

2 Wirkstoff-Träger-Systeme

2.1 Beschreibung ausgesuchter Wirkstoff-Träger-Systeme

Der Begriff “kontrollierte Arzneistoffapplikation” (controlled drug release) umfasst die Einstellung des gewünschten Freigabeprofiles eines durch ein Trägersystem geschützten Arzneistoffes über einen gewünschten Zeitraum. Darüber hinaus versteht man darunter die gezielte Zuführung eines Arzneistoffes (drug) an sein Zielgewebe (target), das sogenannte “Drug Targeting”. Im Idealfall wird die Kombination von beidem angestrebt, das heißt optimiertes Freigabeverhalten nach gewebespezifischer Anreicherung. Durch die Verknüpfung mit einem Trägersystem können manchen Wirkstoffen neue Darreichungswege eröffnet werden. Folgende Beispiele beschreiben typische Probleme aus der pharmazeutischen Praxis:

Teure, hochwirksame Medikamente stellen die Pharmazeuten immer wieder vor das Problem des Applikationsweges. Pharmaka, die oral verabreicht werden, machen zunächst eine Leberpassage durch, bevor sie mit dem Blutstrom im Organismus verteilt werden. Bei diesem sogenannten “first pass” kann das Pharmakon weitgehend zu unwirksamen Metaboliten abgebaut werden, so dass der für die Wirkung notwendige Plasmaspiegel nicht erreicht wird¹. Bei manchen Pharmaka liegt die Bioverfügbarkeit bei oraler Gabe bei nur 4 bis 5%. Besonders Peptide und Proteine gehören zu den problematischen Substanzen, denn sie werden sehr schnell im Magen-Darm-Trakt abgebaut². Die oft im Minutenbereich liegenden Halbwertszeiten der Plasma-Spiegel von Peptiden und Proteinen erfordern mehrfache Injektionen pro Tag, um eine therapeutische Konzentration im Körper aufrecht zu erhalten. Dieser Umstand wird von vielen Patienten nicht akzeptiert. Oben genannte Probleme könnten mit einem geeigneten controlled drug release-System im Nanometer-Bereich bei intravenöser Applikation umgangen werden. Hochwirksame Zytostatika oder auch neue Pharmaka in der HIV-Therapie zeigen bei Penetration in gesundes Gewebe starke Nebenwirkungen, die durch ein drug targeting erheblich vermindert werden könnten³.

Zusammenfassend kann man sagen, dass ein geeignetes Trägersystem einem Pharmakon völlig neue Eigenschaften bezüglich seiner Wirkungen und seiner Einsatzmöglichkeiten geben kann. Für den klinischen Einsatz werden aber besondere Ansprüche an diese Wirkstoff-Träger-Systeme gestellt. Sie dürfen in der dosierten Menge nicht toxisch wirken, müssen sterilisier- und biologisch abbaubar sein. Der Durchmesser potenzieller Wirkstoff-Träger-Systeme muss bei intravenöser Applikation kleiner als 4 µm sein, damit sie durch die kleinsten Blutgefäße im Körper wandern können. Ansonsten drohen lebensbedrohliche Embolien für den Patienten⁴.

Im folgenden sollen einige Wirkstoff-Träger-Systeme vorgestellt werden:

2.1.1 Parenterale Fettemulsionen als Arzneistoffträger

Bei der Herstellung wird der Wirkstoff in einem Öl gelöst. Durch Mischen des Öls mit Wasser und nach Zugabe eines Emulgators wird die wirkstoffhaltige Fettemulsion durch Hochdruckhomogenisierung gebildet. Als pharmakologisch unbedenkliche Öle zur Herstellung dieser wirkstoffhaltigen Öl-in-Wasser-Emulsionen werden das aus langkettigen Triglyceriden aufgebaute Sojaöl bevorzugt oder auch Kokosöl eingesetzt, welches aus mittelkettigen Triglyceriden aufgebaut ist. Der Öltröpfchendurchmesser liegt im Bereich von 200-300 nm. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven bei ca. 120°C, die Haltbarkeitsdauer liegt bei Raumtemperatur bei circa zwei Jahren. Diese Fettemulsionen werden in der postoperativen klinischen Ernährung² eingesetzt oder auch in der Anästhesie. Die meisten Anästhetika haben lipophilen Stoffcharakter, der die notwendige Voraussetzung für die Passage der Blut-Hirn-Schranke ist. Aufgrund dieser lipophilen Eigenschaft können sie gut in die Ölphase der Fettemulsionen eingebracht werden. Die kontrollierte Freisetzung eines Pharmakons kann mit diesen Emulsionen allerdings nicht erreicht werden. Bei intravenöser Injektion werden die inkorporierten Arzneimittel spontan freigesetzt. Dieser sogenannte "burst release" liegt bei diesen Systemen in der Größenordnung von Millisekunden.

2.1.2 Liposome

Zunächst sei eine Definition des Begriffes Vesikel vorgestellt:

Vesikel sind kugelig in sich abgeschlossene Membranlamellen, die einen wässrigen Innenraum von einer kontinuierlichen wässrigen Phase abtrennen. Die Membranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht (Bilayer) mit amphiphilen Lipiden, deren hydrophile Teile ("Kopfgruppen") der wässrigen Seite zugewandt sind. Die lipophilen Molekülteile der beiden Lipidschichten (Monolayer) sind einander zugewandt und bilden den hydrophoben Innenbereich der Membran⁵.

Liposome sind künstlich hergestellte Vesikel. Der Aufbau der Liposome zeigt eine große Ähnlichkeit mit dem von Zellmembranen. Zu ihrer Herstellung werden hauptsächlich amphiphile Phospholipide, Glycolipide und Cholesterol verwendet. In den wässrigen Innenraum können im Gegensatz zu den Fettemulsionen hydrophile Pharmaka eingeschlossen werden. Liposome haben einen Durchmesser zwischen 20 nm und 3 µm. Ihre Membranen haben eine Dicke von circa 5 nm⁶.

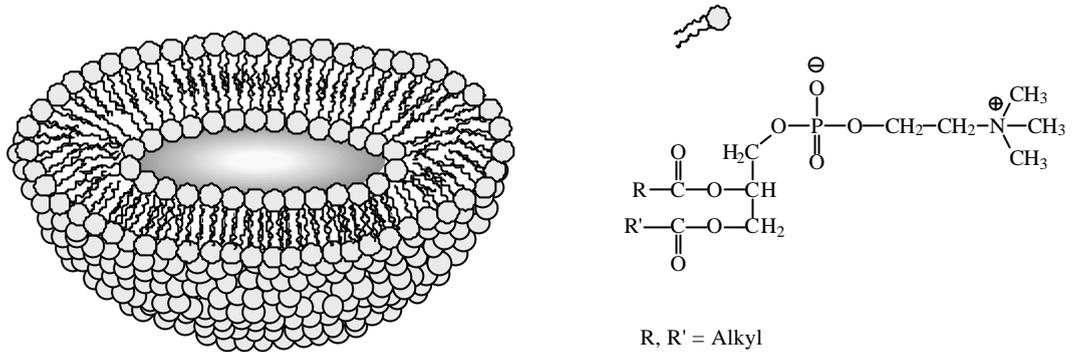


Abb. 2.1: Schnitt durch ein unilamellares Liposom aus Phospholipiden, die als Bilayer einen wässrigen Innenraum umhüllen.

Die Morphologie dieser Liposome ist so umfangreich, dass im Jahre 1977 eine spezielle Nomenklatur eingeführt wurde, die bis heute erweitert wird. Es gibt drei Grundtypen von Liposomen:

1. SUV - Small Unilamellar Vesicles
2. LUV - Large Unilamellar Vesicles
3. MLV - Multilamellar Large Vesicles,

die sich in ihrer Größe und Schalenbau unterscheiden. Kleine unilamellare Vesikel haben einen Durchmesser bis zu 50 nm, die Durchmesser der großen unilamellaren Vesikel reichen von 50 nm bis 3 µm. Große multilamellare Vesikel haben eine Größe von 100 nm bis zu mehreren Mikrometern und sind durch eine Vielzahl von konzentrischen Bilayerschalen aufgebaut⁷.

Wichtig für den Pharmazeuten ist, dass die Bandbreite der Strukturen viele Einsatzmöglichkeiten im Sinne eines Wirkstoffeinschlusses in sich birgt. Diese Bandbreite ist abhängig von den Bedingungen bei der Herstellung. Es gibt eine Vielzahl von Methoden, deren genaue Beschreibung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde⁸. Es werden dabei trockene Membranlipide hydratisiert, wobei sich spontan Vesikel bilden, deren Gestalt durch mechanische Einwirkungen, wie Scherkräfte, Druck oder Schallenergie, modifiziert werden kann. Zum Beispiel bilden sich durch eine Behandlung mit großen Ultraschallenergien oder Drucken von circa 700 bar kleine unilamellare Liposome⁹. Die vielseitigen pharmazeutischen Anwendungsbereiche der Liposome beruhen auf den Möglichkeiten, hydrophile Moleküle im wässrigen Innenraum zu verkapseln, amphiphile oder geladene Moleküle an die Membranen zu adsorbieren und lipophile Moleküle in die inneren Membranbereiche zu

inkorporieren. Durch die Wahl der Membranlipide, der Lamellenzahl und der Größe kann der Beladungsgrad mit Wirkstoffen variiert und die Wirkstofffreisetzung modifiziert werden. Durch die Verkapselung wird das Liposom zu einem Transportmittel und für hydrophile Wirkstoffe zu einer Permeationsbarriere mit Depoteffekt. Der Depoteffekt wird vor allem mit den großen multilamellaren Liposomen erreicht. Liposome finden ihren Einsatz in der Kosmetik als Hautschutz oder in Heilsalben und sind im klinischen Einsatz gut etabliert. Sie dienen zum Beispiel dem Herzmittel Adalat® oder verschiedenen Antibiotika bei der intravenösen Applikation als Wirkstoff-Träger-System^{10,11}.

Durch ihre natürlichen und untoxischen Bausteine besitzen sie eine hohe Bioakzeptanz. Sie können aber nicht oral verabreicht werden, da Liposome durch das saure Milieu im Magen und durch Enzyme im Magen-Darm-Trakt zerstört werden⁶.

