

**Ueber Mizellpolymerisate, mögliche Einschluss-  
verbindungen (Nanokapseln) und deren Eignung  
als Adjuvantien**

ABHANDLUNG

zur Erlangung  
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften  
der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN  
HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

**GERD BIRRENBACH**

Apotheker, Universität Erlangen-Nürnberg  
geboren am 1. Mai 1943  
deutscher Staatsangehöriger

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. P. P. Speiser, Referent  
PD Dr. M. Soliva, Korreferent

aku-Fotodruck  
Zürich  
1973

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Der vorliegenden Arbeit liegt die Beschreibung eines neuartigen Verfahrens zugrunde, in kolloidalen, mizellaren Systemen Polymerisationen auszuführen.

Durch den Prozess der "sekundären" Solubilisierung werden in Wasser gelöste Monomere ( Acrylamid und N,N' - Methylenebisacrylamid ) sowie z. B. hydrophile Proteine in Kohlenwasserstoff ( n - Hexan ) gelöst.

Mit verschiedenen Bestrahlungsarten und - Methoden ( sichtbares Licht, UV - Licht, Gammastrahlen und evtl. Katalysatoren bzw. Sensibilisatoren ) können die flüssigen mizellaren Reaktionsräume mit ihren Monomeren polymerisiert werden ( "Mizellpolymerisation" ), wobei reaktionsunfähige Begleitstoffe ( Wirkstoffe ) passiv in das Polymergerüst eingeschlossen werden.

Der Verlauf der Polymerisation ist durch acidimetrische Titration der noch vorhandenen Monomeren nach der "Morpholin" - Methode zu verfolgen. - Die festen, kugeligen Produkte von unter 800 Å Durchmesser ( "Nanokapseln" ) können durch Fällungsoperationen und/oder Ultrafiltration sowie Lyophilisation isoliert werden.

2. Die elektronenmikroskopisch darstellbaren Nanokapseln können als "erstarrte" Mizellen Hinweise auf das Verhalten kolloidaler Lösungen geben.

Synthesen von Nanokapseln bei einem Tensidgehalt zwischen 5 bis 20% erzeugen annähernd gleichgestaltete, gleichgrosse, kugelige erstarrte Mizellen ( 800 Å Durchmesser ). In diesem Konzentrationsbereich zwischen offensichtlich 1. und 2. CMC treten in den kolloidalen Lösungen im Refraktionsverhalten und deutlicher im Hochfrequenzverhalten plötzliche Unstetigkeiten auf. Diese physikalischen Phänomene können ( z. T. in Uebereinstimmung mit analogen Einzelbeobachtungen anderer Autoren ) durch folgende Mizelltheorie erklärt werden:

Zwischen 1. und 2. CMC liegen kugelige Mizellen vor, die möglicherweise bei steigender Tensidkonzentration in einem engen Konzentrationsbereich schlauch- oder netzartig von überschüssigem Tensid verknüpft werden. Die beobachteten physikalischen Unstetigkeiten und die Isolierung

von in allen Fällen praktisch gleichartigen erstarrten Mizellen fänden eine Erklärung in der mehr oder weniger plötzlichen Aggregation kugelliger Mizelluntereinheiten, die sich bei bestimmten Tensidkonzentrationen ( Bereich der Unstetigkeiten ) vereinen.

3. Selbst empfindliche Proteine können in Nanokapseln einpolymerisiert werden.

Nach "simulierter" Nanokapselsynthese und - Aufarbeitung zeigen Urease, Tetanus - Toxoid und ( Human ) Immunglobulin G keine merkliche Einbusse an enzymatischer bzw. immunologischer Reaktionsfähigkeit; der schonende Einbau selbst von leicht denaturierbaren Proteinen in Nanokapseln ist also unter verschiedenen ausgewählten Bedingungen möglich.

4. Einpolymerisierter Wirkstoff ( Modell: IgG ) bildet ein stabiles Depot in den Nanokapseln.

Mit  $^{125}\text{J}$  - markiertem ( Human ) IgG als Modell kann in einem Zeitraum von rund 50 Tagen unter "in - vitro" Bedingungen nur unverändert max. 25% der eingesetzten Substanz aus Mizellpolymeren freigesetzt werden, wobei der Verdacht nahe liegt, dass bei der Aktivitätsbestimmung von freiem  $^{125}\text{J}$  - IgG nur radioaktive Spaltstücke des Moleküls erfasst werden, der fixierte Anteil an IgG somit möglicherweise mehr als 75% beträgt.

5. Stabile Antigenfixierung und physikalische Eigenschaften von Mizellpolymeren lassen hypothetisch eine immunologische Verwendbarkeit aussichtsreich erscheinen: eine gute Adjuvanswirkung wird bestätigt. Die parenterale Verträglichkeit von Nanokapseln wird ebenfalls im Tierversuch festgestellt.

Nanokapseln auf Acrylamidbasis können Meerschweinchen problemlos intramuskulär appliziert werden.

Der Adjuvanseffekt von ( Human ) IgG in Nanokapseln zeigt im Immunisierungsversuch an Meerschweinchen, dass im Vergleich zum Aluminiumoxid höhere Antikörpertiter erzielt werden, und man in vergleichbare Nähe des Freundschens Adjuvans rückt.

Nanokapseln mit Tetanus - Toxoid als Antigen bewirken in Meerschweinchen nur wenig geringere Immunisierung ( Antikörperproduktion ) wie das übliche Aluminiumphosphat - Adjuvans.

## 7. ABSTRACT

A new kind of polymerization of only hydrophilic micelles in a colloidal system of water with dissolved monomers within a hydrocarbon medium is described: By the process of secondary solubilization - with the aid of selected surfactants - polymerization of micelles under different conditions ( especially different types of initiating radiation ) can take place; the stable inclusion of non-reacting substances ( even proteins ) within the polymer product ( "nanocapsules" ) with dimensions smaller than 800 Å diameter and isolation of the polymer product are possible without causing great destruction of the capsulated molecules.

The electronmicroscopically visible nanocapsules together with observations of refractive index and high-frequency behaviour in the primary colloidal solutions led to a theory of micelles of spherical shape, eventually bound together by surfactants in a certain concentration range to an extended network.

Nanocapsules containing Human - IgG or tetanus toxoid show good adjuvant effects.