

# **Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus amphiphilen Blockcopolymeren**



INAUGURALDISSERTATION  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

vorgelegt von

**Anja Rank**

aus Ebersdorf / Thüringen

**2007**



Die vorliegende Doktorarbeit wurde im Zeitraum von Juli 2003 bis Juni 2007 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rolf Schubert am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie des Instituts für Pharmazeutische Wissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg angefertigt.

|                                         |                        |
|-----------------------------------------|------------------------|
| Dekan:                                  | Prof. Dr. A. Bechthold |
| Vorsitzender des Promotionsausschusses: | Prof. Dr. G. Schulz    |
| Referent:                               | Prof. Dr. R. Schubert  |
| Korreferentin:                          | PD Dr. R. Peschka-Süss |
| Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses:    | 05.07.2007             |



## **Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:**

### **Publikationen:**

Rank A, Hauschild S, Schubert R, Förster S.

"The temperature-dependent alterations in the self-association of the block copolymer P2VP-PEO." (in Vorbereitung)

Leson A, Hauschild S, Rank A, Neub A, Schubert R, Förster S, Mayer C (2007).

"Molecular exchange through membranes of poly(2-vinylpyridine-block-ethylene oxide) vesicles." *Small* 3, Issue 6: 1074-1083.

Borchert U, Lipprandt U, Bilanz M, Lindner P, Kimpfler A, Rank A, Peschka-Süss R, Schubert R, Förster S (2006). "pH-induced release from P2VP-PEO block copolymer vesicles." *Langmuir* 22: 5843-5847.

Hauschild S, Borchert U, Lipprandt U, Rank A, Schubert R, Förster S (2005).

"Direct preparation and loading of small monodisperse vesicles using inkjet printers." *Small* 12: 1177-1180.

### **Poster:**

Rank A, Hauschild S, Schubert R, Förster S

"The temperature-dependent alterations in the self-association of the polymer P2VP<sub>66</sub>-PEO<sub>46</sub>"

Summer School – Complex Materials, IU Bremen, Juni 2006

Rank A, Lipprandt U, Förster S, Schubert R

"Preparation of polymer vesicles"

1<sup>st</sup> International Symposium on Polymer Vesicles Schloss Beuggen (Basel), August 2005

Rank A, Lipprandt U, Förster S, Schubert R

"Preparation of polymersomes as drug carriers"

2<sup>nd</sup> International Symposium on Complex Materials, Stuttgart, Juni 2005

### **Vorträge:**

Rank A, Hauschild S, Schubert R, Förster S

"The temperature-based preparation of polymersomes composed of P2VP-PEO"  
Summer School – Complex Materials, IU Bremen, Juni 2006

Rank A, Schubert R

„Manchmal steckt der Wurm drin...oder: Die temperaturbasierte Vesikelpräparation aus P2VP-PEO“

6. Pharmazie-Workshop, Oberjoch/Allgäu, März 2006

Rank A, Hauschild S, Lipprandt U, Förster S, Schubert R  
“Preparation of Polymer Vesicles (Polymersomes) composed of P2VP-PEO”  
CRS – German Chapter Annual Meeting, Jena, März 2006

Rank A, Schubert R  
“Polymersomes – a new drug delivery system?”  
17th Mountain/Sea Liposome Workshop, Oberjoch/Allgäu, März 2005

Rank A, Schubert R, Peschka-Süss R  
„Polymersomen – Membranvesikel aus amphiphilen Blockcopolymeren.“  
FAF-Jahresversammlung, Freiburg, Januar 2005

Rank A, Schubert R  
„Vesikel aus Blockcopolymeren – Stand der Wissenschaft”  
5. Pharmazie-Workshop, Oberjoch/Allgäu, April 2004

## **Danksagung**

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Rolf Schubert, für die herzliche Aufnahme in seinen freundlichen und familiären Arbeitskreis sowie die sehr gute Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit der Promotion. Insbesondere bin ich ihm dankbar für sein jederzeit offenes Ohr, die anregenden Diskussionen und die wertvollen Ratschläge.

### **Besonders bedanken möchte ich mich bei:**

Frau PD Dr. Regine Peschka-Süss für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Stephan Förster und seinen Mitarbeitern (Institut für Physikalische Chemie, Universität Hamburg) sowie Herrn Prof. Dr. Christian Mayer und Frau Alina Leson (Institut für Physikalische Chemie, Universität Duisburg-Essen) für die hervorragende Zusammenarbeit im Rahmen dieses interessanten und interdisziplinären VW-Kooperationsprojektes. Besonders danke ich Stephan Hauschild für sein großes Engagement, viele hilfreiche Diskussionen, zahlreiche DLS-Messungen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Der Volkswagen-Stiftung, Hannover, für die finanzielle Unterstützung.

Ralf Thomann für die Hilfe bei Fragen und Problemen rund um das TEM.

Herrn Peter Wiest und Herrn Sascha Ferlino für den technischen Support.

Herrn Wolf Ulrich Michaelis für den fachlichen Beistand und seine unermüdliche Hilfsbereitschaft.

Johannes Parmentier und Felix Lerch für ihr großes Engagement im Rahmen eines Mitarbeiterpraktikums.

Frau Nuria Beltran-Sanchez für ihre Hilfe und ihren Einsatz bei allen bürokratischen und organisatorischen Dingen.

Meinen Kollegen und Freunden aus der Pharmazeutische Technologie für das angenehme Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft und Kollegialität. Insbesondere danke ich meinen Laborkollegen Wan-Hsun Wu, Louma Kali und Andreas Fritze für die tolle gemeinsame Zeit mit vielen wissenschaftlichen als auch privaten Diskussionen. Ebenso danke ich Nadia Schwalm, Amina Alkatout, Ulrich Huth, Holm Schmidt, Christian Schifter, Alice Theobald, Felicitas Hens und Stefanie Häfele für die vielen heiteren Stunden - auch außerhalb der Universität. In gleicher Weise danke ich meiner Korrekturleserin Vanessa Bunjes.

Meiner Familie und Gerd für ihre wunderbare Unterstützung, ihre unendliche Geduld und für all das, was man nicht mit Worten beschreiben kann.



Für meine Eltern



## Inhaltsverzeichnis

|            |                                                                 |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>Einleitung .....</b>                                         | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Vesikel.....</b>                                             | <b>3</b>  |
| 1.1.1      | Prinzip der Selbstorganisation.....                             | 4         |
| 1.1.2      | Packungsparameter .....                                         | 6         |
| 1.1.3      | Nomenklatur der Vesikelformen .....                             | 7         |
| 1.1.4      | Liposomen versus Polymersomen .....                             | 8         |
| <b>1.2</b> | <b>Blockcopolymere als Grundbaustein von Polymersomen .....</b> | <b>8</b>  |
| 1.2.1      | Aufbau von Blockcopolymeren.....                                | 8         |
| 1.2.2      | Anionische Polymerisation .....                                 | 10        |
| <b>1.3</b> | <b>Herstellung und Charakterisierung von Polymersomen .....</b> | <b>12</b> |
| 1.3.1      | Herstellung .....                                               | 12        |
| 1.3.1.1    | Filmmethode .....                                               | 13        |
| 1.3.1.2    | Extrusion .....                                                 | 14        |
| 1.3.1.3    | Detergenzentfernung .....                                       | 15        |
| 1.3.1.4    | Inkjet-Methode .....                                            | 15        |
| 1.3.2      | Charakterisierung von Polymersomen .....                        | 16        |
| 1.3.2.1    | PCS .....                                                       | 17        |
| 1.3.2.2    | Cryo-TEM.....                                                   | 20        |
| <b>1.4</b> | <b>Stabilität von Polymersomen .....</b>                        | <b>23</b> |
| 1.4.1      | Chemische Stabilität .....                                      | 23        |
| 1.4.2      | Biologische Stabilität .....                                    | 23        |
| 1.4.3      | Physikalische Stabilität.....                                   | 25        |

|            |                                                         |           |
|------------|---------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.5</b> | <b>Ansätze für die Anwendung von Polymersomen .....</b> | <b>26</b> |
| 1.5.1      | Drug Delivery System .....                              | 27        |
| 1.5.1.1    | Passives Targeting .....                                | 27        |
| 1.5.1.2    | Aktives Targeting .....                                 | 27        |
| 1.5.1.3    | Controlled Release .....                                | 28        |
| 1.5.2      | Verkapselung von Zytostatika .....                      | 31        |
| 1.5.3      | Gentherapie .....                                       | 32        |
| 1.5.4      | Biotechnologie.....                                     | 33        |
| 1.5.5      | Diagnostik .....                                        | 34        |
| <b>1.6</b> | <b>Zielsetzung der Arbeit.....</b>                      | <b>35</b> |
| <b>2</b>   | <b>Materialien und Geräte.....</b>                      | <b>36</b> |
| 2.1        | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....             | 36        |
| 2.2        | Geräte.....                                             | 40        |
| <b>3</b>   | <b>Methoden .....</b>                                   | <b>42</b> |
| 3.1        | Methoden zur Präparation von Polymervesikeln.....       | 42        |
| 3.1.1      | Herstellung von MLVs .....                              | 42        |
| 3.1.1.1    | Filmmethode .....                                       | 42        |
| 3.1.1.2    | Reverse-phase evaporation (REV) .....                   | 43        |
| 3.1.2      | Frier-Tau-Zyklen.....                                   | 43        |
| 3.1.3      | Homogenisierung .....                                   | 44        |
| 3.1.3.1    | Extrusion .....                                         | 44        |
| 3.1.3.2    | Hochdruckhomogenisation.....                            | 45        |
| 3.1.3.3    | Ultraschall .....                                       | 45        |
| 3.1.3.4    | Temperatur-Methode .....                                | 46        |
| 3.1.4      | Detergenzdialyse .....                                  | 46        |

---

|            |                                                                                    |           |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.2</b> | <b>Verkapselung hydrophiler Substanzen .....</b>                                   | <b>47</b> |
| 3.2.1      | Direkte Verkapselung .....                                                         | 47        |
| 3.2.1.1    | Calcein .....                                                                      | 47        |
| 3.2.1.2    | HPTS/DPX .....                                                                     | 48        |
| 3.2.1.3    | FITC-Dextran .....                                                                 | 49        |
| 3.2.2      | Remote Loading .....                                                               | 50        |
| <b>3.3</b> | <b>Methoden zur Charakterisierung .....</b>                                        | <b>51</b> |
| 3.3.1      | Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) .....                                      | 51        |
| 3.3.1.1    | Streulichtmessung bei festem Winkel von 90° .....                                  | 51        |
| 3.3.1.2    | Streulichtmessung bei festem Winkel von 173° .....                                 | 52        |
| 3.3.1.3    | Streulichtmessung bei variabler Winkeleinstellung .....                            | 53        |
| 3.3.2      | Cryo-Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (Cryo-TEM) .....                         | 53        |
| 3.3.3      | Einlagerung .....                                                                  | 55        |
| 3.3.4      | Größenausschlusschromatographie (GAC) .....                                        | 55        |
| 3.3.5      | Bestimmung der Einschlusseffizienz (EE%).....                                      | 57        |
| 3.3.5.1    | Bestimmung der theoretischen Einschlusseffizienz .....                             | 57        |
| 3.3.5.2    | Bestimmung der tatsächlichen Einschlusseffizienz .....                             | 57        |
| 3.3.5.3    | Bestimmung der Einschlusseffizienz (EE%) von DXR .....                             | 58        |
| 3.3.6      | Bestimmung des intravesikulären pH-Wertes .....                                    | 59        |
| 3.3.7      | Freisetzungsuntersuchung (Stabilität der Verkapselung hydrophiler Substanzen)..... | 61        |
| 3.3.7.1    | HPTS/DPX bzw. Calcein.....                                                         | 61        |
| 3.3.7.2    | FITC-Dextran 4 kDa .....                                                           | 63        |
| 3.3.8      | Säure-induzierte Auflösung von Vesikeln aus P2VP-PEO-8 .....                       | 63        |
| 3.3.9      | Stabilität gegenüber Triton .....                                                  | 63        |
| 3.3.9.1    | PCS .....                                                                          | 63        |
| 3.3.9.2    | Fluoreszenz .....                                                                  | 64        |
| <b>4</b>   | <b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>                                             | <b>67</b> |
| 4.1        | Bewertung der Herstellungsverfahren .....                                          | 68        |

|            |                                                                                       |            |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1.1      | Filmmethode .....                                                                     | 68         |
| 4.1.1.1    | P2VP-PEO-8.....                                                                       | 69         |
| 4.1.1.2    | PI-PEO-18.2.....                                                                      | 72         |
| 4.1.1.3    | Diskussion.....                                                                       | 74         |
| 4.1.2      | Extrusion .....                                                                       | 74         |
| 4.1.2.1    | Extrusion in HBS .....                                                                | 74         |
| 4.1.2.2    | Einfluss von Ethanol .....                                                            | 76         |
| 4.1.2.3    | Einfluss der Polymerkonzentration.....                                                | 77         |
| 4.1.2.4    | Einfluss der Ionenstärke.....                                                         | 78         |
| 4.1.2.5    | Einfluss anderer Puffermedien.....                                                    | 79         |
| 4.1.2.6    | Cryo-TEM.....                                                                         | 80         |
| 4.1.3      | Hochdruckhomogenisation.....                                                          | 85         |
| 4.1.4      | Ultraschall .....                                                                     | 87         |
| 4.1.5      | Detergenzdialyse .....                                                                | 90         |
| 4.1.6      | Temperatur.....                                                                       | 93         |
| 4.1.6.1    | Abkühlung .....                                                                       | 93         |
| 4.1.6.2    | Erwärmung.....                                                                        | 96         |
| 4.1.6.3    | Einfluss der Probenzusammensetzung.....                                               | 97         |
| 4.1.6.4    | Andere P2VP-PEOs.....                                                                 | 100        |
| 4.1.7      | Zusammenfassung zur Bewertung der Herstellungsverfahren.....                          | 101        |
| <b>4.2</b> | <b>Aufklärung des temperaturabhängigen Aggregationsverhaltens von P2VP-PEO-8.....</b> | <b>103</b> |
| 4.2.1      | Temperaturabhängiges Aggregationsverhalten nach 24 Stunden bei 4°C .....              | 103        |
| 4.2.2      | Aufklärung der Vesikel-Wurm-Umwandlung.....                                           | 109        |
| 4.2.2.1    | Abkühlen .....                                                                        | 109        |
| 4.2.2.2    | Erwärmen.....                                                                         | 111        |
| <b>4.3</b> | <b>Beladung mit hydrophilen Substanzen .....</b>                                      | <b>114</b> |
| 4.3.1      | Beladung mit hydrophilen Fluoreszenzmarkern .....                                     | 114        |
| 4.3.1.1    | Einschlusseffizienz.....                                                              | 114        |
| 4.3.1.2    | Freisetzung .....                                                                     | 117        |

---

|            |                                                             |            |
|------------|-------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.2      | Beladung mit Doxorubicin .....                              | 118        |
| <b>4.4</b> | <b>Stabilität .....</b>                                     | <b>121</b> |
| 4.4.1      | Stabilität während Lagerung .....                           | 121        |
| 4.4.1.1    | P2VP-PEO-8.....                                             | 121        |
| 4.4.1.2    | PI-PEO-18.2 (Extrusion) .....                               | 132        |
| 4.4.1.3    | Zusammenfassung Lagerstabilität .....                       | 136        |
| 4.4.2      | Stabilität gegenüber Triton X-100.....                      | 137        |
| 4.4.2.1    | PCS .....                                                   | 139        |
| 4.4.2.2    | Fluorimeter (HPTS/DPX).....                                 | 142        |
| 4.4.3      | Säure-induzierte Auflösung von Vesikeln aus P2VP-PEO-8..... | 145        |
| <b>5</b>   | <b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>                   | <b>148</b> |
| <b>6</b>   | <b>Literatur.....</b>                                       | <b>153</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                                 |                                                                                           |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| AFM                             | atomic force microscopy                                                                   |
| CAC                             | <i>critical aggregation concentration</i>                                                 |
| C <sub>8</sub> E <sub>4</sub>   | n-Octyl-tetraethylen-monoether                                                            |
| C <sub>12</sub> E <sub>9</sub>  | n-Dodecyl-nonaethylen-monoether, Thesit <sup>®</sup>                                      |
| C <sub>12</sub> E <sub>10</sub> | n-Dodecyl-decaethylen-monoether                                                           |
| C <sub>16</sub> E <sub>10</sub> | n-Hexadecyl-decaethylen-monoether                                                         |
| CMC                             | <i>critical micelle concentration</i>                                                     |
| Cryo-TEM                        | Cryo-Transmissions-Elektronenmikroskop                                                    |
| d                               | <i>day</i> (Tag)                                                                          |
| eV                              | Elektronenvolt                                                                            |
| kDa                             | Kilodalton                                                                                |
| DDM                             | Dodecylmaltosid                                                                           |
| DEA-stat-TMSPMA                 | 2-(Diethylamino)ethyl methacrylat- <i>stat</i> -3-(trimethoxysilyl) propyl<br>methacrylat |
| DXR                             | Doxorubicin                                                                               |
| EDTA                            | Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz                                                |
| EE                              | Einschlusseffizienz                                                                       |
| EM                              | Elektronenmikroskop                                                                       |
| FDA                             | <i>Food and Drug Administration</i>                                                       |
| FITC-Dextran                    | Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran                                                         |
| g                               | Gramm                                                                                     |
| GAC                             | Größenausschlusschromatographie                                                           |
| GPC                             | Gelpermeationschromatographie                                                             |
| h                               | <i>hour</i> (Stunde(n))                                                                   |
| HBS                             | <i>Hepes buffered saline</i> (isotoner HEPES Puffer pH 7,4)                               |
| HEPES                           | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure                                     |
| HLB                             | <i>hydrophilic lipophilic balance</i>                                                     |
| HPTS                            | 4-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure, Pyranin                                              |
| i.v.                            | intravenös                                                                                |
| K                               | Kühlschrank (2-8°C)                                                                       |
| kCps                            | <i>kilocounts per second</i> (Zählimpulse pro Sekunde x 1000)                             |
| kV                              | Kilovolt                                                                                  |
| λ                               | Wellenlänge                                                                               |
| LM                              | Lichtmikroskop                                                                            |

---

|                |                                                                                                        |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LUV            | <i>large unilamellar vesicle</i> (großes unilamellares Vesikel)                                        |
| M              | Molmasse                                                                                               |
| M <sub>n</sub> | <i>molecular weight number</i> (zahlenmittlere Molmasse)                                               |
| M <sub>w</sub> | <i>molecular weight weight</i> (gewichtsmittlere Molmasse)                                             |
| MALDI-TOF      | <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight</i>                                    |
| mbar           | Millibar                                                                                               |
| mg             | Milligramm                                                                                             |
| min            | Minute                                                                                                 |
| mm             | Millimeter                                                                                             |
| MLV            | <i>multilamellar large vesicle</i> (großes multilamellares Vesikel)                                    |
| mM             | millimolar, 10 <sup>-3</sup> Mol pro Liter Lösung                                                      |
| mmol           | Millimol                                                                                               |
| MOPS           | 3-(N-Morpholino-propan)-sulfonsäure                                                                    |
| MPS            | Mononukleäres Phagozyten-System                                                                        |
| MVV            | <i>multivesicular vesicle</i> (multivesikuläres Vesikel)                                               |
| MWCO           | <i>molecular weight cut-off</i> (Ausschluss-Molmasse einer Membran)                                    |
| n              | <i>number</i> (Anzahl)                                                                                 |
| n              | Stoffmenge (mol)                                                                                       |
| nm             | Nanometer                                                                                              |
| OG             | n-Octyl β-D-Glucopyranosid                                                                             |
| p              | Druck                                                                                                  |
| PAA            | Poly(acrylsäure)                                                                                       |
| PA44           | Poly((4''-acryloyl-oxybutyl)2,5,-bis(4'butyloxybenzoyloxy) benzoat)                                    |
| PBS            | <i>phosphate buffered saline</i> (isotoner Phosphat Puffer pH 7,4)                                     |
| PCS            | <i>photon correlation spectroscopy</i> (Photonenkorrelationsspektroskopie)                             |
| PEG            | Polyethylenglykol                                                                                      |
| PEO            | Polyethylenoxid                                                                                        |
| PFG-NMR        | <i>pulsed-field-gradient-nuclear magnetic resonance</i><br>(Kernresonanz mit gepulsten Feldgradienten) |
| P2VP           | Poly(2-vinyl-pyridin)                                                                                  |
| PB             | Poly(butadien)                                                                                         |
| PCL            | Poly(caprolacton)                                                                                      |
| PDI            | Polydispersitätsindex                                                                                  |
| PDMS           | Poly(dimethylsiloxan)                                                                                  |
| PDPA-PMPC      | Poly(2-diisopropylamino)ethyl methacrlat - Poly((2-methacryloyl-oxy)ethyl phosphorcholin)              |
| PG2MA          | Poly(glycerol-2-monomethacrylat)                                                                       |

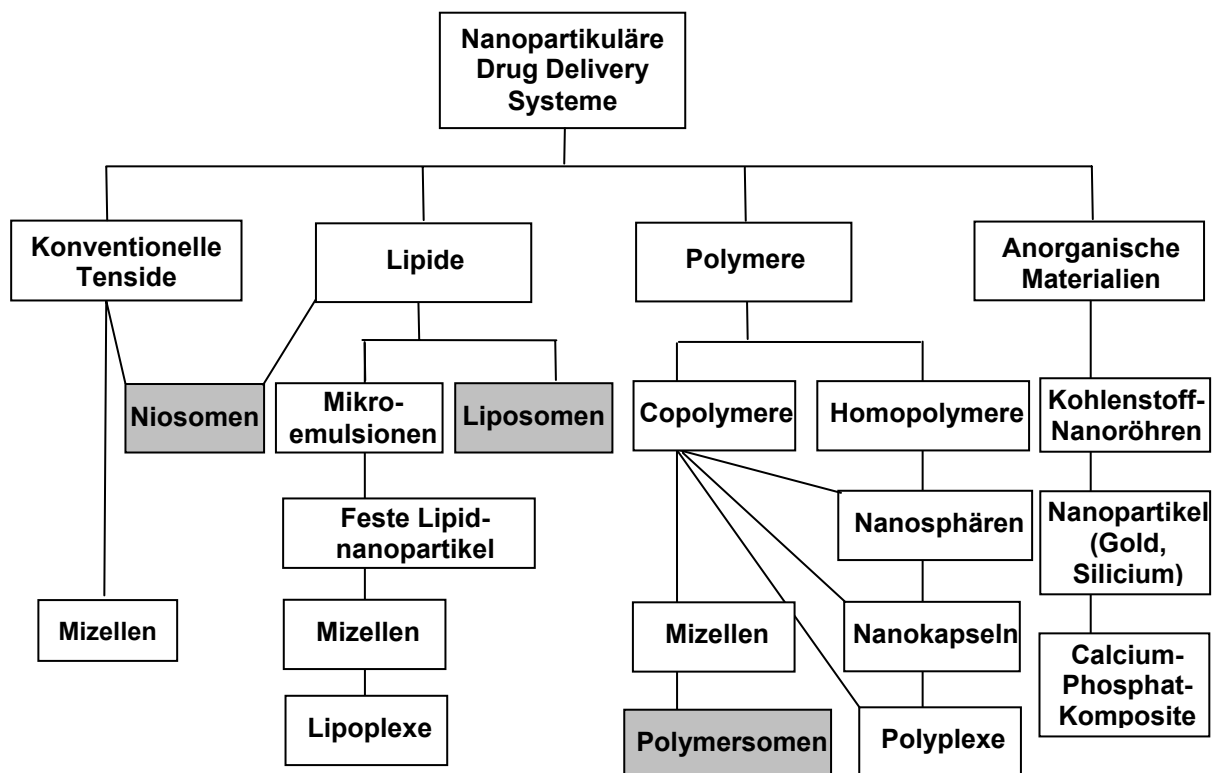
|                |                                                                               |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| PHEA-g-LA      | Poly(2-hydroxyethyl-aspartamid)- <i>graft</i> -Milchsäure                     |
| PI             | Poly(isopren)                                                                 |
| PLA            | Poly(milchsäure)                                                              |
| PMOXA          | Poly(2-methyloxazolin)                                                        |
| PNIPAM         | Poly(N-isopropylacrylamid)                                                    |
| PPO            | Poly(propylenoxid)                                                            |
| PPS            | Poly(propylensulfid)                                                          |
| PS             | Poly(styrol)                                                                  |
| REV            | <i>reverse phase evaporation vesicle</i><br>(Umkehrphasenverdunstungsvesikel) |
| r              | Radius                                                                        |
| RT             | Raumtemperatur                                                                |
| SANS           | <i>small angle neutron scattering</i> (Neutronenkleinwinkelstreuung)          |
| SAXS           | <i>small angle X-ray scattering</i> (Röntgenkleinwinkelstreuung)              |
| sec            | Sekunde                                                                       |
| sd             | <i>standard deviation</i> (Standardabweichung)                                |
| SDS            | <i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)                           |
| t              | Zeit                                                                          |
| T              | Temperatur (in Kelvin oder °C)                                                |
| TAX            | Paclitaxel                                                                    |
| T <sub>g</sub> | Glasübergangstemperatur                                                       |
| TBME           | tert-Butylmethylether                                                         |
| THF            | Tetrahydrofuran                                                               |
| TRIS           | Trishydroxymethylaminomethan                                                  |
| Triton X-100   | 4-(1,1,2,2 Tetramethylbutyl)-phenyl-polyethylenglykol                         |
| V/V            | Volumenverhältnis                                                             |
| µl             | Mikroliter                                                                    |
| z-Av           | <i>z-Average</i> (mittlerer hydrodynamischer Teilchendurchmesser)             |

# 1 Einleitung

Therapien mit hochpotenten Arzneistoffen (z.B. zur Krebstherapie) werden oft durch starke Nebenwirkungen limitiert. Eine Ursache hierfür ist oftmals darin zu finden, dass die Arzneistoffe nicht nur auf die zu behandelnden Teile des menschlichen Körpers wirken, sondern auch gesunde Körperabschnitte negativ belasten können. Die Entwicklung einer „intelligenten Verpackung“, die den Wirkstoff gezielt an den Wirkungsort transportiert (drug targeting) und dort kontrolliert freisetzt (controlled release), ohne dabei den restlichen Körper zu schädigen, hat sich somit als interessantes Forschungsgebiet herausgestellt. Schon Paul Ehrlich hatte vor ca. 100 Jahren den Wunsch nach solch einer „intelligenten Verpackung“, die ihr Ziel von selbst trifft und nie verfehlt. Er nannte sie eine „magische Kugel“. Im Zusammenhang mit der Entwicklung solcher Drug Delivery Systeme stehen in den letzten Jahren besonders nanopartikuläre Systeme im Focus der Forschung. Die Größenordnung dieser Systeme liegt im so genannten mesoskopischen Bereich zwischen 1 und 500 nm (ein Nanometer = ein Milliardstel Meter), damit fallen sie in das Gebiet der Kolloidforschung (griech.: kolla - Leim, eidos - Aussehen). Als Kolloide werden u.a. geordnete Strukturen bezeichnet, die durch Selbstorganisation aus meist amphiphilen Molekülen (griech.: ampho - beide; philos - liebend) entstehen. Sie finden sich allgegenwärtig in vielen Bereichen wieder, wie bspw. in der Natur (Zellen, Milch), in der technischen Welt (Farben, Medikamente) oder im Haushalt (Seife). Speziell die hochaktuelle Nanowissenschaft (griech.: nano - Zwerg) nimmt sich gegenwärtig dieser Thematik an und verbindet dabei die unterschiedlichen Forschungszweige wie Chemie, Physik, Biologie, Medizin und Pharmazie.

Als nanopartikuläre Arzneimittelträger kommen verschiedenste Kolloidstrukturen in Frage, worüber Abbildung 1-1 einen guten Überblick vermittelt. Die favorisierte Transporthülle stellen hierbei speziell die Vesikel dar. Dies sind Hohlkugeln, die aus einer Doppelschicht membranbildender Moleküle bestehen und die Möglichkeit bieten, sowohl wasserlösliche Wirkstoffe im Inneren als auch wasserunlösliche in ihre Hülle aufzunehmen. In der Anwendung als Wirkstoffträger müssen Vesikel jedoch einige weitere Voraussetzungen erfüllen. Konkret bedeutet dies, dass sie stabil, kleiner als 200 nm und biokompatibel sein müssen, um in krankes Gewebe

gelangen zu können. Bangham (Bangham et al. 1965) beschrieb bereits vor ca. 40 Jahren erstmals Vesikel aus Lipiden, so genannte Liposomen. Im Rahmen der Bemühungen die Stabilität dieser Vesikel und deren Zirkulationsdauer im Blut zu erhöhen, haben sich vor wenigen Jahren zusätzlich Polymere als Grundbausteine für Vesikel herausgestellt (Discher et al. 1999). Diese erst wenig untersuchten Polymerbasierten Vesikel werden auch als Polymersomen bezeichnet und stellen eine Alternative zu den in vielen Bereichen bereits sehr gut untersuchten Liposomen dar.

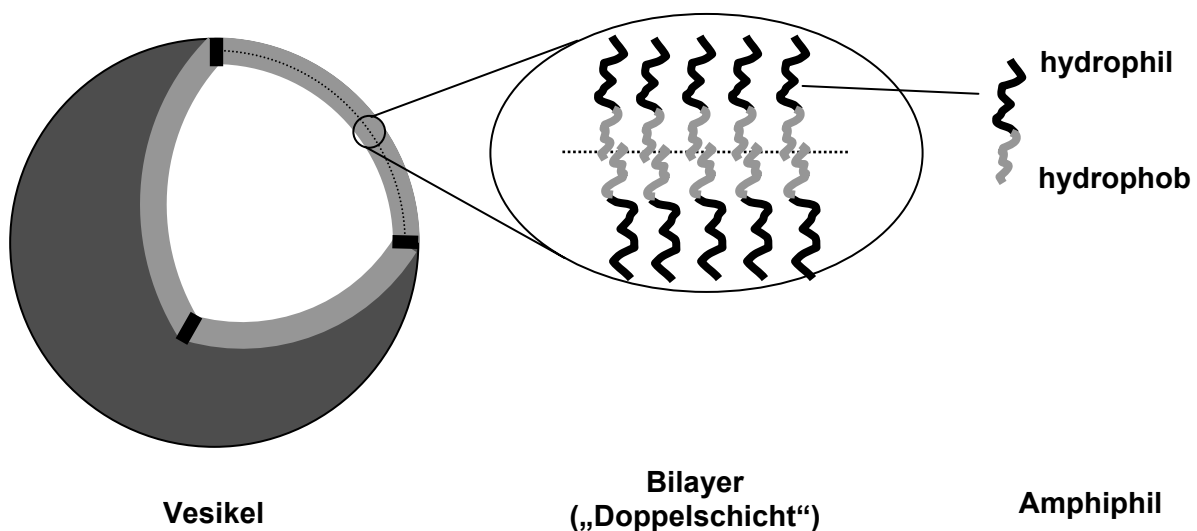


**Abbildung 1-1: Übersicht zu Drug Delivery Systemen im Nanobereich; die Vesikel sind grau unterlegt (nach Letchford & Burt 2007)**

Vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die Untersuchungen im Bereich der Polymersomen zu unterstützen. Aufgrund der angestrebten Verwendung als zukünftiger Arzneistoffträger liegt das spezielle pharmazeutisch-technologische Augenmerk auf der Herstellung von Polymervesikeln, sowie deren Charakterisierung hinsichtlich Aussehen, Stabilität und dem Vermögen Substanzen einschließen zu können.

## 1.1 Vesikel

Das Wort Vesikel leitet sich aus dem Lateinischen von *vesicula* ab und bedeutet kleine Blase. Vesikel stellen geschlossene Hohlkugeln dar, deren Hülle, im Falle von Arzneistoffträgern, aus einer Bilayermembran (Abbildung 1-2) besteht. Diese Membran ist ein Assoziat aus Amphiphilen, weshalb Vesikel auch zu den Assoziationskolloiden gezählt werden. Amphiphile bestehen aus zwei Strukturbereichen: einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil. In wässrigem Medium ordnen sie sich deshalb so an, dass beide Teile möglichst „zufrieden“ sind. Dieses Prinzip der Selbstorganisation wird im folgenden Unterkapitel 1.1.1 näher behandelt. Die Art des Vesikels ergibt sich aus der chemischen Natur des Amphiphils. Vesikel, deren Membran aus Phospholipiden aufgebaut ist, werden auch als Liposomen (griech.: lipo = „fett“ und soma = „Körper“) bezeichnet. Dementsprechend bestehen Niosome aus nichtionischen Tensiden und Polymersome aus amphiphilen Blockcopolymeren.



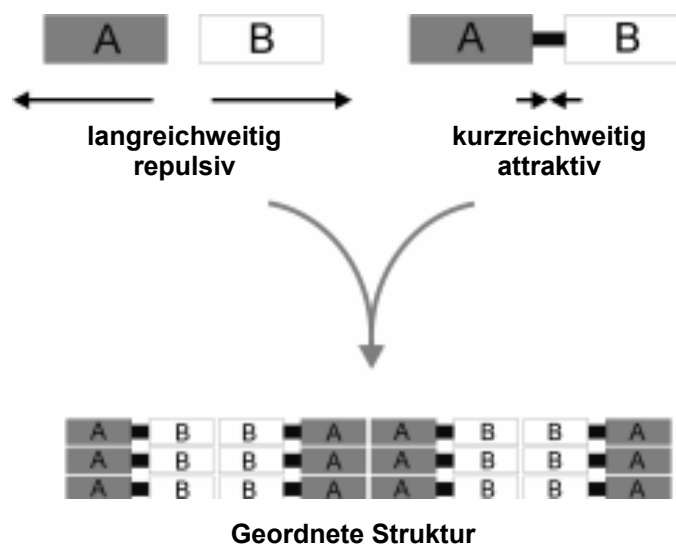
**Abbildung 1-2: Schematische Darstellung eines Vesikels**

Aufgrund ihres Aufbaus eignen sich Vesikel hervorragend, um wässrige Substanzen in ihren Innenraum einzuschließen oder wasserunlösliche Stoffe in ihre Membran einzubauen. Somit können nahezu alle Wirkstoffe in Vesikel assoziiert werden. Weitere Anwendungsgebiete von Vesikeln sind ihr Einsatz als Nanoreaktor oder als

Membranmodell. Kapitel 1.5 geht nachfolgend im Speziellen auf aktuelle Verwendungsmöglichkeiten von Polymersomen ein.

### 1.1.1 Prinzip der Selbstorganisation

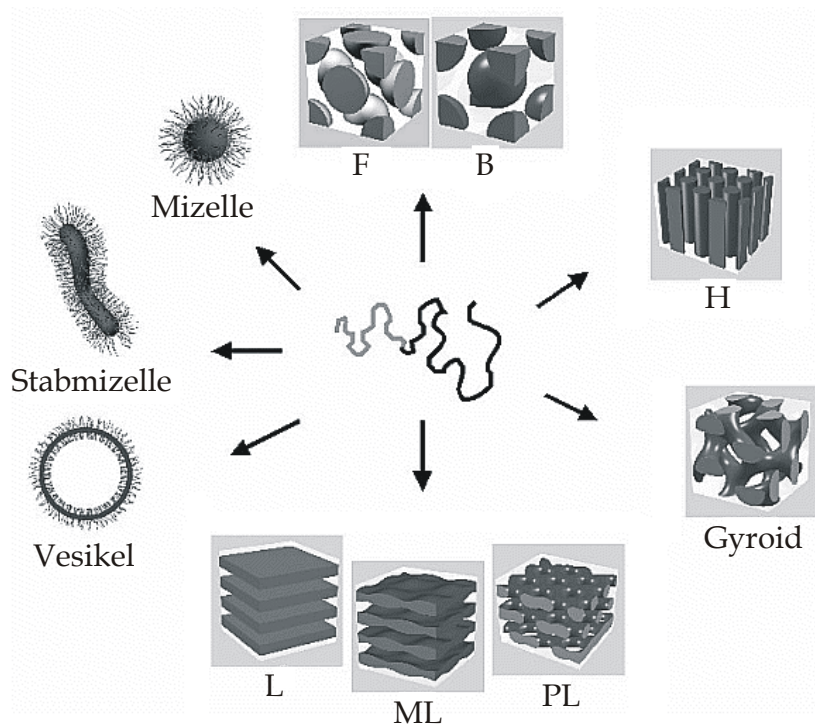
Die spontane Bildung von geordneten Strukturen im Nanometerbereich wird als Selbstorganisation bezeichnet und tritt in vielen Bereichen der Biologie, Physik und Chemie auf. In der Chemie benötigt man dafür Moleküle, die aus zwei unterschiedlichen Bereichen bestehen. Diese Bereiche sind kurzreichweitig attraktiv über eine Bindung miteinander verbunden und stoßen sich gleichzeitig wegen ihrer Unverträglichkeit langreichweitig ab. Kommt es nun zur Anordnung vieler solcher A/B-Moleküle auf engem Raum, so wird die Anordnung, mit möglichst wenigen Kontakten, in A- und B-Domänen begünstigt (Abbildung 1-3).



**Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Selbstorganisation von A/B-Strukturen durch Domänenbildung (nach Förster & Plantenberg 2002)**

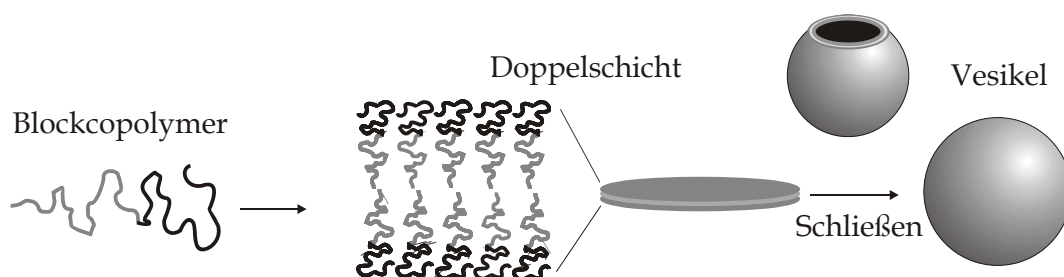
Diese Domänenbildung wird bei amphiphilen Molekülen in einem selektiven Lösungsmittel beobachtet. Die Minimierung von energetisch ungünstigen Strukturen ist dabei die treibende Kraft. Die Größe der jeweiligen Molekülteile und die Art des verwendeten Lösungsmittels entscheiden über die resultierende Form der Überstruktur (siehe Abbildung 1-4). Die Ausbildung der kolloidalen Strukturen erfolgt jedoch erst oberhalb der so genannten kritischen Mizellenkonzentration (CMC). Oberhalb der CMC bilden sich zunächst sphärische Mizellen, Stabmizellen oder Vesikel. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration des Amphiphils bilden sich dann

lyotrop flüssigkristalline Phasen, zu denen die Kugelpackungen (F, B), die hexagonal gepackten Zylinder (H), bikontinuierliche, dreidimensionale Strukturen (Gyroid) und die verschiedenen lamellaren Strukturen (L, ML, PL) gehören (Förster & Plantenberg 2002).



**Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Überstrukturen von amphiphilen Molekülen (Förster und Plantenberg 2002)**

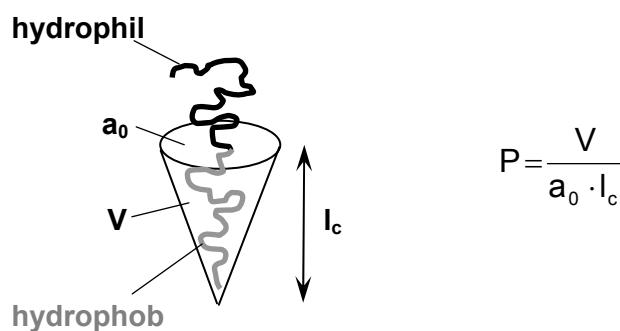
Die Bildung von Vesikeln durch Selbstorganisation von Lipiden oder amphiphilen Blockcopolymeren verläuft in zwei Schritten (Antonietti & Förster 2003). Zu Beginn ordnen sich die Amphiphile zu einer scheibenförmigen Doppelschicht, die stetig in ihrem Radius wächst. Wird ein bestimmter Radius erreicht, ist die Scheibe energetisch ungünstig, weshalb sich diese krümmt und zum energetisch günstigeren Vesikel schließt (Abbildung 1-5).



**Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der Bildung von Vesikeln (Antonietti & Förster 2003)**

### 1.1.2 Packungsparameter

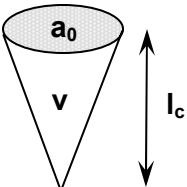
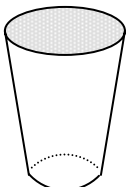
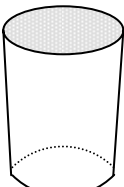
Der Packungsparameter ist eine theoretische und dimensionslose Größe. Er ermöglicht es, die geometrische Struktur eines amphiphilen Moleküls und damit dessen Aggregationsstruktur in einem selektiven Lösungsmittel abzuschätzen. Diese mathematische Beziehung wurde von Israelachvili et al. 1976 für niedermolekulare Tenside eingeführt. Der Packungsparameter (P) beschreibt den Zusammenhang zwischen Volumen (V) und der Länge ( $l_c$ ) des hydrophoben Teils mit dem mittleren Flächenbedarf ( $a_0$ ) der hydrophilen Kopfgruppe wie folgt:



**Abbildung 1-6: Geometrische Ableitung des Packungsparameters P mit den Kenngrößen V (Volumen) und Konturlänge ( $l_c$ ) des hydrophoben Teils sowie dem Flächenbedarf der hydrophilen Kopfgruppe**

In der folgenden Tabelle sind der Packungsparameter und die daraus resultierenden geometrischen Strukturen für Amphiphile zusammengefasst:

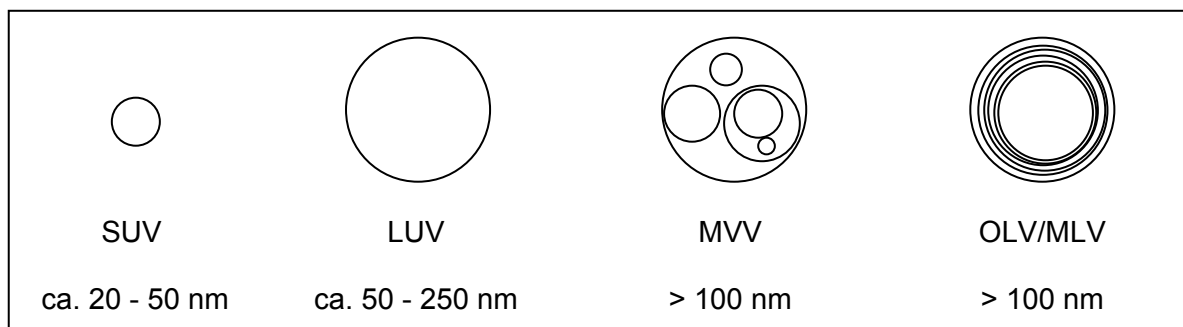
**Tabelle 1-1: Abhängigkeit der Aggregatstruktur vom Packungsparameter**

| Packungsparameter     | 1/3                                                                                                  | 1/3-1/2                                                                                               | 1/2-1                                                                                                                |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Molekül-geometrie     | spitzer Kegel<br> | stumpfer Kegel<br> | stumpfer Kegel bis Zylinder<br> |
| Aggregations-struktur | sphärische Mizelle                                                                                   | zylindrische Mizelle (Wurmmizelle)                                                                    | Vesikel                                                                                                              |

Als Amphiphile kommen bspw. Salze langkettiger Fettsäuren, (nicht)ionische Tenside, natürliche Phospholipide oder Blockcopolymere in Frage. Bei Blockcopolymeren kann sowohl über die Chemie und Länge der Blöcke, als auch über die Zusammensetzung des Mediums (Salzkonzentration, Temperatur, pH) die Struktur vorbestimmt werden (Soo & Eisenberg 2004). Zur Bildung von Vesikeln sollte der hydrophile Volumenanteil des Polymers bei  $35 \pm 10\%$  (Discher et al. 2000, Jain & Bates 2003) liegen.

### 1.1.3 Nomenklatur der Vesikelformen

Abhängig von der Präparation (siehe 1.3.1) können verschiedene Vesikelformen auftreten. Diese können nach ihrer Größe und Lamellarität, wie in Abbildung 1-7 dargestellt, eingeteilt werden (New 1990). Sie können aus einem, zwei oder mehreren Bilayern bestehen oder andere Vesikel einschließen. Der Vesikeldurchmesser kann stark zwischen wenigen nm bis über 100  $\mu\text{m}$  variieren.



**Abbildung 1-7: Klassifizierung von Vesikeln**

Oligolamellare (*oligolamellar vesicle*, OLV) und multilamellare Vesikel (*multilamellar vesicle*, MLV) haben einen Durchmesser von über 100 nm und bestehen aus mehreren (OLV) bzw. vielen (MLV) konzentrischen Bilayern. Nur einen Bilayer besitzen dagegen große (*large unilamellar vesicle*, LUV > 50 nm) und kleine unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicle*, SUV < 50 nm). Bei SUVs kommt es aufgrund der geringen Größe zu einer sehr starken Krümmung der Membran, weshalb im äußeren Monolayer die Zahl an Amphiphilen wesentlich größer ist als im inneren Monolayer. Als unilamellare Riesenvesikel (*giant unilamellar vesicle*, GUV) werden Vesikel bezeichnet, die einen Durchmesser zwischen 10  $\mu\text{m}$  und 100  $\mu\text{m}$  besitzen. Bei multivesikulären Vesikeln (*multivesicular vesicle*, MVV) umschließt ein großes Vesikel (> 100 nm) ein oder mehrere kleinere Vesikel.

### **1.1.4 Liposomen versus Polymersomen**

Wie bereits erwähnt, werden Vesikel nach der chemischen Natur ihrer Membranbausteine in Liposomen, Polymersomen und Niosomen eingeteilt. Da nur die ersten beiden eine bedeutende Rolle als Arzneistoffträger spielen, werden diese im Folgenden miteinander verglichen.

Liposomen bestehen aus Lipiden natürlichen oder halbsynthetischen Ursprungs, die biokompatibel und bioabbaubar sind. Aufgrund ihrer Chemie sind sie jedoch sehr hydrolyse- und oxidationsempfindlich. Weiterhin sind Liposomen sehr anfällig gegenüber Änderungen des osmotischen Druckes. Die Bausteine von Polymersomen dagegen sind vollsynthetischen Ursprungs. Im Vergleich zu Liposomen sind Polymervesikel chemisch sowie mechanisch wesentlich stabiler und reagieren weniger auf Temperaturschwankungen. Zudem lassen sich die Membrandicken über die Blocklängen des Polymers einstellen, wodurch gezielt die Eigenschaften wie Permeabilität und Stabilität entsprechend variiert werden können. Auch die biologische Stabilität der Polymersomen wird erhöht durch eine meist 100%-ig PEGylierte Oberfläche als Tarnung vor dem Immunsystem, während bei Liposomen aus sterischen Gründen maximal nur 5% PEGyliertes Lipid in die Membran eingebaut werden kann.

Polymersomen sind im Gegensatz zu Liposomen bisher wenig erforscht, gelten aber aufgrund ihrer vielfältigen molekularen Architektur und dadurch steuerbaren Eigenschaften als neue Vesikelgeneration, mit der einige der bisherigen Probleme von Liposomen überwunden werden könnten.

## **1.2 Blockcopolymere als Grundbaustein von Polymersomen**

Polymersomen sind Vesikel, die aus amphiphilen Blockcopolymeren bestehen. Im Folgenden wird die Einteilung, der Aufbau sowie die Synthese dieser Polymere näher beschrieben.

### **1.2.1 Aufbau von Blockcopolymeren**

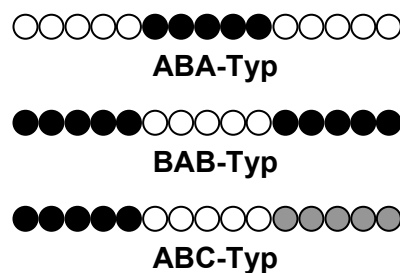
Polymere gehören zu einer Materialklasse mit endloser Unterschiedlichkeit in Form und Chemie. Sie können aufgrund ihrer Struktur allgemein in lineare, verzweigte und vernetzte Polymere unterteilt werden. Copolymere bestehen, im Unterschied zu

Homopolymeren, aus mindestens zwei verschiedenen Monomerbausteinen A und B. Je nach Verteilung der Monomere A und B in der Polymerkette unterscheidet man zwischen statistischen (AABABBBBAABB), alternierenden (ABABABAB) und Block- (AAAABBBB) Copolymeren. Im Folgenden wird näher auf lineare Blockcopolymeren eingegangen, die durch kovalente Verknüpfung zweier oder mehrerer Homopolymerblöcke entstehen und entsprechend als Di-, Tri- usw.- block-Copolymer bezeichnet werden.

#### **Diblock-Copolymer**

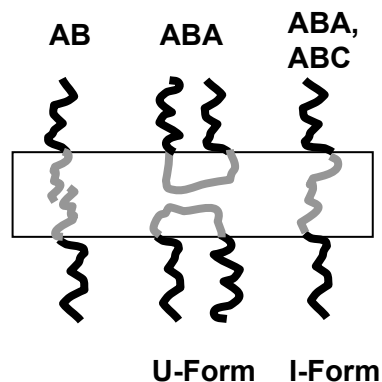


#### **Triblock-Copolymer**



**Abbildung 1-8: Einteilung von Blockcopolymeren**

Ist ein Polymerblock hydrophob und ein anderer Block hydrophil, so resultiert daraus ein amphiphiles Molekül (griech.: amphi – beide; philos – liebend), das in selektiven Lösungsmitteln oberhalb einer kritischen Konzentration (*critical aggregation concentration*, CAC) Assoziate ausbildet. Je nach ihrem Aufbau sind vesikelbildende Blockcopolymeren innerhalb einer Bilayermembran wie in folgender Darstellung angeordnet:



**Abbildung 1-9: Anordnung verschiedener vesikelbildender Blockcopolymeren innerhalb einer Bilayermembran (schwarz: hydrophil, grau: lipophil)**

Über die Chemie der Monomere sowie die Variation der Länge und Anzahl der Polymerblöcke lassen sich gezielt die Eigenschaften der Blockcopolymere einstellen, die später für eine gezielte Wirkstofffreisetzung von Bedeutung sein können. Den hydrophilen Block bildet meist Polyethylenoxid (PEO), da es viele wichtige Eigenschaften vereint. Zum einen ist PEO aufgrund seiner Biokompatibilität von der FDA zugelassen und verhindert *in vivo* die Opsonisierung von PEGylierten Nanopartikeln durch Serumproteine (Lee et al. 1995). Zum anderen ist es gut zur Endfunktionalisierung und chemischen Anbindung biologisch aktiver Substanzen (Targeting) geeignet. Der hydrophobe Block kann aus inerten und teils quervernetzbaaren Polymeren (PB, PI, PEE, PDMS), aber auch aus temperatur- (PNIPAM) oder pH-sensitiven (P2VP) sowie bioabbaubaren (PLA, PCL) oder oxidationsempfindlichen (PPS) Polymeren bestehen.

**Tabelle 1-2: Gebräuchliche Abkürzungen von Polymeren, die häufig den hydrophoben Teil vesikelbildender Blockcopolymere bilden**

| Abkürzung | Vollständige Bezeichnung   |
|-----------|----------------------------|
| PB        | Poly(butadien)             |
| PCL       | Poly(caprolacton)          |
| PDMS      | Poly(dimethylsiloxan)      |
| PEE       | Poly(ethylethlen)          |
| PI        | Poly(isopren)              |
| PLA       | Poly(milchsäure)           |
| PNIPAM    | Poly(N-isopropylacrylamid) |
| PPS       | Poly(propylensulfid)       |
| PPO       | Poly(propylenoxid)         |
| PS        | Poly(styrol)               |
| P2VP      | Poly(2-vinylpyridin)       |

### 1.2.2 Anionische Polymerisation

Die meisten Blockcopolymere sind nicht kommerziell erhältlich und müssen deshalb per Eigensynthese hergestellt werden. Die Polymersynthese kann man allgemein unterteilen in die Polyaddition, die Polykondensation und die Polymerisation. Die radikalische, kationische und anionische Polymerisation werden dabei nach der Art ihres Kettenendes unterschieden. Die anionische Polymerisation, die 1956 von Szwarc und Milkovich eingeführt wurde, ist die am weitesten verbreitete Technik zur Synthese von Blockcopolymeren (Kumar et al. 2001) und wird unter Ausschluss von

Luft, Feuchtigkeit und Verunreinigungen durchgeführt. Auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Polymere (P2VP-PEO, PI-PEO) wurden durch diese Synthesetechnik hergestellt (Lipprandt 2004).

Mit Hilfe der anionischen Polymerisation erhält man gut definierte Polymere mit kontrollierter Molmasse und enger Molmassenverteilung. Sie ist eine Kettenwachstumsreaktion und kann in drei Reaktionsschritte aufgeteilt werden: Initiierung, Wachstum und gezielter Abbruch. Nach vollständigem Umsatz der Monomere bleiben die anionischen Kettenenden reaktiv, weshalb die Polymerisation auch als „lebend“ bezeichnet wird. Die Polymerisation kann durch Zugabe eines weiteren Monomers zur Makroanionlösung fortgesetzt werden, so dass bspw. Diblockcopolymere entstehen.

Als anionisch polymerisierbare Monomere gelten Vinylanaloga mit elektronenanziehenden oder -delokalisierenden Gruppen (z.B. Derivate der Acrylsäure und Olefine). Die Reaktion wird meist mit metallorganischen Brönstedt- oder Lewis-Basen als Initiator gestartet. Der Initiator addiert sich nukleophil an eine Doppelbindung des ersten Monomers. Das daraus resultierende Anion addiert sich dann wiederum an jedes folgende Monomer, bis alle Monomere aufgebraucht sind. Da jedes Initiatormolekül eine eigene wachsende Polymerkette erzeugt, ist der mittlere Polymerisationsgrad  $P_n$  proportional zum Umsatz  $U$  sowie dem molaren Verhältnis der Startkonzentrationen vom Monomeren  $M_0$  und dem Initiator  $I_0$ :

$$P_n = \frac{[M]_0}{[I]_0} \cdot U$$

**Gleichung 1-1**

Somit lässt sich bei dieser Synthese das Molekulargewicht der einzelnen Blöcke (Initiator/Monomer-Verhältnis), das Volumenverhältnis (Monomer/Monomer-Verhältnis) und die Blockanordnung (AB, ABC, ABA) einfach steuern. Werden zudem idealerweise alle Ketten gleichzeitig gestartet und wachsen gleich schnell, erhält man eine sehr enge Verteilung der Molmassen mit einer Polydispersität (PD) von  $\overline{M}_w / \overline{M}_n < 1,1$ .

Die anschließende Bestimmung der Molmassenverteilung (Polydispersität) der Polymere erfolgt mit GPC. Die genauen Molmassen  $\overline{M}_n$  (Zahlenmittel) und  $\overline{M}_w$  (Massenmittel) sowie die Blocklängenverhältnisse erhält man mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

## **1.3 Herstellung und Charakterisierung von Polymersomen**

### **1.3.1 Herstellung**

In der Literatur werden zahlreiche Methoden zur Herstellung verschiedener Vesikelarten aufgeführt. Viele der bekannten Herstellungsmethoden für Liposomen sind auch für die Herstellung von Polymersomen anwendbar. Die Einteilung dieser Methoden kann in lösungsmittelfreie Verfahren und in Verfahren, die den Zusatz eines organischen Lösungsmittels benötigen, unterteilt werden. Im ersten Fall wird das Polymer in „trockenem“ Zustand mit dem wässrigen Medium in Kontakt gebracht. In der zweiten Gruppe wird das Polymer zunächst in einem geeigneten organischen Lösungsmittel gelöst und anschließend mit Wasser gemischt oder dispergiert. Das Lösungsmittel muss später mit einer angemessenen Methode (z.B. Dialyse) entfernt werden. Problematisch ist, dass das Lösungsmittel nie vollständig entfernt werden kann. Dies kann zum einen zu Störungen in biologischen Systemen führen, oder aufgrund der erhöhten Membranfluidität eine Vesikelinstabilität induzieren und die Aggregation fördern.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über gängige Herstellungsmethoden zur Gewinnung verschiedener Liposomenspezies, die gleichzeitig Anwendung in der Präparation von Polymersomen finden. Eine kurze Erläuterung der wichtigsten Verfahrenstechniken zur Herstellung von Polymervesikeln folgt im Anschluss.

**Tabelle 1-3: Methoden zur Herstellung von Vesikeln**

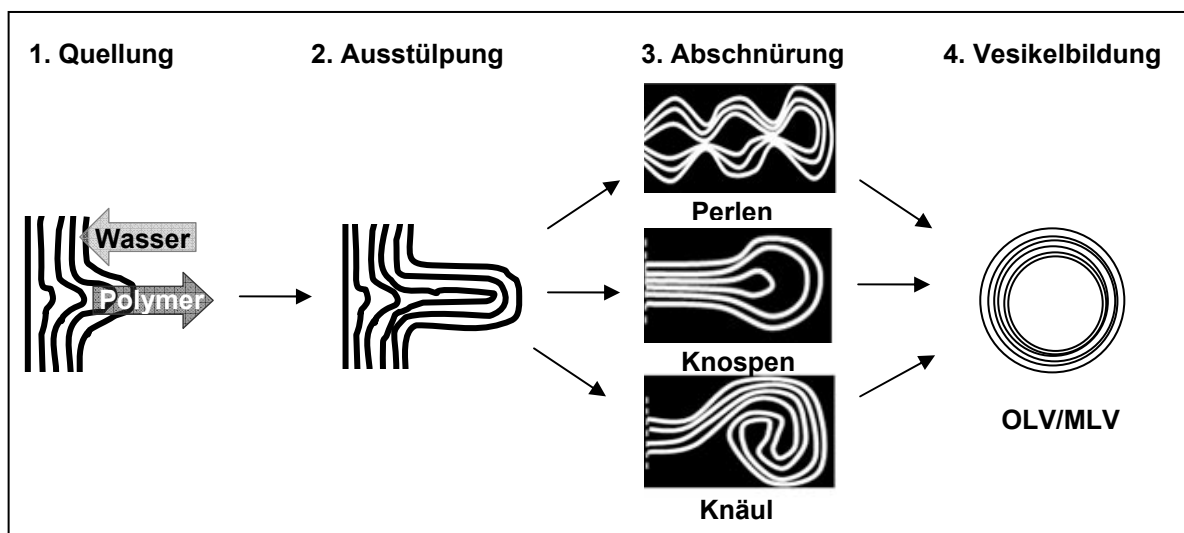
| Herstellungsverfahren                               | Vesikelart | Liposomen                    | Polymersomen                                   |
|-----------------------------------------------------|------------|------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>Ohne Lösungsmittel</b>                           |            |                              |                                                |
| <b>a) Mechanisch</b>                                |            |                              |                                                |
| ▪ Filmmethode                                       | MLV        | Bangham et al. 1956          | Lee et al. 2001                                |
| ▪ Elektroformation                                  | GUV        | Angelova 1986                | Discher et al. 1999                            |
| ▪ Extrusion                                         | LUV/OLV    | Olson et al. 1979            | Schillen et al. 2001                           |
| ▪ Ultraschallbehandlung                             | SUV        | Huang 1969                   | Brown et al. 2000                              |
| <b>b) Sonstige</b>                                  |            |                              |                                                |
| ▪ Freeze-Thaw-Methode                               | LUV        | Mayer et al. 1985            | Lee et al. 2001                                |
| ▪ Detergenzentfernung                               | SUV/LUV    | Milsmann et al. 1978         | Ruysschart et al. 2005                         |
| ▪ pH-Methode                                        | SUV        | /                            | Du et al. 2005                                 |
| <b>Mit Lösungsmittel</b>                            |            |                              |                                                |
| ▪ Lösungsmittelinjektion                            | SUV        | Batzri & Korn 1973           | Nardin et al. 2000,<br>Du & Armes 2005         |
| → Sonderfall: „Drucken“                             | SUV        | Hauschild et al. 2005        | Hauschild et al. 2005                          |
| ▪ Verdünnung mit Wasser                             | SUV        | /                            | Shen & Eisenberg<br>1999, Lee et al. 2006      |
| ▪ Lösungsmittelentfernung<br>aus O/W Emulsion (REV) | LUV        | Szoka & Papahadjopoulos 1978 | Meng et al. 2003,<br>Borchert 2006             |
| ▪ Lösungsmittelentfernung<br>aus W/O/W-Emulsion     | LUV/GUV    | Kim & Martin 1981            | Lorenceanu et al. 2005,<br>Hayward et al. 2006 |

### 1.3.1.1 Filmmethode

Die erstmals von Bangham beschriebene Filmmethode (Bangham et al. 1965) dient zur Herstellung von MLVs. Hierbei werden die Membranbestandteile in einem geeigneten organischen Lösungsmittel gelöst, das anschließend wieder entfernt wird, so dass ein dünner Film des Amphiphils auf der Gefäßinnenfläche zurückbleibt. Nach Zugabe eines wässrigen Mediums entsteht oberhalb der Phasenübergangstemperatur des Amphiphils, unter Anwendung mechanischer Energie (z.B. Rühren) eine polydisperse, trübe Vesikeldispersion aus meist großen MLVs. Diese

Rohdispersion kann durch weitere mechanische Verfahren (wie z.B. Extrusion) zu Vesikeln geringerer Größe, definierterer Membranzahl und Partikelgrößenverteilung homogenisiert werden.

