

Untersuchungen zur Anwendbarkeit von Polyelektrolytmultischichten für Drug-Eluting Stents zur lokalen Freisetzung von Paclitaxel

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Fakultät Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Lutz Kröhne
aus Jena

April 2009

Diese Doktorarbeit entstand in der Zeit von September 2002 bis April 2009 am
Lehrstuhl Pharmazeutische Technologie an der Universität Regensburg.

Die Arbeit wurde von Prof. Dr. Achim Göpferich angeleitet.

Promotionsgesuch eingereicht am: 15.04.2009
Mündliche Prüfung am: 29.05.2009
Prüfungsausschuss:
Prof. Dr. J. Heilmann (Vorsitzender)
Prof. Dr. A. Göpferich (Erstgutachter)
Prof. Dr. J. Wegener (Zweitgutachter)
Prof. Dr. J. Schlossmann (Drittprüfer)

Index

1	Einleitung.....	5
1.1	Drug-Eluting Stents	7
1.2	Polyelektrolytmultischichten	11
1.2.1	Die Layer-by-Layer Technik	11
1.2.2	Polyelektrolyte.....	12
1.2.3	Adsorption von Polyelektrolyten an Grenzflächen.....	17
1.2.4	Wachstum und Struktur von Multischichten	18
1.2.5	Polyelektrolytmultischicht-Hohlkapseln	21
1.3	Eigenschaften von Polyelektrolytmultischichten.....	25
1.3.1	Einflussparameter auf die Struktur von PEM.....	25
1.3.2	Permeabilität von PEM.....	26
1.4	Aufbau von Wirkstoff-Polyelektrolyt-Multischicht Strukturen	29
1.4.1	Direkte LbL-Beschichtung von Wirkstoffen	29
1.4.2	Beladung von LbL-Hohlkapseln	30
1.4.3	Beladung über poröse Template	31
1.4.4	LbL-Beschichtung von Mikrogelen	32
1.4.5	Einbau von Wirkstoffen in PEM.....	33
1.5	Polyelektrolytmultischichten zur lokalen Freisetzung von Paclitaxel	36
1.6	Zielsetzung der Arbeit	39
2	Material und Methoden.....	40
2.1	Materialien.....	40
2.1.1	Paclitaxel.....	40
2.1.2	Polyethylenimin	41
2.1.3	Poly(L-lysin)	41
2.1.4	Poly(L-glutaminsäure)	42
2.1.5	Polyallylaminhydrochlorid.....	43
2.1.6	Polystyrolsulfonat	43
2.1.7	Polydiallyldimethylammoniumchlorid.....	44
2.1.8	Objektträger	44
2.1.9	Quarzküvetten.....	44
2.1.10	Siliziumscheiben	44
2.1.11	Chemikalien	44

2.2	Methoden	45
2.2.1	Allgemeine Durchführung der LbL-Beschichtung	45
2.2.2	Quarzmikrowaage	46
2.2.3	UV/Vis-Spektroskopie	50
2.2.4	Analyse der Wirkstofffreisetzung	52
2.2.5	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie	52
2.2.6	Größenausschlusschromatographie	53
2.2.7	Konjugation mit Dicyclohexylcarbodiimid	55
2.2.8	Konjugation mit Carbonyldiimidazol	56
2.2.9	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	57
2.2.10	Rasterkraftmikroskopie	58
3	Ergebnisse	61
3.1	Aufbau von Polyelektrolytmultischichten aus PG und PLL	61
3.1.1	Einfluss des pH-Wertes	61
3.1.2	Einfluss von NaCl	66
3.1.3	Vergleich zwischen PG30 und PG75	79
3.1.4	Zusammenfassung und Einordnung der Vorversuche	87
3.2	Synthese von Konjugaten aus PG und PTx (PG-PTx)	93
3.2.1	Aktivierung mit Dicyclohexylcarbodiimid	93
3.2.2	Aktivierung mit Carbonyldiimidazol	99
3.2.3	Ergebnisse der Synthese von PG-PTx	100
3.3	Aufbau von Polyelektrolytmultischichten mit PG-PTx Konjugaten	101
3.3.1	LbL-Beschichtung mit PG-PTx bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl	101
3.3.2	LbL-Beschichtung bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl	111
3.3.3	LbL-Beschichtung bei pH 7,6 mit 0,2 M NaCl	117
3.3.4	Untersuchung der Wirkstofffreisetzung aus PEM mit PG-PTx	119
4	Diskussion der Ergebnisse	131
5	Zusammenfassung und Ausblick	144
6	Literatur	146
7	Anhang	163
7.1	Abkürzungen	163
7.2	Lebenslauf	165
7.3	Veröffentlichungen	166
7.4	Danksagung	167

1 Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen und hierbei vor allem die koronare Herzkrankheit zählen in den Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen [1]. Bei der koronaren Herzkrankheit (KHK) kommt es infolge verengter Herzkranzgefäß zu einer Mangeldurchblutung des Herzens [2]. Zur Behandlung dieser Erkrankung werden seit den frühen 90er Jahren kleine Drahtprothesen, sogenannte Koronar-Stents, operativ in die verengte Herzkranzarterie für eine dauerhafte Revaskularisierung eingesetzt. Doch in den ersten 6 Monaten induzieren ca. 30 % der Stents eine Restenose, also einen erneuten Verschluss des Gefäßabschnittes und machen dadurch einen wiederholten Eingriff häufig notwendig [3].

Um die Restenoserate zu verringern wurden Stents entwickelt, die antiproliferativ wirksame Substanzen wie Paclitaxel, Sirolimus oder Zotarolimus zur Unterdrückung der lokalen Gewebereaktion freisetzen. Mit diesen medikamentenbeschichteten Stents (Drug-Eluting Stents, DES) kann die Restenoserate im Vergleich zu unbeschichteten Stents (Bare-Metal Stents, BMS) effektiv gesenkt werden [3, 4]. Zur Beladung der Stentoberfläche mit Wirkstoffen, sowie für die verzögerte Freisetzung, werden die Drahtprothesen mit Biomaterialien beschichtet [5]. Als Biomaterialien werden Substanzen bezeichnet, die für therapeutische oder diagnostische Zwecke eingesetzt werden und kein Wirkstoff oder Nahrungsmittel sind [6]. Im Verlauf der Entwicklungen von DES wurden viele neue Biomaterialien entwickelt und getestet [5]. Trotz intensiver Entwicklungen, ist bei der Langzeitanwendung der seit ca. 6 Jahren verwendeten DES im Vergleich zu BMS ein erhöhtes Risiko von späten Stenthrombosen zu beobachten. Als Ursache für das Risiko wird häufig die Polymerbeschichtung diskutiert [4, 7-9]. Zur Optimierung der Langzeitsicherheit von DES werden daher insbesondere Biomaterialien mit verbesserter Gewebeverträglichkeit gefordert, um das Auftreten später Stenthrombosen zu verhindern [4, 5, 9].

Diese Arbeit untersucht die Möglichkeiten einer versatilen Methode – der Layer-by-Layer Technik (LbL) – zum Aufbau wirkstoffhaltiger Beschichtungen für DES. Die LbL-Technik verwendet Polyelektrolyte unterschiedlicher Ladung als Biomaterialien [10]. Im Verlauf des schichtweisen Aufbaus entstehen Polyelektrolytmultischichten (PEM), wobei die anziehende elektrostatische Wechselwirkung zwischen den entgegengesetzten Ladungen der aufeinanderfolgenden Polymerschichten eine wichtige Rolle spielt. Der große Vorteil dieser Technologie besteht darin, dass die Assemblierung von Multischichten eine generelle und allgemein anwendbare Methode ist und dadurch Beschichtungen unterschiedlichster Zusammensetzung aufgebaut werden können. Zusätzlich ermöglicht die Methode eine Kontrolle der Schichtdicke von Beschichtungen im Nanometerbereich. Durch den modularen Aufbau der Multischichten ist es möglich, mit jeder einzelnen Schicht unterschiedliche Funktionalitäten in diese zu integrieren. Auch eine Beladung und

Fixierung von kolloidalen Partikeln in den PEM ist mit der LbL-Technik möglich. Aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten zur Herstellung von maßgeschneiderten Polyelektrolytfilmen hat die LbL-Technik eine große Popularität erlangt. Die rasante Entwicklung der LbL-Technik wurde auch durch die Möglichkeit der Herstellung von Mikrokapseln (LbL-Kapseln) vorangetrieben, da eine Vielzahl von Applikationen in medizinischen und biotechnologischen Bereichen damit erreichbar scheinen [11, 12]. Mit dieser Technik können beispielsweise die Größe, Form und Zusammensetzung der LbL-Kapseln kontrolliert werden [13]. Ein Weg zur Herstellung von mit Wirkstoffen beladenen LbL-Kapseln ist dabei eine Beschichtung der aktiven Substanzen mit Polyelektrolyten [14-16].

Die Permeabilität von Polyelektrolytmultischichten ist für sehr viele „controlled release“ Anwendungen entscheidend. Mehrere Arbeiten untersuchten an direkt beschichteten Kristallen den Einfluss einer LbL-Beschichtung auf die Wirkstofffreisetzung [17-20]. Eine deutliche Verzögerung der Freisetzung kleiner Wirkstoffe (< 1000 g/mol) konnte jedoch mittels der direkten LbL-Beschichtung nicht erreicht werden. Neben dem Aufbau einer Barriere können mit PEM gezielt weitere Funktionen hinzugefügt werden, wie z.B. für die Signalerhöhung bei der Magnetresonanztomographie [21]. Durch eine Beschichtung mit PEM können Oberflächen hydrophilisiert [22, 23] oder hydrophobisiert [24, 25] sowie deren Oberflächenladung beeinflusst werden, was für die Proteinadsorption [26] oder Steuerung der Zell- und Gewebs-Implantat-Wechselwirkung interessant ist. Bei der Verwendung biologisch aktiver Polymere können auch Multischichten mit antimikrobiellen Eigenschaften konstruiert werden [27, 28]. Möglich ist auch die Anwendung von PEM als beladenes Wirkstoffreservoir, wie etwa durch passive Adsorption der aktiven Verbindung in vorab aufgebauten Multischichten [29]. Polyelektrolytmultischichten finden zunehmend Beachtung bei der gezielten Funktionalisierung von Oberflächen [30]. Insbesondere die Möglichkeit unterschiedliche Eigenschaften in einer Beschichtung zu kombinieren, macht die LbL-Technik dabei so attraktiv und vielseitig [31].

Zum Aufbau von Multischichten können auch, entsprechend dem Ansatz von Ringsdorf [32], mehrfach funktionalisierte Makromoleküle angewendet werden (Abbildung 1) [33].

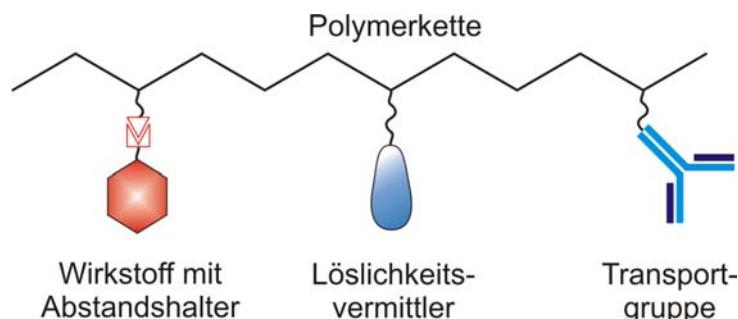


Abbildung 1: Modell eines pharmakologisch aktiven Polymers nach Ringsdorf [32]

Ringsdorf entwickelte das Modell eines pharmakologisch aktiven Polymers, das neben dem kovalent gebundenen Wirkstoff weitere Gruppen zur Beeinflussung des Löslichkeitsverhalten des Gesamt moleküls (solubilizing group) sowie Transportgruppen (targetting moiety) für eine spezifische Anreicherung / Aufnahme im Zielgewebe über geeignete Rezeptoren enthält (Abbildung 1).

Die Wirkstofffreisetzung, somit die Spaltung des Pharmakons von der Polymerkette, wird von der Stabilität der chemischen Bindung des Wirkstoffes an den makromolekularen Träger bestimmt und kann durch den gezielten Einbau von spaltbaren Abstandshaltern (cleavable spacer) in weiten Bereichen beeinflusst werden. Aber auch eine unter physiologischen Bedingungen nicht spaltbare Wirkstoffanbindung an die Polymerkette ist unter Umständen sinnvoll, sofern die Aktivität nicht durch die Bindung zur Polymerkette verloren geht. Die Verwendung von pharmakologisch aktiven Polymeren zum Aufbau von Polyelektrolytmultischichten mit Hilfe der LbL-Technik eröffnet so eine Vielzahl an Einsatzmöglichkeiten [9, 30, 31]. Diese Methode bietet die Möglichkeit zur Entwicklung von aktiven Oberflächenbeschichtungen, z.B. für Implantate, die Wirkstoffe lokal freisetzen und damit unerwünschte Gewebsreaktionen unterdrücken oder das Wachstum bestimmter Zellen begünstigen [9].

Diese experimentelle Arbeit untersucht die Herstellung von wirkstoffhaltigen Polyelektrolytmultischichten durch Assemblierung von Polyelektrolyt-Wirkstoff-Konjugaten. Hierfür wurden Poly(L-glutaminsäure)-Paclitaxel-Konjugate (PG-PTx) synthetisiert und der Aufbau von Multischichten zusammen mit Poly(L-lysin) (PLL) charakterisiert. Die verwendete Polyelektrolytkombination hat dabei modellhaften Charakter. Am Beispiel von Drug-Eluting Stents wurde untersucht, ob geeignete aktive Beschichtungen mit Hilfe der LbL-Technik aufgebaut werden können. Vorteile dieser Beschichtungstechnik sind vor allem der stabile selbstlimitierende Beschichtungsprozess, die Einstellung der Schichtdicke im Bereich weniger Nanometer sowie die Trennung von Synthese und Beschichtung. Bei der Anwendung dieser Technik ist neben einer Abschätzung der erreichbaren Wirkstoffbeladung auch die Kinetik der Paclitaxel-Freisetzung aus den Multischichten von Bedeutung.

1.1 Drug-Eluting Stents

Drug-Eluting Stents (DES) werden zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit (KHK) angewendet. Ursache ist meist eine Arteriosklerose der Herzkranzgefäße, die zu einer Einengung der Koronargefäße oder durch zusätzliche Thrombenbildung zum teilweisen oder vollständigen Verschluss von Koronararterienästen führt [2]. Verengte Herzkranzgefäße rufen eine Mangeldurchblutung des Herzmuskels hervor, was vor allem unter Belastung zu einem Missverhältnis von angebotenem und

benötigtem Sauerstoff führt. Leitsymptom der KHK ist die Angina pectoris. Unter Belastung äußert sie sich zum Teil durch in verschiedene Regionen ausstrahlende Schmerzen, durch zunehmende Atemnot und durch geringe Belastbarkeit. In Abhängigkeit des Schweregrades reicht das Spektrum der KHK von der asymptomatischen Form über die Angina pectoris bis hin zum Herzinfarkt oder Sekundenherztod [2]. Die koronare Herzkrankheit gehört in den westlichen Industrieländern zu den häufigsten Todesursachen [1].

Die Behandlung dieser Erkrankung umfasst medikamentöse Therapien und Methoden zur Revaskularisierung. Kleinere Gefäße oder operativ ungünstig gelegene Gefäßabschnitte können dabei häufig nur mit Arzneimitteln zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung und Entlastung des Herzens behandelt werden. Bei größeren Gefäßen sind operative Methoden zur Revaskularisation erfolgversprechend. Die perkutane Koronarintervention (PCI) ist aktuell die häufigste Art der myokardialen Revaskularisation in den USA und Europa. Sie ist im Vergleich zur koronaren Bypassoperation deutlich geringer invasiv. So kommen heute in Deutschland auf eine Bypassoperation ca. 3,5 Koronarinterventionen [4].

Bei der perkutanen Koronarintervention wird mit Hilfe von Kathetern versucht, das verengte oder verschlossene Koronargefäß zu öffnen bzw. zu weiten. Dazu finden sowohl Drähte mit weichen Spitzen als auch Ballonkatheter Anwendung. Reine Ballonkatheter ohne Stent dienen heute in erster Linie zur Vorbehandlung einer sich anschließenden Stent-Implantation [34]. Stents sind kleine röhrenförmige Drahtgeflechte mit denen versucht wird, verengte Gefäßabschnitte dauerhaft offen zu halten. Zur Platzierung befindet sich der Stent auf einem Katheter und wird unter Angiographie am verengten Gefäßabschnitt positioniert. Dabei ist grundsätzlich zwischen selbstexpandierenden und Ballon-expandierenden Stents zu unterscheiden.

In den Anfangszeiten der Stent-Implantation zeigten unbeschichtete Metall-Stents, die sogenannten Bare-Metal Stents (BMS), eine hohe Rate an akuten und subakuten Stent-Thrombosen, die erst durch die Einführung der dualen Thrombozytenaggregationshemmung (Kombination von Acetylsalicylsäure und einem Thienopyridinderivat) in einen klinisch akzeptablen Bereich von etwa 1 % gesenkt werden konnten [4]. Doch innerhalb der ersten 6 Monate treten bei ca. 30 % der BMS stentinduzierte Restenososen auf, die eine erneute perkutane Koronarintervention notwendig machen [4]. Als Ursache für die stentinduzierten Restenososen wird eine Gewebsreaktion im Sinne einer Intimalhyperplasie als Folge von Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen angesehen [4]. Erst durch Einführung einer intrakoronaren Brachytherapie konnte aufgrund ihrer starken antiproliferativen Wirkung die Rate der In-Stent-Rostenosen von BMS erneut reduzieren werden [4].

Ein weiteres Konzept zur Verringerung von stentinduzierten Restenososen besteht in der lokalen Freisetzung antiproliferativ wirksamer Substanzen [35]. Dafür wurden medikamentenbeschichtete Stents, die sogenannten Drug-Eluting Stents (DES),

entwickelt, welche über einen längeren Zeitraum kontrolliert Wirkstoffe abgeben. Die ersten DES mit den Wirkstoffen Sirolimus (Cypher Stent, Cordis / Johnson & Johnson, Miami Lakes, Florida, USA) oder Paclitaxel (Taxus Stent, Boston Scientific Corp, Natick, Massachusetts, USA) sind seit 2003 auf dem Markt. Bei beiden Stents werden die Metallgerüste mit einer nichtabbaubaren Polymerbeschichtung umhüllt, in die der jeweilige Wirkstoffe eingelagert ist [9]. Diese Beschichtungen müssen verschiedene Anforderungen erfüllen [36]. Neben einer reproduzierbaren Wirkstofffreisetzung ist die Stabilität insbesondere bei der Sterilisation, Applikation und Expansion entscheidend [36]. Auch nach der Positionierung und Expansion im Gefäß muss die Beschichtung den Stent fest und homogen umschließen.

Es konnte gezeigt werden, dass mit DES die Restenoserate deutlich reduziert werden kann [5, 7]. Bis 2008 haben weltweit ca. 6 Millionen Patienten DES (mit Sirolimus oder Paclitaxel) zur Behandlung der KHK erhalten [37]. Von Bedeutung für die effektive Verringerung einer Restenose ist vor allem die Dosis und Freisetzungskinetik des Wirkstoffes [5]. Der Cypher Stent mit Sirolimus gibt 50 % des Wirkstoffes ($1,4 \mu\text{g/mm}^2$) innerhalb eines Tages und 100 % in 90 Tagen ab [9]. Im Unterschied dazu setzt der Taxus Stent mit PTx insgesamt nur ca. 10 % des Wirkstoffes frei [9]. Je höher der Polymergehalt der Beschichtung beim Taxus Stent ist, umso langsamer und unvollständiger wird PTx abgegeben [9].

Doch seit 2006 ist die Euphorie gegenüber DES gedämpft, da vermehrt Stent-Thrombosen beobachtet wurden. Obwohl mit DES die Neointimaproliferation und dadurch frühe Restenosen fast vollständig unterdrückt werden können, besteht offensichtlich aufgrund der verzögerten Stent-Endothelialisierung ein erhöhtes Risiko von späten Stent-Thrombosen [7]. Durch die vermehrt beobachteten späten Stent-Thrombosen besteht ein hoher Klärungsbedarf zur Langzeitsicherheit von DES [7]. Wie sich zeigte, sind für die entzündliche Reaktion der Gefäßwand auf den DES drei Elemente entscheidend: das metallene Trägergerüst (insbesondere die Strebendicke und Mechanik), das Polymer und der Wirkstoff mit seiner Freisetzungskinetik [9]. Für die nächste Generation der DES wird daher gefordert: erstens ein modulares Design des Grundgerüsts mit abgerundeten Streben zur Schonung des Endothels bei deren Einsatz, zweitens ein biokompatibles nicht-inflammatorisches Polymer, das eine vollständige Endothelialisierung erlaubt und drittens eine lipophile zytostatische aber nicht zytotoxische Substanz, die rasch von der Arterienwand absorbiert wird [38]. Die Beurteilung von DES sollte daher an der Endothelialisierung zur Verhinderung der späten Stent-Thrombosen sowie am möglichst geringen Volumenverlust des behandelten Gefäßabschnittes (late lumen loss) erfolgen.

Die Anwendung neuer aktiver Substanzen mit selektiveren Wirkungen auf die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen kann ein Weg zur Erhöhung der Langzeitsicherheit von DES sein. Interessante Ansätze zur Verringerung der Stent-Thrombosen bieten auch neue Wirkstoffe zur Unterstützung der Endothelialisierung oder zur Inhibition der Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen [39]. Auch das Potential einer lokalen Freisetzung spezifischer

Antikörper zur Verhinderung von Thrombosen wurde untersucht [9]. Bis 2007 wurden zehn Wirkstoffe klinisch in randomisierten DES-Studien geprüft: Actinomycin-D, Biolimus A9, Dexamethason, 17-β-Estradiol, Everolimus, Paclitaxel, QuaDDS (7-Hexanoyltaxol), Sirolimus (Rapamycin), Tacrolimus und Zotarolimus [4]. Insgesamt wurden mehr als 20 DES mit dem CE-Verfahren als Medizinprodukt zugelassen, wobei die Wirksamkeit nur von 3 DES bis 2007 nachgewiesen werden konnte, dem Sirolimus freisetzenden Cypher Stent (Cordis / Johnson & Johnson, Miami Lakes, Florida USA), dem Paclitaxel freisetzenden Taxus Stent (Boston Scientific Corp, Natick, Massachusetts, USA) und dem Zotarolimus freisetzenden Endeavor Stent (Medtronic, Santa Rosa, California, USA) [7].

Für eine Verbesserung der Langzeitsicherheit von DES ist eine übergreifende Forschung in den unterschiedlichsten Bereichen, z.B. der Biologie, Materialwissenschaft, Pharmakologie und Pharmazeutischen Technologie notwendig. Es ist sehr wahrscheinlich, dass neben diffusionskontrollierten Freisetzungssystemen aufgrund der vielen verschiedenen Wirkstoffe mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften weitere Technologien zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung notwendig sind [5]. Möglicherweise kann mit Hilfe der LbL-Technologie eine Stent-Beschichtung entwickelt werden, die einerseits eine kontrollierte und vollständige Wirkstoffabgabe ermöglicht und andererseits biokompatibel und nicht-inflammatorisch ist. Von besonderem Interesse sind bioabbaubare Beschichtungen aus Polyelektrolytmultischichten, welche im Verlauf der Wirkstofffreisetzung einen Bare-Metal Stent (BMS) entstehen lassen, da diese in Bezug auf In-Stent-Thrombosen gegenüber den aktuellen DES überlegen scheinen. Auch komplett bioabbaubare Stents mit lokaler Freisetzung proliferationshemmender Substanzen werden momentan intensiv entwickelt [38].

Aktuell wird kontrovers die notwendige Dauer der Wirkstofffreisetzung zur Unterdrückung einer Restenose diskutiert. Interessant ist die Beobachtung, dass auch Paclitaxel beladene Drug-Eluting Balloons - mit einer im Vergleich zu DES sehr kurzen Kontaktzeit – die Restenose effektiv verhindern können [40]. Im Vergleich zum Taxus Stent mit $1 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ist die Wirkstoffbeladung bei dem Drug-Eluting Ballon mit $3 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ PTx deutlich höher [40, 41]. Berücksichtigt man, dass der Taxus Stent nur 10 % des PTx freisetzt, ist anscheinend für eine Verringerung der Restenoserate mit Drug-Eluting Balloons mehr als die 10fache Menge an PTx erforderlich. Bisher ungeklärt ist, welche Dosis an PTx letztlich bei der Applikation lokal freigesetzt wird, da bis zu Entfaltung des Balloons ein unbekannter Wirkstoffanteil aufgrund des teilweisen Kontaktes der Beschichtung mit dem Blutsystem verloren gehen kann.

Bei dem Taxus Stent ist insbesondere die unvollständige Wirkstoffabgabe aus der Polymermatrix kritisch, da die lokale Freisetzung kleiner Mengen an PTx die gewünschte Stent-Endothelialisierung ungünstig beeinflussen kann [9]. Um die für die Langzeitsicherheit wichtige komplette Endothelialisierung von Stents nicht zu unterdrücken, ist eine vollständige Wirkstofffreisetzung über einen begrenzten Zeitraum notwendig.

1.2 Polyelektrolytmultischichten

1.2.1 Die Layer-by-Layer Technik

Die Layer-by-Layer Technik (LbL) ist eine Methode zum Aufbau von ultradünnen Beschichtungen, die im Bereich von ca. 5 nm bis 1 µm liegen können. Vorgeschlagen wurde diese Methode 1966 von Iler [42], aber erst über 20 Jahre später, Anfang der 90er Jahre von Decher et al. maßgeblich entwickelt [43-45].

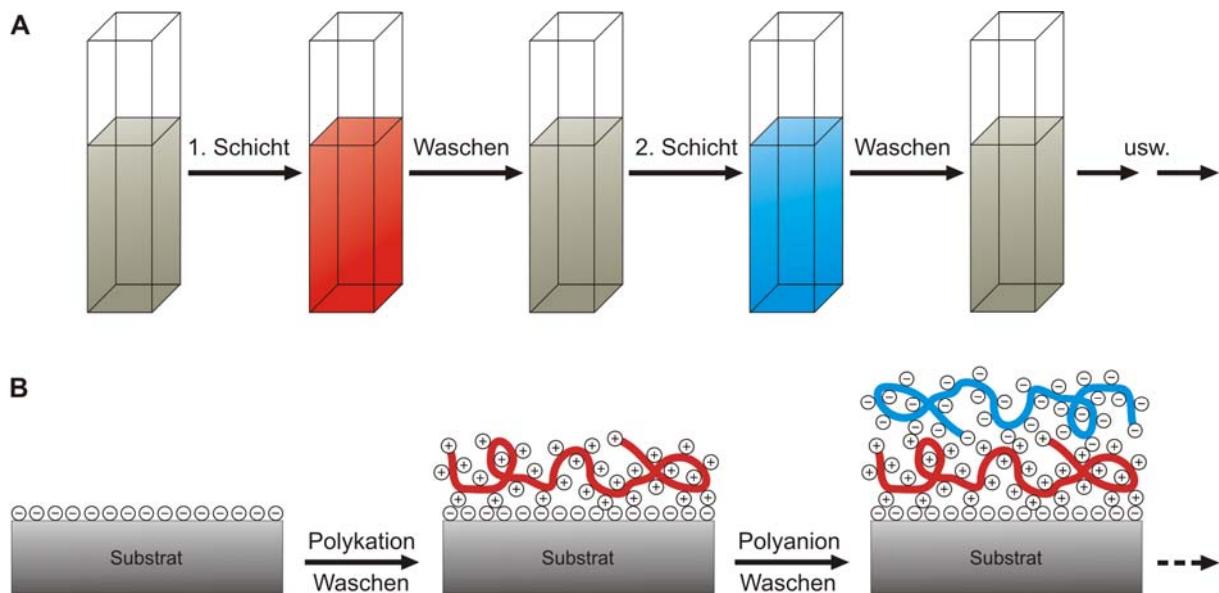


Abbildung 2: Schema zur Herstellung von Polyelektrolytmultischichten; A) Beschichtung der Innenseiten einer Quarzküvette; B) Vereinfachte molekulare Darstellung ohne Gegenionen zum Aufbau von Polyelektrolytmultischichten, Beschichtung eines anionisch geladenen Substrates mit Polykation und Polyanion, Polyelektrolytkonformation und Durchdringung der einzelnen Schichten sind idealisiert dargestellt

Die LbL-Technik ist eine Anwendung der Polyelektrolytkomplexbildung [46]. Dazu wird das Substrat Schicht für Schicht (layer-by-layer) mit Polyelektrolytlösungen alternierender Ladung beschichtet [10, 47]. Bei jedem Beschichtungsschritt lagern sich auf der entgegengesetzt geladenen Oberfläche Polyelektrolyte ab (siehe auch Abbildung 2). Der Beschichtungsprozess ist durch die freiwerdenden Gegenionen entropiegetrieben und aufgrund der elektrostatischen Abstoßung selbstlimitierend. Überschüssiges Polymer wird beim schichtweisen Aufbau vom Multischichten nach jeder Polyelektrolytschicht durch mehrmaliges Waschen entfernt, um eine unkontrollierte Komplexbildung in der Lösung zu verhindern. Vorausgesetzt, dass bei den Beschichtungsbedingungen ein kontinuierlicher Aufbau von Multischichten stattfindet, gibt es keine Limitierung der Anzahl von Polyelektrolytschichten. Es wurden PEM mit bis zu 1000 Schichten erfolgreich hergestellt [48, 49].

Die Filmdicke von PEM kann im trockenen Zustand auf wenige Nanometer genau eingestellt werden. Zum Beispiel liegt die Dicke einer einzelnen Schicht in Abhängigkeit der Gegenionen und Beschichtungsbedingungen von Multischichten aus Polystyrolsulfonat (PSS) und Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDA) im Bereich von 1-5 nm [50].

Bei PEM mit schwachen Polyelektrolyten, z.B. mit Polyacrylsäure können sich auch dickere Schichten von ca. 15 nm ausbilden [51]. Neben dem Tauchverfahren ist ein Aufbau von PEM auch durch Sprühen [52-54], Einschrittverfahren [55] und Rotationsbeschichtung (spin coating) [56, 57] möglich, was zu einer deutlichen Verkürzung der Präparationszeit führt.

Der ladungskontrollierte Aufbau von Polyelektrolytmultischichten ist eine generelle und allgemein anwendbare Methode die es ermöglicht, eine Vielzahl von unterschiedlichen maßgeschneiderten Strukturen herzustellen. Hinzu kommt, dass in Abhängigkeit von der chemischen Struktur der verwendeten Polymere neben der elektrostatischen Anziehung auch andere intermolekulare Wechselwirkungen, wie z.B. die Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen, an der Bildung von Multischichten beteiligt sein können. Mehrere Arbeiten zeigen, dass ein Aufbau von PEM schon durch Wasserstoffbrückenbindung allein möglich ist [58-62]. Neben dem Aufbau von PEM mit synthetisch funktionalisierten Polyelektrolyten [63, 64] wurden auch Multischichten mit folgenden Materialien / Strukturen aufgebaut:

- Polysaccharide [17, 28, 65-69]
- Proteine [70-76]
- DNA [77-81]
- Lipide [82-86]
- Polymer-Wirkstoff-Konjugate [33, 87]
- Dendrimere [88, 89]
- anorganische Nanopartikel, wie kolloidales Gold [90-92] und Quantenpunkte [93, 94], Fullerene [95] und Kohlenstoffnanoröhren [96],
- Viren [97]

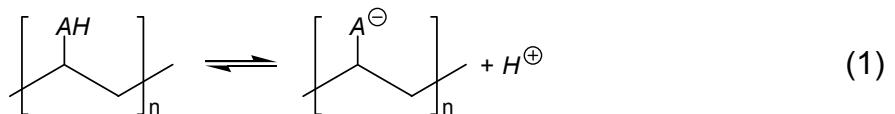
Anhand der unterschiedlichen Materialien, welche zum Aufbau von Multischichten geeignet sind, ist ersichtlich, dass die LbL-Technik sehr vielseitig einsetzbar ist. Sie ermöglicht sowohl die Herstellung von Oberflächenbeschichtungen als auch von freistehenden Filmen [98-100].

1.2.2 Polyelektrolyte

Der Begriff Polyelektrolyt (PE) bezeichnet laut IUPAC-Empfehlung (International Union of Pure and Applied Chemistry) ein Polymer aus Makromolekülen, in denen

ein wesentlicher Teil der Baueinheiten ionische oder ionisierbare Gruppen oder beide enthält [101]. Polyelektrolyte vereinen die Eigenschaften von Polymeren und Elektrolyten und können der Ladung nach in anionische und kationische eingeteilt werden. Ein Spezialfall sind ampholytische Polymere (Polyampholyte), die sowohl positiv als auch negativ geladene Gruppen oder die entsprechenden ionisierbaren Gruppen enthalten. In der Natur sind PE als Proteine, Nukleinsäuren oder Polysaccharide weit verbreitet.

Trotz eines hydrophoben Rückgrats sind PE aufgrund ihrer großen Anzahl an ionischen Gruppen in polaren Lösungsmitteln wie z.B. Wasser gut löslich und dissoziieren in geladene Polymerketten und niedermolekulare Gegenionen. Der jeweilige Dissoziationsgrad und damit die Ladungsdichte in Lösung wird von der Säure- oder Basenstärke der funktionellen Gruppen bestimmt. Neben der Ladungsart, also anionisch oder kationisch, können PE auch nach ihrer Stärke eingeteilt werden. Starke PE sind permanent geladen und über den gesamten pH-Bereich komplett dissoziert, wohingegen schwache PE nur in einem begrenzen Bereich ionisiert vorliegen. Damit ist bei schwachen PE der Dissoziationsgrad eine Funktion des pH-Wertes der Lösung. Für schwache Polysäuren (genauso wie für die entsprechenden Polybasen) wird die Ladungsdichte vom Säure-Base-Gleichgewicht



mit der ungeladenen Gruppe AH, der negativ geladenen Gruppe A^- und dem Proton H^+ bestimmt. Im Unterschied zu verdünnten Lösungen einwertiger Säuren wird die Gleichgewichtskonstante K_s jeder funktionellen Gruppe von allen anderen Gruppen des Polymers aufgrund elektrostatischer Interaktionen beeinflusst, wobei der Unterschied zwischen den endständigen und den restlichen Gruppen besonders groß ist [102]. Daraus resultiert im Vergleich zu einwertigen Säuren, ein deutlich verbreiterter Äquivalenzbereich. Aus praktischen Gründen wird das Gleichgewicht der Dissoziation einer Polymerkette zu einer scheinbaren Gleichgewichtskonstante K_{app}

$$K_{app} = \frac{[H^+] [A^-]}{[HA]} \quad (2)$$

zusammengefasst. Die scheinbare Dissoziationskonstante K_{app} wird meist als negativer dekadischer Logarithmus, dem pK_{app} angegeben. Der Dissoziationsgrad α wird im Allgemeinen wie folgt definiert:

$$\alpha = \frac{[A^-]}{[A^-] + [HA]} \quad (3)$$

Durch Einführen eines empirischen Aktivitätsfaktors n in die Henderson-Hasselbalch-Gleichung (Gleichung 4) wird versucht, das vielfältige Dissoziationsverhalten von Polyionen zu berücksichtigen [102, 103].

$$pK_{app} = pH - n \cdot \log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right) \quad (4)$$

Die Konformation von PE in Lösung ist von der Polymerkonzentration, den Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel und der Kettenlänge abhängig. Zusätzlich wird die Konformation von der Stärke der sauren oder basischen Gruppe, der Ladungsverteilung entlang der Polymerkette als auch von der Natur der Gegenionen beeinflusst. Die theoretische Beschreibung der Struktur von PE in Lösung ist sehr komplex, da diese die typischen Eigenschaften von makromolekularen Verbindungen und von Elektrolyten vereint. Zusätzlich zu der Flexibilität des Polymergrundgerüstes wird die Struktur von PE in Lösung insbesondere von der elektrostatischen Abstoßung der positiven oder negativen Ladung beeinflusst. Die elektrostatische Wechselwirkung tritt zwischen den geladenen Gruppen entlang einer einzelnen Polymerkette sowie zwischen mehreren Polymerketten auf. Trägt ein Polymermolekül wiederholt starke Ladungsgruppen, so liegt es im Vergleich zu einem neutralen Polymer aufgrund der Abstoßungskräfte in einer deutlich gestreckteren Konformation vor. Die Steifheit eines Polymers kann mit Hilfe der Persistenzlänge q_p , also der Länge des einzelnen unflexiblen Kettenabschnittes, beschrieben werden.

$$q_p = q_o + q_e \quad (5)$$

Die Persistenzlänge q_p von Polyelektrolyten ist die Summe aus der sterischen Persistenzlänge q_o und der elektrostatischen Persistenzlänge q_e [104, 105]. Die elektrostatische Persistenzlänge ist definiert als

$$q_e = \frac{I_B}{4} \left(\frac{\kappa^{-1}}{l_{eff}} \right)^2 \quad (6)$$

mit der Bjerrum-Länge I_B , der Debyeschen Abschirmlänge κ^{-1} und dem effektiven Ladungsabstand l_{eff} . Die Bjerrum-Länge ist der Abstand, bei welchem die thermische Energie $k_B T$ gleich der Wechselwirkungsenergie zwischen zwei nicht abgeschirmten Elementarladungen e ist.

$$I_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon k_B T} \quad (7)$$

In der Gleichung 7 für die Bjerrum-Länge sind die Permittivität ϵ , die Boltzmann-Konstante k_B und die Temperatur T enthalten. Für Wasser beträgt die Bjerrum-Länge bei Raumtemperatur 0,7 nm.

Die maximale Ladung entlang einer Polymerkette wird von der Manning-Kondensation geschränkt [106-108]. Bei dieser kondensieren Gegenionen aus der Lösung bis Abstand der Ladung entlang der Kette gleich der Bjerrum-Länge I_B ist. Insbesondere bei starken Polyelektrolyten mit hoher Ladungsdichte führt die Manning-Kondensation zu einer Kondensation von Gegenionen verbunden mit einer effektiven Reduktion der Ladungsdichte auf I_B^{-1} .

Im Allgemeinen können Polyelektrolyte in Lösung nur im Zusammenhang mit den Gegenionen gesehen werden. Eine Abschätzung der Reichweite des elektrischen Potentials ist mit der Debyeschen Abschirmlänge κ^{-1} möglich.

$$\kappa^{-1} = \sqrt{1/(8 \cdot I \cdot I_B \cdot N_A \pi)} \quad (8)$$

In der Debyeschen Abschirmlänge κ^{-1} ist die Ionenstärke I mit der Ladungszahl z_i und der molaren Ionenkonzentration c_i enthalten.

$$I = \frac{1}{2} \sum z_i^2 c_i \quad (9)$$

Ein Zusatz von Salz zu Polyelektrolytlösungen reduziert die elektrostatische Wechselwirkung zwischen geladenen Gruppen und beeinflusst somit die Struktur und Flexibilität von Polyelektrolyten in Lösung. In Abbildung 3 ist der Effekt der Ionenstärke auf die Konformation eines Polyelektrolyten in Lösung dargestellt. Die Persistenzlänge des ungeladenen Polymerrückgrates wurde bei der Monte-Carlo Simulation konstant gehalten. Da der Beitrag der elektrostatischen Abstoßung bei niedrigen Ionenstärken stärker ist, liegt das Polymer in einer gestreckten Konformation vor (Abbildung 3 c, Persistenzlänge im Bereich der Konturlänge des PE). Bei höheren Ionenstärken kann der PE durch die Abschirmung der Ladung eine geknäulte Konformationen mit kleiner Persistenzlänge einnehmen (Abbildung 3 a, Persistenzlänge im Bereich der Monomergröße).

Bei der Entwicklung der LbL-Technik wurden größtenteils Polyelektrolyte wie Polystyrolsulfonat (PSS), Polyallylaminhydrochlorid (PAH) und Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDA) verwendet [109]. Dabei handelt es sich um synthetisch hergestellte Homopolymere deren Struktur und Verhalten gut charakterisiert ist. Die möglichen Materialien zum Aufbau von PEM sind aber nicht auf diese Polyelektrolyte beschränkt. Für eine Anwendung der Multischichten als Biomaterialien, ist die Biokompatibilität eine essentielle Voraussetzung. Interessante Materialien zum Aufbau von PEM sind in Tabelle 1 zusammengestellt.



Abbildung 3: Monte-Carlo Simulation zum Einfluss der Salzkonzentration auf die Konformation eines Polyelektrolyten mit 100 Monomeren; von (a) nach (c) nimmt die Ionenstärke ab; die Persistenzlänge des ungeladenen Polymergrundgerüstes wurde konstant gehalten, (a) die Debyeschen Abschirmlänge liegt im Bereich der Monomergröße, (b) Debyeschen Abschirmlänge im Bereich von wenigen Monomeren, (c) Debyeschen Abschirmlänge im Bereich der Konturlänge des PE, Abbildung aus [110]

Tabelle 1: Übersicht möglicher polyionischer Verbindungen zum Aufbau von Polyelektrolytmultischichten, Protein¹, Polypeptid², Polysaccharid³, Polymer⁴

Polymere als anionische Schicht	Polymere als kationische Schicht
Albumin ¹	Chitosan ³
Alginat ³	Collagen ¹
Carboxymethylcellulose ³	Gelatine A ¹
Chondroitinsulfat ³	Polyallylaminhydrochlorid ⁴
Gelatine B ¹	Polyarginin ²
Heparin ³	Polydiallyldimethylammoniumchlorid ⁴
Hyaluronsäure ³	Polydimethylaminoethylmethacrylsäure ⁴
Modifizierte Dextrane ³	Polyethylenimin ⁴
Polyacrylsäure ⁴	Polylysin ²
Polyglutaminsäure ²	Polyornithin ²
Polymethacrylsäure ⁴ und Derivate	Protamin ¹
Polystyrolsulfonat ⁴	Thaumatin ¹
Polyvinylsulfonat ⁴	

1.2.3 Adsorption von Polyelektrolyten an Grenzflächen

Die Adsorption von Polyelektrolyten (PE) auf einem Substrat wird von unterschiedlichen Parametern, wie dem Vorzeichen der Ladung und der Ladungsdichte von Substrat und PE, der Ionenstärke der Beschichtungslösung sowie bei schwachen PE auch vom pH-Wert der Lösung bestimmt. Die Struktur der adsorbierten Polymerschicht wird dabei maßgeblich von der PE-Konformation in Lösung gesteuert. So adsorbieren PE aus wässrigen Lösungen mit geringer Ionenstärke stäbchenförmig und behalten ihre gestreckte Konformation. Unter diesen Bedingungen entsteht im Allgemeinen ein sehr dünner Film (trocken). Typischerweise erfolgt die Beschichtung jedoch bei höheren Ionenstärken, wo sich kompaktere Strukturen in Lösung ausbilden und damit auch dicke Filme entstehen können. In Abbildung 4 ist die Adsorption einer Polyelektrolytkette auf einem Substrat vereinfacht zweidimensional dargestellt.

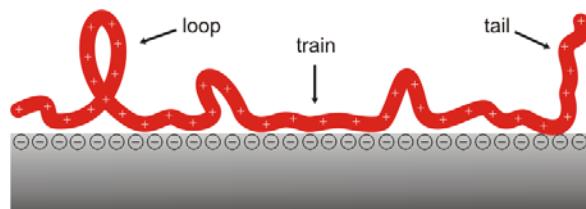


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Adsorption einer kationischen Polyelektrolytkette auf einem anionisch geladenen Substrat

Die Struktur einer adsorbierten Polyelektrolytkette kann in verschiedene Bereiche unterteilt werden. Neben Schlaufen (*loops*), bei denen die Polymerkette über einen größeren Bereich keinen Kontakt mit dem Substrat hat, gibt es die Bereiche mit direktem Kontakt zum Substrat (*trains*). Unter Umständen ragt ein Kettenende auch frei in das umgebende Medium hinein (*tail*). Mehrere Arbeiten zur Adsorption von PE an geladenen Grenzflächen haben gezeigt, dass während der Polyelektrolytadsorption eine Umkehr der Grenzflächenladung auftreten kann [111]. Eine Erklärung für dieses Verhalten ist die Ausbildung von *loops* und *tails*. Bei diesen Strukturen erfolgt aufgrund des fehlenden Kontaktes keine vollständige Neutralisation der Polyelektrolytladungen durch die Grenzflächenladung. Das führt letztendlich zur Inversion der Grenzflächenladung. Im Unterschied zu starken PE ist das Adsorptionsverhalten von schwachen PE aufgrund des variablen Dissoziationsgrad α komplizierter und wird stark vom pH-Wert der Beschichtungslösung bestimmt.

1.2.4 Wachstum und Struktur von Multischichten

Polyelektrolytmultischichten (PEM) sind ein komplexes System, das vereinfacht nach dem Modell von Ladam et al. (Abbildung 5) auf anschauliche Weise in drei Zonen unterteilt werden kann [112]. Im Verlauf der Assemblierung von PEM bilden sich zuerst die Zonen I und III. In direktem Kontakt zum Substrat / Träger ist die Zone I, während die Polyelektrolyte in Zone III mit dem Umgebungsmedium in Verbindung stehen und von diesem maßgeblich beeinflusst werden. Nachdem sich die Zonen I und III vollständig aufgebaut haben, bildet sich im weiteren Verlauf der Assemblierung die Zone II in der die entgegengesetzt geladen PE hoch vermischt vorliegen. Bei der fortschreitenden Beschichtung wächst dann lediglich die mittlere Zone, so dass sich die Grenze zwischen Zone II und Zone III verschiebt. Während der Assemblierung diffundieren die Polyelektrolyte auch in die Zone III hinein [54, 113, 114].

Die ersten Polyelektrolytschichten (Zone I), welche in direktem Kontakt zum Substrat stehen, werden vorrangig von der Wechselwirkung mit dem Träger beeinflusst. In dieser Schicht sind die einzelnen Polyelektrolytschichten am dünnsten. Die äußerste Zone III ragt teilweise in das umgebende Medium hinein und trägt die Überschussladung [115, 116].

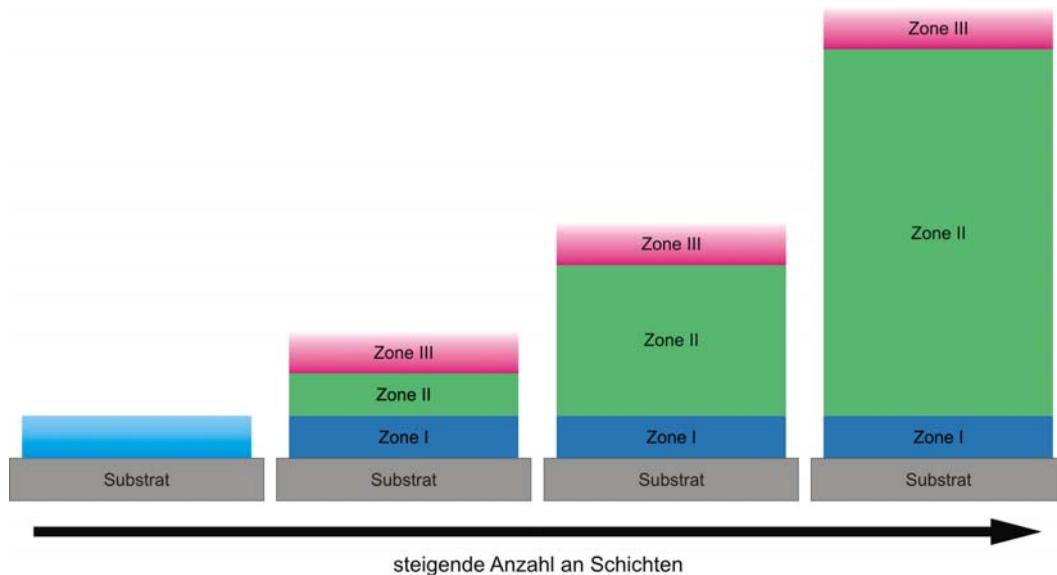


Abbildung 5: Zonenmodell von Polyelektrolytmultischichten nach Ladam et al. [117]

Das Wachstum von PEM erfolgt in Abhängigkeit der Polyelektrolytkombination und den Beschichtungsbedingungen linear oder nicht-linear (häufig auch als exponentiell bezeichnet). Beim nicht-linearen Schichtenwachstum vergrößert sich die pro Polyelektrolytschicht adsorbierte Polymermenge, wohingegen beim linearen Wachstum keine Veränderung der pro Schicht adsorbierten Menge festzustellen ist. Im Allgemeinen verläuft bei den ersten Polyelektrolytschichten das Wachstum nicht-linear [114]. Erst im weiteren Verlauf etabliert sich ein lineares Schichtenwachstum.

Die Ursache für das Auftreten des nicht-linearen Wachstums liegt in einer unvollständig ausgebildeten Zone III. Dadurch findet bei jeder nachfolgenden Beschichtung eine etwas stärkere Polymeradsorption statt, was vorrangig bei schwachen PE zu beobachten ist. Ab einer bestimmten kritischen Filmdicke, charakterisiert durch eine vollständig ausgebildete Zone III, wandelt sich das nicht-lineare Wachstum in ein lineares um [54]. Die sehr häufig untersuchte Polyelektrolytkombination PAH / PSS ist ein typischer Vertreter für das lineare Schichtenwachstum [118]. Im Unterschied dazu zeigen viele Biopolymere ein ausgeprägtes exponentielles Schichtenwachstum [28, 54, 119-124]. Neben dem Polymereinfluss gibt es noch weitere Faktoren, die den Filmaufbau sowie die Struktur von PEM beeinflussen. Folgende Parameter haben einen Einfluss:

- Ionenstärke [28, 66, 115, 125-130] und die Art des Salzes in der Beschichtungslösung [50, 115]
- pH-Wert [119, 130-135]
- Polymerkonzentration [115]
- Spülmedium [132]
- Lösungsmittel [115, 136]
- Temperatur [113, 137, 138]
- Beschichtungszeit [115, 139]
- Molekulargewicht [51, 140, 141]
- Ladungsdichte bei Copolymeren [127, 142, 143]

Die Ionenstärke hat einen starken Einfluss auf das Wachstum und die Struktur von PEM. Bei höheren Ionenstärken können sich in Folge der stärkeren Ladungsabschirmungen entlang der Polyelektrolytkette kompaktere Strukturen in Lösung ausbilden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Ionenstärke oder der Temperatur zu einem stärkeren Schichtenwachstum führt und somit pro Polyelektrolytschicht mehr Polymer adsorbiert, wobei sich auch der Anteil des exponentiellen Wachstums vergrößerte [113]. Nach der Assemblierung bei höheren Ionenstärken bleibt die Polymerstruktur mit einer sehr kleinen Oberfläche pro Polymerkette zurück, was andererseits zu einer Vergrößerung der Filmdicke führt. Neben dem stärkeren Wachstum vergrößert sich jedoch auch die interne und externe Rauigkeit der gebildeten Polymerschichten [125, 144].

Bei schwachen Polyelektrolyten hat neben der Ionenstärke besonders der pH-Wert einen großen Einfluss auf das Schichtenwachstum und die Struktur. Rubner et al. konnten für PEM aus Polyacrylsäure und Polyallylaminhydrochlorid zeigen, dass die Filmdicke pro aufgebrachte Schicht über den pH-Wert kontrolliert werden kann [131, 133, 145]. Unter Bedingungen, bei denen ein oder beide Polyelektrolyte unvollständig geladen sind, bilden sich deutlich dickere Strukturen aus.

Während der Assemblierung penetrieren die Polyelektrolyte teilweise in die darunter liegenden Polyelektrolytschichten (Zone III), so dass die Multischichten im Gegensatz zum Langmuir-Blodgett-Film nicht lamellar aufgebaut sind. Bei Röntgen- und Neutronenstrukturuntersuchungen von Multischichten mit einer deuterierten Polyelektrolytschicht wurden keine Bragg-Reflexe gefunden [125, 146]. Die einzelnen „Schichten“ der entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyte sind in PEM hochgradig verflochten, was zu einer konstanten Monomerdichte entlang einer Schicht führt. Durch die starke Verflechtung der einzelnen Schichten untereinander sind PEM gegenüber Defekten der Beschichtung nicht so anfällig wie Langmuir-Blodgett-Filme.

Die Konzentration der Gegenionen in Multischichten ist um mehrere Zehnerpotenzen kleiner als die Anzahl an geladenen Gruppen der vorhandenen Polyelektrolyte. Somit sind die meisten ionischen Gruppen der Polyelektrolyte an der Komplexbildung untereinander beteiligt [147, 148] und eine spätere Restrukturierung der Polymerketten ist durch die vielen ionischen Wechselwirkungen sehr erschwert. In Richtung der Wasserphase (Zone III) erhöht sich jedoch die Konzentration der Gegenionen deutlich, was die oben beschriebene Penetration der nächsten PE-Schicht sehr erleichtert. Die fertig aufgebauten PEM haben im Inneren typischerweise einen Anteil von 40-75 % Wasser, was die lockere Struktur erklärt die diese Penetration überhaupt erst ermöglicht [124, 126, 149].

Der Einfluss des Substrates erstreckt sich, sofern eine Beschichtung des Materials überhaupt möglich ist, im Wesentlichen auf die Zone I. Zur Beschichtung sind erwartungsgemäß geladene Materialien besonders geeignet. Aber auch auf hydrophoben Oberflächen, wie z.B. Polyethylenterephthalat [150], Polydimethylsiloxan [151] und Polyurethan [23] und auf Metallen [65] können Multischichten aufgebaut werden. Bei diesen hydrophoben Materialien können zur Adsorption der ersten Polyelektrolytschicht neben der Ausnutzung von hydrophoben Wechselwirkungen, z.B. durch die Verwendung von Polyelektrolyten mit hydrophoben Seitengruppen, auch verschiedene chemische und physikalische Techniken zur Induktion einer Oberflächenladung eingesetzt werden. So können beispielsweise mit einer oxidativen Aktivierung (z.B. RCA-Reinigung, Radio Corporation of America [152]) oder durch Plasmaätzen ausreichend Ladungen direkt vor der Beschichtung auf der Oberfläche erzeugt werden [23]. Sehr häufig wird auch hochmolekulares Polyethylenimin (PEI) als erste Polyelektrolytschicht eingesetzt, da PEI auf vielen Oberflächen stabil adsorbiert und dadurch den Aufbau von PEM begünstigt [65, 124].

1.2.5 Polyelektrolytmultischicht-Hohlkapseln

Ein großer Vorteil der LbL-Technik besteht wie oben erwähnt darin, dass sehr viele Substrate von beliebiger Form und Struktur beschichtet werden können. Zur Herstellung von Polyelektrolytmultischicht-Hohlkapseln (LbL-Kapseln) werden zuerst dispergierte Partikel mit PEM beschichtet. Als Template sind besonders geladene Substrate wie z.B. Silikapartikel geeignet. Es konnte gezeigt werden, dass auch kolloidale Partikel, z.B. 30 nm Goldpartikel, mit PEM beschichtet werden können [153-155]. Der Aufbau von Multischichten auf Partikeln entspricht weitestgehend der Beschichtung von makroskopisch planaren Oberflächen. Die Schwierigkeit der Übertragung der LbL-Technik auf Partikel besteht jedoch darin, geeignete Bedingungen für eine homogene Beschichtung zu finden ohne eine Aggregation der umhüllten Partikel. Dazu müssen vor allem die Partikel- und Polymerkonzentration, Ionenstärke sowie der pH-Wert an das jeweilige System angepasst werden.

Die Abtrennung des vorhandenen Polymerüberschusses nach jeder Polyelektrolytschicht kann dabei entweder durch mehrmalige Zentrifugation und anschließendes Waschen [11] oder durch eine kontinuierliche Membranfiltration erfolgen [156]. Für Partikel mit einem geringen Dichteunterschied zum Dispersionsmedium ist die Abtrennung durch Zentrifugation erwartungsgemäß sehr zeitaufwendig. Erschwerend kommt dabei hinzu, dass häufig die Redispersierung des Sedimentes beschichteter Partikel sehr schwierig ist. Diese Schwierigkeiten können jedoch durch ein kontinuierliches Verfahren umgangen werden.

Zur Herstellung von LbL-Kapseln werden die Template, nach der Beschichtung mit PEM, aufgelöst. Dabei können leere Polymerhüllen (LbL-Kapseln) entstehen. Voraussetzung hierfür ist, dass die PEM unter den Auflösungsbedingungen stabil sind und die Auflösungsprodukte des Kerns die aufgebaute Polyelektrolythülle permeieren können [11, 12, 154, 157]. Das Verfahren zur Herstellung solcher LbL-Kapseln ist in Abbildung 6 illustriert.

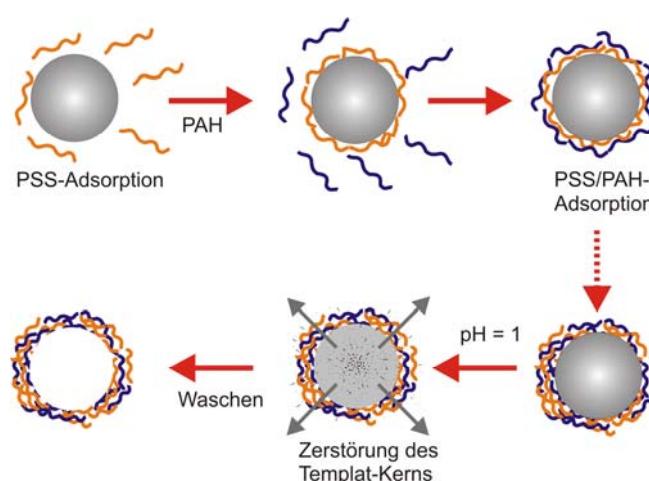


Abbildung 6: Herstellung von Polyelektrolytmultischicht-Hohlkapseln [109]

Bisher wurden LbL-Kapseln im Größenbereich von ca. 30 nm [155] bis über 20 µm [158] hergestellt. Begrenzt werden die möglichen Größen zum einen durch die stark zunehmende Aggregationstendenz bei kleinen Partikeln und zum anderen durch den ansteigenden osmotischen Druck bei der Templatauflösung großer Partikel. Ein hoher osmotische Druck wird beispielsweise von noch höhermolekularen Oligomeren aufgrund von eindringendem Wasser bei polymerbasierten Templaten während der Templatauflösung hervorgerufen und kann so zu einem Platzen der Polyelektrolythüllen führen [159, 160]. Neben dem mechanischen Stress bei der Templatauflösung verbleibt teilweise auch ein nicht geringer Anteil an Oligomeren im Kapselinneren und beeinflusst dadurch erheblich die Eigenschaften der resultierenden LbL-Kapseln [161, 162]. So ist vielfach der entscheidende Schritt bei der Herstellung von LbL-Kapseln neben einer aggregatfreien Beschichtung das spätere Herauslösen der Template (Abbildung 6). Hierfür müssen diese Template folgende Anforderungen erfüllen [109]:

- Die Template müssen unter den Bedingungen der Beschichtung mit Polyelektrolyten stabil sein
- Unter den notwendigen Bedingungen zur Templatauflösung dürfen die PEM nicht zerstört werden
- Die Template müssen aus den LbL-Kapseln möglichst rückstandslos entfernbare sein

Neben der chemischen Zusammensetzung beeinflussen natürlich auch die Form und Größenverteilung der Template die Eigenschaften und Qualität der resultierenden LbL-Kapseln. Insbesondere bei geladenen Templaten ist eine homogene Ladungsverteilung auf der Templatoberfläche für die Beschichtung mit Polyelektrolyten und die Stabilität der resultierenden Dispersion entscheidend. Für die Mehrzahl der Anwendungen sind daher sphärische Template mit einer engen Größenverteilung vorteilhaft. Template lassen sich im Wesentlichen in drei große Gruppen unterteilen: die anorganischen, organischen und die Template biologischen Ursprungs, wie z.B. Bakterien, Hefen oder Erythrozyten. Es sind eine Vielzahl von völlig unterschiedlichen Templaten zur Herstellung von LbL-Kapseln geeignet und in der Literatur beschrieben [109]. Als Template wurden z.B. schwach vernetzte Melaminformaldehyd-Latizes (MF-Partikel) [12], Polystyrol-Latizes [163, 164], Gold-Nanopartikel [155], Polymilchsäure-Partikel [158], Carbonat-Partikel, wie z.B. CaCO₃, CdCaO₃, MnCaO₃ [165], Siliciumdioxid-Partikel [62, 166, 167], Zellen [168-170] und kürzlich auch Gel-Partikel, wie z.B. Alginat [171, 172], thermosensitives Poly(N-Isopropylacrylamid) [173] oder Dextran-Hydroxyethylmethacrylat-Gelpartikel [159, 160], zur Herstellung von LbL-Kapseln verwendet. Jedes Templat hat sowohl Vorteile als auch Nachteile, so dass für eine spezifische Anwendung das Templat individuell ausgewählt werden muss.

Ein Großteil der Studien verwendet zur Herstellung von LbL-Kapseln monodisperse MF-Partikel, welche kommerziell im Größenbereich von 500 nm bis 12 µm (Microparticles GmbH, Berlin) erhältlich sind [174-176]. Wasserlösliche MF-Partikel sind oberhalb pH 5 stabil, so dass die Beschichtung mit Polyelektrolyten im neutralen pH-Bereich möglich ist. Die Auflösung von schwach vernetztem MF zu protonierten MF-Oligomeren erfolgt mittels 0,1 M HCl in Sekunden [161]. Auch mit wassermischbaren Lösungsmitteln, wie z.B. Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylsulfoxid (DMSO), können MF-Template leicht aufgelöst werden. Häufig kann bei der Auflösung der organischen Template ein Anschwellen der LbL-Kapseln beobachtet werden [154, 161, 162]. Das Anschwellen der LbL-Kapseln wird dabei durch MF-Oligomere hervorgerufen, welche aufgrund der Größe nicht ungehindert durch die PEM diffundieren. Dadurch entsteht vorübergehend eine osmotische Druckdifferenz, welche zum Anschwellen der Kapseln führt. Die Größe der auftretenden MF-Oligomere bei der Templayauflösung wird dabei stark vom Alter und der Qualität der MF-Charge beeinflusst und liegt im Bereich von 5000 g/mol bis 12000 g/mol [109].

Die Auflösung der weiteren organischen Template, wie z.B. Polystyrol- oder Polymilchsäure-Partikel, erfolgt üblicherweise mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln, welche bekanntermaßen einen großen Einfluss auf die Struktur und Stabilität von PEM haben können [177, 178]. Auch auftretender mechanischer Stress beeinflusst die Eigenschaften von LbL-Kapseln, wie z.B. Permeabilität und Festigkeit, so dass die Kapselqualität sehr stark vom verwendeten Templat und den Bedingungen bei der Templayauflösung abhängt [179, 180]. Neben diesen technischen Einschränkungen sind MF-Template für biomedizinische Anwendungen aufgrund von vorhandenen MF-Rückständen, die wegen der Größe oder der Wechselwirkung mit Polyelektrolyten im Kapselvolumen verbleiben, nur zweite Wahl [176, 181, 182]. Auch die Reproduzierbarkeit der Untersuchungen von LbL-Kapseln, welche auf Basis von MF-Templaten hergestellt wurden, ist nur sehr eingeschränkt möglich [109].

Template biologischen Ursprungs haben im Gegensatz zu den Polymerpartikeln den Vorteil, dass sie in verschiedensten Formen und Größen verfügbar sind. Sie ermöglichen die Herstellung von Kapseln unterschiedlichster Formen, da die resultierende Kapselform eine exakte Kopie des Templa darstellt [170, 183]. Für die Auflösung von Glutaraldehyd fixierten Erythrozyten kann beispielsweise eine basische Natriumhypochlorit-Lösung angewendet werden. Allerdings findet bei diesen aggressiven Auflösungsbedingungen unter Umständen auch eine chemische Modifikation der Polyelektrolyte statt [168].

Im Unterschied zu den organischen Templaten sind die anorganischen Template, wie z.B. CaCO₃, CdCO₃, MnCO₃, Gold oder SiO₂, vollständig unter sehr milden Bedingungen löslich. Die resultierenden kleinen Ionen können zudem sehr leicht die Multischichten permeieren. Silikatemplate (SiO₂) sind kommerziell in einem sehr breiten Größenbereich mit enger Korngrößenverteilung erhältlich. Dennoch gibt es

nur wenige Arbeiten, die zur Herstellung von LbL-Kapseln SiO₂-Partikel verwendeten. Ein Grund dafür ist unter Umständen, neben der Verwendung von toxischer Flusssäure, die sehr starke Partikelaggregation beim Auflösungsprozess, welche im Vergleich zu MF-Partikeln deutlich stärker zu beobachten ist [166, 167, 184]. Das Herauslösen von SiO₂-Partikeln kann direkt mit 1 M Flusssäure oder bei milderen Bedingungen (pH 5) mit einer Mischung aus HF und Ammoniumfluorid durchgeführt werden [62, 166, 167, 184, 185].

Im Unterschied zu SiO₂-Partikel mit glatter Oberfläche sind CaCO₃-Partikel häufig porös. Bei der Beschichtung von porösen CaCO₃-Partikeln bilden sich auch in den Poren, sofern diese mit den Polyelektrolytlösungen ausgefüllt sind, PEM die nach der Templatauflösung in den Kapseln erhalten bleiben [186]. CaCO₃-Partikel lassen sich leicht im neutralen pH-Bereich mit 0,2 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder im sauren Milieu mit 0,1 M HCl auflösen [187, 188]. Das Herauslösen der Gold-Partikel, welche nur im kolloidalen Größenbereich erhältlich sind, kann mit KCN unter sehr moderaten pH-Bedingungen erreicht werden [155].

Auch Gel-Partikel, wie z.B. aus Alginat oder Dextran, können mit Polyelektrolyten alternierender Ladung beschichtet werden und stellen so eine attraktive Methode zur Herstellung von gefüllten LbL-Kapseln dar. Die Auflösung der mit Calcium vernetzten Alginat-Gelpartikel durch EDTA ermöglicht auch die Herstellung von Alginat beladenen LbL-Kapseln [172].

Bisher gibt es kein universell einsetzbares Templat zur Herstellung von LbL-Kapseln, da deren resultierenden Eigenschaften zum Teil stark vom Templat beeinflusst werden. Zum Aufbau der Kapselwand sind vor allem solche Polyelektrolytkombinationen geeignet, die neben der chemischen Stabilität bei der Templatauflösung auch als frei vorliegender Film ausreichend stabil sind [160]. Abgesehen von den kommerziell erhältlichen synthetisch hergestellten Polymeren, wie z.B. PSS, PAH und PDA, konnte auch die Herstellung von LbL-Kapseln aus Polysacchariden, Proteinen, DNA, Lipiden und auch geladenen Nanopartikeln demonstriert werden [91, 92, 158, 164, 167, 181, 189-191]. Dabei muss unterschieden werden, ob die Bestandteile vor dem Herauslösen des Templatkerns oder auch danach als weitere Schicht aufgebracht wurden, da auch nach der Herstellung der LbL-Kapseln weitere Polyelektrolytschichten hinzugefügt werden können [180].

1.3 Eigenschaften von Polyelektrolytmultischichten

Die Eigenschaften von Polyelektrolytmultischichten (PEM) werden im Wesentlichen von der Zusammensetzung, also von den verwendeten Polyelektrolyten und den Bedingungen beim Aufbau der Multischichten, bestimmt. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über die Struktur und resultierende Permeabilität von PEM sowie die Möglichkeiten zur Beeinflussung geben.

1.3.1 Einflussparameter auf die Struktur von PEM

Den größten Einfluss auf die Struktur und damit auch auf die meisten Eigenschaften der ultradünnen Filme haben die Ionenstärke [144, 192, 193], der pH-Wert [194, 195], die Art des Lösungsmittels [196], die Temperatur [141, 197, 198], das Templat und die Feuchtigkeit [199, 200]. Polyelektrolytmultischichten sind vergleichsweise stabil gegenüber pH Änderungen, wenn ausschließlich starke Polyelektrolyte am Aufbau der Multischichten beteiligt sind. Ist ein schwacher Polyelektrolyt enthalten, so hat der pH-Wert des umgebenden Mediums einen großen Einfluss auf die Struktur der Schichten. Durch eine Verschiebung des pH-Wertes kann die Ladungsdichte des schwachen Polyelektrolyten beeinflusst werden, was zu einer Umstrukturierung der PEM führt. Mit einer gezielten pH-Behandlung kann so beispielsweise die Benetzung, Rauhigkeit und Porosität von PEM nachträglich beeinflusst werden [29, 145, 194, 195, 201-203].

Da PEM vor allem durch elektrostatische Wechselwirkungen zusammengehalten werden, wird deren Struktur maßgeblich durch die Ionenstärke des umgebenden Mediums beeinflusst. Hohe Ionenstärken begünstigen den Umbau der Struktur durch Abschirmung der elektrostatischen Ladungen an den Polymeren und können so zu einer Glättung und fortschreitenden Durchmischung (interdiffusion) der Polymerketten führen [193, 204]. Ab welcher Ionenstärke eine Umstrukturierung der PEM stattfindet, variiert sehr stark von System zu System und hängt unter anderem ab von der Stärke der elektrostatischen Bindungen, der Ionenarten und ob weitere Bindungskräfte, wie hydrophobe Wechselwirkungen, am Aufbau der Multischichten beteiligt sind [51].

Im Unterschied zum pH-Wert beeinflusst die Ionenstärke auch PEM, die ausschließlich aus starken Polyelektrolyten aufgebaut sind. Bei höheren Ionenstärken quellen PEM, wobei das Ausmaß jedoch von der jeweiligen Polyelektrolytkombination abhängig ist. So wurde z.B. für die Polyelektrolytkombination PSS/PDA bei geringer Ionenstärke auch eine vorübergehende Abnahme der Filmdicke beobachtet [192]. Bei sehr hohen Ionenstärken zerfallen die PEM im Allgemeinen, es sei denn, dass die Multischichten durch weitere intermolekulare Wechselwirkungen zusätzlich stabilisiert werden [51]. An LbL-Kapseln wurde der Einfluss der Ionenstärke sehr intensiv untersucht. Unter

anderem wurde dabei beobachtet, dass LbL-Kapseln beim Zusatz niedermolekularer Ionen schrumpfen. Das Ausmaß hängt dabei stark von der Art der Ionen ab und folgt der Hofmeister-Reihe, wobei schwach hydratisierte Kationen den stärksten Effekt zeigen [50, 205, 206].

Polyelektrolytmultischichten können unter Abnahme der Filmdicke, z.B. im Vakuum, getrocknet werden. Beim erneuten Kontakt mit Wasser oder in Gegenwart hoher Luftfeuchtigkeit quellen getrocknete Multischichten bis zur Ausgangsfilmdicke. Dieser Vorgang ist reversibel. Von Multischichten aus PSS/PAH und PSS/PDA wurde der Wassergehalt im getrockneten Zustand untersucht und dabei festgestellt, dass diese Multischichten nach dem Trocken noch einen relativ hohen Wasseranteil von ca. 10-20 % haben [199, 207]. Einige Polyelektrolytkombinationen quellen beim erneuten Kontakt mit Wasser um mehr als das Vierfache [208]. Es ist zu vermuten, dass das Quellverhalten mit der Stärke der Komplexbildung bzw. den noch freien Ladungsgruppen in den Multischichten korreliert. Sind innerhalb der PEM noch viele freie Ladungsgruppen vorhanden, ist eine stärkere Quellung zu beobachten als bei Multischichten, wo die Mehrzahl der geladenen Gruppen an der gegenseitigen Komplexbildung beteiligt ist. Die erhaltene interne Struktur von PEM steuert die wichtigsten Eigenschaften der Multischichten, wie die Permeabilität, Stabilität, Festigkeit und das Quellverhalten.

1.3.2 Permeabilität von PEM

Für viele pharmazeutische und diagnostische Anwendungen ist die Permeabilität von Polyelektrolytmultischichten die entscheidende Eigenschaft. Niedermolekulare Verbindungen, wie z.B. Glucose, können PEM leicht durchdringen, wohingegen Makromoleküle zurück gehalten werden. Für den Durchtritt eines Stoffes durch die PEM ist neben der Größe die Ladung von entscheidender Bedeutung. Ab welchem Molekulargewicht Substanzen von den PEM effektiv zurückgehalten werden, hängt stark von der Filmzusammensetzung und Filmdicke ab und somit auch von den Bedingungen, unter denen die PEM gebildet wurden. Die Permeabilität von LbL-Kapseln wird außerdem auch durch das verwendete Templat und den Auflösungsbedingungen beeinflusst [209].

Viele Permeabilitätsuntersuchungen wurden vorzugsweise mit LbL-Kapseln durchgeführt. LbL-Kapseln, die mindestens einen schwachen Polyelektrolyten enthalten, sind dabei nur in einem sehr engen pH-Bereich stabil. Eine Verschiebung des pH-Wertes in den Bereich des pK_s -Wertes des schwachen Polyelektrolyten führt zu einer starken Strukturänderung der Multischichten, was mit einem Anschwellen der Kapseln und einer drastischen Erhöhung der Permeabilität einhergeht [177, 210]. Im gequollenen Zustand sind LbL-Kapseln über einen längeren Zeitraum nur dann stabil, wenn weitere Bindungskräfte die PEM zusätzlich zusammenhalten. Es konnte

gezeigt werden, dass die Größen- und Permeabilitätsänderungen von LbL-Kapseln durch eine Verschiebung des pH-Wertes reversibel sind, was die Möglichkeit einer gezielten Befüllung mit Makromolekülen eröffnet, da zwischen verschiedenen Permeabilitäten gezielt gewechselt werden kann [177, 211].

