	10 mM
A. bidest	ad 1000 ml

Trypsinlösung

Natriumbikarbonat	200 mM in A. bidest.
Trypsin	25 µg/ml

4.8. Antikörper**4.8.1. Kaninchen- α -CAT-Antikörper**

Diese Antikörper wurden als primäre Antikörper in Verbindung mit FITC-konjugierten Antikörpern zum Nachweis der CAT-Genexpression nach Transfektionsversuchen eingesetzt. Die Antikörper wurden als Anti-CAT-Serum mit 1,0–2,0 mg Protein/ml bezogen (Invitrogen™ living science). Sie wurden in einer Gebrauchsverdünnung von 1 : 200 eingesetzt.

4.8.2. FITC-konjugierte Antikörper

Polyklonale FITC-konjugierte Ziege- α -Kaninchen-Antikörper (Sigma) wurden im Immunfluoreszenzantikörpertest als sekundäre Antikörper in Verbindung mit α -CAT-Antikörpern eingesetzt. Sie wurden in einer Gebrauchsverdünnungen von 1 : 200 eingesetzt.

4.9. Verwendete Analysekits

Tabelle 2: Eingesetzte Ananlyseskits

Bezeichnung	Hersteller
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIA Giga Kit	Qiagen

4.10. Transfektionsreagenz

Für die Einschleusung von pDNS in eukaryotische Zellen wurde das Reagenz Lipofectamin™ Reagent (GibcoBRL® life technologies, Konzentration der Stammlösung: 2 mg/ml) gemäß dem Herstellerprotokoll eingesetzt.

4.11. Polymere

Zur Herstellung von Mikrosphären zur Einkapselung von pDNS wurden Polymere aus Poly(D,L-lactide-co-glycolide, DL-PLG) im D,L-Lactide:Glycolide-Verhältnis von 50:50 (nominal) mit unterschiedlichen Spezifikationen eingesetzt. Die einzelnen Polymere wurden separat oder in Mischungsverhältnissen zueinander verwendet, um die Eigenschaften der erzeugten Mikrosphären zu modifizieren.

4.11.1. Lactel® BP-0100 (Sigma)

Dieses Polymer wird vom Vertreiber (Sigma) als D,L-Laktid:Glykolid-Copolymer im Verhältnis 50:50 spezifiziert, mit einem Molekulargewichtsbereich (M_w) von 40 000 - 70 000. Das Rohmaterial liegt als dunkelgelbes, durchsichtiges Granulat mit Korngrößen von etwa 1,2 - 4 mm Durchmesser vor.

4.11.2. Lactel[®] 50DG040 (Birmingham)

Der Hersteller dieses 50:50-DLPLG gibt als Mischungsverhältnis einen Bereich von 45:55 für beide Monomere an. Anstelle des Molekulargewichtes wird die Zähigkeit als inhärente Viskosität (η_V) angegeben. Sie beträgt für Lactel[®] 50DG040 nach Herstellerangaben 0,39 dl/g bei 30 °C. Das Polymer liegt als dunkelgelbes, durchsichtiges Granulat mit Korngrößen von etwa 1,2 - 4 mm Durchmesser vor.

4.11.3. Lactel[®] 50DG065 (Birmingham)

Das Copolymerverhältnis von D,L-Laktid zu Glykolid bei diesem Polymer wird vom Hersteller mit 45:55 für die entsprechenden Monomere angegeben. Die inhärente Viskosität beträgt 0,58 dl/g bei 30 °C. Das Polymer wird als hellgelbes, durchsichtiges Granulat mit Korngrößen von etwa 1,2 - 3 mm Durchmesser geliefert.

4.11.4. Resomer[®] RG 503H

Dieses 50:50-DLPLG unterscheidet sich von den vorher genannten Polymeren dadurch, daß es stärker hydrophil ist. Die inhärente Viskosität von Resomer[®] RG 503H wird vom Hersteller mit 0,42 dl/g angegeben. Das Polymer liegt als rohweißes Pulver vor.

Das in den Versuchen verwendete Resomer[®] RG 503H war ein Geschenk der Firma Boehringer Ingelheim KG, Deutschland.

Alle verwendeten Polymere wurden in der Originalverpackung oder anderen gut schließenden Behältnissen zusammen mit Kieselgel bei -20 °C aufbewahrt, da das Material hygroskopisch ist. Vor der Verwendung wurden die verschlossenen Packungen mind. eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut, um einen Niederschlag von Kondenswasser in der Packung zu vermeiden.

4.12. Lösungsmittel

Als Lösungsmittel zur Erstellung der organischen Phase für die Herstellung von Mikrosphären wurde entweder Methylenchlorid (CH_2Cl_2 , Aldrich) oder Ethylacetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, Sigma) eingesetzt.

4.13. Oberflächenaktive Substanz

Als oberflächenaktive Substanz wurde Polyvinylalkohol (Sigma) in der wässrigen Phase bei der Herstellung von Mikrosphären in Konzentrationen von 0,5 - 8 % (w/v) eingesetzt. Der verwendete Polyvinylalkohol (PVA) hat einen M_w -Bereich von 30.000 - 70.000.

4.14. Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Vertreiber
Calciumchlorid (CaCl_2)	Riedel-de Haën Ag
Chloroform reinst	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Ethanol reinst	Merck
Ethidiumbromid	Amersham Life Science
Ethylacetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	Sigma
Glucose	Sigma
Glycin	Merck
Glycerol	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck

LE-Agarose	SeaKam
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
Methylenchlorid (CH ₂ Cl ₂)	Aldrich
Mowiol [®] 4-88	Fluka
N-(1-Naphtyl)ethylendiamindihydrochlorid	Sigma
Natriumacetat	Serva
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck
Poly-L-Lysin	Sigma
Polyvinylalkohol	Sigma
Salzsäure (HCl)	Merck
Saccharose	Sigma
Sulfanilamid	Sigma
Tris-Base	Sigma
Tris-EDTA 100x	Sigma
Tris-HCl	Boehringer Mannheim
Triton [®] X-100	Sigma
Trypsin-Lösung	Difco

5. Methoden

5.1. Zellkulturtechnik

5.1.1. Herstellung von Hühnerembryofibroblasten (CEF)

Die Herstellung der CEF wurde nach dem Protokoll von SCHAT und PURCHASE (1998) durchgeführt. Nach Desinfektion der zehn Tage lang bebrüteten Eier wurden die Embryonen steril entnommen, Kopf, Extremitäten und Viscera entfernt und die Karkasse in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Durch 10 - 20-minütige Inkubation mit 1 %iger Trypsinlösung (Difco) unter langsamem Rühren bei 37 °C wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellsuspension wurde 10 min bei Raumtemperatur bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit Wachstumsmedium (Kap. 4.6.) auf eine Zelldichte von $7,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt.

5.1.2. Kultivierung der permanenten Zelllinien

Die MQ-NCSU-Makrophagen wurden bei 41°C unter 5%iger CO₂-Atmosphäre in Leibowitz's L-15-McCoy-Medium, HD11-Makrophagen in RPMI-1640-Medium kultiviert.

Für die Passagen wurden die permanenten Zelllinien einmal mit 37 °C warmem PBS gewaschen und anschließend durch Abklopfen vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Die Zellen wurden in 20 ml Medium aus der Zellkulturflasche gespült und bei Zimmertemperatur mit 300 x g pelletiert. Das Pellet wurde mit 9 ml Medium resuspendiert, im Verhältnis von 1:10 bis 1:20 mit Medium verdünnt und in neue Zellkulturflaschen überführt.

CEF-Zellen wurden jede Woche neu hergestellt, die Zellen der permanenten Zelllinien wurden zweimal wöchentlich passagiert. Sofern nicht anders beschrieben, wurden CEF-

Zellen und Zellen der permanenten Zelllinien in 75 cm²-Polystyrol-Zellkulturflaschen (Nunc) kultiviert.

Für die *in vitro*-Versuche wurden die Zellen ausgezählt und in die entsprechenden Zellkultur-platten ausgesät.

5.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen der permanenten Zelllinie MQ-NCSU, die nicht unmittelbar für Versuche gebraucht wurden, wurden in Wachstumsmedium mit 10 % fetalem bovinem Serum (FBS, PAA) und 10 % DMSO (Merck) resuspendiert und in Aliquots von 1 ml in Cryo-Röhrchen (Corning Costar Corp., Cambridge, MA) bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Das Auftauen von Zellen erfolgte im 37 °C warmen Wasserbad unter Schwenken. Nach Zugabe von 20 ml 37 °C warmen Vollmediums wurde das DMSO durch Zentrifugieren (Jürgens Megafuge 1.0, Heraeus Sepatech) für 5 min bei 300 x g und Raumtemperatur vom Zellpellet abgetrennt. Das Zellpellet wurde in 9 ml Vollmedium resuspendiert und in eine Polystyrol-Zellkulturflasche (75 cm²) überführt. Nach 72 - 96 h wurden nicht adherente Zellen durch Waschen mit PBS entfernt, die adherenten Zellen durch Abklopfen vom Flaschenboden gelöst, in 20 ml Vollmedium aufgenommen und bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Medium aufgenommen, auf eine Zellzahl von 8 x 10⁵ Zellen/ml eingestellt und in eine neue Kulturflasche überführt.

Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wurde von Vollmedium auf Erhaltungsmedium umgestellt. Da die MQ-NCSU-Zelllinie sich als besonders gut wachsend herausstellte, wurde zur Steuerung der Wachstumsgeschwindigkeit dieser Zellen bei einigen Untersuchungen das Erhaltungsmedium durch Verringerung der Nährstoffgehalte reduziert (Kap. 4.5).

5.2. Molekularbiologische Methoden

5.2.1. Bestimmung der Größe von DNS-Molekülen mittels Agarosegel-Elektrophorese

Die Überprüfung der Größe von Plasmiden und DNS-Fragmenten erfolgte mit der Agarosegel-Elektrophorese. Dabei werden DNS-Moleküle der Größe nach in einem Agarosegel im TAE-Pufferbad durch Anlegen einer elektrischen Spannung aufgetrennt. Die entstehenden Banden können durch Anfärben mit Ethidium-Bromid, welches sich durch Interkalierung an die DNS anlagert und unter UV-Licht ein orangefarbenes Licht emittiert, sichtbar gemacht werden.

15 µl DNS-Suspension wurden mit 5 µl Laufpuffer (Bromphenol-Blau-Saccharose-Puffer) vermischt und neben einem DNS-Größenstandard (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) in einem 1 %igen (w/v) Agarosegel in TAE-Puffer bei 67 V über einen Zeitraum von 48 min elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde 10 min mit Ethidium-Bromid (Amersham Life Science, 0,5 µg/ml A. bidest.) gefärbt, anschließend kurz gewässert und die angefärbten Banden unter einer UV-Lichtquelle (Intas 3400, Göttingen) mit dem Größenstandard verglichen.

5.2.2. Bestimmung der Konzentration von DNS-Präparationen durch UV-Absorptionsmessung (OD-Wertmessung)

Durch die Bestimmung der UV-Absorption kann die Konzentration von Nukleinsäure in einer Lösung berechnet werden. Die Messung erfolgte bei 260 nm und 280 nm in Quarzküvetten mit einem Meßweg von 5 mm. Für die Messung wurden DNS-Lösungen, je nach Präparation einfach, 10-fach oder 100-fach verdünnt, eingesetzt. Eine Umrechnung der Messdaten bei 260 nm in µg/µl erfolgte durch das Meßsystem (GeneQuant pro, RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK). Durch die Bildung des Quotienten 260/280

wird die Reinheit der untersuchten DNS-Lösung bestimmt, wobei als Richtwert für gute DNS-Qualität ein Wert von 1,8 gilt.

5.2.3. Transformation von chemisch kompetenten Zellen

Um die Plasmide pCR[®]3.1/CAT und pEGFP für die Transfektion von Zellen und die Einkapselung in PLG zu vermehren, wurden chemisch kompetente *E. coli* transformiert (SAMBROOK et al, 2001). Die bei -70 °C in 50 µl-Aliquots gelagerten ultrakompetenten *E.coli* wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut. Die Plasmidsuspension wurde ebenfalls aufgetaut, kurz zentrifugiert und auf Eis gekühlt. 2 µl der Plasmidsuspension wurden vorsichtig zu den Zellen pipettiert, durch langsames Rühren mit der Pipettenspitze in die Zellsuspension eingemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Wasserbad für genau 30 s einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt. Nach Hinzufügen von 250 µl SOC-Medium wurde die Mischung 60 min bei 225 rpm und einer Temperatur von 37 °C inkubiert.

50 µl bzw. 100 µl der Bakteriensuspension wurden anschließend auf zwei vorbereitete LB-Agarnährböden mit Antibiotikumzusatz ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Da der Expressionsvektor pCR[®]3.1 über Antibiotikaresistenzgene verfügt, wuchsen positiv transformierte *E. coli*, die ein Plasmid aufgenommen hatten, in weißlichen Einzelkolonien. Sie dienten als Ausgangsprodukt für die anschließende Vermehrung.

5.2.4. Vermehrung eines positiv transformierten Klones

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine kleine Menge der Bakterienkolonie entnommen, in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikumzusatz überführt und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde als Startersuspension für die Produktion größerer Plasmidmengen verwendet.

5.2.5. Kontrolle der Aufnahme des korrekten Plasmids

Die Bestätigung der Aufnahme des richtigen Plasmides erfolgte durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen. Nach Aufreinigung einer Plasmidpräparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben wurde die pNDS mit dem Restriktionsenzym NheI (10 IE/ μ l Stammlösung) fragmentiert. In ein Reaktionsgefäß wurden

- 7 μ l Plasmid-Suspension
- 2 μ l Puffer
- 1 μ l Restriktionsenzym
- 10 ml Reinstwasser

gegeben, zwei Stunden bei 37°C inkubiert und die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Vergleich der Fragmente erfolgte mit einem Größenstandard.

5.2.6. Plasmidvermehrung und -isolierung

Zur Erzeugung von größeren Mengen an pDNS wurden 125 μ l der Startersuspension in 250 ml LB-Medium mit Antibiotikumzusatz überführt und in Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurden die Bakterien für 15 min bei 6000 x g und 4 °C pelletiert, der Überstand verworfen und die Pellets bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C eingefroren.

Pellets von ca. 5 l Bakteriensuspension wurden anschließend gemeinsam weiterverarbeitet. Nach Auftauen der Bakterienpellets bei Raumtemperatur erfolgte die Isolierung und Aufreinigung der Plasmide mit dem Qiagen Plasmid Giga Kit (Qiagen) nach dem vom Hersteller bereitgestellten Protokoll.

5.3. Transfektion von eukaryotischen Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen von nackter DNS in eukaryotische Zellen. Die DNS wird dabei nicht in das zelleigene Genom eingebaut, sondern als Vorlage für die Synthese der kodierten Proteine durch Replikationsmechanismen der Zellen genutzt.

Mit den Plasmiden pCR[®]3.1/CAT und pEGFP wurden CEF-Zellen sowie die Makrophagenzelllinien HD11 und MQ-NCSU transfiziert.

In Polystyrol-Zellkulturplatten (Nunc) mit 24 Kavitäten wurden sterile Deckgläschen mit 12 mm Durchmesser (Marienfeld) eingelegt, Zellen (5×10^5 /ml) darauf ausgesät und in dem für die jeweilige Zellart geeigneten Medium bis zum Erreichen eines 80 - 90 % konfluenten Zellrasens vermehrt. Für jede Transfektion wurden 1 - 2 µg pDNS in 100 µl serumfreiem Medium mit 5 µl Lipofectamin[™] 2000-Reagenz in 100 µl serumfreiem Medium 30 min bei Raumtemperatur komplexiert, dann 800 µl serumfreies Medium zugefügt und die Mischung zu den Zellen gegeben.

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C (CEF) bzw. 41 °C (MQ-NCSU, HD11) in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre für zwei bis 24 Stunden. Durch Hinzufügen von je 1 ml Medium mit doppeltem Serumgehalt pro Kavität wurde die Inkubationsdauer beendet und die Expressionsphase eingeleitet. Dies erfolgte zwei, fünf, 12, 18 bzw. 24 Stunden nach Aufbringen der Transfektionsmischung, um die am besten geeignete Inkubationsdauer zu ermitteln. Die Untersuchung auf Genexpression erfolgte 12 h bis 72 h nach Transfektionsbeginn.

Eine Inkubationsdauer von fünf Stunden vor Aufbringen des nährstoffreichen Mediums ergab die deutlichste Fluoreszenz und wurde für weitere Transfektionen von Zellkulturen beibehalten.

Eine Variation des Verhältnisses von Plasmid zu Transfektionsreagenz im Bereich von 1 - 2 µg DNS auf 5 µl Transfektionsreagenz ergab keine Unterschiede in der Ausprägung der Fluoreszenz.

5.4. Nachweis der Proteinexpression bei transfizierten Zellkulturen

5.4.1. Nachweis der Expression von CAT im Immunfluoreszenzantikörpertest

Für den Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) wurden die auf den Deckgläschen haftenden, mit pCR[®]3.1/CAT transfizierten Zellen 5 min mit PBS gewaschen, anschließend mit 500 µl 3 %igem Paraformaldehyd (Merck)/Kavität überschichtet und 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen einmal 5 min mit PBS, dem 1 % Glycin (Sigma) zugesetzt worden war, gewaschen. Um eine intrazelluläre Antikörperbindung zu ermöglichen, wurde die Zellwand durch kurzzeitige Überschichtung des Zellrasens mit 500 µl 0,2 % Triton[®] X-100 (Sigma) in PBS (v/v) pro Kavität permeabilisiert. Nach Inkubation mit dem primären Antikörper für eine Stunde in feuchter Kammer wurden die Zellen dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Die anschließende Inkubation mit dem Fluoreszein-konjugierten Antikörper erfolgte in feuchter Kammer für 1 h im Dunkeln. Nach drei Waschgängen von je 5 min mit PBS und einem 5-minütigen Waschgang mit A. bidest. wurden die Deckplättchen entnommen und mit Mowiol-Eindeckmedium auf Objektträger geklebt. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4 °C getrocknet und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica) begutachtet.

5.4.2. Nachweis von der Expression von GFP

Zum Nachweis der GFP-Expression wurden Zellen, die mit pEGFP transfiziert worden waren, nach 15 minütigem direkt Fixieren mit 3 %igem Paraformaldehyd dreimal je 5 min mit PBS und einmal 5 min mit A. bidest. gewaschen und ohne weitere Behandlung eingedeckt. Nach dem Trocknen wurden sie unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

5.5. Mikrosphären

Abbildung 2: Herstellung von pDNS-enthaltenden Mikrosphären im Doppelmulsionsverfahren, Schema

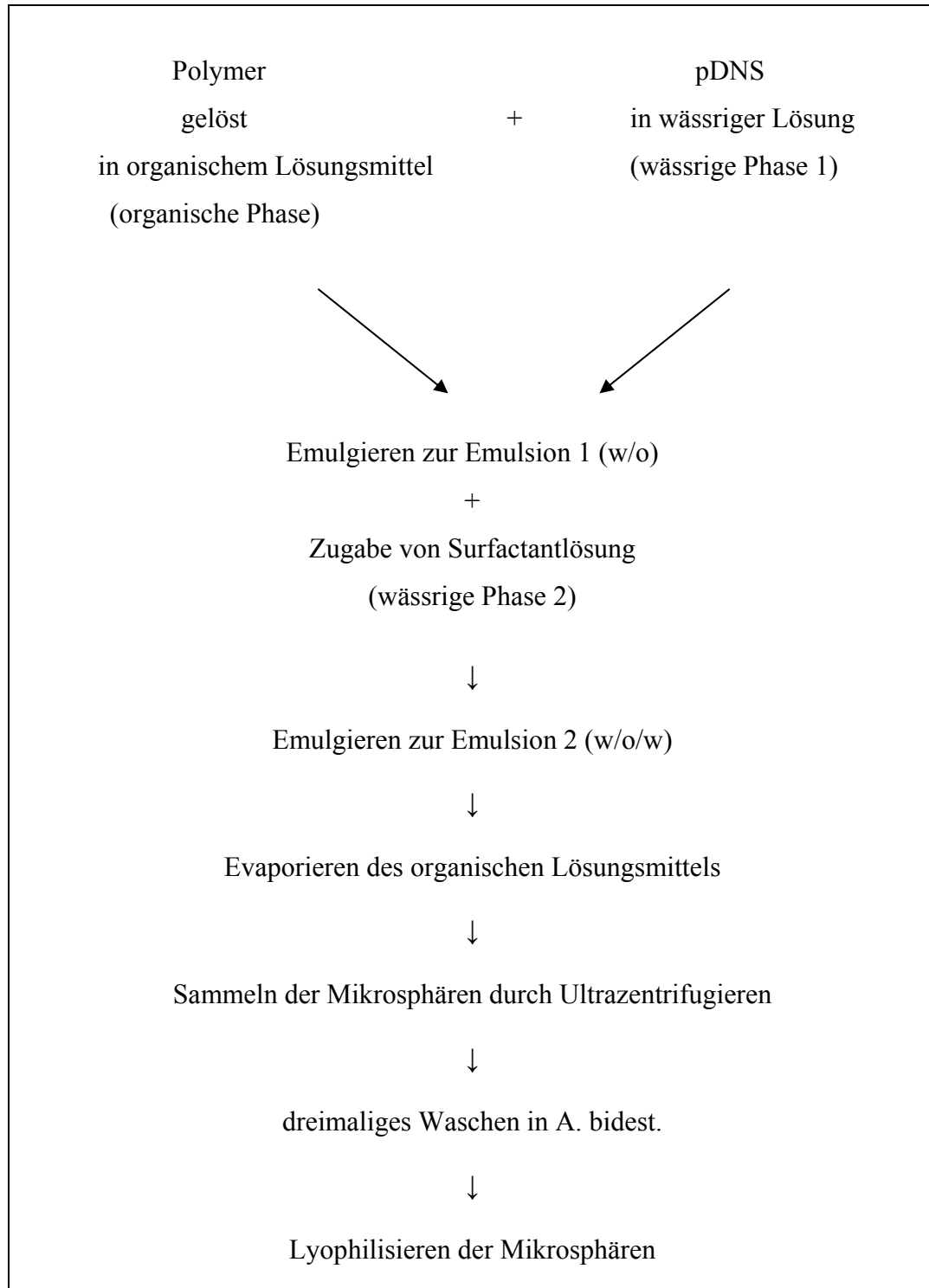
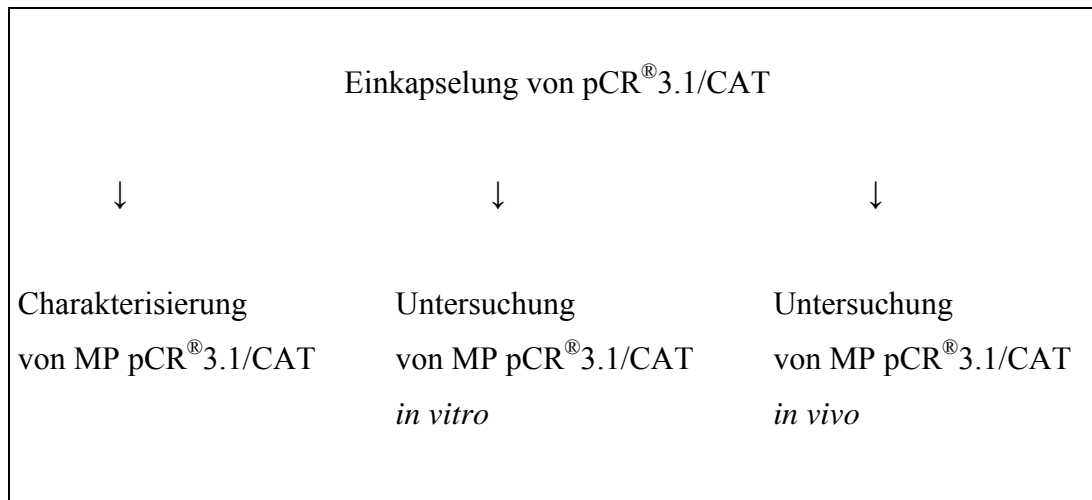


Abbildung 3: Untersuchung des CRS



5.5.1. Herstellung der Mikrosphären

Die Herstellung von Mikrosphären erfolgte im Doppemulsionsverfahren nach einem Standardprotokoll (Kap. 5.5.1.1.), basierend auf einem modifizierten Protokoll nach HEDLEY et al. (1998) und TINSLEY-BOWN et al. (2000). Einen Überblick über die einzelnen Schritte bei der Herstellung von Mikrosphären gibt Abbildung 2.

Zur Erstellung der Emulsionen wurde das Dispergiergerät ULTRA-TURRAX T8 mit Dispergierwerkzeug S8N-5G (Janke und Kunkel GmbH & Co. KG, IKA Labortechnik, 79219 Staufen) eingesetzt.

Arbeitsweise des Dispergierwerkzeugs:

Ein drehbarer Stab, der mit zwei kleinen Schneiden bestückt ist, ist konzentrisch in einer starren Hülse gelagert. Zwischen Hülseninnenwand und Drehstab befindet sich ein schmaler Spalt, durch den am unteren Ende der Hülse das flüssige Emulgiergut angesaugt wird und durch zwei feine Bohrungen oberhalb der Eintrittsstelle wieder austritt. Durch die Umdrehungen des Drehstabs wird das Emulgiergut verwirbelt. Sowohl die eingestellte Drehzahl als auch die Dauer des Homogenisiervorganges hat Auswirkungen auf die

Homogenität der Emulsion. Der optimale Arbeitsbereich des verwendeten Dispergiergerätes liegt bei einem Volumen zwischen 0,5 ml bis 5 ml.

5.5.1.1. Standardprotokoll

Im Standardprotokoll wurden folgende Mengen der einzelnen Komponenten oder Teilmengen im entsprechenden Verhältnis eingesetzt

Polymer	200 mg
Lösungsmittel	4 ml
pDNS-Lösung	400 µl
Surfaktantlösung	4 ml
Evaporierungslösung	50 ml

Variationen in der Zusammensetzung wurden bei verschiedenen Standardisierungsschritten vorgenommen und sind im Einzelnen im Text ausgewiesen.

In einem Reagenzglas wurden 200 mg Polymer unter mehrmaligem Vortexen bei Raumtemperatur in 4 ml Lösungsmittel aufgelöst und auf Eis gekühlt. Zu der organischen Phase wurden 400 µl eisgekühlte pDNS in wässriger Lösung zugegeben und die Mischung mit dem Dispergierwerkzeug zu einer Wasser in Öl-Emulsion (w/o, Emulsion 1) verarbeitet.

Zur Schonung der pDNS wurde die Emulgierzeit in vier Zyklen von je 15 s Emulgieren mit jeweils einer dazwischen liegenden Pause von 15 s fraktioniert.

Dann wurden 4 ml Polyvinylalkohol(PVA)-Lösung zugegeben und erneut fraktioniert emulgiert, um eine Wasser in Öl in Wasser-Emulsion (w/o/w, Emulsion 2) zu erstellen. Alle Emulgierungsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die Emulsion 2 wurde anschließend rasch unter Rühren in 50 ml 37 °C warme PVA-Lösung gegossen und das flüchtige Lösungsmittel unter mäßigem Rühren bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde unter dem Abzug evaporiert.

Die Mikrosphären wurden anschließend durch Ultrazentrifugieren (Sorvall superspeed RC2-B, Kendo) bei 22000 x g von der Evaporierungsflüssigkeit abgetrennt, der Überstand verworfen und das Mikrosphärenpellet noch zweimal nach Resuspendierung in je 100 ml A. bidest. durch Zentrifugieren bei 20000 x g und einmal bei 22000 x g gewaschen.

Die gesammelten Mikrosphären wurden in max. 300 μ l A. bidest. aufgenommen, in spezielle Glaspiolen gefüllt, bei -70 °C tiefgefroren und anschließend lyophilisiert.

Die Lyophilisierung erfolgte mit einer Gefriertrocknungsanlage (Jürgens Beta, Martin Christ, Osterode) bei einem Endvakuum von 5×10^{-4} Torr für mindestens 12 Stunden.

