

Wirkstoffverabreichung mithilfe polymerer Mehrschichtkapseln

Liesbeth J. De Cock, Stefaan De Koker, Bruno G. De Geest,* Johan Grooten, Chris Vervaet, Jean Paul Remon, Gleb B. Sukhorukov und Maria N. Antipina

Stichwörter:

Biotechnologie · Dünne Schichten ·

Nanowerkstoffe · Polymere ·

Wirkstoff-Transport



Die Fortschritte der letzten Jahre in Medizin und Biotechnologie haben die Entwicklung von Transportsystemen im Nanomaßstab dringlich gemacht, die eine Vielzahl an neuartigen Therapeutika wie Proteine, Chemotherapeutika und Nucleinsäuren einschließen können. Zudem sollten diese Transportsysteme „intelligent“ sein, d. h., sie sollten ihre Ladung zu einer festgelegten Zeit, an einem bestimmten Ort oder nach einer spezifischen Stimulierung abladen können. Seit polymere Mehrschichtkapseln verfügbar sind, die durch mehrstufiges Beschichten eines Opfertemplats und anschließendes Auflösen dieses Templatzes hergestellt werden, ist es möglich, Mikrokapseln unter rein wässrigen Bedingungen mithilfe einfacher Baustein- und Assoziationsverfahren gezielt herzustellen, was eine bislang unerreichte Steuerung der Mikrokapselfunktionalität erlaubt. Inzwischen sind polymere Mehrschichtkapseln auf zunehmendes Interesse in den Biowissenschaften gestoßen, und viele interessante Systeme mit bioabbaubaren Bestandteilen und biospezifischen Funktionen wurden beschrieben. In dieser Übersicht werden die neuesten Durchbrüche beim Einsatz für die Wirkstoffverabreichung vorgestellt.

1. Einleitung

Damit Wirkstoffe ihren therapeutischen Zweck erfüllen, müssen sie zuverlässig zum Zielort oder Zielgewebe gelangen und dort in definierter Menge mit der beabsichtigten Geschwindigkeit und/oder auf ein bestimmtes Signal hin freigesetzt werden. Dem Erreichen dieses wichtigen Ziels widmet sich die Forschung zur Wirkstoffverabreichung („Drug Delivery“).^[1,2] Die Anforderungen haben zu einem Trend zur Miniaturisierung geführt, und in multidisziplinärer Arbeit werden gegenwärtig neuartige Systeme zur Verabreichung von Wirkstoffen entwickelt. Ferner können einige Wirkstoffe nicht mit herkömmlichen Verfahren formuliert oder appliziert werden, weil sie entweder schlecht wasserlöslich sind oder in komplexen Umgebungen wie dem menschlichen Körper nur eine geringe Stabilität aufweisen.

Ein beeindruckendes Beispiel für ein neues Wirkstoffsystem, das kürzlich durch interdisziplinäre Forschungen zugänglich wurde, sind polymere Mehrschichtkapseln (PMLCs).^[3-5] Diese Kapseln werden durch die sequenzielle Abscheidung polymerer Schichten auf einem Opfertemplat hergestellt (Abbildung 1). Als treibende Kraft für den Aufbau der Mehrfachschichten kann nahezu jede Art von Wechselwirkung (z. B. elektrostatisch, Wasserstoffbrückenbindungen, kovalente Bindung, molekulare Erkennung) eingesetzt werden. Die Auflösung des Opfertemplats liefert dann die hohlen Kapseln. Seit der Einführung der PMLCs Ende der 1990er Jahre sind ihre physikochemischen Eigenschaften intensiv untersucht worden.^[6] In neuerer Zeit wurde auch die Verabreichung von Wirkstoffen mit diesen PMLCs erforscht.^[7-12] Inzwischen stehen PMLCs zur Verfügung, die unterschiedliche Wirkstoffklassen einschließen können und aus Polymeren bestehen, die entweder biologisch abbaubar sind oder durch Stimulanten zur Freisetzung ihres Inhalts angeregt werden können.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	7109
2. Herstellung polymerer Mehrschichtkapseln	7109
3. Einschluss und Freisetzung	7112
4. Wechselwirkungen mit lebenden Zellen und Geweben	7116
5. Wirkstoffverabreichung	7119
6. Schlussbemerkungen	7123
7. Abkürzungen	7124

Der größte Vorteil der Mehrschichtkapseln ist zweifels-
ohne ihre Vielseitigkeit. Sie können mit Templayen herge-
stellt werden, deren Größe von wenigen Nanometern bis zu
Hunderten von Mikrometern reicht, und ihre chemischen und
mechanischen Eigenschaften können durch die Dicke und die
Zusammensetzung der Schale gesteuert werden. Darüber
hinaus können diese Mikrokapseln durch eine fast unbegrenzte
Zahl an Komponenten, von Polymeren über Nano-
partikel^[13] bis zu spezifischen biologischen Einheiten, modifi-
ziert werden. Wir geben hier einen Überblick über die
wichtigsten Entwicklungen zur Wirkstoffverabreichung mit
PMLCs und gehen auch auf die Gebiete ein, in denen
Mehrschichtkapseln einen Vorteil gegenüber herkömmlichen
Systemen haben könnten.

[*] L. J. De Cock, Dr. B. G. De Geest, Prof. Dr. C. Vervaet,
Prof. Dr. J. P. Remon
Laboratory of Pharmaceutical Technology
Department of Pharmaceutics, Ghent University
Harelbekestraat 72, 9000 Ghent (Belgien)
E-Mail: br.degeest@ugent.be
Dr. S. De Koker,^[+] Prof. Dr. J. Grooten
Laboratory of Molecular Immunology, Ghent University (Belgien)
Prof. Dr. G. B. Sukhorukov
School of Engineering and Materials Sciences
Queen Mary University of London (Großbritannien)
Dr. M. N. Antipina
Institute of Materials Research and Engineering, A*STAR (Singapur)
[+] Diese Autoren haben gleichrangig zu diesem Aufsatz beigetragen.

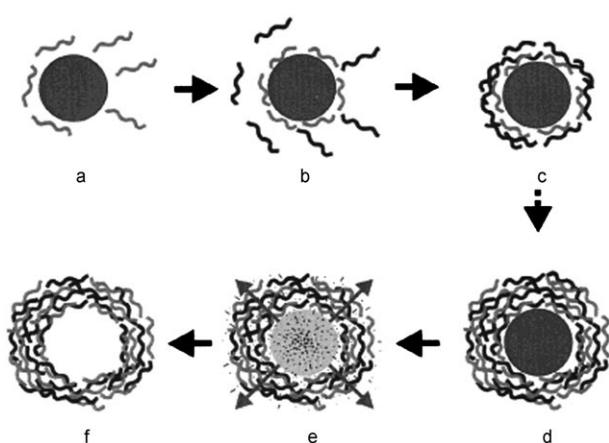


Abbildung 1. Aufbau von PMLCs (schematisch). a)–d) Zunächst werden dem Kolloid abwechselnd zwei Polymere mit unterschiedlichen Wechselwirkungen zugesetzt, die auf der Oberfläche einen zunehmend dickeren Film bilden. Nach jedem Abscheidevorgang wird überschüssiges Polymer durch Spülen und Abzentrifugieren entfernt. e) Nachdem die gewünschte Zahl an Schichten abgelagert wurde, wird der Templatkern aufgelöst. f) Nach weiteren Spülstufen liegt eine Suspension hohler PMLCs vor.^[3]

2. Herstellung polymerer Mehrschichtkapseln

2.1. Opfertemplatkerne

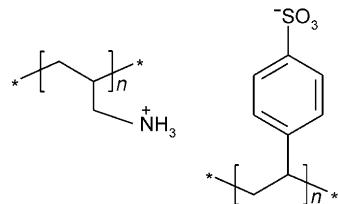
Als Templat für polymeren Mehrschichtkapseln dienten zunächst organische Mikropartikel aus Polystyrol oder Melaminformaldehyd (MF), deren Größe meist 1–10 µm betrug.^[3] In diesen Fällen waren organische Lösungsmittel oder saure Medien erforderlich, um den Templatkern aufzulösen, was einen Einsatz der Kapseln in der Medizin verhinderte. Daher war der Übergang zu anorganischen Temperaturen, die sich unter relativ milden Bedingungen zersetzen lassen, ein großer Fortschritt.^[14–17] Am intensivsten untersucht wurden hier poröses Calciumcarbonat (Größe 3–5 µm, zersetztlich in wässriger EDTA) und (mesoporöses) Kieselgel (Größe 0,5–5 µm, zersetztlich in gepufferter, verdünnter Flusssäure).^[18–20] Wegen ihrer Porosität absorbieren diese Temperaturen relativ große Mengen an Biomolekülen, die auch nach schichtweiser (Layer-by-Layer(LbL)) Beschichtung und Auflösung des Kerns in der Kapsel verbleiben.



Bruno De Geest graduierte 2003 als Chemieingenieur an der Universität Gent in Belgien und erhielt dort 2006 seinen PhD. Nach zwei Jahren als Postdoktorand an der Universität Utrecht in den Niederlanden erhielt er ein Postdoktorandenstipendium am Laboratorium für Pharmazeutische Technik der Universität Gent. Sein Hauptforschungsinteresse ist die Schnittstelle zwischen Chemie, Materialwissenschaften, Medizin und Biologie.

2.2. Elektrostatische Wechselwirkungen

Nach Pionierarbeiten von Iler 1966^[21] entwickelten Decher et al. in den 1990er Jahren ein LbL-Verfahren zur schichtweisen Belegung geladener Oberflächen.^[22–24] Dabei nutzten sie die elektrostatische Anziehung zwischen Schichten aus entgegengesetzt geladenen Polyelektronen. Zunächst wurde vorwiegend das Polyelektronypaar Natrium-poly(styrolsulfonat)/Poly(allylaminhydrochlorid) (PSS/PAH; Schema 1) genutzt, mit dem sich auf zahlreichen Templat-

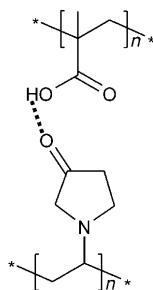


Schema 1. Struktur der Polymere PSS und PAH, deren Komplexbildung elektrostatische Wechselwirkungen nutzt.

kernen stabile Kapseln aufbauen ließen. PSS/PAH-Kapseln sind allerdings nicht biologisch abbaubar und reagieren nicht auf physiologische Stimulierung, was ihr Potenzial für die Wirkstoffverabreichung verringert. Picart et al.^[25,26] und Lynn et al.^[27–29] erforschten ebene Mehrfachschichten, die durch elektrostatische Wechselwirkungen entstehen und enzymatisch bzw. hydrolytisch abbaubar sind. Dadurch angeregt entwickelten De Geest et al. PMLCs mit Polypeptiden oder Polysacchariden als enzymatisch abbaubarem Bestandteil oder mit Polymeren als Hülle, deren Nettoladung sich bei der Hydrolyse des Polymergerüsts ändert.^[30]

2.3. Wasserstoffbrückenbindungen

Nach ersten Arbeiten der Arbeitsgruppe von Sukhishvili^[31] wurde der Einsatz von Wasserstoffbrückenbindungen genauer untersucht, weil so ohne potenziell giftige Polykationen Mehrschichtkapseln hergestellt werden können. Am intensivsten wurde das System Poly(*N*-vinylpyrrolidon)/Polymethacrylsäure (PVPON/PMA) untersucht, in dem PVPON der Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor und PMA der Wasserstoffbrückenbindungsdonor ist (Schema 2), sofern die PMLCs bei niedrigen pH-Werten hergestellt werden, bei denen beide Polymere nahezu neutral vorliegen. Bei pH-Werten, die eher physiologischen Bedingungen entsprechen (pH = 7,4), werden die PMA-Carboxygruppen deprotoniert und damit geladen, und die Kapseln werden wegen der elektrostatischen Abstoßung instabil. Um eine irreversible Zersetzung zu umgehen, ist eine kovalente Stabilisierung der Kapselmembran erforderlich. Die Sukhishvili-Gruppe kuppelte Carbodiimide mit den PMA-Carboxygruppen und setzte Ethylen diamin als Vernetzer ein.^[32] Die so erhaltenen Kapseln waren über den gesamten pH-Bereich stabil. In alkalischer Lösung setzten sie PVPON frei, da dieses nicht mehr durch das nun deprotonierte PMA gebunden wurde.



Schema 2. Struktur der Polymere PMA und PVPON, deren Komplexbildung Wasserstoffbrückenbindungen nutzt.

Die resultierenden, nur noch aus einer Komponente bestehenden Kapseln quellen oder schrumpfen in Abhängigkeit vom pH-Wert; ein rascher, reversibler Übergang vom einen in den anderen Zustand findet bei einem Ansteigen des pH-Werts über 6 statt. Da der pH-Wert in endo- oder lysosomalen Vesikeln, in die PMLCs nach einer Phagozytose gewöhnlich gelangen, bei 5.4 liegt, ist dieser Schwellenwert für eine intrazelluläre Verabreichung von Wirkstoffen interessant.

Der zweite große Unterschied zwischen intra- und extrazellulären Medien neben dem pH-Wert ist die reduktive Umgebung in den Zellen, die auf die Gegenwart von Glutathion zurückzuführen ist. Disulfidbindungen lassen sich reduktiv in Thioleinheiten spalten und sind häufig als biologisch abbaubare Linker eingesetzt worden. Die Arbeitsgruppe von Caruso nutzte dies bei Mehrschichtkapseln, indem sie Cysteamingruppen (Cysteamin = 2-Aminoethanthyd) in das PMA-Gerüst einführte und es so mit Thiolgruppen versah (PMA^{SH}).^[33–36] Danach wurden PMA^{SH} und PVPON auf Kieselgel-Mikropartikeln abgelagert und so Mehrschichtkapseln erhalten; anschließend wurden die Thiolgruppen oxidativ mit Wasserstoffperoxid oder Chloramin T vernetzt und das Templat mit Flusssäure entfernt.

2.4. Kovalente Reaktionen

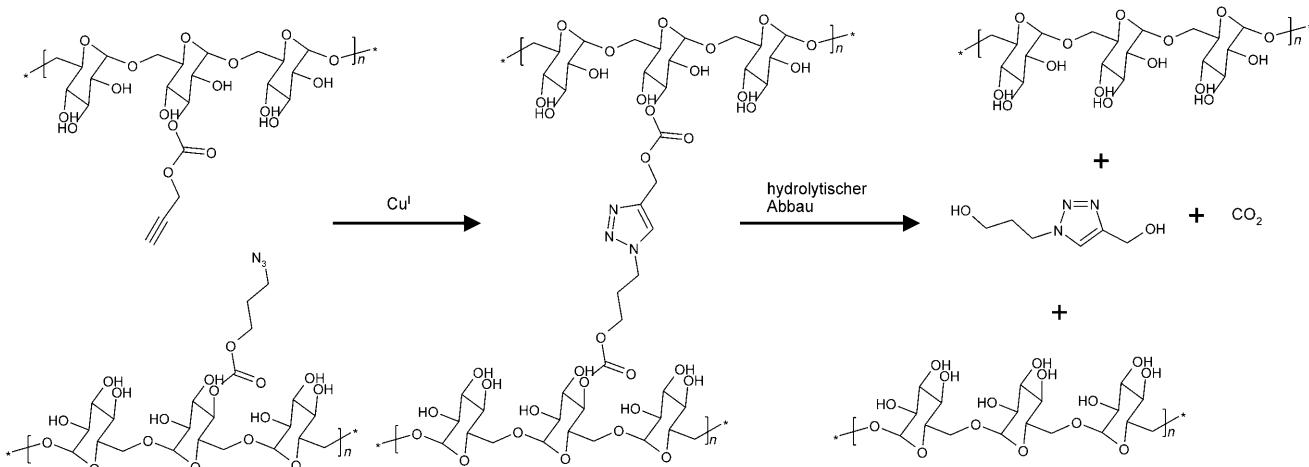
Durch kovalente Bindungen lässt sich der unerwünschte Zerfall von PMLCs vermeiden (siehe Abschnitt 2.3). Außer zur bloßen Stabilisierung können kovalente Bindungen auch als treibende Kraft beim Aufbau von Mehrfachschichten eingesetzt werden. In mehreren Arbeiten wurde der Einsatz von niedermolekularem Glutaraldehyd als Vernetzer zur kovalenten Verknüpfung von Polymeren beschrieben, deren primäre Aminogruppen dabei in Imine überführt wurden.^[37–39] In ähnlicher Weise wurden auch reaktive Polymere eingesetzt. So wurde Poly(dichlorphosphazhen), das leicht mit Aminen reagiert,^[40] mit Hexamethylendiamin zu Mehrschichtkapseln umgesetzt, und Poly(glycidylmethacrylat) wurde mit PAH kombiniert.^[41]

Ein aktueller Schwerpunkt in der Polymerforschung ist die Klickchemie,^[42,43] die inzwischen auch zur Herstellung von Mehrschichtkapseln eingesetzt wurde. Nach der These von Sharpless et al.^[44] sind für Klickreaktionen eine hohe Selektivität und Reaktivität unter milden Bedingungen charakteristisch. Dies eröffnet vielfältige Möglichkeiten zur