Die Permeabilität von LbL-Kapseln wird weiterhin auch von der Ionenstärke des umgebenden Mediums beeinflusst. In reinem Wasser sind LbL-Kapseln mit 8 Polyelektrolytschichten aus $(\text{PSS}/\text{PAH})_4$ auf Basis von MF-Templaten nicht permeabel für Substanzen mit einem Molekulargewicht > 15.000 g/mol. Bereits bei einem geringen Salzgehalt von ca. 10 mM NaCl werden die LbL-Kapseln auch für hochmolekulare Substanzen > 70.000 g/mol permeabel [109, 212]. Durch eine Erhöhung der Anzahl an Polyelektrolytschichten kann diese Permeabilität merklich reduziert werden, so dass in Gegenwart von 250 mM NaCl LbL-Kapseln mit 14 Schichten aus PSS und PAH nicht mehr für Tetramethylrhodaminisothiocyanat-Dextran (TRITC-Dextran) mit einem Molekulargewicht von 4400 g/mol wohl aber für niedermolekulare Verbindungen wie z.B. TRITC permeabel sind [175]. Wie bei den Permeabilitätsuntersuchungen an leeren LbL-Kapseln wurde ein Einfluss der Ionenstärke auch auf die Freisetzung von direkt beschichteten Fluoreszein-Mikrokristallen (PSS/PAH) gefunden. Mit steigender Ionenstärke beschleunigt sich die Freisetzung dieser Modellsubstanz [213].

Die Ionenstärke beeinflusst neben der Permeabilität auch die Größe von LbL-Kapseln. Das Ausmaß muss in Abhängigkeit von der Ionenstärke betrachtet werden. Bei niedrigen Ionenstärken bleibt die Größe von LbL-Kapseln weitestgehend unbeeinflusst, wohingegen die Permeabilität bereits zunimmt [212]. Für die Polyelektrolytkombination PAH/PSS nimmt die Permeabilität von LbL-Kapseln mit 8 Polyelektrolytschichten im Bereich einer Salzkonzentration von 5-20 mM NaCl drastisch zu, ohne eine sichtbare Veränderung der Kapselgröße [212]. Bei höheren Salzkonzentrationen schrumpfen die LbL-Kapseln und die Dicke der Multischichten nimmt zu [205, 214-216].

Der Temperatureinfluss auf die Permeabilität von PEM wurde an LbL-Kapseln aus PSS/PAH und PSS/PDA untersucht. Für die mit MF-Templaten hergestellten LbL-Kapseln aus PSS/PAH wurde eine Abnahme der Kapselgröße und Permeabilität durch eine zeitlich begrenzte Erhöhung der Temperatur gefunden [174, 217]. Auch die Größe von LbL-Kapseln aus PSS/PDA wird von der Temperatur beeinflusst. In Abhängigkeit von der äußeren Polyelektrolytschicht und der Salzkonzentration quellen oder schrumpfen LbL-Kapseln aus PSS und PDA bei einer Erhöhung der Temperatur [141, 214, 218]. Offensichtlich führt eine kurzzeitige Temperaturerhöhung zu einer Strukturänderung der Multischichten, was damit die Permeabilität beeinflusst. So zeigte Ye et al. an Insulin beladenen LbL-Kapseln, dass sich die Insulin-Freisetzung durch ein Tempern bei 60°C deutlich verlangsamt. Auch durch eine direkte LbL-Beschichtung bei erhöhter Temperatur kann die Permeabilität von PEM, wie Ye et al. zeigte, beeinflusst werden [18].

Ein Zusatz von organischen Lösungsmitteln zu wässrigen Kapsel-Dispersionen erhöht im Allgemeinen die Permeabilität der PEM [219, 220]. Eine Abnahme der Dielektrizitätskonstante des Mediums verstärkt die elektrostatische Bindung und Abstoßung der Ladungen in den Multischichten und führt zu einer makroskopisch sichtbaren Veränderung der Filmstruktur. Als Folge bilden sich in den Multischichten Poren aus, die zu einer Zunahme der Permeabilität führen. Inwiefern diese Beeinflussung der Permeabilität durch organische Lösungsmittel reversibel ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert [219, 220].

Unter physiologischen Bedingungen sind die meisten PEM semipermeabel. Die geringste Permeabilität wurde von LbL-Kapseln bestehend aus Tannin und Chitosan berichtet [221]. Im neutralen Milieu wurde für diese Polyelektrolytkombination an LbL-Kapseln aus 8 Polyelektrolytschichten schon eine deutliche Beeinflussung der Permeabilität für Fluorescein-Dextran 4.400 Da festgestellt [221].

Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung der Permeabilität besteht in der Vergrößerung der Schichtdicke. Üblicherweise liegt die Dicke von PEM bei 10-30 Polyelektrolytschichten weit unter 300 nm. Bereits kleinste Löcher oder Fehlstellen dieser Beschichtung führen zum Verlust der Diffusionsbarriere und erhöhen die Permeabilität drastisch. Im Unterschied zur Herstellung von LbL-Kapseln mit sphärischen Templayern und enger Korngrößenverteilung, sind Wirkstoffkristalle dabei häufig von irregulärer Form und Größe. Damit wird eine vollständige Umhüllung / Beschichtung, insbesondere der Ecken und Kanten, von Wirkstoffkristallen erschwert und es müssen unter Umständen deutlich mehr Polyelektrolytschichten aufgebracht werden. Hinzu kommt, dass Wirkstoffkristalle im Unterschied zu den üblicherweise verwendeten Templayern, häufig keine stabile und homogene Ladungsverteilung auf der Oberfläche besitzen. In mehreren Arbeiten an direkt beschichteten Wirkstoffkristallen wurde eine Reduktion der Freisetzungsraten durch dickere PEM gefunden [17-20, 209, 222-224]. So zeigt z.B. Qui et al., dass sich die Ibuprofen-Freisetzung von beschichteten Kristallen durch eine Erhöhung der Anzahl von Polyelektrolytschichten verringert [17]. Von Ye et al. konnte an Insulin beladenen LbL-Kapseln nachgewiesen werden, dass die Wirkstofffreisetzung durch eine nachträgliche Beschichtung der bereits beladenen LbL-Kapseln mit 4 zusätzlichen Polyelektrolytschichten weiter reduziert wird [176]. Außerdem zeigt dieses Beispiel deutlich, dass PEM auch für Insulin mit einem Molekulargewicht von 5.808 Da noch durchlässig sind.

Insgesamt ist der Einfluss von PEM auf die Wirkstofffreisetzung kleiner organischer Moleküle insbesondere unter isotonen Bedingungen nur sehr gering und es erscheint aus heutiger Sicht fraglich, ob durch eine direkte Beschichtung von Wirkstoffkristallen eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung über mehrere Tage und Wochen überhaupt möglich ist, wie zu Beginn der Entwicklung der LbL-Technik immer gehofft wurde.

1.4 Aufbau von Wirkstoff-Polyelektrolyt-Multischicht Strukturen

Bereits kurz nach der Etablierung der LbL-Technik wurde damit begonnen, LbL-Kapseln mit pharmakologisch aktiven Substanzen zu beladen [14-16, 225]. Dabei verfolgten die meisten Untersuchungen das Ziel, den Einfluss der PEM auf die Wirkstofffreisetzung aus dem Inneren der Kapseln zu untersuchen. Bis jetzt wurden verschiedene Wege zur Beladung von LbL-Kapseln entwickelt, welche prinzipiell in zwei Hauptgruppen unterteilt werden können. Entweder erfolgt die Beladung mit der aktiven Substanz während der Kapselherstellung oder erst nach einer vollständigen Herstellung von Polyelektrolytmultischicht-Hohlkapseln.

Seit geraumer Zeit finden aber auch die Multischichten selbst als Wirkstoffträger zunehmendes Interesse. So wurde herausgefunden, dass PEM zur Herstellung von bioaktiven Filmen, z.B. auf Prothesen oder Stents, geeignet sind [33, 75, 226-229]. Im Folgenden werden die einzelnen Wege zur Herstellung von beladenen LbL-Kapseln sowie von wirkstoffbeladenen Multischichten vorgestellt.

1.4.1 Direkte LbL-Beschichtung von Wirkstoffen

Die ersten beladenen LbL-Kapseln wurden durch direkte Beschichtung von schwer wasserlöslichen Wirkstoffen hergestellt [14-16]. Diese Methode eignet sich für Wirkstoffe, die unter den Bedingungen der LbL-Beschichtung chemisch stabil sind und sich nicht signifikant auflösen [15, 223, 230]. Bevorzugt geeignet sind solche Stoffe, die über einen großen pH-Bereich sehr schwer wasserlöslich sind. Wie bei der Herstellung von LbL-Hohlkapseln wird die Kapselgröße und Form im Wesentlichen von der Korngröße der Wirkstoffkristalle bestimmt. Häufig ist es daher notwendig, den Wirkstoff vor der Beschichtung zu zerkleinern und zu klassieren. Für die Beschichtung von hydrophoben und nicht geladenen Wirkstoffen wurden zur Erzeugung einer Oberflächenladung ursprünglich ionische Tenside angewendet [15]. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass hydrophobe Partikel auch ohne Tenside mit Multischichten beschichtet werden können, was vorteilhaft ist, da Tenside durch die Mizellbildung häufig die Löslichkeit des Wirkstoffes erhöhen und somit für eine effektive Beschichtung im wässrigen Milieu ungünstig sind [17, 20, 231].

Eine häufig auftretende Schwierigkeit bei der direkten Beschichtung von schwer wasserlöslichen Wirkstoffen besteht in der Zusammenlagerung von einzelnen Partikeln zu größeren Agglomeraten. Besonders häufig erfolgt die Agglomeration bei der Abtrennung des Polymerüberschusses durch Zentrifugation, da hier die Partikel trotz der gleichsinnigen Ladung im Sediment kompaktiert werden. Die Agglomeration wird insbesondere durch eine inhomogene Beschichtung der Kristalloberfläche begünstigt, wodurch sich die Partikel aufgrund der elektrostatischen Anziehung unterschiedlich geladener Oberflächenbereiche zu größeren Strukturen

zusammenlagern. Durch eine Behandlung mit Ultraschall in Anwesenheit eines Überschusses des äußeren Polyelektrolyten, können die Agglomerate teilweise wieder aufgelöst werden. Ein weiterer Faktor, der die Entstehung von Agglomeraten auslöst, liegt in der typischerweise breiten Korngrößenverteilung von unklassierten Mahlprodukten. Breite Korngrößenverteilungen begünstigen die Bildung von Agglomeraten und erschweren die vollständige Abtrennung des Polymerüberschusses mittels Zentrifugation. Auch die Partikelform hat einen Einfluss. Besonders bei flachen, plättchenförmigen Kristallen können sich stabile Agglomerate durch die großen Kontaktflächen bilden. Insgesamt erhöht sich aber die Tendenz zur Bildung von Agglomeraten bei kleineren Partikeln.

Neben einer inhomogenen Beschichtung und der Partikelform ist das Ausmaß der Bildung von Agglomeraten natürlich sehr stark von den verwendeten Polyelektrolyten und den Beschichtungsbedingungen wie pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur abhängig [160]. Weiterhin beeinflusst auch das Molekulargewicht der verwendeten Polyelektrolyte die Tendenz zur Bildung von Agglomeraten. Die Verwendung von hochmolekularen Polyelektrolyten vergrößert die Möglichkeit zur Bildung von Brücken zwischen mehreren Partikeln, so dass unter Umständen auch das Molekulargewicht an die jeweilige Partikelgröße angepasst werden muss. Bei der Beschichtung mit Polymerüberschuss kann die Abtrennung des ungebundenen Polyelektrolyten nach jeder Schicht durch Zentrifugation oder mittels kontinuierlicher Membranfiltration erfolgen [156].

1.4.2 Beladung von LbL-Hohlkapseln

Eine attraktive Methode nutzt die nachträgliche Beladung vorgefertigten Hohlkapseln durch Dispergierung in einem Medium mit gelöstem Wirkstoff. Elegante Systeme verwenden dabei eine reversible Veränderung der Permeabilitätseigenschaften der LbL-Hülle durch Einstellung der Ionenstärke, des pH-Wertes oder der Temperatur [176, 211, 216, 220, 232, 233]. Zur Erhöhung der Stabilität oder einer gezielten Verringerung der späteren Permeabilität bei der Freisetzung können die PEM auch vor der Beladung zusätzlich kovalent vernetzt werden.

Eine Verkapselung ist nur für solche Moleküle möglich, welche die PEM unter den Lager- und Applikationsbedingungen nicht permeieren und somit effektiv unter bestimmten Bedingungen zurück gehalten werden. Unter Umständen ist das besonders für höhermolekulare Verbindungen möglich. Die erreichbare Beladung ist jedoch aufgrund der geringen Löslichkeit im Dispersionsmedium häufig sehr begrenzt. Hinzu kommt, dass die extremen Bedingungen (insbesondere die hohe Salzkonzentration, pH-Wert und Temperatur), die für eine Beladung bei erhöhter Permeabilität notwendig sind, möglicherweise für viele Makromoleküle ungeeignet

sind, da sie unter diesen Bedingungen schwer löslich sind oder ebenfalls geladen vorliegen.

Eine weitere Strategie zur Beladung von LbL-Kapseln nutzt Kapseln, welche vor der Beladung mit der aktiven Substanz bereits mit Makromolekülen beladen sind. Die im Lumen der LbL-Kapseln eingeschlossenen Polymere können zusätzlich die Aufnahme und Abgabe von pharmakologisch aktiven Substanzen beeinflussen. Die Beladung der LbL-Kapseln mit Makromolekülen, welche zu der gewünschten Anreicherung der aktiven Substanz führen, kann auf unterschiedliche Wege erreicht werden. So können diese, neben einer Modifizierung der Permeabilität der Multischichten, über poröse Template, sphärische Mikrogele oder eine Polymersynthese in den Kapseln eingebracht werden. Die sogenannte „ship-in-a-bottle“ Strategie nutzt dazu deren semipermeable Eigenschaften aus [234]. Zuerst wird für die Synthese das Monomer zu einer Kapseldispersion zugegeben. Aufgrund der hohen Permeabilität der Kapselwand für niedermolekulare Verbindungen, kann sich das Monomer homogen im gesamten Volumen verteilen. Nachdem die Polymerisationsreaktion stattgefunden hat, wird das nicht eingeschlossene Polymer durch Waschen abgetrennt, während die mit synthetischem Polymer befüllten LbL-Kapseln erhalten bleiben [234, 235].

So konnten Ye et al zeigen, dass LbL-Kapseln aus Chitosan / Alginat mit Insulin in Abhängigkeit vom pH-Wert beladen werden können [176]. Die Autoren fanden heraus, dass die Beladung unterhalb des isoelektrischen Punktes von Insulin bevorzugt stattfindet und führt dies auf eingeschlossene Komplexe aus Alginat und Melaminformaldehyd zurück. Die Komplexe sind anionisch geladen und können das im Sauren kationisch geladene Insulin komplexieren. Die Herausforderung besteht darin, Polymere zu finden, die möglichst selektiv den Wirkstoff binden und so eine Akkumulation von Wirkstoffen in LbL-Kapseln ermöglichen. Theoretisch eignet sich diese Methode auch zur Befüllung von LbL-Kapseln mit kleinen Molekülen, da z.B. durch eine elektrostatische Wechselwirkung oder eine variierende Lösungsmittelzusammensetzung eine Anreicherung / Präzipitation der Substanzen in den Kapseln erreicht werden kann [236-238].

1.4.3 Beladung über poröse Template

Eine vielseitige Methode zur Beladung von LbL-Kapseln ist die Verwendung von porösen Templayern, welche nachfolgend mit PEM beschichtet werden. Dabei können die porösen Template entweder durch Adsorption [186, 188, 236, 239-241] oder durch Kopräzipitation mit der aktiven Substanz bei der Templaytherstellung beladen werden [92, 187]. Nach der Beschichtung mit Polyelektrolyten können die Template unter milden Bedingungen aufgelöst werden. So können beispielsweise poröse CaCO_3 -Partikel mit EDTA bei neutralem pH-Wert aufgelöst werden. Aufgrund der

großen Oberfläche von porösen Templaten können mit dieser Methode Kapseln mit vergleichsweise hoher Wirkstoffbeladung hergestellt werden [13]. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass diese Methode zur Anreicherung von hochmolekularen [185, 186, 188, 240-243] und niedermolekularen [239, 244] Verbindungen in LbL-Kapseln geeignet ist. So konnten Palath et al. zeigen, dass eine Anreicherung von Hämoglobin in porösen CaCO₃-Partikel möglich ist [240]. Durch eine Beschichtung der beladenen Partikel mit PEM und Auflösung der Template lassen sich künstliche rote Blutzellen herstellen, die aufgrund der Verkapselung von Hämoglobin viele Vorteile besitzen z.B. als blutgruppenunabhängiges Blutersatzmittel [240].

Der Verlust an adsorbiertem Material, der beim nachträglichen Aufbau von PEM entsteht, kann möglicherweise durch einen Zusatz von Polyethylenglykol zu den Beschichtungslösungen verringert werden. So konnte Zhi et al. zeigen, dass mit einem Zusatz von 50 % Polyethylenglykol 300 (PEG 300) zu den Polyelektrolytlösungen die Beladung mit Glucose-Oxidase durch eine Verringerung der Desorption erhöht werden kann [241]. Das Ausmaß der Wechselwirkung mit dem Templat ist neben der großen Oberfläche für die Beladung und Ausbeute entscheidend. Zur Erhöhung der Beladung und Stabilität kann die Oberfläche von porösen Templaten auch schon vor der Beladung mit der LbL-Technik modifiziert werden. So können z.B. die Poren von CaCO₃ Partikeln mit Chitosan ausgekleidet werden, was für anionisch geladene Wirkstoffe zu einer Erhöhung der Beladung führen kann. Natürlich eignen sich zur Befüllung auch hydrophob modifizierte Partikel, welche besonders für schwer wasserlösliche Wirkstoffe prädestiniert sind.

Im Gegensatz zu der direkten Beschichtung von schwer wasserlöslichen Substanzen bietet die Verwendung von porösen Templaten den Vorteil, dass LbL-Kapseln mit sphärischer Form, mit enger einheitlicher Größe und gleichbleibenden mechanischen Eigenschaften hergestellt werden können. Für viele Anwendungen, wie z.B. der Entwicklung von künstlichen roten Blutzellen, ist das von großem Nutzen. Auch im Hinblick auf eine effektive Verkapselung, sind sphärische Partikel mit einer glatten Oberfläche Kristallen mit Ecken und Kanten vorzuziehen. Die LbL-Beschichtung ermöglicht dabei eine Steuerung der Hydrophilie und der Oberflächenladung. So können auch hydrophobe Partikel mit einer LbL-Beschichtung oberflächlich hydrophilisiert werden, was eine Herstellung von stabilen wässrigen Suspensionen ohne Tensideinsatz ermöglicht.

1.4.4 LbL-Beschichtung von Mikrogelen

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von beladenen sphärischen LbL-Kapseln ist die Verwendung von Mikrogelen als Template. Mikrogele, mit einer Partikelgröße im µm-Bereich, sind aus innermolekular vernetzten Makromolekülen aufgebaut und quellbar [245, 246]. So erforschten De Geest et al. die Beschichtung von

quervernetzen Dextran-Hydroxyethylmethacrylat (Dextran-HEMA) Mikrogele mit PEM [159]. Mit der LbL-Technik ist es möglich, Mikrogele oberflächlich zu modifizieren und auf diesem Weg die Permeation, die Suspensionsstabilität oder die Aufnahme / Adsorption von Gelpartikeln gezielt zu beeinflussen. Dabei beobachtete De Geest eine Beeinflussung der Freisetzung von Dextran-Tetramethylrhodaminisothiocyanat (Dextran-TRITC) durch die Beschichtung mit PEM. Beschichtete Dextran-HEMA Mikrogele zeigen eine weitere interessante Eigenschaft. Durch die Hydrolyse der Esterbindung des quervernetzten Dextran-HEMA erhöht sich der Quellungsdruck innerhalb der LbL-Kapseln. Ab einem bestimmten kritischen Druck reißen diese dann auf [160]. Damit ist es theoretisch möglich, ein Darreichungssystem für hochmolekulare Wirkstoffe zu entwickeln, welches den Wirkstoff nach einer definierten Zeit pulsatil freisetzt.

1.4.5 Einbau von Wirkstoffen in PEM

Polyelektrolytmultischichten können aber auch direkt als Wirkstoffträger fungieren. Es bestehen verschiedene Möglichkeiten, die Multischichten mit Wirkstoffen zu beladen. Entweder können in bestehende PEM Wirkstoffe nachträglich eingebracht werden oder der Einbau erfolgt direkt mit dem Aufbau der Multischichten. Für den Erfolg der Beladung sind neben dem Einfluss der verwendeten Polyelektrolyte die physikochemischen Eigenschaften der aktiven Substanz, insbesondere ihre Ladung, Molekulargewicht und Löslichkeit entscheidend.

Substanzen mit mehreren gleichsinnigen Ladungen können beim Aufbau von Multischichten als separate Schicht integriert werden. So untersuchte z.B. Zhang et al. den direkten Aufbau von PEM mit DNA als negative Schicht [247]. Auch kleinere Moleküle wie z.B. Gentamycin, können direkt als Schicht für den Aufbau von Multischichten verwendet werden [228]. Dabei demonstrierte Chuang et al., dass über das Molekulargewicht von PAA als entgegengesetzt geladen Schicht die Dosierung und Freisetzung von Gentamycin kontrolliert werden kann [228]. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, kolloidale Komplexe aus Polyelektrolyten und geladenen aktiven Substanzen zum Aufbau von Multischichten zu verwenden. Zum Beispiel zeigte Thierry et al., dass Komplexe aus Hyaluronsäure und L-Arginin als niedermolekulare geladenen Substanz prinzipiell zum Aufbau von Multischichten in Kombination mit Chitosan geeignet sind [31]. Neben der Beschichtung mit Komplexen ist es auch möglich, eine Mischung aus zwei Polymeren als Schicht zu verwenden. So zeigten Mao et al., dass eine Herstellung von PEM aus PEI und einer Mischung von saurem Fibroblasten-Wachstumsfaktor und Heparin alternierend möglich ist [87]. Auch ein direkter Einbau von basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor in PEM ist möglich [120]. In Zellkulturuntersuchungen wurde beobachtet, dass bereits nach kurzer Zeit die Information einer einzelnen aktiven

Schicht unter mehreren Multischichten von direkt aufgebrachten Zellen erkannt werden kann [248, 249]. Mikroskopisch konnte gezeigt werden, dass zur Freisetzung der eingebauten aktiven Schichten ein lokaler Abbau der darüberliegenden PEM erfolgt [248]. Von wissenschaftlichem Interesse ist zudem die Beobachtung, dass eine Erkennung der Information durch die Verwendung von Poly(D-lysin) statt Poly(L-lysin) unterdrückt und somit als zelluläre Barriere verwendet werden kann [248].

Auch eine Akkumulation von niedermolekularen Substanzen in bereits bestehende PEM, unabhängig von der Ladung der äußersten Schicht, ist möglich [250]. So erforschten Berg et al. nanoporöse PEM als ultradünne Beschichtungen für die kontrollierte Freisetzung von Ketoprofen und Cytochalasin D [29]. Die Porosität von Multischichten aus PAH/PAA oder PAH/PSS kann mit einer pH-Behandlung aufgrund der pH abhängigen Ladungsdichte schwacher Polyelektrolyte modifiziert werden [194, 201]. Die porösen Strukturen wurden durch eine zweistündige Lagerung bei 180°C fixiert, da bei dieser Temperatur eine Quervernetzung der Polyelektrolyte stattfindet. Die Autoren konnten eine Aufnahme von beiden Stoffen in PEM aus Dimethylsulfoxid-Lösungen zeigen und beobachteten eine Wirkstofffreisetzung 0. Ordnung über mehrere Tage [29]. Auch ohne zusätzliche Erzeugung einer Porosität können PEM mit organischen, insbesondere mit geladenen Molekülen, beladen werden [251, 252]. Der Einbau von geladenen Molekülen in Multischichten mit schwachen Polyelektrolyten wird vom pH-Wert beeinflusst, da dieser die Ladung und somit die elektrostatische Wechselwirkung beeinflusst [252]. Zusätzlich kann die Beladung durch den Quellungsgrad und damit über die Ionenstärke gesteuert werden [251]. Insgesamt hängt die Integration von Substanzen in PEM stark von den Eigenschaften der aktiven Substanz ab und wird von der Struktur und Ladungsverteilung der Multischichten gesteuert. So akkumulieren positiv geladene Substanzen stärker in PEM mit schwachen kationischen Polyelektrolyten im basischen pH-Bereich [252]. Im sauren pH-Bereich hingegen reichern sich negativ geladene acide Substanzen in PEM aus schwachen Polyanionen stärker an, da bei niedrigeren pH-Werten die Ladungsdichte anionisch geladener Polyelektrolyte abnimmt und damit die negativ geladenen Substanzen stärker in den Multischichten akkumuliert werden können [252]. Insgesamt steigt die Beladungskapazität der PEM linear mit der Dicke der Multischichten an [251].

Vodouhe et al. berichteten kürzlich, dass PEM aus Poly(L-lysin) (PLL) und Hyaluronsäure (HA) mit Paclitaxel (PTx) ohne eine chemische Modifikation des Wirkstoffes oder der Polyelektrolyte beladen werden können [253]. Multischichten aus PLL und HA zeigen ein ausgeprägtes nicht-lineares Schichtenwachstum. Bei der Assemblierung dringt PLL in die Multischichten ein, so dass die PEM als Reservoir für PLL fungieren [253-255]. Die Untersuchungen von Vodouhe et al. zur Beladung erfolgten allerdings mit fluoreszenzmarkiertem PTx (Oregon Green 488), welches dadurch im Unterschied zu PTx eine anionische Gruppe trägt. Möglicherweise beruht

die beobachtete starke Anreicherung von fluoreszenzmarkiertem PTx auch auf der elektrostatischen Wechselwirkung mit dem im Überschuss vorliegendem PLL. Auch in PEM aus ausschließlich starken Polyelektrolyten können Substanzen integriert werden [256]. Der Einbau kann dabei in Gegenwart der polyionischen Beschichtungslösung und / oder mit dem Spülwasser durchgeführt werden [65, 256]. Kürzlich wurde die Beladung von PEM mit kleinen hydrophoben Molekülen über amphiphil modifizierte Polyelektrolyte vorgestellt [67]. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass auch geladene Cyclodextrin-Derivate zur Bildung und Beladung von PEM geeignet sind [257-259]. So erforschten Gangloff et al. die Beladung und biologische Aktivität einer in β -Cyclodextrin eingeschlossenen Substanz. Bei diesen Untersuchungen wurde ein Lipid A Antagonist in kationisch modifiziertes β -Cyclodextrin komplexiert und zum Aufbau von PEM angewendet [258]. Die Verwendung von hydrophob modifiziertem Pullulan ermöglicht ebenso die Beladung von PEM [67]. Die Autoren zeigten, dass sowohl ein Aufbau mit Polyelektrolyt-Substanz-Komplexen als auch eine nachträgliche Beladung in bestehende Multischichten möglich sind [67].

Polyelektrolytmultischichten können auch durch Konjugation mit Wirkstoffen beladen werden [33, 229, 249, 260]. Die Verknüpfung kann dabei prinzipiell vor dem Aufbau oder an bereits gebildete PEM erfolgen. Im Hinblick auf Selektivität und Charakterisierung ist die separate Konjugation gegenüber der Ankopplung an bestehende Multischichten zu bevorzugen. Im Allgemeinen sind in PEM viele verschiedene, möglicherweise chemisch konkurrierende funktionelle Gruppen vorhanden, die eine selektive Ankopplung des Wirkstoffes verhindern. Außerdem ist eine Mögliche und meistens unerwünschte Quervernetzung der Polyelektrolyte untereinander zu berücksichtigen.

Chluba et al. erforschten die Immobilisierung und biologische Aktivität eines kovalent gebundenen Signalpeptides in Multischichten aus Poly(L-glutaminsäure) (PG) und Poly(L-lysin) (PLL) [249]. Die Autoren konnten zeigen, dass die Aktivität des Peptides erhalten bleibt. Das Signalpeptid wurde an modifiziertes PLL über eine Disulfidbindung gekoppelt und als einzelne Schicht in Multischichten integriert oder als Abschlusssschicht aufgebracht. Die Autoren fanden heraus, dass Zellen in kurzer Zeit auf die Information des aktiven Peptides reagierten [249]. Sehr interessant ist die Beobachtung, dass die Aktivität des Peptides bei der Verwendung als äußerste Schicht im Vergleich zu einer Inkorporation in PEM deutlich kürzer zu beobachten ist [249]. Eine mögliche Ursache für die Beobachtung könnte in der vergleichsweise geringen Stabilität von Disulfidbindungen begründet sein. Eventuell wird durch den Einbau in Multischichten die Stabilität von Disulfidbindungen erhöht oder deren Abbau verzögert.

Den Aufbau von PEM mit mehrfach geladenen polymeren Prodrugs erforschten erstmals Thierry et al. [33]. Die Autoren demonstrierten die Möglichkeit des Aufbaus von PEM mit Hyaluronsäure-Paclitaxel-Konjugaten (HA-PTx) und Chitosan und analysierten die Freisetzung von PTx [33]. Vor der Bildung der wirkstoffbeladenen

Strukturen wurde PTx über eine labile Esterbindung an Hyaluronsäure kovalent gekoppelt. Obwohl die Multischichten unter den gewählten Bedingungen stabil sind, analysierten die Autoren eine Freisetzung von ca. 50 % des eingebauten PTx innerhalb von 3 Stunden [33].

Aus heutiger Sicht besitzt der Einbau von Wirkstoffen in PEM im Vergleich zur Umhüllung von wirkstoffhaltigen Strukturen mit Polyelektrolyten das größere Potenzial. Durch eine direkte Beschichtung von niedermolekularen Wirkstoffen mit PEM konnte, insbesondere unter physiologischen Bedingungen, bisher keine relevante Beeinflussung der Wirkstofffreisetzung erreicht werden. Möglicherweise können PEM zur tensidarmen Stabilisierung von Suspensionen Anwendung finden. Auch die stabile Anbindung von Transportgruppen durch eine Assemblierung funktionalisierter Polyelektrolyte an partikuläre Systeme kann mittels der LbL-Technik erreicht werden.

Der Fokus dieser experimentellen Arbeit lag im Aufbau von Paclitaxel-haltigen PEM durch chemische Bindung der aktiven Verbindung an einen Polyelektrolyten. Über diesen Weg können Substanzen mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften in Multischichten eingebracht werden, was ein Vorteil gegenüber etablierten Technologien darstellt. Dabei können die Multischichten auf makroskopischen und mikroskopischen Oberflächen unterschiedlichster Form und Gestalt aufgebaut werden (conformal coating). Sofern poröse Strukturen direkt mit den Beschichtungslösungen in Kontakt kommen, können auch kleinste Poren bis in den unteren Nanometer-Bereich mit PEM ausgefüllt sowie in den Grenzflächeneigenschaften modifiziert werden. Ein aktuell hoch interessantes Anwendungsgebiet wirkstoffbeladener Beschichtungen sind Drug-Eluting Stents (DES). Bei der Entwicklung von DES der nächsten Generation wird auch eine Mikrostrukturierung der Stent-Oberfläche verfolgt, wobei auch kleinste Wirkstoffreservoir (poröse Oberflächen) mit aktiven Beschichtungen ausgefüllt werden sollen [8]. Wie die Untersuchungen an porösen Templanen zeigen sind PEM zur Beladung solcher Strukturen sehr gut geeignet. Mit dieser Arbeit wurde versucht, die Möglichkeiten und Grenzen dieser Nanotechnologie am Beispiel von DES herauszufinden.

1.5 Polyelektrolytmultischichten zur lokalen Freisetzung von Paclitaxel

Die Beladung von Multischichten mit Paclitaxel (PTx) wurden bereits an verschiedenen Polyelektrolytkombinationen untersucht [33, 253, 261]. Abgesehen von der passiven Anreicherung des Wirkstoffes in bestehende PEM aus Poly(L-lysin) (PLL) und Hyaluronsäure (HA) wurde auch der Aufbau von Multischichten mit einem Hyaluronsäure-Paclitaxel-Konjugat (HA-PTx) und Chitosan publiziert [33, 253]. Die

beiden Systeme zeigen ein nicht vergleichbares Freisetzungerverhalten. Während keine PTx-Freisetzung aus PEM mit PLL und HA innerhalb von 4 Tagen von den Autoren festgestellt wurde, zeigte die Beschichtung mit dem Konjugat eine schnelle Wirkstofffreisetzung von ca. 50 % des integrierten PTx innerhalb von 3 Stunden. Die Effektivität von DES ist jedoch nicht nur von der absolut abgegebenen Menge an PTx sondern auch von der Kinetik der Freisetzung abhängig [262]. Welche PTx Dosis und Freisetzungskinetik für Koronarstents geeignet ist, wird sehr unterschiedlich diskutiert und ist zusätzlich vom jeweiligen Beschichtungssystem abhängig [5]. Zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit (KHK) wäre eine Dosis und Freisetzungskinetik von PTx optimal, die eine Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur weitestgehend unterdrückt und damit eine Restenose verhindert und zusätzlich die gewünschte Endothelialisierung nicht beeinflusst [5]. Der 2003 international eingeführte DES von Boston Scientific (TaxusTM) setzt den Wirkstoff aus einer nicht abbaubaren Polymermatrix diffusionskontrolliert frei [5, 35, 263]. Durch das Wirkstoff-Polymer-Verhältnis kann das Freisetzungsprofil in weiten Grenzen variiert werden, was bei gleichen PTx-Beladungen ($1 \mu\text{g}/\text{mm}^2$) zu unterschiedlichen Beschichtungsdicken führt [5]. In klinischen Studien wurden Formulierungen mit 8,8 % (m/m) PTx (langsam freisetzend) und 25 % (m/m) PTx (moderat freisetzend) mit dem nichtabbaubaren Poly(styren-b-isobutylen-styren) (SIBS) als Polymermatrix untersucht. Insgesamt werden aus beiden Beschichtungen nur ca. 10 % des PTx freigesetzt, wohingegen fast 90 % des hochpotenten Wirkstoffes ungenutzt auf dem Stent verbleiben [264]. Ungeachtet des neuen Biomaterials SIBS stellt die unvollständige PTx-Freisetzung in Bezug auf die Langezeitsicherheit ein hohes Risiko dar.

Die Motivation dieser Arbeit lag in der Entwicklung einer bioabbaubaren PTx-haltigen Beschichtung, welche im Verlauf der Degradation den Wirkstoff komplett freisetzt und zudem die unmodifizierte Metallocberfläche exponiert. Dafür wurde als Beschichtungstechnologie die LbL-Technik ausgewählt, mit der in Abhängigkeit der verwendeten Polymere auch abbaubare Beschichtungen aufgebaut werden können [261, 265]. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten mit den bioabbaubaren Polyelektrolyten PLL und Poly(L-glutaminsäure) (PG). Der Wirkstoff PTx wurde kovalent entsprechend Li et al. an PG gebunden (PG-PTx) und dadurch schon während der Assemblierung der PEM in die Beschichtung eingebracht.

Die Stabilität von PG-PTx-Konjugaten in wässrigen Lösungen wurde von Li et al. untersucht [266]. Innerhalb von 2 Tagen werden bei pH 5,5 ca. 9 % (m/m), bei pH 7,4 ca. 16 % (m/m) und bei pH 9,5 ca. 28 % (m/m) des Wirkstoffes (PTx und 7-Epi-Paclitaxel) freigesetzt (Abbildung 7).

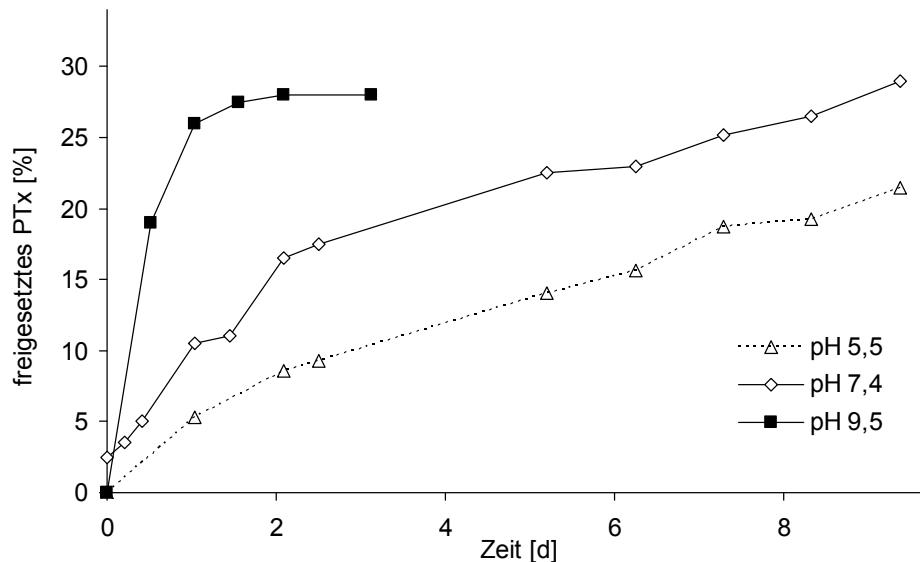


Abbildung 7: Freisetzung von Paclitaxel (PTx und 7-Epi-PTx) aus PG-PTx in Abhängigkeit des pH-Wertes, Daten entnommen aus [266]

Die Autoren stellten fest, dass die Stabilität von PG-PTx im Sauren größer als im Basischen ist [266]. In Bezug auf Ausbeute und PTx-Beladung ist die Stabilität der Polyelektrolyt-Wirkstoff-Bindung relevant, um mit möglichst wenig Polyelektrolytschichten eine ausreichende Wirkstoffbeladung erreichen zu können. Typischerweise erfolgt die Assemblierung innerhalb von 24 h. Aufgrund der Ergebnisse von Li et al. wird ein Aufbau von Multischichten im pH-Bereich von 5,6 bis 7,6 präferiert. Insbesondere im leicht sauren pH-Bereich ist die Beschichtung günstig, um die Hydrolyse beim Aufbau der Multischichten möglichst gering zu halten.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht eine neue Anwendung der LbL-Technik. Es sollte die Anwendbarkeit von Polyelektrolytmultischichten (PEM) zur lokalen Freisetzung von Paclitaxel (PTx) untersucht werden. Als Drug Delivery System sind ultradünne PEM für medikamentenbeschichtete Stents eine interessante Alternative zu bestehenden polymerbasierten Technologien.

Für die Untersuchungen wurden in dieser Arbeit Multischichten aus Poly(L-glutaminsäure) (PG) und Poly(L-lysin) (PLL) als Modellsystem verwendet. Das Ziel dieser Arbeit lag in der Entwicklung einer Beschichtung, die den Wirkstoff vollständig abgibt. Zum Aufbau von wirkstoffhaltigen PEM wurden Polyelektrolyt-Wirkstoff-Konjugate mit PG synthetisiert. Dabei sollte die Wirkstofffreisetzung im Vergleich zu Multischichten mit Hyaluronsäure-Paclitaxel-Konjugaten verzögerter sein. Außerdem sollte geklärt werden, ob eine ausreichende Wirkstoffbeladung und Freisetzung von PTx für Drug-Eluting Stents (DES) mit Polyelektrolytmultischichten erreicht werden kann.

Im experimentellen Teil wurden mehrere Einflussfaktoren, wie z.B. der pH-Wert und die Ionenstärke, auf die Assemblierung von Poly(L-glutaminsäure) und Poly(L-lysin) untersucht. Dazu wurde der jeweilige Schichtenaufbau mit unterschiedlichen Methoden analysiert. Die Ergebnisse der wirkstofffreien Beschichtung dienten als Grundlage zur Assemblierung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten. Insbesondere das Schichtenwachstum war im Hinblick auf die erreichbare Wirkstoffbeladung von besonderem Interesse, da für eine spätere Anwendung eine stabile Beschichtung mit ausreichender Wirkstoffbeladung notwendig ist. Ziel der Untersuchungen war es, geeignete Beschichtungsbedingungen für einen stabilen Aufbau von Multischichten mit Polyelektrolyt-Wirkstoff-Konjugaten zu finden. Weiterhin wurde die Wirkstofffreisetzung aus Polyelektrolytmultischichten untersucht. Diese Versuche orientierten sich am Beispiel koronarer PTx-haltiger Stents.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Paclitaxel

Seit 1992 ist Paclitaxel (Taxol A, PTx) als Wirkstoff zur Behandlung cisplatinrefraktärer Ovarialkarzinome von der Amerikanischen Zulassungsbehörde (Food and Drug Administration, FDA) unter dem Handelsnamen Taxol® zugelassen [263, 267, 268]. Paclitaxel gehört zu der Gruppe der Taxane und kann aus mehreren nordamerikanischen Eiben-Arten, z.B. *Taxus brevifolia* oder halbsynthetisch aus Baccatin III (13-Desacyl-Paclitaxel), das in den Nadeln verschiedener Eiben-Arten in relativ hoher Konzentration vorkommt, gewonnen werden [269].

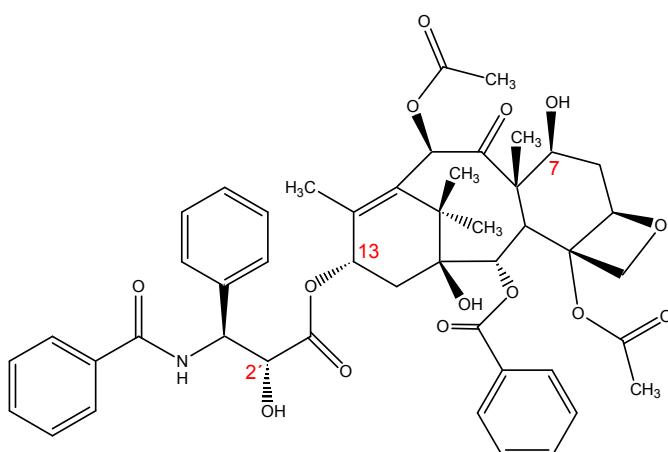


Abbildung 8: Strukturformel von Paclitaxel, Mw 853,9 g/mol

Paclitaxel hemmt den Zellzyklus durch eine Blockade der Mitose. Zunächst beschleunigt PTx die Bildung von Mikrotubuli, bindet dann aber an die β -Tubulinuntereinheit und verhindert so die Desaggregation des Spindelapparats [2]. In der G₂-Phase zum Stofftransport gebildete Spindeln können danach nicht mehr umgebaut werden, insbesondere entstehen in der Mitosephase keine Kernspindeln [2]. Paclitaxel blockiert somit den Zellzyklus in der G₂- bzw. M-Phase, wodurch die Zellen schließlich absterben [2]. Inzwischen wird PTx u.a. zur Behandlung vom metastasierenden Ovarial- und Mamakarzinom sowie bei Melanomen und beim Kaposi-Sarkom angewandt [2]. Im Rahmen der Behandlung kann eine Resistenzentwicklung eintreten, die sehr wahrscheinlich auf der Bildung von P-Glykoprotein bzw. einer Strukturänderung der β -Untereinheit des Tubulindimers beruht [2].

Seit 2003 wird PTx auch zur Verhinderung von Restenososen in DES angewendet [263]. Im Taxus Stent ist PTx in einer Polymerbeschichtung (SIBS) eingebettet, wobei der Wirkstoff bei der Trocknung im Nanometer-Bereich präzipitiert [35].

Paclitaxel ist in Wasser sehr schwer löslich. Das Anhydrat hat mit ca. 3,5 µg/ml eine höhere Löslichkeit als für das Dihydrat (< 1 µg/ml) [263, 270]. Auch der amorphe Zustand ist für PTx beschrieben, der wie das Anhydrat zum Auskristallisieren von PTx aus Lösungen führen kann [270].

Um PTx als Lösung parenteral verabreichen zu können, enthält Taxol® hohe Konzentrationen an Cremophor® EL und Ethanol. Neue Formulierungsansätze ohne Cremophor EL, dem verschiedene Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität, Lebertoxizität und anaphylaktische Reaktionen zugeschrieben werden, nutzen makromolekulare Träger [271]. So wurde 2005 von der FDA eine partikuläre Formulierung mit Albuminpartikeln zugelassen, in der PTx nichtkovalent gebunden ist (Abraxene™) [272]. Auch Polymer-Wirkstoff-Konjugate, in denen PTx an wasserlösliches Polymer kovalent gebunden ist, sind in der Erprobung (z.B. Xytax™ Phase III) [273]. Das in dieser Arbeit verwendete Paclitaxel wurde von Indena S.p.A., Milan (Italien) produziert.

2.1.2 Polyethylenimin

Synthetisches Polyethylenimin (PEI) ist ein hoch verzweigtes Blockcopolymer und besitzt primäre, sekundäre und tertiäre Aminogruppen mit einem relativen Verhältnis von 1:2:1 [274].

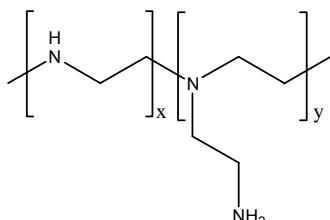


Abbildung 9: Chemische Struktur von Polyethylenimin

Durch Protonierung der primären und sekundären Aminogruppen ist PEI im neutralen pH-Wert kationisch geladen. Aufgrund der festen Adhäsion zu negativ geladenen Oberflächen wurde hochmolekulares PEI als erste Schicht zum Aufbau von PEM auf Gold- und Glasoberflächen mit einem Molekulargewicht (Mw) von ~ 750.000 g/mol (Sigma P3143, Steinheim, Deutschland) angewendet.

2.1.3 Poly(L-lysin)

Poly(L-Lysin) (PLL) ist ein synthetisches Homopolypeptid mit einem pK_s von 9,8 [265]. Das Monomer, die basische und essentielle Aminosäure L-Lysin, besitzt in der Seitenkette eine primäre Aminogruppe, die durch Protonierung PLL eine kationische Ladung verleiht.

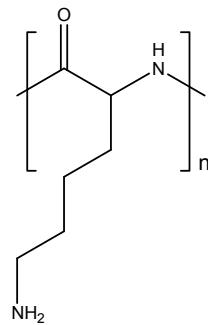


Abbildung 10: Chemische Struktur von Poly(L-lysin)

Gelöstes PLL liegt im neutralen pH-Bereich ohne Sekundärstruktur vor (Random-coil-Struktur) [275]. Erst die Erhöhung des pH-Wertes führt zur Konformationsänderung mit Ausbildung einer α -Helix [275]. Im Rahmen der Arbeit wurde PLL mit einem Molekulargewicht > 30.000 g/mol (Sigma P9404, Steinheim, Deutschland) verwendet.

2.1.4 Poly(L-glutaminsäure)

Poly(L-glutaminsäure) (PG) kann im Wässrigen unterschiedliche Sekundärstrukturen ausbilden [124, 275, 276]. Im neutralen pH-Bereich existieren mehrere Sekundärstrukturen wie z.B. α -Helix und β -Faltblattstruktur nebeneinander, wobei der Anteil an α -Helices bei niedrigen pH-Werten stark zunimmt, insbesondere unterhalb des pK_s -Wertes von 4,9 [276]. In den Versuchen wurde PG mit einem Mw von 50.000-100.000 g/mol (PG75, Sigma P4886, Steinheim, Deutschland) und kürzerkettige PG mit einem Mw von 15.000-50.000 g/mol (PG30, Sigma P4761, Steinheim, Deutschland) eingesetzt.

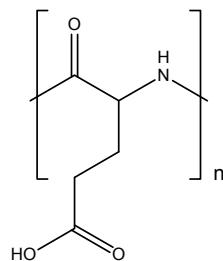


Abbildung 11: Chemische Struktur von Poly(L-glutaminsäure)

2.1.5 Polyallylaminhydrochlorid

Zur Herstellung von PEM wurde das synthetische Polymer Polyallylaminhydrochlorid (PAH) mit einem mittleren Mw von ca. 70.000 g/mol (Sigma 283223, Steinheim, Deutschland) verwendet. Die Ladungsdichte von PAH ist stark pH-Wert abhängig. Bei pH < 2 sind alle primären Aminogruppen protoniert und damit kationisch geladen, wohingegen bei pH 12 alle Aminogruppen ungeladen vorliegen. Bei pH 8-9 sind ca. 50 % der Aminogruppen vom PAH protoniert [133].

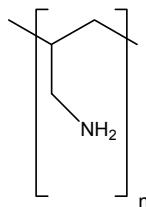


Abbildung 12: Chemische Struktur von Polyallylamin

2.1.6 Polystyrolsulfonat

Das verwendete Polystyrolsulfonat (PSS) hat ein Molekulargewicht von ca. 70.000 g/mol und wurde von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (243051, Steinheim, Deutschland) bezogen. PSS ist ein starker Polyelektrolyt, der neben der Sulfonatgruppe auch hydrophobe Eigenschaften aufgrund der Polystyrolstruktur besitzt und dadurch Polyelektrolytmultischichten zusätzlich stabilisieren kann [277].

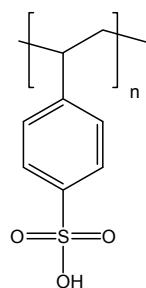


Abbildung 13: Chemische Struktur von Polystyrolsulfonat

2.1.7 Polydiallyldimethylammoniumchlorid

Als starker kationischer Polyelektrolyt diente Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDA). Das Material mit einem Mw von 100.000-200.000 g/mol wurde von Aldrich bezogen (409014-1L).

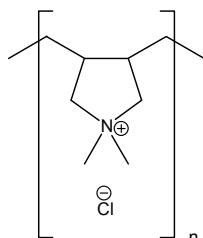


Abbildung 14: Chemische Struktur von Polydiallyldimethylammoniumchlorid

2.1.8 Objektträger

Zur Mikroskopie wurden 1 mm dicke Objektträger aus Kalknatronglas der Firma Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig, Deutschland) verwendet.

2.1.9 Quarzküvetten

Für die UV/Vis-Spektroskopie wurden Küvetten (Breite: 4 mm, Tiefe: 10 mm, Höhe: 45 mm) von der Hellma GmbH (Müllheim, Deutschland) aus Quarzglas Suprasil® verwendet (Transmission > 80% zwischen 200 nm und 2500 nm).

2.1.10 Siliziumscheiben

Beidseitig polierte Siliziumwafer (150 mm Wafer) wurden von Siltronic AG (Burghausen, Deutschland) bezogen. Vor der LbL-Beschichtung wurden Siliziumstücke herausgeschnitten (ca. 1 cm x 1 cm), mit einer Mischung aus konzentriertem Ammoniak (25 %), konzentriertem Wasserstoffperoxid (30 % w/w) und Wasser im Verhältnis 1:1:5 (alkalische RCA Reinigung, Radio Corporation of America [152]) bei 70-80°C gereinigt und abschließend mit Wasser gespült.

2.1.11 Chemikalien

Alle weiteren verwendeten Chemikalien und Substanzen wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen und ohne weitere Reinigung angewendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Durchführung der LbL-Beschichtung

Der Aufbau von Polyelektrolytmultischichten (LbL-Beschichtungen) erfolgte im Rahmen dieser Arbeit im Tauchverfahren bei Raumtemperatur [53]. Dafür wurden die zu beschichtenden Oberflächen in die Polyelektrolytlösungen eingetaucht (z.B. Glasobjektträger, Siliziumscheiben usw.) oder teilweise mit den Beschichtungslösungen in direkten Kontakt gebracht (z.B. Beschichtung von Quarzküvetten). Vor dem Aufbau der Multischichten wurden die Oberflächen mit Wasser gespült und, sofern das Substrat chemisch stabil ist, mit einer Mischung aus konzentriertem Ammoniak (25 %), konzentriertem Wasserstoffperoxid (30 % w/w) und Wasser im Verhältnis 1:1:5 (alkalische RCA Reinigung, Radio Corporation of America [152]) gereinigt. Die RCA-Reinigung wurde an Glasobjektträgern, Quarzküvetten und Siliziumwafern bei 70-80°C für 20 Minuten durchgeführt. Im Anschluss an die RCA-Reinigung wurden die Oberflächen bis zum neutralen pH-Wert mit Wasser gespült.

Alle Oberflächen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit hochmolekularem PEI (Mw 750.000, 1 mg/ml, pH 6, 0,2 M NaCl) als „0. Schicht“ vorbehandelt. Damit wurde versucht, die verschiedenen Ladungsdichten der unterschiedlichen Materialien auszugleichen. Der Aufbau von LbL-Filmen wurde prinzipiell mit einem Überschuss an Polymer durchgeführt (pro Schicht > 10 mg/m²). Die erforderliche Polyelektrolytmenge wurde anhand der zu beschichtenden Gesamtoberfläche kalkuliert. Zwischen den einzelnen Polyelektrolytschichten wurde zur Abtrennung von nicht adsorbiertem Polymer mindestens dreimal mit Wasser gewaschen.

Tabelle 2: Übersicht über die beschichteten Materialien

Templat		LbL-Beschichtung		
Material	Fläche [cm ²]	Konzentration [mg/ml]	Zeit pro Schicht [min]	Spülzyklen
Glas (Kalknatronglas, Objektträger)	40	1,0	10	3
Gold (QCM-D Quarzsensoren)	0,8	0,2	5	4
Quarzglas (UV-Küvetten)	6	0,2	10	3
Silizium (Waferstücke)	ca. 1,3	0,2	10	3
Siliziumdioxid [*] (QCM-D Quarzsensoren)	0,8	0,2	5	4

^{*}) LbL-Beschichtung ohne Vorbehandlung mit hochmolekularem PEI

Pro Schicht wurde eine Beschichtungszeit von mindestens 5 min und maximal 20 min ausgewählt (Details siehe Tabelle 2), wobei zwischen den einzelnen Polymerschichten nicht getrocknet wurde. Zum Aufbau von Multischichten auf Objektträgern oder Silizium-Scheiben wurden die Template in die Beschichtungslösungen eingetaucht (siehe auch Abbildung 2). Nach der Beschichtungszeit wurde die Template mit Wasser gespült (dreimal in frisches Spülmedium eingetaucht).

Für die Beschichtung von Küvetten auf den Innenseiten (Quarzglas „Suprasil“, Breite: 4 mm, Tiefe 10 mm, Höhe 45 mm) wurden diese pro Schicht mit 0,8 ml Polyelektrolytlösung gefüllt. Nach der Beschichtungszeit wurde die Polymerlösung verworfen und die Küvette dreimal mit 1,0 ml Wasser gespült.

Die Benennung der hergestellten Polyelektrolytmultischichten erfolgt in dieser Arbeit anhand der Polymersequenz mit der die LbL-Filme im Tauchverfahren aufgebaut wurden. Zum Beispiel wird die LbL-Beschichtung mit 8 abwechselnden Schichten PG75 und PLL als $(\text{PG75}/\text{PLL})_4$ bezeichnet. Aus der Bezeichnung geht auch hervor, dass als erste Polyelektrolytschicht PG75 und somit als äußerste Schicht PLL verwendet wurde. Die Beschichtung mit einer weiteren PG75-Schicht, daher mit insgesamt 9 Schichten, wird mit $(\text{PG75}/\text{PLL})_4\text{-PG75}$ bezeichnet. Die außer bei der Beschichtung von Siliziumdioxid immer durchgeführte Vorbehandlung mit PEI wird zur Verkürzung der Bezeichnung nicht mit aufgeführt, obwohl die Vorbehandlung mit PEI strenggenommen auch eine Schicht im Sinne der LbL-Technik darstellt.

2.2.2 Quarzmikrowaage

Die Quarzmikrowaage (Quartz Crystal Microbalance, QCM) hat sich in den letzten Jahren von einem reinen Massensensor zu einem vielseitigen Werkzeug der Chemo- und Bioanalytik mit immer größere Bedeutung entwickelt [278]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Gerät der Q-Sense AG (Modell E4, Göteborg, Schweden) verwendet welches simultan die Messung der Resonanzfrequenz und des Dissipationsfaktors (Quartz Crystal Microbalance with Dissipation, QCM-D) erlaubt. Die QCM-D-Technik wurde zur Charakterisierung von Beschichtungen mit Polyelektrolyten angewendet. Dafür wurden die Sensoren schichtweise mit Polyelektrolyten beschichtet und die Änderung der Resonanzfrequenz (Δf) und Dämpfung (ΔD) ausgewertet.

Die physikalische Grundlage der Quarzmikrowaagetechnik bildet der sogenannte piezoelektrische Effekt. Als piezoelektrischen Effekt bezeichnet man das Auftreten einer elektrischen Potentialdifferenz zwischen den Oberflächen eines Kristalls als Folge einer mechanischen Deformation durch Druck, Zug oder Torsion. Voraussetzung für das Auftreten von Piezoelektrizität ist das Fehlen eines

Punktsymmetriezentrums im Kristallgitter, wie z.B. im Quarz (SiO_2). Diesen Effekt beschrieben erstmals Pierre und Jaques Curie 1880.

Durch Anlegen einer elektrischen Spannung an einen Kristall ohne Inversionszentrum wird umgekehrt auch eine mechanische Deformation induziert (sogenannter inverser oder reziproker piezoelektrischer Effekt). Bei der Anwendung einer auf den verwendeten Kristall abgestimmten Wechselspannung kann so eine Resonanzschwingung angeregt werden. Kommerziell wird besonders Quarz eingesetzt, da Quarz geeignete mechanische, elektrische, chemische und thermische Materialeigenschaften aufweist [278]. Je nach Schnittwinkel durch den Quarzkristall können unterschiedliche Resonatortypen gewonnen werden (Abbildung 15). Es lassen sich so verschiedene Biege-, Flächen-, Längs- und Dickenscherschwinger mit einem Frequenzbereich von $5 \times 10^2 - 3 \times 10^8$ Hz herstellen [278]. In der QCM werden vor allem AT-Schnitt-Quarze (sogenannte *AT-cut*-Quarze) verwendet, die mit einem Winkel von $35^\circ 10'$ zur kristallographischen z-Achse aus einem Quarzkristall herausgeschnitten wurden und zu einer Dickenscherschwingung angeregt werden können (Abbildung 15).

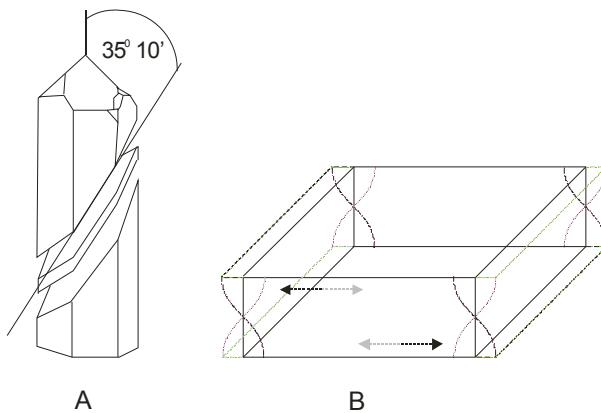


Abbildung 15: A) AT-cut durch einen Quarzkristall [278]; B) Mechanische Deformation eines *AT-cut*-Quarzes beim Anlegen einer Wechselspannung

Das Gerät von Q-Sense ist für Quarzsensoren (Abbildung 16, 14 mm Durchmesser, 0,3 mm Dicke) mit einer Resonanzfrequenz von ca. 5 MHz ausgelegt, die beidseitig mit Gold als Elektrode beschichtet sind. Neben den Quarzsensoren mit einer Goldoberfläche wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Kristalle mit einer zusätzlichen Beschichtung aus Siliziumdioxid auf der Elektrodenoberfläche verwendet.

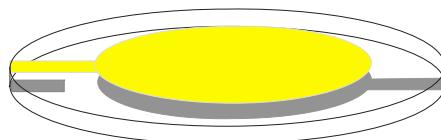


Abbildung 16: AT-cut-Quarz mit Goldelektroden, Durchmesser = 14 mm, Dicke = 0,3 mm

Zur Messung wird der Quarzsensor durch einen Frequenzgenerator mit Wechselspannung im Bereich seiner Resonanzfrequenz (und im dritten, fünften, siebten, neunten, elften und dreizehnten Oberton) angeregt und in Intervallen mittels eines computergesteuerten Relais von der antreibenden Spannungsquelle getrennt. Neben der Bestimmung der Resonanzfrequenz wird in der spannungslosen Phase das Abklingverhalten der freien Schwingung des Quarzes durch ein digitales Oszilloskop aufgezeichnet und aus dem zeitlichen Abfall der Schwingungsamplitude die Dämpfung ermittelt.

Die QCM erlangte durch den von Sauerbrey abgeleiteten linearen Zusammenhang zwischen Frequenzänderung Δf und Masseänderung Δm an Bedeutung [279].

$$\Delta f = -f_0 \frac{\Delta d_q}{d_q} = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{A_q \sqrt{\mu_q \rho_q}} = -C_f \Delta m \quad (10)$$

Hierin bezeichnet f_0 die Resonanzfrequenz des Quarzsensors, Δd_q die Änderung der Dicke, ρ_q die Dichte und μ_q das Schermodul des Quarzes, A die Elektrodenfläche und Δm die zusätzliche Massenbelegung durch die zu untersuchende Substanz. Aus der Gleichung 10 geht hervor, dass die Resonanzfrequenz mit steigender Masse fällt. Die Proportionalitätskonstante C_f wird als integrale Schichtwägeempfindlichkeit oder Sauerbrey-Konstante bezeichnet und hängt vom Quadrat der Resonanzgrundfrequenz der Oszillation ab. Eine ortsaufgelöste Betrachtung der Schichtwägeempfindlichkeit zeigt, dass diese in der Mitte des Quarzes am größten ist und zu den Elektrodenrändern hin auf null absinkt [278]. Die aktive Sensoroberfläche der verwendeten Quarze liegt laut Q-Sense bei ca. $0,2 \text{ cm}^2$. Für 5 MHz Resonatoren beträgt die Sauerbrey-Konstante $17,7 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ und kann durch die Verwendung von Quarzen mit höherer Resonanzfrequenz gesteigert werden.

Der von Sauerbrey aufgestellte Zusammenhang gilt uneingeschränkt unter der Voraussetzung, dass die auf der Quarzoberfläche angelagerte Masse ohne nennenswerte Reibungsverluste mit dem Quarz schwingt (starre Masse), homogen auf dem Quarz verteilt ist und im Verhältnis zur Gesamtmasse des Quarzes sehr klein ist (bis etwas 2 %). Eine Beschichtung mit $17,7 \text{ ng/cm}^2$, die diese Bedingungen erfüllen, führt somit zu einer Änderung der Resonanzfrequenz um 1 Hz bei den verwendeten 5 MHz Quarzsensoren.

Neben dem apparativen Aufwand unterscheiden sich Messungen in wässrigen Lösungen deutlich von denen in Luft oder Vakuum. Bei der Messung in Wasser ist eine erheblich größere Dämpfung zu beobachten, da es zu einer Fortsetzung der Scherwelle in die Flüssigkeit kommt. Die Schwingung wird in Abhängigkeit von der Dichte und der Viskosität der Flüssigkeit unterschiedlich stark gedämpft. Genaugenommen ist die Beziehung von Sauerbrey für Messungen in Wasser nicht

gültig [280]. In Wasser wird bei der Auswertung nach Sauerbrey neben der Masse des aufgebrachten Materials auch die Masse des eingeschlossenen oder fest adsorbierten Lösungsmittels (z.B. Wasser aber auch andere Ionen) mitbestimmt [281]. Folglich wird alles, was der Kristallbewegung folgt und damit zu einer Frequenzänderung führt, bei der Kalkulation berücksichtigt.

Jede natürliche Schwingung wird durch Energieverluste mit der umgebenden Materie gedämpft. Bei der QCM-D-Technik wird zu der Resonanzfrequenz auch der Dissipationsfaktor analysiert, welcher das Verhältnis aus gespeicherter und dissipierter Energie beschreibt (Gleichung 11).

$$D = \frac{E_{\text{disspiert}}}{2\pi \cdot E_{\text{gespeichert}}} \quad (11)$$

Der Dissipationsfaktor (dimensionslos) liegt in der Größenordnung von 10^{-6} und gibt zusätzliche Informationen zu den Eigenschaften der aufgebrachten Masse [282]. Wie oben bereits erwähnt, verliert der von Sauerbrey gefundene Zusammenhang seine Gültigkeit bei größeren Schichtdicken, viskosen Flüssigkeiten und viskoelastischen Filmen. Ein beschleunigtes Abklingen der Kristallschwingung in der Spannungslosen Phase von QCM-D-Messung (z.B. durch die Beschichtung mit Polyelektrolytmultischichten) erhöht den Dissipationsfaktor und kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum Beispiel führt eine erhöhte Oberflächenrauhigkeit durch hydrophile Polyelektrolytmultischichten zu einer verstärkten Fortsetzung der Scherwelle in die Flüssigkeit. Dies bewirkt eine größere Frequenzerniedrigung durch die zusätzlich mitbewegte Lösungsmittelmasse aber auch zu einer Erhöhung des Dissipationsfaktors. Hoch elastische Filme führen ebenso zu einem Anstieg der Dämpfung, da auch diese zu einem beschleunigten Abklingen der Kristallschwingung führen. Auf eine vertiefende Auswertung der Frequenz- und Dämpfungsänderungen der QCM-D-Daten, z.B. zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften oder dem Wassergehalt, wurde verzichtet, da dies außerhalb der Zielsetzung dieser Arbeit liegt.

LbL-Beschichtung von Quarzsensoren

Die mit Gold beschichteten Quarzsensoren wurden vor jeder Messung fünfmal mit Piranha-Lösung (1 Teil 30 %ige Wasserstoffperoxid-Lösung, 2 Teile konzentrierte Schwefelsäure) gereinigt. Zwischen den einzelnen Reinigungsschritten wurden die Quarzsensoren 3x mit destilliertem Wasser gespült und zum Abschluss der Reinigung unter N_2 -Strom getrocknet.

Alle Beschichtungen fanden bei konstanter Temperatur ($23,5^\circ C$) in der Messzelle statt. Die Quarzsensoren wurden zuerst mit hochmolekularem PEI (Mw 750.000, 1 mg/ml, pH 6, 0,2 M NaCl, 0,6 ml) als „0. Schicht“ beschichtet. Damit sollte eine

gleichbleibende Ladungsdichte auf der Goldoberfläche erzeugt werden. Nach einer Beschichtungszeit von 5 min wurden die Kristalle im Anschluss zehnmal mit 0,6 ml Wasser (Fluss 0,6 ml/min) gewaschen. Zwischen den Waschschriften 1 bis 9 wurde jeweils 1 Minute und nach dem 10. Waschen 3 Minuten gewartet.

Zum Aufbau von Polyelektrolytmultischichten wurden die Quarzsensoren pro Schicht und Messzelle mit 0,6 ml Polyelektrolytlösung (0,2-2,0 mg/ml) für 1 Minute gespült (Fluss 0,6 ml/min). Nach einer Beschichtungszeit von 5 Minuten wurden die Sensoren viermal mit 0,6 ml Wasser (Fluss 0,6 ml/min) gewaschen. Zwischen den Waschschriften 1 bis 3 wurde jeweils 1 Minute und nach dem 4. Waschen 3 Minuten gewartet.

Für die Auswertung wurden die Frequenz- und Dämpfungswerte nach dem vierten Waschen herangezogen. Jede Messung wurde mindestens dreimal durchgeführt und daraus der Mittelwert berechnet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software QTools. Zur orientierenden Kalkulation der Filmdicke nach Sauerbrey wurde eine Dichte von 1050 kg/m³ für die Polyelektrolytmultischichten angenommen.

2.2.3 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie gehört zu der Elektronenanregungsspektroskopie, bei der Valenzelektronen mit monochromatischem Licht der Intensität I_0 im Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm angeregt werden. Im Allgemeinen werden mit der Methode gelöste Substanzen analysiert. Bei der Messung wird die Lösung mit monochromatischem Licht I_0 durchstrahlt und die Lichtintensität I gemessen. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist der dekadische Logarithmus des Kehrwertes der Transmission T proportional zur Konzentration c und Schichtdicke d der Küvette. Der Ausdruck $\lg(I_0/I)$ wird als Extinktion E oder Absorption A , die Proportionalitätskonstante ε als molarer Extinktionskoeffizient bezeichnet, welcher der Extinktion einer einmolaren Lösung bei definierter Wellenlänge und Schichtdicke (1 cm) entspricht.

$$E = \lg\left(\frac{1}{T}\right) = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (12)$$

Der Extinktionskoeffizient ist eine wellenlängenabhängige Stoffkonstante, die in der Einheit l·mol⁻¹·cm⁻¹ angegeben wird. Nicht immer ist das Lambert-Beersche Gesetz erfüllt das heißt, der Extinktionskoeffizient weist in manchen Fällen eine Abhängigkeit von der Konzentration, der Temperatur, der Zeit und dem pH-Wert des Lösungsmittels auf [283].

Mit der UV/Vis-Spektroskopie wurden im Rahmen der Arbeit das Schichtenwachstum von Polyelektrolytmultischichten sowie die Wirkstoffbeladung von PG-PTx

Konjugaten und Polyelektrolytmultischichten untersucht. Alle Spektren wurden mit einem Einstrahlphotometer von Varian (Cary 50 Bio, Darmstadt, Deutschland) mit einer Spaltbreite <1,5 nm und einer Scan-Geschwindigkeit von 60 nm/min aufgenommen.

Zur Untersuchung des Aufbaus und der Wirkstoffbeladung von Multischichten wurden Oberflächen von Quarzküvetten beschichtet (Abbildung 2). Die Messungen (UV-Spektren von 220 bis 350 nm) wurden mit Wasser gefüllten Küvetten durchgeführt. Die Wirkstoffbeladung von Multischichten wurde aus den UV-Spektren kalkuliert. Dafür wurde der molare Extinktionskoeffizient von PTx in Methanol bei 230 nm bestimmt. Der erhaltene Wert von $\epsilon=29800 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ stimmt gut mit der Literaturangabe von PTx in Ethanol ($\epsilon=31000 \pm 1800 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) überein und wurde für alle Berechnungen verwendet [284]. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit ist eine direkte Bestimmung des Extinktionskoeffizienten in Wasser nicht möglich ($E < 0,01$).

Zur Berechnung der Wirkstoffbeladung von Polyelektrolytmultischichten wurden die UV-Spektren der entsprechenden, wirkstofffreien Beschichtung (gleiche Anzahl an Polyelektrolytschichten, identische Beschichtungsbedingungen wie Ionenstärke, pH-Wert und Mw) als Blindwert abgezogen. Unter der Annahme, dass keine weiteren Effekte wie z.B. Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel, Assoziationen oder Streulicht das Ergebnis beeinflussen, kann aus der Extinktion bei 230 nm mit dem Lambert-Beerschen Gesetz die Wirkstoffbeladung berechnet werden. Da direkt vor den UV-Messungen die Küvetten mehrfach gespült und mit frischem Medium befüllt wurden, befindet sich in diesem Volumen (1 ml = 1 cm³) theoretisch kein gelöstes PTx. Die gemessene Extinktion wird nach Abzug des Lösungsmittels somit nur von den Multischichten auf den Küvettenwänden hervorgerufen. Die erhaltenen Werte korrespondieren daher mit der durchstrahlten Fläche von 2 cm² (es werden immer 2 Filme durchstrahlt).

Für die Bestimmung des Substitutionsgrades von PG-PTx Konjugaten wurden diese in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,5 über Nacht gelöst (2 mg/ml) und vor der Messung mit dem Puffer 1:10 verdünnt. Alle Proben wurden unmittelbar vor der Analyse filtriert (0,2 µm). Zur Kompensation der Extinktion der Polyglutaminsäure und des Lösungsmittels wurde die Extinktion von Polyglutaminsäure (PG75) gelöst in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,5 (0,2 mg/ml), als Blindwert abgezogen. Aus der erhaltenen Extinktion bei 230 nm konnte die PTx-Beladung berechnet werden. Die Kalkulation der PTx-Beladung beruht auf der Annahme, dass der Extinktionskoeffizient nicht durch die Konjugation oder das Dispersionsmittel beeinflusst wird.

2.2.4 Analyse der Wirkstofffreisetzung

Die Untersuchungen zur Wirkstofffreisetzung wurden mit Hilfe von beschichteten Quarzküvetten durchgeführt. Dafür wurden die Küvetten mit 1 ml Freisetzungsmedium pH 7,4 (10 mM Phosphatpuffer mit 2,7 mM KCl, 140 mM NaCl und 0,05 % Tween 20) gefüllt und bei 37°C gelagert. Um eine konstante Befüllung der Küvetten sicherzustellen, wurden diese im Exsikkator über Freisetzungsmedium gelagert.

Die Freisetzung wurde mit Zugabe des Mediums in die Küvetten gestartet, welches innerhalb der ersten 3 Wochen täglich gewechselt wurde und in der verbleibenden Zeit bis zum Versuchsende bei jeder Messung. Zwischen jedem Medienwechsel wurden die Küvetten mehrfach mit dem Puffer gespült, bevor die Extinktion bei 230 nm gemessen wurde. Die Berechnung der Wirkstofffreisetzung erfolgte anhand der Abnahme der Extinktion.

