

Effiziente Kopplung räumlich getrennter Enzymreaktionen in „Shell-in-shell“-Mikrokapseln**

Oliver Kreft,* Michelle Prevot, Helmuth Möhwald und Gleb B. Sukhorukov

Die Entwicklung effizienter und vielseitig einsetzbarer Mikroverkapselungssysteme ist für eine Vielzahl von Anwendungen im Life-Science-Bereich und in den Materialwissenschaften von Interesse. Insbesondere der Umgang mit komplexen und empfindlichen Biomolekülen verlangt nach einfachen und „sanften“ Verkapselungsverfahren, wobei Polyelektrolyt-Mikrokapseln^[1,2] aufgrund ihres modularen Bauprinzips eine vielversprechende Alternative zu etablierten Mikro- und Nanocontainersystemen sind.^[3–8] Eine Schwierigkeit bestand bislang darin, mehrere Substanzen gleichzeitig, aber räumlich getrennt in einer einzigen Containereinheit unterzubringen. Bisher beschriebene Multikompartimentssysteme wie Polymermicellen,^[9] Hybridpolymermikropartikel,^[10] Zweikompartimentvesikel^[11] oder hierarchisch aufgebaute Polyelektrolytkapseln^[12] weisen aufgrund geringer Beladungskapazitäten, ungenügender Permeabilität für niedermolekulare Substanzen oder extremer Herstellungsbedingungen zum Teil deutliche Einschränkungen für biologisch orientierte Anwendungen auf. Eine „Kapsel-in-der-Kapsel“-Struktur („shell-in-shell“), die sich unter milden Reaktionsbedingungen schrittweise aus semipermeablen Polyelektrolytmembranen aufbauen und beladen lässt, könnte eine Lösung für dieses Problem sein.

Bei der Herstellung von Polyelektrolythohlkörpern nutzen wir das ursprünglich für planare Filme entwickelte Layer-by-Layer(LbL)-Verfahren der konsekutiven Adsorption gegensätzlich geladener Polyelektrolyte.^[13] Dabei wird schichtweise ein Polyelektrolytfilm auf einen löslichen Kern (Templat) aufgebracht, der nach dem Schichtaufbau entfernt wird. Die zurückbleibenden Hohlkapseln können mit Wirkstoffen gefüllt oder als Reaktionscontainer genutzt werden.^[1,14,15] Kürzlich wurden sphärische Calciumcarbonat-Mikropartikel als geeignetes Templat für die Verkapselung von Biomaterialien vorgestellt: Sie lassen sich im Größen-

bereich zwischen 2 und 8 µm herstellen, weisen exzellente Beladungskapazitäten auf und können nach Aufbau des Polyelektrolytmultifilms unter milden Bedingungen durch Komplexierung des Calciums mit Ethyldiamintetraacetat (EDTA) herausgelöst werden.^[16–19] Der semipermeable Polyelektrolytmultifilm der Kapselwand lässt niedermolekulare Verbindungen (z.B. EDTA, anorganische Ionen, Farbstoffe) ungehindert hinein- und herausdiffundieren, während größere Moleküle zurückgehalten werden.^[20] Die Verkapselung biologisch aktiver Substanzen bietet eine Reihe von Vorteilen: So können Materialien durch Verkapselung vor schädlichen Einflüssen (z.B. durch mechanische Einwirkung oder enzymatische Degradation) geschützt werden.^[21] Darüber hinaus kann die Permeabilität der Kapselwand in weitem Unfang variiert werden, um verkapselfe Enzyme für niedermolekulare Substrate gezielt zugänglich zu machen.^[1,22,23]

Wir beschreiben hier eine einfache Methode zur Herstellung von mikrometergroßen Shell-in-shell-Polyelektrolytkapseln. Unsere Methode basiert auf der Herstellung sphärischer, aus zwei konzentrischen Calciumcarbonat-Kompartimenten aufgebauten Kern-Schale-Partikeln, deren Kompartimente unabhängig voneinander mit Biopolymeren beladen werden können. Durch Einführung flankierender Polyelektrolytmultischichten war es möglich, einen völlig neuartigen Typ von Polyelektrolytkapsel zu verwirklichen, der eine räumliche Trennung von Biopolymeren in separaten Kompartimenten einer Kapsel zulässt.