Wie in Abbildung 1-10 dargestellt, wird das Quellen des Polymerfilmes und die Bildung der Vesikel durch die Diffusion des Wassers in die Polymerschicht hinein und aus der Polymerschicht heraus bestimmt (Battaglia & Ryan 2006a). Um an der Grenzfläche einen konstanten Konzentrationsgradienten aufrecht zu erhalten, muss Energie z.B. durch Bewegung wie Rühren eingebracht werden, die gleichzeitig das Abschnüren der Vesikel fördert. Nach vollständiger Quellung der Polymerschichten (Lamellen) bilden sich Myelin-artige (multilamellare) Strukturen aus, die sich durch Destabilisierung abschnüren und zu Vesikeln formieren. Die Art dieser Destabilisierung, die über perlen-, knospen- oder knäuelartige Strukturen ablaufen kann, hat dabei Einfluss auf die Vesikelform (Battaglia & Ryan 2006b).



**Abbildung 1-10: Schematische Darstellung der Vesikelbildung während der Quellung eines dünnen Polymerfilmes (nach Battaglia & Ryan 2006b)**

### **1.3.1.2 Extrusion**

Die Vesikelgröße und Anzahl an Lamellen der mittels Filmmethode gewonnenen MLVs kann durch Extrusion reduziert werden (Olson et al. 1979, Hope et al. 1985). Die Dispersion wird dabei - oberhalb der Phasenübergangstemperatur (Nayar et al. 1989) - wiederholt durch eine Membran (meist Polycarbonat) mit definierter Porengröße gepresst. Da die Porendurchmesser kleiner als die Vesikeldurchmesser sind, treten hohe Scherkräfte auf, die den äußeren Monolayer oder große Vesikel in

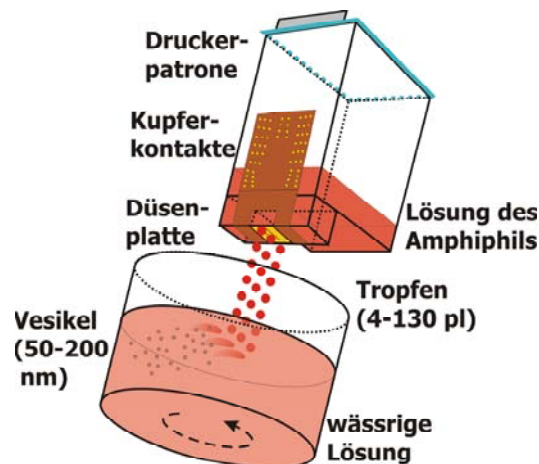
kleinere Bilayerbruchstücke zerreißt, welche sofort revesikulieren. Häufig liegt die resultierende Vesikelgröße etwas über dem Porendurchmesser, da sich die Vesikel bei der Passage durch die Pore elastisch verformen können (Hunter & Frisken 1998). Neben der Porengröße und der Anzahl der Extrusionsschritte beeinflusst auch der Extrusionsdruck die Vesikelgröße und Größenverteilung (Kölchens et al. 1993). Der Mindestdruck, der zur Ruptur der Vesikel führt, entspricht dabei der *lysis tension* der Vesikelmembran (Hunter & Frisken 1998). Da diese *lysis tension* bei Polymersomen deutlich höher ist als bei Liposomen (Bermudez et al. 2002), ist bei Polymervesikeln ein höherer Extrusionsdruck nötig, um kleine homogene Vesikel zu erhalten.

#### **1.3.1.3 Detergenzentfernung**

Die Detergenzentfernung ist eine Herstellungsmethode, die unter milden (stressarmen) Bedingungen zu sehr einheitlichen unilamellaren Vesikeln führt (Schubert 2003). Zunächst wird nach der Filmmethode ein Lipid- bzw. Polymerfilm hergestellt, der zusätzlich einen molaren Überschuss an Detergenz enthält. Nach Zugabe einer wässrigen Pufferlösung bildet sich eine klare bis leicht opaleszierende mischmizellare Lösung. Voraussetzung ist, dass die Detergenzkonzentration oberhalb der CMC liegt. Die in den Mischmizellen gebundenen Detergenzmoleküle bilden ein dynamisches Gleichgewicht mit den freien Detergenzmonomeren. Wird dem System Detergenz entzogen, muss sich das Gleichgewicht neu einstellen und die Mischmizellen verarmen an Monomer. Über mehrere mischmizellare Zwischenstrukturen (Wurmmizelle, Scheibenmizelle) kommt es zur Bildung von Vesikeln (Schubert 2003). Die Entfernung des Detergenz kann u.a. mittels Dialysemembranen (Milsman et al. 1978), Hohlfasern (Rhoden & Goldin 1979), Tangentialfiltration (Peschka et al. 1998), BioBeads (Philippot 1985) sowie durch eine einfache Verdünnung (Schurtenberger et al. 1984) erfolgen.

#### **1.3.1.4 Inkjet-Methode**

Eine direkte und schnelle Herstellungsmöglichkeit von Vesikeln in einem Schritt ist die modifizierte Lösungsmittel-Injektionsmethode mittels Tintenstrahl-Druckern (Hauschild et al. 2005). Der Prozess wird in folgender Abbildung wiedergegeben:



**Abbildung 1-11: Schematische Darstellung der Vesikelherstellung mit der Inkjet-Drucker-Technologie: Die Lösung eines Vesikel-bildenden Amphiphils wird in eine fixierte Druckerpatrone gefüllt und in eine gerührte wässrige Lösung „gedruckt“, in der die Amphiphile spontan zu Vesikeln aggregieren (Hauschild et al. 2005).**

Die Vesikelgröße kann über die Konzentration der Amphiphillösung und die Art des Amphiphils, des Lösungsmittels und der Druckerpatrone, als auch über die Druck- und Rührgeschwindigkeit gesteuert werden. Das Lösungsmittel kann durch Dialyse - kontinuierlich während oder nach der Präparation - aus der Vesikeldispersion entfernt werden.

### 1.3.2 Charakterisierung von Polymersomen

Kolloidale Systeme wie Polymersomen können sich hinsichtlich ihrer Partikelstruktur und Membraneigenschaften unterscheiden. Die Methoden zur Charakterisierung dieser verschiedenen Strukturen und Eigenschaften sind in Tabelle 1-4 aufgeführt. In der Polymerchemie spielen dabei vor allem die Lichtstreuung und verschiedene Mikroskopietechniken die wichtigste Rolle.

**Tabelle 1-4: Auswahl einiger wichtiger Methoden zur Charakterisierung von Polymersomen**

|                           | <b>Eigenschaft</b>         | <b>Methode</b>                           |
|---------------------------|----------------------------|------------------------------------------|
| Partikelstruktur          | Partikelgröße(nverteilung) | PCS,<br>Cryo-TEM                         |
|                           | Lamellarität               | Cryo-TEM,<br>TEM (Negativkontrastierung) |
|                           | Form, Membrandicke         | Cryo-TEM,<br>SANS bzw. SAXS              |
| Membran-<br>eigenschaften | Permeabilität              | Fluoreszenz-Dequenching,<br>PFG-NMR      |
|                           | Viskoelastizität           | AFM,<br>Pipettenaspiration               |
|                           | Oberflächenladung          | $\zeta$ - Potential                      |

Im Rahmen dieser Arbeit nahmen PCS und Cryo-TEM einen besonderen Stellenwert ein. Im Folgenden wird daher das Funktionsprinzip dieser beiden Methoden näher erläutert. Weitere verwendete Verfahren werden in entsprechenden Abschnitten kurz erklärt.

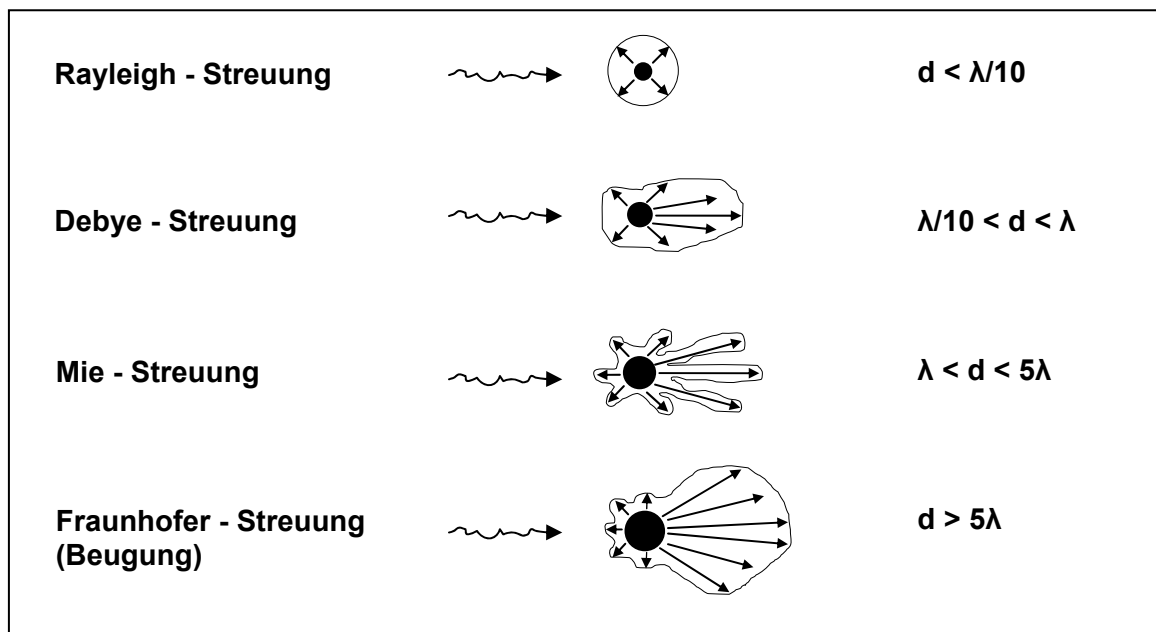
### **1.3.2.1 PCS**

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), die auch als dynamische (DLS) oder quasielastische Lichtstreuung (QELS) bezeichnet wird, ermöglicht innerhalb kurzer Zeit die quantitative Bestimmung des mittleren Teilchendurchmessers (z-Average) und der Partikelgrößenverteilung (PDI) dispergierter Systeme in einem Messbereich von 5 bis 1000 nm (limitierender Faktor: Sedimentation). Die Grundlage der dynamischen Lichtstreuung ist die Brownsche Molekularbewegung. Aus der Diffusions-Geschwindigkeit der Teilchen im Medium wird deren „solvatodynamischer“ (in Wasser: hydrodynamischer) Durchmesser ermittelt.

Das Phänomen der Lichtstreuung wurde 1868 erstmals von Faraday und Tyndall an einem Goldsol beobachtet (Dörfler 2002). Die Streuung von Licht an Teilchen beruht auf deren Polarisierbarkeit. Das einfallende monochromatische Licht (Laser) versetzt

den Partikelladungspol in Schwingung, welcher dann selbst Licht mit derselben Frequenz abstrahlt (Streulicht). Dies wird als elastische Lichtstreuung bezeichnet.

Die Intensität der Streuung ist von der Wellenlänge ( $\lambda$ ) des eingestrahnten Lichtes, der Größe der streuenden Teilchen ( $I \sim r^6$ ) und dem gemessenen Streuwinkel abhängig. Deshalb gibt es verschiedene theoretische Grundlagen der Lichtstreuung, die Abbildung 1-12 darstellt (Rawle 1994).



**Abbildung 1-12: Art der Lichtstreuung in Abhängigkeit von der Partikelgröße**

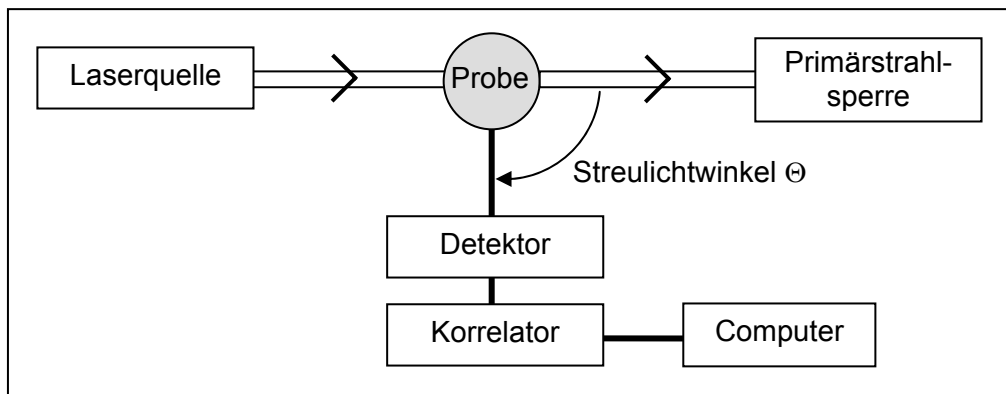
Für kleine Teilchen ( $\lambda \gg d$ ) gilt die Rayleigh-Approximation. Kleine Teilchen streuen Licht in alle Richtungen intensitätsgleich (isotrop), das bedeutet, die Streulichtintensität ist winkelunabhängig. Bei größeren Teilchen dagegen ist die Streulichtintensität stark winkelabhängig (anisotrop) und es treten Streulichtminima und -maxima auf. Zum Ausschließen von Messfehlern wird deshalb bei größeren Partikeln die Messung mit variabler Winkeleinstellung empfohlen. Ein weiteres Problem stellen die Inhomogenität der Probe und das Vorhandensein von Staubeilchen dar, da die Streulichtintensität großer Teilchen um ein Vielfaches höher ist als bei kleinen Teilchen und zur Verfälschung der Messergebnisse führen kann. Dies ist vor allem bei der Ergebnisinterpretation zu beachten, da der z-Average den harmonischen, über die Intensität gemittelten Partikeldurchmesser darstellt.

Da sich die Teilchen aufgrund der Brownschen Molekularbewegung frei in der Lösung bewegen, tritt der Dopplereffekt auf. Die Frequenzverschiebung ist jedoch sehr klein, weshalb die zeitliche Fluktuation der Streuintensität detektiert wird. Die Bewegungsgeschwindigkeit der Teilchen ist abhängig von deren Größe (kinetische Gastheorie). Kleine Partikel bewegen sich schneller als große und erzeugen deshalb mehr Streusignale pro Zeit. In einer Dispersion liegen die Partikel nur selten monodispers vor und weisen eine gewisse Größenverteilung auf. Erfasst wird deshalb ein komplexes Streulichtmuster, welches mittels Korrelator ausgewertet, in eine Autokorrelationsfunktion umgewandelt und über Kumulantenentwicklung angenähert wird. Die höheren Kumulanten stellen hierbei ein Maß für die Polydispersität der Probe dar. Die Steilheit der Autokorrelationsfunktion liefert den Diffusionskoeffizient ( $D$ ), der über die Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung 1-2) in direktem Zusammenhang mit dem hydrodynamischen Teilchenradius ( $r_h$ ) steht.

$$D = \frac{k_b \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_h} \quad \text{Gleichung 1-2}$$

|        |                                                                            |
|--------|----------------------------------------------------------------------------|
| $D$    | Diffusionskoeffizient [ $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ]                 |
| $k_b$  | Boltzmannkonstante [ $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ ] |
| $T$    | Temperatur [K]                                                             |
| $\eta$ | kinematische Viskosität [ $\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ ]  |
| $r_h$  | hydrodynamischer Radius [m]                                                |

Der Aufbau und die Durchführung eines Streuexperiments ist im Vergleich zur mathematischen Auswertung sehr einfach und sieht prinzipiell aus wie in Abbildung 1-13 dargestellt. Die Probe (in einem temperierten Probenhalter) wird von einem monochromatischen Laserstrahl durchleuchtet und das Streulichtsignal in einem bestimmten Winkel (meist  $90^\circ$ ) von einem Detektor (Photomultiplier) erfasst, verstärkt und an den Korrelator weitergeleitet. Zur Speicherung und Auswertung der Messung wird ein Computer verwendet. Als Lichtquelle wird eine starke Lichtquelle (Laser) benötigt, da die Intensität des Streulichtes um den Faktor  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$  kleiner ist als die des Primärstrahls.

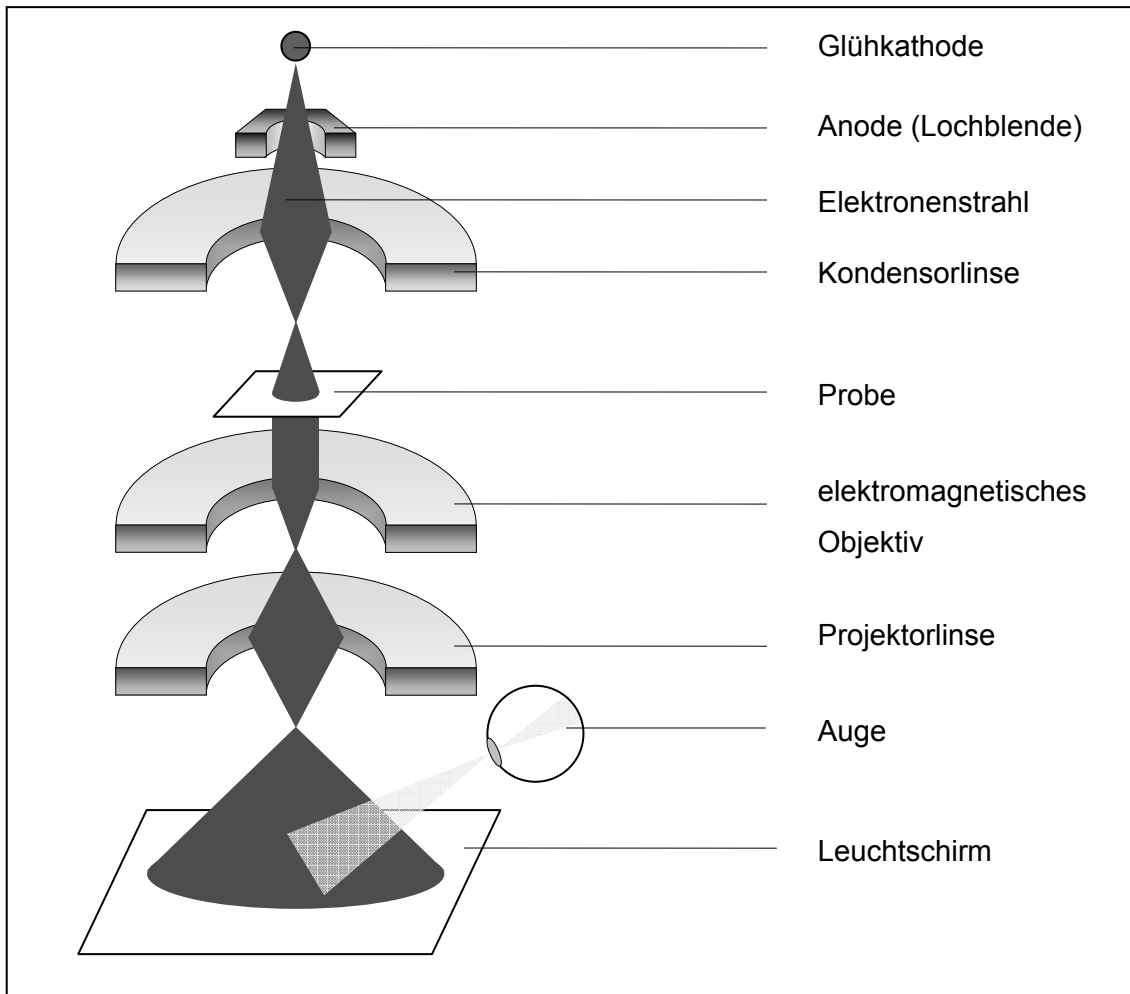


**Abbildung 1-13: Schematischer Aufbau eines PCS-Gerätes**

### **1.3.2.2 Cryo-TEM**

In der Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM) wird ein dünner gefrorener Probenfilm von Elektronen durchstrahlt und dadurch eine indirekte zweidimensionale Abbildung der Probe im nativen Zustand ermöglicht. Diese Methode eignet sich besonders für wässrige Proben, die dynamische Strukturen im kolloidalen Größenbereich (5 - 500 nm) enthalten und liefert Aussagen über deren Aussehen und Größe (Almgren et al. 2000).

Der Aufbau eines TEM gleicht im Prinzip dem eines Lichtmikroskops. In Abbildung 1-14 ist der Strahlengang eines TEM schematisch dargestellt. Als „Licht“ dient ein Elektronenstrahl, welcher an einer Glühkathode erzeugt und zur Anode hin beschleunigt wird. Zur Fokussierung des Strahls werden elektromagnetische Spulen an Stelle von Glaslinsen eingesetzt. Die vergrößerte Abbildung der Probe erfolgt indirekt auf einem fluoreszierenden Bildschirm. Um die Streuung des Elektronenstrahls und Präparatverschmutzung zu minimieren, herrscht in der gesamten Mikroskopsäule ein Hochvakuum.



**Abbildung 1-14: Schematischer Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskopes**

Der Vorteil des TEM gegenüber dem LM besteht im deutlich höheren Auflösungsvermögen aufgrund der sehr kleinen Wellenlänge  $\lambda$  von Elektronen. Der kleinste noch auflösbare Abstand  $\Delta x$  zwischen zwei Objekten ist laut Gleichung 1-3 (Haas 2002) umso kleiner, je kleiner die Wellenlänge der verwendeten Strahlung ist :

$$\Delta x = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha} = \frac{\lambda}{2 \cdot A_N}$$

**Gleichung 1-3**

- |          |                                                |
|----------|------------------------------------------------|
| $n$      | Brechungsexponent zwischen Objekt und Objektiv |
| $\alpha$ | Akzeptanzwinkel des Objektivs                  |
| $A_N$    | numerische Apertur                             |

Über die *de Broglie* - Beziehung (Welle-Teilchen-Dualismus) kann jedem Teilchen eine Wellenlänge  $\lambda$  zugeordnet werden (Gleichung 1-4), welche umgekehrt proportional zur angelegten Beschleunigungsspannung im elektrischen Feld ist:

$$\lambda = \frac{h}{m_e \cdot v} = \frac{h}{\sqrt{2 \cdot m_e \cdot U \cdot e}}$$

**Gleichung 1-4**

|               |                                                            |
|---------------|------------------------------------------------------------|
| $h$           | Planck'sches Wirkungsquantum [ $6,626 \cdot 10^{-34}$ J·s] |
| $m_e$         | Elektronenmasse [ $9,1 \cdot 10^{-31}$ kg]                 |
| $v$           | Geschwindigkeit eines Elektrons [ $m \cdot s^{-1}$ ]       |
| $m_e \cdot v$ | Impuls eines Elektrons [N·s]                               |
| $U$           | Beschleunigungsspannung im Mikroskop [kV]                  |
| $e$           | Elementarladung eines Elektrons [ $1,6 \cdot 10^{-19}$ C]  |

Das Auflösungsvermögen eines Gerätes ist somit umso besser, je höher die angelegte Beschleunigungsspannung ist. Bei einer Spannung von z.B. 120 kV ist die Wellenlänge der Elektronen ca. 3,5 pm und die Auflösung theoretisch 0,2 nm. Da aber im Vergleich zum LM die sphärische Aberration der elektromagnetischen Linsen nicht korrigiert werden kann, wird mit einer sehr kleinen numerischen Apertur gearbeitet (Saibil 2000). Dies führt zu einer Verschlechterung der Auflösung, weshalb die tatsächliche Auflösungsgrenze bei ca. 2 nm liegt.

Beim Durchstrahlen des dünnen Probenfilmes (ca. 100 nm) treten verschiedene Wechselwirkungen der Elektronen mit der Probe auf. Werden die Elektronen an der Kernhülle abgelenkt, geben sie Energie als Röntgenstreuung ab. Diese inelastische Streuung, welche elementspezifische spektroskopische Informationen liefert, wird zur Kontrastverbesserung und zur Minimierung des Hintergrundrauschens herausgefiltert (*Zero-loss mode*) (Grimm et al. 1998). Bei der elastischen Streuung dagegen erfolgt eine Ablenkung der Elektronen am Atomkern ohne Energieverlust. Die Streuintensität ist hierbei verantwortlich für den Bildkontrast und steigt mit der Ordnungszahl der Atome (Talmon 1996). Deshalb erzeugen Atome niedriger Ordnungszahl wie z.B. C, H, N oder O nur einen geringen Kontrast. Auf dem fluoreszierenden Schirm entstehen nun an den Stellen schwarze Schatten, an denen die Elektronen mit der Probe wechselwirken und abgelenkt werden.

Im Gegensatz zur LM ist bei der EM eine Fixierung der Probe notwendig. In der Cryo-TEM werden die wässrigen Proben schockgefroren, wodurch das Wasser im amorphen Zustand ohne Kristallbildung gefriert und die Probe damit ohne Zerstörung eingebettet wird (Dubochet et al. 1988).

Da Elektronen eine nur geringe Durchdringungstiefe in Materie besitzen, muss die Probe sehr dünn sein. Zur Probenpräparation eignen sich Kupfergrids, die mit einem Kohlelochfilm überzogen sind (Adrian et al. 1984). Nach Auftragen einer geringen Probenmenge auf das Grid, wird der Probenüberschuss abgesaugt (geblottet), so dass sich ein dünner Probenfilm (ca. 100 nm) in den Löchern aufspannt, welcher sofort in flüssigem Ethan gefroren wird. Dieser Vorgang muss sehr schnell durchgeführt werden, um ein Verdunsten des Flüssigkeitsfilms zu verhindern. Bei puffersalzhaltigen Proben führt das Verdunsten geringer Flüssigkeitsmengen zu einer Aufkonzentrierung an Puffersalzen im Dispersionsmedium und es kann durch osmotische Effekte zur Artefaktbildung (z.B. Einschnürung bei Liposomen) kommen (Berclaz 1999). Da der Probenfilm sehr dünn ist, werden größere Probenbestandteile (> 500 nm) beim Blotten meist entfernt. Um ein späteres Auftauen/Kristallisieren des Präparates zu unterbinden, ist ein ständiges Arbeiten bei Flüssigstickstoff-Temperatur (-196°C) erforderlich. Aus diesem Grund wird die Probe anschließend unter Stickstoffatmosphäre bei -196°C in das auf dieselbe Temperatur gekühlte EM überführt.

## **1.4 Stabilität von Polymersomen**

Die Stabilität von Polymervesikeln, die stark von der Polymerchemie abhängt (Soo & Eisenberg 2004), umfasst die chemische, physikalische und biologische Stabilität. Auf diese verschiedenen Teilaspekte wird im Folgenden näher eingegangen.

### **1.4.1 Chemische Stabilität**

Die chemische Stabilität der Polymere ist abhängig vom Vorhandensein oxidierbarer Doppelbindungen oder hydrolysierbarer Bindungen wie z.B. Esterbindungen. Da Polymere im Allgemeinen sehr stabil sind, lässt sich über die Chemie gezielt der chemische Abbau der Vesikel und darüber die Freisetzung von Arzneistoffen steuern (1.5.1.3).

### **1.4.2 Biologische Stabilität**

Körperfremde Nanopartikel wie Liposomen werden nach Einbringung in den Organismus schnell vom Immunsystem erkannt und aus der Blutbahn eliminiert.

(Senior 1987). Ein Hauptgrund hierfür ist die Markierung der Teilchenoberfläche durch Markerproteine (sog. Opsonine), die vom RES (retikuloendotheliales System, Monozyten-Makrophagen-System) erkannt werden und zur Phagozytose der Partikel durch Makrophagen sowie deren Abtransport in v.a. Leber und Milz führt (van Etten et al. 1998).

Die Zirkulationsdauer im Blut kann durch Unterdrückung der Opsonisierung auf folgenden Wegen verlängert werden:

1. sterische Stabilisierung der Vesikeloberfläche (Blume & Cevc 1990, Allen 1994)
2. kleine Vesikelgröße (Harashima et al. 1996)
3. geringe Membranfluidität (Kirby et al. 1980)

Die erste und wichtigste Möglichkeit stellen inerte, nichtionische, voluminöse hydrophile Polymere an der Vesikeloberfläche dar, die als sterisches „Schutzschild“ gegen eine Opsonisierung wirken. Dadurch wird die Halbwertszeit der Vesikel verlängert und folglich deren Anreicherung in anderen Geweben ermöglicht. Ein weiterer Vorteil der sterischen Abschirmung ist die erhöhte physikalische Stabilität (s.u.) durch eine reduzierte Fusion und Aggregation der Vesikel während Lagerung (Needham et al. 1992). Das Polymer Polyethylenglykol (PEG) bzw. -oxid (PEO) spielt dabei die wichtigste Rolle. PEGylierte Liposomen tragen den Handelsnamen „Stealth®-Liposomen“. Bei Liposomen ist aus Stabilitätsgründen nur ein maximaler Anteil von 5% (mol/mol) PEG-Lipid in der Membran möglich (Kuhl et al. 1994), während Polymersomen aufgrund ihrer chemischen Struktur zu 100% PEGyliert sind. Die erhöhte biologische Stabilität solcher Polymervesikeln wurde sowohl *in vitro* (Lee et al. 2001), als auch *in vivo* (Photos et al. 2003) nach Einmalapplikation gezeigt.

In den letzten Jahren wird jedoch im Zusammenhang mit PEGylierten Vesikeln das so genannte ABC-Phänomen (accelerated blood clearance phenomenon) kritisch diskutiert (Ishida et al. 2004, Bendas et al. 2003). Während sich bei der ersten Injektion die Bluthalbwertszeit der Vesikel durch die sterische Stabilisierung deutlich verlängert, wird bei wiederholter Injektion in Maus, Ratte und Resusaffe eine Verkürzung der Zirkulationsdauer mit Anreicherung in der Leber beschrieben. Von Problemen bei mehrfacher Applikation PEGylierter Liposomen beim Menschen wurde bisher nicht berichtet.

### 1.4.3 Physikalische Stabilität

Unter physikalischer Stabilität von Polymervesikeln versteht man die Verhinderung einer Größenveränderung, Aggregation oder Fusion von Vesikeln und der Freisetzung von eingeschlossenem Material. Die Stabilität hängt hierbei stark von den Membraneigenschaften, wie z.B. Membranfluidität, ab.

Viele Eigenschaften der Membran zeigen dabei eine Abhängigkeit von der Molmasse der amphiphilen Moleküle. Die Membrandicke der Polymervesikel steigt, je höher die Molmasse ist mit  $d \sim M_w^b$ , was sowohl experimentell (Bermudez et al. 2002, Battaglia & Ryan 2005), als auch theoretisch (Srinivas et al. 2004) für Polymersomen demonstriert wurde. Wegen der dicken hydrophoben Schicht in der Membran wird vermutet, dass kein Flipp-Flopp innerhalb der Membran stattfindet (Pata et al. 2004). Auf der anderen Seite wird ein Flipp-Flopp diskutiert, der wegen der starken Segregation der Polymerketten möglich sein sollte und zur Stabilisierung von stark gekrümmten Polymersomen beiträgt (Discher & Eisenberg 2002). Die elastischen Eigenschaften der Polymermembranen sind vergleichbar mit denen von Lipidmembranen, wogegen die physikalische Stabilität höher (Lee et al. 2001) und die Permeabilität niedriger (Discher et al. 1999, Bermudez et al. 2004) als bei Liposomen sind. Sowohl die elektromechanische Stabilität (Aranda-Espinoza et al. 2001) als auch die *lysis tension* (Bermudez et al. 2002) der Polymerbilayern sind dabei umso stärker, je höher die Molmasse der Polymere ist, wogegen die Permeabilität sinkt (Battaglia et al. 2006c). Zudem weisen Polymermembranen eine 500-fach höhere Membranviskosität als Lipidmembranen auf (Dimova et al. 2002), was vermutlich durch das Interpenetrieren der Polymerketten der gegenüberliegenden Monolayer (Interdigitieren) hervorgerufen wird (Battaglia & Ryan 2005). Diese Viskosität hat wiederum Einfluss auf die Membrandynamik, die mit steigender Molmasse sinkt (Lee et al. 2002) und somit die erhöhte Stabilität der Vesikel erklärt. So zeigen Poren, die durch Elektroporation erzeugt wurden, aufgrund der verlangsamten Dynamik in den dicken Polymermembranen, eine längere Lebenszeit (Bermudez et al. 2003). Zusammenfassend ist zu erkennen, dass, je höher die Molmasse ist, die Stabilität steigt und die Membranfluidität als auch die Permeabilität der Polymersomen sinken (Discher & Eisenberg 2002).

Die Löslichkeit der amphiphilen Polymere ist zudem sehr gering, weshalb die Polymere schon bei sehr niedrigen Konzentrationen zur Assoziation neigen. Da die

so genannte kritische Aggregations-Konzentration (*critical aggregation concentration*, CAC) für Polymere sehr niedrig ist, bleiben die Vesikel also auch bei starker Verdünnung, wie es z.B. nach i.v. Applikation auftritt, intakt. Die CAC lässt sich aufgrund der Polydispersität der Polymere nur schwer bestimmen (Mecke et al. 2006). In der Literatur gibt es Angaben zur CAC von Blockcopolymeren, die nach Tensiometerbestimmungen im Bereich von  $10^{-5}$  M (Nardin et al. 2000, Kickelbick et al. 2003) und bei Bestimmung nach der Pyren-Methode im Bereich zwischen  $10^{-6}$  M (Checot et al. 2005) und  $10^{-7}$  M (Napoli et al. 2004a) liegt. Interessant ist dabei, dass Polymere mit hoher Molmasse auch metastabile Aggregate ausbilden, die sehr stabil sind (Ahmed et al. 2006a).

Die Polydispersität der Polymere im Vergleich zu Liposomen kann als Vorteil angesehen werden, da dadurch z.B. der Einbau von Proteinen in die Membran möglich ist, weil die kürzeren Polymere sich vornehmlich an Stellen in der Membran aufhalten, die sehr dünn sind (Pata & Dan 2003).

Eine zusätzliche Erhöhung der Vesikelstabilität kann durch nachträgliche Quervernetzung der Polymermembran erreicht werden, die aus einem *fluid-like* in einen *solid-like* Zustand übergeht (Discher et al. 2002), wobei integrierte Kanalproteine in ihrer Aktivität unverändert bleiben (Meier et al. 2000). Die Quervernetzung kann durch verschiedene Mechanismen sowohl innerhalb des hydrophoben Membranteils (Discher et al. 2002, Checot et al. 2003, Du & Armes 2005, Thibault et al. 2006), als auch innerhalb des hydrophilen Membranabschnittes (Nardin et al. 2000) oder durch ein interpenetrierendes Polymernetzwerk (IPN) (Li et al. 2007) erfolgen.

## **1.5 Ansätze für die Anwendung von Polymersomen**

Polymersomen können aufgrund ihrer Stabilität und ihrer über die Chemie steuerbaren Eigenschaften vielfältig angewendet werden. Im Folgenden soll auf den aktuellen Forschungsstand auf dem Gebiet der „Polymersomen“ näher eingegangen werden. Es werden die bisherigen Ansätze hin zu einem Drug Delivery System beleuchtet und die mögliche therapeutische Anwendung der Vesikel in der Krebs- und Gentherapie, als auch ihre nicht-therapeutische Verwendung in der Biotechnologie und Diagnostik betrachtet.

### 1.5.1 Drug Delivery System

Zu den Voraussetzungen für ein Drug Delivery System gehören zum einen die gezielte Anreicherung der wirkstoffhaltigen Vesikel im Zielgewebe durch passives und aktives Targeting (*drug targeting*) und zum anderen die gesteuerte Freisetzung des Wirkstoffes aus dem Vesikel in das Zielgewebe (*controlled release*).

#### 1.5.1.1 Passives Targeting

Das Passive Targeting nutzt den sogenannten EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention effect*), der auf den anatomischen Besonderheiten vieler solider Tumore beruht (Park 2002). Die Endothelschicht von Tumoren besitzt viele „Löcher“, durch welche die Vesikel aus dem Blutkreislauf ins Tumorgewebe gelangen können. Da Tumore zudem meist nicht an das Lymphsystem angeschlossen sind, werden die Arzneistoffträger nur langsam eliminiert und eine Anreicherung im Tumor kann erfolgen. Einen entscheidenden Faktor für das Passive Targeting stellt somit die Vesikelgröße dar, damit die Vesikel die Endothelschicht über deren Lücken passieren können. Polymersomen – wie Liposomen auch – könnten hierfür aufgrund ihrer geringen Größe vorteilhafte Arzneistoffträger darstellen.

#### 1.5.1.2 Aktives Targeting

Das aktive oder auch spezifische Targeting hat – wie das passive Targeting – das Ziel, die Vesikel im Zielgewebe anzureichern. Im Gegensatz zum passiven Targeting werden die Vesikel allerdings an der Oberfläche mit für das Zielgewebe spezifischen Molekülen (Liganden) funktionalisiert (*homing device*). Die Liganden werden dabei über die endfunktionalisierten, hydrophilen Polymerblöcke auf der Vesikeloberfläche gebunden. Die Ligandenbindung kann auf zwei Wege erfolgen: über eine nicht-kovalente (adsorptive) oder eine kovalente Bindung.

Die nicht-kovalente Bindung von Liganden erfolgt über die sog. „Sandwich-Methode“, welche z.B. auf der starken Interaktion von Biotin mit Avidin beruht (Rivnay et al. 1987). Bei der Liganden-Kopplung geht man von einem biotinylierten Liganden aus, der über Avidin (oder Streptavidin) als Linker an das ebenfalls biotinylierte Polymer bindet. Über diese Methode wurden beispielsweise Vesikel aus PMOXA-PDMS-PMOXA mit dem Oligonukleotid Polyguanylsäure funktionalisiert, das als Target für

den Makrophagen-Rezeptor SRA1 dient (Broz et al. 2005). Biotinylierte Diblock-copolymere wie PLA-PEO (Salem et al. 2001) und PB-PEO (Dalhaimer et al. 2004, Lin et al. 2004) können durch Funktionalisierung mit dem Antikörper ICAM-1 die adhäsiven Eigenschaften von Leukozyten nachahmen und sind ein erster Schritt in Richtung „Leuko-Polymersomen“ (Lin et al. 2006).

Die kovalente Kopplung von nicht-modifizierten (nativen) Liganden kann direkt an der Vesikeloberfläche erfolgen. Dabei wird die terminale Hydroxylgruppe der PEO-Kette mit einer aminoaktiven Abgangsgruppe versehen. Als Abgangsgruppe kann eine Carboxylatgruppe dienen, welche mit einem Amin des Liganden zu einer Amid-Struktur reagiert (Ishida et al. 2001). Über diese Carbodiimid-Methode können bspw. monoklonale Antikörper wie  $\alpha$ -HSA oder  $\alpha$ -IgG an Vesikel aus PLA-PEO gekoppelt werden (Meng et al. 2005). Die Bindung des aminhaltigen Liganden kann außerdem über eine Urethan(Carbamat)-bindung erfolgen, wenn Succinimidylcarbonat als Abgangsgruppe verwendet wird (Miron & Wilchek 1993). So wurden Vesikel aus PB-PEO mittels dieser Kopplungsmethode mit dem hochkationischen, fluoreszenzmarkierten Peptid TAT funktionalisiert, welches die Aufnahme der Vesikel in Dendritische Zellen (DCs) fördern soll. Diese könnten anschließend zur *in vivo* Detektion genutzt werden mit dem Ziel einer zukünftigen DC-basierten Zelltherapie (Christian et al. 2007).

Oberflächenmodifizierte Polymersomen wurden bisher noch nicht *in vivo* getestet. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass bei einer *in vivo* - Anwendung die Funktionalisierung einige Probleme mit sich bringt, da die Kopplung mit Antikörpern die Zirkulationszeit verkürzen kann oder das Einbringen körperfremder Proteine (z.B. Avidin) zu einer Sensibilisierung führt (New 1990).

#### **1.5.1.3 Controlled Release**

Neben der Anreicherung des Vesikels im Zielgewebe mit Hilfe des passiven bzw. aktiven Targetings ist es für eine erfolgreiche Therapie wichtig, dass der Arzneistoff am Wirkungsort wieder aus dem Vesikel freigesetzt wird. Zur kontrollierten Freigabe des Pharmakons aus Polymersomen gibt es verschiedene Ansätze, die auf der Variation der Polymerchemie beruhen. Die Freisetzung kann dann durch Veränderungen im umgebenden Milieu wie Änderung des pH-Wertes oder der

Temperatur induziert werden. Auf die verschiedenen Strategien wird im Folgenden eingegangen.

Bei **bioabbaubaren** Polymeren kommt es zu einer Zersetzung des hydrophoben Polymerblockes, die aufgrund der damit verbundenen Änderung des Packungsparameters zur Porenbildung oder Auflösung des Vesikels führt. Eine große Rolle spielen dabei Polyester wie PLA, PCL (Meng et al. 2003, Ahmed & Discher 2004, Wittemann et al. 2007) oder oligo(DTO-suberat) (Nardin et al. 2004), da ihr Abbau pH-abhängig und im Sauern am Größten ist. Zu bioabbaubaren Polymeren zählen zudem PHEA-g-LA (Lee et al. 2006), als auch Polyanhydride aus Sebacin-und Fumarsäure (Najafi & Sarbolouki 2003).

Eine weitere Möglichkeit, den HLB-Wert des Polymers zu ändern und damit eine Vesikeldestabilisierung hervorzurufen, kann bei PEO-PPS-PEO durch **Oxidation** des Sulfides zu hydrophilerem Sulfoxid und Sulfon erfolgen (Napoli et al. 2004a). So wird bspw. nach Verkapselung des Enzyms Glukoseoxidase (Gerber et al. 2001) bei äußerer Zugabe von Glukose in Anwesenheit von Sauerstoff das oxidierende Wasserstoffperoxid gebildet, das schließlich zur Vesikelzerstörung führt (Napoli et al. 2004b).

Die Wirkstofffreisetzung von frei verkapseltem Wirkstoff, v.a. aus endozytierten Vesikeln, kann außerdem durch den Einsatz **pH-sensitiver** Polymere erreicht werden. Zu Polymeren, die eine erhöhte Wasserlöslichkeit infolge einer Ladungsänderung durch Protonierung zeigen, gehören P2VP-PEO (Borchert 2006), P(DEA-stat-TMSPMA)-PEO (Du & Armes 2005) oder PDPA-PMPC (Du et al. 2005). Ein an das Polymer gebundener Wirkstoff kann ebenfalls durch eine pH-Änderung freigesetzt werden. So permeiert frei verkapseltes Indometacin nur bei neutralem pH durch die Vesikelmembran nach außen, während kovalent an Polymer gebundenes Indometacin im Sauern durch Esterhydrolyse des Polymers Indometacin-(PG2MA-b-PE=) freigesetzt wird (Giacomelli et al. 2007).

Einen anderen Ansatz für pH-Sensitivität bieten Polypeptid-basierte Vesikel, die auch als **Peptosomen** bezeichnet werden. Der Begriff „Peptosom“ wurde 1999 von Kimura et al. im Zusammenhang mit dem PEGylierten Peptid-Antibiotikum Gramacidin A eingeführt. Peptosomen bestehen entweder aus einem Polymer-Peptid (Brown et al. 2000, Kukula et al. 2002) oder einem Diblock-Copolypeptid (Bellomo et

al. 2004, Rotriguez-Hernandez et al. 2005) und enthalten meist „pH-sensitive“ Aminosäuren wie Glutaminsäure oder Lysin. Einen wichtigen Faktor stellt hierbei die Sekundärstruktur der Peptide dar, die als  $\alpha$ -Helix vorliegt. Änderungen des pH-Wertes oder der Ionenstärke können eine Konformationsänderung dieser geordneten Helix zu einer irregulären Random-Coil-Struktur auslösen, die wiederum Einfluss auf die Vesikeleigenschaften (z.B. Membranpermeabilität) nimmt.

Weiterhin kann die **Temperatur** eine Wirkstofffreisetzung auslösen. So führt die Temperaturerhöhung PEG-haltiger Polymersomen oberhalb der LCST (*low critical solution temperature*) zu einer Dehydratation von PEG und dadurch zu einem reversiblen Fusionieren und Kollabieren der Vesikel (Zhou et al. 2007). Ebenso kann umgekehrt durch Verringerung der Temperatur, wie z.B. bei lokaler Eiskühlung, eine Zerstörung von Vesikeln aus PNIPAM-PEO (Qin et al. 2006) oder PEO-PPO-PEO (Li et al. 2007) erzielt werden.

Mit dem Einsatz so genannter **thermotrop-flüssigkristalliner** Polymere wie PA444-PEO (Yang et al. 2006) erhofft man sich die gezielte Steuerung der Freisetzung durch verschiedene Stimuli wie Licht, Temperatur, Anlegen eines Magnetfeldes oder Elektrischer Felder, die Einfluss auf den mesomorphen Zustand des Polymers (nematisch, smektisch) ausüben.

Als letzte Möglichkeit, um einen kontrollierten Einfluss auf die Wirkstofffreisetzung zu nehmen, kann die **Mischung** verschiedener Polymere angesehen werden, die mehrere Eigenschaften vereint. Mit unterschiedlichen Polymeren wurde bereits bewiesen, dass eine Mischung von Blockcopolymeren möglich ist, ohne dass es zur Domänenbildung innerhalb der Membran kommt. Durch Mischung von PB-PEO mit PEE-PEO kann bspw. der Grad der Quervernetzung des PB-PEO kontrolliert werden (Discher et al. 2002). Auch die Mischung zweier PB-PEOs mit unterschiedlicher Molmasse (Lin et al. 2004) ist möglich. Über die Menge an PLA-PEO oder PCL-PEO in einer Mischung mit PB-PEO lässt sich zudem die Freisetzungsgeschwindigkeit steuern (Ahmed et al. 2003 & 2004). Weiterhin ist auch eine Mischung von Blockcopolymeren mit Phospholipiden möglich, die Vesikel mit einer hohen Verkapselungseffizienz („Liposom“) und einer gleichzeitig hohen Stabilität („Polymersom“) liefern (Ruysschart et al. 2005).

### 1.5.2 Verkapselung von Zytostatika

Die Chemotherapie stellt ein entscheidendes Therapieelement in der Behandlung vieler Krebserkrankungen dar. Bei systemischer Gabe von Zytostatika treten neben dem gewünschten pharmakologischen Effekt häufig ungewünschte Nebenwirkungen auf. Durch die Verteilung des relativ unspezifischen Wirkstoffes im gesamten Körper, werden auch gesunde Zellen geschädigt, die nicht Ziel der Therapie sind. Für den Therapieerfolg ist deshalb die Verkapselung des Wirkstoffes in ein Drug Delivery System, das die Wirksamkeit erhöht und die Toxizität senkt, unabdingbar. Ein bekanntes Beispiel dafür ist in PEGylierte Liposomen verkapseltes Doxorubicin (Caelyx®). Der verkapselte Wirkstoff wird zudem vor vorzeitigem Abbau geschützt und erst dann metabolisiert, wenn dieser aus dem Vesikel herausdiffundiert ist (Allen 1997) oder die Vesikel von den Zellen des MPS aufgenommen worden sind (Senior 1987). Weiterhin erfolgt durch passives Targeting die Anreicherung der Vesikel im Gewebe und damit die Anreicherung des Zytostatikums im Tumorgewebe.

Zu besonders wichtigen antineoplastischen Substanzen gehören Doxorubicin und Paclitaxel. Doxorubicin (DXR) ist ein wasserlösliches Zytostatikum vom Anthrazyklin-Typ, das über verschiedene Mechanismen zytotoxisch und mutagen wirkt (Bouma et al. 1986). Die Wirkung beruht dabei zum einen auf der Interkalation von DXR mit DNA (Patel et al. 1981) sowie der Hemmung des Enzyms DNA-Topoisomerase-II (Chen et al. 1984). Zum anderen wird die Bildung freier Radikale, wie reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS, reactive oxygen species), die während des DXR-Metabolismus entstehen, als Wirkmechanismus diskutiert (Bachur et al. 1978). Als dosislimitierende Nebenwirkung von DXR gilt die Kardiotoxizität.

Das aus der Eibe stammende Paclitaxel (TAX) ist ein Mitosehemmstoff, der den Zellzyklus in der G<sub>2</sub>- bzw. M-Phase hemmt, da er den Abbau des Spindelapparates unterbindet (Leistner 2005). Aufgrund seiner Wasserunlöslichkeit wird Paclitaxel häufig zusammen mit dem Lösungsvermittler Cremophor® EL (nichtionisches Tensid) angewendet, das jedoch eine allergische Reaktion auslösen kann. Der Einbau von Paclitaxel in Liposomenmembranen führt dagegen neben der „Lösungsvermittlung“ zu einer Reduzierung der Neurotoxizität (Lipp & Bokenmeyer 2005).

Der Einbau von TAX in die Polymermembran (Li et al. 2007b), als auch die Verkapselung von DXR in verschiedenste Polymersomen, wurde schon beschrieben

(Brown et al. 2000, Du et al. 2005, Quin 2006). Der im Vergleich zu Liposomen deutlich dickere Polymerbilayer ermöglicht es höhere Mengen an TAX einzuschließen. Für die einzeln in Polymersomen verkapselten Zytostatika gibt es jedoch bisher noch keine Angaben zum *in vivo* Verhalten, weshalb kein Vergleich mit Liposomen möglich ist. Einzig die Kombination, d.h. die gleichzeitige Verkapselung von TAX und DXR in PLA-PEO-Vesikel, wurde in ersten *in vivo* Versuchen an Nacktmäusen untersucht (Ahmed et al. 2006b). Es konnte dabei gezeigt werden, dass es nach Einzelinjektion innerhalb weniger Tage zu einer deutlichen Tumorverkleinerung kam.

Zur Erhöhung der Verkapselungseffizienz von DXR in Polymersomen wurde oft das für Liposomen übliche Remote Loading Verfahren für Vesikel aus PLA-PEO (Ahmed et al. 2005), PS-PAA (Choucair et al. 2005) oder PCL-PEO (Ghoroghchian et al. 2006) angewendet. Der Vorteil des Remote Loading Prozesses besteht darin, dass der hochpotente Wirkstoff zum einen erst nach der Vesikelherstellung zur Vesikeldispersion zugegeben wird und zum anderen sehr hohe Einschlusseffizienzen von bis zu 100% erreicht werden können. Die Voraussetzung ist, dass DXR als freie Base (unprotoniert) durch die Vesikelmembran diffundieren kann und anschließend durch Veränderung im Vesikel verbleibt. Die Rückhaltung von DXR im Vesikel kann auf verschiedenen Wegen über Gradienten erfolgen wie durch Protonierung (Maurer-Spureij et al. 1999), Bildung nicht Membran-gängiger Komplexe (Abraham et al. 2002) oder durch Ausfällung (Haran et al. 1993, Bolotin et al. 1994, Fritze et al. 2006).

### **1.5.3 Genterapie**

Ziel der Genterapie ist es, bestimmte genetische Informationen in die Zelle einzuschleusen und dort zur Expression zu bringen, um gezielt genetisch bedingte Krankheiten behandeln zu können. Diblockcopolymere stellen hierfür geeignete Kandidaten für nichtvirale (chemische) Vektoren dar, falls ein Polymerblock ein lineares kationisches Polyelektrolyt wie z.B. Polyethylenimin (PEI, Lipprandt 2004) oder ein Polyamidoamin (PAA, Hartmann 2007) ist. Diese kationischen Polymere sind in der Lage mit dem Polyanion DNA zu einem dicht gepackten Komplex zu kondensieren, der die DNA vor enzymatischem Abbau in der Zelle schützt. Zur sterischen Abschirmung der Oberflächenladung und zur Erhöhung der

Biokompatibilität dieser Polyplexe wird als zweiter Polymerblock bevorzugt PEO verwendet, der das Polymer zugleich noch wasserlöslicher macht.

#### 1.5.4 Biotechnologie

Die Verkapselung von empfindlichen biologischen Makromolekülen (z.B. Enzyme) spielt in der Biotechnologie eine wichtige Rolle. In unfunktionalisierte Polymersomen wurden bisher verschiedenste Enzyme bzw. Proteine eingeschlossen: Acetylcholinesterase (Ruysschaert et al. 2005), Glukoseoxidase (Napoli et al. 2004), Hämoglobin (Lee et al. 2001, Arifin & Palmer 2005), Myoglobin (Lee et al. 2001) sowie bovines Serumalbumin (Lee et al. 2001, Wittemann et al. 2007).

Für biotechnologische Anwendungen ist der Einbau integraler Membranproteine in Vesikel interessant, da diese Proteine aktive Komponenten der natürlichen Zellmembran sind und die Zellkommunikation regulieren. Infolge dessen wurden Kanalproteine wie OmpF (Nardin et al. 2001), FhuA (Nallani et al. 2005), Txs (Ranquin et al. 2005) oder LamB (Graff et al. 2002) in Membranen von Polymervesikeln (v.a. PMOXA-PDMS-PMOXA) inkorporiert. Solche funktionalisierten Nanocontainer, die die Selektivität der „natürlichen“ Tore und die Stabilität der Polymere vereinen, werden auch als **Synthosomen** bezeichnet (Onaca et al. 2006). Der erfolgreiche Einbau solcher Proteine in die viel dickeren Polymermembranen, wird mit der Polydispersität und Kettenflexibilität/-komprimierung der Polymere erklärt und konnte sowohl experimentell (Meier et al. 2000) als auch theoretisch durch *Mean-field* Analyse (Pata & Dan 2003) sowie *Coarse Grained Molecular Dynamics* Simulation (Srinivas et al. 2005) bestätigt werden. In Membranen aus AB oder ABA-Blockcopolymeren können sich die Proteine in beide Richtungen orientieren, während die Verwendung von ABC-Blockcopolymer-Membranen die gezielte Orientierung der Proteine in nur eine Richtung ermöglicht (Stonescu et al. 2004).

Synthosomen werden als Bioreaktoren bzw. zum Produktrückhalt verwendet. Bei der Biokatalyse können Enzyme wie  $\beta$ -Lactamase (Nardin et al. 2001), Nucleosid-Hydrolase (Ranquin et al. 2005) oder Meerrettich-Peroxidase (Nallani et al. 2005) verkapselt werden, die ein Substrat, das durch das entsprechende Kanalprotein in das Vesikel gelangt, umsetzen. Wird in die Vesikel ein geladenes Molekül eingeschlossen, können gegensätzlich geladene Moleküle nach Einstrom in das Vesikel „gefangen“ und zurückgehalten werden. Eine biomimetische Mineralisierung

erhält man bspw., wenn Calcium über ein Ionophor in ein mit Phosphationen beladenes Vesikel gelangt und ausfällt (Sauer et al. 2001). Einströmende Plasmid-DNA (negativ) kann über einen Polyelektrolytkomplex mit verkapseltem Poly(lysin) (positiv) im Vesikel zurückgehalten werden (Onaca et al. 2006). DNA kann zudem auch über den Phagen  $\lambda$ , der an das Kanalprotein LamB als Rezeptor andockt, in Polymersomen injiziert werden (Graff et al. 2002).

Eine weitere Unterklasse funktionalisierter Polymersomen stellen neben Synthosomen so genannte **Proteo-Polymersomen** dar, bei denen ebenfalls Proteine in die Membran eingebaut werden. Handelt es sich bei diesen Proteinen bspw. um Bacteriorhodopsin (lichtgesteuerte Protonenpumpe) und ATP-Synthase, kann das Vesikel bei Lichteinfall aus ADP ATP synthetisieren (Choi & Montemagno 2005).

Als letztes Beispiel für die Anwendung von Polymersomen in der Biotechnologie können **Nanoröhren** genannt werden, die auch für die Mikrofluidtechnik interessant sind. Dabei werden aus durch Elektroformation erzeugten Riesenvesikeln (PB-PEO) mittels einer Mikropipette oder einer optischen Pinzette Nanoröhren herausgezogen. Diese können bis zu 1 cm lang sein und mit anderen Vesikeln verbunden werden. Die Stabilisierung erfolgt durch anschließende Quervernetzung (Reiner et al. 2006).

### 1.5.5 Diagnostik

Zu diagnostischen Zwecken könnten sich in Zukunft Polymersomen eignen, deren Membran durch  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  mineralisiert ist und dadurch magnetische Eigenschaften besitzt (Lecommandoux et al. 2005). Auch fluoreszenzmarkierte Vesikel gelten als Kandidaten für den diagnostischen Einsatz. Als Alternative zu toxischen Quantum-Dots können porphyrinhaltige NIR-Fluorophore (Ghoroghchian et al. 2007) verwendet werden, die in der Polymermembran (bis zu 10%) eingelagert sind (Ghoroghchian et al. 2006).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren haben sich Polymervesikel (Polymersomen) als mögliche Alternative zu Liposomen herausgestellt. Sie verfügen vom theoretischen Gesichtspunkt her über einige Vorteile wie erhöhte physikalische, chemische und biologische Stabilität sowie eine geringere Membranpermeabilität. Bisher sind Polymersomen als Arzneistoffträger jedoch wenig untersucht. Zudem gibt es eine Vielzahl von Polymeren, die als Membranbausteine in Frage kommen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, speziell die Blockcopolymere P2VP-PEO und PI-PEO hinsichtlich ihrer vesikelbildenden Eigenschaften und ihres Potentials als Arzneistoffträger näher zu untersuchen.

Dazu werden verschiedene Herstellungstechnologien für Vesikel ausgewählt und die resultierenden Präparationen bezüglich wesentlicher Parameter, wie Größe, Aussehen, Lamellarität und Homogenität der Polymerdispersion, charakterisiert. Daraus lässt sich abschließend eine Bewertung der Eignung der verwendeten Herstellungsverfahren ableiten.

Darauf aufbauend wird unter Einsatz des bestgeeigneten Herstellungsverfahrens die Verkapselung von sowohl fluorimetrischen Modellschubstanzen als auch des Zytostatikums Doxorubicin hinsichtlich Effizienz und Stabilität untersucht.

Weiterhin wird das Verhalten ausgewählter Präparationen während der Lagerung bei festgelegten Temperaturen, bei Zusatz von Detergenzien und bei Änderung des pH-Wertes beobachtet. Dies liefert Informationen über die Stabilität der Vesikel im Verlauf der Lagerung als auch bei Veränderung des umgebenden Mediums.

## 2 Materialien und Geräte

### 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verschiedenen vesikelbildenden Blockcopolymere P2VP-PEO und PI-PEO wurden von Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. S. Förster an der Universität Hamburg synthetisiert und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Die genauen Polymereigenschaften sind im Ergebnisteil der Tabelle 4-1 zu entnehmen.