Zur Analyse des Einflusses der Wirkstofffreisetzung auf die Stabilität und Filmdicke von Polyelektrolytmultischichten wurden Siliziumscheiben mit den Multischichten beschichtet und die Struktur nach der Lagerung im Freisetzungsmedium bei 37°C untersucht.

2.2.5 Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie

Die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ist eine insbesondere zur Trennung, Identifizierung und Quantifizierung von Substanzen weit verbreitete Methode. Dabei bilden unterschiedlich starke Wechselwirkungen der gelösten Substanzen mit dem Laufmittel und der stationären Phase die Grundlage für die Stofftrennung. Als Folge werden die Substanzen bei unterschiedlichen Retentionszeiten eluiert. Zur Detektion und Bestimmung der Konzentration finden eine Vielzahl an unterschiedlichen Detektoren, wie z.B. UV-, Fluoreszenz- oder Brechungsindex-Detektoren Anwendung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die HPLC zum Nachweis von PTx verwendet. Die HPLC-Analysen wurden mit einer Trennsäule von Varian (Lake Forest, USA, MetaChem, Taxil, 250x4,6 mm, 5 µm) durchgeführt. Als Laufmittel wurde eine Mischung aus 52 Teilen Acetonitril und 48 Teilen Wasser mit einem Fluss von 1,0 ml/min verwendet. Die Kalibriergerade wurde im UV-Maximum von PTx bei 220 nm (PTx gelöst in Methanol, 0,3 bis 6,0 µg/ml) und einem Injektionsvolumen von 10 µl erstellt. Alle Chromatogramme wurden mit einer Anlage von Merck aufgenommen, welche aus einem Degaser L-7614, Pumpe L-7100, Autosampler L-7200 und Dioden Array Detector (DAD) L-7455 bestand. Gesteuert wurde die Anlage mit der Software EZChrom Elite Version 3.1 über das Interface L-7000.

2.2.6 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (engl. size exclusion chromatography, SEC) ist eine Methode zur Trennung von Polymeren. Dabei werden Polymere aufgrund ihrer unterschiedlichen hydrodynamischen Volumina aufgetrennt. Im idealen Fall finden keine Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und den Polymeren in Lösung statt. Die Grundlagen dieser Methode entdeckten Porath und Flodin, denen es mittels quer vernetzter Dextrane gelang, wässrige Proteinlösungen zu trennen [285]. Der Trennmechanismus basiert auf der unterschiedlichen Volumenverfügbarkeit für die einzelnen hydrodynamischen Radien der gelösten Polymermoleküle (Abbildung 17). Die zu trennenden Polymere können aufgrund ihres hydrodynamischen Radius unterschiedlich tief in die Poren der stationären Phase eindringen.

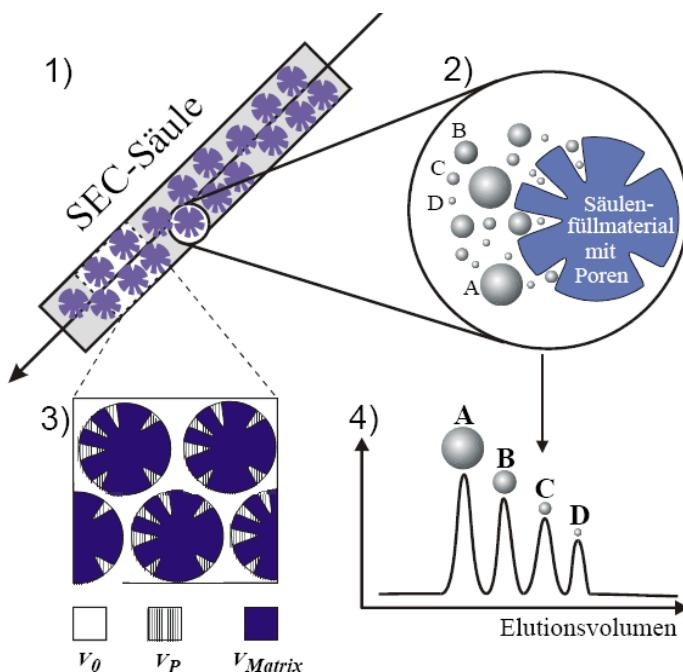


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Trennprinzips der SEC aus [286]; 1) Säule gepackt mit porösem Füllmaterial; 2) idealisierte Darstellung der Verteilung von Polymermolekülen unterschiedlicher Größe um poröses Säulenfüllmaterial; 3) Darstellung der unterschiedlichen Volumina mit dem Zwischenkornvolumen V_0 , Porenvolumen V_P und der porösen Matrix V_{Matrix} ; 4) Elutionsvolumina in Abhängigkeit der Molekülgrößen

In der Abbildung 17 ist das Trennprinzip der SEC schematisch dargestellt. Große Polymermoleküle (A) können nicht in Poren geringerer Größe eindiffundieren, sie werden ausgeschlossen und von der mobilen Phase durch die Säule transportiert (Größenausschluss). Ihnen steht nur das Volumen V_0 zwischen dem Säulenmaterial zur Verfügung. Sehr kleine Polymermoleküle (D) können hingegen das gesamte Volumen, bestehend aus dem Porenvolumen V_P und dem Zwischenvolumen V_0

nutzen, in dem sie tief in alle Poren eindringen. Durch das Eindringen in die Poren, in denen sich die Polymermoleküle fast ausschließlich durch Diffusion bewegen, wird die Elution verzögert. Bei den Polymermolekülen mittlerer Größe (B, C) kann das vorhandene Porenvolumen nur zu einem Teil genutzt werden. Sie eluieren nach den großen Teilchen (A) und vor den kleinen Teilchen (D). Die Polymermoleküle eluieren daher in der Reihenfolge abnehmender hydrodynamischer Radien.

Das Elutionsvolumen V_e wird durch folgende empirische Gleichung mit Hilfe des Verteilungskoeffizienten K_{SEC} , dem Zwischenkornvolumen V_o und dem Porenvolumen V_P beschrieben [287]:

$$V_e = V_o + K_{SEC} \cdot V_P \quad (13)$$

Der Verteilungskoeffizient K_{SEC} beschreibt das Verhältnis der mittleren Konzentrationen innerhalb und außerhalb der Poren. Er liegt zwischen Null, für völlig ausgeschlossene Moleküle, und Eins für Moleküle, die die Poren vollständig durchdringen können. Da K_{SEC} als eine Funktion des Verhältnisses der gelösten Molekülgröße und der Größe der Poren aufgefasst werden kann, hängt V_e von der Beschaffenheit der Poren, dem Lösungsmittel und der Form sowie des hydrodynamischen Volumens der gelösten Polymermoleküle ab.

In der vorliegenden Arbeit wurde die SEC zur Bestimmung des Substitutionsgrades von synthetisierten PG-PTx Konjugaten benutzt. Mit dieser Methode ist es im Unterschied zur UV-Messung möglich, zwischen gebundenem und freiem PTx zu unterscheiden. Da PG bei 230 nm eine UV-Absorption zeigt, erfolgte die Auswertung der Chromatogramme bei 268 nm. Hier zeigt PG (untersucht bis ca. 2 mg/ml) keine nennenswerte UV-Absorption. Mit Hilfe einer Kalibriergerade (PTx gelöst in der mobilen Phase) wurde über die Fläche die PTx-Beladung der Konjugate bestimmt. Das angegebene Molverhältnis (PTx:PG) wurde aus der Konzentrationen der gelösten Synthesen, dem Monomergewicht der PG (151,1 g/mol, Natriumsalz) und der molaren Masse von PTx (853,9 g/mol) berechnet.

Für die Analysen wurden die getrockneten Syntheseprodukte im Laufmittel (Mischung aus 30 Teilen Acetonitril und 70 Teilen 10 mM Phosphatpuffer pH 5,5) über Nacht gelöst (0,2-1,0 mg/ml). Chromatographiert wurde mit einer Trennsäule von Phenomenex (Torrance, USA, BioSep-SEC-S3000, 300x7,8 mm, 5 µm, Porengröße 290 Angström, Trennbereich von 5-700 kDa), einem Fluss von 1,0 ml/min und einem Injektionsvolumen von 10 µl. Die Analysen wurden an einer Anlage von Merck durchgeführt, bestehend aus einer Pumpe L-7100, Autosampler L-7200, DAD L-7455 und Degaser L-7614. Gesteuert wurde die Anlage mit der Software EZChrom Elite Version 3.1 über das Interface L-7000.

2.2.7 Konjugation mit Dicyclohexylcarbodiimid

Die Synthese von PG-PTx wurde mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) im wasserfreien Milieu entsprechend einer Methode von Li et al. unter Verwendung von N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP) als Katalysator durchgeführt [288]. Paclitaxel verfügt über zwei reaktive OH-Gruppen, die mit aktivierten Carbonsäuren reagieren können (siehe Abbildung 8, Positionen 7 und 2'). Die Umsetzung wurde mit PG30 und PG75 durchgeführt. Vor der Konjugation wurden die freien Polysäuren aus den entsprechenden Natriumsalzen durch Fällung mit 0,2 M HCl hergestellt. Die Aufreinigung bzw. Abtrennung von NaCl erfolgte durch Waschen des Präzipitates mit HCl, anschließende Dialyse bis zum neutralen pH-Wert gegen Wasser sowie Lyophilisation des resultierenden Produktes. Die Dialyse der PG30 wurde mit einer 3,5 kDa und der PG75 mit einer 15 kDa Membran durchgeführt.

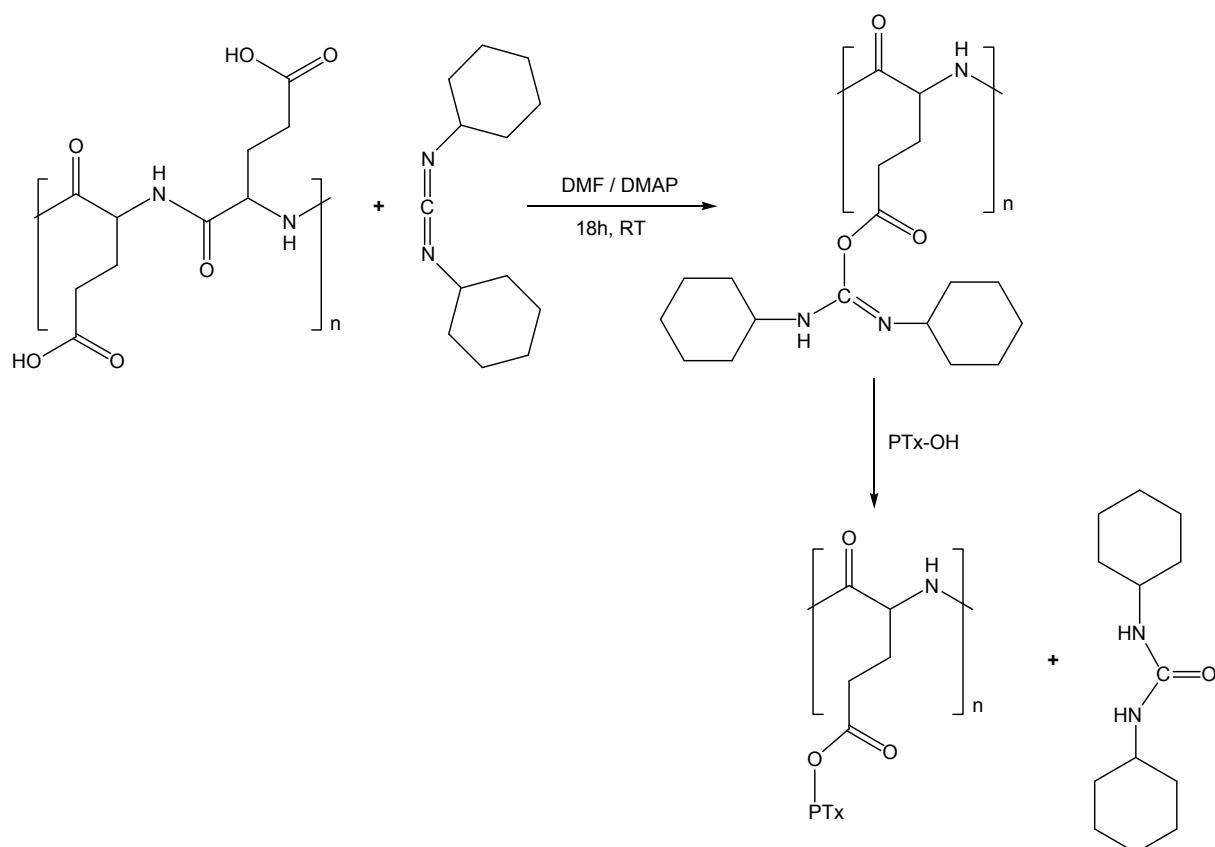


Abbildung 18: Konjugation von Poly(L-glutaminsäure) (PG) und Paclitaxel (PTx) mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Aktivierung der PG mit DCC und 4-N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP) als Katalysator zu O-Acyl-isoharnstoffderivat und Reaktion mit PTx

Zur Synthese wurde PG (75 mg) in 5 ml wasserfreiem N,N-Dimethylformamid (DMF) mit PTx (22 mg), DCC, (15 mg, 30 mg) und einer katalytischen Menge von 4-N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP) versetzt und anschließend bei Raumtemperatur (RT)

gerührt. Der Reaktionsansatz wurde dünnenschichtchromatographisch verfolgt (Laufsystem: Chloroform / Methanol (10:1), Detektion mit UV und Cer(IV)-sulfat / Molybdatophosphorsäure). Nach einer Reaktionszeit von ca. 18 h war kein freies PTx mehr detektierbar ($R_f_{PTx}=0,6$).

Bei der DCC-vermittelten Veresterung erfolgt zuerst eine Aktivierung der Carbonsäuregruppen (Abbildung 18). Im Sinne einer nukleophilen Addition reagiert eine Carboxylgruppe der PG mit dem Carbodiimid, wobei ein reaktives O-Acyl-isoharnstoffderivat entsteht. Dieses Zwischenprodukt kann anschließend mit einer OH-Gruppe zu einem Ester reagieren. Nach einer Reaktionszeit von ca. 18 h wurden die Synthesen durch Ausfällen in Chloroform gestoppt. Um eine Umesterung durch Ethanol zu verhindern, wurde mit Amylen stabilisiertes Chloroform verwendet. Der Niederschlag wurde mehrfach mit Chloroform gewaschen und anschließend getrocknet. Der resultierende Feststoff wurde dann in DMF gelöst und mit Acetatpuffer (50 mM, 0,2 M NaCl, pH 5,6) gemischt. Hierdurch erfolgte eine Auflösung der Zielverbindung in Form des Natriumsalzes. Gleichzeitig konnte das unlösliche Nebenprodukt N,N'-Dicyclohexylharnstoff mittels Filtration (0,8 µm) abgetrennt werden. Abschließend wurde die Synthese ausgiebig gegen Wasser dialysiert und durch Lyophilisation getrocknet.

2.2.8 Konjugation mit Carbonyldiimidazol

Die Konjugation mit Carbonyldiimidazol (CDI) von PG30 und PTx wurde in wasserfreiem DMF durchgeführt (Abbildung 19). Als Ausgangsmaterial für die Synthese wurde die protonierte PG30 eingesetzt, welche aus dem Natriumsalz durch Fällung mit 0,2 M HCl hergestellt wurde. Die Aufreinigung und Trocknung erfolgte wie unter 2.2.7 beschrieben. Für die Umsetzung wurde PG30 gelöst in DMF (6 ml, 10 mg/ml) mit CDI aus einer Stammlösung (11 mg/ml in DMF) versetzt. Nach 2 h bei 37°C wurde dem Reaktionsansatz PTx (gelöst in DMF) zugegeben. Die Reaktion wurde nach weiteren 2 h bei 37°C durch Zugabe von 50 mM PBS pH 6,8 gestoppt. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz mittels Dialyse (3,5 kDa Membran) gereinigt und durch Lyophilisation getrocknet.

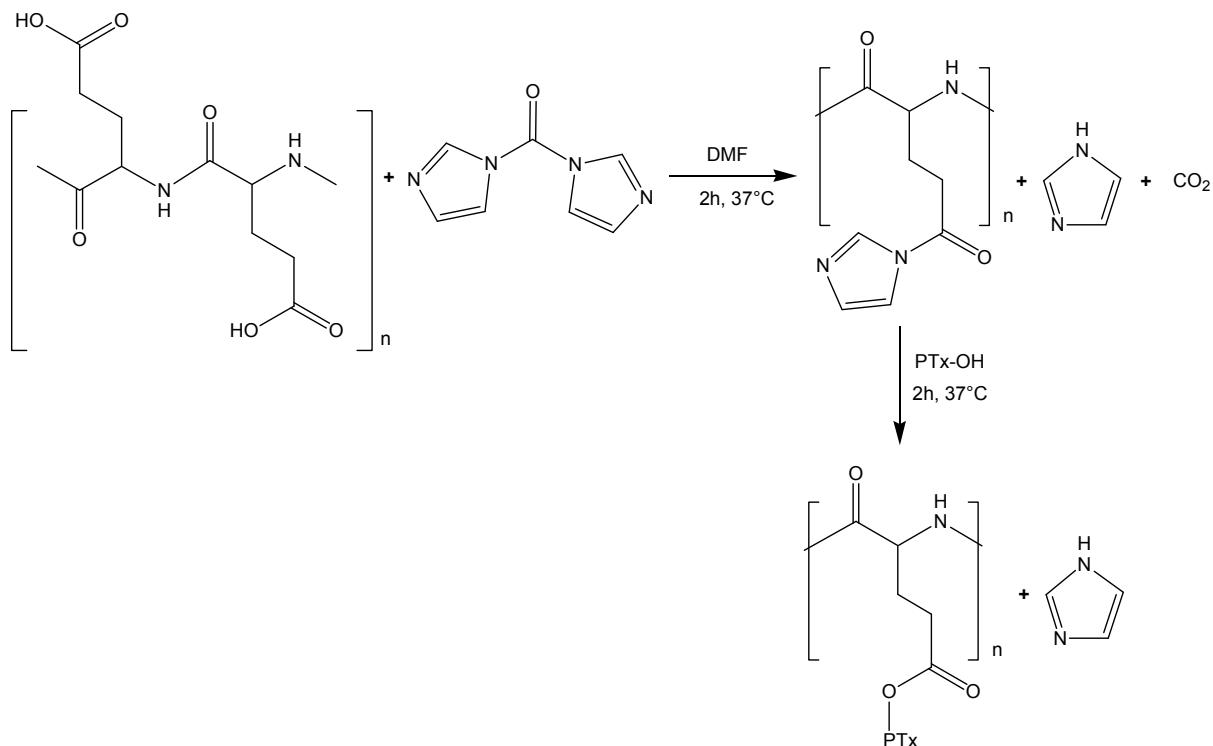


Abbildung 19: Konjugation von Poly(L-glutaminsäure) (PG30) und Paclitaxel (PTx) mit Carbonyldiimidazol (CDI)

2.2.9 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) eignet sich gut zur Charakterisierung von Polyelektrolytmultischichten und insbesondere von LbL-Kapseln [289, 290]. Damit ist es möglich, optische Schnitte mit definiertem Abstand durch Objekte zu legen. Als Lichtquelle wurde bei dem verwendeten CLSM ein Argon- und ein Helium / Neon-Laser genutzt, der das Objekt punktweise rasternt. Als Anregungswellenlänge können mit dem Argon-Laser, 488 nm und 514 nm und mit dem Helium / Neon-Laser 543 nm, 663 nm ausgewählt werden. Das konfokale Prinzip besteht darin, dass nur ein Punkt, der genau in der Schärfenebene liegt, beobachtet wird (Abbildung 20). Der unscharf erscheinende Hintergrund bzw. Vordergrund wird durch zwei Blenden (Pinholes) ausgeblendet. Nur der mittlere Strahl (durchgezogene Linie) liegt in der Fokusebene, die zwei äußeren Strahlen (gestrichelte Linien) liegen außerhalb der Ebene und beeinflussen das Bild nicht (Abbildung 20). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein CLSM (TCS SP1) von Leica (Wetzlar, Deutschland) verwendet. Die Untersuchungen an beschichteten Objektträgern erfolgten mit getrockneten Proben.

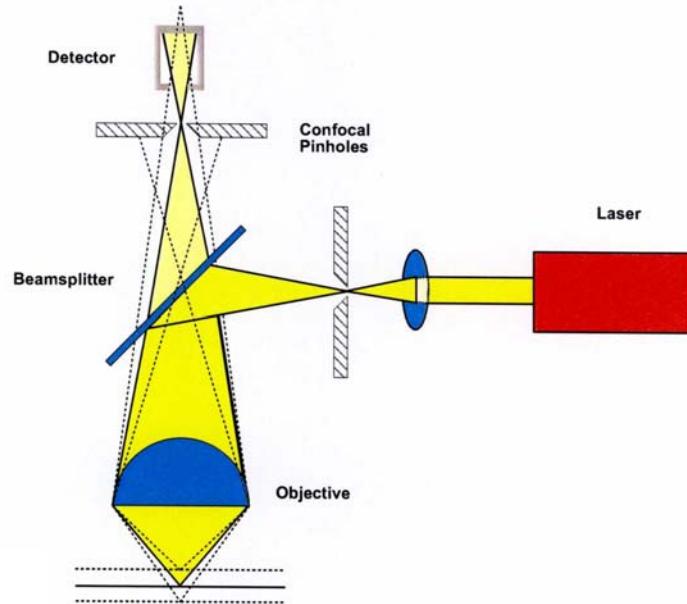


Abbildung 20: Prinzip der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie [Leica]

2.2.10 Rasterkraftmikroskopie

Mit dem Rasterkraftmikroskop (engl. atomic force microscope, AFM oder scanning force microscope, SFM) können Oberflächeneigenschaften wie die Topographie und die chemische Zusammensetzung bestimmt werden. Das Prinzip des Rasterkraftmikroskops entwickelte sich aus dem Rastertunnelmikroskop (scanning tunneling microscope, STM) und wurde von Binning et al. 1986 eingeführt [291].

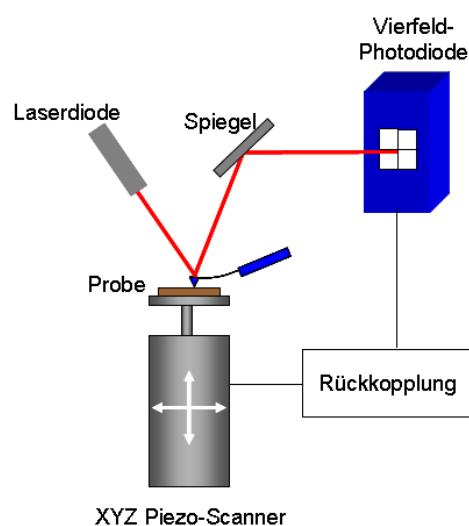


Abbildung 21: Schematischer Aufbau eines AFMs, mit Federbalken, Probe, Piezo, Laser und Detektor

Das AFM besteht aus einem Federbalken (cantilever), unter welchem, durch Piezokristalle gesteuert, das Substrat bewegt wird. An einer Seite des Federbalkens befindet sich eine Spalte als Messfühler, deren Durchmesser die Auflösung des Mikroskopes limitiert. Bei der Annäherung der Spalte an die Probe wird der Federbalken ausgelenkt. Die Auslenkung (deflection) wird durch einen auf den Federbalken fokussierten Laser detektiert. Aufgrund der Messanordnung resultiert aus einer kleinen Auslenkung des Federbalkens eine große Auslenkung auf der Vierfeldfotodiode. Die Messgröße ist die Differenz der Intensität zwischen den einzelnen Diodenfeldern, die sich durch die Ablenkung des Laserstrahls ergibt. Der Messaufbau ist in Abbildung 21 dargestellt.

Bei der Messung im „contact mode“ wird die Auslenkung des Federbalkens in z-Richtung konstant gehalten. Im Vergleich zur Rastertunnelmikroskop besitzt die AFM einige Vorteile. So können nichtleitende Materialien untersucht werden und es ist möglich, die Probe unter Umgebungsbedingungen (auch in Lösungsmitteln) zu analysieren. Der Nachteil dieser Methode („contact mode“) ist, dass bei weichen Proben der Federbalken der Topographie nicht mehr folgt und in die Oberfläche eindringt. Weiterhin treten beim Abrastern der Probe Scherkräfte auf, die weiche Proben beschädigen können.

Ein weiterer Betriebsmodus ist der „tapping mode“ (™Digital Instruments). Im „tapping mode“ wird der Federbalken mit einem Piezokristall zur Schwingung angeregt und kommt nur kurz, während der Oszillation, in Kontakt mit der Probe. Bei diesem Betriebsmodus ist die Beanspruchung der Probe durch Scherkräfte deutlich geringer. Aufgrund der Wechselwirkung des Federbalkens mit der Probe wird die Schwingung gedämpft, so dass sich die Amplitude gegenüber der freien Amplitude verringert. Die gedämpfte Amplitude wird durch entsprechende Regelung des Piezokristalls konstant gehalten. Als Anregungsfrequenz wählt man eine Frequenz in der Nähe der Resonanzfrequenz, um eine möglichst große Amplitude zu erhalten.

Durchführung der Messung

Für die Untersuchungen der Filmdicken von Polyelektrolytmultischichten wurden diese auf polierte Siliziumstücke (150 mm Wafer als Schenkung von der Siltronic AG erhalten) mit geringer Oberflächenrauhigkeit (<1 nm) entsprechend Kapitel 2.2.1 aufgebracht [292]. Vor den AFM-Messungen wurden die beschichteten Siliziumstücke ausgiebig mit Wasser gespült, im N₂-Strom getrocknet und für ca. 14 Stunden über Trockengel im Vakuum gelagert. Damit wurde versucht den Einfluss der Restfeuchte auf die Filmdicke zu nivellieren.

Zur Bestimmung der Schichtdicke wurden die PEM mit einem spitzen Siliziumstück angeritzt (scratch). Die Messung der Schichtdicke erfolgte an dem Riss. Als Betriebsmodus wurden der „tapping mode“ mit einem „Scanareal“ von 10,6 µm x 10,6 µm und einer „Scan rate“ von 1,65 Hz verwendet. Dabei wurden pro

Beschichtung mindestens drei Messungen an unterschiedlichen Stellen durchgeführt und aus den Einzelwerten der Mittelwert berechnet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software NanoScope (R) II Version 5.31R1 der Firma Digital Instruments.

3 Ergebnisse

3.1 Aufbau von Polyelektrolytmultischichten aus PG und PLL

Der Aufbau von Beschichtungen mit Paclitaxel (PTx) für Drug-Eluting Stents (DES) erfolgte mit den Polyelektrolyten Poly(L-glutaminsäure) (PG) und Poly(L-lysin) (PLL) als Modellsystem. Begonnen wurden die Untersuchungen an wirkstofffreien Multischichten mit dem Ziel, Bedingungen für eine möglichst starke und kontinuierliche Assemblierung im geeigneten pH-Bereich zu finden. Es wurden drei pH-Werte für die Beschichtung ausgewählt. Bei pH 7,6 sind beide Polyelektrolyte entgegengesetzt geladen was zu einer homogenen, stabilen Beschichtung führt. Der Schichtenaufbau und die Stabilität von PEM aus PG und PLL werden stark vom pH-Wert beeinflusst [130, 276, 293]. So entsteht die geringste und damit homogenste Filmdicke zumindest unter salzfreien Bedingungen bei der Beschichtung im neutralen pH-Bereich [130]. Eine Verschiebung des pH-Wertes sowohl in den sauren als auch alkalischen Bereich führen zu einer Zunahme der Beschichtungsdicke bei gleichzeitiger Destabilisierung der Multischichten. Als Ursachen werden auftretende hydrophobe Wechselwirkungen, H-Brückenbindungen sowie die geänderte Struktur der Polypeptide in Lösung gesehen [74]. Zum Aufbau von Multischichten wurde als unterer pH-Wert 5,6 festgelegt. In diesem pH-Bereich ist die PG-PTx-Bindung nach Li et al. am stabilsten. Dagegen erhöht eine Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich die Hydrolyserate der Wirkstoff-Polymer-Bindung. Zusätzlich wurde die Assemblierung der PEM bei pH 6,1 charakterisiert.

Ziel der Vorversuche war es, Bedingungen für einen kontinuierlichen Aufbau von stabilen Multischichten mit hoher Wirkstoffbeladung zu finden. Gleichzeitig soll die Wirkstofffreisetzung primär nicht durch den Zerfall der Multischichten erfolgen, sondern durch eine langsame hydrolytische Spaltung der PG-PTx-Bindung.

Ein weiteres Ziel der Vorversuche an wirkstofffreien Multischichten war herauszufinden, ob im Vergleich zu Multischichten mit PG-PTx der Schichtenaufbau durch PTx beeinflusst wird. Weiterhin stellte sich die Frage, inwieweit eine Variation der Ionenstärke sowie des Molekulargewichtes der verwendeten PG den Aufbau von Multischichten beeinflusst. Im Rahmen der Arbeit wurden die Beschichtungen mit der QCM-D, der UV-Spektroskopie und an ausgewählten Systemen mit der AFM analysiert.

3.1.1 Einfluss des pH-Wertes

Besonders bei schwachen Polyelektrolyten, wie bei den hier verwendeten Polypeptiden PG und PLL, wird das Schichtenwachstum stark vom pH beeinflusst

(siehe Abschnitt 1.2.4). Typischerweise erfolgt der Aufbau von PEM mit einem Zusatz von NaCl im Bereich von 0,1-0,5 M. Dadurch wird die Flexibilität der Polyelektrolytketten in Lösung durch eine Abschirmung der Ladung erhöht und so ein stabiles Schichtenwachstum ermöglicht. Für die untersuchte Polyelektrolytkombination ist bereits bekannt, dass bei pH 7,4 mit 0,15 M NaCl ein nicht-lineares Wachstum stattfindet (siehe auch Kapitel 1.2.4) [294].

Die Versuche zum Einfluss des pH-Wertes auf das Schichtenwachstum wurden mit einem Zusatz von NaCl (0,2 M NaCl) bei pH 5,6, 6,1 und 7,6 durchgeführt. Die pH-Werte der Polyelektrolytlösungen wurden durch Verwendung von Puffern (50 mM Acetatpuffer für pH 5,6; 50 mM Phosphatpuffer für pH 6,1 und 7,6) stabilisiert. Dabei beeinflussen neben den pH-Werten die verschiedenen Puffer die Ionenstärke der Lösung. Die Differenz der Ionenstärke zwischen dem Phosphatpuffer pH 7,6 und dem Acetatpuffer ist in Bezug auf die Assemblierung von PEM aber vertretbar gering. Bei allen Beschichtungen wurde der pH-Wert zwischen der kationischen und anionischen Polyelektrolytschicht nicht variiert, so dass die gesamte Beschichtung immer bei einem pH aufgebaut wurde.

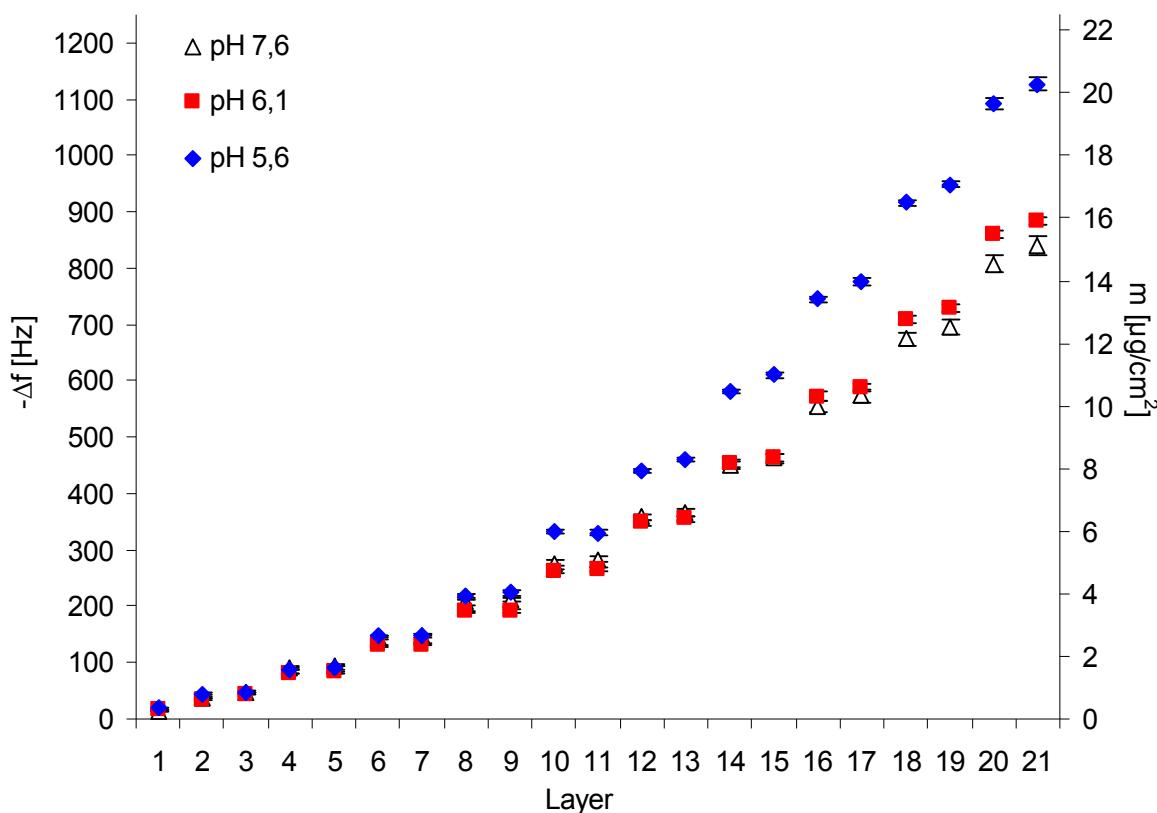


Abbildung 22: Einfluss des pH-Wertes auf das Schichtenwachstum der LbL-Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}-\text{PG75}$; Assemblierung in Anwesenheit von 0,2 M NaCl; analysiert mit der QCM-D; Berechnung der Massen nach Sauerbrey aus dem 5. Oberton

Die mit der QCM-D analysierten Verläufe der Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ sind in Abbildung 22 zusammen dargestellt. Entsprechend den Ergebnissen von Richert et al. zur salzfreien Assemblierung von PG75/PLL ist auch in Anwesenheit von 0,2 M NaCl eine deutliche Beeinflussung des Schichtenaufbaus durch den pH-Wert zu erkennen [130]. Mit der QCM-D wird eine stärkere Beschichtung bei pH 5,6 in Anwesenheit von 0,2 M NaCl analysiert, wobei die Unterschiede der Resonanzfrequenzen ab der 8. Schicht zwischen pH 5,6 und 6,1 / 7,6 signifikant sind. Die Signifikanz wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (Two Way ANOVA, Faktor A: pH-Wert, Faktor B: Anzahl an Schichten) und Einzelvergleichen (Tukey Test) getestet. Die etwas schwächeren Beschichtungen bei pH 7,6 und 6,1 unterscheiden sich nur geringfügig (Unterschiede sind erst ab der 16. Schicht signifikant). Bei allen Beschichtungen ist das Verhältnis des Dissipationsfaktors zur Frequenzänderung (D/f -Quotient) sehr klein, so dass die mit der Sauerbrey-Gleichung berechneten Massen in der richtigen Größenordnung liegen sollten. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei den durchgeführten QCM-D-Messungen Wassermoleküle und Ionen, welche der Quarzschwingung folgen, auch einen Beitrag zur Frequenzänderung liefern und dadurch eine stärkere Beschichtung vortäuschen können.

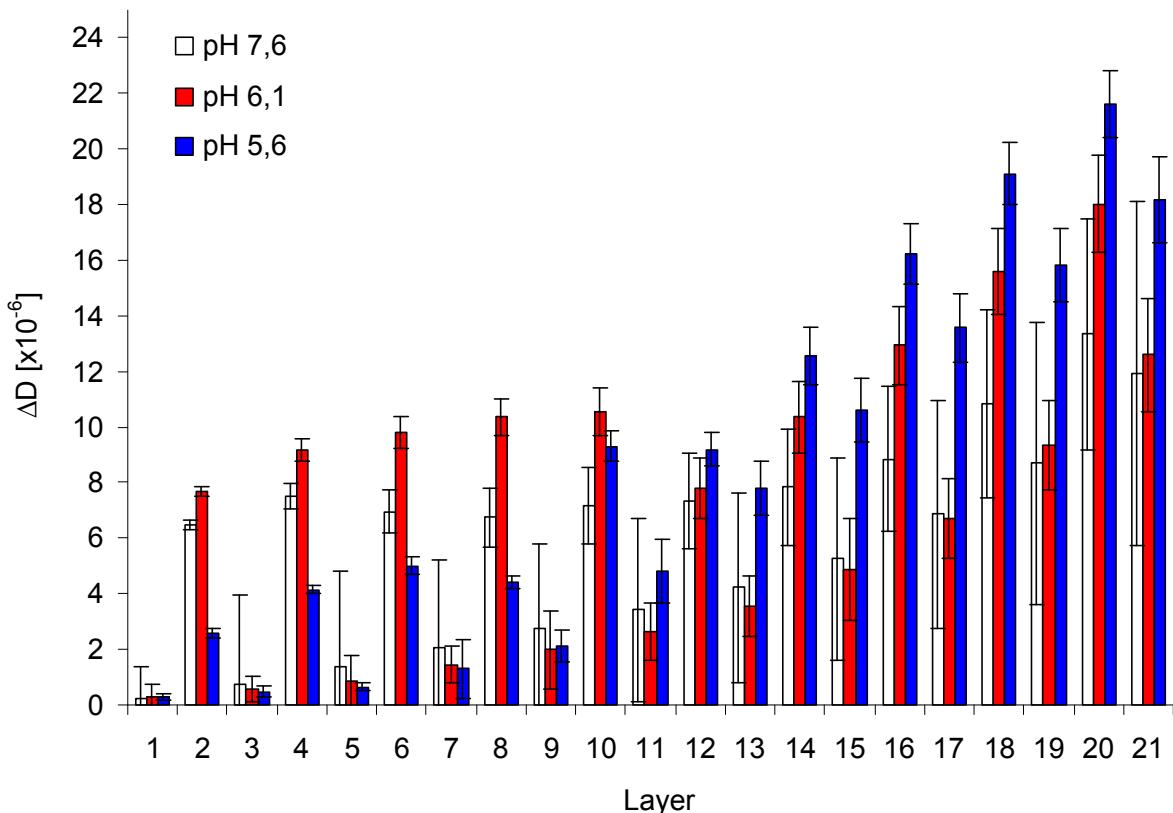


Abbildung 23: Verlauf des Dissipationsfaktors der LbL-Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6, 6,1 und 7,6 mit 0,2 M NaCl; analysiert mit der QCM-D

In Abbildung 23 sind die Dämpfungswerte der Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ mit 0,2 M NaCl bei pH 5,6, 6,1 und 7,6 graphisch dargestellt. Bei allen pH-Werten vergrößert sich mit steigender Zahl an Polyelektrolytschichten der Dissipationsfaktor. Ab der 13. Schicht sind die Unterschiede der Dämpfungen zwischen pH 5,6 und 6,1 / 7,6 signifikant (Two Way ANOVA mit Einzelvergleichen (Tukey Test), Faktor A: pH, Faktor B: Anzahl an Schichten). Charakteristisch für diese LbL-Beschichtungen ist der Verlauf des Dissipationsfaktors: So nimmt dieser bei jeder Schicht mit PLL zu und verringert sich wieder bei der nachfolgenden Schicht mit PG. Dieses Verhalten wurde bei allen pH-Werten gefunden, wobei insgesamt eine Zunahme des Dissipationsfaktors mit steigender Anzahl an Polyelektrolytschichten erfolgt. Die erhöhten Dämpfungen der PLL-Schichten im Vergleich zu den benachbarten PG-Schichten deuten auf strukturelle Unterschiede der Multischichten in Abhängigkeit der terminierenden Schicht hin. Möglicherweise ändern sich die mechanischen Eigenschaften der PEM durch die Beschichtung von PLL oder führen zu einer Quellung der Multischichten. Auch ein höherer Anteil an Schlaufen sowie freie, in das umgebende Medium hineinragende Kettenenden bei PLL terminierten Multischichten können zu dem beobachteten Verhalten führen, da dadurch eine insgesamt größere Masse (Polymer plus Wasser) zusammen mit dem Quarz schwingt.

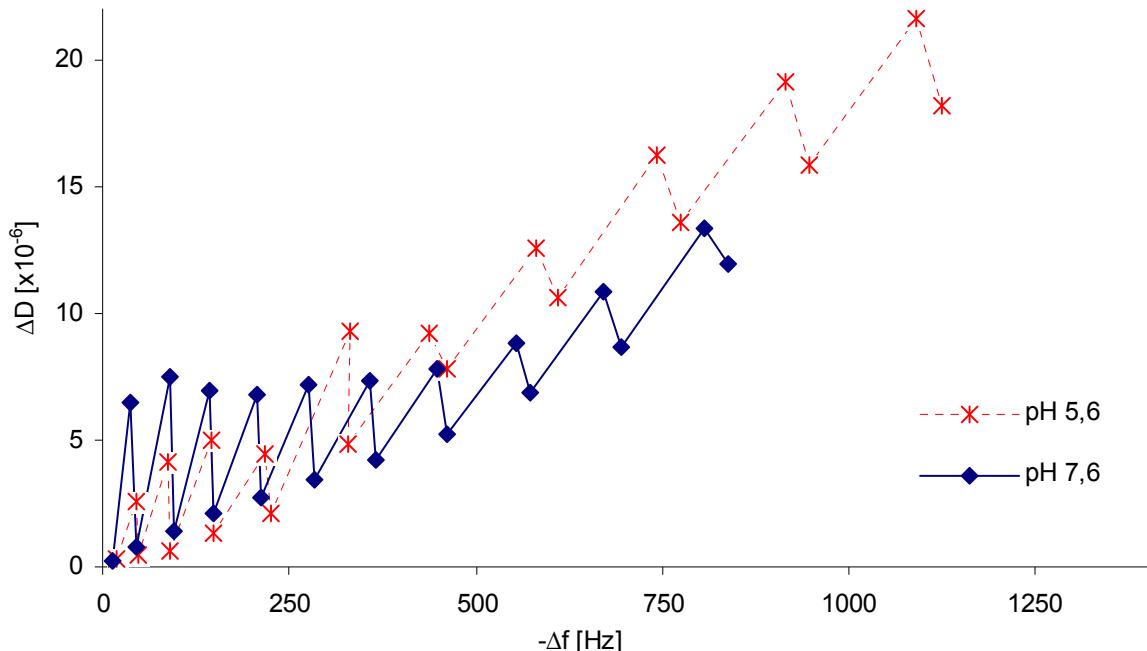


Abbildung 24: Graphische Darstellung des D/f-Verhältnisses der LbL-Beschichtungen $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$, assembliert bei pH 5,6 und pH 7,6 in Anwesenheit von 0,2 M NaCl; die Anzahl an Polyelektrolytschichten erhöht sich von links nach rechts

Die stärkste Zunahme des Dissipationsfaktors zeigte die Beschichtung bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl, wobei die absolute Größe welche im Verlauf von 21

Polyelektrolytschichten erreicht wird gering ist. Ein Anstieg der Dämpfung im Verlauf der Beschichtung ist aufgrund des zunehmenden Beitrages der viskoelastischen Eigenschaften der sich bildenden Multischichten zu erwarten (Abbildung 24). Das D/f-Diagramm zeigt für beide Beschichtungen einen stabilen Anstieg, was darauf schließen lässt, dass keine starke Strukturänderung im Verlauf der Beschichtungen erfolgt. Von der Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 und 7,6 mit 21 Polyelektrolytschichten wurde die Filmdicke von getrockneten Multischichten mit der AFM bestimmt. In Abbildung 25 ist das AFM-Bild und Höhenprofil der Beschichtung bei pH 5,6 und in Abbildung 26 von pH 7,6 dargestellt.

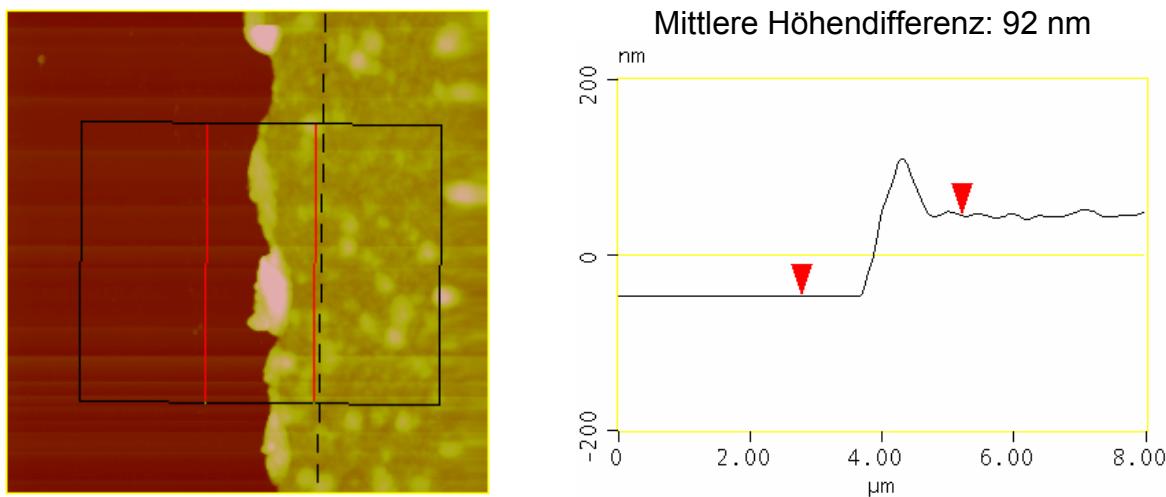


Abbildung 25: Bestimmung der Filmdicke mit der AFM an trockenen Multischichten aus $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$; assembliert bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

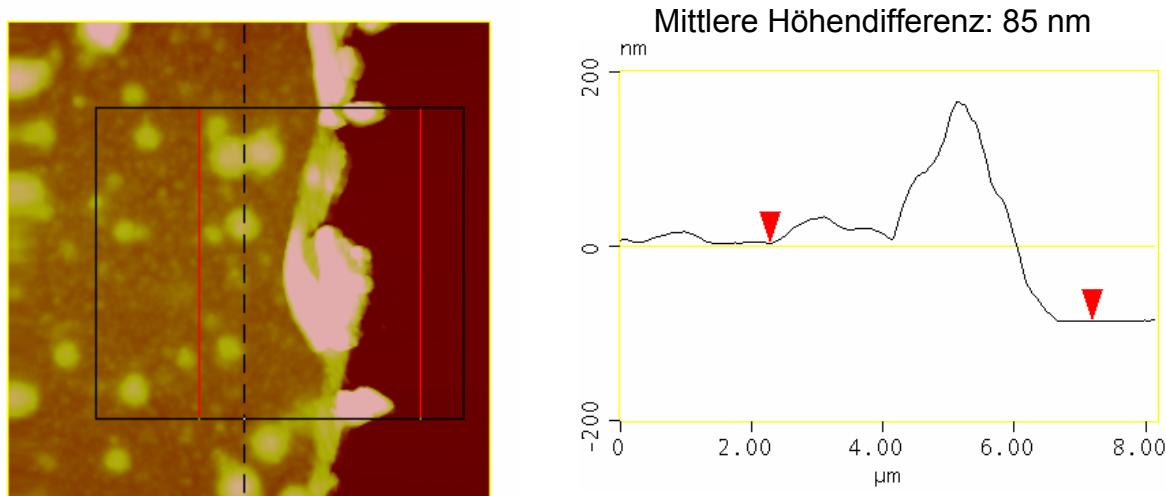


Abbildung 26: Bestimmung der Filmdicke mit der AFM an trockenen Multischichten aus $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$; assembliert bei pH 7,6 mit 0,2 M NaCl; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

Die Beschichtung bei pH 5,6 hat mit 92 ± 2 nm eine ca. 1,2fach größere Filmdicke als die entsprechenden Multischichten assembliert bei pH 7,6 (85 ± 3 nm). Bei der AFM kann das Messergebnis durch Restfeuchte nach der Trocknung beeinflusst werden. Prinzipiell bestätigen in diesem Fall die AFM-Messungen an den Beschichtungen mit PG75 bei pH 5,6 und 7,6 die Ergebnisse der QCM-D. Am Beispiel der Beschichtung (PG75/PLL)₁₀-PG75 in Anwesenheit von 0,2 M NaCl wurde eine deutliche Beeinflussung durch den pH-Wert im untersuchten Bereich auf die Assemblierung festgestellt. Alle Beschichtungen zeigen ein nicht-lineares Schichtenwachstum. Der stärkste Aufbau von PEM mit PG75 und PLL findet bei pH 5,6 und 0,2 M NaCl statt.

Zusammenfassung:

Die Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Richert et al., als dass sich die Filmdicke von Multischichten aus PG und PLL durch die Assemblierung bei niedrigeren pH-Werten erhöht [130]. Es konnte gezeigt werden, dass auch schon bei pH 5,6 ein stärkeres Schichtenwachstum stattfindet und somit pro Schicht mehr Polymer adsorbiert als bei pH 7,6. Bei pH 6,1 wurde eine erheblich geringere Beeinflussung gefunden. Haynie et al. zeigte, dass die Filmdicke von der Konformation der Polypeptide in Lösung gesteuert wird [276]. Durch eine Verringerung des pH-Wertes erhöht sich der Anteil mit helicaler Struktur, was zu einer Erhöhung der Schichtdicke von PEM führen kann. Es wird daher vermutet, dass die Zunahme der Filmdicke bei pH 5,6 durch eine Konformationsänderung der PG in den Multischichten verursacht wird. Für den Aufbau von wirkstoffhaltigen PEM mit PG75 erscheinen diese Bedingungen in Bezug auf Schichtenwachstum und Homogenität der Beschichtung sowie die Stabilität der PG-PTx Bindung besonders geeignet.

3.1.2 Einfluss von NaCl

Die Ionenstärke beeinflusst ebenso wie der pH-Wert die Bildung und Struktur von PEM (siehe Abschnitt 1.2.4). Der Einfluss von NaCl auf den Aufbau von Multischichten aus PG75 und PLL wurde bei pH 5,6 und 7,6 untersucht. In Abbildung 27 sind die QCM-D-Ergebnisse der Beschichtungen bei pH 5,6 und in Abbildung 33 bei pH 7,6 dargestellt.

Es ist ein Einfluss der Ionenstärke auf die Beschichtung bei pH 5,6 mit der QCM-D zu sehen. Nach 21 Polyelektrolytschichten wurde die stärkste Frequenzänderung an der Beschichtung ohne Zusatz von NaCl analysiert (Abbildung 27). Es scheint, dass bei geringer Ionenstärke ein stärkerer Aufbau von PEM stattfindet. Der Unterschied zwischen den Resonanzfrequenzen der Beschichtungen mit 0,2 M und 0,5 M NaCl ist im Vergleich zu der Assemblierung ohne Zusatz von NaCl deutlich kleiner, wobei

nach 21 Polyelektrolytschichten die geringste Frequenzabnahme für die Beschichtung mit 0,5 M NaCl gefunden wurde. Ab der 8. Polyelektrolytschicht unterscheidet sich die Frequenzänderung der Beschichtung ohne Zusatz von NaCl signifikant von den Beschichtungen mit 0,2 oder 0,5 M NaCl (Abbildung 27, Two Way ANOVA mit Einzelvergleichen (Tukey Test), Faktor A: Salzkonzentration, Faktor B: Anzahl an Schichten). Der Unterschied zwischen den Beschichtungen in Anwesenheit von 0,2 und 0,5 M NaCl ist erst ab der 13. Schicht signifikant.

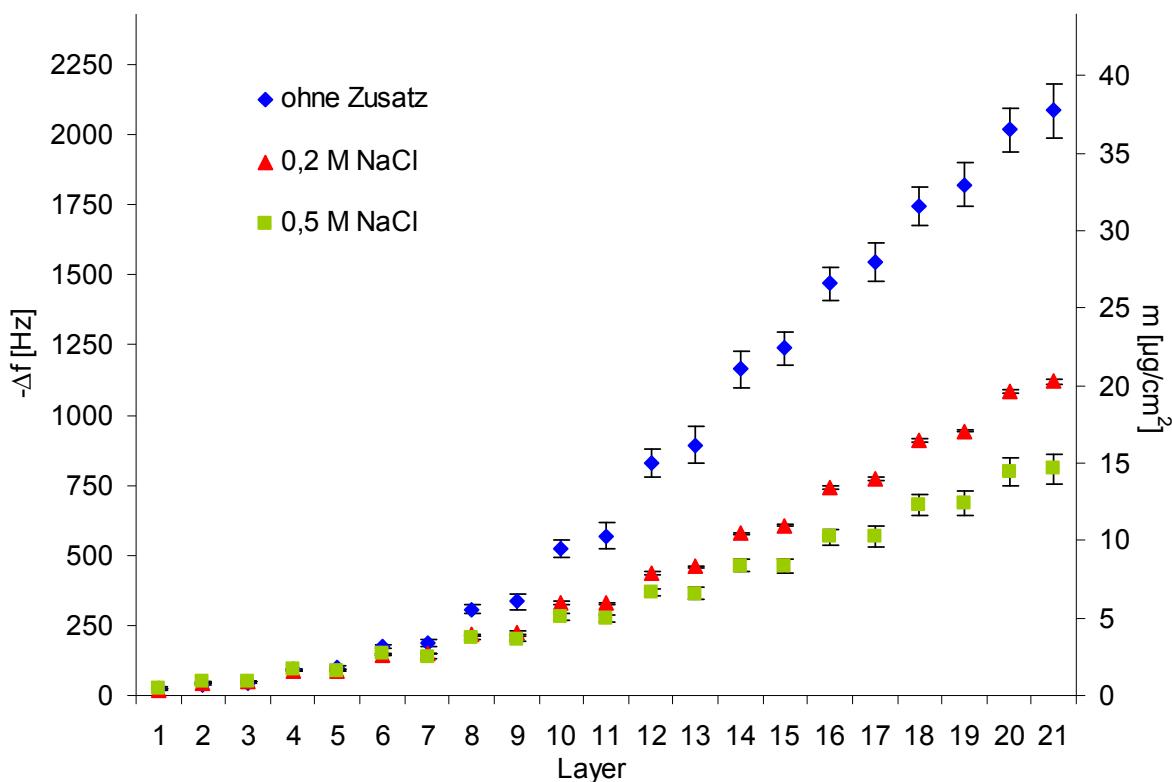


Abbildung 27: Schichtenwachstum der LbL-Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl, mit 0,2 M und 0,5 M NaCl; analysiert mit der QCM-D; Massen berechnet nach Sauerbrey aus dem 5. Oberton

Für die Beschichtung ohne Zusatz von NaCl wurde gegenüber der mit 0,5 M NaCl nach 21 Schichten eine 2,6fach stärkere Reduktion der Resonanzfrequenz analysiert. Auch bei geringer Ionenstärke zeigte die Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ ein nicht-lineares Schichtenwachstum. Im Allgemeinen wird ein stärkeres Schichtenwachstum bei größeren Ionenstärken durch eine Erhöhung der Kettenflexibilität sowie Interpenetration der Polyelektrolyte bei der Assemblierung beobachtet [295]. An unterschiedlichen Polyelektrolytkombinationen wurde herausgefunden (z.B. Hyaluronsäure / Chitosan oder PDA / PSS), dass sich in Anwesenheit von Salz dickere Schichten bilden (häufig im Rahmen der Arbeit als stärkeres Schichtenwachstum bezeichnet) [28, 144]. Umgekehrt adsorbiert somit im

Salzfreien weniger Polymer, so dass bei gleicher Anzahl an Schichten eine dünneren Beschichtung entsteht (schwächeres Schichtenwachstum). Das mit der QCM-D beobachtete abweichende Verhalten der Polyelektrolytkombination PG / PLL bei pH 5,6 kann verschiedene Ursachen haben. Neben dem bereits im Kapitel 3.1.1 diskutieren Konformationseinfluss der PG auf das Schichtenwachstum bei pH 5,6 könnte die Ursache auch auf eine erhöhte Persistenzlänge der Polyelektrolyte bei geringer Ionenstärke zurückzuführen sein. So adsorbieren Polyelektrolyte bei niedriger Ionenstärke aufgrund der erhöhten elektrostatischen Wechselwirkung entlang der Polymerkette häufig stäbchenförmig in gestreckter Konformation. Aber auch der intermolekulare Abstand zwischen den Polymermolekülen einer Schicht wird dadurch größer. Möglicherweise bewirkt die Kettensteifigkeit sowie die Topographie der adsorbierten Polyelektrolyte, dass insgesamt ein größerer Anteil an Wasser der Kristallbewegung bei den QCM-D-Messungen folgt und führt dadurch zu der hohen Frequenzänderung im Verlauf von 21 Schichten.

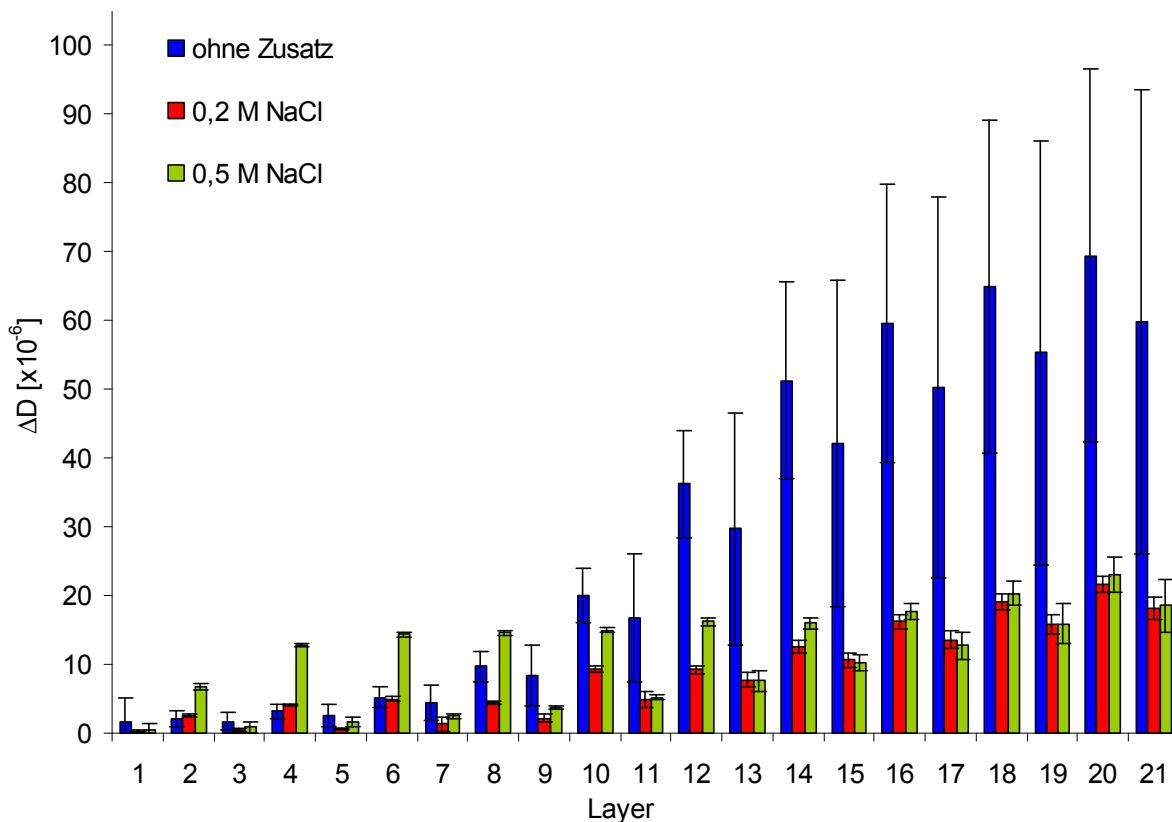


Abbildung 28: Verlauf des Dissipationsfaktors der LbL-Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6, ohne Zusatz von NaCl, mit 0,2 M und 0,5 M NaCl; analysiert mit der QCM-D

Der Dissipationsfaktor vergrößert sich bei allen Ionenstärken mit steigender Anzahl an Polyelektrolytschichten bei pH 5,6 (Abbildung 28). Die stärkste Zunahme sowie die größeren Streuungen zwischen den einzelnen Messungen sind bei der

Assemblierung ohne Zusatz von Salz (pH 5,6) zu beobachten. Die Dissipationsfaktoren der Beschichtung bei geringer Ionenstärke unterscheiden sich von den Beschichtungen mit 0,2 oder 0,5 M NaCl ab der 11. Schicht signifikant (Two Way ANOVA mit Einzelvergleichen (Tukey Test), Faktor A: Salzkonzentration, Faktor B: Anzahl an Schichten). Die D/f-Diagramme der Beschichtungen ohne Zusatz von NaCl und mit 0,2 M NaCl sind in Abbildung 29 dargestellt und zeigen bei beiden Beschichtungsbedingungen einen stabilen Anstieg, was darauf schließen lässt, dass keine starke Strukturänderung im Verlauf der Beschichtungen erfolgt.

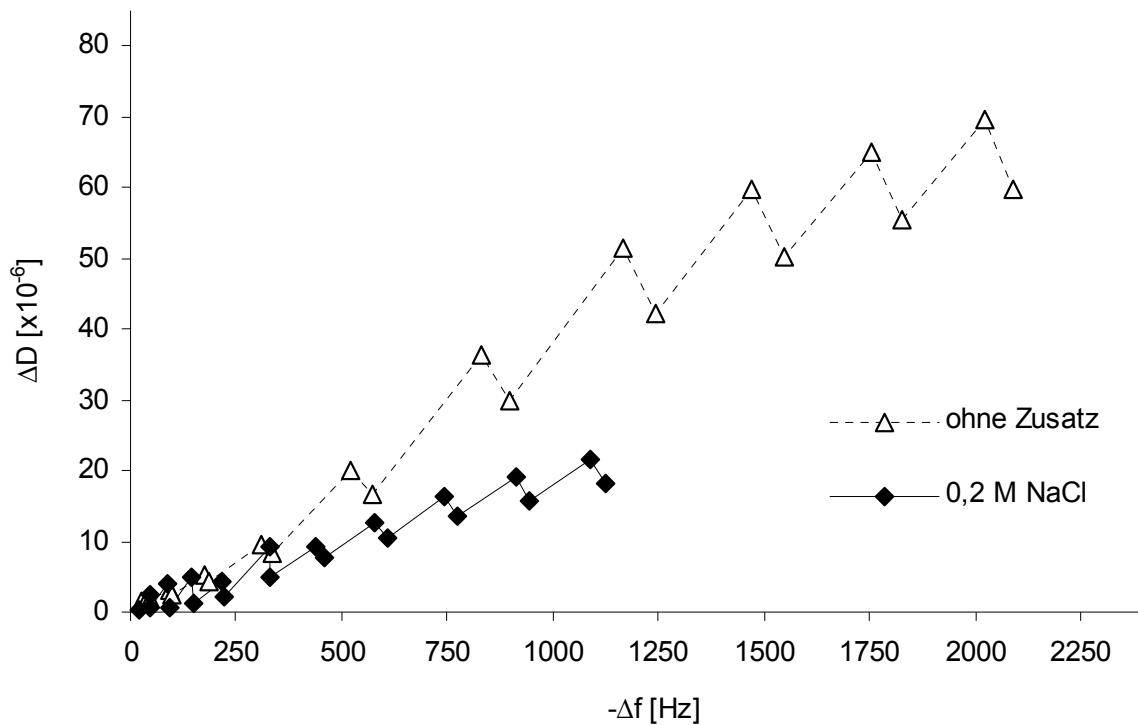


Abbildung 29: Graphische Darstellung des D/f-Verhältnisses der LbL-Beschichtungen (PG75/PLL)₁₀-PG75; assembliert bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl und mit 0,2 M NaCl; die Anzahl an Polyelektrolytschichten erhöht sich von links nach rechts

Die erheblich größeren Frequenzänderungen bei einem stabilen D/f-Verhältnis der Beschichtung ohne Zusatz von NaCl lassen vermuten, dass die Bildung und Zusammensetzung von Multischichten aus PG und PLL in Wasser erheblich durch die Ionenstärke (NaCl) beeinflusst wird. Aufgrund der relativ hohen Dämpfung gilt die Sauerbrey-Gleichung nicht, so dass die damit kalkulierten Massen (Abbildung 27) nur orientierenden Charakter haben. Im Weiteren wurde daher die Filmdicke getrockneter PEM, assembliert bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl, mit der AFM analysiert, um festzustellen, ob die große Frequenzänderung durch die Adsorption von Polyelektrolyten oder eine Einlagerung von Wasser hervorgerufen wird.

Die Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 wurde weiterhin mit der UV-Spektroskopie im Bereich von 200 - 300 nm untersucht.

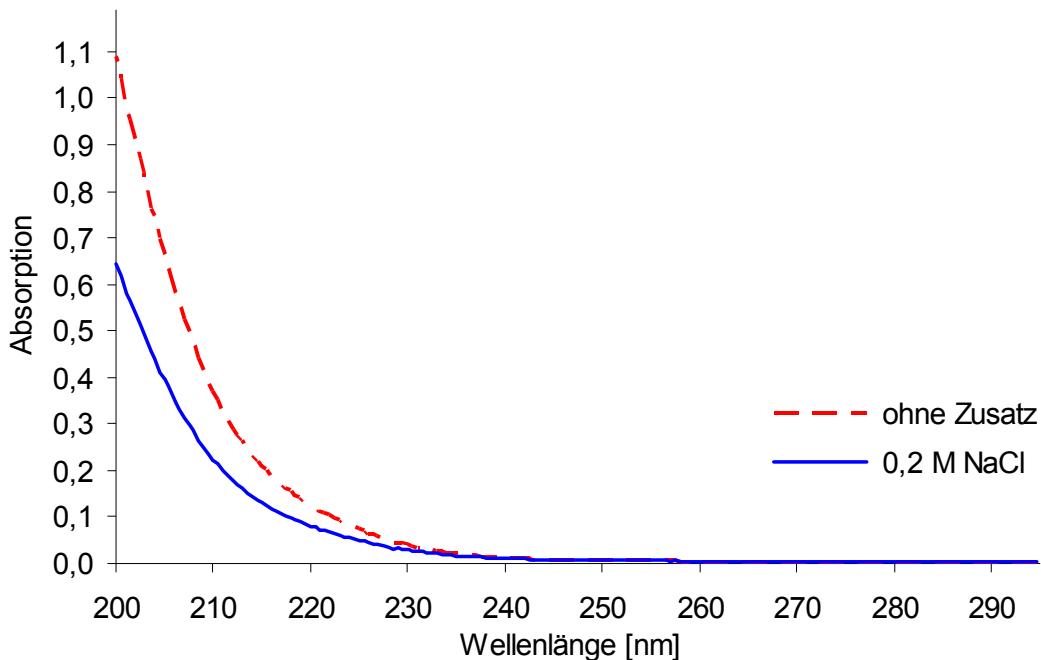


Abbildung 30: UV-Spektren der LbL-Beschichtungen $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 ohne Zusatz und mit 0,2 M NaCl

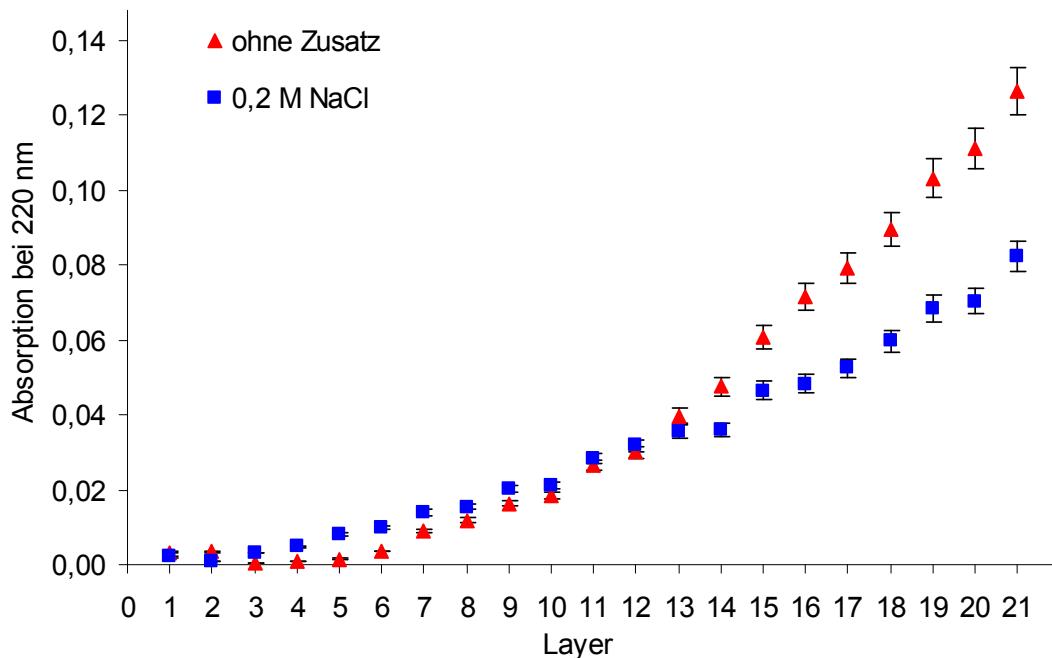


Abbildung 31: Verlauf der UV-Absorption bei 220 nm der LbL-Beschichtungen $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 ohne Zusatz und mit 0,2 M NaCl

In Abbildung 30 sind die UV-Spektren der Beschichtungen mit 21 Polyelektrolytschichten ohne Zusatz und mit 0,2 M NaCl dargestellt die einen Einfluss der Ionenstärke auf die PEM insbesondere im Bereich von 200 bis 240 nm belegen. Die Multischichten, welche ohne Zusatz von Salz aufgebaut wurden, zeigen eine stärkere UV-Absorption im kurzweligen Bereich. Auch der Verlauf der UV-Absorption bei 220 nm (Abbildung 31) zeigt einen stärkeren Anstieg der Absorption bei der Beschichtung ohne Zusatz von NaCl. Allerdings wird bei dieser Methode erst ab der 14. Polyelektrolytschicht ein Einfluss der Ionenstärke auf das Schichtenwachstum deutlich, was möglicherweise der geringen Absorption und damit Zuverlässigkeit der Messung geschuldet ist. Die Zunahme der Absorption bei 220 nm im Verlauf der Beschichtung ist insgesamt sehr gering.

Von der Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$, aufgebaut bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl, wurde die Filmdicke mit der AFM bestimmt (Abbildung 32). Das AFM-Messergebnis zeigt eine homogene Beschichtung der Waferoberfläche mit PEM.

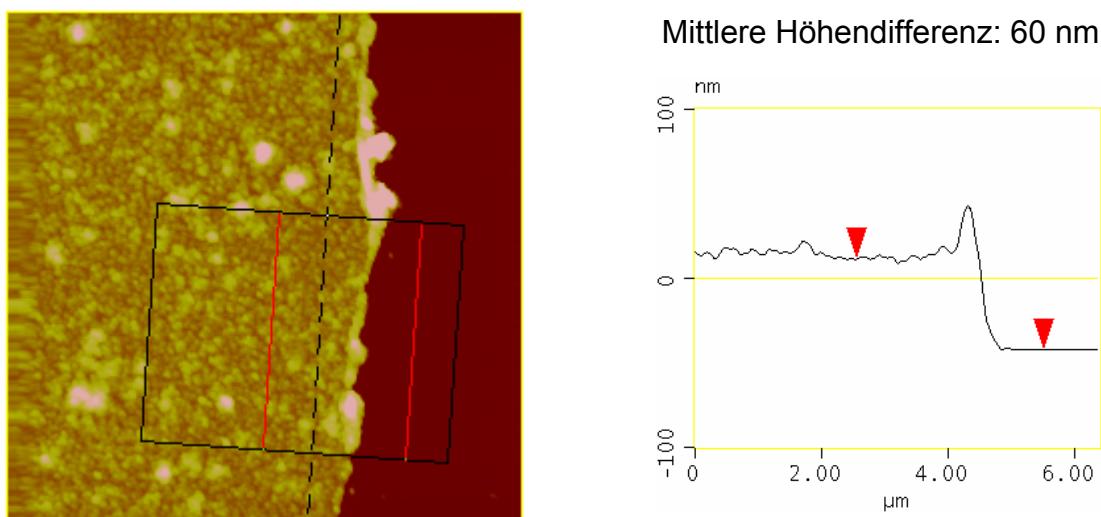


Abbildung 32: Bestimmung der Filmdicke mit der AFM an trockenen Multischichten aus $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$; assembliert bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

An der getrockneten Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$, assembliert bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl, wurde eine Filmdicke von ca. 60 ± 5 nm (Abbildung 32) bestimmt. Die vergleichbare Beschichtung in Anwesenheit von 0,2 M NaCl zeigt mit 92 ± 2 nm (Abbildung 25) eine erheblich größere Schichtdicke. Somit unterscheiden sich die Untersuchungsergebnisse an getrockneten Multischichten erheblich von denen in Wasser (QCM-D und UV-Spektroskopie).