Synthese von PMLCs ohne Störungen durch funktionelle Gruppen der eingeschlossenen Wirkstoffe, wie sie z.B. bei Verwendung der Aminchemie auftreten. Die am häufigsten eingesetzte Klickreaktion ist die Huisgen-Reaktion, die Cu^{l} -katalysierte 1,3-Dipolare Cycloaddition von Aziden und Alkinen zu einem stabilen Triazol (siehe Schema 3).^[44] Die Arbeitsgruppe von Caruso führte Azid- und Alkinylgruppen in Polyacrylsäure (PAA) ein und fügte die Produkte anschließend zu Mehrfachschichten zusammen.^[45,46] Dazu beschichtete sie Kieselgelpartikel in Gegenwart von CuSO_4 und Natriumascorbat (zur Reduktion der Cu^{II} -Ionen in CuSO_4 zu Cu^{l}) abwechselnd mit PAA^{Azid} und $\text{PAA}^{\text{Alkin}}$. Deren funktionellen Gruppen reagierten dann miteinander zu Triazolringen und verknüpften die Schichten. Die Zersetzung des Kieselgeltemplats lieferte schließlich stabile, hohle Kapseln, deren Verhalten vom pH-Wert abhing, weil die Carboxyreste bei pH-Wert-Änderungen (de)protoniert werden. In ähnlicher Weise wurden aus azid/alkinylfunktionalisiertem Poly(*N*-isopropylacrylamid) temperaturempfindliche PMLCs erhalten.^[47]

Die mit den bisher beschriebenen Verfahren zugänglichen Kapseln weisen keine Funktionalität zur Freisetzung ihres Inhalts auf. Eine Wirkstoffverabreichung wird sich jedoch nur mit abbaubaren Kapseln realisieren lassen. Zwei Arbeitsgruppen haben über (biologisch) abbaubare, durch Klickreaktionen erhaltene Kapseln berichtet. Ochs et al. funktionalisierten abbaubare Polypeptide wie Poly-L-glutaminsäure und Poly-L-lysin mit Azid- und Alkinylresten.^[48] Klickreaktionen zwischen den gleichartig geladenen modifizierten PGAs oder PLLs lieferten nicht nur Mehrschichtkapseln, sondern ermöglichen auch die Funktionalisierung der Kapseln mit Biomolekülen wie Biotin. Die so erhaltenen Kapseln können durch die Bindung von Streptavidin oder Polyethylenglycol (PEG) weiter modifiziert werden, wobei PEG die Adsorption von Albumin auf der Kapseloberfläche deutlich verringert. De Geest et al. erhielten mit einem anderen Ansatz abbaubare Klickverknüpfungen (Schema 3).^[49,50] Sie modifizierten Dextran mit Azid- oder Alkinylresten, indem sie Azidopropanol bzw. Propargylalkohol mit 1,1'-Carbonyldiimidazol aktivierten. Dabei bildeten sich abbaubare Carbonatester-Bindungen zwischen dem Dextrangerüst und den Azid- bzw. Alkinylgruppen. Die Cu^{l} -gestützte Verknüpfung von Dextran^{Alkin} und Dextran^{Azid} lieferte dann sowohl feste Mikrogele (mit einem Emulsionsverfahren) als auch hohle PMLCs, wobei im zweiten Fall CaCO_3 -Mikropartikel als Opfertemplat für die verknüpften Dextrane eingesetzt wurden. Carbonatester können unter physiologischen Bedingungen (d.h. pH 7–4 und 37 °C) abgebaut werden. Die Freisetzung von Wirkstoffen im Verlauf von Tagen oder Wochen konnte dabei über den Grad der Substitution des Dextrangerüsts mit Azid- und Alkinylgruppen gesteuert werden.

Die Caruso-Gruppe nutzte ihre Kenntnisse über biologisch abbaubare, durch Wasserstoffbrücken verknüpfte Kapseln und kombinierte die Klickchemie mit Disulfidbrücken, die in biologischen Systemen leicht reduziert werden.^[51] Dazu wurden in PVPON Alkinylgruppen eingeführt und das Produkt mit einem Bisazid umgesetzt, um die durch Wasserstoffbrücken verknüpften PMA/PVPON-Kapseln zu stabilisieren.

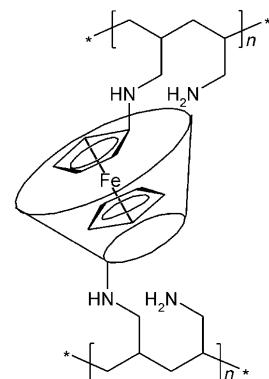


Schema 3. Klickchemische Verknüpfung von alkinyl- und azidsubstituiertem Dextran: In Gegenwart von Cu^I-Ionen entstehen Triazolbrücken und dadurch Mehrfachschichten. Die Hydrolyse der Estergruppen, die das Dextransgerüst mit den Triazolringen verbinden, führt zum Abbau der Mehrfachschichten.

sieren. Da der Bisazidlinker in der Mitte eine Disulfidgruppe aufwies, wurden so biologisch reduzierbare polymere Mehrschichtkapseln erhalten, die – da PMA bei hohen pH-Werten freigesetzt wird – nur aus PVPON bestehen. Diese Kapseln adsorbieren Proteine kaum und könnten daher gut im Blutkreislauf zirkulieren; zudem ist ihre Cytotoxizität niedrig. Die gleiche Forschungsgruppe untersuchte auch die Anwendung ihres Systems zur Wirkstoffverabreichung und tränkte dazu mesoporöse Kieselgelmikropartikel mit PEG^{Alkin} und vernetzte sie anschließend mit einem Bisazid, das eine Disulfidgruppe enthielt.^[52] Vor der Zersetzung des Templaats wurde der azidfunktionalisierte Antitumorwirkstoff Doxorubicin über verbliebene Alkinylreste angekuppelt. Unter reduktiven intrazellulären Bedingungen zersetzen sich die wirkstoffhaltigen Kapseln und setzen das Doxorubicin frei.

2.5. Spezifische Erkennung

Während die spezifische Erkennung intensiv zur Herstellung von LbL-Filmen auf planaren Oberflächen genutzt wurde, gibt es nur wenige Berichte über ihre Anwendung beim Aufbau von Mehrschichtkapseln. Wang et al. erhielten PMLCs, indem sie abwechselnd mit β -Cyclodextrin und Ferrocen funktionalisiertes PAH abschieden.^[53] Die Wirt-Gast-Wechselwirkungen zwischen β -Cyclodextrin und Ferrocen führten zur Entstehung eines Einschluskomplexes (Schema 4) und stabilisierten die Mehrfachschichten. Größe und Permeabilität der gebildeten Kapseln veränderten sich in interessanter Weise in Abhängigkeit von pH-Wert, Ionenstärke und β -Cyclodextrin-Konzentration. Akashi und Mitarbeiter schlugen einen anderen Ansatz zur Herstellung von PMLCs durch spezifische Erkennung vor, bei dem abwechselnd Schichten aus isotaktischem und syndiotaktischem Poly(methylmethacrylat) abgelagert werden, zwischen denen sich Stereokomplexe bilden.^[54] Beide Verfahren sind interessant, und Weiterentwicklungen hin zu biologisch abbaubaren oder biologisch stimulierbaren Systemen wären für Anwendungen zur Wirkstoffverabreichung nützlich.



Schema 4. Einschluskomplex aus einem Ferrocen- und einem Cyclo-dextrin-haltigen Polymer.

3. Einschluss und Freisetzung

3.1. Prä- und Post-Beladung

Es gibt zwei Strategien zum Einschluss nieder- und hochmolekularer Stoffe in Mehrschichtkapseln: die Prä- und die Post-Beladung. Bei der Post-Beladung werden fertige Kapseln mit den gewünschten Stoffen beladen, indem die Permeabilität der Kapselhülle verändert wird.^[55–57] In Abbildung 2 sind die unterschiedlichen Möglichkeiten zur Post-Beladung zusammengestellt. Unter Standardbedingungen in wässriger Phase ist die Kapselhülle durchlässig für niedermolekulare Stoffe wie Ionen und kleine Wirkstoffmoleküle (z.B. Ibuprofen), aber undurchlässig für Makromoleküle ($M_w > 5$ kDa).^[58] Die Beladung mit höhermolekularen Stoffen ist entweder durch die Änderung von deren Löslichkeit oder durch eine Modifikation der Hülle möglich. Ersteres wurde zur selektiven Kristallisation von Farbstoffen durch eine reversible, wiederholte Änderung von deren Löslichkeit genutzt.^[59]

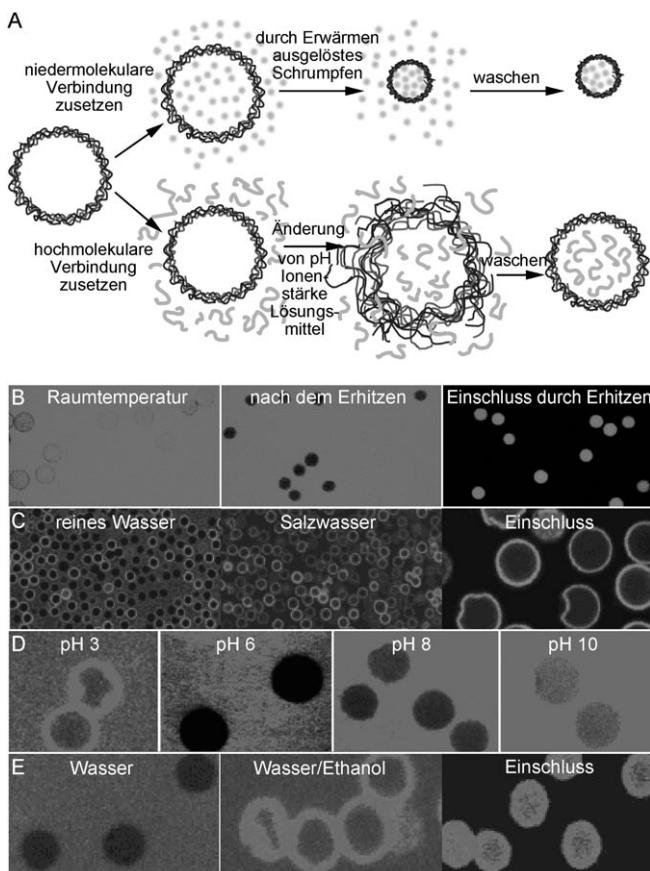


Abbildung 2. A) Strategien zur Post-Beladung von Mehrschichtkapseln durch Änderung physikochemischer Parameter. B)–E) Konfokalmikroskopische Aufnahmen: B) (PDADMAC/PSS)₄-Kapseln, deren Permeabilität für FITC-Dextran (10 kDa) sich durch Erwärmen verändert.^[62] C) Beladung von (PSS/PAH)₈-Kapseln mit FITC-PAH (70 kDa) durch reversible Änderung der Ionenstärke des Mediums.^[55] D) (TA/PAH)₅-Kapseln nach Inkubieren in Lösungen von FITC-Dextran (2000 kDa) bei unterschiedlichen pH-Werten.^[61] E) Einschluss von FITC-Urease in (PSS/PAH)₄-Kapseln durch Änderung der Lösungsmittelpolarität.^[60]

Eine reversible Änderung der Durchlässigkeit der Kapselhülle für Makromoleküle gelingt durch Änderungen von pH-Wert, Ionenstärke oder Polarität des Lösungsmittels, die zu einer Lockerung des Polyelektrolytnetzwerks und zu Defekten in der Hülle führen.^[55,57,60,61] Nachdem die Makromoleküle die Hülle passiert haben, werden die Mehrschichtkapseln wieder in das ursprüngliche Medium überführt und die aufgenommenen Stoffe so in ihrem Hohlraum eingeschlossen. Nachdem Ibarz et al. das temperaturabhängige Schrumpfen von PMLCs entdeckt hatten,^[56] untersuchten Köhler und Sukhorukov genauer, ob sich niedrigmolekulare (10 kDa) und hochmolekulare Stoffe (70 kDa) einschließen lassen, wenn die Kapseln bei einer Erwärmung über die Glasübergangstemperatur T_g schrumpfen, ihre Membran dichter wird und die Permeabilität dadurch abnimmt.^[62] Die treibende Kraft für die Diffusion von Stoffen in die Kapseln ist der Konzentrationsgradient zwischen dem Medium und dem Innern der Kapseln. Gibt es elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem aufzunehmenden Stoff und einer

Matrix mit entgegengesetzter Ladung im Kapselinnern, erleichtern diese die Diffusion wasserlöslicher Verbindungen gegen den Konzentrationsgradienten in die Kapsel und ihre Ansammlung dort. Solche geladenen Matrices können durch unvollständige Auflösung des organischen Templatkerns (z.B. MF) oder durch Einsatz geladener Geltemplate wie Calciumalginat-Kügelchen erhalten werden.^[63,64] Mit dieser Methode sind Polymere, Farbstoffe, Proteine, Enzyme und niedermolekulare Wirkstoffe eingekapselt worden. Ein Spezialfall der Post-Beladung ist die Synthese der einzuschließenden Verbindung im Innern der Kapsel oder in ihrer Hülle durch Polymerisation oder enzymatische Reaktion.^[65,66]

Diese Methode ist zwar für zahlreiche Stoffe einsetzbar, die Einschlusseffizienz (=Menge an in der Kapsel eingeschlossenem Protein relativ zur ursprünglich zugegebenen Proteinmenge) ist aber sehr gering. Außerdem können sich die aufzunehmenden makromolekularen Wirkstoffe unter den drastischen Bedingungen bei der Permeabilisierung der Membran verändern, und ihre Bioaktivität kann abnehmen. Seit wenigen Jahren ist bekannt, dass CaCO_3 -Mikropartikel für den Einschluss von Proteinen, Enzymen und Nanopartikeln geeigneter sind.^[15] Sie haben wegen ihrer Porosität eine große Oberfläche und können Makromoleküle gut aufnehmen. In diesem Fall handelt es sich um eine Prä-Beladung, entweder durch physikalische Adsorption/Porendiffusion oder durch Mitfällen bei der Herstellung der Mikropartikel. Nach dem Aufbringen der Polyelektrolytschichten wird das CaCO_3 -Templat mit EDTA entfernt; zahlreiche Stoffe biologischen Ursprungs werden dabei nicht angegriffen. Kreft et al. verfeinerten dieses Verfahren und stellten PMLCs mit zwei Hohlräumen her, in denen unterschiedliche Makromoleküle eingeschlossen sein können (Schale-Schale-Mikrokapseln; Abbildung 3 A,B),^[67,68] indem auf polyelektrolytbeschichtete, substrathaltige CaCO_3 -Mikropartikel erneut CaCO_3 co-gefällt und anschließend eine zweite Polyelektrolytschicht aufgebracht wurde. Das Auflösen des CaCO_3 -Templats lieferte dann Kapseln in Kapseln (Abbildung 3 C,D), was – nach Auflösen der inneren Kapselhülle – Reaktionen in abgegrenzten Räumen ermöglicht.

CaCO_3 ist als Templat für Mehrschichtkapseln allerdings nicht für Verbindungen geeignet, die empfindlich auf Änderungen des pH-Werts reagieren oder die zwei- oder dreiwertige Metallkationen enthalten und sich deshalb bei der Zugabe von EDTA zersetzen können. Auch mesoporöses Kieselgel weist eine große Oberfläche auf und ist als Templatkern zum Einschluss von Makromolekülen in PMLCs eingesetzt worden.^[19,69] Da dieses Templat aber mit Flussäure aufgelöst werden muss, ist die Handhabung viel aufwendiger. Balabushevitch et al. berichteten über eine Prä-Beladung von PMLCs mit Enzymen ohne Verwendung eines Templat, indem ausgesalzene Aggregate von α -Chymotrypsin mit Polyelektrolyten beschichtet wurden.^[70] Mit einem Prä-Beladungskonzept wurden ferner Liposomen, die Makromoleküle enthielten, in die Mehrfachschichten der Kapselhülle eingebettet.^[71] Auf diesem Weg sind Kapseln zugänglich, die eine große Zahl von Vesikeln enthalten, die durch Detergentien aufgelöst werden können.^[72–74]

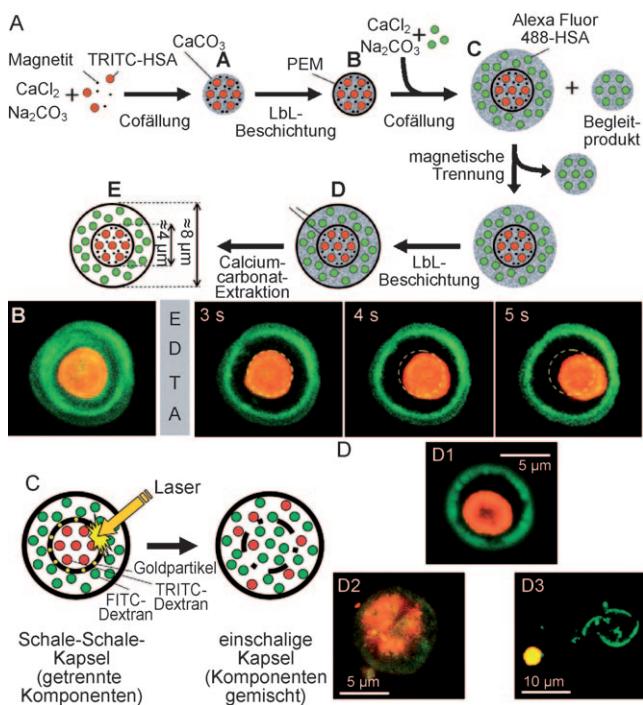


Abbildung 3. A) Synthese von Schale-Schale-Mikrokapseln (schematisch). A: Kern; B: Kern-Schale-Partikel; C: Ball-Ball-Partikel (Typ I); D: Ball-Ball-Partikel (Typ II); E: Schale-Schale-Mikrokapsel.^[67] B) D-Partikel während der Extraktion des Templatmaterials (CaCO_3), aufgenommen mit einem Laser-Konfokalrastermikroskop (CLSM). Der Niederschlag aus CaCO_3 enthielt TRITC-HSA (orange, innen) und Alexa Fluor 488-HSA (grün, außen). Nach dem Herauslösen von CaCO_3 unter Bildung der Schale-Schale-Kapseln bleiben beide Verbindungen durch die innere Polyelektrolythülle getrennt. Der gestrichelte Kreis markiert die Ausgangsposition der inneren Kapsel, die sich während der Extraktion zur Außenwand verschiebt.^[67] C) Laserinduziertes Mischen der Bestandteile beider Kompartmente der PMLCs. Die inneren und äußeren Hälften sind schematisch durch schwarze Kreise wiedergegeben.^[68] D) CLSM-Aufnahmen vor (D1) und nach der Laserbestrahlung (D2) der mit Goldpartikeln dotierten inneren Hülle. Bei einigen Kapseln führte die Bestrahlung zur Zerstörung der äußeren Hülle und zur Freisetzung der inneren Kapsel (D3).^[68]

3.2. Emulsionstemplate

Öl-in-Wasser-Emulsionen werden in der Medizin verbreitet als Träger für lipophile, biologisch wirksame Verbindungen eingesetzt, die so gezielt und kontrolliert freigesetzt werden.^[75,76] So ist MF59 eine Öl-in-Wasser-Emulsion, die als Trägermedium für Grippeimpfstoffe zugelassen ist. Auch in der Lebensmittelindustrie gibt es einen großen Bedarf an definierten Emulsionen.^[77] Als Plattform zur Herstellung intelligenter Systeme zur Verabreichung von Wirkstoffen in ölichen Medien wurde der Einschluss von Tröpfchen in Polyelektrolyt-Mehrfachschichten entwickelt. Ein möglicher Vorteil von LbL-Beschichtungen ist die Beeinflussbarkeit der physikochemischen Eigenschaften der Tröpfchenoberfläche, durch die die Wirkstoffverabreichungssysteme vielseitiger werden.