**Tabelle 2-1: Verbrauchskemikalien**

| Substanz                                     | Qualität | Mr [g/mol] | Abkürzung/<br>Summenformel                          | Bezugsquelle                      |
|----------------------------------------------|----------|------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Ammoniak                                     | ≥ 25 %   | 17,03      | NH <sub>3</sub>                                     | Carl Roth, Karlsruhe              |
| Diammoniumhydrogenphosphat                   | 99 %     | 133,06     | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>    | Fluka, Biochemika, Buchs, Schweiz |
| Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat           | ≥ 99 %   | 162,0      | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | Merck, Darmstadt                  |
| Ethylendiamintetraessig-säure; Dinatriumsalz | > 99 %   | 372,24     | EDTA                                                | Merck, Darmstadt                  |
| 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure          | ≥ 99 %   | 238,31     | HEPES                                               | Carl Roth, Karlsruhe              |
| Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat           | ≥ 99 %   | 140,0      | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | Carl Roth, Karlsruhe              |
| Natriumchlorid                               | > 99 %   | 58,44      | NaCl                                                | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim   |
| Natriumhydroxid                              | > 99 %   | 40,01      | NaOH                                                | Merck, Darmstadt                  |
| 3-(n-Morpholino-propan)-sulfonsäure          | > 99 %   | 209,0      | MOPS                                                | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim   |
| Phosphorsäure                                | 85%      | 98,0       | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>                      | Riedel-de Haen, Seelze            |
| Schwefelsäure                                | ≥ 95 %   | 98,08      | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                      | Carl Roth, Karlsruhe              |
| Salzsäure 37%                                | p.a.     | 36,46      | HCl                                                 | Carl Roth, Karlsruhe              |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan             | ≥ 99 %   | 121,14     | Tris                                                | Carl Roth, Karlsruhe              |

Tabelle 2-2: Einzuschließende Substanzen

| Substanz                                | Qualität         | Mr [g/mol] | Abkürzung/<br>Summenformel | Bezugsquelle                                                            |
|-----------------------------------------|------------------|------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Calcein                                 | p.a.             | 622,55     | $C_{30}H_{26}N_2O_{13}$    | Sigma, St. Louis, USA                                                   |
| Doxorubicin                             | Ph.Eur.,<br>99 % | 543,54     | DXR                        | Council of Europe.<br>Pharmacopoeia BP<br>907, Straßburg,<br>Frankreich |
| Fluorescein-<br>isothiocyanat-Dextran   | p.a.             | 4.000      | FITC-Dextran<br>4 kDa      | Fluka, Biochemika,<br>Buchs, Schweiz                                    |
|                                         |                  | 40.000     | 40 kDa                     | Sigma-Aldrich,<br>Steinheim                                             |
|                                         |                  | 148.000    | 150 kDa                    | Fluka, Biochemika,<br>Buchs, Schweiz                                    |
| 8-Hydroxypyren-1,3,6-<br>trisulfonsäure | p.a.             | 524,4      | HPTS; Pyranin              | Molecular Probes<br>Eugene (Oregon USA)                                 |
| p-Xylene-bis-<br>pyrrolidiniumbromid    | p.a.             | 422,2      | DPX                        | Molecular Probes<br>Eugene (Oregon USA)                                 |

Tabelle 2-3: Puffer (Zusammensetzung)

| Bezeichnung                           | Abkürzung | Bestandteile                                                                                            | Zusammensetzung                                   |
|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 10 mM HEPES Puffer,<br>isotonisiert   | HBS       | 10 mM HEPES<br>150 mM NaCl<br>NaOH (1 N)<br>M-Wasser                                                    | 2,4 g<br>8,77 g<br>ad pH 7,4<br>ad 1 l            |
| 10 mM Phosphatpuffer,<br>isotonisiert | PBS       | 5 mM $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$<br>5 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$<br>142,5 mM NaCl<br>NaOH (1 N)<br>M-Wasser | 0,78 g<br>0,89 g<br>8,33 g<br>ad pH 7,4<br>ad 1 l |

**Tabelle 2-4: Detergenzien**

| Substanz                                               | Qualität | Mr<br>[g/mol] | Abkürzung/<br>Summenformel      | Bezugsquelle                                       |
|--------------------------------------------------------|----------|---------------|---------------------------------|----------------------------------------------------|
| 4-(1,1,2,2 Tetra-methylbutyl)-phenyl-polyethylenglykol | reinst   | 576,6         | Triton X-100                    | Fluka, Biochemika, Buchs, Schweiz                  |
| Natriumdodecylsulfat                                   | ≥ 95 %   | 288,4         | SDS                             | Fluka, Biochemika, Buchs, Schweiz                  |
| Natriumcholat                                          | p.a.     | 430,6         | NaCh                            | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim                    |
| n-Octyl-β-D-glucopyranosid                             | > 99 %   | 292,4         | OG                              | Fluka, Biochemika, Buchs, Schweiz                  |
| Tetraethylenglykol-monooctylether                      |          | 306,5         | C <sub>8</sub> E <sub>4</sub>   | Synthese<br>Dr. J.-K. Kim,<br>Universität Freiburg |
| Decaethylenglykol-monododecylether                     |          | 627,0         | C <sub>12</sub> E <sub>10</sub> |                                                    |
| Decaethylenglykol-monohehexadecylether                 |          | 378,0         | C <sub>16</sub> E <sub>10</sub> |                                                    |
| n-Dodecyl-β-maltosid                                   | > 99 %   | 510,6         | DDM                             | Fluka, Biochemika, Buchs, Schweiz                  |

**Tabelle 2-5: Lösungsmittel**

| Bezeichnung                 | Qualität    | Abkürzung/<br>Summenformel      | Bezugsquelle                          |
|-----------------------------|-------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| Dichlormethan               | HPLC        | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Tetrahydrofuran             | HPLC        | THF                             | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Ethanol                     | HPLC        | EtOH                            | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Methanol                    | HPLC        | MeOH                            | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Tertiärer Butylmethyl-ether | HPLC        | TBME                            | Fluka, Biochemika, Buchs, Schweiz     |
| Wasser (M-Wasser)           | Elix-System | H <sub>2</sub> O                | Millipore Simplicity 185 Milli Anlage |

**Tabelle 2-6: Verbrauchsmaterialien**

| Bezeichnung                                                     | Bezugsquelle                          |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Diachema Dialysemembranen,<br>high permeability, 5 kDa MWCO     | Dianorm (München)                     |
| Einmalpipetten (3 ml)                                           | Greiner-Bio One GmbH, Frickenhausen   |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)                                  | Eppendorf-Netherler-Hinz, Hamburg     |
| Rotilabo® Probenfläschchen 4ml<br>(Braunglas)                   | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Einmalküvetten Plastibrand®, PMMA,<br>Halbmikro (1,5 - 3 ml)    | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Einmalspritzen (1 - 20 ml)                                      | Braun (Melsungen)                     |
| Einmal-Injektions-Kanülen (Sterican)                            | Braun (Melsungen)                     |
| Fraktionsröhrchen (3,5 ml)                                      | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Falcon® Röhrchen aus PP (15 ml, 50 ml)                          | Greiner-Bio One GmbH, Frickenhausen   |
| HPLC-Vials (1,5 ml, klar)                                       | VWR, Darmstadt                        |
| Membranfilter, Celluloseacetat 0,22 µm<br>(Minisart)            | Sartorius, Göttingen                  |
| Cellulosenitrat 5 µm (FP 30/5.0 CN)                             | Schleicher & Schuell                  |
| Pipettenspitzen                                                 | Eppendorf (Hamburg)                   |
| Polycarbonatmembranen<br>(80, 100, 200, 400, 600 nm Porenweite) | Whatman Nuclepore (Pfullingen)        |
| Sephadex® G-50 fine (Gelmaterial)                               | Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) |
| Sepharose® CL-4B (Gelmaterial)                                  | Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) |

## 2.2 Geräte

**Tabelle 2-7: Geräte**

| Gerät                             | Typ                                                    | Hersteller, Ort                                                             |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Fluoreszenz-Spektrometer          | LS 50B                                                 | Perkin-Elmer, Überlingen                                                    |
| Software Fluorimeter              | FL WinLab Version 4.00.02                              | Perkin Elmer, Boston, USA                                                   |
| Quarzküvette                      | 101 OS Suprasil                                        | Hellma, Müllheim                                                            |
| Gefriertrockner                   | Alpha 2-4 Christ                                       | Martin Christ GmbH, Osterode                                                |
| Gelchromatographiesäulen          | 0,5 × 10 cm<br>0,7 × 15 cm<br>1,5 × 20 cm              | Bio-Rad Laboratories GmbH, München                                          |
| Handextruder                      | LiposoFast®                                            | Avestin, Ottawa, Kanada                                                     |
| Hochdruckhomogenisator            | Micron Lab 40                                          | APV Gaulin GmbH, Lübeck                                                     |
| Hochvakuumanlage                  | RD4                                                    | Vaccubrand GmbH, Wertheim                                                   |
| Magnetrührer                      | Variomag Poly 15                                       | H+P, Oberschleißheim                                                        |
| pH-Meter                          | Delta 320                                              | Mettler-Toledo, Steinbach                                                   |
| Photonenkorrelations-spektrometer | Zetamaster S<br>Zetasizer Nano<br>ALV-Lichtstreuanlage | Malvern Instruments, England<br>Malvern Instruments, England<br>ALV, Langen |
| Pipetten                          | verschiedene Volumina<br>Research Serie                | Eppendorf AG, Hamburg                                                       |
| Rotationsverdampfer               | Rotavapor R                                            | Büchi, Göppingen, Schweiz                                                   |
| Thermostat                        | Fischerbrand® FBC 720                                  | Fisher Scientific GmbH, Schwerte                                            |
| Tischzentrifuge                   | Biofuge pico                                           | Heraeus, Osterode                                                           |

| Gerät                             | Typ                                              | Hersteller, Ort                     |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Transmissionselektronen-mikroskop | Leo 912 $\Omega$ -mega                           | Leo, Oberkochen                     |
| Kamera TEM                        | Proscan HSC 2 (Slow Scan CCD)                    | Oxford Instrum., Abingdon, USA      |
| Software                          | TEM iTEM 5.0 (Build 1054)                        | Soft Imaging System, Münster        |
| Cryo-Probenhalter                 | Model 626-DH                                     | Gatan, Warrendale, USA              |
| Cryo-Kammer                       | Cryo-Box 340719                                  | Carl-Zeiss GmbH, Oberkochen         |
| Grids (Kupfer mit Kohlefilm)      | Quantifoil® S7/2 Cu 400 mesh, holey carbon films | Quantifoil Micro Tools, Jena        |
| Hochvakuumpumpe                   | TMH 071 P                                        | Pfeiffer Vakuum GmbH, Aßlar         |
| Trockenschrank                    | UM-500                                           | Memmert, Schwabach                  |
| Ultraschallbad                    | Sonorex Super RK 255 H                           | Bandelin, Berlin                    |
| Ultraschallspitze                 | Sonoplus (BR 30)<br>Sonoplus (MS 72)             |                                     |
| Waagen                            | AT 261 Delta Range<br>PK 200                     | Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz |
| Wasserfiltersystem                | Simplicity 185                                   | Millipore, Eschborn                 |
| Wasserbäder                       | Julabeo F 12                                     | Julabo Seelbach                     |
|                                   | Memmert                                          | Memmert, Schwabach                  |
|                                   | Haake K20 u. DC5                                 | Haake Messtechnik, Karlsruhe        |
|                                   | Haake N2                                         | Thermo Haake, Hannover              |
|                                   | GFL Typ 1002                                     | GFL, Burgwedel                      |

## **3 Methoden**

### **3.1 Methoden zur Präparation von Polymervesikeln**

Zur Präparation von Polymervesikeln muss das Polymer zunächst im wässrigen Medium quellen, bevor durch das Ablösen einzelner gequollener Schichten die spontane Ausbildung von Vesikeln unterschiedlicher Größe und Lamellarität (MLV) stattfindet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden MLVs hauptsächlich über die Filmmethode (siehe 3.1.1.1) hergestellt und anschließend durch eine der nachfolgend beschriebenen mechanischen Methoden wie Extrusion, Hochdruckhomogenisation oder Ultraschall (siehe Tabelle 1-3) hinsichtlich der Vesikelgröße, Größenverteilung und Reduzierung der Lamellenzahl homogenisiert. Eine alternative nichtmechanische Herstellungsmethode stellt die Detergenzdialyse dar. Falls nicht anders erwähnt, wurde dabei mit einer Polymerkonzentration von 10 mg/ml gearbeitet und als Hydratisierungsmedium 10 mM HEPES-Puffer pH 7,4 (isotonisiert mit 150 mM NaCl, sterilfiltriert) verwendet.

#### **3.1.1 Herstellung von MLVs**

##### **3.1.1.1 *Filmmethode***

Die klassische, von Bangham für Phospholipide beschriebene Filmmethode (Bangham et al. 1965) führte zu keiner vollständigen Quellung der Polymere. Aus diesem Grund wurde mit einer modifizierten Methode in Anlehnung an Photos (Photos et al. 2003) gearbeitet.

Zunächst wurde das Polymer in ein verschließbares Glasgefäß mit flachem Boden (Vial) geeigneter Größe eingewogen. Für Ansätze bis 2 ml fanden 4 ml–Braunglas–Vials Verwendung, während bei größeren Ansätzen der Lichtschutz durch Verpackung mit Alufolie gewährleistet wurde. Anschließend wurde das Polymer in einer geringen Menge THF oder Dichlormethan vollständig gelöst. Durch vorsichtige Begasung mit Stickstoff als Schleppgas wurde das Lösungsmittel bei RT entfernt, bis ein dünner Polymerfilm auf der Glasinnenoberfläche entstand. Zur kompletten Befreiung des Polymerfilms von Lösungsmittelresten wurde für mindestens 2 Stunden bei RT an einer Hochvakuumanlage ( $p < 0,05$  mbar) nachgetrocknet.

Falls der Polymerfilm keine sofortige Verwendung fand, wurde das Vial mit Stickstoff inertbegast, dicht verschlossen und bei -27°C im Gefrierschrank gelagert. Vor der späteren Weiterverarbeitung erfolgte das Temperieren des Films bei RT.

Nach Zugabe der entsprechenden Puffermenge wurde der Ansatz für mindestens einen Tag bei RT (falls nicht anders angegeben) mittels eines Magnetrührers gerührt bis eine milchig-trübe Dispersion ohne sichtbare Polymerklümpchen entstand.

#### **3.1.1.2 Reverse-phase evaporation (REV)**

Diese Methode wurde in modifizierter Form nach Angaben von Szoka und Pidgeon (Szoka & Papahadjopoulos 1978, Pidgeon 1993) durchgeführt.

10 mg Polymer wurden in ein Glasvial eingewogen, in 3 ml eines Lösungsmittelgemisches aus TBME und Dichlormethan (V/V = 3:1) gelöst und mit 1 ml Puffer versetzt. Die Pufferphase enthielt in der Regel auch das zu verkapselnde Material (z.B. Calcein). Nach Stickstoffbegasung und Verschließen des Vials wurde der Ansatz für 5 Minuten in einem mit Eis gekühlten Ultraschallbad beschallt, so dass sich eine stabile trübe Emulsion ausbildete. Der Deckel des Vials wurde durch eine perforierte Alufolie ersetzt und das organische Lösungsmittel unter Stickstoffbegasung und leichtem Rühren mittels Magnetrührer entfernt. Dadurch bildete sich, abhängig von der Temperatur, nach 1-8 Stunden ein zähes Gel, das nach kurzer Zeit kollabierte. Anschließend wurde das restliche Lösungsmittel durch Weiterrühren bis zur völligen Geruchsfreiheit entfernt. Eventuell bei der Präparation verdunstetes Wasser wurde gewichtsmäßig wieder ergänzt.

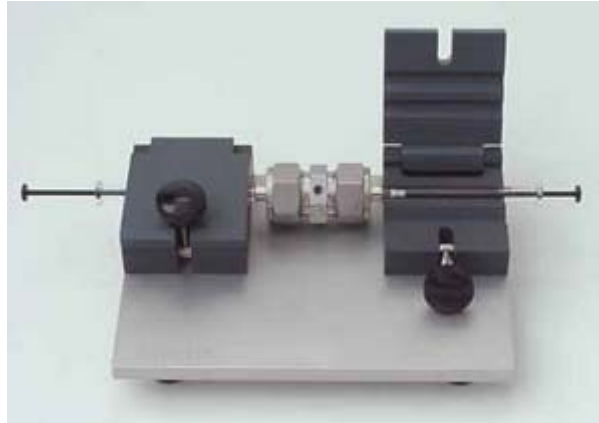
#### **3.1.2 Frier-Tau-Zyklen**

Die meisten in dieser Arbeit verwendeten Präparationen wurden ohne Frier-Tau-Zyklen (FTZ) hergestellt. Die Anwendung von FTZ wird entsprechend im Ergebnisteil erwähnt. Die nach dem Hydratisieren erhaltene Polymerdispersion wurde in einen Rundkolben überführt, welcher in flüssigen Stickstoff getaucht und gedreht wurde, bis die gesamte Dispersion durchgefroren war. Anschließend wurde die Probe in einem Wasserbad (etwa 40°C) aufgetaut. Nach 3 FTZ-Wiederholungen wurde die Probe extrudiert.

### 3.1.3 Homogenisierung

#### 3.1.3.1 Extrusion

Die nach der Film- bzw. REV-Methode erhaltene MLV-Dispersion wurde unter Verwendung eines Handextruders (LiposoFast-Basic<sup>®</sup>, Avestin), wie in Abbildung 3-1 dargestellt, homogenisiert (MacDonald et al. 1991).



**Abbildung 3-1: Handextruder LiposoFast-Basic<sup>®</sup> (www.avestin.com)**

Die Polymerdispersion wurde dabei mit Hilfe von 1 ml-Hamilton<sup>®</sup>-Spritzen je 21-mal durch eine Polycarbonat-Membran (Nuclepore) definierter Porengröße (stufenweise mit abnehmenden Porendurchmessern) extrudiert. Die für die einzelnen Polymere verwendeten Membranen sind in Tabelle 3-1 angegeben.

**Tabelle 3-1: Porengröße der verwendeten Membranen**

| Polymer     | Porengröße (nm)      |
|-------------|----------------------|
| P2VP-PEO-8  | 600, 400, 200*, 100* |
| PI-PEO-9    | 200, 100             |
| PI-PEO-18.2 | 200, 100             |

\*Diese Membranen konnten erst bei Zusatz von 5% (V/V) Ethanol verwendet werden.

Die ungerade Anzahl an Extrusionsschritten wurde gewählt, damit die Vesikel aus der Akzeptorspritze entnommen werden können, ohne sich mit den ursprünglichen MLVs zu vermischen. Die wiederholte Extrusion der inhomogenen Präparation ermöglichte die Herstellung einer homogenen und fast unilamellaren Vesikeldispersion. Aufgrund des geringen Probendurchsatzes ist diese Methode jedoch nur für kleinere Ansatzmengen (1 ml) geeignet.

### **3.1.3.2 Hochdruckhomogenisation**

Bei der Herstellung der Polymervesikel mit dem Hochdruckhomogenisator wurden 20 ml der durch die Filmmethode erhaltenen MLV-Dispersion in den Probenbehälter eines APV Gaulin Micron LAB 40 gegeben und homogenisiert. Die Anzahl der Zyklen und der Arbeitsdruck sind bei den einzelnen Zubereitungen angegeben.

### **3.1.3.3 Ultraschall**

Die Homogenisierung der MLV-Dispersion (Filmmethode) mit Hilfe von Ultraschall wurde mit dem Gerät Sonoplus<sup>®</sup> von Bandelin mit folgenden Gerätedaten durchgeführt:

Hochfrequenzgenerator: HD 3100

Ultraschallwandler: UW 3100

Boosterhorn: SH 70G

Dieses Gerät ermöglichte sowohl die direkte Beschallung der Probe mittels Ultraschallspitze (Sonotrode MS 72, Ø 2 mm), als auch nach einfachem Umbau die indirekte Beschallung in einem Ultraschallbad (BR 30 Becherresonator). Wegen des hohen Energieeintrages wurde die Probe während der Beschallung in einem Wasser-Eis-Bad gekühlt, um eine Schädigung der Probe durch lokale Überhitzung zu vermeiden. Die Beschallungszeit ist bei den einzelnen Präparationen angegeben.

### **Ultraschallspitze**

1 ml der Probe wurde in ein spitz zulaufendes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Ultraschallspitze wurde so in die Probe eingetaucht, dass der Abstand zum Meniskus ca. 0,5 cm betrug, keine Berührung mit der Gefäßwand und keine Blasenbildung während der Beschallung auftraten. Die Energieauslastung der Spitze betrug 40%.

### **Ultraschallbad**

1 ml der Probe wurde in ein am Boden abgerundetes 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und im Ultraschallbad mit einer Amplitude von 100% beschallt.

#### **3.1.3.4 Temperatur-Methode**

Diese Methode ist zur Homogenisierung des Blockcopolymers P2VP-PEO geeignet. Die durch die Filmmethode erhaltene MLV-Dispersion wurde in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 4°C für eine Dauer von mindestens 24 Stunden inkubiert und anschließend wieder auf RT erwärmt.

#### **3.1.4 Detergenzdialyse**

Bei dieser Methode wurde zunächst ein Film in einem Rundkolben hergestellt, der neben dem Polymer auch ein Detergenz enthielt. Es wurde jeweils 1 ml Probenlösung mit einem Polymergehalt von 1 mM hergestellt. Dazu wurde das Polymer zusammen mit dem Detergenz in einem Stoffmengenverhältnis, wie in Tabelle 3-2 angegeben, in einen 50 ml Rundkolben eingewogen und in etwas Ethanol gelöst.

**Tabelle 3-2: Stoffmengenverhältnis Detergenz ( $n_{\text{det}}$ ) zu Polymer ( $n_{\text{poly}} = 1 \text{ mM}$ ) für das entsprechende Detergenz**

| Detergenz                     | $n_{\text{det}}/n_{\text{poly}}$ |
|-------------------------------|----------------------------------|
| OG                            | 10                               |
| C <sub>8</sub> E <sub>4</sub> | 5                                |
| SDS                           | 25                               |

Das organische Lösungsmittel wurde bei einer Wasserbadtemperatur von max. 40°C am Rotationsverdampfer unter allmählicher Druckreduktion entfernt. Der am Kolben verbleibende dünne Probenfilm wurde anschließend an der Hochvakuumanlage für 1 Stunde nachgetrocknet und danach durch Zugabe von 2 ml des entsprechenden Puffers (Dialysemedium) unter Schwenken des Kolbens in eine klare Mischmizellenlösung überführt. Zur Entfernung des Detergenz wurde diese Lösung in eine nach der Vorschrift von Stauch (Stauch 2002) selbst hergestellte Dialysekammer überführt und für mind. 72 Stunden dialysiert. Als Dialysemembranen wurden Cellulosemembranen mit einem *cutoff* von 5 kDa verwendet, die zuvor zum Hydratisieren für mind. 10 Minuten in das Dialysemedium eingelegt wurden. Zur Durchmischung der Probe wurde ein kleiner Rührmagnet in die Dialysekammer eingebracht. Zu Beginn wurden 200 ml Dialysemedium benutzt, das am ersten Tag viermal (nach 1, 2, 4, 8 Stunden) mit 200 ml und an den folgenden Tagen zweimal alle 12 Stunden mit 500 ml gewechselt wurde.

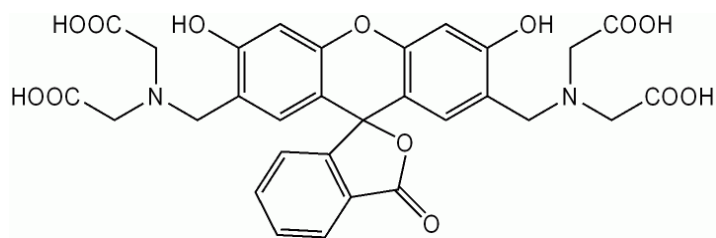
## **3.2 Verkapselung hydrophiler Substanzen**

### **3.2.1 Direkte Verkapselung**

Hydrophile Substanzen können im wässrigen Innenraum von Vesikeln verkapselt werden. Dazu wurden diese Substanzen direkt dem Herstellungspuffer zugesetzt. Der nicht verkapselte Anteil wurde über Größenausschlusschromatographie (GAC) abgetrennt. Die dafür verwendeten Säulenmaterialien mit den entsprechenden Säulemaßen sind in den jeweiligen Kapiteln näher beschrieben.

#### **3.2.1.1 Calcein**

Der Fluoreszenzfarbstoff Calcein ( $M_w$  622,55), der nur im Basischen leicht löslich ist, diente zur Bestimmung der Einschlusseffizienz und zur Untersuchung der Permeabilität der Polymermembran. Calcein besitzt die Eigenschaft, in hohen Konzentrationen Dimere zu bilden und sich dadurch selbst zu quenchen (Fluoreszenzlöschung). Deshalb findet Calcein häufig in Freisetzungsstudien Verwendung. Kommt es zum Austritt des verkapselten Calceins aus dem Vesikel, erfolgt eine starke Verdünnung der Substanz und die Fluoreszenz wird messbar.

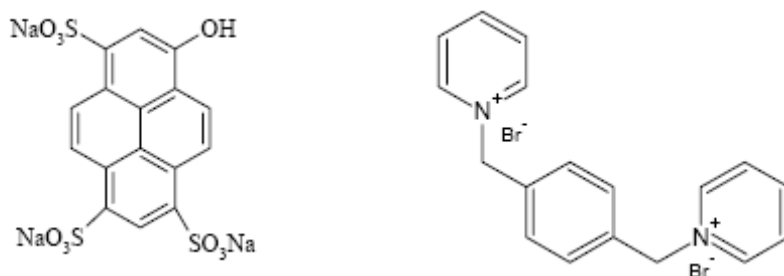


**Abbildung 3-2: Struktur von Calcein**

Die Anregungswellenlänge von Calcein beträgt  $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$  und die Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ . Die Markerlösung enthielt 50 mM Calcein in HBS pH 7,4, dem 1 mM EDTA zugesetzt wurden, um den Einfluss von Metallionen auf die Fluoreszenz auszuschließen. Der nicht verkapselte Farbstoff wurde über eine GAC-Säule (Sephacel CL-4B, 0,7x20 cm, HBS als Elutionspuffer) abgetrennt.

### 3.2.1.2 HPTS/DPX

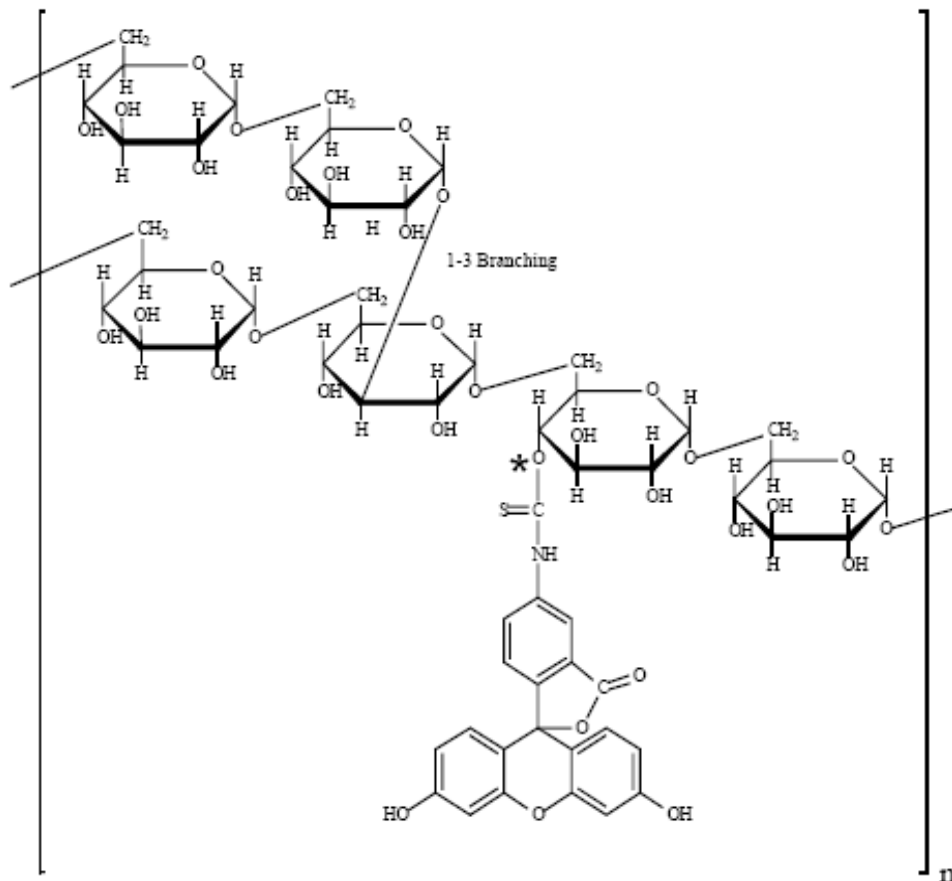
Der Fluoreszenzfarbstoff HPTS (31,8 mM) wurde zusammen mit seinem Quencher DPX (35,0 mM) in HBS bei einem pH von 7,4 gelöst und direkt zur Polymervesikel-Herstellung mit dem Extrusionsverfahren verwendet. Nach Abtrennung des nicht-verkapselten Farbstoffes mittels GAC (Sephacel CL-4B, 0,7x20 cm, HBS als Elutionspuffer), wurde die Einschlusseffizienz oder die Freisetzung bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 403 \text{ nm}$  und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$  bestimmt.



**Abbildung 3-3: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes HPTS (8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfon-säure, links) und seines Quencher DPX (p-Xylen-bis-pyridiniumbromid, rechts)**

### 3.2.1.3 FITC-Dextran

Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) diene sowohl als hydrophiler Marker zur Bestimmung der Einschlusseffizienz als auch zur Bestimmung der Freisetzungsrates bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$  und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$ .



**Abbildung 3-4: Struktur von Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran)**

FITC-Dextrane sind in unterschiedlichen Größen erhältlich. Es wurden FITC-Dextrane mit einer durchschnittlichen Molmasse von 4, 40 oder 150 kDa eingesetzt, die in einer Konzentration von 5 mg/ml in HBS pH 7,4 gelöst wurden. Anschließend erfolgte die Vesikelherstellung mit dem Extrusionsverfahren oder der Temperaturmethode. Die Abtrennung des nicht verkapselten Materials wurde mit GAC (Sephacrose CL-2B bzw. CL-4B, 0,7 x 20 cm, HBS als Elutionspuffer) erreicht.

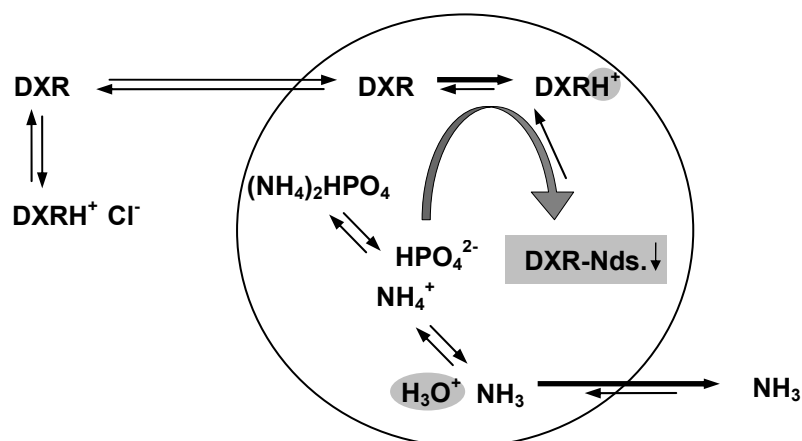
**Tabelle 3-3: Für GAC verwendete Säulenmaterialien zur Abtrennung von un- verkapseltem FITC-Dextran unterschiedlicher Größe**

| FITC-Dextran | Größe (Å)* | Säulenmaterial  |
|--------------|------------|-----------------|
| 4 kDa        | 14         | Sepharose CL-4B |
| 40 kDa       | 45         | Sepharose CL-4B |
| 150 kDa      | 85         | Sepharose CL-2B |

\*Stokes-Radius ( $1 \text{ Å} = 0,1 \text{ nm}$ ), Produktinformation

### 3.2.2 Remote Loading

*Prinzip:* Die Verkapselung von Doxorubicin (DXR) in Vesikel aus PI-PEO-18.2 erfolgte über das Remote Loading Verfahren, d.h. die zu verkapselnde Substanz wird nicht dem Hydratationspuffer sondern zur fertigen Polymerdispersion zugesetzt. Die Beladung erfolgte über einen transmembranären  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Gradienten nach Fritze (Fritze 2005) wie in Abbildung 3-5 dargestellt. Zuerst wird über einen Ammonium-Gradienten ein pH-Gradient in situ generiert, wobei es zum Absinken des intravesikulären pH-Wertes kommt. Das von außen zugegebene DXR diffundiert als freie ungeladene Base (pH 7,4) in das Vesikel (pH  $\ll$  7,4). Aufgrund des durch den Ammoniumgradienten erzeugten niedrigen intravesikulären pH-Wertes, wird DXR im Vesikel protoniert und fällt dort zusammen mit Phosphat aus. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen intra- und extravesikulärem ungeladenem DXR, das nachdiffundiert und schließlich DXR im Vesikel akkumuliert.



**Abbildung 3-5: Beladung von Vesikeln mit DXR über transmembranären  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Gradienten (Fritze 2005)**

*Durchführung:* Die nach der Filmmethode präparierte Polymerdispersion (10 mg/ml) in 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (pH 4) wurde extrudiert und der Außenpuffer mittels GAC (Sephacel CL-4B  $1,5 \times 10$  cm, in HBS (pH 7,4), Probenvolumen bis 400  $\mu\text{l}$ ) gegen HBS pH 7,4 ausgetauscht. Die gesäulte Probe wurde sofort zu einem DXR-Aliquot (0,1 mg DXR in HPLC-Vial, lyophilisiert) in einem Polymer/DXR-Verhältnis von 3/1 bzw. 6/1 mol/mol gegeben, gevortext bis das DXR vollständig gelöst war und anschließend lichtgeschützt im Kühlschrank oder bei 40°C inkubiert.

*Qualitative Kontrolle der DXR-Verkapselung:* Im basischen Medium kommt es zu einer Farbänderung der DXR-Lösung von rot nach blau. Um zu überprüfen, ob DXR quantitativ verkapselt ist, wurden einige  $\mu\text{l}$  der Probe in 0,1N NaOH pipettiert. Ein Farbumschlag nach blau zeigt, dass ein Großteil des DXR nicht verkapselt vorliegt, während bei Erhalt der Rotfärbung von einer fast vollständigen Verkapselung ausgegangen werden kann (Fritze 2005).

### **3.3 Methoden zur Charakterisierung**

#### **3.3.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)**

Der mittlere hydrodynamische Teilchendurchmesser ( $z\text{-}A_v$ ) und der Polydispersitätsindex (PDI) der Probe wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit einem Zetamaster S<sup>®</sup> der Firma Malvern Instruments Inc. bestimmt.

##### **3.3.1.1 Streulichtmessung bei festem Winkel von 90°**

Die Streulichtmessung erfolgte dabei in einem konstanten Winkel von 90° unter Einsatz eines 5 mW He-Ne-Lasers ( $\lambda = 633$  nm) mit dem Zetamaster S<sup>®</sup>.

Die Probe wurde mit dem entsprechenden Puffer in einer Polystyrol-Einmalküvette verdünnt, so dass die Streulichtintensität (*count rate*) des Gerätes zwischen 100 000 bis 200 000 Zählimpulsen pro Sekunde lag. Da die Intensität des Streulichtes in der sechsten Potenz vom Teilchendurchmesser abhängt (siehe 1.3.2.1), muss die Probe schwebstofffrei und luftblasenfrei sein. Das Verdünnungsmedium wurde deshalb zuvor durch einen Membranfilter mit der Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$  filtriert. Ebenso erfolgte eine Reinigung der Küvette durch Ausblasen mit Stickstoff und Ausspülen mit dem filtrierten Puffer. Zur Verdünnung der Probe wurde ausschließlich das auch zur

Herstellung benutzte Medium verwendet, um osmotisch bedingte Veränderungen des z-Av und PDI zu vermeiden.

Die Küvette wurde in das Gerät gestellt und vor der Messung mit Hilfe eines Thermostaten ca. 10 Minuten lang auf  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$  temperiert, da die gemessene Teilchengröße laut Stokes-Einstein-Beziehung (siehe Gleichung 1-2) stark von der Temperatur abhängt. Es wurden drei Hauptmessungen (bestehend aus 10 Einzelmessungen) zu je 120 Sekunden durchgeführt. Bei zu niedriger Zählrate wurde die Messdauer des Gerätes automatisch gewählt, so dass genügend Messwerte zur Auswertung vorlagen. Anschließend wurden die Rohdaten im *Contin*-Modus ausgewertet. Der mittlere hydrodynamische Teilchendurchmesser (z-Average) und der Polydispersitätsindex (PDI), als das dimensionslose Maß für die Breite der Verteilung, wurden aus dem Mittelwert der drei Hauptmessungen (bei bekannter Temperatur, Viskosität und Brechungsindex des Dispersionsmediums) ermittelt. Der PDI einer Messung sollte laut Herstellerangaben unter 0,1 liegen, was einer monomodalen Verteilung entspricht, ist aber noch bis 0,3 akzeptabel.

### **3.3.1.2 Streulichtmessung bei festem Winkel von $173^\circ$**

Ein anderes Festwinkelgerät der Firma Malvern (Zetasizer<sup>®</sup> Nano Series Nano-ZS red Label) arbeitet mit einem He-Ne-Laser ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ , 4 mW) und misst das Streulicht in einem festen Winkel von  $173^\circ$ . Dieses Gerät wurde zur Messung der Tritonstabilität (siehe 3.3.9) verwendet, da es besser als der Zetamaster S<sup>®</sup> die Messung und Unterscheidung sehr kleiner Partikel (z.B. Mizellen) von größeren ermöglicht. Der Messwinkel von  $173^\circ$  zeigt zudem eine geringere Beeinflussung der Messergebnisse durch Mehrfachstreuung.

Die Proben wurden mit filtriertem ( $0,2 \mu\text{m}$  Celluloseacetat-Filter) Medium verdünnt, staubfrei über einen  $5 \mu\text{m}$ -Filter in eine saubere Polystyrol-Einmalküvette filtriert und mittels eines im Gerät integrierten Peltier-Elements auf  $25^\circ\text{C}$  thermostatiert. Der gewichtsgemittelte Teilchendurchmesser, der PDI und die Peakmitten wurde aus dem Mittelwert von zwei Hauptmessungen zu je zweimal 90 Sekunden ermittelt.

### **3.3.1.3 Streulichtmessung bei variabler Winkeleinstellung**

Die Streulichtmessungen in variablem Winkel wurden mit einer Streulichtanlage der Firma ALV, Langen durchgeführt. Als Lichtquelle dient ein 35 mW He-Ne-Laser ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ). Zur Messung wird eine Quarzküvette ( $d = 10 \text{ mm}$ ) verwendet. Der Detektor befindet sich auf einem Schrittmotoren-betriebenen Goniometer, welcher die Detektion der Streulichtintensität in einem Winkelbereich zwischen  $12^\circ$  und  $155^\circ$  erlaubt. Die Auswertung der Streulichtdaten erfolgte mit der Software der Firma ALV.

Die Quarzküvetten wurden in Nitriersäure aufbewahrt und vor der Messung mehrmals mit deionisiertem Wasser gespült, anschließend mit destilliertem Ethanol nachgespült und im Vakuum getrocknet. Die verdünnten Proben wurden durch einen Cellulosenitrat-Membranfilter mit einer Porengröße von  $5 \mu\text{m}$  staubfrei in die Küvetten filtriert und in einem Indexbad mittels eines Thermostaten (FischerBrand, FBC 720) auf die gewünschte Temperatur (meist  $20^\circ\text{C}$ ) thermostatiert. Die Messung bei niedrigen Temperaturen ( $< 10^\circ\text{C}$ ) war nur bei niedriger Luftfeuchtigkeit möglich, da es sonst zu einem Beschlagen der Küvetten kam. Die Messungen erfolgten in einem Winkelbereich von  $30^\circ$  bis  $150^\circ$  mit einer Schrittweite von  $10^\circ$  bei einer Messdauer von je 60–120 Sekunden pro Winkel jeweils dreifach.

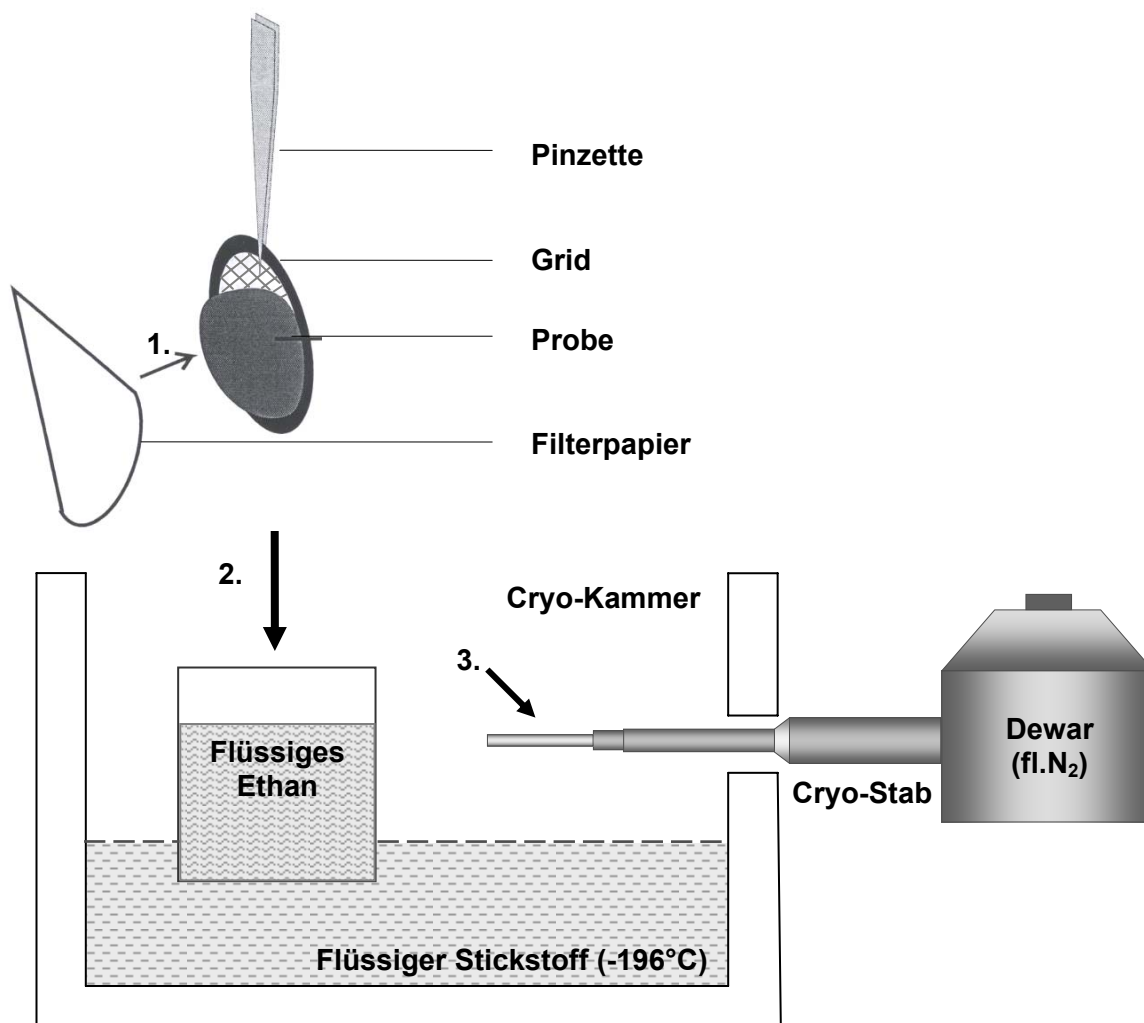
Für die kinetischen Untersuchungen (siehe 4.2.2), in denen die Messintervalle kurz gehalten werden mussten, wurden die Messungen nur in einem Winkelbereich zwischen  $120^\circ$  bis  $150^\circ$  in  $10^\circ$ -Schritten durchgeführt. Die höheren Winkel wurden gewählt, da in diesem Bereich der Einfluss der Mehrfachstreuung geringer ist.

### **3.3.2 Cryo-Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (Cryo-TEM)**

Die Probenpräparation erfolgte in einer speziellen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Cryo-Kammer (Zeiss, Oberkochen) wie in Abbildung 3-6 schematisch dargestellt. Diese ist mit einer Guillotine-artigen Vorrichtung, an der die Pinzette befestigt werden kann, ausgestattet und wird über eine Feder ausgelöst.

Ein Tropfen der unverdünnten Probe (etwa  $5 \mu\text{l}$ ) wurde auf die beschichtete Seite eines mit einem Kohlelochfilm versehenen Kupfernetzchen von Quantifoil® (S7/2 200 x 400 mesh) aufgebracht.

Die überschüssige Probenflüssigkeit wurde mit Hilfe eines Filterpapiers abgesaugt und die Probe sofort durch Auslösen der „Guillotine“ in flüssiges Ethan eingeschossen und schockgefroren. Anhaftendes Ethan wurde an einem kalten in der Kammer befindlichen Filterpapier abgestreift. Das Probengrid wurde anschließend in die Halterung an der Spitze eines mit Stickstoff gekühlten ( $-174^{\circ}\text{C}$ ) Cryo-Transfersystems (Gatan-Stab 626-DH) überführt und mit dessen Hilfe unter  $\text{N}_2$ -Gas-Spülung zügig in das Elektronenmikroskop (LEO Omega 912, Zeiss) eingeschleust, welches ebenfalls mit flüssigem Stickstoff gekühlt ( $-164^{\circ}\text{C}$ ) wurde.



**Abbildung 3-6: Schematische Darstellung der Cryo-Probenpräparation:**

- 1. Absaugen der überschüssigen Probenflüssigkeit mit Filterpapier,**
- 2. Einfrieren des Probenfilms durch Einschießen in flüssiges Ethan,**
- 3. Überführen der Probe in den Cryo-Stab**

Die Temperatur des EM und des Cryo-Stabes wurde ständig über eine Anzeige kontrolliert und konstant gehalten. Die Beschleunigungsspannung des EM betrug 120 kV und der Strahlstrom lag zwischen 1-4  $\mu\text{A}$ . Mit der Probenbetrachtung wurde frühestens nach einer Äquilibrierzeit von 15 Minuten nach Einschleusen in das EM begonnen, um ein Driften der Probe zu reduzieren.

Da es trotz der niedrigen Temperatur zu Strahlenschäden (Blasenbildung) kommen kann, erfolgte die Betrachtung der Cryo-Proben im EM unter *Low-Dose-Conditions*. Die Strahlenbelastung des gewünschten Bildausschnittes wurde mit Hilfe des *Minimal-Dose-Fokussing-Systems* (MDF) so gering wie möglich gehalten, indem zunächst an einer benachbarten Probenstelle in der jeweiligen Vergrößerung fokussiert wurde. Um den Kontrast der Proben zu erhöhen, wurde diese mit minimalem Unterfokus (Schmidtgen et al. 1998) betrachtet. Zusätzlich wurde unter *Zero-Loss-Bedingungen* ( $\Delta E = 0 \text{ eV}$ ) gearbeitet, d.h. der in der EM-Säule befindliche Omega-Filter ließ nur Elektronen ohne Energieverlust durch.

Die Aufnahme der Proben erfolgte digital mit einer *Slow-Scan-CCD*-Kamera (Oxford, 1024 X 1024 Pixel) bei einer Belichtungszeit von 500 oder 1000 ms. Anhand der Bilder konnten die enthaltenen Strukturen näher charakterisiert (bei Vesikeln z.B. Membrandicke, Lamellarität) und deren Größendimension durch Ausmessen sowie die Größenverteilung durch Messung des horizontalen Durchmessers von mindestens 350 Vesikeln bestimmt werden.

### **3.3.3 Einlagerung**

Für Stabilitätsuntersuchungen wurden die Probenansätze nach der Extrusion oder Temperaturmethoden-Präparation zu gleichen Teilen in HPLC-Vials abgefüllt und unter Lichtausschluss im Kühlschrank (2-8°C), bei Raumtemperatur (18-23°C) und im Trockenschrank (41°C) aufbewahrt.

### **3.3.4 Größenausschlusschromatographie (GAC)**

Die Größenausschlusschromatographie wird auch als Gelfiltration oder *Size Exclusion Chromatography* (SEC) bezeichnet.

Die GAC ist ein säulenchromatographisches Verfahren, das die Trennung von dispergierten bzw. gelösten Teilchen nach ihrer Teilchengröße ermöglicht. Als Säulenmaterial (stationäre Phase) dient ein polymeres Gel mit definierter Porengröße. Die Trennung verschiedener Molmassen erfolgt hierbei durch Größenausschluss in den Poren des Säulenmaterials (Molekularsieb). Große Teilchen wie Polymervesikel können nicht in die Poren eindringen, werden also „ausgeschlossen“ und verlassen die Säule als erstes zusammen mit der mobilen Phase (Eluent). Kleinere Teilchen (z.B. nicht-verkapselte Substanzen) dagegen dringen zwischenzeitlich in die Poren des Gelmaterials ein und werden deshalb später von der Säule eluiert. Die Eindringtiefe und -dauer und damit die Retentionszeit wird dabei von der Molekülgröße der gelösten Teilchen bestimmt. Die GAC ermöglicht somit die Trennung des vesikulär verkapselten Materials von nicht verkapselten Anteilen.

Als Säulenmaterial diente in den meisten Fällen Sepharose CL-4B. Für die Separation der vesikulären Fraktion von FITC-Dextran 150 kDa wurde Sepharose CL-2B verwendet. Als Eluent wurde, wenn nicht anders erwähnt, der bei der Herstellung der Vesikel verwendete Puffer, jedoch ohne die zu verkapselnde Substanz, eingesetzt.

Die Säulen wurden in ihrer Größe so gewählt, dass die aufzutragende Probenmenge maximal 3-5% des Säulenvolumens entsprach. Das Gelmaterial wurde zunächst blasenfrei in eine Säule eingefüllt und mit dem entsprechenden Puffer (Eluent) in der mindestens dreifachen Menge des Säulenvolumens gespült. Anschließend wurde das Gelmaterial vor dem eigentlichen Gebrauch mit dem jeweiligen Polymer abgesättigt. Dazu wurde mindestens fünfmal eine per Extrusion präparierte Polymerlösung (ohne die zu verkapselnde Substanz) über die Säule laufen gelassen. Die GAC wurde ausschließlich bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Vesikelfraktionen wurden visuell getrennt von den Fraktionen mit unverkapselter Substanz aufgefangen. Der Verdünnungsfaktor der Fraktionen wurde durch Auswiegen der auf die Säule aufgegebenen Volumina sowie der nach der Trennung erhaltenen Fraktionen bestimmt.

### 3.3.5 Bestimmung der Einschlusseffizienz (EE%)

Die Einschluss- oder Verkapselungseffizienz stellt den prozentualen Anteil an Substanz dar, der nach der entsprechenden Herstellung in den Vesikeln verkapselt vorliegt, bezogen auf die Gesamtmenge der verwendeten Substanz.

#### 3.3.5.1 Bestimmung der theoretischen Einschlusseffizienz

Nach Schubert (Schubert et al. 1991) kann die maximal mögliche Einschlusseffizienz einer wasserlöslichen Substanz nach folgender Formel (Gleichung 3-1) berechnet werden. Diese Berechnung setzt voraus, dass der hydrophile Stoff innerhalb und außerhalb des Vesikels in gleicher Konzentration vorliegt, und stellt nur eine Näherung dar unter der Annahme, dass die Vesikel unilamellar und sphärisch sind.

$$\text{theoretische EE \%} = \frac{(R-D)^3}{\left(R - \frac{D}{2}\right)^2} \cdot \frac{1}{\frac{6 \cdot 10^{22}}{N \cdot P \cdot A} - 0,03 \cdot D} \quad \text{Gleichung 3-1}$$

|      |   |                                                                                             |
|------|---|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| mit: | R | hydrodynamischer Radius eines Vesikels [nm]                                                 |
|      | D | Membrandicke aus Cryo-TEM-Messungen [nm]                                                    |
|      | N | Avogadrozahl ( $6,0225 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )                                   |
|      | P | Polymerkonzentration [ $\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ]                                  |
|      | A | durchschnittliche Querschnittsfläche eines Membranpolymermoleküls (ca. $1,5 \text{ nm}^2$ ) |

Da für die verwendeten Polymere keine Messdaten zur durchschnittlichen Querschnittsfläche eines Moleküls in der Membran vorliegen, wurde von einem Durchschnittswert von  $1,5 \text{ nm}^2$  ausgegangen, der aus Literaturangaben zu anderen Diblock-Copolymeren abgeleitet wurde (Napoli et al. 2002, Ahmed et al. 2003, Battaglia & Ryan 2005).

#### 3.3.5.2 Bestimmung der tatsächlichen Einschlusseffizienz

Zur Ermittlung der tatsächlichen Einschlusseffizienz (EE%) wurde die vesikulär verkapselte Substanz von der freien nicht verkapselten Substanz über GAC abgetrennt. Nach dem Trennen wurden die Anteile an Substanz in freier und

vesikulärer Fraktion fluorimetrisch nach Verdünnen mit dem entsprechenden Puffer bestimmt. Durch Zusatz von 100 µl Triton X-100 (10%-ige Lösung) zu 2 ml der jeweiligen Verdünnung wurden die Vesikel zerstört, wodurch die verkapselte Substanz freigesetzt und Streulicht eliminiert wurde. Anschließend wurde die EE% wie folgt berechnet:

$$\text{tatsächliche EE\%} = \frac{\text{Anteil}_{\text{Vesikel}}}{\text{Anteil}_{\text{Vesikel}} + \text{Anteil}_{\text{frei}}} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

EE%                      Einschlusseffizienz

Anteil<sub>Vesikel</sub>              Fluoreszenzintensität der Vesikelfraktion (verkapselte Substanz)

Anteil<sub>frei</sub>                  Fluoreszenzintensität der Fraktion mit unverkapselter Substanz

### 3.3.5.3 Bestimmung der Einschlusseffizienz (EE%) von DXR

Bei der Bestimmung der EE% von DXR wird dessen Eigenschaft ausgenutzt, sich in hohen Konzentrationen, z.B. im verkapselten Zustand, selbst zu quenchen (Fluoreszenzlöschung).

Die fluorimetrische Bestimmung wurde bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$  und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$  (LS 50B Perkin Elmer, Spaltbreite 5 nm, *time-drive*-Modus, Magnetrührergeschwindigkeit *low*) durchgeführt.

Zunächst wurden 2 ml HBS pH 7,4 in einer Quarzküvette vorgelegt ( $I_0$  - Nullwert), nach ungefähr einer Minute wurden 100 µl der Probe hinzu pipettiert ( $I_x$  - Intensität freies bzw. unverkapseltes DXR) und überprüft, ob die Intensität bzw. Verkapselung stabil blieb. Nach weiteren fünf Minuten wurden die Vesikel durch Zugabe von 50 µl 10%-ige Triton X-100 Lösung zerstört und somit die Fluoreszenzintensität für 100% freies DXR ( $I_{100}$ ) ermittelt (Lee et al. 1998).

Die Berechnung der Einschlusseffizienz (EE%) erfolgte nach:

$$EE \% = 100 - \left( \frac{I_x - I_0}{I_{100} - I_0} \cdot 100 \right) \quad \text{Gleichung 3-3}$$

|           |                                                                   |
|-----------|-------------------------------------------------------------------|
| $I_0$     | Fluoreszenzintensität Puffer (Nullwert)                           |
| $I_x$     | Fluoreszenzintensität Probe vor Tritonzugabe (unverkapseltes DXR) |
| $I_{100}$ | Fluoreszenzintensität Probe nach Tritonzugabe (gesamtes DXR)      |

### 3.3.6 Bestimmung des intravesikulären pH-Wertes

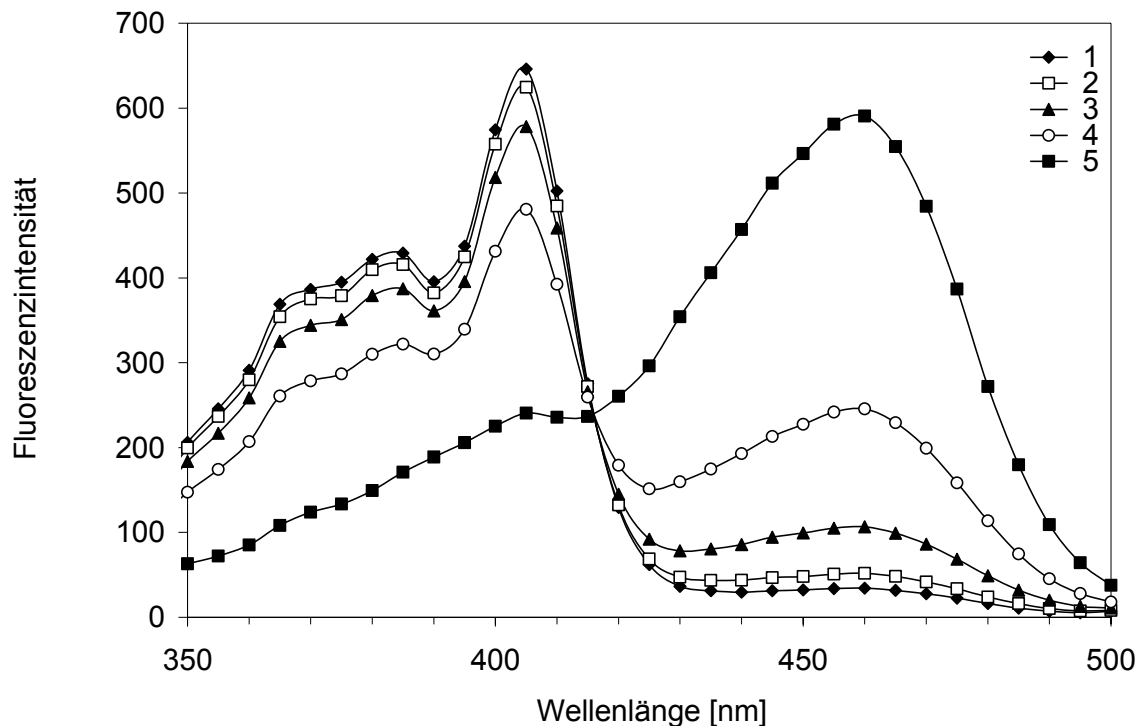
Die Bestimmung des intravesikulären pH-Wertes erfolgte mit Hilfe des pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure (HPTS, Pyranin) (Kano & Fendler 1977, Daleke et al. 1990).

HPTS besitzt in wässriger Lösung bei einem Emissionsmaximum von  $\lambda = 510$  nm zwei pH-abhängige Anregungsmaxima bei  $\lambda = 403$  nm ( $\lambda_{\max}$  im „Sauren“) und  $\lambda = 455$  nm ( $\lambda_{\max}$  im „Alkalischen“), sowie den pH-unabhängigen isosbestischen Punkt bei  $\lambda = 415,5$  nm. Die pH-Abhängigkeit der HPTS-Fluoreszenz ist auf das Vorhandensein der freien Hydroxylgruppe am Pyrengerüst zurückzuführen, die bei „Abdissoziieren“ eines Protons (höherer pH) zu einem bathochromen Shift der Anregungswellenlänge führt. Der pKs-Wert von Pyranin liegt bei 7,2.

Zur Kalibrierung wurden HPTS-Lösungen mit 2 mM HPTS in 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Puffer und HBS-Puffer mit pH-Werten zwischen 5,5 und 7,5 hergestellt.

Polymervesikel aus PI-PEO-18.2 (10 mg/ml) wurden wie beschrieben mit Hilfe der Filmmethode und anschließender Extrusion hergestellt. Als Hydratationspuffer wurde 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Puffer, dem 2 mM HPTS zugesetzt wurden, verwendet. Unverkapseltes HPTS wurde mit Hilfe der GAC über ein Sephadex G-50 fine Gelbett ( $0,7 \times 20$  cm, Probenvolumen 100  $\mu\text{l}$ ) abgetrennt.