Die AFM-Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die große Frequenzänderung (QCM-D) bei der salzfreien Beschichtung nicht durch eine erhöhte Polymeradsorption hervorgerufen wird. Die Beeinflussung des Schichtenwachstums durch die Ionenstärke wird vermutlich durch die erheblich größere Reichweite der

Abstoßung gleichgesinnter Ladungen bei geringer Ionenstärke hervorgerufen. Dadurch adsorbieren die Polyelektrolyte in einer gestreckteren Konformation und die Polymerketten der äußeren Schicht sollten auch weiter in das umgebende Medium hineinragen. Insgesamt würde dies dazu führen, dass bei der QCM-D ein dickerer Wasserfilm der Kristallschwingung folgt und damit eine größere Beschichtung vortäuscht. Auch die nach 21 Schichten erhöhte UV-Absorption der salzfrei assemblierten PEM kann durch einen Konformationswechsel in den Multischichten hervorgerufen werden. Unter Umständen haben helicale Strukturen einen erhöhten Extinktionskoeffizienten bei 220 nm. Aber auch eine Streuung an den beschichteten Küvettenwänden kann die UV-Messung erheblich beeinflussen. Die zuverlässigste Methode zur Bestimmung der aufgebrachten Polymermenge nach einer größeren Anzahl an Polyelektrolytschichten ist die Analyse der Schichtdicke getrockneter Filme mit der AFM, wobei auch hier das Ergebnis vom Restwassergehalt beeinflusst wird. Durch die Trocknung im Vakuum wurde versucht, diesen Effekt zu minimieren. Neben der Filmdicke kann die AFM auch Informationen zur Homogenität von Beschichtungen liefern.

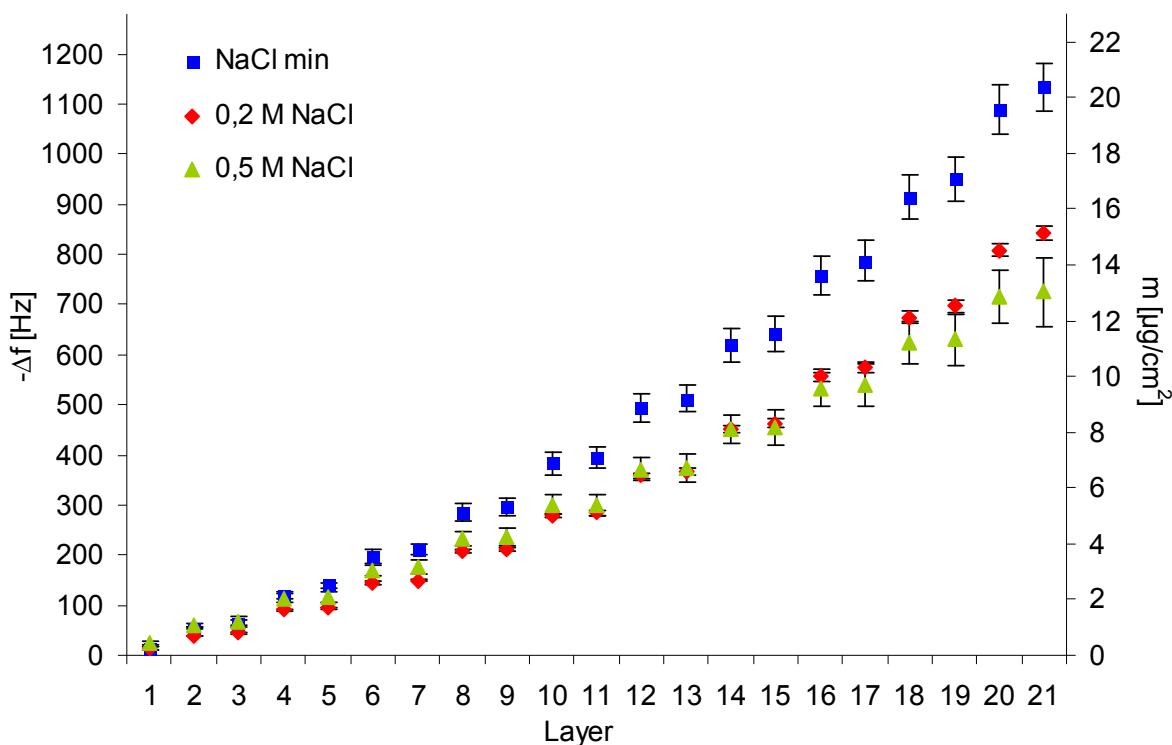


Abbildung 33: Schichtenwachstum der LbL-Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 7,6 mit NaCl min, 0,2 M und 0,5 M NaCl; analysiert mit der QCM-D; Massen berechnet nach Sauerbrey aus dem 5. Oberton

Nachfolgend wurde bei pH 7,6 der Einfluss der Ionenstärke auf die Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ untersucht. Bei diesem pH-Wert ist ein „salzfreier“ Aufbau von

Multischichten nicht möglich, da sich PLL im verwendeten Puffer (50 mM Phosphatpuffer, PLL 0,2 mg/ml) im Unterschied zu PG nicht vollständig löst. Erst mit einem Zusatz von 50 mM NaCl wird eine klare PLL-Lösung erhalten. Die Beschichtung findet folglich alternierend mit und ohne Zusatz von NaCl statt. Ziel ist eine Beschichtung bei minimaler Ionenstärke. Sie wird im Folgenden als „NaCl min“ bezeichnet.

Die QCM-D-Ergebnisse der Versuche bei pH 7,6 sind in Abbildung 33 (Resonanzfrequenzen) und Abbildung 34 (Dämpfungen) dargestellt. Auch bei pH 7,6 zeigen die QCM-D-Werte die stärkste Frequenzänderung für die Beschichtung (PG75/PLL)₁₀-PG75 bei der minimalen Ionenstärke. Alle Beschichtungen haben ein nicht-lineares Schichtenwachstum, wobei im Vergleich zu pH 5,6 das Ausmaß der Beeinflussung durch die Ionenstärke bei pH 7,6 deutlich geringer erscheint. Die Resonanzfrequenzen der Beschichtung „NaCl min“ unterscheiden sich von den Beschichtungen mit 0,2 oder 0,5 M NaCl ab der 8. Schicht signifikant (Two Way ANOVA mit Einzelvergleichen (Tukey Test), Faktor A: Salzkonzentration, Faktor B: Anzahl an Schichten). Zwischen der Beschichtung mit 0,2 und 0,5 M NaCl sind nur geringe Unterschiede in der Resonanzfrequenz festzustellen.

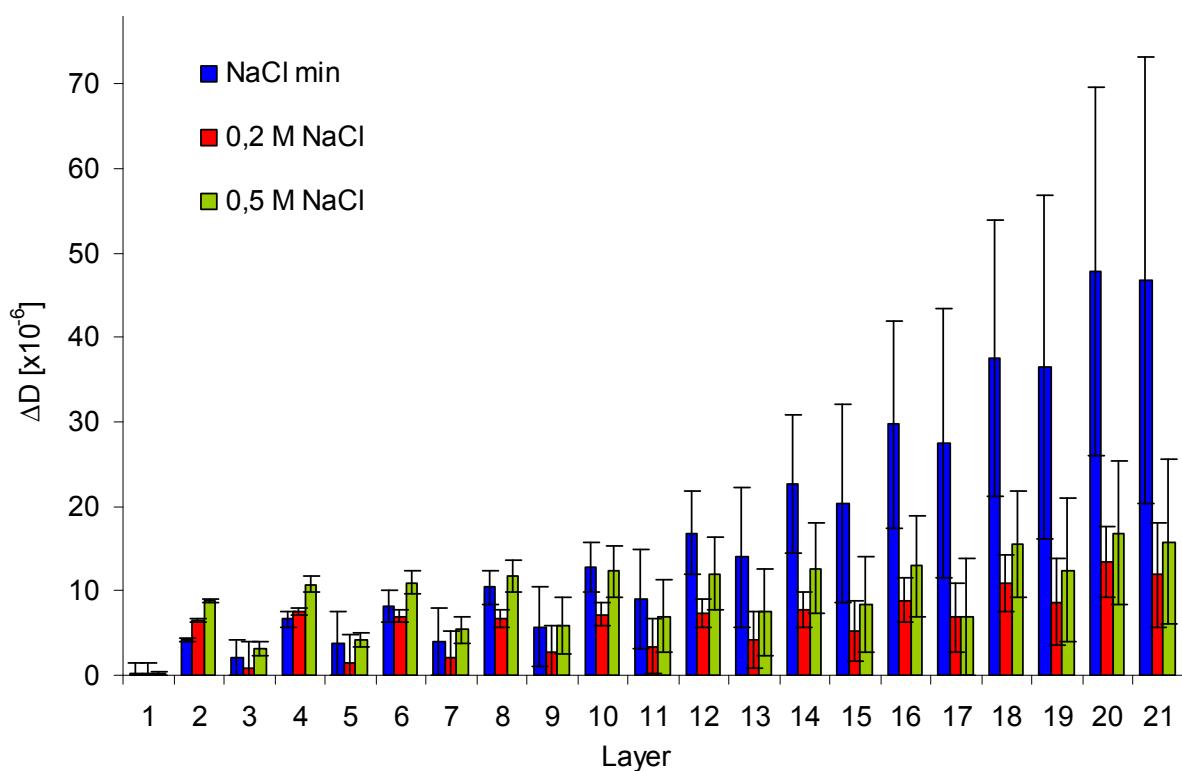


Abbildung 34: Verlauf des Dissipationsfaktors der LbL-Beschichtung (PG75/PLL)₁₀-PG75 bei pH 7,6 mit NaCl min, 0,2 und 0,5 M NaCl; analysiert mit der QCM-D

Nach 21 Polyelektrolytschichten zeigt die Beschichtung bei der geringsten Ionenstärke gegenüber der mit 0,5 M NaCl eine ca. 1,6fach stärkere Frequenzänderung. Bei pH 5,6 ist der Faktor mit ca. 2,6 deutlich größer. Eventuell wird der scheinbar geringere Einfluss der Ionenstärke auf die Beschichtung bei pH 7,6 durch den notwendigen Zusatz von 50 mM NaCl zur PLL-Lösung hervorgerufen. Auch ein Einfluss des Puffers (Phosphat- anstatt Acetatpuffer) mit mehrwertigen Ionen kann eine Ursache dafür sein. Ein weiterer Erklärungsansatz liegt in der Dominanz der elektrostatischen Wechselwirkung (bei pH 7,6 ist PG75 vollständig deprotoniert) im Unterschied zu pH 5,6. Parallel zum Schichtenwachstum vergrößert sich der Dissipationsfaktor am stärksten bei der Beschichtung mit der geringsten Ionenstärke (Abbildung 34). Gleichzeitig nehmen die Abweichungen der Dämpfungen nach jeder Schicht zu ($n=3$). Die Dissipationsfaktoren der Beschichtung mit 0,2 oder 0,5 M NaCl sind dagegen stabil und unterscheiden sich im untersuchten Bereich nicht signifikant.

In Abbildung 35 sind die Verläufe der Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 und 7,6 mit der geringsten Ionenstärke gegenübergestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Assemblierung bei pH 5,6 zu einer stärkeren Frequenzänderung führt. Bis zur 9. Polyelektrolytschicht verlaufen die Beschichtungen sehr ähnlich und es sind kaum Differenzen erkennbar.

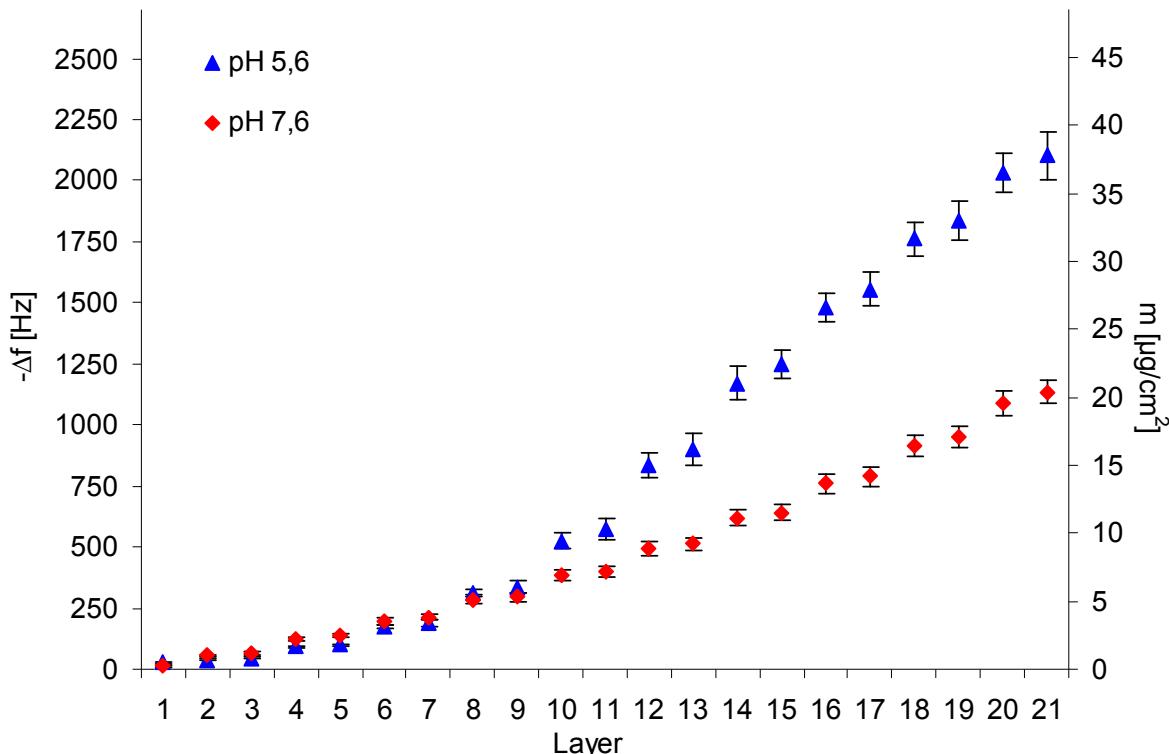


Abbildung 35: Verlauf der LbL-Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ mit geringer Ionenstärke bei pH 5,6 und 7,6; analysiert mit der QCM-D; Aufbau der Multischichten bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl und bei pH 7,6 mit Zusatz von NaCl min zur PLL-Lösung

Erst im weiteren Verlauf bei einer größeren Anzahl an Polyelektrolytschichten wird der Einfluss des pH-Wertes deutlich, wobei die Unterschiede ab der 10. Schicht signifikant sind (Two Way ANOVA mit Einzelvergleichen (Tukey Test), Faktor A: pH, Faktor B: Anzahl an Schichten). Bei beiden pH-Werten erhöht sich der Dissipationsfaktor mit zunehmender Anzahl an Polyelektrolytschichten (Abbildung 36). Auffällig ist, dass unabhängig vom pH-Wert bei beiden Beschichtungen ähnliche Dämpfungswerte bei gleicher Frequenzänderung aber unterschiedlicher Anzahl an Polyelektrolytschichten analysiert werden. Dies lässt vermuten, dass die Dämpfung in Wasser maßgeblich von der Gesamtdicke der Multischichten, aufgebaut bei geringer Ionenstärke, bestimmt wird. Insgesamt bleiben die Anstiege im D/f-Diagramm für bei Beschichtungen konstant, so dass vermutlich keine starke Strukturänderung im Verlauf der Beschichtung erfolgt (Abbildung 36).

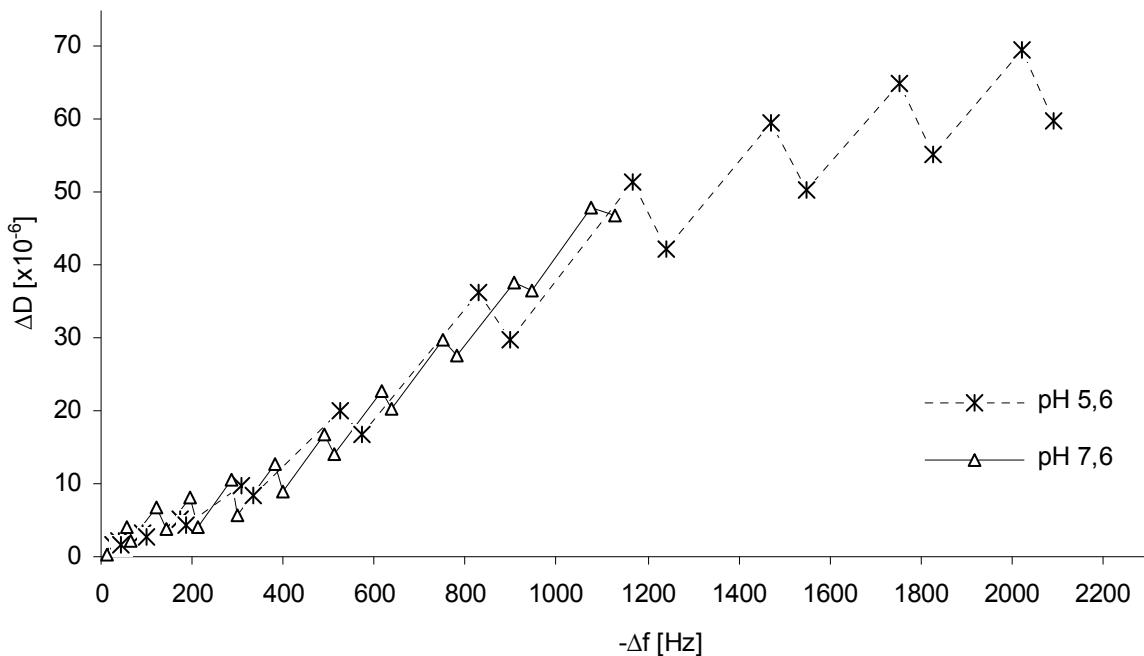


Abbildung 36: Graphische Darstellung des D/f-Verhältnisses der LbL-Beschichtungen ($(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}-\text{PG75}$; assembliert ohne Zusatz von NaCl bei pH 5,6 und 7,6; die Anzahl an Polyelektrolytschichten erhöht sich von links nach rechts

Wie bereits im Abschnitt 3.1.1 gezeigt wurde, beeinflusst der pH-Wert die Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}-\text{PG75}$. So bilden sich in Anwesenheit von 0,2 M NaCl bei pH 5,6 dicke Filme als bei pH 7,6.

An der Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}-\text{PG75}$ bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl wurde exemplarisch der Einfluss des Spülmediums (insbesondere die Ionenstärke) auf das Schichtenwachstum untersucht. Dazu wurden Multischichten aufgebaut und entweder zwischen jeder Polyelektrolytschicht viermal mit destilliertem Wasser oder

mit Acetatpuffer (pH 5,6, 50 mM), welcher 0,2 M NaCl enthielt, gewaschen und das Schichtenwachstum mit der QCM-D analysiert.

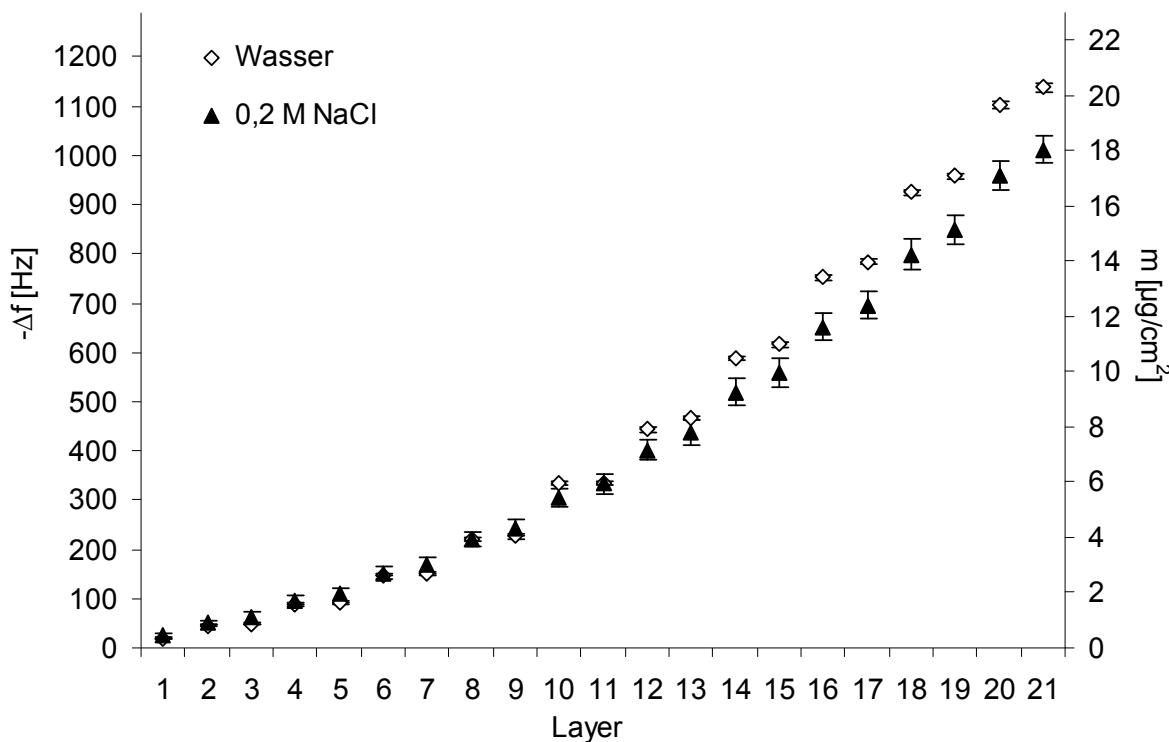


Abbildung 37: Einfluss des Spülmediums auf die LbL-Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}$ -PG75 bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; analysiert mit der QCM-D; Spülmedium Wasser oder 0,05 M Acetatpuffer pH 5,6 mit 0,2 M NaCl

Die Verläufe der Resonanzfrequenzen (Abbildung 37) zeigen einen schwachen Einfluss des Spülmediums auf die Beschichtung mit PG75 und PLL. Nach 21 Polyelektrolytschichten wird eine etwas stärkere Frequenzänderung bei der LbL-Beschichtung mit Wasser als Spülmedium analysiert.

Es scheint, dass das Spülen mit Wasser zu einer stärkere Beschichtung (kleinere Abweichungen zwischen den Messungen) führt, wenn auch die Dämpfungswerte etwas erhöht sind (Abbildung 38). Der mit der QCM-D festzustellende Einfluss des Spülmediums (Ionenstärke) auf die LbL-Beschichtung (Abbildung 38) kann aber auch durch eine Polymerdesorption beim Waschen mit 0,2 M NaCl hervorgerufen werden. Die Dissipationsfaktoren beim Spülen mit 0,2 M NaCl könnten darauf hindeuten, dass die Multischichten bei höheren Ionenstärken in einer etwas kompakteren Struktur vorliegen.

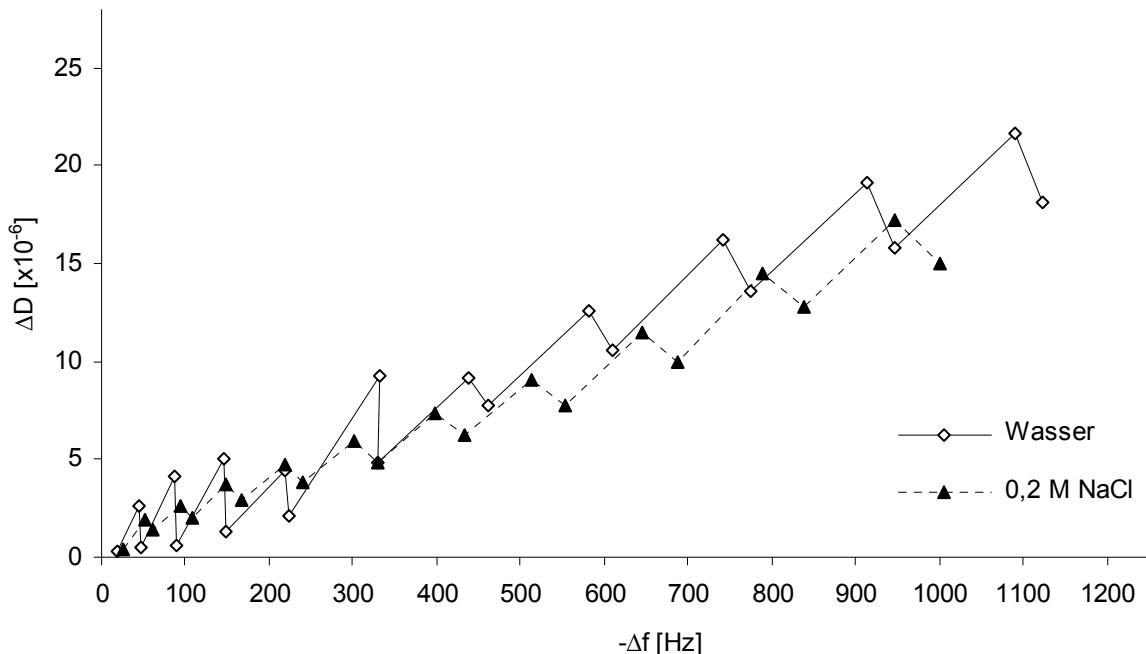


Abbildung 38: Einfluss des Spülmediums auf die LbL-Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; Graphische Darstellung des D/f-Verhältnisses der LbL-Beschichtungen $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$; die Anzahl an Polyelektrolytschichten erhöht sich von links nach rechts

Zusammenfassung:

Der Aufbau von Polyelektrolytmultischichten aus PG75 und PLL wird durch die Ionenstärke in den Beschichtungslösungen und der Spüllösung beeinflusst. Eine Beeinflussung durch die Ionenstärke wurde bei beiden pH-Werten (pH 5,6 und 7,6) gefunden, wobei bei pH 5,6 der Einfluss größer erscheint.

Die Untersuchungsergebnisse an PEM in Wasser (QCM-D und UV-Spektroskopie) zeigen ein stärkeres Schichtenwachstum bei geringer Ionenstärke. Doch mit Hilfe der AFM wurde an getrockneten Multischichten herausgefunden, dass bei der Assemblierung in Anwesenheit von 0,2 NaCl bei pH 5,6 insgesamt dickere Filme entstehen als bei der vergleichbaren Beschichtung ohne Zusatz von NaCl. Die Ursache für das beobachtete Verhalten liegt vermutlich in der erheblich größeren Reichweite der elektrostatischen Wechselwirkung bei geringer Ionenstärke. Neben dem Einfluss auf die Konformation in Lösung hat eine geringe Ionenstärke durch die erhöhte elektrostatische Abstoßung entlang der Polymerkette häufig auch einen Effekt auf die Konformation der Polyelektrolyte in den Multischichten. Auch der Abstand zwischen den Polymermolekülen innerhalb einer Schicht wird dadurch größer und die Polyelektrolyte der terminierenden Schicht ragen stärker in das umgebende Medium hinein. Dadurch folgt bei der QCM-D-Messung ein dickerer

Wasserfilm der Kristallschwingung und bewirkt die großen Frequenzänderungen der salzfreien Beschichtung.

Die Ergebnisse mit PG75 und PLL zeigen, dass ein stabiler und reproduzierbarer Aufbau von Multischichten bei den Beschichtungsbedingungen (pH 5,6, 0,2 M NaCl) stattfindet. Für die Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ sind das die optimalen Bedingungen zum Aufbau von Multischichten und wurden daher auch nachfolgend für den Aufbau von mit Wirkstoff beladenen Multischichten angewendet.

3.1.3 Vergleich zwischen PG30 und PG75

Da bekannt ist, dass auch das Molekulargewicht der Polyelektrolyte den Aufbau und die Struktur von Multischichten beeinflusst, wurde die Beschichtung mit der kürzerkettigen PG30 (Mw 15-50 kDa) anstelle PG75 (Mw 50-100 kDa) zusammen mit PLL (Mw >30 kDa) bei pH 5,6 untersucht [51, 140, 141]. Der Verlauf der Assemblierung zu $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$ in Anwesenheit von 0,2 M NaCl, analysiert mit der QCM-D, ist zusammen mit der Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ in Abbildung 39 (Resonanzfrequenz) und Abbildung 40 (Dissipationsfaktor) dargestellt.

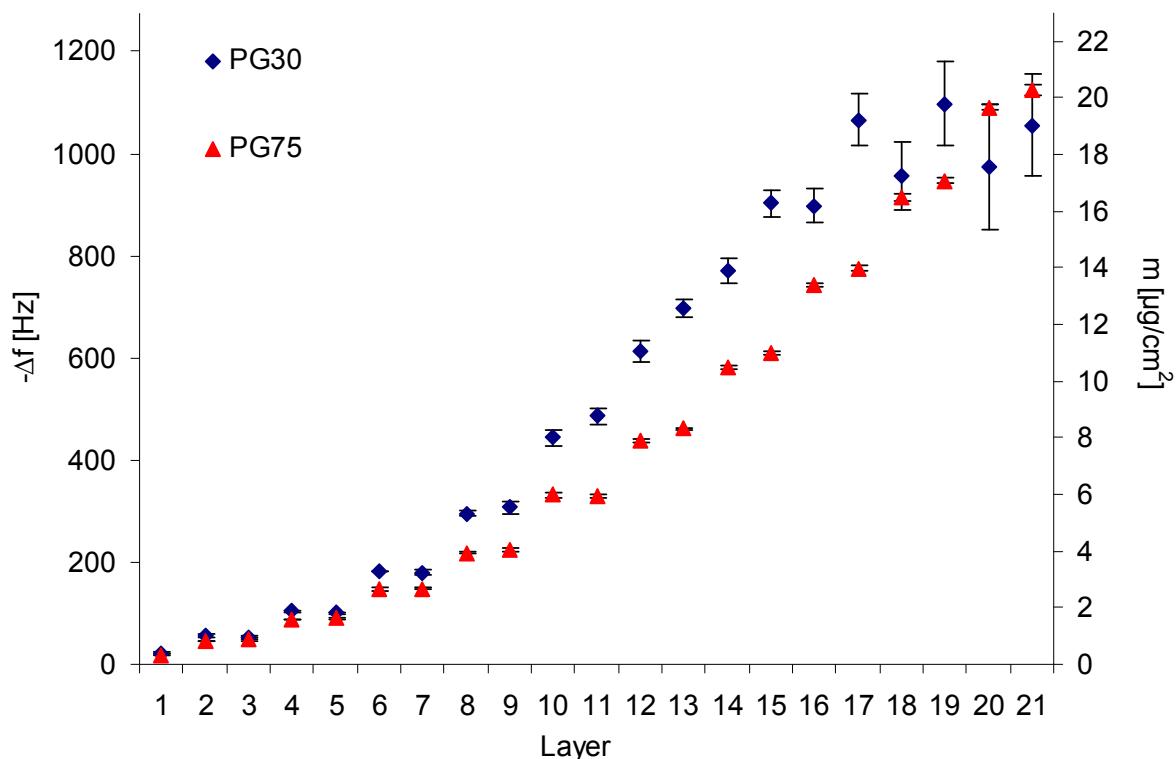


Abbildung 39: Verlauf der LbL-Beschichtungen $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$ und $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; analysiert mit der QCM-D; Berechnung der Massen nach Sauerbrey aus dem 5. Oberton

Das Molekulargewicht der PG hat einen erheblichen Einfluss auf die Frequenzänderung bei der Beschichtung mit PLL (pH 5,6 mit 0,2 M NaCl). Lediglich bei den ersten Polyelektrolytschichten sind keine Abweichungen zwischen PG30 und PG75 messbar. Ab der 8. Schicht sind die Unterschiede der Resonanzfrequenzen (außer bei der 18. Schicht) und Dissipationsfaktoren bei beiden Beschichtungen signifikant (Two Way ANOVA mit Einzelvergleichen (Tukey Test), Faktor A: Polymer, Faktor B: Anzahl an Schichten). Bei den Multischichten mit PG30 vergrößert sich die Dämpfung erheblich und erreicht nach 21 Polyelektrolytschichten einen Wert von $320 \times 10^{-6} \pm 30 \times 10^{-6}$ (Abbildung 40).

Insbesondere von der 11. bis 15. Polyelektrolytschicht werden starke Frequenz- und Dämpfungsänderungen bei der Beschichtung mit PG30 analysiert. Im weiteren Verlauf der Beschichtung wird ab der 16. Polyelektrolytschicht (PLL) keine kontinuierliche Abnahme der Resonanzfrequenz mehr festgestellt (Abbildung 39). Entweder erfolgt kein weiterer Aufbau von Multischichten ab der 16. Schicht oder diese sind mit PG30 zu elastisch, wodurch die gesamte Struktur nicht mehr der Kristallschwingung folgt. Der starke Anstieg des Dissipationsfaktors im Verlauf der Beschichtung deutet darauf hin, dass die Multischichten mit PG30 erheblich viskoelastischer sind und dadurch ab der 16. Schicht keine stabile Frequenzabnahme mehr analysiert werden kann.

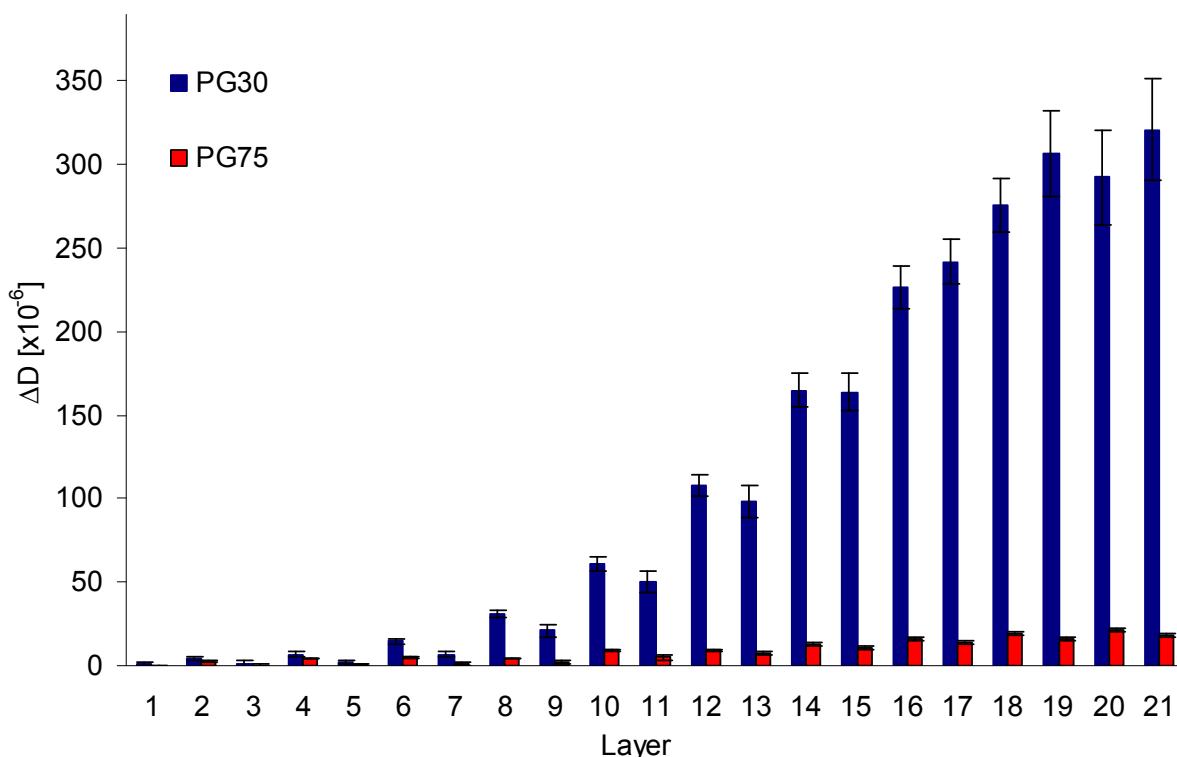


Abbildung 40: Verlauf des Dissipationsfaktors der LbL-Beschichtungen $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$ und $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; analysiert mit der QCM-D

Das D/f-Diagramm veranschaulicht die großen Unterschiede zwischen PG30 und PG75 assembliert bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl (Abbildung 41). Während bei der Beschichtung mit PG75 der Anstieg der Dämpfung bei der Beschichtung konstant erscheint, vergrößert sich dieser bei der kürzerkettigen PG erheblich. Weiterhin zeigt sich bei den Multischichten mit PG30, dass bereits bei geringen Frequenzänderungen von ca. 300 Hz die Dämpfung deutlich erhöht ist. Da beide Beschichtungen bei gleicher Ionenstärke durchgeführt wurden ist es sehr wahrscheinlich, dass der beobachtete Einfluss ausschließlich vom Molekulargewicht

der PG hervorgerufen wird. Neben strukturellen Unterschieden in den PEM kann insbesondere die Interpenetration der PG30 während der Beschichtung das beobachtete Verhalten erklären. Um zu klären, ob durch das Molekulargewicht der PG die adsorbierte Gesamtpolymermasse beeinflusst wird, wurde die Filmdicke von trockenen Multischichten mit der AFM bestimmt (Abbildung 42).

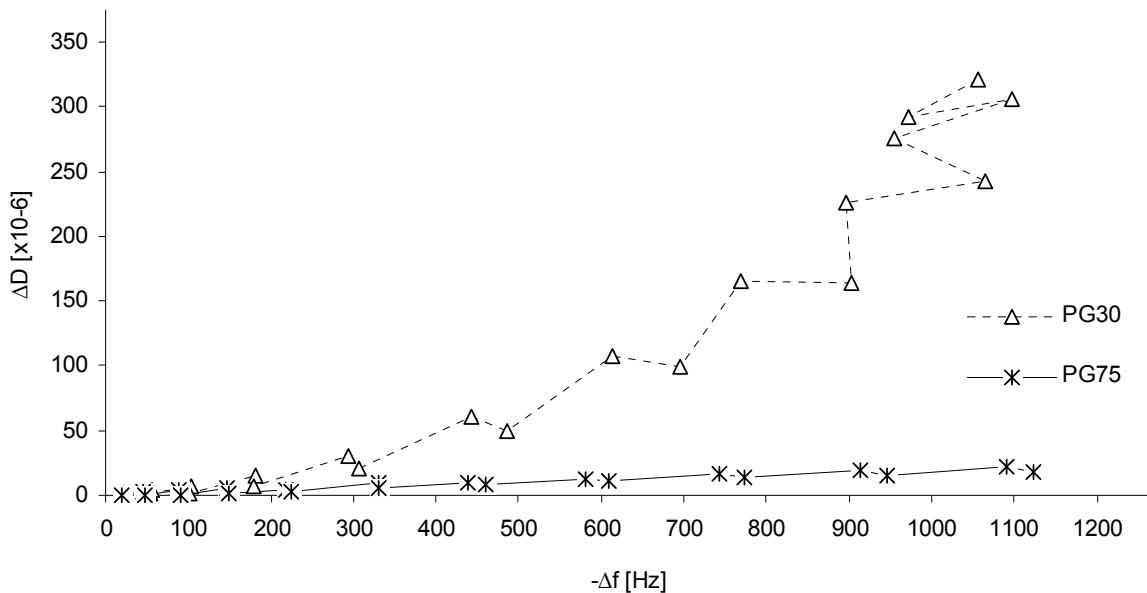


Abbildung 41: Graphische Darstellung des D/f-Verhältnisses der LbL-Beschichtungen $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$ und $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$; assembliert bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; die Anzahl an Polyelektrolytschichten erhöht sich von links nach rechts

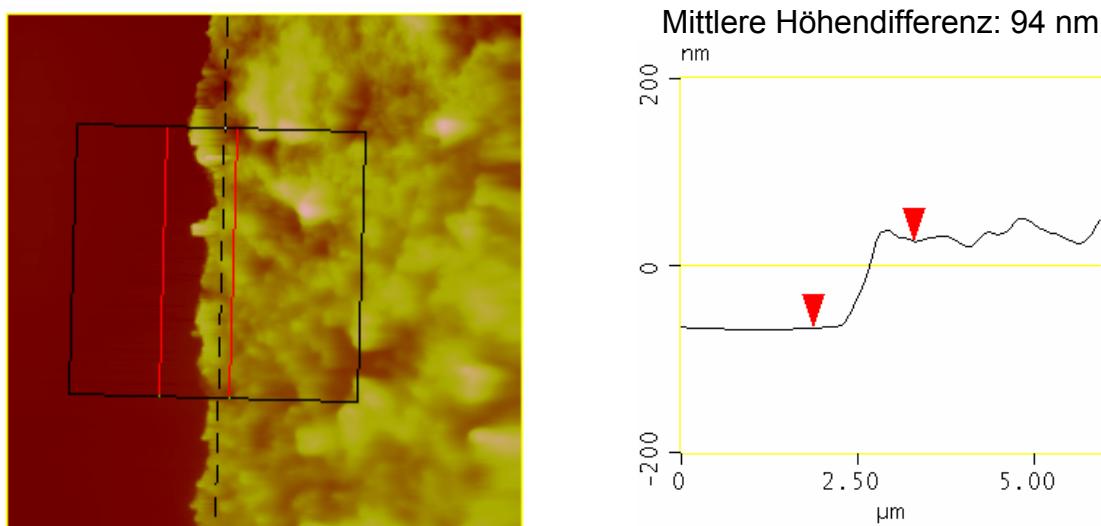


Abbildung 42: Bestimmung der Filmdicke mit der AFM an trockenen Multischichten aus $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$; assembliert bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

An der Beschichtung $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$ wurde eine Filmdicke von $94 \pm 3 \text{ nm}$ (trocken) mit der AFM gemessen (Abbildung 42, pH 5,6 mit 0,2 M NaCl). Die Dicke der Multischichten mit PG75 ($92 \pm 2 \text{ nm}$, Abbildung 25) liegt in der gleichen Größenordnung, so dass keine signifikanten Unterschiede festzustellen sind. Allerdings erscheint die Oberfläche der Beschichtung mit PG30 im mikroskopischen Bild inhomogener. Das unterstützt die These einer stärkeren Interpenetration beim Aufbau der Multischichten mit der kürzerkettige PG30. Eine erhöhte Interpenetration führt dazu, dass aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung von der vorherigen Polyelektrolytschicht penetrierte Polymere bei der Beschichtung mit dem entgegengesetzt geladenem Polymer teilweise wieder heraus diffundieren und Polyelektrolytkomplexe ausbilden. Dadurch verändert sich die Zusammensetzung innerhalb der PEM während der Beschichtung. Ein erhöhter Anteil an freien Ladungsgruppen in den Multischichten begünstigt die Immobilisierung von Wasser und kann die große Frequenzänderung bei der Beschichtung mit PG30/PLL begründen. Die AFM-Ergebnisse stimmen somit gut mit dem Verlauf der QCM-D-Messungen überein. Unabhängig vom Molekulargewicht der PG werden trotz der großen Frequenz- und Dämpfungsänderung ähnliche Filmdicken im Trockenen analysiert. Das deutet darauf hin, dass die Unterschiede zwischen PG30 und PG75 im Wesentlichen auf Strukturunterschiede zurückzuführen sind.

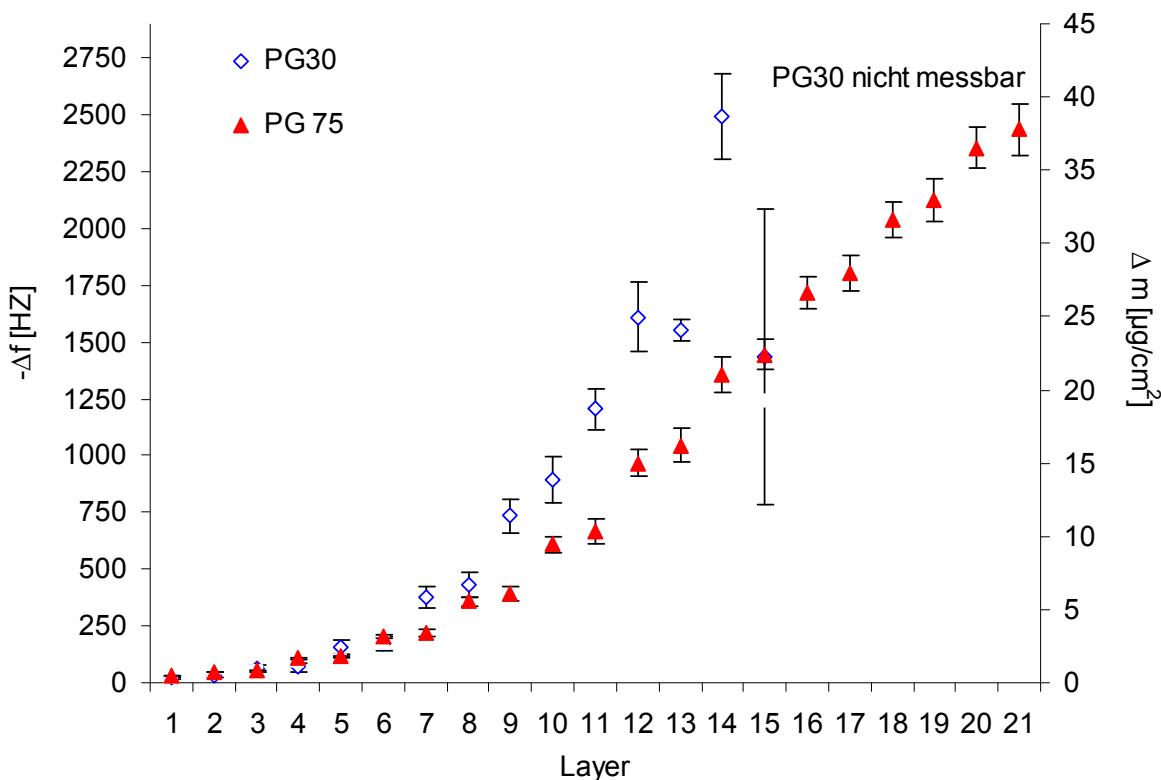


Abbildung 43: Schichtenwachstum der LbL-Beschichtungen $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$ und $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; analysiert mit der QCM-D; Berechnung der Massen nach Sauerbrey aus dem 5. Oberton

Im Folgenden wurde die Beschichtung mit PG30 ohne Zusatz von NaCl bei pH 5,6 untersucht (Abbildung 43). Bereits ab der 6. Schicht liegt die Resonanzfrequenzänderung der Beschichtung mit PG30 signifikant oberhalb der mit PG75 (Two Way ANOVA mit Einzelvergleichen (Tukey Test), Faktor A: Polymer, Faktor B: Anzahl an Schichten). Bis zu 12. Polyelektrolytschicht wird eine sehr starke Frequenzänderung gemessen. Im weiteren Verlauf der Assemblierung ist erneut keine kontinuierliche Abnahme der Resonanzfrequenz mehr bei der kürzerkettigen PG zu beobachten (Abbildung 43). Entweder sind die Multischichten zu elastisch und folgen nicht komplett der Resonanzschwingung oder sind zu instabil bzw. verlieren teilweise den Kontakt zum Schwingquarz. Bis zur 14. Schicht nimmt der Dissipationsfaktor bei der Beschichtung mit PG30 extrem stark zu und erreicht nach nur 12 Schichten einen Wert von $> 500 \times 10^{-6}$ (Abbildung 44). Der Aufbau von Multischichten mit PG30 und PLL bei pH 5,6, ohne Zusatz von NaCl, kann mit der QCM-D nur bis zur 14. Schicht verfolgt werden.

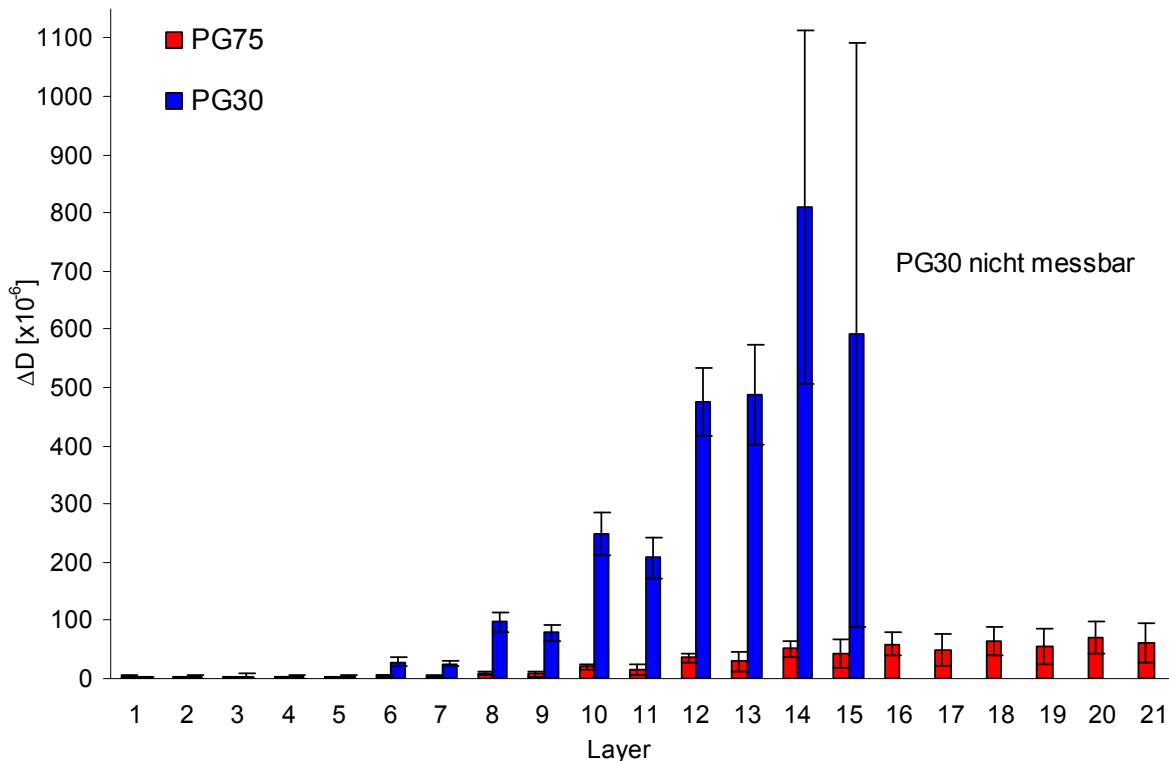


Abbildung 44: Verlauf des Dissipationsfaktors der LbL-Beschichtungen $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$ und $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; analysiert mit der QCM-D

Die Beschichtung $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$ bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl wurde weiterhin mit der UV-Spektroskopie bei 220 nm untersucht. Das Ergebnis der Untersuchung ist zusammen mit der Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ in Abbildung 45 dargestellt. Hier kann der Verlauf der Beschichtung bis zur 21. Schicht analysiert

werden und es wird ein kontinuierlicher, nicht-linearer Aufbau gefunden. Der Einfluss des Molekulargewichtes der PG auf das Schichtenwachstum ist erst ab der 17. Schicht mit der UV-Spektroskopie sichtbar. Mit der QCM-D kann erheblich früher der Einfluss des Mw auf die Beschichtung festgestellt werden. Im Folgenden wurde die Filmdicke von trockenen Multischichten mit der AFM untersucht.

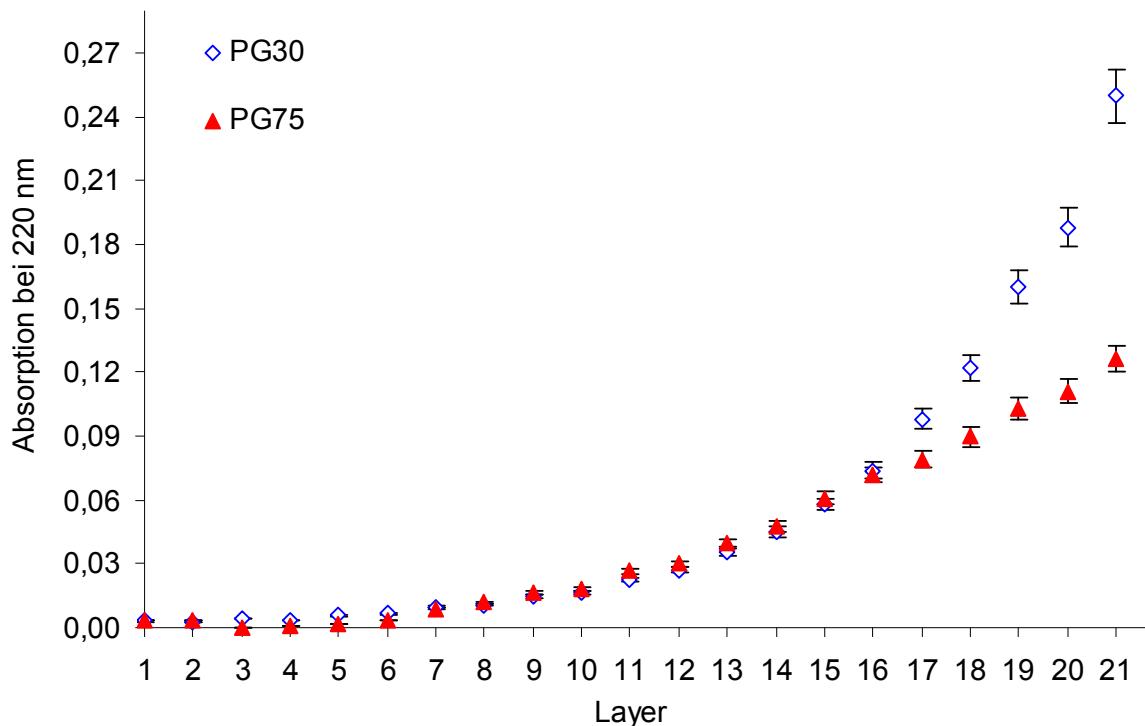


Abbildung 45: Verlauf der UV-Absorption der LbL-Beschichtung $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$ und $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; analysiert bei 220 nm

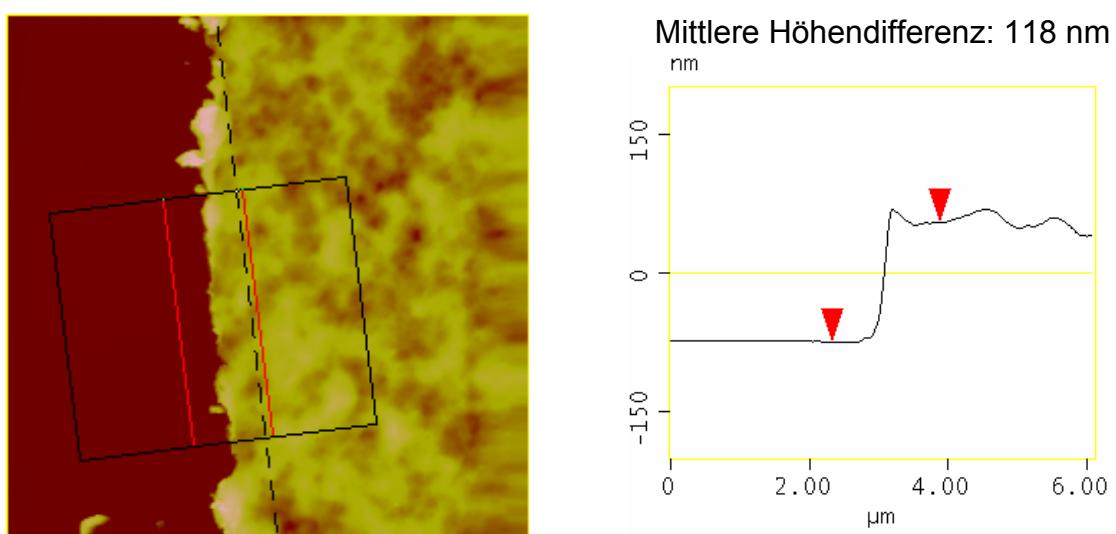


Abbildung 46: Bestimmung der Filmdicke mit der AFM an trockenen Multischichten aus $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$; assembliert bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

An der getrockneten Beschichtung $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$, assembliert bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl, wurde eine Filmdicke von $118 \pm 3 \text{ nm}$ bestimmt (Abbildung 46). Die unter vergleichbaren Bedingungen aufgebauten Multischichten mit PG75 haben lediglich eine Filmdicke von $60 \pm 5 \text{ nm}$ (Abbildung 47). Wie bereits mit der QCM-D und UV-Spektroskopie festgestellt hat das Molekulargewicht der PG einen starken Einfluss auf die Beschichtung mit PLL.

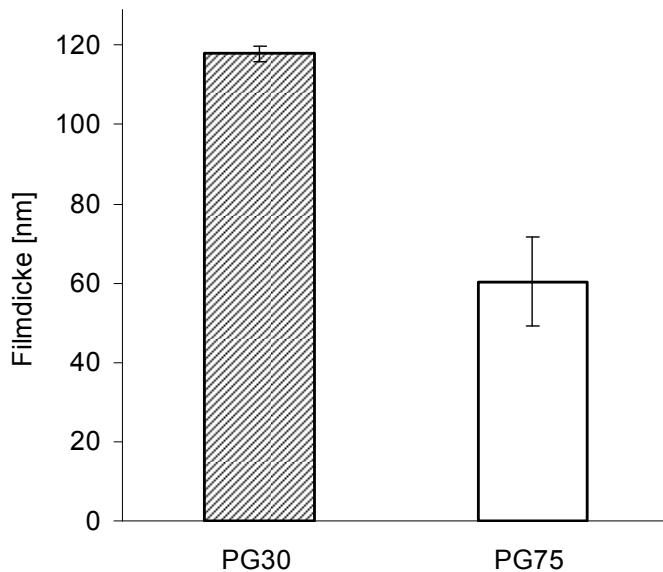


Abbildung 47: Vergleich der Filmdicken der Beschichtungen $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$ und $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$; assembliert bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; analysiert mit der AFM an trockenen Multischichten

Zusammenfassung

Die Untersuchungen zum Einfluss des Molekulargewichtes der PG auf die Beschichtung mit PLL bei pH 5,6 zeigen deutlich eine Beeinflussung des Schichtenwachstums durch das Molekulargewicht. Dabei spielt die Ionenstärke eine zentrale Rolle. In Anwesenheit von 0,2 M NaCl ist anhand der Filmdicke getrockneter Multischichten kein Einfluss des Molekulargewichtes festzustellen. Im Unterschied dazu wird eine erhebliche Beeinflussung an den Beschichtungen ohne Zusatz von NaCl bei pH 5,6 beobachtet. Hier bildet sich mit PG30/PLL eine deutlich dickere Beschichtung, wohingegen bei PG75 für einen starken Aufbau von Multischichten ein Zusatz an NaCl notwendig ist. Die Ionenstärke beeinflusst somit die Assemblierung von PG in Abhängigkeit des Molekulargewichtes. Das unterstützt die Vermutung, dass bei pH 5,6 am Aufbau der Multischichten aus PG und PLL nicht nur ionische Wechselwirkungen beteiligt sind, sondern auch weitere Phänomene oder intermolekulare Bindungskräfte die Assemblierung beeinflussen. Bei geringer Ionenstärke liegen Polyelektrylyte aufgrund der elektrostatischen Abstoßung entlang der Polymerkette im Allgemeinen in gestreckter Konformation vor. Auch der Abstand

zwischen Polymermolekülen innerhalb einer Polyelektrolytschicht wird beim Aufbau von Multischichten im salzfreien dadurch größer. Die Ergebnisse mit PG75 bestätigen die These, da eine Abnahme der Filmdicke an getrockneten Beschichtungen, assembled ohne Zusatz von NaCl, gefunden wurde. Beim Aufbau von Multischichten mit der kürzerkettigen PG30 wurde ein abweichendes Verhalten festgestellt. Hier wurde eine starke Zunahme der Schichtdicke an trockenen Multischichten beobachtet. Als Ursache für die Zunahme der Schichtdicke kommt vor allem eine verstärkte Interpenetration der PG30 in Betracht. Auch die QCM-D-Ergebnisse mit PG30 zeigen anhand der starken Zunahme des Dissipationsfaktors, dass sich die Struktur der Multischichten zwischen PG30/PLL und PG75/PLL unterschieden. Die starke Zunahme der Dämpfung beim Beschichten mit PG30 deutet darauf hin, dass die Viskoelastizität im Vergleich zu Multischichten mit PG75 erhöht ist. So konnte die Resonanzfrequenz von PEM, assembled bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl, nur bis zur 14. Schicht analysiert werden. Vermutlich bewegen sich die Multischichten nicht mehr in Phase mit der Kristallschwingung. Die Ursache kann in der Filmdicke oder Elastizität der aufgebauten Strukturen liegen. Aufgrund der großen Filmdicke nach 21 Schichten wurden diese Bedingungen (PG30, pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl) auch zur Herstellung von wirkstoffbeladenen Multischichten untersucht.

3.1.4 Zusammenfassung und Einordnung der Vorversuche

In Vorbereitung auf die Herstellung von wirkstoffhaltigen Beschichtungen für Drug-Eluting Stents wurde der Aufbau von Multischichten aus PG und PLL untersucht. Die Versuche hatten zum Ziel, geeignete Bedingungen für eine stabile und reproduzierbare LbL-Beschichtung im leicht sauren pH-Bereich zu finden. Dabei wurde die Bildung von Polyelektrolytmultischichten mit PG30 und PG75 bei den pH-Werten 5,6, 6,1 und 7,6 mit 0,5 M, 0,2 M und ohne Zusatz von NaCl untersucht.

Die Resultate zeigen, dass der Aufbau und die Struktur von PEM aus PG/PLL vom pH-Wert, der Ionenstärke und dem Molekulargewicht der PG abhängig sind. Alle drei Parameter beeinflussen die LbL-Beschichtung. Es wurde herausgefunden, dass ein stabiler und reproduzierbarer Aufbau von Multischichten aus PG75 und PLL bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl möglich ist.

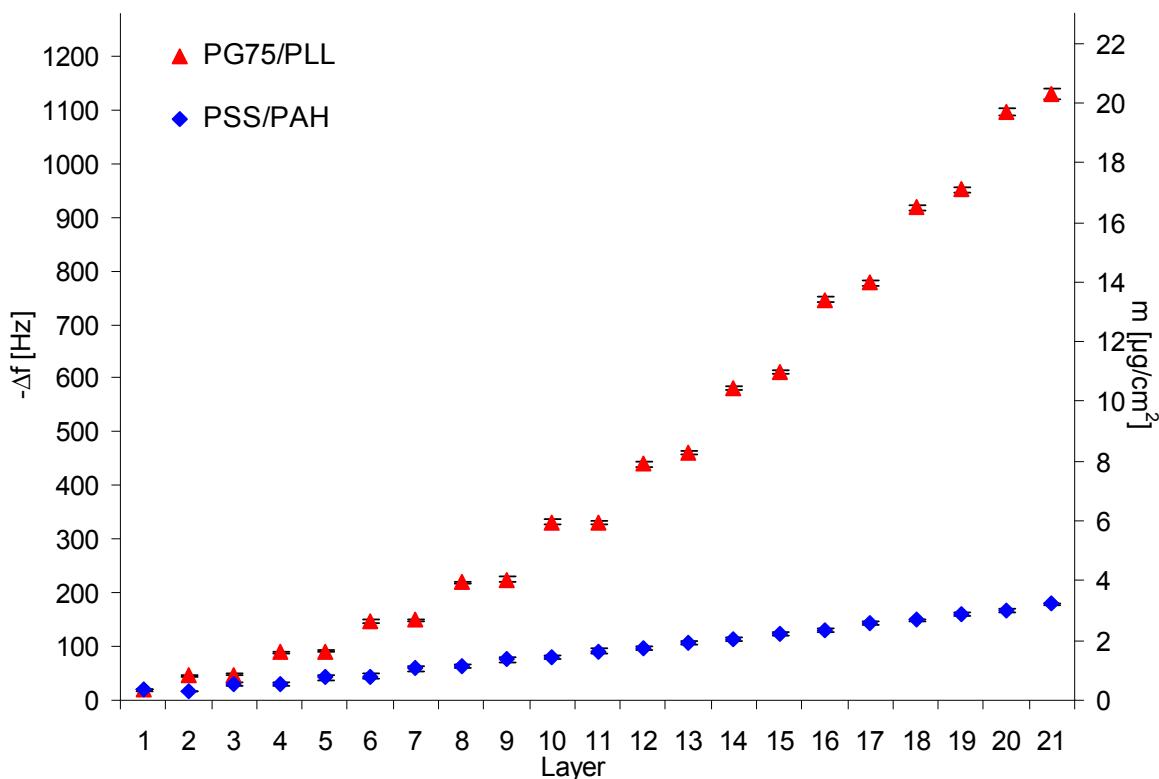


Abbildung 48: Verlauf der LbL-Beschichtungen $(\text{PG75/PLL})_{10}\text{-PG75}$ und $(\text{PSS/PAH})_{10}\text{-PSS}$ bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; analysiert mit der QCM-D; Berechnung der Massen nach Sauerbrey aus dem 5. Oberton

Der direkte Vergleich der LbL-Beschichtung $(\text{PG75/PLL})_{10}\text{-PG75}$ mit der etablierten Polyelektrolytkombination aus PAH und PSS, beide assembliert bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl, zeigt ein deutlich stärkeres und nicht-lineares Schichtenwachstum von PG75/PLL (Abbildung 48). Die Unterschiede der Resonanzfrequenzen sind dabei

schon ab der ersten Polyelektrolytschicht signifikant (Two Way ANOVA mit Einzelvergleichen (Tukey Test), Faktor A: Polymer, Faktor B: Anzahl an Schichten). Der Dissipationsfaktor erhöht sich leicht im Verlauf der Beschichtung ($(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}$ - PG75 bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl (Abbildung 49). Bei der Assemblierung von PAH und PSS ist der Dissipationsfaktor stabil und steigt innerhalb von 21 Polyelektrolytschichten kaum an, wobei der Unterschied des Dissipationsfaktors zu PG75 / PLL erst ab der 12. Schicht signifikant ist. Die zwei Polyelektrolytkombinationen unterscheiden sich im Verlauf der Beschichtung anhand des Dissipationsfaktors und der Resonanzfrequenz merklich. Für beide Polyelektrolytkombinationen gilt, dass der Dämpfungswert bei kationisch terminierten Multischichten größer als bei den darauf folgenden anionisch terminierten Polyelektrolytschichten ist. Bei allen untersuchten Beschichtungsbedingungen erhöht sich der Dissipationsfaktor mit steigender Anzahl an Polyelektrolytschichten aus PG (PG30 und PG75) und PLL. Die erhöhten Dämpfungen PLL terminierter Multischichten im Vergleich zu PG terminierten kann durch strukturelle Unterschiede hervorgerufen werden. Möglicherweise ändern sich die mechanischen Eigenschaften der Multischichten in Abhängigkeit der letzten Polyelektrolytschicht oder PLL adsorbiert mit einem erhöhten Anteil an Schlaufen sowie freie in das umgebende Medium hineinragende Kettenenden.

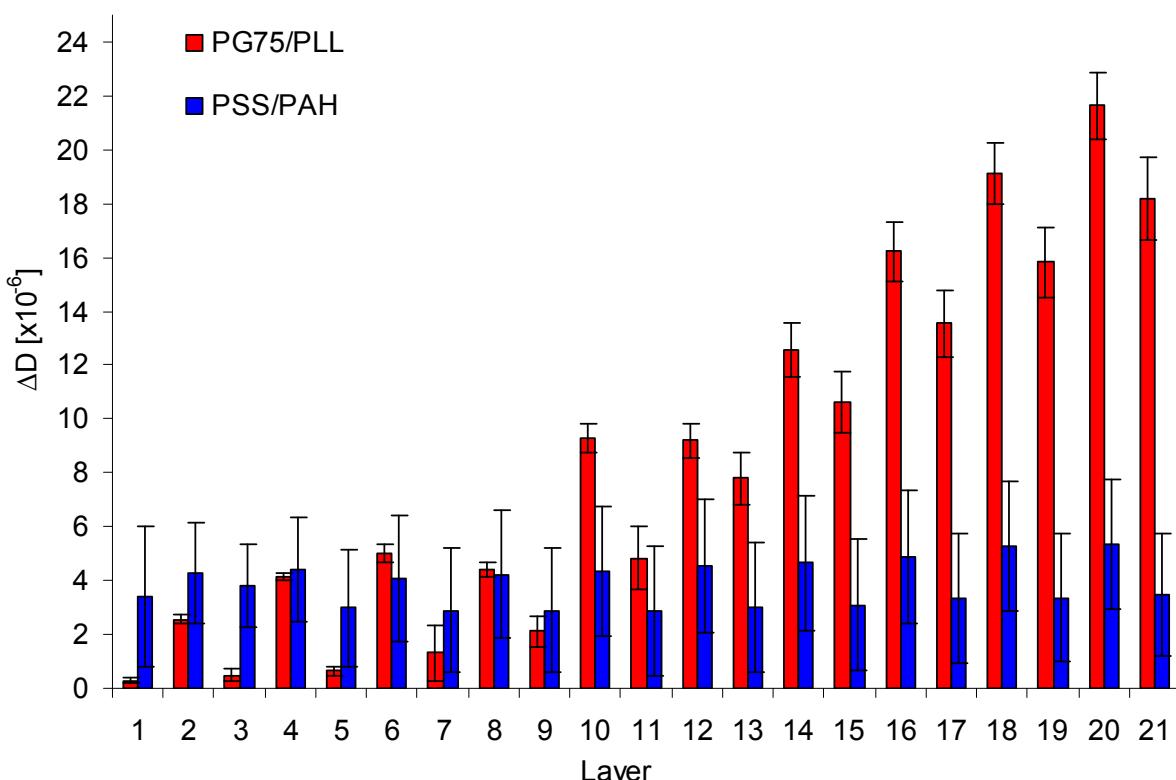


Abbildung 49: Verlauf des Dissipationsfaktors der LbL-Beschichtungen $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}$ - PG75 und $(\text{PSS}/\text{PAH})_{10}$ - PSS bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; analysiert mit der QCM-D

Die Ergebnisse der durchgeföhrten Untersuchungen zum Einfluss des pH-Wertes auf die Assemblierung von wirkstofffreien Multischichten aus PG und PLL zeigen, dass bei pH 5,6 im Vergleich zu pH 7,6 und 6,1 eine stärkere Beschichtung stattfindet. Es wird vermutet, dass die Zunahme der Filmdicke durch eine Konformationsänderung der PG in den Multischichten hervorgerufen wird.

Das Schichtenwachstum bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl von der Beschichtung (PG75/PLL)₁₀-PG75 wurde mit der QCM-D, der UV-Spektroskopie und ab der 9. Polyelektrolytschicht mit der AFM untersucht (Abbildung 50). Auch die AFM belegt, dass die Zunahme der Dicke nicht-linear stattfindet. Sogar nach 17 Polyelektrolytschichten vergrößert sich noch die Zunahme der Filmdicke pro Schicht. Die geringe Variabilität zwischen den einzelnen Messungen einer Schicht belegt die Genauigkeit der Methode und zeigt, dass bei pH 5,6 in Anwesenheit von 0,2 M NaCl eine kontinuierliche und reproduzierbare Beschichtung mit PG75 und PLL erfolgt. Vor der AFM-Analyse wurden die Beschichtungen im Vakuum getrocknet, um den Einfluss der Restfeuchte auf die Schichtdicke so gering wie möglich zu halten. Möglicherweise wird die Filmdicke aber auch durch die interne Struktur der Multischichten in Abhängigkeit der äußersten Schicht beeinflusst.

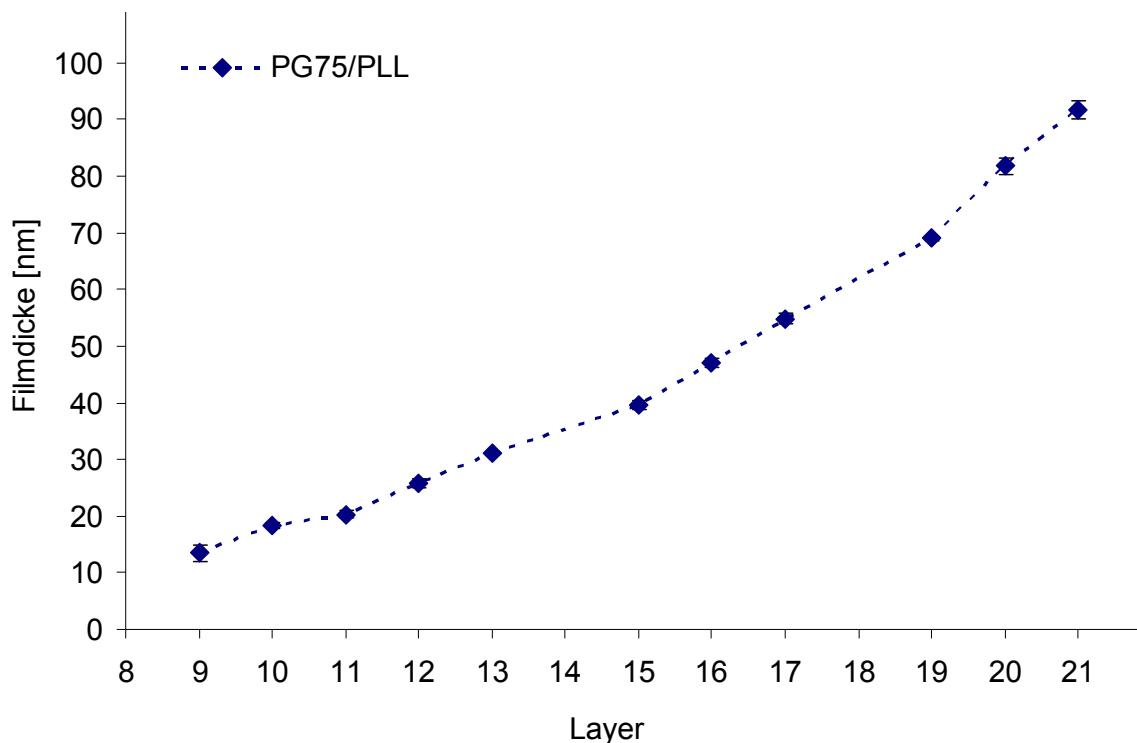


Abbildung 50: Verlauf der Filmdicke der Beschichtung (PG75/PLL)₁₀-PG75; analysiert mit der AFM an trockenen Multischichten

Auch das Molekulargewicht der PG beeinflusst die Bildung von Multischichten mit PLL (Tabelle 3). Nach 21 Schichten wurden die höchste Filmdicke an der

Beschichtung $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$ bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl analysiert. Überraschenderweise verringert sich durch einen Zusatz von 0,2 M NaCl bei der Beschichtung mit PG30 nach 21 Schichten die Filmdicke um ca. 24 nm. Komplett gegensätzlich verhält sich die LbL-Beschichtung mit PG75. Bei der salzfreien Beschichtung mit PG75 bilden sich dünnere Filmdicken als bei der Assemblierung mit 0,2 M NaCl aus. Somit ist für eine kontinuierliche LbL-Beschichtung mit PG75 und PLL bei pH 5,6 ein Zusatz von Salz notwendig.