Wir demonstrieren unser Konzept zunächst anhand der Verkapselung zweier humaner Serumalbumine (HSAs) mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern als Modellproteine. Die Shell-in-shell-Kapseln wurden in einem sechsstufigen Verfahren hergestellt (Abbildung 1): Zunächst wird ein kolloidales, poröses CaCO₃-Partikel, in das TRITC-HSA (TRITC = Tetramethylrhodaminisothiocyanat) und Magnetit-Nanopartikel eingeschlossen sind, nach der Copräzipitationsmethode erzeugt (Schritt 1).^[24] Die beladenen CaCO₃-Partikel werden in Schritt 2 mit einer Polyelektrolytmultischicht aus fünf Doppelschichten Polystyrolsulfonat (PSS) und Polyallylamin-HCl (PAH) bedeckt. In Schritt 3 wird auf die beschichteten Partikel in einem zweiten Copräzipitationsschritt (Schritt 3) konzentrisch eine Alexa-Fluor-488-HSA enthaltende CaCO₃-Schicht abgeschieden, wobei die mit TRITC-HSA + Magnetit beladenen Ausgangspartikel als Kristallisationskeime dienen. Wir erhielten Kern-Schale-Partikel (hier Typ I), die dadurch charakterisiert sind, dass zwei CaCO₃-Kompartimente durch eine Polyelektrolytmultischicht voneinander getrennt sind. Im zweiten Copräzipitationsschritt entstand ein Nebenprodukt in Form einzelner, nur mit Alexa-HSA gefüllter CaCO₃-Partikel. Mithilfe der im inneren Kompartiment der Kern-Schale-Partikel einge-

[*] Dr. O. Kreft, Dr. M. Prevot, Prof. Dr. H. Möhwald
Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung
Wissenschaftspark Golm, 14424 Potsdam (Deutschland)
Fax: (+49) 331-567-9222
E-Mail: oliver.kreft@mpikg.mpg.de

Prof. Dr. G. B. Sukhorukov
Department of Materials, Queen Mary University of London
Mile End Road, E1 4NS, London (Großbritannien)

[**] Wir danken der Volkswagenstiftung (I/80 051-054) und dem FP6-EU-Projekt STREP-NMP3-CT-2005-516922 „SelectNANO“ für die finanzielle Unterstützung. Radostina Georgieva danken wir für anregende Diskussionen und Jürgen Hartmann für Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

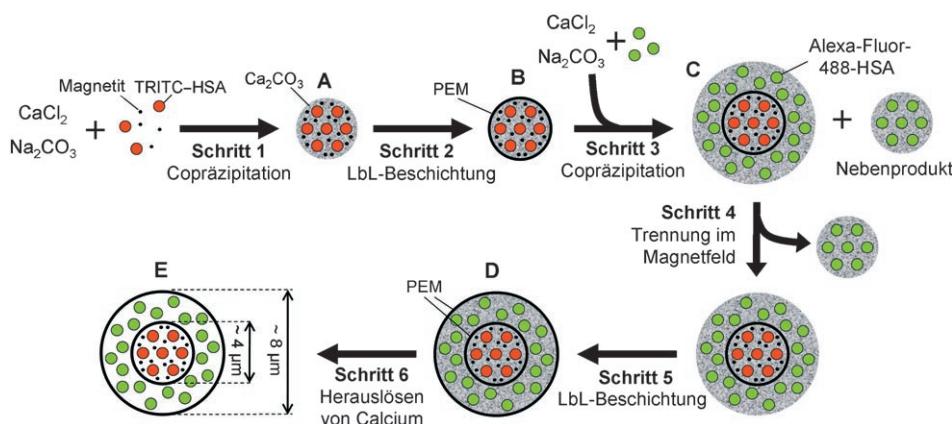


Abbildung 1. Syntheseschema zur Herstellung von Shell-in-shell-Mikrokapseln. A = Ausgangspartikel; B = Ausgangspartikel mit aufgebrachter Polyelektrolytmultischicht (PEM); C = Kern-Schale-Partikel (Typ I); D = Kern-Schale-Partikel (Typ II); E = Shell-in-shell-Mikrokapsel.

brachten Magnetitpartikel konnten die erwünschten Partikel durch ein externes Magnetfeld vom nichtmagnetischen Nebenprodukt getrennt werden (siehe Hintergrundinformationen).^[25] Das Aufbringen einer terminalen PSS/PAH-Multischicht auf die Kern-Schale-Partikel vom Typ I (Schritt 5) führt zu Kern-Schale-Partikel vom Typ II.