Ein weiterer Nachteil ist, dass Liposome durch das Immunsystem innerhalb weniger Minuten als körperfremd erkannt und aus dem Blutstrom eliminiert werden. Zur gezielten Ansteuerung von Organen muss deshalb die Immunerkennung unterdrückt werden. Dies erreicht man durch Oberflächenmodifikationen der Liposome mit Fremdmolekülen, wie zum Beispiel Tensiden. Somit kann die Halbwertszeit der Blutverweildauer auf bis zu 20 Stunden erhöht werden. Auf Oberflächenmodifikationen wird im weiteren Verlauf dieses Kapitels ausführlicher eingegangen werden.

2.1.3 Feste Lipidnanopartikel

Die festen Lipidnanopartikel oder SLN (Solid-Lipid-Nanoparticles) stellen ein alternatives Carriersystem zu Emulsionen und Liposomen dar^{12,13}. Auch mit diesem können prinzipiell hydrophile und hydrophobe Pharmaka inkorporiert werden. Sie können oral oder parenteral verabreicht werden. Durch geeignete Parameterisierung bei der Herstellung werden Korngrößen von 50 nm bis 1 µm erhalten. Bei diesem Trägersystem besteht das Matrixmaterial im Gegensatz zu den oben beschriebenen Emulsionen aus festen Lipiden. Zur Gewährleistung einer hohen Bioakzeptanz und guter in-vivo-Abbaubarkeit werden überwiegend physiologische Lipide oder Lipide aus physiologischen Komponenten, wie zum Beispiel Glyceride aus körpereigenen Fettsäuren, verwendet¹³. Aus Stabilitätsgründen und um einen “targeting effect” zu gewährleisten, werden auch hier Tenside eingesetzt. Die Herstellung erfolgt durch Hochdruckhomogenisation. Dabei wird das als Matrix verwendete Lipid geschmolzen und der Arzneistoff darin gelöst. Bei der Heißhomogenisation wird die arzneistoffhaltige Lipidphase in einer auf gleicher Temperatur befindlichen Tensidlösung mit

einem Rührer dispergiert. Der Temperaturbereich liegt zwischen 40 und 90°C, je nach Schmelzpunkt des Lipids. Die so erhaltene "Präemulsion" wird anschließend in einem Kolben-Spalt-Homogenisator bei Drücken zwischen 200 bar bis maximal 1500 bar im heißen Zustand homogenisiert. Es entsteht eine Emulsion, deren Lipidphase beim Erkalten zu festen Lipidnanopartikeln rekristallisiert. Im Gegensatz dazu wird bei der Kalthomogenisation der Arzneistoff in die flüssige Lipidphase eingebracht und diese Mischphase danach abgekühlt. Nach der Rekristallisation wird die Arzneistoff-Lipidmischung gemahlen, wobei Korngrößen von 50 bis 100 µm erreicht werden. Die Lipidmikropartikel werden dann in einer kalten Tensidlösung dispergiert und diese Suspension dann hochdruckhomogenisiert.

Bei der in beiden Verfahren eingesetzten Hochdruckhomogenisation sind die auftretenden Kavitations- und Scherkräfte groß genug, um die Lipidmikropartikel zu Lipidnanopartikeln zu zerbrechen. Die Kalthomogenisation wird bei der Einarbeitung hydrophiler Pharmaka vorgezogen, weil diese bei einer Heißhomogenisation von der flüssigen Lipidphase in die wässrige Phase übergehen würden. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven oder durch radioaktive Strahlung. Das Freisetzungsprofil der Wirkstoffe ist abhängig von der Matrixzusammensetzung und dem Herstellungsverfahren. In vitro ist sowohl ein burst release als auch eine Freisetzung von Wirkstoffen über einen Zeitraum von sechs Wochen beobachtet worden¹⁴. Auch die Kombination eines burst releases mit einer prolongierten Freisetzung ist möglich. Dieses spezielle Releaseverhalten kann mit folgender Strategie realisiert werden:

Bei der Heißhomogenisierung wird ein hydrophiler Wirkstoff, der in die Lipidphase eingebracht wurde, teilweise nach dem Nernst'schen Verteilungssatz in die wässrige Phase diffundieren. Diese Lösungstendenz ist abhängig von der Temperatur und der Tensid-Konzentration in der wässrigen Phase. Beim Abkühlen kommt es zu einer erneuten Umverteilung des Wirkstoffes mit partieller Anreicherung in den äußeren Bereichen der Lipidmatrix. Der Anteil der Wirkstoffmoleküle, die sich in den äußeren Bereichen der Lipidmatrix befinden, werden im Vergleich zu denen, die im Inneren lokalisiert sind, sehr schnell freigesetzt. Eine Kalthomogenisation mit niedriger Tensidkonzentration würde den initialen burst release verhindern.

Abbildung 2.2 soll diese Zusammenhänge verdeutlichen:

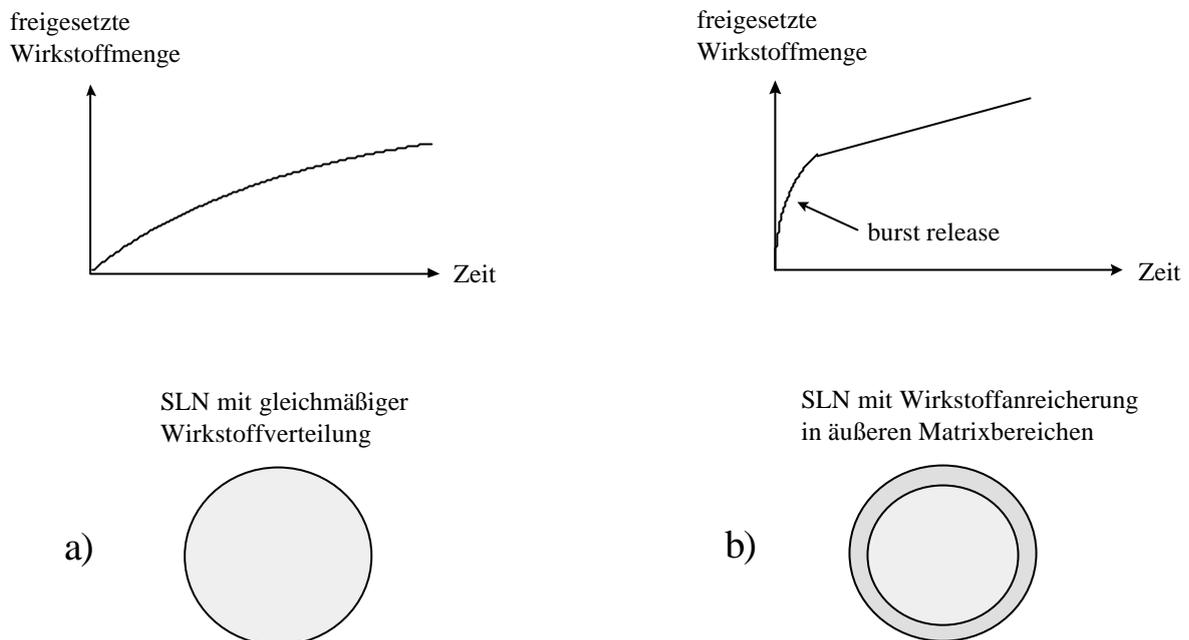


Abb. 2.2: Einfluss der Wirkstoffverteilung auf das Releaseverhalten bei festen Lipidnanopartikeln,

- a) Kalthomogenisation mit niedriger Tensidkonzentration in der wässrigen Phase
- b) Heißhomogenisation mit hoher Tensidkonzentration in der wässrigen Phase

Dieses Beispiel zeigt, dass Pharmazeuten mit den festen Lipidnanopartikeln ein Carrier-System gefunden haben, mit dem sie durch die geeignete Wahl der Herstellungsparameter die Diffusionsgeschwindigkeit des Wirkstoffes aus der Matrix steuern können. In vivo wird die Lipidmatrix durch das Immunsystem abgebaut, so dass die Wirkstoffliberation zusätzlich von der Abbaugeschwindigkeit des Trägersystems abhängig wird. Dabei zeigte sich, dass Cetylpalmitat sehr schnell, Triglyceride aus langkettigen Fettsäuren hingegen langsam abgebaut werden. Außerdem lässt sich die Abbaugeschwindigkeit durch auf die Partikeloberfläche aufgebrauchte Tenside (ethoxylierte Surfactants) vermindern. Der Grund dafür liegt unter anderem in der sterischen Hinderung, so dass abbauende Enzyme nicht mehr zur Partikeloberfläche gelangen können.

Da sich die Entwicklung der festen Lipidnanopartikel für den pharmakologischen Einsatz in einem frühen Stadium befindet, werden hier nur potenzielle Einsatzmöglichkeiten aufgeführt. In der Hautheilkunde sollen hydrolyseempfindliche Wirkstoffe in die festen Lipidnanopartikel eingearbeitet werden. Die geringe Partikelgröße erlaubt es diesem Wirkstoff-Carrier-System direkt durch die

Hautschichten zu wandern. Feste Lipidnanopartikel können auch oral verabreicht werden, weil sie im Gegensatz zu den Liposomen die Magen-Darm-Passage überstehen und in den Blutstrom gelangen. Prinzipiell können feste Lipidnanopartikel aufgrund ihrer Größe auch intravenös eingesetzt werden.

2.1.4 Polymernanopartikel

Ein alternatives Carrier-System zu den festen Lipidnanopartikeln sind Nanopartikel aus Polymeren. Sie bestehen aus natürlichen Polymeren wie Polysacchariden oder synthetischen, mehr oder weniger gewebeverträglichen makromolekularen Materialien wie Polyalkylacrylaten, Polyalkylcyanoacrylaten und Polyalkylvinylpyrrolidonen. Ebenso kommen Acrylpolymeren, Polymilchsäuren und Polylaktide zum Einsatz.

An dieser Stelle soll der allgemeine Begriff "Nanopartikel" näher erläutert werden. Definitionsgemäß sind Nanopartikel kolloidale Systeme, deren Durchmesser von zehn bis 1000 Nanometer reichen. Sie sind aus Polymeren aufgebaut, die bioabbaubar sein können, was aber keine notwendige Bedingung ist. Abhängig von den Synthesebedingungen bei der Nanopartikel-Herstellung werden Nanosphären oder Nanokapseln erhalten¹⁵. Nanosphären bilden eine durchgehende Polymermatrix, über die der Wirkstoff verteilt vorliegt. Man könnte sie auch als "Wirkstoff-Schwämme" bezeichnen. Ihr Aufbau entspricht dem der festen Lipidnanopartikel. Nanokapseln sind aus einer Polymerhaut aufgebaut, die einen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum umschließt und entsprechen in ihrer Morphologie eher den Liposomen.