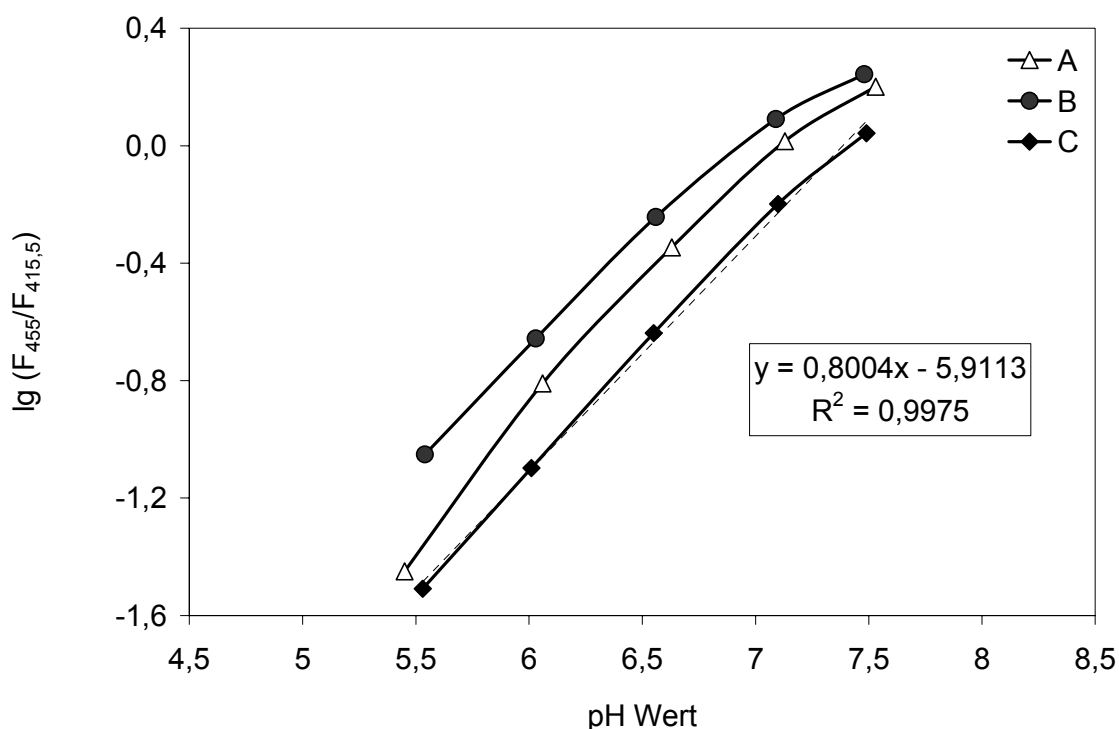
Sofort nach der GAC wurde das HPTS - Excitationsspektrum zwischen 350 und 500 nm bei einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 310$  nm bestimmt (Spaltbreiten: 5 nm, Geschwindigkeit: 200 nm/min, 25°C, LS 50B, Perkin Elmer). Zur Probenverdünnung wurde der GAC-Elutionspuffer verwendet.



**Abbildung 3-7: Fluoreszenzspektrum von vesikulär verkapseltem HPTS 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  bei verschiedenen pH-Werten (1: pH-Wert = 6; 2-5: nach Zugabe von 10, 20, 30 und 40  $\mu\text{l}$  konzentrierter NaOH zu 2 ml Probe)**

Abbildung 3-7 zeigt das Fluoreszenzspektrum von verkapseltem HPTS in 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  pH 6,0 (GAC mit gleichem Puffer ohne HPTS). Durch schrittweise Zugabe von konzentrierter NaOH wurde der pH-Wert erhöht und der isosbestische Punkt konnte aus dem Schnittpunkt bestimmt werden.

Die Bestimmung des pH-Wertes beruht auf dem Zusammenhang  $\text{pH} = \text{pK}_s + \log (F_{455}/F_{415,5})$ , wobei der letzte Term den Logarithmus der Fluoreszenzintensität bei  $\lambda = 310 \text{ nm}$  für die Anregungswellenlängen  $\lambda = 455 \text{ nm}$  und  $\lambda = 415,5 \text{ nm}$  darstellt (Fritze 2005). Die Kalibrierung wurde in einem pH-Bereich zwischen pH 5,5 und 7,5 durchgeführt. Dazu wurden sowohl die Excitationsspektren von HPTS in 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Puffer und HBS-Puffer aufgenommen als auch die Excitationsspektren von in Polymervesikel verkapseltem HPTS. Der intravesikuläre Puffer bestand dabei aus 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  und 2 mM HPTS, der extravesikuläre Puffer aus 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  mit dem gleichen pH-Wert. In Abbildung 3-8 sind die Kalibrierkurven für die jeweiligen Medien dargestellt.



**Abbildung 3-8: Kalibrierkurven von HPTS in verschiedenen Medien ( $\Delta$  A = HBS;  $\bullet$  B = 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ;  $\blacklozenge$  C = vesikulär verkapselt in 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  mit Kalibrierfunktionen-Gleichung)**

Zur Ermittlung des Aufbaus eines pH-Gradienten in PI-PEO-Polymervesikeln wurde bei deren Herstellung als Hydratationspuffer 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (pH 7,4) mit 2 mM HPTS verwendet. Unverkapseltes HPTS wurde durch GAC mit HBS (pH 7,4) als Elutionspuffer abgetrennt. Die Probe wurde sofort mit dem extravasikulären Puffer verdünnt (1:2000), fluorimetrisch vermessen und über die Kalibriergerade aus Abbildung 3-8 der intravesikuläre pH-Wert bestimmt.

### 3.3.7 Freisetzungsuntersuchung (Stabilität der Verkapselung hydrophiler Substanzen)

#### 3.3.7.1 HPTS/DPX bzw. Calcein

Die Freisetzung der verkapselten Fluoreszenzmarker HPTS/DPX bzw. Calcein kann direkt fluorimetrisch verfolgt werden, da es bei Austritt der Substanzen zu einer Verdünnung kommt, die den Quencheffekt aufhebt und die Fluoreszenz wieder messbar wird. Die Fluoreszenzintensität korreliert dabei direkt mit der freigesetzten Menge an Marker.

Zunächst wurden die nach der Filmmethode hergestellten Polymerfilme (10 mg/ml) mit der entsprechenden Farbstofflösung (HPTS/DPX oder Calcein) hydratisiert und anschließend extrudiert. Der unverkapselte Anteil wurde mittels Größenausschlusschromatographie über Sepharose CL-4B (0,7 × 15 cm) und HBS pH 7,4 als mobile Phase abgetrennt. Die gesäulte Probe wurde anschließend auf eine Polymerkonzentration von 1 mg/ml mit HBS verdünnt und gleich für die Freisetzungsmessung am Fluorimeter (LS 50B, Perkin Elmer) verwendet. Die Fluoreszenzuntersuchungen erfolgten in einer Quarzküvette, die auf  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  bzw.  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  temperiert wurde. Zuvor wurden 2 ml des entsprechenden Mediums vorgelegt und auf die jeweilige Temperatur temperiert:

a) HBS mit verschiedenen pH-Werten (pH 8,5 / 7,4 / 7,0 / 6,5 / 6,0 / 5,5 / 5,0 / 4,5 oder 4,0) bei  $25^\circ\text{C}$  bzw.  $37^\circ\text{C}$

b) Serum pH 7,4 bei  $37^\circ\text{C}$  (Kalie 2006)

Die Probe wurde dabei kontinuierlich mit Hilfe eines Magnetrührers (Stufe *low*) durchmischt. Nach Erreichen der gewünschten Temperatur wurde die Messung gestartet. Die Fluoreszenzintensität wurde über die Zeit im *Time-Dive-Modus* bei den jeweiligen Anregungs- und Emissionswellenlängen und einer Spaltbreite von 5 nm erfasst. Nach ca. einer Minute wurde die entsprechende Menge an gesäulter Probe zugegeben, was dem Zeitpunkt Null entspricht ( $I_0$ ). Nach weiteren 30 Minuten wurden die Vesikel durch Zugabe von 100 µl Triton X-100 (in HBS) zerstört und so der Intensitätswert bei 100%-Freisetzung ( $I_{100}$ ) ermittelt.

Die Berechnung der prozentualen Marker-Freisetzung zu einem bestimmten Zeitpunkt erfolgte nach Volumenkorrektur der Intensitätswerte auf Grundlage folgender Gleichung:

$$\% \text{ Marker}_{\text{frei}}(t) = \frac{I_t - I_0}{I_{100} - I_0} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 3-4}$$

$I_t$                       Fluoreszenzintensität der Probe zu verschiedenen Zeitpunkten

$I_0$                       Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt Null

$I_{100}$                     Fluoreszenzintensität nach vollständiger Zerstörung der Vesikel

### **3.3.7.2 FITC-Dextran 4 kDa**

Die Verfolgung der Freisetzung von FITC-Dextran 4 kDa aus P2VP-PEO-8 Vesikeln erfolgte säulenchromatographisch und wurde fluorimetrisch detektiert. Dazu wurde der nach der Filmmethode hergestellte Polymerfilm (10 mg/ml) mit einer FITC-Dextran-Lösung (5 mg/ml in HBS pH 7,4) hydratisiert und extrudiert. Anschließend wurde der unverkapselte Anteil von 200 µl Probe über eine Sepharose CL4B-Säule (0,7 × 15 cm) mit HBS pH 7,4 als mobile Phase abgetrennt und die Zeitmessung ( $t_0$ ) gestartet. Nach verschiedenen Zeiten ( $t_x$ ) wurden je 100 µl der gesäulten vesikulären Fraktion ( $t_0$ , trüb) nochmals gesäult (CL4B-Säule 0,5 × 10 cm) und am Fluorimeter (LS 50B, Perkin Elmer) die Einschlusseffizienz zu den einzelnen Zeitpunkten bestimmt ( $\lambda_{\text{ex}} = 493 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$ , Spaltbreite 10 nm).

Zur Überprüfung einer Wechselwirkung zwischen Polymer und FITC-Dextran wurden 300 µl einer extrudierten, markerfreien Polymerdispersion (in HBS pH 7,4) mit 1,5 mg FITC-Dextran 4 kDa versetzt, gevortext und bei RT inkubiert. Nach 30 Minuten wurde der nichtverkapselte Teil über GAC abgetrennt und die EE% bestimmt. Die gesäulte Vesikelfraktion wurde nach einer Stunde nochmals gesäult und die EE% erneut bestimmt.

### **3.3.8 Säure-induzierte Auflösung von Vesikeln aus P2VP-PEO-8**

Eine extrudierte Probe von P2VP-PEO-8 in HBS (10 mg/ml) wurde vorsichtig durch Zugabe von 0,1 N Salzsäure auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und bei RT aufbewahrt. Die Cryo-TEM-Untersuchungen wurden am darauf folgenden Tag durchgeführt. Für PCS-Messungen wurde die Probe in HBS mit dem gleichen pH-Wert verdünnt. Der pH-Wert wurde vor den Messungen nochmals kontrolliert.

### **3.3.9 Stabilität gegenüber Triton**

#### **3.3.9.1 PCS**

Die Zerstörung der Polymervesikel durch Triton X-100 wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 und 250 mM Triton, also unter- und oberhalb der CMC von 0,25 mM (Partearroyo et al. 1996), untersucht. Die Herstellung der Tritonlösungen erfolgte über die Einwaage mit frisch filtriertem (0,2 µm) HBS.

Zunächst wurde ein Polymerfilm aus P2VP-PEO-8 oder PI-PEO-18.2 ( $c = 10 \text{ mg/ml}$ ) mittels Filmmethode hergestellt, der mit HBS hydratisiert und anschließend extrudiert wurde. Die Teilchengrößenbestimmung erfolgte mit dem Zetasizer<sup>®</sup> Nano (siehe Kap. 3.3.1.2) bei einer Temperatur von  $25^\circ\text{C}$ . Die extrudierten Proben wurden 1:20 oder 1:100 mit der entsprechenden Triton-Lösung verdünnt und die Messung der Teilchengröße gestartet. Die mittleren Teilchengrößen entsprechen dem Mittelwert aus 15 Einzelmessungen innerhalb von 30 Minuten.

Für die Kinetikmessungen wurde die extrudierte Probe von PI-PEO-18.2 entweder 1:20 mit  $1 \text{ mM}$  Tritonlösung oder 1:100 mit  $0,375 \text{ mM}$  Tritonlösung verdünnt. Die Messung wurde sofort nach dem Mischen gestartet.

### **3.3.9.2 Fluoreszenz**

*Messprinzip der HPTS-DPX-Freisetzungsuntersuchung:* Der Fluoreszenzfarbstoff HPTS und sein Quencher DPX (beide gut wasserlöslich) werden in Polymervesikel verkapselt, wobei aufgrund der räumlichen Nähe beider Substanzen nur eine sehr geringe Fluoreszenzintensität messbar ist. Kommt es aufgrund von Membranschäden durch ein Tensid zum Austritt der Stoffe aus dem Vesikel, verliert DPX durch die starke Verdünnung im extravesikulären Raum seine quenchende Wirkung und die durch das freie HPTS verursachte Fluoreszenz wird messbar. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität entspricht dabei der Menge an freigesetztem HPTS. Wird die Fluoreszenzzunahme über die Zeit verfolgt, kann man Aussagen über die Durchlässigkeit der Membran und den Grad der Membranschädigung erhalten.

*Durchführung:* Es wurde ein Polymerfilm aus PI-PEO-18.2 mittels Filmmethode hergestellt, der mit einer HPTS/DPX-Farbstofflösung hydratisiert wurde, so dass die Polymerkonzentration  $10 \text{ mg/ml}$  betrug. Die Farbstoff-Lösung bestand aus  $31,8 \text{ mM}$  HPTS und  $35,0 \text{ mM}$  DPX (van Bambeke et al. 2000) gelöst in HBS und besaß einen pH-Wert von 7,4. Die Polymerdispersion wurde anschließend extrudiert und der unverkapselte Anteil an HPTS und DPX mittels GAC (Sephacrose CL-4B, mobile Phase: HBS) abgetrennt. Die Vesikelfraktion wurde danach so verdünnt, dass die Polymerkonzentration  $1 \text{ mg/ml}$  betrug. Die gesäulte Probe wurde innerhalb der nächsten acht Stunden verwendet, wobei die Freisetzung von HPTS nach acht Stunden bei RT bei ca. 4% lag. Da die Fluoreszenzintensität von HPTS abhängig

von der Temperatur und dem pH-Wert der Lösung ist, wurden alle Versuche bei einer Temperatur von  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  und einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt.

*Herstellung der Tritonlösung:* Die Schädigung der Polymermembran durch Triton X-100 wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen  $3 \mu\text{M}$  und  $130 \mu\text{M}$  Triton untersucht. Dazu wurden Lösungen von Triton X-100 mit Konzentrationen von 0,01 mg/g bis 0,4 mg/g hergestellt. Die Herstellung erfolgte durch die Einwaage mit frisch  $0,2 \mu\text{m}$ -filtriertem HBS.

*Durchführung der Fluoreszenzmessung:* Die Fluoreszenzuntersuchungen erfolgten mit einem LS 50B Lumineszenz Spektrometer der Firma Perkin Elmer. Die Messungen wurden in einer Quarzküvette, die in einer thermostatisierbaren Küvettenhalterung mittels Wasserzirkulation auf  $25 \pm 1,0^\circ\text{C}$  temperiert wurde, und unter permanentem Durchmischen der Probe mit einem Magnetrührer (Stufe *low*) durchgeführt.

**Tabelle 3-4: Messbedingungen für fluorimetrische Bestimmung der Detergenz-induzierten HPTS/DPX-Freisetzung: Volumina an Puffer und gesäulter Probe in Küvette, Stoffmenge des Polymers nach Tritonzugabe und eingestellte Spaltbreiten (Ex, Em) der Blenden am Fluorimeter**

| Puffer [ $\mu\text{l}$ ] | Probe <sub>gesäult</sub> [ $\mu\text{l}$ ] | PI-PEO-18.2 [ $\mu\text{M}$ ] | Spaltbreite [nm] |
|--------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------|------------------|
| 1990                     | 10                                         | 1,2                           | 5                |
| 1980                     | 20                                         | 2,4                           | 4                |
| 1970                     | 30                                         | 3,6                           | 3,5              |

Die Erfassung der Fluoreszenzintensität über die Zeit erfolgte im *Time-Drive*-Modus bei einer Anregungswellenlänge von 403 nm und einer Emissionswellenlänge von 514 nm (Spaltbreiten der Blenden siehe Tabelle 3-4). Zunächst wurde die in Tabelle 3-4 angegebene Puffermenge in der Küvette vorgelegt und fünf Minuten bis zum Temperatúrausgleich gewartet, bevor die Messung gestartet und der Nullwert des Mediums bestimmt wurde. Nach ungefähr einer Minute wurde die entsprechende Menge an verdünnter Probe hinzupipettiert und überprüft, ob es zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität kommt. blieb die Intensität konstant, wurden nach fünf Minuten 500  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Triton X-Lösung hinzugegeben und der Fluoreszenzanstieg über 900 Sekunden verfolgt. Anschließend wurden die Polymervesikel durch

Zusatz von 10 µl einer 10%-igen Lösung von Triton X-100 (in HBS) zerstört, um die Fluoreszenzintensität bei 100% Freisetzung zu erhalten.

Die Berechnung der prozentualen Freisetzung erfolgte nach Volumenkorrektur der Intensitätswerte. Die höchste nach Zerstörung der Vesikel gemessene Intensität wurde gleich 100% gesetzt. Der Wert für 0% Freisetzung entspricht der Fluoreszenzintensität der intakten Vesikel kurz vor Zugabe der jeweiligen Triton X-100-Lösung (Zeitpunkt Null). Die prozentuale Freisetzung zu verschiedenen Zeitpunkten unmittelbar nach Zugabe der Triton X-100-Lösung und vor Zerstörung der Vesikel wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\% \text{ HPTS}_{\text{frei}}(t) = \frac{I_t - I_0}{I_{100} - I_0} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 3-5}$$

|           |                                                                 |
|-----------|-----------------------------------------------------------------|
| $I_t$     | Fluoreszenzintensität der Probe zu verschiedenen Zeitpunkten    |
| $I_0$     | Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt Null                        |
| $I_{100}$ | Fluoreszenzintensität nach vollständiger Zerstörung der Vesikel |

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Für die Experimente wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Polymere (Tabelle 4-1) mit ihren Blocklängen und Molmassen verwendet. Den chemischen Aufbau gibt Abbildung 4-1 wieder. Die vereinfachte Nomenklatur der Polymerenamen bezeichnet Poly(isopren) als PI, Poly(2-vinylpyridin) als P2VP und Poly(ethylenoxid) als PEO. Der an die Polymere angehängte Index entspricht der fortlaufenden Nummerierung aufeinander folgend synthetisierter Polymere. Die Dicken der Bilayermembranen wurden mittels SANS, SAXS oder Cryo-TEM im Rahmen verschiedener Arbeiten ermittelt (siehe Legende Tabelle 4-1) und beziehen sich bei Cryo-TEM auf den kontrastgebenden hydrophoben Membranteil (Zheng et al. 1999, Won et al. 2002, Battaglia und Ryan 2005).

**Tabelle 4-1: Daten der in dieser Arbeit verwendeten Blockcopolymere**

| Polymer                             | Index               | M<br>[g/mol] | Blocklänge |    | n/m  | Mw/<br>Mn | Membrandicke [nm] |      |      |
|-------------------------------------|---------------------|--------------|------------|----|------|-----------|-------------------|------|------|
|                                     |                     |              | m          | n  |      |           | SANS              | SAXS | TEM  |
| PI <sub>m</sub> -PEO <sub>n</sub>   | 9 <sup>[4]</sup>    | 4850         | 53         | 28 | 0,52 | 1,07      | -                 | -    | 12,7 |
|                                     | 18.2 <sup>[2]</sup> | 3417         | 32         | 27 | 0,84 | 1,07      | -                 | 9,5  | 8,6  |
| P2VP <sub>m</sub> -PEO <sub>n</sub> | 3 <sup>[1]</sup>    | 7600         | 55         | 38 | 0,69 | 1,08      | -                 | -    | 11   |
|                                     | 6 <sup>[1]</sup>    | 3900         | 29         | 15 | 0,52 | 1,09      | 10,7              | -    | 11   |
|                                     | 7 <sup>[1]</sup>    | 5200         | 37         | 24 | 0,65 | 1,14      | 13,1              | -    | 13   |
|                                     | 8 <sup>[3]</sup>    | 9277         | 66         | 46 | 0,69 | 1,03      | 13,5              | -    | 13   |
|                                     | 10 <sup>[3]</sup>   | 7350         | 54         | 34 | 0,63 | 1,10      | 11,4              | -    | 10   |
|                                     | 12 <sup>[1]</sup>   | 6400         | 47         | 29 | 0,62 | 1,06      | -                 | -    | 9    |

Polymersynthese und -charakterisierung: <sup>[1]</sup> Lipprandt (2003), <sup>[2]</sup> Filiz (2006), <sup>[3]</sup> Rumplecker (2003), <sup>[4]</sup> Dohrn (2003)



**Abbildung 4-1: Chemische Formeln von PI-PEO (links) und P2VP-PEO (rechts),**  
 \* steht für den Initiator aus der Synthese

## 4.1 Bewertung der Herstellungsverfahren

Im folgenden Teil der Arbeit wird nach einer einfachen Methode gesucht, um Polymervesikel aus den Polymeren P2VP-PEO-8 bzw. PI-PEO-9/-18.2 mit folgenden Kriterien herzustellen:

- Die mittlere Teilchengröße der Vesikel (z-Average) sollte unter 200 nm liegen. Bei i.v. Applikation werden Teilchen durch die Zellen des Mononukleären Phagozytensystems (MPS) aus dem Blut eliminiert, wobei kleine Vesikel langsamer entfernt werden und somit länger im Blut zirkulieren (Ishida 2002). Die Partikel dürfen allerdings nicht kleiner als 50 nm sein, da ansonsten der wässrige Innenraum zu klein zur Verkapselung von genügend Wirkstoff ist.
- Die Größenverteilung sollte möglichst eng sein ( $PDI < 0,2$ ). Dies spielt z.B. bei der Lagerstabilität eine Rolle, da es nach der *Ostwald-Reifung* zu einem Größenzuwachs kommen kann und dies weitere Aggregation sowie Fusion mit anschließender Sedimentation fördert.
- Die Vesikel sollten unilamellar sein, da zu viele Lamellen den für die Verkapselung zur Verfügung stehenden wässrigen Innenraum reduzieren und die Wirkstoff-Permeation beeinflussen.

Deshalb wurden folgende für Liposomen bekannte Herstellungsmethoden auf ihre Eignung getestet: Extrusion, Hochdruckhomogenisation, Ultraschall und Detergenzdialyse. Die so genannte Temperatur-Methode wurde für das Polymer P2VP-PEO-8 im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Die Charakterisierung und Beurteilung der einzelnen Methoden erfolgte mit Hilfe von PCS und Cryo-TEM. Die in dieser Arbeit abgebildeten Cryo-Aufnahmen stellen dabei ausgewählte Bilder typischer Strukturen dar, die auch auf vielen anderen Aufnahmen zu sehen waren. Die dunklen Flecken in der Probe sind Artefakte und stammen, falls nicht anders erwähnt, von Eiskristallen oder anhaftendem Ethan.

### 4.1.1 Filmmethode

Die Voraussetzung zur Herstellung von Polymervesikeln ist das Hydratisieren des Polymers im wässrigen Medium, was als Ausgangspunkt für die weiteren Homogenisationsmethoden wie z.B. Extrusion dient.

Das einfache Quellen der Polymere erfolgt aufgrund der im Vergleich zu Lipiden größeren Hydrophobie des unlöslichen Polymerblocks und der höheren Molmasse deutlich langsamer (Battaglia und Ryan 2005). Deshalb wird wie bei der klassischen Filmmethode nach Bangham (Bangham et al. 1965) ein dünner Polymerfilm auf einer Gefäßinnenfläche erzeugt. Nach Zugabe der Pufferlösung ist zwar ein Quellen des Polymerfilms und ein Ablösen einzelner Schichten als „Schlieren“ zu beobachten, jedoch ist dies nur unzureichend. Auch der Einsatz von Glasperlen und Ultraschallbad, der die Polymerschicht aufreißen soll, bringt keine deutliche Beschleunigung des Quellvorganges.

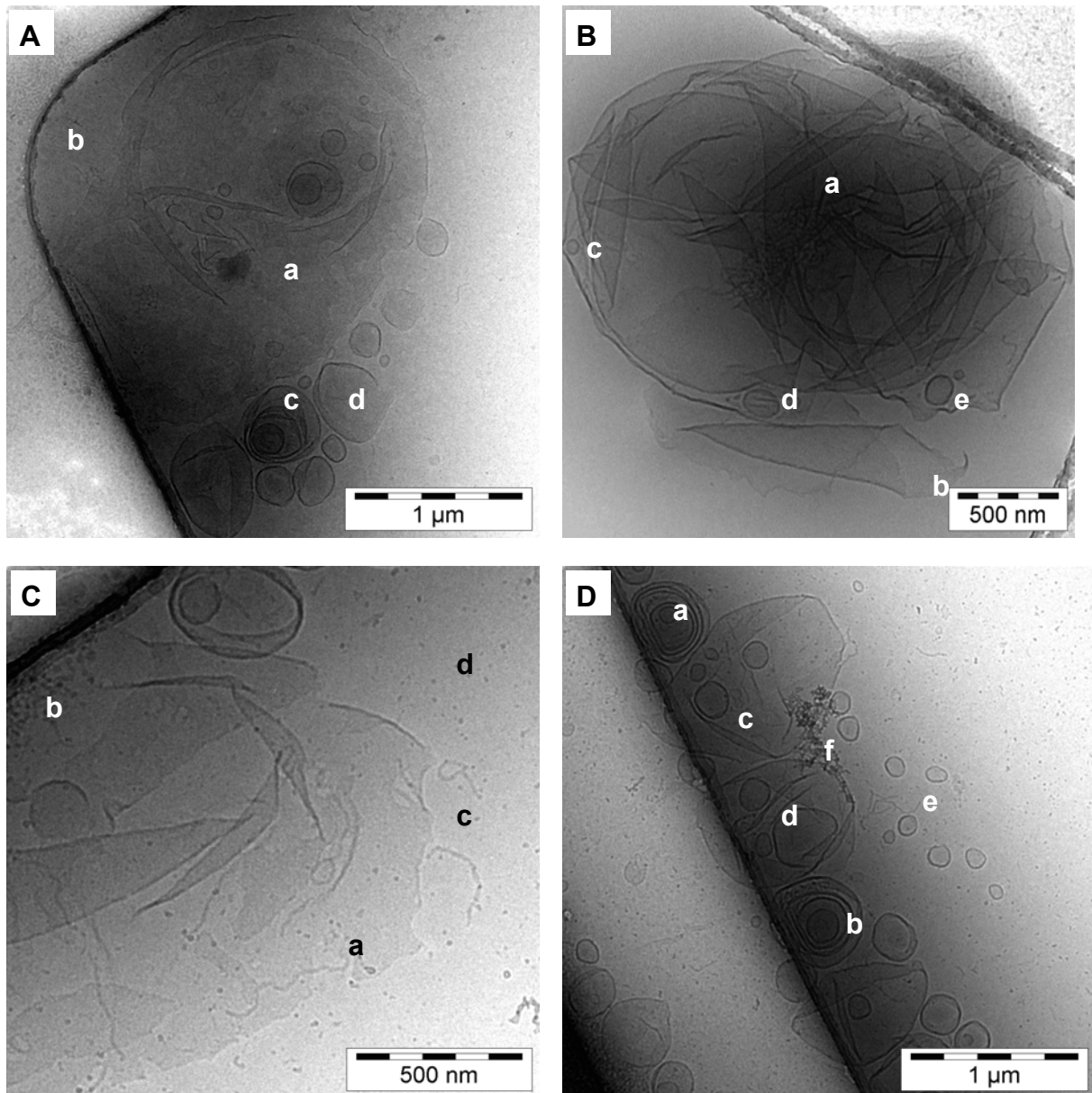
Die Hydratisierung und die Vesikelbildung werden schließlich durch starkes Rühren, welches das Oberflächen-Volumen-Verhältnis vergrößert, gefördert. Dieser Vorgang dauert mindestens einen Tag. Höhere Temperaturen bis 60°C bringen nur eine minimale Beschleunigung des Quellvorganges und wurden im Hinblick auf die Stabilität des Probenmaterials nicht genutzt (Rumplecker 2003).

Die Größenbestimmung der Polymerdispersion mittels PCS liefert keine aussagekräftigen Ergebnisse, da die Größenverteilung sehr inhomogen (PI 0,6-1) und somit die Korrelationsfunktion sehr schlecht ist. Die Proben können deshalb nur mit Cryo-TEM charakterisiert werden.

#### **4.1.1.1 P2VP-PEO-8**

Die Abbildung 4-2 zeigt Strukturen aus P2VP-PEO-8, die sich durch die Filmmethode gebildet haben. Bild A zeigt eine großflächige Struktur mit Membranfalten („Teppich“) und ohne zusammenhängenden Bilayer (a). Vesikelmembranen erkennt man in Cryo-TEM-Bildern als dunklere, klar abgegrenzte dünne Linien, welche z.B. gut an den Vesikeln im unteren Bildteil zu sehen sind. Die starke dunkle Linie und die angrenzende Fläche im linken Bildabschnitt (b) rühren dagegen vom Probengrid her. Auffällig sind in der Abbildung 4-2 A das oligolamellare Vesikel (c) und daneben ein Vesikel mit offener Membran (d). Bild B zeigt ein riesiges, stark gefaltetes Membranassoziat (a) mit offener Membrankante (b), in dem kleinere Vesikel integriert zu sein scheinen (c-e). Die Vesikel können sich auch ober- oder unterhalb des Bilayers befinden, was aus der Aufnahme nicht ersichtlich wird. In Bild C ist ein vergrößerter Ausschnitt solch einer offenen Membrankante (a) zu sehen. Zudem sind ebenfalls vereinzelte Wurmmizellen zu erkennen (b, c). Die dunklen Punkte (d) sind

nicht eindeutig einzuordnen, es könnte sich zum einen um sphärische Mizellen und zum anderen um Präparatverschmutzungen durch Eiskristalle handeln. Bild D zeigt eine Anhäufung verschieden großer Vesikel, z.T. multilamellar (a, b) oder multivesikulär (c, d), sowie vereinzelte Wurmmizellen (e). Die Ansammlung aus kleinen schwarzen Punkten in der Mitte des Bildes (f) rührt von anhaftendem Ethan. Die größeren Vesikel zeigen stark ausgeprägte Kanten und Faltungen und unterscheiden sich dadurch deutlich von den kleineren Vesikeln.

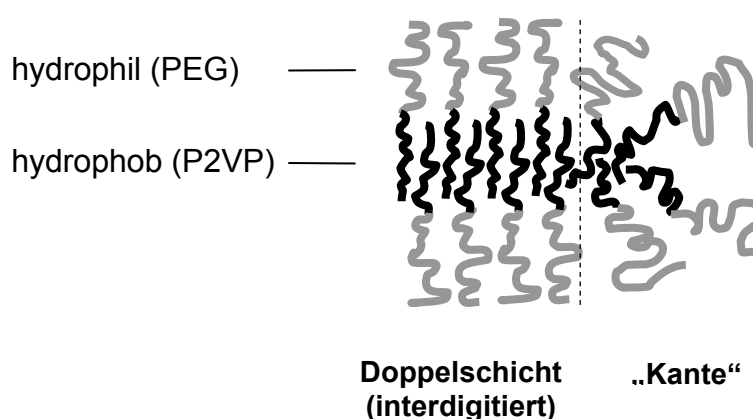


**Abbildung 4-2: Cryo-TEM Aufnahmen von P2VP-PEO-8 in HBS (Filmmethode)**

**A:** a) große gefaltete Membranfläche, b) Gridrand, c) OLV, d) Vesikel mit offener Membran  
**B:** a) Membranassoziat, b) offene Membrankante, c-e) LUV  
**C:** a) offene Membrankante, b+c) Wurmmizellen, d) Mizellen  
**D:** a+b) OLV, c+d) MVV, e) Wurmmizellen, f) Ethan

Die Größen der abgebildeten Strukturen sind sehr inhomogen und reichen von 38 bis ca. 2000 nm. Da bei der Cryo-Probenpräparation große Vesikel mit abgesaugt werden, ist davon auszugehen, dass viele der sehr großen bis 20 µm großen Gebilde (Rumplecker 2003) nicht erfasst werden und nur über die LM zugänglich sind.

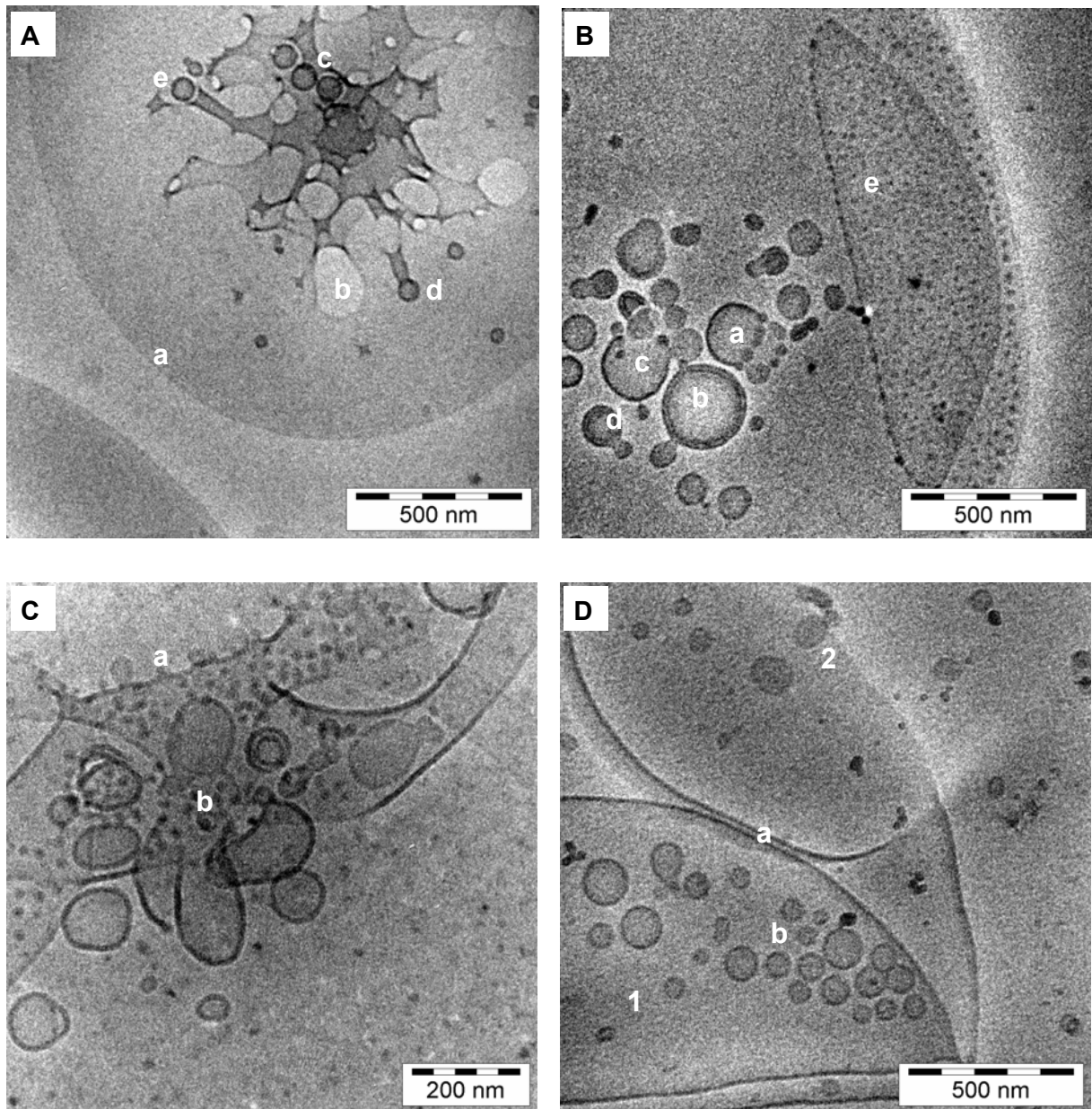
Sehr auffällig bei diesem Polymer sind die großen Membranflächen mit z.T. offenen Membrankanten. Solche Strukturen wurden schon für tensidhaltige Lipiddispersionen beschrieben, wo der lipophile Teil der Membran durch Tensidmoleküle gegenüber dem wässrigen Medium abgeschirmt wird (Vinson et al. 1989). Auch für Lipidvesikel des menschlichen Stratum corneums wurden, abhängig von der Präparationsmethode und dem pH-Wert, solche gestapelten und gefalteten Membranflächen (Schmidtgen et al. 1998) beobachtet, deren offene Kanten durch hohe lokale Ceramidkonzentrationen stabilisiert werden. Die Existenz dieser großen Doppelschichten wird somit durch das Vorhandensein strukturstabilisierender Moleküle erklärt. Da die Polymerproben keine stabilisierenden Zusätze enthalten, muss die Abschirmung des lipophilen Membranteils an der offenen Membrankante durch das Polymer selbst erfolgen. Aufgrund der Polydispersität des Polymers, der Flexibilität der Polymerketten und der Möglichkeit zu interdigitieren, kann folgendes schematisches Modell einer nicht geschlossenen Bilayerschicht, wie in Abbildung 4-3 dargestellt, angenommen werden.



**Abbildung 4-3: Schematische Darstellung einer „offenen“ Bilayerfläche (Querschnitt)**

#### 4.1.1.2 PI-PEO-18.2

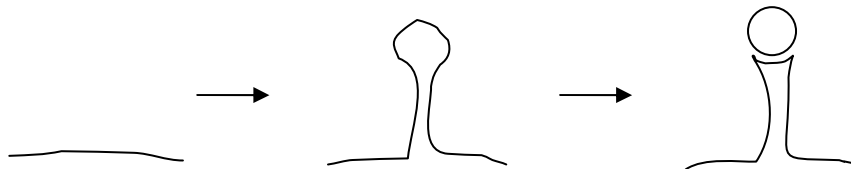
Die Abbildung 4-4 zeigt komplexe, heterogene Strukturen, die von PI-PEO-18.2 nach der Präparation mittels Filmmethode erhalten wurden. Der Größenbereich liegt dabei zwischen 42 bis ca. 3000 nm.



**Abbildung 4-4: Cryo-TEM Aufnahmen von PI-PEO-18.2 in HBS (Filmmethode)**

- A:** a) großes Vesikel, b) Membranloch, c) LUVs, d+e) Vesikelbildung  
**B:** a) quallenähnliches Vesikel, b+d) bilamellares Vesikel c) offenes Vesikel; alle mit Membranausstülpungen; e) Mizellen  
**C:** a+b) Mizellen zusammen mit Vesikelausstülpungen  
**D:** 1+2) umgeklappte Membranen, a) sterische Abschirmung zwischen Membranen, b) LUVs

In Abbildung 4-4 A ist ein Ausschnitt einer sehr großen runden Struktur (a) zu sehen, die in der Mitte aufgeplatzt zu sein scheint und sich heller abhebende Löcher (b) enthält. Es ist unklar, ob es sich hierbei um ein sehr großes Vesikel handelt oder um eine Membranscheibe, da keine Bilayermembran sichtbar ist, wie vergleichsweise bei den kleinen Vesikeln in der oberen Bildmitte (c). Eine stärkere Vergrößerung zur Strukturaufklärung war nicht möglich, da der Probenfilm an dieser Stelle relativ dick war und die dafür notwendige höhere Strahlendosis zur Zerstörung der Probe geführt hätte. Die Bildung der kleineren Vesikel aus der größeren Struktur scheint wie folgt vonstatten zu gehen (Abbildung 4-5). Zunächst bildet sich ein schlauchförmiges Gebilde aus der Membran heraus, an dessen Ende sich anschließend ein Vesikel ausbildet (d) und abschnürt (e).



**Abbildung 4-5: Schema der Vesikelentstehung bei PI-PEO-18.2**

Dieser Mechanismus wird in Abbildung 4-4 B bestätigt, die die Bildung kleiner Vesikel aus größeren Vesikeln über eine Ausstülpung zeigt. Die Form der „Ausgangsvesikel“ ist dabei sehr variabel wie quallenartige Strukturen (a), bilamellare Vesikel (b, d) oder offene Vesikel (c) zeigen. Im rechten Bildteil ist eine Ansammlung dunkler Punkte (e) zu sehen, die vermutlich von Mizellen stammen. Diese scheinen eine Rolle bei der Vesikelbildung zu spielen, da sie gehäuft an Stellen mit Ausstülpungen (a, b) auftreten, wie in Abbildung 4-4 C, die einen vergrößerten Ausschnitt aus einem sehr großen Vesikel zeigt, zu sehen ist.

Abbildung 4-4 D zeigt zwei große, halbrunde Strukturen (1, 2), die im Vergleich zur Struktur in Bild A eine deutliche Bilayermembran aufweisen und umgeklappte Teile einer größeren Membranstruktur zu sein scheinen. Zwischen der abgeflachten Kontaktfläche (a) dieser beiden Teile ist ein kleiner Spalt zu erkennen, der durch den sterischen Abschirmungseffekt der hydrophilen PEG-Gruppen zu erklären ist. Zudem ist eine Ansammlung vieler unilamellar geschlossener Vesikel (b) zu erkennen, deren Lokalisation (ober-, inner- oder unterhalb) nicht exakt bestimmt werden kann.

#### **4.1.1.3 Diskussion**

Die Filmmethode ist zur Bildung vesikulärer Strukturen aus amphiphilen Blockcopolymeren geeignet. Die Größe und Form der Vesikel ist jedoch sehr inhomogen, wodurch ein weiterer Homogenisierungsschritt nötig wird.

Vergleicht man die gefundenen Strukturen beider Polymere nach der Filmmethode, sind einige Unterschiede feststellbar. Die Membran der PI-PEO-Vesikel ist glatt, geschlossen und ohne Falten, während die P2VP-PEO-Vesikel einen sehr kantigen Bilayer mit stellenweise offenen Membrankanten besitzen und die größeren Vesikel meist stark gefaltet sind. Diese Unterschiede sind mit der sehr unterschiedlichen Glasübergangstemperatur  $T_g$  der hydrophoben Polymerblöcke zu erklären, die für Poly(isopren) bei  $-70^\circ\text{C}$  (Quarti et al. 2005) und für Poly(2-vinylpyridin) bei ca.  $+100^\circ\text{C}$  (Gan et al. 1995) liegt.

MLVs wurden häufig bei P2VP-PEO gefunden, bei PI-PEO dagegen nicht. MLVs treten auf, wenn das Wasser beim Quellen die Schichten des Films gut durchdringen und hydratisieren kann und dadurch ein gleichzeitiges Ablösen mehrerer Schichten ermöglicht wird.

#### **4.1.2 Extrusion**

Die Herstellung von Vesikeln mit dem Handextruder (LiposoFast<sup>®</sup>) stellt eine gebräuchliche Methode zur schnellen Gewinnung von Lipidvesikeln im Labormaßstab (1 ml) dar und wird auch zur Homogenisierung von Blockcopolymer-vesikeln eingesetzt (Lee et al. 2001). Zunächst sollte untersucht werden, ob sich im Anschluss an die Filmmethode die Extrusion zur Präparation von Vesikeln aus P2VP-PEO bzw. PI-PEO eignet und durch welche Faktoren die Vesikelgröße beeinflusst wird. Die Analytik der Proben erfolgte über Messung der Größe und Größenverteilung mittels PCS sowie über die mit Cryo-TEM beobachtete Form und Lamellarität der Vesikel.

##### **4.1.2.1 Extrusion in HBS**

Der am häufigsten in dieser Arbeit verwendete Puffer stellt HBS (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) dar. Deshalb wurde zu Beginn überprüft, ob eine Extrusion

mit diesem Puffer bei einer Polymerkonzentration von 10 mg/ml möglich ist und welche minimalen Membranporengrößen verwendet werden können.

Für den Polymertyp PI-PEO wurden zwei verschiedene Polymere (PI-PEO-9 und -18.2), die sich in der Molmasse und dem Blocklängenverhältnis hydrophil-zu-lipophil unterscheiden (Tabelle 4-1), untersucht. Für die vesikelbildenden Eigenschaften spielt dabei das Verhältnis des hydrophilen Anteils zum lipophilen Anteil eine entscheidende Rolle (siehe 1.1.2). Die Molmasse beeinflusst dagegen die Dicke der Vesikelmembran (siehe 1.4.3). Im Vergleich zu PI-PEO-9 besitzt das PI-PEO-18.2 eine etwas geringere Molmasse, die in einer kleineren Membrandicke resultiert, und einen größeren hydrophilen PEO-Anteil, weshalb PI-PEO-18.2 besser zur Vesikelbildung neigt.

Die Größen der Vesikel aus PI-PEO, die 21-mal durch Membranen mit einer deklarierten Porengröße von 200 nm bzw. 100 nm extrudiert wurden, sind der Tabelle 4-2 zu entnehmen. Tabelle 4-3 stellt dagegen die Größen der Vesikel aus P2VP-PEO-8 dar, welche 21-mal durch eine Membran der Porengröße 600 nm bzw. 400 nm extrudiert wurden.

**Tabelle 4-2: Hydrodynamischer Durchmesser und Polydispersität verschiedener PI-PEOs in HBS, extrudiert (n=3)**

| Porengröße der Membran [nm] | PI-PEO-9         |                  | PI-PEO-18.2      |                  |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                             | z-Av [nm] (± sd) | Polyindex (± sd) | z-Av [nm] (± sd) | Polyindex (± sd) |
| 200                         | 174 (± 3)        | 0,17 (± 0,03)    | 246 (± 18)       | 0,32 (± 0,06)    |
| 100                         | 152 (± 9)        | 0,09 (± 0,02)    | 195 (± 6)        | 0,07 (± 0,03)    |

**Tabelle 4-3: Hydrodynamischer Durchmesser und Polydispersität von P2VP-PEO-8 in HBS, extrudiert (n=3)**

| Porengröße der Membran [nm] | z-Av [nm] (± sd) | Polyindex (± sd) |
|-----------------------------|------------------|------------------|
| 600                         | 225 (± 7)        | 0,19 (± 0,04)    |
| 400                         | 205 (± 7)        | 0,11 (± 0,02)    |

Anhand der PCS-Daten kann davon ausgegangen werden, dass die Extrusion ein geeignetes Verfahren darstellt, um Polymervesikel mit einer engen Größenverteilung zu erhalten. Dabei ist die resultierende Vesikelgröße von Proben aus PI-PEO-9 bei gleicher Porengröße der Extrusionsmembran etwas kleiner als die von PI-PEO-18.2. Auffällig ist, dass sich die Proben aus P2VP-PEO-8 nur durch eine minimale Porengröße von 400 nm extrudieren lassen, woraus eine Endgröße von ca. 200 nm resultiert. Diese Beobachtung ist auf die hohe  $T_g$  und damit Starrheit des Polymers ( $T_{g(P2VP)} \approx 100^\circ\text{C}$ ) bei Raumtemperatur zurückzuführen. Als Voraussetzung für eine erfolgreiche Extrusion gilt das Arbeiten oberhalb der Phasenübergangstemperatur (Nayar et al. 1989), was in diesem Fall limitiert ist, da diese im Bereich des Siedepunktes von Wasser liegt.

#### 4.1.2.2 Einfluss von Ethanol

Zur Erleichterung der Extrusion kann die Zugabe von Ethanol hilfreich sein, der den Bilayer durch leichtes Anquellen flüidier macht, die Flow-Rate erhöht und die Erzielung kleinerer Durchmesser ermöglicht (Mui et al. 2003). Da Ethanol wasserlöslich ist und somit wieder leicht über Dialyse oder Gelfiltration aus der Präparation entfernt werden kann, ist seine Verwendung als unbedenklich anzusehen. Die Menge an zugesetztem Ethanol darf jedoch nicht zu hoch gewählt werden (max. 15% V/V), da dies zur Vesikelauflösung führt (Rumplecker 2003).

Wie in Tabelle 4-4 dargestellt, wurde der Einfluss von 5% Ethanol (V/V) auf die Extrusion von P2VP-PEO-8 untersucht.

**Tabelle 4-4: Hydrodynamischer Durchmesser und Polydispersität von P2VP-PEO-8 (10 mg/ml) in HBS mit 5% Ethanol, extrudiert (n=3)**

| Porengröße der Membran [nm] | z-Av [nm] ( $\pm$ sd) | Polyindex ( $\pm$ sd) |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 600                         | 239 ( $\pm$ 6)        | 0,30 ( $\pm$ 0,04)    |
| 400                         | 197 ( $\pm$ 8)        | 0,19 ( $\pm$ 0,02)    |
| 200                         | 188 ( $\pm$ 6)        | 0,13 ( $\pm$ 0,02)    |
| 100                         | 168 ( $\pm$ 2)        | 0,09 ( $\pm$ 0,02)    |

Durch die Verwendung von Ethanol wird die Extrusion von P2VP-PEO-8 deutlich erleichtert und eine Extrusion durch Poren mit 100 nm Durchmesser möglich. Bei PI-PEO-18.2 konnte dagegen kein Einfluss von Ethanol bei der Extrusion durch 100 nm - Membranen beobachtet werden (z-Av:  $193 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$ , Polyindex:  $0,07 \pm 0,03$ ).

#### 4.1.2.3 Einfluss der Polymerkonzentration

Die Größe von Liposomen nach Extrusion zeigt keine Abhängigkeit von der Lipidkonzentration (Kölchens et al. 1993). Es wurde überprüft, ob diese Konzentrationsunabhängigkeit auch für Blockcopolymer-vesikel gilt. Dazu wurden die Proben mit unterschiedlicher Polymerkonzentration bis zur minimal möglichen Porengröße in absteigender Folge (600-400-200-100 nm) je 21-mal extrudiert. Die Größenresultate werden in Tabelle 4-5 und Tabelle 4-6 für die einzelnen Polymere wiedergegeben.

Es kann für beide Polymere eine geringfügige Abhängigkeit der Größe der extrudierten Polymer-vesikel von der Polymerkonzentration festgestellt werden, die tendenziell zeigt, dass die Größe mit wachsender Konzentration steigt. Am deutlichsten ist dabei der Größenunterschied bei sehr niedrigen Konzentrationen (2 mg/ml und 5 mg/ml) zu sehen. Für das Polymer P2VP-PEO-8 sind die erhaltenen Werte jedoch schwer vergleichbar, da verschiedene Porengrößen zur Extrusion verwendet wurden. Eine niedrigere Konzentration von P2VP-PEO-8 lässt dabei eine Extrusion durch kleinere Porengrößen zu, während für PI-PEO-18.2 keine Beeinflussung zu sehen ist.

**Tabelle 4-5: Hydrodynamischer Durchmesser und Polydispersität von P2VP-PEO-8 in HBS in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration, extrudiert (n=3)**

| Polymerkonzentration [mg/ml] | Porengröße der Membran [nm] | z-Av [nm] ( $\pm$ sd) | Polyindex ( $\pm$ sd) |
|------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 2                            | 100                         | 141 ( $\pm$ 2)        | 0,05 ( $\pm$ 0,02)    |
| 5                            | 200                         | 196 ( $\pm$ 5)        | 0,11 ( $\pm$ 0,02)    |
| 10                           | 400                         | 204 ( $\pm$ 6)        | 0,16 ( $\pm$ 0,05)    |

**Tabelle 4-6: Hydrodynamischer Durchmesser und Polydispersität von PI-PEO-18.2 in HBS in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration, extrudiert (n=3)**

| Polymerkonzentration [mg/ml] | Porengröße der Membran [nm] | z-Av [nm] (± sd) | Polyindex (± sd) |
|------------------------------|-----------------------------|------------------|------------------|
| 2                            | 100                         | 165 (± 3)        | 0,05 (± 0,04)    |
| 5                            | 100                         | 195 (± 4)        | 0,07 (± 0,02)    |
| 10                           | 100                         | 194 (± 4)        | 0,06 (± 0,03)    |

**4.1.2.4 Einfluss der Ionenstärke**

Als Hydratisierungsmedium wird hauptsächlich isotonisierter Puffer verwendet, der Voraussetzung für eine spätere biologische Anwendung ist. Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob verschiedene Tonizitäten des Puffers einen Einfluss auf die Vesikelgröße ausüben. Die Polymere (10 mg/ml) wurden dazu in 10 mM HEPES-Puffer pH 7,4, der unterschiedliche Mengen NaCl enthielt, hydratisiert und extrudiert.

**Tabelle 4-7: Hydrodynamischer Durchmesser und Polydispersität in 10 mM HEPES pH 7,4 mit verschiedenen NaCl-Gehalten, extrudiert (n=3)**

| Gehalt NaCl [mM] | P2VP-PEO-8       |                  | PI-PEO-18.2      |                  |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                  | z-Av [nm] (± sd) | Polyindex (± sd) | z-Av [nm] (± sd) | Polyindex (± sd) |
| 0                | 202 (± 6)        | 0,11 (± 0,02)    | 191 (± 5)        | 0,03 (± 0,02)    |
| 20               | 208 (± 5)        | 0,13 (± 0,02)    | 188 (± 3)        | 0,03 (± 0,02)    |
| 50               | 195 (± 2)        | 0,12 (± 0,02)    | 193 (± 2)        | 0,06 (± 0,01)    |
| 100              | 199 (± 3)        | 0,12 (± 0,01)    | 189 (± 2)        | 0,04 (± 0,03)    |
| 150              | 208 (± 3)        | 0,15 (± 0,01)    | 192 (± 3)        | 0,09 (± 0,02)    |

Tabelle 4-7 zeigt, dass bei der Extrusion kein Einfluss der Ionenstärke auf die Größe der resultierenden Polymervesikel festzustellen ist. Dagegen sinkt die bei der Extrusion anzuwendende Presskraft, je höher der Gehalt an NaCl ist. Anzumerken ist, dass ein direktes Vergleichen der Größen schwierig ist. Bei PCS-Messungen wird der hydrodynamische Durchmesser bestimmt, welcher durch Salzzusätze beeinflusst wird. Salze führen zu einer Komprimierung der Hydrathülle und dadurch zu einer leichten Veränderung der gemessenen Teilchengröße.

#### 4.1.2.5 Einfluss anderer Puffermedien

Da die Tonizität des Puffers keinen Einfluss auf die Größe hat, wurde untersucht inwieweit die Art des Puffers eine Änderung auf die Vesikelgröße ausübt. Für P2VP-PEO-8 wurden mehrere Medien bei gleichem pH-Wert getestet (Tabelle 4-8), da bei diesem Polymer aufgrund des sekundären Stickstoffes im 2-Vinylpyridin eher eine Beeinflussung vermutet wird. Für PI-PEO wurde dagegen nur der Einfluss von Phosphat-Puffer untersucht (Tabelle 4-9), welcher eine Rolle bei der DXR-Beladung (Kap. 4.3.2) von Vesikeln spielte.

**Tabelle 4-8: Hydrodynamischer Durchmesser und Polydispersität von P2VP-PEO-8 in verschiedenen Medien, pH 7,4, extrudiert (Porengröße 200 nm) (n=3)**

| Medium            | z-Av [nm] ( $\pm$ sd) | Polyindex ( $\pm$ sd) |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| HEPES 50 mM       | 212 ( $\pm$ 8)        | 0,14 ( $\pm$ 0,03)    |
| Wasser            | 204 ( $\pm$ 5)        | 0,13 ( $\pm$ 0,02)    |
| Na-Phosphat 50 mM | 208 ( $\pm$ 5)        | 0,14 ( $\pm$ 0,04)    |
| MOPS 50 mM        | 214 ( $\pm$ 5)        | 0,15 ( $\pm$ 0,03)    |
| TRIS 50 mM        | 202 ( $\pm$ 4)        | 0,13 ( $\pm$ 0,02)    |

Bei P2VP-PEO-8 kann kein Unterschied in der Größe nach Extrusion in verschiedenen Medien festgestellt werden. Nur bei PI-PEO-18.2 wird in höher konzentriertem Ammoniumphosphat-Puffer (300 mM) ein deutlich größerer Vesikeldurchmesser erreicht. Dies lässt die Vermutung zu, dass ein gewisser Einfluss der Tonizität auf die Größe besteht.

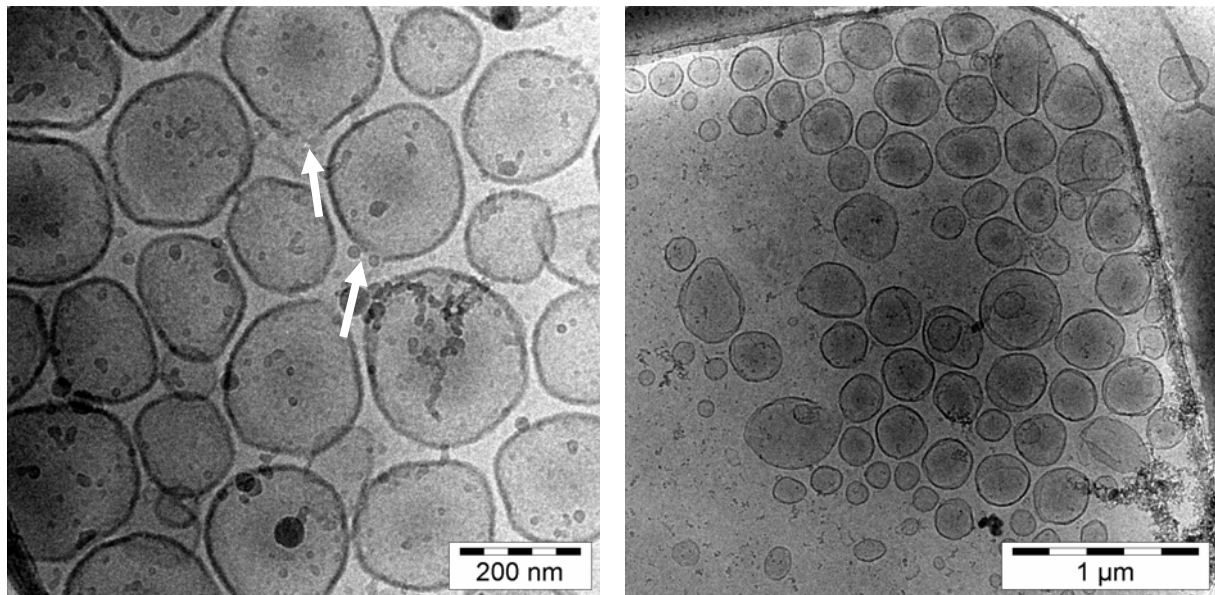
**Tabelle 4-9: Hydrodynamischer Durchmesser und Polydispersität von PI-PEO-9 und PI-PEO-18.2 in verschiedenen Medien, pH 7.4, extrudiert (Porengröße 100 nm) (n=3)**

| Medium                                                       | PI-PEO-9            |                     | PI-PEO-18.2         |                     |
|--------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                                                              | z-Av [nm]<br>(± sd) | Polyindex<br>(± sd) | z-Av [nm]<br>(± sd) | Polyindex<br>(± sd) |
| Wasser                                                       | 187<br>(± 5)        | 0,11<br>(± 0,05)    | 163<br>(± 3)        | 0,17<br>(± 0,02)    |
| Na-Phosphat [10 mM,<br>140 mM NaCl]                          | 183<br>(± 9)        | 0,13<br>(± 0,02)    | 192<br>(± 2)        | 0,03<br>(± 0,03)    |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>[300 mM] | 241<br>(± 13)       | 0,17<br>(± 0,06)    | 240<br>(± 9)        | 0,10<br>(± 0,03)    |

#### 4.1.2.6 Cryo-TEM

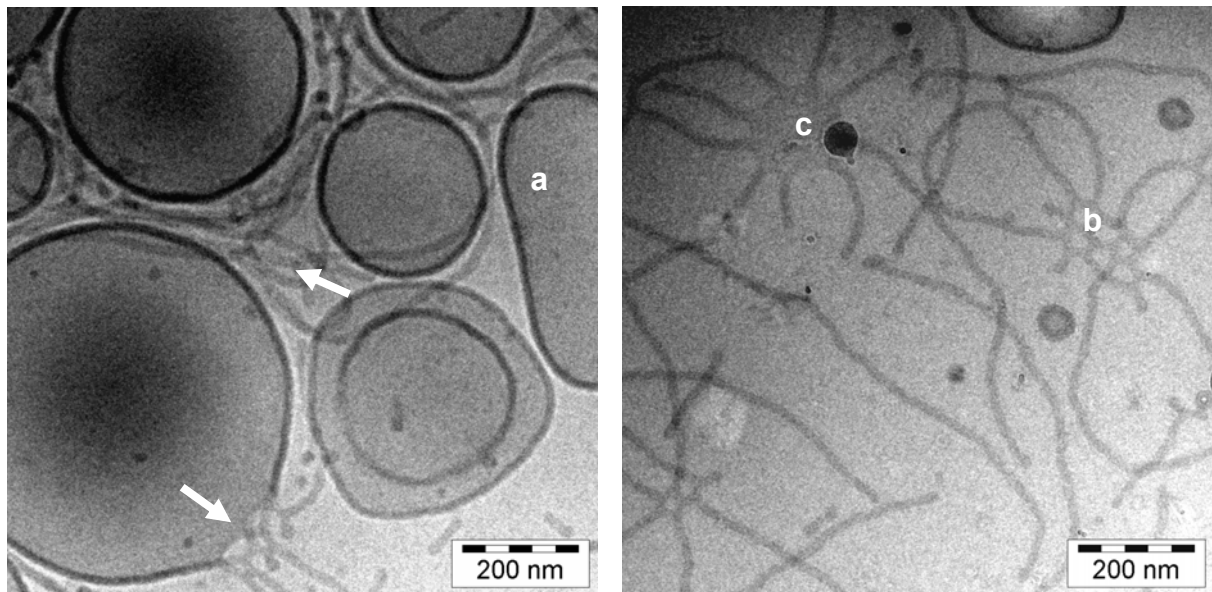
Zur Beurteilung des Herstellungsverfahrens ist neben der Größenbestimmung auch die Kenntnis über die Struktur der gebildeten Vesikel von Bedeutung. Mittels Cryo-TEM können die extrudierten Polymerproben hinsichtlich ihrer Größe, Form, Lamellarität und Bilayerdicke näher charakterisiert werden.