Auch unpolare Verbindungen können auf zwei Wegen eingekapselt werden: durch Post-Beladung fertiger Mehr-

schichtkapseln und durch die LbL-Beschichtung von Öltröpfchen, die in einem wässrigen Medium dispergiert sind.^[78] Moya et al. wendeten als erste den Post-Beladungs-Ansatz an und berichteten über den Einschluss von Decan in fertige PSS/PAH-Kapseln, indem sie fünfmal ein polareres gegen ein weniger polares Lösungsmittel austauschten. Sivakumar et al. stellten PSS/PAH- und PMA/PVPON-PMLCs her, die mit Ölen einschließlich Silikonöl, Paraffinöl und thermotropen Flüssigkristallen beladen waren. Dabei wurden mit einem Opfertemplate hohle Mehrschichtkapseln hergestellt, mit einem geeigneten Lösungsmittel gefüllt und dann in Kontakt mit dem Öl gebracht. Nachdem das Öl in die Kapseln eingedrungen war, wurde das Lösungsmittel wieder gegen Wasser ausgetauscht, was stabile Öl-in-Wasser-Mikroemulsionen lieferte.^[79]

Der größte Vorteil des Post-Beladungsverfahrens bei der Herstellung ölbefüllter Träger ist, dass monodisperse Emulsionen erhalten werden können, da dieser Parameter durch die Größe und Form des Templaats vorgegeben ist. Die Beladung der fertigen Kapseln mit dem Öl kann aber material- und zeitaufwendig sein, und die Einschlusseffizienz erreicht nie 100 %. Ferner sind damit Einschränkungen bei der Zusammensetzung der Kapselhülle verbunden, da letztere stabil genug sein muss, den Austausch des Lösungsmittels und mehrfaches Zentrifugieren auszuhalten.

Die LbL-Beschichtung zuvor stabilisierter Öltröpfchen in einem wässrigen Medium scheint daher ein vielseitigerer Ansatz zu sein. Am einfachsten lässt sich ein Stoff, der mit einer kontinuierlichen Phase nicht mischbar ist, durch hohe Scherkräfte oder Ultraschalleinwirkung darin dispergieren. Die Tröpfchen in den erhaltenen Emulsionen weisen eine ziemlich breite Größenverteilung auf,^[81] die Emulsion kann aber weiter homogenisiert werden.^[82,83] In neuerer Zeit hat sich das Mikrofluid-Emulgieren als das einfachste Verfahren zur Herstellung monodisperser Emulsionen herausgestellt.^[84] Zunächst werden dabei die Öltröpfchen stabilisiert, indem der Öl/Wasser-Emulsion ein amphiphiler Stoff zugesetzt wird. Um die mehrfache Beschichtung der Tröpfchen zu erleichtern, ist ein ionisches Detergens zu bevorzugen, das den Tröpfchen eine hinreichende Oberflächenladung verleiht. Es wurde über Proteine,^[85] kationische^[81,86] und anionische Lipide^[82] sowie amphiphile Polymere^[86] als Bestandteil mehrfach beschichteter Tröpfchen in Emulsionen berichtet. Bei der Wahl des Emulgators sollten die Eignung für Lebensmittel und die Cytotoxizität berücksichtigt werden.

Nach dem Aufbringen einer Schicht des Detergents werden die emulgierten Tröpfchen ähnlich wie die festen Template mit mehreren Schichten überzogen. Priest et al. stellten ein kontinuierliches Strömungsverfahren vor, mit dem mehrere Schichten auf die Tröpfchen aufgebracht wurden. Dabei wurden Flüssigkristalltröpfchen einer Mikrofluid-Emulgierung unterworfen und im gleichen Gerät beschichtet (Abbildung 4).^[80] Anders als bei der herkömmlichen Mehrfachbeschichtung sind hier nicht zahlreiche Einzelschritte erforderlich. Bislang wurden emulgierte Tröpfchen vor allem beschichtet, um ihre Koaleszenz bei Veränderungen von Bedingungen wie pH-Wert, Ionenstärke oder Temperatur zu verhindern.^[87] Polyelektrolyt-Mehrfachschichten dienten auch als Barriere gegen die Diffusion von Fe^{2+} -Ionen, die die

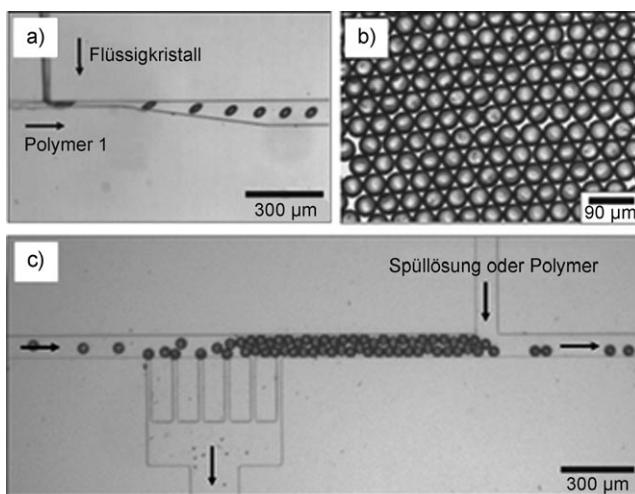


Abbildung 4. Kapselaufbau in einem Mikrofluidreaktor: a) Ermulgieren von Flüssigkristallen in einem T-Stück; b) hexagonal dichteste Packung der monodispersen, polymerbeschichteten Partikel vor dem Herauslösen des Flüssigkristallkerns mit Ethanol; c) selektives Abziehen der kontinuierlichen Phase durch die kammartig angeordneten Kanäle und anschließend Infusion der Spülösung oder des Polymers. Wegen des verringerten Volumenanteils der kontinuierlichen Phase zwischen der Absaugung und der Infusion liegen die Partikel hier dichtest gepackt vor.^[80]

Oxidation von Lipiden beschleunigen, in die Öltröpfchen.^[88] Kürzlich berichteten Caruso und Mitarbeiter über Emulsionen mit mehrfach mit Polymeren beschichteten Tröpfchen zur Verabreichung von Wirkstoffen. Mikroemulsionen mit abbaubaren, mehrfach beschichteten Tröpfchen, die mit lipophilen Tumortherapeutika beladen waren (Doxorubicin oder 5-Fluoruracil), verringerten die Lebensfähigkeit menschlicher Darmkrebszellen (LIM1215) in vitro deutlich.^[89]

3.3. Stimulierbare Freisetzung

Eines der Hauptziele bei der Forschung zu Wirkstoff-Transport und -freisetzung ist die Entwicklung eines Trägers, der seine Ladung selektiv auf ein Signal hin freisetzen kann (wobei dieses Signal von außen einwirken oder vom Zielgewebe selbst ausgehen kann). Über die Fähigkeit von PMLCs, auf Stimulanten zu reagieren, wurde bereits ausführlich berichtet.^[11,12,90] In diesem Abschnitt konzentrieren wir uns auf Ansätze, die so weit fortgeschritten sind, dass biomedizinische Anwendungen realisierbar werden.

Im Grunde können die meisten polymeren Mehrschichtkapseln als stimulierbar angesehen werden, denn wenn elektrostatische Wechselwirkungen die Schichten zusammenhalten, können Änderungen des pH-Werts oder der Ionenstärke diese Wechselwirkungen natürlich beeinflussen und so die Freisetzung der eingekapselten Stoffe induzieren.^[91] Diese Befunde sind auf durch Wasserstoffbrücken verbundene Kapseln ausgedehnt worden, die eine polyionische Komponente enthalten.^[31] Neben dem pH-Wert und der Ionenstärke^[55] beeinflussen auch die Lösungsmittelpolarität,^[60] Glucose,^[92,93] die Temperatur^[62] und Oxidationsreak-

tionen^[94] die Permeabilität der PMLC-Schichten. Alle diese Parameter sind jedoch nichtphysiologisch, was den Einsatz dieser Systeme *in vivo* weitgehend ausschließt. Daher konzentrieren sich die derzeitigen Forschungen auf die Entwicklung von Kapseln, die auf Stimulanten reagieren, die in biologischen Systemen auftreten können. Dazu zählen der enzymatische Verdau^[95–99] und die reduktive intrazelluläre Umgebung.^[33–36,100,101] Enzymatisch abbaubare PMLCs sind von mehreren Gruppen aus entgegengesetzt geladenen Polypeptiden und/oder Polysacchariden hergestellt worden. De Geest et al. bewiesen, dass PMLCs aus Dextransulfat und Poly-L-arginin nach der Phagozytose durch In-vitro-Zellkulturen intrazellulär von Proteasen abgebaut werden.^[96] Ähnliche Befunde wurden später von mehreren Arbeitsgruppen erhalten, die Hyaluronidase und Chitinase einsetzen, um Kapseln zu zersetzen, deren Hülle Hyaluronsäure bzw. Chitosan enthielten.^[97–99,102]

Auch der Wechsel von einer oxidativen in eine reduktive Umgebung wurde genutzt, um die Auflösung von Mehrschichtkapseln nach ihrer Aufnahme in Zellen auszulösen. Wie in Abschnitt 2.3 erwähnt können Disulfidgruppen als Vernetzer in biologischen Systemen reduktiv leicht zu Thiolen gespalten werden. Haynie und Mitarbeiter waren die ersten, die Mehrschichtkapseln durch Disulfidgruppen stabilisierten und entgegengesetzt geladene 32-mere Peptide synthetisierten, die Cysteinreste enthielten.^[100,101] Bei niedrigen pH-Werten können sich diese geladenen Peptide durch elektrostatische Wechselwirkungen zu PMLCs zusammenlagern, die sich bei einem physiologischen pH-Wert von 7.4 normalerweise zersetzen, wenn die Cystein- nicht zu Cystinresten oxidiert wurden. Die Caruso-Gruppe wendete diesen Ansatz auf wasserstoffverbrückte PMLCs an, indem sie Cysteaminreste in Polymethacrylsäure einführte. Auf Kieselgel-Ofertemplaten wurden dazu abwechselnd Schichten aus PVPPON und PMA^{SH} aufgebracht und die Thiolgruppen anschließend oxidativ vernetzt. Die Auflösung des Templaats mit HF lieferte dann die Kapseln,^[34–36,103] die sich *in vitro* reduktiv unter Bedingungen, die denen in Zellen ähnelten, zersetzen ließen. Die Autoren nutzten das gleiche Verfahren zum Einschluss von Oligonucleotiden, Peptiden und niedermolekularen Tumortherapeutika.^[104]

Außer durch physiologische Signale kann die Freisetzung aus PMLCs auch durch externe Stimulanten ausgelöst werden. Dies gelang vor allem durch das Einbetten von Metallnanopartikeln oder lichtempfindlichen Farbstoffen in die Kapselhülle.^[105] Mehrere Arbeitsgruppen berichteten über gesteuerte Freisetzungen a) aus Farbstoff-funktionalisierten Kapseln durch Bestrahlung mit Licht,^[106] b) aus Kapseln, deren Hülle Metallnanopartikel enthält, durch magnetische Felder,^[107] Mikrowellen^[108] oder Ultraschall^[109–111] und c) aus Kapseln, deren Hülle Edelmetalle (Silber, Gold) enthält, durch fokussierte Laserstrahlung.^[106,112–117] Besonders der letzte Ansatz wurde intensiv erforscht. Goldnanopartikel (Au^{NP}) weisen im sichtbaren Spektralbereich bei einer Wellenlänge von etwa 530 nm ein Oberflächenplasmonenresonanzsignal auf.^[114] Daher wird Au^{NP} lokal stark erhitzt, wenn Laserstrahlung dieser Wellenlänge auf die Nanopartikel trifft (Umwandlung von Photonen in thermische Energie). Bei in die Kapselhülle eingebetteten Goldnanopartikeln führt

dieses Erhitzen zum Aufreißen der Kapsel und zur Freisetzung des Inhalts. Interessanterweise kann das Oberflächenplasmonenresonanzsignal durch eine Veränderung der Form (d.h. des Seitenverhältnisses) und des Aggregationsgrads der Nanopartikel auf der Kapseloberfläche in den für biologische Systeme verträglicheren infraroten Spektralbereich mit Wellenlängen oberhalb von 800 nm verschoben werden.^[118] Bei einer präzisen Einstellung der Zusammensetzung der Kapselhülle kann diese sogar reversibel durch IR-Strahlung permeabel gemacht werden, sodass die Kapsel nicht zerstört und nur ein Teil des Inhalts freigesetzt wird.^[116] Die prinzipielle Eignung des Verfahrens mit Au^{NP} für die Verabreichung von Wirkstoffen in lebenden Zellen bewiesen Skirtach et al., indem sie zeigten, dass die Laserstrahlung die Lebensfähigkeit der Zellen nicht beeinträchtigte.^[115] Spätere Arbeiten ergaben, dass bei einem Aufbrechen der Kapselhülle auch die phagosomale Membran um die Kapseln riss und der Kapselinhalt ins Cytoplasma gelangte.^[119]

Auf eine dritte Gruppe von Kapseln, bei denen die Freisetzung ebenfalls initiiert werden kann, die selbstabbauenden Kapseln, werden wir nur kurz eingehen. Sie tragen den Signalgeber in sich, der die Freisetzung des Inhalts bewirken kann. Dies kann z.B. ein Verdauenzym sein, das zusätzlich in den Kapselhohlraum eingebracht wird^[95] und das entweder die Kapselhülle verdaut oder den Inhalt in kleinere Fragmente spaltet, die die Hülle durchdringen können. Eine andere Möglichkeit sind „selbstexplodierende“ Kapseln, die einen abbaubaren Mikrogelkern enthalten, dessen Volumen bei der Hydrolyse bei physiologischen pH-Werten zunimmt. Übersteigt der dadurch entstehende Druck die Reißfestigkeit der Kapselhülle, reißt diese auf, und der Inhalt wird freigesetzt.^[120–127] In Abbildung 5 sind Aufnahmen durch ein Konfokalmikroskop wiedergegeben, auf denen das Barsten einer Kapsel zu sehen ist, die fluoreszierende Latexkügelchen

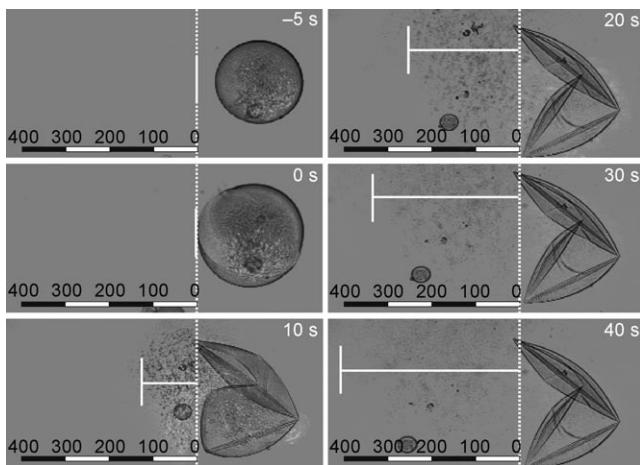


Abbildung 5. Aufnahmen des Abbaus des Kerns von (PSS/DAR)₂-beschichteten Mikrogelkapseln mit Natriumhydroxid mit einem Konfokalmikroskop zu den angegebenen Zeiten. Das Mikrogel enthielt fluoreszierende Latexkügelchen (Durchmesser 50 nm), und bei den Aufnahmen wurden der Fluoreszenz- und der Transmissionskanal überlagert. Die Mikrokapseln barsten 10 s nach dem Zusatz von Natriumhydroxid. Die Front der sich ausbreitenden Nanopartikel ist mit dem senkrechten weißen Strich markiert. Der Maßstabsbalken ist 400 µm lang.^[125]

enthielt. Die freigesetzten Latexkügelchen können innerhalb kurzer Zeit relativ große Strecken zurücklegen, wenn man als Vergleich die reine Brownsche Molekularbewegung heranzieht.^[125] Diese PMLCs sind komplexer als konventionelle Mehrschichtkapseln. Obwohl ihr Einsatz aussichtsreich ist, müssen die präzise Steuerung der Freisetzung und ihr Potenzial bei der Wirkstoffverabreichung noch genauer erforscht werden.