Die Abbildung 2.3 soll diese Verhältnisse verdeutlichen:

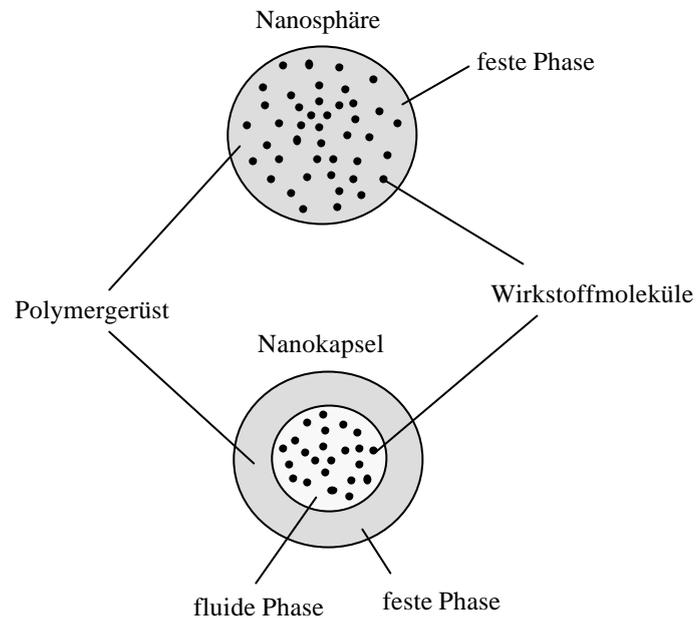


Abb. 2.3: Unterschiede in der Morphologie zwischen einer Nanosphäre und einer Nanokapsel.

Die Unterschiede im Aufbau zwischen Nanosphären und Nanokapseln führen nach Kreuter zu unterschiedlichen Wirkstoff-Freisetzungs-Profilen¹⁶. Unter der Annahme, dass das Polymergerüst nicht abgebaut wird, findet man für eine rein diffusionskontrollierte Wirkstofffreisetzung folgende Verhältnisse:

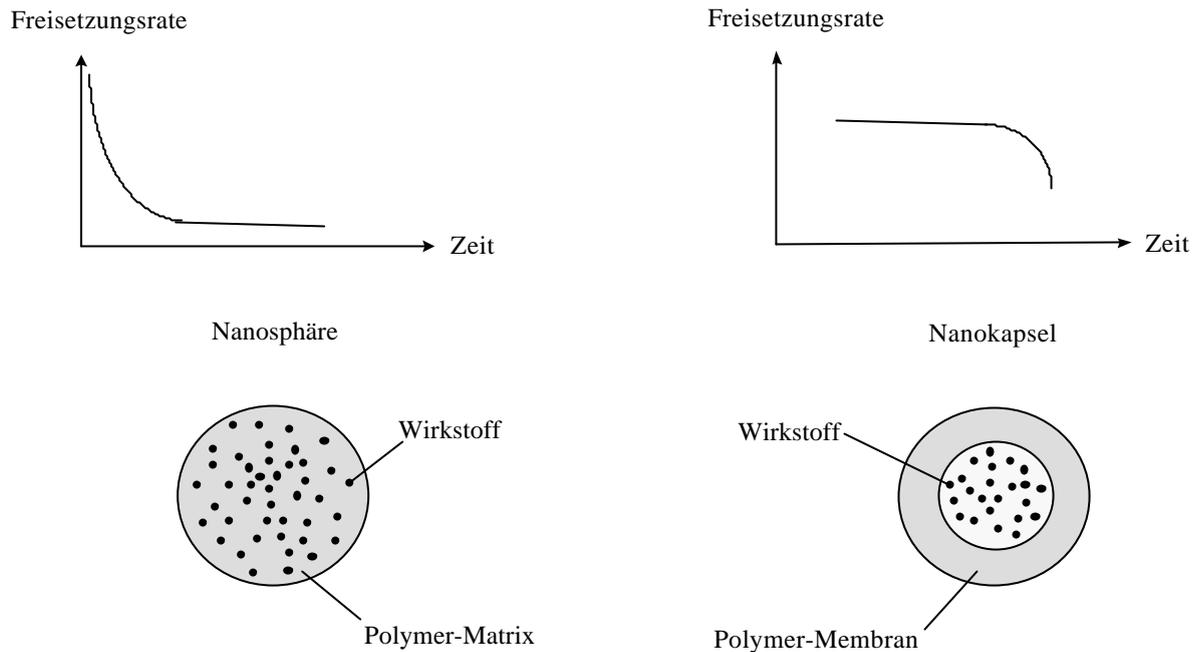


Abb. 2.4: Wirkstoff-Freisetzungprofil nach Kreuter im Vergleich zwischen Nanosphären und Nanokapseln bei einem diffusionsgesteuerten Prozess.

Die Abbildung 2.4 zeigt, dass der Wirkstoff aus Nanosphären schnell entlassen wird. Aus den Nanokapseln beginnt die Wirkstofffreigabe verzögert und verläuft dann über einen längeren Zeitraum nahezu konstant.

2.1.5 Nanosphären

Die Geschichte der Nanosphären begann im Jahre 1976 mit den Arbeiten von Birrenbach und Speiser. Sie synthetisierten Nanosphären aus Polyacrylamiden¹⁷. 1977 konnten Kopf et al. erfolgreich Norephedrin in diese Nanopartikel einschließen¹⁸. Die Herstellung basiert auf einer Polymerisation in einer Mikroemulsion¹⁹. Dabei werden organische Lösemittel, wie Hexan, Toluol oder Chloroform verwendet.

Zur Stabilisierung der Emulsion werden anionische Tenside eingesetzt. Als Starter für die Polymerisation werden Radikale oder auch γ -Strahlung benötigt. Für den täglichen, klinischen Einsatz sind Polyacrylamid-Nanosphären nicht mehr von Interesse. Aufgrund der Reaktionsbedingungen können empfindliche Pharmaka nicht eingesetzt werden, weil sie zerstört werden würden. Die Lösemittel müssen vor dem in vivo-Einsatz quantitativ entfernt werden. Außerdem sind Polyacrylamide nicht bioabbaubar, was zu einer Akkumulierung dieser Substanzen im

Körper führt. Diese Akkumulierung würde mit einer toxischen Reizung des Körpers einhergehen. Polyacrylamid-Nanosphären werden deshalb heute nur noch in der immunologischen Forschung eingesetzt.

1976 präsentierten Kreuter und Speiser ein ähnliches Nanosphären-System, basierend auf Polyalkylmethacrylaten²⁰. Die Synthese erfolgt über eine Dispersions-Polymerisation im wässrigen Medium. Der Vorteil ist, dass im Vergleich zu den Polyacrylamiden keine toxischen, organischen Lösemittel benötigt werden. Die Monomere werden direkt in der wässrigen Phase dispergiert. Als Kettenstarter werden aber auch hier Radikale oder γ -Strahlung eingesetzt, die empfindliche Wirkstoffe zerstören können. Außerdem werden Polyalkylmethacrylate im Körper nicht abgebaut, so dass wiederum Nebenwirkungen auftreten²¹.

In Polyalkylmethacrylat-Nanosphären können sowohl lipophile als auch lipophobe Pharmaka eingebaut werden. Als hervorragende Eigenschaft wird die Fähigkeit, Substanzen mit hohen Molekulargewichten einzuschließen, erwähnt. Hierzu zählen neben bestimmten Grippe-Virionen auch HIV-Antigene.

1979 entwickelte Couvreur eine Methode zur Synthese von Nanosphären aus Polyalkylcyanoacrylaten (PACA), die er 1982 patentieren ließ^{22,23}. Polyalkylcyanoacrylate haben gegenüber den Polyalkylmethacrylaten den Vorteil, dass sie biologisch abbaubar sind und der Polymerisationsprozess vereinfacht und unter moderaten Bedingungen abläuft. Bei dieser anionischen Emulsions-Polymerisation werden Tröpfchen des Monomers in eine wässrige Tensidlösung emulgiert. Die Reaktion wird spontan durch Hydroxid-Ionen aus der Autoprotolyse des Wassers gestartet. Man erhält Sphären mit einem Durchmesser von circa 200 nm. Durch Erhöhung des pH-Wertes und der Tensid-Konzentration kann der Durchmesser bis auf 30 nm reduziert werden²⁴.

Der geringe Durchmesser und die gute Bioverträglichkeit machen diese PACA-Nanosphären zu einem optimalen Trägersystem für Pharmaka. Sie schließen sowohl hydrophile als auch hydrophobe Wirkstoffe mit guter Effizienz ein und können oral oder parenteral appliziert werden. Bisher wurden umfangreiche Untersuchungen mit Zytostatika und Antibiotika durchgeführt. Eine Übersicht wird in einem Review-Artikel von E. Allemann, R. Gurny und E. Doelker vorgestellt²⁵.

Durch Wahl geeigneter Präparationsbedingungen kann die Wirkstoffverteilung innerhalb der PACA-Nanosphären manipuliert werden, was letztendlich Auswirkungen auf das Freisetzungsprofil der pharmazeutisch aktiven Substanzen hat²⁶.