Abbildung 4-6 zeigt extrudierte Vesikel aus P2VP-PEO-8 mit kantigen und z.T. nicht vollständig geschlossenen (siehe Pfeil) Membranen, die ein typisches Zeichen für Bilayer unterhalb der Phasenübergangstemperatur sind. Die kleineren dunklen Punkte auf den Aufnahmen stammen von anhaftenden Ethanresten.



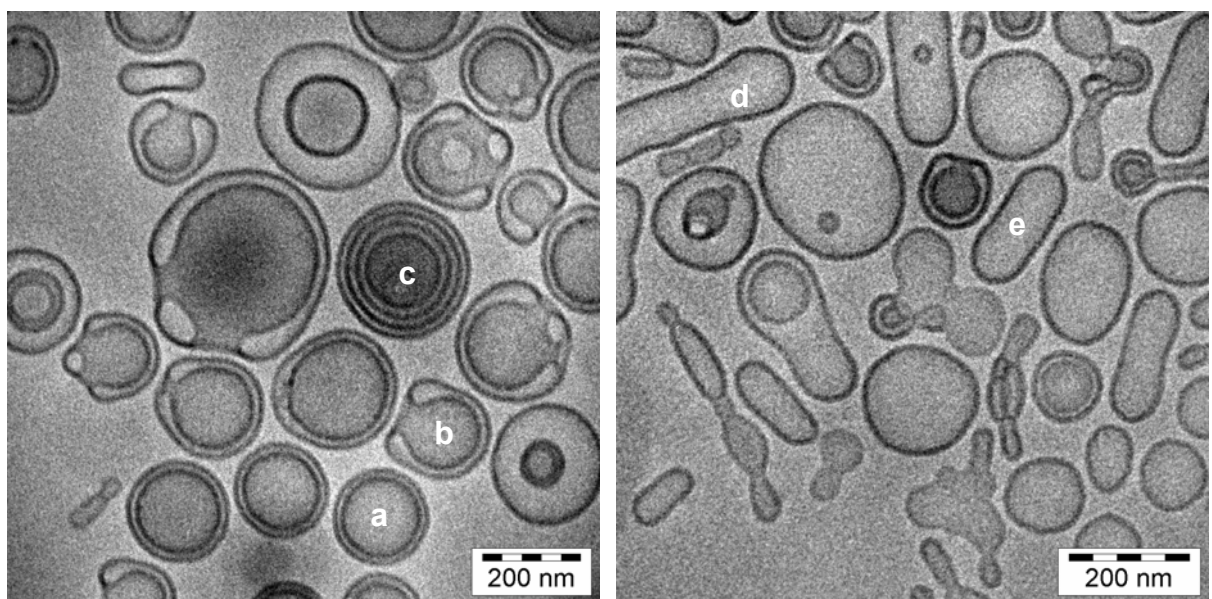
**Abbildung 4-6: Cryo-TEM von P2VP-PEO-8 in HBS, extrudiert (Porengröße 200 nm)**

In Abbildung 4-7 sind Vesikel aus PI-PEO-9 in Koexistenz mit Wurmmizellen dargestellt. Die Membranen der Vesikel sind im Vergleich zu P2VP-PEO-8 ebenmäßiger und die Vesikelform ist zum Teil länglich (linkes Bild, a), was auf eine geringere Membranstarrheit hinweist. Im rechten Bild sieht man deutlich Wurmmizellen, welche teilweise ein Netzwerk (b) ausbilden oder aus einer Scheibenmizelle (c) entspringen. Das gleichzeitige Vorhandensein von Wurmmizellen und Vesikeln ist zum einen auf die breitere Molmassenverteilung von Polymeren zurückzuführen. Zum anderen muss bei diesem Polymer das Verhältnis zwischen hydrophilem zu hydrophobem Block und damit der Packungsparameter in Wasser (siehe 1.1.2) sehr nahe an der Grenze zwischen diesen beiden Aggregationsformen liegen (Won et al. 2002).



**Abbildung 4-7: Cryo-TEM von PI-PEO-9 in HBS, extrudiert (Porengröße 100 nm)**

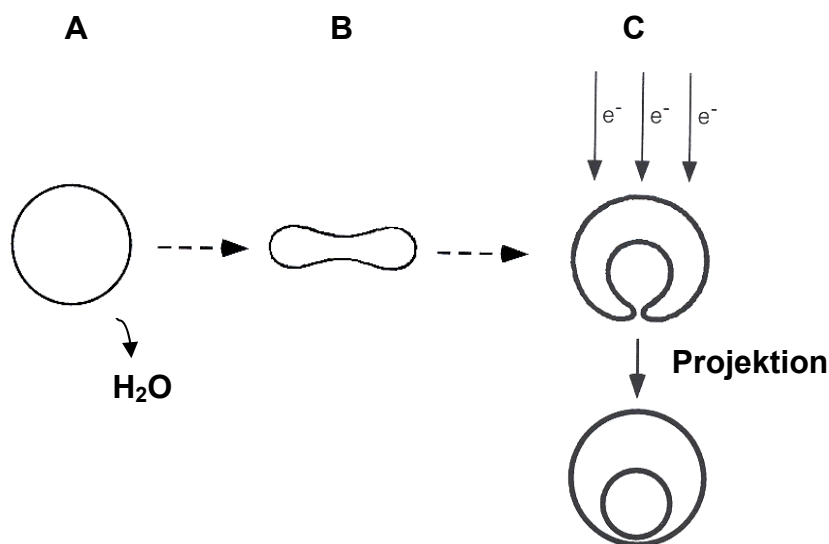
Im Vergleich dazu enthält PI-PEO-18.2 nach der Extrusion ausschließlich Vesikel wie in der Abbildung 4-8 zu erkennen ist. Auffällig ist im linken Bild das Vorhandensein von fast ausschließlich bilamellaren Vesikeln (a), die z.T. aus U-förmigen Membranen (b) bestehen, und einem multilamellaren Vesikel (c). Im rechten Bild sind einige ovale lang gestreckte Vesikel (d, e) zu sehen, die aus dem Extrusionsprozess stammen oder durch osmotische Effekte induziert worden sein können.



**Abbildung 4-8: Cryo-TEM von PI-PEO-18.2 in HBS, extrudiert (Porengröße 100 nm)**

Solche länglichen und bilamellaren Formen treten bei Liposomen häufig als Folge von osmotischen Einflüssen auf, die zum Austritt von Wasser aus dem Vesikel und dadurch zu einer Änderung des Verhältnis zwischen Oberfläche zu Vesikelvolumen führen. Da die Oberfläche im Gegensatz zum Volumen konstant bleibt, treten wie in Abbildung 4-9 dargestellt, bevorzugt Vesikel (A), oblatenförmige (B) oder stomatozytenartige (C) Strukturen auf. Jede Struktur stellt dabei die niedrigste Energiekonfiguration für das jeweilige Volumen-Flächen-Verhältnis dar (Seifert et al. 1991).

Die Interpretation solcher Cryo-TEM Aufnahmen wird erschwert, da es sich hier um eine Aufsicht handelt. Aus diesem Grund kann nicht differenziert werden, ob es sich bei den Stomatozyten um ein kollabiertes oder ein bilamellares Vesikel handelt.

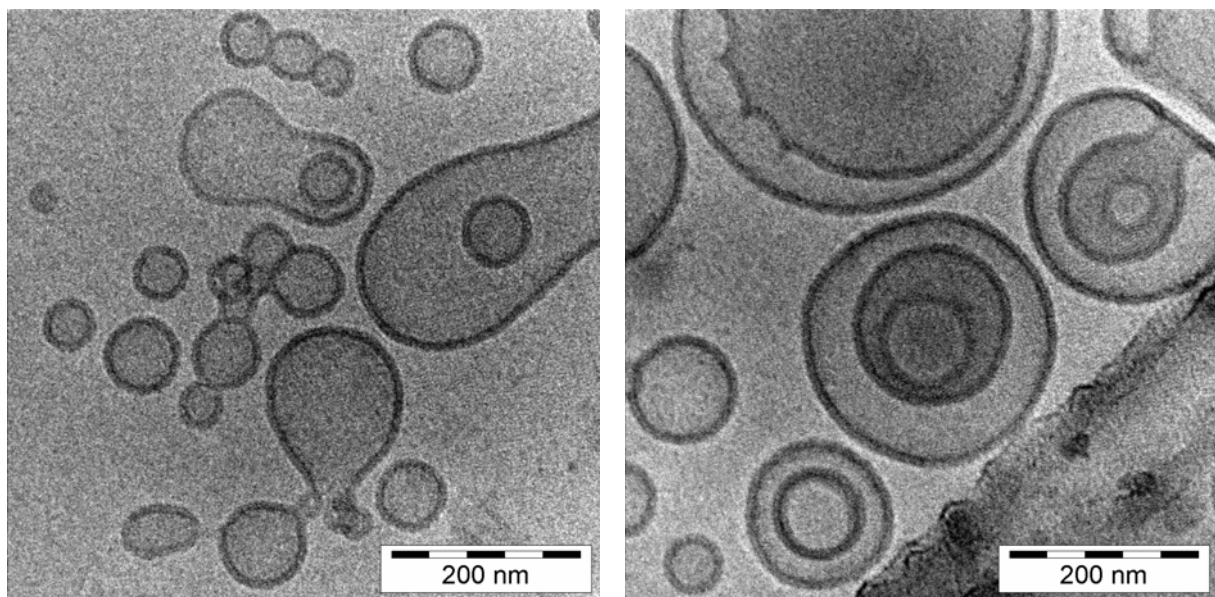


**Abbildung 4-9: Schematische Darstellung der morphologischen Umwandlung eines Vesikels in einen „Stomatozyten“ (nach Berclaz 1999)**

Ursachen für eine osmotisch bedingte Formänderung können einerseits in der Cryo-Präparation von puffersalzhaltigen Proben liegen. Bei der Probenpräparation kann es - vor dem Einfrieren - zum Verdunsten von Wasser aus dem dünnen Probenfilm kommen. Dies führt zu einem Anstieg der Salzkonzentration außerhalb des Vesikels und wiederum zu einer Wasserpermeation aus dem Vesikel heraus. Zur Verhinderung von Artefaktbildung dieser Art wird für die Präparation das Arbeiten in einer Klimakammer empfohlen, in der Luftfeuchtigkeit und Temperatur kontrolliert werden können (Bellare et al. 1988, Egelhaaf et al. 2000).

Zusätzlich muss das Vesikel bei der Extrusion deformiert werden, um durch eine Pore gepresst werden zu können (Hunter & Frisken 1998). Dabei kommt es zu einer Verlängerung des Vesikels durch Volumenreduktion, also Ausstrom von Wasser aus dem Vesikel. Dieser Effekt und das Auftreten von länglichen Vesikeln wurden in salzhaltigen Liposomenproben beobachtet, während bei Proben in Wasser ausschließlich runde Vesikel gefunden wurden (Mui et al. 1993).

Um eine durch osmotische Effekte verursachte Artefaktbildung während der Probenpräparation einer PI-PEO-18.2 Probe (Abbildung 4-8) ausschließen zu können, wurde eine in Wasser extrudierte Polymerprobe im Cryo-TEM betrachtet (Abbildung 4-10). Auch in Wasser sind ähnliche Strukturen wie in der puffersalzhaltigen Probe zu finden, was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei um für dieses Polymer typische Vesikelformen handelt und nicht durch osmotischen Stress bedingte Artefakte.

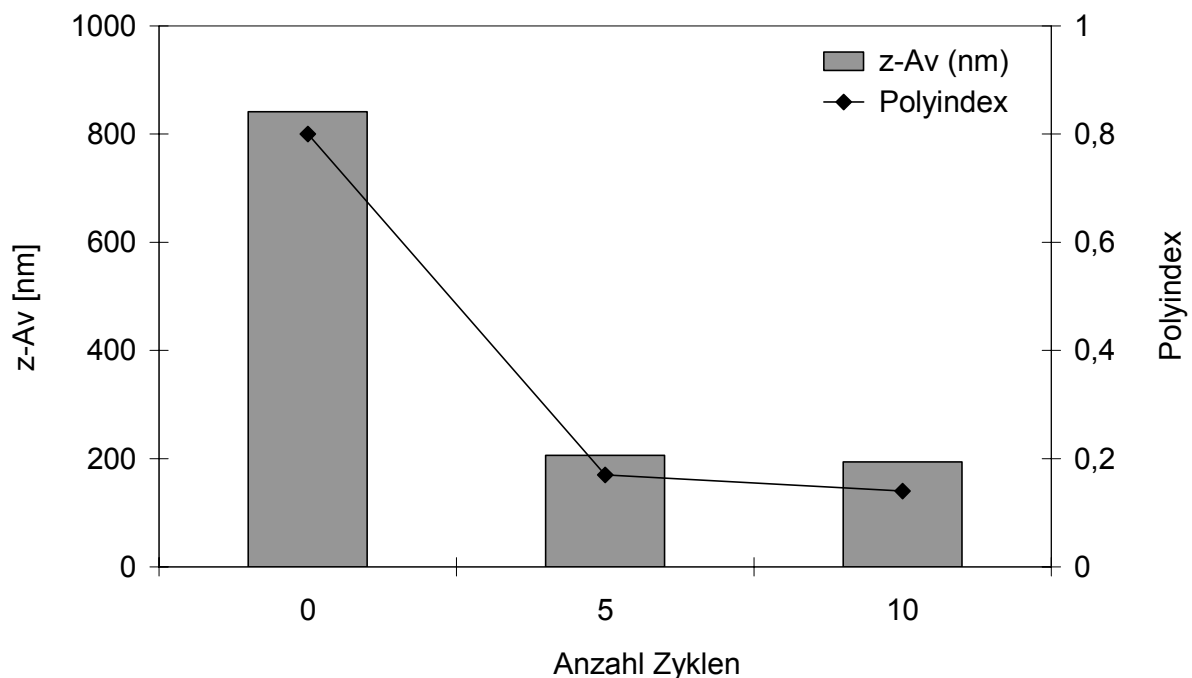


**Abbildung 4-10: Cryo-TEM von PI-PEO-18.2 in Wasser, extrudiert (Porengröße 100 nm)**

In der Literatur wurden für das dem PI-PEO chemisch sehr ähnliche Polymer PB-PEO in Cryo-TEM-Aufnahmen analoge Morphologien sowohl vor (Won et al. 2002, siehe Abbildung 4-8 B) als auch nach (Discher et al. 1999) Extrusion gefunden, was die Annahme unterstützt, dass es sich um stabile Aggregationsformen handelt und nicht um Cryo- bzw. Extrusions-Artefakte.

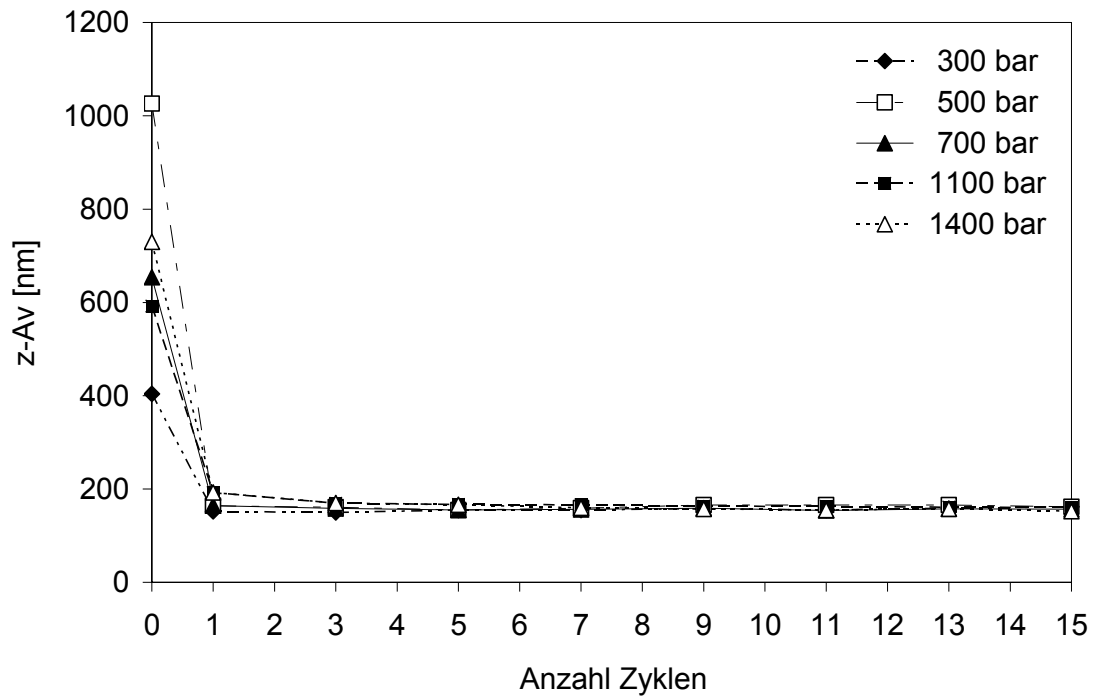
### 4.1.3 Hochdruckhomogenisation

Die schnelle Homogenisierung großer Mengen ( $\geq 20$  ml) an Polymerdispersion wird durch die Verwendung eines Hochdruckhomogenisators ermöglicht. Im Gegensatz zum Extruder, bei dem die Größe der Vesikel vor allem durch die Porengröße der Membran bestimmt wird, wird die Polymervesikelgröße beim Hochdruckhomogenisator durch den Druck und die Anzahl der Zyklen beeinflusst. Aufgrund des hohen Verbrauchs an Polymermaterial (mind. 200 mg pro Ansatz) wurden die Versuche nur einmal durchgeführt bzw. das Polymer PI-PEO-18.2 wurde nicht hochdruckhomogenisiert. Für das Polymer P2VP-PEO-8 wird schon nach 5 Zyklen eine deutliche Größenreduktion auf 200 nm mit einer relativ engen Größenverteilung ( $PDI < 0,2$ ) erzielt (Abbildung 4-11).

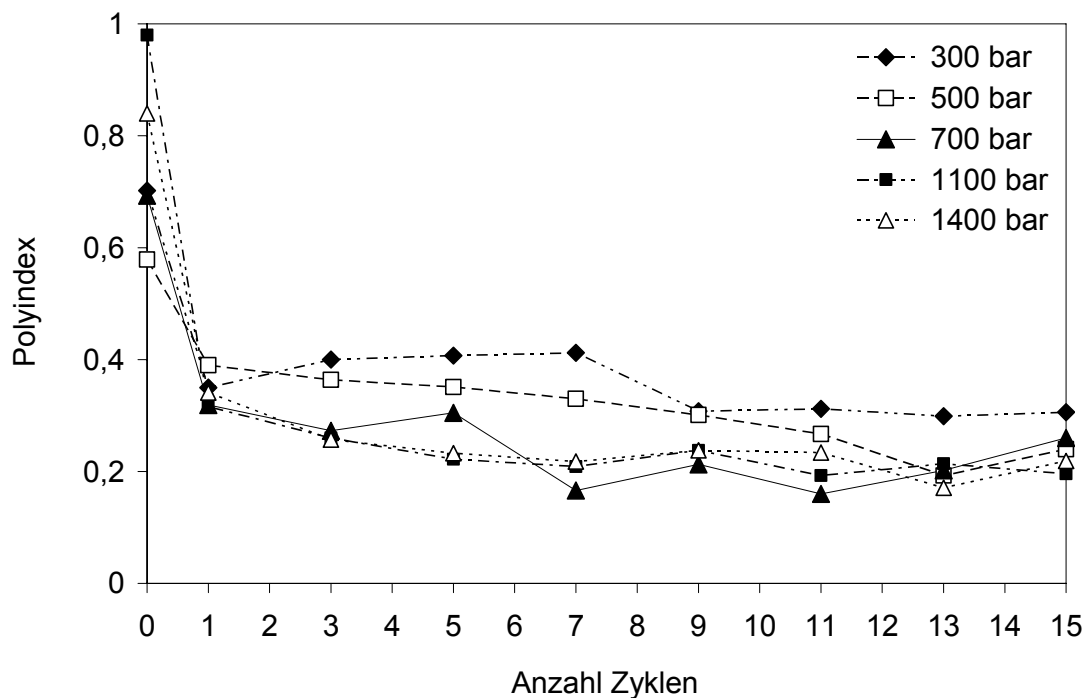


**Abbildung 4-11: Größe und Größenverteilung der Vesikel aus P2VP-PEO-8 in HBS nach Hochdruckhomogenisation bei 700 bar (n=1)**

Für das Polymer PI-PEO-9 wird die Größe, unabhängig von der Druckstufe, schon nach einem Homogenisationszyklus auf ca. 160 nm reduziert (Abbildung 4-12). Weitere Durchläufe führen zu keiner weiter bedeutenden Größenänderung. Die Vesikelgrößen sind auch nach mehreren Zyklen noch relativ breit verteilt (Polyindices zwischen 0,2 und 0,3). Höhere Drücke ( $\geq 700$  bar) führen dabei zu geringfügig besseren Polyindices als niedrige Drücke (Abbildung 4-13).

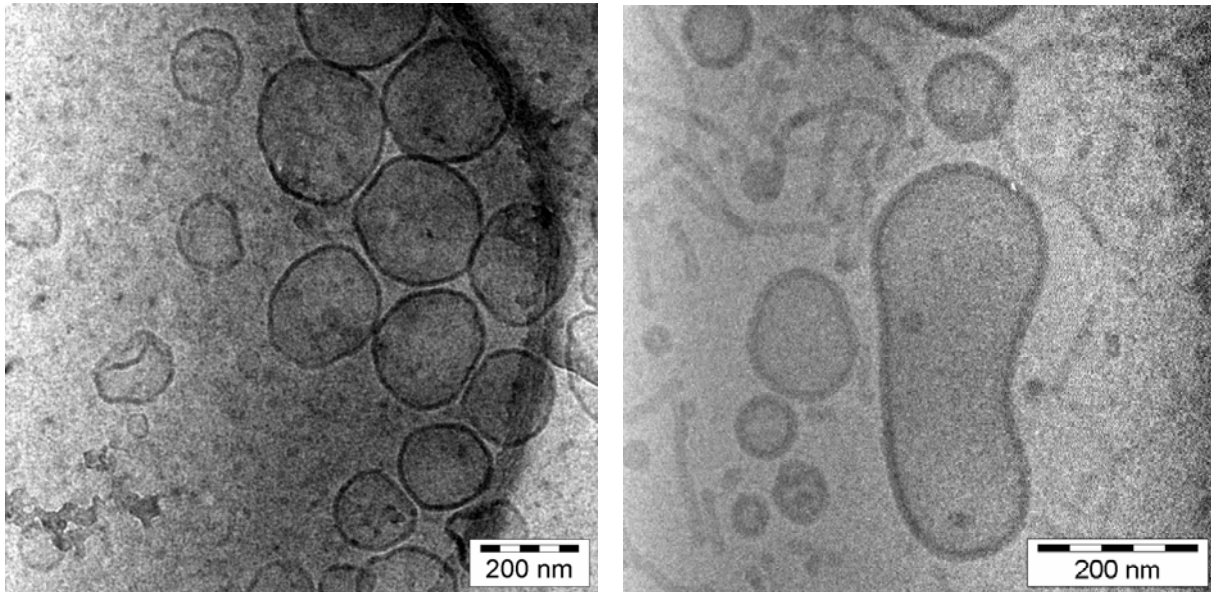


**Abbildung 4-12: Größe von PI-PEO-9 in HBS nach Hochdruckhomogenisation bei verschiedenen Druckstufen (n=1)**



**Abbildung 4-13: Größenverteilung von PI-PEO-9 in HBS nach Hochdruckhomogenisation bei verschiedenen Druckstufen (n=1)**

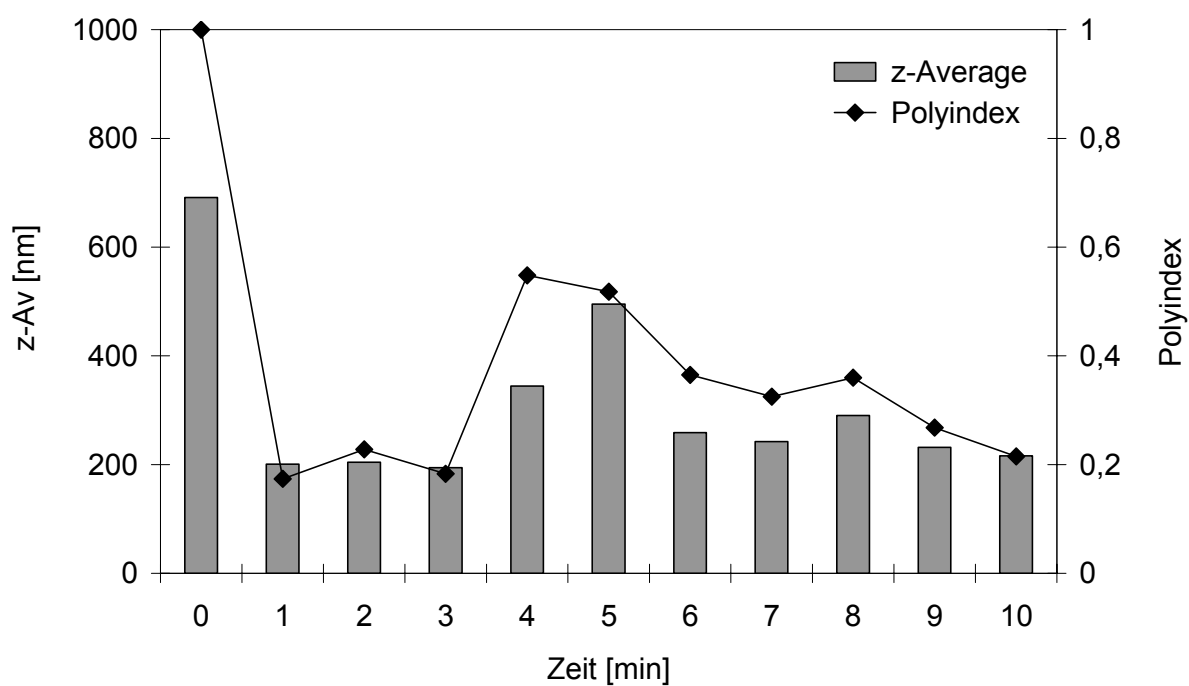
Das Aussehen der Vesikel gleicht den Strukturen, welche bereits zuvor bei der Extrusion beschrieben wird (Abbildung 4-14). Bei dem Polymer PI-PEO-9 ist wieder eine große Anzahl von Wurmmizellen neben Vesikeln zu erkennen, was zugleich eine Erklärung für den schlechteren Polyindex darstellt.



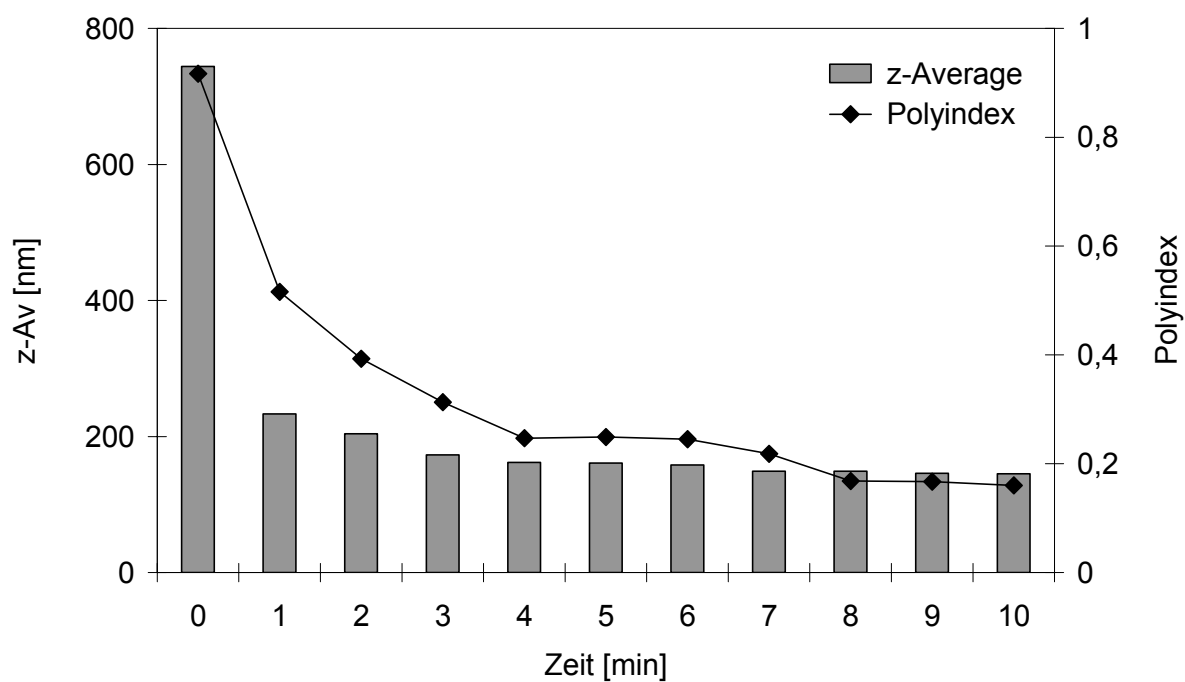
**Abbildung 4-14: Cryo-TEM von P2VP-PEO-8 (links, 10 Zyklen) und PI-PEO-9 (rechts, 11 Zyklen) nach Hochdruckhomogenisation bei 700 bar**

#### 4.1.4 Ultraschall

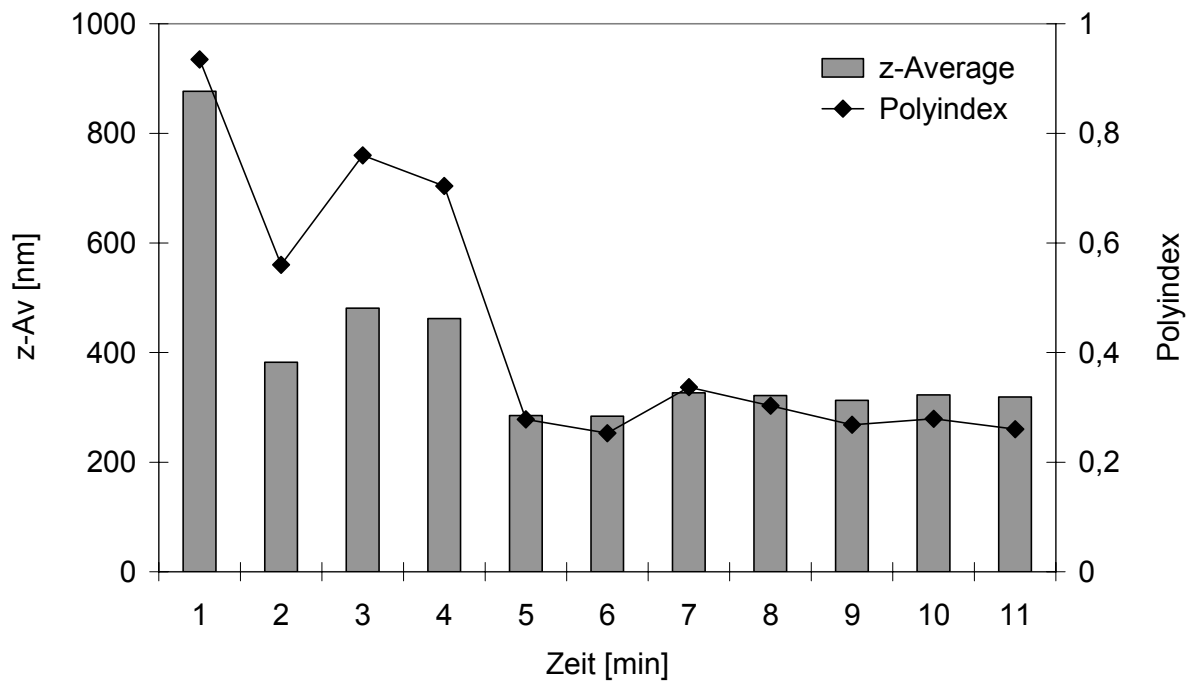
Mit der Ultraschallspitze wird bei 40% Amplitude die Größe der Vesikel nach einer Minute Beschallungszeit beträchtlich reduziert. Eine direkte Beschallung mit 70% Amplitude führt jedoch aufgrund des hohen Energieeintrages zu sehr schlechten Ergebnissen. Bei PVP-PEO-8 wird nach drei Minuten das beste Resultat mit einer Größe von 183 nm und einem Polyindex von 0,18 erzielt, welches sich mit weiterer Beschallung wieder verschlechtert (Abbildung 4-15). Auch PI-PEO-18.2 besitzt nach fünf Minuten das Optimum mit 284 nm und einem PDI von 0,25 (Abbildung 4-17). Das Polymer PI-PEO-9 zeigt dagegen eine kontinuierliche Verbesserung der Größe und Größenverteilung mit zunehmender Beschallungsdauer und die Probe enthält nach zehn Minuten 145 nm große Teilchen mit einem Polyindex von 0,16 (Abbildung 4-16).



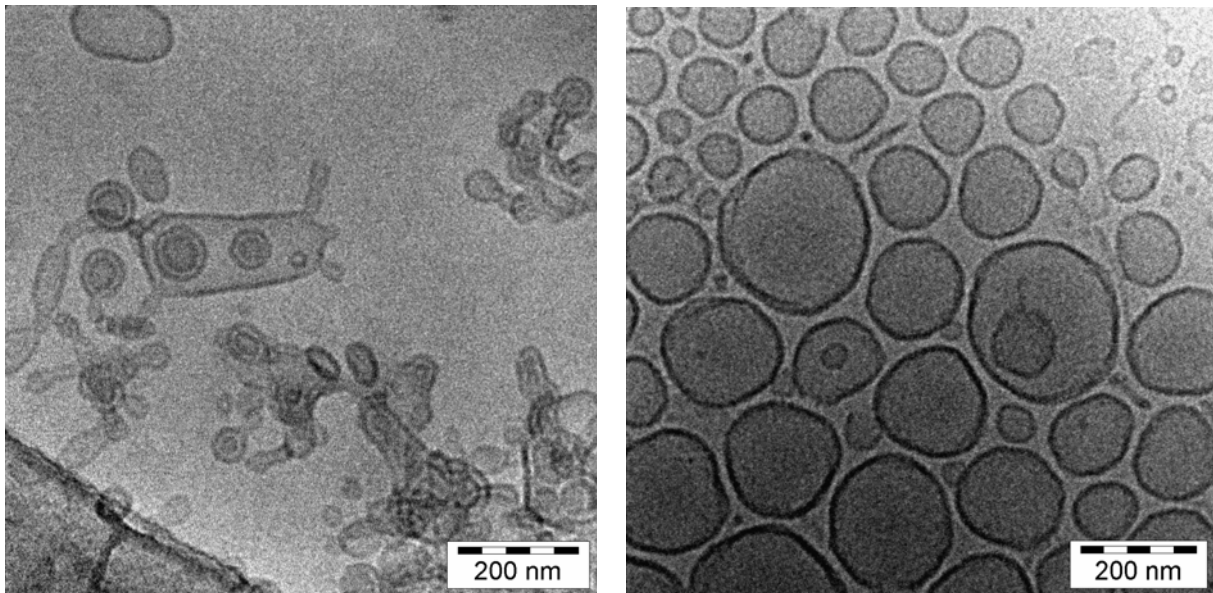
**Abbildung 4-15: P2VP-PEO-8 in HBS, Ultraschallspitze 40% Amplitude (sd < 10%) (n=3)**



**Abbildung 4-16: PI-PEO-9 in HBS, Ultraschallspitze 40% Amplitude (sd < 8%) (n=3)**



**Abbildung 4-17: PI-PEO-18.2 in HBS, Ultraschallspitze 40% Amplitude (sd < 12%) (n=3)**



**Abbildung 4-18: Cryo-TEM Aufnahme nach 10 min Ultraschallspitze 40% Amplitude von PI-PEO-18.2 (links) bzw. P2VP-PEO-8 (rechts)**

Der Energieeintrag mit der Ultraschallspitze führt zu sehr starker mechanischer und thermischer Beanspruchung der Probe. Abbildung 4-18 zeigt eine Cryo-TEM Aufnahme des Polymers PI-PEO-18.2, in der sehr viele Ausstülpungen an den vesikulären Strukturen zu erkennen sind, die ein Zeichen solch einer Belastung sind. Das Polymer P2VP-PEO-8 zeigt dagegen keine Anzeichen einer Veränderung.

#### 4.1.5 Detergenzdialyse

In einem Vorversuch wurde zunächst untersucht, welche Detergenzien sich zur Dialyse der Polymere eignen. Dazu wurde ein Polymerfilm mit einer wässrigen Tensidlösung resuspendiert, so dass die Endkonzentrationen an Polymer 1 mM und die des Tensides 50 mM (> CMC) betrugen. Ein Tensid galt als geeignet, wenn es eine klare Mischmizellenlösung mit dem Polymer ausbildete. Während für PI-PEO mehrere Detergenzien in Frage kommen, ist für das P2VP-PEO-8 nur das ionische Tensid SDS verwendbar (Tabelle 4-10).

**Tabelle 4-10: Getestete Detergenzien**

| Detergenz                         | CMC [mM]                | PI-PEO | P2VP-PEO |
|-----------------------------------|-------------------------|--------|----------|
| <i>Ionische Detergenzien</i>      |                         |        |          |
| Natriumcholat                     | 14,6 * <sup>[1]</sup>   | nein   | nein     |
| SDS                               | 8 * <sup>[1]</sup>      | ja     | ja       |
| <i>Nichtionische Detergenzien</i> |                         |        |          |
| OG                                | 24,5 * <sup>[1]</sup>   | ja     | nein     |
| C <sub>8</sub> E <sub>4</sub>     | 0,4 ** <sup>[2]</sup>   | ja     | nein     |
| C <sub>12</sub> E <sub>10</sub>   | 0,2 * <sup>[3]</sup>    | n.d.   | nein     |
| C <sub>16</sub> E <sub>10</sub>   | 0,004 ** <sup>[2]</sup> | n.d.   | nein     |
| DDM                               | 0,17 * <sup>[1]</sup>   | n.d.   | nein     |

\* Wasser, \*\* HBS; n.d. – nicht untersucht

<sup>[1]</sup> Schubert (2003), <sup>[2]</sup> Kim (2001), <sup>[3]</sup> [www.anatrace.com](http://www.anatrace.com)

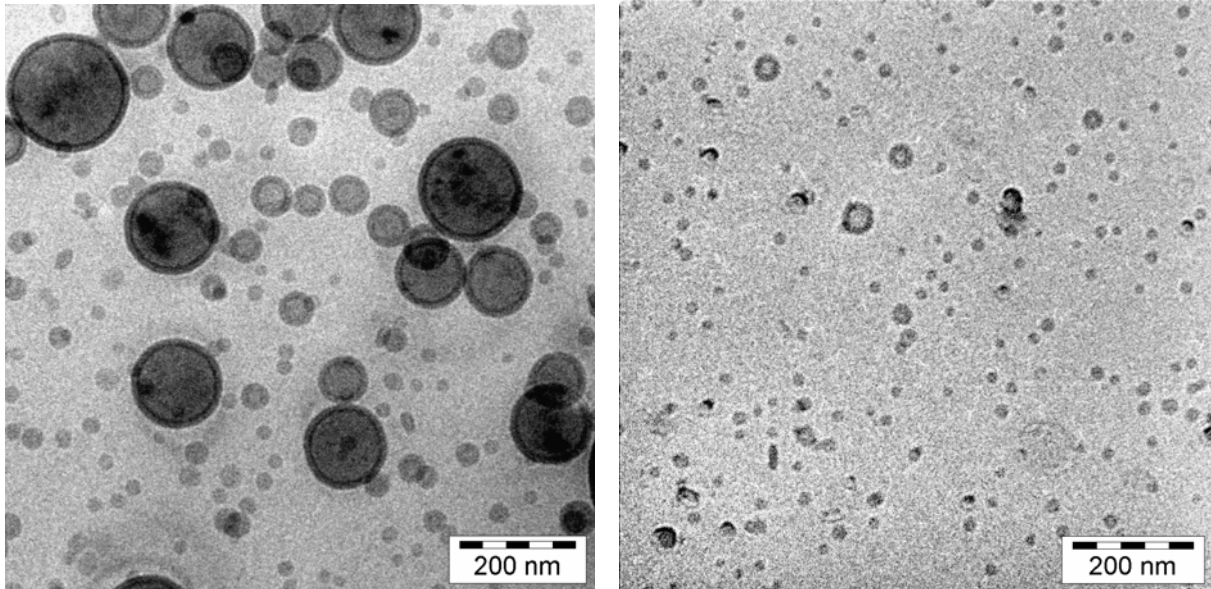
Im Anschluss daran wurden verschiedene Dialyseansätze, die Tabelle 4-11 zu entnehmen sind, getestet und über drei Tage gegen verschiedene Medien dialysiert. Die mit PCS ermittelten Größenverteilungen sind in allen Fällen sehr breit.

**Tabelle 4-11: Größe und Größenverteilung der einzelnen Dialyseansätze**

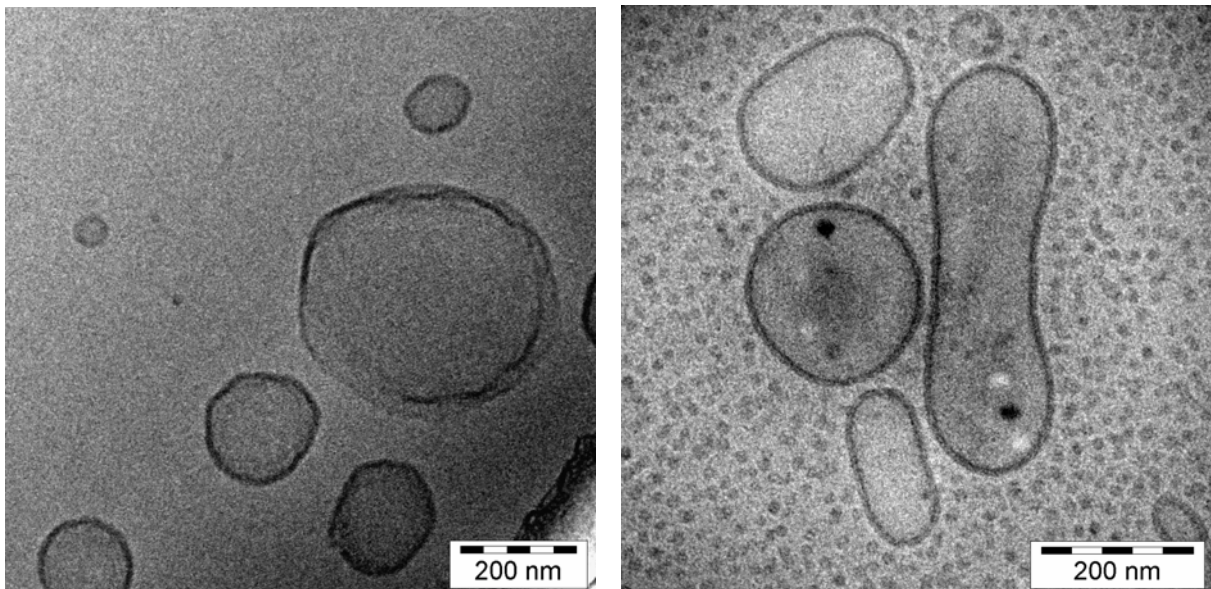
| Polymer<br>[1 mM] | Detergenz                     |    | Dialyse-<br>medium | z-Av [nm] | Polyindex |
|-------------------|-------------------------------|----|--------------------|-----------|-----------|
|                   | Typ                           | mM |                    |           |           |
| PI-PEO-9          | C <sub>8</sub> E <sub>4</sub> | 5  | HBS                | 145       | 0,53      |
|                   |                               |    | Wasser             | 221       | 0,81      |
|                   | OG                            | 10 | HBS                | 177       | 0,69      |
|                   | SDS                           | 25 | HBS                | 126       | 0,64      |
|                   |                               |    | PBS                | 188       | 0,58      |
| PI-PEO-18.2       | C <sub>8</sub> E <sub>4</sub> | 5  | HBS                | 81,9      | 0,59      |
|                   |                               |    | Wasser             | 94,2      | 0,61      |
|                   | OG                            | 10 | HBS                | 99,2      | 0,62      |
|                   |                               |    | Wasser             | 92,1      | 0,49      |
| P2VP-PEO-8        | SDS                           | 25 | HBS                | 186       | 0,26      |
|                   |                               |    | PBS                | 171       | 0,23      |

Die Cryo-TEM-Aufnahmen zeigen, dass die Detergenzdialyse zur Bildung unilamellarer Vesikel führt. In der linken Abbildung 4-19 ist die breite Größenverteilung (36 nm bis 170 nm) der Vesikel aus PI-PEO-9 gut zu sehen. Im Bild daneben sind dagegen nur wenige größere Vesikel mit vielen kleinen, runden Strukturen, die von Mizellen oder sehr kleinen Vesikeln stammen, zu erkennen. Diese Probe wurde zu einem späteren Zeitpunkt präpariert (ca. 15 Monate später) und deutet aufgrund des veränderten Verhaltens auf eine Alterung des Polymers hin. Interessant ist die ausschließlich runde Form der Vesikel und das Fehlen von Wurmmizellen, wie es bei den mechanischen Präparationsmethoden (siehe 4.1.2.6) zuvor beobachtet wurde. Das Polymer PI-PEO-18.2 zeigt, ebenso wie PI-PEO-9, viele kleine Strukturen neben großen Vesikeln (Abbildung 4-20, rechts).

In der dialysierten Probe von P2VP-PEO-8 (Abbildung 4-20, links) sind dagegen ausschließlich als Vesikel identifizierbare Strukturen enthalten, deren Größenverteilung sich vergleichsweise eng darstellt.



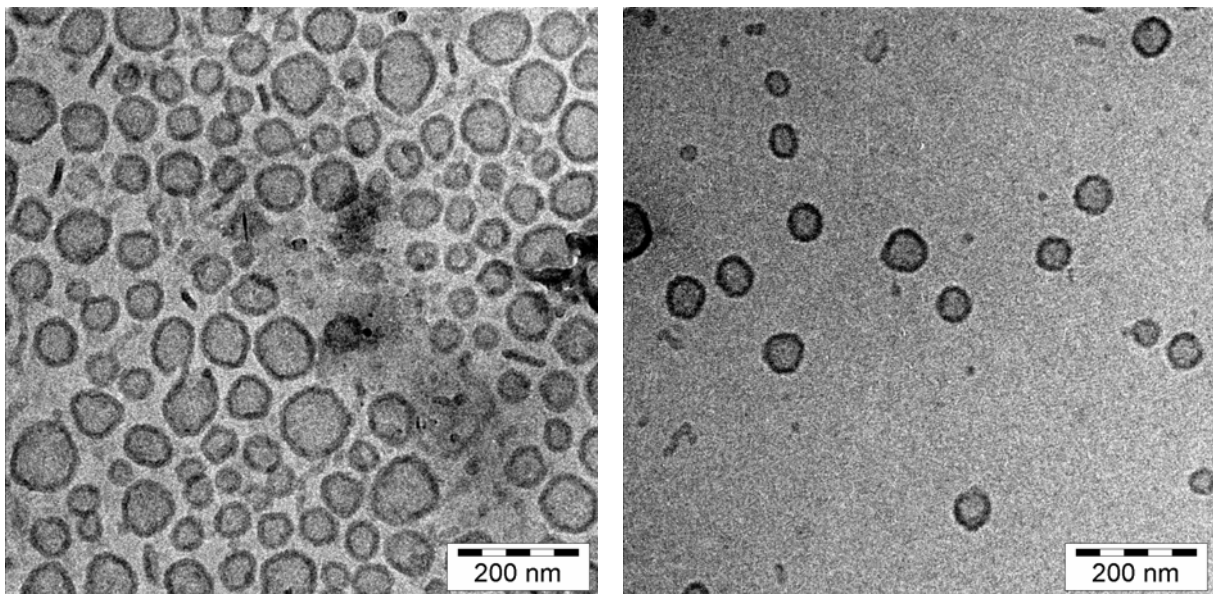
**Abbildung 4-19: Cryo-TEM von PI-PEO-9: Dialyse von  $C_8E_4$ , links: „frisches“ Polymer (in Wasser), rechts: älteres Polymer (in HBS)**



**Abbildung 4-20: Cryo-TEM links: P2VP-PEO-8 in PBS, SDS dialysiert gegen PBS, rechts: PI-PEO-18.2 in HBS, OG dialysiert gegen HBS**

#### 4.1.6 Temperatur

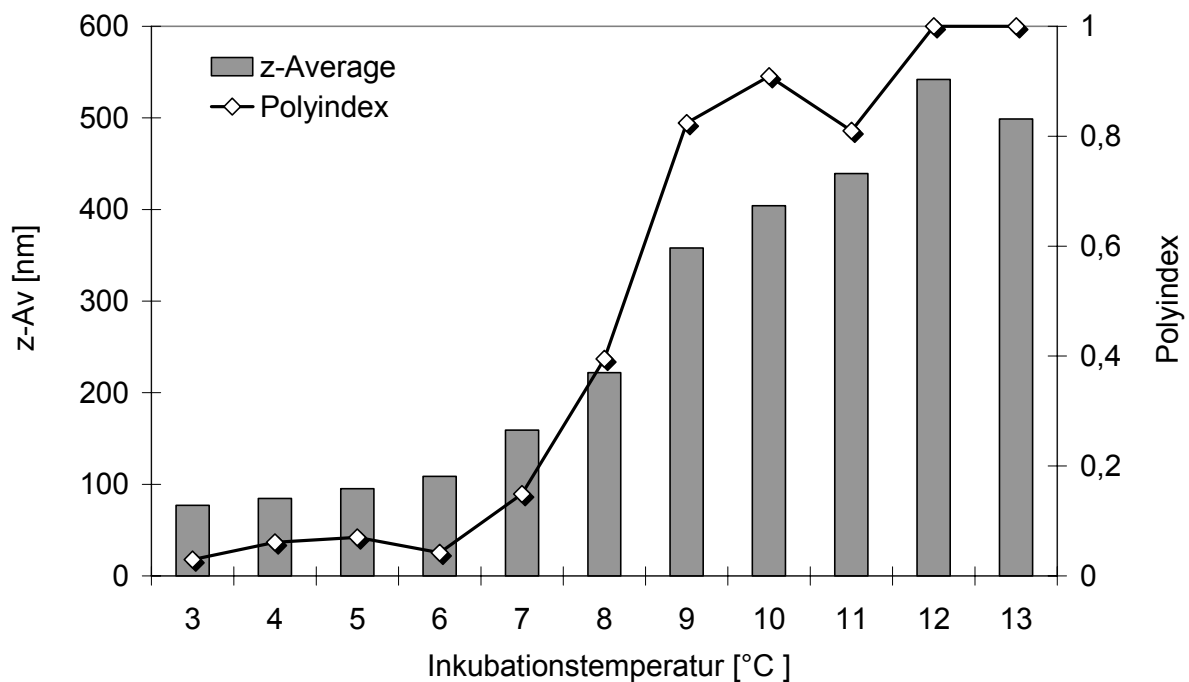
Ein Einfluss der Temperatur auf die Vesikelgröße wurde bereits für das Polymer P2VP-PEO-6 bei PCS-Messungen beobachtet (Hauschild 2004). Bei Lagerung im Kühlschrank (2-8°C) zeigen die milchig-trüben Polymerdispersionen von P2VP-PEO-8, im Gegensatz zu den PI-PEO Proben, eine Aufklärung, die beim Erwärmen auf Raumtemperatur wieder verschwindet. Bei PCS Messungen ist eine erstaunliche Größenreduzierung der Polymervesikel von ca. 400 nm ( $PDI > 0,6$ ) auf ca. 80 nm mit enger Größenverteilung ( $PDI < 0,1$ ) festzustellen und kann mit Cryo-TEM (Abbildung 4-21) bestätigt werden. Diese Erkenntnis eröffnet eine neue Möglichkeit zur Präparation von Polymervesikeln, die im Folgenden näher beleuchtet wird.



**Abbildung 4-21: Cryo-TEM von P2VP-PEO-8 (10 mg/ml in HBS) bei RT nach Lagerung im Kühlschrank**

##### 4.1.6.1 Abkühlung

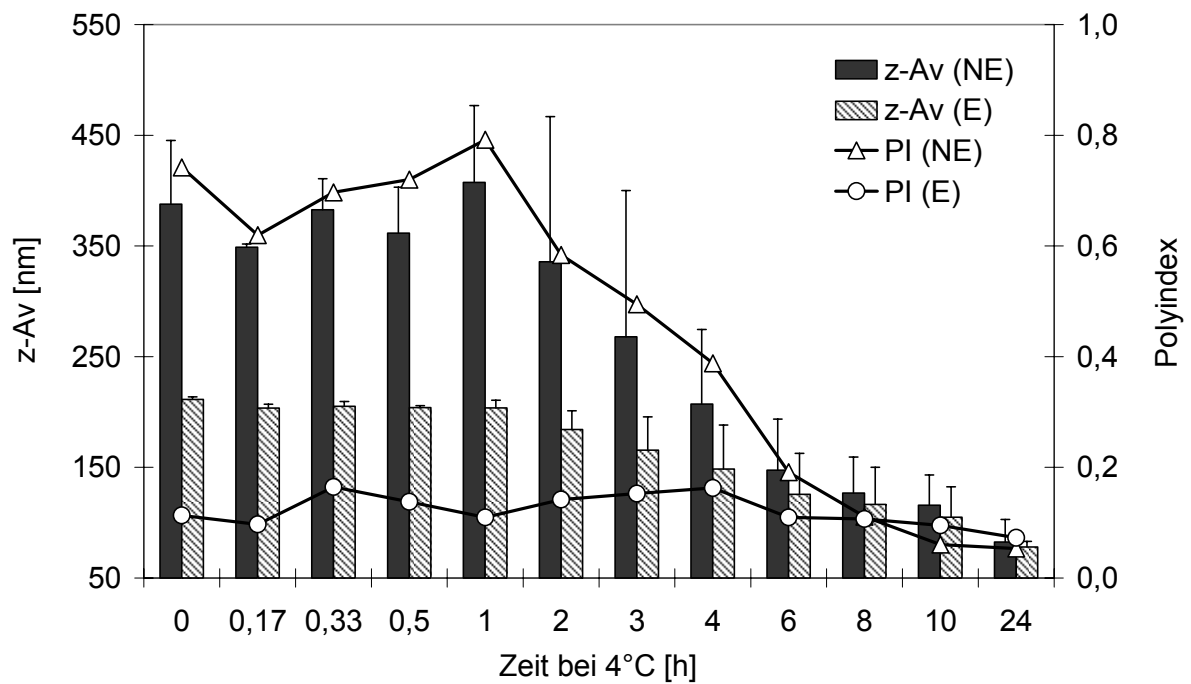
Zunächst wurde untersucht, unterhalb welcher Inkubationstemperatur es zu einer Veränderung innerhalb der Probe kommt. Dazu wurde eine nach der Filmmethode präparierte Vesikellösung aufgeteilt und für 48 Stunden bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Nach anschließender Erwärmung auf 25°C wurde die Probe mit PCS charakterisiert. Die Probe zeigt eine deutliche Veränderung unterhalb 9°C wie aus Abbildung 4-22 zu entnehmen ist. Für die weiteren Versuche wird deshalb als Inkubationstemperatur 4°C festgelegt.



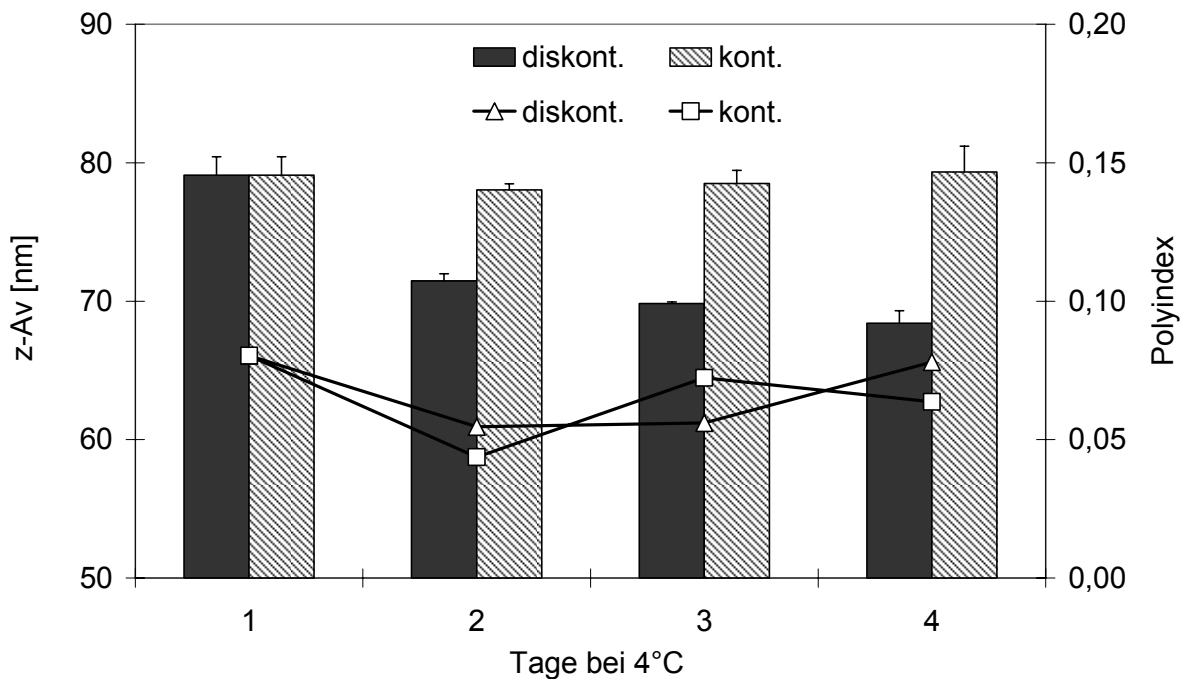
**Abbildung 4-22: Hydrodynamischer Durchmesser und Größenverteilung von P2VP-PEO-8 (10 mg/ml in HBS) bei 25°C nach 48 h Inkubation bei verschiedenen Temperaturen**

Um zu überprüfen, für welche Zeit die Probe mindestens bei 4°C gehalten werden muss, bis es zu keiner weiteren Veränderung mehr kommt, wurden eine extrudierte sowie eine nicht extrudierte Probe bei 4°C inkubiert. In Abständen wurden Proben entnommen, die nach Erwärmung auf 25°C mittels PCS vermessen wurden. Nach zwei Stunden sind erste Anzeichen einer Größenreduktion in der Probe erkennbar, die nach 24 Stunden ein Minimum erreicht und keinen Unterschied mehr zwischen extrudierter und nicht extrudierter Probe aufweist (Abbildung 4-23). Deshalb wird für weitere Versuche eine Kühlzeit von mindestens 24 Stunden bei 4°C angesetzt.

Weiterhin wurde der Einfluss der Zyklenzahl auf die Vesikelendgröße untersucht. Dazu wurde eine Probe, die kontinuierlich bei 4°C gehalten wurde, mit einer Probe, die wiederholt nach 24 Stunden bei 4°C für 24 Stunden bei 25°C temperiert wurde (ein Zyklus), verglichen. In Abbildung 4-24 ist zu erkennen, dass es bei wiederholtem Abkühlen zu einer geringen Vesikelverkleinerung kommt, während bei kontinuierlicher Lagerung bei 4°C innerhalb von vier Tagen keine Änderung auftritt.