4. Wechselwirkungen mit lebenden Zellen und Geweben

4.1. In-vitro-Wechselwirkungen

4.1.1. Wechselwirkungen zwischen polymeren Mehrfachschichten und lebenden Zellen

Wechselwirkungen zwischen lebenden Zellen und planaren Mehrfachschichten werden derzeit im Hinblick auf zahlreiche biomedizinische Anwendungen untersucht. Da wir uns in diesem Aufsatz auf kolloidale Systeme beschränken, gehen wir auf sie nicht ein und verweisen interessierte Leser auf die exzellenten Übersichten in Lit. [26, 128].

Auch menschliche Erythrozyten sowie Pilz- und Bakterienzellen sind als Opfertemplate für PMLCs eingesetzt worden. Nach der LbL-Beschichtung wurden diese Template oxidativ entfernt.^[129–131] Für lebende Zellen, die in polymeren Mehrfachschichten eingekapselt sind, sind zahlreiche Anwendungen denkbar, z.B. zur Isolierung nichtautologer Zellen vom Immunsystem in der Transplantationsmedizin, bei der gezielten Verabreichung von Wirkstoffen und beim Züchten von Zellgewebe (Gewebe-Engineering). Für diese Applikationen ist eine präzise Steuerung der Porengröße der Kapseln, ihrer chemischen und mechanischen Stabilität und ihrer Biokompatibilität mit Wirtsgewebe und Transplantat höchst wichtig.^[132, 133] Diaspro et al. entdeckten die Fähigkeit von PSS/PAH-Mehrfachschichten, den Stoffwechsel von Zellen der Bierhefe *S. cerevisiae* aufrechtzuerhalten.^[134] Später beschichteten sie Langerhans-Inseln und schützten sie so vor der Erkennung durch Antikörper. Dies ist ein wichtiger Fortschritt bei der Abschirmung implantierter Zellen vor dem Immunsystem des Wirts.^[135] Wilson et al. gelang die Transplantation LbL-beschichteter Langerhans-Inseln, wobei sie als Beschichtungen PLL/PEG und Streptavidin einsetzten.^[136]

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben bereits über die Beschichtung lebender Zellen mit polymeren Mehrfachschichten berichtet. Kürzlich wurden auch unkonventionellere Varianten beschrieben. So wiesen Swiston et al. nach, dass man nicht nur die gesamten Zelloberfläche, sondern auch nur Teile davon beschichten kann, was zu „Mehrschichtplättchen“ führt (Abbildung 6A). Die Zelfunktionen und die Mobilität (an T-Zellen untersucht) wurden durch diese Plättchen nicht beeinträchtigt. Dieser Ansatz weist daher ein großes Potenzial für die Wirkstoffverabreichung oder für Sensoranwendungen auf, weil das normale Verhalten der Zellen genutzt werden kann.^[137] Auch Zellen selbst können Bestandteil von Mehrfachschichten sein. Fakhrullin und Paunov erhielten diese „Zellosomen“, indem sie anorganische Mikrokristalle mit Polyelektrolyten, magnetischen Nanopartikeln und Po-

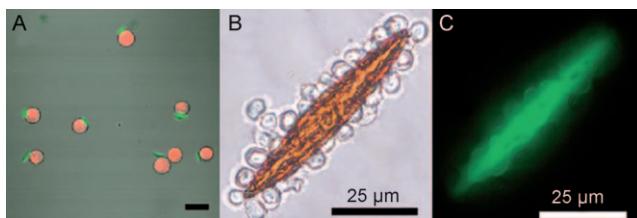


Abbildung 6. A) Rot fluoreszierende B-Zellen mit einem Mehrschichtplättchen (grün fluoreszierend).^[137] B, C) Aufnahme eines mit Fluoresceindiacetat gefärbten stäbchenförmigen Zellosoms mit einem optischen und mit einem Fluoreszenzmikroskop. Da diese Verbindung nur lebende Zellen anfärbt, belegt dies die Lebensfähigkeit der beschichteten Zellosomen.^[138]

lyelektrolyt-beschichteten Hefezellen beschichteten und anschließend das anorganische Templat auflösten.^[138] Mikroskopische Aufnahmen dieser Zellosome sind in Abbildung 6B und C wiedergegeben. Durch Weiterentwicklung könnten sie als Wirkstoffträger, biologische Mikroreaktoren oder Bausteine für das Gewebe-Engineering interessant werden.

4.1.2. Wechselwirkung zwischen polymeren Mehrschichtkapseln und lebenden Zellen

Einige Wirkstoffe sollen im Zellinnern wirken und werden schlecht aufgenommen, wenn sie in löslicher Form verabreicht werden, oder sie sind schlecht löslich. Generell ist es oft wünschenswert, dass Arzneimittel gezielt an bestimmten Stellen wirken, um den therapeutischen Nutzen zu vergrößern oder Nebenwirkungen zu vermeiden. Um das Potenzial von PMLCs als Wirkstoffträger einschätzen zu können, müssen ihre Wechselwirkungen mit lebenden Zellen bekannt sein. Einer der wichtigsten Parameter ist dabei die Toxizität. Mehrere Arbeitsgruppen haben diese Frage mit *In-vitro*-Tests auf Zellvitalität wie dem MTT-Test untersucht.^[139,140] Bei mäßigen Kapselkonzentrationen wurde im Allgemeinen keine akute Toxizität nachgewiesen, und durch eine polyanionische Außenhülle scheint die Toxizität weiter verringert zu werden (PMLCs mit kationischer Außenhülle heften sich leicht an Zelloberflächen).^[141] Bei höheren Konzentrationen wirken die Kapseln leicht giftig, was ihrer Sedimentation auf der Zelloberseite wegen der Konkurrenz zwischen Kapseln und Zellen um den verfügbaren Raum zugeschrieben wurde. Dies beeinträchtigt den Metabolismus der Zellen und damit ihre Lebensfähigkeit.^[139,142,143]

Phagocytierende Zellen wie die meisten Krebszellen und Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und dendritische Zellen können Mehrschichtkapseln aufnehmen. Dies wurde zuerst von Sukhorukov et al. für eine Brustkrebszelllinie nachgewiesen,^[8] und derzeit untersuchen mehrere Gruppen den Mechanismus der Kapselaufnahme.^[8,96,144,145] In vitro an Krebszelllinien erhaltene Befunde von De Geest et al. und der Parak-Gruppe deuten darauf hin, dass die PMLCs in saure intrazelluläre Vesikel gelangen. Dies wurde nach Einfärbung der Lysosomen mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff an der gelb-orangen Emission deutlich, die sich aus der Überlagerung mit der grünen Fluoreszenz der

Kapseln ergibt (Abbildung 7B).^[96,146] Kreft et al. lieferten eine weitere Bestätigung für diese Annahme, indem sie SNARF-Dextran, einen pH-empfindlichen Farbstoff, in

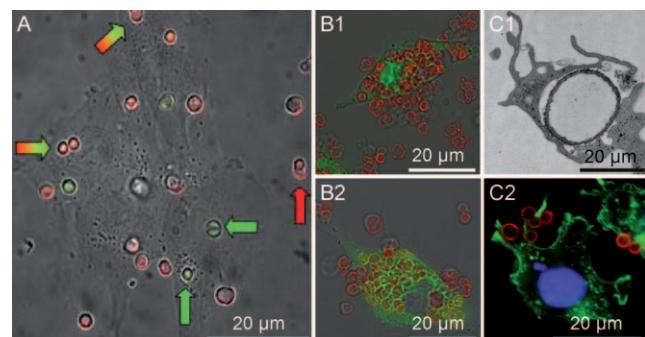


Abbildung 7. A) Aufnahmen von Brustkrebszellen (MDA-MB435S), die mit SNARF-Dextran-beladenen PMLCs inkubiert wurden, mit einem Konfokalmikroskop. Freie Kapseln fluoreszieren rot, aufgenommene grün (siehe Pfeile).^[148] B) Konfokalmikroskopische Aufnahmen dendritischer Zellen aus dem Knochenmark, die mit rot fluoreszierenden Mehrschichtkapseln inkubiert wurden. Dabei war entweder das Cytoplasma (B1) oder die Endo/Lysosomen (B2) grün fluoreszierend markiert. Die gleichzeitige Anwesenheit beider Fluoreszenzquellen lieferte eine gelb-orange Emission. C) Aufnahmen der Phagozytose von PMLCs durch Actin-reiche Ausstülpungen (grün fluoreszierend) mit einem Transmissionselektronen- (C1) und einem Konfokalmikroskop (C2).^[145]

PMLCs einkapselten (Abbildung 7A).^[147] Durch eine theoretische Analyse des Intensitätsverhältnisses der roten und grünen Emission wurde der pH-Wert in der Umgebung der Kapseln zu 5.2 bestimmt; dies entspricht dem Wert in Endo- oder Lysosomen. De Koker et al. inhibierten Endozytosepfade und die Polymerisation von Actin und untersuchten Ausstülpungen der Zellmembranen dann mit Konfokal- und Transmissionselektronenmikroskopie (Abbildung 7C). Aus den Resultaten schlossen sie auf eine Makropinozytose als Aufnahmemechanismus bei dendritischen Zellen des Knochenmarks.^[145]

Mehrere Arbeitsgruppen erforschten den weiteren Verlauf nach Aufnahme der Kapseln und stellten deutliche Verformungen fest, vermutlich wegen des Drucks des umgebenden Cytoplasmas.^[141,146] Durch den Einbau von Metallnanopartikeln, die bekanntlich die mechanische Belastbarkeit von LbL-Filmen erhöhen, wurden die Kapseln robuster gegen Deformationen.^[149] De Geest et al. setzten abbaubare Polyalaninen wie Poly-L-arginin und hydrolytisch leicht abbaubares Poly(HPMA-DMAE) ein, und diese Kapseln wurden in den Zellen zerstört und vollständig abgebaut.^[96] Bei der Co-inkubation von VERO-1-Krebszellen mit diesen PMLCs wurden die Kapseln von den Zellen aufgenommen und binnen 60 h nach und nach zersetzt; danach waren keine intakten Kapseln mehr nachweisbar.^[96] Ähnliche Befunde erhielten diese Autoren auch mit dendritischen Zellen des Knochenmarks, die mit PMLCs aus Dextransulfat/Poly-L-arginin inkubiert wurden.^[139,145]

Biotechnologisch hergestellte Wirkstoffe wie Proteine und Nucleinsäuren oder Tumortherapeutika sind häufig

gegen ein spezifisches Zielgewebe gerichtet, wirken in anderen Teilen des Körpers aber nur schwach oder sind, z.B. Chemotherapeutika, sogar gesundheitsschädlich. Eine Funktionalisierung der Kapseln mit biologischen Komponenten verbessert die Lenkung der Kapseln hin zum und ihre Aufnahme durch das Zielgewebe und schützt sie vor einer unerwünschten Resorption durch andere Gewebe.

An in den Körper eingedrungene Mikropartikel lagern sich rasch opsonisierende Proteine (Anlagerungsproteine) an, durch die die Partikel von Phagozyten erkannt und beseitigt werden. Um die Umlaufzeiten im Körper zu verlängern und eine Aufnahme durch das Zielgewebe zu erreichen, würde es daher helfen, die Proteinadsorption auf der Kapseloberfläche zu minimieren.^[150] Dies kann durch die Beschichtung von PMLCs mit einem die Adsorption erschwerenden „Stealth“-Polymer wie PEG erreicht werden. So führte die Beschichtung von PAH/PSS-Kapseln mit PLL-graft-PEG (graft: Ppropfen) zu einer drastisch verringerten Proteinadsorption. Dies wurde der Hydrophilie von PEG zugeschrieben, das in Wasser vollständig hydratisiert vorliegt, was eine Adsorption von Proteinen durch hydrophobe Wechselwirkungen wahrscheinlich verhindert. Ferner schirmt die dichte PEG-Bürtenschicht elektrostatische Ladungen ab und minimiert so elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Kapsel und Protein. Eine noch bessere Lenkungswirkung lässt sich durch den Einsatz von biotinyliertem PLL-graft-PEG erzielen. Diese biotinylierten Stealth-Kapseln adsorbierten 40 Mal so viel Streptavidin wie PMLCs ohne Biotin in der PLL-graft-PEG-Beschichtung.^[150] Wattendorf et al. untersuchten den Einfluss der PEGylierung der Kapseln auf deren Aufnahme in die Zellen. Kapseln aus (PAH/PSS)₄ und (PAH/PSS)₄PAH (4 = Zahl der Schichten) wurden mit PLL-graft-PEG oder PGA-graft-PEG beschichtet und anschließend mit Kulturen von Makrophagen oder dendritischen Zellen inkubiert. Die PGA-graft-PEG-Schicht beeinflusste die Aufnahme in die Zellen nicht, wahrscheinlich weil die PEG-Dichte nicht ausreichte. Dagegen führte die Beschichtung mit PLL-graft-PEG zu einer drastisch verringerten Aufnahme.^[151]

Eine Steuerung der Kapseln hin zu spezifischen Zielgeweben ist möglich, wenn die Kapseln mit monokonalen Antikörpern,^[152,153] Kohlenhydraten^[154–156] oder magnetischen Partikeln^[157] funktionalisiert werden. Cortez et al. berichteten über die Biofunktionalisierung von Kapseln aus PSS/PAH mit humanisierten monoklonalen Antikörpern A33 (huA33 mAb), die sich an das menschliche A33-Antigen binden, das von 95% der menschlichen Darmkrebszellen exprimiert wird. Diese funktionalisierten Kapseln werden von Krebszellen, die das Antigen A33 enthalten, viel besser aufgenommen als die nichtfunktionalisierten Kapseln.^[152,153] Kohlenhydrate werden häufig nur von spezifischen Geweben erkannt, daher werden sie oft als Liganden eingesetzt. So wird Galactose spezifisch von Asiaglycoprotein-Rezeptoren erkannt, die nur von Leberepithelzellen exprimiert werden. PMLCs, die auf der Oberfläche Galactosereste aufweisen, könnten daher besser an Hepatozyten binden. Zhang et al. berichteten über die Synthese eines galactosehaltigen Polymers, das mit PSS oder Hämoglobin als Polyanion zu einer PMLC kombiniert wurde.^[154,155] Diese Kapsel bindet stärker an das Lektin Erdnuss-Agglutinin als an das Lektin Concanav-

avalin A, was ihre Spezifität verdeutlicht. Über die In-vitro- oder In-vivo-Aufnahme von Mehrschichtkapseln durch Hepatozyten wurde bislang aber noch nicht berichtet.

Zebli et al. erforschten die magnetische Lenkung, indem sie PSS/PAH-Kapseln mit magnetischen Metallnanopartikeln funktionalisierten. Mit einem Strömungskanal, an dem lokal ein magnetisches Feld herrschte, wiesen die Autoren nach, dass diese Kapseln bevorzugt von Brustkrebszellen aufgenommen wurden, die in der Nähe des Magnetfelds wuchsen.^[157] Neben Antikörpern sind auch Viren zur Oberflächenmodifikation von PMLCs und damit zur Beeinflussung der Aufnahme in Zellen eingesetzt worden. Fischlechner et al. erhielten durch Lipidfusion virenhaltige Kapseln, indem sie lipidbeschichtete PMLCs mit Partikeln, die Rötelnviren ähnelten, oder mit Influenza-A/PR8-Viren funktionalisierten. Hauptziele der Vireneinführung sind eine bessere Bindung der Kapseln an die Zelloberfläche sowie die Induktion einer Endozytose und der anschließenden Fusion mit der Endosomenmembran. VERO-Zellen nahmen virusbeschichtete Kapseln besser auf als analoge virusfreie PMLCs.^[158–161] Mögliche Anwendungen für virusfunktionalisierte Partikel sind die Diagnostik, Impfungen und die Gentherapie. Beispielsweise berichteten Toellner et al. über ein Assay aus kleinen Kugelchen, die aus virushaltigen Kapseln bestehen und sich zum gleichzeitigen Nachweis mehrerer viraler Antikörper in Seren eignen.^[162]

4.2. In-vivo-Wechselwirkungen

Wegen ihrer hohen Ladung können Mikrokapseln aus Polyelektrolyten bei der Applikation in vivo erhebliche Gewebereaktionen hervorrufen. De Koker et al. untersuchten die Gewebereaktionen nach der subkutanen Injektion von Mikrokapseln aus Dextransulfat/Poly-L-arginin-Doppelschichten an Mäusen. Die Injektionen führten zu einer schnellen entzündungsfördernden Reaktion, die durch die Aktivierung von polymorphonukleären Zellen und Monozyten charakterisiert war.^[159] Die Mikrokapseln verhielten sich dabei wie ein poröses Implantat, dessen Infiltration am Rand des Injektionsgebiets begann und zum Zentrum hin fortschritt (siehe die konfokalmikroskopischen Aufnahmen von Gewebeschnitten in Abbildung 8). Dabei ersetzten mononukleäre Phagozyten nach und nach die polymorphonukleären Zellen. Die Entzündung blieb auf die Injektionsstelle beschränkt, um die sich schnell mehrere Lagen Fibroblasten bildeten. Das Gewebe wurde aber nicht zerstört, und es bildete sich auch kein Geschwür. Polyelektrolyt-Mikrokapseln scheinen ähnlich starke Entzündungen hervorzurufen wie andere Mikropartikel mit der gleichen Größe, z.B. das gut untersuchte und von der amerikanischen Food and Drug Administration zugelassene Milchsäure/Glycolsäure-Copolymerisat. Die Autoren untersuchten auch den In-vivo-Verbleib von Mikrokapseln, die mit RITC-Poly-L-arginin markiert waren und subkutan injiziert wurden. Die Kapseln wurden von Phagozyten aufgenommen, verformt und anschließend abgebaut, wobei Kapseln mit einer dickeren Hülle (und einer größeren Zahl an Schichten) widerstandsfähiger waren. Insgesamt lassen diese Befunde erkennen, dass Poly-

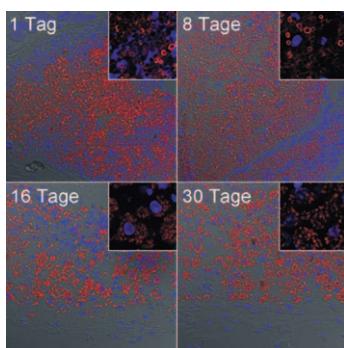


Abbildung 8. Bilder von Gewebeschnitten, die zu unterschiedlichen Zeiten nach der subkutanen Injektion von $(\text{Dextransulfat}/\text{Poly-L-arginin})_4$ -Kapseln mit einem Konfokalmikroskop aufgenommen wurden. Die Kapselhülle wurde mit Rhodamin eingefärbt (rote Fluoreszenz), die Zellkerne mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; blaue Fluoreszenz). Die Ausschnitte oben rechts geben Aufnahme und Abbau der Kapseln vergrößert wieder.^[139]

elektrolyt-Mikrokapseln *in vivo* einsetzbar sind. Wegen des engen Zusammenhangs zwischen Entzündungen und der Induktion einer Immunantwort und der Fähigkeit der Kapseln, Phagozyten anzugreifen, könnten sich Polyelektrolyt-Mikrokapseln zur Verabreichung von Antigenen eignen (siehe Abschnitt 5.3).