2.1.6 Nanokapseln

1986 wurde von Al Khouri-Fallouh et al. eine Methode vorgeschlagen, mit der Polyalkylcyanoacrylat-Nanokapseln in einer Grenzflächenpolymerisation präpariert werden können²⁷. Der Hohlraum enthält ein Öl, welches lipophile Wirkstoffe lösen kann. Bei der Herstellung wird das Alkylcyanoacrylat-Monomer in einer wasserfreien, das Öl enthaltenden Ethanol-Phase gelöst. Diese organische Phase wird dann in einer wässrigen Tensidlösung dispergiert. Bei Kontakt mit der wässrigen Phase bildet sich eine Öl-in-Wasser-Emulsion. An der Grenzfläche beider Phasen reagiert das amphiphile Monomer in einer anionischen Polymerisation und bildet Nanokapseln. Die Wanddicke liegt bei wenigen Nanometern und ist abhängig vom eingesetzten Monomer. Sie beträgt zum Beispiel bei Polyisobutylcyanoacrylat-Kapseln, wie transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, 3-5 nm²⁸. Das mittels dynamischer Lichtstreuung gemessene Massenmittel der Kapseldurchmesser liegt zwischen 200 und 300 nm, abhängig von den Präparationsbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert der wässrigen Phase, Konzentration des Tensids, des Alkohols und des Monomers^{27,28}. In dem Öl der organischen Phase können lipophile Wirkstoffe gelöst werden, die dann bei der Polymerisation in die Kapsel inkorporiert werden. Untersuchungen zeigen, dass die Tensid-Moleküle, auch Surfactants genannt, teilweise auf der Partikeloberfläche adsorbiert werden. Diese Adsorption hat einen entscheidenden Einfluss auf den Abbauprozess der Nanokapseln. Diese Zusammenhänge werden weiter unten im Text beschrieben. Des Weiteren verhindert das adsorbierte Surfactant eine Agglomeration der einzelnen Kapseln zu Clustern in der Dispersion. Diese Clusterbildung würde die Dispersion für den klinischen Einsatz unbrauchbar machen. Als Surfactants kommen häufig Block-Copolymere zum Einsatz, die über einen zentralen, relativ hydrophoben Teil (z. B. Polypropylenoxid) und einen terminalen, hydrophilen Kettenteil (z.B. Polyethylenoxid) verfügen. Bei dieser sogenannten sterischen Stabilisierung verhindern die in das Dispersionsmedium hineinragenden hydrophilen Polyethylenoxid-Ketten mechanisch die Annäherung der Kapseln, vergleichbar mit zwei Igel, die sich nur auf eine gewisse Distanz annähern können. Zusätzlich verhindern entropische Effekte eine Agglomeration der Kapseln. Bei einer Agglomeration würde die Beweglichkeit der Surfactant-Ketten stark eingeschränkt werden, was mit einer Abnahme der Entropie verbunden wäre. Die "hydrophoben" Polypropylenoxid-Ketten sind auf der Partikeloberfläche fixiert. Die Triebkraft für die Adsorption der Polypropylenoxid-Ketten ist der Entropiegewinn durch die Dehydratisierung bei der Fixierung auf die Partikeloberfläche. Die Dicke dieser Polymerschicht beträgt nach Müller 7-15 nm für Ethylenoxid-Propylenoxid-Block-Copolymere, abhängig von der Hydrophilie der Partikeloberfläche und der genauen Zusammensetzung

des eingesetzten Surfactants²⁹. Nach Tadros et al. sollte diese Schicht zur vollständigen sterischen Stabilisierung größer als 10 nm sein³⁰.

Die Abbildung 2.5 zeigt den schematischen Feinaufbau einer Nanokapsel:

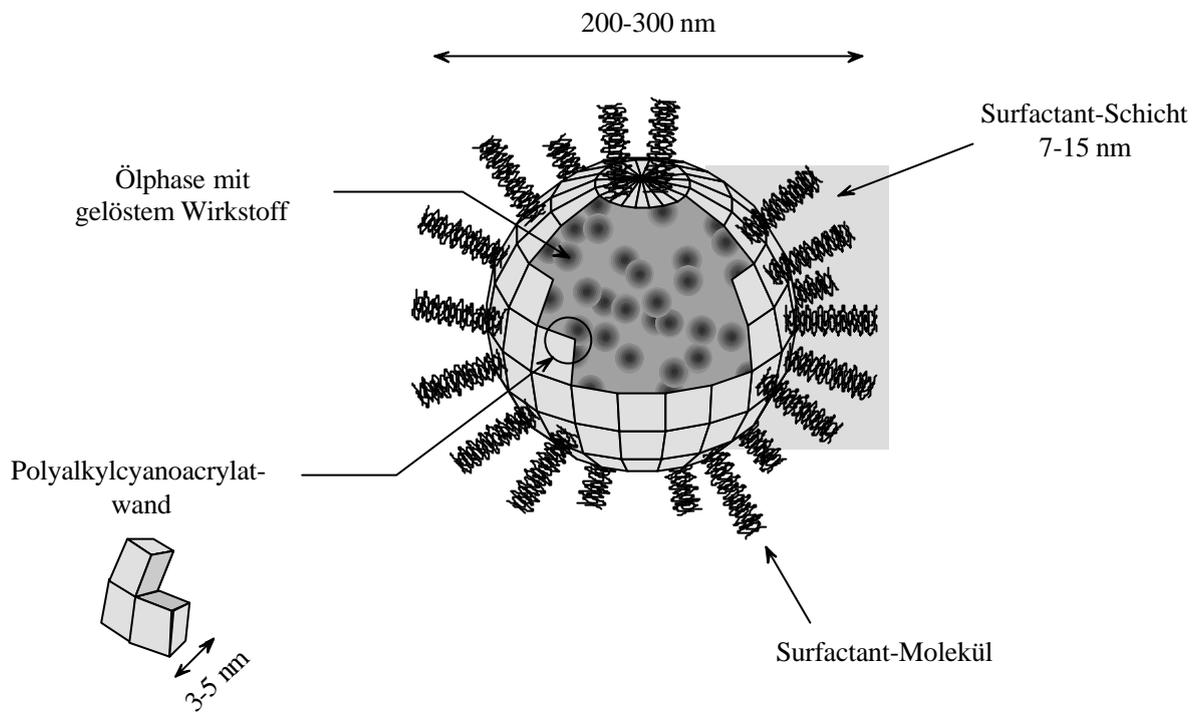


Abb. 2.5: Morphologie einer Nanokapsel.

Die Abbildung 2.6 zeigt das Prinzip der sterischen Stabilisierung durch Surfactants nach Tadros et al.³⁰:

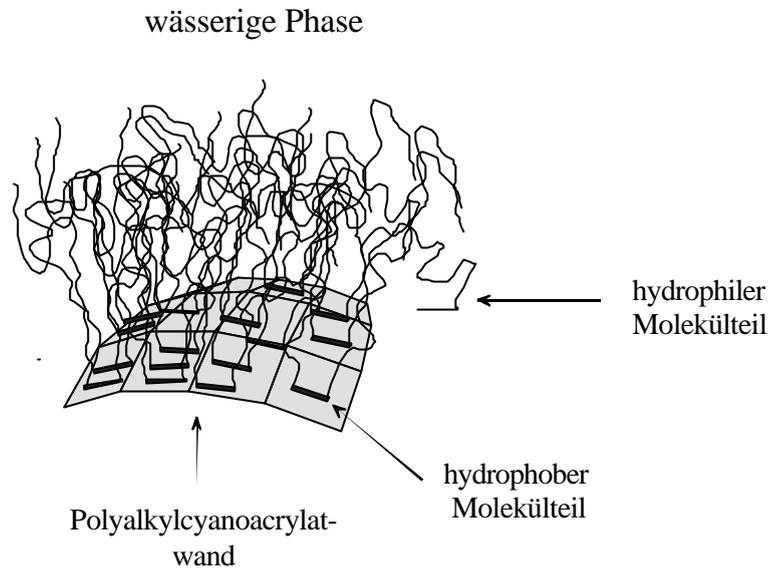


Abb. 2.6: Prinzip der sterischen Stabilisierung: Block-Copolymere adsorbieren mit dem zentralen, hydrophoben Molekülteil auf der Partikeloberfläche, die terminalen, hydrophilen Molekülteile ragen in das Dispersionsmedium hinein. Es entsteht eine mechanische Barriere von mehreren Nanometern Dicke.

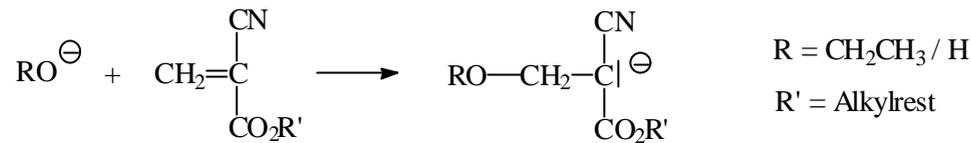
Da die Untersuchung von Polyalkylcyanoacrylat-Nanokapseln Gegenstand dieser Arbeit ist, sollen chemische und pharmazeutische Aspekte näher erläutert werden.

2.2 Die Nanokapselsynthese

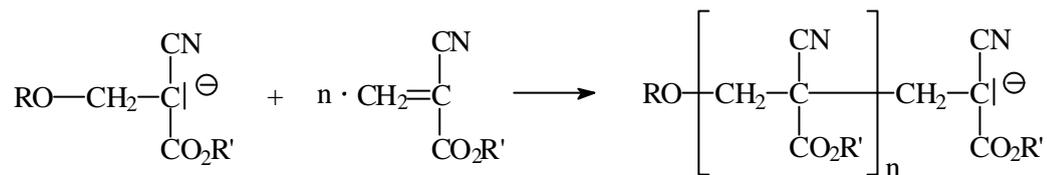
2.2.1 Die anionische Polymerisation von Alkylcyanoacrylaten

Die anionische Polymerisation des Alkylcyanoacrylat-Monomers lässt sich folgendermaßen beschreiben³¹:

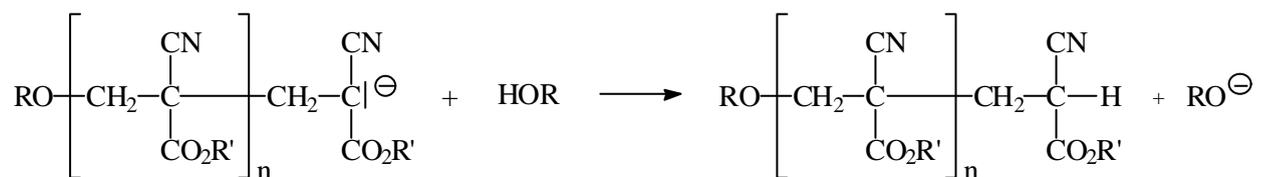
1. Kettenstart



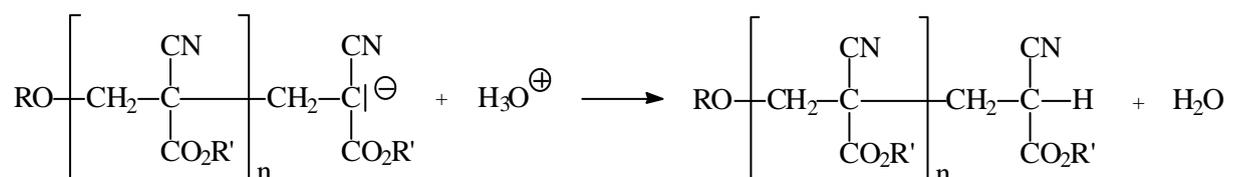
2. Kettenwachstum



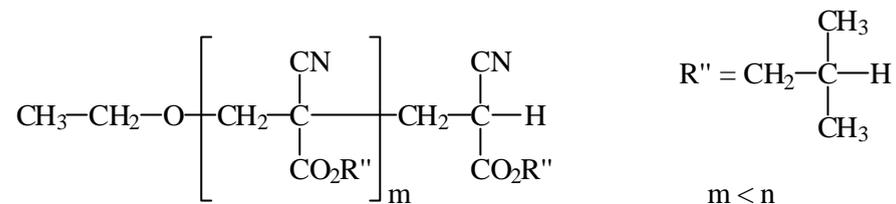
3. Übertragungsreaktion



4. Kettenabbruch



Schon vor dem Eintropfen in die wässrige Phase kommt es in der organischen Phase, zumindest teilweise, zu einer Bildung von Oligomeren. Dieses Ergebnis wurde von M. Gallardo et al. mittels GPC-Messungen bei Versuchen mit Isobutylcyanoacrylaten gefunden³¹. Diese Oligomere bilden sich bei der Reaktion von Ethanolat-Ionen mit den Isobutylcyanoacrylat-Monomeren. Durch ¹H- und ¹³C-NMR-Untersuchungen wurden folgende Spezies identifiziert:



1997 findet M. Wohlgemuth bei seinen ¹H-NMR-Untersuchungen der organischen Phase ebenfalls ein Monomer-Ethanol-Additionsprodukt mit Butylcyanoacrylaten³².

M.Gallardo et al. machen keine Aussagen über den Polymerisationsgrad dieser Oligomere, können aber zeigen, dass diese bei Kontakt mit Wasser spontan zu Polymeren und letztendlich zu Nanokapseln reagieren. Sie kreierten den Begriff "lebendige" Oligomere (short live chain oligomers).

2.2.2 Bildungsmechanismus der Nanokapseln

Für die Bildung der Nanokapseln an der Grenzfläche zwischen organischer und wässriger Phase wurden bisher zwei Bildungsmechanismen vorgeschlagen. Die erste Theorie stammt von Al Khouri Fallouh²⁷. Sie besagt, dass bei Injektion der organischen Phase in die wässrige unter Rühren das in Wasser unlösliche Öl in nanometergroße Tröpfchen dispergiert wird. Unter diesen Bedingungen sollten die vom Rührer erzeugten Scherkräfte einen entscheidenden Einfluss auf die Größe der entstehenden Nanokapseln haben. Dieser Einfluss wurde von N. Altinbas beschrieben. Sie konzipierte einen Stator-Rotor-Rührer mit erhöhten Scherkräften, womit sie, im Vergleich zum Scheiben-Rührer, Nanokapseln mit kleineren Durchmessern erhielt³³. Nach der Dispersion der Öltröpfchen im wässrigen Millieu wandern die amphiphilen Monomermoleküle an die Grenzfläche und polymerisieren dort spontan unter der Einwirkung von Hydroxid-Ionen. Durch die Akkumulation der Monomermoleküle an der Grenzfläche werden die Öltröpfchen durch die Verminderung der Grenzflächenspannung gleichzeitig stabilisiert.

Die Abbildung 2.7 soll den Bildungsmechanismus nach Al Khouri Fallouh verdeutlichen:

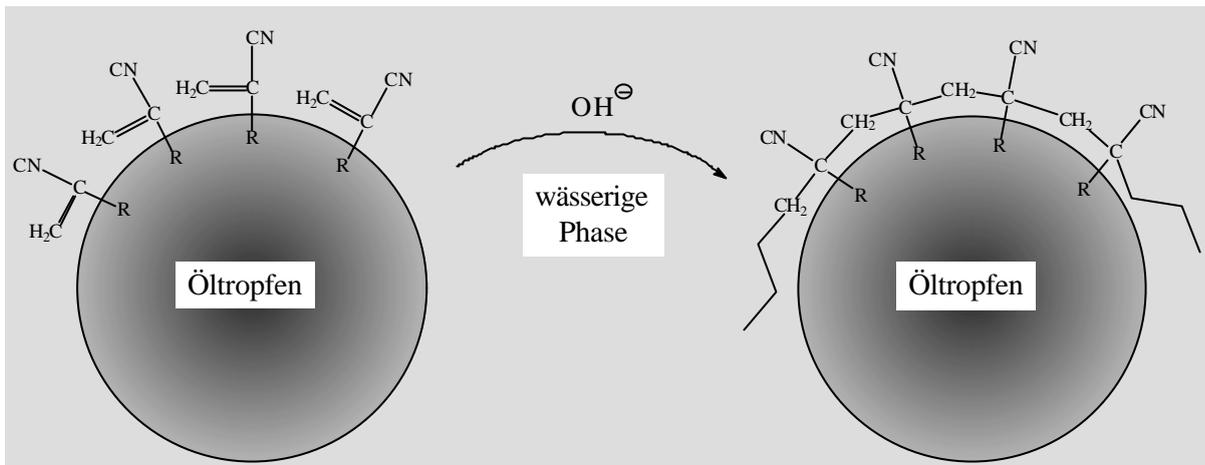


Abb. 2.7: Bildungsmechanismus der Nanokapseln nach N. Al Khouri Fallouh.

Die zweite Theorie basiert auf Untersuchungen von M. Gallardo et al., die die Bildung von Nanokapseln auf die Fragmentierung eines an der Grenzfläche zwischen wässriger und organischer Phase gebildeten Polymerhäutchens zurückführen. Verursacher dieser Fragmentierung sind Strömungsphänomene in dieser Grenzfläche, die folgendermaßen zustande kommen. Monomere und Oligomere der Alkylcyanoacrylate sind gut in Ethanol löslich, dagegen aber schlecht in Wasser. Durch die Diffusion des Ethanols aus der organischen in die wässrige Phase werden ständig Monomer- und Oligomermoleküle in Richtung der Phasengrenze zwischen organischer und wässriger Phase transportiert und dort akkumuliert (*primäre Konvektion*). Bei Kontakt mit der wässrigen Phase kommt es zur Polymerisation unter Ausbildung eines dünnen Polyalkylcyanoacrylat-Häutchens, welches für nachfolgende Monomere und Oligomere als Diffusionsbarriere wirkt. Gleichzeitig verhindert dieses Häutchen ein Eindringen terminierender Oxonium-Ionen, sodass das Polymerwachstum in Richtung der organischen Phase gewährleistet ist. Aufgrund der primären Konvektion und der oberflächenaktiven Eigenschaften der Monomere und Oligomere kommt es in der Grenzschicht zu lokalen Schwankungen der Oberflächenspannung. Diese Gradienten der Oberflächenspannung erzeugen Turbulenzen (*sekundäre Konvektion*) in der organischen Phase an der Grenzschicht, deren Krafteinwirkung letztendlich die Fragmentierung einleitet. Strömungen entlang eines Gradienten der Oberflächenspannung werden als Marangoni-Effekt bezeichnet. In Flüssigkeiten, in denen der Marangoni-Effekt auftritt, werden Strömungen von Orten niedriger zu Orten hoher Oberflächenspannung beobachtet³⁴. In dem hier beschriebenen

System sind, im Vergleich zu reinen Flüssigkeiten, die Verhältnisse komplizierter, sodass der genaue Mechanismus der Nanokapselbildung nach Gallardos Theorie bislang nicht geklärt ist.

Abbildung 2.8 soll die oben beschriebenen Verhältnisse verdeutlichen:

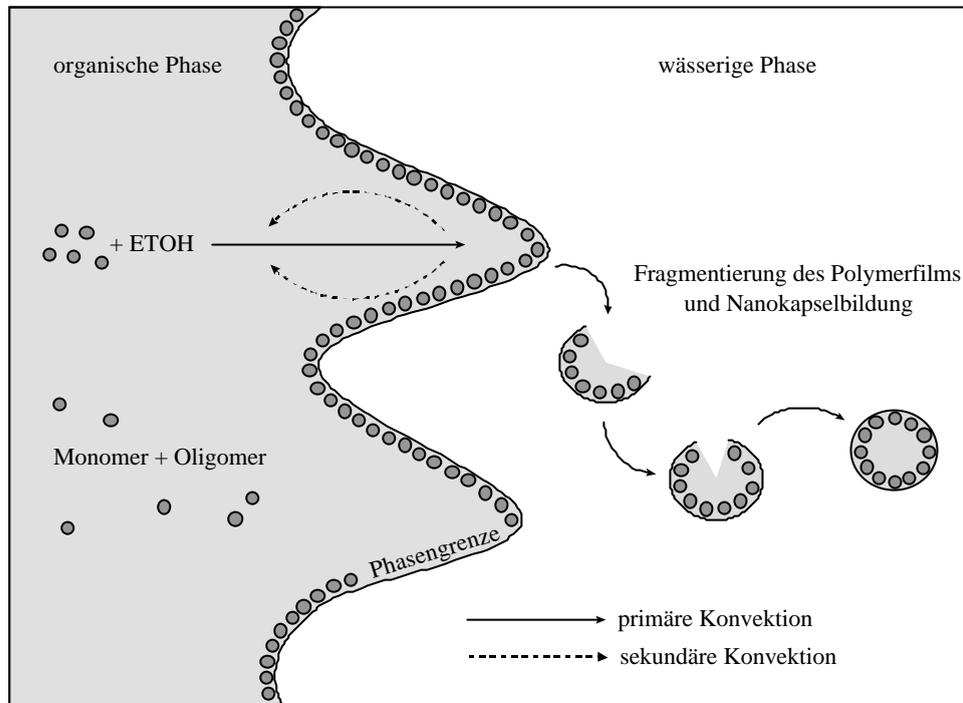


Abb. 2.8: Darstellung der Grenzflächen-Polymerisation von Alkylcyanoacrylaten nach Gallardo et al..