5.5.1.2. Modifizierung des Standardprotokolls

Um die Effekte der Homogenisierungsgeschwindigkeit und der Komponenten Polymer, Lösungsmittel und Surfactant auf die Eigenschaften der Mikrosphären näher zu untersuchen, wurde das Standardprotokoll bei den einzelnen Präparationen modifiziert. Dabei wurden folgende Ziele verfolgt:

- Herstellung von Mikrosphärenpräparationen mit einem großen Anteil an Mikrosphären mit 5 - 10 μ m Durchmesser
- hohe Einkapselungsrate von pDNS
- Bewahrung eines hohen Anteils an überspiralisierter pDNS
- gute Stimulierung der Phagozytoseaktivität von Makrophagen
- Verträglichkeit *in vitro* und *in vivo*

Zur Erreichung dieser Ziele wurden verschiedene Herstellungsparameter variiert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Variationen des Standardprotokolls zur Herstellung von Mikrosphären

Parameter	Optimierungsziel
Homogenisierungsgeschwindigkeit	Größe der Mikrosphären
Polymerformulierung	Größe der Mikrosphären pDNS-Einkapselungsrate Degradierungsverhalten Auswirkung auf Phagozytose
organisches Lösungsmittel	pDNS-Einkapselungsrate Toxizität Auswirkung auf Phagozytose
Surfactant-Volumen	pDNS-Einkapselungsrate
Zusätze zur pDNS-Suspension	Auswirkung auf die pDNS-Integrität

5.5.1.2.1. Untersuchung des Einflusses der Homogenisierungsgeschwindigkeit auf die Größe der Mikrosphären

Die Drehzahl des Dispergiergerätes kann manuell über eine Rändelschraube stufenlos von null auf ~ 23000 U/min geregelt werden, wobei die Einstellungen mit 1 bis 6 markiert sind. Die den einzelnen Einstellungen entsprechenden Drehzahlen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Zuordnung der Einstellung zu Drehzahlen des Dispergierwerkzeuges ULTRA-TURRAX[®] T8-S8N-5G (nach Herstellerangaben)

Einstellung	Drehzahl/min
1	5900
2	6670
3	8520
4	10100
5	16230
6	23170

Um zu untersuchen, wie sich die Größe der hergestellten Mikrosphären durch unterschiedliche Homogenisiergeschwindigkeiten verändert, wurden 150 mg PLG in 3 ml Methylenchlorid aufgelöst. 150 µl pDNS in A. bidest. (3290 µg/ml) wurden hinzugefügt und die Mischung bei Einstellung 3 zur Emulsion 1 homogenisiert. Diese Emulsion wurde in fünf Teilportionen aufgeteilt.

Jede Teilmenge der Emulsion 1 wurde mit 0,6 ml einer 1 %igen PVA-Lösung bei den Einstellungen 3, 3,3, 4, 4,3 und 5 zur Emulsion 2 verarbeitet. Das weitere Herstellungsverfahren dieser Präparationen erfolgte gemäß dem Standardprotokoll (Kap. 5.5.1.1.).

Die Beurteilung der Größe der Mikrosphären erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Zeiss, Carl Zeiss; 25/0,45, Okular 8x). Ein Tropfen einer Mikrosphärensuspension (0,1 mg/ml) wurde auf einen Objektträger gebracht. Die Objektmessung erfolgte mit einem skalierten Okular. Bei diesem Okular entsprechen 100 Teilstriche bei einer 25-fachen Objektivvergrößerung 0,375 mm.

Die Größenverteilung wurde unter dem Lichtmikroskop durch Auszählen der Mikrosphären in einem Gesichtsfeld ermittelt, Form und Oberflächenbeschaffenheit wurden bei einer Vergrößerung von 100 x beurteilt.

Bei weiteren Mikrosphärenpräparationen wurden die Emulsion 1 und die Emulsion 2 mit der Einstellung 3 hergestellt.

5.5.1.2.2. Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Polymerformulierungen auf die Mikrosphärenpräparation

Die Spezifität der verwendeten Polymere hat auf die Eigenschaften der daraus hergestellten Mikrosphären einen erheblichen Einfluß. Neben der Größe, der pDNS-Einkapselungsrate und der Beeinflussung der Phagozytoseaktivität von Makrophagen wird vor allem das Degradierungsverhalten der Mikrosphären von der Art des Polymers bestimmt (DUVVURI et al., 2006).

Polymere mit hohem Molekulargewicht bzw. hoher inhärenter Viskosität bedingen eine höhere Viskosität der organischen Phase und damit eine höhere Belastung der pDNS durch

Scherkräfte beim Homogenisieren, aber auch eine Größenreduktion der Mikrosphären und eine langsamere Degradierung der Matrix.

Mikrosphären wurden aus den in Tabelle 6 aufgelisteten Polymeren und Polymermischungen nach dem Standardprotokoll (Kap. 5.5.1.1.) hergestellt:

Tabelle 6: Verwendete Polymere und Polymermischungen zur Herstellung von Mikrosphären

Polymer	Mischungsverhältnis (%)
Lactel [®] BP-0100	100 %
Lactel [®] 50DG040	100 %
Lactel [®] 50DG065	100 %
Resomer [®] RG 503H	100 %
Resomer [®] RG 503H : Lactel [®] 50DG040	75 % : 25 %
Resomer [®] RG 503H : Lactel [®] 50DG040	80 % : 20 %

5.5.1.2.3. Effekt des organischen Lösungsmittels auf die Mikrosphärenpräparation

Zum Lösen des Polymers können unterschiedliche organische Lösungsmittel verwendet werden (O'HAGAN et al., 1991; CHALLACOMBE et al., 1992; HEDLEY et al., 1998; CAPAN et al., 1999; TINSLEY-BOWN et al., 2000).

Als Lösungsmittel wurden Methylenchlorid und Ethylacetat aufgrund ihrer dokumentierten Verträglichkeit in biologischen Systemen verwendet.

Arbeiten mit den Lösungsmitteln wurden unter dem Abzug bzw. in einem gut belüfteten Raum durchgeführt, wobei die Geruchsbeeinträchtigung durch Ethylacetat trotzdem deutlich intensiver war.

Zum Lösen von 100 mg Polymer wurden entweder 2 ml Methylenchlorid oder 2 ml Ethylacetat eingesetzt. Die übrigen Herstellungsparameter folgten dem Standardprotokoll (Kap. 5.5.1.1.).

5.5.1.2.4. Untersuchung des Einflusses der Konzentration der PVA-Lösung bei der Bereitung der w/o/w-Emulsion auf die Morphologie der Mikrosphären

PVA liegt als trockenes Ausgangsprodukt in Flocken vor und wurde zur Herstellung der Surfactantlösung in unterschiedlichen Anteilen (w/v) eingesetzt. Durch die polymere Natur von PVA entsteht mit zunehmenden Gewichtsanteilen eine deutlich visköse Lösung, die die beim Emulgiervorgang auftretenden Scherkräfte bei höherer Viskosität verstärkt (CAPAN et al., 1999). Zur Untersuchung der Auswirkungen der verschiedenen PVA-Konzentrationen auf die Präparation von Mikrosphären wurden fünf unterschiedlich konzentrierte PVA-Lösungen eingesetzt.

50 mg PLG wurden in 1 ml Methylenchlorid gelöst, nach dem Standardprotokoll (Kap. 5.5.1.1.) mit 75 µl pDNA-Suspension zur Emulsion 1 verarbeitet und in 5 Portionen aufgeteilt. Jeweils eine Teilportion wurde mit 1 %iger, 2 %iger, 3 %iger, 4 %iger oder 5 %iger PVA-Lösung zur Emulsion 2 homogenisiert und die Mikrosphären nach dem Standardprotokoll (Kap. 5.5.1.1.) gewonnen.

Die Mikrosphären wurden unter dem Lichtmikroskop im Hinblick auf Größenverteilung, Form und Oberfläche beurteilt.

Sofern nicht anders vermerkt, wurde bei weiteren Präparationen zur Erzeugung der w/o/w-Emulsion 2 eine 5 %ige PVA-Lösung verwendet.

5.5.1.2.5. Einfluß des Volumens der PVA-Surfactantlösung auf die Einkapselungsrate

Um Mikrosphären einer bestimmten Größe zu erzeugen, sind die Literaturangaben bezüglich der eingesetzten Volumina von Polymerlösung und PVA-haltiger Surfactantlösung zur Erstellung der Emulsion 2 uneinheitlich (HEDLEY et al., 1998; IGARTUA et al., 1998; KANEKO et al., 2000; STURESSON u. WIKINGSSON, 2000; TINSLEY-BOWN et al., 2000).

Um den Einfluß unterschiedlicher Volumina bei den gegebenen Laborbedingungen zu untersuchen, wurde ein Verhältnis von Polymerlösung zu Surfactantlösung (v/v) von 1 : 2,5 bzw. 1 : 12,5 getestet.

200 mg PLG wurden entweder in 4 ml Methylenchlorid oder Ethylacetat aufgelöst, 400 µl DNS-Suspension zugefügt und die Mischung zur Emulsion 1 homogenisiert. Die erzeugten Emulsionen wurden in Portionen von 1 ml und 3 ml aufgeteilt und, wie in Tabelle 7 dargestellt, mit 2,5 ml bzw. 37,5 ml Surfactantlösung zur Emulsion 2 homogenisiert. Die weitere Präparation und Gewinnung der Mikrosphären erfolgte nach dem Standardprotokoll (Kap. 5.5.1.1.).

Tabelle 7: Präparationen mit unterschiedlichen Volumina der Surfactantlösung im Verhältnis zur Polymerlösung

Polymer	(mg)	Lösungsmittel (ml)	DNS-Suspension (µl)	Surfactantlösung (ml)	
Lactel [®] 50DG040	50	MC	1	100	2,5
Lactel [®] 50DG040	150	MC	3	300	37,5
Lactel [®] 50DG040	50	EA	1	100	2,5
Lactel [®] 50DG040	150	EA	3	300	37,5

MC : Methylenchlorid ; EA : Ethylenacetat

Zur Untersuchung der Einkapselungsrate wurde die pDNS mit Chloroform aus den Mikrosphären extrahiert (Kap. 5.5.3.1.), mit Ethanol präzipitiert (Kap. 5.5.3.2.) und die pDNS-Menge durch OD-Wertmessung (Kap. 5.2.2.) bestimmt.

5.5.1.2.6. Einfluß von stabilisierenden Zusätzen zur pDNS auf die Einkapselungsrate

Als großes anionisches Molekül ist pDNS nicht nur empfindlich gegenüber mechanischen Einflüssen, sondern kann auch durch chemische Einflüsse in ihrer Konformation verändert werden. Niedrige pH-Werte können zur Entspiralisierung der pDNS führen (WALTER et al., 1999). Um den pH-Wert der pDNS-Lösung bei der Herstellung anzuheben, wurden

verschiedene kationische Puffer eingesetzt und die Auswirkungen des Puffereinsatzes untersucht.

Eine Stabilisierung der pDNS kann auch durch Komplexbildung mit Poly-L-Lysin (PLL) als Komplexierungshilfsstoff erfolgen (CAPAN et al., 1999).

Folgende kationische Puffer wurden eingesetzt:

- TE 10 mM TRIS-HCl, 1 mM TRIS-EDTA, in A. bidest., pH 7,4
- NaHCO₃ 100 mM in A.bidest., pH 8,0
- TNE 100 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl, 1mM EDTA in A. bidest., pH 8,0

Aufgereinigte pDNS wurde anstatt in Reinstwasser in einem der vorgenannten Puffer aufgenommen und als gepufferte pDNS-Lösung in dem erforderlichen Volumen zu der organischen Phase gegeben.

Die Komplexbildung der pDNS mit PLL erfolgte in einem pDNS:PLL-Verhältnis von 1:0,33 (w/w). Dazu wurde der pDNS-Gehalt der Plasmidsuspension durch OD-Wert-Bestimmung ermittelt und mit der entsprechenden Menge einer 10 %igen PLL-Lösung (w/v) in A. bidest. versetzt. Die Komplexbildung erfolgte durch 30-minütige Inkubation auf Eis.

In einem weiteren Herstellungsansatz wurde die Stabilisierung der pDNS durch Puffer mit der PLL-Komplexbildung kombiniert, indem die zuvor in Puffer aufgenommene pDNS zusätzlich noch mit PLL komplexiert wurde.

Die stabilisierte bzw. komplexierte pDNS wurde jeweils entsprechend dem Standardprotokoll (Kap. 5.5.1.1.) in Mikrosphären eingekapselt. Beurteilt wurde die Integrität der eingekapselten pDNS nach Extraktion und Präzipitation durch gelelektrophoretische Auftrennung. Die Menge der eingekapselten pDNS erfolgte durch die Bestimmung des OD-Wertes (Kap. 5.2.2.).

Für nachfolgende Präparationen wurde die Resuspendierung der pDNS mit TNE-Puffer vorgenommen und bei einigen Präparationen zusätzlich eine Komplexierung mit PLL durchgeführt.

5.5.2. Charakterisierung der Mikrosphären

Die Charakterisierung der Mikrosphären erfolgte in Bezug auf die in Tabelle 8 aufgelisteten Parameter, wobei nicht alle Präparationen allen Charakterisierungskriterien unterzogen wurden.

Tabelle 8: Charakterisierung von Mikrosphären

Parameter	Testsystem
Morphologie	Lichtmikroskop (Kap. 5.5.1.2.1.)
Einkapselungsrate	Chloroformextraktion (Kap. 5.5.3.1.) DNase-1-Verdau (Kap. 5.5.3.4)
Integrität der pDNS	Agarosegel-Elektrophorese (Kap. 5.2.5.) Transfektion (Kap. 5.3.)
Degradierungsverhalten	Degradierung in Puffer (Kap. 5.5.5.2.) Degradierung in Zellkultur (Kap. 5.5.4.2)
Phagozytierbarkeit	Inkubation mit MQ-NCSU-Makrophagen (Kap. 5.5.5.2.)

5.5.2.1. Morphologie der Mikrosphären

Die Morphologie der Mikrosphären wurde unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Zur Beurteilung frisch hergestellter Mikrosphären wurde ein Tropfen Mikrosphären haltiger Waschlösung auf einen Objektträger gegeben, mit einem Tropfen Mowiol-Eindeckmedium vermischt und mit einem Deckplättchen abgedeckt. Gemeinsam mit Zellen inkubierte Mikrosphären wurden unter dem Lichtmikroskop in den Kavitäten der Zellkulturplatten beurteilt.

5.5.2.2. Untersuchung des Degradierungsverhaltens von Mikrosphären

Neben den morphologischen Charakteristika der Mikrosphären wurden auch die materialimmanenten Eigenschaften von Präparationen aus unterschiedlichen Polymeren und Polymermischungen untersucht. Dazu wurde das Degradierungsverhalten von Mikrosphären in PBS bei 37 °C und in Zellkultur untersucht.

5.5.2.3. Degradierungsverhalten und Freisetzungsdynamik in PBS

Um die Freisetzungsdynamik zu untersuchen, d. h. ob die Freisetzung gleichmäßig oder schubweise erfolgt, wurden unterschiedliche Präparationen von Mikrosphären mit eingekapselter pDNS in PBS inkubiert (CAPAN et al., 1999).

Um die Degradierung zu untersuchen, wurde je 1 mg Mikrosphären unterschiedlicher Präparationen auf der Analysenwaage in Reaktionsgefäße eingewogen, mit 1,5 ml PBS resuspendiert und im Brutschrank bei 37 °C unter ständiger Rotation inkubiert. Nach 1 h, 2 h, 24 h bzw. 48 h wurden die Suspensionen gründlich gevortext. Von jeder Probe wurden 30 µl auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckglas abgedeckt.

Die Mikrosphären wurden unter dem Lichtmikroskop betrachtet und im Hinblick auf ihre Morphologie bewertet.

Für die Bestimmung der Menge freigesetzter pDNS wurden je Präparation 20 mg Mikrosphären auf der Analysenwaage in Reaktionsgefäße eingewogen, mit 1,5 ml PBS resuspendiert und unter ständiger Rotation bei 37 °C inkubiert. Nach 1 h, 2 h, 24 h und 48 h wurden die Proben 3 min bei 6000 x g zentrifugiert und der Überstand entnommen. Das Mikrosphärenpellet wurde mit 1,5 ml frischem PBS resuspendiert, gevortext und weiter inkubiert.

Die pDNS-Konzentration in der entnommenen Probe wurde durch OD-Messung (Kap. 5.2.2.) bei 260 nm bestimmt.

5.5.3. Untersuchung des Effektes von Prozessparametern auf in Mikrosphären eingekapselte pDNS

Bei der Herstellung von Mikrosphären mit eingekapselter DNS stellte sich die Frage, ob und zu welchem Anteil die Plasmide den Herstellungsprozess überstehen, ohne ihre biologische Integrität zu verlieren. Dazu wurde die pDNS aus der polymeren Matrix durch Inkubation mit Chloroform herausgelöst (Kap. 5.5.3.1) und präzipitiert (Kap. 5.5.3.2.). Anschließend wurde der Gesamtgehalt pro mg Mikrosphären einer Präparation bestimmt. Die Differenz zwischen außen anhaftender und eingekapselter pDNS wurde durch Inkubation von Mikrosphären mit DNase I (Kap. 5.5.3.4.) und anschließender pDNS-Extraktion (Kap. 5.5.3.1) und Präzipitation (Kap. 5.5.3.2.) ermittelt. Die Integrität der extrahierten pDNS wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 5.2.1.) und Transfektion von MQ-NCSU-Makrophagen (Kap. 5.3.) nachgewiesen.

5.5.3.1. Chloroformextraktion

Zur Untersuchung von Menge und Integrität der eingekapselten pDNS wurde diese aus den Mikrosphären herausgelöst. Als Methode zur Herauslösung der eingekapselten pDNS wurde die Chloroformextraktion gewählt, weil Chloroform die polymere Matrix der Mikrosphären auflöst, die pDNS jedoch nicht zerstört (CAPAN et al., 1999).

In ein Reaktionsgefäß wurden 5 mg Mikrosphären auf der Analysenwaage eingewogen, 500 µl Chloroform zugefügt und mindestens 30 min rotierend bei 37 °C inkubiert. 1000 µl eines 10 mM TE-Puffers (pH 8,0) wurden zugegeben, durch Vortexen intensiv mit der Mikrosphärensuspension vermischt und zur Phasenseparation 10 min bei 8500 x g zentrifugiert. Zur weiteren Verarbeitung kam die wässrige Phase, welche die pDNS enthält. Die pDNS wurde mittels Ethanolpräzipitation (Kap. 5.5.3.2.) gefällt.

5.5.3.2. Ethanolpräzipitation

Für die Ethanolpräzipitation (SAMBROOK et al, 2001) wurden 400 µl der wässrigen Phase, die durch Chloroformextraktion (Kap. 5.5.3.1.) gewonnen worden war, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gekühlt. Nach Zugabe des doppelten Volumens von eiskaltem 100%igem Ethanol und 100 µl Ammoniumacetat (2,5 M) wurde die pDNS-haltige Lösung zur Präzipitierung der pDNS 30 min auf Eis inkubiert.

Durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 14 000 x g und 2 °C wurde die DNS am Boden des Reaktionsgefäßes präzipitiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, ohne das Pellet zu zerstören. Mit 700 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol wurde das DNS-Pellet gewaschen, kurz gevortext und für 5 min mit 14 000 x g bei 2 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet bei Raumtemperatur für 15 min getrocknet.

Das DNS-Pellet wurde in 30 µl Reinstwasser aufgenommen. Der DNS-Gehalt wurde mittels OD-Messung (Kap. 5.2.5.) bestimmt.

5.5.3.3. Bestimmung des pDNS-Gesamtgehaltes von Mikrosphären

Ziel der Einkapselung von DNS in Mikrosphären ist es, diese nach Applikation vor enzymatischen Einflüssen zu schützen. Es wird angenommen, daß nur DNS, die vollkommen von der Polymermatrix umschlossen ist, als geschützt und als in ihrer Fähigkeit zu korrekter Ablesung nicht gemindert angesehen werden kann.

Bei der Bestimmung, welche Menge DNS eine Mikrosphärencharge enthält, muß unterschieden werden zwischen der Menge an DNS, die oberflächlich und damit relativ locker an die polymere Matrix gebunden ist, und der Menge, die von Polymer umgeben ist und erst durch dessen Degradierung frei wird.

Für die Bestimmung des gesamten pDNS-Gehaltes von Mikrosphären wurde zunächst die Chloroformextraktion (Kap. 5.5.3.1.) mit anschließender Ethanolpräzipitation (Kap. 5.5.3.2.) durchgeführt und die Menge an gesamthaft extrahierter pDNS mittels OD-Wertmessung (Kap. 5.2.2.) bestimmt. Für jede Extraktion wurden 5 mg Mikrosphären eingesetzt.

5.5.3.4. Bestimmung der Menge eingekapselter pDNS nach DNase-Verdau

Zur Bestimmung der Mengendifferenz an pDNS, die außen an den Mikrosphären anhaftet und derjenigen, die eingeschlossen ist, wurden von den gleichen Mikrosphärenchargen, bei denen eine Bestimmung des Gesamtgehaltes an pDNS vorgenommen worden war (Kap. 5.5.3.3.), jeweils eine weitere Teilmenge untersucht. Dazu wurden die Mikrosphären zunächst mit dem Enzym DNase 1 inkubiert (CAPAN et al., 1999). DNase 1 degradiert unmittelbar zugängliche DNS, kann aber die polymere Matrix der Mikrosphären nicht durchdringen.

Für den Versuchsansatz wurden 5 mg Mikrosphären in 100 µl TRIS-HCl (10 mM, pH 8,0) aufgenommen, 80 µl MgSO₄ (10 mM) und 20 µl DNase 1 (5 µg/ml) in 0,9 % NaCl hinzugefügt und 30 min rotierend bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Mikrosphären durch Zentrifugieren bei 3 600 x g pelletiert, der Überstand verworfen und drei Waschgänge mit je 200 µl TE-Puffer angeschlossen.

Die restliche pDNS wurde aus den Mikrosphären extrahiert (Kap. 5.5.3.1.) und präzipitiert (Kap. 5.5.3.2.). Die Bestimmung der pDNS-Menge erfolgte durch OD-Wertmessung (Kap. 5.2.2.).

5.5.3.5. Bestimmung der pDNS-Integrität nach Einkapselung in Mikrosphären

Plasmide können in unterschiedlichen Konformationen als

- überspiralisierte Form
- entspannte Ringform nach Bruch eines pDNS-Stranges
- linearisierte Form nach Bruch des Doppelstranges

vorliegen. Von den möglichen Konformationszuständen ist die überspiralisierte Form am besten geeignet, Zellen effektiv zu transfizieren. Wie bereits angeführt, können verschiedene Herstellungsparameter die Integrität der pDNS beeinflussen. Daher ist im Verlauf des

Herstellungsprozesses der Erhalt eines möglichst hohen Anteils von pDNS in der überspiralisierten Form anzustreben.

Um festzustellen, ob die eingekapselte und nach Inkubation in Puffer, z. B. PBS, freigesetzte pDNS noch intakt ist, wurden zwei verschiedene Testmethoden angewandt:

- Auftrennung in der Agarosegel-Elektrophorese (Kap. 5.2.1.) mit Schätzung der Molekülgröße
- Transfektion von Zellkulturen (Kap. 5.3.) zum Nachweis der Expression der kodierenden Gensequenz

Zur Bestimmung der morphologischen Integrität wurden Mikrosphären mit eingekapseltem pCR[®]3.1/CAT untersucht. Die eingekapselte pDNS wurde durch Chloroformextraktion (Kap. 5.5.3.1.) aus den Mikrosphären herausgelöst und anschließend durch Ethanolpräzipitation (Kap. 5.5.3.2.) gefällt. Die Auftrennung der pDNS zur Ermittlung der Konformationszustände erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese (Kap. 5.2.1.). Bestimmt wurde das Verhältnis der jeweiligen Konformationszustände der pDNS durch Schätzung im Vergleich mit einer definierten DNS-Menge.

Die funktionelle Integrität der pDNS wurde nach Extraktion aus Mikrosphären (Kap. 5.5.3.1. und 5.3.3.2) durch Transfektion von Zellkulturen (Kap. 5.3.) überprüft. Eingesetzt wurde eine Mikrosphärenpräparation aus Lactel[®]BP-100 mit eingekapseltem pCR[®]3.1/CAT. Nachdem der Gehalt der aus den Mikrosphären extrahierten pDNS durch OD-Wertmessung bestimmt worden war, wurde die Komplexierung der pDNS mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin[™] gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt und die Zellen zusammen mit der komplexierten pDNS inkubiert. Die Detektion erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Markierung mit FITC-konjugierten α -CAT- Antikörpern.

5.5.4. Untersuchung von Mikrosphären in Zellkultur

In den Untersuchungen von Mikrosphären in Zellkultur sollten mögliche toxische Effekte auf Zellkulturen, die Degradierung in Zellkultur und die Bereitschaft zur Phagozytose durch Hühnermakrophagen bewertet werden.

5.5.4.1. Toxizität der Mikrosphären

Die Untersuchung der Toxizität erfolgte *in vitro* an MQ-NCSU-Makrophagen-Zellkulturen. Dabei stand einerseits die Frage im Vordergrund, welche Auswirkungen die Applikation von Mikrosphären auf Zellkulturen hat. Andererseits sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Verträglichkeit von Mikrosphären gibt, die entweder mit Methylenchlorid oder mit Ethylacetat als Lösungsmittel hergestellt worden waren.

100 µl einer Zellsuspension mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml wurden auf Zellkulturplatten mit 24 Kavitäten (Nunc) ausgesät und 24 h in Leibowitz-McCoy-Erhaltungsmedium bei 41 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Angestrebt wurde ein ca. 70 - 80 % konfluenter Zellrasen. Die Zellen wurden einmal mit warmem PBS gewaschen, um nicht adherente Zellen zu entfernen. Je Kavität wurden 1,5 ml Leibowitz-McCoy-Magermedium und 100 µl Mikrosphärensuspension (0,1 mg/ml) in Medium dazugegeben. Zur weiteren Inkubation wurden die Zellkulturplatten wieder in den Brutschrank gestellt. Die Platten wurden täglich lichtmikroskopisch betrachtet.

Das Wachstumsverhalten und die Vitalität von Zellkulturen, die mit einer Mikrosphärensuspension (0,1 mg/ml) versetzt worden waren, wurden lichtmikroskopisch über einen Zeitraum von drei Wochen untersucht. Die Bewertung erfolgte im Vergleich mit Zellkulturen, die ohne Mikrosphären kultiviert wurden.

5.5.4.2. Degradierung und Phagozytose der Mikrosphären in Zellkultur

Untersucht wurde das Degradierungsverhalten von Mikrosphären aus verschiedenen Polymerspezifitäten und einem Polymergemisch, die unter Verwendung von Methylenchlorid bzw. Ethylacetat hergestellt worden waren. Die eingesetzten Polymere und Lösungsmittel sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Komponenten der Mikrosphären, die auf Degradierungs- und Phagozytoseverhalten in Zellkultur untersucht wurden

Polymer / Polymermischung	Verhältnis	Lösungsmittel
Lactel [®] 50DG040	100 %	Methylenchlorid
Lactel [®] 50DG040	100 %	Ethylacetat
Lactel [®] 50DG065	100 %	Methylenchlorid
Resomer [®] RG 503H	100 %	Ethylacetat
Resomer [®] RG 503H : Lactel [®] 50DG040	80 % : 20 %	Ethylacetat

Die Untersuchungen zur Degradierung von Mikrosphären in Zellkultur wurden mit MQ-NCSU-Makrophagen durchgeführt. Die Inkubation und Kultivierung der Zellen erfolgte, wie in Kap. 5.5.4.2. beschrieben, über einen Zeitraum von drei Wochen.

Nach jeweils einer Woche wurden die Zellen zusammen mit den Mikrosphären auf neue Zellkulturplatten passagiert, um ein Absterben der Kulturen durch Überalterung zu verhindern. Eine Überalterung der Kultur äußerte sich durch Abkugeln der Zellen, Wachstum in Zellklumpen und Ablösen des Zellrasens vom Boden der Zellkulturplatten. Die Zellkulturplatten wurden täglich unter dem Lichtmikroskop auf Nachweisbarkeit von Mikrosphären sowie Wachstum und Vitalität der Zellen untersucht.

5.5.4.3. Nachweis der Aktivierung von Makrophagen durch Mikrosphären mittels des Stickoxidtests

Makrophagen werden durch die Aufnahme von fremdem Material aktiviert und sezernieren daraufhin eine Reihe von immunmodulierenden Substanzen, welche auf andere Zellpopulationen einwirken und somit die Immunantwort beeinflussen (MACMICKING et al, 1997).

Um zu untersuchen, durch welche PLG-Formulierung Makrophagen am stärksten stimuliert werden können, wurden Mikrosphären aus zehn unterschiedlichen Präparationen auf Makrophagenkulturen aufgebracht.

Tabelle 10: Im Makrophagenstimulationstest untersuchte Parameter von Mikrosphärenpräparationen und deren Variation

Parameter	Variation
Größenbereich	max. 12 µm bzw. max. 300 µm
Lösungsmittel	Methylenchlorid bzw. Ethylacetat
Polymerspezifität	Lactel [®] BP-100 Lactel [®] 50DG040 Resomer [®] RG 503H
Polymergemische	Resomer [®] RG 503H : Lactel [®] 50DG040 (75 : 25) Resomer [®] RG 503H : Lactel [®] 50DG040 (80 : 20)
Surfactantlösung	5 %ige, 6 %ige bzw. 8 %ige Lösung

Aktivierete Makrophagen sezernieren nach Stimulation neben anderen Substanzen Stickoxid (NO), welches zu Nitrit (NO₂) und Nitrat (NO₃) konvertiert wird. Die NO₂-Konzentration im Zellkulturüberstand kann im Stickoxidtest mit dem Griess-Reagenz bestimmt werden.

Durchführung des Stickoxidtestes:

Aliquots von 100 µl Zellsuspension ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml) von MQ-NCSU-Makrophagen wurden in Flachboden-Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten pipettiert und über Nacht kultiviert. Angestrebt wurde eine Konfluenz der Zellen von 50 - 60 %.