5. Wirkstoffverabreichung

5.1. Niedermolekulare Wirkstoffe

Unter den Wirkstoffen sind die meisten niedermolekular, und diese zählen zu den ersten Substraten, die in PMLCs eingeschlossen wurden. Da LbL-Beschichtungen gewöhnlich in wässriger Lösung aufgebracht werden, müssen wasserlösliche Wirkstoffe zuvor in eine nichtlösliche Form gebracht werden. Dies gelingt z. B. durch Änderung des pH-Werts. Auf diese Weise wurden mikrokristalline Wirkstoffe wie Aciclovir, Ibuprofen, Dexamethason, Ketoprofen, Biotin, Indometacin, Furosemid und Vitamin K₃ eingekapselt. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Auflösung der eingekapselten Mikrokristalle durch adsorbierte Polyelektrolyte verzögern kann, sodass die Wirkstoffe langsamer freigesetzt werden.^[156,163-168] Ungeladene, in Wasser unlösliche Wirkstoffe wurden ebenfalls eingekapselt, und zwar indem auf die Wirkstoffkristalle mit einem ionischen Detergens zunächst Oberflächenladungen und anschließend Polyelektrolytschichten aufgebracht wurden.^[169] Ferner wurden Wirkstoffe auch in organischen Lösungsmitteln ausgefällt und anschließend mit Polyelektrolyten LbL-beschichtet, die in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Beyer et al. nutzten dieses Umkehrphasen-LbL-Verfahren zur Einkapselung von Glucose und Vitamin C. Mit einem optischen Mikroskop aufgenommene Bilder des Einschlusses in und der Freisetzung aus diesen Mikrokapseln sind in Abbildung 9 wiedergegeben.^[170] Die gleiche Forschungsgruppe setzte auch Hydrogelkügelchen ein, die mit wasserlöslichen Stoffen beladen waren, und stabilisierte die Kugelchen dann durch die Adsorption von

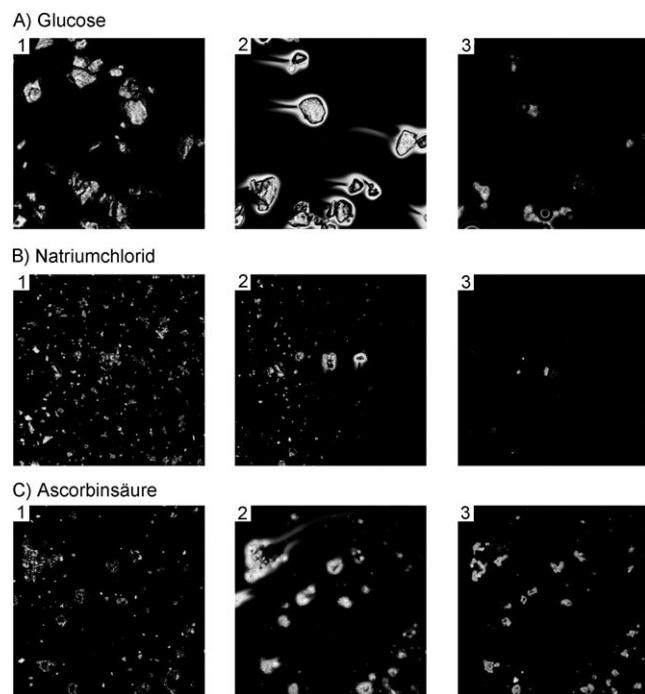


Abbildung 9. Mikroskopische Aufnahmen des Umkehrphasen-LbL-Einschlusses von A) Glucose, B) Natriumchlorid und C) Ascorbinsäure. Die Aufnahmen zeigen mit dem Umkehrphasen-LbL-Verfahren eingekapselte Kristalle in Ethanol 1) vor und 2) nach der Zugabe von Wasser sowie 3) die leeren Kapseln nach vollständiger Freisetzung des Inhalts.^[170]

Kolloiden und eine Umkehrphasen-LbL-Beschichtung. Mit diesem Ansatz wird die vorzeitige Freisetzung der eingekapselten Stoffe vermieden, und die Einschlusseffizienz beträgt nahezu 100%.^[171] Auch über den passiven Einschluss von Wirkstoffen durch elektrostatische Wechselwirkungen und den Einsatz von Micellen, die hydrophobe Stoffe enthielten, als Hüllbestandteil wurde berichtet.^[172,173]

Radtchenko et al. schlugen einen Ansatz zur aktiven Post-Beladung vor, der die unterschiedliche Löslichkeit schlecht wasserlöslicher Wirkstoffe im Kapselinnern und in der Lösung nutzt, d. h. die Tatsache, dass Wirkstoffe in der Kapsel ausgefällt werden können.^[174] Dazu wurde ein sehr hydrophiles Polymer in den Kapseln eingeschlossen, was zur Bildung eines Polaritätsgradienten zwischen dem Kapselinnern und einer Wasser/Aceton-Lösung führte. Wirkstoffe, die in diesem Gemisch löslich sind, gelangen in den Kapseln in eine wasserreichere Umgebung und fallen aus. Dieser Vorgang setzt sich fort, bis der Kapselhohlraum mit dem Niederschlag ausgefüllt ist. Moleküldynamiksimulationen und Kristallstrukturuntersuchungen ergaben einen amorphen Zustand des Wirkstoffs in der Kapsel, während er suspendiert in Wasser meist kristallin vorliegt. Der amorphe Zustand könnte eine Freisetzung des Wirkstoffs unter physiologischen Bedingungen begünstigen.^[175]

Die Befunde mehrerer Arbeitsgruppen lassen vermuten, dass sich wasserlösliche Stoffe nur schwer in PMLCs mit Hüllen aus gut wasserlöslichen Polyelektrolyten einschließen lassen werden. Kapselhüllen aus Polyelektrolyten weisen

immer kleine Poren auf, die für kleine Moleküle durchlässig sind. Diese Einschränkung könnte sich durch den Einsatz hydrophoberer Kapselbestandteile oder durch eine Erhöhung der Hydrophobie der Hülle nach Herstellung der Kapseln umgehen lassen. In der Tat gelang dies durch Verwendung eines Fluoropolymers als Hüllbestandteil. Die erhaltenen Kapseln waren nach einer Verdichtung der Hülle durch thermisches Schrumpfen undurchlässig für niedermolekulare hydrophile Verbindungen.^[62] Ein ähnlicher Effekt stellt sich bei der Beschichtung der Kapseloberfläche mit einer Lipiddoppelschicht ein.^[176] Andreeva et al. modifizierten die Hülle chemisch durch die Knüpfung von Imidbindungen zwischen den Polyelektrolytschichten.^[177] In all diesen Fällen ist eine Wirkstofffreisetzung nur durch mechanische Zerstörung der Kapseln möglich.

Tumorthapeutika sind eine wichtige Klasse niedermolekularer Wirkstoffe. Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Daunorubicin, 5-Fluoruracil oder Polyphenole wurden in PMLCs eingekapselt.^[143,178-181] Wie sich bei In-vitro-Untersuchungen an den Krebszelllinien H460, A549 und HepG2 herausstellte, ist die Aktivität von Doxorubicin und Daunorubicin sogar erhöht, wenn sie eingekapselt sind. In einem Heterotransplantat-Experiment mit Mäusen verringerte eingekapseltes Doxorubicin wirksam die Größe des Tumors.^[180,182] Zur Einkapselung dieser Wirkstoffe werden häufig elektrostatische Wechselwirkungen genutzt, es wurde aber auch über andere Einschlussverfahren wie das Emulsionsverfahren oder die hydrophobe Assoziation berichtet.^[89,181] Sivakumar et al. setzten das Emulsionsverfahren zum Einschluss ein und wiesen die Giftigkeit von eingekapseltem Doxorubicin und 5-Fluoruracil für menschliche LIM-1215-Darmkrebszellen nach.^[89] Hypocrellin B wurde von Wang et al. über einen Austausch von Ethanol, in dem der Wirkstoff löslich ist, in PMLCs eingekapselt. Wurden menschliche Brustkrebszellen (MCF-7) mit Hypocrellin B inkubiert und gleichzeitig eine Lichttherapie durchgeführt, verringerte sich die Lebensfähigkeit der Zellen.^[144] In all diesen Verfahren wird der Wirkstoff selbst eingekapselt, alternativ ist aber auch der Einschluss von Chemotherapeutikavorstufen möglich. So berichteten Wang et al. und Schneider et al. über die Einkapselung einer Doxorubicin-Vorstufe in Mehrschichtkapseln, aus denen der aktive Wirkstoff nach enzymatischer Spaltung und Endozytose freigesetzt wurde.^[104,183]

5.2. Proteine

Der Einsatz von Proteinen als Therapeutika ist aussichtsreich, und sie werden daher zunehmend häufiger im Hinblick auf die Behandlung von und die Vorbeugung von entzündlichen und Stoffwechselerkrankungen untersucht. Meist werden sie injiziert, da ihre Bioverfügbarkeit bei einer Verabreichung auf anderen Wegen häufig gering ist. Allerdings ist die Stabilität der meisten Proteine begrenzt, wenn sie in vivo appliziert werden, und häufig sind mehrere Injektionen erforderlich. In vielen Fällen kann eine Mikroverkapselung hilfreich sein, wenn dadurch eine höhere Stabilität oder bessere Steuerung der Proteine erzielt wird. Zudem könnten

proteinhaltige Mikrokapseln auch als Depot eingesetzt werden, aus dem der Inhalt erst nach einer bestimmten Zeit oder auf ein spezifisches Signal hin freigesetzt wird.

Bei der Einkapselung von Proteinen in PMLCs müssen mehrere Randbedingungen erfüllt sein. So sollte der Einschlussvorgang die biologische Aktivität des Proteins nicht beeinflussen.^[184] Zahlreiche Enzyme wie Katalasen, Peroxidasen, α -Chymotrypsin, Ureasen und Glucose-Oxidasen sind in Mehrschichtkapseln eingeschlossen worden. Dieser Einschluss gelang entweder spontan bei PMLCs mit einem MF-Templat oder durch Diffusion in poröse Kieselgel- oder Calciumcarbonat-Templatkerne. Die biologische Aktivität aller dieser Wirkstoffe blieb weitgehend erhalten, und da die Enzyme den Hohlraum nicht verlassen können, könnten sich die Kapseln somit auch als Mikroreaktoren eignen.^[15,16,60,185-189] Zheng et al. untersuchten die biologische Aktivität von in PMLCs eingeschlossenem Insulin an Ratten. Dazu wurden Insulin-Mikropartikel mit Fe^{3+} , Dextransulfat und Protamin belegt; die Glucosetoleranz nahm dabei von 2 auf 12 h zu, und das Glucosesenkungsprofil war verbreitert und stabil.^[190]

Cytokine sind als Mediatoren bei Entzündungen wichtig, und bei der Gewebebildung steuern sie zahlreiche zelluläre Prozesse wie die Angiogenese, die Vermehrung und die Differenzierung. Wegen der schnellen Diffusion und kurzen Halbwertszeit von Cytokinen ist eine gesteuerte Freisetzung für sie besonders vorteilhaft, denn sie erreichen ihr Zielgewebe dann eher intakt und in hinreichender Konzentration. Akashi und Mitarbeiter setzten als Erste Mehrschichtkapseln als Träger für Cytokine ein. Biologisch abbaubare PMLCs aus Dextransulfat und Chitosan wurden durch die pH-gesteuerte Änderung der Kapselpermeabilität mit dem Fibroblastenwachstumsfaktor FGF-2 beladen. In physiologischer Umgebung bewirken Salze eine kontrollierte Freisetzung des Wachstumsfaktors. FGF-2-haltige Mehrschichtkapseln verlängerten den Vermehrungszeitraum von L929-Fibroblasten von 4 Tagen (bei löslichem FGF-2) auf 15 Tage.^[98]

5.3. Verabreichung von Impfstoffen

Impfungen haben die Häufigkeit von Infektionskrankheiten enorm reduziert, gegen viele gefährliche Pathogene wie HIV, Malaria und *Mycobacterium tuberculosis* gibt es aber noch keine wirksamen Impfserien. Um diese Krankheitserreger erfolgreich bekämpfen zu können, werden Impfstoffe benötigt, die das gesamte Abwehrarsenal des Immunsystems aktivieren. Dazu gehört neben der Antwort von CD4-T-Helferzellen auch die Bildung cytotoxischer T-Lymphozyten (CTLs), die infizierte Zellen erkennen und abtöten können.^[191] Die CTLs können nur auf Infektionen reagieren, wenn die entsprechenden Antigene zuvor von dendritischen Zellen verarbeitet und in der Spalte des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klasse I präsentiert werden.^[192] Dies ist mit rekombinanten löslichen Antigenen kaum möglich,^[193] denn im Allgemeinen erfordert diese Präsentation eine proteasomale Verarbeitung cytosolischer Antigene, während exogene Antigene typischerweise von lysosomalen Proteasen verarbeitet und anschließend auf MHC-Klasse-II-

Moleküle transferiert werden, was eine Aktivierung der CD4-T-Helferzellen ermöglicht. Dagegen können Antigene aus ganzen Bakterien und Viren den CD4- und CD8-T-Helferzellen durch dendritische Zellen gut präsentiert werden, was eine viel umfangreichere Immunantwort hervorruft. Durch den Einschluss von Antigenen in synthetische Polymerteilchen mit einer Größe von 0.1–10 µm kann die größere Ausdehnung der Pathogene nachgeahmt werden. Diese Partikel werden durch dendritische Zellen besser erfasst, und damit werden die Antigene den CD4- und CD8-T-Helferzellen wirksamer präsentiert. Gegenwärtig wird die Einschleusung von Antigenen mit Poly(lactid-co-glycolid)-Kügelchen und Gelpartikeln erforscht; eine klinische Anwendung ist aber wegen mehrerer Probleme, wie einer niedrigen Antigenbeladung, einer Zerstörung der Antigene durch das verwendete organische Lösungsmittel und drastischer Reaktionsbedingungen, nahezu unmöglich.^[194–198]

LbL-Mikrokapseln schließen Proteine unter nichtdenaturierenden Bedingungen effizient ein und könnten sich deswegen als Vehikel für Antigene eignen. Mehrschichtkapseln aus den Polyelektrolyten Dextransulfat und Poly-L-arginin werden glatt von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen aufgenommen und sind dabei nicht stark toxisch.^[139] Dieser Ansatz wurde von De Rose et al. auf andere PMLCs ausgedehnt, die von menschlichen Antigen präsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen wurden. In vitro wurden Peptide und Proteinantigene mit PMLCs in dendritische Zellen eingeschleust. De Rose et al. stellten aus thiolsubstituierter Polymethacrylsäure (PMA^{SH}) Mehrschichtkapseln her, die in biologischen Systemen gespalten werden. Diese wurden mit einem MHC-Klasse-I-restrin-gierten Peptidepitop des SIV-gag-Proteins (SIV: Immundefizienzvirus von Affen) verknüpft, das von Makaken-APCs präsentiert werden sollte.^[199,200] Die PMA^{SH}-Mikrokapseln werden bei physiologischen pH-Werten durch Disulfidbrücken stabilisiert, die nach der Aufnahme durch die reduktiv wirkende Umgebung gespalten werden, was zum Zerfall der Kapseln führt. Die Autoren funktionalisierten das Peptid N-terminal mit Cystein und konnten es dann über eine Disulfidbindung mit der Kapsel verknüpfen. Nach der Aufnahme der Kapseln durch APCs im Blut wurde das Peptid effizient freigesetzt und peptidspezifischen CD8-T-Helferzellen präsentiert, die dadurch aktiviert wurden.