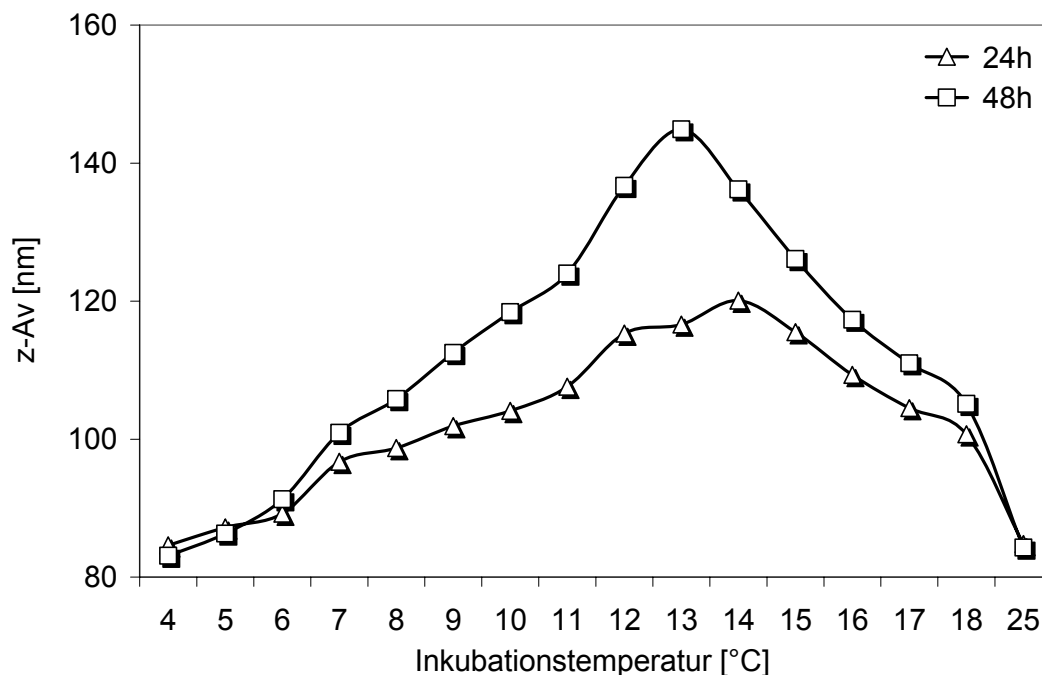
**Abbildung 4-23:** Hydrodynamischer Durchmesser und Größenverteilung von P2VP-PEO-8 (10 mg/ml in HBS) bei 25°C nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 4°C, NE-nicht extrudiert, E-Extrudiert (n=3)



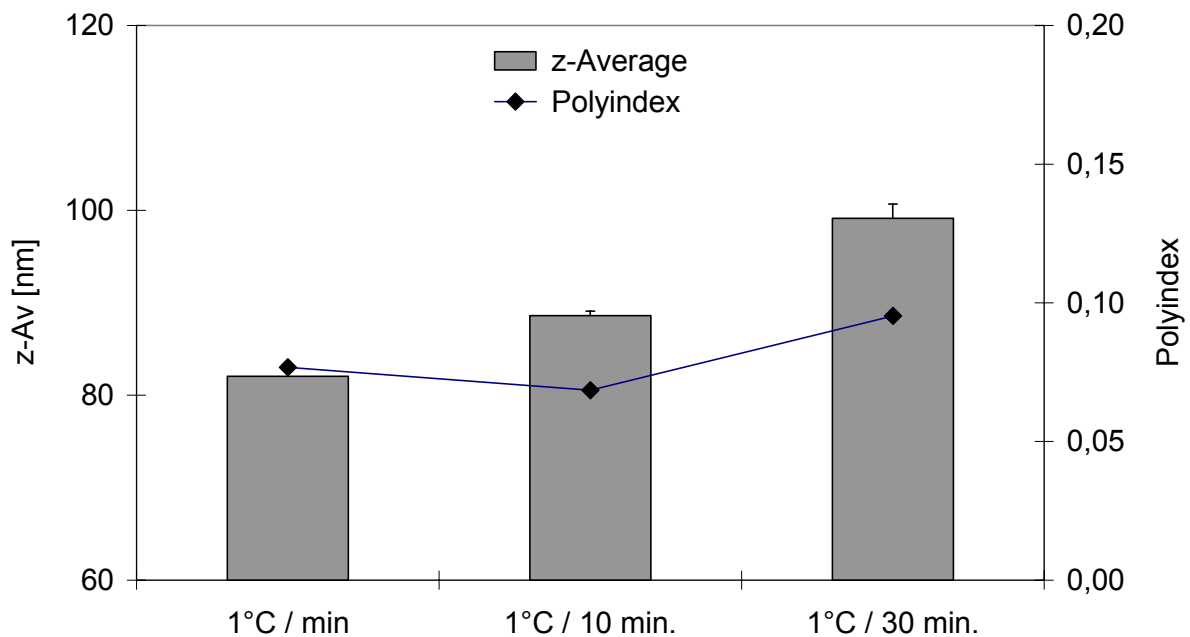
**Abbildung 4-24:** Hydrodynamischer Durchmesser und Größenverteilung von P2VP-PEO-8 (10 mg/ml in HBS) bei 25°C nach diskontinuierlichem (ein Tag 4°C, ein Tag 25°C) oder kontinuierlichem Kühlen bei 4°C (n=3)

#### 4.1.6.2 Erwärmung

Als nächstes wurde untersucht, wie eine Veränderung der Erwärmungsparameter die Vesikelendgröße beeinflusst. Abbildung 4-25 zeigt, dass die Größe der Vesikel variiert, wenn die Probe nicht direkt von 4°C auf 25°C erwärmt wird, sondern zunächst bei einer anderen Temperatur zwischeninkubiert wird. Dabei durchläuft die Vesikelgröße ein Maximum (145 nm), welches bei einer Zwischeninkubations-temperatur von 13°C liegt. Wird die Probe dagegen bei unterschiedlicher Geschwindigkeit von 4°C auf 25°C erwärmt, wird deutlich, dass die Vesikelgröße umso größer ist, je langsamer die Heizrate ist (Abbildung 4-26). Eine Erklärung dafür liefert die in Kap. 4.2.2.2 bei Erwärmung beschriebene Wurmmizelle-Vesikel-Umwandlung. Bei langsamer Erwärmung besteht für die Wurmmizellen mehr Zeit zu fusionieren, was in einem größeren Vesikeldurchmesser resultiert. Das Durchlaufen eines Maximum in der Vesikelendgröße durch eine Zwischeninkubation während des Erwärmens (Abbildung 4-25), kann ebenfalls darauf zurückgeführt werden, dass eine Temperatur oberhalb 4°C die Fusion und das Wachsen der Wurmmizellen fördert. Oberhalb von 13°C kommt es dann zusätzlich zur Vesikelbildung und es besteht somit weniger Zeit zum fusionieren, so dass die Vesikelendgröße wieder sinkt.



**Abbildung 4-25:** Hydrodynamischer Durchmesser von P2VP-PEO-8 (10 mg/ml in HBS) bei 25°C: nach 24 h bei 4°C und anschließenden 24 h bzw. 48 h bei anderer Inkubationstemperatur (schnelle Erwärmung) gefolgt von schneller Erwärmung auf 25°C; Polyindex < 0,13

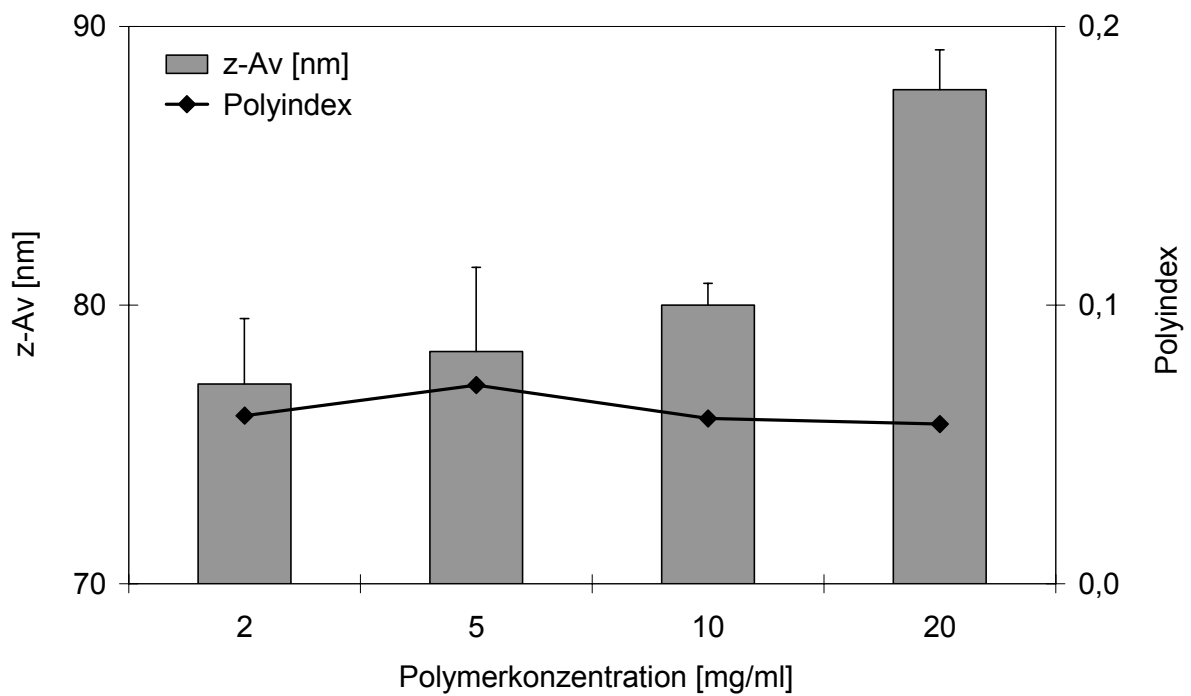


**Abbildung 4-26: Hydrodynamischer Durchmesser und Größenverteilung von P2VP-PEO-8 (10 mg/ml in HBS) bei 25°C nach 24 h bei 4°C und Erwärmen auf 25°C mit unterschiedlichen Heizraten (n=3)**

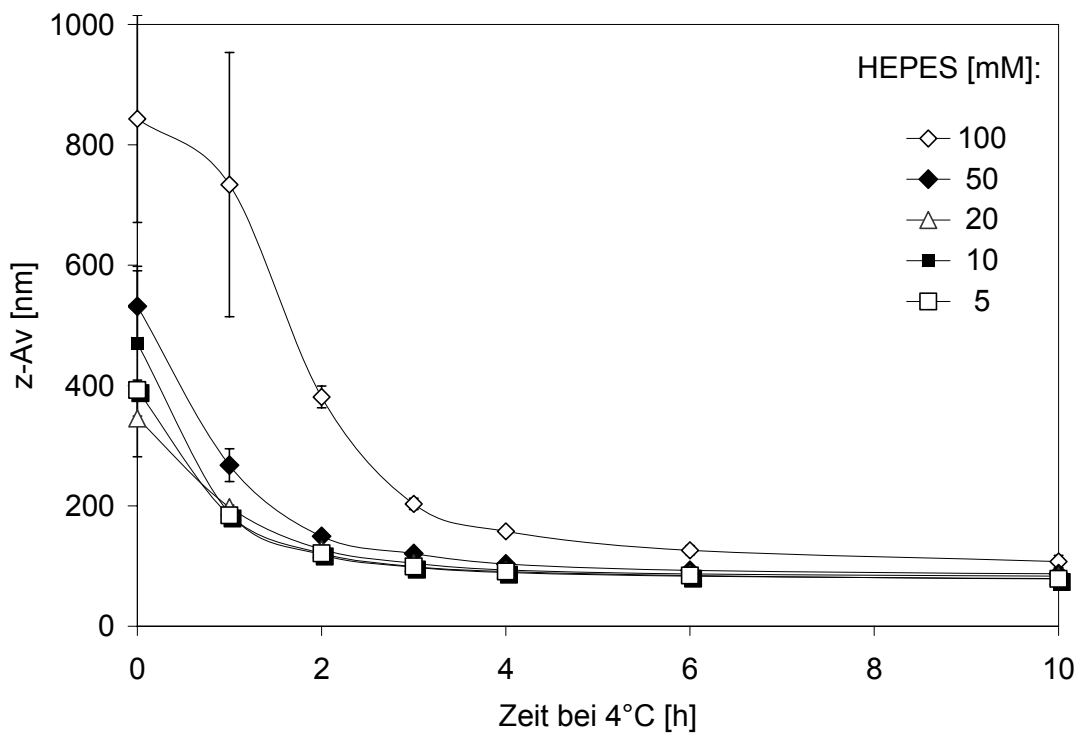
#### 4.1.6.3 Einfluss der Probenzusammensetzung

Es sollte untersucht werden, wie die Vesikelendgröße bei der Herstellung über die Temperaturmethode durch die Zusammensetzung der Probe hinsichtlich Polymerkonzentration und Pufferzusammensetzung beeinflusst wird. Wie in Abbildung 4-27 dargestellt, ist die Größe der Vesikel abhängig von der Polymerkonzentration und steigt mit größerer Polymermenge.

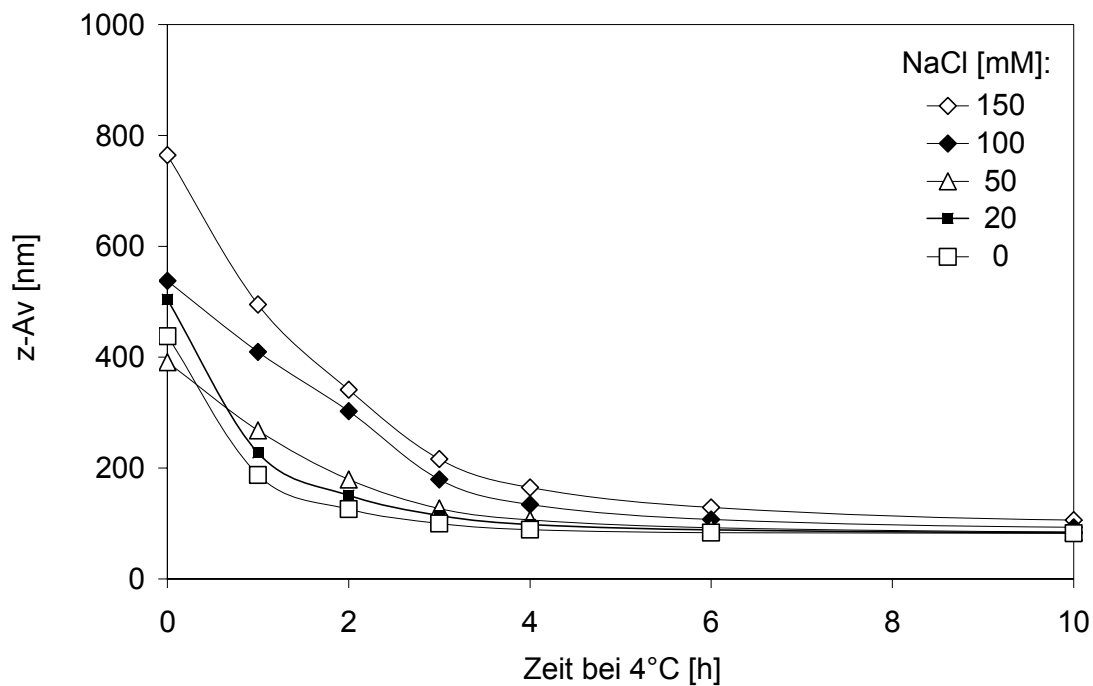
Die Zusammensetzung des Puffers hat ebenfalls einen Einfluss auf die Teilchengröße. Dazu ist in Abbildung 4-28 der zeitliche Verlauf der Größenminimierung der Proben mit unterschiedlichem Gehalt an HEPES aufgeführt. Die Größen nach 24 Stunden Kühlung sind nicht im Diagramm dargestellt, da es zu keiner nennenswerten Änderung mehr kam. Bei sehr hohen HEPES-Konzentrationen ( $\geq 50$  mM) ist der Größenabfall langsamer und die Vesikelendgröße geringfügig größer als bei niedrigeren Konzentrationen. Ein ähnlicher Verlauf ist bei Proben mit konstantem HEPES-Gehalt und unterschiedlichen Mengen an NaCl zu beobachten (Abbildung 4-29). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Vesikelgröße mit steigender Tonizität minimal ansteigt.



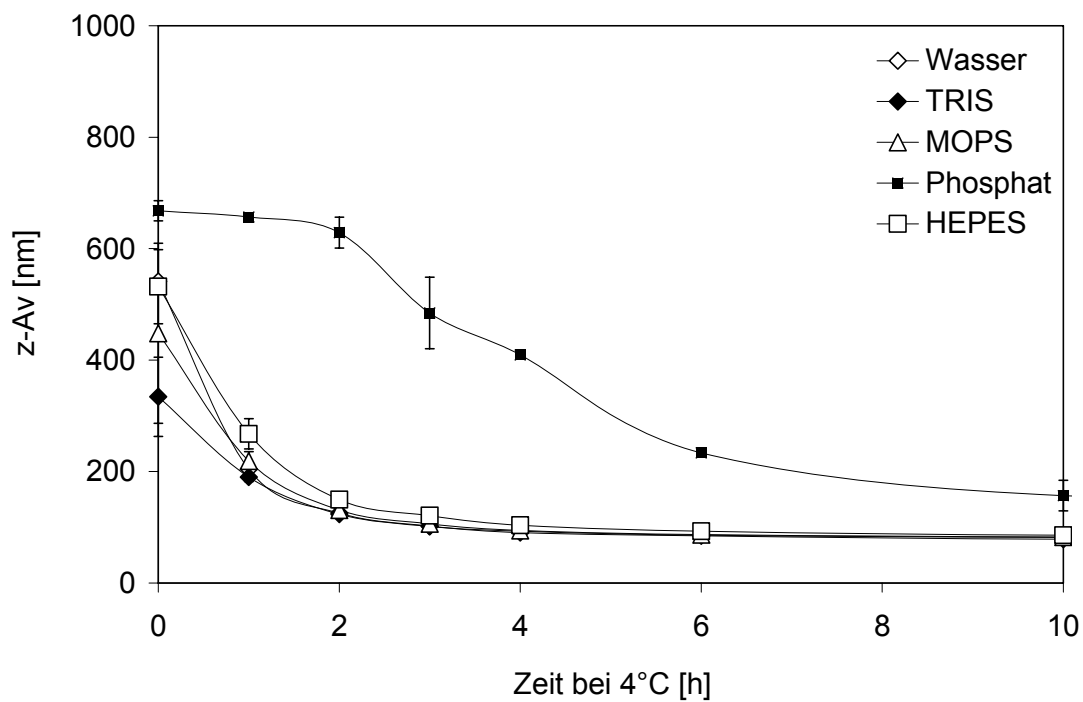
**Abbildung 4-27: Hydrodynamischer Durchmesser und Größenverteilung von P2VP-PEO-8 mit verschiedenen Polymerkonzentrationen (in HBS) bei 25°C nach 24 h bei 4°C (n=3)**



**Abbildung 4-28: Hydrodynamischer Durchmesser und Größenverteilung von P2VP-PEO-8 (10 mg/ml in Puffer pH 7,4 mit verschiedenen HEPES-Gehalten) bei 25°C nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 4°C (n=3)**



**Abbildung 4-29:** Hydrodynamischer Durchmesser und Größenverteilung von P2VP-PEO-8 (10 mg/ml in 10 mM HEPES-Puffer pH 7,4 mit verschiedenen NaCl-Gehalten) bei 25°C nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 4°C (n=3) (sd wegen Übersichtlichkeit nicht dargestellt)



**Abbildung 4-30:** Hydrodynamischer Durchmesser und Größenverteilung von P2VP-PEO-8 (10 mg/ml in verschiedenen Puffermedien 50 mM pH 7,4) bei 25°C nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 4°C (n=3)

Der Einfluss der Pufferart auf die Vesikelgröße wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurden verschiedene Proben mit 50 mM Puffer hergestellt und die Größenreduktion durch Kühlung zeitlich verfolgt (Abbildung 4-30). Der Größenverlauf zwischen den einzelnen organischen Puffersubstanzen TRIS, MOPS und HEPES sowie reinem Wasser ist sehr ähnlich, einzig der anorganische Puffer Phosphat weicht mit deutlich größeren Teilchengrößen ab.

#### 4.1.6.4 Andere P2VP-PEOs

Um zu überprüfen, ob die Eigenschaft des Polymers P2VP-PEO-8, welches in Lösung nach Kühlung kleine, einheitlich große Vesikel bildet, auch für andere vesikelbildende P2VP-PEO-Polymere (Tabelle 4-12) zutrifft, wurden diese auf ihre Temperatursensitivität getestet.

Der Tabelle 4-12 ist zu entnehmen, dass die Polymere mit dem Index 6, 7 und 12 ebenfalls mit einer Größenreduktion durch Kühlung reagieren. Die Polymere 3 und 10 dagegen scheinen aus der Temperaturänderung unverändert hervorzugehen. Es ist allerdings auffällig, dass bei diesen Polymerdispersionen (3, 7) bei 4°C ein Niederschlag mit klarem Überstand zu beobachten war, der sich bei Erwärmung auf RT wieder löste. Bei den „6er“, „7er“ und „12er“ Proben war jedoch die bei RT trübe Lösung bei Abkühlung auf 4°C fast klar, wie es für das „8er“ Polymer zuvor schon beobachtet wurde.

**Tabelle 4-12: Hydrodynamischer Durchmesser und Größenverteilung verschiedener P2VP<sub>a</sub>-PEO<sub>b</sub>s vor (roh) und nach der Temperaturmethode (gekühlt) sowie der bei 4°C beobachtete Trübungsgrad der Probe (NS = Niederschlag)**

| Polymer     | z-Average [nm] |         | Polyindex |         | Trübung (4°C) |
|-------------|----------------|---------|-----------|---------|---------------|
|             | roh            | gekühlt | roh       | gekühlt |               |
| P2VP-PEO-3  | 103            | 108     | 0,37      | 0,43    | NS            |
| P2VP-PEO-6  | 175            | 55      | 0,48      | 0,16    | gering        |
| P2VP-PEO-7  | 198            | 61      | 0,42      | 0,24    | gering        |
| P2VP-PEO-10 | 103            | 105     | 0,38      | 0,44    | NS            |
| P2VP-PEO-12 | 207            | 95      | 0,49      | 0,42    | gering        |

Somit ist auch für andere P2VP-PEO-Blockcopolymere eine Änderung ihres Verhaltens in wässrigem Medium durch Verringerung der Temperatur zu beobachten. Diese Temperaturempfindlichkeit kann auf den hydrophoben P2VP-Block zurückgeführt werden, da für andere PEGylierte Diblock-Copolymere ein solches Verhalten bisher nicht beschrieben ist. Ferner scheint das Blocklängenverhältnis eine Rolle zu spielen, weil das 3er und das 10er Polymer, die sehr ähnliche Blocklängen haben, analog bei tieferen Temperaturen mit Niederschlagsbildung reagieren. Zudem ist zu erkennen, dass die Größenverteilung nach Kühlung zwischen den einzelnen Polymeren sehr stark variiert und trotz Größenminimierung teilweise recht breit ist. Dies deutet darauf hin, dass für jedes einzelne Polymer die optimalen Herstellungsparameter wie Umwandlungstemperatur, Erwärmungsgeschwindigkeit oder Polymerkonzentration neu definiert werden müssen.

Beispielsweise zeigt das P2VP-PEO-7 eine, im Vergleich zum P2VP-PEO-8, verhältnismäßig starke Konzentrationsabhängigkeit der Teilchengröße (Tabelle 4-13).

**Tabelle 4-13: Hydrodynamischer Durchmesser und Größenverteilung von P2VP-PEO-7 (verschiedene Polymerkonzentrationen in HBS) bei 25°C nach Temperaturmethode (n=3)**

| Konzentration [mg/ml] | z-Average ( $\pm$ ) [nm] | Polyindex ( $\pm$ ) |
|-----------------------|--------------------------|---------------------|
| 1                     | 54 ( $\pm$ 2)            | 0,07 ( $\pm$ 0,02)  |
| 2                     | 70 ( $\pm$ 5)            | 0,10 ( $\pm$ 0,01)  |
| 5                     | 119 ( $\pm$ 5)           | 0,15 ( $\pm$ 0,02)  |
| 10                    | 226 ( $\pm$ 14)          | 0,33 ( $\pm$ 0,07)  |

#### 4.1.7 Zusammenfassung und Bewertung der Herstellungsverfahren

Bei den mechanischen Methoden führt die Extrusion bei allen Polymeren zu einer deutlichen und reproduzierbaren Größenreduktion und Homogenisierung der Polymerdispersion. Die Größe der Proben wird dabei geringfügig durch die Polymerkonzentration und die Art des Mediums beeinflusst. Vorteil der Extrusion ist zudem der geringe Materialverbrauch im Vergleich zur Hochdruckhomogenisation

und die Schonung der Probe verglichen mit der Ultraschallmethode. Die Detergenzdialyse erweist sich aufgrund der sehr breiten Größenverteilung als ungeeignet. Für das Polymer P2VP-PEO-8 kann zudem zur Erzeugung sehr kleiner Vesikel ( $< 100$  nm) die Temperaturmethode genutzt werden. Die resultierende Teilchengröße wird dabei durch Parameter wie Temperatur, Konzentration oder Puffer beeinflusst.

Die Form der gebildeten Polymeraggregate, die nur über Cryo-TEM zugänglich ist, variiert stark zwischen den einzelnen Polymeren und zeigt neben verschiedenen Vesikelmorphologien (P2VP-PEO-8, PI-PEO-18.2) auch koexistierende, nichtvesikuläre Strukturen wie Mizellen (PI-PEO-9). Das Polymer P2VP-PEO-8 bildet bei allen Herstellungsmethoden ausschließlich unilamellare Vesikel aus, wo hingegen bei den PI-PEO-Polymeren eine Beeinflussung der Morphologie durch die Herstellungsmethode beobachtet wird.

Während bei der Detergenzdialyse von PI-PEO nur runde Vesikel auftreten, entstehen bei den mechanischen Methoden (Extrusion, Hochdruckhomogenisation, Ultraschall) auch andere Aggregationsformen. So enthalten PI-PEO-9 Proben neben Vesikeln auch Wurmmizellen, was darauf zurückzuführen ist, dass das Blocklängenverhältnis des Polymers und damit der Packungsparameter sehr nahe an der Grenze zwischen Vesikel und Wurmmizelle liegt. Die vorherrschende Aggregationsform wird somit stark von der Herstellungsmethode bestimmt (Timmann 2005).

Das Polymer PI-PEO-18.2 zeigt ebenfalls verschiedenste Vesikelformen nach Einwirken von Scherkräften. Dies ist zum einen auf ein, im Vergleich zum Ideal des runden Vesikels, verändertes Volumen-Oberflächen-Verhältnis zurückzuführen, das durch Anschwellen oder Schrumpfen der Vesikel (Oberfläche konstant) ausgelöst wird. Zum anderen kann ein Ungleichgewicht durch Änderung der Oberfläche (Vesikelvolumen konstant) aufgrund von Flipp-Flopp-Vorgängen sowie Teilungsprozesse und Fusionierungen auftreten (Antonietti & Förster 2003). Solche Vesikelformen befinden sich nicht im Gleichgewichtszustand und sind daher oft metastabil. Da die Morphologie thermodynamisch kontrolliert wird, ist diese somit stark von der Herstellungsmethode abhängig (Cerritelli et al. 2005). Dies wird für das PI-PEO-18.2 deutlich, da es nicht nur bei der Dialyse, sondern auch bei der Präparation mittels Tintenstrahldrucker ausschließlich runde Vesikel bildet (Filiz

2006). Nachteil dieser beiden Methoden ist, dass die vollständige Entfernung des Detergenz- bzw. Lösungsmittels gewährleistet werden muss und die resultierende Größenverteilung oftmals recht breit ist.

Aufgrund der oben genannten Gründe wird als Standardpräparationsmethode zur Polymervesikelherstellung die Extrusion und speziell für das Polymer P2VP-PEO-8 zusätzlich die Temperaturmethode gewählt.

## **4.2 Aufklärung des temperaturabhängigen Aggregationsverhaltens von P2VP-PEO-8**

Wie in Kapitel 4.1.6 bereits erwähnt, zeigt das Polymer P2VP-PEO-8 in wässriger Lösung bei Temperaturverringerung (4°C) ein verändertes Verhalten. Dies wird am Aufklaren der trüben Polymerdispersion und einer Probenhomogenisierung bei anschließender Erwärmung auf die Ausgangstemperatur (25°C) erkennbar. Da ein solches Verhalten bisher nicht in der Literatur beschrieben wurde, sollte dies mit Hilfe von PCS- und Cryo-TEM-Untersuchungen aufgeklärt werden. Eine Probe von P2VP-PEO-8 (10 mg/ml in HBS) wurde hierzu entsprechend der Filmmethode präpariert und nach verschiedenen Zeiten bei bestimmten Temperaturen (4, 16 und 25°C) hinsichtlich Größe und Aussehen charakterisiert.

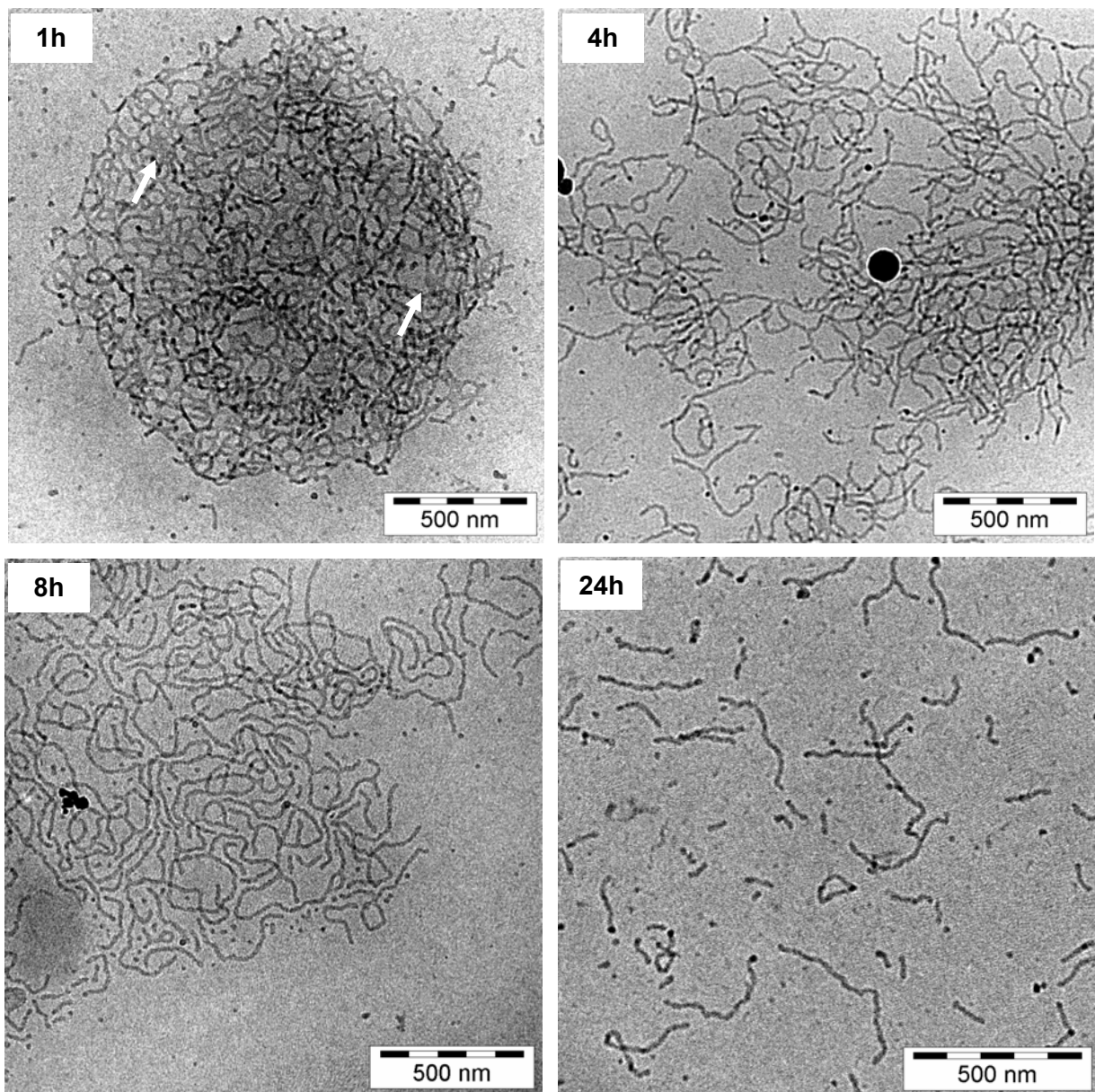
### **4.2.1 Temperaturabhängiges Aggregationsverhalten nach 24 Stunden bei 4°C**

In Kapitel 4.1.6.1 konnte bereits gezeigt werden, dass bei Homogenisierung nach der so genannten Temperaturmethode nach einem Tag Inkubation bei 4°C keine weitere Vesikelgrößenänderung stattfindet. Folglich kann von einem Gleichgewichtszustand nach einem Tag bei 4°C ausgegangen werden. PCS-Messungen (90°-Winkel) bei 4°C zeigen eine Teilchengröße von durchschnittlich 120 nm mit einem Polyindex von 0,24. Die Werte sind kleiner als direkt nach der Polymerhydratation bei 25°C (Größe ca. 400 nm, PDI > 0,6) aber größer als bei nachfolgender Erwärmung auf 25°C (Größe ca. 80 nm, PDI < 0,1) und liefern keine Information zur Aggregatmorphologie.

In Abbildung 4-31 (24 h) ist eine Cryo-TEM-Aufnahme bei 4°C nach einem Tag Inkubation bei dieser Temperatur (4°C) zu sehen. Es zeigt, dass die Probe aus P2VP-PEO-8 bei 4°C anstatt von Vesikeln wellenförmige Wurmmizellen zusammen

mit sphärischen Mizellen enthält. Das bedeutet, dass der Homogenisationsprozess der Vesikel bei der Temperaturmethode über die Bildung von Wurmmizellen abläuft.

Die Beobachtung, dass bei Abkühlung von P2VP-PEO eine Umwandlung von Vesikel in Wurmmizellen erfolgt, ist im Hinblick auf verkapseltes Material bedeutend, da dieses entsprechend freigesetzt wird. Aus diesem Grund muss bei Vesikeln aus P2VP-PEO-8 von einer Lagerung im Kühlschrank nach Beladung abgesehen werden.



**Abbildung 4-31:** Cryo-TEM-Aufnahmen von P2VP-PEO-8 (10 mg/ml in HBS) bei 4°C zu verschiedenen Zeitpunkten nach Temperatursprung von 25°C auf 4°C. Vesikel werden in ein Netzwerk (1 h) aus Wurmmizellen umgewandelt, die sich mit der Zeit vereinzeln und verkürzen bis nach ca. einem Tag ein Gleichgewichtszustand erreicht ist.

Die Länge dieser Wurmstrukturen beträgt durchschnittlich 250 nm (50-1000  $\mu$ m). Der Durchmesser ist nicht einheitlich ( $16 \pm 2$  nm) und variiert innerhalb einer Wurmmizelle. Das Ende der Zylinder sowie die sphärischen Mizellen besitzen einen etwas größeren Durchmesser von  $21 \pm 2,5$  nm und erscheinen dunkler als der restliche Wurmteil. Hierbei ist anzumerken, dass teilweise auch innerhalb eines Zylinders dunklere punktförmige Flächen existieren, die möglicherweise „Sollbruchstellen“ darstellen, an denen eine weitere Verkürzung des Wurmes stattfindet.

Weiterhin sind verzweigte Wurmmizellen zu finden, die meist schwierig von sich überlappenden Wurmmizellen zu unterscheiden sind, da Cryo-TEM-Aufnahmen nur eine 2D-Projektion ermöglichen. Eine Unterscheidung kann bei höheren Vergrößerungen aufgrund von Kontrastunterschieden getroffen werden, da Verzweigungen einheitlich erscheinen, während Überlappungen am Kreuzungspunkt dunkler sind (Won et al. 2002, Gonzalez & Kaler 2005, He et al. 2006). Eine genaue Differenzierung ist jedoch nur durch Cryo-TEM-Aufnahmen unter verschiedenen Winkeln möglich.

Eine exakte Erklärung für diese Vesikel-Wurm-Umwandlung ist schwierig. Verschiedene Morphologien von Polymeraggregaten können laut Literatur durch Änderung der Polymerzusammensetzung, des Lösungsmittels, des Wassergehalts, der Menge an zugesetzten Ionen oder der Temperatur induziert werden (Shen & Eisenberg 1999, Desbaumes & Eisenberg 1999, Förster & Plantenberg 2002, Reinecke & Döbereiner 2003, Xu et al. 2003, Gozdz 2004, Cerritelli et al. 2005, Zhou et al. 2007).

Für das hier beobachtete temperaturabhängige Aggregationsverhalten des Polymers P2VP-PEO-8 gibt es in der Literatur jedoch bisher kaum Angaben. So wurde für das Diblock-Copolymer PS-PEO (in DMF-Wasser-Gemisch) ein Übergang Vesikel - Wurm - Mizelle beschrieben - jedoch in umgekehrter Richtung - bei Temperaturerhöhung (Bhargava et al. 2006). Nur für Pluronic L121 ( $\text{PEO}_5\text{-PPO}_{68}\text{-PEO}_5$ ) wurde bisher von einem Zerfall der Vesikel in Mizellen bei Temperaturen unterhalb von 14°C berichtet, der auf die erhöhte Löslichkeit von Pluronic bei tiefen Temperaturen zurückgeführt wird (Li et al. 2007).

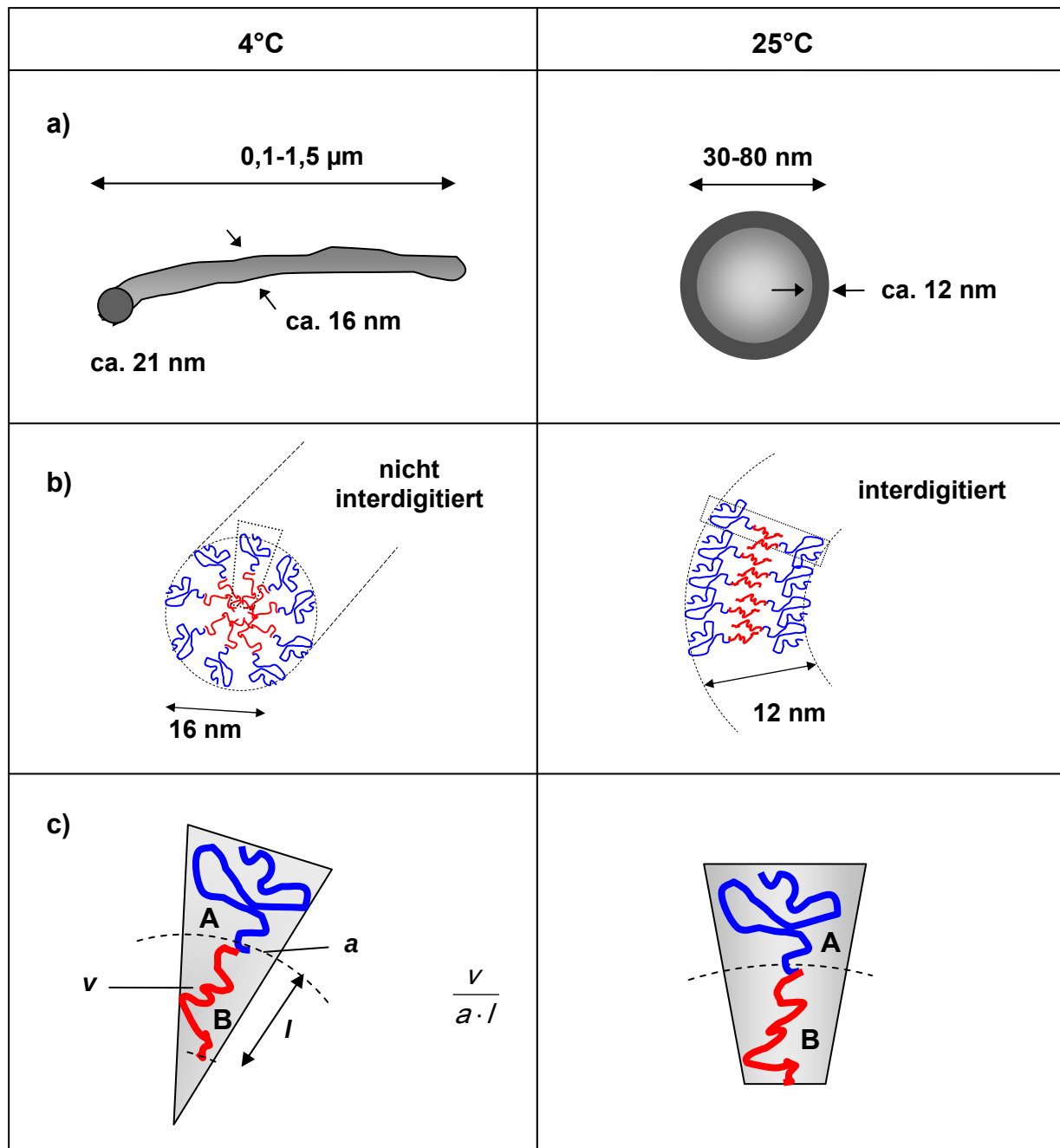
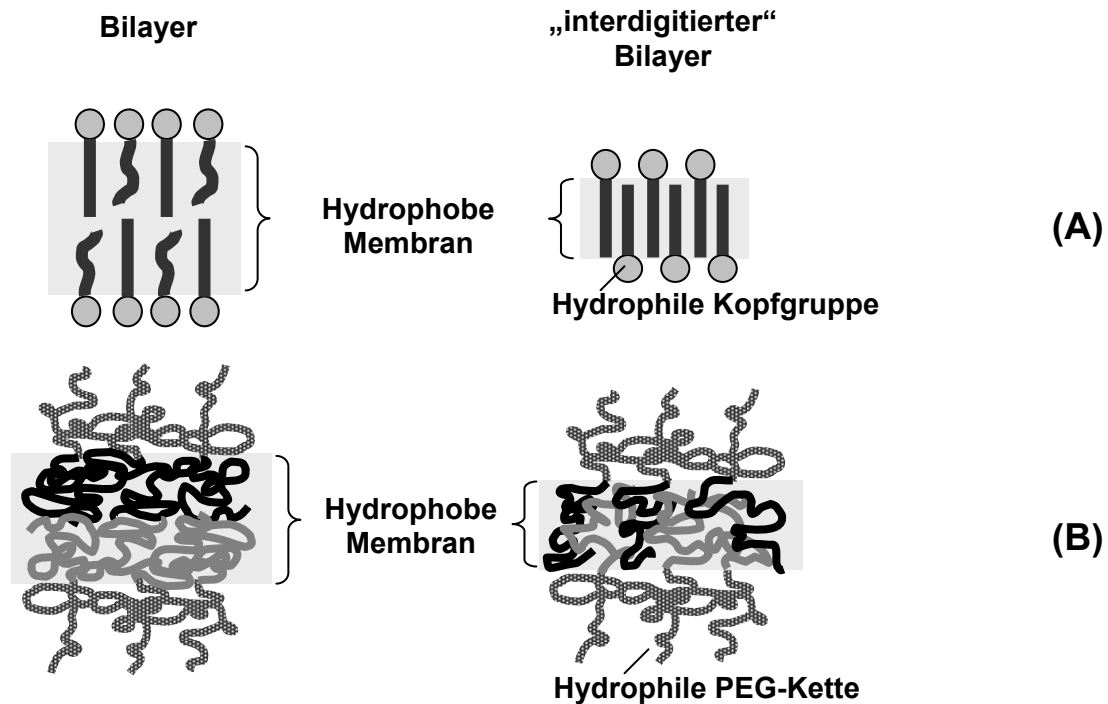


Abbildung 4-32: a) Vergleich der Größendimension einer Wurmmizelle (4°C) mit einem Vesikel (25°C)  
 b) Anordnung der amphiphilen Polymermoleküle zu einer Mizelle (4°C) oder einer Bilayermembran (25°C) im Querschnitt  
 c) Form eines Diblockcopolymermoleküls (A-hydrophil, B-lipophil) in Bezug auf den Packungsparameter  $v/(a \cdot l)$  ( $v$  - Volumen und  $l$  - Länge von B,  $a$  - Grenzfläche)

Die Bildung dieser Wurmmizellen beruht auf einer Änderung des Packungsparameters (Abbildung 4-32 c), welche durch eine Temperaturänderung ausgelöst wird. Veränderungen der Temperatur führen zu einer Änderung des Lösungsmittelcharakters für einen oder beide Polymerblöcke (He et al. 2006). So ist für PEO-haltige Amphiphile im wässrigen Medium bekannt, dass die Hydratation von PEO durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken und damit das Volumen von PEO bei abnehmender Temperatur zunimmt (Li et al. 2007). Die Mizellenbildung bei tieferen Temperaturen muss zum anderen jedoch zusätzlich auf einer Veränderung des hydrophoben Polymerblocks P2VP beruhen, da für andere PEO-haltige Diblock-Copolymere ein solches temperaturabhängiges Aggregationsverhalten bisher nicht beschrieben wurde.

Bei niedrigeren Temperaturen ist außerdem von einer geringeren Flexibilität der Polymerketten auszugehen, so dass diese weniger interdigitieren und sich verflechten können (Abbildung 4-32 b). Diese Annahme beruht dabei auf der Cryo-TEM-Auswertung, bei der der Durchmesser der Zylinder (16 nm) größer ist als die Bilayermembran (12 nm).

Es wird deshalb angenommen, dass P2VP-PEO-8 innerhalb der Vesikelmembran (25°C) interdigitiert, was im Folgenden kurz erläutert wird. Vergleicht man die Membrandicken verschiedener P2VP-PEO-Polymere in Abhängigkeit von deren Molmasse (siehe Tabelle 4-1), wird ersichtlich, dass bei der Polymerreihe 12, 10, 3 und 8 die Dicke des Bilayers mit steigender Molmasse erwartungsgemäß zunimmt (Bermudez et al. 2002, Battaglia & Ryan 2005). Dagegen besitzen das „6er“ bzw. „7er“ Polymer einen ähnlichen Bilayerdurchmesser wie das „3er“ bzw. „8er“ Polymer, welche eine fast doppelt so hohe Molmasse aufweisen. Eine mögliche Erklärung ist im so genannten Interdigitieren der hydrophoben Membranbestandteile zu finden, wie es auch bei Phospholipidmembranen induziert durch z.B. Temperaturänderung (Ranck 1977), Tenside oder Ethanol (Koynova & Chaffrey 1998) beschrieben wird (Abbildung 4-33).



**Abbildung 4-33:** Schematische Darstellung einer Bilayermembran (links) im Vergleich zu einem interdigitierten Bilayer (rechts) aus Phospholipiden (A) oder Diblockcopolymeren (B) (in Anlehnung an Battaglia & Ryan 2005)

Eine klare Abgrenzung zwischen interdigitiertem und normalem Bilayer ist für die hochmolekularen Polymere im Vergleich zu Lipiden nicht möglich, da aus entropischen Gründen ein Mischen der hydrophoben Ketten an der Grenzfläche erwartet wird (Matsen & Bates 1995). Das Interdigitieren wird umso wahrscheinlicher je höher die Molmasse der Polymere ist (Srinivas et al. 2004). Bezogen auf die P2VP-PEO-Polymere liegt die Grenze zwischen interdigitieren und nicht interdigitieren unterhalb einer Molmasse von 6400 g/mol (P2VP-PEO-12).

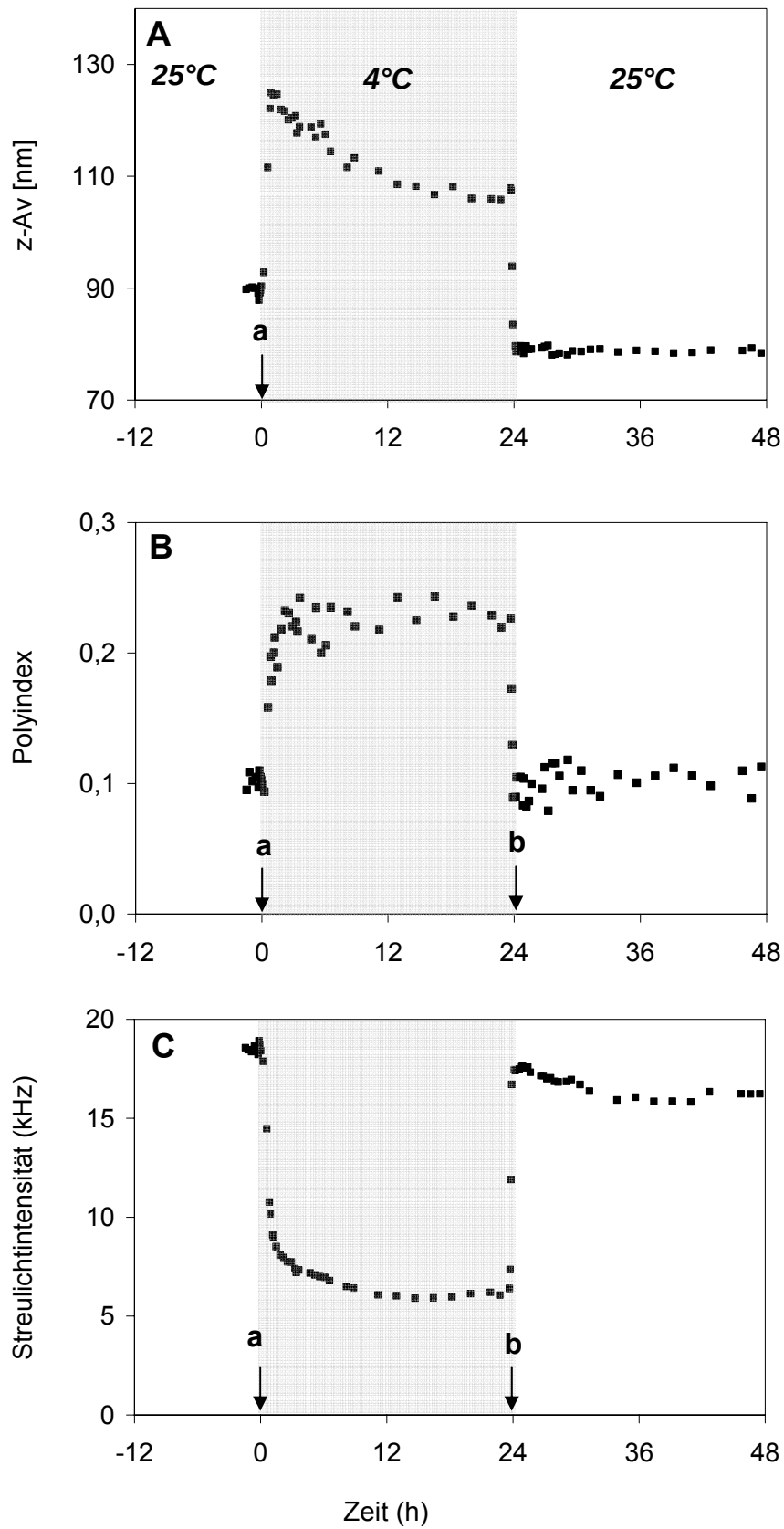
#### **4.2.2 Aufklärung der Vesikel-Wurm-Umwandlung**

Der erste Schritt in Richtung Klärung der Vesikel - Wurm - Umwandlung bestand in der Messung der Größe, Größenverteilung und des Intensitätssignals während des Homogenisationsprozesses mittels winkelabhängiger DLS (30-150°). Dazu wurde eine Polymerprobe verwendet, die zuvor einen Tag im Kühlschrank gelagert und wieder auf RT erwärmt worden war („vorhomogenisiert“). Nach einer Ausgleichszeit bei 25°C wurde die Temperatur auf 4°C abgesenkt (Zeitpunkt 0 h) und nach 24 Stunden wieder auf 25°C erwärmt. Abbildung 4-34 zeigt, dass nach dem Temperatursprung auf 4°C sowohl die Teilchengröße als auch der Polyindex zunächst rapide ansteigen, während das Streulichtsignal abnimmt. Die Umwandlung nach dem Temperatursprung von 25°C auf 4°C und umgekehrt scheint sehr schnell vonstatten zu gehen. Die Messwerte sind dabei stark vom Streulichtwinkel abhängig (nicht dargestellt) und ein Indiz für die Koexistenz kleiner und großer Teilchen bzw. länglicher Objekte wie Wurmmizellen (Putaux et al. 2005, Scarzello et al. 2006).

Zur detaillierten Bestimmung des Umwandlungsprozesses wurde die Probe mit Cryo-TEM nach verschiedenen Zeiten sowohl während des Kühlens als auch bei anschließender Erwärmung untersucht.

##### **4.2.2.1 Abkühlen**

Abbildung 4-31 zeigt eine Serie von Cryo-TEM-Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten bei 4°C nach Temperatursprung von 25°C auf 4°C. Der erste Messpunkt nach einer Stunde zeigt ein Netzwerk aus miteinander verworrenen Wurmmizellen zusammen mit einigen grauen Flächen (mit Pfeil markiert) zwischen den Mizellen, die als flache Bilayerflächen (Scheibenmizelle) angesehen werden können. Dies ist ein Hinweis, dass der Umwandlungsprozess Vesikel - Wurm über eine Zwischenstufe abläuft (Chen et al. 1999, Antonietti & Förster 2003). Das Netzwerk aus Mizellen vereinzelt sich anschließend immer mehr und die Wurmmizellen verkürzen sich (4 h und 8 h). Nach 24 Stunden ist ein Gleichgewichtszustand erreicht, der nur einzelne Wurmmizellen zusammen mit wenigen sphärischen Mizellen zeigt. Diese Vereinzellung und Verkleinerung der Wurmmizellen erklärt, warum während der vorherigen DLS-Messungen die Teilchengröße bei 4°C langsam wieder sinkt (Abbildung 4-34) und eine Kühlzeit von einigen Stunden notwendig ist, um kleine homogene Vesikel zu erhalten (Kap. 4.1.6).



**Abbildung 4-34:** DLS-Messungen (Streulichtwinkel 120-150°) vor und nach Temperatursprung von 25°C auf 4°C (a) und umgekehrt (b);  
**A:** Teilchendurchmesser (Ausgang 90 nm), **B:** PDI,  
**C:** Streulichtintensität

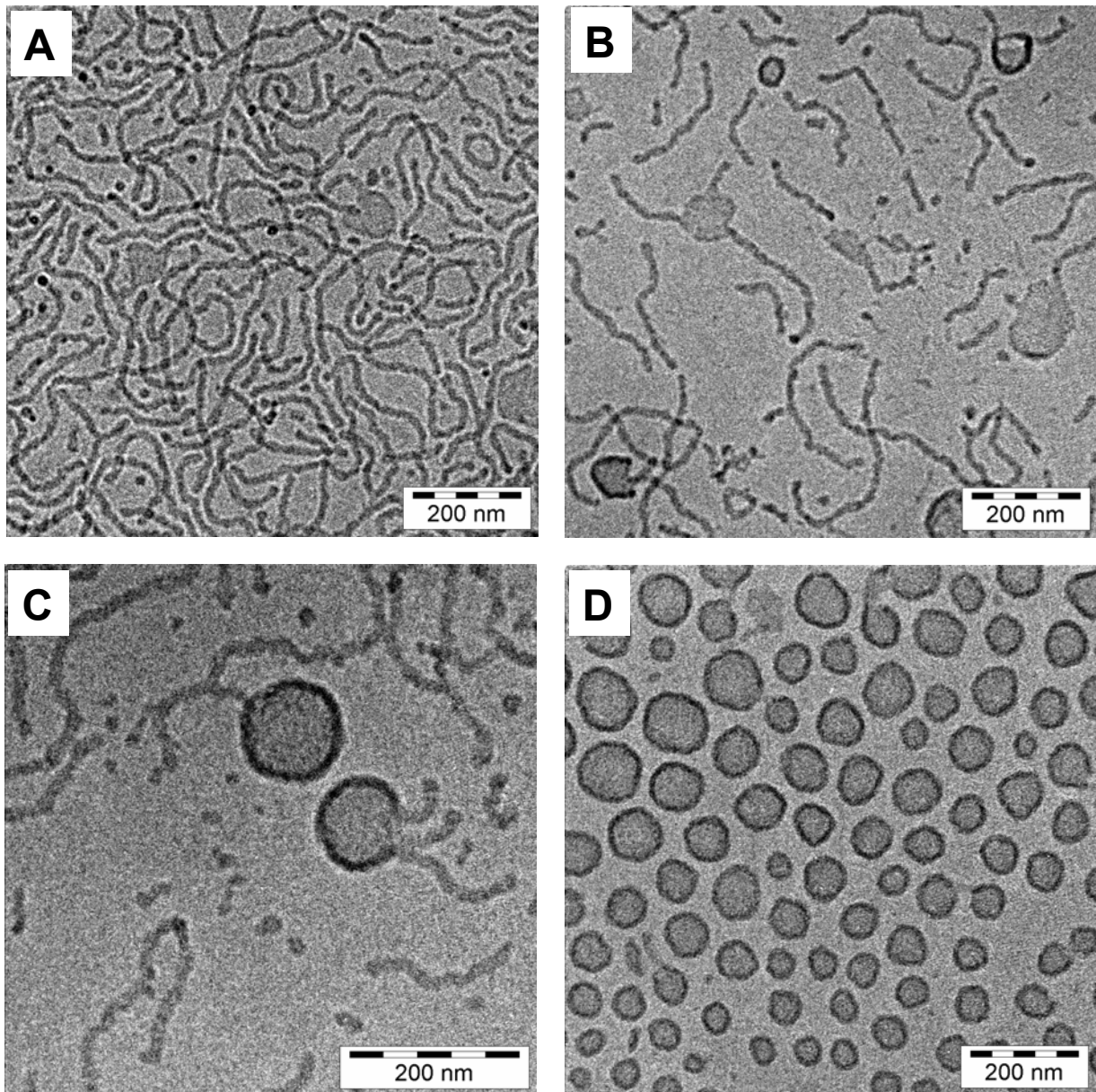
#### 4.2.2.2 *Erwärmen*

Nach 24 Stunden bei 4°C wurde die Probe wieder schnell auf 25°C erwärmt. Nach nur 15 Minuten sind schon viele Vesikel mit restlichen Wurmmizellen und nach einer Stunde ausschließlich Vesikel in Cryo-TEM-Aufnahmen zu finden (Bilder nicht dargestellt). Es können jedoch keine Zwischenstadien gefunden werden, da die Umwandlung zu schnell vonstatten geht.

Um mögliche auftretende Zwischenstrukturen zu finden, wurde die Probe bei einer niedrigeren Temperatur (16°C) inkubiert. Das bedeutet, die Probe wurde nach einem Tag bei 4°C auf 16°C erwärmt und erst nach einem Tag bei 16°C wieder auf 25°C erwärmt.