Je 1 mg Mikrosphären aus verschiedenen Präparationen wurde in 10 ml Medium resuspendiert. In jede Kavität wurden 100 µl der Mikrosphärensuspension zu den Zellen hinzupipettiert. Jede Mikrosphärenpräparation wurde in Triplikaten getestet. Unmittelbar vor Zugabe der Mikrosphärensuspension zu den Zellen, nach 1 h, 4 h, 8 h, 18 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurde vorsichtig Zellkulturüberstand abgenommen und auf NO₂-Gehalt untersucht. Der Verlauf der NO₂-Gehalte im Zellkulturüberstand wurde durch Messung der Absorption nach Zugabe von Griess-Reagenz ermittelt.

Zellen, die mit 100 µl LPS-Suspension (50 µg/ml) pro Kavität stimuliert worden waren, dienten als Positivkontrolle, unstimulierte Zellen wurden als Negativkontrolle in den Test eingeschlossen. Zellkulturüberstände der Positiv- und Negativkontrolle wurden zu denselben Zeitpunkten bewertet wie die der Mikrosphären-stimulierten Makrophagen.

Die Durchführung des NO-Tests erfolgte in Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc) mit 96 Kavitäten. In die erste Reihe der Kavitäten wurden je 100 µl Zellkulturmedium vorgelegt. In die erste Kavität dieser Reihe wurden 100 µl Standardlösung (1 mM Na₂NO₂) hinzupipettiert und 12 Stufen einer log₂-Verdünnung erstellt.

Von jeder zu untersuchenden Probe einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen wurden 100 µl mit drei Wiederholungen in die restlichen Kavitäten pipettiert.

Griess-Reagenz A und Griess-Reagenz B (Kap. 4.7.) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und je 100 µl der Mischung mit einer Multikanalpipette zu jeder Kavität hinzugefügt. Die Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Bei Vorhandensein von NO₂ erfolgte ein Farbumschlag nach rot. Die Intensität des Farbumschlags wurde mit einem ELISA-Lesegerät (Flow Filtetek® Multiskan PLUS MK 11, ICN Labsystems Finland) bei 570 nm analysiert. Die Umrechnung der OD-Werte in µm NO erfolgte nach der Formel $f_{(x)} = -5,1439 + (187,22 \times \text{OD-Wert})$.

5.6. *In vivo*-Untersuchung von Mikrosphären

Die *in vivo*-Untersuchungen der Mikrosphären erfolgte sowohl *in ovo* als auch an geschlüpften Küken. Es sollte geprüft werden, ob die *in ovo*-Applikation von Mikrosphären die Vitalität und Schlupfrate beeinträchtigt.

Tabelle 11: *In vivo*-Versuche mit Mikrosphären im embryonierten Hühnerei und nach dem Schlupf oral und als i.m.-Applikation

Versuchs-Nr.	Inokulationsroute
Versuch 1	<i>in ovo</i> -Inokulation am BT 18
Versuch 2	<i>in ovo</i> -Inokulation am BT 18
Versuch 3	<i>in ovo</i> -Inokulation am BT 18
Versuch 4	<i>in vivo</i> -Inokulation am LT 1 oral, i.m.

BT: Bruttag; LT: Lebenstag

5.6.1. *In ovo*-Vakzinationstechnik

Die Verträglichkeit der *in ovo*-Applikation von Mikrosphären wurde in insgesamt drei Versuchsansätzen bewertet.

Bei der *in ovo*-Applikation gelangt ein Großteil des Inokulums in die Amnionhöhle (SHARMA und BURMEISTER, 1982). Die dafür vorgesehenen Bruteier wurden unter Standardbedingungen bis zum 18. Embryonierungstag bebrütet und am 10. und 18. Tag geschickt, um die Vitalität der Embryonen zu überprüfen. Zur Vorbereitung der Beimpfung wurden die Bruteier individuell gekennzeichnet, der stumpfe Pol mit einer alkoholischen Desinfektionslösung eingesprüht und über der Luftblase ein Loch gebohrt.

Die Applikation des Inokulates erfolgte mit einer 0,70 x 32 mm Kanüle, die bis zum Anschlag senkrecht in das Ei eingeführt wurde (SHARMA und BURMEISTER, 1982). Als Inokulat diente eine Mikrosphärensuspension oder PBS mit 2 % Antibiotikumzusatz. Anschließend erfolgte die Umlegung der Bruteier in den Schlupfbrüter. Die Bruteier wurden weiterhin täglich auf Vitalität der Embryonen geschickt.

5.6.2. Einfluß der Mikrosphären auf die Embryonalentwicklung nach *in ovo*-Applikation

Dieser Versuch sollte die Frage beantworten, ob das Einbringen von PLG-Mikrosphären in das Brutei den sich entwickelnden Embryo schädigt oder gar abtötet.

Tabelle 12: Inokulation von Mikrosphären am Embryonierungstag 18

Versuch Nr.	Bruteier mit Inokulat:		Bruteier ohne Inokulat
	MP	PBS	
1	8	3	0
2	11	2	0
3	33	0	48

MP: Mikrosphären

In je 800 µl PBS mit 2 % Antibiotikumzusatz wurden 40 mg Mikrosphären resuspendiert. Acht Bruteier wurden mit je 200 µl Mikrosphärensuspension inokuliert. Als Kontrolle wurden in drei Bruteier je 200 ml PBS mit 2% Antibiotikumzusatz injiziert.

Nach der Inokulation erfolgte eine Umlegung der Eier in den Schlupfbrüter.

In einem weiteren Versuch wurde getestet, welche Auswirkungen auf die Vitalität die Inokulation von Mikrosphärensuspension in den Dottersack hat. Am wurde am 6. Embryonierungstag wurden 500 µl Mikrosphärensuspension in PBS (3,5 mg/100 µl) mit Antibiotikumzusatz bzw. 500 ml PBS mit Antibiotikumzusatz inokuliert. Die Eier wurden bis zum 21. Embryonierungstag unter Standardbedingungen (Vorbrut: 37,8 °C, 60 % rel. Luftfeuchtigkeit; Schlupfbrut: 37 °C, 80 % rel., Luftfeuchtigkeit) weiterbebrütet.

Tabelle 13: Inokulation von Mikrosphären in den Dottersack am Embryonierungstag 6

Versuch Nr.	Bruteier mit Inokulat:	
	Mikrosphären	PBS
4	3	3

5.6.3. *In vivo*-Untersuchung zur Verträglichkeit von Mikrosphären bei Küken

Zur Untersuchung der Gewebeverträglichkeit von Mikrosphären wurden bei Eintagsküken und Küken am 19. Lebenstag je Tier 500 µl einer Mikrosphärensuspension in die Oberschenkelmuskulatur injiziert. Die Tiere wurden täglich auf klinische Krankheitserscheinungen und Entzündungen an der Injektionsstelle untersucht.

Die orale Applikation von Mikrosphären erfolgte mit einer Pipette in die Schnabelhöhle. Jedem Tier wurden 500 µl Mikrosphärensuspension verabreicht. Auch bei diesen Tieren erfolgte eine tägliche Gesundheitskontrolle.

Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich auf fünf Wochen. Am Ende des Versuches wurden die Tiere durch Kopfschlag betäubt, entblutet und auf pathologisch-anatomische Veränderungen untersucht.

6. Ergebnisse

6.1. Herstellung von Mikrosphären

Es wurden insgesamt 44 verschiedene Präparationen von Mikrosphären (MP) hergestellt (s. Liste der Mikrosphärenpräparationen im Anhang). Das Ziel der Herstellung war die Erzeugung von Mikrosphären mit einem Schwerpunkt im Größenbereich bis max. 10 μm , in die eine möglichst große Menge an pDNS eingekapselt sein sollte. Zur Erreichung dieses Zieles wurden verschiedene Varianten des Standardprotokolls (Kap. 5.5.1.1.) getestet. Eine Auflistung aller Präparationen ist im Anhang aufgeführt.

6.1.1. Einfluß von Homogenisierungsgeschwindigkeit und Konzentration der Surfactantlösung auf das Größenspektrum von Mikrosphären

Um das Größenspektrum der Mikrosphären auf den Bereich von 5 bis 10 μm einzustellen, wurde die am besten geeignete Homogenisierungsgeschwindigkeit gesucht. Bei den untersuchten Drehzahlen von 8500, 10100, 11400 und 16230 U/min konnten sphärische Mikropartikel hergestellt werden. Die Mikrosphären der einzelnen Präparationen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und vier Größenbereiche von 1 bis 5 μm , 10 bis 15 μm und größer als 15 μm gebildet. In allen Präparationen waren überwiegend Mikrosphären in der angestrebten Größe bis zu 10 μm Durchmesser vorhanden (Tabelle 14).

Mit der Einstellung 3, entsprechend 8500 U/min, wurden prozentual die meisten Mikrosphären in dem angestrebten Bereich von 5 bis 10 μm hergestellt.

In das Standardprotokoll wurde deshalb die Einstellung 3 für die Herstellung von Mikrosphären übernommen.

Tabelle 14: Auswirkungen der Polymere und Polymergemische auf die Größenverteilung und Oberflächenbeschaffenheit der Mikrosphären bei vier unterschiedlichen Homogenisierungsgeschwindigkeiten

MP-Präparation* hergestellt mit Drehzahl (U/min)	% MP mit Größe (µm)				Oberfläche der MP	
	1-5	5-10	10-15	>15	glatt	porös
8500	56	43	1	-	+	
10100	65	17	11	7	+	
11400	84	10	6	-		+
16230	79	18	3	-	+	

MP: Mikrosphären

* Alle Mikrosphären wurden hergestellt aus 20 mg Lactel®BP-0100, 0,6 ml Methylenchlorid und 30 µl pDNS-Suspension. Als Surfactantlösung wurde eine 5 %ige PVA-Lösung verwendet. Ausgezählt wurden je Präparation mindestens 1000 Mikrosphären im Lichtmikroskop bei einer Vergrößerung von 200 x.

Neben der Emulgiergeschwindigkeit kann die Größe und Morphologie der Mikrosphären auch durch die Konzentration der als Surfactant verwendeten PVA-Lösung beeinflusst werden.

Es wurden PVA-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen (1 %, 2 %, 3 %, 4 % und 5 %) getestet. Mit allen Konzentrationen konnten sphärische Mikropartikel hergestellt werden (Tabelle 15).

Tabelle 15: Einfluß der PVA-Konzentration auf die Morphologie und Größe der Mikrosphären

MP-Präparation mit PVA-Konzentration	% MP mit Größe (µm)				Oberfläche der MP	
	<5	1-10	10-15	>15	glatt	porös
1 %	32	21	8	40		+
2 %	36	20	18	26		+
3 %	35	23	27	15	+	
4 %	38	24	31	7	+	
5 %	53	18	24	5	+	

MP: Mikrosphären

Alle Präparationen wurden aus je 10 mg Lactel®BP-0100, 0,3 ml Lösungsmittel Methylenchlorid und 15 µl pDNS-Suspension nach dem Standardprotokoll hergestellt hergestellt.

In der Präparation, die mit 5 %iger PVA-Lösung hergestellt wurde, lagen die meisten Mikrosphären im Größenbereich bis 10 μm . In dieser Präparation zeigten etwa 30 % der Mikrosphären mit einem Durchmesser von 5 bis 15 μm eine abweichende Lichtbrechung und erschienen dunkel (Abb. 4).

Für das Standardprotokoll wurde die 5 %ige PVA-Lösung als Surfactant gewählt.

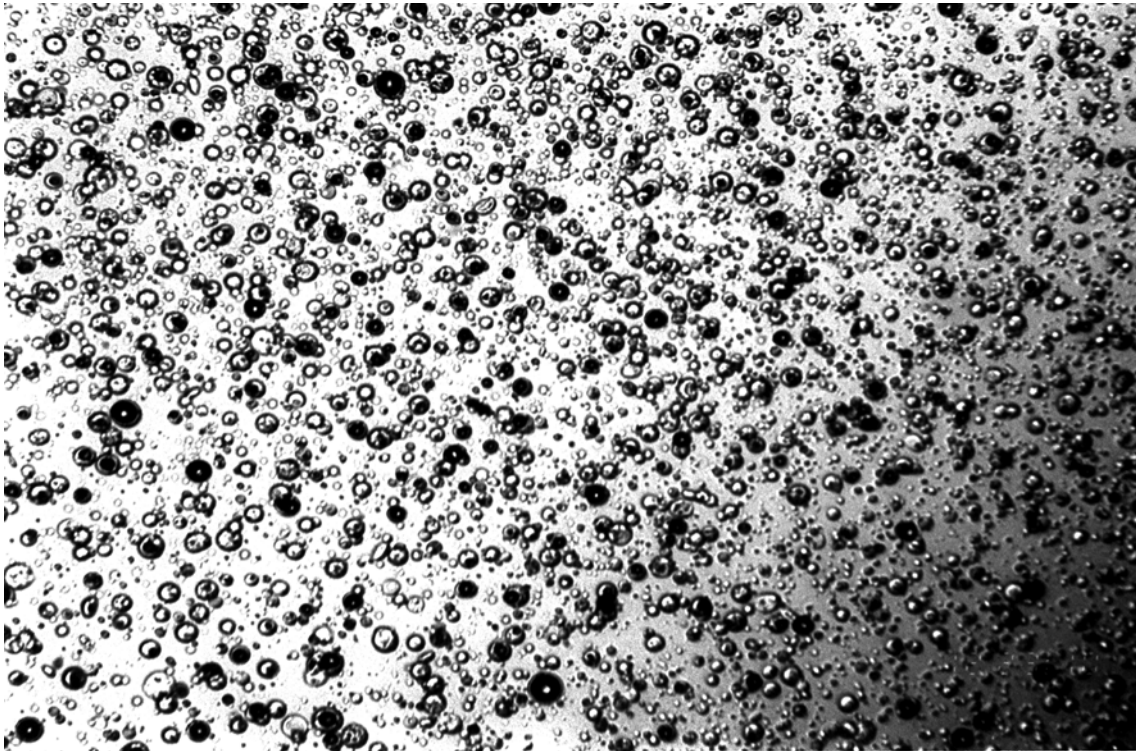


Abbildung 4: Mikrosphären hergestellt aus Lactel[®]BP-0100 mit 5 %iger PVA-Lösung und Homogenisierungsgeschwindigkeit mit Einstellung 3.
Mikroskopische Vergrößerung: 100 x.

6.1.2. Einfluß des Polymers auf die Mikrosphärengröße und DNS-Einkapselungskapazität

Verglichen wurden Präparationen aus verschiedenen Polymeren und Polymermischungen in Bezug auf Größe und Morphologie und DNS-Einkapselungskapazität der Mikrosphären (Tabelle 16).

Tabelle 16: Auswirkungen der Polymere und Polymergemische auf die Größe und Morphologie der Mikrosphären und Beladung mit pDNS

Polymere oder Polymergemische	Anzahl von Präparationen	Morphologie	% MP mit Größe (µm)	eingesetzte pDNS in µg/mg PLG	pDNS-Gehalt ^a in % der eingesetzten pDNS
R RG 503H 100 %	1	rund	<5 5 - 10 >5	9,9	19,8
L BP-0100 100 %	3	rund	65 30 5	4,9	2,8 ± 0,8 ^c
L 50DDG040 100 %	2	rund	62 32 6	3,3	2,6 ± 0,8 ^c
L 50DG065 100 %	1	polymorph	20 10 70	3,4	4,7
R RG503H:L 50DDG040 75:25	1	rund	58 35 7	9,8	5,6
R RG503H:L 50DDG040 80:20 ^b	1	rund	55 40 5	15,1	5,8

MP: Mikrosphären; L: Lactel; R: Resomer

^{a)} nach Chloroformextraktion. ^{b)} Die Präparation aus Resomer[®]RG503H:Lactel[®]50DDG040 80:20 wurde mit 6 %iger PVA-Lösung hergestellt. Alle anderen Präparationen wurden unter Verwendung von 5 %iger PVA-Lösung hergestellt. Die Polymere Lactel[®]BP-0100, Lactel[®]50DDG040 und Lactel[®]50DDG065 wurden in Metylenchlorid aufgelöst, die Polymermischungen Resomer[®]RG 503H:Lactel[®]50DDG040 (75:25), Resomer[®]RG 503H:Lactel 50DDG04 (80:20) und das Polymer Resomer[®]RG 503H wurden in Ethylacetat aufgelöst. ^{c)}± SD bei mehreren Präparationen.

Mikrosphären aus 100 % Resomer[®]RG503H bildeten zu 95 % kleine, nahezu monodisperse runde Mikrosphären von <10 µm Durchmesser. Diese lagerten sich zu kugeligen Konglomeraten von bis zu 75 µm Durchmesser zusammen, welche von einer dünnen Haut umgeben waren. Diese Konglomerate zerplatzten bereits kurz nach Resuspendierung, wobei die eingeschlossenen kleinen Mikrosphären freigesetzt wurden.

Aus 100% Lactel[®]BP-0100 bzw. Lactel[®]50DG040 konnten runde glattwandige Mikrosphären hergestellt werden, die zu 30 % bzw. 32 % in dem angestrebten Größenbereich von 5 bis 10 µm lagen.

Die Mikrosphärenpräparation aus 100 % Lactel[®]50DG065 ergab makroskopisch sichtbare Partikel. Unter dem Lichtmikroskop betrachtet bestanden diese Partikel aus unregelmäßig geformten Konglomeraten von kleinen Partikeln und Mikrosphären. Sphärische Mikrosphären <10 µm stellten nur einen Anteil von 30 % dar. Wegen der Größe der Partikel war es nicht möglich, sie in die für die Gefriertrocknung verwendeten Glasphiolen einzufüllen. Daher wurde diese Präparation nach dreimaligem Waschen pelletiert und dann bei -20°C gelagert.

Die Polymermischung aus 75 % Resomer[®]RG 503H und 25 % Lactel[®]50DG040 enthielt 35 % Mikrosphären, die zwischen 5 und 10 µm groß waren. Die Mikrosphären aus dieser Polymermischung besaßen eine glatte Oberfläche.

Mikrosphären aus dem Gemisch von 80 % Resomer[®]RG 503H und 20 % Lactel[®]50DG040 waren zu 40 % im Größenbereich zwischen 5 und 10 µm. Diese Präparation wies einen weiten Größenbereich von 0,5 µm bis zu 190 µm Durchmesser auf. Mikrosphären mit einem Durchmesser von mehr als 30 µm waren aus mehreren kleineren Mikrosphären zusammengesetzt, die von einer fragilen Membran umschlossen waren.

Der pDNS-Gehalt der Mikrosphären wurde nach Chloroformextraktion (Kap. 5.5.3.1.) und Ethanolpräzipitation (Kap. 5.5.3.2.) durch OD-Wertmessung (Kap. 5.2.2.) ermittelt. Bei mehreren Präparationen aus derselben Polymerformulierung wurden die Gehalte an extrahierter pDNS gemittelt.

6.1.3. Einfluß des Lösungsmittels auf Mikrosphärenbeschaffenheit, DNS-Einkapselungskapazität und Toxizität in Zellkultur

Als Lösungsmittel zur Erzeugung der organischen, das Polymer enthaltenden Phase, wurden Methylenchlorid oder Ethylacetat verwendet.

Die verwendeten Polymere lösten sich sowohl in Methylenchlorid als auch in Ethylacetat vollständig auf, wobei die in granulierter Form vorliegenden Polymere Lactel[®]50DG040, Lactel[®]50DG065 und Lactel[®]BP-0100 unter mehrmaligen Vortexen bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C gelöst werden konnten. Der Lösungsvorgang bei Raumtemperatur dauerte bei Methylenchlorid ~ 1 h und bei Ethylacetat ~ 1,5 h. Das pulverförmige Polymer Resomer[®]RG 503H löste sich in beiden Lösungsmitteln innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur unter mehrmaligem Vortexen.

Die Untersuchung der lyophilisierten Mikrosphären ergab eine höhere absolute Beladung mit pDNS bei den Präparationen, die mit Ethylacetat hergestellt wurden (Tabelle 17). Die Präparationen aus in Ethylacetat gelöstem Lactel[®]50DG040 enthielten durchschnittlich 1340 ng pDNS/mg Mikrosphären. Aus in Methylenchlorid aufgelöstem Lactel[®]BP-0100 konnten 141 ng pDNS/mg Mikrosphären extrahiert werden. Die geringste Beladung wurde mit 23 ng pDNS/mg Mikrosphären bei der Verwendung von Lactel[®]50DG040 in Verbindung mit Methylenchlorid erreicht. Eine Abhängigkeit der pDNS-Beladung der Mikrosphären von der Konzentration der eingesetzten pDNS-Lösung und war bei der geringen Anzahl hergestellter Präparationen nicht zu erkennen.

Um die Verträglichkeit der Mikrosphären in Zellkultur zu untersuchen, wurden Mikrosphären, die unter Verwendung von Methylenchlorid oder Ethylacetat hergestellt worden waren, auf MQ-NCSU-Makrophagenkulturen aufgebracht. Sowohl die mit Methylenchlorid als auch die mit Ethylacetat hergestellten Mikrosphären beeinflussten das Wachstum von MQ-NCSU-Makrophagen nicht (Tabelle 17). MQ-NCSU-Zellkulturen mit Mikrosphären konnten über drei Wochen mit vergleichbarer Vitalität passagiert werden, wie nicht zusammen mit Mikrosphären inkubierte MQ-NCSU-Zellkulturen.

Tabelle 17: pDNS-Menge nach Chloroformextraktion aus Mikrosphären unterschiedlicher Präparationen mit anschließender Ethanolpräzipitation

Lösungsmittel	Polymer	Anzahl von Präparationen	pDNS-Gehalt (ng/mg MP)	pDNS-Gehalt in % der eingesetzten pDNS	Effekt auf Makrophagen
MC	Lactel®BP-0100	3	141 ± 47	47,6 ± 20,3	nicht toxisch
MC	Lactel®50DG040	2	23 ± 14	0,43 ± 0,15	nicht toxisch
EA	Lactel®50DG040	4	1340 ± 929	6,1 ± 4,7	nicht toxisch

MP: Mikrosphären; MC: Methylenchlorid; EA: Ethylacetat. Alle Präparationen wurden nach dem Standardprotokoll hergestellt.

Eine Aufnahme in Makrophagen konnte bei Mikrosphären, die mit Methylenchlorid hergestellt worden waren, drei Stunden nach Aufbringen der Mikrosphärensuspension beobachtet werden. Bei Mikrosphären, die mit Ethylacetat hergestellt wurden, konnte eine Aufnahme nach acht Stunden beobachtet werden.

Drei Tage nach Aufbringen der Mikrosphärensuspension auf die Zellkulturen waren keine frei im Medium liegenden Mikrosphären unter 5 μm Durchmesser mehr unter dem Lichtmikroskop zu erkennen. Mikrosphären mit mehr als 5 μm Durchmesser befanden sich in Assoziation mit Zellen. Mikrosphären, die mehr als 10 μm im Durchmesser maßen, wurden vereinzelt von Makrophagen aufgenommen. Mikrosphären, die zu groß waren, um aufgenommen zu werden, degradierten im Medium. Dabei verloren sie ihre sphärische Gestalt und nahmen ein schwammartiges Aussehen an. Die gemeinsame Inkubation von Makrophagen und Mikrosphären wurde nach 3 Wochen beendet. Zu diesem Zeitpunkt konnten noch unregelmäßig geformte Reste von Mikrosphären zwischen vitalen Makrophagen liegend nachgewiesen werden.

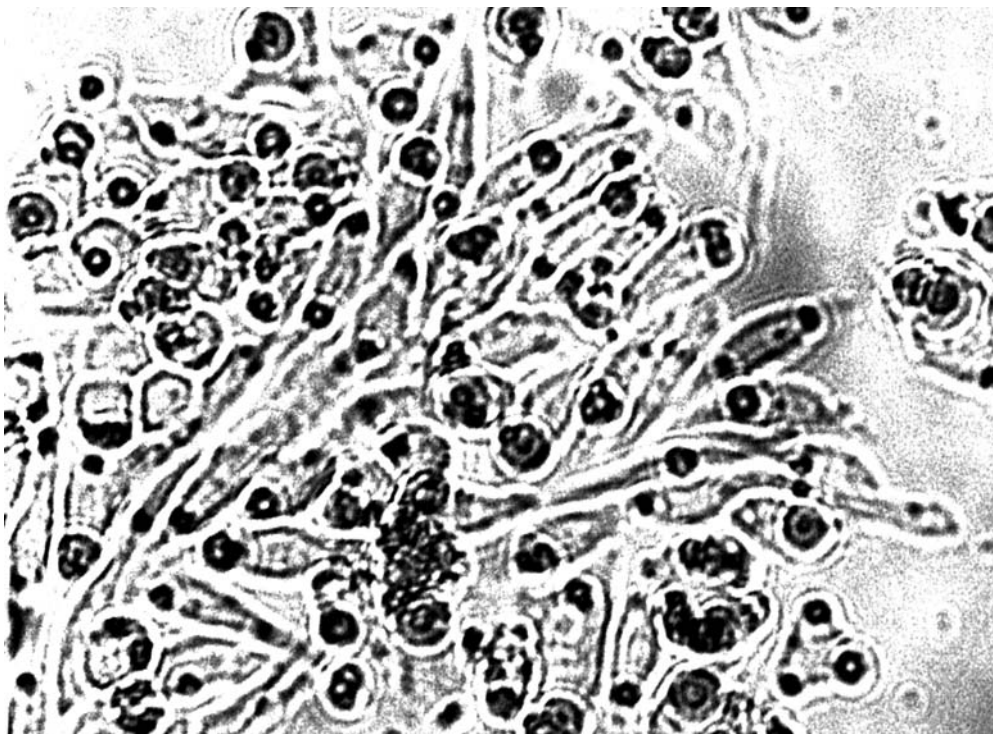


Abb. 5 a: MQ-NCSU-Makrophagenkulturen ohne Mikrosphären.

Mikroskopische Vergrößerung: 200 x.

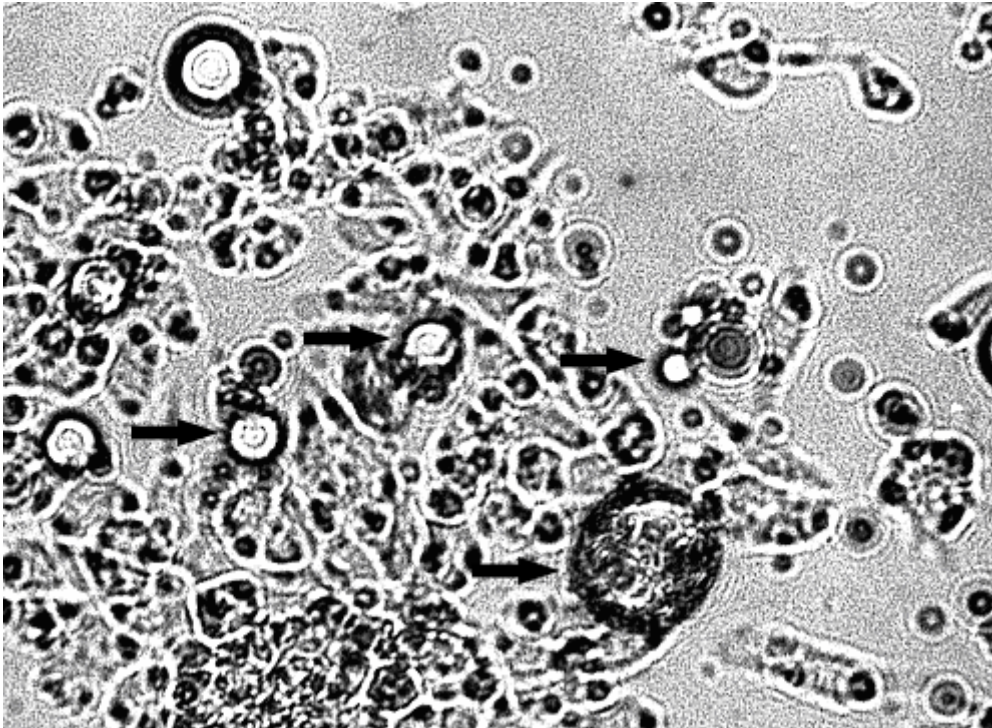


Abb. 5 b: MQ-NCSU-Makrophagen, 1 h nach Aufbringen von Mikrosphären. Schwarze Pfeile: Mikrosphären. Mikroskopische Vergrößerung: 200 x.