Kürzlich ist auch der Einschluss von Proteinantigenen in LbL-Kapseln im Hinblick auf die Präsentation von Antigenen durch dendritische Zellen untersucht worden.^[201] Proteinantigene weisen gegenüber Peptiden einige Vorteile auf. Zum einen induzieren Proteinantigene viel effektiver eine Antikörperreaktion. Zum anderen enthalten sie häufig Epitope sowohl für eine MHC-Klasse-I- als auch für eine MHC-Klasse-II-Präsentation von Antigenen; damit kann eine umfassendere Immunantwort induziert werden.

Die Autoren kapselten Ovalbumin (OVA) als Modellantigen in Dextransulfat/Poly-L-arginin-Mikrokapseln ein. Nach der Aufnahme durch dendritische Zellen wurden die Kapseln glatt proteolytisch abgebaut (Abbildung 10A,B)^[202] und die Antigene den CD4- und CD8-T-Helferzellen viel deutlicher präsentiert als lösliches OVA (Abbildung 10C).^[145]

Ihr wahres Potenzial als Vehikel für Antigene sollten Mehrschichtkapseln aber in In-vivo-Untersuchungen zeigen. Bekanntlich werden nach subkutaner Injektion Dextransulfat/Poly-L-arginin-Mikrokapseln von Phagozyten aufgenommen und abgebaut und sollten sich daher als Vehikel für Antigene eignen.^[139] Ob diese Mikrokapseln auch in vivo dendritische Zellen ansteuern und eine T-Zellen-Antwort auslösen können, wird zur Zeit noch untersucht. Selina et al. immunisierten kürzlich Mäuse mit einer Reihe von PMLCs, die Plasmid-DNA enthielten, die für das Epitop E2 des Erregers der klassischen Schweinepest kodiert. Die T-Zellen-Antwort wurde zwar nicht untersucht, die Antikörpertiter schienen aber im Vergleich zur Immunisierung mit bloßer Plasmid-DNA erhöht. Dies deutet auf Vorteile von Mehrschichtkapseln auch bei der Immunisierung mit DNA hin.^[203] Ein weiterer Vorteil der Kapseln als Antigenvehikel ist schließlich die enorme Vielseitigkeit des LbL-Verfahrens:

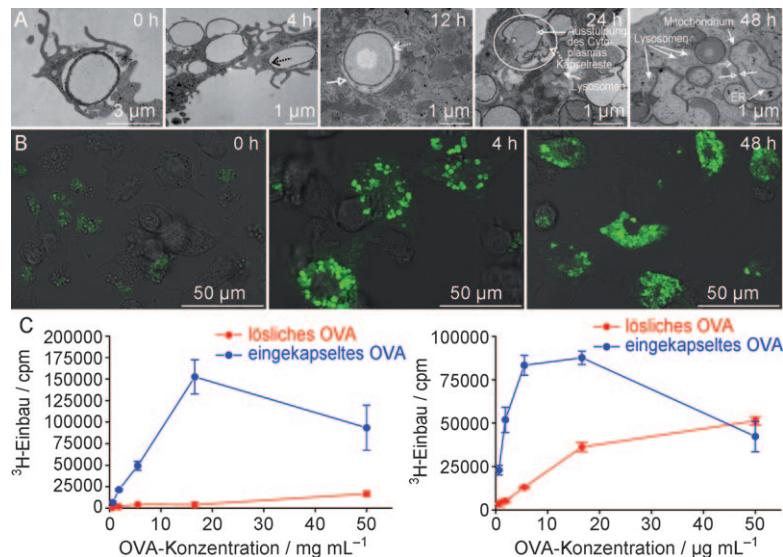


Abbildung 10. A) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von dendritischen Zellen des Knochenmarks, die Dextransulfat/Poly-L-arginin-Mikrokapseln aufgenommen haben, nach den angegebenen Zeiten. Punktige Pfeile markieren die Hülle von Mikrokapseln, nicht ausgefüllte Pfeilspitzen die Membranen um die Mikrokapseln. Im eingezirkelten Kreis (nach 24 h) lassen sich die geborstene Mikrokapsel und die Ausstülpung des Cytoplasmas in den Kapselhohlraum erkennen. Lysosomen, endoplasmatisches Reticulum (ER) und ein Mitochondrium sind durch durchgezogene Pfeile gekennzeichnet. B) Verfolgung des Abbaus von Dextransulfat/Poly-L-arginin-Mikrokapseln, die DQ-OVA enthalten (DQ-OVA ist ein Ovalbumin, das mit BODIPY-Farbstoffen übersättigt ist; BODIPY steht für Borat-Dipyrromethin), in dendritischen Zellen des Knochenmarks mit einem Konfokalmikroskop unter Überlagerung von grüner Fluoreszenz und Differentialinterferenzkontrast. Die Fluoreszenz des Farbstoffs wird gelöscht, solange DQ-OVA eingekapselt ist. Erst nach Proteolyse der Kapselhülle wird sie nicht mehr unterdrückt und somit in den Aufnahmen sichtbar. C) Vergleich der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen des Knochenmarks nach Aufnahme von löslichem und von eingekapseltem OVA. Die Vermehrung der Zellen von OT-I-Mäusen wurde als Maß für die MHC-Klasse-I-vermittelte Kreuzpräsentation von OVA genommen (links), die Vermehrung der Zellen von OT-II-Mäusen als Maß für die MHC-Klasse-II-vermittelte Präsentation (rechts).^[145]

Die Oberfläche der Kapseln kann in nahezu beliebiger Weise funktionalisiert werden. So könnten die Kapseln mit Antikörpern verknüpft werden, die spezifische Ziele ansteuern, oder sie könnten dendritische Zellen besser aktivieren, indem sie mit Immunverstärkern wie synthetischen Agonisten der Signaltransduktions-vermittelnden Mustererkennungsrezeptoren (Toll-aktigen Rezeptoren) beschichtet werden.

5.4. Nucleinsäuren

Nucleinsäuren gelten als aussichtsreiche Wirkstoffe für Therapien, mit denen Erbkrankheiten und Krebs geheilt werden könnten.^[204] Der Einsatz von Plasmid-DNA und siRNA (small interfering RNA) in der Gentherapie wurde zuerst untersucht. Um defekte Gene ersetzen oder unterdrücken zu können, müssen die Nucleinsäuren intakt in die Zielzellen (die DNA in den Kern und die siRNA in das Cytoplasma) gelangen. Werden Nucleinsäuren ungeschützt verabreicht, werden sie aber enzymatisch abgebaut und kaum von den Zellen aufgenommen. Die Einbettung der Nucleinsäuren in Partikel ist daher der Schlüssel zur Gentherapie.^[205]

DNA ist polyanionisch und daher in LbL-Verfahren von Anfang an als Bestandteil von Mehrfachschichten eingesetzt worden, die elektrostatisch zusammengehalten werden.^[207] Schüler und Caruso stellten PMLCs her, deren Hülle teilweise aus Komplexen aus DNA und Spermidin bestanden.^[208] Salzlösungen mit physiologischen Konzentrationen destabilisierten diese Kapseln. Dies ermöglicht die Freisetzung des Inhalts, begrenzt aber auch die praktische Anwendbarkeit. Shchukin et al. stabilisierten DNA/Spermidin-beschichtete Kolloide mit weiteren Polyelektrolytschichten und erhielten nach Auflösung des Kerns und Destabilisierung des DNA/Spermidin-Komplexes Kapseln mit freier DNA im Hohlräum.^[209] Die Möhwald-Gruppe setzte menschliche Erythrozyten als Templat ein und berichtete über ein einfaches Verfahren zur Beladung der Kapseln mit DNA. Dabei wurde als Zwischenschritt eine Trocknung vorgenommen, durch die sich eine größere Menge DNA in den Kapseln zu akkumulieren scheint.^[131] Die gleiche Arbeitsgruppe beschrieb die Freisetzung der DNA durch den Coeinschluss von Enzymen, die die Kapselhülle abbauen.^[95] Donath und Mitarbeiter bauten Plasmid-DNA, die für das verstärkt grün fluoreszierende Protein (eGFP) oder das rot fluoreszierende Protein aus einer *Discosoma*-Spezies (dsRED) kodiert, in Mehrfachschichten aus Dextransulfat und Protamin ein.^[210] Die PMLCs transfizierten Zellen, die die Kapseln aufgenommen hatten; damit gelang hier erstmals der Transport funktionaler DNA mit Mehrschichtkapseln in Zellen. Ferner können auch DNA-Nanopartikel mit Polyelektrolyten beschichtet werden, um ihre Transfektion zu erleichtern.^[211] Diese Systeme scheinen nach derzeitigem Kenntnisstand für die parenterale Verabreichung konzipiert zu sein. Doch kürzlich berichteten Aouadi et al. über die erfolgreiche orale Verabreichung von siRNA-beladenen modifizierten Hefezellen an Mäuse. Dies könnte ein Durchbruch bei der oralen Applikation von PMLCs sein.^[212]

Die Caruso-Gruppe hat intensiv an der Herstellung von Mehrschichtkapseln aus kurzen DNA-Stücken und Oligonu-

cleotiden gearbeitet;^[206] dabei wurden zwei Strategien verfolgt: Zum einen wurden mesoporöse Kieselgelmikropartikel mit Aminogruppen funktionalisiert, um die Diffusion von Oligonucleotiden in die Kieselgelporen und ihren Verbleib dort durch elektrostatische Wechselwirkungen zu begünstigen.^[34,103] Nach dem Aufbringen mehrerer PMA^{SH}/PVPPON-Schichten, dem Knüpfen von Disulfidbindungen und dem Auflösen des Kieselgelemplats wurden hohle Kapseln erhalten, in denen Oligonucleotide eingelagert werden können (Abbildung 11 A–D). Dieser Ansatz eröffnet vielfältige Möglichkeiten, denn die Kapseln zersetzen sich in reduktiver Umgebung unter Spaltung der Disulfidbindung, und die Nucleotide könnten durch eine getriggerte enzymatische Reaktion freigesetzt werden, wenn DNase I mit in den Kapseln eingeschlossen und durch Ca²⁺- oder Mg²⁺-Ionen aktiviert wird.^[213] In der gleichen Gruppe wurden auch DNA-beladene PMLCs als Biosensoren getestet, wobei die verwendete einsträngige DNA (ssDNA) nur in Gegenwart spezifischer DNA-Sequenzen fluoreszierend wurde, also als „molekulares Leuchtfeuer“ fungierte.^[214] Dieses Verfahren könnte z.B. zum Hochdurchsatz-Screening genutzt werden, bei dem Mehrschichtkapseln mit unterschiedlicher ssDNA durchflusscytometrisch analysiert werden.

Ein zweites von der Caruso-Gruppe eingeführtes Verfahren ist die Verwendung von DNA als „programmierbarem Baustein“.^[215] Durch Nutzen der gezielten Basenpaarbildung wurden Diblock-Oligonucleotide zu Filmen aus Mehrfach-

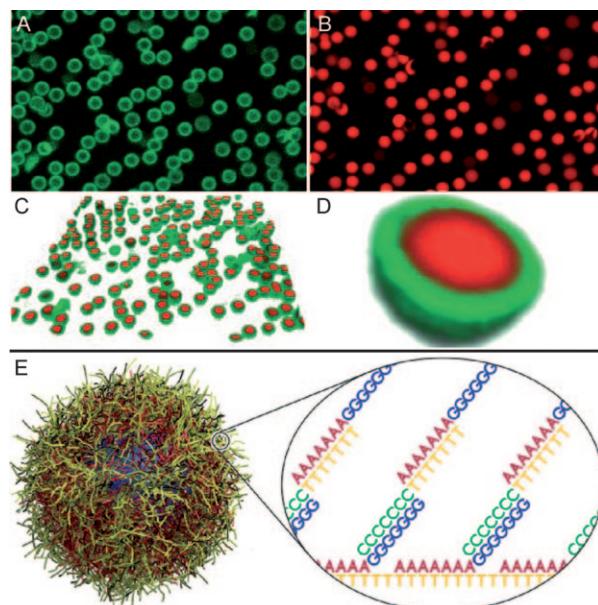


Abbildung 11. Aufnahmen von 16-Schicht-PMA^{SH}/PVPPON-Kapseln, die Poly(T₁₅C₁₅) enthielten, mit einem Laser-Konfokalrastermikroskop (T: Thymin, C: Cytosin). A) Fluoreszenz der Kapselhüllen, deren PMA^{SH}-Komponente mit dem Farbstoff AF488 markiert war, und B) Fluoreszenz des Kapselinhals TAMRA-Poly(T₁₅C₁₅). C, D) Dreidimensionale Ansicht aufgeschnittener Kapseln (rekonstruiert aus den CLSM-Daten). Die Bilder in (A)–(C) sind 30 µm breit, die Kapsel in (D) ist 1.5 µm groß. E) Schematische Darstellung einer idealisierten Orientierung von Oligonucleotiden, die aus homopolymeren Blöcken sich wiederholender Nucleotide (Poly(TC) und Poly(AG)) in DNA-Kapseln entstanden sind. Zusätzlich ist eine Primer-Schicht aus PolyT gezeigt.^[34,206]

schichten hybridisiert (schematische Darstellung in Abbildung 11E). Dafür müssen die Oligonucleotide einen Block (z.B. aus PolyA) enthalten, der komplementär zur darunterliegenden Schicht ist (das wäre bei PolyA der Block PolyT). Beide Blöcke hybridisieren dann durch Wasserstoffbrückenbindungen und π - π -Stapelung ihrer Basen-Arenringe. Der zweite Block (z.B. PolyG) sollte dann mit einem Block (das wäre PolyC) des nächsten Diblock-Oligonucleotids (z.B. Poly(CT)) hybridisieren können. Durch diese Hybridisierung von Basenpaaren lässt sich der Aufbau der Mehrfachschichten und durch eine geeignete Wahl der Oligonucleotid-Blöcke die Struktur der Kapselhülle steuern.^[216] So wurde das Schrumpfen der Kapseln beim Auflösen des Templatkerns durch die Zusammensetzung der Oligonucleotid-Diblocke gezielt beeinflusst. Dabei wurde genutzt, dass DNA gerichtet ist und beim Aufbau eine Doppelhelix bildet.^[217] Durch kontrolliertes Schrumpfen könnten die Kapselfeigenschaften verändert und die Konzentration der eingeschlossenen Verbindungen erhöht werden. Wegen der Abstoßung zwischen den anionischen Basenpaaren destabilisieren niedrige Salzkonzentrationen die Kapseln, da die negativen Ladungen der Nucleotide dann nicht mehr abgeschirmt werden. Dies ließ sich durch die Verwendung von Triblock-Oligonucleotiden verhindern, die die Schichten stärker vernetzen und die Kapseln unter physiologischen Bedingungen einsetzbar machen.^[218] Schließlich ließen sich durch den Einbau von Schnittstellen für Restriktionsenzyme in die Schichten die Kapseln gezielt destabilisieren und damit auch die Freisetzung des Inhalts steuern.^[219] *EcoRI* ist ein solches Restriktionsenzym, und es spaltet spezifisch 5'-G | ATTC-3'-Sequenzen. Mit obigem Verfahren wurden aus Triblock-Oligonucleotiden PMLCs hergestellt, die im mittleren Block die Sequenz 5'-G | 3'-ATTC aufweisen. Bei Zusatz von *EcoRI* begannen die Kapseln zu schrumpfen, und der eingekapselte Wirkstoff Rinderserumalbumin wurde freigesetzt. Dieses Konzept ist sehr elegant und das erhaltene System gut steuerbar. Da die Produktionskosten für diese Kapseln relativ hoch sind, wird allerdings eine Kosteneffizienz nicht leicht zu erreichen sein. Für bestimmte Nischenanwendungen könnte dieses System aber in Frage kommen.

6. Schlussbemerkungen

Wir haben hier versucht, einen Überblick über aktuelle Entwicklungen beim Einsatz polymerer Mehrschichtkapseln (PMLCs) zur Verabreichung medizinischer Wirkstoffe zu geben. Im ersten Abschnitt sind wir auf unterschiedliche Ansätze zur Synthese von PMLCs eingegangen. Zunächst wurden Mehrschichtkapseln aus synthetischen, nicht abbau-baren Polyelektrolyten hergestellt, bei denen sich aber besonders bei den Polykationen ernste Toxizitätsprobleme ergaben. Später wurden Polykationen auf der Basis von Polypeptiden oder Polysacchariden eingesetzt, die enzymatisch abbaubar sind. PMLCs aus diesen Polykationen sind nur wenig oder gar nicht giftig. Anfangs wurden elektrostatische Wechselwirkungen als treibende Kraft zum Aufbau der Mehrfachschichten eingesetzt, dann erschienen immer mehr Berichte über Kapseln, die durch andere Wechselwirkungen

wie Wasserstoffbrückenbindungen oder kovalente Bindungen zusammengehalten werden. Der Einsatz von Polykationen, deren Giftigkeit klinische Anwendungen behindern könnte, kann auf diese Weise ganz vermieden werden. Doch chemische Umsetzungen zur Funktionalisierung oder Vernetzung von Polymeren können ebenfalls Schwierigkeiten mit sich bringen, weil es sich bei den eingesetzten Verbindungen in den allermeisten Fällen nicht um Stoffe mit GRAS-Status handelt, d.h. um Stoffe, die allgemein als unbedenklich angesehen werden. Ferner sind diese Ansätze komplexer als die bloße Nutzung elektrostatischer Wechselwirkungen. Die größte Schwierigkeit hierbei ist, die spezifischen Anwendungen herauszufinden, bei denen das aufwendige Nano-Engineering bei der Herstellung der PMLCs Vorteile im Vergleich zum Einsatz herkömmlicher weniger komplexer Wirkstoffträger zur Folge hat.