U. Großpietsch findet mit der Methode der dynamischen Lichtstreuung ein Gewichtsmittel der Molmasse des Polymers von $86 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ für Nanokapseln bestehend aus Polybutylcyanoacrylat³⁵.

Aus geometrischen Überlegungen wird damit klar, dass Nanokapseln nicht aus einem langen, aufgewickelten Polymerknäuel bestehen, vergleichbar mit einem Kokon, sondern aus Aggregaten vieler Polymereinheiten.

Im folgenden sollen die Einflüsse der einzelnen physikalischen und chemischen Komponenten bei der Nanokapsel-Präparation beleuchtet werden.

2.2.3 Diskussion der Parameter bei der Nanokapselsynthese

2.2.3.1 Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes auf die Kapselgrößen

Zur Ermittlung des Temperatureinflusses bei der Nanokapsel-Präparation wurde die Reaktion mit Isobutylcyanoacrylaten in einem Temperaturintervall von 4 bis 90°C durchgeführt. Mit steigender Temperatur erhöht sich das Massenmittel der Kapseldurchmesser von 249 auf 334 nm. Parallel dazu findet man eine Zunahme der Polydispersität²⁷.

Nach Al Khouri sind in einem pH-Wert-Bereich von 4-10 Nanokapseln aus Polyisobutylcyanoacrylaten mit einer engen Größenverteilung darstellbar, über deren absolute Größe aber keine Angaben gemacht werden. Unterhalb eines pH-Wertes von 4 steigt die Polydispersität²⁷. Chouinard et al. zeigen, dass der pH-Wert nur einen geringen Einfluss auf die Größe von Polyisohexylcyanoacrylat-Nanokapseln hat. In dem pH-Wert-Intervall von 3 bis 9 reduziert sich das Massenmittel der Nanokapseldurchmesser linear von 250 auf 210 nm³⁶.

Nach den vorgestellten Bildungsmechanismen sollte der pH-Wert eigentlich weitere Einflüsse auf die Morphologie der Kapselwand haben. Der Polymerisationsgrad und damit das Molekulargewicht der die Nanokapsel aufbauenden Polymereinheiten hängt von dem Gleichgewicht zwischen Kettenstart, Kettenwachstum und Kettenabbruch ab. Die Anzahl der wachsenden Ketten in der Grenzschicht zwischen der organischen- und wässrigen Phase wird bestimmt durch die Konzentration der Startermoleküle. Bei hoher Hydroxid-Ionen-Konzentration ist diese Anzahl hoch, der Polymerisationsgrad gering. Nach diesen Überlegungen wird die Dichte und die Oberflächenstruktur der Nanokapselwand durch den pH-Wert beeinflusst, was letztendlich einen erheblichen Einfluss auf das Release-Verhalten haben sollte. In der Literatur werden bezüglich dieser Thematik bisher noch keine Aussagen gemacht.

2.2.3.2 Einfluss von Art und Menge des Tensids auf die Kapselgrößen

Nach Chouinard et al. hat die Konzentration des Surfactants keinen signifikanten Einfluss auf den Durchmesser der Nanokapseln³⁶. Dieses Ergebnis wurde bei Versuchen mit Isohexylcyanoacrylaten (IHCA) und Isobutylcyanoacrylaten (IBCA) gefunden. Dabei wurde die Surfactant-Konzentration (Poloxamer 407) von 0.031 auf 0.5 Gewichtsprozent bezüglich der wässrigen Phase erhöht und nur Änderungen der Kapseldurchmesser innerhalb der statistischen Schwankungen gefunden. Es scheint allerdings eine kritische Surfactant-Konzentration zu geben, unterhalb derer keine Nanokapseln mehr gebildet werden. Diese liegt für Poloxamer 407 bei IBCA höher als bei IHCA.

2.2.3.3 Einfluss des Öl-Ethanol-Verhältnisses auf die Kapselgrößen

Al Khouri et al. ermittelt bei der Kapselsynthese mit Isobutylcyanoacrylaten, dass mit einer Zunahme der Ethanolmenge von 5 bis 50 Volumenprozent (bezogen auf das Gesamtvolumen aus wässriger und organischer Phase) kleinere Nanokapseln gebildet werden²⁷. Unterschreitet die Ethanolmenge einen Grenzwert von 10 Vol.% werden keine Kapseln mehr gebildet. Man beobachtet dann Polymerflocken. Erst ab 15 Vol.% Ethanol bilden sich isolierte Nanokapseln in der erwünschten Größenordnung.

Chouinard et al. finden bei Kapseln aus Isobutylcyanoacrylaten ebenfalls die oben beschriebenen Tendenzen³⁶. Sie gehen allerdings noch einen Schritt weiter und bestätigen durch ihre Untersuchungen den von Al Khouri et al. vorgestellten Bildungsmechanismus. Sie entdeckten, dass die Nanokapselgröße identisch ist mit der Öltröpfchengröße in Emulsionen mit identischem Öl zu Ethanol-Verhältnis, allerdings ohne Polymerhülle. Dies lässt den Schluss zu, dass die Polymerhülle erst entsteht, wenn die Öltröpfchen bereits im Nanometerbereich in der wässrigen Phase dispergiert sind. Aus diesem Grund ist die Nanokapselgröße auch unabhängig von der Reaktionskinetik bei der Polymerisierung (s. Ergebnisse pH-Wert-abhängige Messungen). Da die Alkylcyanoacrylat-Monomere bei der Polymerisation, außer durch Entanglements, kein verzweigtes Netzwerk ausbilden können, sehen Chouinard et. al die linearen Polymerketten mehr als "mobile Emulsions-Stabilisierer", denn als Bestandteile einer festen Kapselwand.

M. Gallardo et al. finden hinsichtlich der Optimierung der Kapselgröße und der Größenverteilung bei Polyisobutylcyanoacrylat-Nanokapseln ein optimales Volumenverhältnis von Miglyol 812 zu Ethanol von 1:50. Wenn kein Öl in die organischen Phase eingebracht wird, beobachtet man lediglich die Bildung von Nanosphären³¹.

2.2.3.4 Einfluss der Monomermenge auf die Kapselgrößen

Die Variation der Menge des Isohexylcyanoacrylat-Monomers im Intervall von 0.3 bis 2 Vol.% in der organischen Phase bewirkt keine signifikante Änderung der Nanokapselgröße. Da die Anzahl der gebildeten Nanokapseln bei Konzentrationsänderung des Monomers pro Volumeneinheit konstant bleibt, schlossen Chouinard et al., dass sich lediglich die Dicke und / oder die Dichte, der Nanokapselwand ändert³⁶. Damit wäre für den Pharmazeuten eine neue Möglichkeit eröffnet, das Release-Verhalten durch einfache Variation der Monomermenge zu steuern. Allerdings bleibt zu beachten, dass im klinischen Einsatz mit wachsender Polymermenge das Risiko einer Intoxikation steigt.

Im Gegensatz zum oben Genannten, berichteten Rollot et al. in einer früheren Arbeit von einem Anstieg der Kapselgröße mit steigendem Monomergehalt bei Polyisobutylcyanoacrylat-Nanokapseln. Die Monomerkonzentration wurde hier von 0.4 bis 1 Vol.% variiert, bezogen auf die organische Phase²⁸.

Inwieweit die Konstitution der Alkylkette und die Konzentration des Monomers einen Einfluss auf die Nanokapselgröße haben, bleibt Gegenstand weiterer Forschungen.

2.3 Pharmazeutische Aspekte der Nanokapselforschung

Ein Großteil der Literatur beschäftigt sich mit den Eigenschaften von Nanosphären aus Polyalkylcyanoacrylaten. Da aber Phänomene wie die Abwehrreaktion oder der Abbau der Polymermatrix an der Kapseloberfläche stattfinden, werden Ergebnisse, die an Nanosphären gefunden werden, oftmals verallgemeinernd auch auf Nanokapseln übertragen.

2.3.1 Nanopartikelverteilung und Abbau im Körper

Im Tierversuch wurde festgestellt, dass sich Nanopartikel nach intravenöser Verabreichung innerhalb weniger Minuten in den phagozytierenden Zellen des sogenannten retikuloendothelialen Systems (RES) ansammeln. Es handelt sich hierbei um ein über den gesamten Organismus verbreitetes System von Zellen, deren Hauptaufgabe die Phagozytose ist. Zum RES gehören verschiedene Zelltypen, unter anderem auch die Makrophagen. Des weiteren werden die Nanokapseln nach intravenöser Applikation von bestimmten Zellen der Leber und Milz phagozytiert^{27,37}. Nach der Phagozytose erfolgt der enzymatische Abbau des Polyalkylcyanoacrylat-Polymergerüsts. Der Prozess soll anhand einer Zeichnung verdeutlicht werden:

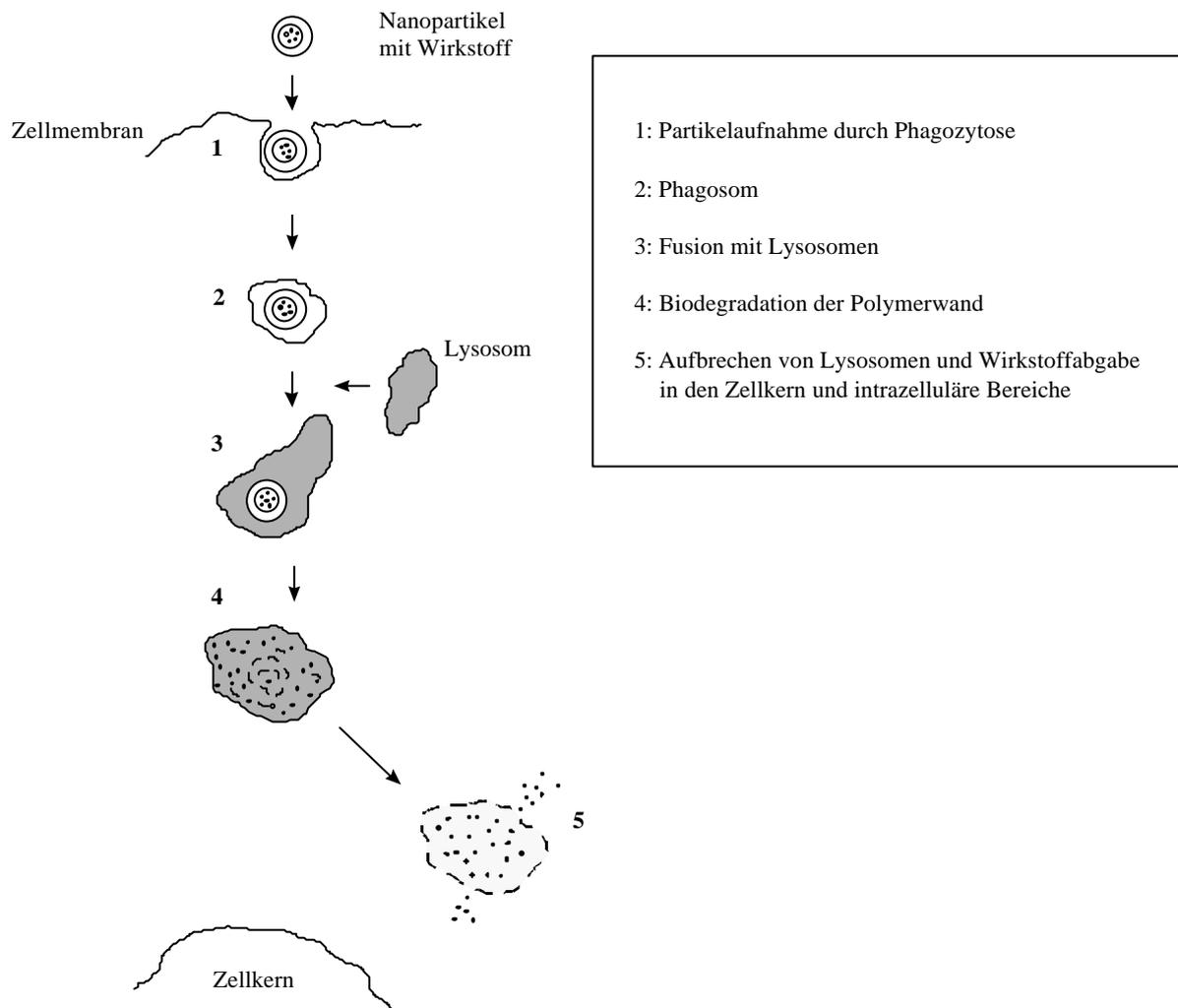


Abb. 2.9: Schema der Phagozytose von Nanopartikeln durch Zellen des RES. Nach der Biodegradation des Polymergerüsts wird der Wirkstoff in das Zellinnere entlassen.

Der wichtigste Schritt bei der Biodegradation ist die unter Punkt drei beschriebene Fusion des Phagosoms mit Lysosomen, die die für den Polymerabbau nötigen Enzyme tragen. Nach dem heutigen Stand der Forschung wird das Polymergerüst in einem sogenannten Oberflächen-Erosions-Prozess gelöst. Dabei wird die Ester-Seitenkette der Polyalkylcyanoacrylate durch esterasekatalysierte Hydrolyse abgebaut.

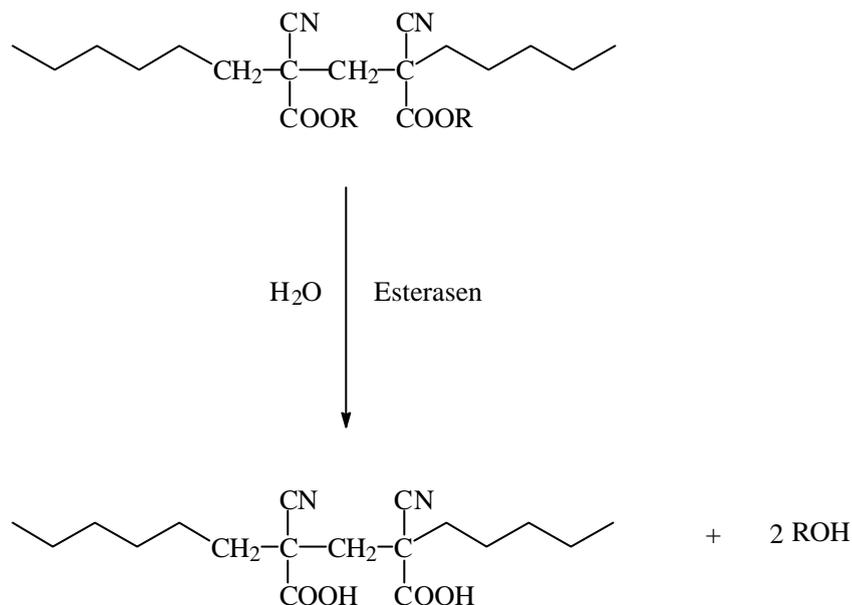


Abb. 2.10: Hydrolytische Spaltung der Ester-Seitenkette in Polyalkylcyanoacrylaten durch Esterasen.

Durch diesen Mechanismus bleibt das Polymergerüst intakt. Mit fortschreitender Reaktion aber wird es hydrophiler, bis sich einzelne Ketten von der Partikeloberfläche lösen und in das wässrige Dispersionsmedium abdiffundieren. In in vitro-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die gebildete Alkoholmenge von der Konzentration zugefügter Esterasen abhängig ist³⁸. Die Abbaugeschwindigkeit ist abhängig von der Ester-Seitenkettenlänge. Es konnte gezeigt werden, dass Partikel aus Polymethyl- und Polyethylcyanoacrylaten langsam abgebaut werden. Dagegen sind die Abbaugeschwindigkeiten für Partikel aus Polyisobutyl- und Polyisohexylcyanoacrylaten signifikant größer. Auch dieses Ergebnis wird in der Zukunft für Pharmazeuten interessant sein, weil mit der Wahl eines geeigneten Monomers ein einfacher Weg geöffnet wird, das Release-Verhalten zu beeinflussen³⁹.

Durch die Immunreaktion werden Nanopartikel schnell aus dem Blutstrom eliminiert, ein Umstand, der das erwünschte Targeting schwierig macht. Oftmals wird es der Wunsch der Pharmazeuten sein, andere Organe als Leber und Milz zu medikamentieren. Das ist nur möglich, wenn wirkstoffbeladene Partikel die für die Wanderung zum Zielort benötigte Zeit im Blutstrom verbleiben. Es gibt einige physiko-chemische Oberflächeneigenschaften, die die Verweildauer der Nanopartikel im Blutstrom beeinflussen.

Ein niedriges ξ -Potential sowie eine hydrophile Oberfläche bremsen die immunologische Erkennung und die Phagozytierung^{40,41}. Auch hier kann ein Coating der Partikeloberfläche mit Polymeren, die Ethoxy-Gruppen enthalten, eine Aufnahme durch Makrophagen verhindern und eine längere Zirkulation im Blut ermöglichen⁴².

Des Weiteren haben solche Tenside einen Einfluss auf die Oberflächenporosität der Nanopartikel aus Polyalkylcyanoacrylaten⁴³.

Um ein effektives Targeting zu gewährleisten, müssen die Partikel, neben einer genügend langen Aufenthaltsdauer im Blutstrom, gewebespezifische Affinitäten besitzen. Dies erreicht man beispielsweise durch das Anheften monoklonaler Antikörper auf die Oberfläche, die mit Oberflächenstrukturen der Zellen (z.B. Tumorzellen) im Zielgewebe in Wechselwirkung treten⁴⁴.

2.3.2 Toxizität von Nanopartikeln

Die Toxizität der Nanopartikel ist abhängig von der Länge der Ester-Seitenkette. Es besteht die Vermutung, dass die Toxizität mit einer lokalen Konzentrationserhöhung der Nanopartikel-Abbauprodukte pro Zeit- und Volumeneinheit auf Zelloberflächen steigt. Damit sollten Partikel, die eine hohe Affinität zu einer bestimmten Zellspezies haben, toxischer sein, als jene mit geringerer Affinität. Kurzkettige Esterreste sind relativ zu ihren längeren Homologen toxischer. Ausnahmen dieser Faustregel werden mit Unterschieden in der Oberflächenaffinität erklärt.

Allgemein sind kleinere Nanopartikel toxischer als größere, weil hier aufgrund des erhöhten Oberflächen-Volumen-Verhältnisses mehr toxische Abbauprodukte pro Zeiteinheit auf Zelloberflächen abwandern können³⁹.

2.4 Medikationszielrichtungen von Nanopartikeln

Nanopartikel könnten bei Infektionen im Organismus angewendet werden, besonders bei denen der inneren Organe wie Milz, Nieren und Lungen. Auch in der Augenheilkunde könnten Nanopartikel zum therapeutischen Einsatz kommen. Inkorporierte Zytostatika sind teilweise schon erfolgreich im Tierversuch eingesetzt worden. Bemerkenswert ist, dass Nanopartikel die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, wie kürzlich von Kreuter et al. gezeigt wurde⁴⁵. Auch der Einsatz als Trägermedium für Impfstoffe und Virostatika, besonders in der HIV-Therapie, wird diskutiert⁴⁶. Ergänzend ist die subkutane, intramuskuläre und perorale Applikation über den Darmkanal wegen der hohen Stabilität von Nanopartikeln möglich. 1994 wurde von Yu und Chang vorgeschlagen,

speziell Nanokapseln als Träger von Hämoglobin zu nutzen, um auf diese Weise einen bequemen, künstlichen Blutersatzstoff zu erhalten⁴⁷.

Ein kommerzieller Durchbruch ist bisher mit Nanopartikeln noch nicht erfolgt. Dies hat folgende Gründe:

- Fehlen langzeitlicher Toxizitätsstudien von leeren Placebonanopartikeln in vitro und am Tier.
- Nichtvorliegen klinischer langzeitlicher Verträglichkeitsprüfungen von Placebo-Nanopartikeln an einer größeren Probandenzahl.
- Bedenken der Hersteller gegenüber einer relativ anspruchsvollen Arzneiform, die bei jeder noch so geringen Veränderung neu registriert werden muss.