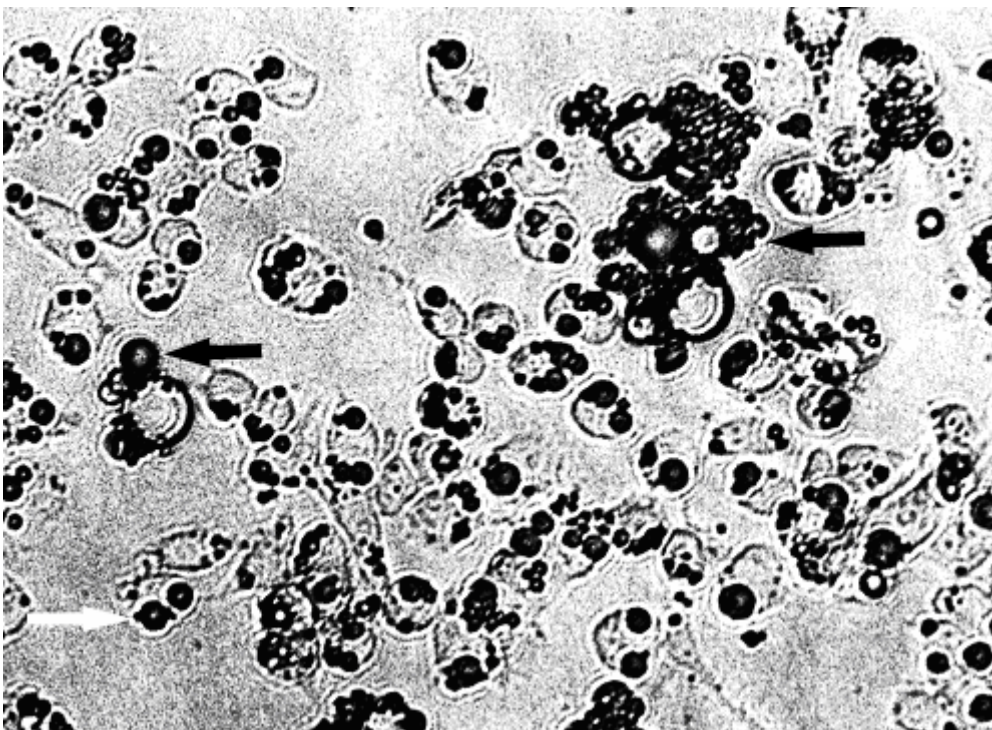


Abb. 5 c: MQ-NCSU-Makrophagen, 18 h nach Aufbringen von Mikrosphären. Schwarze Pfeile: Mikrosphären. Mikroskopische Vergrößerung: 200 x.

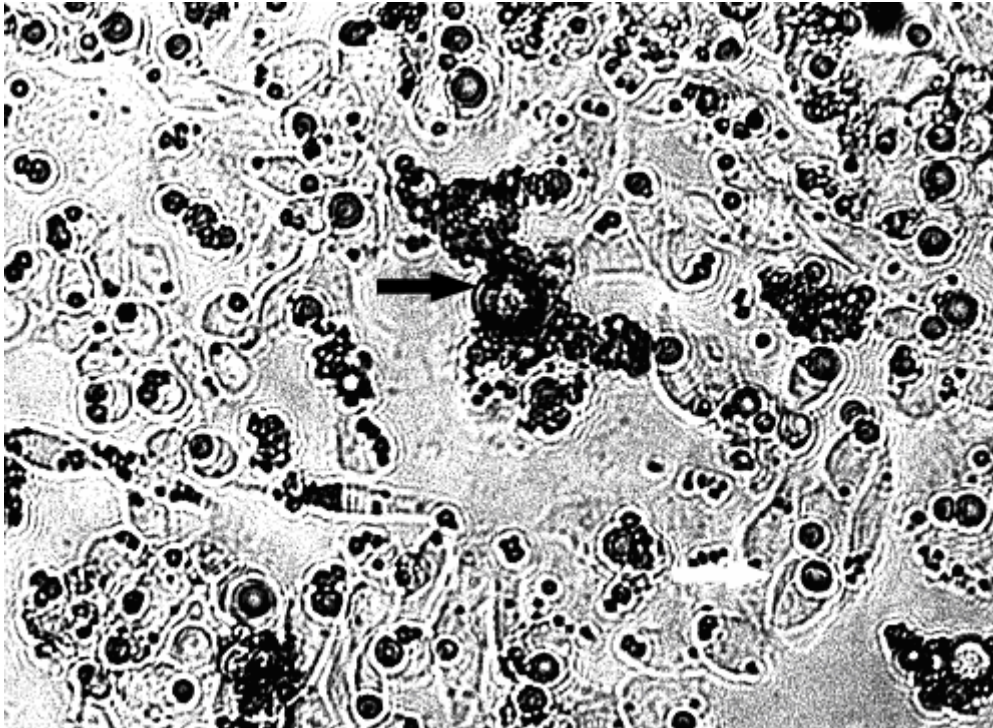


Abb.5 d: MQ-NCSU-Makrophagen, 24 h nach Aufbringen von Mikrosphären. Schwarzer Pfeil: Mikrosphären außerhalb von Makrophagen. Weißer Pfeil: Makrophagen mit aufgenommenen Mikrosphären. Mikroskopische Vergrößerung: 200 x.

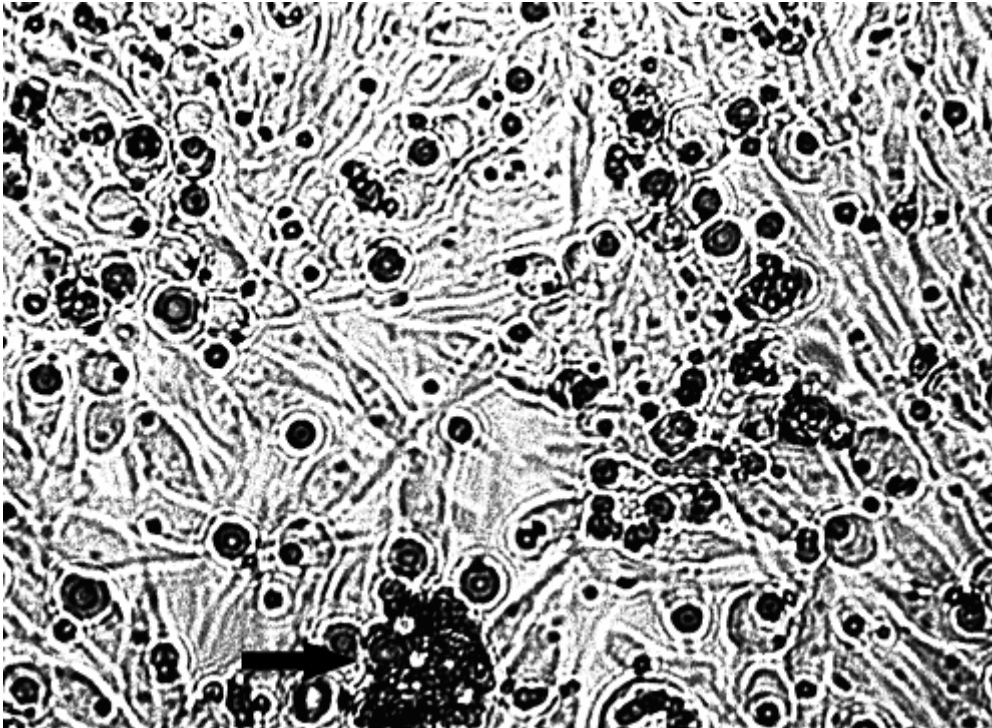


Abb. 5 e: MQ-NCSU-Makrophagen, 48 h nach Aufbringen von Mikrosphären. Schwarzer Pfeil: Mikrosphären. Mikroskopische Vergrößerung: 200 x.

6.1.4. Effekt des Lösungsmittels und des Volumenverhältnisses der Surfactantlösung zur Erstellung der Emulsion 1 und Emulsion 2 auf die Einkapselungsrate

Da in der Literatur unterschiedliche Protokolle für die Herstellung von Mikrosphären existieren, sollte untersucht werden, welche Unterschiede sich bei den gegebenen Herstellungsbedingungen in der Einkapselungsrate ergeben, wenn das Verhältnis der Volumina der Surfactantlösung zur eingesetzten Polymermenge gegenüber dem Standardprotokoll verändert wird.

Die untersuchten Präparationen wurden aus Lactel[®]50DG040 unter Verwendung von Methylenchlorid bzw. Ethylacetat als Lösungsmittel hergestellt (Tabelle 18).

Tabelle 18 Effekt unterschiedlicher Volumina von 5 %iger PVA-Surfactantlösung auf den pDNS-Gehalt der Mikrosphären aus in Methylenchlorid bzw. Ethylacetat gelöstem Polymer

Polymer:Surfactant- lösung in ml	pDNS-Gehalt in ng/mg MP		pDNS-Gehalt in % der Ausgangsmenge	
	Methylenchlorid	Ethylacetat	Methylenchlorid	Ethylacetat
1:2,5	36	189	1,3	6,9
1:12,5	353	904	4,3	11,0

Die untersuchten Präparationen wurden aus Lactel[®]50DG040, gelöst in Methylenchlorid bzw. Ethylacetat, nach dem Standardprotokoll hergestellt, mit Ausnahme des Volumens der Surfactantlösung. Eingesetzt wurden 273 µg pDNS in 0,4 ml TNE-Puffer pro 100 mg Polymer.

In Mikrosphären, die aus 1 ml PLG-Lösung und 12,5 ml Surfactantlösung hergestellt worden waren, konnte mehr DNS eingekapselt werden als in Mikrosphären, bei deren Herstellung auf 1 ml PLG-Lösung nur 2,5 ml Surfactantlösung verwendet wurde. Wie schon in Tabelle 18 gezeigt, konnten mit Ethylacetat als Lösungsmittel höhere Einkapselungsraten erzielt werden als mit dem Lösungsmittel Methylenchlorid.

6.1.5. Effekt von Zusätzen zur Stabilisierung der pDNS auf den Herstellungsvorgang von Mikrosphären, die Einkapselungsrate und die pDNS-Integrität

Das Bestreben bei der Herstellung von Mikrosphären mit eingekapselter pDNS ist es, möglichst viel pDNS in der überspiralisierten Form zu erhalten. Schädigend sind während des Emulgiervorganges auftretende Scherkräfte sowie ein Absinken des pH-Wertes des Lösungsgemisches in den sauren Bereich.

Bei der angewandten Technik sind die auf die pDNS-Moleküle einwirkenden Scherkräfte unvermeidbar. Sie wurden durch die fraktionierte Homogenisierung so gering wie möglich gehalten.

Zur Verbesserung der Stabilität der überspiralisierten pDNS erfolgte die Aufnahme der pDNS in Pufferlösung mit einem pH >7,0, durch Komplexierung der pDNS mit Poly-L-Lysin (PLL) oder durch eine Kombination von Pufferlösung und PLL (Kap. 5.5.1.2.6.).

Alle fünf Präparationen ergaben Mikrosphären, die von der Größe her geeignet waren, von Makrophagen aufgenommen zu werden. Mit gepufferter und PLL-komplexierter pDNS konnte im Vergleich mit nur gepufferter pDNS eine größere Menge pDNS eingeschlossen werden. Trotz der absolut geringeren Menge an eingeschlossener pDNS bei Pufferung mit TNE-Puffer lag die relative Menge bei dieser Präparation höher als bei den Präparationen mit TE- oder NaHCO₃ als Puffer (Tabelle 19).

Bei der Emulgierung der gepufferten und komplexierten pDNS mit der Polymer-Methylenchlorid-Lösung gab es keine Verarbeitungsunterschiede gegenüber der Herstellung von Mikrosphären in ungepufferter Lösung bzw. ohne PLL-Komplexierung der pDNS. Alle Ansätze ließen sich zu einer makroskopisch homogenen Emulsion verarbeiten. Es zeigte sich jedoch, daß nach Extraktion der pDNS aus den Mikrosphären und anschließender Ethanolpräzipitation die Präparationen mit NaHCO₃ einen unlöslichen weißlichen Niederschlag aufwiesen. Die Präparationen mit TE- oder TNE-Puffer bzw. TE-Puffer + PLL wiesen einen solchen Niederschlag nicht auf. Auf die Stabilisierung mit NaHCO₃ wurde daher bei weiteren Präparationen verzichtet.

Tabelle 19: Einfluß der Stabilisierung der pDNS durch kationische Puffer mit oder ohne Komplexierung der pDNS mit PLL auf den pDNS-Gehalt

Aufnahmepuffer für pDNS	Komplexierung mit PLL	pDNS-Gehalt		Oberfläche		Größenanteil v. MP (%) 5 - 10 µm
		ng/mg MP	%*	glatt	porös	
TE	-	94	1,9	-	+	92
TE	+	227	4,6	+	-	88
NaHCO ₃	-	94	1,9	+	-	95
NaHCO ₃	+	131	2,7	+	-	85
TNE	-	87	3,4	+	-	n.d.

MP: Mikrosphären; TE: TRIS-EDTA; NaHCO₃: Natriumhydrogencarbonat; TNE: TRIS-Natriumchlorid-EDTA; PLL: Poly-L-Lysin; n.d.: nicht durchgeführt.

%*: Prozent der eingesetzten Menge.

Alle fünf Präparationen wurden aus Lactel[®]50DG040, gelöst in Methylenchlorid, nach dem Standardprotokoll hergestellt, außer in Bezug auf die Pufferung und Komplexierung.

Der pDNS-Einsatz pro 100 mg Polymer betrug 256 µg bei der Präparation mit TNE, bei den übrigen Präparationen 493 µg pro 100 mg Polymer.

Nicht in Tabelle 19 aufgeführt sind Präparationen mit Ethylacetat als Lösungsmittel. Bei Vermischung von Ethylacetat-haltiger Polymerlösung und der gepufferten, PLL-komplexierten pDNS bildete sich ein Film, der sich teilweise am Emulgierwerkzeug ansetzte und den Emulgiervorgang behinderte. Die Ethylacetat-haltige w/o/w-Emulsion enthielt makroskopisch sichtbare unregelmäßig geformte Klumpen mit einem Durchmesser bis mehrere Hundert μm . Diese Präparationen wurden nicht weiter charakterisiert, und PLL wurden bei Präparationen mit Ethylacetat zur Komplexierung nicht mehr eingesetzt.

Da bei Verwendung von Ethylacetat als Lösungsmittel höhere Einkapselungsraten erzielt wurden (Kap. 5.5.1.2.3.), als bei der Verwendung von Methylenchlorid, wurde bei weiteren Präparationen TNE-Puffer zur Resuspendierung der pDNS eingesetzt, um durch die Kombination der Effekte von Puffer und Lösungsmittel die Einkapselungsrate zu optimieren.

6.2. Morphologische und funktionelle Integrität der pDNS

6.2.1. Nachweis der Expression von CAT bzw. GFP nach Transfektion von Zellkulturen mit pCR[®]3.1/CAT bzw. pEGFP vor Einkapselung

Transfektionen wurden mit pCR[®]3.1/CAT bzw. pEGFP bei CEF, HD11-Makrophagen und MQ-NCSU-Makrophagen durchgeführt. Die primären CEF dienten dabei als Bestätigung für das Funktionieren der Versuchsbedingungen.

Nach Transfektion sowohl mit pCR[®]3.1/CAT als auch mit pEGFP konnte bei CEF und bei den Makrophagenzelllinien MQ-NCSU und HD11 eine deutliche Fluoreszenz und somit eine Proteinexpression nachgewiesen werden. Bei der Variation der Inkubationszeit der Zellen mit dem pDNS-Transfektionsreagenz-Komplex wurde bei allen verwendeten Zelllinien die besten Ergebnisse mit einer 5-stündigen Inkubationszeit vor Zugabe von nährstoffreichem Medium erreicht (Abb. 6). Bei den nicht transfizierten Kontrollen waren keine fluoreszierenden Zellen zu erkennen.

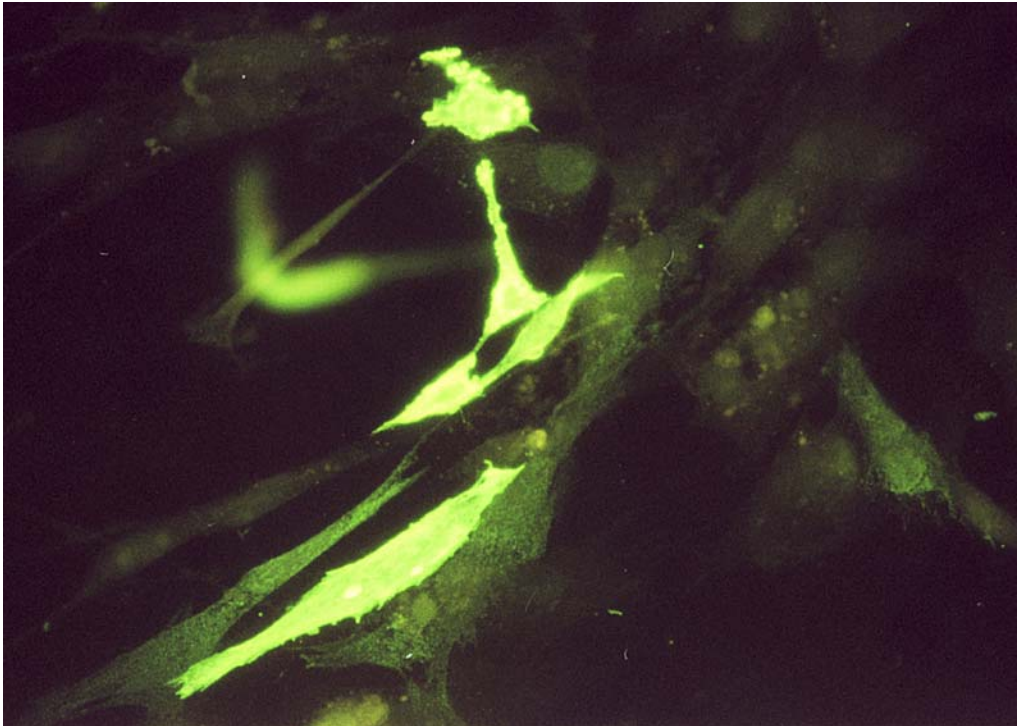


Abbildung 6: Mit pCR[®]3.1/CAT transfizierte MQ-NCSU-Makrophagen. Fluoreszenz nach fünfständiger Inkubation von MQ-NCSU-Makrophagenkulturen mit dem Plasmid pCR[®]3.1/CAT. Mikroskopische Vergrößerung: 200 x.

6.2.2. Morphologische und funktionelle Integrität der pDNS nach Einkapselung

Die morphologische Integrität der pDNS nach Einkapselung wurde an drei unterschiedlichen Mikrosphärenpräparationen durch elektrophoretische Auftrennung (Kap. 5.2.1.) überprüft.

Die verschiedenen Konformationszustände wandern im Agarosegel unterschiedlich schnell. Überspiralisierte pDNS kann am schnellsten durch das Molekülgitter des Gels wandern, gefolgt von linearisiert vorliegender pDNS. Am langsamsten wandert pDNS, die als entspannter Ring vorliegt.

Für diese Untersuchung wurden drei Präparationen von pDNS-beladene Mikrosphären aus Lactel[®] BP-0100, gelöst in Methylenchlorid herangezogen. Der pDNS-Einsatz betrug 316 µg pDNS pro mg Polymer (Tabelle 20).

Die Mikrosphären wurden in PBS bei 37°C inkubiert und die pDNS durch Ethanolpräzipitation aus dem Puffer gewonnen. Aus der Pufferlösung konnte nach

einstündiger Inkubation bei den Präparationen 22 und 23 pDNS gewonnen werden, die im Ethidium-Bromid-gefärbten 1 %igen Agarosegel am Ende der Laufzeit als drei diskrete Banden bei ca. 3000 bp, 5000 bp und 9000 bp im Vergleich mit dem Größenstandard darstellbar waren. Bei Probe 26 war je eine Bande bei ca. 3000 bp und 5000bp anfärbbar (Abbildung 7).

Als Marker wurde ein DNS-Größenstandard (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) eingesetzt. Anhand des Größenvergleichs sammelte sich pDNS in überspiralischer Konformation bei etwa 3000 bp an. Die Bande bei 5000 bp repräsentiert linearisierte pDNS und die Bande bei 9000 bp das Plasmid in der entspannten Form.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. 48 h konnte aus dem Puffer bei keiner der untersuchten Proben darstellbare pDNS isoliert werden. (Abbildung 7, Spuren 4, 5 und 9).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Abbildung 7: Agarosegel mit aus Mikrosphären extrahierter pDNS. Das aufgetragene Probenvolumen betrug jeweils 15 µl, bei dem Größenstandard 5 µl. Spur 1 enthält den 1 Kb-Größenstandard. Spur 3 enthält eine Probe pDNS mit 50 ng/ml als Mengenvergleich. Spur 6 enthält die aus Präparation 26 extrahierte pDNS, die Spuren 7 und 8 enthalten extrahierte pDNS aus Präparation 23 bzw. Präparation 22 (Tabelle 20). Spur 11 enthält nicht eingekapselte pDNS. Die Spuren 4 und 5 wurden Präzipitate der Präparationen 23 bzw. 22 nach 24 stündiger Inkubation aufgetragen. Spur 9 enthält Präzipitat der Präparation 22 nach 48 stündiger Inkubation.

Tabelle 20: Gehalt an pDNS und Konformation der pDNS im Ethidium-Bromid gefärbten Agarosegel nach 1-stündiger Inkubation in PBS

Präparation Nr.	Polymer (mg)	Lösungsmittel (ml)	pDNS-Gehalt ng/mg MP	angefärbte Banden bei bp		
				3000	5000	9000
22	20	2,0	56	+	+	+
23	40	2,0	24	+	+	+
26	100	2,0	9	+	+	-

+: anfärbbare Banden im 1%igen Agarosegel, 48 min Laufzeit bei 67 V.

Alle Mikrosphären wurden mit Lactel[®]BP-0100 hergestellt. Die angegebenen Mengen Polymer wurden in jeweils 2,0 ml Methylenchlorid gelöst. Es wurden 316 µg pDNS pro mg Polymer eingesetzt. Die übrigen Herstellungsparameter entsprachen dem Standardprotokoll.

Somit konnte gezeigt werden, daß bei den drei untersuchten Mikrosphärenpräparationen ein Teil der eingesetzten pDNS auch nach dem Einkapselungsprozess in überspiralisierter Form erhalten blieb (Tabelle 20).

Die funktionelle Integrität der extrahierten pDNS wurde durch Transfektion von MQ-NCSU-Makrophagen (Kap.5.3.) nachgewiesen. Für diesen Nachweis wurde das Plasmid pCR[®]3.1/CAT aus Mikrosphären nach Chloroformextraktion (Kap. 5.5.3.1.) und anschließender Ethanolpräzipitation (Kap. 5.5.3.2.) gewonnen. Die pDNS wurden aus Mikrosphären extrahiert, die aus Lactel[®]50DG040 mit Ethylacetat hergestellt worden waren. Die Transfektion von MQ-NCSU-Makrophagen erfolgte nach dem Transfektionsprotokoll (Kap. 5.3.). Die Expression von CAT wurde nach Markierung mit α -CAT-Antikörpern und FITC-konjugierten Antikörpern unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht (Kap. 5.4.). Die mit der extrahierten pDNS transfizierten Zellen zeigten eine deutliche grüne Fluoreszenz, wodurch die Aufnahme von intakter pDNS und deren Expression durch zelleigene Mechanismen nachgewiesen werden konnte.

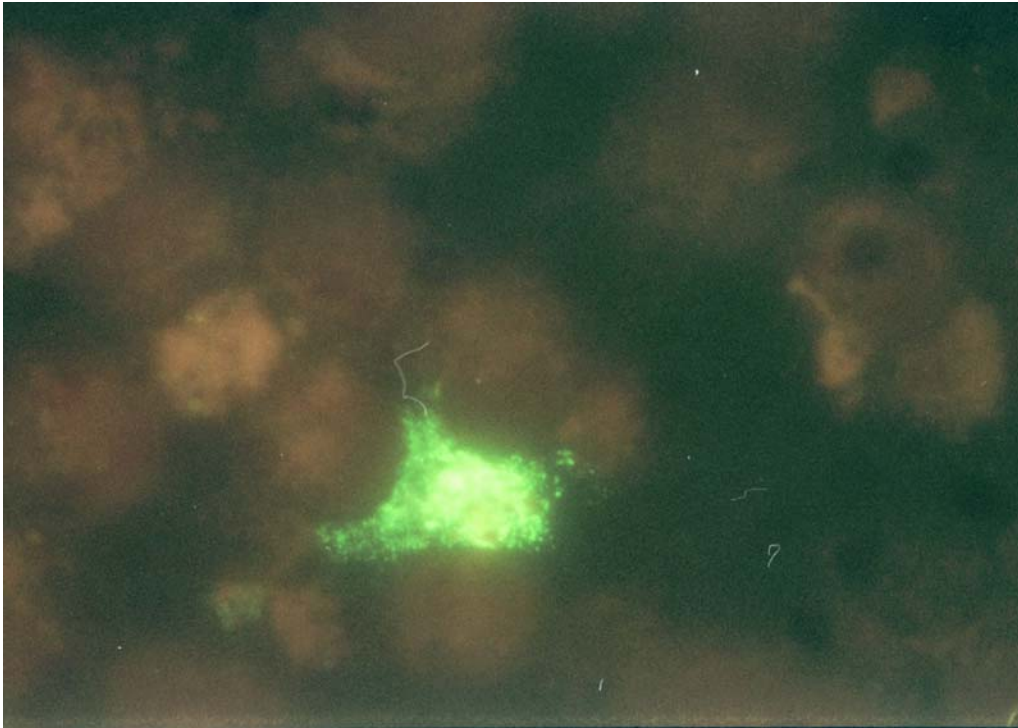


Abbildung 8 : Mit pCR[®]3.1/CAT transfizierter MQ-NCSU-Makrophage. Die pDNS wurde aus Mikrosphären extrahiert, die aus Lactel[®]BP-0100 hergestellt worden waren. Mikroskopische Vergrößerung: 400 x.

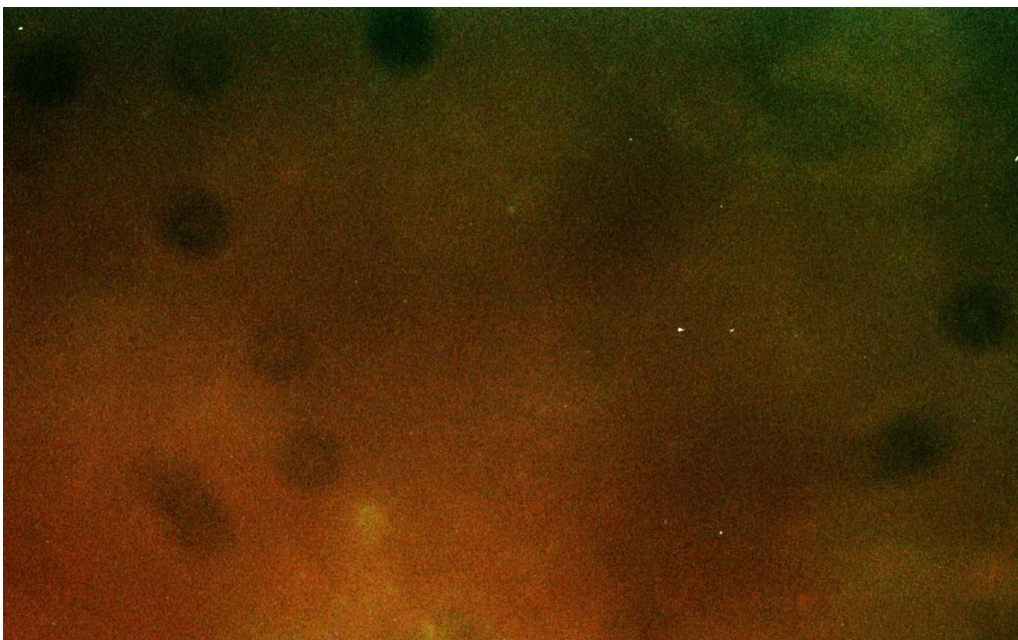


Abbildung 9: Negativkontrolle zur Transfektion von MQ-NCSU-Makrophagen mit pCR[®]3.1/CAT. Es war keine Fluoreszenz nachweisbar. Mikroskopische Vergrößerung: 400 x.

6.3. pDNS-Gehalt von Mikrosphären ohne und mit Verdau mit DNase I

Ziel der Einkapselung ist es, die pDNS vor der Degradierung durch Nukleasen im Organismus zu schützen. Es muß daher unterschieden werden zwischen pDNS, die außen an der Mikrosphärenoberfläche anhaftet und für Nukleasen zugänglich ist, und der pDNS, die vollständig in die polymere Matrix eingeschlossen ist.

Um die Menge der eingeschlossenen pDNS zu bestimmen, wurde zunächst bei verschiedenen Mikrosphärenpräparationen der Gesamtgehalt an pDNS, also die außen anhaftende und die eingeschlossene pDNS, durch Chloroformextraktion ermittelt. In einer weiteren Untersuchung wurde der pDNS-Gehalt von Mikrosphären der gleichen Präparationen durch Chloroformextraktion ermittelt, nachdem die Mikrosphären zunächst mit DNase I inkubiert worden waren.

Die Gegenüberstellung der pDNS-Gehalte mit und ohne Verdau durch DNase I zeigte, daß der überwiegenden Teil der pDNS durch die DNase I angreifbar ist und außen an den Mikrosphären anhaftet. Bei allen Präparationen waren weniger als 1 % der ursprünglich eingesetzten Menge an pDNS nicht angreifbar für die DNase I. Nur diese geringe Menge an eingesetzter pDNS kann als geschützt angesehen werden.