Im zweiten Abschnitt haben wir die unterschiedlichen Ansätze zur Einkapselung von Stoffen in Mehrschichtkapseln und zu ihrer Freisetzung daraus zusammengefasst. Der Post-Beladungsansatz, mit einer reversiblen Änderung der Permeabilität der Kapselhülle, wurde anfänglich häufig genutzt, die Einschlusseffizienz ist aber niedrig. Daher werden immer häufiger Prä-Beladungsverfahren angewendet, bei denen poröse, mit Wirkstoffen beladene Template oder Emulsionsmethoden eingesetzt werden. Forschung zum Thema Freisetzung der eingekapselten Wirkstoffe hat bisher ergeben, dass eine genaue Steuerung der Freisetzung niedermolekularer hydrophiler Stoffe aus PMLCs schwierig ist. Dagegen wurden bereits mehrere Verfahren zur Verabreichung makromolekularer Wirkstoffe und hydrophober Verbindungen entwickelt. Dazu wurden die Mehrschichtkapseln so funktionalisiert, dass sie sich auf ein Signal hin öffnen. Die bislang aussichtsreichsten Systeme nutzen den enzymatischen Abbau der Kapselhülle oder die reduktive Spaltung von Disulfidbrücken, die die Hülle stabilisieren. Auch die aktuellen Be-funde von Skirtach et al.^[115] zu Laserstrahl-aktivierten Kapseln könnten für das Erreichen einer kontrollierten intrazellulären Verabreichung von Wirkstoffen hilfreich sein. Da PMLCs und andere Partikel ähnlicher Größe gewöhnlich in endo- oder lysosomale Vesikel gelangen, könnten die Kapseln mit dieser Methode aus den Vesikeln herausgelöst und die Wirkstoffe in das Cytosol überführt werden. Dies ist für die Einschleusung von Nucleinsäuren und Peptiden wichtig.

Die Synthese von PMLCs ist recht zeit- und kostenaufwendig. Erstens sind zahlreiche Syntheseschritte erforderlich, und zweitens müssen die LbL-Beschichtung und die Reinigungsschritte (Zentrifugieren/Filtrieren) überwacht werden, um eine Agglomeration der Teilchen zu verhindern. Es ist daher wohl ausgeschlossen, dass Mehrschichtkapseln etablierten Verfahren zur oralen Verabreichung von Wirkstoffen Konkurrenz machen werden. Wir sind aber überzeugt, dass PMLCs für bestimmte Anwendungen Vorteile aufweisen. Dies ist von mehreren Arbeitsgruppen für die Verabreichung von Impfstoffen belegt: Zellen des Immunsystems lassen sich gezielt und sehr effizient mit PMLCs ansteuern. Auch die Verabreichung von Tumortherapeutika weist zweifellos Potenzial auf. Mehrere Methoden haben sich für den Einschluss solcher Wirkstoffe als geeignet erwiesen, und es stehen Verfahren zur Funktionalisierung von PMLCs mit Antikörpern,

die gezielt Zellen ansteuern, und Stealth-Beschichtungen aus PEG zur Verfügung. Ferner sollten die Kapseln wegen der Flexibilität ihrer Hülle Kapillarvenen leichter passieren können als massive Mikropartikel. Die größte Herausforderung bei der Verabreichung von Tumortherapeutika und Nucleinsäuren und beim Gentransport bleibt allerdings die In-vivo-Lenkung der Kapseln zum Krebsgewebe. Die Kapseln sollten im Blutkreislauf zirkulieren können, ohne zu aggregieren oder ihre Ladung vorzeitig freizusetzen. Auch die Größe der Kapseln ist wichtig: Wegen des EPR-Effekts (der verstärkten Durchlässigkeit- und Rückhaltewirkung) der Blutgefäße in Krebsgeweben können Partikel mit einer Größe bis zu 200 nm die Blutgefäße verlassen, die meisten Kapseln sind aber weitaus größer. Künftige Forschungsarbeiten werden sich daher ohne Zweifel auf das Design von Kapseln mit einer Größe von weniger als 500 nm konzentrieren.

7. Abkürzungen

CLSM	Laser-Konfokalrastermikroskop
DAR	Diazoharz
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HSA	humanes Serumalbumin
LbL	schichtweise
MF	Melaminformaldehyd
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PAH	Poly(allylaminhydrochlorid)
PDADMAC	Poly(diallyldimethylammoniumchlorid)
PEG	Polyethylenglycol
PGA	Poly-L-glutaminsäure
PLL	Poly-L-lysin
PMA	Polymethacrylsäure
PMA ^{SH}	thiolsubstituierte Polymethacrylsäure
PMLC	polymere Mehrschichtkapsel
Poly(HPMA-DMAE)	Poly(hydroxypropylmethacrylamidemethylaminoethyl)
PSS	Poly(styrolsulfonat)
PVPON	Poly(<i>N</i> -vinylpyrrolidon)
RTIC	Rhodamin-B-isothiocyanat
RP-LbL	Umkehrphasen-LbL-Verfahren
siRNA	small interfering RNA
SNARF	ein Seminaphtharhodafluorescein
TA	Gerbsäure
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat

L.J.D.C. dankt dem IWT für ein Doktorandenstipendium, B.G.D.G. dem FWO Vlaanderen für ein Postdoktorandenstipendium und S.D.K. der Universität Gent für Unterstützung (BOF-GOA).

Eingegangen am 6. November 2009

Online veröffentlicht am 19. Juli 2010

Übersetzt von Dr. Jürgen Eckwert, Seeheim-Jugenheim

- [1] R. Langer, D. A. Tirrell, *Nature* **2004**, 428, 487.
- [2] D. A. LaVan, T. McGuire, R. Langer, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1184.
- [3] E. Donath, G. B. Sukhorukov, F. Caruso, S. A. Davis, H. Möhwald, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2323; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2201.
- [4] G. B. Sukhorukov, E. Donath, S. Davis, H. Lichtenfeld, F. Caruso, V. I. Popov, H. Möhwald, *Polym. Adv. Technol.* **1998**, 9, 759.
- [5] C. S. Peyratout, L. Dähne, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3850; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3762.
- [6] A. A. Antipov, G. B. Sukhorukov, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2004**, 111, 49.
- [7] G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach, M. Garstka, S. Springer, W. J. Parak, A. Munoz-Javier, O. Kreft, A. G. Skirtach, A. S. Susha, Y. Ramaye, R. Palankar, M. Winterhalter, *Small* **2007**, 3, 944.
- [8] G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach, B. Zebli, T. Liedl, A. G. Skirtach, K. Kohler, A. A. Antipov, N. Gaponik, A. S. Susha, M. Winterhalter, W. J. Parak, *Small* **2005**, 1, 194.
- [9] W. F. Daamen, P. J. Geutjes, H. T. B. van Moerkerk, S. T. M. Nillesen, R. G. Wismans, T. Hafmans, L. van den Heuvel, A. M. A. Pistorius, J. H. Veerkamp, J. C. M. van Hest, T. H. van Kuppeveld, *Adv. Mater.* **2007**, 19, 673.
- [10] B. G. De Geest, S. De Koker, G. B. Sukhorukov, O. Kreft, W. J. Parak, A. G. Skirtach, J. Demeester, S. C. De Smedt, W. E. Hennink, *Soft Matter* **2009**, 5, 282.
- [11] B. G. De Geest, N. N. Sanders, G. B. Sukhorukov, J. Demeester, S. C. De Smedt, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 636.
- [12] B. G. De Geest, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, *Expert Opin. Drug Delivery* **2009**, 6, 613.
- [13] F. Caruso, R. A. Caruso, H. Möhwald, *Science* **1998**, 282, 1111.
- [14] A. A. Antipov, D. Shchukin, Y. Fedutik, A. I. Petrov, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, *Colloids Surf. A* **2003**, 224, 175.
- [15] A. I. Petrov, D. V. Volodkin, G. B. Sukhorukov, *Biotechnol. Prog.* **2005**, 21, 918.
- [16] D. V. Volodkin, N. I. Larionova, G. B. Sukhorukov, *Biocomolecules* **2004**, 5, 1962.
- [17] D. V. Volodkin, A. I. Petrov, M. Prevot, G. B. Sukhorukov, *Langmuir* **2004**, 20, 3398.
- [18] Y. J. Wang, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2006**, 18, 795.
- [19] Y. J. Wang, A. M. Yu, F. Caruso, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2948; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2888.
- [20] T. Mauser, C. Dejugnat, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov, *Langmuir* **2006**, 22, 5888.
- [21] R. K. Iler, *J. Colloid Interface Sci.* **1966**, 21, 569.
- [22] G. Decher, *Science* **1997**, 277, 1232.
- [23] G. Decher, J. D. Hong, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1991**, 46, 321.
- [24] G. Decher, J. D. Hong, J. Schmitt, *Thin Solid Films* **1992**, 210, 831.
- [25] C. Picart, A. Schneider, O. Etienne, J. Mutterer, P. Schaaf, C. Egles, N. Jessel, J. C. Voegel, *Adv. Funct. Mater.* **2005**, 15, 1771.
- [26] T. Boudou, T. Crouzier, K. Ren, G. Blin, C. Picart, *Adv. Mater.* **2010**, 22, 441.
- [27] D. M. Lynn, *Soft Matter* **2006**, 2, 269.
- [28] D. M. Lynn, *Adv. Mater.* **2007**, 19, 4118.
- [29] E. Vázquez, D. M. Dewitt, P. T. Hammond, D. M. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13992.
- [30] B. G. De Geest, R. E. Vandenbroucke, A. M. Guenther, G. B. Sukhorukov, W. E. Hennink, N. N. Sanders, J. Demeester, S. C. De Smedt, *Adv. Mater.* **2006**, 18, 1005.
- [31] E. Kharlampieva, V. Kozlovska, S. A. Sukhishvili, *Adv. Mater.* **2009**, 21, 3053.
- [32] V. Kozlovska, E. Kharlampieva, M. L. Mansfield, S. A. Sukhishvili, *Chem. Mater.* **2006**, 18, 328.

- [33] A. N. Zelikin, A. L. Becker, A. P. R. Johnston, K. L. Wark, F. Turatti, F. Caruso, *ACS Nano* **2007**, *1*, 63.
- [34] A. N. Zelikin, Q. Li, F. Caruso, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7907; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7743.
- [35] A. N. Zelikin, Q. Li, F. Caruso, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 2655.
- [36] A. N. Zelikin, J. F. Quinn, F. Caruso, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 27.
- [37] W. J. Tong, C. Y. Gao, H. Möhwald, *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 2078.
- [38] W. J. Tong, C. Y. Gao, H. Möhwald, *Macromolecules* **2006**, *39*, 335.
- [39] W. J. Tong, C. Y. Gao, H. Möhwald, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 4610.
- [40] Z. Q. Feng, G. Q. Fan, H. X. Wang, C. Y. Gao, J. C. Shen, *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 448.
- [41] Z. Q. Feng, C. Y. Gao, J. C. Shen, *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210*, 1387.
- [42] D. Fournier, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1369.
- [43] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- [44] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- [45] G. K. Such, J. F. Quinn, A. Quinn, E. Tjipto, F. Caruso, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9318.
- [46] G. K. Such, E. Tjipto, A. Postma, A. P. R. Johnston, F. Caruso, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1706.
- [47] C. J. Huang, F. C. Chang, *Macromolecules* **2009**, *42*, 5155.
- [48] C. J. Ochs, G. K. Such, B. Städler, F. Caruso, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3389.
- [49] B. G. De Geest, W. Van Camp, F. E. Du Prez, S. C. De Smedt, J. Demeester, W. E. Hennink, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 1111.
- [50] B. G. De Geest, W. Van Camp, F. E. Du Prez, S. C. De Smedt, J. Demeester, W. E. Hennink, *Chem. Commun.* **2008**, 190.
- [51] C. R. Kinnane, G. K. Such, G. Antequera-Garcia, Y. Yan, S. J. Dodds, L. M. Liz-Marzan, F. Caruso, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2839.
- [52] H. P. Yap, A. P. R. Johnston, G. K. Such, Y. Yan, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4348.
- [53] Z. P. Wang, Z. Q. Feng, C. Y. Gao, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 4194.
- [54] T. Kida, M. Mouri, M. Akashi, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7696; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7534.
- [55] G. Ibarz, L. Dähne, E. Donath, H. Möhwald, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1324.
- [56] G. Ibarz, L. Dähne, E. Donath, H. Möhwald, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 4059.
- [57] G. B. Sukhorukov, A. A. Antipov, A. Voigt, E. Donath, H. Möhwald, *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, *22*, 44.
- [58] G. B. Sukhorukov, M. Brumen, E. Donath, H. Möhwald, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 6434.
- [59] G. Sukhorukov, L. Dähne, J. Hartmann, E. Donath, H. Möhwald, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 112.
- [60] Y. Lvov, A. A. Antipov, A. Mamedov, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 125.
- [61] T. Shutava, M. Prouty, D. Kommireddy, Y. Lvov, *Macromolecules* **2005**, *38*, 2850.
- [62] K. Köhler, G. B. Sukhorukov, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 2053.
- [63] C. Y. Gao, E. Donath, H. Möhwald, J. C. Shen, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3943; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3789.
- [64] H. G. Zhu, R. Srivastava, M. J. McShane, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2221.
- [65] L. Dähne, S. Leporatti, E. Donath, H. Möhwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5431.
- [66] D. G. Shchukin, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4610; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4472.
- [67] O. Kreft, M. Prevot, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5702; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5605.
- [68] O. Kreft, A. G. Skirtach, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3142.
- [69] L. Dähne, B. Baude, Patent WO 2005 089727, **2005**.
- [70] N. G. Balabushevitch, G. B. Sukhorukov, N. A. Moroz, D. V. Volodkin, N. I. Larionova, E. Donath, H. Möhwald, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *76*, 207.
- [71] J. M. Lally, N. Kotov, Patent WO 2003 075888, **2003**.
- [72] R. Chandrawati, B. Städler, A. Postma, L. A. Connal, S. F. Chong, A. N. Zelikin, F. Caruso, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5988.
- [73] B. Städler, R. Chandrawati, K. Goldie, F. Caruso, *Langmuir* **2009**, *25*, 6725.
- [74] B. Städler, R. Chandrawati, A. D. Price, S. F. Chong, K. Breheney, A. Postma, L. A. Connal, A. N. Zelikin, F. Caruso, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4423; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4359.
- [75] D. O. Grigoriev, R. Miller, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, *14*, 48.
- [76] C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, M. J. Garcia-Celma, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2005**, *10*, 102.
- [77] D. Guzey, D. J. McClements, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *128*, 227.
- [78] S. Moya, G. B. Sukhorukov, M. Auch, E. Donath, H. Möhwald, *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *216*, 297.
- [79] S. Sivakumar, J. K. Gupta, N. L. Abbott, F. Caruso, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 2063.
- [80] C. Priest, A. Quinn, A. Postma, A. N. Zelikin, J. Ralston, F. Caruso, *Lab Chip* **2008**, *8*, 2182.
- [81] D. O. Grigoriev, T. Bukreeva, H. Möhwald, D. G. Shchukin, *Langmuir* **2008**, *24*, 999.
- [82] U. Klinkesorn, P. Sophanodora, P. Chinachoti, D. J. McClements, E. A. Decker, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4561.
- [83] J. R. Mancuso, D. J. McClements, E. A. Decker, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4112.
- [84] I. Kobayashi, M. Nakajima, H. Nabeta, Y. Kikuchi, A. Shohno, K. Satoh, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, *78*, 797.
- [85] H. Wackerbarth, P. Schon, U. Bindrich, *Langmuir* **2009**, *25*, 2636.
- [86] E. Tjipto, K. D. Cadwell, J. F. Quinn, A. P. R. Johnston, N. L. Abbott, F. Caruso, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2243.
- [87] D. Guzey, D. J. McClements, *Food Biophys.* **2006**, *1*, 30.
- [88] S. Ogawa, E. A. Decker, D. J. McClements, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5522.
- [89] S. Sivakumar, V. Bansal, C. Cortez, S. F. Chong, A. N. Zelikin, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1820.
- [90] B. G. De Geest, S. De Koker, G. B. Sukhorukov, O. Kreft, W. J. Parak, A. G. Skirtach, J. Demeester, S. C. De Smedt, W. E. Hennink, *Soft Matter* **2009**, *5*, 282.
- [91] A. A. Antipov, G. B. Sukhorukov, S. Leporatti, I. L. Radchenko, E. Donath, H. Möhwald, *Colloids Surf. A* **2002**, *198*, 535.
- [92] B. G. De Geest, A. M. Jonas, J. Demeester, S. C. De Smedt, *Langmuir* **2006**, *22*, 5070.
- [93] T. Levy, C. Dejugnat, G. B. Sukhorukov, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 1586.
- [94] Y. J. Ma, W. F. Dong, M. A. Hempenius, H. Möhwald, G. J. Vancso, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 724.
- [95] T. Borodina, E. Markovicheva, S. Kunizhev, H. Moehwald, G. B. Sukhorukov, O. Kreft, *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 1894.
- [96] B. G. De Geest, R. E. Vandenbroucke, A. M. Guenther, G. B. Sukhorukov, W. E. Hennink, N. N. Sanders, J. Demeester, S. C. De Smedt, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1005.
- [97] Y. Itoh, M. Matsusaki, T. Kida, M. Akashi, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2715.