Tabelle 3: Filmdicke von Polyelektrolytmultischichten mit 21 Schichten aus $(\text{PG}/\text{PLL})_{10}\text{-PG}$; analysiert an trockenen Filmen mit der AFM ($n=3$)

Molekulargewicht der Poly(L-glutaminsäure) [kDa]	pH-Wert	NaCl [M]	Filmdicke [nm]
15-50	5,6	0,0	118 ± 3
50-100	5,6	0,0	60 ± 6
15-50	5,6	0,2	94 ± 1
50-100	5,6	0,2	92 ± 2
50-100	7,6	0,2	85 ± 3

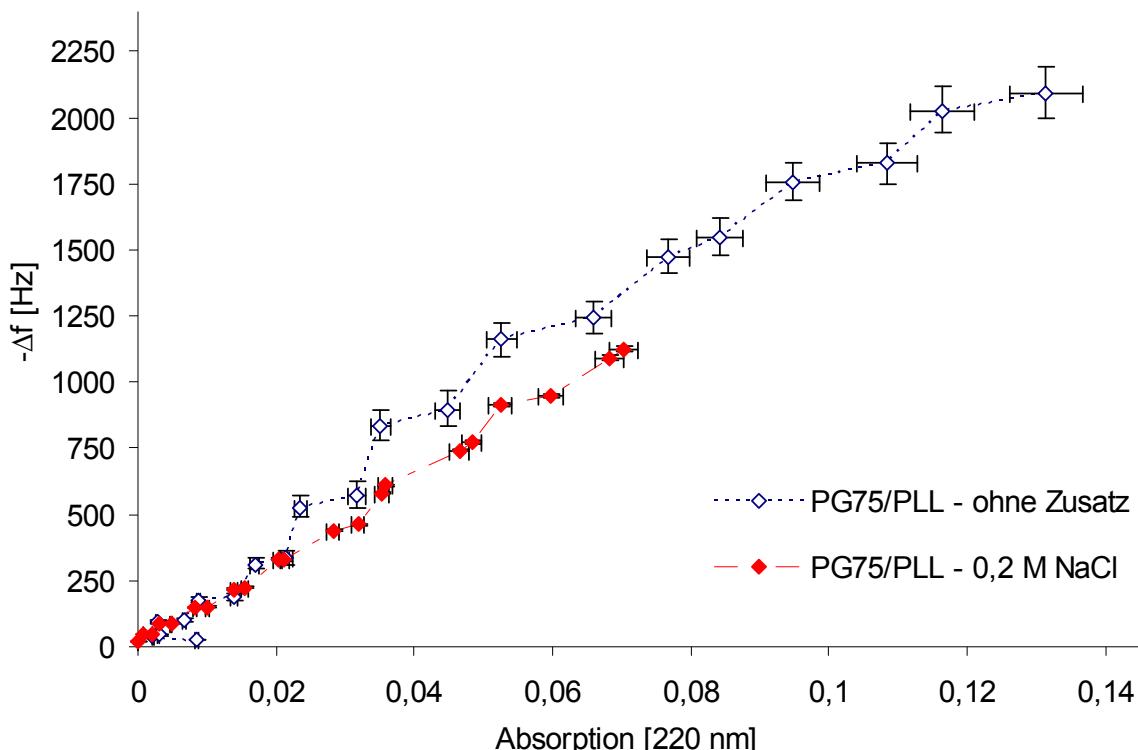


Abbildung 51: Vergleich der QCM-D und UV-Spektroskopie von den LbL-Beschichtungen $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl und mit 0,2 M NaCl

In Abbildung 51 wurden die Messergebnisse der QCM-D und UV-Spektroskopie an der Beschichtung $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}$ -PG75 bei pH 5,6 ohne Zusatz und mit 0,2 M NaCl zusammen in einem Diagramm dargestellt. Insbesondere bei der Beschichtung in Anwesenheit von 0,2 M NaCl (pH 5,6) korrelieren die beiden Messmethoden, da ein linearer Zusammenhang zwischen der Absorption bei 220 nm und der Resonanzfrequenz bis zur 21. Polyelektrolytschicht besteht. An den ohne Zusatz von NaCl aufgebauten Multischichten wird eine Veränderung des Anstieges im Verlauf der Beschichtung festgestellt was auf eine Beeinflussung des Messergebnisses durch die Analysenmethode hindeutet. Möglicherweise führt das bei der Beschichtung ohne Zusatz von NaCl in den Multischichten eingeschlossenes Wasser zu der erhöhten Resonanzfrequenzänderung. Die bei hoher Anzahl an Polyelektrolytschichten festgestellte Abnahme des Anstieges wird höchstwahrscheinlich dadurch hervorgerufen, dass nicht mehr die gesamte Struktur zusammen mit dem Kristall schwingt.

Polyelektrolytmultischichten aus PG und PLL wurden auch mit der CLSM charakterisiert. Dafür wurden die Multischichten direkt auf Glasobjektträgern bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl aufgebracht. Zur Visualisierung der ersten Schicht wurde mit Aminofluorescein markierte PG (PG-AF) verwendet.

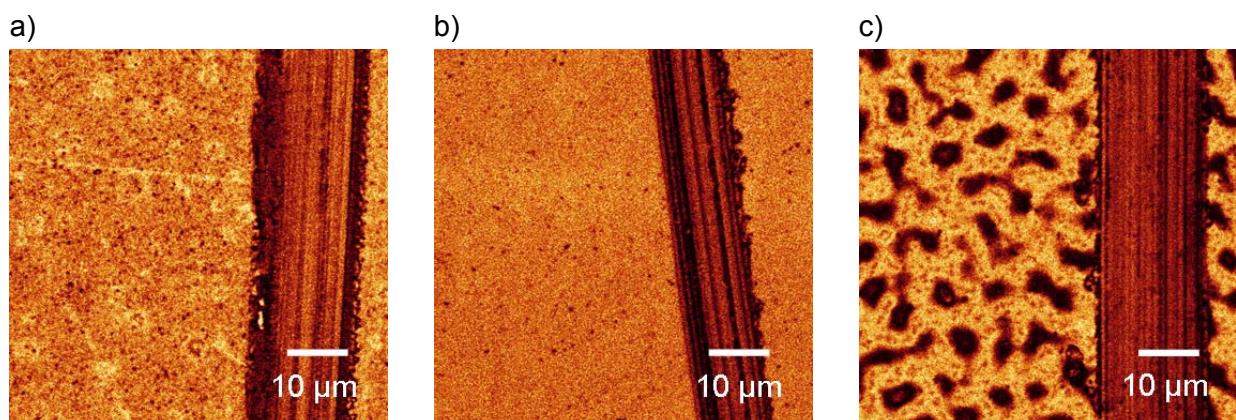


Abbildung 52: Untersuchung der Porosität von PEM mit der CLSM, LbL-Beschichtung bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl, Filme wurden mit Glas angeritzt; a) PG-AF-(PLL/PG30)₁₀; b) PG-AF-(PLL/PG75)₁₀; c) PG-AF-(PDA/PG30)₁₀

Nach 21 Polyelektrolytschichten aus PG und PLL ist die Fluoreszenz der ersten PG-AF Schicht noch deutlich zu erkennen. Die Multischichten aus PG30 und PG75 mit PLL zeigen wie auch bei den AFM-Untersuchungen eine homogene Beschichtung. Im Gegensatz dazu haben Multischichten mit dem starken kationischen Polyelektrolyten Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDA) eine abweichende Struktur. Diese LbL-Beschichtung hat eine mikroporöse Struktur, wohingegen sich die Multischichten mit PLL mikroskopisch als nanoporös darstellen.

Es können bei pH 5,6 Polyelektrolytmultischichten mit PG und PLL aufgebaut werden. Der Aufbau von PTx-haltigen Multischichten ist bei pH 5,6 aufgrund des stärkeren Schichtenwachstums und der Stabilität der Wirkstoffbindung gegenüber einer Assemblierung bei pH 7,6 begünstigt. Für Multischichten aus PG30 ist kein Zusatz von NaCl in Bezug auf ein starkes Schichtenwachstum notwendig. Dagegen findet bei PG75 ein kontinuierlicher Aufbau von PEM nur mit NaCl statt. Im Folgenden wurden die Synthese von PG-PTx und die nachfolgende Assemblierung zu Multischichten untersucht.

3.2 Synthese von Konjugaten aus PG und PTx (PG-PTx)

Zum Aufbau von Wirkstoff beladenen ultradünnen Beschichtungen wurden im Rahmen dieser Arbeit PG-PTx Konjugate synthetisiert. Ausgangspunkt war die Entwicklung einer Beschichtung für DES, die den Wirkstoff Paclitaxel (PTx) vollständig abgibt. Hierfür wurden Konjugate mit PG als bioabbaubarem, synthetischen Polymer verknüpft. Dabei wird Paclitaxel kovalent unter Bildung einer Esterbindung an PG gebunden. Die Kopplung wurde sowohl mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als auch mit Carbonyldiimidazol (CDI) durchgeführt. Da Paclitaxel zwei reaktive OH-Gruppen besitzt, die mit aktivierten Carbonsäuren reagieren können, sind in Abbildung 53 die möglichen Strukturen dargestellt. Eine Ankopplung von Paclitaxel kann dabei über die OH-Gruppe der Seitenkette (Position 2') oder über die des Taxan-Grundgerüstes erfolgen (Position 7). Für die notwendigen Ladungen zum PEM-Aufbau und die Wasserlöslichkeit von PG-PTx sind ausreichend freie COOH-Gruppen notwendig, weshalb die Konjugation mit beschränkten Mengen von PTx erfolgen muss.

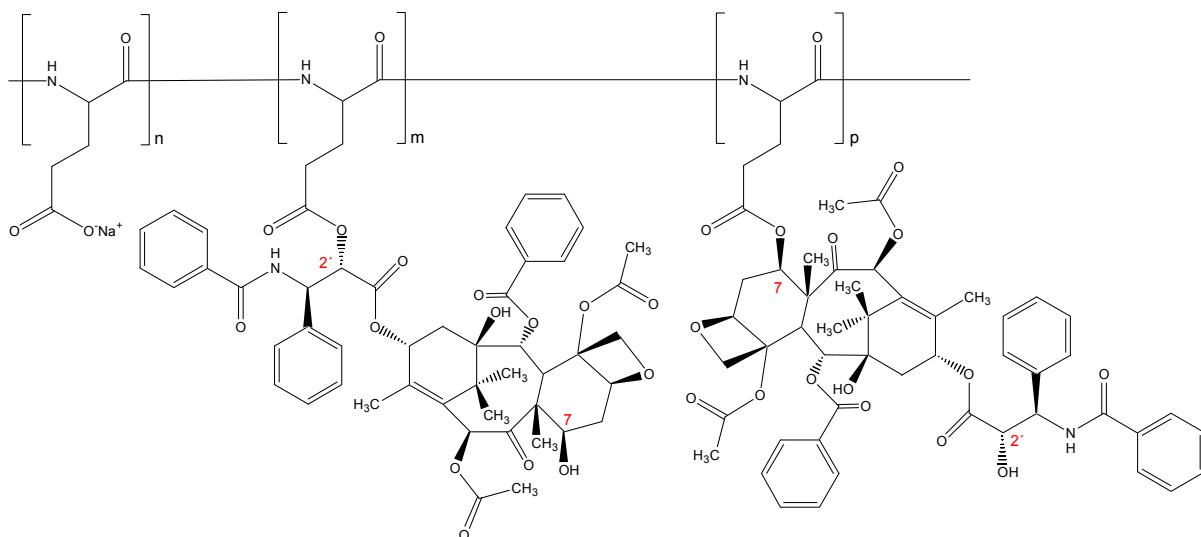


Abbildung 53: Übersicht der möglichen Strukturen von PG-PTx nach Ankopplung von Paclitaxel (PTx) an Poly(L-glutaminsäure) (PG)

3.2.1 Aktivierung mit Dicyclohexylcarbodiimid

Die erste bereits publizierte Methode zur Herstellung von PG-PTx aus PG und PTx nutzt DCC zusammen mit Dimethylaminopyridin (DMAP) als Katalysatoren und wurde entsprechend auch im Rahmen dieser Arbeit angewendet [288]. Anschließend wurden die Produkte nach der Reinigung charakterisiert. Für die Anwendung der PG-

PTx Konjugate zum Aufbau von PTx-haltigen LbL-Filmen sind dabei vor allem die Wirkstoffbeladung und Löslichkeit entscheidend.

Die Synthesen wurden mit Hilfe der UV-Spektroskopie analysiert. In Abbildung 54 sind die UV-Spektren von PG75 sowie PG75-PTx in Phosphatpuffer pH 6,5 zusammen mit PTx, gelöst in Methanol dargestellt. Aufgrund der geringen Löslichkeit von PTx in Wasser wurde als Vergleich das UV-Spektrum in Methanol aufgetragen.

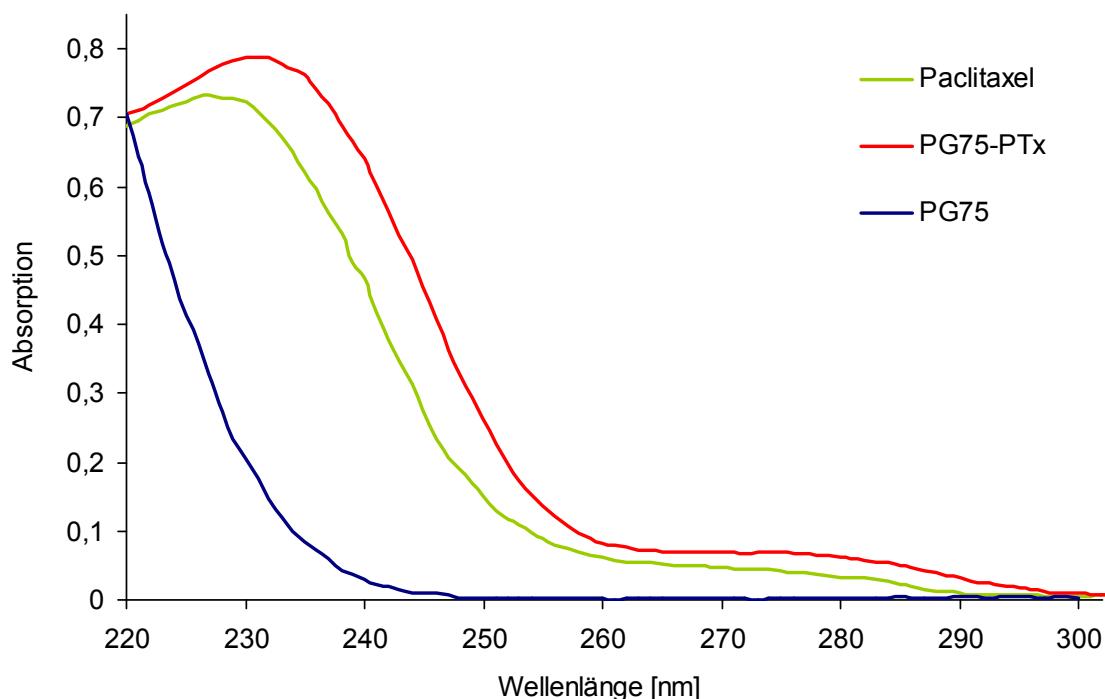


Abbildung 54: UV-Spektren von Paclitaxel in Methanol (20 µg/ml), PG75 und PG75-PTx nach der Umsetzung mit DCC / DMAP in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,5 (0,2 mg/ml)

Zur Aufnahme des UV-Spektrums von PG75 wurde als Blindwert das Lösungsmittel (50 mM Phosphatpuffer pH 6,5) verwendet. Poly(L-glutaminsäure) absorbiert nennenswert erst bei Wellenlängen kleiner 250 nm. Für die Auswertung des UV-Spektrums von PG75-PTx wurde als Blindwert die UV-Absorption von PG75 mit einer vergleichbaren Konzentration abgezogen. Das Konjugat zeigt ein zu PTx vergleichbares UV-Spektrum mit einem Maximum im Bereich von 230-240 nm und einer charakteristischen Schulter von 260-290 nm. Ein Nachteil der UV-Spektroskopie ist jedoch, dass zwischen gebundenem und freiem PTx nicht differenziert werden kann. Daher wurden die Ansätze unter Auftrennung von konjugiertem und freiem PTx mit der SEC untersucht.

Betrachtet man die Chromatogramme von PG30 und PG75 bei 230 nm, so ist das unterschiedliche Molekulargewicht deutlich zu erkennen (Abbildung 55). Wie erwartet wird die hochmolekularere PG75 vor PG30 eluiert, wobei PG75 im Bereich von ca. 5,5 ml bis 8,5 ml und PG30 von ca. 6,3 ml bis 9,5 ml gefunden wird. Zur Bestimmung

des Substitutionsgrades der synthetisierten Konjugate wurden die Chromatogramme bei 268 nm ausgewertet, da bei dieser Wellenlänge PG im Unterschied zu PTx nicht nennenswert absorbiert (Abbildung 56).

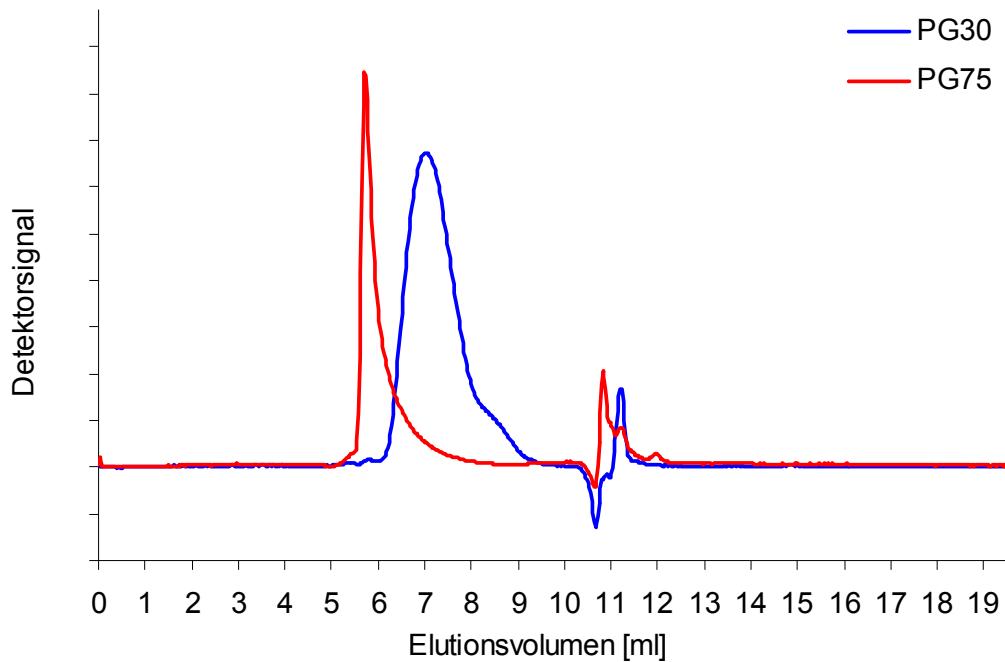


Abbildung 55: Chromatogramm von PG30 und PG75 bei 230 nm

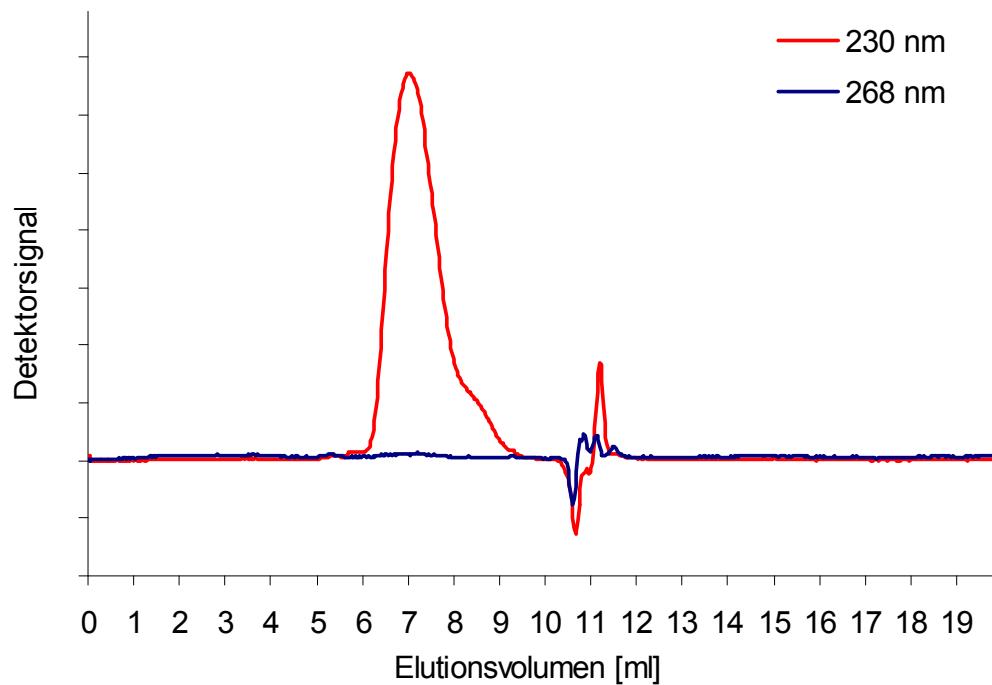


Abbildung 56: Chromatogramm von PG30 bei 230 nm und 268 nm

In Abbildung 57 ist das erhaltenen Chromatogramm von PG30-PTx (268 nm) zusammen mit dem Ausgangspolymer PG30 (230 nm) dargestellt. Durch die Synthese verbreitert sich bei PG30-PTx der Peak in Richtung höherer Molekulargewichte (Abbildung 57). Auch das Peakmaximum verschiebt sich zu einem kleineren Elutionsvolumen. Offensichtlich vergrößert sich durch die Konjugation das hydrodynamische Volumen von PG30-PTx deutlich, obwohl nur ein PG-PTx Verhältnis von 23:1 bezogen auf das Monomer der PG eingesetzt wurde.

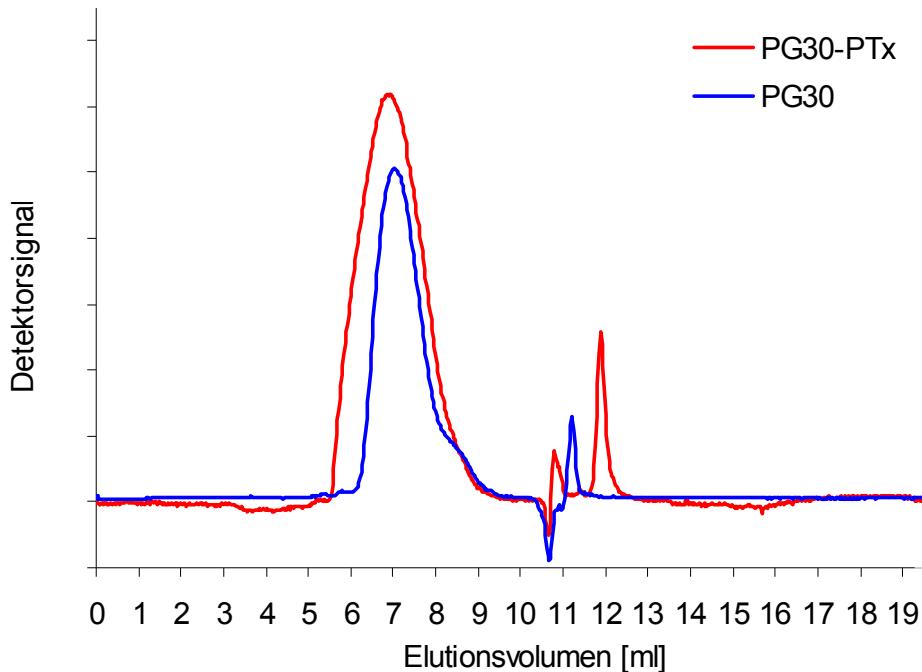


Abbildung 57: Chromatogramm von PG30-PTx bei 268 nm nach der Umsetzung mit DCC / DMAP und PG30 bei 230 nm

Ein ähnliches Verhalten wird bei der Synthese mit PG75 beobachtet (Abbildung 58). Auch hier verschiebt sich das Peakmaximum im Vergleich zur Ausgangssubstanz zu einem kleineren Elutionsvolumen.

Für die Bestimmung von freiem PTx wurden die Chromatogramme mit PG-PTx bei 230 nm ausgewertet. Die Detektion von PTx erfolgte zusätzlich anhand des UV-Spektrums (DAD). In beiden Syntheseprodukten (PG30-PTx und PG75-PTx) ist freies PTx vorhanden, welches bei ca. 11 ml eluiert wird (Abbildung 59). Der Anteil an freiem PTx ist im Verhältnis zu gebundenem PTx sehr gering. Dabei kann zwischen bereits hydrolytisch gespaltenem oder bei der Synthese unvollständig umgesetzten PTx nicht differenziert werden.

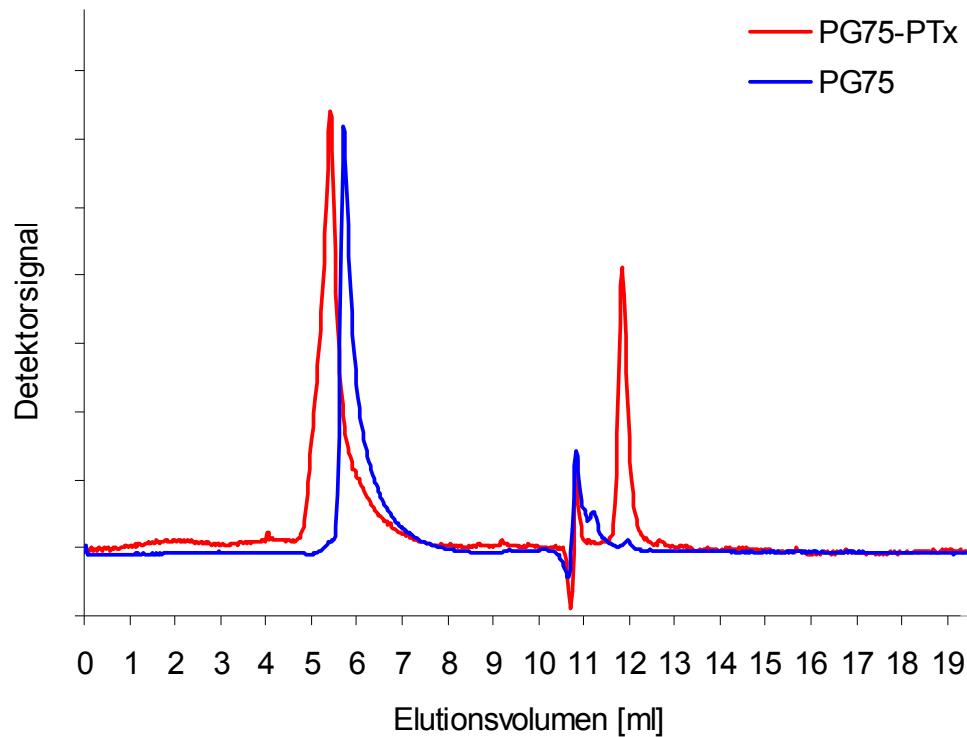


Abbildung 58: Chromatogramm von PG75-PTx bei 268 nm nach der Umsetzung mit DCC / DMAP und PG75 bei 230 nm

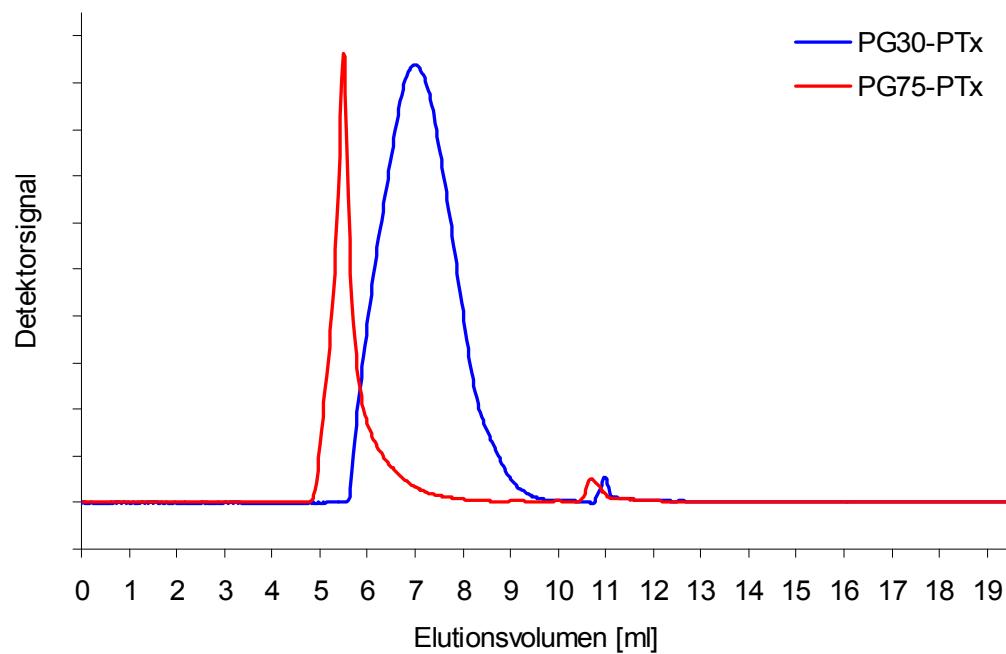


Abbildung 59: Chromatogramme von PG30-PTx und PG75-PTx bei 230 nm nach der Umsetzung mit DCC / DMAP

In den Chromatogrammen der Synthesen PG30-PTx (Abbildung 57) und PG75-PTx (Abbildung 58) ausgewertet bei 268 nm, ist ein zusätzlicher Peak mit einem Elutionsvolumen von ca. 12 ml zu sehen. Der Zusätzliche Peak kann anhand des UV-Spektrums (Abbildung 60, λ_{max} ca. 280 nm) dem Katalysator DMAP zugeordnet werden. Das gegenüber PTx größere Elutionsvolumen wird vermutlich durch die ionischen Wechselwirkung zwischen DMAP und dem porösen Säulenfüllmaterial der BioSep-S3000 (Silika basiert, negativ geladen) hervorgerufen. Alle Synthesen enthielten trotz ausgiebiger Dialyse (>1 Woche) noch Verunreinigungen an DMAP. Auch hier kann die Ursache in der ionische Wechselwirkung begründet sein, da die deprotonierte Poly(L-glutaminsäure) kationische Gegenionen als Ionenpaar bindet.

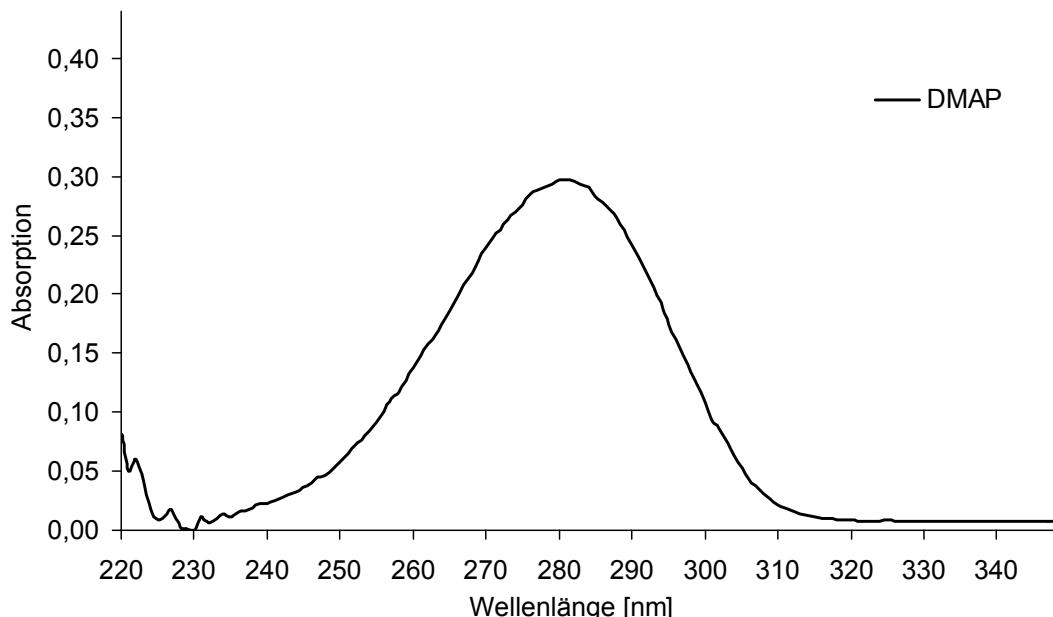


Abbildung 60: UV-Spektrum von Dimethylaminopyridin (DMAP) in Wasser

Mit beiden Molekulargewichten der PG wurden Konjugate mit PTx synthetisiert. Die mit der SEC bestimmten Ergebnisse der PTx-Beladung von PG30 und PG75 sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Im Vergleich zu PG75 wurde eine höhere PTx-Beladung mit PG30 erreicht.

Tabelle 4: Übersicht der Synthese von PG-PTx mit DCC / DMAP; Analyse der Wirkstoffbeladung mit der SEC bei 268 nm

Polymer	Angesetztes Molverhältnis [PTx : DCC : PG]	Analysiertes Molverhältnis [PTx:PG]	Prozentuale Beladung mit PTx [m/m]
PG30	1:2,8:23	1:23	20
PG75	1:2,8:23	1:31	16

Das Molekulargewicht der PG scheint einen Einfluss auf die Synthese zu haben, da die Umsetzung im selben Molverhältnis durchgeführt wurde. Alle Synthesen wurden mit einem molaren Überschuss an DCC im Vergleich zu den Carboxylgruppen durchgeführt. Die Restfeuchte kann die Kopplung von PG mit PTx beeinflussen. Obwohl beide Proben parallel getrocknet wurden, lagen möglicherweise unterschiedliche Restfeuchten zwischen PG30 und PG75 nach der Bildung der freien Säure vor.

3.2.2 Aktivierung mit Carbonyldiimidazol

Neben der Synthese mit dem schwer wasserlöslichen DCC wurde die Möglichkeit der Konjugation von PG30 und PTx mit Carbonyldiimidazol (CDI) in DMF untersucht. Ein Vorteil der Umsetzung mit CDI gegenüber DCC wäre, dass die entstehenden Nebenprodukte wasserlöslich sind und somit gut durch Dialyse abgetrennt werden können. Weiterhin wird bei dem Ansatz mit CDI nicht der schwer abzutrennende Katalysator DMAP verwendet. Das Chromatogramm mit der höchsten PTx-Beladung der Reaktion mit CDI ist zusammen mit PG30 in Abbildung 61 dargestellt.

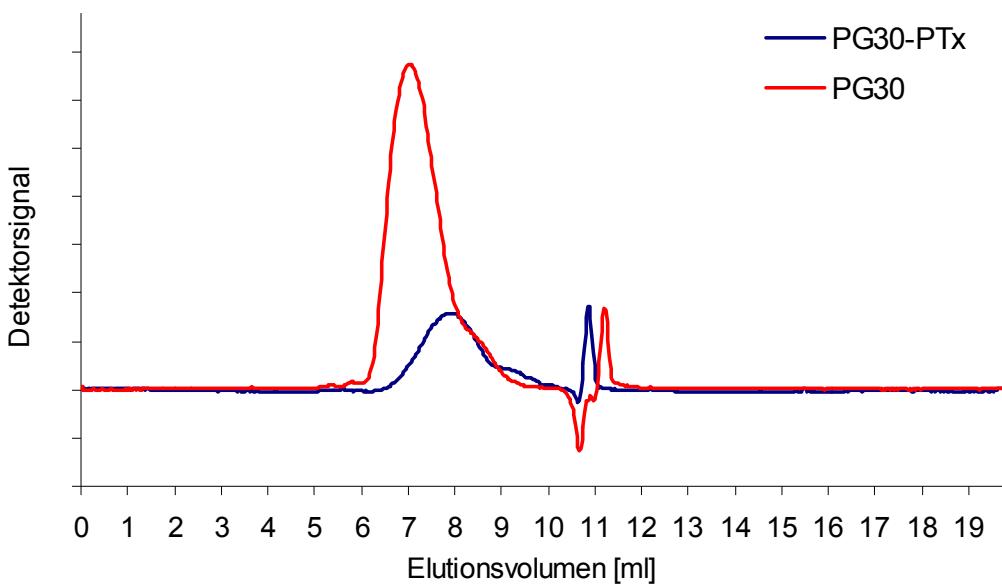


Abbildung 61: Chromatogramme von PG30-PTx bei 268 nm nach der Umsetzung mit Carbonyldiimidazol und PG30 bei 230 nm

Die Reaktionsansätze mit CDI zur Synthese von PG30-PTx sowie die mit der SEC bestimmten PTx-Beladungen sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Die höchste

Beladung an PTx wurde bei der Synthese mit dem größten Anteil an CDI erhalten. Die Auswertung dieser Synthese ergab, dass an jedem 34. Monomer der Poly(L-glutaminsäure) PTx gebunden wurde, was einer PTx-Beladung von ca. 14 % (w/w) entspricht. Im Vergleich zu der Umsetzung mit DCC / DMAP (Tabelle 4) ist ein größerer molarer Überschuss an CDI für die Kopplung notwendig. Selbst ein zehnfacher molarer Überschuss an CDI gegenüber PTx führte nicht zu einer vollständigen Umsetzung von PTx. Eine Ursache für die geringen Umsetzungen mit CDI könnte am hohen Restwassergehalt der PG30 liegen, da CDI im wässrigen Milieu sehr schnell zerfällt. Selbst bei einem geringen Wassergehalt (>0,1 %) hydrolysiert CDI schnell zu Kohlendioxid und Imidazol und vermindert so die Umsetzung zu PG30-PTx [296].

Tabelle 5: Übersicht der Synthesen von PG30-PTx mit CDI, Berechnung der Wirkstoffbeladung aus den Chromatogrammen der SEC bei 268 nm

Polymer	Eingesetztes Molverhältnis [PTx : CDI : PG]	Analysiertes Molverhältnis [PTx:PG]
PG30	1:2,4:24	1:132
PG30	1:10:24	1:34

3.2.3 Ergebnisse der Synthese von PG-PTx

Im Rahmen der Arbeit wurden PG-PTx Konjugate mit PG30 und PG75 hergestellt. Die Synthesen erfolgte mit DCC / DMAP oder CDI, wobei die Aktivierung mit DCC / DMAP zu höheren Beladungen mit Paclitaxel führte. Es wurde gefunden, dass die Kopplungseffizienz von CDI im Vergleich zu DCC deutlich geringer ist. Für PG30-PTx wurde eine PTx-Beladung von 20 % m/m und für PG75-PTx von 16 % m/m analysiert. Trotz der hohen Wirkstoffbeladung mit dem schwer wasserlöslichen PTx sind die erhaltenen Konjugate für eine Assemblierung von PEM ausreichend löslich in Wasser (1 mg/ml).

Zum Aufbau von PTx-haltigen Multischichten werden aufgrund der höheren Ausbeuten und Beladungen mit PTx die Synthesen mit DCC / DMAP verwendet, wobei mit der SEC festgestellt wurde, dass die Proben mit DMAP verunreinigt sind. Es ist davon auszugehen, dass DMAP aufgrund der einwertigen positiven Ladung und des kleinen MW die Assemblierung von PG-PTx nicht beeinflusst. Außerdem wird bei der Beschichtung zwischen den einzelnen Schichten mehrfach mit Wasser gewaschen und dadurch unter Umständen der Restgehalt an DMAP entfernt.

3.3 Aufbau von Polyelektrolytmultischichten mit PG-PTx Konjugaten

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob ein Aufbau von Polyelektrolytmultischichten mit PG-PTx möglich ist und abzuschätzen, welches Potential eine derartige Beschichtung für Drug-Eluting Stents hat. Besonders die Dicke, Wirkstoffbeladung und Stabilität einer Beschichtung sind für erfolgreiche Drug-Eluting Stents relevant. Daher waren die Experimente darauf fokussiert, Bedingungen für eine möglichst starke und stabile LbL-Beschichtung mit PG-PTx und PLL als Modellsystem zu finden, um eine ausreichende Wirkstoffbeladung bei einer vertretbaren Anzahl an Schichten zu erreichen.

Der erste auf dem Markt befindliche PTx freisetzende Stent hat eine Beladung von $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ PTx und setzt davon insgesamt nur ca. 10 % des Wirkstoffes frei. Vorausgesetzt, dass PTx aus beladenen PEM vollständig freigesetzt wird, sollte zur Verhinderung einer Restenose bei geeigneter Freisetzungskinetik eine Beladung von ca. $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ausreichen. Die Untersuchungen zum Aufbau von PEM mit PTx hatten somit das Ziel herauszufinden, wie viele Schichten an PG-PTx für eine Beladung von ca. $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ PTx notwendig sind.

Neben der absoluten Beladung ist jedoch für eine Anwendung von PEM zur lokalen Darreichung von Wirkstoffen die Kinetik der Freisetzung von entscheidender Bedeutung. Daher wurde zudem versucht, die Paclitaxel-Freisetzung aus Multischichten mit PG-PTx zu analysieren. Bevor Paclitaxel aus den Multischichten abgegeben wird, muss die Esterbindung zwischen PG und PTx hydrolysieren und der Wirkstoff durch die noch vorhandenen Multischichten zur Oberfläche diffundieren.

3.3.1 LbL-Beschichtung mit PG-PTx bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl

Die Vorversuche an unbeladenen Multischichten mit PG75 und PLL haben unter anderem gezeigt, dass bei gleicher Ionenstärke bei pH 5,6 im Vergleich zu pH 7,6 ein stärkeres Schichtenwachstum stattfindet und dadurch bei gleicher Anzahl an Schichten dickere Filme entstehen. Es wurde außerdem beobachtet, dass bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl ein reproduzierbarer Aufbau von PEM unabhängig vom Mw der verwendeten PG erfolgt. Die ersten Versuche zur Assemblierung von PG-PTx mit PLL wurden somit unter diesen Bedingungen mit PG75-PTx durchgeführt, wobei entsprechend den Untersuchungen an PG/PLL das Schichtenwachstum mit Hilfe der QCM-D und UV-Spektroskopie analysiert wurde. In Abbildung 62 ist das Schichtenwachstum des Polymerpaars $(\text{PG75-PTx/PLL})_{10}$ -PG75-PTx zusammen mit der entsprechenden wirkstofffreien Beschichtung dargestellt.

Das QCM-D-Ergebnis zeigt, dass ein kontinuierlicher Aufbau von Multischichten mit PG75-PTx möglich ist (Abbildung 62). Bei der Beschichtung mit PG75-PTx wird eine deutlich größere Abnahme der Resonanzfrequenz als bei PG75 beobachtet, wobei

die Unterschiede ab der 12. Schicht (PLL) signifikant sind (Two Way ANOVA mit Einzelvergleichen (Tukey Test), Faktor A: Polymer, Faktor B: Anzahl an Schichten).

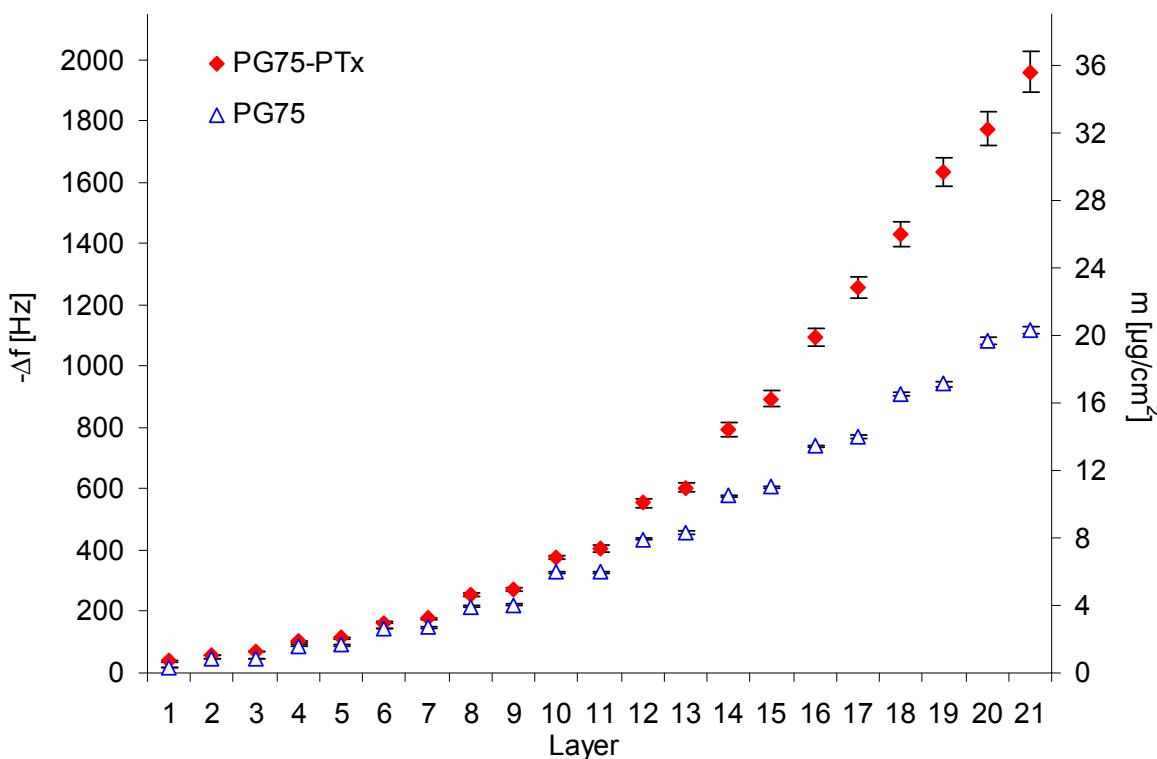


Abbildung 62: Verlauf der LbL-Beschichtungen $(\text{PG75-PTx}/\text{PLL})_{10}$ - PG75-PTx und $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}$ - PG75 bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; analysiert mit der QCM-D, Berechnung der Massen nach Sauerbrey aus dem 5. Oberton

Unter der Hypothese, dass die Voraussetzungen für die Gültigkeit der Sauerbrey-Gleichung erfüllt sind, die entgegengesetzt geladenen Polymere zu gleichen Anteilen am Aufbau der Multischichten beteiligt sind und durch den Einbau von PTx keine strukturelle Beeinflussung der PEM hervorgerufen wird, ist eine Zunahme der Resonanzfrequenzänderung im Bereich von ca. 8% für PG75-PTx zu erwarten, da die prozentuale PTx-Beladung des eingesetzten PG75-PTx bei ca. 16 % (m/m) liegt und jede 2. Schicht mit dem Konjugat aufgebaut wurde. Mit der QCM-D wird für PG75-PTx/PLL nach nur 21 Polyelektrolytschichten eine fast 1,8fach so starke Änderung der Resonanzfrequenz analysiert. Es ist zu vermuten, dass sich die räumlich Konformation von PG-PTx deutlich von der nativen PG in den Multischichten unterscheidet. So berichtete Duncan et al., dass ein merklicher Einfluss der Wirkstoffbeladung auf die Konformation von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten in Lösung besteht [297]. Sogar die Wirkstofffreisetzung kann durch eine hohe Wirkstoffbeladung reduziert werden [297]. Möglicherweise adsorbiert PG-PTx in einer geknäulten Struktur, bei der sich die hydrophoben PTx-Moleküle im Inneren

zusammenlagern. Auch eine Stabilisierung der helicalen Konformation durch PTx ist möglich, womit die stärkere Frequenzänderung bei PG-PTx erklärt werden kann.

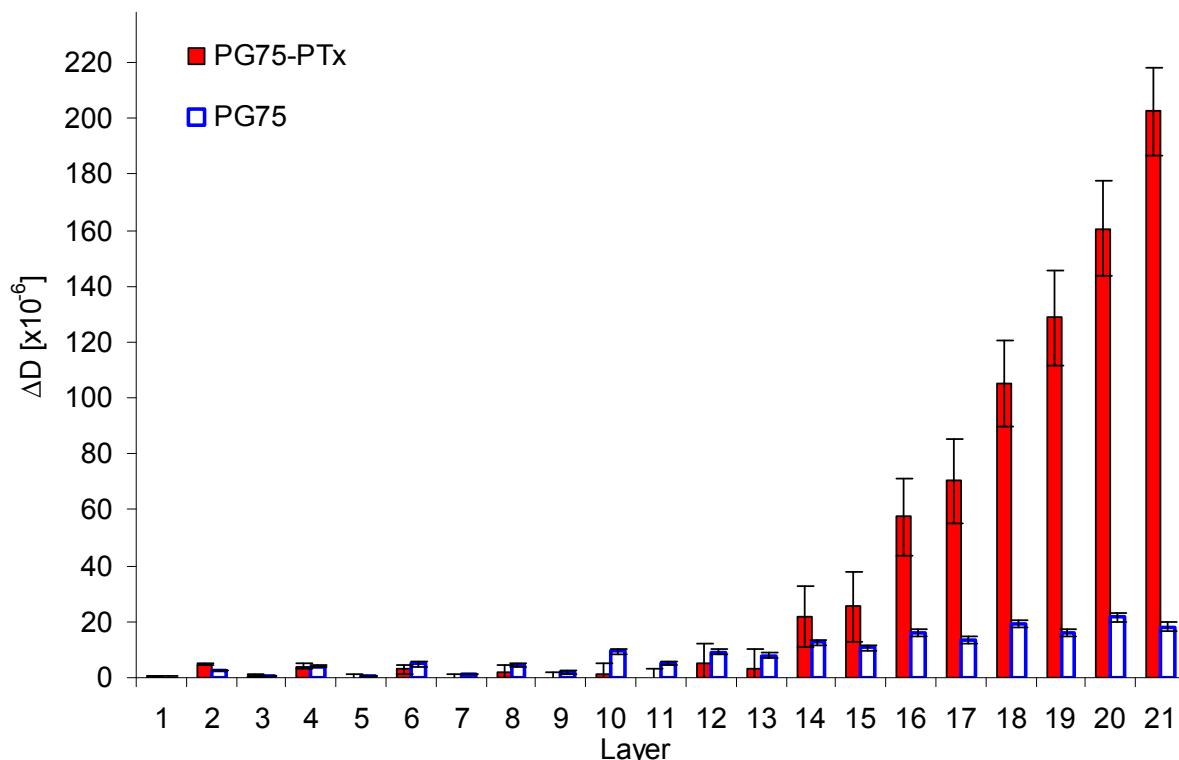


Abbildung 63: Verlauf des Dissipationsfaktors der LbL-Beschichtungen $(\text{PG75-PTx}/\text{PLL})_{10}$ - PG75-PTx und $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}$ - PG75 bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl, analysiert mit der QCM-D

Auch die Dämpfung wird durch den Einbau von PTx in die Multischichten erheblich beeinflusst (Abbildung 63). Bei der Beschichtung mit PG-PTx erhöht sich der Dissipationsfaktor bis auf 200×10^{-6} und unterscheidet sich ab der 15. Schicht signifikant (Two Way ANOVA mit Einzelvergleichen (Tukey Test), Faktor A: Polymer, Faktor B: Anzahl an Schichten) von den Multischichten mit PG75. Dies deutet auf strukturelle Unterschiede zwischen den Multischichten aus PG75/PLL und PG75-PTx/PLL, assembliert bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl, hin.

Die QCM-D-Untersuchungen erfolgten in Anwesenheit von Wasser und werden auch vom Grad der Quellung der Multischichten beeinflusst. Einerseits führt fest am Polymerfilm gebundenes Wasser (auch Ionen) zu einer zusätzlichen Frequenzabnahme und andererseits kann eine erhöhte Quellung durch eine damit verbundene Abnahme der Festigkeit zu einer geringeren der Frequenzabnahme führen. Da bei den PEM mit PG75-PTx eine sehr starke Zunahme der Frequenzreduktion zusammen mit hohen Dissipationsfaktoren festgestellt wurde, sind eine erhöhte Filmdicke und eine Beeinflussung der Quellung bei den

Multischichten mit PG75-PTx sehr wahrscheinlich. Aufgrund der hohen Dämpfungen gilt die Sauerbrey-Gleichung nicht.

Die Beschichtung $(\text{PG75-PTx}/\text{PLL})_{10}$ -PG75-PTx bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl wurde zusätzlich mit der UV-Spektroskopie untersucht. In Abbildung 64 ist der Verlauf der Beschichtungen $(\text{PG75-PTx}/\text{PLL})_{10}$ -PG75-PTx zusammen mit der wirkstofffreien dargestellt. Die UV-Spektroskopie zeigt wie bei den Untersuchungen mit der QCM-D einen stabilen Aufbau von Multischichten mit PG-PTx (pH 5,6 mit 0,2 M NaCl). Dabei vergrößert sich im UV-Maximum von PG-PTx (230 nm) bei der Beschichtung mit PG75-PTx die Absorption erheblich stärker als bei PG75. Mit jeder PG75-PTx Schicht nimmt die UV-Absorption zu. Zusammen mit den Rohdaten sind in Abbildung 64 der Gehalt an PTx nach jeder Schicht, berechnete aus der Differenz der Absorption (230 nm), als Balken dargestellt. Für die Kalkulation wurde von der Beschichtung mit PG75-PTx die UV-Absorption der entsprechenden Beschichtung mit PG75 als Blindwert subtrahiert. Aus den so erhaltenen UV-Absorptionen wurde der theoretische Gehalt an PTx in den Multischichten berechnet. Da die UV-Absorption von PG75-PTx bei 230 nm deutlich stärker als von PLL ist, stellt sich der Verlauf der UV-Absorption bei der Beschichtung stufenförmig dar (Balkendiagramm in Abbildung 64).

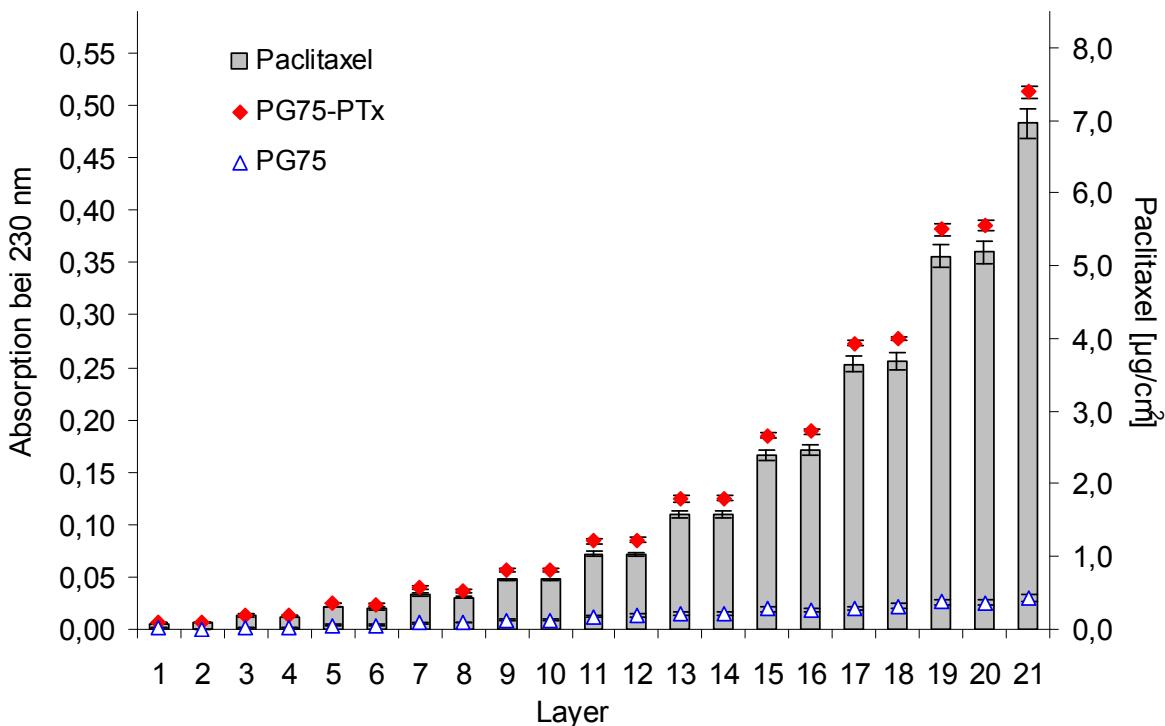


Abbildung 64: Verlauf der UV-Absorption bei 230 nm der LbL-Beschichtungen $(\text{PG75-PTx}/\text{PLL})_{10}$ -PG75-PTx und $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}$ -PG75 bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl, Gehalt an Paclitaxel berechnet

Im nächsten Schritt wurde der Beschichtungsverlauf mit der kürzerkettigen PG30-PTx (pH 5,6 mit 0,2 M NaCl) unter Verwendung der QCM-D und UV-Spektroskopie untersucht. Schon bei den wirkstofffreien Vorversuchen wurde herausgefunden, dass das Molekulargewicht der PG einen Einfluss auf das Schichtenwachstum und die viskoelastischen Eigenschaften der Multischichten hat.

Das Ergebnis zeigt einen kontinuierlichen Aufbau von Multischichten mit PG30-PTx und PLL bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl. In Abbildung 65 ist der analysierte Verlauf der Resonanzfrequenz der Beschichtung $(\text{PG30-PTx}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30-PTx}$ abgebildet. Der Vergleich mit der unbeladenen Beschichtung zeigt die nach 21 Schichten stärkere Abnahme der Resonanzfrequenz bei der Assemblierung mit PG30-PTx, wobei die Frequenzänderung auch über 17 Schichten hinaus ansteigt. Ausgenommen bei der 16. Polyelektrolytschicht unterscheiden sich ab der 8. Schicht die Resonanzfrequenzen der beiden Polymerpaare signifikant (Two Way ANOVA mit Einzelvergleichen (Tukey Test), Faktor A: Polymer, Faktor B: Anzahl an Schichten).

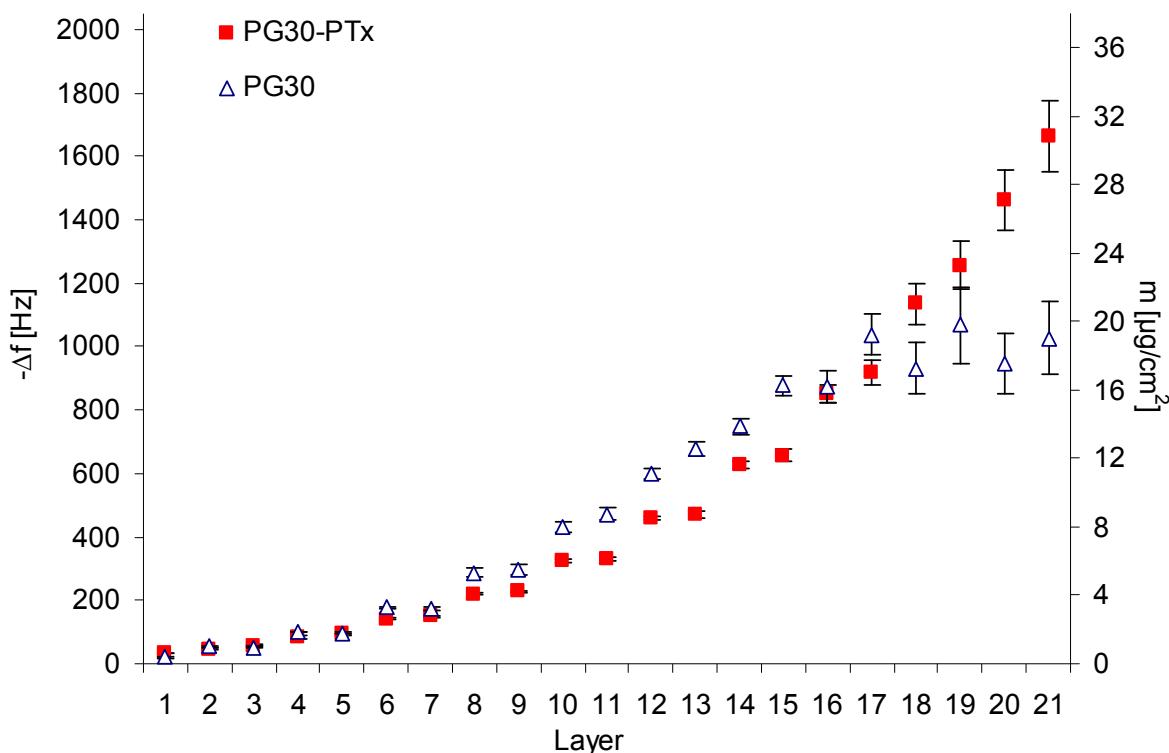


Abbildung 65: Verlauf der LbL-Beschichtungen $(\text{PG30-PTx}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30-PTx}$ im Vergleich zu der LbL-Beschichtung $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$; Assemblierung bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; analysiert mit der QCM-D

Im mittleren Bereich der Assemblierung (8.-15. Schicht) liegt die Resonanzfrequenzerniedrigung der wirkstofffreien Beschichtung oberhalb der mit PG30-PTx. Erst ab der 18. Schicht, nachdem bei der Beschichtung mit PG30 die Frequenzabnahme stark abnimmt, wird für die PTx-haltige Beschichtung eine höhere

Frequenzänderung analysiert. Der Verlauf der Beschichtung ist bei PG30-PTx/PLL konstanter als bei PG30/PLL. Auch die analysierten Dämpfungen zwischen den beiden Beschichtungen sind unterschiedlich (Abbildung 66). Der Anstieg des Dissipationsfaktors ist bei der Beschichtung mit PG30-PTx kleiner als bei der mit PG30. Nach 21 Schichten wird für die Beschichtung mit PG30 ein Dissipationsfaktor von ca. 312×10^{-6} und für PG30-PTx von ca. 125×10^{-6} analysiert. Ab der 8. Schicht unterscheiden sich die Dämpfungen signifikant (Two Way ANOVA mit Einzelvergleichen (Tukey Test), Faktor A: Polymer, Faktor B: Anzahl an Schichten). Die QCM-D-Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Konjugation mit PTx eine Stabilisierung der Beschichtung mit PG30 erfolgt. Dafür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. So können die Multischichten durch eine geknäulte Konformation oder Sekundärbindungen, hervorgerufen durch PTx, stabilisiert werden, aber auch ein Einfluss auf den Wassergehalt / Quellung durch den hydrophoben Wirkstoff ist möglich.

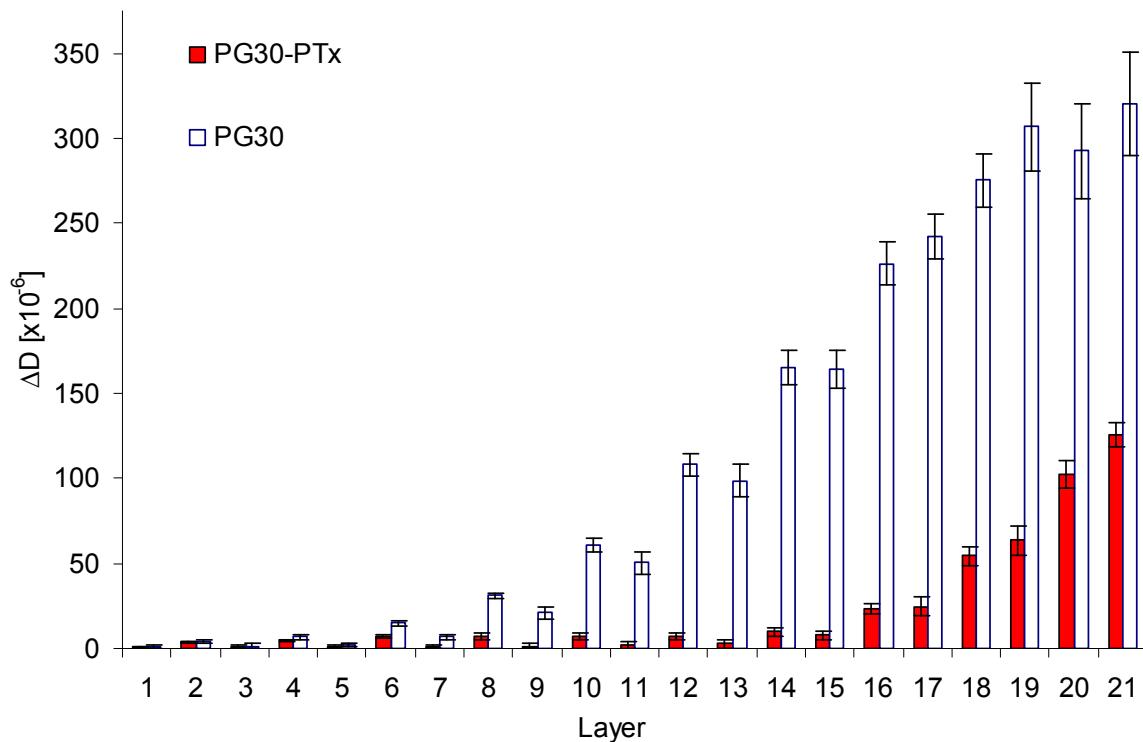


Abbildung 66: Verlauf des Dissipationsfaktors der LbL-Beschichtungen $(\text{PG30-PTx/PLL})_{10}$ -PG30-PTx und $(\text{PG30/PLL})_{10}$ -PG30 bei pH 5,6 mit NaCl, analysiert mit der QCM-D

Der Verlauf der Beschichtung $(\text{PG30-PTx/PLL})_{10}$ -PG30-PTx bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl (analysiert mit der UV-Spektroskopie) ist in Abbildung 67 zusammen mit PG75/PLL dargestellt. Bei der Assemblierung vergrößert sich mit steigender Anzahl an Schichten die UV-Absorption (230 nm). Es ist ein kontinuierlicher Aufbau von PEM mit PG30-PTx wie bei der Beschichtung mit PG75-PTx zu erkennen. Somit ist

ein stabiler und reproduzierbarer Aufbau von PTx-haltigen Multischichten mit PG30-PTx und PG75-PTx in Kombination mit PLL bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl möglich.

Unterschiede zwischen den Beschichtungen mit PG30-PTx oder PG75-PTx, sind wie mit der QCM-D auch am Verlauf der UV-Absorption zu erkennen. Während sich bei der gesamten Beschichtung mit PG75-PTx die Absorption treppenförmig darstellt (deutliche Zunahme nur nach jeder PG75-PTx Schicht), vergrößert sich die Absorption ab der 16. Schicht auch nach der Beschichtung mit PLL bei den Multischichten mit PG30-PTx und deutet auf eine eingeschränkte Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes hin. Wahrscheinlich wird das Messergebnis durch Streuung, Reflexion, intermolekulare Wechselwirkungen oder eine inhomogene Wirkstoffverteilung in den Polyelektrolytmultischichten beeinflusst.

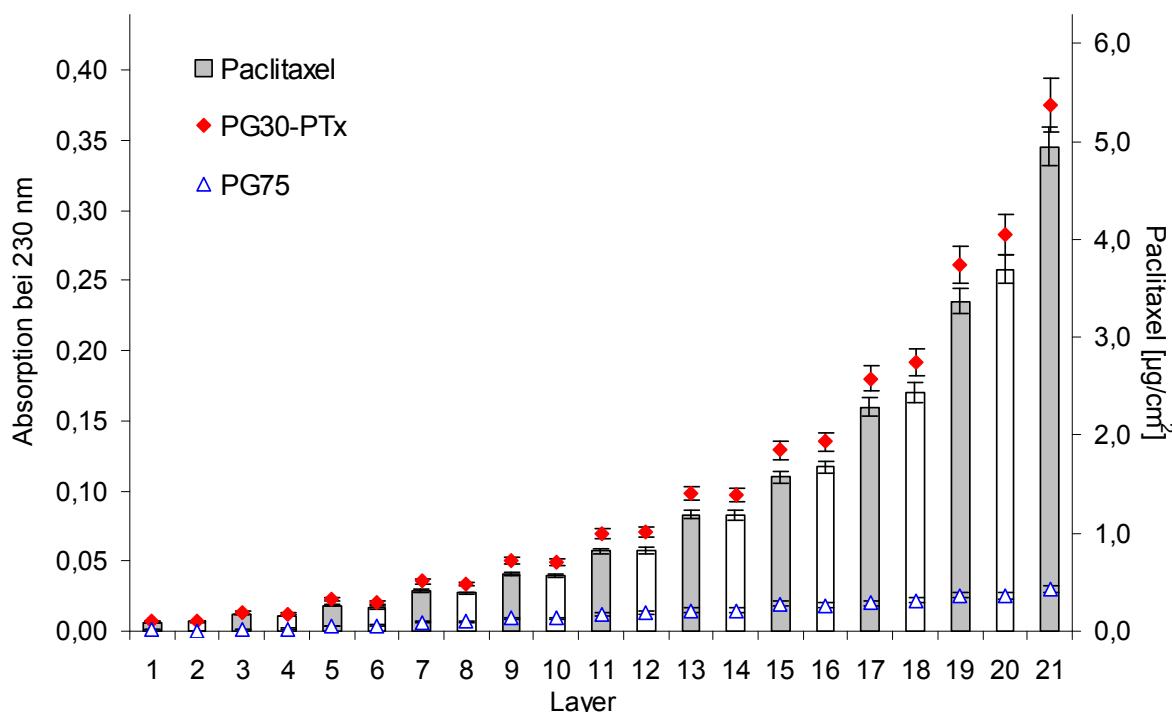


Abbildung 67: Verlauf der UV-Absorption bei 230 nm der LbL-Beschichtung (PG30-PTx/PLL)₁₀-PG30-PTx und (PG75/PLL)₁₀-PG75 bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; Gehalt an Paclitaxel berechnet

Zum Vergleich mit anderen Beschichtungen wurden trotz der Hinweise auf die eingeschränkte Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes aus den Werten der UV-Absorption bei 230 nm ($\epsilon=29800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) die PTx-Beladungen kalkuliert. Da nur bei jeder PG30-PTx Schicht Wirkstoff in das System eingebracht wird, ist der stärkere Anstieg der UV-Absorption bei der Beschichtung mit PLL (ab der 16. Schicht) nicht mit einer Zunahme von Paclitaxel gleichzusetzen. Bei größeren Schichtdicken muss daher davon ausgegangen werden, dass die kalkulierte Gesamtbeladung insgesamt

zu hoch ist, obwohl zur Berechnung der PTx-Beladung die Absorptionswerte der wirkstofffreien Beschichtung als Blindwerte abgezogen wurden.

Bei beiden Beschichtungen vergrößert sich die Absorption pro PG-PTx Schicht bis zur 21. Schicht. Die abschließende PG-PTx Schicht führt zu einer Zunahme der PTx-Beladung bei der Beschichtung (PG30/PLL)₁₀-PG30-PTx von ca. 1,6 µg/cm² und bei dem entsprechenden System mit PG75-PTx zu ca. 1,8 µg/cm² PTx. Für die 9. Schicht (5x PG-PTx) wurde bei beiden Beschichtungen ein Einbau von lediglich 0,2 µg/cm² PTx berechnet. Nach 21 Polyelektrolytschichten zeigt die Beschichtung mit dem höhermolekularerem Konjugat eine etwas größere Beladung mit PTx, wobei die Differenz zwischen den zwei Beschichtungen nur im Bereich der Menge einer zusätzlichen PG30-PTx Schicht liegt (Abbildung 68). Der Verlauf des PTx-Gehaltes nach der 15., 17., 19. und 21. Schicht der bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl aufgebauten Multischichten ist in Abbildung 68 dargestellt.