Tabelle 21: Gehalt an eingekapselter pDNS (ng/mg Mikrosphären) nach DNase-I-Verdau im Vergleich zum Gesamtgehalt und Anteil (%) der eingekapselten pDNS

Polymer	eingesetzte pDNS ng/mg Polymer	Gesamt-pDNS in ng/mg MP		% der eingesetzten pDNS	
		ohne Verdau	mit Verdau	ohne Verdau	mit Verdau
L BP-0100	4940	94	22	1,9	0,4
L BP-0100	2530	169	15	10,2	0,9
L50DG040	19900	412	40	2,7	0,2
R RG 503H	10000	15	7	7,0	0,07
R/L (80:20)	10000	953	10	9,6	0,1

MP: Mikrosphären; L: Lactel[®]; R: Resomer[®]; R/L: Resomer[®]RG 503H/Lactel[®]50DG040

Alle Präparationen wurden nach dem Standardprotokoll hergestellt.

6.4. Degradierungsverhalten von Mikrosphären in PBS und pDNS-Freisetzungsdynamik

Werden Mikrosphären in wässriger Lösung inkubiert, so dissoziiert zunächst die außen anhaftende pDNS. Einge kapselte pDNS diffundiert, unterstützt durch die Degradierung des Polymers, aus der Matrix in die Pufferlösung und reichert sich dort an.

Zur Untersuchung des pDNS-Freisetzungsverhaltens wurden Mikrosphären aus 100 % Lactel®BP-0100 bzw. 100 % Lactel®50DG040 über einen Zeitraum von drei Wochen verglichen. Die Menge des für die Untersuchung entnommenen Inkubationsmediums wurde jeweils ersetzt.

Mit dem entnommenen Inkubationsmedium wurde eine Ethanolpräzipitation (Kap. 5.5.3.2.) durchgeführt, um den pDNS-Gehalt im Inkubationsmedium zu bestimmen. Das Produkt der Präzipitation wurde gelelektrophoretisch (Kap. 5.2.1.) aufgetrennt.

Mit dieser Technik konnte bei den zwei untersuchten Mikrosphärenpräparationen in das Inkubationsmedium übergetretene pDNS nur nach einer Inkubationsdauer bis zu einer Stunde im Agarosegel nach Ethidium-Bromid-Färbung nachgewiesen werden, zu späteren Zeitpunkten war keine Bande mehr dektektierbar.

Tabelle 22: Mikroskopische Untersuchung der Degradierung von Mikrosphären aus PLG im geschlossenen System

Inkubationsdauer in Tagen	Form	Oberflächen- beschaffenheit	prozentuale Größenverteilung (relativ)	
			<10 µm	>10 µm
0	rund	glatt	60	40
2	rund	kleine Poren	60	40
7	rund-polymorph	unregelm. Poren	45	55
14	rund-polymorph	rauh, porös	20	80
35	polymorph	großporig	5	95
56	polymorph	zerklüftet	0	100*

* vereinzelte Reste von Mikrosphären

Im Einzelnen wurde das morphologische Degradierungsverhalten von Mikrosphären an einer Präparation aus 100 % Lactel[®] 50DG040 weiter untersucht. Dazu wurden Mikrosphären mit PBS resuspendiert. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich auf acht Wochen.

Untersucht wurden Mikrosphären aus 100 % Lactel[®]50DG040, hergestellt mit Ethylenacetat und einer 5 %igen PVA-Lösung als Surfactant. Bei dieser Präparation maßen 60 % der Mikrosphären im lyophilisierten Zustand weniger als 10 µm im Durchmesser, 40 % der Mikrosphären hatten einen Durchmesser von 10-18 µm. Über die Dauer des Versuches nahm die Anzahl der Mikrosphären, die zu Beginn größer als 10 µm gewesen waren, laufend ab. Die Degradierung der polymeren Matrix im geschlossenen System führte zu einem Verlust der sphärischen Gestalt der Mikrosphären. Bis zum 56. Tag waren noch vereinzelt unregelmäßig geformte Mikropartikel mit einem Durchmesser größer als 10 µm zu detektieren (Tabelle 22).

6.5. Phagozytose und Degradierung von MP nach Aufbringen auf Zellkulturen

Die Phagozytose von Mikrosphären wurde mit verschiedenen Mikrosphärenpräparationen an HD11- und MQ-NCSU-Makrophagenkulturen untersucht.

Eine Mikrosphärenpräparation aus Lactel[®]50DG040 mit eingekapseltem pCR[®]3.1/CAT wurde auf MQ-NCSU-Makrophagenkulturen aufgebracht. Nach viertägiger Inkubation konnte mit FITC-konjugierten α -CAT-Antikörpern eine Fluoreszenz im Zellinneren nachgewiesen werden.

HD11-Makrophagenkulturen wurden mit Mikrosphären aus Lactel[®]50DG040, die mit pCR[®]3.1/CAT bzw. pEGFP beladen waren, wurden vier Tage lang mit inkubiert. Bei diesen Zellen konnte zwar eine Aufnahme von Mikrosphären aus beiden Präparationen unter dem Lichtmikroskop festgestellt werden, allerdings war weder eine deutliche GFP-Expression noch eine CAT-Expression nach Markierung mit α -CAT-Antikörpern sichtbar.

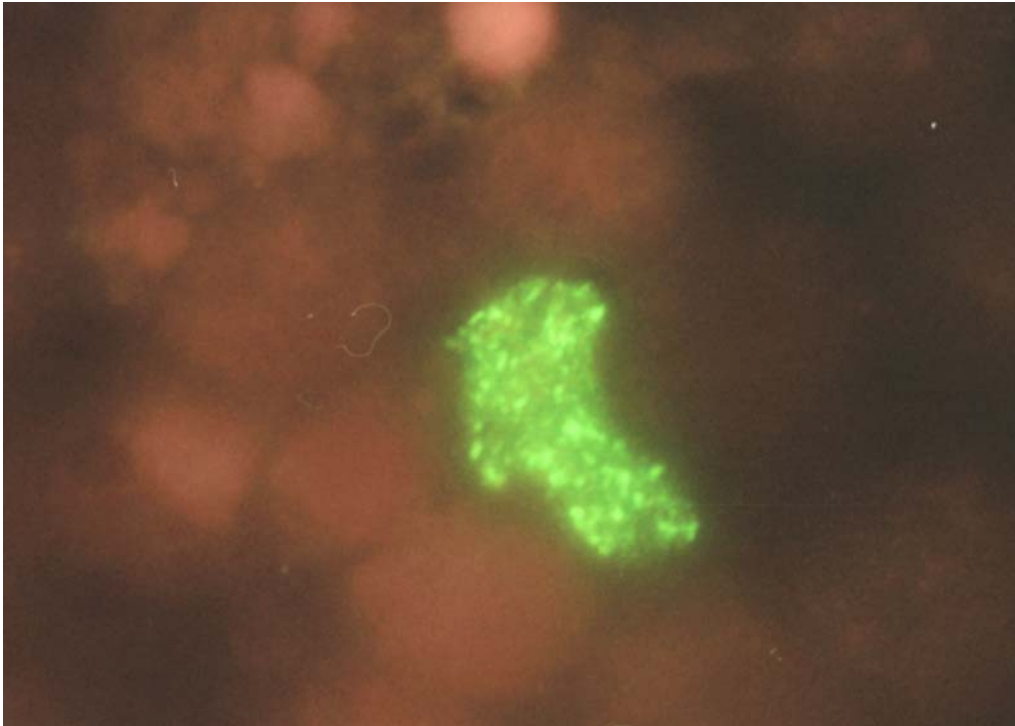


Abbildung 10: MQ-NCSU-Makrophage nach viertägiger Inkubation mit Mikrosphären, die mit pCR[®]3.1/CAT beladen waren. Die Fluoreszenz stammt von FITC-konjugierten α -CAT-Antikörpern und wurde mit UV-Licht sichtbar gemacht. Mikrosk. Vergrößerung: 400 x.

Um die Unterschiede im Degradierungsverhalten von Mikrosphären aus unterschiedlichen Polymeren zu untersuchen, wurden fünf unterschiedliche Präparationen von Mikrosphären auf MQ-NCSU-Makrophagen aufgebracht (Tabelle 23). Drei der Präparationen waren mit Ethylactat und zwei mit Methylenchlorid als Lösungsmittel hergestellt worden. Durch die Inkubation mit MQ- NCSU-Makrophagen sollte untersucht werden, ob die Verwendung dieser Lösungsmittel Einfluß auf die Phagozytose hat. Die lichtmikroskopische Evaluierung erfolgte täglich.

Mikrosphären aus Lactel[®]50DG040, die weniger als 10 μm maßen, wurden von den Makrophagen internalisiert oder wurden in Zellkultur innerhalb von 10 Tagen vollständig abgebaut. Größere Mikrosphären degradierten unvollständig. Zum Ende des Untersuchungszeitraumes von drei Wochen wiesen diese eine lichtmikroskopisch erkennbar unregelmäßige, löchrige Struktur auf. Sie befanden sich meist in Assoziation zu Makrophagen. Sowohl die mit Ethylacetat als auch die mit Methylenchlorid hergestellten Mikrosphären wurden von den Zellen aufgenommen.

Tabelle 23: Degradierungs- und Phagozytoseverhalten von Mikrospähren unterschiedlicher Polymerformulierungen, Lösungsmittel und Größenspektrum

Polymere und Polyergemische	Lösungsmittel	% Mikrospähren mit Größe (µm)						Phagozytose					
		vor Zugabe zur Zellkultur		nach 10 Tagen im Zellkulturmedium		Phagozytose							
		<5	5-10	>10	<5	5-10	>10		<5	5-10	>10		
R-RG 503H 100%	Ethylacetat	90	5	5	0	0	0	0	0	0	+	+	+
L-50DG040 100%	Methylenchlorid	65	30	5	0	0	100	0	100	0	+	+	-
L-50DG040 100%	Ethylacetat	62	32	6	0	0	100	0	100	0	+	+	-
L-50DG065 100%	Methylenchlorid	20	10	70	0	0	100	0	100	0	+	+	-
R-RG 503H:L-50DG040 (80:20)	Ethylacetat	55	40	5	0	0	100	0	100	0	+	+	-

MP: Mikrospähren; L: Lactel[®]; R: Resomer[®].

* Die Präparation aus Resomer[®] RG503H:Lactel[®] 50DG040 (80:20) wurde mit 6%iger PVA-Lösung hergestellt. Alle anderen Präparationen wurden unter Verwendung von 5%iger PVA-Lösung hergestellt.

Suspensionen der untersuchten Mikrospähren wurden auf MQ-NCSU-Makrophagenkulturen gegeben und gemeinsam inkubiert. Die Evaluation erfolgte nach einer Stunde, nach fünf Stunden und anschließend alle 12 Stunden.

Mikrosphären aus dem Polymergemisch Resomer[®]RG 503H : Lactel[®]50DG040 (80:20) verhielten sich ähnlich wie Mikrosphären aus der Polymerspezifität Lactel[®]50DG040. Auch hier persistierten in Assoziation zu Makrophagen nur Mikrosphären, die größer als 10 µm waren, unter deutlicher Veränderung ihrer ursprünglich kugeligen Gestalt.

Mikrosphären aus Lactel[®]50DG065 wurden phagozytiert, wenn sie kleiner als 10 µm waren. Größere Mikrosphären zeigten nur eine geringe Veränderung in ihrer Größe und Gestalt. Sie persistierten über den Untersuchungszeitraum von 3 Wochen hinaus als nahezu sphärische Partikel.

Mikrosphären aus 100 % Resomer[®]RG 503H zerfielen sofort nach Resuspendierung in Nährmedium in Mikrosphären von weniger als 5 µm Durchmesser. Bereits 4 Tage nach Aufbringen der Mikrosphärensuspension dieser Präparation waren lichtmikroskopisch keine Partikel mehr ausserhalb der Zellen erkennbar.

Mikrosphären aus Lactel[®]50DG040 bzw. der Mischung aus den Polymeren Resomer[®]RG 503H:Lactel[®]50DG040 (80:20) zeigten ein vergleichbares Degradierungsverhalten in der Zellkultur.

Alle Zellen, die mit Mikrosphären zusammen inkubiert worden waren, wiesen ein vitales Wachstum auf.

6.6. Aktivierung von MQ-NCSU-Makrophagen durch Mikrosphären

Die Aktivierung von MQ-NCSU-Makrophagen durch Mikrosphären wurde mittels des NO-Tests ermittelt. Als positive Kontrolle für eine Aktivierung wurden Makrophagenzellkulturen mit LPS stimuliert.

In Tabelle 24 sind die eingesetzten Mikrosphären aufgelistet. Die Freisetzung von Stickoxid (NO) nach Makrophagenstimulierung durch Mikrosphären wurde über einen Zeitraum von

96 h mit der Stimulierung durch LPS verglichen. Die ermittelten Werte beruhen auf der Extinktion nach Durchführung der Griess-Reaktion (Kap. 5.5.4.3.).

Die Stimulierung der Makrophagen durch LPS erreichte ein Plateau ca. 24 h nach Zugabe zu den Zellkulturen, nach Mikrosphären-Zugabe nach ca. 72 h. Es zeigte sich, daß einige der untersuchten Mikrosphärenpräparationen die MQ-NCSU-Makrophagen ähnlich stark stimulierten wie LPS, wenn auch verzögert.

Tabelle 24: Untersuchung unterschiedlicher Mikrosphärenpräparationen zur Aktivierung von Makrophagen

Polymer	Surfactant	PVA	Größenverteilung (μm)	$\mu\text{M NO}$ 72 h nach MP-Zugabe	Präparation Nr.
L BP-100	MC	1 %	0,7 - 15,0	43,62	5
L BP-100	MC	5 %	3,7 - 20,0	11,04	10
L 50DG040	MC	5 %	1,8 - 75,0	10,29	21
L 50DG040	EA	8 %	0,5 - 15,0	19,65	28
L 50DG040	EA	8 %	1,8 - 30,0	47,92	30
L 50DG040	MC	8 %	1 - 7,5	14,04	32
R/L 80/20	EA	5 %	1,8 - 190,0	39,31	33
R 100	EA	5 %	1,8 - 75,0	12,54	34
R/L 75/25	EA	8 %	1,8 - 30,0	11,79	41
R/L 80/20	EA	6 %	5 - 15,0	53,54	43
LPS				50,73	
Mediumkontrolle				10,10	

L: Lactel[®]; R: Resomer[®]RG 503H; MC: Methylenchlorid; EA: Ethylacetat

*: Mittelwerte aus Triplikaten

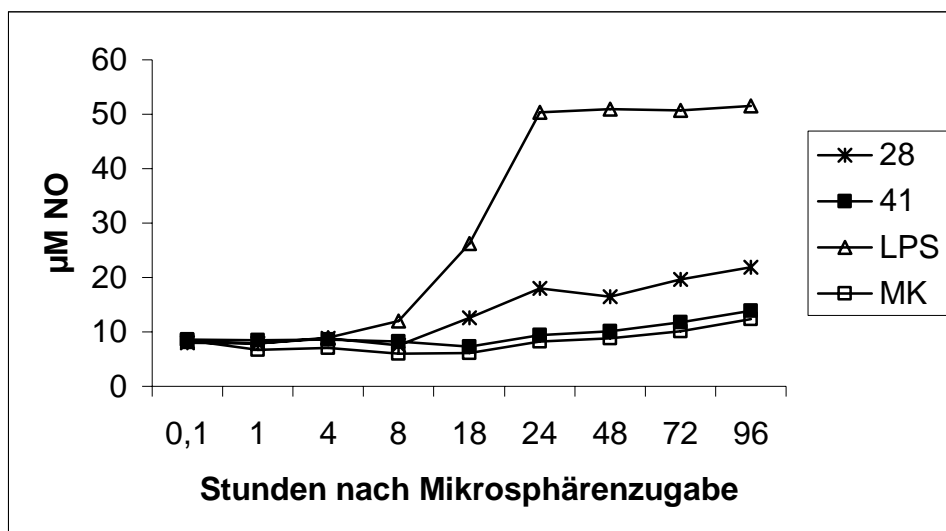


Abbildung 11: Darstellung der NO-Produktion von MQ-NCSU-Makrophagen nach Stimulierung mit MP-Präparationen, die aus unterschiedlichen Polymeren (Nr. 28: Lactel[®]50DG040; Nr. 41: Resomer[®]RG503H:Lactel[®]50DG040 75/25) hergestellt wurden, im Vergleich mit LPS-stimulierten und unstimulierten Makrophagen durch OD-Messung. Lösungsmittel (Ethylacetat) und Surfactantlösung (8 %ig) waren identisch.

MK: Mediumkontrolle

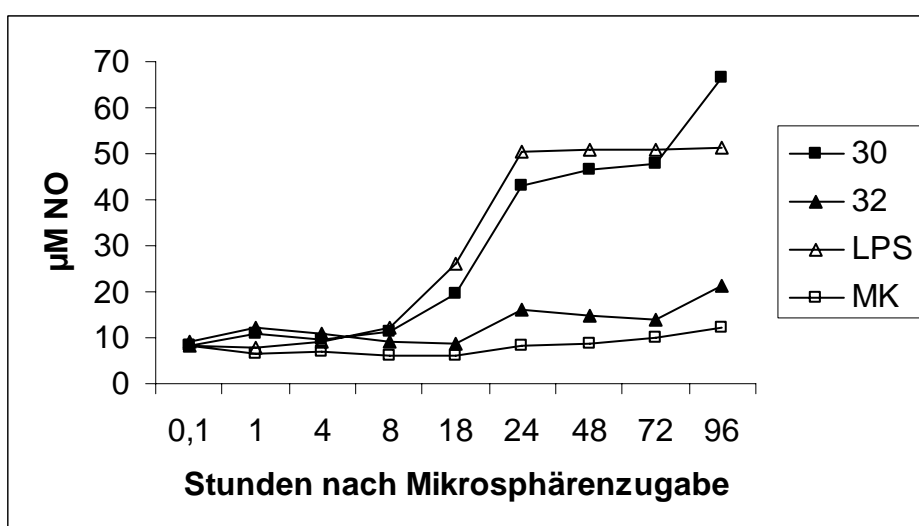


Abbildung 12: Darstellung der NO-Produktion von MQ-NCSU-Makrophagen nach Stimulierung mit MP-Präparationen aus Lactel[®]50DG040, gelöst in Ethylacetat (Nr. 30) bzw. Methylenchlorid (Nr. 32) im Vergleich mit LPS-stimulierten und unstimulierten Makrophagen durch OD-Messung.

MK: Mediumkontrolle

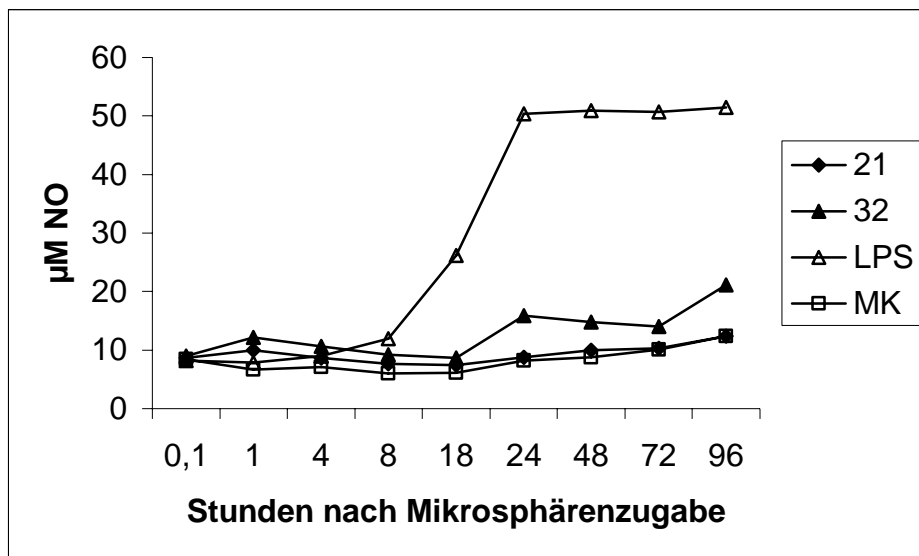


Abbildung 13: Darstellung der NO-Produktion von MQ-NCSU-Makrophagen nach Stimulierung mit MP-Präparationen, hergestellt aus Lactel[®]50DG040 mit Methylenechlorid als Lösungsmittel und 5 %iger (Nr. 21) bzw. 8 %iger PVA-Lösung (Nr. 32) durch OD-Wertmessung.

MK: Mediumkontrolle

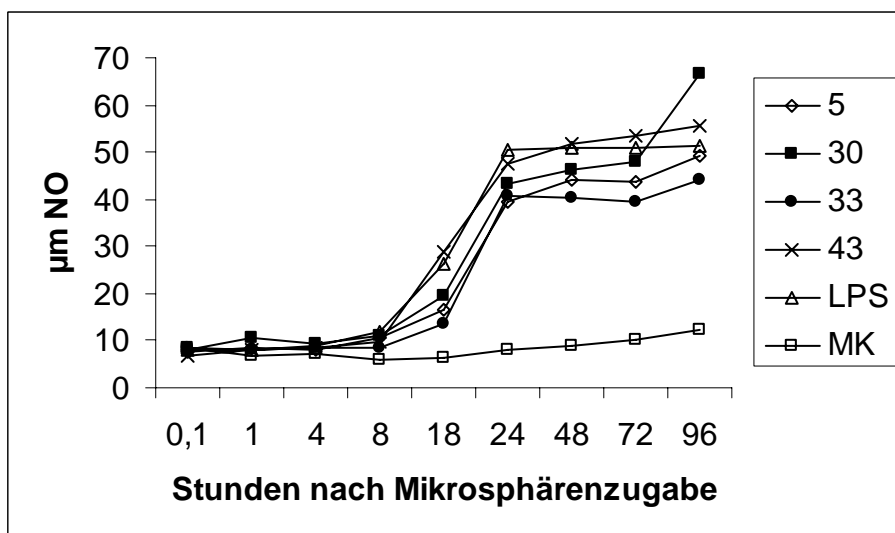


Abbildung 14: Stimulierung von MQ-NCSU-Makrophagen durch Mikrosphärenpräparationen, die vergleichbar stark wie die Stimulierung durch LPS ausfällt. Die Mikrosphären bestanden aus Polymeren Lactel[®]BP-100 (Nr. 5), Lactel[®]50DG040 (Nr. 30) sowie der Polymermischung aus 80 % Resomer[®]RG503H und 20 % Lactel[®]50DG040 (Nr. 33 und Nr. 43).

MK: Mediumkontrolle

Das bei der Herstellung von Mikrosphären verwendete Lösungsmittel hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die Stimulierung der Makrophagen. Unter den Präparationen, die eine hohe NO-Produktion hervorriefen, waren sowohl Mikrosphären, die mit Methylenchlorid als auch mit Ethylacetat hergestellt worden waren. Ebenso hatten unterschiedliche Konzentrationen der Surfactantlösung keinen Einfluß auf die Stimulierung der Makrophagen. Drei Präparationen mit einem MP-Größenbereich bis zu 15 µm stimulierten die Makrophagen vergleichbar stark wie LPS, ebenso wie eine Präparation mit einem Größenbereich von 1,8 - 190 µm Durchmesser.

Dagegen erzeugten die untersuchten Mikrosphärenpräparationen aus Resomer[®]RG503H:Lactel[®]50DG040 75/25 (Nr. 41) und aus Lactel[®]50DG040 (Nr 32), die aus unterschiedlichen Polymeren hergestellt worden waren, im Vergleich mit LPS-stimulierten Makrophagen eine deutlich geringere NO-Produktion (Abbildung 10 und 11). Lösungsmittel (Ethylacetat) und Surfactantlösung (8 %ig) waren bei diesen Präparationen identisch.

Keine deutliche Stimulierung wurde mit den Mikrosphärenpräparationen aus Lactel[®]50DG040, hergestellt mit dem Lösungsmittel Methylenchlorid und 5 %iger Surfactantlösung (Nr. 21) bzw. mit dem Lösungsmittel Ethylacetat (Nr. 28) und 8 %iger Surfactantlösung, erreicht (Abbildung 10 und 12).

Die NO-Produktion von MQ-NCSU-Makrophagen nach Stimulierung mit Mikrosphärenpräparationen aus Lactel[®]50DG040, gelöst in Ethylacetat (Nr. 30) bzw. Methylenchlorid (Nr. 32), und mit 8 %iger Surfactantlösung hergestellt, war bei Präparation Nr. 30 vergleichbar mit der LPS-Stimulierung und bei Präparation Nr. 32 geringfügig über dem Wert der unstimulierten Makrophagen.

Es war kein Zusammenhang zwischen der Verwendung der einzelnen Mikrosphärenkomponenten und der Fähigkeit zur Stimulierung zu erkennen.

6.7. Untersuchungen zur *in ovo*- und *in vivo*-Applikation von Mikrosphären

Um die Effekte der Mikrosphäreninokulation nach *in ovo*-Applikation zu untersuchen, wurden Mikrosphären aus verschiedenen Präparationen am 18. Bebrütungstag in embryonierte Hühnereier injiziert. Die Mikrosphärenapplikation ins Küken erfolgte direkt nach dem Schlupf bzw. am 19. Lebenstag oral oder als i.m.-Injektion.

6.7.1. Effekt von Mikrosphären auf die Vitalität und Schlupfrate nach *in ovo*-Inokulation

Die *in ovo*-Inokulation erfolgte mit Mikrosphären aus verschiedenen Präparationen. Es wurden Mikrosphären appliziert, in die pDNS eingekapselt wurde sowie leere Mikrosphären. Bewertet wurden die Vitalität am 20. Bebrütungstag und die Schlupfrate.

Tabelle 25: Vitalität und Schlupfrate nach *in ovo*-Inokulation von Mikrosphären am 18.

Bebrütungstag		
Versuch	Inokulat	Vitalität am 20. Tag der Bebrütung
1	200 µl MP-S	100%
2	200 µl MP-S	100%
3	200 µl MP-S	100%

MP-S: Mikrosphärensuspension

Nach der Inokulation am 18. Bebrütungstag mit unterschiedlichen Mikrosphären wurden die Bruteier täglich geschickt. Einbußen in der Vitalität konnten mit keiner der getesteten Mikrosphärenpräparationen festgestellt werden. Zwei Tage nach Inokulation waren 100% der inokulierten Embryonen vital. Präparationen, die einen großen Anteil an Mikrosphären enthielten, die > 30 µm im Durchmesser waren, konnten nicht mit der 0,70 x 32 mm Kanüle in Ei injiziert werden. In diesem Fall wurde eine 0,90 x 40 mm Kanüle verwendet, ohne Vitalitätseinbußen der Embryonen.

Im chi-square-Test (two tailed) war die Schlupfrate zwischen inokulierten und Kontrolleiern nicht signifikant unterschiedlich ($P > 0,05$).

In einem weiteren Versuch wurde die *in ovo*-Inokulation von Mikrosphärensuspension in den Dottersack am 6. Bebrütungstag durchgeführt, um zu überprüfen, ob diese Inokulationsroute für die Applikation einer Vakzine auf CRS-Basis praktikabel ist. Jedes Brutei wurde mit 500 µl einer Mikrosphärensuspension bzw. 500 µl PBS inokuliert. Es wurde eine Mikrosphärenpräparation aus 80 % Resomer[®]RG 503H und 20 % Lactel[®]50DG040 eingesetzt. Von den mit Mikrosphärensuspension in den Dottersack inokulierten Bruteiern waren am 20. Bebrütungstag 100% der Embryonen vital.

6.7.2. Effekte der oralen und i.m.-Applikation von Mikrosphären

Die i.m.-Inokulation von Mikrosphären verursachte keine Ausfälle oder klinische Krankheitssymptomatik bei den Küken. Eingesetzt wurden je Tier 500 µl einer Mikrosphären aus 75% Resomer[®]RG 503H und 25 %Lactel[®]50DG040 in PBS.

Die Applikation wurde bei Eintagsküken bzw. am 19. Lebenstag in den Oberschenkel vorgenommen. Die Mikrosphärensuspension konnte nicht bei allen Tieren in der Muskulatur abgesetzt werden. Bei einigen Tieren verteilte sich das Inokulat teilweise subkutan. Bei drei Tage nach der Inokulation zur Sektion kommenden Küken waren an den Injektionsstellen weder Reste der Mikrosphärensuspension noch Läsionen oder Entzündungserscheinungen erkennbar.

Auch nach oraler Applikation von Mikrosphären waren bei den Küken keine pathologisch-anatomischen Veränderungen oder Todesfälle festzustellen.