Rasterelektronenmikroskop(SEM)-Aufnahmen bestätigen, dass im zweiten Copräzipitationsschritt eine Calciumcarbonatschicht konzentrisch um einen inneren Calciumcarbonatkern aufgebaut wurde (Abbildung 2). Im Querschnitt

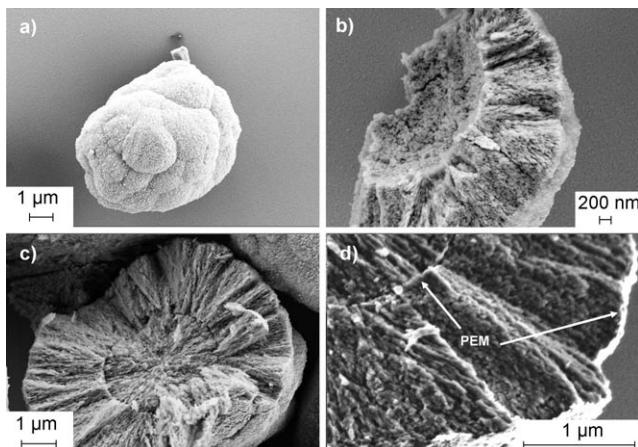


Abbildung 2. SEM-Aufnahmen von Kern-Schale-Partikeln vom Typ II: a) vollständiges Partikel, b) Partikelfragment (äußeres Kompartiment), c,d) Partikelquerschnitte mit deutlich erkennbaren Polyelektrolytmultischichten (Pfeile).

offenbart sich der radialsymmetrische Charakter der inneren Struktur (Abbildung 2c,d). Eingebettete und umhüllende Polyelektrolytmultischichten sind deutlich erkennbar (Abbildung 2d). Die untersuchten Kern-Schale-Partikel haben einen Gesamtdurchmesser von 8–10 µm, wobei der innere Kern 3–4 µm einnimmt.

Nach Herauslösen der CaCO₃-Bestandteile durch Calcium-Komplexierung mit EDTA bilden die verbleibenden Po-

lyelektrolythüllen eine „Kapsel in der Kapsel“ (Abbildung 1, Schritt 6). Der Auflösungsprozess wurde mit konfokaler Laserfluoreszenzmikroskopie verfolgt, und es wurde bestätigt, dass die räumliche Trennung der beiden Proteine durch die für makromolekulare Spezies impermeable Polyelektrolyt-Zwischenschicht erhalten bleibt (Abbildung 3, obere Reihe). Lu et al. zeigten kürzlich, dass die Funktionalisierung von (PSS/PAH)₅-Kapseln mit ferromagnetischen Gold-Cobalt-Nanopartikeln die Permeabilität für

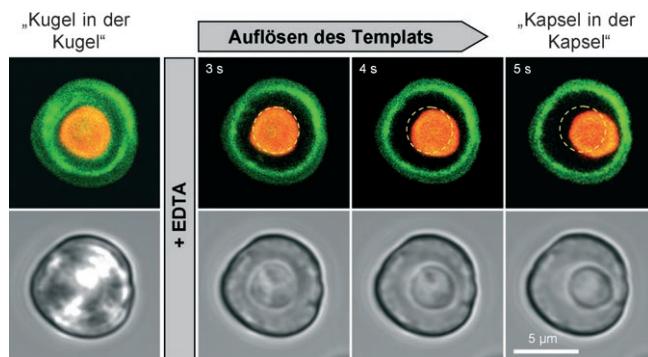


Abbildung 3. Echtzeitbeobachtung der Templatauflösung von Kern-Schale-Partikeln vom Typ II mit konfokaler Laserrastermikroskopie (CLSM). Die CaCO₃-Kompartimente sind mit TRITC-HSA (orange, innen) oder Alexa-Fluor-488-HSA (grün, außen) beladen. Nach Calcium-Komplexierung mit EDTA verbleiben beide Proteine in getrennten Kompartimenten der entstandenen „Kapsel in der Kapsel“.

hochmolekulares Dextran ($MW=2 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) deutlich erhöht.^[23] Wir vermuten, dass ein derartiger Effekt in unserem Fall wegen der vergleichsweise niedrigen Partikeldichte (3000–5000 Magnetitnanopartikel pro Kapsel) nicht festzustellen war. Wir beobachteten, dass Anteile von Alexa-HSA (grün in Abbildung 3) an der inneren Oberfläche der äußeren Kapsel adsorbieren. Grund hierfür sind starke elektrostatische Wechselwirkungen zwischen nichtkompensierten Ladungen des Polyelektrolytnetzwerks und polaren Seitenketten des Proteins. Dieser Effekt wird vermutlich durch die hohe Rauigkeit der inneren Kapseloberfläche – bedingt durch die poröse Struktur des Templa – erheblich verstärkt.^[16,26] Lichtmikroskop-Aufnahmen belegen, dass sich die innere Kapsel nach der Auflösung des Templa vom Zentrum an den Rand der äußeren Kapsel bewegt (Abbildung 3, untere Reihe), und stützen so die Annahme zweier unabhängiger konzentrischer Polyelektrolytkapseln (siehe Videofilm in den Hintergrundinformationen).