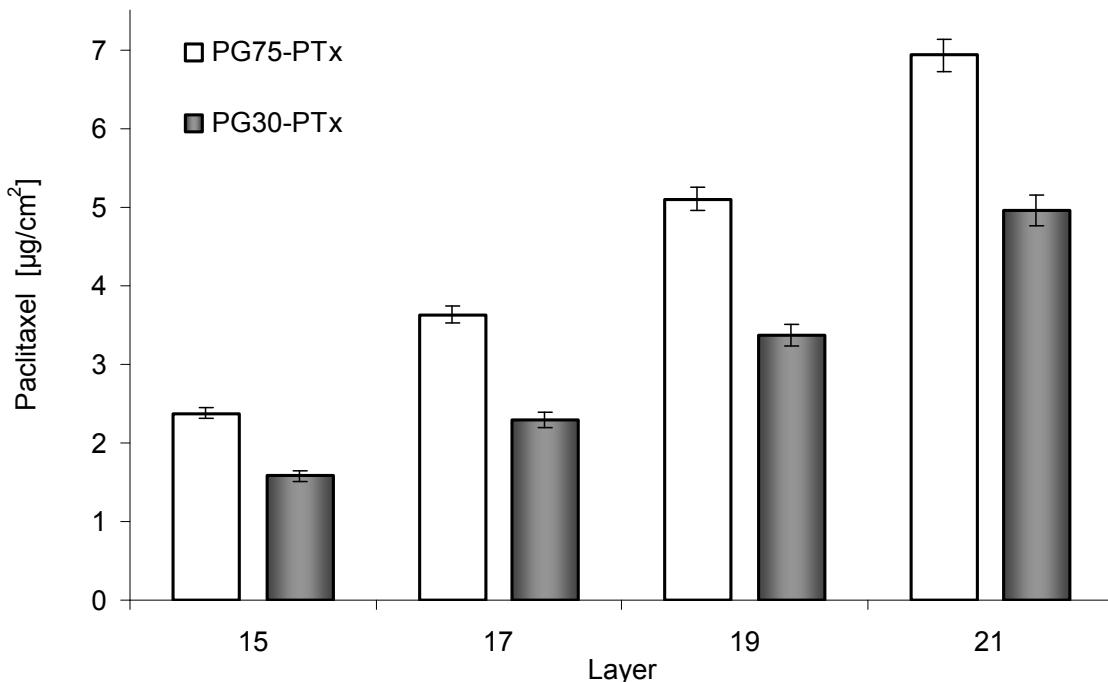


Abbildung 68: Verlauf des PTx-Gehaltes der LbL-Beschichtungen (PG75-PTx/PLL)₁₀-PG75-PTx und (PG30-PTx/PLL)₁₀-PG30-PTx nach der 15., 17., 19. und 21. Schicht; LbL-Beschichtung bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; Kalkulation des PTx-Gehaltes aus der UV-Absorption bei 230 nm

Der Gesamtgehalt an PTx liegt bei der Beschichtung (PG75-PTx/PLL)₁₀-PG75-PTx bei ca. 6,9 µg/cm². Für die Beschichtung (PG30-PTx/PLL)₁₀-PG30-PTx wurde ein PTx-Gehalt von ca. 5,0 µg/cm² aus den UV-Daten kalkuliert.

Zur Bestätigung eines Aufbaus von Multischichten mit PG-PTx bei pH 5,6 in Anwesenheit von 0,2 M NaCl wurden die Filmdicken von getrockneten Multischichten

mit der AFM bestimmt. Die AFM-Bilder bestätigen, dass ein Aufbau von Multischichten mit PG30-PTx (Abbildung 69) und PG75-PTx (Abbildung 70) stattfindet und eine mikroskopisch homogene Beschichtung erfolgt.

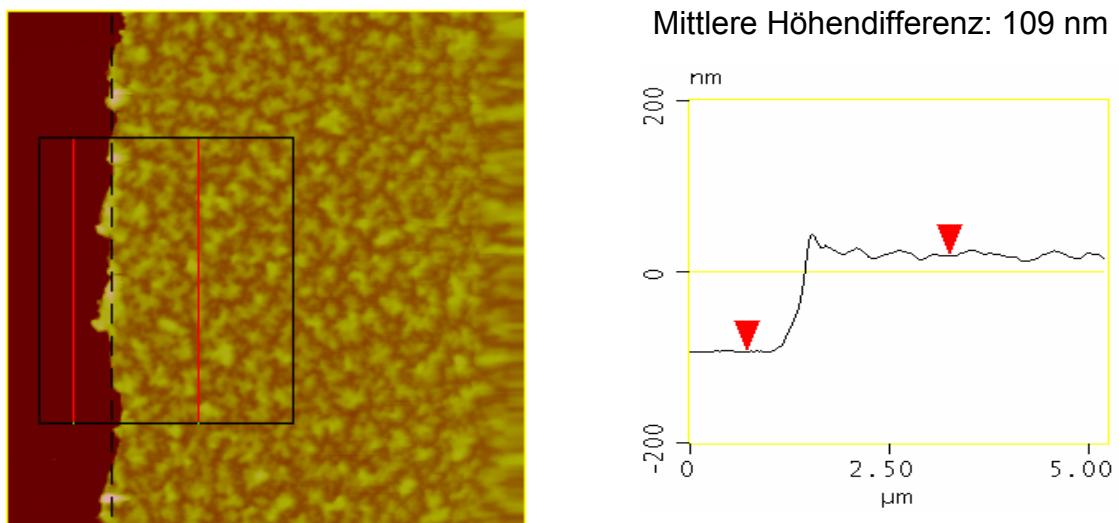


Abbildung 69: Bestimmung der Filmdicke mit AFM an trockenen Multischichten aus (PG30-PTx/PLL)₁₀-PG30-PTx; assembliert bei pH 5,6 mit 0,2 NaCl; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

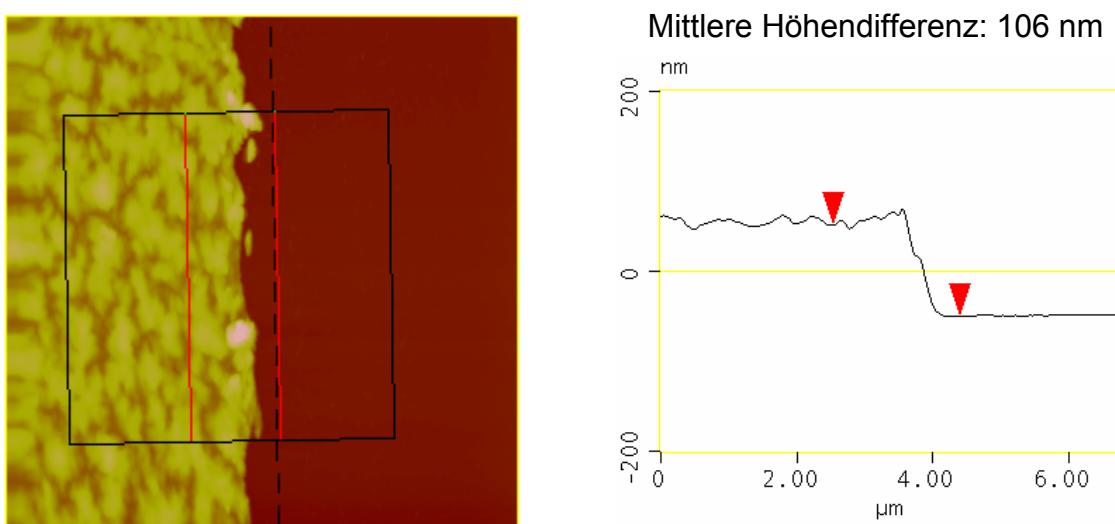


Abbildung 70: Bestimmung der Filmdicke mit AFM an trockenen Multischichten aus (PG75-PTx/PLL)₁₀-PG75-PTx; assembliert bei pH 5,6 mit 0,2 NaCl; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

Für beide Beschichtungen ((PG75-PTx/PLL)₁₀-PG75-PTx und (PG30-PTx/PLL)₁₀-PG30-PTx) wurden ähnliche Filmdicken von 106 nm bzw. 109 nm an getrockneten PEM mit der AFM analysiert (Abbildung 71). Auch an den entsprechenden unbeladenen Multischichten mit PG30 oder PG75 wurden ebenfalls fast gleiche

Schichtdicken (92 bzw. 94 nm) bestimmt. Bei beiden Molekulargewichten der PG haben die Multischichten mit PG-PTx nach 21 Schichten gegenüber den unbeladenen PEM eine um durchschnittlich 15 nm erhöhte Struktur. Das ist ein weiterer Beleg für die angestrebte Beladung mit PTx. Insofern bestätigen die AFM-Messungen die UV- und QCM-D-Ergebnisse.

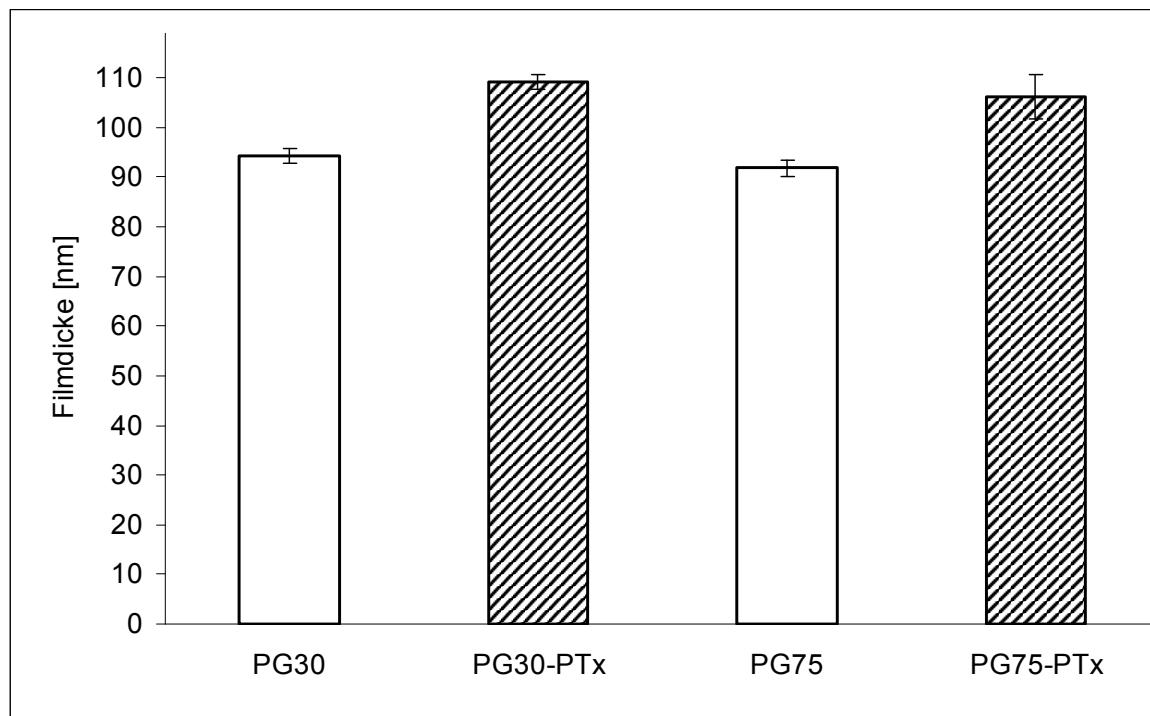


Abbildung 71: Vergleich der Filmdicken von Multischichten mit 21 Schichten aus $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}$ -PG30, $(\text{PG30-PTx}/\text{PLL})_{10}$ -PG30-PTx, $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}$ -PG75 und $(\text{PG75-PTx}/\text{PLL})_{10}$ -PG75-PTx; LbL-Beschichtungen bei pH 5,6 mit 0,2 NaCl; Bestimmung der Dicke an trockenen Filmen ($n=3$) mit der AFM

Wie bei den QCM-D-Experimenten wurde auch an trockenen PEM mit der AFM eine Zunahme der Filmdicke durch den Einbau von PTx gefunden. Die Filmdicke von trockenen PEM erhöht sich unabhängig vom Molekulargewicht (PG-PTx) um ca. 16 % (analysiert mit AFM). Insgesamt ist die Filmdickenzunahme von getrockneten PEM damit deutlich kleiner als an gequollenen PEM (analysiert mit der QCM-D). Es ist zu vermuten, dass die interne Struktur der PG in den Multischichten durch die Konjugation mit PTx beeinflusst wird. Eine kompaktere räumliche Struktur von PG-PTx in PEM, bei der sich die hydrophoben PTx-Moleküle zusammenlagern, würde zu einem Anstieg der Filmdicke führen. Möglicherweise sind PEM mit PG-PTx auch stärker gequollen oder die elektrostatischen Wechselwirkungen sind abgeschwächt.

Beim bevorzugten pH von 5,6 (mit 0,2 M NaCl) können wirkstoffhaltige PEM mit PG30-PTx und PG75-PTx zusammen mit PLL aufgebaut werden. Durch den Einbau

von PTx erhöhte sich die Filmdicke der Multischichten. In weiterführenden Untersuchungen sollte die Struktur von PG-PTx und die PTx-Verteilung in den Multischichten, das Verhältnis zwischen PLL und PG-PTx sowie das Quellungsverhalten näher analysiert werden.

3.3.2 LbL-Beschichtung bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl

Ein wichtiges Ergebnis der Vorversuche an unbeladenen Multischichten mit PG und PLL ist, dass bei pH 5,6 das stärkste Schichtenwachstum mit PG30 und PLL ohne Zusatz von NaCl erfolgt. Daher wurde untersucht, ob unter diesen Bedingungen auch eine Beschichtung mit PG30-PTx möglich ist und wie sich PG75-PTx verhält. Für PG75 ohne PTx wurde festgestellt, dass sich bei geringer Ionenstärke dünnere Filme bilden als mit 0,2 M NaCl. Der Verlauf der Beschichtung $(\text{PG30-PTx}/\text{PLL})_{10}$ -PG30-PTx ist in Abbildung 72 dargestellt.

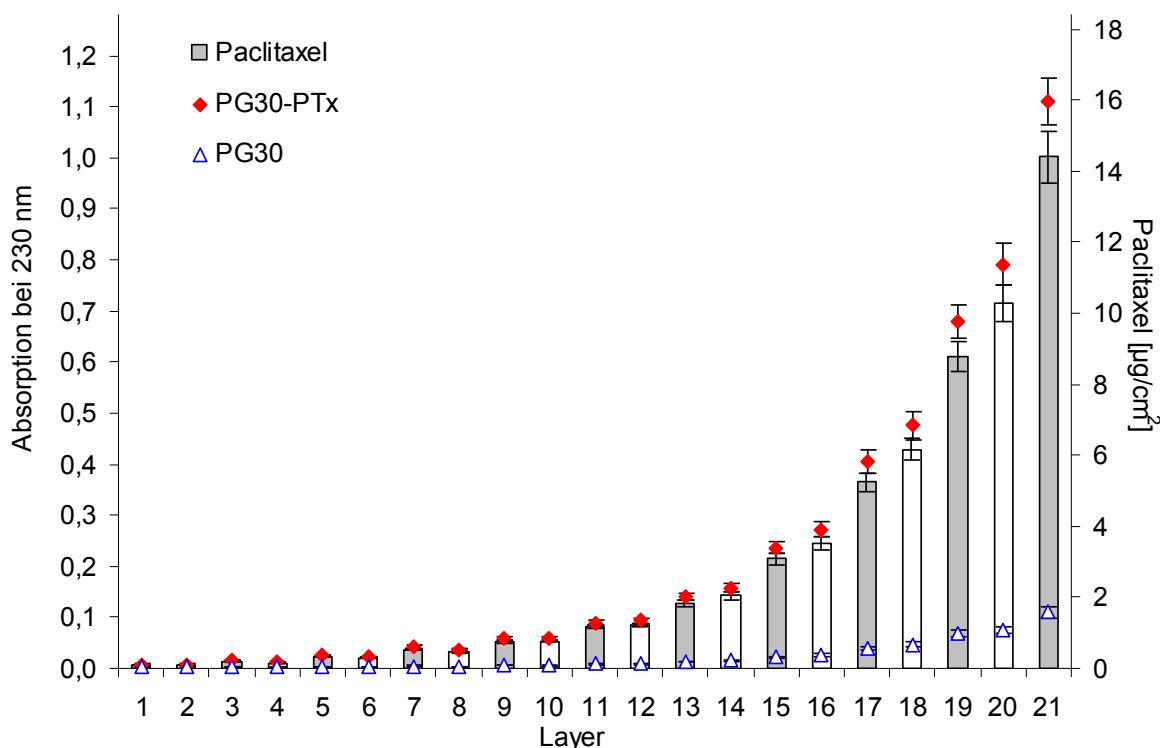


Abbildung 72: Verlauf der UV-Absorption bei 230 nm der LbL-Beschichtung $(\text{PG30-PTx}/\text{PLL})_{10}$ -PG30-PTx und $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}$ -PG30 bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; Absorption von Paclitaxel berechnet

Die bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl aufgebauten Multischichten mit dem kleineren Molekulargewicht der PG (PG30-PTX) zeigen eine sehr starke Zunahme der UV-

Absorption im Verlauf der Beschichtung. Auch bei diesen Bedingungen erhöht sich bei der Beschichtung mit PLL die UV-Adsorption ab der 14. Schicht stärker als bei der vergleichbaren wirkstofffreien Beschichtung, obwohl bei der PLL-Schicht kein Wirkstoff in die Multischichten eingebaut wird (Abbildung 72). Dies lässt eine eingeschränkte Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes vermuten und führt zu einem kontinuierlichen Verlauf der UV-Absorption. Wahrscheinlich wird das Messergebnis durch Streuung, Reflexion, intermolekulare Wechselwirkungen oder eine inhomogene Wirkstoffverteilung in den Polyelektrolytmultischichten beeinflusst. Zum Vergleich mit anderen Beschichtungen wurden trotz der Hinweise auf die eingeschränkte Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes aus den UV-Werten bei 230 nm ($\epsilon=29800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) die PTx-Beladungen kalkuliert. Die berechnete UV-Absorption von 1,0 nach 21 Schichten korreliert mit einer PTx-Beladung von ca. $14,4 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($n=5$). Das ist die größte PTx-Beladung für Multischichten mit 11 PG-PTx Schichten die im Rahmen dieser Arbeit erhalten wurde. Die QCM-D-Messergebnisse der salzfreien Beschichtung mit PG30-PTx bei pH 5,6 sind wie bei den entsprechenden wirkstofffreien Multischichten nicht auswertbar.

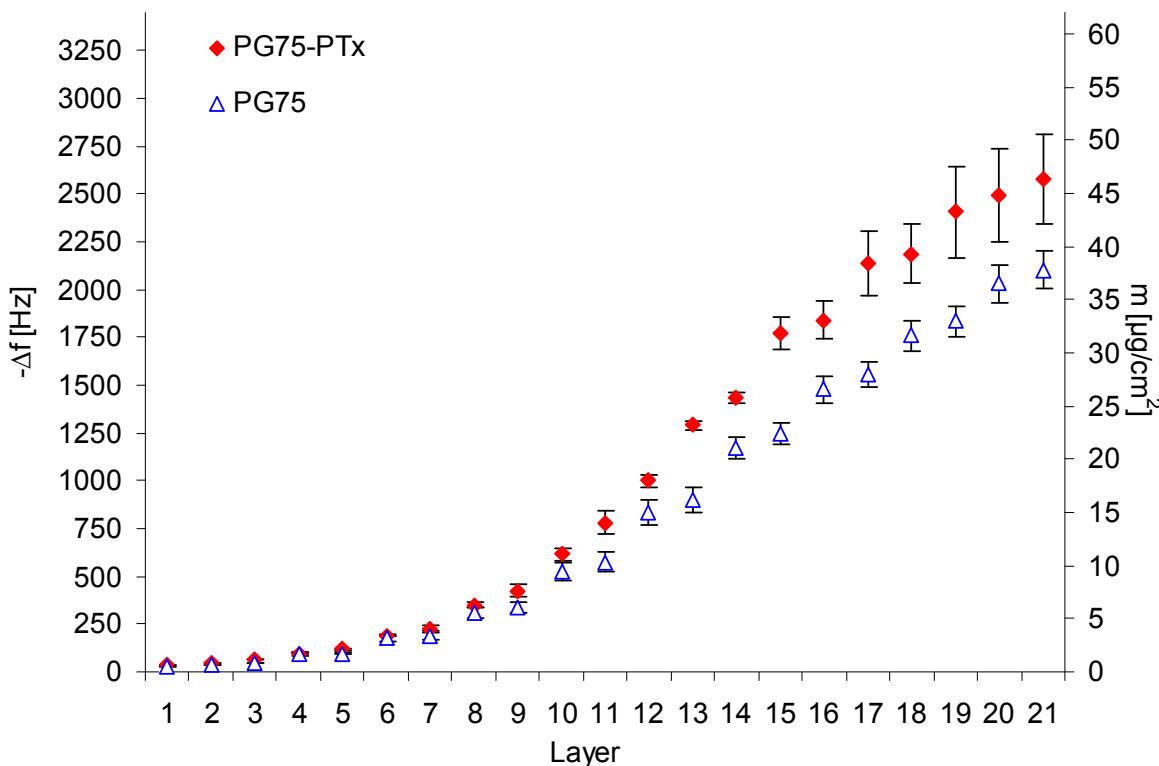


Abbildung 73: Verlauf der LbL-Beschichtungen $(\text{PG75-PTx/PLL})_{10}-\text{PG75-PTx}$ im Vergleich zu der LbL-Beschichtung $(\text{PG75/PLL})_{10}-\text{PG75}$; Assemblierung bei pH 5,6 ohne Zusatz an NaCl; analysiert mit der QCM-D

In Abbildung 73 ist der Verlauf der Beschichtung $(\text{PG75-PTx}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75-PTx}$, analysiert mit der QCM-D, zusammen mit der wirkstofffreien Beschichtung dargestellt. Das Messergebnis zeigt eine kontinuierliche Beschichtung von PG75-PTx und PLL bei geringer Ionenstärke. Ab der 16. Schicht verringert sich, wie auch bei der Beschichtung mit PG75, die Frequenzänderung pro Schicht deutlich, was auf eine abweichende Festigkeit oder Zusammensetzung der Beschichtung schließen lässt. Damit verbunden ist eine deutliche Zunahme der Standardabweichung. Die Beschichtung mit PG75-PTx führt zu einer stärkeren Abnahme der Resonanzfrequenz bei erheblich höheren Dämpfungen (Abbildung 74) im Vergleich zu PG75. Ab der 12. Schicht unterscheiden sich Resonanzfrequenzen und Dissipationsfaktoren beim Aufbau der Beschichtung mit PG75 oder PG75-PTx signifikant (Two Way ANOVA mit Einzelvergleichen (Tukey Test), Faktor A: Polymer, Faktor B: Anzahl an Schichten).

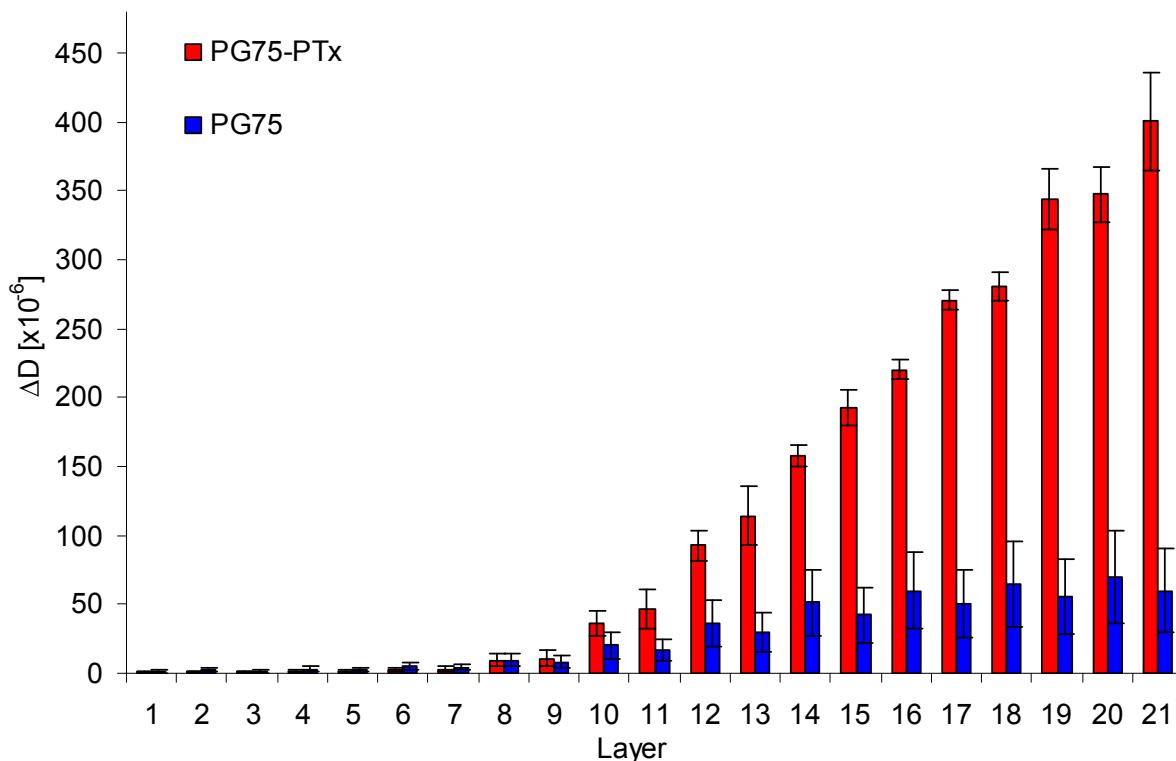


Abbildung 74: Verlauf des Dissipationsfaktors der LbL-Beschichtungen $(\text{PG75-PTx}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75-PTx}$ und $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 ohne Zusatz an NaCl; analysiert mit der QCM-D

Das Abflachen der Resonanzfrequenz (> 16 Schichten, Abbildung 73) kann auch durch die hohen Dissipationsfaktoren hervorgerufen werden, da die gesamte Struktur möglicherweise nicht mehr der Schwingung folgt. Nach 21 Schichten wird eine Beschichtung mit ca. $46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ aus den QCM-D-Daten für die Beschichtung (PG75-

$\text{PTx/PLL}_{10}\text{-PG75-PTx}$ kalkuliert (Auswertung nach Sauerbrey unter Annahme einer Dichte von 1050 kg/m^3). Das entspricht einer Zunahme von ca. 21 % gegenüber den unbeladenen PEM mit PG75 (ca. $38 \mu\text{g/cm}^2$).

Wie bei der Assemblierung bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl wird auch bei der Beschichtung ohne Zusatz von NaCl ein starker Einfluss von PTx auf die Resonanzfrequenz gemessen. Unklar ist, ob durch PTx die räumliche Struktur der PG-Schicht in den PEM und / oder die Quellung beeinflusst wird. Unter Umständen findet auch ein stärkeres Wachstum aufgrund hydrophober Bindungen statt. Der starke Anstieg der Dämpfung bei der Beschichtung mit PG75-PTx lässt vermuten, dass eine Strukturänderung der PEM durch PTx hervorgerufen wird.

Die Beschichtung $(\text{PG75-PTx/PLL})_{10}\text{-PG75-PTx}$ wurde auch mit der UV-Spektroskopie beim bevorzugten pH-Wert von 5,6 ohne Zusatz von NaCl untersucht (Abbildung 75). Das Resultat bestätigt den wie mit der QCM-D analysierten kontinuierlichen und nicht-linearen Aufbau von Multischichten mit PG75-PTx unter diesen Beschichtungsbedingungen.

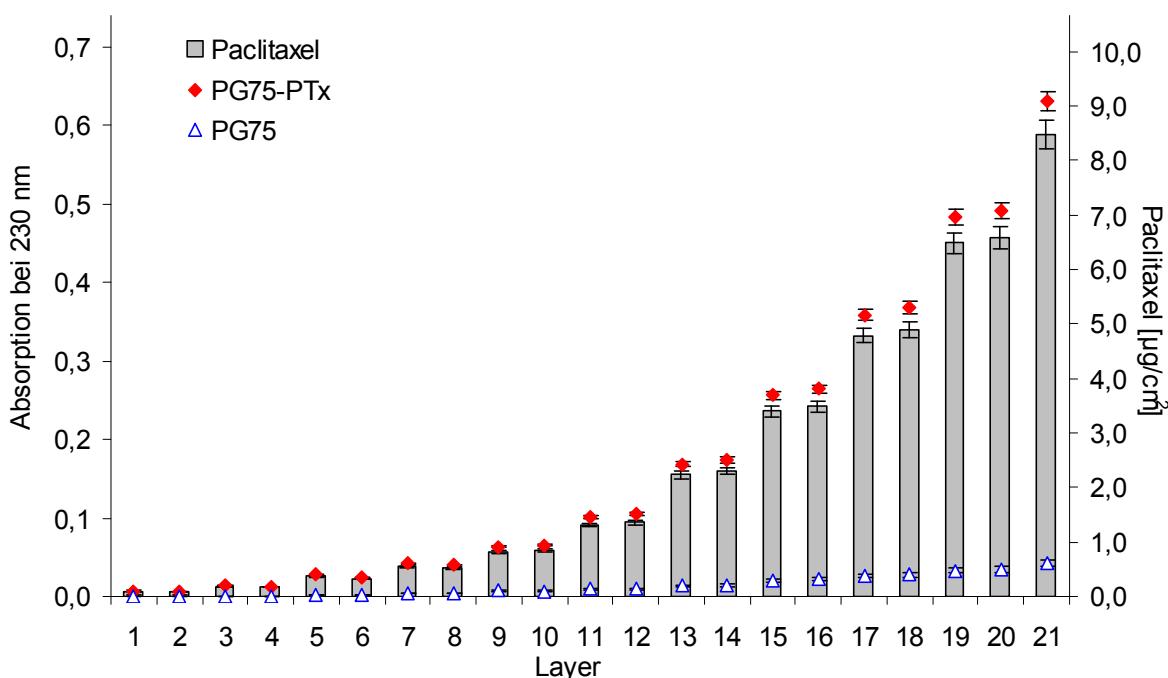


Abbildung 75: Verlauf der UV-Absorption bei 230 nm der LbL-Beschichtung $(\text{PG75-PTx/PLL})_{10}\text{-PG75-PTx}$ und $(\text{PG75/PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; Absorption von Paclitaxel berechnet

Mit steigender Anzahl an Polyelektrolytschichten erhöht sich die Absorption bei 230 nm. Dabei zeigt die berechnete PTx-Beladung (Balkendiagramm Abbildung 75) im Gegensatz zu der Beschichtung mit PG30-PTx wieder einen treppenförmigen

Verlauf. Die PG75-PTx Schichten führen zu einer stärkeren Zunahme der UV-Absorption als die PLL-Schichten. Die Beschichtung $(PG75/PLL)_{10}$ -PG75-PTx und $(PG75/PLL)_{10}$ -PG75 erreicht nach 21 Schichten eine theoretische PTx-Beladung von $8,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Auch die AFM-Untersuchungen an trockenen Filmen bestätigen, dass ein Aufbau von Multischichten ohne Zusatz von NaCl bei pH 5,6 mit PG30-PTx (Abbildung 76) und PG75-PTx (Abbildung 77) stattfindet.

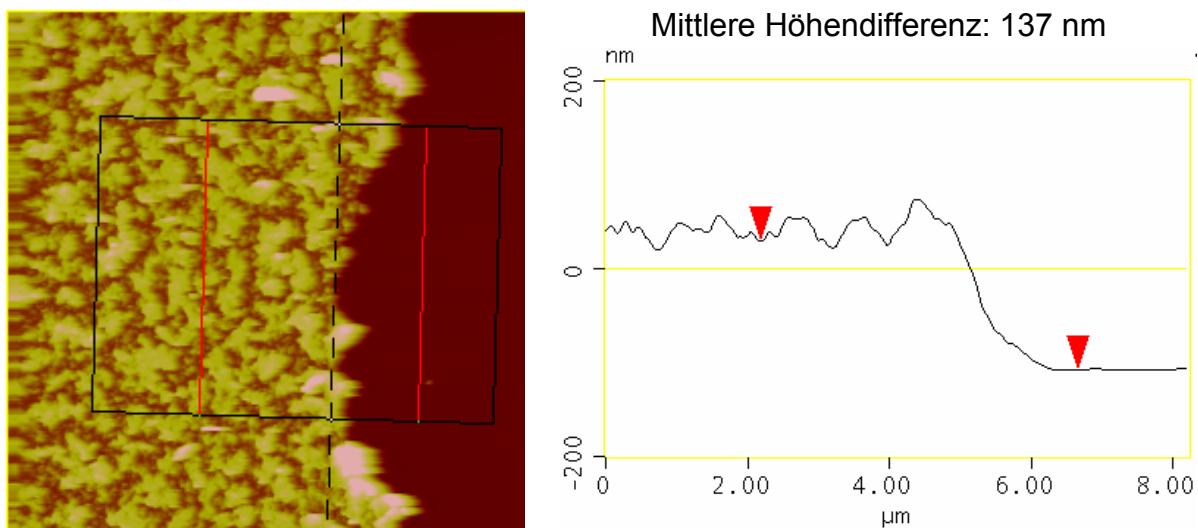


Abbildung 76: Bestimmung der Filmdicke mit AFM an trockenen Multischichten aus $(PG30/PLL)_{10}$ -PG30-PTx; assembliert bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

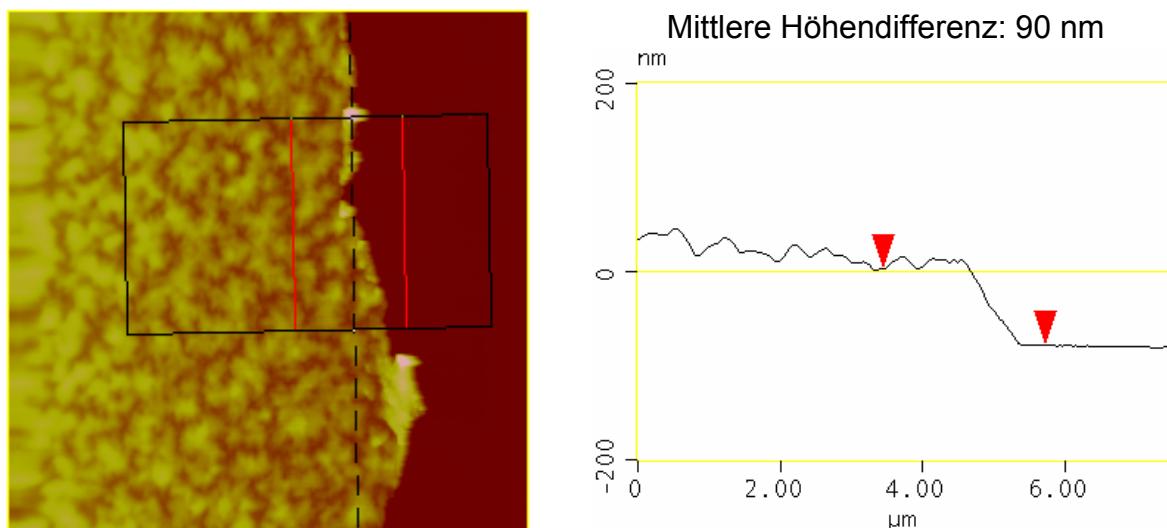


Abbildung 77: Bestimmung der Filmdicke mit AFM an trockenen Multischichten aus $(PG75/PLL)_{10}$ -PG75-PTx; assembliert bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

Die Schichtdicken der Beschichtungen ohne Zusatz von NaCl bei pH 5,6 sind in Abbildung 78 zusammen mit den wirkstofffreien Multischichten dargestellt. Sowohl bei PG30 als auch bei PG75 vergrößert sich durch die Verwendung von PG-PTx-Konjugaten die Filmdicke. Im Vergleich zur Beschichtung mit PG75-PTx in Anwesenheit von 0,2 M NaCl (106 nm) wurden ohne Zusatz von NaCl mit ca. 90 nm erheblich dünnere PEM bestimmt. Nach 21 Schichten wurde die stärkste Beschichtung mit ca. 137 nm bei der salzfreien Assemblierung von PG30-PTx gefunden. Durch die Ankopplung von PTx an PG30 vergrößert sich die Filmdicke um ca. 19 nm. Die Beeinflussung durch die Konjugation mit Paclitaxel ist bei PG75 mit 29 nm größer als bei PG30 wobei berücksichtigt werden muss, dass zwischen den einzelnen Messungen deutlich größere Abweichungen vorhanden sind (90 ± 11 nm). Die großen Abweichungen zwischen den einzelnen Messungen werden möglicherweise durch eine inhomogene Beschichtung oder unvollständige Trocknung hervorgerufen. Insgesamt ist die Filmdicke der salzfreien Beschichtung mit PG75-PTx deutlich dünner als bei PG30-PTx (Abbildung 78).

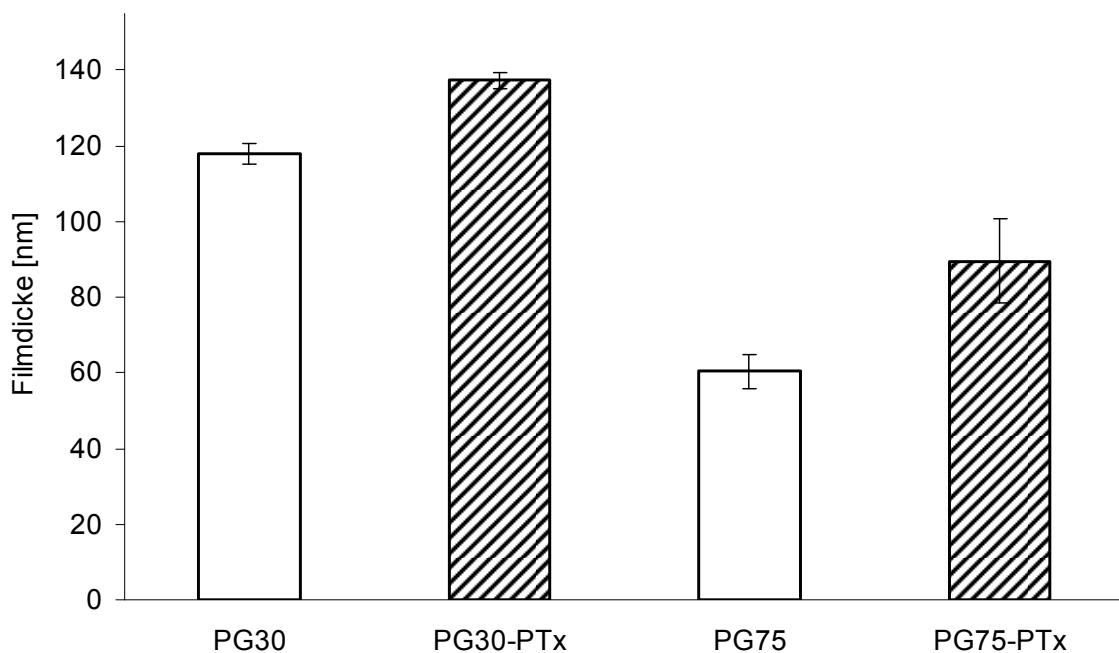


Abbildung 78: Vergleich der Filmdicken von Multischichten mit 21 Schichten aus $(\text{PG30}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30}$, $(\text{PG30-PTx}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30-PTx}$, $(\text{PG75}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75}$ und $(\text{PG75-PTx}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75-PTx}$; LbL-Beschichtungen bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; Bestimmung der Dicke an trockenen Filmen (n=3) mit AFM

Die Ergebnisse zum Aufbau von wirkstoffhaltigen Multischichten ohne Zusatz von NaCl bei pH 5,6 zeigen, dass eine kontinuierliche Beschichtung mit PG30-PTx oder PG75-PTx zusammen mit PLL unter diesen Bedingungen möglich ist. Durch den

Einbau von PTx vergrößert sich bei beiden Molekulargewichten der PG die Dicke der trockenen Multischichten. An der Beschichtung $(\text{PG30-PTx/PLL})_{10}\text{-PG30-PTx}$, assembliert bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl, wurde die höchste Wirkstoffbeladung ($14,4 \pm 0,7 \mu\text{g/cm}^2$ PTx) und Filmdicke (137 nm) bestimmt.

3.3.3 LbL-Beschichtung bei pH 7,6 mit 0,2 M NaCl

Auch unter diesen Bedingungen, wo PG komplett deprotoniert vorliegt, wurde der Aufbau von Multischichten mit PG75-PTx untersucht, um die Ergebnisse mit der Assemblierung bei pH 5,6 vergleichen zu können. In Abbildung 79 ist der Verlauf der UV-Absorption (230 nm) von der Beschichtung $(\text{PG75-PTx/PLL})_{10}\text{-PG75-PTx}$ bei pH 7,6 mit 0,2 M NaCl zusammen mit dem dazugehörigen wirkstofffreien System dargestellt. Die UV-Untersuchungen zeigen, dass wie zu erwarten eine Beschichtung mit PG75-PTx und PLL stattfindet. Mit steigender Anzahl an Schichten erhöht sich die Absorption bei 230 nm.

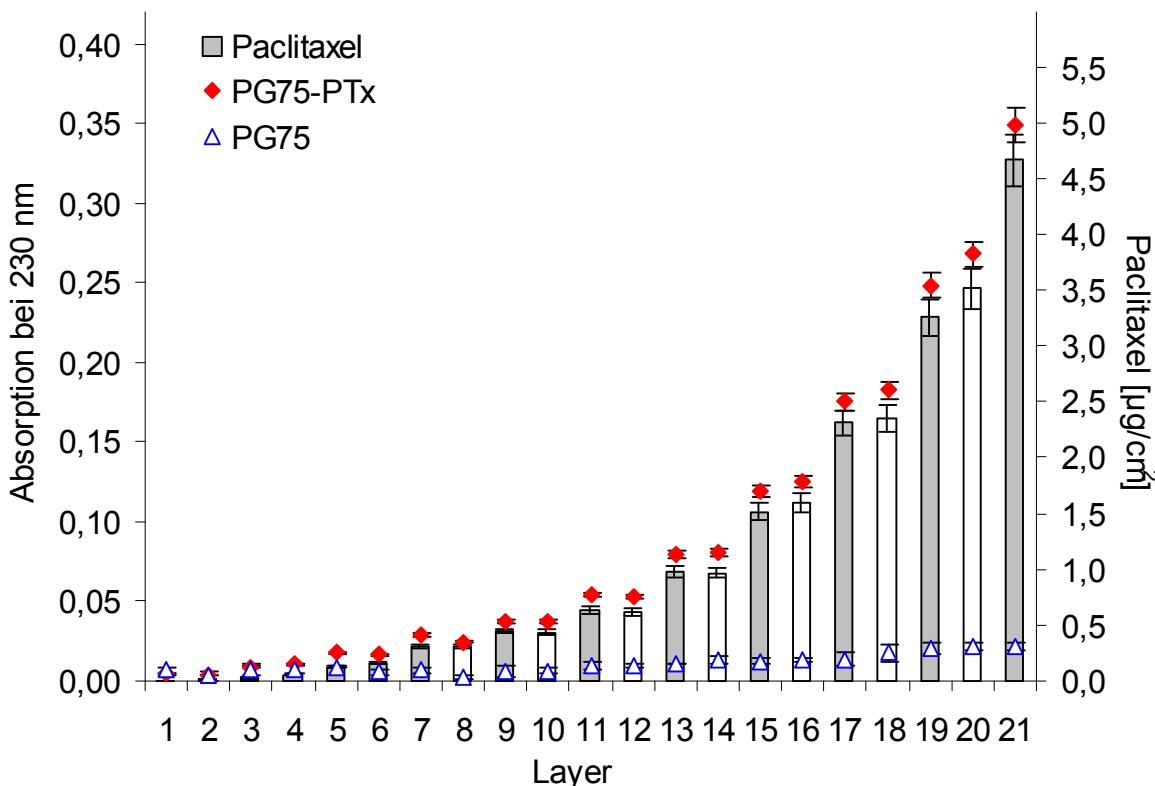


Abbildung 79: Verlauf der UV-Absorption der LbL-Beschichtung $(\text{PG75-PTx/PLL})_{10}\text{-PG75-PTx}$ und $(\text{PG75/PLL})_{10}\text{-PG75}$ bei pH 7,6 mit 0,2 M NaCl; Absorption von Paclitaxel berechnet

Die wirkstofffreie Beschichtung $(\text{PG75/PLL})_{10}\text{-PG75}$, hat nach 21 Schichten eine erheblich geringe Absorption (ca. 0,02) als die Multischichten mit PTx (0,35). Nach Abzug des Blindwertes von 0,02 verbleibt eine Absorption von 0,33 die rechnerisch einer PTx-Beladung von ca. $4,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ entspricht.

Der Vergleich der UV-Absorption zwischen der Beschichtung bei pH 5,6 (Absorption von ca. 1,1 bei 230 nm, Abbildung 72) und der bei pH 7,6 belegt das schwächere Schichtenwachstum der Beschichtung bei pH 7,6. Die Beschichtung $(\text{PG75-PTx/PLL})_{10}\text{-PG75-PTx}$ bei pH 7,6 mit 0,2 M NaCl hat getrocknet eine Filmdicke von $86 \pm 6 \text{ nm}$ (Abbildung 80).

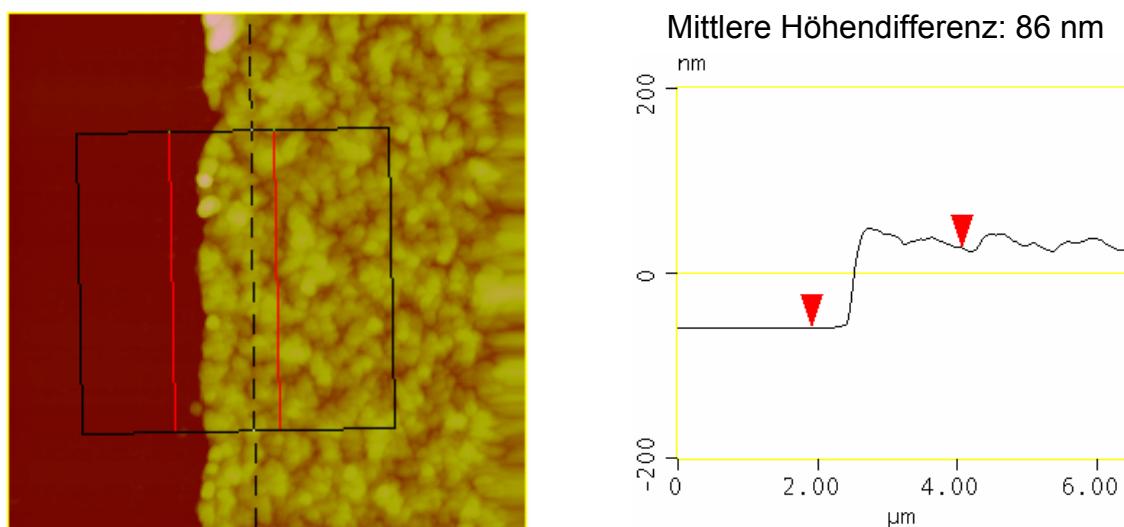


Abbildung 80: Bestimmung der Filmdicke mit AFM an trockenen Multischichten aus $(\text{PG75-PTx/PLL})_{10}\text{-PG75-PTx}$; assembliert bei pH 7,6 mit 0,2 NaCl; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

Die AFM-Untersuchungen an PEM mit PG75-PTx bestätigen den homogenen Aufbau von Multischichten mit PG75-PTx bei pH 7,6. An unter identischen Bedingungen aufgebauten wirkstofffreien Multischichten wurde eine ähnliche Schichtdicke von $85 \pm 3 \text{ nm}$ gemessen (Abbildung 26). Somit ist an den bei 7,6 aufgebauten Multischichten im Gegensatz zu den Ergebnissen bei pH 5,6 keine Zunahme der Filmdicke durch die Verwendung von PG75-PTx zu beobachten.

Aufgrund der Stabilität von PG-PTx und der stärkeren Beschichtung bei pH 5,6 wird daher der Aufbau von Paclitaxel-haltigen PEM mit PLL bei diesem pH-Wert bevorzugt.

3.3.4 Untersuchung der Wirkstofffreisetzung aus PEM mit PG-PTx

Das Ziel der Versuche war es zu prüfen, ob Paclitaxel aus den Multischichten freigesetzt wird und mit welcher Kinetik die Abgabe erfolgt. Die Charakterisierung der Freisetzung aus LbL-Beschichtungen mit PG-PTx erfolgte in Anlehnung an die Methode von Ranade et al. für PTx-haltige Stents (Taxus) [35]. Hierfür wird als Freisetzungsmedium saliner Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS) mit 0,05 % (m/V) Tween 20 verwendet [35]. Der Zusatz von Tween 20 (Polysorbat 20) oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC, 0,06 mg/ml) ist aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von PTx notwendig [298]. Eigenen Vorversuchen nach liegt die Sättigungslöslichkeit von PTx im Freisetzungsmedium bei ca. 3,3 µg/ml (RT). Weiterhin wurde bei den Freisetzungsversuchen entsprechend Ranade et al. an festgelegten Zeitpunkten das Freisetzungsmedium komplett mit frischem Medium gewechselt und zusätzlich bei jedem Mediumswechsel die beschichtete Oberfläche (6 cm^2) mehrfach gespült. Dies ist notwendig, um Sink-Bedingungen aufrecht zu halten [35]. Um einen eventuellen Einfluss der Assemblierungsbedingungen auf die Wirkstofffreisetzung feststellen zu können, wurden alle Beschichtungen mit derselben Freisetzungsmethode analysiert.

In Tabelle 6 sind die zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung hergestellten LbL-Beschichtungen zusammengestellt. Für die Versuche wurden Beschichtungen mit jeweils 21 Polyelektrolytschichten hergestellt. Aufgrund des starken Einflusses der Beschichtungsbedingungen auf das Schichtenwachstum haben die Multischichten unterschiedliche Wirkstoffbeladungen. Die berechneten PTx-Beladungen am Start der Freisetzungsversuche sind zusammen mit den direkt nach den Beschichtungen bestimmten Werten in Tabelle 6 aufgeführt. Bis zum Start der Freisetzungsversuche verringerte sich bei allen Beschichtungen der PTx-Gehalt, da die Multischichten nicht trocken gelagert wurden.

Tabelle 6: Übersicht der LbL-Beschichtungen zur Untersuchung der PTx-Freisetzung; Beschichtung von Quarzglas und Silizium; ¹⁾ kalkulierte Beladung anhand der UV-Absorption direkt nach der LbL-Beschichtung

LbL-Beschichtung			Beladung PTx [µg/cm ²]	Anzahl der Versuche
Polymersequenz	pH	NaCl [M]		
(PG75-PTx/PLL) ₁₀ -PG75-PTx	7,6	0,2	3,3 (4,7 ¹⁾)	1
(PG75-PTx/PLL) ₁₀ -PG75-PTx	5,6	0,2	4,5 (6,9 ¹⁾)	1
(PG75-PTx/PLL) ₁₀ -PG75-PTx	5,6	0,0	5,2 (8,4 ¹⁾)	1
(PG30-PTx/PLL) ₁₀ -PG30-PTx	5,6	0,2	3,8 (5,0 ¹⁾)	1
(PG30-PTx/PLL) ₁₀ -PG30-PTx	5,6	0,0	10,8 (14,4 ¹⁾)	5

In Abbildung 81 sind die analysierten Wirkstofffreisetzungen aus Multischichten mit PG75-PTx dargestellt. Alle drei Beschichtungen zeigen ein annähernd identisches

Freisetzungprofil insbesondere wenn man berücksichtigt, dass die Versuche an nur jeweils einer Beschichtung durchgeführt wurden. Die Unterschiede der Wirkstofffreisetzung zwischen den einzelnen Beschichtungen mit PG75-PTx liegen im Bereich der Fehlergrenze der indirekten Analysenmethode. Nach einer stärkeren PTx-Freisetzung innerhalb der ersten 6-7 Tage, ist eine Abnahme der Freisetzung zu beobachten. Ab der 3. Woche wird keine weitere Freisetzung bzw. Verringerung der UV-Absorption bei 230 nm mehr festgestellt.

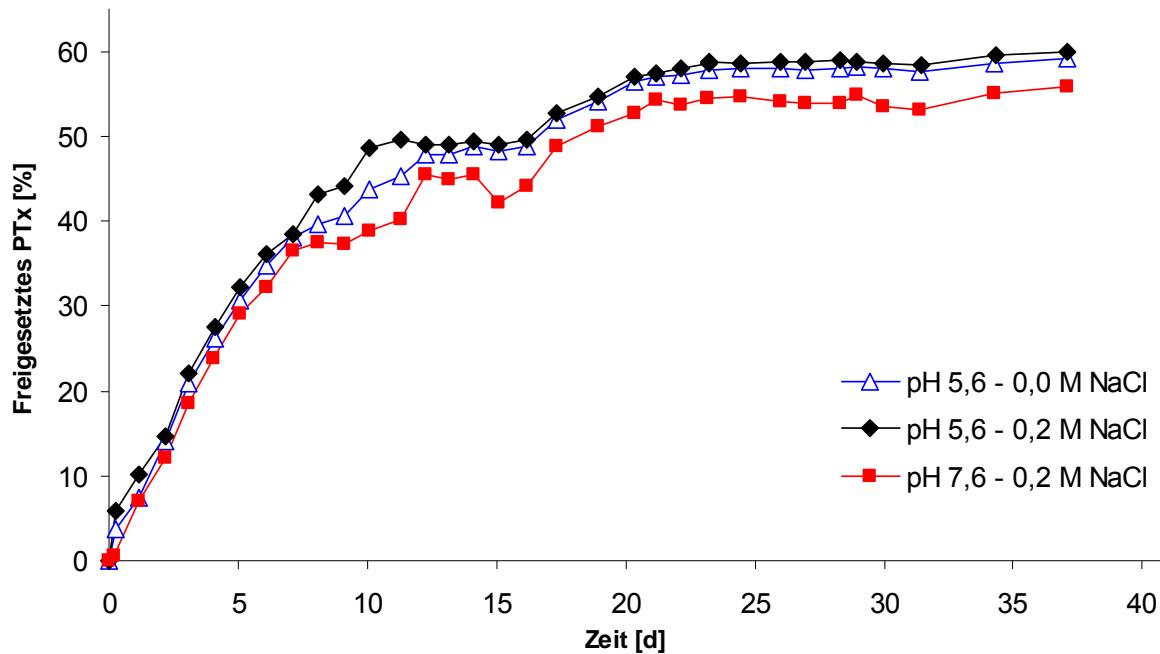


Abbildung 81: Freisetzung von PTx aus Multischichten mit PG75-PTx; Untersuchungen an den LbL-Beschichtungen ($(\text{PG75-PTx/PLL})_{10}$ -PG75-PTx) aufgebaut bei pH 5,6 mit und ohne Zusatz von 0,2 M NaCl sowie bei pH 7,6 mit 0,2 M NaCl

Ein ähnlicher Verlauf der PTx-Freisetzung wurde von den Multischichten mit PG30-PTx analysiert (Abbildung 82). Auch hier erfolgt die stärkste Abnahme der UV-Absorption in den ersten Tagen und ist bis zu ca. 3 Wochen messbar. Die Analyse der Wirkstofffreisetzung der LbL-Beschichtung mit der höchsten PTx-Beladung ($(\text{PG30-PTx/PLL})_{10}$ -PG30-PTx, ohne Zusatz von NaCl aufgebaut bei pH 5,6) wurde 5fach durchgeführt. Zwischen den Messwerten der einzelnen Beschichtungen wird eine Varianz von maximal 2 % analysiert. Sowohl die Beschichtungsmethode als auch die Freisetzung sind offensichtlich sehr stabil und liefert reproduzierbare Ergebnisse. Die Untersuchungen verdeutlichen, dass bereits ab dem ersten Tag eine kontinuierliche Abnahme der Wirkstofffreisetzung erfolgt. Bei allen Beschichtungen mit PG-PTx wurde festgestellt, dass innerhalb von 1 Monat nur ca. 50 – 60 % des inkorporierten Paclitaxels abgegeben werden unabhängig vom Molekulargewicht der PG und den Beschichtungsbedingungen.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode zur Bestimmung der Wirkstofffreisetzung nutzt als Indikator die Abnahme der UV-Absorption bei 230 nm. Diese indirekte Analyse musste aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit und Nachweisgrenze von PTx, der begrenzt verfügbaren Probenmenge sowie der Toxizität angewendet werden. Sie liefert nicht den direkten Beweis für eine Freisetzung von PTx, da auch eine Degradation der Multischichten zu einer Verringerung der UV-Absorption führen kann.

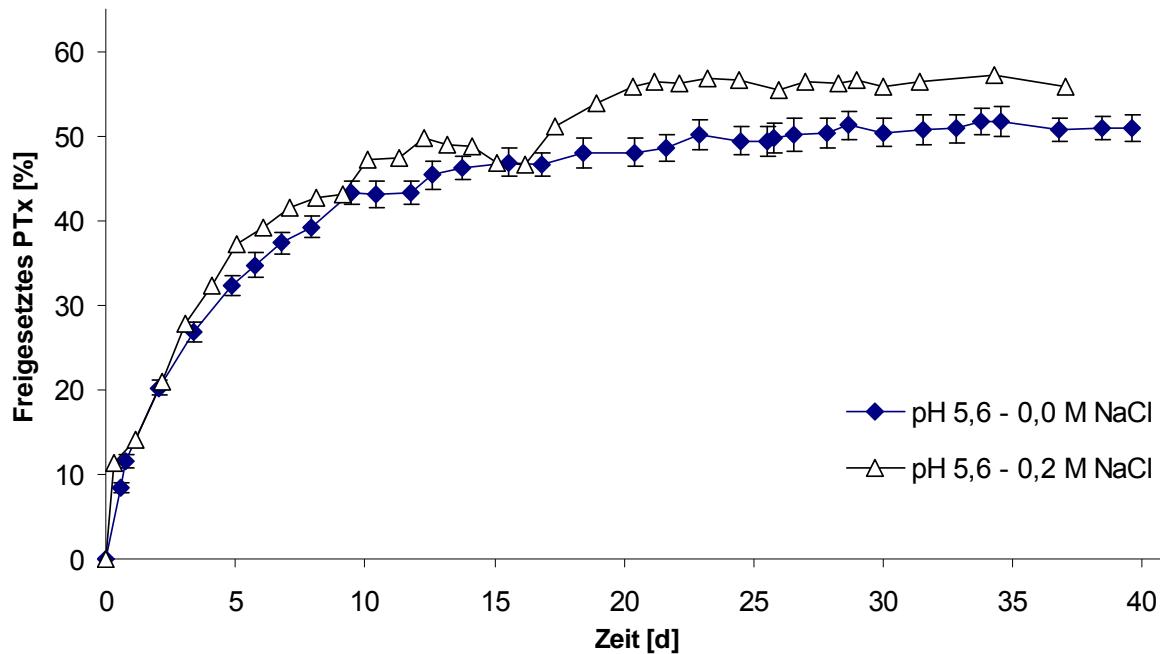


Abbildung 82: Freisetzung von PTx aus Multischichten mit PG30-PTx; Untersuchungen an den LbL-Beschichtungen $(\text{PG30-PTx}/\text{PLL})_{10}$ -PG30-PTx aufgebaut bei pH 5,6 mit und ohne Zusatz von 0,2 M NaCl

Um festzustellen, ob PTx aus den Multischichten freigesetzt wird und die Beschichtungen unter den Bedingungen (37°C, Phosphatpuffer pH 7,4 mit Tween 20) stabil sind, wurde das Freisetzungsmittel mit der HPLC auf PTx (siehe auch unter 2.2.5) untersucht und die Struktur der PEM nach der Lagerung im Freisetzungspuffer mit der AFM analysiert. Für diese Versuche wurden Siliziumscheiben (ca. 1,3 cm²) mit den PEM aus Tabelle 6 beschichtet und im Anschluss daran im Freisetzungspuffer gelagert. Nach ca. 1 Woche wurde das Medium entnommen und mit HPLC auf PTx untersucht. Diese lange Lagerung ohne Medienwechsel war notwendig, um sicherzustellen, dass die Nachweisgrenze der HPLC-Methode überschritten wird. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde das Freisetzungsmittel mehrfach ausgetauscht. Bevor die Schichtdicken mit der AFM analysiert wurden, lagerten die beschichteten Siliziumscheiben insgesamt für mehr als 2 Monate im Phosphatpuffer pH 7,4 mit Tween 20 bei 37°C.

In Abbildung 83 ist beispielhaft eine HPLC-Messung der Beschichtung ($\text{PG30-PTx/PLL}_{10}\text{-PG30-PTx}$, aufgebaut bei pH 5,6 und geringer Ionenstärke, zusammen mit PTx dargestellt. Entsprechend Paclitaxel, welches bei ca. 9,1 min eluiert wird, ist auch in der Freisetzungsprüfung ein deutlicher Peak bei dieser Retentionszeit vorhanden.

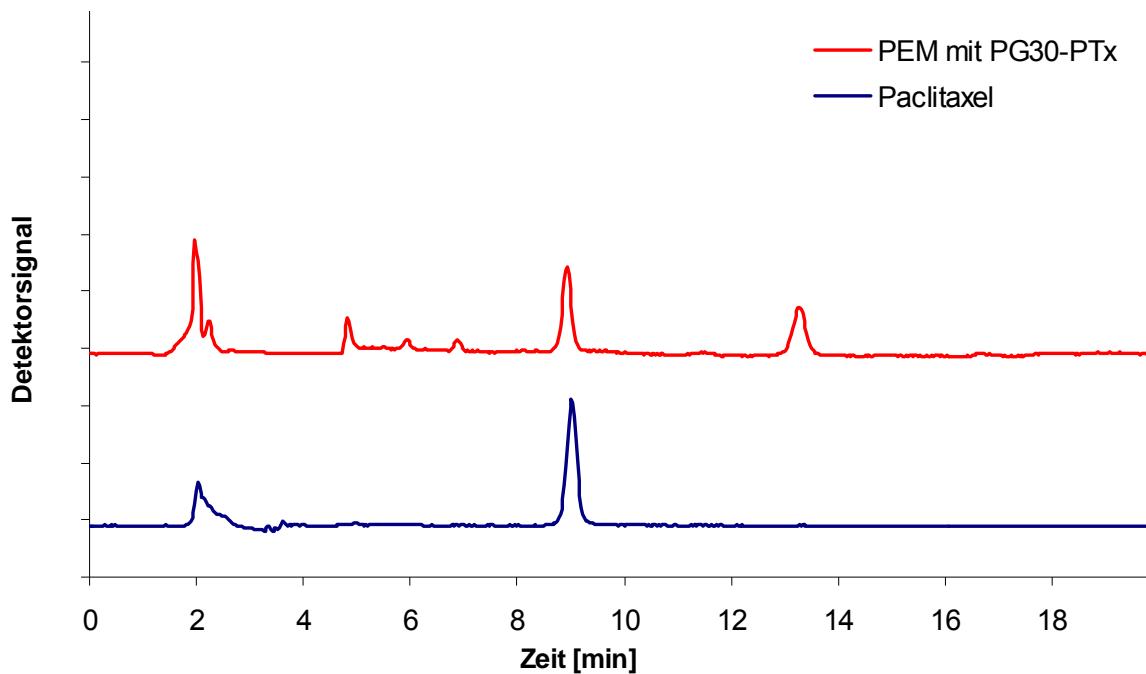


Abbildung 83: Untersuchung der Freisetzung der Beschichtung ($\text{PG30-PTx/PLL}_{10}\text{-PG30-PTx}$ mit der HPLC, Chromatogramm bei 232 nm im Vergleich zu PTx gelöst in Methanol

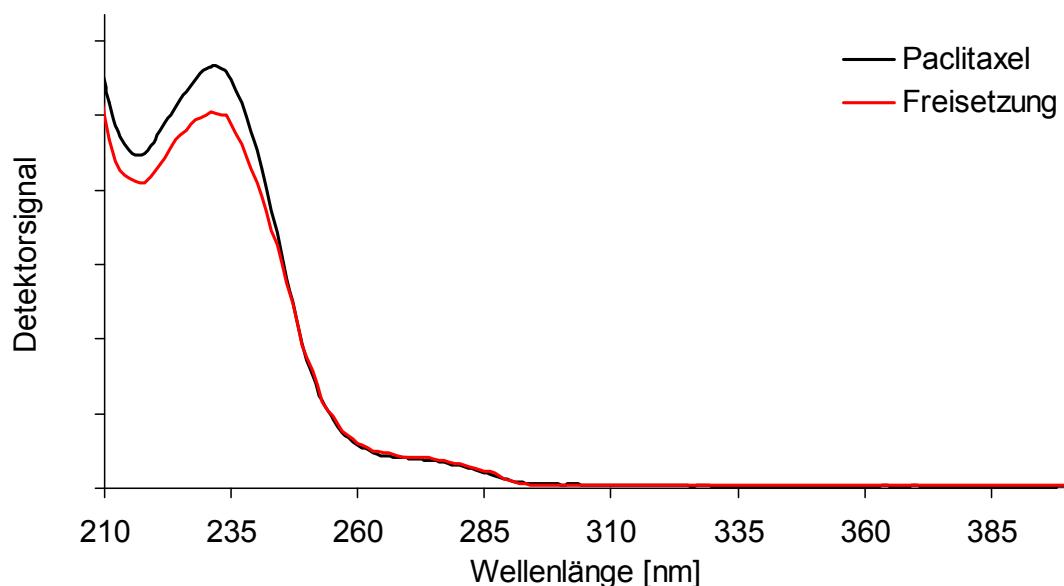


Abbildung 84: UV-Spektren nach 9 min von Paclitaxel und der Freisetzung der Beschichtung ($\text{PG30-PTx/PLL}_{10}\text{-PG30-PTx}$; analysiert mit der HPLC

Da auch die UV-Spektren bei ca. 9,1 min im Chromatogramm übereinstimmen, ist davon auszugehen, dass der Peak Paclitaxel entspricht und somit die Beschichtung mit PG30-PTx den Wirkstoff abgibt (Abbildung 84). Auch bei den anderen Beschichtungen mit PG-PTx wurde unabhängig vom Molekulargewicht der PG (PG30-PTx oder PG75-PTx) freies PTx mit der HPLC nachgewiesen. Neben dem PTx-Peak sind in dem Chromatogramm der Freisetzungsprobe weitere vorhanden, die auf Zersetzungsprodukte oder Syntheseverunreinigungen hindeuten (Abbildung 83).

Um die Gültigkeit der UV-Ergebnisse der Freisetzungsexperimente zu bestätigen (Abbildung 81 und Abbildung 82), wurde die Stabilität und Filmdicke der wirkstofffreien LbL-Beschichtung (PG75/PLL)₁₀-PG75, aufgebaut bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl, sowie der Multischichten mit PTx aus Tabelle 6 unter den Freisetzungsbedingungen untersucht.

Dafür wurde die Beschichtung (PG75/PLL)₁₀-PG75 für mehr als 2 Monate im Freisetzungsmedium bei 37°C gelagert. Auch nach der Lagerung sind PEM mit der AFM nachweisbar vorhanden. Die mikroskopische Erscheinung der im Freisetzungsmittel gelagerten Probe (Abbildung 85, PG75/PLL) unterscheidet sich dabei deutlich von der Probe nach der Assemblierung (Abbildung 32).

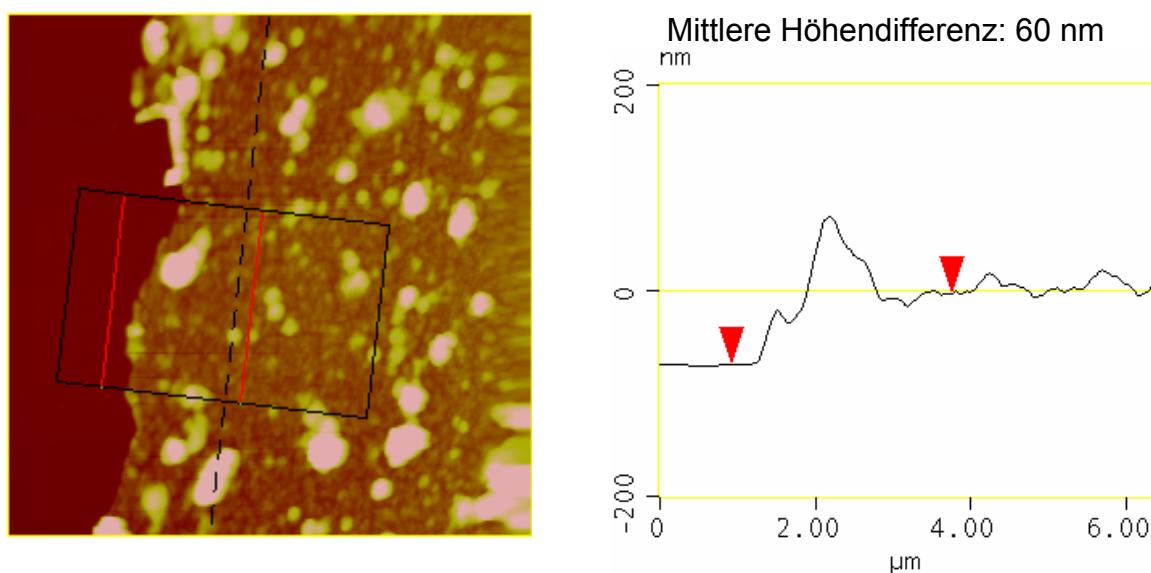


Abbildung 85: Untersuchung der Lagerstabilität im Freisetzungspuffer pH 7,4 mit 0,05 % Tween 20 der LbL-Beschichtung (PG75/PLL)₁₀-PG75; assembliert bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil; Lagerung bei 37°C über ca. 2,5 Monate

Das Bild zeigt erheblich mehr partikuläre Strukturen mit großer Höhe. Vermutlich war das Spülen der Multischichten zur Entfernung des Puffers nicht ausreichend, so dass teilweise das Freisetzungsmittel bei der Trocknung auf der Oberfläche auskristallisierte. Zur Bestimmung der Filmdicke wurden diese Bereiche nicht mit

herangezogen. Die Multischichten haben vor der Lagerung eine Dicke von ca. 60 ± 5 nm und danach von ca. 61 ± 8 nm. Es ist keine Beeinflussung der Filmdicke durch die Lagerung für mehr als 2 Monate in salinem PBS pH 7,4 mit 0,05 % Tween 20 feststellbar. Die PEM bedecken mikroskopisch homogen die beschichtete Oberfläche und sind offensichtlich unter den in vitro Bedingungen im Freisetzungsmedium lagerstabil.

Die folgenden Abbildungen zeigen die mikroskopischen Bilder der Beschichtungen mit PG75-PTx nach der Lagerung im Freisetzungspuffer.