7. Diskussion

Die Infektionsprophylaxe ist in allen Bereichen der Massentierhaltung, gerade auch beim Wirtschaftsgeflügel, oft entscheidend für die Rentabilität der Produktion. Trotz intensiven Vakzineeinsatzes kommt es jedoch immer wieder zu Feldinfektionen, bedingt durch unzureichenden Schutz der kommerziell erhältlichen Lebend- und Inaktivatvakzinen. Zudem besteht bei Lebendvakzinen die Gefahr der Rückmutation zu infektiösen Erregern. Mit der Entwicklung von DNS-Vakzinen wurden in den letzten Jahren nicht nur experimentell, sondern auch im kommerziellen Einsatz gute Erfolge erzielt, weil sich diese Vakzinen als sehr sicher, gut verträglich und effektiv erwiesen haben. Ein Nachteil dieser Vakzinen liegt darin, daß sie meist parenteral als Einzeltierapplikation verabreicht werden, denn oral verabreichte Nukleinsäurevakzinen verlieren während der Magendarmpassage rasch an Wirksamkeit. Ziel der vorliegenden Studie ist es, mit der Entwicklung eines CRS zur DNS-Vakzinierung einen Beitrag zur Verbesserung von Vakzinierungsstrategien beim Huhn zu leisten.

7.1. Zielsetzung und Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung von Mikrosphären aus DLPLG als potentielle Träger für eine DNS-Vakzine für das Huhn getestet. Obwohl umfangreiche experimentelle Untersuchungen zu DNS-Vakzinen in Form von CRS beim Säuger vorgenommen und vielversprechende Ergebnisse publiziert wurden, wurde dieses System bisher weder *in vitro* noch *in vivo* beim Huhn getestet. Wegen der unterschiedlichen Physiologie von Säugern und Vögeln sind im Säugetiermodell gewonnene Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf aviäre Systeme zu übertragen. Deshalb wurden Mikrosphären aus unterschiedlichen PLG-Polymerspezifitäten als Matrix für eine pDNS-Vakzine hergestellt und charakterisiert. Ausgewählte Präparationen wurden *in vitro* an Hühnermakrophagen und *in ovo* im embryonierten Hühnerei sowie nach oraler und i.m.-Applikation auf ihre Verträglichkeit im Organismus von SPF-Küken überprüft.

Zunächst wurde auf der Basis des veröffentlichten Protokolls von HEDLEY et al. (1998) ein Herstellungsprotokoll für Mikrosphären aus PLG etabliert und Mikrosphären erzeugt, die eine möglichst große Mengen an Plasmid-DNS einschließen. Diese Mikrosphären sollten von der Größe her geeignet sein, von Hühnermakrophagen aufgenommen zu werden. Außerdem wurde die Eignung dieser Mikrosphären für die Verträglichkeit als *in ovo*-Vakzine sowie zur oralen und i.m.-Applikation untersucht.

Im Phagozytoseversuch wurde nachgewiesen, daß Mikrosphären aus PLG mit eingekapselter pDNS nicht toxisch für Hühnermakrophagen sind und von der permanenten Hühnermakrophagenzelllinie MQ-NCSU phagozytiert werden. Weitere Versuche mit *ex vivo*-Kultivierung von primären Makrophagen müssen in der Zukunft diese Beobachtung bestätigen. Das Plasmid pCR[®]3.1/CAT wurde als Reporterplasmid in Mikrosphären eingekapselt und das kodierte Protein nach Expression in MQ-NCSU-Makrophagen mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Mikrosphärenpräparationen aus unterschiedlichen Polymeren degradierten in der Hühnermakrophagenzellkultur und die Makrophagen wurden durch die Mikrosphären stimuliert.

In Versuchen zur *in vivo*-Applikation wurde festgestellt, daß pDNS-beladene PLG-Mikrosphären für Hühnerembryonen nach *in ovo*-Inokulation nicht toxisch sind und keinen Einfluß auf die Vitalität der Embryonen oder den Schlupf haben. Die orale Applikation bei Küken am ersten bzw. neunzehnten Lebenstag wurde ohne erkennbare Schädigung der Tiere vertragen. Intramuskuläre Injektion von Mikrosphärensuspension in die Oberschenkelmuskulatur von Küken wurden ohne lokale Gewebeschäden oder systemische Krankheitserscheinungen vertragen. Die lokale Expression von Plasmid kodiertem Protein muß in weiteren Untersuchungen in der Zukunft noch nachgewiesen werden.

Mit den durchgeführten Untersuchungen in Zellkultur und am Tier wurde der grundsätzliche Nachweis der Eignung eines CRS zur Vakzineentwicklung beim Huhn erbracht und eine gute Grundlage für die Weiterentwicklung von DNS-Vakzinen beim Geflügel gelegt. Eine eingekapselte DNS-Vakzine bietet den Vorteil, daß sie bei allen Altersklassen, sowohl *in ovo* als auch oral, zur Massenapplikation geeignet ist, da die eingekapselte DNS bei diesem Applikationssystem vor der Degradierung im Magendarmtrakt geschützt ist.

7.2. Bewertung der Ergebnisse

7.2.1. Anforderungen an pDNS-beladene Mikrosphären

Ziel eines CRS auf der Basis von Mikrosphären ist, mit einer einmaligen Applikation von pDNS-enthaltenden Mikrosphären eine Erstimmunisierung und nach Degradierung der Matrix fünf bis sieben Tage später eine Boosterimmunisierung zu erzeugen. Literaturangaben unterstützten die These einer zweiphasigen Freisetzung der eingekapselten pDNS aus PLG-Mikrosphären, die vor allem von der Degradierungsrate des Polymers abhängt (CHALLACOMBE et al., 1992; O'HAGAN et al., 1994; SANDOR et al., 2001). Die erste Phase betrifft die Freisetzung von oberflächennah lokalisierten DNS-Molekülen. Die zweite Phase erfolgt nach der Degradierung des polymeren Gerüsts der Mikrosphären. Auch eine langsame kontinuierliche Abgabe von pDNS, die mehr einer natürlichen Infektion gleicht, könnte geeignet sein, eine belastbare Immunität zu erzeugen, falls die Degradierung der polymeren Matrix nicht dem zweiphasigen Verlauf folgt, sondern mehr linear vonstatten geht.

7.2.2. Eignung der verwendeten Polymere

Mikrosphären, die aus Lactel[®]BP-0100, Lactel[®]50DG040, den Resomer[®]RG 503H : Lactel[®]50DG040 (75:25)- und Resomer[®]RG 503H : Lactel[®]50DG040 (80:20)-Gemischen hergestellt worden waren, hatten ein vergleichbares Größenspektrum, welches dem angestrebten Bereich entsprach. Mikrosphären aus den Gemischen von Resomer[®]RG 503H und Lactel[®]50DG040 wiesen eine höhere Beladung mit pDNS auf als die Mikrosphären aus den Polymeren Lactel[®]BP-0100 bzw. Lactel[®]50DG040.

Für die Herstellung von Mikrosphären wurde DLPLG verwendet, da die Unbedenklichkeit dieses biologisch abbaubaren Polymers in lebenden Systemen gut erforscht und in Formulierungen mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften erhältlich ist (BENDIX, 1998). Die in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich eingesetzten Polymerformulierungen Lactel[®]BP-100 und Lactel[®]50DG040 wurden ausgewählt, weil die

Degradierung der daraus hergestellten Mikrosphären, wie in zahlreichen Veröffentlichungen übereinstimmend dokumentiert, *in vivo* zum überwiegenden Teil innerhalb von einer bis vier Wochen stattfindet. Um die Eigenschaften der Mikrosphären zu modifizieren, wurden das Polymer Lactel[®] 50DG040 bei einigen Präparationen mit dem schneller degradierenden Polymer Resomer[®]RG 503H gemischt. Die Präparationen aus 100 % Resomer[®]RG 503H bzw. 100 % Lactel[®]50DG065 entsprachen nicht den Vorgaben des Versuches, überwiegend Mikrosphären bis zu einer Größe von 10 µm Durchmesser herzustellen und erwiesen sich aufgrund der Größenverteilung der Mikropartikel daher als ungeeignet.

Die Polymere Lactel[®]BP-100 und Lactel[®]50DG040, einzeln oder in Mischung mit 20 bzw. 25 % Resomer[®]RG 503H ließen sich mit dem Doppemulsionsverfahren unter den gegebenen Laboreinrichtungen gut verarbeiten. Die daraus erzeugten Mikrosphären entsprachen dem angestrebten Größenspektrum und konnten von Makrophagen aufgenommen werden. Durch eine Verfeinerung der Methoden sollte in weiteren Untersuchungen die optimale Polymerformulierung noch herausgefunden werden.

7.2.3. Bewertung des Herstellungsverfahrens

Als Herstellungsverfahren zur Erzeugung von Mikrosphären wurde das Doppemulsionsverfahren nach HEDLEY et al. (1998) gewählt. Auf dieses Verfahren beziehen sich die Protokolle von vielen Forschungsgruppen, die sich mit der Herstellung und Charakterisierung von Mikrosphären befasst haben. Modifizierungen des von HEDLEY et al. (1998) vorgeschlagenen Protokolls bestanden in der Verwendung unterschiedlich konzentrierter Surfactantlösungen und verschiedener Pufferlösungen zur Stabilisierung der Nukleinsäure und um die Einkapselungsrate der pDNS zu optimieren.

Mit dem Doppemulsionsverfahren konnten Mikrosphären unter Laborbedingungen ohne großen technischen Aufwand hergestellt werden. Bei nahezu allen Präparationen, mit Ausnahme derjenigen unter Verwendung des Polymers Lactel[®] 50DG065, wurden sphärische Partikel erzeugt, die vom Größenspektrum her dem Verwendungszweck zumindest teilweise entsprachen. Mindestens 50 % der erzeugten Mikrosphären lagen in dem Größenbereich bis zu 10 µm im Durchmesser und waren somit geeignet, von Makrophagen

aufgenommen zu werden. Als ungünstig erwiesen sich Präparationen, die einen hohen Anteil an Mikrosphären enthielten, die größer als 50 μm im Durchmesser waren, da solche Mikrosphären nicht mehr von Makrophagen aufgenommen werden können und sich nur schlecht für eine Applikation *per injectionem* eignen.

Ein Problem stellte die erhebliche morphologische Heterogenität der erzeugten Mikrosphären dar, die selbst bei Präparationen aus identischen Komponenten festzustellen war und besonders das Größenspektrum der Mikrosphären betraf. Dies wird vor allem auf die manuelle Bedienung des Emulgierwerkzeuges zurückgeführt und ließe sich bei einer Technisierung der Herstellung vermeiden.

7.2.4. Effekte unterschiedlich konzentrierter Surfactantlösungen

Entsprechend dem Verwendungszweck war die Vorgabe die Herstellung von Mikrosphären in einem Größenbereich bis 10 μm Durchmesser. Außer durch die Polymerspezifität kann die Größe der Mikrosphären nach Literaturangaben am besten durch die Konzentration der Surfactantlösung beeinflusst werden. Dazu wurden die einzelnen Präparationen entweder mit 5%iger, 6%iger oder 8%iger PVA-Lösung als Surfactant hergestellt. Diese damit hergestellten Präparationen enthielten unterschiedliche Anteile an Mikrosphären mit der erwünschten Größe. Eine deutliche Auswirkung der Konzentration der Surfactantlösung auf das Größenspektrum ließ sich nicht feststellen. Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung von CAPAN et al. (1999), bei deren Versuchen mit der Erhöhung der PVA-Konzentration von 1 % auf 7 % die Größe der Mikrosphären von durchschnittlich 6,6 μm auf 2,2 μm abnahm.

7.2.5. Einkapselungskapazität und pDNS-Integrität

Ein generelles Problem bei der Herstellung von pDNS-beladenen Mikrosphären war die nur geringe Menge an Nukleinsäure, die in die polymere Matrix eingearbeitet werden konnte. Diese Feststellung wird von anderen Arbeitsgruppen geteilt (ANDO et al., 1999; WALTER et al., 1999).

Um die Einkapselungsrate zu optimieren und die eingesetzte pDNS möglichst schonend in die Polymerlösung einzuarbeiten, wurden Variationen des Standardprotokolls vorgenommen. Die beste Einkapselungsrate konnte nach Verwendung von TNE- oder TE-Pufferlösung mit einem pH-Wert von 8,0 im Vergleich zu der Verwendung von A. bidest. als Resuspendiermedium für die pDNS erzielt werden. Die höchste Beladung von Mikrosphären wurde mit 2,780 µg/mg Mikrosphären mit TNE-gepuffert pDNS erzielt. Die von TINSLEY-BOWN et al. (2000) bzw. PEREZ et al. (2001) dokumentierte ca. viermal höhere Einkapselungsrate von 11 µg/mg Mikrosphären konnte nicht erreicht werden.

Während Nukleinsäuren gegenüber den Komponenten der Matrix von Mikrosphären relativ unempfindlich sind, solange der pH-Wert der Lösungen um 8,0 bleibt, können die mechanischen Einwirkungen während des Homogenisiervorgangs die überspiralisiert vorliegende pDNS zerstören. Zur Erhaltung eines möglichst hohen Anteils der überspiralisierten Konformation der pDNS wurde daher das Emulgierschema von TINSLEY-BOWN et al. (1998) übernommen, welches fraktionierte Homogenisierungszyklen mit dazwischenliegenden Pausen vorsieht. Als weiterer Optimierungsschritt wurde eine Komplexierung der pDNS mit Poly-L-Lysin (PLL) vorgenommen. Die PLL-Komplexierung war mit Ethylacetat jedoch nicht praktikabel, sondern nur in Verbindung mit Methylenchlorid als Lösungsmittel. CAPAN et al. (1999) erzielten in ihren Untersuchungen mit der Komplexierung von pDNS mit PLL einen Anteil an überspiralisierter pDNS von 45 - 65 % der eingekapselten pDNS, abhängig von der verwendeten Polymerspezifität.

Durch die Kombination von fraktionierter Homogenisierung, Pufferung in TNE mit einem pH-Wert von 8,0 und PLL-Komplexierung der pDNS vor der Erstellung der ersten Emulsion, bei Verwendung von Methylenchlorid als Lösungsmittel, konnte bei den hier dokumentierten Untersuchungen ein geschätzter Anteil von 60 % der Mikrosphären-assoziierten pDNS in überspiralisierter Konformation erhalten werden.

7.3. Charakterisierung der Mikrosphären

Bei der Bewertung der hergestellten Mikrosphären lag der Schwerpunkt auf den Parametern Größe, pDNS-Einschlußkapazität und Eignung zur Phagozytose durch Makrophagen sowie Verträglichkeit *in vitro* und *in vivo*.

7.3.1. Morphologie der Mikrosphären

Die Größenbestimmung mit Hilfe des Lichtmikroskops und skaliertem Okular ermöglichte eine brauchbare und schnelle Beurteilung der Mikrosphären bereits vor der Gefriertrocknung. Durch den Gefriertrocknungsprozess veränderten sich die Mikrosphären morphologisch nicht erkennbar. Strukturelle Unterschiede der einzelnen Präparationen, wie eine glatte oder unregelmäßige Oberfläche sowie die Bildung von Konglomeraten waren in der 200fachen Vergrößerung gut zu erkennen. Ebenso konnte die fragile Struktur der Präparationen aus Resomer[®] RG 503H, die bereits kurz nach Resuspendierung zerfielen, gut unter dem Mikroskop beobachtet werden. Auffällig war bei der lichtmikroskopischen Beurteilung einiger Präparationen die unterschiedliche Lichtbrechung, die einen Teil der Mikrosphären dunkel erscheinen ließ. Es wird vermutet, daß die Unterschiede in der Lichtbrechung verschiedene Einkapselungsraten reflektieren, da Mikrosphären sowohl in Reservoirform als auch in Matrixform hergestellt werden können (COWSAR et al., 1985). Im Inneren hohle Mikrosphären mit einem eingeschlossenen Reservoir an pDNS-Lösung könnten größere Mengen pDNS enthalten als die Matrixform mit dispers verteilter pDNS. Aufschluß über die Ursache für die unterschiedliche Lichtbrechung bei Mikrosphären aus derselben Präparation könnte eventuell durch elektronenmikroskopische Beurteilung am Gefrierbruch nach gewichtsabhängiger Auftrennung gewonnen werden (TINSLEY-BOWN et al., 2000).

7.3.2. Beladung der Mikrosphären mit pDNS

Nach der Optimierung des Herstellungsprotokolls konnte eine maximale pDNS-Beladung von 2,78 µg/mg Mikrosphären erzielt werden. Das entspricht einer Beladung von 0,278 % in

Bezug auf das Mikrosphärengewicht. Wie die Inkubation dieser Mikrosphären mit DNase I vor Extraktion der pDNS ergab, hafteten mehr als 99 % der pDNS an der Oberfläche. Nur weniger als 1 % war von der polymeren Matrix umschlossen. Es zeigte sich, wie auch schon in der Literatur beschrieben, daß der Einschluß größerer Mengen an pDNS schwierig ist. CAPAN et al. (1999) geben für deren Präparation von pDNS-beladenen Mikrosphären eine Totalbelastung von 0,9 % der eingesetzten pDNS-Menge an. Meist werden als Totalbelastung nur 1 - 2 µg/mg Mikrosphären erreicht. MCKEEVER et al. (2002) bestimmten den Gehalt an pDNS bei ihren Präparationen allerdings mit 3,4 - 4,5 µg/mg.

Die bei den eigenen Präparationen erzielten Einkapslungsmengen blieben deutlich hinter den von TINSLEY-BOWN et al. (2000) veröffentlichten Werten (11 µg/mg) zurück, obwohl sich das Herstellungsprotokoll weitgehend an dem dieser Arbeitsgruppe orientierte. Teilweise wurde zur Erzeugung von beladenen Mikrosphären sogar mehr pDNS eingesetzt als von TINSLEY-BOWN et al. (2000). Die Auswertung verschiedener Präparationen zeigte, daß eine hohe Konzentration der eingesetzten pDNS-Lösung nicht zwangsläufig mit einer hohen Einkapslungsrate korreliert. Eine um 62 % höhere Einkapselungsrate erzielten ANDO et al. (1999) dadurch, daß sie die DNS-Lösung zuerst tiefgefroren und anschließend mit der Polymerlösung homogenisierten, anstatt die DNS-Lösung in flüssigem Aggregatzustand einzusetzen.

Zur Optimierung der Einschlusskapazität in Mikrosphären sind daher weitere Versuche notwendig. Möglicherweise könnten mit einem Verfahren, bei dem die polymere Matrix vermischt mit pDNS als solide Masse zur Aushärtung gebracht und anschließend auf die gewünschte Korngröße vermahlen wird, höhere Werte an eingeschlossener pDNS erzielt werden.

7.3.3. Integrität der eingekapselten pDNS

Die morphologische Integrität von extrahierter pDNS konnte durch gelelektrophoretische Auftrennung nachgewiesen werden. Im Agarosegel waren drei deutliche Banden anfärbbar, die den drei Konformationszuständen der pDNS entsprachen. Wie PEREZ et al. (2001)

feststellten, wird stets ein Teil der eingesetzten pDNS durch den Einkapselungsprozess von der überspiralisierten Form zu der entspannten Ringform bzw. der linearisierten Form konvertiert.

MQ-NCSU-Makrophagen, die mit aus Mikrosphären extrahierter pDNS transfiziert wurden, exprimierten ebenfalls das kodierte Protein. Damit konnte erstmals in Zellkultur gezeigt werden, dass die pDNS nach Extraktion aus Mikrosphären intakt ist und somit den Einkapselungsprozess und die Freisetzung ohne Schädigung überstehen kann.

Dieser Nachweis der funktionellen Integrität von eingekapselter pDNS ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen mehrerer Forschungsgruppen, die nach Applikation von pDNS-beladenen Mikrosphären bei Labormäusen *in vivo* eine Proteinexpression feststellten (OFFIT et al., 1994; JONES et al., 1996; MCKEEVER et al.; 2002). Entsprechende *in vivo*-Versuche beim Huhn stehen für zukünftige Untersuchungen noch aus.

Obwohl das Problem der pDNS-Beladung von Mikrosphären trotz unterschiedlicher Modifizierungen des Standardprotokolls nicht zufrieden stellend gelöst werden konnte, wurde gezeigt, daß die pDNS durch den Einkapselungsprozess ihre biologische Aktivität nicht verliert. MQ-NCSU-Makrophagen wurden vier Tage lang mit Mikrosphären, die mit dem Plasmid pCR[®]3.1/CAT beladen waren, inkubiert. Mit FITC-konjugierten Antikörpern gegen CAT konnte anschließend eine Expression der kodierten Proteine in den Zellen nachgewiesen werden.

7.4. Untersuchungen zum Phagozytoseverhalten

Ziel der Verabreichung von CRS in Form von Mikrosphären ist das selektive Ansprechen von Makrophagen als bedeutendes Segment der zellulären Abwehr. Makrophagen sezernieren nach Aufnahme körperfremden Materials eine Reihe von Mediatoren und modulieren auf diese Weise die Immunantwort. Um diese Eigenschaft der Makrophagen gezielt zu nutzen, müssen die Mikrosphären so konfektioniert sein, daß eine Aufnahme ins Zytoplasma der Zellen möglich ist.

7.4.1. Phagozytose von Mikrosphären durch Hühnermakrophagen

In den Untersuchungen zur Phagozytose durch die MQ-NCSU-Makrophagen konnte gezeigt werden, daß diese Zellen Mikrosphären aus PLG aufnehmen und durch Inkubation zusammen mit Mikrosphären nicht in ihrer Vitalität beeinträchtigt werden. Die Abhängigkeit der Phagozytoserate von der Mikrosphärengröße war deutlich erkennbar. Mikrosphären bis 5 µm im Durchmesser, oder Fragmente von Mikrosphären in dieser Größe, wurden rasch von den Zellen phagozytiert, während Mikrosphären, die größer als 10 µm im Durchmesser waren, auch nach drei Wochen lichtmikroskopisch noch erkennbar waren. Bei der gemeinsamen Inkubation von Mikrosphären und Makrophagen über einen längeren Untersuchungszeitraum, in der vorliegenden Studie von drei Wochen, konnte nicht eindeutig zwischen Degradierung und Phagozytose unterschieden werden. Beide Prozesse laufen wahrscheinlich parallel ab, wobei zuerst die Fraktion der Mikrosphären < 5 µm aus dem Medium verschwand. Mikrosphären, die durch Degradierung in kleinere Fragmente zerfielen, wurden im Laufe des Inkubationszeitraumes von den Makrophagen aufgenommen, so daß die Menge der Mikrosphären kontinuierlich abnahm. Am Ende des Untersuchungszeitraumes befanden sich noch vorhandene größere Fragmente immer in Assoziation zu den Zellen. Daher kann auf eine intensive Interaktion zwischen den Makrophagen und dem polymeren Material geschlossen werden.

7.4.2. Stimulierung von Makrophagen durch PLG-Mikrosphären

Der Stickoxidtest zur Bestimmung der Stimulierung von Makrophagen wurde mit MQ-NCSU-Makrophagen durchgeführt.

Lichtmikroskopisch war bereits kurz nach Aufbringen der Mikrosphärensuspension auf die Makrophagenkulturen eine deutliche Zunahme von intrazellulären Vesikeln erkennbar. Parallel zur lichtmikroskopisch beobachteten Vesikelbildung erfolgte ein deutlicher Anstieg der NO-Produktion bei gemeinsamer Inkubation von Makrophagen und einigen der untersuchten Mikrosphärenpräparationen. Mit dem NO-Test wurde die Eignung von PLG-Mikrosphären zur Stimulierung von Hühnermakrophagen in Zellkultur nachgewiesen. Es

kann angenommen werden, daß diese Fähigkeit zur Stimulierung auch *in vivo* hervorgerufen werden kann.

Die in den Versuchen eingesetzten, sehr phagozytoseaktiven MQ-NCSU-Makrophagen konnten jedoch nicht mit jeder der zehn ausgewählten Mikrosphärenpräparationen gleichermaßen stimuliert werden. Die eingesetzten Mikrosphärenpräparationen waren aus den Polymerspezifitäten Lactel[®]BP-100, Lactel[®]50DG040, Resomer[®]RG 503H bzw. den Polymermischungen aus 80 % Resomer[®]RG 503H und 20 % Lactel[®]50DG040 und 75 % Resomer[®]RG 503H und 25 % Lactel[®]50DG040 hergestellt worden. Als Lösungsmittel waren sowohl Methylenchlorid als auch Ethylacetat verwendet worden. In allen untersuchten Präparationen waren Mikrosphären in einer für die Aufnahme in die Zellen geeigneten Größe vorhanden. Welche Gründe für eine gute, mäßige oder ausbleibende Stimulierung ausschlaggebend waren, konnte nicht ermittelt werden. Da die Erzeugung von Mikrosphären in der richtigen Größe im Vordergrund der Studie stand, wurden weitere physikochemische Eigenschaften der Mikrosphären, die mitentscheidend für eine gute Aufnahme durch Makrophagen sein können, nicht untersucht. So beeinflussen nach ELDRIDGE et al. (1990) die Hydrophobizität der polymeren Matrix und die Oberflächenladung der Mikrosphären die Phagozytoserate. Aus Polymeren mit hohem Molekulargewicht können stärker hydrophobe Mikrosphären erzeugt werden, Polymere wie das verwendete Resomer[®] RG503H ergeben mehr hydrophile Mikrosphären (LILL und SANDOW, 1996). AHSAN et al. (2002) beobachteten, daß hydrophobe Mikrosphären in Zellkultur besser phagozytiert werden als hydrophile, und sowohl eine positive als auch negative Oberflächenladung die Phagozytoserate erhöht. Nach PRIOR et al. (2002) kann die Oberflächenladung sowohl durch die Beladung mit therapeutisch wirksamen Substanzen als auch durch Beschichtung mit opsonisierenden Substanzen, wie z. B. BSA, beeinflußt werden und dann von der werkstoffimmanenten Oberflächenladung der polymeren Matrix abweichen, d.h. diese verstärken oder abschwächen. Wahrscheinlich spielt die Oberflächenladung der Mikrosphären bei der Interaktion mit Zellen, nicht nur *in vitro* sondern auch bei der Applikation *in vivo*, eine bedeutende Rolle. Durch die Beschichtung von Nanopartikeln mit Lectinmolekülen als opsonisierenden Substanzen konnten FLORENCE et al. (1995) eine verstärkte Aufnahme in darmassoziierte lymphatische und nichtlymphatische Gewebe bei Ratten gegenüber der Anwendung von unbehandelten Mikrosphären feststellen.

7.5. Untersuchungen zur *in ovo* und *in vivo*-Applikation von Mikrosphären

Neben der Herstellung von Mikrosphären war die Praktikabilität der *in ovo*- und *in vivo*-Applikation ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Während es zur Inokulation von Mikrosphären im Mausmodell umfangreiche Literatur gibt (ELDRIDGE et al., 1991; CHALLACOMBE et al., 1992; NARDELLI et al., 1994; OFFIT et al., 1994; NAKAOKA et al., 1995; KLAVINSKIS et al., 1996; JONES et al., 1997; CHEN et al., 1998; HEDLEY et al., 1998; IGARTUA et al., 1998; KANEKO et al., 2000; STURESSON und WIKINGSSON, 2000; KENDE et al., 2002; MCKEEVER et al., 2002; NAKASE et al., 2002), sind Veröffentlichungen über die Applikation von Mikrosphären beim Huhn und besonders die *in ovo*-Injektion von partikulären Substanzen noch selten (JOCHEMSEN und JEURISSEN, 2002). Bei der vorliegenden Studie stand die Frage der Verträglichkeit der applizierten Mikrosphären im Vordergrund, die Verteilung der Mikrosphären im Empfängerorganismus war nicht Gegenstand der Versuche. Diese sollte aber in weiterführenden Studien untersucht werden.

7.5.1. Untersuchungen nach *in ovo*-Applikation von Mikrosphären

Die Injektion der Mikrosphären ins embryonierte Hühnerei erfolgte manuell nach dem standardisierten Schema von SHARMA und BURMESTER (1984). Am 18. Bebrütungstag injizierte Substanzen werden bei dieser Applikationsroute in 89 % der Fälle ins Amnion plaziert und in 11 % der Fälle in den Embryo.

Mikrosphären, die *per injectionem* appliziert werden sollen, müssen für diese Technik geeignet sein, damit das Absetzen des Inokulums ohne großen Widerstand durchgeführt werden kann. Für eine zügige Injektion darf der maximale Durchmesser der Mikrosphären nur so groß sein, daß die einzelnen Mikrosphären während der Passage durch das Kanülenlumen gegeneinander verschieblich sind, um ein Blockieren der Kanüle durch die Partikel zu verhindern. Nicht jede der untersuchten Präparationen konnte nach Resuspendierung mit der 0,70 x 32 mm Kanüle ins Ei abgesetzt werden, weshalb die Injektion in diesen Fällen mit einer stärkeren Nadel erfolgte. So blockierte eine

Mikrosphärenpräparation aus Lactel 50DG040, die Mikrosphären bis 30 µm Durchmesser enthielt, die Kanüle.

Für die Untersuchungen zur *in ovo*-Applikation wurden bis zu 42 mg Mikrosphären pro Brutei in einem Suspensionsvolumen bis 500 µl appliziert. Am 18. Bebrütungstag in die Amnionhöhle applizierte Mikrosphären wurden von 100 % der Embryonen ohne Vitalitätsverlust vertragen. Ebenso wenig gab es Ausfälle nach der Applikation von Mikrosphärensuspension am 6. Bebrütungstag in den Dottersack. Beim Schieren konnte festgestellt werden, dass alle inokulierten Embryonen am 20. Bebrütungstag vital waren.