Um mögliche Anwendungen aufzuzeigen, haben wir die beiden Modellproteine durch ein bienzymatisches System aus Glucose-Oxidase (GOD) und Peroxidase (POD) ersetzt.

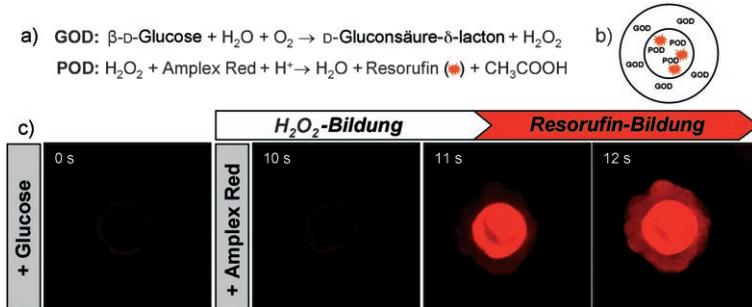


Abbildung 4. Gekoppelter Enzymtest mit Glucose-Oxidase (GOD) und Peroxidase (POD) in einer „Kapsel in der Kapsel“: a) Reaktionsschema; b) Lokalisierung der Enzyme (Details siehe Hintergrundinformationen); c) Echtzeitbeobachtung (CLSM) der Resorufin-Bildung.

Abbildung 4a zeigt das zugrundeliegende Reaktionsschema: Die Oxidation von Glucose durch GOD führt zur Bildung von H_2O_2 , das in Gegenwart eines Elektronendonors als Substrat für POD fungiert. Als Elektronendonator haben wir Amplex Red gewählt, das durch GOD zum fluoreszenzaktiven Resorufin oxidiert werden kann.^[27] Wir haben GOD in das äußere und POD in das innere Kapselkompartiment eingebracht (Abbildung 4b, detailliertes Reaktionsschema in den Hintergrundinformationen). Die Kopplung der Enzymreaktionen sollte durch die semipermeablen Eigenschaften der Polyelektrolythüllen vermittelt werden, die es niedermolekularen Substraten und Produkten ermöglichen, durch die Kapselwände ein- und auszudiffundieren, während die makromolekularen Enzyme in den Kompartimenten zurückgehalten werden. Nach Zugabe von Glucose sollte H_2O_2 ausschließlich im äußeren Kompartiment (durch GOD) gebildet werden, um im Anschluss in das umgebende Medium und das innere Kompartiment zu diffundieren. Demgegenüber sollte Resorufin nach Zugabe von Amplex Red ausschließlich im inneren Kompartiment (durch POD) entstehen (Details siehe Hintergrundinformationen). Tatsächlich wird im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop nach schrittweiser Zugabe von Glucose und Amplex Red innerhalb weniger Sekunden eine Resorufin-Fluoreszenz im inneren Kompartiment sichtbar, die anschließend in das äußere Kompartiment der Shell-in-shell-Kapsel diffundiert (Abbildung 4c; Videofilme – auch zu Kontrollexperimenten – sind in den Hintergrundinformationen vorhanden). Die hier vorgestellte Studie hat in erster Linie qualitativen Charakter, dennoch lässt die Anreicherung und Verteilung von Resorufin auf einen dynamischen Prozess im Fließgleichgewicht schließen, der durch die Umsatzgeschwindigkeiten von GOD und POD sowie durch die Diffusionsgeschwindigkeiten von H_2O_2 und Resorufin durch die Polyelektrolythüllen bestimmt wird.