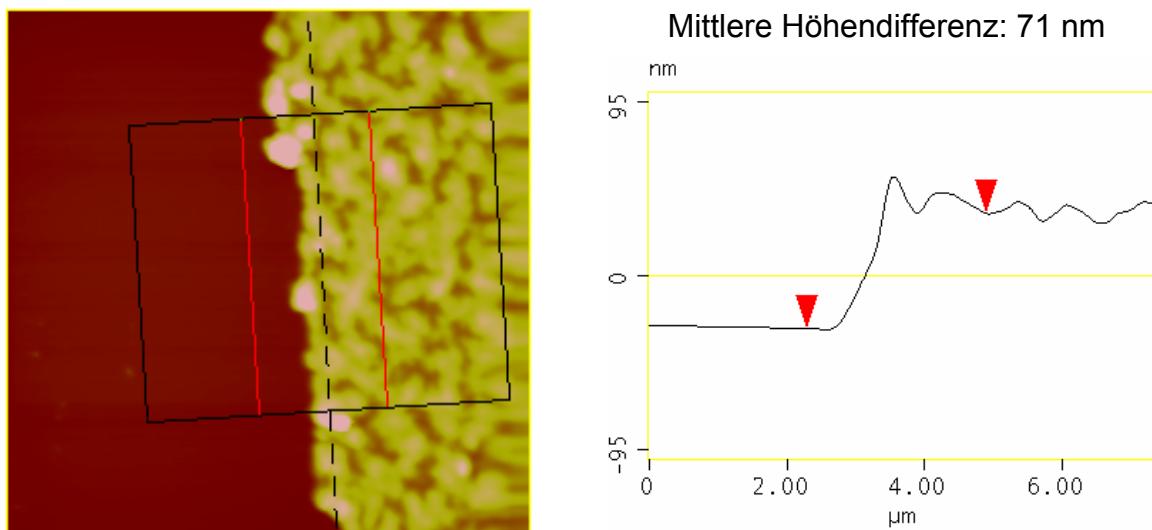


Abbildung 86: Bestimmung der Filmdicke der Beschichtung $(\text{PG75-PTx}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75-PTx}$ nach der Lagerung im Freisetzungspuffer pH 7,4 mit 0,05 % Tween 20; Beschichtung bei pH 7,6 mit 0,2 M NaCl; Lagerung bei 37°C für ca. 2,5 Monate; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

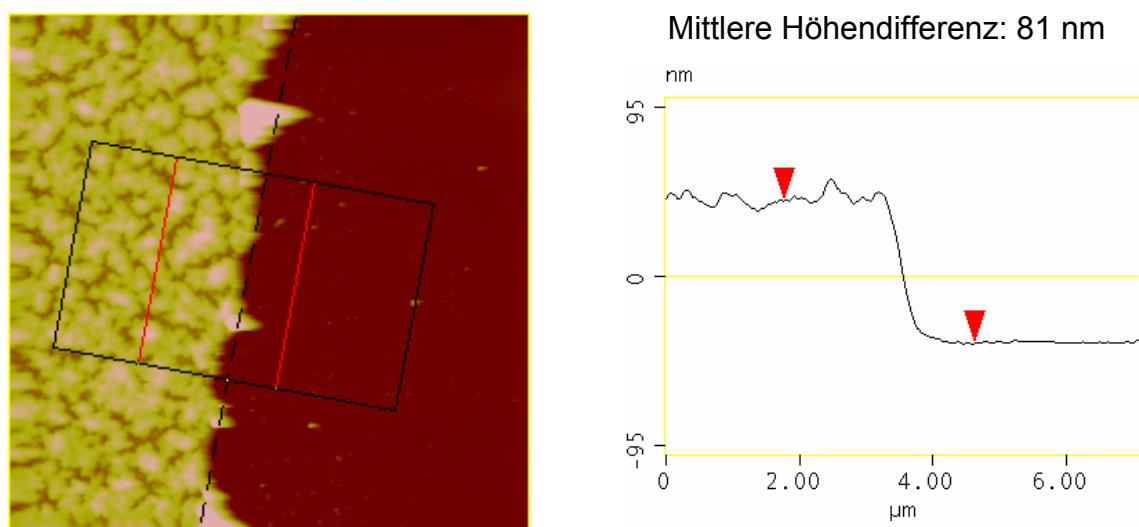


Abbildung 87: Bestimmung der Filmdicke der Beschichtung $(\text{PG75-PTx}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75-PTx}$ nach der Lagerung im Freisetzungspuffer pH 7,4 mit 0,05 % Tween 20; Beschichtung bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; Lagerung bei 37°C für ca. 2,5 Monate; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

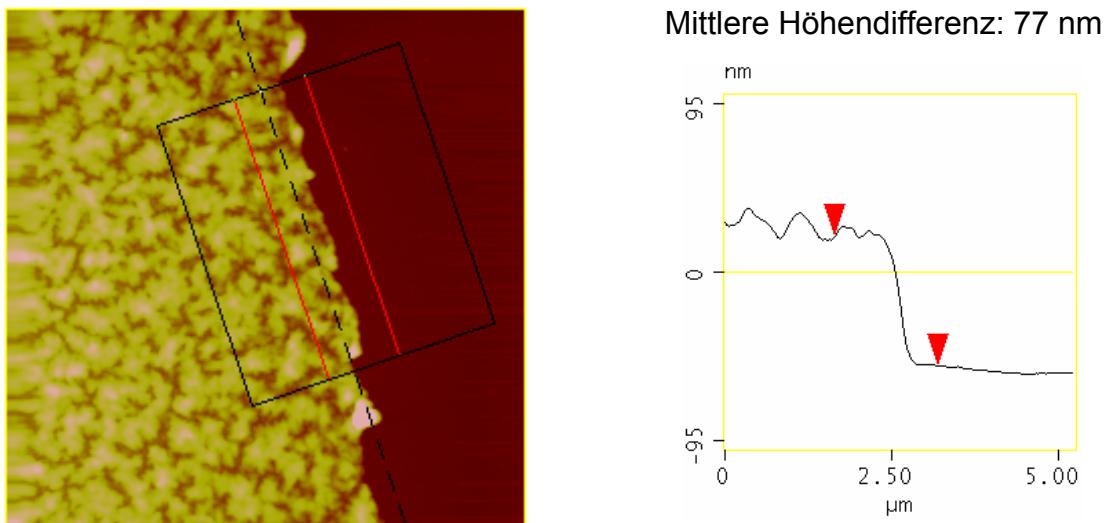


Abbildung 88: Bestimmung der Filmdicke der Beschichtung $(\text{PG75-PTx}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75-PTx}$ nach der Lagerung im Freisetzungspuffer pH 7,4 mit 0,05 % Tween 20; Beschichtung bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; Lagerung bei 37°C für ca. 2,5 Monate; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

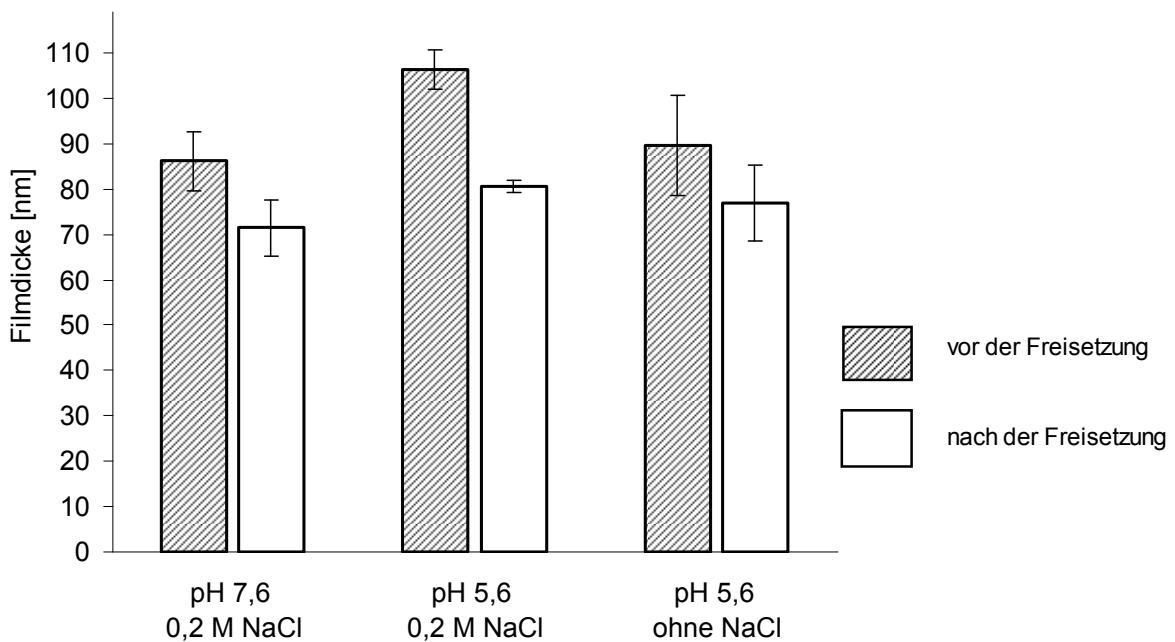


Abbildung 89: Vergleich der Filmdicken von Multischichten mit PG75-PTx vor und nach der Lagerung im Freisetzungspuffer pH 7,4 mit 0,05 % Tween 20; LbL-Beschichtungen $(\text{PG75-PTx}/\text{PLL})_{10}\text{-PG75-PTx}$ assembliert bei pH 7,6 mit 0,2 M NaCl, pH 5,6 mit 0,2 M und pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; Bestimmung der Filmdicke mit der AFM an trockenen PEM

Bei allen Proben wurden auch nach einer Lagerung im wässrigen Milieu Multischichten auf der Siliziumoberfläche gefunden. Ein großflächiges Ablösen der Multischichten oder Risse wurde nicht beobachtet. Allerdings verringert sich, wie anhand der Zusammenstellung in Abbildung 89 zu sehen, bei allen Beschichtungen während der Lagerung bzw. Wirkstofffreisetzung die Schichtdicke der PEM.

Auch von den Multischichten mit PG30-PTx wurde die Filmdicke nach der Lagerung im Freisetzungspuffer mit der AFM untersucht (Abbildung 90, Abbildung 91).

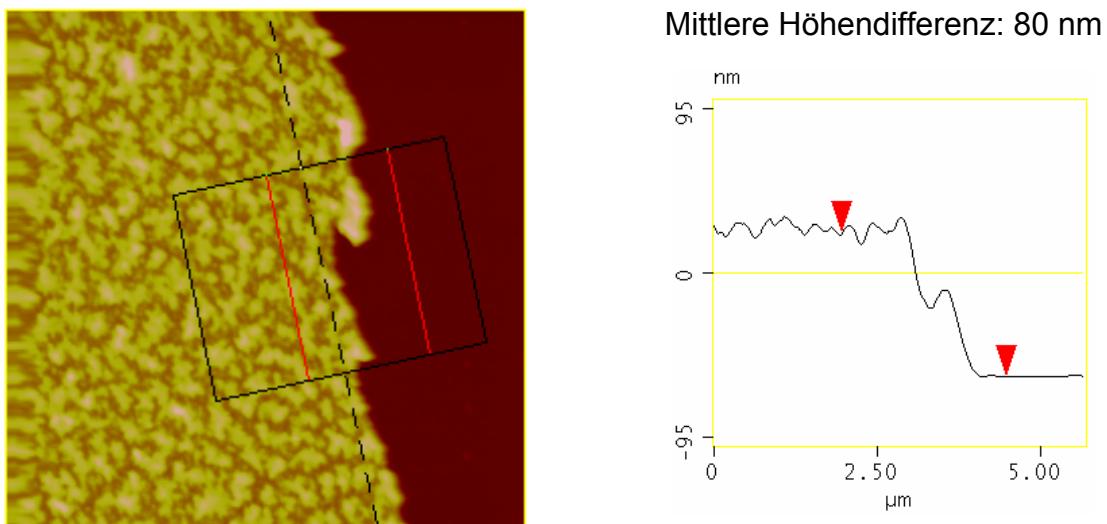


Abbildung 90: Bestimmung der Filmdicke der Beschichtung $(\text{PG30-PTx}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30-PTx}$ nach der Lagerung im Freisetzungspuffer pH 7,4 mit 0,05 % Tween 20; Beschichtung bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; Lagerung bei 37°C für ca. 2,5 Monate; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

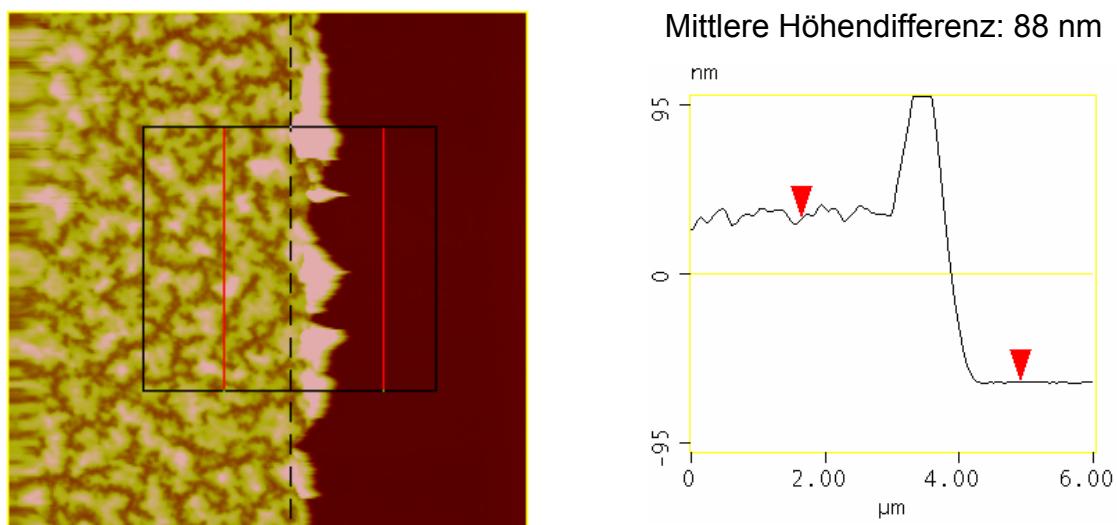


Abbildung 91: Bestimmung der Filmdicke der Beschichtung $(\text{PG30-PTx}/\text{PLL})_{10}\text{-PG30-PTx}$ nach der Lagerung im Freisetzungspuffer pH 7,4 mit 0,05 % Tween 20; Beschichtung bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl; Lagerung bei 37°C für ca. 2,5 Monate; links mikroskopisches Bild mit Messpunkten für Schichtdickenanalyse, rechts Höhenprofil

Die untersuchten Beschichtungen mit PG30-PTx verringern während der Lagerung im Freisetzungsmittel ihre Dicke und sind jedoch gut mit AFM erkennbar. Die Beschichtungen sind weiterhin homogen auf der Siliziumoberfläche vorhanden. Die stärkste Abnahme der Filmdicke wurde an der Beschichtung mit der höchsten Wirkstoffbeladung festgestellt.

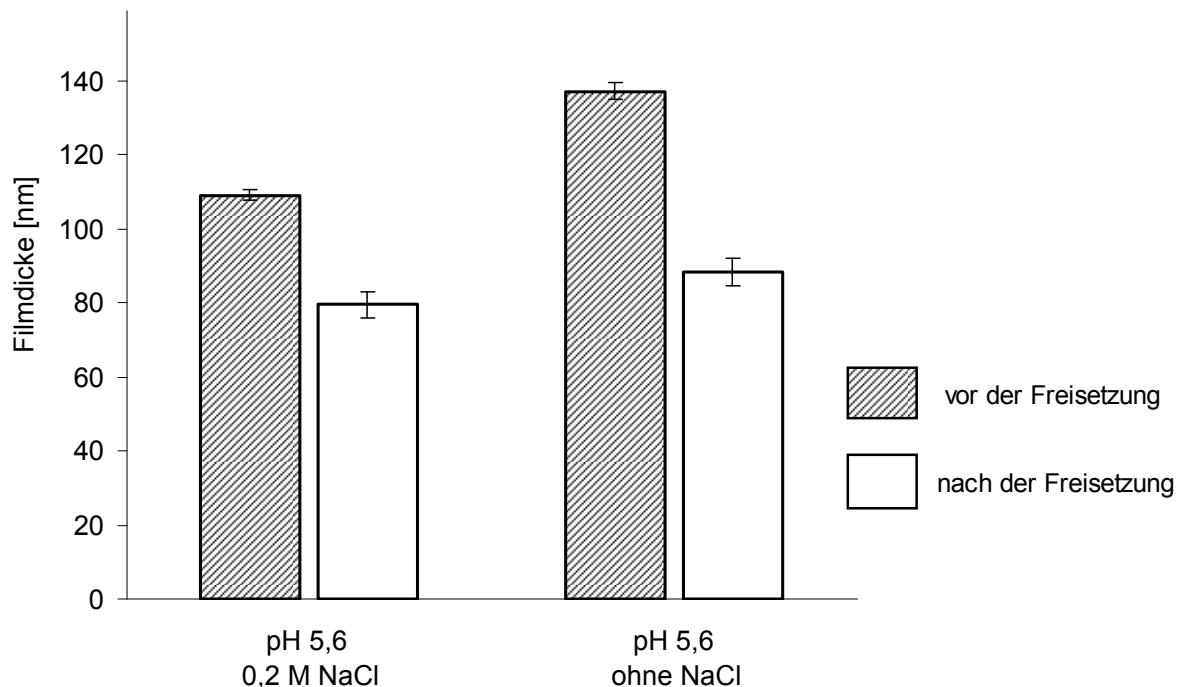


Abbildung 92: Vergleich der Filmdicken von Multischichten mit PG30-PTx vor und nach der Lagerung im Freisetzungspuffer pH 7,4 mit 0,05 % Tween 20; LbL-Beschichtungen (PG30-PTx/PLL)₁₀-PG30-PTx assembliert bei pH 5,6 mit 0,2 M und ohne Zusatz von NaCl; Bestimmung der Filmdicke mit AFM an trockenen PEM

Durch die Lagerung der Beschichtungen mit PG-PTx verringert sich im Unterschied zu wirkstofffreien Multischichten die Schichtdicke. Die Abnahme kann gut mit einer Freisetzung von PTx erklärt werden insbesondere dadurch, dass an der Beschichtung mit der höchsten PTx-Beladung die stärkste Reduktion der Filmdicke bestimmt wurde.

Auch nach einer Lagerung von mehr als einem Monat bei 37°C im Freisetzungsmittel zeigen die Multischichten mit PG-PTx eine gegenüber den korrespondierenden unbeladenen PEM erhöhte UV-Absorption bei 230 nm. Der Restgehalt an PTx in den Multischichten wurde aus den UV-Absorptionen berechnet (Tabelle 7). Der geringste Restgehalt wurde an der Beschichtung bei pH 7,6 mit PG75-PTx und der höchste an der mit PG30-PTx bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl

kalkuliert. An den Multischichten mit der geringsten Filmdicke wurde der kleinste Restgehalt von PTx gefunden. Der an der Beschichtung (PG30-PTx/PLL)₁₀-PG30-PTx, aufgebaut bei geringer Ionenstärke und pH 5,6, auf diesem Weg analysierte Restgehalt ist in Bezug auf die Schichtdicke deutlich erhöht.

Tabelle 7: Übersicht der Filmdicke nach der Lagerung im Freisetzungsmittel (2 Monate, 37°C) und des Restgehaltes an PTx; Restgehalt aus der UV-Absorption der Wirkstofffreisetzungsversuche nach >1 Monat kalkuliert

LbL-Beschichtung			Filmdicke [nm]	Restgehalt PTx [µg/cm ²]
Polymersequenz	pH	NaCl [M]		
(PG75-PTx/PLL) ₁₀ -PG75-PTx	7,6	0,2	71 ± 6	1,4 (43 %)
(PG75-PTx/PLL) ₁₀ -PG75-PTx	5,6	0,2	81 ± 1	1,8 (39 %)
(PG75-PTx/PLL) ₁₀ -PG75-PTx	5,6	0,0	77 ± 8	2,0 (40 %)
(PG30-PTx/PLL) ₁₀ -PG30-PTx	5,6	0,2	80 ± 4	1,6 (42 %)
(PG30-PTx/PLL) ₁₀ -PG30-PTx	5,6	0,0	88 ± 4	6,3 (58 %)

Die Untersuchungen der Wirkstofffreisetzungen von Multischichten mit PG-PTx haben gezeigt, dass Paclitaxel aus den PEM freigesetzt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zu Analyse der Freisetzung die Abnahme der UV-Absorption von PTx-haltigen Multischichten benutzt. Diese indirekte Methode ist insofern geeignet, als dass sich die Beschichtungen während der Freisetzung nicht auflösen und der Wirkstoff in dem Freisetzungspuffer mit Hilfe der HPLC nachgewiesen werden konnte. Während der Wirkstofffreisetzung verringert sich die Filmdicke der Multischichten entsprechend der Wirkstoffbeladung.

Am Beispiel der Beschichtung (PG30-PTx/PLL)₁₀-PG30-PTx, aufgebaut bei pH 5,6 und geringer Ionenstärke, wurde versucht, die Kinetik der Wirkstofffreisetzung aus den Untersuchungsergebnissen näher zu analysieren. Im Allgemeinen verläuft die Hydrolyse einer Esterbindung in gepufferten wässrigen Medien nach einer Kinetik pseudoerster Ordnung, da Wasser als zweiter Reaktionspartner im Überschuss vorliegt [299]. Durch graphische Darstellung der logarithmierten Restkonzentration an PTx (ln C) gegen die Zeit (linear) kann die Reaktionsordnung für eine Reaktion erster Ordnung überprüft werden und sollte eine Gerade ergeben. In Abbildung 93 ist der Verlauf der logarithmierten Restkonzentration an Paclitaxel für die Beschichtung (PG30-PTx/PLL)₁₀-PG30-PTx, aufgebaut bei pH 5,6 und geringer Ionenstärke, dargestellt. Es zeigt sich, dass kein linearer Zusammenhang, wie charakteristisch für eine Reaktion erster Ordnung, besteht. Mit zunehmender Zeit verringert sich die Geschwindigkeitskonstante der Freisetzung (Abbildung 93), was graphisch am Abflachen der Kurve ersichtlich wird. Der Restgehalt an PTx verringert sich ab ca. 6,3 µg/cm² nicht mehr. Offensichtlich sind mehrere Vorgänge mit mindestens zwei

Zeitkonstanten überlagert oder die Abnahme der Konzentration an PTx folgt einem Vorgang höherer Komplexität.

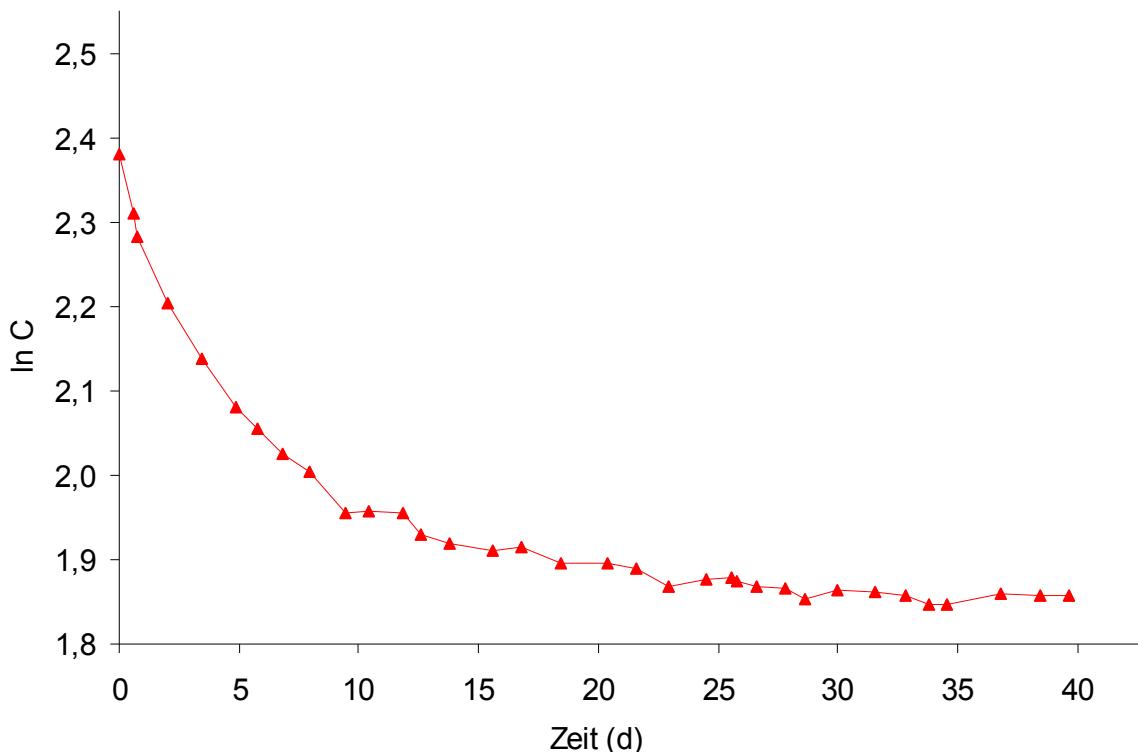


Abbildung 93: Halblogarithmische Darstellung der Restkonzentration von PTx (ln C) in den PEM (PG30-PTx/PLL)₁₀-PG30-PTx während der Lagerung in PBS, pH 7,4, mit Tween bei 37°C; LbL-Beschichtung bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl

Als Möglichkeiten für die unvollständige Wirkstoffabgabe kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Der initiale Schritt für die Freisetzung von PTx aus stabilen Multischichten ist die Spaltung der Esterbindung zwischen PG und PTx. Unter Umständen wird die Hydrolyse durch das Mikromilieu oder aufgrund der räumlichen Anordnung in den PEM teilweise unterbunden. So berichteten Richert et al., dass sich der effektive pK_s-Wert der PG in Multischichten mit PLL auf ca. 2,5 von 4,6 verringert [130]. Aber auch ein behinderter Durchtritt von freiem PTx, insbesondere aus tieferen Schichten, durch die Multischichten ist eine Möglichkeit. Des Weiteren kann die Hydrolyse an die Existenz / Nichtexistenz von geclustertem PTx in den Multischichten gebunden sein. Es ist zu vermuten, dass die Freisetzung von der internen Struktur der PG-PTx in den Multischichten beeinflusst wird. Möglicherweise lagern sich die hydrophoben Wirkstoffmoleküle zu kompakteren Strukturen (Cluster) zusammen, so dass diese nicht molekulardispers im Film verteilt vorliegen und nur die zugänglichen äußeren PTx-Moleküle freigesetzt werden können, da kein Wasser in die hydrophoben Cluster eindringen kann. So kann z.B. die Auflösung der Cluster

eine Voraussetzung für eine effiziente Hydrolyse sein [300]. Weiterhin ist ein Einfluss des Freisetzungsmediums theoretisch denkbar, da Tenside die Esterhydrolse beeinflussen können [301].

In weiterführenden Untersuchungen sollte die Verteilung von PTx in den Multischichten näher untersucht werden. Auch ein Vergleich der Hydrolyse von gelöstem PG-PTx mit in Multischichten eingebautem ist von besonderem Interesse, um die intramolekularen von den intermolekularen Einflüssen unterscheiden zu können. Abschließend sollten auch die Wirkstofffreisetzung und der Abbau unter *in vivo* Bedingungen untersucht werden.

4 Diskussion der Ergebnisse

Zur Verhinderung von stentinduzierten Restenosen, die eine erneute perkutane Koronarintervention (PCI) erforderlich machen, werden seit 2003 Stents angewendet, welche antiproliferativ wirksame Substanzen freisetzen. Diese Drug-Eluting Stents (DES) geben den Wirkstoff über einen längeren Zeitraum lokal ab. Die Motivation der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung und Charakterisierung einer alternativen Beschichtungsmethode für DES, welche zum einen bioabbaubar sein sollte und zum anderen den Wirkstoff vollständig freisetzen kann. Aufgrund der hohen Wirksamkeit und direkten Freisetzung am Wirkort ist zur Verhinderung von Restenosen nur eine sehr geringe Dosis von Paclitaxel (PTx) erforderlich. Der bisher verwendete Taxus Stent, mit einer Beladung von ca. $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, gibt aus der Stentbeschichtung jedoch insgesamt lediglich 10 % des PTx ab [35]. Bei dieser Formulierung ist der Wirkstoff partikular in einer Polymermatrix eingebettet und löst sich im Verlauf der Freisetzung nur zu einem geringen Teil auf. Die Kinetik der Wirkstoffabgabe wird vom Beladungsgrad des nichtabbaubaren Polymers (SIBS) mit PTx maßgeblich beeinflusst und stagniert nach ca. 14 Tagen [35]. Da Paclitaxel in SIBS unlöslich ist und nicht diffundiert, kann, nachdem alle zugänglichen Wirkstoffkristalle aufgelöst sind, keine weitere Wirkstofffreisetzung mehr stattfinden [35]. Dies erklärt den hohen Restgehalt an PTx von bis zu 90 % sowie die von der Wirkstoffbeladung abhängige Freisetzungskinetik.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, am Beispiel PTx die prinzipielle Anwendbarkeit von Polyelektrolytmultischichten als wirkstoffhaltige Beschichtung für Drug-Eluting Stents zu untersuchen. Dafür musste geklärt werden, ob Multischichten mit einer medizinisch ausreichenden Wirkstoffbeladung bei einer technisch vertretbaren Anzahl an Schichten aufgebaut werden können und ob damit eine kontrollierte Wirkstoffabgabe über mind. 14 Tage möglich ist. Eine weitere essentielle Anforderung an Beschichtungen für DES ist die Integrität der Beschichtung während der Platzierung in den Patienten und der abschließenden Stent-Expansion. Dies wurde im Rahmen der Arbeit nicht untersucht, da hierfür die Verbindung zwischen der Beschichtung und der spezifischen Stentoberfläche sowie die Stabilität der Beschichtung selbst entscheidend sind. Polyelektrolytmultischichten können, wie hohle LbL-Kapseln zeigen, mechanisch stabil sein, wobei die Stabilität sehr von der Polyelektrolytkombination und den Beschichtungsbedingungen abhängig ist [130]. Als bioabbaubares Modellsystem wurden im Rahmen dieser Arbeit Multischichten aus Poly(L-glutaminsäure) (PG) und Poly(L-Lysin) (PLL) untersucht, obwohl bekannt ist, dass PLL in Lösung hoch zelltoxisch ist [302]. Die Untersuchungen mit PLL hatten vorrangig Modellcharakter, um zu klären, ob die Technologie zur Entwicklung von Wirkstoff freisetzenden Beschichtungen für Stents geeignet ist. Möglicherweise wird auch die Toxizität von PLL durch eine Komplexierung bzw. den Einbau in PEM verringert, was abschließend nur durch *in vivo* Versuche geklärt werden kann.

Ein Vorteil der verwendeten LbL-Technik besteht u.a. darin, dass der Aufbau von Multischichten eine sehr universelle Methode ist und PLL durch ein anderes kationisches Polymer ausgetauscht werden kann. Für die Langzeitsicherheit von DES ist eine vollständige Stent-Endothelialisierung entscheidend, insbesondere zur Verhinderung von Thrombosen. In dieser Hinsicht ist außerdem bekannt, dass die Zelladhäsion auch durch PEM gesteuert werden kann [130]. Daher eröffnet der modulare Aufbau die Möglichkeit, das Design der einzelnen Schichten den jeweiligen Anforderungen anzupassen. So könnten Strukturen / Polymere als terminierende Schicht aufgebracht werden, welche z.B. eine Endothelialisierung unterstützen.

Für die Wirkstoffbeladung und zur Kontrolle der PTx-Freisetzung wurden in dieser Arbeit Polymer-Wirkstoff-Konjugate, welche nach der Spaltung des Wirkstoffes von der Polymerkette die aktive Substanz freigeben, ausgewählt. Aufgrund der lokalen Wirkung ist eine zusätzliche Ankopplung von Transportgruppen an das hochmolekulare Polymer entsprechend dem Modell nach Ringsdorf nicht erforderlich [32]. Beim verwendeten Konjugat ist der Wirkstoff über eine Esterbindung, die in Anwesenheit von Wasser hydrolysieren kann, gebunden. Durch die chemische Variation der Anbindung des Wirkstoffes an den Polyelektryten kann möglicherweise die Freisetzungskinetik weiter kontrolliert werden und auch eine Kombination unterschiedlich stabiler Konjugate zu einer Gesamtbeschichtung ist mit der LbL-Technik vorstellbar.

Das Konzept zum Aufbau von PEM mit Wirkstoff beladenen Polyelektryten publizierte erstmals Thierry et al. [33]. Die Autoren untersuchten den Aufbau von Multischichten aus Hyaluronsäure und Chitosan und konnten zeigen, dass die Assemblierung mit einem Hyaluronsäure-PTx-Konjugat möglich ist. Weiterhin wurde beobachtet, dass PTx aus dieser Beschichtung mit 10 Schichten des Prodrugs sehr schnell freigesetzt wird. Innerhalb von 3 Stunden werden ca. 50 % des eingebauten PTx abgegeben. Die kurze Freisetzung sowie die Gesamtbeladung mit PTx von lediglich $1,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ machen es notwendig, nach alternativen Beschichtungen / Polyelektryt-kombinationen für DES zu suchen. Hinzu kommt, dass die Autoren eine inhomogene Beschichtung analysierten die aus einzelnen Inseln aufgebaut ist [33].

Durch die Anbindung von PTx an Hyaluronsäure wird die Wasserlöslichkeit des Polymers stark reduziert und limitiert dadurch erheblich die erreichbare PTx-Beladung der Multischichten bzw. vergrößert die notwendige Anzahl an Schichten. Ein entscheidender Vorteil von Poly(L-glutaminsäure) gegenüber Hyaluronsäure ist die Möglichkeit der höheren Beladung mit PTx bei einer für die LbL-Beschichtung ausreichenden Wasserlöslichkeit. Das Konjugat von PG mit dem schwer löslichen PTx ist bis zu einer Wirkstoffbeladung von ca. 37 % (m/m) in Wasser löslich [303].

Der experimentelle Teil wurde damit begonnen, die Assemblierung von PEM mit den schwachen Polyelektryten PG und PLL zu analysieren. Das Ziel dieses Abschnittes

war es, die Assemblierung unter dem für das Konjugat PG-PTx bevorzugten, leicht sauren pH-Wert zu charakterisieren, da in diesem Bereich die Stabilität der PG-PTx-Bindung höher als im Neutralen oder Basischen ist. Insbesondere bei pH 5,6 wurde untersucht, inwieweit die Ionenstärke und das Molekulargewicht der PG die Qualität der Beschichtung beeinflussen. Auch zum Verständnis der Gesamtbeschichtung mit PG-PTx ist es von Interesse, ob und in welchem Ausmaß die Assemblierung durch PTx zusätzlich beeinflusst wird.

Der Aufbau von PEM erfolgte im Rahmen dieser Arbeit immer bei einem bestimmten pH-Wert, um die Variabilität des Schichtenwachstums etwas zu reduzieren. Auch das Spülmedium für die Reinigungsschritte während dem Schichtenaufbau wurde nicht variiert. Zwischen den einzelnen Schichten der Beschichtungen mit PG-PTx wurde immer mit deionisiertem Wasser gespült.

Die Vorversuche mit PG und PLL zeigten die für schwache Polyelektrolyte typische Abhängigkeit der Beschichtung vom pH-Wert. Im untersuchten pH-Bereich von 5,6 bis 7,6 erfolgt das geringste Wachstum bei pH 7,6, wo PG komplett geladen vorliegt. Deutlich dickere Filme bildeten sich bei pH 5,6 aus. Es ist bekannt, dass am Aufbau von Multischichten aus PG und PLL neben den ionischen Wechselwirkungen auch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Bindungen beteiligt sein können [276, 293]. Im sauren Bereich, wo die PG protoniert vorliegt, erhöht sich der Anteil an H-Brücken und führt zur einer Strukturänderung der PG von einer vorrangigen β -Faltblattstruktur zu einer schraubenförmigen Konformation (α -Helix) in den PEM [293]. Außerdem war ein merklicher Einfluss des Molekulargewichtes der PG, auf die Assemblierung zu beobachten. Das stärkste Schichtenwachstum wurde mit PG30 ohne Zusatz von NaCl bei pH 5,6 festgestellt, wohingegen ein Zusatz von Kochsalz bei PG75 die Beschichtung verbessert. Weshalb ein Zusatz von NaCl die Assemblierung mit PG30 verringert, ist bisher ungeklärt. Offensichtlich beeinflusst ein wirkungsvoller Effekt schon bei pH 5,6 die Assemblierung von PG und PLL, da sich die Filmdicken von trockenen PEM mit nur 21 Schichten zwischen PG30 und PG75 mit ca. 50 nm erheblich unterscheiden. In Betracht kommen neben der bei der LbL-Technik vorrangig ausgenutzten Ionenbeziehung auch Wasserstoffbrückenbindungen, Van der Waals-Kräfte oder hydrophobe Bindungen.

Durch die Assemblierung von PG-PTx anstelle PG (pH 5,6) erhöht sich die Schichtdicke (trocken) um ca. 15-20 nm bei nur 21 Schichten. Lediglich im Neutralen ist kein Unterschied zwischen den wirkstofffreien und wirkstoffhaltigen Beschichtungen anhand der Schichtdicke erkennbar, was ein Beleg dafür ist, dass bei pH 7,6 die ionischen Wechselwirkungen am Aufbau der Multischichten überwiegen. Aufgrund der Anbindung von PTx über die freie COOH-Gruppe der PG verringert sich die Ladungsdichte des Polymers nur leicht. Durchschnittlich ist an jedem 27. Monomer der PG ein Molekül PTx angekoppelt, wobei die Synthesen mit PG30 etwas höhere Beladungen (ca. jedes 23. Monomer) als die mit PG75 (ca. jedes 31. Monomer) haben. Die um ca. 4% verringerte Ladungsdichte kommt bei pH 7,6,

wo PG bzw. PG-PTx vollständig deprotoniert vorliegen, offensichtlich nicht zum Tragen bzw. die Konformation der PG wird bei diesen Bedingungen nur unmerklich vom Paclitaxel beeinflusst. Die beobachtete Zunahme der Schichtdicke bei pH 5,6 kann verschiedenen Ursachen haben. So konnte Haynie et al. an PEM aus PG/PLL zeigen, dass durch eine Erhöhung des α -Helix-Anteils der PG die Filmdicke von Multischichten zunimmt [276]. Obwohl der schraubenförmige Bereich einer PG-Kette durch die intramolekularen H-Brücken rigide ist, verringert sich die Gesamtfestigkeit von PEM mit erhöhtem Anteil an α -Helices, da die schraubenförmigen Bereiche typischerweise rasch fluktuieren [276]. Möglicherweise beeinflusst PTx die Struktur der PG und führt zur Stabilisierung einer kompakteren räumlichen Struktur in den PEM. Es ist zu vermuten, dass durch PTx eine Konformationsänderung hervorgerufen bzw. stabilisiert wird, bei der sich die hydrophoben PTx-Moleküle zusammenlagern. Die QCM-D-Ergebnisse der Beschichtung (PG30-PTx/PLL)₁₀-PG30-PTx bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl geben erste Hinweise darauf, dass PTx zu einer Stabilisierung der Beschichtung führt (Abbildung 94). Im Vergleich zur Beschichtung mit PG30 wird bei der Beschichtung mit PG30-PTx eine erheblich geringere Zunahme des Dissipationsfaktors bei großer Frequenzänderung analysiert, was auf stabilere Multischichten hindeutet.

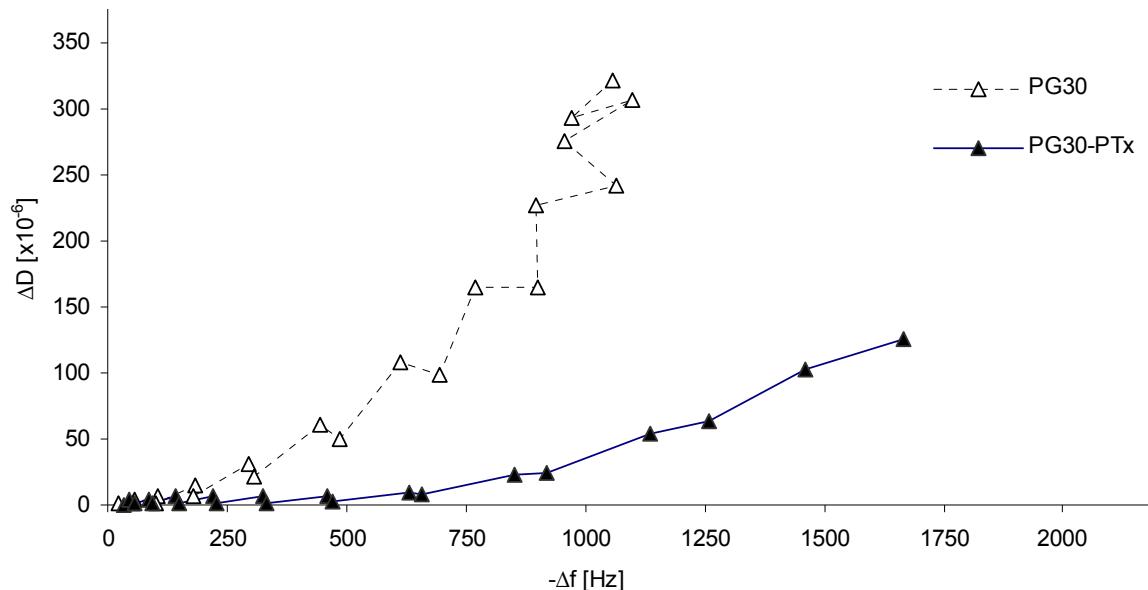


Abbildung 94: Graphische Darstellung des D/f-Verhältnisses der LbL-Beschichtungen (PG30/PLL)₁₀-PG30 und (PG30-PTx/PLL)₁₀-PG30-PTx bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl; die Anzahl an Polyelektrolytschichten erhöht sich von links nach rechts

Aber auch die geringere Ladungsdichte von PG-PTx kann einen Anteil an der beobachteten Zunahme der Schichtdicke bei pH 5,6 haben. Diese Bedingung kann dazu führen, dass zur Kompensation der Ladung mehr Polymer adsorbiert und dadurch insgesamt eine stärkere Beschichtung stattfindet.

Der allgemein beobachtete Verlauf der Beschichtung - das nicht-lineare Wachstum - wird durch den Einbau von PTx in die Multischichten nicht beeinflusst. Auch Polyelektrolytmultischichten mit PG-PTx bilden eine sehr gleichmäßige Beschichtung (Abbildung 95 und Abbildung 96). Es sind mikroskopisch keine großflächigen unbeschichteten Bereiche zu erkennen. Allerdings vermitteln die Bilder den Eindruck, dass die Rauigkeit zwischen den Beschichtungen variiert. Auf eine Auswertung wurde jedoch verzichtet, da für eine zuverlässige Rauigkeitsanalyse mit der AFM deutlich mehr Aufnahmen pro Beschichtung notwendig sind und das Messergebnis im Unterschied zur Höhenanalyse erheblich stärker von der Qualität der AFM-Spitze beeinflusst wird.

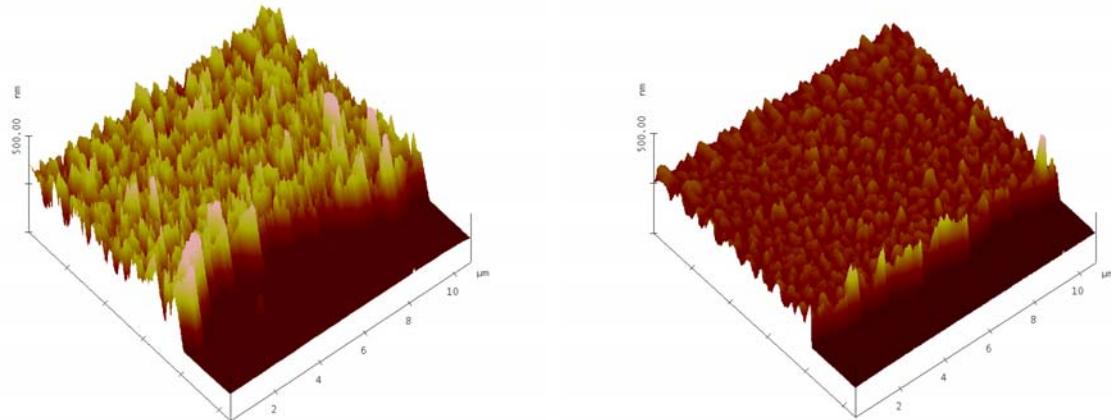


Abbildung 95: Profil der LbL-Beschichtungen $(\text{PG30-PTx/PLL})_{10}\text{-PG30-PTx}$; aufgebaut bei pH 5,6 analysiert mit der AFM; links ohne Zusatz von NaCl; rechts mit 0,2 M NaCl

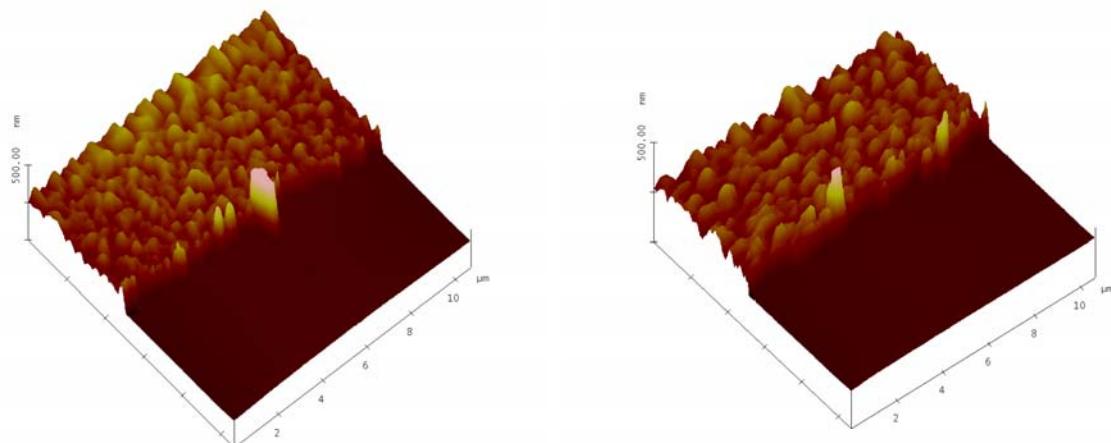


Abbildung 96: Profil der LbL-Beschichtungen $(\text{PG75-PTx/PLL})_{10}\text{-PG75-PTx}$; aufgebaut bei pH 5,6 analysiert mit der AFM; links ohne Zusatz von NaCl; rechts mit 0,2 M NaCl

Es konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse zum Schichtenwachstum von wirkstofffreien Multischichten aus PG/PLL im Wesentlichen auf die Beschichtung mit

PG-PTx übertragbar sind. Diese Feststellung ist für weitere Entwicklungen wichtig, da somit durch Versuche an unbeladenen PEM eine Vorhersage über das Schichtenwachstum mit PG-PTx möglich ist. Zum Beispiel ist kein Einfluss des Molekulargewichtes, bei der Beschichtung bei pH 5,6 mit 0,2 M NaCl zu beobachten. Hier verläuft die Assemblierung von PG75-PTx entsprechend PG75. Auch das stärkste Schichtenwachstum wurde mit PG30 bzw. PG30-PTx bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl gefunden.

Prinzipiell können Oberflächen mit PEM im Tauchverfahren (so wurden alle Beschichtungen im Rahmen dieser Arbeit hergestellt) oder im Sprühverfahren aufgebaut werden. Letzteres ist in Bezug auf Beschichtungszeit und das Risiko von Verunreinigungen gegenüber dem Tauchverfahren im Vorteil. Damit lassen sich in relativ kurzer Zeit Multischichten mit über 100 einzelnen Schichten herstellen, so dass auch Beschichtungsbedingungen mit einem geringeren Dickenwachstum zur Beschichtung von DES geeignet sind. Beim Tauchverfahren muss, neben dem größeren zeitlichen Aufwand, insbesondere das erhöhte Risiko von Verunreinigungen berücksichtigt werden. Hier kommt das Substrat bei jeder Schicht mit den Oberflächen der Beschichtungs- und Waschlösungen in direkten Kontakt. In dieser Grenzfläche reichern sich häufig partikuläre Verunreinigungen an und werden, sofern sie an den PEM hängen bleiben, in die Multischichten eingebaut. Im Unterschied dazu kommen beim Sprühverfahren partikuläre Verunreinigungen nicht in direkten Kontakt mit den Multischichten oder werden weggespült. Aufgrund der hohen Wirksamkeit von PTx und dem damit verbundenen Risiko einer Kontamination durch Aerosole konnte im Rahmen dieser Arbeit das Sprühverfahren nicht etabliert werden, obwohl damit in kurzer Zeit PEM mit vielen Schichten hergestellt werden können [53, 54]. Das Verfahren selbst ist prinzipiell auch zur Beschichtung von Stents geeignet [3, 264, 304]. Für komplett beschichtete Stents ist die Homogenität der Beschichtung ein wichtiges Qualitätsmerkmal. Bei den untersuchten Beschichtungsbedingungen bilden sich Filme aus, die diese Anforderung erfüllen können, zumal die Strukturen im getrockneten Zustand mit weniger als 200 nm sehr dünn sind.

Entsprechend der Filmdicke wird auch die Wirkstoffbeladung der PEM von den Beschichtungsbedingungen beeinflusst (Tabelle 8). Die höchste Wirkstoffbeladung mit $14,4 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ wurde bei der Beschichtung $(\text{PG30-PTx/PLL})_{10}\text{-PG30-PTx}$ (assembliert bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl) unmittelbar nach der Beschichtung erhalten. Sofern *in vivo* eine vollständige PTx-Freisetzung stattfindet, würde eine Beschichtung mit nur 19 Polyelektrolytschichten die dem Taxus-Stent entsprechende Menge an PTx freisetzen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Die zum Erreichen einer PTx-Beladung von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ notwendige Anzahl an Polyelektrolytschichten ist stark von den Bedingungen bei der Assemblierung abhängig. In Tabelle 8 sind für die untersuchten Beschichtungen die kalkulierte Anzahl an Polyelektrolytschichten zusammengestellt.

Tabelle 8: Übersicht der analysierten PTx-Beladungen von PEM mit 21 Polyelektrolytschichten; Kalkulation der Anzahl an Schichten für eine PTx-Beladung von 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PTx, Berechnung auf Basis der Zunahme der UV-Absorption bei 230 nm zwischen der 17. und 19. Polyelektrolytschicht oder der 19. und 21. Schicht¹

LbL-Beschichtung			PTx Gehalt nach 21 Schichten [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Theoretische Anzahl an Schichten für 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PTx
Polymersequenz	pH	NaCl [M]		
PG75-PTx/PLL	7,6	0,2	4,7	ca. 69 (31 ¹)
PG75-PTx/PLL	5,6	0,2	6,9	ca. 29 (25 ¹)
PG75-PTx/PLL	5,6	0,0	8,4	ca. 27 (23 ¹)
PG30-PTx/PLL	5,6	0,2	5,0	ca. 33 (27 ¹)
PG30-PTx/PLL	5,6	0,0	14,4	ca. 19

Die Extrapolation wurde sowohl mit der UV-Differenz der vorletzten PG-PTx-Schicht (17.-19. Schicht) als auch mit der terminierenden (19.-21. Schicht) Schicht durchgeführt und beruht auf der Annahme, dass ab dieser Schicht keine weitere Erhöhung der Polymeradsorption mehr stattfindet. Allerdings wurde mit den angewendeten Methoden bei allen Beschichtungen eine Zunahme der Adsorption von der 10. zur 11. PG-PTx-Schicht festgestellt. Bei alternativen Beschichtungen, z.B. aus Hyaluronsäure und PLL, wurde herausgefunden, dass eine Umwandlung des nicht-linearen in ein lineares Wachstum nach ca. 20-24 Polyelektrolytschichten stattfindet, so dass sich die Anzahl an Schichten für eine PTx-Beladung mit 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nicht wesentlich verändern sollte (Tabelle 8) [54]. Eine weitere Zunahme der Adsorption von PG-PTx würde die Gesamtzahl an Polyelektrolytschichten bis zu einer PTx-Beladung von 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ eher noch reduzieren.

Lediglich die Assemblierung bei pH 7,6 bedarf einer höheren Zahl an Polyelektrolytschichten, wobei hier die Adsorption bei der terminierenden Schicht mit PG75-PTx stark zunimmt. Die geringste Anzahl an PG-PTx-Schichten ist bei der Beschichtung mit PG30-PTx bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl notwendig. Hier sind ca. 10 Schichten an PG30-PTx für eine PTx-Beladung von 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ notwendig, wobei das verwendete Konjugat im Vergleich zu PG75-PTx auch eine etwas höhere PTx-Beladung hat. Allerdings wurde bei dieser Beschichtung mit PG30-PTx auch eine merkliche Zunahme der UV-Absorption bei den PLL-Schichten (> 10 Schichten) festgestellt und deutet auf eine eingeschränkte Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes hin. Wahrscheinlich wird das Messergebnis durch Streuung oder Reflexion beeinflusst, so dass die berechneten PTx-Beladungen höchstwahrscheinlich etwas zu hoch sind.

Mit der QCM-D ist es sehr schwierig, die PTx-Beladung der gequollenen Multischichten zu bestimmen, da das Messergebnis erheblich vom adsorbieren Wasser und / oder Ionen in den PEM beeinflusst wird. Außerdem kann bei

Beschichtungen mit höherer Filmdicke, wie z.B. mit PG30 bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl, der Aufbau nicht mehr verfolgt werden (Abbildung 43), da die gesamte Struktur nicht der Kristallschwingung folgt (verbunden mit sehr hohen Dämpfungen). Der Vergleich der zwei Methoden (QCM-D und UV-Spektroskopie) zeigt, dass die Messergebnisse nicht im gesamten Bereich linear korrelieren. In Abbildung 97 sind die Ergebnisse der QCM-D und UV-Spektroskopie vom Aufbau der Beschichtungen mit PG75-PTx bei pH 5,6 dargestellt.

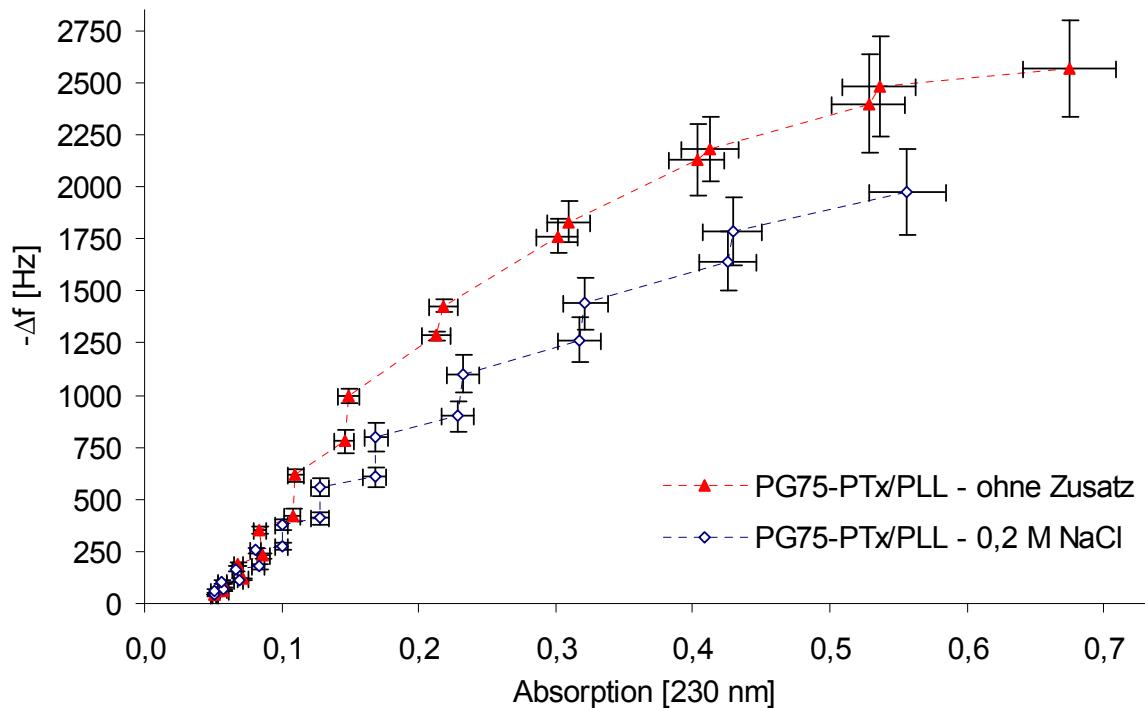


Abbildung 97: Vergleich der QCM-D und UV-Spektroskopie von den LbL-Beschichtungen $(\text{PG75-PTx/PLL})_{10}\text{-PG-PTx}$ bei pH 5,6 mit und ohne Zusatz von 0,2 M NaCl

Die Gegenüberstellung in Abbildung 97 veranschaulicht eine Beeinflussung der Messergebnisse durch die Analysenmethoden. An der Abnahme des Anstieges wird ersichtlich, dass im Verlauf der Assemblierung zunehmend zu geringe Frequenzänderungen gemessen werden. Interessant ist der unterschiedliche Anstieg bei dünnen Filmen zwischen der Besichtung mit und ohne Zusatz von 0,2 M NaCl. Hier liefert die QCM-D erhöhte Messwerte bei der Beschichtung ohne NaCl. Bei beiden Beschichtungen ist eine Abnahme des Anstieges bei dicken Filmen zu beobachten, was auch durch zu hohe UV-Absorptionen hervorgerufen werden kann. Möglicherweise sind auch beide Effekte überlagert. Theoretisch sollte ein abgestufter Kurvenverlauf, entsprechend der Beschichtung mit 0,2 M NaCl in Abbildung 97, vorliegen, da der Extinktionskoeffizient von PG-PTx deutlich größer als von PLL ist und bei der QCM-D beide Polyelektrolyte ein vergleichbar starkes Signal hervorrufen.

Beobachtet wurde eine Zunahme der Absorption auch bei den PLL-Schichten (> 10 Schichten), insbesondere bei der Beschichtung ohne Zusatz von NaCl, was vermutlich durch eine Streuung des UV-Lichtes an den Multischichten hervorgerufen wird. Dieser Effekt tritt besonders stark bei PEM mit PG30-PTx auf (siehe Abbildung 67 und Abbildung 75), so dass höchstwahrscheinlich die berechneten PTx-Beladungen etwas zu hoch sind. Auch eine Aussage über die quantitative Zusammensetzung der Multischichten, also der Anteil an PLL und PG, ist mit den angewendeten Methoden nicht möglich. Die QCM-D-Ergebnisse werden sehr stark von der Quellung und den mechanischen Eigenschaften der Multischichten beeinflusst, bei der UV-Spektroskopie ist eine Interpretation aufgrund der geringen Extinktionskoeffizienten und der eventuellen Beeinflussung durch die Streuung vage. Die QCM-D zeigt anhand der Dämpfungswerte, dass die mechanischen Eigenschaften der Multischichten durch die Beschichtungsbedingungen und den Einbau von PTx verändert werden.

Die Analyse der Wirkstofffreisetzung erfolgte im Rahmen dieser Arbeit, aufgrund der geringen Menge an freigesetzter Substanz, indirekt durch die Bestimmung der Abnahme der UV-Absorption (Abbildung 98).

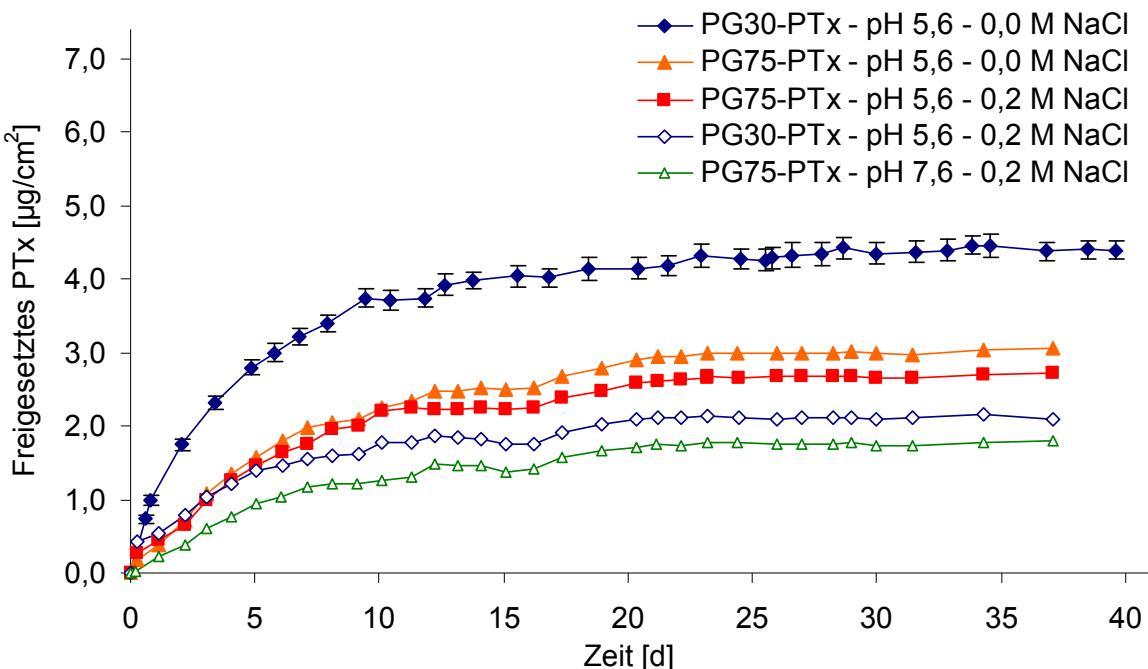


Abbildung 98: Freisetzung von PTx aus LbL-Beschichtungen mit PG-PTx in PBS pH 7,4 mit 0,05 % (m/V) Tween 20 bei 37 °C; LbL-Beschichtung von PG-PTx mit PLL bei pH 7,6 mit 0,2 M NaCl oder bei pH 5,6 mit und ohne Zusatz von 0,2 M NaCl

Beim verwendeten Messaufbau ist eine Reduktion der UV-Absorption nur dann ein Beleg für die Wirkstofffreisetzung aus den PEM, wenn die Multischichten über die

Messung stabil sind und der Wirkstoff im Freisetzungsmittel nachgewiesen werden kann. Die Freisetzunguntersuchungen wurden daher bei Bedingungen durchgeführt, unter denen die Multischichten lagerstabil sind, so dass dem Medium keine Serum oder Enzyme, wie z.B. Esterasen oder Peptidasen, zugesetzt wurden. Vorversuche an wirkstofffreien Multischichten zeigten, dass die PEM im Freisetzungspuffer bei 37°C über Monate stabil sind. Nur so ist es mit der verwendeten UV-Methode möglich, die Freisetzung zu bestimmen.

Im Verlauf der Wirkstofffreisetzung verringert sich bei allen Beschichtungen mit PG-PTx die Filmdicke. Auch nach Ende des Freisetzungsvorlaufs sind die Multischichten mit der AFM nachweislich vorhanden und mikroskopisch homogen. Zusätzlich konnte PTx im Freisetzungsmittel durch HPLC-Messungen eindeutig nachgewiesen werden. Die Kombination aller Messergebnisse zur Bestimmung der PTx-Freisetzung, also die Abnahme der UV-Absorption bei 230 nm, die Stabilität der PEM und der Nachweis von PTx im Freisetzungsmittel, belegt die Abgabe von PTx aus den Multischichten.

Von dem insgesamt aus den Multischichten abgegebenen PTx werden 50 % innerhalb der ersten 3-4 Tage freigesetzt. Es ist kein Einfluss der Beschichtungsbedingungen sowie des Molekulargewichtes der PG auf das Freisetzungsmittel festzustellen. Verglichen mit den Multischichten aus Chitosan und dem Hyaluronsäure-PTx-Konjugat, wo ca. 50 % des Wirkstoffes innerhalb weniger Stunden freigesetzt werden, zeigen die Beschichtungen mit PG-PTx eine deutlich verlängerte Wirkstofffreisetzung [33]. Erst nach ca. drei Wochen ist keine Abgabe mehr aus den PEM mit PG-PTx messbar.

Die Beschichtung mit der höchsten Wirkstoffbeladung ((PG30-PTx/PLL)₁₀-PG30-PTx) assembliert bei pH 5,6 mit geringer Ionenstärke) gibt auch am meisten PTx ab. Innerhalb von einem Monat wurden aus dieser Beschichtung ca. 4,5 µg/cm² PTx freigesetzt. Diese wurde im Unterschied zu den anderen Beschichtungen, welche nur einfach untersucht wurden, 5fach durchgeführt, so dass hier die Streuung angegeben werden kann (Abbildung 98). Die Varianz zwischen den einzelnen Beschichtungen ist relativ gering, was ein Beleg für eine stabile Beschichtung und reproduzierbare Freisetzung ist. Diese Beschichtung setzt im untersuchten Zeitraum jedoch insgesamt lediglich ca. 42% des Wirkstoffes frei, der Rest verbleibt in den Multischichten.

Zur Veranschaulichung des Restgehaltes an PTx in den PEM sind zwei UV-Spektren der Beschichtung (PG30-PTx/PLL)₁₀-PG30-PTx bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl beispielhaft in Abbildung 99 dargestellt. Im Verlauf der Freisetzung verringert sich erheblich die UV-Absorption, wobei auch nach 40 Tagen eine Absorption von ca. 0,4 bei 230 nm nach Abzug einer PTx-freien Beschichtung als Blindwert verbleibt. Dies entspricht einem theoretischen Restgehalt von ca. 6,3 µg/cm². In allen Beschichtungen ist auch nach einer Lagerung von mehr als 1 Monat PTx vorhanden (Tabelle 7) wobei der höchste Restgehalt mit 6,3 µg/cm² bei der Beschichtung mit PG30-PTx bestimmt wurde. Auch durch eine deutlich längere Lagerung der PEM

(über 200 Tage) unter den *in vitro* Bedingungen verringerte sich der PTx-Gehalt nicht wesentlich.

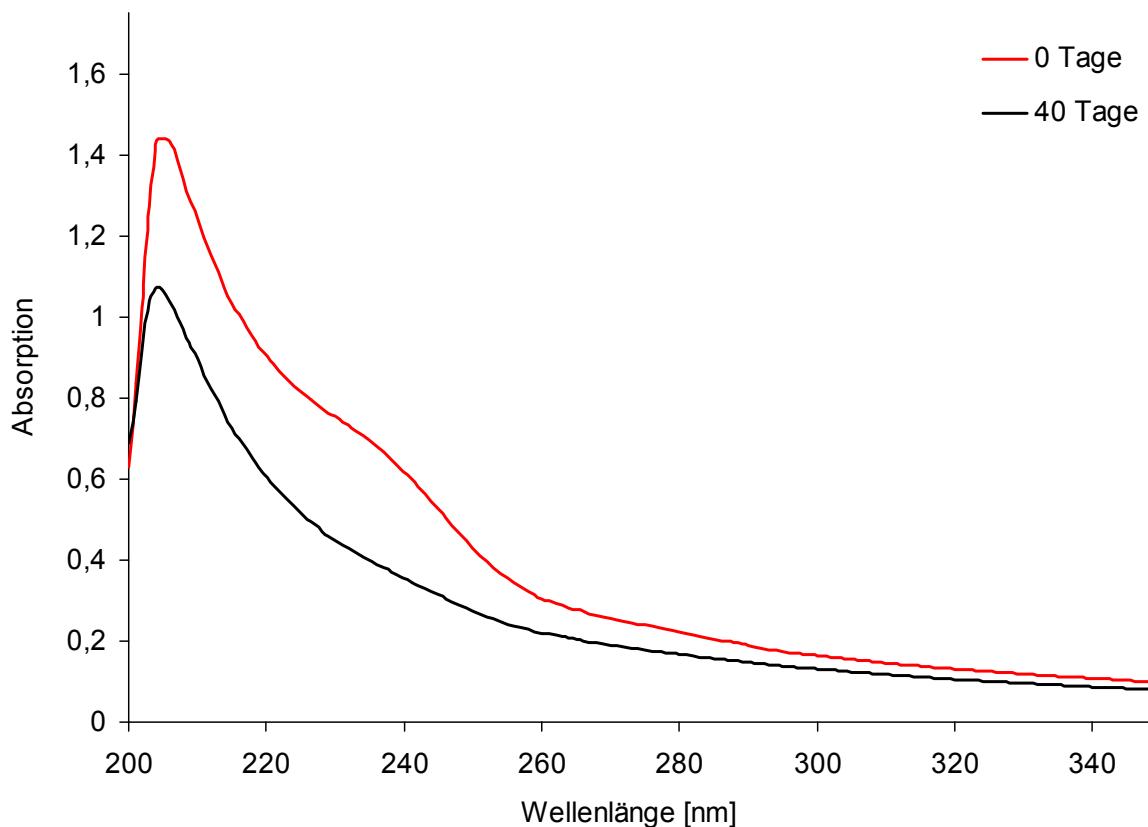


Abbildung 99: UV-Spektren von der LbL-Beschichtung $(\text{PG30-PTx/PLL})_{10}\text{-PG30-PTx}$ zu Beginn der Messung und nach 40 d Lagerung in PBS pH 7,4 mit 0,05 % (m/V) Tween 20 bei 37 °C; als Basislinie wurde die entsprechende wirkstofffreie LbL-Beschichtung $(\text{PG30/PLL})_{10}\text{-PG30}$ verwendet

Der initiale Schritt für die Freisetzung von PTx aus Multischichten mit PG-PTx ist die Hydrolyse der Esterbindung unter Freigabe des Wirkstoffes. Möglicherweise ist die Esterhydrolyse in tieferen Schichten oder aufgrund der räumlichen Anordnung in den PEM teilweise behindert. Es wird vermutet, dass die Wirkstofffreisetzung von der internen Struktur der PG-PTx in den Multischichten durch eine Ausbildung bzw. Stabilisierung von kompakteren Strukturen beeinflusst wird. Auch ein Einfluss des Freisetzungsmediums ist theoretisch denkbar, da Tenside die Esterhydrolyse beeinflussen können [301]. Zur kompletten Freisetzung des vom Polymer hydrolytisch getrennten Wirkstoffes muss dieser, insbesondere aus tieferen Schichten, durch die Multischichten diffundieren. Unter Umständen verhindert auch die Permeabilität der PEM die vollständige Abgabe von PTx, da eventuell Tween 20, welches zur Solubilisierung von PTx dem Medium oberhalb der CMC zugesetzt wurde, nicht in die tieferen Schichten der PEM eindringen kann oder den Wirkstoff

selbst zurückhält. Möglicherweise wird dadurch die Freisetzung stärker von der geringen Wasserlöslichkeit des Wirkstoffes beeinflusst als ursprünglich erwartet.

Die Arbeiten von Vodouhe et al. [253] und Schneider et al. [261] zeigten, dass eine passive Anreicherung von fluoreszenzmarkiertem PTx in PEM aus PLL und Hyaluronsäure stattfindet. Somit wird PTx eventuell auch durch Adsorption in den Multischichten aus PG und PLL zurückgehalten.

Bei weiterführenden Untersuchungen sollte neben der Charakterisierung der Stabilität und Biokompatibilität von PEM die Hydrolysekinetik von PG-PTx im Detail untersucht werden. Auch ein Vergleich der Hydrolyse von gelöstem PG-PTx mit in Multischichten eingebautem ist von besonderem Interesse, um die intramolekularen Einflüsse von den intermolekularen differenzieren zu können. Interessant ist dabei auch die Verteilung und Kristallinität von PTx in den Multischichten vor und nach der Freisetzung. Abschließend sollte der Abbau und die Wirkstofffreisetzung der PEM unter *in vivo* Bedingungen untersucht werden.

Zur Anwendung von PEM als Wirkstoffreservoir für Drug-Eluting Stents ist die Kenntnis der notwendigen Anzahl an Schichten zum Erreichen einer bestimmten Dosis wichtig. Die effektive Dosis an Paclitaxel zur Verhinderung von Restenosen bei Drug-Eluting Stents liegt im Bereich von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und ist im Vergleich zu anderen antiproliferativ wirksamen Substanzen deutlich am geringsten [9].

Tabelle 9: Übersicht der aus Multischichten freigesetzten Menge an PTx; Kalkulation der Anzahl an Schichten für ein PTx-Freisetzung von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ PTx, Berechnung auf Basis des freigesetzten PTx

LbL-Beschichtung		Freigesetztes PTx [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Theoretische Anzahl an Schichten für $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ PTx
Polymersequenz	pH		
PG75-PTx/PLL	7,6	0,2	1,8
PG75-PTx/PLL	5,6	0,2	2,7
PG75-PTx/PLL	5,6	0,0	3,1
PG30-PTx/PLL	5,6	0,2	2,2
PG30-PTx/PLL	5,6	0,0	4,5

Verwendet man die aus 21 Schichten freigesetzte Menge an PTx zur Hochrechnung der erforderlichen Anzahl an Polyelektrolytschichten für eine Wirkstofffreisetzung von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ so wird ersichtlich, dass aus Multischichten mit weniger als 100 Schichten die Dosis freigesetzt werden kann (Tabelle 9). Aufgrund der unvollständigen PTx-Freisetzung (unter den angewendeten Freisetzungsberechnungen) sind bei allen Beschichtungen mehr Polyelektrolytschichten notwendig als ursprünglich kalkuliert (Tabelle 8). Anstelle von 19 Schichten, wie für die Beschichtung mit PG30-PTx und PLL bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl bestimmt (Tabelle 8), bedarf es ca. 47

Polyelektrolytschichten für die Freisetzung von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ PTx. Ein Aufbau von PEM mit bis zu 200 Schichten ist im Sprühverfahren leicht möglich, so dass die LbL-Technik eine Alternative zu den bestehenden DES-Technologien darstellt. Zusätzlich bietet das Sprühverfahren die Möglichkeit, zwischen den einzelnen Beschichtungsschichten zu trocknen. Auch eine seitenabhängige Beschichtung, z.B. nur die der Gefäßwand zugewandten Seite, ist mit diesem Verfahren prinzipiell möglich. Unter Umständen sind auch Beschichtungsbedingungen mit einem etwas geringeren Schichtenwachstum für die Anwendung relevant, da für die Wirksamkeit und Sicherheit die Stabilität der Multischichten insbesondere während der Platzierung in den Patienten und der abschließenden Stent-Expansion entscheidend sind. Ob die PEM auch unter *in vivo* Bedingungen den Wirkstoff geeignet freisetzen und welche chemische und hydrolytische Stabilität die Multischichten haben, muss noch untersucht werden.

Wie die Ergebnisse zeigen, können mit Polymer-Wirkstoff-Konjugaten Multischichten aufgebaut werden. Ein großer Vorteil der LbL-Technik liegt im allgemeingültigen Aufbau von Beschichtungen mit dieser Methode. Diese Arbeit hatte zum Thema Polyelektrolytmultischichten aus PG und PLL als Modellsystem zu untersuchen, wobei diese Polyelektrolyte auch leicht durch andere Polymere ausgetauscht werden können. Für eine ausreichend hohe Wirkstoffbeladung sind Systeme mit starkem Schichtenwachstum und hohem Wirkstoffgehalt des Konjugates begünstigt. Sofern die aktive Substanz an einen Polyelektrolyten gekoppelt werden kann, ermöglicht die LbL-Technik aktive Beschichtungen mit den unterschiedlichsten Wirkstoffen. Prinzipiell sollten positiv geladenen Wirkstoffe über Polykationen und negativ geladene Wirkstoffe zusammen mit Polyanionen in die Multischichten eingebaut werden, um die Eigenschaften der Polyelektrolyte möglichst wenig zu beeinflussen. Ein großer Vorteil der Verknüpfung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten mit der LbL-Technik besteht darin, dass es damit möglich erscheint, die Freisetzung von leicht wasserlöslichen als auch von schwerlöslichen Substanzen, wie z.B. PTx, zu kontrollieren. Außerdem ermöglicht der schichtweise Aufbau die Herstellung einer zusammengesetzten Beschichtung mit unterschiedlichen Konjugaten. Neuere Drug-Eluting Stents verwenden strukturierte Stent-Oberflächen mit Vertiefungen zur Wirkstoffbefüllung. Ferner werden aktuell auch poröse Oberflächen zur Verringerung der Restenoserate untersucht [305]. Aufgrund der damit verbundenen Vergrößerung der Oberfläche können auch Multischichten mit einer etwas geringeren Wirkstoffbeladung für diese Drug-Eluting Stents attraktiv sein. Mit Hilfe der LbL-Technik können Poren bis in den Nanometerbereich gefüllt werden, was ein großes Potential für zukünftige Entwicklungen darstellt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Anwendbarkeit von Polyelektrolytmultischichten (PEM) zur lokalen Freisetzung von Paclitaxel (PTx) zu untersuchen. Es sollte geklärt werden, ob für Drug-Eluting Stents (DES) eine ausreichende Wirkstoffbeladung und Freisetzung mit PEM erreicht werden kann. Die Motivation dieser Arbeit lag in der Entwicklung einer bioabbaubaren PTx-haltigen Beschichtung, welche im Verlauf der Degradation den Wirkstoff komplett freisetzt und die unmodifizierte Metallocberfläche exponiert. Zum Aufbau von wirkstoffhaltigen Beschichtungen wurden Polyelektrolyt-Wirkstoff-Konjugate synthetisiert und die Assemblierung mit Poly(L-lysin) (PLL) zu Multischichten charakterisiert. Über eine Esterbindung wurde PTx an Poly(L-glutaminsäure) (PG-PTx) gebunden und experimentell bestimmt, wie viele Polyelektrolytschichten zum Aufbau einer Beschichtung mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ PTx erforderlich sind.