2.5 Größenvergleich der Drug-Carrier-Systeme

Zum Schluss des Kapitels soll dem Leser ein zusammenfassender Größenvergleich der hier vorgestellten Carrier-Systeme präsentiert werden:

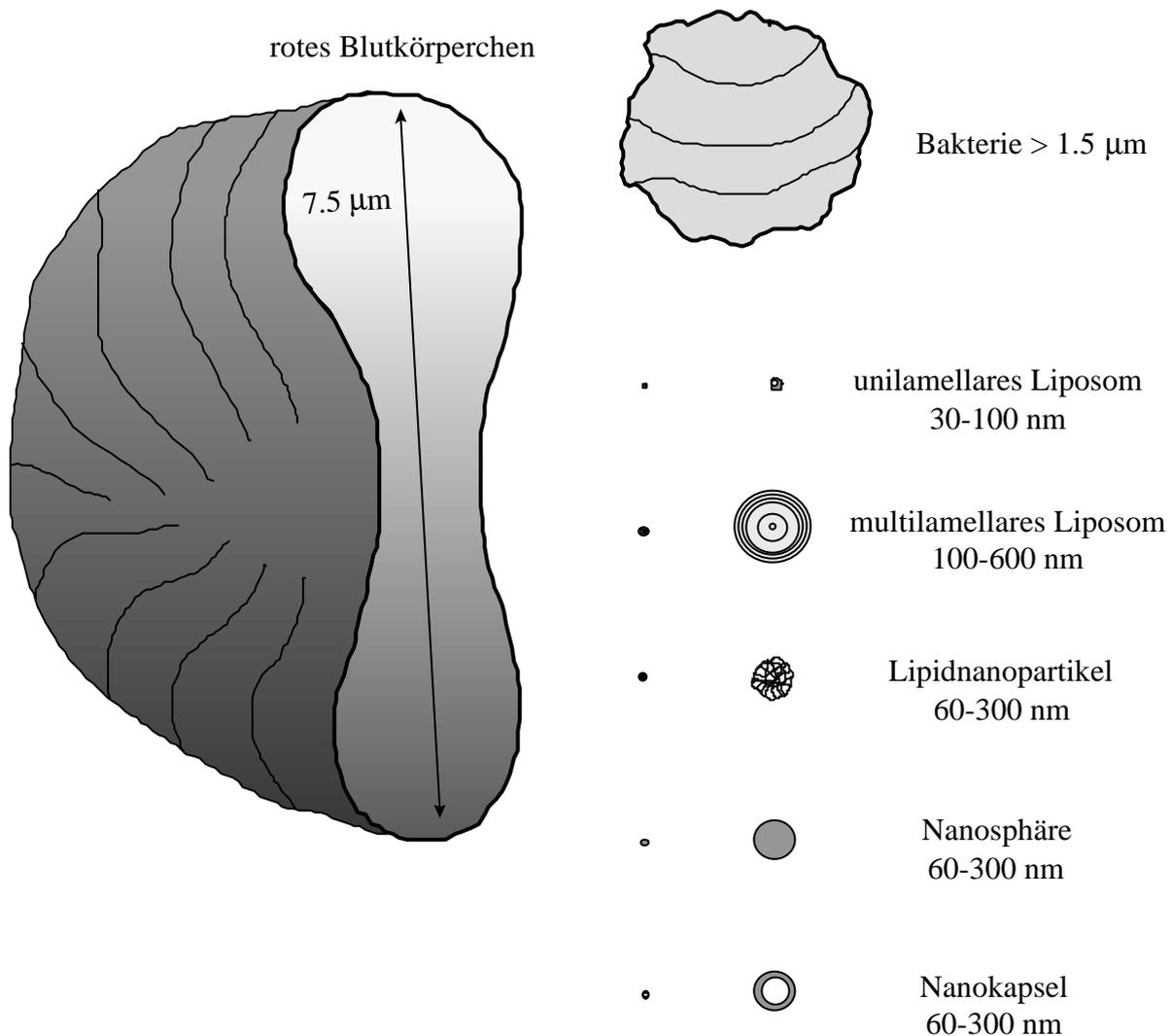


Abb. 2.11: Größe einiger Drug-Carrier-Systeme mit charakteristischen, durchschnittlichen Durchmessern im Vergleich zu einem roten Blutkörperchen und einer Bakterie. Dabei ist zu beachten, dass rote Blutkörperchen gerade durch die kleinsten Blutgefäße im Körper wandern können.

Literatur:

1. Auterhoff, Knabe, Höltje; Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, S.50, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1991)
2. R.H. Müller, G.E. Hildebrand, "Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1997)
3. P.Couvreur, CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 5, 1-20, (1988)
4. J.Kreuter, "Nanoparticles" in Drug Delivery Systems, Dekker, New York (1994)
5. Alberts et al., Molekularbiologie der Zelle, 2. Aufl., S.381-389, 540-542, Weinheim: VCH Verlagsges. (1990)
6. Gregoriadis, Liposomes as Drug Carriers, Recent Trends and Progress, Chichester: Wiley (1988)
7. R. Schubert, H. Wolburg, K.-H. Schmidt, H.J. Roth, Chem. Phys. Lipids, 58, 121, (1991)
8. Arndt, D.; Fichtner; I.; Liposomen. Darstellung, Eigenschaften, Anwendungen; Akademie-Verlag Berlin (1986)
9. C. Huang, Biochemistry, 8, 344, (1969)
10. G. Gregoriadis, Liposome Technology, Vol.1, 1st Edition , Preparation of Liposomes, CRC Press, Boca Raton Florida, (1984)
11. H. Rainer, G. Müller, W. Mehnert, Deutsche Apotheker Zeitung 135 (28), 2597, (1995)
12. C. Schwarz, W. Mehnert, J.S. Lucks, R.H. Müller, J. Controlled Rel. 30, 83, (1994)
13. R.H. Müller, W. Mehnert, J.S. Lucks, C. Schwarz, A. zur Mühlen, H. Weyhers, C. Freitas, D. Rühl, Eur. J. Pharm. Biopharm. 41, 62, (1995)
14. D. Papahadjopoulos, Liposomes in Drug Delivery, 21 Years on. London, 12-15 December 1990, (1990)
15. P. Couvreur, C. Dubernet, F. Puisieux, Eur. J. Pharm. Biopharm. 41, (1), 2, (1995)
16. J. Kreuter, "Nanoparticles" in Colloidal Drug Delivery Systems, S.257, Dekker New York (1994)
17. G.Birrenbach, P. Speiser, J. Pharm. Sci., 65, 1763, (1976)
18. H. Kopf, R.K. Joshi, M. Soliva, P. Speiser, Pharm. Ind., 39, 993, (1977)
19. C. Vauthier-Holtzscherrer, S. Benabbou, G.Spenlehauer, M. Veillard, P. Couvreur, S.T.P. Pharma 1, 109, (1991)
20. J. Kreuter, P. Speiser, J. Pharm. Sci., 65, 1624, (1976)
21. J. Kreuter, U. Täuber, V. Illi, J. Pharm. Sci., 68, 1443, (1979)

22. P. Couvreur, B. Kante, M. Roland, P. Guiot, P. Bauduin, P. Speiser, *J. Pharm. Pharmacol.* 31, 331, (1979)
23. P. Couvreur, M. Roland, P. Speiser, Biodegradable submicroscopic particles containing a biologically active substance and compositions containing them, US. Patent 4, 329, (1982)
24. B. Seijo, E. Fattal, L. Roblot-Treupel, P. Couvreur, *Int. J. Pharm.*, 62, 1, (1990)
25. E. Allemann, R. Gurny, E. Doelker, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 39, 5, 173, (1993)
26. P. Couvreur, C. Vauthier, *J. Contr. Rel.*, 17, 187, (1991)
27. N. Al Khouri-Fallouh, L. Roblot-Treupel, H. Fessi, J.P. Devissaguet, F. Puisieux, *Int. J. Pharm.*, 28, 125, (1986)
28. J.M. Rollot, P. Couvreur, L. Roblot-Treupel, F. Puisieux, *J. Pharm. Sci.*, 75, 361, (1986)
29. R. Müller, *Zetapotential und Partikelladung: Wiss. Verl.-Ges.*, S. 195, (1996)
30. Th. F. Tadros, *The Effect of Polymers on Dispersion Properties*, Academic Press (1984)
31. M. Gallardo, G. Courazze, B. Denizot, L. Treupel, P. Couvreur and F. Puisieux, *Int. J. Pharm.*, 100, 55, (1993)
32. M. Wohlgemuth: *Optimierung der Synthese von Nanokapseln und deren Größenbestimmung mittels der Durchlicht-Dunkelfeldmikroskopie*, Diplomarbeit am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Duisburg (1997)
33. N. Altinbas, *Optimierung der Monodispersität von Nanokapseln*, Diplomarbeit am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Duisburg (1998)
34. D. Myers, *Surfaces, Interfaces and Colloids, Principles and Application*, S.99, VCH (1991)
35. U. Großpietsch, *Ausschlusschromatographie-Vielwinkelstreulichtphotometer-Kopplung zur Charakterisierung von Nanokapseln*, Diplomarbeit am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Duisburg (1997)
36. F. Chouinard, F.W.K. Kan, J.-C. Leroux, C. Foucher, V. Lenaerts, *Int. J. Pharm.* 72, 211, (1991)
37. S.J. Douglas, S.S. Davis, L. Illum, *Int. J. Pharm.* 34, 145, (1986)
38. F. Lenaerts, P. Couvreur, D. Christiaens-Leyh, E. Joiris, M. Roland, B. Rollmann, P. Speiser, *Biomaterials*, 5, 65, (1984)
39. R. H. Müller, C. Lherm, J. Herbot, T. Blunk, P. Couvreur, *Int. J. Pharm.* 84, 1, (1992)
40. D.J. Wilkins, P.A. Myers, *Br. J. Exp. Pathol.*, 47, 568, (1966)

41. C.J. van Oss, C.F. Gillman, A.W. Neumann, Phagocytic Engulfment and Cell Adhesiveness as Cellular Surface Phenomena , Dekker, New York, (1975)
42. L. Illum, S.S. Davis, R.H. Müller, P. West, Life Sci., 40, 367, (1987)
43. M.A. Vandelli , M. Fresta, G. Puglisi, F. Forni, J. Microencapsulation, Vol. 11, No. 5, 531, (1994)
44. L. Illum, P.D.E. Jones, J. Kreuter, R.W. Baldwin, S.S. Davis, Int. J. Pharm., 17, 65, (1983)
45. “Blut-Hirn-Schranke überwunden”, Pressemitteilung der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, 11-04-1997
46. New Trends in Vaccine Research and Development: Adjuvants, Delivery Systems and Antigen Formulations, S. 1-102, Elsevier (1998)
47. W.P. Yu, T.M.S. Chang, Art. Cells, Blood Subs. and Immob. Biotech., 22 (3), 889, (1994)