Die einzige Veröffentlichung zur *in ovo*-Applikation von partikulären Substanzen stammt von JOCHEMSEN und JEURISSEN (2002) und behandelt die Verteilung der Inokulate im Hühnerembryo. Diese Untersuchungen wurden mit kolloidaler Kohle und Polystyrol-Latex-Mikrosphären durchgeführt. Nach Inokulation ins Amnion am 16. bzw. 18. Bebrütungstag konnten die injizierten Kohle- bzw. Polystyrol-Latex-Partikel sowohl in der Lunge als auch im Gastrointestinaltrakt, einschließlich der Bursa cloacalis, nachgewiesen werden. Am 18. Bebrütungstag verabreichte Substanzen akkumulierten rascher nach der Inokulation in den Organen der Embryonen, als nach Inokulation am 16. Bebrütungstag. Als Grund dafür wird angesehen, dass erst ab dem 17. Bebrütungstag die rhythmische Atmung der Embryonen einsetzt und das Inokulat dann oral aufgenommen wird. Auch wenn angenommen werden kann, dass sich Mikrosphären aus PLG im Adsorptionsverhalten an Zellverbände von Kohle- oder Polystyrol-Latex-Partikeln unterscheiden, so ist doch mit demselben Aufnahmemechanismus in den Atmungs- und Verdauungstrakt der Embryonen zu rechnen.

7.5.2. Untersuchung von Mikrosphären nach oraler bzw. i.m.-Applikation

In den Versuchen am geschlüpften Küken wurde die orale und i.m.-Applikation von Mikrosphärensuspension individuell am Einzeltier vorgenommen, um sicherzustellen, daß identische Mengen verabreicht wurden. Nach oraler Applikation konnten ebenso wenig wie nach i.m.-Applikation klinische Krankheitserscheinungen oder systemische oder lokale Schädigung am Tier festgestellt werden.

Die i.m.-Applikation von Mikrosphären bei Eintagsküken bzw. 19 Tage alten Küken in die Oberschenkelmuskulatur verursachte keine lokale Entzündung. Drei Tage nach Inokulation waren keine makroskopisch sichtbaren Läsionen an der Injektionsstelle vorhanden. Damit hat sich die gute Gewebeverträglichkeit von PLG-Mikrosphären, wie in Studien am Säuger beschrieben, auch beim Vogel bestätigt. Aufgrund der gegenüber Säugetieren höheren Körpertemperatur und der damit verbundenen hohen Stoffwechselrate beim Vogel werden in den Organismus eingebrachte Mikrosphären wahrscheinlich schneller abgebaut als in Säugetiermodellen. Bei der Konfektionierung von CRS mit verzögerter oder kontrollierter Abgabe sollte dies in der Zukunft berücksichtigt werden.

Die Verteilung von oral applizierten Mikrosphären wurde nicht untersucht. Auch hier wird angenommen, daß im Verteilungsmuster Analogien zur Verabreichung von partikulären Substanzen aus anderem Material bestehen. So untersuchten PORTER et al. (1997) die größenabhängige Aufnahme von fluoreszierenden Latex-Partikeln an ligierten Darmabschnitten von acht Wochen alten Hühnerküken. Innerhalb einer Stunde nach Applikation konnten sie eine Aufnahme von Partikeln bis 2 µm Durchmesser in die Lamina propria von Duodenum, Ileum und Caecum feststellen. Die Aufnahme der Partikel erfolgte dabei über die ganze Mukosa verteilt durch intraepitheliale Leukozyten und nicht, wie häufig beim Säuger beschrieben, überwiegend durch M-Zellen, zumal vermutet wird, daß M-Zellen beim Huhn in geringerer Anzahl vorkommen als bei Säugetieren (JEURISSEN et al., 1999). HOSHI et al. (1999) verglichen die Aufnahme von Mikropartikeln aus Polystyrol-Latex bzw. DLPLG mit verschiedenen Molekulargewichten beim Huhn und stellten ebenfalls eine Eingrenzung des Größenspektrums der aufgenommenen Mikrosphären auf weniger als 10 µm fest. Während Fluoreszein-markierte Polystyrol-Latex-Partikel bis 4,5 µm Durchmesser vor allem in die Peyer'schen Platten aufgenommen wurden, zeigte sich nach Verabreichung von PLG-Mikrosphären eine gute Aufnahme von Mikrosphären aus PLG mit einem Molekulargewicht von ca. 60 000 in diese Gewebe. Dagegen wurden Mikrosphären aus PLG mit einem Molekulargewicht von 20 000 nicht aufgenommen, obwohl diese Mikrosphären im bevorzugten Größenbereich von weniger als 5 µm lagen. HOSHI et al. (1999) nahmen als Ursache für eine Aufnahme oder deren Ausbleiben weitere, nicht offenkundige Charakteristika der Mikrosphären an, die außer dem Größenspektrum ausschlaggebend sind.

O'HAGAN et al. (1991) verabreichten PLG-Mikrosphären aus derselben Präparation an Mäuse und Ratten. Während die Ratten gegen das eingekapselte Antigen eine Immunantwort zeigten, blieb diese bei den Mäusen aus, obwohl es sich bei den Versuchstieren um zwei nahe verwandten Spezies handelte. Wie im Phagozytoseversuch bestehen auch bei der *in vivo*-Applikation noch erhebliche Wissenslücken bezüglich der Parameter, die eine Aufnahme begünstigen oder verhindern.

7.6. **Schlußfolgerung**

Aufgrund der in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen kann für die *in ovo*- als auch die *in vivo*-Applikation beim Huhn ein CRS auf der Basis von PLG-Mikrosphären als geeignet zur Vakzinierung betrachtet werden. Die spärlich vorhandene Literatur zur Applikation und *in vivo*-Aufnahme von partikulären Substanzen beim Huhn unterstützt diesen Entwicklungsansatz insoweit, daß die Aufnahme von Latex-Mikropartikeln in die mukosalen immuninduktiven Gewebe des Darmes bereits beschrieben wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine eingekapselte pDNS-Vakzine auf der Basis von DLPLG am embryonierten Hühnerei bzw. beim Hühnerküken angewendet werden kann. Die Problematik bei der Herstellung der Mikrosphären zur *in vivo*-Anwendung betraf in erster Linie die physikalischen und physikochemischen Eigenschaften der erzeugten Mikrosphären, wie Inhomogenität bei der Herstellung definierter Präparationen und unkontrollierte, eventuell zu schnelle Degradierung. Durch weitere Optimierung der Herstellungsparameter und die Weiterentwicklung von Polymeren sollten Mikropartikel hergestellt werden, die im Einkapselungs- und Freisetungsverhalten besser steuerbar sind. Damit könnte eine sichere und gut verträgliche Vakzine auf der Basis eines CRS für alle Leistungsgruppen in der Geflügelproduktion entwickelt werden.

Zukünftig muß außerdem die *in vivo*-Expression von pDNS kodierten Proteinen oder Peptiden weiteruntersucht werden, sowie die Induktion von lokalen und systemischen Immunreaktion auf die Expressionsprodukte beim Huhn.

8. Zusammenfassung

Lieselotte Peiser

Entwicklung und Charakterisierung eines kontrollierten Freisetzungssystems für die *in ovo*-Vakzination beim Huhn.

Trotz intensiver Prophylaxemaßnahmen durch herkömmliche Vakzinen ist die sichere und kostengünstige Gesunderhaltung großer Tierbestände, insbesondere von Geflügelbeständen, nicht immer gewährleistet. Neuere Entwicklungen haben gezeigt, dass rekombinante Impfstoffe auf der Basis von Plasmid-DNS (pDNS), welche für Antigene von pathogenen Erregern kodiert, eine Möglichkeit darstellen, eine belastbare Immunität zu induzieren. Jedoch ist es notwendig, diese pDNS-Vakzinen parenteral zu verabreichen, was bei großen Tierbeständen nicht praktikabel ist.

Durch die Einkapselung von pDNS-Vakzinen in Mikrosphären kann jedoch die pDNS geschützt und beispielsweise eine orale Applikation ermöglicht werden. Je nach Konfektionierung der Mikrosphären kann eine protrahierte oder phasische Abgabe der pDNS erzielt werden.

Die Eignung und Verträglichkeit von Mikrosphären als kontrolliertes Freisetzungssystem für die pDNS-Vakzination beim Geflügel ist noch nicht untersucht worden. Ziel dieser Arbeit war, ein kontrolliertes Freisetzungssystem auf der Basis von Mikrosphären zur pDNS-Vakzination beim Huhn zu entwickeln. Dieses System soll insbesondere für die *in ovo*-Applikation, ein in der Praxis gut geeignetes Verfahren zur Impfung großer Geflügelbestände, einsetzbar sein.

Es wurden verschiedene Konfektionierungen von Mikrosphären, hergestellt nach dem Doppelemulsionsverfahren, charakterisiert.

Es wurde untersucht auf Mikrosphärengröße, um eine optimale Aufnahme durch Makrophagen zu gewährleisten; pDNS-Einkapselungskapazität; pDNS-

Freisetzungsverhalten; pDNS-Integrität; Eignung zur Aufnahme durch und Stimulation von Hühnermakrophagen; *in vitro*-Expression des Modellantigens Chloramphenicol-acetyltransferase (CAT); *in vivo*-Verträglichkeit nach Applikation *in ovo* und nach dem Schlupf.

Verschiedene Formulierungen von poly(lactide-co-glycolide) (PLG) in Kombination mit unterschiedlichen Lösungsmitteln, oberflächenaktiven Substanzen und pDNS-stabilisierenden Maßnahmen wurden zur Optimierung der Mikrosphärenpräparationen getestet. Von den getesteten Polymeren zeigten die mit den Spezifitäten Lactel[®]BP-0100 und Lactel[®]50DG040 oder Mischungen dieser mit Resomer[®]RG 503H in Kombination mit den Lösungsmitteln Methylenchlorid und Ethylacetat die beste DNS-Einkapselungsrate bei optimaler Größe der Mikrosphären von 5 - 10 µm. Diese Mikrosphären wurden von Hühnermakrophagen aufgenommen, welche das Modellantigen CAT exprimiert haben.

Weiterhin waren diese Mikrosphären nicht toxisch für Hühner nach dem Schlupf und für Hühnerembryonen am 6. und 18. Tag der Bebrütung.

Somit konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Mikrosphären dieser Formulierungen nicht toxisch und somit sicher für das Huhn beim Einsatz als kontrolliertes Freisetzungssystem für pDNS-Vakzinen sind. In weiterführenden Studien ist in der Zukunft auch die Antigenexpression nach *in vivo*-Applikation der pDNS-Vakzine zu bestätigen und die Induktion einer stabilen Immunität zu überprüfen.

9. Summary

Lieselotte Peiser

Development and characterisation of a controlled release system for *in ovo*-vaccination of chickens.

Despite vigorous vaccination strategies in the field, health problems continue to be of major economic importance for commercial farm animals, especially poultry. New generation vaccines such as recombinant plasmid DNA (pDNA) vaccines encoding for antigens of pathogens offer new opportunities for the induction of protective immunity in vaccinated animals. For commercial poultry vaccination, pDNA has not been practicable so far, because these vaccines have to be administered individually via parenteral routes. Recent studies have shown that encapsulation of pDNA in microspheres will protect the pDNA and even oral application may be possible. Depending on the configuration of the microspheres the release of the pDNA may be delayed or phasic.

The possible use and safety of microspheres as a controlled release system for pDNA-vaccines for poultry has not been tested yet.

The goal of this study was to develop a microsphere based controlled release system for pDNA vaccination of chickens. The specific focus was on the *in ovo* route for vaccine administration, because this route is successfully used in the field for mass vaccination. Different protocols for the production of microspheres in a variety of configurations were tested using the emulsification/solvent evaporation method. The following parameters were investigated: size of microspheres, being important for their take-up by macrophages; pDNA encapsulation rate; pDNA release; pDNA integrity. The *in vitro* take-up of microspheres by macrophages, their stimulation, and *in vitro* expression of the model antigen chloramphenicol aminotransferase (CAT) encoded by the enclosed pDNA was tested. Furthermore, the safety of the microsphere preparations was investigated after *in ovo* vaccination as well as after intramuscular and subcutaneous vaccination of post hatch chickens. A variety of poly(lactide-co-glycolide) formulations in combination with different solvents, surfactant factors, and pDNA stabilising factors were tested. The best pDNA encapsulation rate with microsphere size distribution between 5 - 10 μm was obtained with

Lactel[®]BP-0100 and Lactel[®]50DG040 or their mixture with Resomer[®]RG 503H. These microspheres were prepared with dichloromethane and ethyl acetate, and were taken up by chicken macrophage cells, which successfully expressed CAT. Furthermore, it was demonstrated that these microspheres were non-toxic for chickens or embryos, which had received the microspheres after hatch or at 6 or 18 days of embryonation, respectively. Overall, in this study it was demonstrated that microspheres prepared with the described protocols were non-toxic for chickens and chicken macrophages and can be considered safe as a potential controlled release system for pDNA-vaccines in chickens. Future studies have to confirm the expression of the encapsulated pDNA encoded antigens and the development of protective immunity after *in vivo* administration.

10. Literaturverzeichnis

- AHSAN, F., I. P. RIVAS, M. A. KHAN u. A. I. TORRES SUÁREZ (2002)
Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers - liposomes and microspheres - on the phagocytosis by macrophages.
J. Controll. Release 79, 29 - 40
- ANDO, S., D. PUTNAM, D.W. PACK u. R. LANGER (1999)
PLGA microspheres containing plasmid DNA: preservation of supercoiled DNA via cryopreparation and carbohydrate stabilization.
J. Pharm. Sci. 88(1), 126 - 130
- BABIUK, L. A., S. L. BABIUK, B. I. LOEHR u S. VAN DRUNNEN LITTEL-VAN DEN HURK (2000)
Nukleic acid vaccines: research tool or commercial reality.
Vet. Immunol.Immunopathol. 76, 1 - 23
- BENDIX, D. (1997)
Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications.
Polymer Degradation and Stability 59, 129 - 135
- VAN DEN BERG, T.P (2000)
Acute infectious bursal disease in poultry: a review.
Avian Pathology 29, 175 - 194
- BEUG, H., A. V. KIRCHBACH, G. DÖDERLEIN, J.-F. CONSCIENCE u. T. GRAF (1979)
Chicken Hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia virus display three distinct phenotypes of differentiation.
Cell, 18, 375 - 390
- BLOOM, B. R. (1989)
Vaccines for the third world.
Nature 342, 115 - 120
- BROCKHAUS ENZYKLOPÄDIE, Band 11
19. Auflage 1990, FA Brockhaus, Mannheim
- BUTTER, C., T. D. M. STURMAN, B. J. G. BAATEN u. T. F. DAVISON (2003)
Protection from infectious bursal disease virus (IBDV)-induced immunosuppression by immunization with a fowlpox recombinant containing IBDV-VP2.
Avian Pathology 32(6), 597 - 604
- CAO, Y.C., Q.C. SHI, J.Y. MA, QM. XIE UND Y. Z. BI (2005)
Vaccination against very virulent infectious bursal disease virus using recombinant T4 bacteriophage displaying viral protein VP2.
Acta Biochem. Biophys. Sin (Shanghai) 37(10), 657 - 664
- CAPAN, Y., B. H. WOO, S. GEBREKIDAN, S. AHMED u. P. P. DELUCA (1999)

Influence of formulation parameters on the characteristics of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres containing poly(L-lysine) complexed plasmid DNA.

J. Controll. Release 60, 279 - 286

CHALFIE, M. (1995)

Green fluorescent protein.

Photochem. Photobiol. 62(4), 651 - 656

CHALFIE, M., Y. TU, G. EUSKIRCHEN, W. W. WARD u. D. C. PRASCHER (1994)

al a marker for gene expression.

Science 263, 802 - 805

CHALLACOMBE S. J., D. RAHMAN, H. JEFFERY, S. S. DAVIS u. D. T. O'HAGAN (1992)

Enhanced secretory IgA and systemic IgG antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles containing antigen.

Immunology 76, 164 - 168

CHANG, H. C., T. L. LIN u. C. C. WU (2002)

DNA-mediated vaccination against infectious bursal disease in chickens.

Vaccine 20, 328 - 335

CHANG, H. C., T. L. LIN u. C. C. WU (2003)

DNA vaccination with plasmids containing various fragments of large sement genome of infectious bursal disease virus.

Vaccine 21, 507 - 513

CHEN, H. (2000)

Recent advances in mucosal vaccine development.

J. Controll. Release 67, 117 - 128

CHEN, S. C., D. H. JONES, E. F. FYNAN, G. H. FARRER, J. C. S. CLEGG, H. B. GREENBERG u. J. E. HERRMANN (1998)

Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles.

Virology 72, 5757 - 5761

COWSAR, D. R., T. R. TICE, R. M. GILLEY u. J. P. ENGLISH (1985)

Poly(lactide-co-glycolide) microcapsules for controlled release of steroids.

In: K. J. Widder u. R. Green (Eds.), Methods in Enzymology 112,: Drug and enzyme Targeting, 101 - 116. Academic Press, Orlando, FL.

DUNHAM, S. P (2002)

The applications of nucleic acid vaccines in veterinary medicine.

Science 73, 9 - 16

DUVVURI, S., K. GAURAV JANORIA UND A. K. MITRA (2006)

Effect of polymer blending on the release of ganciclovir from PLGA microspheres.

Pharm. Res. 23(1), 215 - 223

ELDRIDGE, J. H., C. J. HAMMOND, J. A. MEULBROEK, J. K. STAAS, R. M. GILLEY u. T. R. TICE (1990)

Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's Patches.

J. Controll. Release 11, 205 - 214

ELDRIDGE, J. H., J. K. STAAS, J. A. MEULEBROEK, J. R. MCGHEE, T. R. TICE u. R. M. GILLEY (1991)

Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system.

Molecular Immunology 28, 287 -294

FLENSBURG, M. F., A. K. ERSBØLL u. P. H. JØRGENSEN (2002)

Risk factors associated with the introduction of acute clinical infectious bursal disease among Danish broiler chickens in 1998.

Av. Pathol. 31, 23 - 29

FLORENCE A. T., A. M. HILLERY, N. HUSSAIN u. P. U. JANI (1995)

Nanoparticles as carriers for oral peptide absorption: studies on particle uptake and fate.

J. Controll. Release 36, 39 - 46

FODOR, I., E. HORVÁTH, N. FODOR, E. NAGY, A. RENCENDORSH, V. N. VAKHARIA u. S. K. DUBE (1999)

Induction of protective immunity in chickens immunised with plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus antigens.

Acta Vet. Hung. 47, 481 - 492

FREITAS, S., MERKLE H.P. u. B. GANDER (2005)

Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology.

J. Controll.Release 102(29); 313 - 332

GAGIC, M., C. A. ST. HILL u. J. M. SHARMA (1999)

In ovo vaccination of specific-pathogen-free chickens with vaccines containing multiple agents.

Avian Dis. 43, 293 - 301

GERDTS, V., L. A. BABIUK, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK u. P.J. GRIEBEL (2000)

Fetal immunization by a DNA vaccine delivered into the oral cavity.

Nature Medicine 6(8), 929 - 932

GERDTS V. u. T. C. METTENLEITER (2001)

DNA vaccines for veterinary medicine.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 108(1), 3 - 10

HAAS, S., J. MIURA-FRABONI, F. ZAVALA, K. MURATA, A. LEONE-BAY u. N. SANTIAGO (1996)

Oral immunization with a model protein entrapped in microspheres prepared from

derivatized α -amino acids.

Vaccine 14, 785 - 791

HEDLEY, M. L., J. CURLEY u. R. URBAN (1998)

Microspheres containing plasmid-encoded antigens elicit cytotoxic T-cell responses.

Nature Medicine 4, 365 - 368

HILDEBRAND, G. E. u. J. W. TACK (2000)

Microencapsulation of peptides and proteins.

Int. J. of Pharmaceutics 196, 173 – 176

HOSHI, S., A. UCHINO, K. KUSANAGI, T. IHARA u. S. UEDA (1999)

Uptake of orally administered polystyrene latex and poly(d,l-lactic/glycolic acid) microspheres into intestinal lymphoid tissues in chickens.

Vet. Immunol Immunopathol. 70, 33 - 42

HULSE, D. J und C. H. ROMERO (2002)

Fate of plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus VP2 capsid Protein gene after injection into the pectoralis muscle of the chicken.

Poultry Science 81, 213 - 216

IGARTUA, M., R. M. HERNÁNDEZ, A. ESQUISABEL, A. R. GASCÓN, M. B. CALVO u. J. L. PEDRAZ (1998)

Enhanced immune response after subcutaneous and oral immunization with biodegradable PLGA microspheres.

J. Controll. Release 56, 63 – 73

IVÁN J., N. NAGY, I. OLÁH u. I. KACSKOVICS (1999)

Influence of IBDV immune complex vaccine administered *in ovo* on the expression of Chb1 gene.

European Commission COST Action 839, Immunosuppressive viral disease in poultry

Proceeding 1999, edited by F. Coudert, R Moulder, T. v. d. Berg

IVAN, J., M. VELHNER, K. URSU, P. GERMAN, T. MATO, C. N. DREN und J. MESZAROS (2005)

Delayed vaccine virus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immune complex infectious bursal disease vaccine. quantitation of vaccine virus by real-time polymerase chain reaction.

Can. J. Vet. Res. 69 (2), 135 - 142

JANEWAY C. A. u. P. TRAVERS (1997)

Immunologie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford

JEURISSEN, S. H. M., A. G. BOONSTRA-BLOM, S. O. AL-GARIB, L. HARTOG u. G. KOCH (2000)

Defence mechanisms against viral infection in poultry: a review.

Vet. Quart. 22, 204 - 208

JEURISSEN, S. H. M., E. M. JANSE, P. R. LEHRBACH, E. E. HADDAD, A. AVIAKAN u. C. E.

WHITFILL (1998)

The working mechanisms of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease.

Immunology 95, 494 - 500

JEURISSEN, S. H. M., F. WAGENAAR u. E. M. JANSE (1999)

Further characterization of M cells in gut-associated lymphoid tissues of the chicken

Poultry Sci. 78, 965 - 972

JIANG, W., R. R. GUPTA, M. C. DESHPRADE u. S. P. SCHWENDEMANN (2005)

Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine agents.

Adv. Drug Deliv. Rev. 57, 391 - 410

JIANG, G., B. H. WOO, F. KANG, J. SINGH u. P. P. DELUCA (2002)

Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(D,L- lactide-co-glycolide) microspheres.

J. Controll. Release 79, 137 - 145

JILEK S., MERKLE H. P. und E. WALTER (2005)

DNA-loaded biodegradable microparticles as vaccine delivery systems and their interaction with dendritic cells.

Adv. Drug Deliv. Rev. 57, 377 - 390

JOCHEMSEN, P. and S. H. M. JEURISSEN (2002)

The localisation and uptake of *in ovo* injected soluble and particulate substances in the chicken.

Poultry Science 81, 1811 - 1817

JØRGENSEN, J. B., L.-H. JOHANSEN, K. STEIRO u. A. JOHANSEN (2003)

CpG DNA induces protective antiviral immun responses in atlantic salmon (*Salmo salar* L.).

Journal of Virology, 77, 11471 - 11479

JOHNSTON, P. A., H. LIU, T. O'CONNELL, P. PHELPS, M. BLAND, J. TYCZKOWSKI, A. KEMPER, T. HARDING, A. AVAKIAN, E. HADDAD, C. WHITFILL, R. GILDERSLEEVE u. C. A. RICKS (1997)

Applications in *in ovo* technology.

Poultry Sci. 76, 165 - 178

JONES, D. H., S. CORRIS, S. McDONALD, J. C. S. CLEGG u. G. H. FARRAR (1997)

Poly(D,L-lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration.

Vaccine 15, 814 -817

JOSEPH, N. J., S. LAKSHMI u. A. JAYAKRISHNAN (2002)

A floating-type oral dosage form for piroxicam based on hollow polycarbonate microspheres: *in vitro* and *in vivo* evaluation in rabbits.

J. Controll. Release 79, 71 - 79

KANEKO, H., I. BEDMAREK, A. WIERZBICKI, I. KISZKA, M. DMOCHOWSKI, T. J. WASIK,
Y. KANEKO und D. KOZBOR (2000)

Oral DNA vaccination promotes mucosal and systemic immune response to HIV envelope glycoprotein.

Virology 267, 8 – 16

KELEMEN, M., K. FORGACH, J. IVAN, V. PALYA, T. SUVEGES, B. TOTH u. J. MESZAROS (2000)
Pathological and immunological study of an in ovo complex vaccine against infectious bursal disease.

Acta Vet. Hung. 48(4), 443 - 454

KENDE, M., C. YAN, H. HEWETSON, M. A. FRICK, W. L. RILL und R. TAMMARIELLO (2002)
Oral immunization of mice with ricin toxoid vaccine encapsulated in polymeric microspheres against aerosol challenge.

Vaccine 20, 11 - 12

KLAVINSKIS, L. S., L. GAO, C. BARNFIELD, T. LEHNER u. S. PARKER (1997)

Mucosal immunization with DNA-liposome complexes.

Vaccine 15, 818 - 820

KOWALCZYK, K., J. DAISS, J. HALPERN u. T. F. ROTH (1985)

Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken.

Immunology 54, 755 – 267

LANGER, R. (1990)

New methods of drug delivery.

Science Vol. 249, 1527 – 1533

LANGER, R., L. BROWN u. E. EDELMANN (1985)

Controlled release and magnetically modulated release systems for macromolecules.

Methods in enzymology 112, 399 – 422, in Drug and Enzyme Targeting Part A, edt. by K.J.

Widder and R. Green, Academic Press, Inc., 1985

LEE, J. S., G. S. CHAE, M. S. KIM, S. H. CHO, H. B. LEE u. G. KHANG (2004)

Degradation behaviour in vitro for poly(D,L-lactide-co-glycolide) as drug carrier.

Biomec. Mater. Eng., 14(2), 185 - 192

LILL, N. u. J. SANDOW (1996)

Two poly(D,L-lactide-co-glycolide) 50:50 types: same polymer but different properties?

Procee. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 23, 329 – 330

Controlled Release Society; Inc.

LUZARDO-ALVAREZ, A., N. BLARER, K. PETER, J. F. ROMERO, C. REYMOND, G. CORRADIN
UND B. GANDER (2005)

Biodegradable microspheres alone do not stimulate murine macrophages in vitro, but prolong antigen presentation by macrophages in vitro an stimulate a solid immune response in mice.

J. Control. Release 109(1 - 3), 62 - 76

MATHIOWITZ, E., J. S. JACOB, Y. S. JONG, G. P. CARINO, D. E. CHICKERING, P. CHATURVEDI, C. A. SANTOS, K. VIJAYARAGHAVAN, S. MONTGOMERY, M. BASSETT u.C. MORRELL (1997)
Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems.
Nature 386, 410 – 414

McGHEE, J. R., J. MESTECKY, M. T. DERTZBAUGH, J. H. ELDRIDGE, M. HIRASAWA u. H. KIYONO (1992)
The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development.
Vaccine 10, 75 - 88

McKEEVER, U., S. BARMAN, T. HAO, P. CHAMBERS, S. SONG, L. LUNSFORD, Y.-Y. HSU, K. ROY u. M. L. HEDLEY (2002)
Protective immune responses elicited in mice by immunization with formulations of poly(lactide-co-glycolide) microparticles.
Vaccine 20, 1524 - 1531

MACMICKING, J., Q. W. XIE u. C. NATHAN (1997)
Nitric oxide and macrophage function.
Annual Rev. Immunol. 15, 323 - 350

MIDDLETON, J. C. u. A. J. TIPTON (2000)
Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices.
Biomaterials 21, 2335 - 2346

MORRIS, W., M. C. STEINHOFF u. P. K. RUSSELL (1994)
Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation.
Vaccine 12, 5 - 11

MOTA, R. M., J. L. MOREIRA, M. R. SOUZA, M. F. HORTA, S. M. TEIXEIRA, E. NEUMANN, J. R. NICOLI UND A. C. NUNES (2006)
Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterogenous proteins: a tool to develop live oral vaccines.
BMC Biotechnol. 6, 2.

MU, L. u. S. S. FENG (2001)
Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol[®]) loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers.
J. Controll. Release 76, 239 - 254

NAKAOKA, R., Y. TABATA. u. Y. IKADA (1995)
Enhanced antibody production through sustained antigen release from biodegradable granules.
J. Controll. Release 37, 215 - 224

NAKASE, H., K. OKAZAKI, Y. TABATA, K. UCHIDA, S. UOSE, M. OHANA, T. NISHI, T. WATANABE, M. MATSUURA, H. HISATSUNE, K. MATSUMURA, T. ITOH, C. KAWANAMI u. T.

CHIBA (2002)

Rectal immunization with antigen-containing microspheres induces stronger Th2 responses than oral immunization: a new method for vaccination.