Speziell für biotechnologische Anwendungen dürfte es interessant sein, mehrere interagierende Komponenten in separate Reaktionsräume einer Shell-in-shell-Kapsel einzubringen. Die interagierenden Komponenten (Enzym und Substrat, mehrere kooperierende Enzyme bis hin zu ganzen Ketten aus enzymatischen Reaktionsschritten) sollen möglicherweise zunächst separiert sein und erst nach einem externen Stimulus zur Reaktion gebracht werden. Die reversible Steuerung der Kapselpermeabilität durch Änderung von pH-

Wert, Ionenstärke oder Polarität des Lösungsmittels^[28–31] ist hier ebenso denkbar wie fortgeschrittenere Systeme auf der Basis von Ultraschall,^[32,33] Magnetfeldern^[23] oder IR-Laserlicht^[34,35] als Stimulus.

Experimentelles

PSS (MW=70 kDa), PAH (MW=70 kDa), TRITC-HSA (MW=66000 g mol⁻¹), GOD, POD (Sigma-Aldrich) und Amplex Red (Invitrogen) wurden ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Alexa Fluor 488 wurde ausgehend von „Alexa Fluor 488 carboxylic acid, succinimidyl ester *mixed isomers*“ (Invitrogen) synthetisiert.^[36] Magnetitpartikel (Durchmesser 40 nm) wurden vom Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (IAP, Potsdam-Golm) zur Verfügung gestellt.

Mit TRITC-HSA oder POD sowie Magnetit beladene CaCO_3 -Partikel wurden durch Copräzipitation wie beschrieben hergestellt.^[24,37] Hierzu wurden 0.615 mL 1M CaCl_2 -Lösung, 0.615 mL 1M Na_2CO_3 -Lösung, 50 μL 1.4-proz. (w/v) Magnetitpartikel-suspension und 2.450 mL H_2O mit 2 mg TRITC-HSA (oder 0.5 mg POD) mithilfe eines Magnetrührers 20 s bei Raumtemperatur gemischt. Das Reaktionsprodukt wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und dreimal mit H_2O gewaschen. Das erhaltene Präzipitat, das aus CaCO_3 -Partikeln mit einem Durchmesser von 4–6 μm bestand, wurde mit fünf Doppelschichten PSS und PAH beschichtet.^[1] Für den zweiten Copräzipitationsschritt wurde ein Viertel des Präzipitats in 0.615 mL 1M CaCl_2 -Lösung, 0.615 mL 1M Na_2CO_3 -Lösung und 2.5 mL H_2O mit 1 mg Alexa-Fluor-488-HSA (oder 0.5 mg GOD) resuspendiert und behandelt wie oben beschrieben. Das Produkt ist eine Mischung aus Kern-Schale-Partikeln (Typ I) und einzelnen, nur mit Alexa-488-HSA gefüllten Partikeln als Nebenprodukt. Die Kern-Schale-Partikel wurden mithilfe eines externen Magnetfelds isoliert (Hintergrundinformationen). Etwa 3000 bis 5000 Magnetitnanopartikel pro Calciumcarbonat-Partikel waren ausreichend für eine erfolgreiche Abtrennung des Nebenprodukts. Die Kern-Schale-Partikel wurden wiederum mit fünf Doppelschichten PSS und PAH beschichtet, wobei Kern-Schale-Partikel des Typs II erhalten wurden. Das Herauslösen des Templatkerns mit EDTA wurde wie beschrieben ausgeführt.^[16] Die Enzymaktivitäten von POD wurden nach Zugabe von 50 mM D-Glucose und 15 μM Amplex Red (in DMSO) mit CLSM visualisiert.

Die CLSM-Experimente wurden mit einem inversen, konfokalen Laserrastermikroskop TCS SP DM IRB (Leica Microsystems, Deutschland) mit einem 100× Öl-Immersionsobjektiv (numerische Apertur: 1.4) durchgeführt. Zur Rasterelektronenmikroskopie wurde ein Gemini 1550 (Zeiss, Deutschland) bei einer Beschleunigungsspannung von 3 kV verwendet. Ein Tropfen der Probenlösung wurde auf einem Glasobjektträger aufgebracht und bei Raumtemperatur verdunstet. Die Partikel wurden durch leichten mechanischen Druck aufgebrochen und vor der Messung mit Platin besputtert.

Eingegangen am 16. März 2007
 Online veröffentlicht am 21. Juni 2007

Stichwörter: Materialwissenschaften · Mikroreaktoren · Mikroverkapselung · Multischichten · Polyelektrolyte

- [1] C. S. Peyratout, L. Dähne, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3850; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3762.
- [2] A. G. Skirtach, O. Kreft, *Biotechnol. Pharm. Aspects* **2007**, im Druck.
- [3] P. Gupta, K. Verma, S. Garg, *Drug Discovery Today* **2002**, *7*, 569.