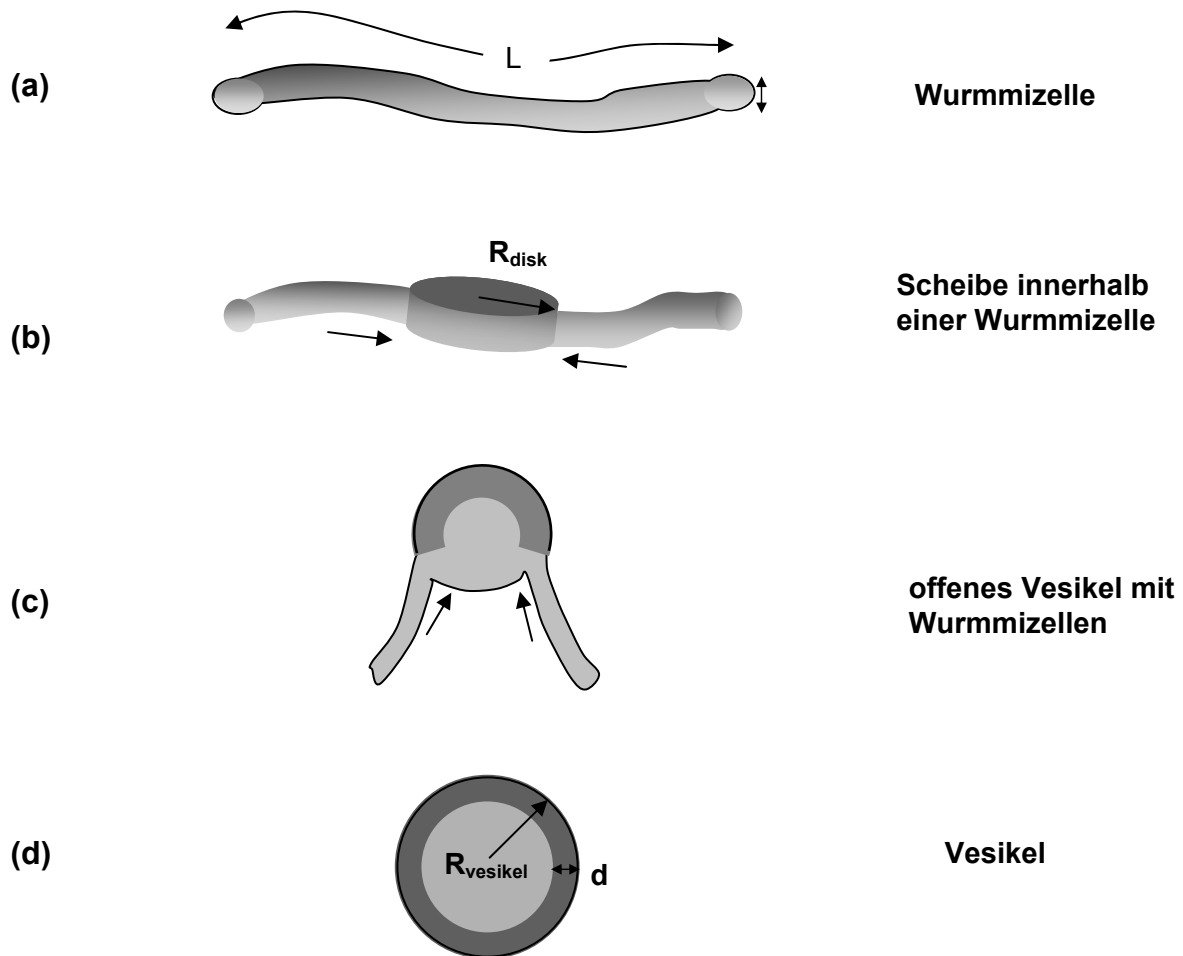
In Abbildung 4-35 A sind nach kurzer Zeit (1 h) bei 16°C neben den Wurmmizellen flächig graue Strukturen zu sehen, wie sie zuvor beim Abkühlen beobachtet wurden (siehe Abbildung 4-31 1 h). Diese Scheibenmizellen sind leicht von Vesikeln zu unterscheiden, da ihnen dunklere Membran fehlen (Almgren et al. 2000). Bei längerer Inkubation (2,5 h bzw. 25 h) sind noch andere Zwischenstrukturen zu finden, wie tintenfischartige halboffene oder geschlossene Vesikel, von deren Membran Wurmmizellen abgehen. Das Zentrum dieser unfertigen Vesikel kann man sich als flachen Bilayer vorstellen, erkennbar an dem im Vergleich zur Vesikelmembran oder den zylindrischen Armen geringeren Kontrast im Cryo-TEM (Jain & Bates 2004, Putaux et al. 2005).

Die Umwandlung der Wurmmizellen in Vesikel ist nach einem Tag bei 16°C noch unvollständig (Abbildung 4-35 C). Dies bedeutet, dass eine bestimmte kinetische Energie für die komplette Umwandlung notwendig ist. Dies wird dadurch bestätigt, dass bei weiterer Erwärmung auf 25°C schon nach kurzer Zeit eine vollständige Umwandlung in Vesikel stattfindet (D).



**Abbildung 4-35:** Cryo-TEM-Aufnahmen von P2VP-PEO-8 (10 mg/ml in HBS, 24 h bei 4°C, ausschließlich Wurm-mizellen = Start), A-C: zeigt Wurm-mizellen zusammen mit einigen Scheiben-mizellen (A, B) und z.T. offenen Vesikeln (B, C) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Temperatursprung von 4°C (siehe Abbildung 4-31 24 h) auf 16°C (A: 1 h, B: 2,5 h, C: 25 h bei 16°C); D: zeigt ausschließlich Vesikel 1 h nach Temperatursprung von 16°C auf 25°C

Abbildung 4-36 stellt zusammenfassend die einzelnen Stadien des Wurm – Vesikel - Übergangs schematisch dar. Der Wurm-Vesikel-Übergang findet über kurzlebige lamellare Strukturen (Scheiben-mizelle) statt.



**Abbildung 4-36:** Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien der Wurm-Vesikel-Umwandlung: zunächst entstehen innerhalb einer Wurmmizelle (a) flache Bilayerflächen (b), die sich beim Erreichen eines kritischen Radius zu einem offenen Vesikel einstülpen (c); zum Schluss werden die Wurmmizellenreste in die Vesikelmembran eingebaut und das Vesikel geschlossen (d)

Beim Erwärmen formieren sich Teile der Wurmmizellen (a) zu flachen Bilayerflächen, die mit der Zeit wachsen, bis ein kritischer Radius erreicht ist (b). Diese flachen Strukturen sind energetisch betrachtet instabil, da ihre Kantenenergie größer ist als die Krümmungsenergie (Chen et al. 1999). An einem kritischen Punkt ist dann die Membranbindungsenergie so niedrig und die Kantenspannung so hoch, dass die Scheibe sich zu einem offenen Vesikel umstülpt (c). Die Wurmmizellenreste flachen schließlich an den Verbindungsstellen zum Vesikel ab und werden in die gekrümmte Bilayermembran eingebaut, wodurch am Ende dieses Umwandlungsprozesses ein geschlossenes rundes Vesikel entsteht (d).

Wie in Kapitel 4.1.6.2 festgestellt, sind die entstehenden Vesikel umso größer, je langsamer der Erwärmungsprozess stattfindet. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Umwandlung der Wurmmizelle in ein Vesikel nicht allein über eine Änderung der Molekülgeometrie stattfindet, sondern auch von Fusionen der Wurmmizellen begleitet wird. Dies bedeutet, dass bei langsamerer Erwärmung mehr Zeit zu solchen Fusionen besteht und die resultierende Vesikelendgröße steigt.

## **4.3 Beladung mit hydrophilen Substanzen**

### **4.3.1 Beladung mit hydrophilen Fluoreszenzmarkern**

Die Verkapselung von Modellsubstanzen ist Voraussetzung für eine spätere Anwendung von Polymervesikeln als Arzneistoffträger. Ein Qualitätsmerkmal für diese Verkapselung ist zum einen die Verkapselungseffizienz, die möglichst hoch und der theoretisch möglichen Verkapselungseffizienz entsprechen sollte. Zum anderen sollte die Substanz stabil verkapselt werden können, also eine möglichst geringe Freisetzung aus den Vesikeln auch über längere Zeit zeigen.

#### **4.3.1.1 Einschlusseffizienz**

Die Einschlusseffizienz beschreibt den prozentualen Anteil einer hydrophilen, in die Vesikel eingeschlossenen Substanz und stellt ein Qualitätsmerkmal dar. Die Effizienz der Verkapselung hängt dabei vom Verhältnis des wässrigen Innenvolumens aller Vesikel zum wässrigen Gesamtvolumen ab. Das bedeutet, es kann umso mehr verkapselt werden, je höher die Polymerkonzentration und je größer die Vesikel sind. In Tabelle 4-14 sind die nach Extrusion erhaltenen Vesikelgrößen und die experimentell als auch theoretisch berechneten Einschlusseffizienzen (Gleichungen 3.1 und 3.2) von verschiedenen Fluoreszenzmarkern dargestellt. Die Bestimmung der Verkapselungseffizienz erfolgte wie in 3.2.1 und 3.3.5 beschrieben.

Die theoretische EE% kann nach folgender Gleichung (Gleichung 3.1) berechnet werden und wird kurz am Beispiel von PI-PEO-9 und Calcein demonstriert. Für die durchschnittliche Querschnittsfläche der hier verwendeten Polymermoleküle (A) liegen bisher keine Messdaten vor, weshalb die Fläche aus Literaturangaben für andere Diblock-Copolymere abgeschätzt wurde (Napoli et al. 2002, Ahmed et al. 2003, Battaglia & Ryan 2005).

$$\text{theoretische EE \%} = \frac{(R-D)^3}{\left(R-\frac{D}{2}\right)^2} \cdot \frac{1}{\frac{6 \cdot 10^{22}}{N \cdot P \cdot A} - 0,03 \cdot D} = 1,8 \% \quad (\text{Gleichung 3.1})$$

|   |                                                                                                                                                                     |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| R | Vesikelradius (z-Av = 165 nm): 82,5 nm                                                                                                                              |
| D | Membrandicke (Cryo-TEM): 12,7 nm                                                                                                                                    |
| N | Avogadrozahl: $6,0225 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$                                                                                                               |
| P | Polymerkonzentration ( $c = 10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , $M_w = 4850 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ): $2,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ |
| A | Querschnittsfläche eines Membranpolymermoleküls: ca. $1,5 \text{ nm}^2$                                                                                             |

Tabelle 4-14: EE% verschiedener Marker in Polymervesikel nach Extrusion

| Polymer<br>(10 mg/ml) | Marker             | z-Av [nm]  | Polyindex     | theoret.<br>EE [%] | tatsächl.<br>EE [%] |
|-----------------------|--------------------|------------|---------------|--------------------|---------------------|
| PI-PEO-9              | Calcein            | 165 (± 8)  | 0,11 (± 0,03) | 1,8                | 0,4 (± 0,2)         |
|                       | HPTS/DPX           | 162 (± 5)  | 0,11 (± 0,05) | 1,8                | 0,4 (± 0,1)         |
| PI-PEO-18.2           | Calcein            | 208 (± 10) | 0,08 (± 0,05) | 3,8                | 0,6 (± 0,1)         |
|                       | HPTS/DPX           | 205 (± 2)  | 0,07 (± 0,02) | 3,8                | 0,8 (± 0,1)         |
|                       | FITC-Dextran 4 kDa | 201 (± 5)  | 0,05 (± 0,01) | 3,7                | 1,5 (± 1,2)         |
| P2VP-PEO-8            | Calcein            | 201 (± 3)  | 0,14 (± 0,02) | 1,2                | /                   |
|                       | HPTS/DPX           | 185 (± 7)  | 0,13 (± 0,05) | 1,1                | /                   |
|                       | FITC-Dextran 4 kDa | 214 (± 6)  | 0,13 (± 0,05) | 1,3                | 4,1 (± 0,8)         |

Die EE% bei PI-PEO-Vesikeln ist in allen Fällen sehr niedrig und liegt unter der theoretisch berechneten EE%. Ursachen dafür könnten die im Cryo-TEM beobachteten Strukturen nach Extrusion sein (siehe 4.1.2.6). So werden bei PI-PEO-9 Proben öfters neben Vesikeln auch Wurmmizellen gefunden, die keinen wässrigen Innenraum zur Verkapselung besitzen. Das PI-PEO-18.2 weist dagegen häufig kollabierte Vesikel auf, deren relatives Volumen/Oberflächen-Verhältnis kleiner ist als das sphärischer Vesikel und damit weniger Raum zur Verkapselung bieten.

Es wurde versucht, die EE% in PI-PEO-Vesikel durch Herstellung über die REV-Methode als auch den Einsatz von Frier-Tau-Zyklen sowie Ultraschall zu erhöhen. Es konnte jedoch keine Verbesserung der EE% erzielt, als auch kein Einfluss auf die Vesikelgröße festgestellt werden. P2VP-PEO-8 dagegen zeigte einen Tag nach der FTZ-Behandlung einen Bodensatz.

Für das Polymer P2VP-PEO-8 ist es nicht möglich, eine EE% mit den Markern HPTS und Calcein zu bestimmen, da nach der GAC keine Fluoreszenz in der vesikulären Fraktion mehr messbar ist. Dies deutet auf eine sehr schnelle Freisetzung der Marker aus den Vesikeln hin. Nur das höhermolekulare FITC-Dextran kann ausreichend stabil in P2VP-PEO-Vesikel verkapselt werden. Deshalb wurde, wie in Tabelle 4-15 dargestellt, die EE% von FITC-Dextranen unterschiedlicher Größe in Abhängigkeit der Herstellungsmethode getestet. Wie zu erwarten war, ist die EE% für die kleineren, nach der Temperaturmethode hergestellten Vesikel niedriger als für die extrudierten Vesikel und sinkt je größer das zu verkapselnde FITC-Dextran ist. Hierbei fällt jedoch auf, dass die für das FITC-Dextran 4kDa experimentell bestimmte EE% deutlich höher ist als die theoretisch bestimmte, was ein Indiz für eine Wechselwirkung zwischen Marker und Polymer sein könnte. In der Vesikelgröße dagegen sind keine Auffälligkeiten erkennbar.

**Tabelle 4-15: P2VP-PEO-8 Vergleich EE% von FITC mit versch. Mw nach Extrusion bzw. Temperaturmethode**

| Herstellung | FITC-Dextran [kDa] | z-Av [nm]      | Polyindex          | theoret. EE [%] | tatsächl. EE [%] |
|-------------|--------------------|----------------|--------------------|-----------------|------------------|
| Extrusion   | 4                  | 214 ( $\pm$ 6) | 0,13 ( $\pm$ 0,05) | 1,3             | 4,1 ( $\pm$ 0,8) |
|             | 40                 | 210 ( $\pm$ 3) | 0,11 ( $\pm$ 0,06) |                 | 1,5 ( $\pm$ 0,7) |
|             | 150                | 207 ( $\pm$ 9) | 0,13 ( $\pm$ 0,02) |                 | 1,5 ( $\pm$ 0,6) |
| Temperatur  | 4                  | 82 ( $\pm$ 1)  | 0,07 ( $\pm$ 0,03) | 0,3             | 2,9 ( $\pm$ 0,2) |
|             | 40                 | 83 ( $\pm$ 3)  | 0,09 ( $\pm$ 0,01) |                 | 0,2 ( $\pm$ 0,1) |
|             | 150                | 82 ( $\pm$ 1)  | 0,08 ( $\pm$ 0,01) |                 | 0,6 ( $\pm$ 0,1) |

#### **4.3.1.2 Freisetzung**

##### **A) HPTS/DPX bzw. Calcein:**

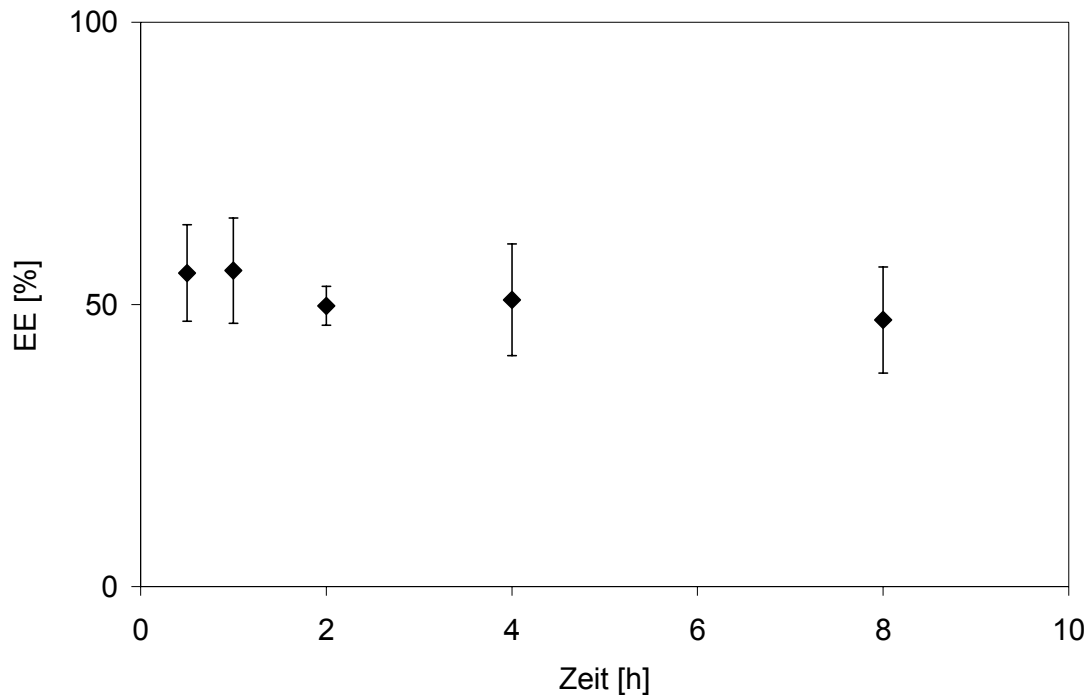
Die Stabilität der Verkapselung von HPTS bzw. Calcein in PI-PEO-Vesikel wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten fluorimetrisch verfolgt.

Die Freisetzung von HPTS wurde in HBS mit verschiedenen pH-Werten im Bereich zwischen pH 4 und pH 8,5 bei 25°C als auch bei 37°C getestet. Die Calceinfreisetzung aus PI-PEO-Vesikeln wurde in HBS bei 25°C bzw. 37°C und in Serum bei 37°C überprüft. Es konnte in allen Fällen keine bedeutende Freisetzung (< 2%) innerhalb von 30 Minuten festgestellt werden. Das bedeutet, dass diese Substanzen stabil in PI-PEO-Vesikel verkapselt sind.

Um eine Adsorption der Substanzen an der Membran auszuschließen, wurde eine extrudierte Polymerlösung (10 mg/ml in HBS), die keinen Farbstoff enthielt, 1:1 mit einer HPTS/DPX- oder Calcein-Lösung gemischt, ein Tag bei RT inkubiert und anschließend die verkapselte Menge bestimmt. Nach einem Tag Inkubation wurde nichts verkapselt. Dies zeigt, dass es zu keiner Adsorption des Farbstoffes an die Polymermembran kommt und dass die Vesikelmembran sehr dicht gegenüber diesen Substanzen ist.

##### **B) FITC-Dextran:**

Da sich nur FITC-Dextran ausreichend stabil in Vesikel aus P2VP-PEO verkapseln lässt, sollte das Freisetungsverhalten von FITC-Dextran 4 kDa bei RT über die Änderung der verkapselten FITC-Dextranmenge innerhalb eines Zeitraumes von acht Stunden verfolgt werden. In Abbildung 4-37 ist zu sehen, dass der Anteil des verkapselten FITC-Dextrans schon nach 30 Minuten nur noch 55% des ursprünglich verkapselten Materials beträgt und auf eine schnelle Freisetzung schließen lässt. Jedoch kommt es mit der Zeit zu keiner weiteren starken Verringerung der EE%, so dass nach acht Stunden immer noch 48% der Ausgangsmenge verkapselt sind.



**Abbildung 4-37: Verkapselter Anteil von FITC-Dextran 4 kDa (EE[%]) in P2VP-PEO-8 nach verschiedenen Zeiten**

Deshalb wird eine Wechselwirkung des Fluoreszenzfarbstoffes mit dem Polymer vermutet. Um dies zu überprüfen, wurde die EE% nach 30 Minuten bei nachträglicher Zugabe des Farbstoffes und anschließend die Freisetzung des verkapselten Materials nach einer Stunde bestimmt. Die EE% beträgt nach 30 Minuten Inkubation 3,7% und entspricht dem Wert bei „normaler“ Verkapselung (Tabelle 4-15). Dieses Indiz für eine Membranwechselwirkung wird dadurch verstärkt, dass die Freisetzung nach einer Stunde 50% beträgt und sich mit den zuvor beobachteten Werten deckt.

Es kann somit von einer Wechselwirkung zwischen der P2VP-PEO-8 Polymermembran mit dem Fluoreszenzmarker FITC-Dextran 4kDa ausgegangen werden. Die für die mit diesem Marker erhaltenen Werte für die EE% und Freisetzung spiegeln folglich nicht die realen Werte wieder.

#### 4.3.2 Beladung mit Doxorubicin

Es wurde untersucht, Vesikel aus PI-PEO-18.2 mit dem basischen Arzneistoff Doxorubicin (DXR) über ein Remote Loading Verfahren mit Hilfe eines

transmembranären Phosphat-Gradienten nach Fritze (Fritze et al. 2006) zu beladen. Ziel ist es, dass der Wirkstoff in hoher Konzentration in den Vesikeln assoziiert vorliegt. Die EE% wurde, wie unter 3.3.5.3 beschrieben, ermittelt.

Wie aus Tabelle 4-16 zu entnehmen ist, kann bei beiden DXR/Polymer-Verhältnissen keine wie für Liposomen (EPC/Chol 7/3 mol/mol) beschriebene hohe EE% von fast 100% erzielt werden. Während der Beladung kommt es zu keiner Veränderung der Teilchengröße, das bedeutet, dass das Polymer/DXR-Verhältnis ausreichend ist, da die Vesikel intakt bleiben. Es erfolgt keine DXR-Ausfällung außerhalb der Vesikel. Die Beladung dauert im Vergleich zu Liposomen aufgrund der dickeren Vesikelmembran deutlich länger (Ahmed & Discher 2004). Nach zwei Stunden Beladungsdauer ist noch keine DXR-Assoziierung in den Vesikeln nachzuweisen, während bei Liposomen schon nach zwei Stunden (7°C) das DXR fast vollständig verkapselt ist (Fritze 2005). Auch innerhalb eines Tages bei Beladung im Kühlschrank liegt kein DXR in den Polymervesikeln verkapselt vor, während bei 40°C immerhin 40-46% verkapselt werden.

**Tabelle 4-16: DXR-Beladung von PI-PEO-18.2-Vesikeln über Phosphatgradienten (Innenpuffer: 300 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 4, Außenpuffer: HBS pH 7,4) nach 20 h bei 40°C**

| Verhältnis<br>(DXR:Polymer) | EE (%) | PCS vor Inkubation |             | PCS nach Inkubation |             |
|-----------------------------|--------|--------------------|-------------|---------------------|-------------|
|                             |        | Größe [nm]         | Polyindex   | Größe [nm]          | Polyindex   |
| 1:3                         | 46 ± 2 | 224 ± 4            | 0,08 ± 0,02 | 216 ± 12            | 0,05 ± 0,04 |
| 1:6                         | 40 ± 9 | 234 ± 6            | 0,07 ± 0,06 | 221 ± 4             | 0,04 ± 0,03 |

Da bei tiefen Temperaturen (2-8°C) kein DXR verkapselt wird, wurde der Probenansatz zusätzlich mit 10% (v/v) Ethanol versetzt. Ethanol soll die Membran fluider machen und damit die DXR-Beladung erhöhen (Dos Santos et al. 2004). Es konnte jedoch für beide Beladungstemperaturen keine Veränderung bzw. Verbesserung der EE% durch Ethanol festgestellt werden.

In der Literatur (de Menezes et al. 1998) wird auch die DXR-Beladung bei höheren Temperaturen (60°C) beschrieben. Jedoch wurde in anderen Untersuchungen belegt, dass DXR thermo- und photolabil ist (Beijnen et al. 1986, Barenholz et al.

1993). Aufgrund der langen Beladungszeit (20 h) bei 40°C ist deshalb von einem DXR-Abbau auszugehen. Bei einer polymerfreien DXR-Lösung ist nach 20 Stunden Inkubation bei 40°C zwar keine makroskopische Veränderung (Farbänderung/Niederschlag) feststellbar, dennoch liegt die Fluoreszenzintensität nach der Inkubation bei 90% der Ausgangsintensität und ist ein Indiz für einen DXR-Abbau. In der Polymerprobe dagegen ist nach Beladung bei 40°C eine geringe Farbänderung zu einem etwas dunkleren Rot zu beobachten. Dies kann möglicherweise auf eine Wechselwirkung des DXR mit der Vesikelmembran zurückgeführt werden (Gallois et al. 1998) und könnte somit die geringe EE% von DXR erklären.

Da die EE% von DXR in die Polymervesikel im Vergleich zu Liposomen recht niedrig ist, wurde weiterhin überprüft, ob sich über den Ammoniumgradienten überhaupt ein pH-Gradient aufbaut, der die DXR-Beladung aktiv fördert. Der intravesikuläre pH-Wert beträgt 5,9 direkt nach Austausch (GAC) des Ammonium-Außenpuffers gegen HBS pH 7,4 als Außenpuffer. Wie aus Tabelle 4-17 zu entnehmen ist, bleibt ein pH-Gradient auch über den Zeitraum von einem Tag erhalten. Es scheint sich also ein stabiler pH-Gradient aufzubauen, der jedoch kritisch zu diskutieren ist.

**Tabelle 4-17: Intravesikulärer pH-Wert ein Tag nach Aufbau des pH-Gradienten (Innenpuffer: 300 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  pH 4, Außenpuffer: HBS pH 7,4) und Lagerung bei verschiedenen Temperaturen; Messung mit HPTS**

| Lagertemperatur | Kühlschrank | RT  | 40°C |
|-----------------|-------------|-----|------|
| pH-Wert         | 6,1         | 6,2 | 6,4  |

Die Bestimmung des pH-Gradienten erfolgte mittels Pyranin (HPTS) als pH-Sensor. Die Eignung von Pyranin als pH-Indikator in PEO-haltigen Polymervesikeln ist kritisch zu betrachten, da das Fluoreszenzspektrum durch PEO verändert wird (Avnir & Barenholz 2005). So ist in der für vesikulär verkapseltes Pyranin erstellten Kalibrierkurve (Abbildung 3-8) deutlich zu erkennen, dass es zu einer Verschiebung des  $\text{pK}_a$ -Wertes nach oben kommt, während unverkapseltes Pyranin im gleichen Puffer einen  $\text{pK}_a$ -Shift nach unten zeigt (bezogen auf Pyranin in HBS). Avnir (Avnir & Barenholz 2005) hat nachgewiesen, dass PEO-Zusätze aufgrund des hohen Wasserbindungsvermögens von PEO (3,1 Moleküle  $\text{H}_2\text{O}$  pro EO-Einheit) zu der genannten Verschiebung führen. Das bedeutet, dass das vesikulär verkapselte

Pyranin in direkter Umgebung der PEO-Membran sein muss und vermutlich mit dieser wechselwirkt. Für PEO ist weiterhin bekannt, dass es häufig Wechselwirkungen mit phenolischen Gruppen, die auch im Pyranin vorhanden sind, zeigt (Hunius 2004). Diese mögliche Wechselwirkung zwischen PEO und Pyranin sollte bei Freisetzungsuntersuchungen mit Pyranin als Marker berücksichtigt werden (Kap. 4.3.1.2). Da jedoch bei der intravesikulären pH-Wert-Bestimmung zunächst eine Kalibriergerade erstellt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass der zuvor bestimmte pH-Wert dem wahren Wert entspricht.

## **4.4 Stabilität**

### **4.4.1 Stabilität während Lagerung**

Ein physikalisches Stabilitätsmerkmal stellt die Größe dar. Zur Untersuchung der Stabilität der Polymervesikel wurden diese deshalb direkt nach der Herstellung als auch nach Lagerung (siehe Kap. 3.3.3) bei unterschiedlichen Temperaturen (2-8°C, RT, 41°C) mit PCS bei 25°C vermessen. Größenveränderungen können durch Fusion oder Aggregation während der Lagerung verursacht werden. PCS erlaubt jedoch keine Differenzierung zwischen den zum Größenwachstum führenden Vorgängen. Zur genauen Erkennung von Veränderungen in der Probe wurden daher neben PCS-Messungen für ausgewählte Proben zusätzlich Cryo-TEM Untersuchungen bei 25°C durchgeführt, die jedoch aufgrund des hohen Aufwandes nicht für die Routineanwendung geeignet sind.

#### **4.4.1.1 P2VP-PEO-8**

Die Stabilitätsprüfung für Vesikel aus P2VP-PEO-8 (10 mg/ml) erfolgte im Anschluss an die Herstellung, die sowohl mittels Extrusion als auch durch die Temperaturmethode erfolgte. Neben HBS-Puffer als Dispergiermedium wurde ferner der Einfluss anderer Medien (pH 7,4) auf die Stabilität bei den nach der Temperaturmethode präparierten Vesikeln untersucht.

Makroskopisch betrachtet konnte bei keiner der Proben eine Veränderung, wie Niederschlagsbildung oder Farbveränderung während der Lagerung, festgestellt werden.

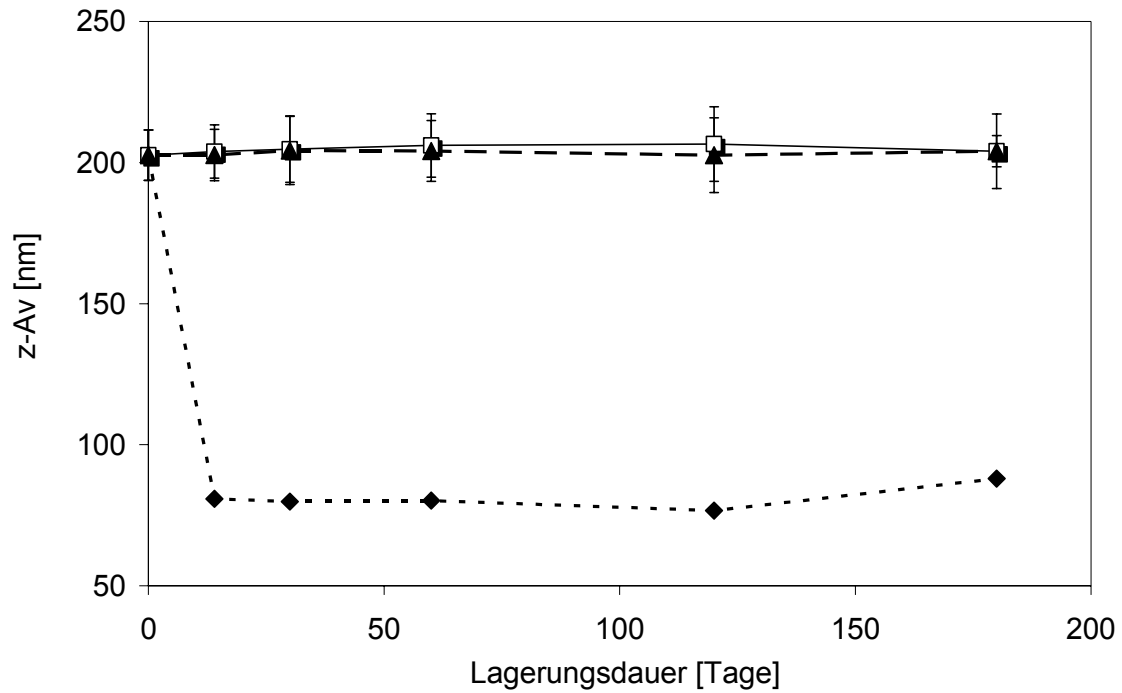
**a) PCS**

In den folgenden Grafiken sind die mit PCS bei 25°C bestimmten mittleren Vesikeldurchmesser bzw. Größenverteilungen ( $n=3$ ) der jeweiligen Herstellungsmethode als Funktion der Einlagerungsdauer bei drei Temperaturen (2-8°C, RT, 41°C) dargestellt.

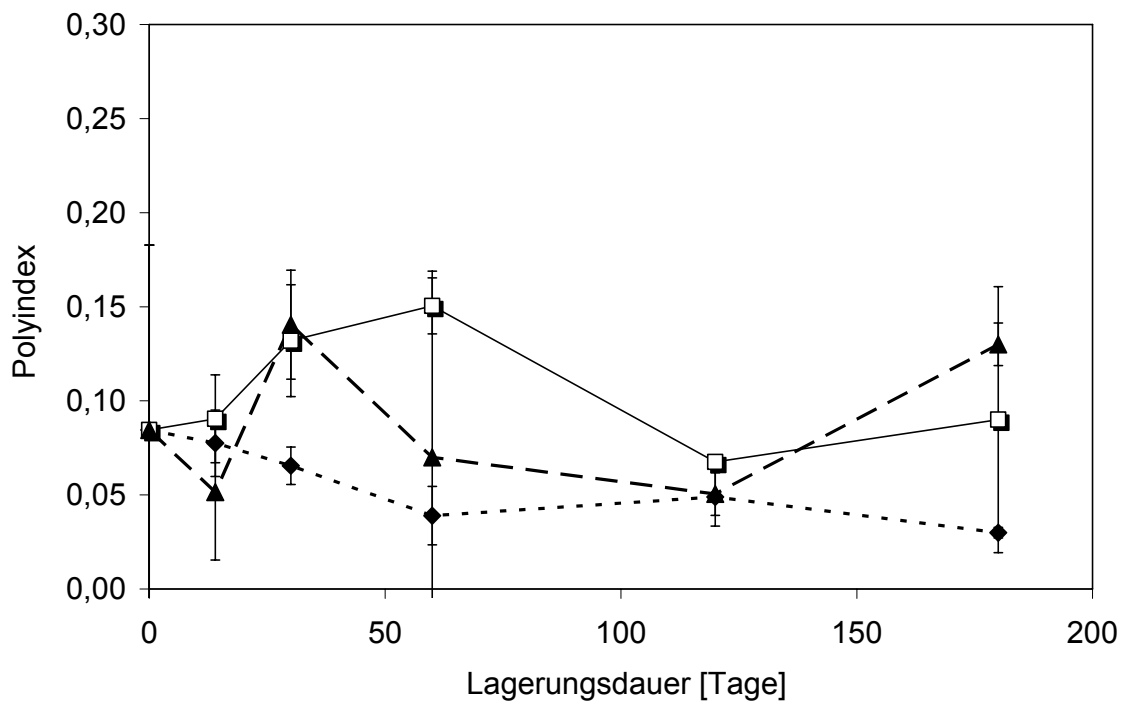
Für die *extrudierte* Probe (Abbildung 4-38 und Abbildung 4-39) konnte innerhalb von sechs Monaten bei RT und 41°C keine deutliche Größenänderung gemessen werden. Die bei 2-8°C erhaltene, deutlich niedrigere Größe entspricht, wie erwartet, dem nach der Temperaturmethode erhaltenen Wert und bleibt während der weiteren Lagerung praktisch unverändert. Ebenso zeigt die Größenverteilung keine Veränderung und bestätigt damit die Stabilität der extrudierten Probe bei allen Einlagerungstemperaturen über einen Zeitraum von sechs Monaten.

Die nach der *Temperaturmethode* hergestellten Proben zeigen über die Dauer von vier Monaten Unterschiede hinsichtlich der Stabilität zwischen den einzelnen Medien und der Einlagerungstemperatur (Abbildung 4-41 bis Abbildung 4-47). Die Probe in HBS weist einen leichten Größenzuwachs während der Lagerung bei RT auf, der in den Medien HEPES 50 mM und Wasser noch stärker ausgeprägt ist, während die Größe in allen Fällen bei 2-8°C und 41°C nahezu unverändert bleibt. Wider Erwarten kommt es zwar bei RT-Lagerung zu keiner Änderung der Größenverteilung, jedoch zu einer Verschlechterung des Polyindex während der Einlagerung bei 2-8°C und 41°C. Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich die Probe bei RT direkt nach der Herstellung noch nicht im Gleichgewicht befindet, also keine vollständige Umwandlung von Wurmmizellen in Vesikel stattgefunden hat. Dies wird dadurch bekräftigt, dass in manchen Cryo-TEM Aufnahmen nach der Temperaturmethode neben Vesikeln einige Wurmmizellen beobachtet wurden. Diese Wurmmizellen könnten während der Lagerung mit den Vesikeln fusionieren und dadurch sowohl zu einem in der Lichtstreuung beobachteten Anstieg der Vesikelgröße als auch zu einer Verbesserung des Polyindex durch Verschwinden der Wurmmizellen führen.

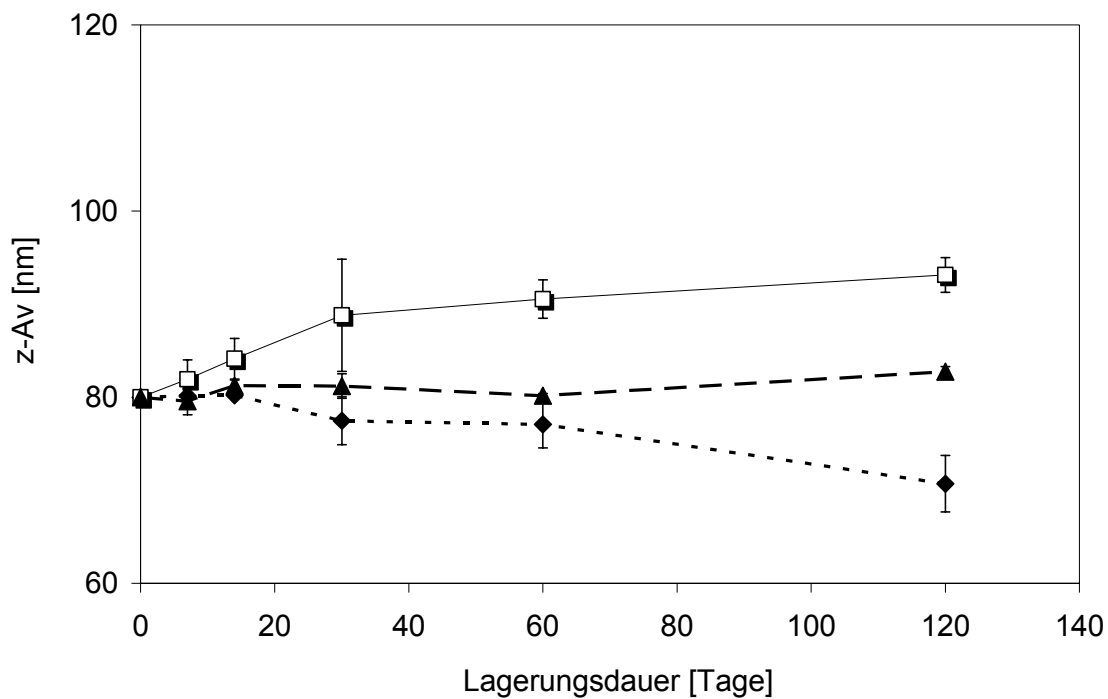
Die Probe in Phosphatpuffer weist, wie schon zuvor beobachtet (Kap. 4.1.6.3), einen etwas größeren Teilchendurchmesser als Startwert auf, der sich während der Lagerung bei RT und 41°C allerdings nicht mehr ändert. Nur bei 2-8°C kommt es im Phosphatmedium zu einer minimalen Größenreduzierung, während die Größenverteilung bei allen Einlagerungstemperaturen über die Zeit konstant bleibt.



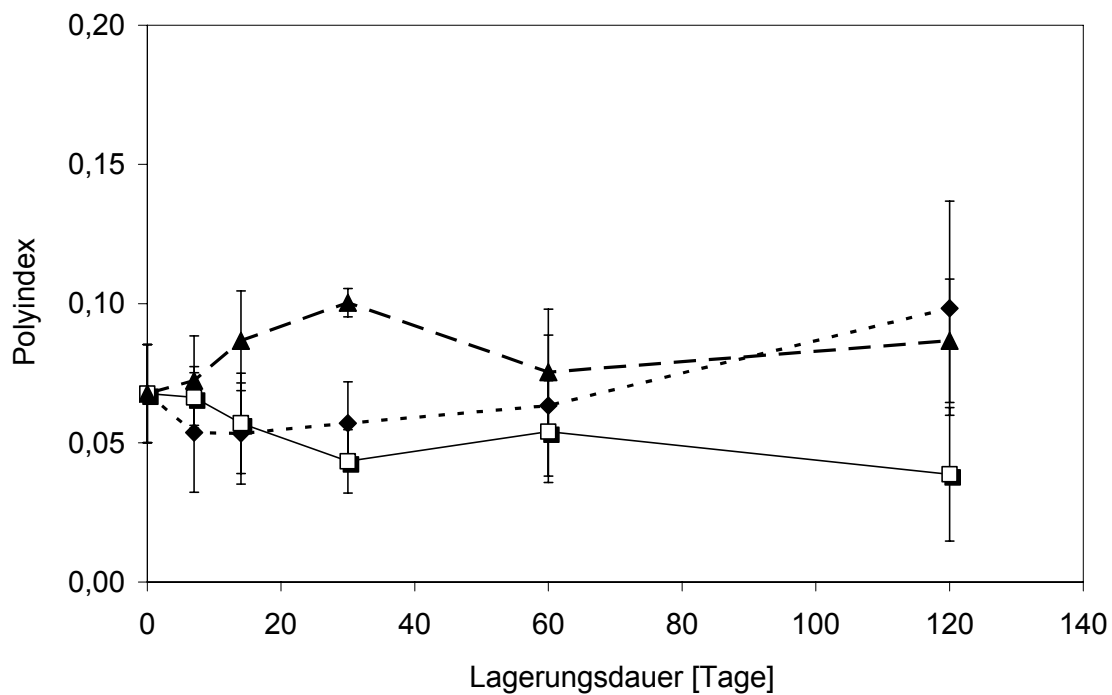
**Abbildung 4-38: Größe von P2VP-PEO-8 in HBS (Extrusion) nach verschiedenen Zeiten im Kühlschrank (◆), bei Raumtemperatur (□) und 41°C (▲) (n=3)**



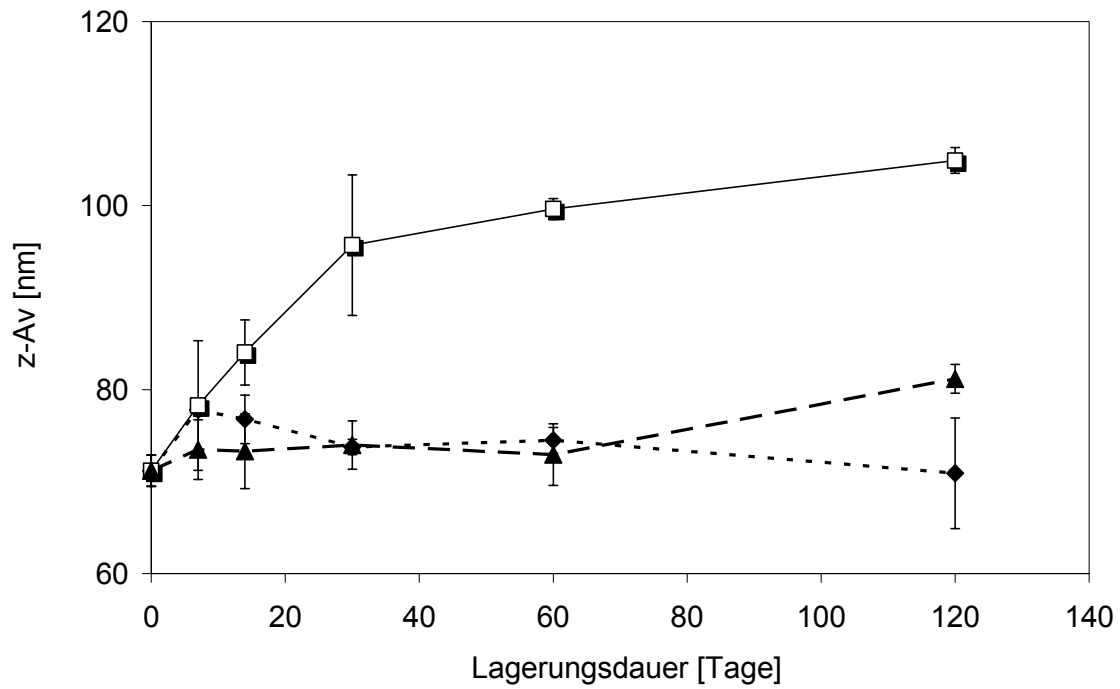
**Abbildung 4-39: Größenverteilung von P2VP-PEO-8 in HBS (Extrusion) nach verschiedenen Zeiten im Kühlschrank (◆), bei Raumtemperatur (□) und 41°C (▲) (n=3)**



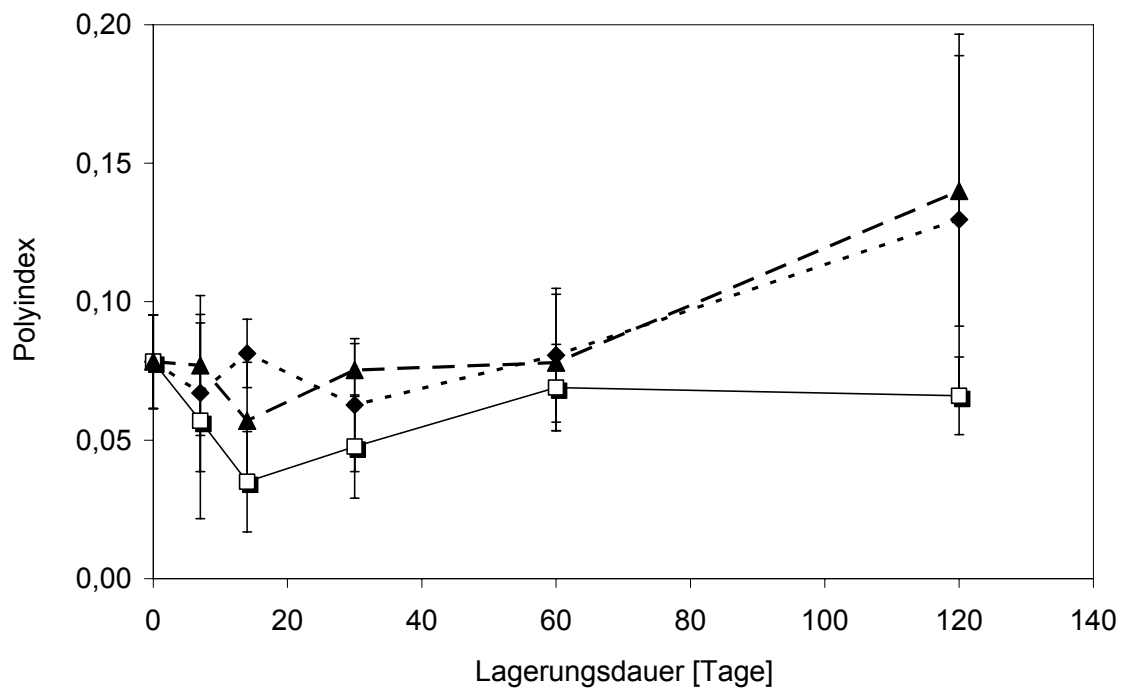
**Abbildung 4-40: Größe von P2VP-PEO-8 in HBS (Temperaturmethode) nach Lagerung im Kühlschrank (◆), bei Raumtemperatur (□) und 41°C (▲) (n=3)**



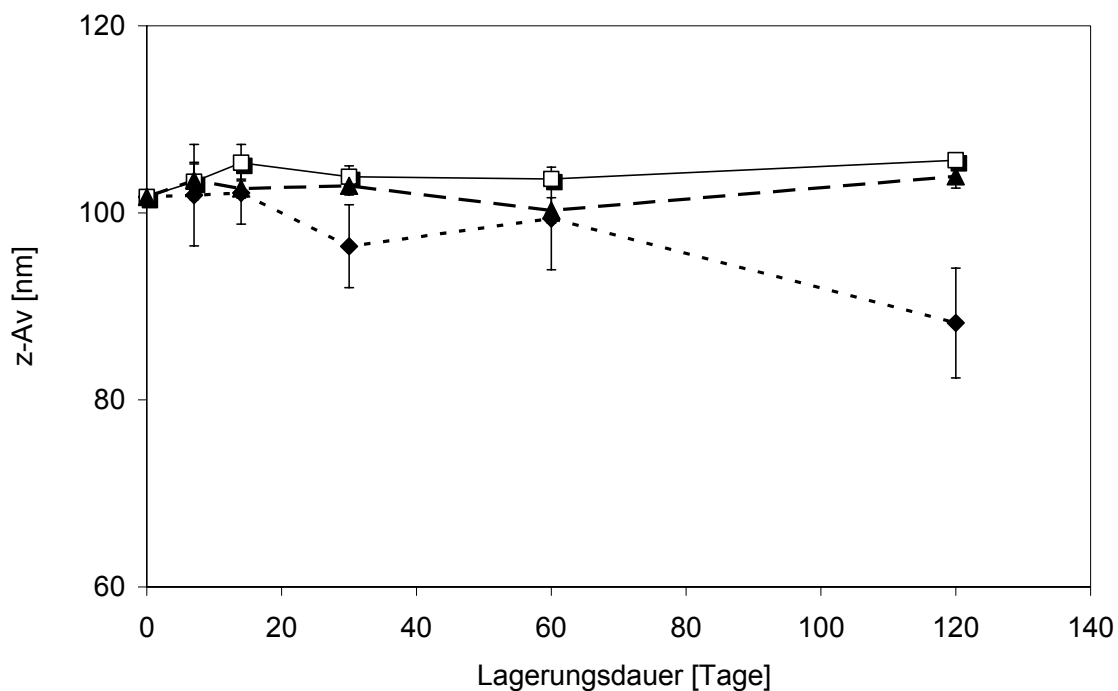
**Abbildung 4-41: Größenverteilung von P2VP-PEO-8 in HBS (Temperaturmethode) nach Lagerung im Kühlschrank (◆), bei Raumtemperatur (□) und 41°C (▲) (n=3)**



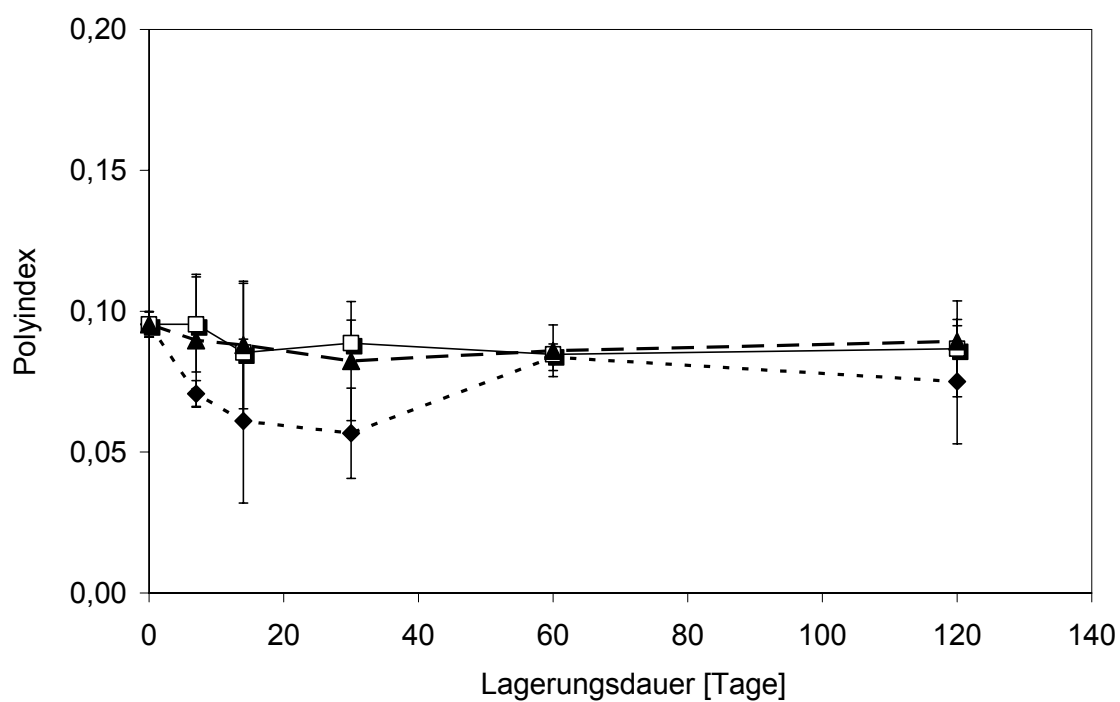
**Abbildung 4-42:** Größe von P2VP-PEO-8 in HEPES 50 mM (Temperaturmethode) nach Lagerung im Kühlschrank (◆), bei Raumtemperatur (□) und 41°C (▲) (n=3)



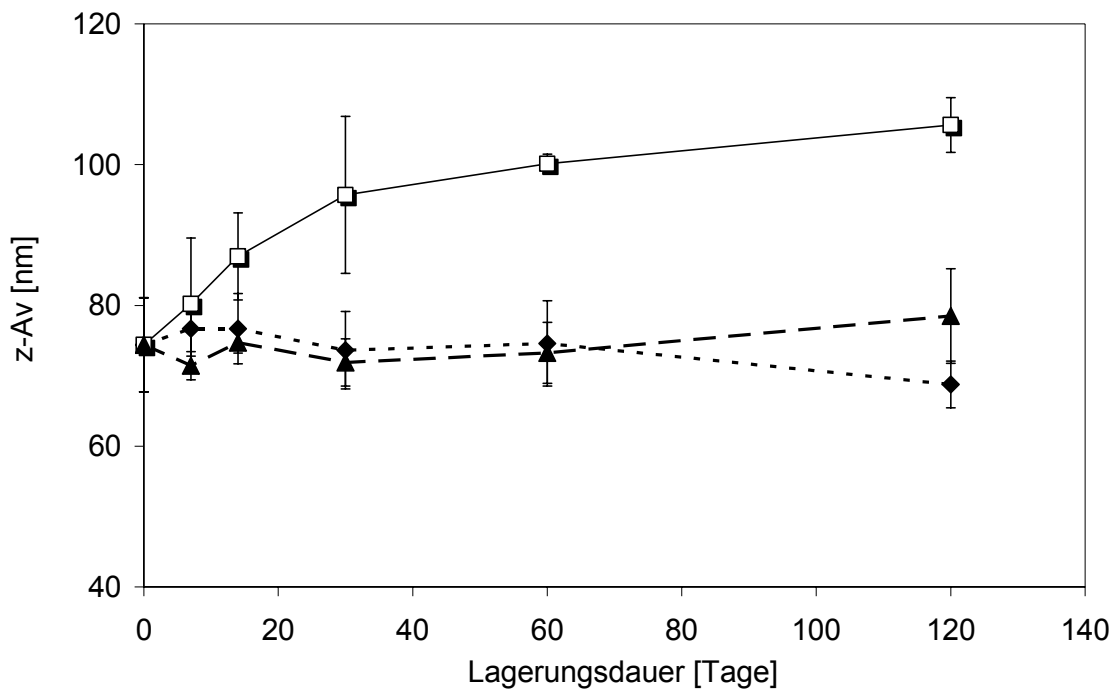
**Abbildung 4-43:** Größenverteilung von P2VP-PEO-8 in HEPES 50 mM (Temperaturmethode) nach Lagerung im Kühlschrank (◆), bei Raumtemperatur (□) und 41°C (▲) (n=3)



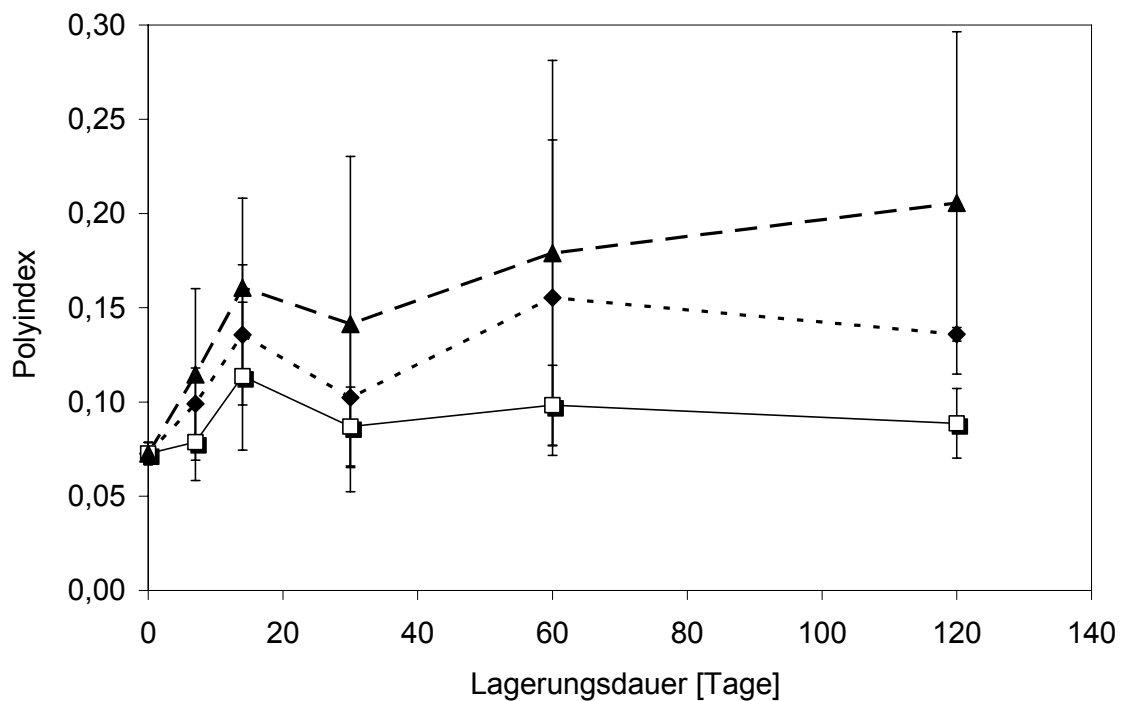
**Abbildung 4-44:** Größe von P2VP-PEO-8 in Phosphat 50 mM (Temperaturmethode) nach Lagerung im Kühlschrank (◆), bei Raumtemperatur (□) und 41°C (▲) (n=3)



**Abbildung 4-45:** Größenverteilung von P2VP-PEO-8 in Phosphat 50 mM (Temperaturmethode) nach Lagerung im Kühlschrank (◆), bei Raumtemperatur (□) und 41°C (▲) (n=3)



**Abbildung 4-46: Größe von P2VP-PEO-8 in Wasser (Temperaturmethode) nach Lagerung im Kühlschrank (♦), bei Raumtemperatur (□) und 41°C (▲) (n=3)**

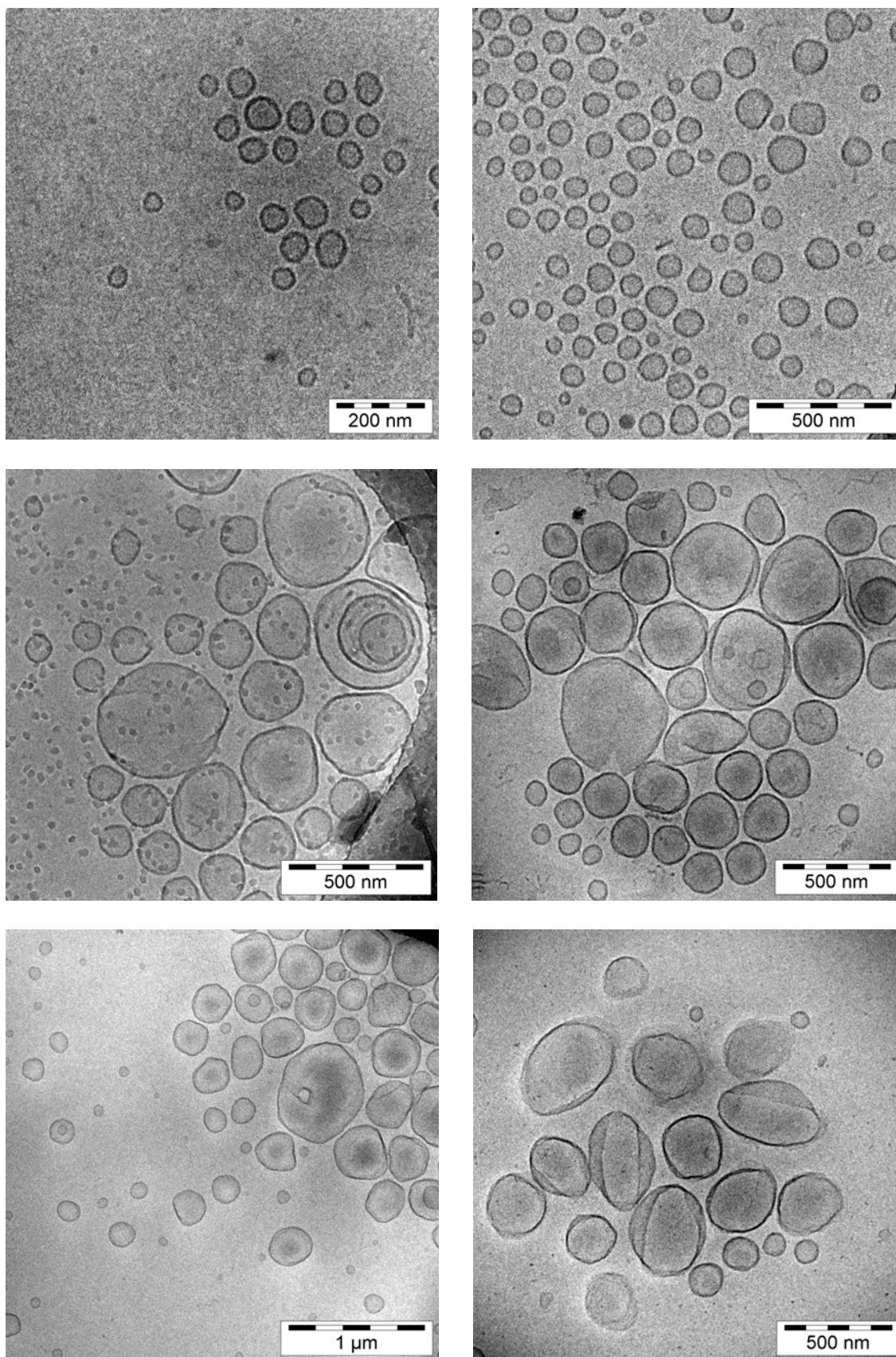


**Abbildung 4-47: Größenverteilung von P2VP-PEO-8 in Wasser (Temperaturmethode) nach Lagerung im Kühlschrank (♦), bei Raumtemperatur (□) und 41°C (▲) (n=3)**

**b) Cryo-TEM**

Eine alternative Methode zur Größenbestimmung stellt die Cryo-TEM dar, bei der repräsentative Bildausschnitte am Computer ausgezählt werden, um daraus eine Größenverteilung zu ermitteln. Dazu wurde eine ausgewählte extrudierte Probe von P2VP-PEO-8 nach zwei Wochen sowie nach ein, zwei und sechs Monaten im Cryo-TEM betrachtet. In Abbildung 4-48 sind beispielhaft Aufnahmen bei 25°C nach zwei Wochen und sechs Monaten Lagerung bei den drei Lagertemperaturen dargestellt. Die im Kühlschrank gelagerten Proben zeigen zu allen Zeitpunkten nach Erwärmung auf 25°C vesikelbildende Eigenschaften und enthalten ausschließlich unilamellare Vesikel in einer sehr homogenen Größenverteilung. Im Vergleich zur Lagerung bei 41°C sind bei Raumtemperatur neben wenigen multilamellaren Vesikeln auch vereinzelte Wurmmizellen zu erkennen. Innerhalb von zwei Monaten werden keine auffälligen Veränderungen der Vesikelform oder das Auftreten anderer Strukturen beobachtet. Nach sechs Monaten fällt bei RT- und 41°C-Lagerung das gehäufte Auftreten geöffneter Vesikel auf, was als erstes Anzeichen einer Instabilität der Probe angesehen werden kann. Diese Art von Instabilität ist mit PCS nicht zugänglich.