Vaccine 20, 377 - 384

NAQI, S. A., B. MARQUEZ u. N. SAHIN (1983)

Maternal antibody and its effect on infectious bursal disease immunization.

Avian Dis. 27(3), 623 - 631

NARDELLI, B., P.B. HASER u. J. P. TAM (1994)

Oral administration of an antigenic synthetic lipopeptide (MAP-P3C) evokes salivary antibodies and systemic humoral and cellular responses.

Vaccine 12, 1335 - 1339

NEGASH, T., S. O. AL-GARIB und E. GRUYS (2004)

Comparison of in ovo and post-hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. A review.

Vet. Q. 26(2), 76 - 87

OFFIT, P. A., C. A. KHOURY, C. A. MOSER, H. F. CLARK, J. E. KIM u. T. J. SPEAKER (1994)

Enhancement of rotavirus immunogenicity by microencapsulation.

Virology 203, 134 - 143

O'HAGAN, D. T., H. JEFFERY, M. J. J. ROBERTS, J. P. MCGHEE u. S. S. DAVIS (1991)

Controlled release microparticles for vaccine development.

Vaccine 9, 768 - 771

O'HAGAN, D. T., J. P. MCGHEE, R. BOYLE, D. GUMAER, X.-M. LI, B. POTTS, C. Y. WANG u. W. C. KOFF (1995)

The preparation, characterization and pre-clinical evaluation of an orally administered HIV-1 vaccine, consisting of a branched peptide immunogen entrapped in controlled release microparticles.

J. Controll. Release 36, 75 - 84

O'HAGAN, D. T., J. P. MCGHEE, J. HOLMGREN, A. MCL. MOWAT, A. M. DONACHIE, K. H. G. MILLS, W. GAISFORD, D. RHAMAN u. S. J. CHALLACOMBE (1993)

Biodegradable microparticles for oral immunization.

Vaccine 11, 149 - 154

O'HAGAN, D. T., K. J. PALIN u. S. S. DAVIS (1989)

Poly(butyl-2-cyanoacrylate) particles as adjuvants for oral immunization.

Vaccine 7, 213 - 216

O'HAGAN, D. T., K. PALIN, S. S. DAVIS, P. ARTURSSON u. I. SJÖHOLM (1989)

Microparticles as potentially orally active immunological adjuvants.

Vaccine 7, 421 - 424

OSHOPI, G. L., S. ELANKUMARAN, V. N. VAKHARIA R. A. HECKERT (2003)

In ovo delivery of DNA to the avian embryo.
Vaccine 21, 1275 - 1281

PEPPAS, N. A., K. B. KEYS, M. TORRES-LUGO u. A. M. LOWMAN (1999)
Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery.
J. Controll. Release 62, 81 – 87

PEREZ, C., A. SANCHEZ, D. PUTNAM, D. TING, R. LANGER u. M. J. ALONSO (2001)
Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA.
J. Controll. Release 75, 211 – 224

PORTER JR., R. E., M. A. SUCKOW, N. P. MACRI u. T. L. BOWERSOCK (1997)
Microsphere uptake by the intestine of white Leghorn chickens.
Avian Dis. 41, 981 - 987

PRIOR, S., B. GANDER, N. BLARER, H. P. MERKLE, M. L. SUBIRA, J. M. IRACHE u. C. GAMAZO (2002)
In vitro phagocytosis and monocyte-macrophage activation with poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres.
Europ. J. of Pharmaceutical Sci. 15, 197 - 207

PSCHYREMBEL
Klinisches Wörterbuch, 259. Auflage
de Gruyter, Berlin, New York, 2002

QADDOUMI, M. G., H. UEDA, J. YANG, J. DAVDA, V. LABHASETWAR u. V. H. LEE (2004)
The characteristics and mechanisms of uptake of PLGA nanoparticles in rabbit conjunctival epithelial cell layers.
Pharm. Res. 21(4), 641 - 648

QURESHI, M. A., L. MILLER, H. S. LILLEHOJ u. M. D. FICKEN (1990)
Establishment and characterization of a chicken mononuclear cell line.
Vet. Immunol. Immunopathol. 26, 237 - 250

RAUTENSCHLEIN, S., J. M. SHARMA, B. WINSLOW, J. McMILLEN, D. JUNKER u. M COCHRAN (2000)
Embryo vaccination of turkeys against Newcastle disease infection with recombinant fowlpox constructs containing interferons as adjuvants.
Vaccine 18: 426 - 433

REDMANN, T., E. F. KALETA u. G. HEIDER(1992)
in: Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels.
Herausgegeben von Günther Heider und Gerhard Monreal
Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart, 187 - 200

RICKS, C. A., A. AVAKIAN, T. BRYAN, R. GILDESLEEVE, E. HADDAD, R. ILICH, S. KING, L. MURRAY . PHELPS, R. POSTON, C. WHITFILL u. C. WILLIAMS (1999)

In ovo vaccination technology.

Advances in veterinary Medicine 41, 495 – 515

RICKS, C. A., N. MENDU und P. V. PHELPS (2003)

The embryonated egg: a practical target for genetic based advances to poultry production.

Poult. Sci 82(6), 931 -938

ROBINSON, H. L. (1997)

Nucleic acid vaccines: an overview.

Vaccine 15,8, 785 -787

ROGEL, A., L. BENVENISTI, I. SELA, O. EDELBAUM, E. TANNE, Y. SHACHAR, Y. ZANBERG, T. GONTMAKHER, E. KHAVAT und Y. STRAM (2003)

Vaccination with E. coli recombinant empty viral particles of infectious bursal disease virus (IBDV) confer protection.

Virus Genes 27, 169,75

RONG, J., T. CHENG, X. LIU, T. JIANG, H. GU und G. ZOU (2005)

Development of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens.

Vaccine 23, 4844 - 4851

ROTH, J. A. (2002)

Vaccination: protective antigens and the protective immune response.

Poultry Vaccines and Vaccination Practices, 1 - 6

45th Annual Meeting Nashville TN, July 14. 2002

American Association of Avian Pathologists

SAIF, Y.M. (2004)

Control of infectious bursal disease virus by vaccination.

Dev. Biol. (Basel) 119, 143 - 146

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH u.T. MANIATIS (2001)

Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Long Island, NY

SANDOR, M., D. ENSCORE, P. WESTON u. E. MATHIOWITZ (2001)

Effect of protein molecular weight on release from micron-sized PLGA microspheres.

J. Controll. Release 76, 297 - 311

SCHACHTER, D. M. u. J. KOHN (2002)

A synthetic polymer matrix for the delayed or pulsatile release of water-soluble peptides.

J. Controll. Release 78, 143 - 153

SCHAT, K. A. u. T. J.MYERS (1991)

Avian intestinal Immunity.

Crit. Rev.Poultry Biol.3, 19 - 34

SCHAT K.A. u. H. G. PURCHASE (1998)

Cell-culture methods

In: A laboratory manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. 3rd Edt.
American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, PA
pp. 223 - 234

SHARMA, J. M. (1985)

Embryo vaccination with infectious bursal disease virus alone or in combination with Marek's disease virus.

Avian Dis. 29, 1155 - 1169

SHARMA, J. A. (1986)

Embryo vaccination of specific-pathogen-free chickens with infectious bursal disease virus: Tissue distribution of the vaccine virus and protection of hatched chickens against disease.

Avian Dis. 30, 776 – 780

SHARMA, J. A. (1999)

Introduction to poultry vaccines and immunity.

Advances in veterinary Medicine 41, 481 – 494

SHARMA, J. M. and B. R. BURMESTER (1982)

Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus.

Avian Dis. 26, 134 - 149

SHARMA, J. A. u. C. A. RICKS (2002)

In ovo technology – future directions.

Poultry Vaccines and Vaccination Practices, 46 - 50

45th Annual Meeting Nashville TN, July 14. 2002

American Association of Avian Pathologists

SHAW, I. u. T. F. DAVISON (2000)

Protection from IBDV-induced bursal damage by a recombinant fowlpox vaccine, fpIBD1, is dependent on the titre of challenge virus and chicken genotype.

Vaccine 18, 3230 - 3241

SILVA, R. F. (2002)

Recombinant vaccines and DNA vaccines: unfulfilled promises.

Poultry Vaccines and Vaccination Practices, 32 - 45

45th Annual Meeting Nashville TN, July 14. 2002

American Association of Avian Pathologists

STURESSON, C. u. L. D. WIKINGSSON (2000)

Comparison of poly(acryl starch) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres as drug delivery system for a rotavirus vaccine.

J. Conroll. Release 68, 441 - 450

TANG, D., M. DEVIT u. S. A. JOHNSTON (1992)

Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response.
Nature 356, 152 - 154

TINSLEY-BOWN, A. M., R. FRETWELL, A. B. DOWSETT, S. L. DAVIS u. G. H. FARRAR (2000)
Formulation of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microparticles for rapid plasmid DNA delivery.
J. Controll. Release 66, 229 - 241

TORCHE A. M., M. LE DIMNA, P. LE CORRE, S. LE GAL, R. CARIOLET UND M. F. LE POTIER (2006)
Immune responses after local administration of IgY loaded-PLGA microspheres in gut-associated lymphoid tissue in pigs.
Vet. Immunol. Immunopathol. 109(3 - 4), 209 - 217

VILA, A., A. SÁNCHEZ, M. TOBIO, P. CALVO u. M. J. ALONSO (2002)
Design of biodegradable particles for protein delivery.
J. Controll. Release 78, 15 - 24

WALKER, R. I. (1994)
New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization.
Vaccine 12, 387 - 400

WALTER, E. u. H. P. MERKLE (2002)
Microparticle-mediated transfection of non-phagocytic cells in vitro.
J. Drug Target., 10(1), 11-21

WALTER, E., K. MOELLING, J. PAVLOVIC u. H. P. MERKLE (1999)
Microencapsulation of DNA using poly(DL-lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics.
J. Controll. Release 61, 361 - 374

WANG, F., X.W. HE, L. JIANG, D. REN, Y. HE, D. A. LI AND S. H. SUN. (2005)
Enhanced immunogenicity of microencapsulated multi-epitope DNA vaccine encoding T and B cell epitopes of foot-and mouth disease virus in mice.
Vaccine 2005 Dec 1; epub ahead of print

WATTS, P. J., M. C. DAVIES u. C. D. MELIA (1990)
Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and application.
Critical Rev. in Therap. Drug Carrier Systems, 7, 235 - 259

WEIHE, S., M. WEHMÖLLER, A. TSCHAKALOFF, R. VON OEPEN, S. SCHILLER, M. EPPLE u. H. EUFINGER (2001)
Alternative Knochenersatzmaterialien zur präoperativen Fertigung individuellen CAD/CAM-Schädelimplantate.
Mund Kiefer Gesichts-Chirurgie, 5, 299 - 304

WHITFILL, C. E., E. E. HADDAD, C. A. RICKS, J. K. SKEELES, L. A. NEWBERRY, J. N.

- BEASLEY, P. D. ANDREWS, J. A. THOMA u. P. S. WAKENELL (1995)
Determination of optimum formulation of a novel infectious bursas disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV.
Avian Dis. 39, 687 - 699
- WOLFF, J. A., R. W. MALONE, P. WILLIAMS, G. ASCADI, A. JANI u. P. L. FELGNER (1990)
Direct gene transfer into mouse muscle in vivo.
Science 247, 1465 - 1468
- WOO, B. H., J. W. KOSTANSKI, S. GEBREKIDAN, B. A. DANI, B. C. THANOO u. P. P. DELUCA (2001)
Preparation, characterization and in vivo evaluation of 120-day poly(D,L-lacide) leuprolide microspheres.
J. Controll. Release 75, 307 - 315
- YUN, Y.H., H. JIANG, R. CHAN UND W. CHEN (2005)
Sustained release of PEG-g-chitosan complexed DNA from poly(lactide-co-glycolide).
Biomater. Sci. Polym. Ed., 16(11), 1359 - 1378
- ZAMBAUX, M. F., F. BONNEAUX, R. GREF, P. MAINCENT, E. DELLACHERIE, M. J. ALONSO, P. LABRUDE u. C. VIGNERON (1998)
Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method.
J. Controll. Release 50, 31 - 40

11. Anhang

11.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata = doppelt destilliertes Wasser
ad	zu
Ak	Antikörper
APC	antigen presenting cell
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BT	Bebrütungstag
bzw.	beziehungsweise
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CEF	Chicken embryo fibroblasts = Hühnerembryofibroblasten
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CRS	Controlled release system
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DLPLG	Poly(D,L-lactide-co-glycolide)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamid-Tetraessigsäure
et al.	et alii = und andere
FBS	Fetales bovines Serum
FCA	Freund's complete adjuvant
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPV	Fowlpox Virus = Geflügelpockenvirus
g	Gramm
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

GALT	<i>Gut associated lymphoid tissue</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
IBD	Infectious bursal disease
IE	Internationale Einheit
IFAT	Immunfluoreszenz-Antikörpertest
IgA	Immunglobulin der Klasse A
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
i.m.	intramuskulär
iV	inherente Viskosität
Kap.	Kapitel
KH ₂ PO ₄	Kaliumphosphat
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LB	Luria-Bertani
log ₂	Logarithmus zur Basis 2
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lebenstag
M	Molar
M _w	Molekulargewicht
matAk	maternaler Antikörper
max.	maximal
MEM	Minimal essential medium
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol

mm	Millimeter
MP	Mikrosphären
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaNO ₂	Natriumnitrit
NaHPO ₄	Natriumphosphat
nm	Nanometer
NO	Stickoxid
NO ₂	Nitrit
NO ₃	Nitrat
Obj.	Objektivvergrößerung
OD	Optische Dichte
o/w	Öl in Wasser
p	Plasmid
pDNS	Plasmid-DNS
PBS	phosphate bufferde saline = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PLG	poly(lactide-co-glycolide)
PLL	Poly-L-Lysin
PVA	Polyvinylalkohol
rel.	relativ
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
s.c.	subcutan
sog.	sogenannt
SPF	spezifisch pathogen frei
syn.	Synonym
TE	TRIS-EDTA
TAE	TRIS-Acetat-EDTA

TNE	TRIS-Natriumchlorid-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organisation
w/o/w	Wasser in Öl in Wasser
w/v	Gewicht pro Volumen
x	mal
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
>	größer als
<	kleiner als
°C	Grad Celsius

11.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von poly(lactide-co-glycolide) und hydrolytische Degradierung	22
Abbildung 2: Herstellung von pDNS-enthaltenden Mikrosphären im Doppemulsionsverfahren, Schema	51
Abbildung 3: Untersuchung des CRS	52
Abbildung 4: Mikrosphären hergestellt aus Lactel [®] BP-0100 mit 5%iger PVA-Lösung und Homogenisierungsgeschwindigkeit mit Einstellung 3	75
Abbildung 5a: MQ-NCSU-Makrophagenkulturen ohne Mikrosphären	80
Abbildung 5b: MQ-NCSU-Makrophagen, 1 h nach Aufbringen von Mikrosphären	81
Abbildung 5c: MQ-NCSU-Makrophagen, 18 h nach Aufbringen von Mikrosphären	81
Abbildung 5d: MQ-NCSU-Makrophagen, 24 h nach Aufbringen von Mikrosphären	82
Abbildung 5e: MQ-NCSU-Makrophagen, 48 h nach Aufbringen von Mikrosphären	83
Abbildung 6: Mit transfizierte MQ-NCSU-Makrophagen	87
Abbildung 7: Agarosegel mit aus Mikrosphären extrahierter pDNS	88
Abbildung 8: Mit aus Mikrosphären extrahiertem pCR [®] 3.1/CAT transfizierter Makrophage	90
Abbildung 9: Negativkontrolle zu transfizierten MQ-NCSU-Makrophagen	90
Abbildung 10: MQ-NCSU-Makrophage nach viertägiger Inkubation mit Mikrosphären, die mit pCR [®] 3.1/CAT beladen waren	94
Abbildung 11: Darstellung der NO-Produktion von MQ-NCSU-Makrophagen nach Stimulierung mit Mikrosphärenpräparationen (Nr. 28 und Nr. 41)	98
Abbildung 12: Darstellung der NO-Produktion von MQ-NCSU-Makrophagen nach Stimulierung mit Mikrosphärenpräparationen (Nr. 30 und Nr. 32)	98

- Abbildung 13: Darstellung der NO-Produktion von MQ-NCSU-Makrophagen
nach Stimulierung mit Mikrosphärenpräparationen
(Nr. 21. und Nr. 32) 99
- Abbildung 14: Darstellung der NO-Produktion von MQ-NCSU-Makrophagen
nach Stimulierung mit Mikrosphärenpräparationen
(Nr. 5, Nr. 30, Nr. 33 und Nr. 43) 99

11.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über kontrollierte Freisetzungssysteme, verwendete Polymere und eingekapselte Substanzen (Auswahl)	17
Tabelle 2:	Verwendete Analysekits	40
Tabelle 3:	Verwendete Chemikalien	42
Tabelle 4:	Variationen des Standardprotokolls zur Herstellung von Mikrosphären	55
Tabelle 5:	Zuordnung der Einstellung zu Drehzahlen des Dispergierwerkzeuges ULTRA-TURRAX T8-S8N-5G (nach Herstellerangaben)	55
Tabelle 6:	Verwendete Polymere und Polymermischungen zur Herstellung von Mikrosphären	57
Tabelle 7:	Präparationen mit unterschiedlichen Volumina der Surfactantlösung im Verhältnis zur Polymerlösung	59
Tabelle 8:	Charakterisierung von Mikrosphären	61
Tabelle 9:	Komponenten der Mikrosphären, die auf Degradierungs- und Phagozytoseverhalten in Zellkultur untersucht wurden	68
Tabelle 10:	Im Makrophagenstimulationstest untersuchte Parameter von Mikrosphärenpräparationen und deren Variation	69
Tabelle 11:	<i>in vivo</i> -Versuche mit Mikrosphären im embryonierten Hühnerei und nach dem Schlupf oral und als i.m. Applikation	70
Tabelle 12:	Inokulation von Mikrosphären am Embryonierungstag 18	71
Tabelle 13:	Inokulation von Mikrosphären in den Dottersack am Embryonierungstag 6	72
Tabelle 14:	Auswirkungen der Polymere und Polymergemische auf die Größe der Mikrosphären und Beladung mit pDNS, Größenverteilung und Oberflächenbeschaffenheit der Mikrosphären bei vier unterschiedlichen Homogenisierungsgeschwindigkeiten	74
Tabelle 15:	Einfluß der PVA-Konzentration auf die Morphologie und Größe	

	der Mikrosphären	74
Tabelle 16:	Auswirkungen der Polymere und Polymergemische auf die Größe der Mikrosphären und Beladung mit pDNS	76
Tabelle 17:	pDNS-Menge nach Chloroformextraktion aus Mikrosphären unterschiedlicher Präparationen mit anschließender Ethanolpräzipitation	79
Tabelle 18:	Effekt unterschiedlicher Volumina von 5 %iger PVA-Surfactantlösung auf den pDNS-Gehalt der Mikrosphären aus in Methylenchlorid bzw. Ethylacetat gelöstem Polymer	84
Tabelle 19:	Einfluß der Stabilisierung der pDNS durch kationische Puffer mit oder ohne Komplexierung der pDNS mit PLL auf den pDNS-Gehalt	85
Tabelle 20:	Gehalt an pDNS und Konformation der pDNS im Ethidium-Bromid gefärbten Agarosegel nach 1-stündiger Inkubation in PBS	89
Tabelle 21:	Gehalt an eingekapselter pDNS nach DNase-I-Verdau im Vergleich zum Gesamtgehalt und Anteil (%) der eingekapselten pDNS	91
Tabelle 22:	Mikroskopische Untersuchung der Degradierung von Mikrosphären aus PLG im geschlossenen System	92
Tabelle 23:	Degradierungs- und Phagozytoseverhalten von Mikrosphären unterschiedlicher Polymerformulierungen, Lösungsmittel und Größenspektrum	95
Tabelle 24:	Untersuchung unterschiedlicher Mikrosphärenpräparationen zur Aktivierung von Makrophagen	97
Tabelle 25:	Vitalität und Schlupfrate nach <i>in ovo</i> -Inokulation von Mikrosphären am 18. Bebrütungstag	101

11.4 Liste der Mikrosphärenpräparationen (1)

Nr.	DLPLG	mg	Lösungs- mittel	ml	pDNS µg	Puffer	µl	PVA % w/v	ml	Einstellung / Dauer ¹	Größe µm	Gehalt pDNS ng/mg	nach Verdau ² ng/mg
1	L BP-100	20	MC	0,6	98,7	A. bidest	60	1	0,6	3 40 s	n.u.	28,8	n.u.
2	L BP-100	20	MC	0,6	98,7	A. bidest	60	1	0,6	3,3 40 s	n.u.	44	n.u.
3	L BP-100	20	MC	0,6	98,7	A. bidest	60	1	0,6	4 40 s	1,8-15.	n.u.	n.u.
4	L BP-100	20	MC	0,6	98,7	A. bidest	60	1	0,6	4,3 40 s	1,8-15	n.u.	n.u.
5	L BP-100	20	MC	0,6	98,7	A. bidest	60	1	0,6	5 40 s	0,7-15	n.u.	n.u.
6	L BP-100	10	MC	0,3	49,35	A. bidest	30	1	2,5	1 4x15 s	1,8-37	4,6	n.u.
7	L BP-100	10	MC	0,3	49,35	A. bidest	30	2	2,5	1 4x15 s	3,7-140	n.u.	n.u.
8	L BP-100	10	MC	0,3	49,35	A. bidest	30	3	2,5	1 4x15 s	1,8-20	n.u.	n.u.
9	L BP-100	10	MC	0,3	49,35	A. bidest	30	4	2,5	1 4x15 s	1,8-30	7,2	n.u.
10	L BP-100	10	MC	0,3	49,35	A. bidest	30	5	2,5	1 4x15 s	3,7-20	n.u.	n.u.
11	L BP-100	100	MC	2,0	493,5	TE	250	5	2,5	3 4x15 s	1,8-45	93,75	21,75
12	L BP-100	100	MC	2,0	493,5	TE PLL	200 50	5	2,5	3 4x15 s	1,8-37	227,25	n.u.
13	L BP-100	100	MC	2,0	493,5	NaHCO ₃	250	5	2,5	3 4x15 s	1,8-30	93,75	12,75
14	L BP-100	100	MC	2,0	493,5	NaHCO ₃ PLL	200	5	2,5	3 4x15 s	0,5-12	131,25	12,75
15	L BP-100	20	MC	2,0	52,6	TE	384	5	2,5	3 4x15 s	n.u.	168,75	15

11.4. Liste der Mikrosphärenpräparationen (2)

Nr.	DLPLG	mg	Lösungs- mittel	ml	pDNS µg	Puffer	µl	PVA % w/v	ml	Einstellung / Dauer ¹	Größe µm	Gehalt pDNS ng/mg	nach Verdau ² ng/mg
16	L BP-100	20	MC	2,0	52,6	TE PLL	366 17	5	2,5	3 4x15 s	37,5	206,25	12,52
17	L BP-100	20	MC	2,0	52,6	NaHCO ₃	384	5	2,5	3 4x15 s	30	159	12,0
18	L BP-100	20	MC	2,0	52,6	NaHCO ₃ PLL	366 17	5	2,5	3 4x15 s	10	159	15,75
19	L BP-100	20	MC	2,0	52,6	TE	384	5	2,5	3 4x15 s	n.u.	159	n.u.
20	L 50DG065	100	MC	2,0	341	TNE PLL	200 50	5	2,5	3 4x15 s	15-300	1961,25	159
21	L 50DG040	50	MC	1,0	128	TE PLL	100 25	5	1,25	3 4x15 s	1,8-75	n.u.	n.u.
22	L 50DG040	20	MC	2,0	63,2	TE	600	5	2,0	3 4x15 s	n.u.	56,25	n.u.
23	L 50DG040	40	MC	2,9	316	TNE	500	5	2,0	3 4x15 s	45	24	n.u.
24	L 50DG040	60	MC	2,0	316	TNE	500	5	20	3 4x15 s	n.u.	20,25	n.u.
25	L 50DG040	80	MC	2,0	63	TNE	500	5	2,0	3 4x15 s	n.u.	24,75	n.u.
26	L 50DG040	100	MC	2,0	316	TNE	100	5	20	3 4x15 s	1,8-15	9,0	n.u.
27	L 50DG040	100	EA	2,0	1990	TNE	100	8	33	3 4x15 s	n.u.	412	67,8
28	L 50DG040	200	EA	4,0	3980	TNE	200	8	33	3 4x15 s	0,5-15	2780	27,7
29	L 50DG040	200	EA	1,0	1247	TE	37,5	8	33	3 4x15 s	1,8-30	189,4	14,5
30	L 50DG040	200	EA	3,0	3741	TE	150	8	50	3 4x15 s	1-7,5	903,7	52,5
31	L 50DG040	200	MC	1,0	1247	TE	37,5	8	2,5	3 4x15 s	n.u.	36	n.u.

11.4. Liste der Mikrosphärenpräparationen (3)

Nr.	DLPLG	mg	Lösungs- mittel	ml	pDNS µg	Puffer	µl	PVA % w/v	ml	Einstellung / Dauer ¹⁾	Größe µm	Gehalt pDNS ng/mg	nach Verdau ²⁾ ng/mg
32	L 50DG040	200	MC	3,0	3747	TE	150	8	37,5	3 4x15 s	n.u.	353	33,75
33	RG503H L 50DG040	160 40	EA	4,0	792	TNE	200	5		3 4x15 s	0,5-190	952,5	9,75
34	L 50DG040	200	EA	4,0	792	TNE	200	5	4,0	3 4x15 s	1,0-75	15	6,75
35	RG503H L 50DG040	160 40	EA	4,0	4988	TE	200	5	4,0	3 4x15 s	n.u.	67,5	n.u.
36	RG503H L 50DG040	150 50	EA	4,0	4988	TE	200	5	4,0	3 4x15 s	1,8-5	15	n.u.
37	RG503H L 50DG040	150 50	EA	3,0	4988	TE	150	5	3,0	3 4x15 s	n.u.	31,5	n.u.
38	RG503H L 50DG040	150 50	EA	1,8	2440	TNE	50	5	50	3 4x15 s	1,0-7,5	12,6	n.u.
39	RG503H L 50DG040	150 50	EA	1,8	2440	TNE	50	5	50	3 4x15 s	1,8-30	3,41	n.u.
40	RG503H L 50DG040	150 50	EA	4,0	2440	TNE	200	8	50	3 4x15 s	1,8-45	1673,3	n.u.
41	RG503H L 50DG040	150 50	EA	2,0	2440	TNE	100	8	50	3 4x15 s	1,8-30	4,5	n.u.
42	L 50DG040	200	EA	4,0	3640	TNE	200	8	50	3 4x15 s	1,8-18	1981	n.u.
43	RG503H L 50DG040	200 50	EA	4,0	5352	TNE	200	6	33	3 4x15 s	5 - 15	1459	n.u.
44	RG503H L 50DG040	150 50	MC	4,0	5352	TNE	200	6	50	3 4x15 s	n.u.	n.u.	n.u.

DLPLG: poly(D,L-lactide-co-glycolide); R: Resomer[®]; L: Lactel[®]; EA: Ethylacetat; MC: Methylenchlorid; NaHCO₃: Natriumhydrogencarbonat; TE: Tris-EDTA; TNE:

TRIS-Natriumchlorid-EDTA; PLL: Poly-L-Lysin; PVA: Polyvinylalkohol; n.u.: nicht untersucht

¹⁾ Einstellung des Homogenisiergerätes, Dauer des Homogenisiervorganges; ²⁾ Verdau mit DNas I vor pDNS-Extraktion

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke ich Frau Prof. Dr. S. Rautenschlein ganz herzlich. Besonders danken möchte ich ihr für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden, ihre ständige Gesprächsbereitschaft sowie große Geduld und Freundlichkeit. Sie hat mir immer wieder Mut gemacht und aufmunternde Worte gefunden, wenn die Arbeit stecken zu bleiben drohte.

Für die Förderung meiner Arbeit (Projekt DFG RA 767/2-1) mit Forschungsmitteln danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Bei allen Mitarbeitern der Klinik für Geflügel der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, und auch Herrn Prof. Dr. U. Neumann, möchte ich mich für die freundliche Aufnahme, Hilfsbereitschaft, Unterstützung und das gute Arbeitsklima bedanken. Ausdrücklich möchte ich Christine Haase erwähnen, die mich bei den Laborarbeiten kompetent unterstützt hat. Herrn Dr. Martin Ryll danke ich besonders für die wiederholte Rettung meiner computergestützten Aufzeichnungen. Frau Sonja Bernhardt und Frau Martina Koschorrek gilt mein Dank für die hervorragende Betreuung meiner Versuchstiere.

Für die freundliche Mitbenutzung von Laboreinrichtungen sowie fachlichen und technischen Rat danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für Parasitologie und des Institutes für Virologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

Besonderer Dank gilt meinem Sohn Jeremy für sein Verständnis, seine Geduld und dass er immer an mich geglaubt hat.

Viele weitere Personen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch bei ihnen möchte ich mich bedanken.