- [98] Y. Itoh, M. Matsusaki, T. Kida, M. Akashi, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2202.
- [99] Y. Itoh, M. Matsusaki, T. Kida, M. Akashi, *Chem. Lett.* **2008**, *37*, 238.
- [100] D. T. Haynie, N. Palath, Y. Liu, B. Y. Li, N. Pargaonkar, *Langmuir* **2005**, *21*, 1136.
- [101] B. Y. Li, D. T. Haynie, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1667.
- [102] H. Lee, Y. Jeong, T. G. Park, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3705.
- [103] A. N. Zelikin, A. L. Becker, A. P. R. Johnston, K. L. Wark, F. Turatti, F. Caruso, *ACS Nano* **2007**, *1*, 63.
- [104] Y. J. Wang, V. Bansal, A. N. Zelikin, F. Caruso, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 1741.
- [105] M. Bedard, B. G. De Geest, A. Skirtach, H. Moehwald, B. G. Sukhorukov, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2010**, *158*, 2.
- [106] A. G. Skirtach, A. A. Antipov, D. G. Shchukin, G. B. Sukhorukov, *Langmuir* **2004**, *20*, 6988.
- [107] Z. H. Lu, M. D. Prouty, Z. H. Guo, V. O. Golub, C. Kumar, Y. M. Lvov, *Langmuir* **2005**, *21*, 2042.
- [108] D. A. Gorin, D. G. Shchukin, A. I. Mikhailov, K. Kohler, S. A. Sergeev, S. A. Portnov, I. V. Taranov, V. V. Kislov, G. B. Sukhorukov, *Tech. Phys. Lett.* **2006**, *32*, 70.
- [109] B. G. De Geest, A. G. Skirtach, A. A. Mamedov, A. A. Antipov, N. A. Kotov, S. C. De Smedt, G. B. Sukhorukov, *Small* **2007**, *3*, 804.
- [110] D. G. Shchukin, D. A. Gorin, H. Moehwald, *Langmuir* **2006**, *22*, 7400.
- [111] A. G. Skirtach, B. G. De Geest, A. Mamedov, A. A. Antipov, N. A. Kotov, G. B. Sukhorukov, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 1050.
- [112] A. S. Angelatos, B. Radt, F. Caruso, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 3071.
- [113] B. Radt, T. A. Smith, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 2184.
- [114] 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.
- [115] A. G. Skirtach, A. M. Javier, O. Kreft, K. Kohler, A. P. Alberola, H. Möhwald, W. J. Parak, G. B. Sukhorukov, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4728; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4612.
- [116] A. G. Skirtach, P. Karageorgiev, M. F. Bedard, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11572.
- [117] A. G. Skirtach, P. Karageorgiev, B. G. De Geest, N. Pazos-Perez, D. Braun, G. B. Sukhorukov, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 506.
- [118] A. G. Skirtach, P. Karageorgiev, B. G. De Geest, N. Pazos-Perez, D. Braun, G. B. Sukhorukov, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 506.
- [119] A. Muñoz Javier, P. del Pino, M. F. Bedard, D. Ho, A. G. Skirtach, G. B. Sukhorukov, C. Plank, W. J. Parak, *Langmuir* **2008**, *24*, 12517.
- [120] B. G. De Geest, S. De Koker, J. Demeester, S. C. De Smedt, W. E. Hennink, *J. Controlled Release* **2009**, *135*, 268.
- [121] B. G. De Geest, S. De Koker, K. Immesoete, J. Demeester, S. C. De Smedt, W. E. Hennink, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 3687.
- [122] B. G. De Geest, C. Dejugnat, M. Prevot, G. B. Sukhorukov, J. Demeester, S. C. De Smedt, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 531.
- [123] B. G. De Geest, C. Dejugnat, G. B. Sukhorukov, K. Braeckmans, S. C. De Smedt, J. Demeester, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2357.
- [124] B. G. De Geest, C. Dejugnat, E. Verhoeven, G. B. Sukhorukov, A. M. Jonas, J. Plain, J. Demeester, S. C. De Smedt, *J. Controlled Release* **2006**, *116*, 159.
- [125] B. G. De Geest, M. J. McShane, J. Demeester, S. C. De Smedt, W. E. Hennink, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14480.
- [126] B. G. De Geest, B. G. Stubbe, A. M. Jonas, T. Van Thienen, W. L. J. Hinrichs, J. Demeester, S. C. De Smedt, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 373.
- [127] B. G. De Geest, S. De Koker, K. Immesoete, J. Demeester, S. C. De Smedt, W. E. Hennink, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 3687.
- [128] Z. Y. Tang, Y. Wang, P. Podsiadlo, N. A. Kotov, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 3203.
- [129] B. Neu, A. Voigt, R. Mitlohner, S. Leporatti, C. Y. Gao, E. Donath, H. Kiesewetter, H. Möhwald, H. J. Meiselman, H. Bäumler, *J. Microencapsulation* **2001**, *18*, 385.
- [130] E. Donath, S. Moya, B. Neu, G. B. Sukhorukov, R. Georgieva, A. Voigt, H. Bäumler, H. Kiesewetter, H. Möhwald, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 5481.
- [131] O. Kreft, R. Georgieva, H. Bäumler, M. Steup, B. Müller-Röber, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27*, 435.
- [132] R. F. Fakhrullin, A. I. Zamaleeva, M. V. Morozov, D. I. Tazetdinova, F. K. Alimova, A. K. Hilmutdinov, R. I. Zhdanov, M. Kahraman, M. Culha, *Langmuir* **2009**, *25*, 4628.
- [133] K. E. La Flamme, K. C. Popat, L. Leoni, E. Markiewicz, T. J. La Tempa, B. B. Roman, C. A. Grimes, T. A. Desai, *Biomaterials* **2007**, *28*, 2638.
- [134] A. Diaspro, D. Silvano, S. Krol, O. Cavalleri, A. Gliozzi, *Langmuir* **2002**, *18*, 5047.
- [135] S. Krol, S. del Guerra, M. Grupillo, A. Diaspro, A. Gliozzi, P. Marchetti, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1933.
- [136] J. T. Wilson, W. X. Cui, E. L. Chaikof, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 1940.
- [137] A. J. Swiston, C. Cheng, S. H. Um, D. J. Irvine, R. E. Cohen, M. F. Rubner, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 4446.
- [138] R. F. Fakhrullin, V. N. Paunov, *Chem. Commun.* **2009**, 2511.
- [139] S. De Koker, B. G. De Geest, C. Cuvelier, L. Ferdinand, W. Deckers, W. E. Hennink, S. De Smedt, N. Mertens, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 3754.
- [140] Z. H. An, K. Kavanoor, M. L. Choy, L. J. Kaufman, *Colloids Surf. B* **2009**, *70*, 114.
- [141] A. Muñoz Javier, O. Kreft, A. P. Alberola, C. Kirchner, B. Zebli, A. S. Susha, E. Horn, S. Kempter, A. G. Skirtach, A. L. Rogach, J. Radler, G. B. Sukhorukov, M. Benoit, W. J. Parak, *Small* **2006**, *2*, 394.
- [142] C. Kirchner, A. M. Javier, A. S. Susha, A. L. Rogach, O. Kreft, G. B. Sukhorukov, W. J. Parak, *Talanta* **2005**, *67*, 486.
- [143] X. Y. Liu, C. Y. Gao, J. C. Shen, H. Möhwald, *Macromol. Biosci.* **2005**, *5*, 1209.
- [144] K. W. Wang, Q. He, X. H. Yan, Y. Cui, W. Qi, L. Duan, J. B. Li, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 4018.
- [145] S. De Koker, B. G. De Geest, S. K. Singh, R. De Rycke, T. Naessens, Y. Van Kooyk, J. Demeester, S. C. De Smedt, J. Grooten, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8637; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8485.
- [146] A. Muñoz Javier, O. Kreft, M. Semmling, S. Kempter, A. G. Skirtach, O. T. Bruns, P. del Pino, M. F. Bedard, J. Raedler, J. Kaebs, C. Plank, G. B. Sukhorukov, W. J. Parak, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4281.
- [147] O. Kreft, A. M. Javier, G. B. Sukhorukov, W. J. Parak, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 4471.
- [148] O. Kreft, A. M. Javier, G. B. Sukhorukov, W. J. Parak, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 4471.
- [149] M. F. Bédard, A. Munoz-Javier, R. Mueller, P. del Pino, A. Fery, W. J. Parak, A. G. Skirtach, G. B. Sukhorukov, *Soft Matter* **2009**, *5*, 148.
- [150] R. Heuberger, G. Sukhorukov, J. Voros, M. Textor, H. Möhwald, *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 357.
- [151] U. Wattendorf, O. Kreft, M. Textor, G. B. Sukhorukov, H. P. Merkle, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 100.
- [152] C. Cortez, E. Tomaskovic-Crook, A. P. R. Johnston, B. Radt, S. H. Cody, A. M. Scott, E. C. Nice, J. K. Heath, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1998.
- [153] C. Cortez, E. Tomaskovic-Crook, A. P. R. Johnston, A. M. Scott, E. C. Nice, J. K. Heath, F. Caruso, *ACS Nano* **2007**, *1*, 93.
- [154] F. Zhang, Q. Wu, Z. C. Chen, X. Li, X. M. Jiang, X. F. Lin, *Langmuir* **2006**, *22*, 8458.
- [155] F. Zhang, L. J. Liu, Q. Wu, X. F. Lin, *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210*, 1052.

- [156] F. Zhang, Q. Wu, Z. C. Chen, M. Zhang, X. F. Lin, *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *317*, 477.
- [157] B. Zebli, A. S. Susha, G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach, W. J. Parak, *Langmuir* **2005**, *21*, 4262.
- [158] M. Fischlechner, O. Zschornig, J. Hofmann, E. Donath, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2952; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2892.
- [159] M. Fischlechner, L. Toellner, P. Messner, R. Grabherr, E. Donath, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 784.
- [160] M. Fischlechner, U. Reibetanz, M. Zaulig, D. Enderlein, J. Romanova, S. Loporatti, S. Moya, E. Donath, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3540.
- [161] M. Fischlechner, E. Donath, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3246; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3184.
- [162] L. Toellner, M. Fischlechner, B. Ferko, R. M. Grabherr, E. Donath, *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 1575.
- [163] X. P. Qiu, S. Loporatti, E. Donath, H. Möhwald, *Langmuir* **2001**, *17*, 5375.
- [164] Z. F. Dai, A. Heilig, H. Zastrow, E. Donath, H. Möhwald, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 6369.
- [165] S. Q. Ye, C. Y. Wang, X. X. Liu, Z. Tong, *J. Controlled Release* **2005**, *106*, 319.
- [166] A. I. Arida, M. M. Al-Tabakha, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 48.
- [167] N. Pargaonkar, Y. M. Lvov, N. Li, J. H. Steenekamp, M. M. de Villiers, *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 826.
- [168] H. Ai, S. A. Jones, M. M. de Villiers, Y. M. Lvov, *J. Controlled Release* **2003**, *86*, 59.
- [169] F. Caruso, W. J. Yang, D. Trau, R. Renneberg, *Langmuir* **2000**, *16*, 8932.
- [170] S. Beyer, W. C. Mak, D. Trau, *Langmuir* **2007**, *23*, 8827.
- [171] W. C. Mak, J. Bai, X. Y. Chang, D. Trau, *Langmuir* **2009**, *25*, 769.
- [172] Z. W. Mao, L. Ma, C. Y. Gao, J. C. Shen, *J. Controlled Release* **2005**, *104*, 193.
- [173] U. Manna, S. Patil, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13258.
- [174] I. L. Radtchenko, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald in *13th International Symposium on Microencapsulation*, Angers, Frankreich, **2001**, S. 219.
- [175] M. Saphiannikova, I. Radtchenko, G. Sukhorukov, D. Shchukin, A. Yakimansky, J. Ilnytskyi, *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 9007.
- [176] S. Moya, E. Donath, G. B. Sukhorukov, M. Auch, H. Bäumler, H. Lichtenfeld, H. Möhwald, *Macromolecules* **2000**, *33*, 4538.
- [177] D. V. Andreeva, D. A. Gorin, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov, *Langmuir* **2007**, *23*, 9031.
- [178] Q. H. Zhao, S. A. Zhang, W. J. Tong, C. Y. Gao, J. C. Shen, *Eur. Polym. J.* **2006**, *42*, 3341.
- [179] X. Tao, H. Chen, X. J. Sun, H. F. Chen, W. H. Roa, *Int. J. Pharm.* **2007**, *336*, 376.
- [180] Q. H. Zhao, B. S. Han, Z. H. Wang, C. Y. Gao, C. H. Peng, J. C. Shen, *Nanomedicine* **2007**, *3*, 63.
- [181] T. G. Shutava, S. S. Balkundi, P. Vangala, J. J. Steffan, R. L. Bigelow, J. A. Cardelli, D. P. O'Neal, Y. M. Lvov, *ACS Nano* **2009**, *3*, 1877.
- [182] B. S. Han, B. Y. Shen, Z. H. Wang, M. M. Shi, H. W. Li, C. H. Peng, Q. H. Zhao, *Polym. Adv. Technol.* **2008**, *19*, 36.
- [183] G. F. Schneider, V. Subr, K. Ulrich, G. Decher, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 636.
- [184] N. G. Balabushevich, O. P. Tiourina, D. V. Volodkin, N. I. Larionova, G. B. Sukhorukov, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1191.
- [185] F. Caruso, D. Trau, H. Möhwald, R. Renneberg, *Langmuir* **2000**, *16*, 1485.
- [186] C. Gao, X. Liu, J. Shen, H. Möhwald, *Chem. Commun.* **2002**, *1928*.
- [187] H. G. Zhu, M. J. McShane, *Langmuir* **2005**, *21*, 424.
- [188] N. G. Balabushevich, G. B. Sukhorukov, N. I. Larionova, *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 1168.
- [189] O. P. Tiourina, G. B. Sukhorukov, *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 155.
- [190] J. Zheng, X. L. Yue, Z. F. Dai, Y. Wang, S. Q. Liu, X. F. Yan, *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 1499.
- [191] M. H. Andersen, P. Keikavoussi, E. B. Brocker, B. Schuler-Thurner, M. Jonassen, I. Sondergaard, P. T. Stratén, J. C. Becker, E. Kampgen, *Int. J. Cancer* **2001**, *94*, 820.
- [192] P. E. Jensen, *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 1041.
- [193] A. Lanzavecchia, *Curr. Opin. Immunol.* **1996**, *8*, 348.
- [194] P. Johansen, J. M. M. Gomez, B. Gander, *Expert Rev. Vaccines* **2007**, *6*, 471.
- [195] M. Singh, J. Kazzaz, M. Uguzzoli, J. Chesko, D. T. O'Hagan, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2004**, *4*, 483.
- [196] D. T. O'Hagan, M. Singh, J. B. Ulmer, *Methods* **2006**, *40*, 10.
- [197] N. Murthy, M. C. Xu, S. Schuck, J. Kunisawa, N. Shastri, J. M. J. Fréchet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4995.
- [198] W. L. Jiang, R. K. Gupta, M. C. Deshpande, S. P. Schwendeman, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 391.
- [199] S. F. Chong, A. Sexton, R. De Rose, S. J. Kent, A. N. Zelikin, F. Caruso, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5178.
- [200] R. De Rose, A. N. Zelikin, A. P. R. Johnston, A. Sexton, S. F. Chong, C. Cortez, W. Mulholland, F. Caruso, S. J. Kent, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4698.
- [201] S. De Koker, T. Naessens, B. G. De Geest, P. Bogaert, J. De-meester, S. C. De Smedt, J. Grootenhuis, *J. Immunol.* **2010**, *184*, 203.
- [202] P. Rivera-Gil, S. De Koker, B. G. De Geest, W. J. Parak, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 4398.
- [203] O. E. Selina, S. Belov, N. N. Vlasova, V. I. Balyshova, A. I. Churin, A. Bartkoviak, G. B. Sukhorukov, E. A. Markvicheva, *Bioorg. Khim.* **2009**, *35*, 113.
- [204] D. Putnam, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 439.
- [205] T. G. Park, J. H. Jeong, S. W. Kim, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 467.
- [206] A. P. R. Johnston, A. N. Zelikin, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3727.
- [207] G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, G. Decher, Y. M. Lvov, *Thin Solid Films* **1996**, *285*, 220.
- [208] C. Schüller, F. Caruso, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 921.
- [209] D. G. Shchukin, A. A. Patel, G. B. Sukhorukov, Y. M. Lvov, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3374.
- [210] U. Reibetanz, C. Claus, E. Typl, J. Hofmann, E. Donath, *Macromol. Biosci.* **2006**, *6*, 153.
- [211] S. Zaitsev, R. Cartier, O. Vyborov, G. Sukhorukov, B. R. Paulke, A. Haberland, Y. Parfyonova, V. Tkachuk, M. Bottger, *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1656.
- [212] M. Aouadi, G. J. Tesz, S. M. Nicoloro, M. X. Wang, M. Chouinard, E. Soto, G. R. Ostroff, M. P. Czech, *Nature* **2009**, *458*, 1180.
- [213] A. D. Price, A. N. Zelikin, Y. J. Wang, F. Caruso, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 335; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 329.
- [214] A. S. Angelatos, A. P. R. Johnston, Y. J. Wang, F. Caruso, *Langmuir* **2007**, *23*, 4554.
- [215] A. P. R. Johnston, E. S. Read, F. Caruso, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 953.
- [216] A. P. R. Johnston, H. Mitomo, E. S. Read, F. Caruso, *Langmuir* **2006**, *22*, 3251.
- [217] A. P. R. Johnston, F. Caruso, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2731; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2677.
- [218] A. P. R. Johnston, F. Caruso, *Small* **2008**, *4*, 612.
- [219] A. P. R. Johnston, L. Lee, Y. J. Wang, F. Caruso, *Small* **2009**, *5*, 1418.