Die Untersuchungen zum Aufbau von PEM mit PG-PTx zeigten, dass Beschichtungen mit Prodrugs auf Basis von Poly(L-glutaminsäure) hergestellt werden können. Das Schichtenwachstum wurde, wie charakteristisch für schwache Polyelektrolyte, vom pH-Wert bei der Assemblierung sowie von der Ionenstärke und vom Molekulargewicht der PG beeinflusst. Bei allen LbL-Beschichtungen auf Basis von PG und PLL wurde ein nicht-lineares Schichtenwachstum beobachtet. Das stärkste Wachstum zeigte die Beschichtung mit PG30-PTx bei pH 5,6 ohne Zusatz von NaCl. Nach 21 Polyelektrolytschichten hatte diese Beschichtung auch die höchste Wirkstoffbeladung mit ca. $14,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und eine Filmdicke von ca. 137 nm. Durch die Assemblierung von PG-PTx bei pH 5,6 erhöhte sich im Vergleich zu wirkstofffreien Multischichten die Dicke der Beschichtung. Bei der Assemblierung unter neutralen pH-Bedingungen mit 0,2 M NaCl wurde dagegen kein Einfluss von PTx auf die Filmdicke festgestellt. Mikroskopisch erschienen die Beschichtungen mit PG-PTx äußerst homogen, da keine unbeschichteten Bereiche oder Risse nach der Trocknung beobachtet wurden.

Die Wirkstoffbeladung von PEM kann durch die Beschichtungsbedingungen und die Anzahl an Schichten kontrolliert werden. Der Wirkstoff wird aus Multischichten mit PG-PTx verzögert abgegeben. Insgesamt konnte eine Freisetzung über ca. drei Wochen nachgewiesen werden. Aus der Beschichtung mit der höchsten Beladung wurde mit ca. $4,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auch die größte Menge an PTx abgegeben, wovon innerhalb von ca. 3-4 Tagen 50 % des PTx freigesetzt wurden. Unter den gewählten *in vitro* Bedingungen wurde ein sehr hoher Restgehalt an PTx beobachtet, da insgesamt nur 42 % des Wirkstoffes aus den Multischichten abgegeben wurden. An allen Beschichtungen mit PG-PTx unabhängig von den Bedingungen bei der Assemblierung, wurde eine unvollständige PTx-Freisetzung *in vitro* festgestellt.

Für eine PTx-Freisetzung von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sind bei der Beschichtung mit dem stärksten Schichtenwachstum ca. 47 Polyelektrolytschichten (entspricht etwa 24 Schichten PG30-PTx) notwendig. Mit dem Sprühverfahren können PEM mit mehr als 100 Schichten technisch leicht hergestellt werden, so dass aufgrund der vertretbaren Anzahl an einzelnen Schichten eine Anwendung der Beschichtungstechnologie für Drug-Eluting Stents möglich erscheint. Die Analyse der Wirkstofffreisetzung wurde bei Bedingungen durchgeführt, unter denen kein Abbau der Multischichten stattfindet. Da die Multischichten *in vivo* höchstwahrscheinlich degradieren, sollte unter diesen Bedingungen eine vollständige PTx-Freisetzung zusammen mit dem Abbau der Multischichten stattfinden. Somit könnte sich die notwendige Anzahl an Polyelektrolytschichten mit PG-PTx noch deutlich reduzieren.

Die Stabilität der Polyelektrolytmultischichten unter *in vivo* Bedingungen wird für die Anwendbarkeit der LbL-Technologie zur Entwicklung von DES mit entscheidend sein. Es muss daher geprüft werden, ob und mit welcher Geschwindigkeit die Multischichten abgebaut werden, da auch geringste Konzentrationen an PTx die zur Erhöhung der Langzeitsicherheit angestrebte Endothelialisierung beeinflussen. Eine weitere essentielle Anforderung für DES ist neben der Sterilität, die Unversehrtheit der Beschichtung über die Applikation in den Patienten und der abschließenden Stent-Expansion hinaus.

Mit Hilfe der LbL-Beschichtung können wirkstoffhaltige ultradünne Beschichtungen mit ausreichender Wirkstoffbeladung bei einer technisch vertretbaren Anzahl an Schichten aufgebaut werden. Ein großer Vorteil der untersuchten Beschichtungstechnik liegt darin, dass die Synthese und Beschichtung voneinander unabhängige Herstellungsschritte darstellen. Dadurch sind eine effektive Reinigung und Charakterisierung der pharmakologisch aktiven Polymere vor dem Aufbau der Beschichtung möglich. Der schichtweise Aufbau von PEM ermöglicht zusätzlich, unterschiedliche Konjugate mit verschiedenen Wirkstoffen und / oder chemischen Stabilitäten zu einer komplexen Gesamtbeschichtung zu kombinieren. Polyelektrolytmultischichten können mit verschiedenen polyionischen Materialien gebildet werden und stellen eine universelle Methode zum Aufbau von Beschichtungen dar, wobei grundsätzlich die Möglichkeit besteht, Multischichten aus bioabbaubaren oder stabilen Polymeren aufzubauen.

6 Literatur

1. Löwel, H., *Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt*. 2006, Robert Koch-Institut. p. 35.
2. Mutschler, E., et al., *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 2001: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 1-1186.
3. Udupi, K., et al., *Development of a novel biocompatible polymer system for extended drug release in a next-generation drug-eluting stent*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008. 85A(4): p. 1064-1071.
4. Silber, S., et al., *Positionspapier der DGK zur Wirksamkeit und Sicherheit von Medikamente freisetzenden Koronarstents (DES)*. Der Kardiologe, 2007. 1(2): p. 27.
5. Acharya, G. and K. Park, *Mechanisms of controlled drug release from drug-eluting stents*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. 58(3): p. 387-401.
6. Langer, R. and D.A. Tirrell, *Designing materials for biology and medicine*. Nature, 2004. 428(6982): p. 487-492.
7. Melikian, N. and W. Wijns, *Drug-eluting stents: a critique*. Heart, 2008. 94(2): p. 145-52.
8. Caves, J.M. and E.L. Chaikof, *The evolving impact of microfabrication and nanotechnology on stent design*. Journal of Vascular Surgery, 2006. 44(6): p. 1363-1368.
9. Deconinck, E., et al., *Pharmaceutical aspects of drug eluting stents*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. 9999(9999): p. n/a.
10. Decher, G. and J.B. Schlenoff, *Multilayer Thin Films*. 2003, Weinheim: Wiley-VCH.
11. Sukhorukov, G.B., et al., *Stepwise Polyelectrolyte Assembly on Particle Surfaces - a Novel Approach to Colloid Design*. Polymers for Advanced Technologies, 1998. 9(10-11): p. 759-767.
12. Donath, E., et al., *Novel Hollow Polymer Shells by Colloid-Templated Assembly of Polyelectrolytes*. Angewandte Chemie (International Edition in English), 1998. 37(16): p. 2201-2204.
13. Johnston, A.P.R., et al., *Layer-by-layer engineered capsules and their applications*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2006. 11(4): p. 203-209.
14. Caruso, F., et al., *Enzyme Encapsulation in Layer-by-Layer Engineered Polymer Multilayer Capsules*. Langmuir, 2000. 16(4): p. 1485-1488.
15. Caruso, F., et al., *Microencapsulation of Uncharged Low Molecular Weight Organic Materials by Polyelectrolyte Multilayer Self-Assembly*. Langmuir, 2000. 16(23): p. 8932-8936.
16. Sukhorukov, G.B., et al., *Microencapsulation by means of step-wise adsorption of polyelectrolytes*. J Microencapsul, 2000. 17(2): p. 177-85.
17. Qiu, X., et al., *Studies on the Drug Release Properties of Polysaccharide Multilayers Encapsulated Ibuprofen Microparticles*. Langmuir, 2001. 17(17): p. 5375-5380.
18. Ye, S., et al., *Deposition temperature effect on release rate of indomethacin microcrystals from microcapsules of layer-by-layer assembled chitosan and alginate multilayer films*. J Control Release, 2005. 106(3): p. 319-28.

19. Pargaonkar, N., et al., *Controlled release of dexamethasone from microcapsules produced by polyelectrolyte layer-by-layer nanoassembly*. Pharm Res, 2005. 22(5): p. 826-35.
 20. Arida, A.I. and M.M. Al-Tabakha, *Encapsulation of ketoprofen for controlled drug release*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007. 66(1): p. 48-54.
 21. Thierry, B., et al., *Magnetic Resonance Signal-Enhancing Self-Assembled Coating for Endovascular Devices*. Advanced Materials, 2005. 17(7): p. 826-830.
 22. Etienne, O., et al., *Polyelectrolyte multilayer film coating and stability at the surfaces of oral prosthesis base polymers: an in vitro and in vivo study*. J Dent Res, 2006. 85(1): p. 44-8.
 23. Yu, D.-G., et al., *Construction of antithrombogenic polyelectrolyte multilayer on thermoplastic polyurethane via layer-by-layer self-assembly technique*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2007. 83B(1): p. 105-113.
 24. JISR, R.M., H.H. Rmaile, and J.B. Schlenoff, *Hydrophobic and ultrahydrophobic multilayer thin films from perfluorinated polyelectrolytes*. Angewandte Chemie (International Edition in English), 2005. 44(5): p. 782-785.
 25. Zhai, L., et al., *Stable Superhydrophobic Coatings from Polyelectrolyte Multilayers*. Nano Letters, 2004. 4(7): p. 1349-1353.
 26. Gergely, C., et al., *Human Serum Albumin Self-Assembly on Weak Polyelectrolyte Multilayer Films Structurally Modified by pH Changes*. Langmuir, 2004. 20(13): p. 5575-5582.
 27. Rudra, J.S., K. Dave, and D.T. Haynie, *Antimicrobial polypeptide multilayer nanocoatings*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2006. 17(11): p. 1301-1315.
 28. Richert, L., et al., *Layer by layer buildup of polysaccharide films: physical chemistry and cellular adhesion aspects*. Langmuir, 2004. 20(2): p. 448-58.
 29. Berg, M.C., et al., *Controlled drug release from porous polyelectrolyte multilayers*. Biomacromolecules, 2006. 7(1): p. 357-64.
 30. Tang, Z., et al., *Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering*. Advanced Materials (Weinheim, Germany), 2006. 18(24): p. 3203-3224.
 31. Thierry, B., et al., *Nanocoatings onto arteries via layer-by-layer deposition: toward the in vivo repair of damaged blood vessels*. J Am Chem Soc, 2003. 125(25): p. 7494-5.
 32. Gros, L., H. Ringsdorf, and H. Schupp, *Polymere Antitumormittel auf molekularer und zellulärer Basis?* Angewandte Chemie, 1981. 93(4): p. 311-332.
 33. Thierry, B., et al., *Delivery platform for hydrophobic drugs: prodrug approach combined with self-assembled multilayers*. J Am Chem Soc, 2005. 127(6): p. 1626-7.
 34. Roskamm, H., et al., *Herzkrankheiten: Pathophysiologie. Diagnostik. Therapie*. 2004: Springer. 1373.
 35. Ranade, S.V., et al., *Physical characterization of controlled release of paclitaxel from the TAXUS Express2 drug-eluting stent*. J Biomed Mater Res A, 2004. 71(4): p. 625-34.
 36. Sipos, L., et al., *Controlled delivery of paclitaxel from stent coatings using poly(hydroxystyrene-*b*-isobutylene-*b*-hydroxystyrene) and its acetylated derivative*. Biomacromolecules, 2005. 6(5): p. 2570-82.
-

37. Mackman, N., *Triggers, targets and treatments for thrombosis*. Nature, 2008. 451(7181): p. 914-8.
 38. Erbel, R., et al., *Absorbable coronary stents. New promising technology*. Herz, 2007. 32(4): p. 308-19.
 39. Walker, T. and H.-P. Wendel, *siRNA-Moleküle zur Behandlung von Blutgefäßen*. 2005: Germany.
 40. Fanggiday, J.C., et al., *Safety and efficacy of drug-eluting balloons in percutaneous treatment of bifurcation lesions: the DEBIUT (drug-eluting balloon in bifurcation Utrecht) registry*. Catheter Cardiovasc Interv, 2008. 71(5): p. 629-35.
 41. Scheller, B., et al., *Treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter*. N Engl J Med, 2006. 355(20): p. 2113-24.
 42. Iler, R.K., *Multilayers of colloidal particles*. Journal of Colloid & Interface Science, 1966. 21: p. 569.
 43. Decher, G. and J.D. Hong, *Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process .2. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces*. Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics, 1991. 95(11): p. 1430-1434.
 44. Decher, G., et al., *Creation and structural comparison of ultrathin film assemblies: transferred freely suspended films and Langmuir-Blodgett films of liquid crystals*. Thin Solid Films, 1992. 210-211(Part 2): p. 504-507.
 45. Decher, G. and J. Schmitt, *Fine-tuning of the film thickness of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes*. Progress in Colloid and Polymer Science, 1992. 89: p. 160.
 46. Schönhoff, M., *Layered polyelectrolyte complexes: physics of formation and molecular properties*. J. Phys.: Condens. Matter, 2003. 15: p. R1781-R1808.
 47. Schönhoff, M., *Self-assembled polyelectrolyte multilayers*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2003. 8(1): p. 86-95.
 48. Lenahan, K.M., et al., *Novel Polymer Dyes for Nonlinear Optical Applications Using Ionic Self-Assembled Monolayer Technology*. Advanced Materials, 1998. 10(11): p. 853-855.
 49. Mermut, O. and C.J. Barrett, *Stable sensor layers self-assembled onto surfaces using azobenzene-containing polyelectrolytes*. Analyst, 2001. 126(11): p. 1861-5.
 50. Salomaki, M., et al., *The Hofmeister anion effect and the growth of polyelectrolyte multilayers*. Langmuir, 2004. 20(9): p. 3679-83.
 51. Dubas, S.T. and J.B. Schlenoff, *Polyelectrolyte Multilayers Containing a Weak Polyacid: Construction and Deconstruction*. Macromolecules, 2001. 34(11): p. 3736-3740.
 52. Schlenoff, J.B., S.T. Dubas, and T. Farhat, *Sprayed Polyelectrolyte Multilayers*. Langmuir, 2000. 16(26): p. 9968-9969.
 53. Izquierdo, A., et al., *Dipping versus spraying: exploring the deposition conditions for speeding up layer-by-layer assembly*. Langmuir, 2005. 21(16): p. 7558-67.
 54. Porcel, C., et al., *From exponential to linear growth in polyelectrolyte multilayers*. Langmuir, 2006. 22(9): p. 4376-83.
 55. Voigt, A., E. Donath, and H. Möhwald, *Preparation of microcapsules of strong polyelectrolyte couples by one-step complex surface precipitation*. Macromolecular Materials and Engineering, 2000. 282(1): p. 13-16.
-

56. Serpe, M.J., et al., *Doxorubicin uptake and release from microgel thin films*. Biomacromolecules, 2005. 6(1): p. 408-13.
57. Lee, S.S., K.B. Lee, and J.D. Hong, *Evidence for spin coating electrostatic self-assembly of polyelectrolytes*. Langmuir, 2003. 19(18): p. 7592-7596.
58. Stockton, W.B. and M.F. Rubner, *Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers. 4. Layer-by-Layer Manipulation of Polyaniline via Hydrogen-Bonding Interactions*. Macromolecules, 1997. 30(9): p. 2717-2725.
59. Sukhishvili, S.A. and S. Granick, *Layered, Erasable Polymer Multilayers Formed by Hydrogen-Bonded Sequential Self-Assembly*. Macromolecules, 2002. 35(1): p. 301-310.
60. Kharlampieva, E. and S.A. Sukhishvili, *Competition of Hydrogen-Bonding and Electrostatic Interactions within Hybrid Polymer Multilayers*. Langmuir, 2004. 20(24): p. 10712-10717.
61. Lutkenhaus, J.L., et al., *Elastomeric flexible free-standing hydrogen-bonded nanoscale assemblies*. Journal of the American Chemical Society, 2005. 127(49): p. 17228-17234.
62. Johnston, A.P.R., E.S. Read, and F. Caruso, *DNA multilayer films on planar and colloidal supports: Sequential assembly of like-charged polyelectrolytes*. Nano Letters, 2005. 5(5): p. 953-956.
63. Jaber, J.A. and J.B. Schlenoff, *Polyelectrolyte multilayers with reversible thermal responsivity*. Macromolecules, 2005. 38(4): p. 1300-1306.
64. Baur, J.W., et al., *Thin-film light-emitting devices based on sequentially adsorbed multilayers of water-soluble poly(*p*-phenylene)s*. Advanced Materials (Weinheim, Germany), 1998. 10(17): p. 1452-1455.
65. Thierry, B., et al., *Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers*. Biomacromolecules, 2003. 4(6): p. 1564-71.
66. Ye, S., et al., *Multilayer nanocapsules of polysaccharide chitosan and alginate through layer-by-layer assembly directly on PS nanoparticles for release*. J Biomater Sci Polym Ed, 2005. 16(7): p. 909-23.
67. Guyomard, A., et al., *Loading and Release of Small Hydrophobic Molecules in Multilayer Films Based on Amphiphilic Polysaccharides*. Langmuir, 2006. 22(5): p. 2281-2287.
68. Kujawa, P., et al., *Probing the stability of biocompatible sodium hyaluronate/chitosan nanocoatings against changes in salinity and pH*. J Nanosci Nanotechnol, 2006. 6(6): p. 1565-74.
69. Schoeler, B., et al., *Polyelectrolyte films based on polysaccharides of different conformations: Effects on multilayer structure and mechanical properties*. Biomacromolecules, 2006. 7(6): p. 2065-2071.
70. Caruso, F., et al., *Characterization of Polyelectrolyte-Protein Multilayer Films by Atomic Force Microscopy, Scanning Electron Microscopy, and Fourier Transform Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy*. Langmuir, 1998. 14(16): p. 4559-4565.
71. Lvov, Y., et al., *Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption*. Journal of the American Chemical Society, 1995. 117(22): p. 6117-6123.
72. Cassier, T., K. Lowack, and G. Decher, *Layer-by-layer assembled protein/polymer hybrid films: nanoconstruction via specific recognition*. Supramolecular Science, 1998. 5(3-4 SU -): p. 309-315.
73. Boulmedais, F., et al., *Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials*. Biomaterials, 2004. 25(11): p. 2003-11.

74. Haynie, D.T., et al., *Polypeptide multilayer films*. Biomacromolecules, 2005. 6(6): p. 2895-913.
75. Leguen, E., et al., *Bioactive coatings based on polyelectrolyte multilayer architectures functionalized by embedded proteins, peptides or drugs*. Biomolecular Engineering, 2007. 24(1): p. 33-41.
76. Caruso, F. and H. Möhwald, *Protein multilayer formation on colloids through a stepwise self-assembly technique*. Journal of the American Chemical Society, 1999. 121(25): p. 6039-6046.
77. Lvov, Y., G. Decher, and G. Sukhorukov, *Assembly of thin films by means of successive deposition of alternate layers of DNA and poly(allylamine)*. Macromolecules, 1993. 26(20): p. 5396-5399.
78. Sukhorukov, G.B., et al., *Assembly of polyelectrolyte multilayer films by consecutively alternating adsorption of polynucleotides and polycations*. Thin Solid Films, 1996. 284-285: p. 220-223.
79. Sukhorukov, G.B., et al., *Multilayer films containing immobilized nucleic acids. Their structure and possibilities in biosensor applications*. Biosens Bioelectron, 1996. 11(9): p. 913-922.
80. Dootz, R., et al., *Raman and surface enhanced Raman microscopy of microstructured polyethylenimine/DNA multilayers*. Langmuir, 2006. 22(4): p. 1735-1741.
81. Johnston, A.P.R., et al., *Compositional and Structural Engineering of DNA Multilayer Films*. Langmuir, 2006. 22(7): p. 3251-3258.
82. Moya, S., et al., *Microencapsulation of Organic Solvents in Polyelectrolyte Multilayer Micrometer-Sized Shells*. Journal of Colloid and Interface Science, 1999. 216(2): p. 297-302.
83. Moya, S., et al., *Lipid Coating on Polyelectrolyte Surface Modified Colloidal Particles and Polyelectrolyte Capsules*. Macromolecules, 2000. 33(12): p. 4538-4544.
84. Ge, L., H. Mohwald, and J. Li, *Polymer-stabilized phospholipid vesicles formed on polyelectrolyte multilayer capsules*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 303(2): p. 653-9.
85. Michel, M., et al., *Layer by layer self-assembled polyelectrolyte multilayers with embedded phospholipid vesicles*. Langmuir, 2004. 20(12): p. 4835-9.
86. Georgieva, R., et al., *Conductance and Capacitance of Polyelectrolyte and Lipid-Polyelectrolyte Composite Capsules As Measured by Electrorotation*. Langmuir, 2000. 16(17): p. 7075-7081.
87. Mao, Z., et al., *Bioactive thin film of acidic fibroblast growth factor fabricated by layer-by-layer assembly*. Bioconjug Chem, 2005. 16(5): p. 1316-22.
88. Kim, B.Y. and M.L. Bruening, *pH-Dependent Growth and Morphology of Multilayer Dendrimer/Poly(acrylic acid) Films*. Langmuir, 2003. 19(1): p. 94-99.
89. Kohli, N., R.M. Worden, and I. Lee, *Direct transfer of preformed patterned bio-nanocomposite films on polyelectrolyte multilayer templates*. Macromol Biosci, 2007. 7(6): p. 789-797.
90. Cant, N.E., et al., *Surface functionalisation for the self-assembly of nanoparticle/polymer multilayer films*. Thin Solid Films, 2003. 426(1-2): p. 31-39.
91. Skirtach, A.G., et al., *The role of metal nanoparticles in remote release of encapsulated materials*. Nano Lett, 2005. 5(7): p. 1371-7.
92. De Geest, B.G., et al., *Stimuli-responsive multilayered hybrid nanoparticle/polyelectrolyte capsules*. Macromolecular Rapid Communications, 2007. 28(1): p. 88-95.

93. Constantine, C.A., et al., *Layer-by-layer biosensor assembly incorporating functionalized quantum dots*. Langmuir, 2003. 19(23): p. 9863-9867.
94. Ma, Q., et al., *Multicolor quantum dot-encoded microspheres for the detection of biomolecules*. Talanta, 2007. 72(4): p. 1446-1452.
95. Guldi, D.M., et al., *Photoactive Nanowires in Fullerene-Ferrocene Dyad Polyelectrolyte Multilayers*. Nano Lett., 2002. 2(7): p. 775-780.
96. Mamedov, A.A., et al., *Molecular design of strong single-wall carbon nanotube/polyelectrolyte multilayer composites*. Nature Materials, 2002. 1(3): p. 190-194.
97. Lvov, Y., et al., *Successive Deposition of Alternate Layers of Polyelectrolytes and a Charged Virus*. Langmuir, 1994. 10(11): p. 4232-4236.
98. Huck, W.T.S., A.D. Stroock, and G.M. Whitesides, *Synthesis of geometrically well defined, molecularly thin polymer films*. Angewandte Chemie (International Edition in English), 2000. 39(6): p. 1058-+.
99. Nolte, M., I. Donch, and A. Fery, *Freestanding Polyelectrolyte Films as Sensors for Osmotic Pressure*. Chemphyschem, 2006. 7(9): p. 1985-1989.
100. Ono, S.S. and G. Decher, *Preparation of ultrathin self-standing polyelectrolyte multilayer membranes at physiological conditions using pH-responsive film segments as sacrificial layers*. Nano Lett, 2006. 6(4): p. 592-8.
101. Hess, M., et al., *Terminology of polymers containing ionizable or ionic groups and of polymers containing ions (IUPAC Recommendations 2006)*. Pure and Applied Chemistry, 2006. 78(11): p. 2067-2074.
102. Aharon Katchalsky, P.S., *Potentiometric titrations of polymethacrylic acid*. Journal of Polymer Science, 1947. 2(4): p. 432-446.
103. Burke, S.E. and C.J. Barrett, *Controlling the physicochemical properties of weak polyelectrolyte multilayer films through acid/base equilibria*. Pure and Applied Chemistry, 2004. 76(7-8): p. 1387-1398.
104. Theo, O., *Polyelectrolytes near the rod limit*. Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition, 1977. 15(3): p. 477-483.
105. Skolnick, J. and M. Fixman, *Electrostatic Persistence Length of a Wormlike Polyelectrolyte*. Macromolecules, 1977. 10(5): p. 944-948.
106. Manning, G.S., *Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions I. Colligative Properties*. The Journal of Chemical Physics, 1969. 51(3): p. 924-933.
107. Manning, G.S., *Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions II. Self-Diffusion of the Small Ions*. The Journal of Chemical Physics, 1969. 51(3): p. 934-938.
108. Manning, G.S., *Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions. III. An Analysis Based on the Mayer Ionic Solution Theory*. The Journal of Chemical Physics, 1969. 51(8): p. 3249-3252.
109. Peyratout, C.S. and L. Dahne, *Tailor-made polyelectrolyte microcapsules: from multilayers to smart containers*. Angew Chem Int Ed Engl, 2004. 43(29): p. 3762-83.
110. Netz, R.R. and D. Andelman, *Neutral and charged polymers at interfaces*. Physics Reports, 2003. 380(1-2): p. 1-95.
111. Joanny, J.F. and M. Castelnovo, *Polyelectrolytes Adsorption and Multilayer Formation*, in *Multilayer Thin Films*, G. Decher and J.B. Schlenoff, Editors. 2002, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 87-97.
112. Ladam, G., et al., *In Situ Determination of the Structural Properties of Initially Deposited Polyelectrolyte Multilayers*. Langmuir, 2000. 16(3): p. 1249-1255.

113. Salomaki, M., I.A. Vinokurov, and J. Kankare, *Effect of Temperature on the Buildup of Polyelectrolyte Multilayers*. Langmuir, 2005. 21(24): p. 11232-11240.
114. Schlenoff, J.B. and S.T. Dubas, *Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution*. Macromolecules, 2001. 34(3): p. 592-598.
115. Dubas, S.T. and J.B. Schlenoff, *Factors controlling the growth of polyelectrolyte multilayers*. Macromolecules, 1999. 32(24): p. 8153-8160.
116. Klitzing, R.V. and R. Steitz, *Internal structure of polyelectrolyte multilayers*, in *Handbook of Polyelectrolytes and Their Applications*, S.K. Tripathy, J. Kumar, and H.S. Nalwa, Editors. 2002, American Scientific Publishers: North Lewis Way. p. 313-334.
117. Decher, G., *Polyelekrolyte Multilayers, an Overview*, in *Multilayer Thin Films*, G. Decher and J.B. Schlenoff, Editors. 2003, Wiley-VCH.
118. Caruso, F., et al., 1. *Ultrathin Multilayer Polyelectrolyte Films on Gold: Construction and Thickness Determination*. 1997. p. 3422-3426.
119. Radeva, T. and K. Kamburova, *Polypeptide multilayer films on colloidal particles: An in situ electro-optical study*. Journal of Colloid and Interface Science, 2007. 308(2): p. 309-317.
120. Tezcaner, A., et al., *Polyelectrolyte multilayer films as substrates for photoreceptor cells*. Biomacromolecules, 2006. 7(1): p. 86-94.
121. Boulmedais, F., et al., *Controlled electrodissolution of polyelectrolyte multilayers: a platform technology towards the surface-initiated delivery of drugs*. Advanced Functional Materials, 2006. 16(1): p. 63-70.
122. Guyomard, A., G. Muller, and K. Glinel, *Buildup of multilayers based on amphiphilic polyelectrolytes*. Macromolecules, 2005. 38(13): p. 5737-5742.
123. Garza, J.M., et al., *Polyelectrolyte multilayers and degradable polymer layers as multicompartiment films*. Langmuir, 2005. 21(26): p. 12372-7.
124. Halthur, T.J. and U.M. Elofsson, *Multilayers of charged polypeptides as studied by in situ ellipsometry and quartz crystal microbalance with dissipation*. Langmuir, 2004. 20(5): p. 1739-45.
125. Lösche, M., et al., *Detailed structure of molecularly thin polyelectrolyte multilayer films on solid substrates as revealed by neutron reflectometry*. Macromolecules, 1998. 31(25): p. 8893-8906.
126. Steitz, R., et al., *Influence of the ionic strength on the structure of polyelectrolyte films at the solid/liquid interface*. Colloids & Surfaces A-Physicochemical & Engineering Aspects, 2000. 163(1): p. 63-70.
127. Steitz, R., W. Jaeger, and R.v. Klitzing, *Influence of Charge Density and Ionic Strength on the Multilayer Formation of Strong Polyelectrolytes*. Langmuir, 2001. 17(15): p. 4471-4474.
128. Kovacevic, D., et al., *Kinetics of formation and dissolution of weak polyelectrolyte multilayers: Role of salt and free polyions*. Langmuir, 2002. 18(14): p. 5607-5612.
129. Kim, S.-H., et al., *Layer-by-layer self-assembled multilayer of cationic spiroxazine and polystyrenesulfonate*. Dyes and Pigments, 2007. 72(3): p. 378-382.
130. Richert, L., et al., *pH dependent growth of poly(L-lysine)/poly(L-glutamic) acid multilayer films and their cell adhesion properties*. Surface Science, 2004. 570(1-2): p. 13-29.

131. Shiratori, S.S. and M.F. Rubner, *pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes*. Macromolecules, 2000. 33(11): p. 4213-4219.
 132. Kato, N., et al., *Thin Multilayer Films of Weak Polyelectrolytes on Colloid Particles*. Macromolecules, 2002. 35(26): p. 9780-9787.
 133. Choi, J. and M.F. Rubner, *Influence of the degree of ionization on weak polyelectrolyte multilayer assembly*. Macromolecules, 2005. 38(1): p. 116-124.
 134. Shutava, T., et al., *pH responsive decomposable layer-by-layer nanofilms and capsules on the basis of tannic acid*. Macromolecules, 2005. 38(7): p. 2850-2858.
 135. Rubner, M.F., *PH-controlled fabrication of polyelectrolyte multilayers: assembly and applications*, in *Multilayer Thin Films*. 2003. p. 133-154.
 136. Poptoshev, E., B. Schoeler, and F. Caruso, *Influence of Solvent Quality on the Growth of Polyelectrolyte Multilayers*. Langmuir, 2004. 20(3): p. 829-834.
 137. Buscher, K., et al., *Influence of adsorption conditions on the structure of polyelectrolyte multilayers*. Langmuir, 2002. 18(9): p. 3585-3591.
 138. Gopinadhan, M., et al., *Approaching the precipitation temperature of the deposition solution and the effects on the internal order of polyelectrolyte multilayers*. Macromolecules, 2005. 38(12): p. 5228-5235.
 139. Lvov, Y., G. Decher, and H. Moehwald, *Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine)*. Langmuir, 1993. 9(2): p. 481-486.
 140. Sui, Z., D. Salloum, and J.B. Schlenoff, *Effect of Molecular Weight on the Construction of Polyelectrolyte Multilayers: Stripping versus Sticking*. Langmuir, 2003. 19(6): p. 2491-2495.
 141. Kohler, K., H. Mohwald, and G.B. Sukhorukov, *Thermal Behavior of Polyelectrolyte Multilayer Microcapsules: 2. Insight into Molecular Mechanisms for the PDADMAC/PSS System*. J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys, 2006. 110(47): p. 24002-10.
 142. Schoeler, B., G. Kumaraswamy, and F. Caruso, *Investigation of the influence of polyelectrolyte charge density on the growth of multilayer thin films prepared by the layer-by-layer technique*. Macromolecules, 2002. 35(3): p. 889-897.
 143. Glinel, K., et al., *Influence of Polyelectrolyte Charge Density on the Formation of Multilayers of Strong Polyelectrolytes at Low Ionic Strength*. Langmuir, 2002. 18(4): p. 1408-1412.
 144. McAloney, R.A., et al., *Atomic Force Microscopy Studies of Salt Effects on Polyelectrolyte Multilayer Film Morphology*. Langmuir, 2001. 17(21): p. 6655-6663.
 145. Yoo, D., S.S. Shiratori, and M.F. Rubner, *Controlling Bilayer Composition and Surface Wettability of Sequentially Adsorbed Multilayers of Weak Polyelectrolytes*. Macromolecules, 1998. 31(13): p. 4309-4318.
 146. Schmitt, J., et al., *Internal structure of layer-by-layer adsorbed polyelectrolyte films: a neutron and x-ray reflectivity study*. Macromolecules, 1993. 26(25): p. 7058-7063.
 147. Klitzing, R. and H. Moehwald, *Proton Concentration Profile in Ultrathin Polyelectrolyte Films*. Langmuir, 1995. 11(9): p. 3554-3559.
 148. Schlenoff, J.B., H. Ly, and M. Li, *Charge and mass balance in polyelectrolyte multilayers*. Journal of the American Chemical Society, 1998. 120(30): p. 7626-7634.
 149. Estrela-Lopis, I., et al., *SANS Studies of Polyelectrolyte Multilayers on Colloidal Templates*. Langmuir, 2002. 18(21): p. 7861-7866.
-

150. Zhang, F., et al., *Bioactive galactose-branched polyelectrolyte multilayers and microcapsules: self-assembly, characterization, and biospecific lectin adsorption*. Langmuir, 2006. 22(20): p. 8458-64.
 151. Park, J. and P.T. Hammond, *Polyelectrolyte multilayer formation on neutral hydrophobic surfaces*. Macromolecules, 2005. 38(25): p. 10542-10550.
 152. Kern, W. and D.A. Puotinen, *Cleaning solutions based on hydrogenperoxide for use in silicon semiconductor technology*. RCA Review, 1970. 31: p. 187-206.
 153. Gittins, D. and F. Caruso, *Multilayered Polymer Nanocapsules Derived from Gold Nanoparticle Templates*. Advanced Materials, 2000. 25(12): p. 1947-1949.
 154. Radtchenko, I.L., et al., *Assembly of Alternated Multivalent Ion/Polyelectrolyte Layers on Colloidal Particles. Stability of the Multilayers and Encapsulation of Macromolecules into Polyelectrolyte Capsules*. Journal of Colloid and Interface Science, 2000. 230(2): p. 272-280.
 155. Schneider, G. and G. Decher, *From functional core/shell nanoparticles prepared via layer-by-layer deposition to empty nanospheres*. Nano Letters, 2004. 4(10): p. 1833.
 156. Voigt, A., et al., *Membrane Filtration for Microencapsulation and Microcapsules Fabrication by Layer-by-Layer Polyelectrolyte Adsorption*. Ind. Eng. Chem. Res., 1999. 38(10): p. 4037-4043.
 157. Moehwald, H., E. Donath, and G. Sukhorukov, *Smart capsules*, in *Multilayer Thin Films*. 2003. p. 363-392.
 158. Shenoy, D.B., et al., *Layer-by-layer engineering of biocompatible, decomposable core-shell structures*. Biomacromolecules, 2003. 4(2): p. 265-72.
 159. De Geest, B.G., et al., *Layer-by-layer coating of degradable microgels for pulsed drug delivery*. J Control Release, 2006.
 160. De Geest, B.G., et al., *Self-rupturing and hollow microcapsules prepared from bio-polyelectrolyte-coated microgels*. Advanced Functional Materials, 2007. 17(4): p. 531-537.
 161. Gao, C., et al., *The decomposition process of melamine formaldehyde cores - the key step in the fabrication of ultrathin polyelectrolyte multilayer capsules*. Macromol. Mater. Eng., 2001. 286(6): p. 355-361.
 162. Gao, C., et al., *Melamine Formaldehyde Core Decomposition as the Key Step Controlling Capsule Integrity: Optimizing the Polyelectrolyte Capsule Fabrication*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2002. 203(7): p. 953-960.
 163. Elsner, N., F. Dubreuil, and A. Fery, *Tuning of microcapsule adhesion by varying the capsule-wall thickness*. Physical Review E: Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics, 2004. 69(3): p. 031802/1-031802/6.
 164. Schuler, C. and F. Caruso, *Decomposable hollow biopolymer-based capsules*. Biomacromolecules, 2001. 2(3): p. 921-6.
 165. Antipov, A.A., et al., *Carbonate microparticles for hollow polyelectrolyte capsules fabrication*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2003. 224(1-3): p. 175-183.
 166. Adalsteinsson, T., W.F. Dong, and M. Schonhoff, *Diffusion of 77000 g/mol dextran in submicron polyelectrolyte capsule dispersions measured using PFG-NMR*. Journal of Physical Chemistry B, 2004. 108(52): p. 20056-20063.
 167. Itoh, Y., et al., *Preparation of Biodegradable Hollow Nanocapsules by Silica Template Method*. Chemistry Letters, 2004. 33(12): p. 1552.
-

168. Moya, S., et al., *Polyelectrolyte multilayer capsules templated on biological cells: core oxidation influences layer chemistry*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. 183-185: p. 27-40.
169. Georgieva, R., et al., *Permeability and conductivity of red blood cell templated polyelectrolyte capsules coated with supplementary layers*. Langmuir, 2004. 20(5): p. 1895-1900.
170. Donath, E., et al., *Hollow Polymer Shells from Biological Templates: Fabrication and Potential Applications*. Chemistry a European Journal, 2002. 8(23): p. 5481-5485.
171. Sakaguchi, H., T. Serizawa, and M. Akashi, *Preparation and characterization of stimuli-resistible hydrogels nano-coated with polyelectrolyte multilayer films*. J Nanosci Nanotechnol, 2006. 6(4): p. 1124-7.
172. Zhu, H., R. Srivastava, and M.J. McShane, *Spontaneous loading of positively charged macromolecules into alginate-templated polyelectrolyte multilayer microcapsules*. Biomacromolecules, 2005. 6(4): p. 2221-8.
173. Wong, J.E., et al., *Layer-by-layer assembly of a magnetic nanoparticle shell on a thermoresponsive microgel core*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2007. 311(1): p. 219-223.
174. Leporatti, S., et al., *Shrinking of ultrathin polyelectrolyte multilayer capsules upon annealing: a confocal laser scanning microscopy and scanning force microscopy study*. European Physical Journal E: Soft Matter, 2001. 5(1): p. 13-20.
175. Dong, W.F., et al., *Influence of shell structure on stability, integrity, and mesh size of polyelectrolyte capsules: Mechanism and strategy for improved preparation*. Chemistry of Materials, 2005. 17(10): p. 2603-2611.
176. Ye, S., et al., *New loading process and release properties of insulin from polysaccharide microcapsules fabricated through layer-by-layer assembly*. J Control Release, 2006. 112(1): p. 79-87.
177. Dejugnat, C. and G.B. Sukhorukov, *pH-Responsive Properties of Hollow Polyelectrolyte Microcapsules Templated on Various Cores*. Langmuir, 2004. 20(17): p. 7265-7269.
178. Cordeiro, A.L., et al., *Effect of shear stress on adhering polyelectrolyte capsules*. J Colloid Interface Sci, 2004. 280(1): p. 68-75.
179. Kim, B.S., et al., *Superswollen ultrasoft polyelectrolyte microcapsules*. Macromolecules, 2005. 38(19): p. 8066-8070.
180. Ibarz, G., et al., *Resealing of polyelectrolyte capsules after core removal*. Macromolecular Rapid Communications, 2002. 23(8): p. 474-478.
181. Balabushevich, N.G., et al., *Loading the Multilayer Dextran Sulfate/Protamine Microsized Capsules with Peroxidase*. Biomacromolecules, 2003. 4(5): p. 1191-1197.
182. Mao, Z., et al., *Preformed microcapsules for loading and sustained release of ciprofloxacin hydrochloride*. J Control Release, 2005. 104(1): p. 193-202.
183. Neu, B., et al., *Biological cells as templates for hollow microcapsules*. Journal of Microencapsulation, 2001. 18(3): p. 385 - 395.
184. P. Schuetz, F.C., *Copper-Assisted Weak Polyelectrolyte Multilayer Formation on Microspheres and Subsequent Film Crosslinking*. Advanced Functional Materials, 2003. 13(12): p. 929-937.
185. Yu, A.M., et al., *Mesoporous silica particles as templates for preparing enzyme-loaded biocompatible microcapsules*. Advanced Materials, 2005. 17(14): p. 1737-+.

186. Volodkin, D.V., et al., *Matrix Polyelectrolyte Microcapsules: New System for Macromolecule Encapsulation*. Langmuir, 2004. 20(8): p. 3398-3406.
187. Petrov, A.I., D.V. Volodkin, and G.B. Sukhorukov, *Protein-calcium carbonate coprecipitation: a tool for protein encapsulation*. Biotechnol Prog, 2005. 21(3): p. 918-25.
188. Zhi, Z.L. and D.T. Haynie, *Straightforward and effective protein encapsulation in polypeptide-based artificial cells*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2006. 34(2): p. 189-203.
189. Balabushevich, N.G., G.B. Sukhorukov, and N.I. Larionova, *Polyelectrolyte multilayer microspheres as carriers for bienzyme system: Preparation and characterization*. Macromolecular Rapid Communications, 2005. 26(14): p. 1168-1172.
190. Vinogradova, O.I., et al., *Multilayer DNA/Poly(allylamine hydrochloride) Microcapsules: Assembly and Mechanical Properties*. Biomacromolecules, 2005. 6(3): p. 1495-1502.
191. An, Z., et al., *Fabrication and Characterization of Human Serum Albumin and Dimyristoylphosphatidic Acid Microcapsules Based on Template Technique*. Chem. Mater., 2005. 17(10): p. 2514-2519.
192. Dubas, S.T. and J.B. Schlenoff, *Swelling and Smoothing of Polyelectrolyte Multilayers by Salt*. Langmuir, 2001. 17(25): p. 7725-7727.
193. McAloney, R.A., V. Dudnik, and M.C. Goh, *Kinetics of Salt-Induced Annealing of a Polyelectrolyte Multilayer Film Morphology*. Langmuir, 2003. 19(9): p. 3947-3952.
194. Zhai, L., et al., *pH-Gated Porosity Transitions of Polyelectrolyte Multilayers in Confined Geometries and Their Application as Tunable Bragg Reflectors*. Macromolecules, 2004. 37(16): p. 6113-6123.
195. Hiller, J.A. and M.F. Rubner, *Reversible molecular memory and pH-switchable swelling transitions in polyelectrolyte multilayers*. Macromolecules, 2003. 36: p. 4078.
196. Müller, M., et al., *Stimulation and binding properties of polyelectrolyte multilayers verified by ATR-FTIR spectroscopy*. Macromolecular Symposia, 2001. 164(1): p. 197-210.
197. Ahrens, H., et al., *Poly(styrene sulfonate) self-organization: electrostatic and secondary interactions*. Macromolecular Symposia, 2004. 211(1): p. 93-106.
198. Kohler, K., et al., *Salt-Induced Swelling-to-Shrinking Transition in Polyelectrolyte Multilayer Capsules*. Physical Review Letters, 2006. 97(18): p. 188301-4.
199. Wong, J.E., et al., *Swelling Behavior of Polyelectrolyte Multilayers in Saturated Water Vapor*. Macromolecules, 2004. 37(19): p. 7285-7289.
200. Kügler, R., J. Schmitt, and W. Knoll, *The swelling Behavior of polyelectrolyte multilayers in air of different relative humidity and in water*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2002. 203(2): p. 413-419.
201. Mendelsohn, J.D., et al., *Fabrication of Microporous Thin Films from Polyelectrolyte Multilayers*. Langmuir, 2000. 16(11): p. 5017-5023.
202. Hiller, J.A., J.D. Mendelsohn, and M.F. Rubner, *Reversibly erasable nanoporous anti-reflection coatings from polyelectrolyte multilayers*. Nat Mater, 2002. 1(1): p. 59-63.
203. Ahn, H., et al., *Reversible porosity transitions in polyelectrolyte multilayers*. PMSE Preprints, 2004. 90: p. 4-5.

204. Jomaa, H. and J. Schlenoff, *Salt-induced polyelectrolyte interdiffusion in multilayered films: A neutron reflectivity study*. Macromolecules, 2005. 38(20): p. 8473-8480.
205. Heuvingh, J., M. Zappa, and A. Fery, *Salt softening of polyelectrolyte multilayer capsules*. Langmuir, 2005. 21(7): p. 3165-3171.
206. Lebedeva, O.V., et al., *Salt softening of polyelectrolyte multilayer microcapsules*. Journal of Colloid and Interface Science, 2005. 284(2): p. 455-462.
207. Farhat, T., et al., *Water and Ion Pairing in Polyelectrolyte Multilayers*. Langmuir, 1999. 15(20): p. 6621-6623.
208. Miller, M.D. and M.L. Bruening, *Correlation of the swelling and permeability of polyelectrolyte multilayer films*. Chemistry of Materials, 2005. 17(21): p. 5375-5381.
209. Antipov, A.A., et al., *Sustained Release Properties of Polyelectrolyte Multilayer Capsules*. Journal of Physical Chemistry B, 2001. 105(12): p. 2281-2284.
210. Mauser, T., C. Dejugnat, and G.B. Sukhorukov, *Balance of Hydrophobic and Electrostatic Forces in the pH Response of Weak Polyelectrolyte Capsules*. J. Phys. Chem. B, 2006. 110(41): p. 20246-20253.
211. Antipov, A.A., et al., *Polyelectrolyte multilayer capsule permeability control*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2002. 198-200: p. 535-541.
212. Ibarz, G., et al., *Smart micro- and nanocontainers for storage, transport, and release*. Advanced Materials, 2001. 13(17): p. 1324-1327.
213. Antipov, A.A., G.B. Sukhorukov, and H. Möhwald, *Influence of the Ionic Strength on the Polyelectrolyte Multilayers' Permeability*. Langmuir, 2003. 19(6): p. 2444-2448.
214. Gao, C., et al., *Swelling and Shrinking of Polyelectrolyte Microcapsules in Response to Changes in Temperature and Ionic Strength*. Chemistry - A European Journal, 2003. 9(4): p. 915-920.
215. Georgieva, R., et al., *Influence of different salts on micro-sized polyelectrolyte hollow capsules*. J. Mater. Chem., 2005. 15: p. 4301 - 4310.
216. Gao, C., H. Möhwald, and J.C. Shen, *Enhanced Biomacromolecule Encapsulation by Swelling and Shrinking Procedures*. ChemPhysChem, 2004. 5(1): p. 116-120.
217. Ibarz, G., et al., *Controlled permeability of polyelectrolyte capsules via defined annealing*. Chemistry of Materials, 2002. 14(10): p. 4059-4062.
218. Kohler, K., et al., *Thermal Behavior of Polyelectrolyte Multilayer Microcapsules. 1. The Effect of Odd and Even Layer Number*. J. Phys. Chem. B, 2005. 109(39): p. 18250-18259.
219. Dong, W.F., et al., *Controlled Permeability in Polyelectrolyte Films via Solvent Treatment*. Chem. Mater., 2005. 17(20): p. 4992-4999.
220. Lvov, Y., et al., *Urease encapsulation in nanoorganized microshells*. Nano Letters, 2001. 1(3): p. 125-128.
221. Shutava, T.G. and Y.M. Lvov, *Nano-engineered microcapsules of tannic acid and chitosan for protein encapsulation*. J Nanosci Nanotechnol, 2006. 6(6): p. 1655-61.
222. Shi, X. and F. Caruso, *Release Behavior of Thin-Walled Microcapsules Composed of Polyelectrolyte Multilayers*. Langmuir, 2001. 17(6): p. 2036-2042.

223. Shenoy, D.B. and G.B. Sukhorukov, *Engineered microcrystals for direct surface modification with layer-by-layer technique for optimized dissolution*. Eur J Pharm Biopharm, 2004. 58(3): p. 521-7.
224. Ai, H., et al., *Nano-encapsulation of furosemide microcrystals for controlled drug release*. Journal of Controlled Release, 2003. 86(1): p. 59-68.
225. Baumler, H., et al., *Plastic behaviour of polyelectrolyte microcapsules derived from colloid templates*. J Microencapsul, 2000. 17(5): p. 651-5.
226. Huang, L.Y. and M.C. Yang, *Hemocompatibility of layer-by-layer hyaluronic acid/heparin nanostructure coating on stainless steel for cardiovascular stents and its use for drug delivery*. J Nanosci Nanotechnol, 2006. 6(9-10): p. 3163-70.
227. Shi, Z., et al., *In vitro antibacterial and cytotoxicity assay of multilayered polyelectrolyte-functionalized stainless steel*. J Biomed Mater Res A, 2006. 76(4): p. 826-34.
228. Chuang, H.F. and P.T. Hammond, *Layer-by-layer thin films for sequential delivery of multiple agents*. Polymer Preprints (American Chemical Society, Division of Polymer Chemistry), 2006. 47(2): p. 78-79.
229. Schultz, P., et al., *Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide, alpha-MSH, for coating a tracheal prosthesis*. Biomaterials, 2005. 26(15): p. 2621-30.
230. Dai, Z., et al., *Novel Encapsulated Functional Dye Particles Based on Alternately Adsorbed Multilayers of Active Oppositely Charged Macromolecular Species*. Macromolecular Rapid Communications, 2001. 22(10): p. 756-762.
231. Wang, C., et al., *Enhanced Resistance of Polyelectrolyte Multilayer Microcapsules to Pepsin Erosion and Release Properties of Encapsulated Indomethacin*. Biomacromolecules, 2007. 8(5): p. 1739-1744.
232. Sukhorukov, G.B., et al., *pH-controlled macromolecule encapsulation in and release from polyelectrolyte multilayer nanocapsules*. Macromolecular Rapid Communications, 2001. 22(1): p. 44-46.
233. Déjugnat, C., D. Halozan, and G.B. Sukhorukov, *Defined Picogram Dose Inclusion and Release of Macromolecules using Polyelectrolyte Microcapsules*. Macromolecular Rapid Communications, 2005. 26(12): p. 961-967.
234. Dähne, L., et al., *Fabrication of micro reaction cages with tailored properties*. Journal of the American Chemical Society, 2001. 123(23): p. 5431-5436.
235. Zhu, H. and M.J. McShane, *Synthesis and functionalization of monodisperse poly(ethylene glycol) hydrogel microspheres within polyelectrolyte multilayer microcapsules*. Chem Commun (Camb), 2006(2): p. 153-5.
236. Sukhorukov, G.B., et al., *Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds*. Journal of Materials Chemistry, 2004. 14(14): p. 2073-2081.
237. Radtchenko, I.L., G.B. Sukhorukov, and H. Mohwald, *A novel method for encapsulation of poorly water-soluble drugs: precipitation in polyelectrolyte multilayer shells*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. 242(1-2): p. 219-223.
238. Sukhorukov, G., et al., *Controlled Precipitation of Dyes into Hollow Polyelectrolyte Capsules Based on Colloids and Biocolloids*. Advanced Materials, 2000. 12("): p. 112-115.

239. Wang, C., et al., *Combination of adsorption by porous CaCO₃ microparticles and encapsulation by polyelectrolyte multilayer films for sustained drug delivery*. Int J Pharm, 2006. 308(1-2): p. 160-7.
240. Palath, N., et al., *Polypeptide multilayer nanofilm artificial red blood cells*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2006.
241. Zhi, Z.L. and D.T. Haynie, *High-capacity functional protein encapsulation in nanoengineered polypeptide microcapsules*. Chem Commun (Camb), 2006(2): p. 147-9.
242. Wang, Y. and F. Caruso, *Enzyme encapsulation in nanoporous silica spheres*. Chem. Commun., 2004: p. 1528-1529.
243. Wang, Y., A. Yu, and F. Caruso, *Nanoporous Polyelectrolyte Spheres Prepared by Sequentially Coating Sacrificial Mesoporous Silica Spheres*. Angew Chem Int Ed Engl, 2005. 44(19): p. 2888-2892.
244. Zhu, Y., et al., *Stimuli-responsive controlled drug release from a hollow mesoporous silica sphere/polyelectrolyte multilayer core-shell structure*. Angew Chem Int Ed Engl, 2005. 44(32): p. 5083-7.
245. Martin, H., *Innermolekular vernetzte Makromoleküle (Mikrogel): Synthese, Eigenschaften und Nachweis in Gemischen*. Die Makromolekulare Chemie, 1974. 175(2): p. 613-639.
246. Daly, E. and B.R. Saunders, *A Study of the Effect of Electrolyte on the Swelling and Stability of Poly(N-isopropylacrylamide) Microgel Dispersions*. Langmuir, 2000. 16(13): p. 5546-5552.
247. Zhang, J., L.S. Chua, and D.M. Lynn, *Multilayered Thin Films that Sustain the Release of Functional DNA under Physiological Conditions*. Langmuir, 2004. 20(19): p. 8015-8021.
248. Jessel, N., et al., *Bioactive Coatings Based on a Polyelectrolyte Multilayer Architecture Functionalized by Embedded Proteins*. 2003. p. 692-695.
249. Chluba, J., et al., *Peptide hormone covalently bound to polyelectrolytes and embedded into multilayer architectures conserving full biological activity*. Biomacromolecules, 2001. 2(3): p. 800-5.
250. Hübsch, E., et al., *Multivalent ion/polyelectrolyte exchange processes in exponentially growing multilayers*, in *Langmuir*. 2005. p. 3664-3669.
251. Chung, A.J. and M.F. Rubner, *Methods of Loading and Releasing Low Molecular Weight Cationic Molecules in Weak Polyelectrolyte Multilayer Films*. Langmuir, 2002. 18(4): p. 1176-1183.
252. Burke, S.E. and C.J. Barrett, *pH-Dependent Loading and Release Behavior of Small Hydrophilic Molecules in Weak Polyelectrolyte Multilayer Films*. Macromolecules, 2004. 37(14): p. 5375-5384.
253. Vodouhe, C., et al., *Control of drug accessibility on functional polyelectrolyte multilayer films*. Biomaterials, 2006. 27(22): p. 4149-56.
254. Picart, C., et al., *Buildup Mechanism for Poly(l-lysine)/Hyaluronic Acid Films onto a Solid Surface*. Langmuir, 2001. 17(23): p. 7414-7424.
255. Picart, C., et al., *Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(20): p. 12531-5.
256. Nicol, E., J.-L. Habib-Jiwan, and A.M. Jonas, *Polyelectrolyte Multilayers as Nanocontainers for Functional Hydrophilic Molecules*. Langmuir, 2003. 19(15): p. 6178-6186.
257. Jessel, N., et al., *Pyridylamino-cyclodextrin as a Molecular Chaperone for Lipopolysaccharide Embedded in a Multilayered Polyelectrolyte Architecture*. Advanced Functional Materials, 2004. 14(10): p. 963-969.

258. Gangloff, S.C., et al., *Biologically active lipid A antagonist embedded in a multilayered polyelectrolyte architecture*. Biomaterials, 2006. 27(9): p. 1771-7.
259. Jessel, N., et al., *Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(23): p. 8618-21.
260. Benkirane-Jessel, N., et al., *Control of Monocyte Morphology on and Response to Model Surfaces for Implants Equipped with Anti-Inflammatory Agent*. 2004. p. 1507-1511.
261. Schneider, A., et al., *Multifunctional Polyelectrolyte Multilayer Films: Combining Mechanical Resistance, Biodegradability, and Bioactivity*. Biomacromolecules, 2007. 8(1): p. 139-145.
262. Wessely, R., A. Schomig, and A. Kastrati, *Sirolimus and Paclitaxel on polymer-based drug-eluting stents: similar but different*. J Am Coll Cardiol, 2006. 47(4): p. 708-14.
263. Kamath, K.R., J.J. Barry, and K.M. Miller, *The Taxus drug-eluting stent: a new paradigm in controlled drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. 58(3): p. 412-36.
264. Unger, F., et al., *Poly(ethylene carbonate): a thermoelastic and biodegradable biomaterial for drug eluting stent coatings?* J Control Release, 2007. 117(3): p. 312-21.
265. Pelsoczi, I., et al., *Structural characterization of self-assembled polypeptide films on titanium and glass surfaces by atomic force microscopy*. Biomacromolecules, 2005. 6(6): p. 3345-50.
266. Li, C., et al., *Water soluble Paclitaxel derivatives*. 2002: US 6.515.017. p. 1-40.
267. *FDA approves treatment IND protocol for taxol*. Clin Pharm, 1992. 11(11): p. 912.
268. Singla, A.K., A. Garg, and D. Aggarwal, *Paclitaxel and its formulations*. Int J Pharm, 2002. 235(1-2): p. 179-92.
269. Teuscher, E., *Biogene Arzneimittel*. 1997: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 1-569.
270. Richard, T., W.L. Liggins, and H.H.M. Burt, *Solid-state characterization of paclitaxel*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1997. 86(12): p. 1458-1463.
271. Feng, S.-s. and G. Huang, *Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol(R)) from nanospheres of biodegradable polymers*. Journal of Controlled Release, 2001. 71(1): p. 53-69.
272. Henderson, I.C. and V. Bhatia, *Nab-paclitaxel for breast cancer: a new formulation with an improved safety profile and greater efficacy*. Expert Rev Anticancer Ther, 2007. 7(7): p. 919-43.
273. Duncan, R., *Polymer conjugates as anticancer nanomedicines*. Nat Rev Cancer, 2006. 6(9): p. 688-701.
274. Winnik, M.A., et al., *Study of Interaction of Poly(ethylene imine) with Sodium Dodecyl Sulfate in Aqueous Solution by Light Scattering, Conductometry, NMR, and Microcalorimetry*. Langmuir, 2000. 16(10): p. 4495-4510.
275. Venyaminov, S.Y. and N.N. Kalnin, *Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water solutions. II. Amide absorption bands of polypeptides and fibrous proteins in alpha-, beta, and random coil conformations*. Biopolymers, 1990. 30(13-14): p. 1259-1271.
276. Haynie, D.T., et al., *Polypeptide multilayer films: role of molecular structure and charge*. Langmuir, 2004. 20(11): p. 4540-7.
277. Khopade, A.J., et al., *Ultrathin antibiotic walled microcapsules*. Biomacromolecules, 2005. 6(1): p. 229-34.

278. Janshoff, A., H.J. Galla, and C. Steinem, *Mikrogravimetrische Sensoren in der Bioanalytik - eine Alternative zu optischen Biosensoren?* 2000. p. 4164-4195.
279. Sauerbrey, G., *Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung*. Zeitschrift für Physik A, 1959. 159(2): p. 206-222.
280. Salomaki, M., K. Loikas, and J. Kankare, *Effect of polyelectrolyte multilayers on the response of a quartz crystal microbalance*. Anal Chem, 2003. 75(21): p. 5895-904.
281. Hook, F., et al., *Measurements Using the Quartz Crystal Microbalance Technique of Ferritin Monolayers on Methyl-Thiolated Gold: Dependence of Energy Dissipation and Saturation Coverage on Salt Concentration*. J Colloid Interface Sci, 1998. 208(1): p. 63-67.
282. Notley, S.M., M. Eriksson, and L. Wagberg, *Visco-elastic and adhesive properties of adsorbed polyelectrolyte multilayers determined in situ with QCM-D and AFM measurements*. J Colloid Interface Sci, 2005. 292(1): p. 29-37.
283. Martin, A., J. Swarbrick, and A. Cammarata, *Physikalische Pharmazie*, in *Physikalische Pharmazie*, H. Stricker, Editor. 1987, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart. p. 587.
284. Wenk, M.R., et al., *Paclitaxel partitioning into lipid bilayers*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996. 85(2): p. 228-231.
285. Porath, J. and P. Flodin, *Gel filtration: a method for desalting and group separation*. Nature, 1959. 183(4676): p. 1657-9.
286. Lohmann, C.A., *Charakterisierung von ionischen und nicht-ionischen Polymeren im Hinblick auf ihre Anwendung*. 2006, Universität Hamburg Fachbereich Chemie.
287. Yau, W.W., J.J. Kirkland, and D.D. Bly, *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography*. 1979: John Wiley & Sons 496.
288. Li, C., et al., *Complete regression of well-established tumors using a novel water-soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate*. Cancer Res, 1998. 58(11): p. 2404-9.
289. Tao, X., et al., *Formulation and cytotoxicity of doxorubicin loaded in self-assembled bio-polyelectrolyte microshells*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. 336(2): p. 376-381.
290. Shenoy, D.B. and G.B. Sukhorukov, *Microgel-based engineered nanostructures and their applicability with template-directed layer-by-layer polyelectrolyte assembly in protein encapsulation*. Macromol Biosci, 2005. 5(5): p. 451-8.
291. Binning, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic Force Microscope*. Physical Review Letters, 1986. 56(9): p. 930.
292. Suhren, M., et al. *Applications of atomic force microscopy for silicon wafer characterization*. in *Defect Recognition and Image Processing in Semiconductors 1995 Conference (DRIP VI)*. 1995. Boulder, Co.
293. Zhou, J., et al., *Influence of assembling pH on the stability of poly(L-glutamic acid) and poly(L-lysine) multilayers against urea treatment*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008. 62(2): p. 250-257.
294. Lavalle, P., et al., *Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: An in situ atomic force microscopy study*. Macromolecules, 2002. 35(11): p. 4458-4465.

295. Liu, G., et al., *Roles of chain conformation and interpenetration in the growth of a polyelectrolyte multilayer*. J Phys Chem B, 2008. 112(14): p. 4167-71.
296. Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*. 1996: Academic Press. 785.
297. Duncan, R., et al., *Polymer-drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer*. Endocr Relat Cancer, 2005. 12 Suppl 1: p. S189-99.
298. Mittal, K.L., *Determination of CMC of polysorbate 20 in aqueous solution by surface tension method*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1972. 61(8): p. 1334-1335.
299. Schoenmakers, R.G., et al., *The effect of the linker on the hydrolysis rate of drug-linked ester bonds*. J Control Release, 2004. 95(2): p. 291-300.
300. Taglienti, A., P. Sequi, and M. Valentini, *Kinetics of drug release from a hyaluronan-steroid conjugate investigated by NMR spectroscopy*. Carbohydr Res, 2009. 344(2): p. 245-9.
301. E. Ullmann, K.T.R.R., *Zur Beeinflussung der Esterhydrolyse durch Tenside; 19. Mitt. über den Einfluß von Hilfsstoffen bei der Herstellung von Arzneizubereitungen*. Archiv der Pharmazie, 1968. 301(5): p. 363-369.
302. Fischer, D., et al., *In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis*. Biomaterials, 2003. 24(7): p. 1121-1131.
303. Vicent, M.J. and R. Duncan, *Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer*. Trends Biotechnol, 2006. 24(1): p. 39-47.
304. Chen, M.C., et al., *A novel drug-eluting stent spray-coated with multi-layers of collagen and sirolimus*. J Control Release, 2005. 108(1): p. 178-89.
305. Hausleiter, J., et al., *Prevention of restenosis by a novel drug-eluting stent system with a dose-adjustable, polymer-free, on-site stent coating*. Eur Heart J, 2005. 26(15): p. 1475-81.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

<i>AFM</i>	Atomic Force Microscope / Rasterkraftmikroskop
<i>ANOVA</i>	Analysis of variance / Varianzanalyse
<i>BMS</i>	Bare-Metal Stents / Unbeschichteter Metall-Stent
<i>bzw.</i>	beziehungsweise
<i>ca.</i>	circa
<i>CDI</i>	Carbonyldiimidazol
<i>CLSM</i>	Confocal Laser Scanning Microscopy / konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
<i>CMC</i>	Critical Micelle Concentration / kritische Mizellbildungskonzentration
<i>D</i>	Dissipationsfaktor / Dämpfung
<i>Da</i>	Dalton
<i>DAD</i>	Dioden Array Detector
<i>DCC</i>	Dicyclohexylcarbodiimid
<i>DES</i>	Drug-Eluting Stent / medikamentenbeschichteten Stents
<i>Dextran-HEMA</i>	Dextran-Hydroxyethylmethacrylat
<i>DMAP</i>	N,N-Dimethylaminopyridin
<i>DMF</i>	N,N-Dimethylformamid
<i>DMSO</i>	Dimethylsulfoxid
<i>E</i>	Extinktion
<i>EDTA</i>	Ethyldiamintetraessigsäure
<i>Engl.</i>	Englisch
<i>f</i>	Resonanzfrequenz
<i>FDA</i>	Food and Drug Administration / Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika
<i>HA</i>	Hyaluronsäure
<i>HA-PTx</i>	Hyaluronsäure-Paclitaxel-Konjugaten
<i>HPLC</i>	High Performance Liquid Chromatography / Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
<i>Hz</i>	Hertz
<i>IUPAC</i>	International Union of Pure and Applied Chemistry / Internationale Union für reine und angewandte Chemie
<i>K_{app}</i>	scheinbaren Gleichgewichtskonstante
<i>KHK</i>	koronare Herzkrankheit
<i>K_{SEC}</i>	Verteilungskoeffizient bei der SEC
<i>l_B</i>	Bjerrum-Länge
<i>LbL</i>	Layer-by-Layer / Schicht für Schicht
<i>m</i>	Masse

<i>MF</i>	Melaminformaldehyd
<i>Mw</i>	Molekulargewicht,
<i>PAA</i>	Polyacrylsäure
<i>PAH</i>	Polyallylaminhydrochlorid
<i>PBS</i>	Phosphate Buffer Saline / saliner Phosphatpuffer
<i>PCI</i>	Percutaneous Coronary Intervention / perkutane Koronarintervention
<i>PDA</i>	Polydiallyldimethylammoniumchlorid
<i>PE</i>	Polyelektrolyt
<i>PEI</i>	Polyethylenimin
<i>PEM</i>	Polyelektrolytmultischicht(en)
<i>PG</i>	Poly(L-glutaminsäure)
<i>PG30</i>	Poly(L-glutaminsäure) mit einem Mw von 15.000-50.000 Da
<i>PG30-PTx</i>	Poly(L-glutaminsäure)-Paclitaxel-Konjugaten aus PG mit einem Mw von 15.000-50.000 Da
<i>PG75</i>	Poly(L-glutaminsäure) mit einem Mw von 50.000-100.000 Da
<i>PG75-PTx</i>	Poly(L-glutaminsäure)- Paclitaxel-Konjugaten aus PG mit einem Mw von 50.000-100.000 Da
<i>pK_s</i>	Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtskonstante
<i>PLL</i>	Poly(L-lysin)
<i>PSS</i>	Polystyrolsulfonat
<i>PTx</i>	Paclitaxel
<i>q</i>	Persistenzlänge
<i>QCM-D</i>	Quartz Crystal Microbalance with Dissipation / Quarzmikrowaage mit Dämpfung,
<i>RCA</i>	Radio Corporation of America
<i>SEC</i>	Size Exclusion Chromatography / Größenausschlusschromatographie
<i>SIBS</i>	Poly(styren-b-isobutylen-styren)
<i>TRITC</i>	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
<i>u.a.</i>	unter anderem
<i>UV</i>	ultraviolettes Licht
<i>z.B.</i>	zum Beispiel
<i>ZP</i>	Zetapotential
<i>α</i>	Dissoziationsgrad
<i>ε</i>	molarer Extinktionskoeffizient
<i>η</i>	Viskosität
<i>κ⁻¹</i>	Debyeschen Abschirmlänge
<i>λ</i>	Wellenlänge
<i>ρ</i>	Dichte

7.2 Lebenslauf

Name Lutz Kröhne
Geburtsdatum 04.08.1973
Geburtsort Jena
Nationalität deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulausbildung:

1980-1986 Erich-Weinert-Schule, Jena
1986-1993 Musikgymnasium Schloss Belvedere, Weimar
23.06.1993 Abitur

Zivildienst:

1993-1994 Pflegedienst in der Klinik für Innere Medizin, Jena

Studium:

1994-1995 Pharmaziestudium an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main
1995-1998 Pharmaziestudium an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
1998-1999 Pharmaziepraktikant am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
1999-1999 Pharmaziepraktikant in der Heinrich - Mann – Apotheke in Potsdam
11.01.2000 Approbation als Apotheker

Berufliche

Tätigkeiten:

2000-2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Friedrich-Schiller-Universität, Arbeitsgruppe Prof. Dr. K. Westesen
2001-2002 Angestellter Apotheker der Krankenhausapotheke Havellandklinik GmbH in Nauen
seit 2002 Projektleiter bei der Capsulation Pharma AG in Berlin

7.3 Veröffentlichungen

Abstracts für Konferenzen:

- Andreas Voigt, Lutz Kröhne, Stefanie Pachl, Hans Bäumler, Manfred Weber: Examples of porosity influence in micro- and nanoparticles on active substance storage and delivery. International Conference on Materials for Advanced Technologies, Singapore, Singapore (2005)
- L. Kroehne, M. Ferreiro, A. Voigt, A. Goepferich: Design of a Novel Implantable Drug Delivery Device Based on Polyelectrolyte Multilayers. Controlled Release Society, Wien, Österreich (2006)
- Lutz Kroehne, Joerg Tessmar, Andreas Voigt, Achim Goepferich: Paclitaxel-loaded Polyelectrolyte Multilayers with pro-longed release from degradable Drug Conjugates. Controlled Release Society, New York, USA (2008)
- Andreas Voigt, Lutz Kröhne: Layer-by-Layer Technology[®]: From Max-Planck-Institute to Business. NanoEurope, St. Gallen, Schweiz (2008)

Patente:

- Jörg Mayer, Karsten Cremer, Lutz Kröhne: Schnellfreisetzende, feste Darreichungsform zur oralen Applikation schwerlöslicher Wirkstoffe. EP 1 545 454 A1 (2003)
- Lutz Kröhne, Andreas Voigt: Segmentierte Vorrichtung für die verzögerte Freisetzung von Molekülen in tangentialer Richtung durch dünne Filme und Anwendungen derselben. DE 10 2004 050 457 A1 (2004)
- Hans Joachim Metz, Carsten Plüg, Gerald Mehltretter, Karl-Heinz Schweikart, Andreas Voigt, Lars Dähne, Lutz Kröhne, Jan Möschwitzer: Polyelektrolytverkapselte Pigmente. EP 1 834 994 A1 (2006)
- Lutz Kröhne, Volker Fehring, Andreas Voigt: Drug-releasing polyelectrolyte coating, method for forming a drug-releasing polyelectrolyte coating, and implantable device. EP 07 110 111.7 (2007)
- Lutz Kröhne, Andreas Voigt: Drug-coated catheter and method for forming a drug-coated catheter. EP 07 014 336.7 (2007)
- Alexander Herrmann, Hans-Ulrich Wandel, Lutz Kröhne, Andreas Voigt: Drug-containing coating and method for forming a drug-containing coating. EP 07 014 337.5 (2007)
- Achim Müller, Katharina Schmid, Andreas Voigt, Maria González Ferreiro, Lutz Kröhne: Cross-linkable polyionic coatings for medical devices US 2008/0226922 A1 (2008)
- Marc Nolte, Christoph Dunmann, Volker Fehring, Jörg Mayer, Maria González Ferreiro, Andreas Voigt, Lutz Kröhne: Stabilization of amorphous drugs using sponge-like carrier matrices. EP 08 15 8678.6 (2008)

7.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde bei der Capsulution Pharma AG und am Institut für Pharmazie der Universität Regensburg erstellt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Achim Göpferich für die kontinuierliche Betreuung und Unterstützung, die Flexibilität bei der Auswahl des Themas, die Aufnahme in seinen Arbeitskreis sowie die wertvollen Hinweise und ermunternden Diskussionen. Meinem Mentor bei Capsulution, Herrn Dr. Andreas Voigt, gilt ebenso mein besonderer Dank für die vielen wertvollen Diskussionen.

Herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Jörg Teßmar für die freundschaftliche Unterstützung und seine Hilfsbereitschaft gegenüber fachlichen Fragestellungen jeglicher Art, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Volker Fehring für die Ratschläge, Diskussionen und Hilfestellungen bei der Herstellung von Konjugaten bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Dr. habil. Lars Dähne für die wertvollen Diskussionen zu theoretischen Grundlagen der UV-Spektroskopie und LbL-Technik.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Stefanie Senst, Monika Unger, Michaela Grabo, Annette Assogba-Zandt, Mariana Dobranis und Sascha Johannes für die hervorragende technische Unterstützung und zahlreichen Herstellungen von LbL-Beschichtungen.

Bei Dr. Rumen Krastev (MPI Golm) und Dr. Jürgen Schlütter (LOT-Oriel GmbH & Co.KG.) möchte ich mich für die Einführung in die QCM-D-Technik bedanken.

Für die Einführung und Hilfestellungen bei den AFM-Messungen möchte ich mich bei Herrn Dr. Nikolai Severin (Institut für Physik der HU-Berlin) und Anne Heilig (MPI Golm) bedanken.

Herrn Dr. Marc Nolte danke ich für Hilfestellungen und Ratschläge bei der Auswertung der AFM-Messungen.

Bei Herrn Ferdinand Brandl bedanke ich mich für die weitreichende technische und organisatorische Hilfe im VPN-Netzwerk.

Frau Dr. Claudia Aldenhoven und Christoph Dunmann danke ich für das präzise Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung des Projektes möchte ich mich bei der Capsulution Pharma AG bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen bei Capsulution und am Lehrstuhl Pharmazeutische Technologie für das hervorragende Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Eltern bedanken, die mir in allen Situationen eine stete Unterstützung waren und dadurch entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.