- [4] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 113.
- [5] A. Kikuchi, T. Okano, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 53.
- [6] Y. Qiu, K. Park, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *53*, 321.
- [7] H. H. Tonnesen, J. Karlsen, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2002**, *28*, 621.
- [8] V. P. Torchilin, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2549.
- [9] A. F. Thünenmann, S. Kubowicz, H. von Berlepsch, H. Möhwald, *Langmuir* **2006**, *22*, 2506.
- [10] K. J. Pekarek, J. S. Jacob, E. Mathiowitz, *Nature* **1994**, *367*, 258.
- [11] P. Y. Bolinger, D. Stamou, H. Vogel, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8594.
- [12] Z. F. Dai, L. Dähne, H. Möhwald, B. Tiersch, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4191; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4019.
- [13] G. Decher, *Science* **1997**, *277*, 1232.
- [14] E. Donath, G. B. Sukhorukov, F. Caruso, S. A. Davis, H. Möhwald, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2323; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2201.
- [15] G. B. Sukhorukov, E. Donath, S. Davis, H. Lichtenfeld, F. Caruso, V. I. Popov, H. Möhwald, *Polym. Adv. Technol.* **1998**, *9*, 759.
- [16] D. V. Volodkin, N. I. Larionova, G. B. Sukhorukov, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1962.
- [17] C. Y. Wang, C. Y. He, Z. Tong, X. X. Liu, B. Y. Ren, F. Zeng, *Int. J. Pharm.* **2006**, *308*, 160.
- [18] B. G. De Geest, R. E. Vandebroucke, A. M. Guenther, G. B. Sukhorukov, W. E. Hennink, N. N. Sanders, J. Demeester, S. C. De Smedt, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1005.
- [19] J. Q. Brown, M. J. McShane, *IEEE Sens. J.* **2005**, *5*, 1197.
- [20] O. Kreft, R. Georgieva, H. Bäumler, M. Steup, B. Müller-Röber, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 435.
- [21] O. P. Tiourina, A. A. Antipov, G. B. Sukhorukov, N. L. Larionova, Y. Lvov, H. Möhwald, *Macromol. Biosci.* **2001**, *1*, 209.
- [22] Y. Lvov, A. A. Antipov, A. Mamedov, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 125.
- [23] Z. H. Lu, M. D. Prouty, Z. H. Guo, V. O. Golub, C. Kumar, Y. M. Lvov, *Langmuir* **2005**, *21*, 2042.
- [24] A. I. Petrov, D. V. Volodkin, G. B. Sukhorukov, *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 918.
- [25] D. V. Andreeva, D. A. Gorin, D. G. Shchukin, G. B. Sukhorukov, *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 931.
- [26] D. V. Volodkin, A. I. Petrov, M. Prevot, G. B. Sukhorukov, *Langmuir* **2004**, *20*, 3398.
- [27] N. G. Balabushevich, O. P. Tiourina, D. V. Volodkin, N. I. Larionova, G. B. Sukhorukov, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1191.
- [28] A. A. Antipov, G. B. Sukhorukov, Y. A. Fedutik, J. Hartmann, M. Giersig, H. Möhwald, *Langmuir* **2002**, *18*, 6687.
- [29] K. Itano, J. Y. Choi, M. F. Rubner, *Macromolecules* **2005**, *38*, 3450.
- [30] T. Mauser, C. Dejugnat, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov, *Langmuir* **2006**, *22*, 5888.
- [31] Z. J. Sui, J. B. Schlenoff, *Langmuir* **2004**, *20*, 6026.
- [32] B. G. De Geest, A. G. Skirtach, T. R. M. De Beer, G. B. Sukhorukov, L. Bracke, W. R. G. Baeyens, J. Demeester, S. C. De Smedt, *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 88.
- [33] D. G. Shchukin, D. A. Gorin, H. Möhwald, *Langmuir* **2006**, *22*, 7400.
- [34] A. G. Skirtach, A. M. Javier, O. Kreft, K. Köhler, A. P. Alberola, H. Möhwald, W. J. Parak, G. B. Sukhorukov, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4728; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4612.
- [35] A. G. Skirtach, C. Dejugnat, D. Braun, A. S. Susha, A. L. Rogach, W. J. Parak, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1371.
- [36] R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Biochemicals, Molecular Probes*, Eugene, **2004**.
- [37] G. B. Sukhorukov, D. V. Volodkin, A. M. Günther, A. I. Petrov, D. B. Shenoy, H. Möhwald, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2073.