Zur Bestimmung der mittleren Vesikelgröße wurde der horizontale Durchmesser von mindestens 350 Vesikeln ermittelt (Tabelle 4-18). Ein Vergleich der PCS-Werte mit den durch Cryo-TEM bestimmten Werten zeigt, dass die mikroskopisch ermittelten Teilchengrößen kleiner sind als die Lichtstreudaten. Dies liegt zum einen daran, dass bei PCS der hydrodynamische Durchmesser ermittelt wird, welcher etwas größer ist als der im Mikroskop sichtbare. Zum anderen ist der Kontrast des hydrophilen PEO-Teils des Blockcopolymers zu niedrig und somit nicht in der EM erkennbar (Won et al. 2002), was zu einer geringen Minimierung der sichtbaren Vesikelgröße führt. Außerdem ist bei Proben mit breiterer Größenverteilung zu beachten, dass es zu einer unterschiedlichen Gewichtung der einzelnen Größen bei den Messmethoden kommt. Bei der Lichtstreuung geben größere Teilchen ein intensiveres Streusignal, welches das Signal sehr kleiner Teilchen überdecken kann und somit zu einer Größenverzerrung führt. Bei Cryo-TEM werden dagegen bevorzugt kleinere Teilchen erfasst, da größere Vesikel (> 500 nm) meist bei der Probenpräparation entfernt (abgesaugt) werden oder aufgrund der Bikonkavität des Probenfilms bevorzugt am Gridrand anzutreffen sind, wodurch sie leicht übersehen werden können (Egelhaaf et al. 1996, Almgren et al. 2000).



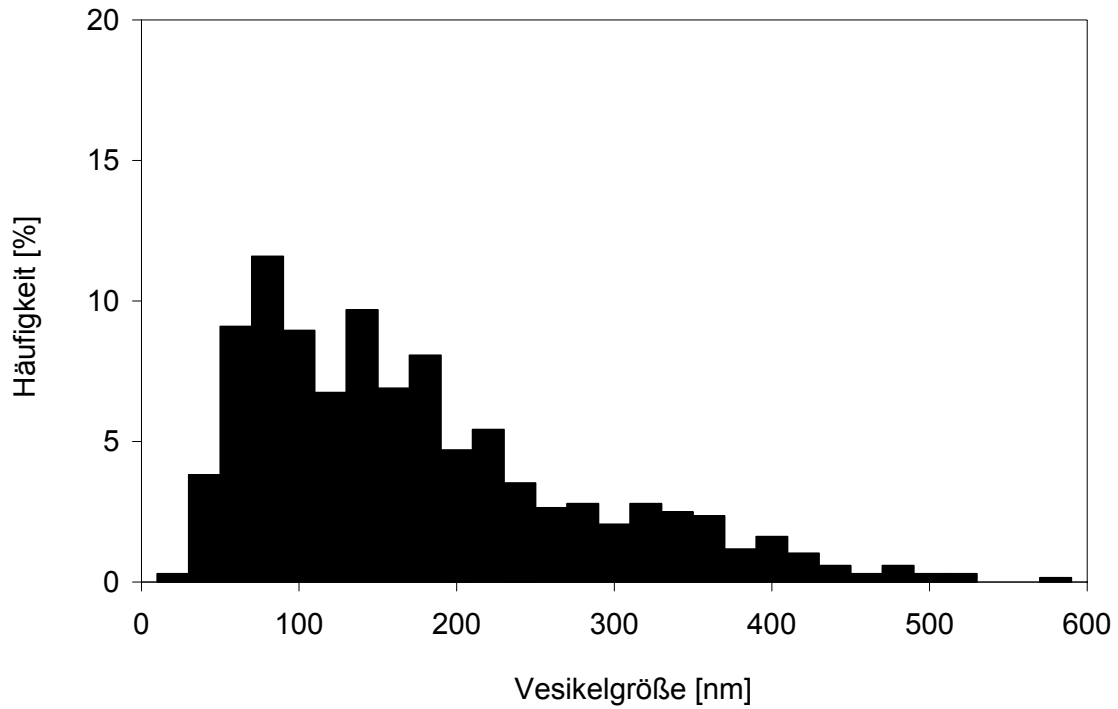
**Abbildung 4-48: Cryo-TEM von P2VP-PEO-8 (extrudiert) bei 25°C nach Lagerung bei: oben 2-8°C, Mitte RT, unten 41°C; links zwei Wochen, rechts sechs Monate nach Präparation**

**Tabelle 4-18: P2VP-PEO-8, extrudiert in HBS, Vergleich PCS mit Cryo-TEM (25°C)**

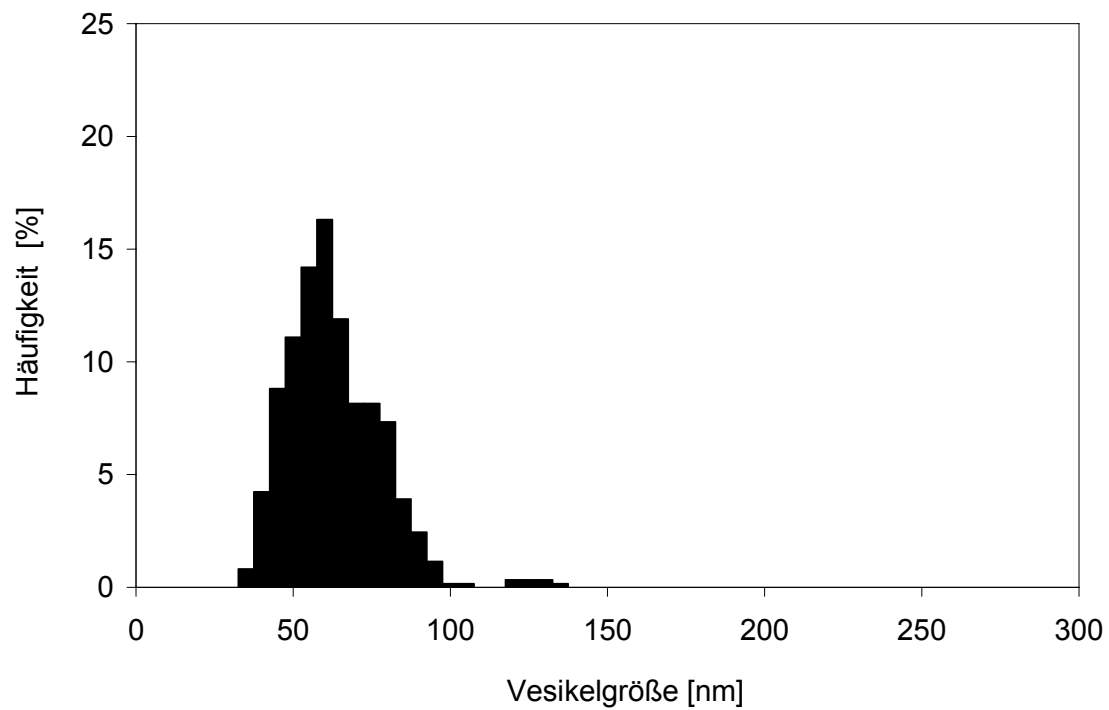
| Lagerung  |      | PCS       |            | Cryo-TEM               |          |          |        |
|-----------|------|-----------|------------|------------------------|----------|----------|--------|
| Ort       | Tage | z-Av [nm] | Poly-index | Größe [nm] ( $\pm$ sd) | Min [nm] | Max [nm] | Anzahl |
| <b>K</b>  | 14   | 80        | 0,06       | 62 ( $\pm$ 15)         | 21       | 115      | 440    |
|           | 30   | 78        | 0,07       | 63 ( $\pm$ 15)         | 33       | 133      | 613    |
|           | 60   | 80        | 0,03       | 57 ( $\pm$ 14)         | 21       | 112      | 386    |
|           | 180  | 88        | 0,03       | 83 ( $\pm$ 30)         | 27       | 198      | 515    |
| <b>RT</b> | 14   | 210       | 0,07       | 188 ( $\pm$ 101)       | 39       | 528      | 493    |
|           | 30   | 213       | 0,11       | 192 ( $\pm$ 105)       | 47       | 627      | 364    |
|           | 60   | 214       | 0,13       | 169 ( $\pm$ 94)        | 47       | 532      | 377    |
|           | 180  | 208       | 0,13       | 179 ( $\pm$ 90)        | 36       | 544      | 485    |
| <b>41</b> | 14   | 209       | 0,13       | 159 ( $\pm$ 104)       | 25       | 625      | 530    |
|           | 30   | 213       | 0,16       | 176 ( $\pm$ 107)       | 28       | 737      | 682    |
|           | 60   | 211       | 0,14       | 181 ( $\pm$ 116)       | 31       | 719      | 382    |
|           | 180  | 214       | 0,14       | 184 ( $\pm$ 105)       | 28       | 485      | 540    |

K: Kühlschrank (2-8°C), RT: Raumtemperatur (18-25°C), 41: Trockenschrank (41°C)

In den folgenden Abbildungen sind beispielhaft erstellte Histogramme aus der Größenzählung für eine extrudierte Probe, die vier Wochen bei 41°C (Abbildung 4-49) oder im Kühlschrank (Abbildung 4-50) gelagert wurde, dargestellt. Die Höhe der einzelnen Größenfraktionsbalken stellt deren Anzahl dar. Bei beiden Proben ist die Größenverteilung zu kleineren Größen hin verschoben und es liegt keine Gauss-Verteilung vor. Die bei 41°C gelagerte extrudierte Probe zeigt eine sehr breite Größenverteilung, obwohl der mit PCS ermittelte Polyindex mit 0,13 eine engere Verteilung erwarten ließ. Das Histogramm für die bei RT gelagerte Probe (nicht dargestellt) ist vergleichbar breit verteilt. Die durch Lagerung im Kühlschrank hervorgerufene Homogenisierung der Probe ist gut in Abbildung 4-50 zu erkennen und zeigt eine schmale Verteilung, die mit den entsprechenden PCS-Daten übereinstimmt.



**Abbildung 4-49: Größen-Histogramm (Cryo-TEM) von P2VP-PEO-8 (extrudiert, 30 Tage bei 41°C)**



**Abbildung 4-50: Größen-Histogramm (Cryo-TEM) von P2VP-PEO-8 (extrudiert, 30 Tage bei 2-8°C)**

#### **4.4.1.2 PI-PEO-18.2 (Extrusion)**

Die Stabilität der durch Extrusion präparierten Polymervesikel aus PI-PEO-18.2 (10 mg/ml) bei verschiedenen Einlagerungstemperaturen wurde, wie zuvor bei P2VP-PEO-8, mittels PCS und Cryo-TEM verfolgt.

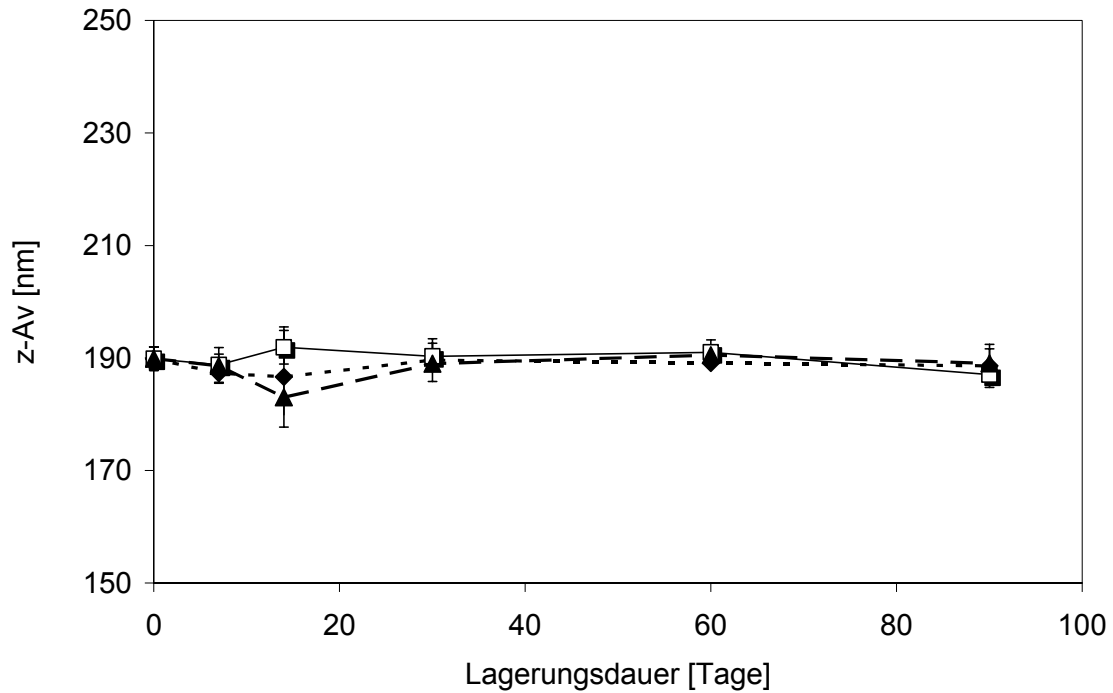
Auffällig ist die während der Lagerung bei 41°C beobachtete Farbänderung der milchig-weißen Polymerdispersion von schwach gelb zu einer intensiv zitronengelben Farbe. Dabei kann nicht von einer Quervernetzung innerhalb des Poly(isopren)-Blockes ausgegangen werden, da bei EtOH-Zusatz eine Vesikelauflösung erfolgt. Die Farbänderung wird somit vermutlich nicht durch eine Veränderung des Polymers hervorgerufen, sondern durch eine im Polymer enthaltene Verunreinigung. Eine Niederschlagsbildung konnte dagegen zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden.

##### **a) PCS**

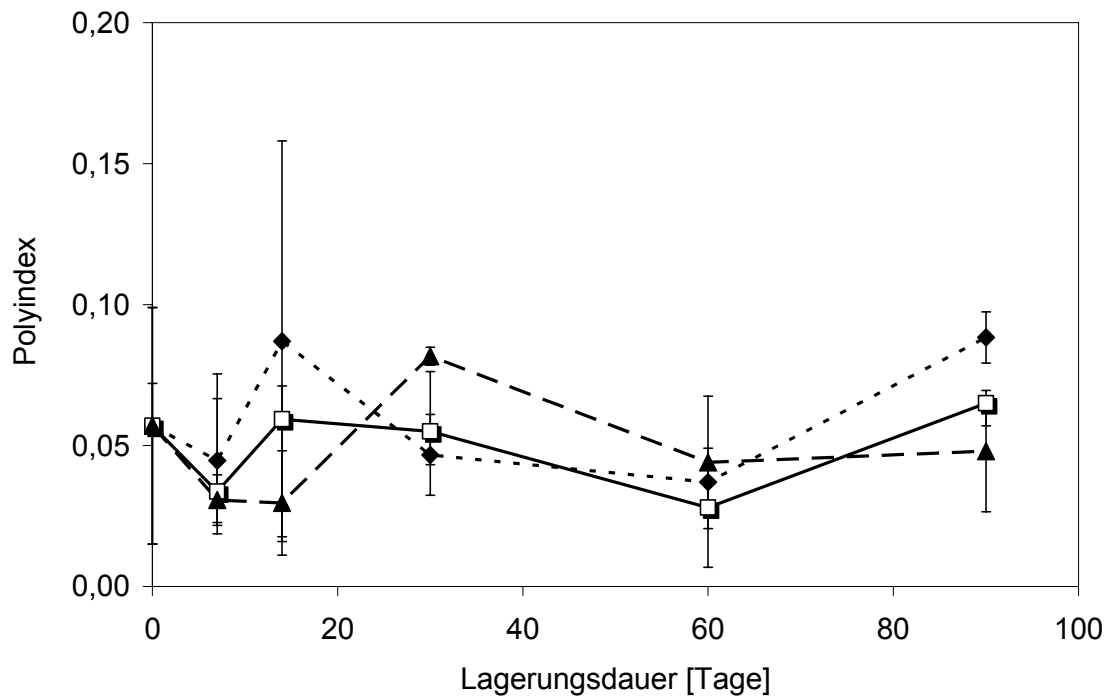
Über einen Zeitraum von drei Monaten kann keine Änderung der Vesikelgröße und Breite der Größenverteilung mit der Lichtstreuungsmessung beobachtet werden. Dies geht aus der Abbildung 4-51 und Abbildung 4-52 hervor. Die beobachtete Farbänderung und damit die Änderung der Probeneigenschaften bei 41°C scheint somit keinen erkennbaren Einfluss auf die Vesikelmorphologie und deren Stabilität zu haben.

##### **b) Cryo-TEM**

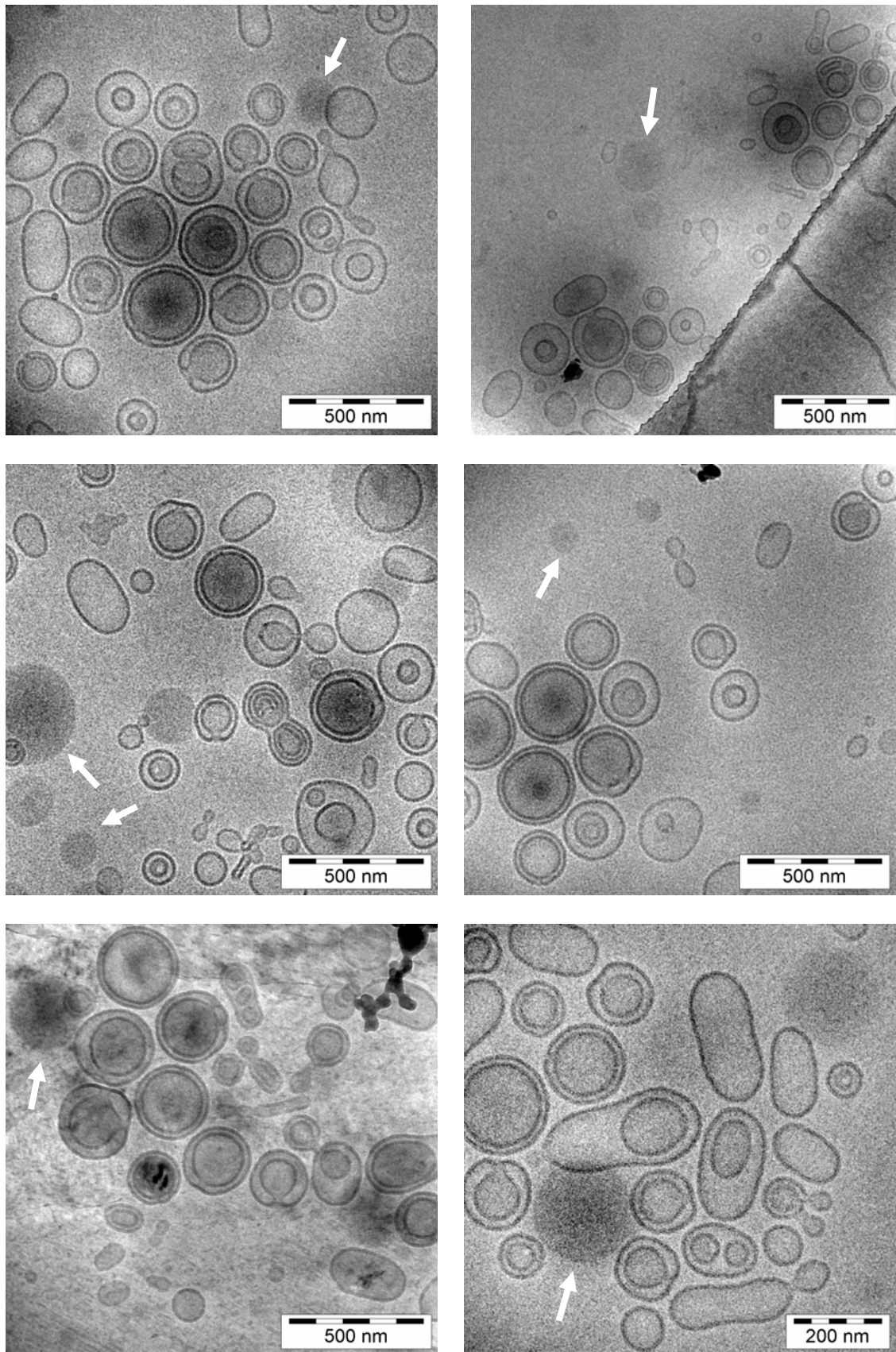
Abbildung 4-53 stellt Cryo-TEM-Aufnahmen dar, welche die Probe nach vier bzw. zwölf Wochen Lagerung bei den drei Temperaturen (2-8°C, RT, 41°C) zeigen. Es kann dabei kein Unterschied zwischen den einzelnen Temperaturen oder Lagerzeiten festgestellt werden. Ebenso finden sich hier die gleichen, häufig eingestülpten Vesikelformen, wie bei einer frisch extrudierten Probe (siehe Abbildung 4-8). Auffällig ist das Auftreten der gleichmäßig dunklen runden Strukturen bei allen Proben, die an Emulsionstropfen oder Scheibenmizellen erinnern, da keine klar abgegrenzte Membran zu erkennen ist (siehe Pfeile). Zudem zeigen sie Ähnlichkeit mit Cryo-TEM-Aufnahmen von LCMs (Large Compound Micelles), die aus einer Ansammlung reverser Mizellen bestehen (Zhang & Eisenberg 1996, Wittemann et al. 2007). Da diese unbekannten Strukturen hauptsächlich bei recht dicken Probenfilmen anzutreffen sind, könnten sie aber auch präparationsbedingte Artefakte darstellen.



**Abbildung 4-51: Größe von PI-EPO-18.2 (extrudiert, in HBS) nach verschiedenen Zeiten im Kühlschrank (♦), bei Raumtemperatur (□) und 41°C (▲) (n=3)**



**Abbildung 4-52: Größenverteilung von PI-PEO-18.2 (extrudiert, in HBS) nach verschiedenen Zeiten im Kühlschrank (♦), bei Raumtemperatur (□) und 41°C (▲) (n=3)**



**Abbildung 4-53: Cryo-TEM von PI-PEO-18.2 (extrudiert) bei 25°C nach Lagerung bei: oben 2-8°C, Mitte RT, unten 41°C; links vier Wochen, rechts zwölf Wochen nach Präparation. Die Pfeile zeigen nichtvesikuläre Strukturen, evtl. Emulsionströpfchen oder Scheibenmizellen.**

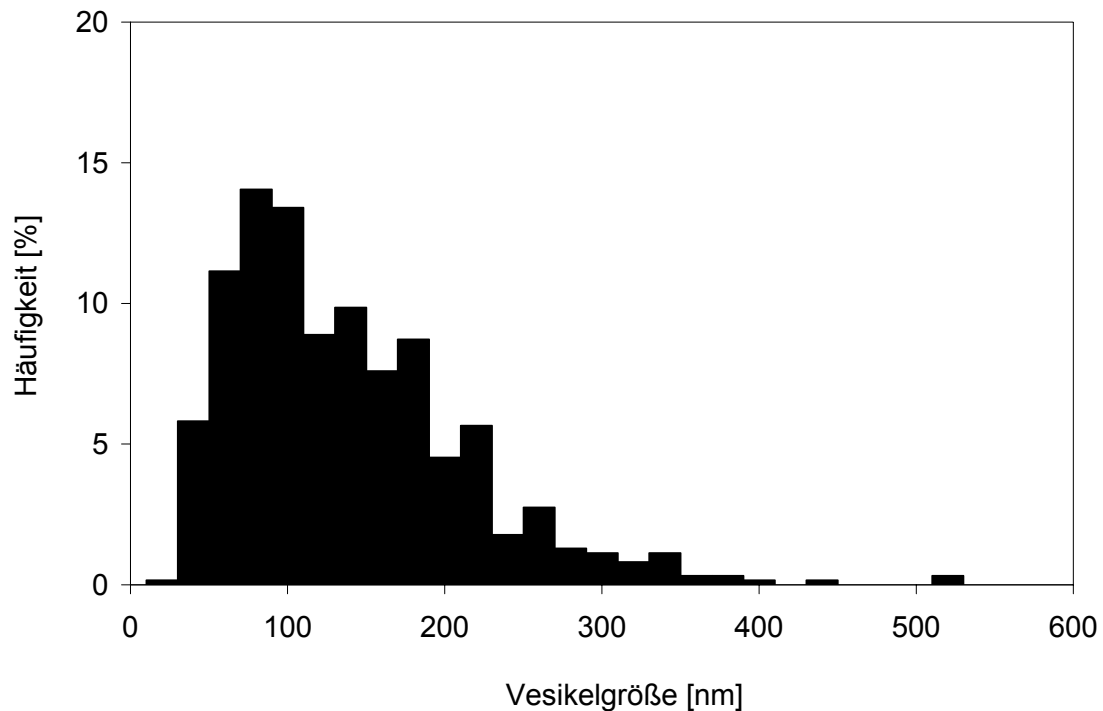
Auch nach Auszählen der aus den Cryo-TEM-Aufnahmen bestimmten Vesikelgrößen (Tabelle 4-19) kann keine auffällige Instabilität der Vesikel festgestellt werden. Zwar ist die durchschnittliche Vesikelgröße nach 90 Tagen geringfügig größer als nach 30 Tagen Lagerung, jedoch sind solche Schwankungen möglich, da bei den Messungen immer nur Probenausschnitte betrachtet werden. Die Größen sind bei der Analyse mit Cryo-TEM, ebenso wie zuvor bei P2VP-PEO-8 beobachtet, kleiner als bei der Bestimmung mit PCS.

**Tabelle 4-19: PI-PEO-18.2, extrudiert in HBS, Vergleich PCS mit Cryo-TEM (25°C)**

| Lagerung |      | PCS       |            | Cryo-TEM          |          |          |        |
|----------|------|-----------|------------|-------------------|----------|----------|--------|
| Ort      | Tage | z-Av [nm] | Poly-index | Größe [nm] (± sd) | Min [nm] | Max [nm] | Anzahl |
| K        | 30   | 193       | 0,04       | 138 (± 75)        | 28       | 522      | 619    |
|          | 90   | 185       | 0,08       | 150 (± 76)        | 31       | 542      | 455    |
| RT       | 30   | 192       | 0,07       | 146 (± 105)       | 21       | 841      | 512    |
|          | 90   | 188       | 0,07       | 163 (± 84)        | 25       | 470      | 406    |
| 41       | 30   | 190       | 0,08       | 149 (± 83)        | 24       | 572      | 469    |
|          | 90   | 191       | 0,03       | 172(± 93)         | 31       | 547      | 337    |

K: Kühlschrank (2-8°C), RT: Raumtemperatur (18-25°C), 41: Trockenschrank (41°C)

Ebenso zeigen die aus der Größenausählung erhaltenen Histogramme, dass die am häufigsten vorkommenden Größenklassen zu kleineren Größen (100 nm) hin verschoben sind und die Größenverteilung relativ breit ist. (Abbildung 4-54).



**Abbildung 4-54: Größen-Histogramm (Cryo-TEM) von PI-PEO-18.2 (extrudiert, 30 Tage bei 2-8°C)**

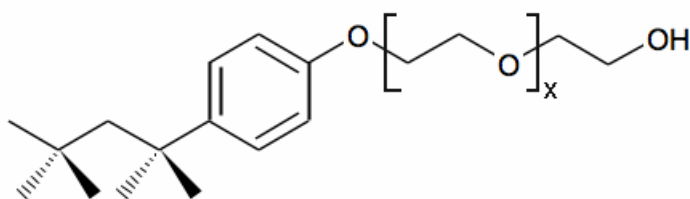
#### **4.4.1.3 Zusammenfassung Lagerstabilität**

In der Literatur gibt es bisher nur wenige Angaben zur Lagerstabilität von Polymervesikeln. So wurde bspw. mit Hilfe der Lichtstreuung die Stabilität für Vesikel aus PB-PEO für vier Monate bei 4°C (Li et al. 2007b), für Pluronics für einen Monat bei 25°C (Li et al. 2007a), für bioabbaubare PLA-PEO-Vesikel eine Stabilität von drei Monaten (Meng et al. 2003) und für Peptosomen eine Stabilität von bis zu neun Monaten bei 4°C (Brown et al. 2000, Bellomo et al. 2004) beschrieben. Auch wurde bereits gezeigt, dass Polymersomen aus PB-PEO gegenüber einer Autoklavierung beständig sind (Lee et al. 2001). Es wird ersichtlich, dass Polymervesikel sehr stabil sind. Ein direkter Vergleich mit den Literaturangaben kann jedoch nicht erfolgen, da es sich um andere Polymere handelt und nicht immer bei den gleichen Lagertemperaturen gearbeitet wurde.

Beide hier verwendeten Polymere zeigten nach Messungen mit PCS und Cryo-TEM eine hinreichende physikalische Stabilität, also keine drastische Änderung der Vesikelgröße, Größenverteilung und Vesikelform, über einen Zeitraum von drei (PI-PEO-18.2) bzw. sechs Monaten (P2VP-PEO-8) bei den Lagertemperaturen 2-8°C, Raumtemperatur und 41°C. Makroskopische Veränderungen konnten nur bei PI-PEO-18.2 während der Lagerung bei 41°C durch eine Farbänderung der Probe festgestellt werden, während alle anderen Proben optisch unverändert blieben. Zur weiteren Untersuchung der physikalischen Stabilität der Polymere wäre deshalb der Einsatz anderer Methoden wie der Lichtmikroskopie - mit der Kristallbildung oder die Entstehung größerer Aggregate sichtbar wird - sinnvoll, da diese Veränderungen in der Probe mit PCS und Cryo-TEM nicht zugänglich sind.

#### 4.4.2 Stabilität gegenüber Triton X-100

Die Aufklärung der Wechselwirkung zwischen Membranen und Detergenzien spielt in der Biochemie eine große Rolle, wo durch Solubilisierung von Biomembranen die enthaltenen Membranproteine ohne Denaturierung herausgelöst und isoliert werden sollen. Nichtionische Detergenzien mit niedriger CMC wie Triton X-100 finden dabei am häufigsten Anwendung.



**Abbildung 4-55:** Triton X-100 steht für Polyethyleneglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether,  $x = 7-8$

Die Solubilisierung von Membranen erfolgt oberhalb einer kritischen Detergenzkonzentration, wobei der Solubilisierungsprozess bei liposomalen Membranen in drei Stufen mit steigender Detergenzkonzentration verläuft (Helenius & Simonis 1975, Lichtenberg et al. 1983, Schubert 1989).

- (1) Bei niedrigen Detergenzkonzentrationen kommt es durch den Einbau des Detergenz in den äußeren Monolayer der Membrandoppelschicht zu Spannungen innerhalb der Membran, der durch Umverteilung ausgeglichen wird. Während dieses „Flipp-Flopps“ kann es kurzzeitig zur Bildung von Membrandefekten kommen.
- (2) Im zweiten Schritt werden scheibenförmige Mischmizellen aus der Membran herausgelöst, die mit Detergenz-gesättigten vesikulären Membranvesikel im dynamischen Gleichgewicht koexistieren. Die Bildung von Membranporen tritt auf.
- (3) Im letzten Schritt liegen bei hohen Detergenzkonzentrationen schließlich alle Membranbestandteile mischmizellar gelöst vor.

Die detergenzinduzierte Solubilisierung von nichtionischen Polymervesikeln (PBD-PEO, PEE-PEO) mit Triton X-100 wurde bisher nur von Pata et al. (2004) mittels Dynamischer Lichtstreuung untersucht. Pata et al. (2004) konnten zeigen, dass die Stabilität der Polymermembran gegenüber dem Detergenz mit steigender Bilayerdicke zunahm und sich der Mechanismus der Solubilisierung von dem für reine Lipidvesikel bekannten Mechanismus unterscheidet. Der Ausgleich der durch den Detergenzeinbau in den äußeren Monolayer verursachten Asymmetrie wird nicht durch „Flipp“ von Blockcopolymeren vom inneren in den äußeren Monolayer erreicht, sondern nur durch den Transport des Detergenz durch die Membran.

Zur Untersuchung der Stabilität von Blockcopolymervesikeln, bestehend aus dem ionischen Polymer P2VP-PEO-8 oder dem nichtionischen PI-PEO-18.2, gegenüber Triton X-100 wurden die Teilchengrößen bei verschiedenen Detergenz-Polymer-Verhältnissen gemessen. Weiterhin wurde die durch Triton X-100 verursachte Erhöhung der Permeabilität des Fluoreszenzmarkers HPTS für PI-PEO-Vesikel wie im Methodenteil 3.3.9 beschrieben bestimmt. Für P2VP-PEO-8 sind keine

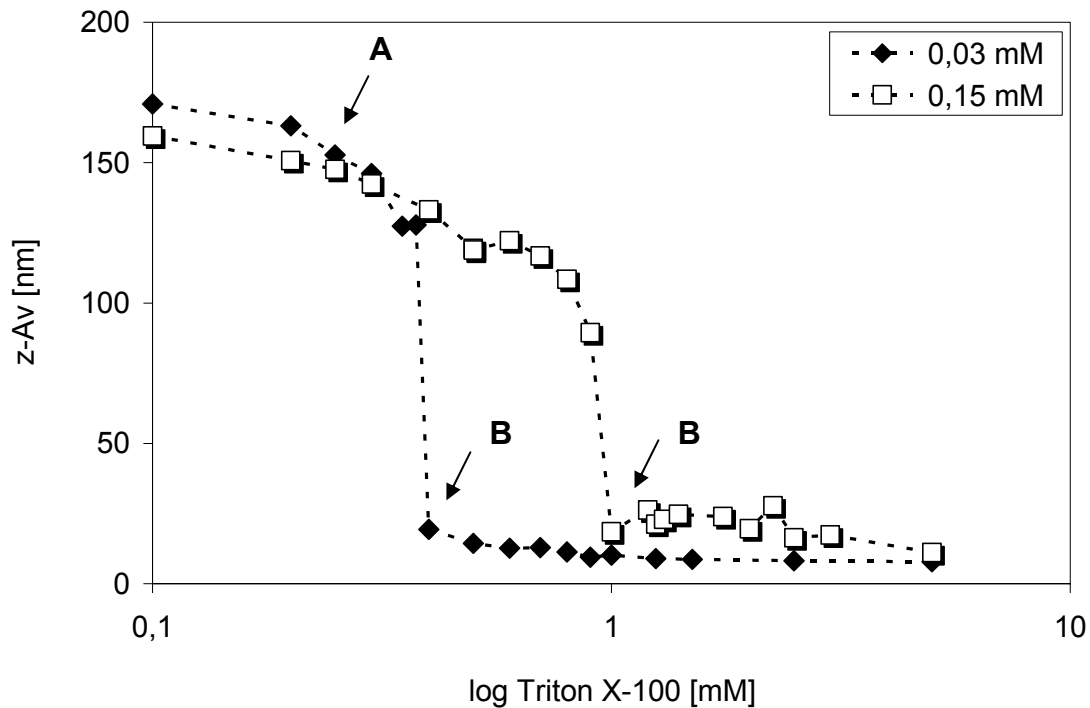
fluorimetrischen Messungen möglich, da der wasserlösliche Farbstoff nicht ausreichend stabil verkapselt wird (Kap. 4.3.1).

#### **4.4.2.1 PCS**

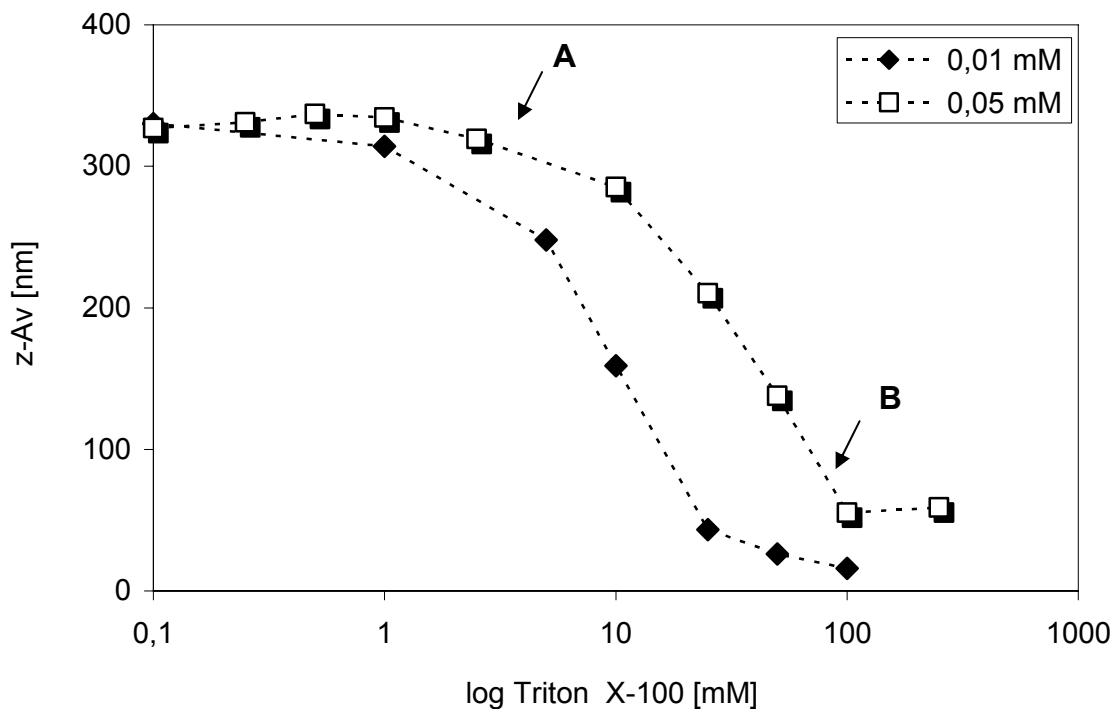
Der Einfluss von Triton X-100 auf die Teilchengröße wurde in einem Triton-Konzentrationsbereich von 0 bis 250 mM bei zwei verschiedenen Polymergehalten (0,1 mg/ml oder 0,5 mg/ml) untersucht. Die mittleren Teilchengrößen in Abhängigkeit von der Tritonkonzentration sind für PI-PEO-18.2 in Abbildung 4-56 und für P2VP-PEO-8 in Abbildung 4-57 dargestellt.

Die Teilchengröße für das PI-PEO-18.2 (Abbildung 4-56) sinkt zunächst langsam mit steigender Tritonkonzentration und fällt dann bei einer bestimmten Tritonmenge steil ab. Das Diagramm könnte man in Bezug auf das Drei-Stufen-Modell (siehe oben) in drei Teilbereiche unterteilen. Die Bildung von Mischmizellen, die in Koexistenz mit intakten Vesikeln auftreten, beginnt ab dem Zeitpunkt des flachen Abfalls und ist durch einen Pfeil (A) im Diagramm markiert. Der Beginn der vollständigen Vesikelsolubilisierung wird durch den Punkt B (Pfeil) der drastischen Größenminimierung gekennzeichnet. Die Vesikelauflösung liegt bei 1 mM Triton für einen Polymergehalt von 0,5 mg/ml bzw. bei 0,375 mM Triton für 0,1 mg/ml Polymer. Dies zeigt, dass für höhere Polymerkonzentrationen auch eine höhere kritische Tritonkonzentration zur Solubilisierung nötig ist. Die für die vollständige Solubilisierung notwendige Tritonmenge liegt in beiden Fällen oberhalb der CMC von Triton X-100, die bei 0,25 mM liegt (Partearroyo et al. 1996).

Der Kurvenverlauf bei dem ionischen Polymer P2VP-PEO (Abbildung 4-57) ist im Vergleich zum dem bei PI-PEO beobachteten deutlich breiter und zeigt keinen starken Abfall bei einer bestimmten Tritonkonzentration. Bei einer Polymerkonzentration von 0,5 mg/ml beginnt die Bildung der Mischmizellen bei einer Tritonkonzentration von 10 mM und die vollständige Solubilisierung liegt bei 100 mM, während bei einem Polymergehalt von 0,1 mg/ml der Koexistenz-Bereich zwischen 5 und 25 mM Triton X-100 liegt.



**Abbildung 4-56: Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser von PI-PEO-18.2 (10 mg/ml, extrudiert) nach 1:20 (0,15 mM) bzw. 1:100 (0,03 mM) Verdünnung mit Triton X-100, A: Beginn der Solubilisierung und Bildung von Mischmizellen, B: vollständige Solubilisierung**

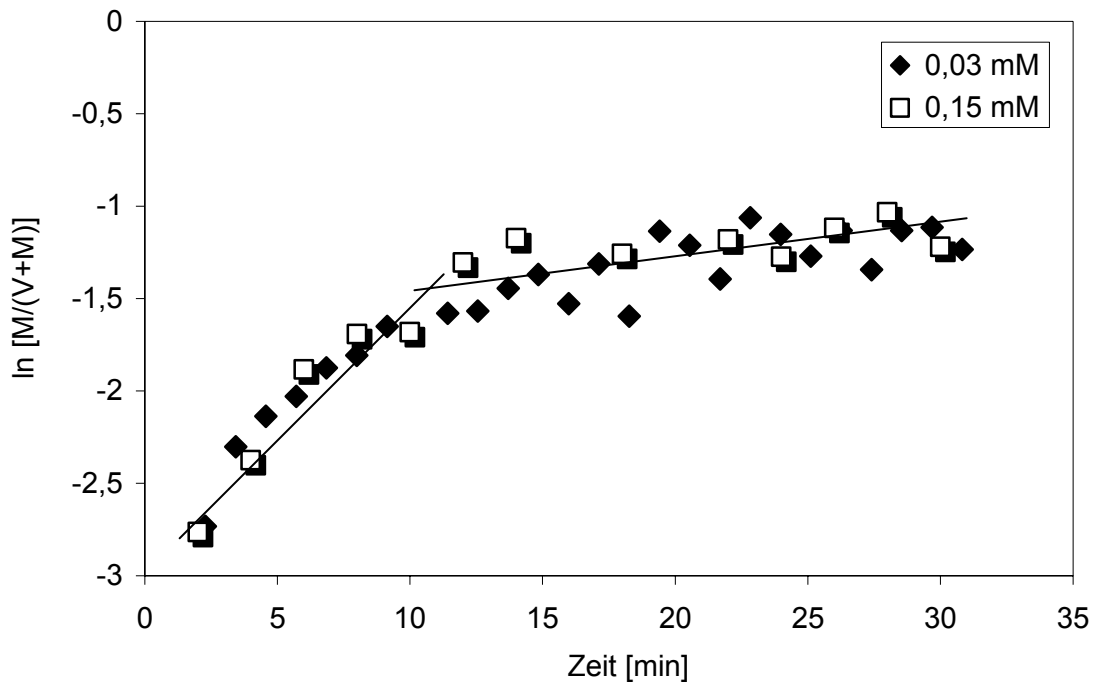


**Abbildung 4-57: Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser von P2VP-PEO-8 (10 mg/ml, extrudiert) nach 1:20 (0,05 mM) bzw. 1:100 (0,01 mM) Verdünnung mit Triton X-100, A: Beginn der Solubilisierung und Bildung von Mischmizellen, B: vollständige Solubilisierung**

Vergleicht man die Kurvenverläufe von PI-PEO-18.2 mit denen von P2VP-PEO-8, fällt nicht nur auf, dass bei P2VP-PEO der Bereich der Koexistenz von Vesikeln mit Mischmizellen über einen sehr breiten Tritonkonzentrationsbereich stattfindet, sondern auch, dass die zur vollständigen Solubilisierung nötige Tritonkonzentration um ein Vielfaches höher ist als bei PI-PEO. Damit wird deutlich, dass das ionische Polymer P2VP-PEO verhältnismäßig resistent gegenüber der Einwirkung nichtionischer Tenside ist, was mit den in Vorversuchen zur Detergenzdialyse gemachten Beobachtungen übereinstimmt (Kap. 4.1.5). Demnach weist P2VP-PEO eine hohe Stabilität gegenüber nichtionischen Detergenzien auf, während es empfindlich gegenüber anionischen Tensiden wie SDS reagiert (Rumplecker 2003).

Interessant ist, dass der von Pata et al. (2004) beobachtete Verlauf der Solubilisierung nichtionischer Polymere ähnlich dem für P2VP-PEO beobachteten breiten Verlauf ist und ebenso erst bei höheren Tritonkonzentrationen ( $> 5$  mM) beginnt. Bei PI-PEO wäre eher das von Pata ermittelte Solubilisierungsverhalten zu erwarten, da das Polymer dem dort verwendeten PB-PEO chemisch sehr ähnlich ist.

Bei den PCS-Messungen mit PI-PEO fiel auf, dass es während der Messung im Übergangsbereich zur vollständigen Solubilisierung zu Veränderungen der Teilchengröße mit der Zeit kam. Deshalb wurde die Teilchengrößenveränderung innerhalb der ersten 30 Minuten nach Mischen mit der kritischen Tritonkonzentration mit Hilfe des Zetasizer<sup>®</sup> Nano (Kap. 3.3.1.2) verfolgt. Die Messung der Teilchengröße in einem Streulichtwinkel von  $173^\circ$  (statt  $90^\circ$ ) erlaubt die Unterscheidung sehr kleiner Teilchen (Mizellen) von größeren Strukturen (Vesikel). Das relative In-Verhältnis von Mizellenanteil zu Vesikelanteil wird anschließend gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 4-58). Der erste Messwert kann frühestens nach zwei Minuten bestimmt werden, da das Gerät eine gewisse Vorlaufzeit braucht, bevor die Messung startet. Der Verlauf sieht bei beiden Verdünnungen (1:20 mit 1 mM Triton, 1:100 mit 0,375 mM Triton) gleich aus und zeigt innerhalb der ersten zehn Minuten eine starke Zunahme des Mizellenanteils - ähnlich einer Kinetik erster Ordnung - der in den darauf folgenden 20 Minuten nur noch minimal ansteigt.



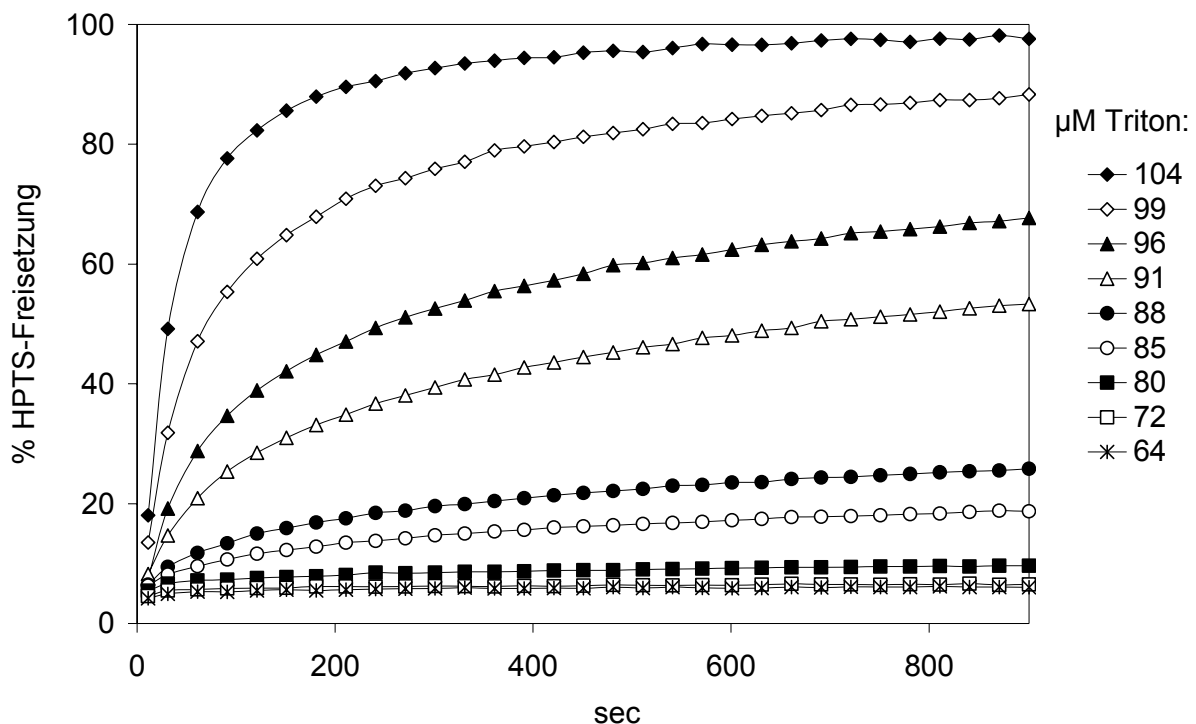
**Abbildung 4-58:** Kinetik der Auflösung von PI-PEO-18.2-Vesikeln innerhalb der ersten 30 Minuten nach Zugabe von Triton X-100 (ln relatives Verhältnis Mizellen(M) / Vesikel (V) gegen die Zeit); 1:20 (0,15 mM Polymer) verdünnt mit 1 mM Triton bzw. 1:100 (0,03 mM Polymer) verdünnt mit 0,375 mM Triton

#### 4.4.2.2 Fluorimeter (HPTS/DPX)

Mit Hilfe der Lichtstreuung kann die zur Solubilisierung führende Tensidkonzentration bestimmt werden, die oberhalb der CMC liegt. Für andere Anwendungen kann jedoch das Wissen über die nur zur Bildung von Membrandefekten führende Tensidmenge im sublytischen Bereich von Bedeutung sein, was beispielsweise für die nachträgliche Beladung von Vesikeln mit hydrophilen Substanzen genutzt wird (Schubert et al. 1991).

Die durch Tenside induzierte erhöhte Permeabilität hydrophiler Substanzen durch die Vesikelmembran lässt sich mit fluorimetrischen Methoden verfolgen. Dazu wurde die Freisetzung des verkapselten wasserlöslichen Fluoreszenzmarkers HPTS aus Polymervesikeln bei verschiedenen Triton- als auch Polymerkonzentrationen über einen Zeitraum von 15 Minuten fluorimetrisch verfolgt. Die Versuche konnten nur mit dem Polymer PI-PEO-18.2 durchgeführt werden, da eine stabile Verkapselung des Farbstoffes in Vesikel aus P2VP-PEO-8 nicht möglich ist (Kap. 4.3.1).

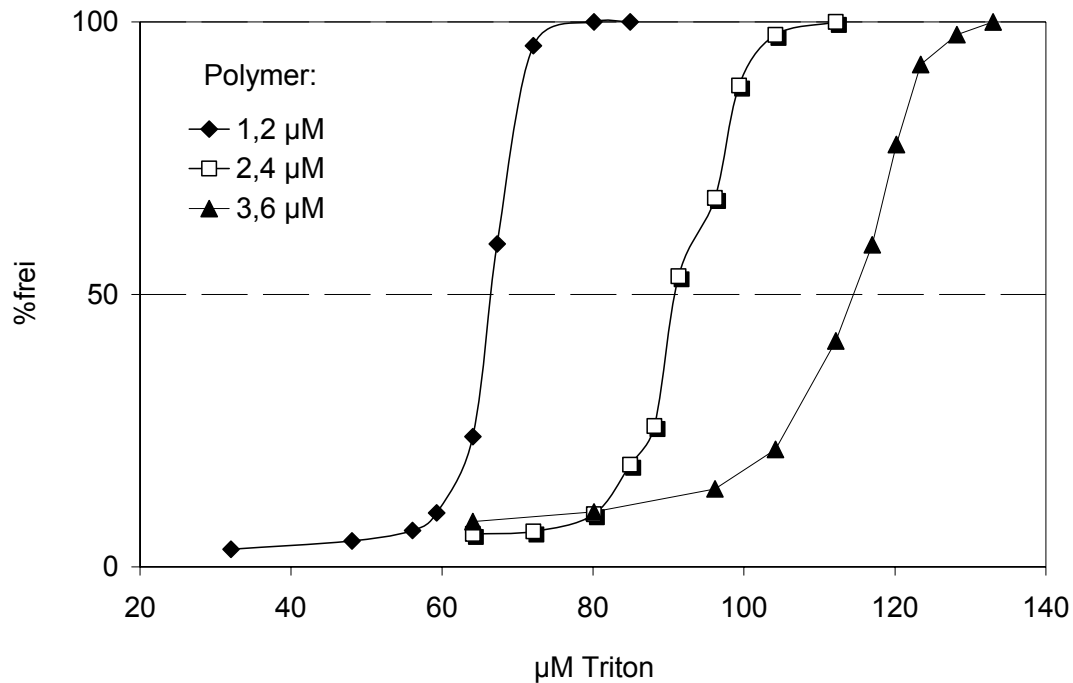
Der innerhalb der ersten 15 Minuten nach Mischen der Polymer- mit der Tritonlösung erhaltene Freisetzungsverlauf ist in Abbildung 4-59 exemplarisch dargestellt. Auffällig ist, dass die Freisetzung scheinbar zweiphasig verläuft, wie es auch für den Leakage von Liposomen beschrieben wird (Annesini et al. 2000, de la Maza & Parra 1996). Zu Beginn ist die Steigung und damit Permeationsgeschwindigkeit am größten und deutliches Indiz für die Ausbildung von Tensid-induzierten Membrandefekten. Darauf folgt ein Bereich in dem der Kurvenverlauf abflacht, also eine langsamere Freisetzung erfolgt. Dieses Abflachen wird auf ein „Ausheilen“ der Membrandefekte zurückgeführt (Annesini et al. 2000, Schubert et al. 1986). Die Freisetzungskinetik ist komplex und lässt sich nicht durch eine Kinetik erster Ordnung beschreiben, sondern muss zeitabhängig betrachtet werden (Annesini et al. 2000).



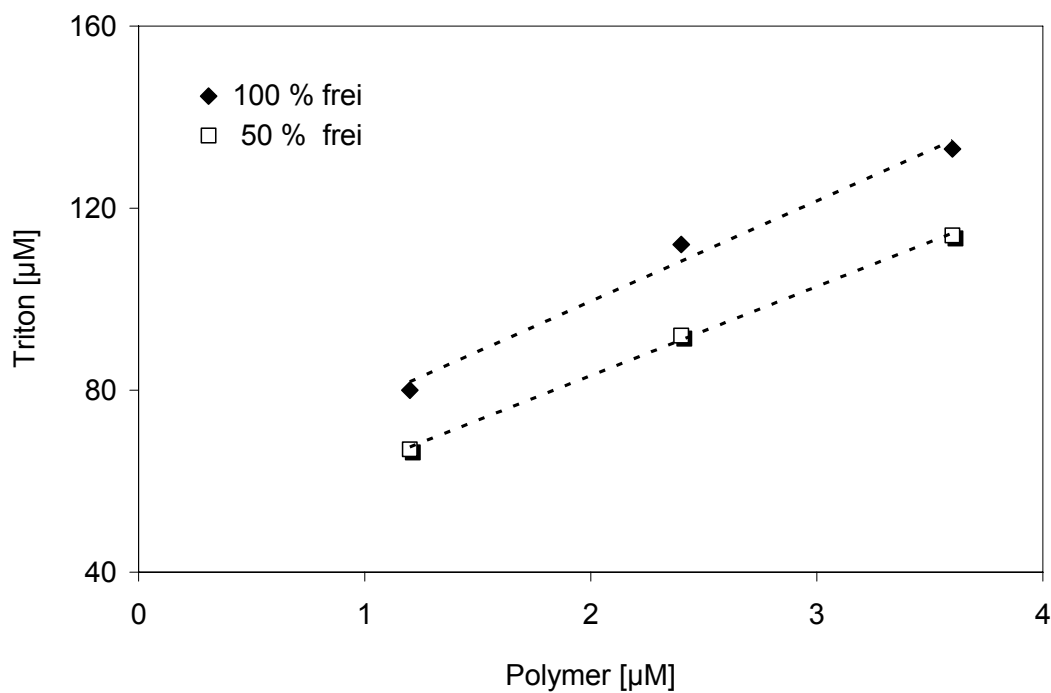
**Abbildung 4-59: Freisetzung von HPTS aus PI-PEO-18.2 (2,4 µM) innerhalb 15 min nach Zugabe verschiedener Mengen Triton X-100 (n=3, SD < 7%)**

Der aus den Messungen ermittelte prozentuale Wert der Freisetzung nach 15 Minuten kann gegen die jeweilige Tritonkonzentration aufgetragen werden und liefert eine sigmoidale Kurve (Abbildung 4-60). Die Kurvenverläufe sind mit steigender Polymerkonzentration nach rechts zu höheren Tritonkonzentrationen hin verschoben, da die Solubilisierung von dem effektiven Tensid-Polymer-Verhältnis abhängt (Lichtenberg 1985).

Trägt man die bei 50% Freisetzung und 100% Freisetzung zugehörige Tensidkonzentration gegen die Polymerkonzentration auf, ist ein linearer Zusammenhang erkennbar (Abbildung 4-61).



**Abbildung 4-60: Prozentuale Freisetzung von HPTS aus PI-PEO-18.2 nach 15 min in Abhängigkeit der Triton X-100 - und Polymerkonzentration**



**Abbildung 4-61: Prozentuale Freisetzung von HPTS aus PI-PEO-18.2 nach 15 min in Abhängigkeit von Polymer- und Tritonkonzentration**

Die zur Freisetzung führende Tritonkonzentration liegt bei allen Polymerkonzentrationen unterhalb der CMC von Triton X-100 (250  $\mu\text{M}$ ). Die erste messbare Freisetzung tritt schon bei sehr niedrigen Tensidmengen auf. Der Leakage kann folglich nicht durch eine Zerstörung der Membran verursacht werden, da zur Mischmizellenbildung Konzentrationen oberhalb der CMC erforderlich sind. Es ist von einer Wechselwirkung der Membran mit den Tensidmolekülen, die mit Porenbildung einhergeht, auszugehen (Schubert et al. 1986).

Die mit Hilfe von Lichtstreuung ermittelte kritische Tritonmenge, die zur Solubilisierung nötig ist, liegt bei höheren Tensidkonzentrationen oberhalb der CMC. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse aus der Lichtstreuung mit denen aus der Fluoreszenzmessung ist jedoch nicht möglich, da die verwendeten Polymerkonzentrationen aus messtechnischen Gründen nicht identisch sind. Zudem sind Leakage und Solubilisierung als zwei unabhängige, tensidinduzierte Prozesse zu betrachten (Partearroyo et al. 1996).

#### **4.4.3 Säure-induzierte Auflösung von Vesikeln aus P2VP-PEO-8**

Das Polymer P2VP-PEO besitzt aufgrund der besonderen Chemie des hydrophoben Blockes pH-sensitive Eigenschaften, die im Hinblick auf eine durch pH-Absenkung induzierte Wirkstofffreisetzung von Bedeutung sein kann. Das Stickstoffatom der Pyridineinheiten des Poly(2-vinylpyridin)-Blockes kann leicht protoniert werden. Mit dem Erhalt einer positiven Ladung wird auch dieser Block hydrophil und somit das gesamte Polymer wasserlöslich. Der  $pK_s$ -Wert des Polymers liegt bei pH 4,9 (Martin et al. 1996, Borchert et al. 2006). In diesem pH-Bereich kommt es zu einer Auflösung der Vesikel, sichtbar am Verschwinden der Trübung, die durch Erhöhung des pH-Wertes wieder reversibel ist (Rumplecker 2003).

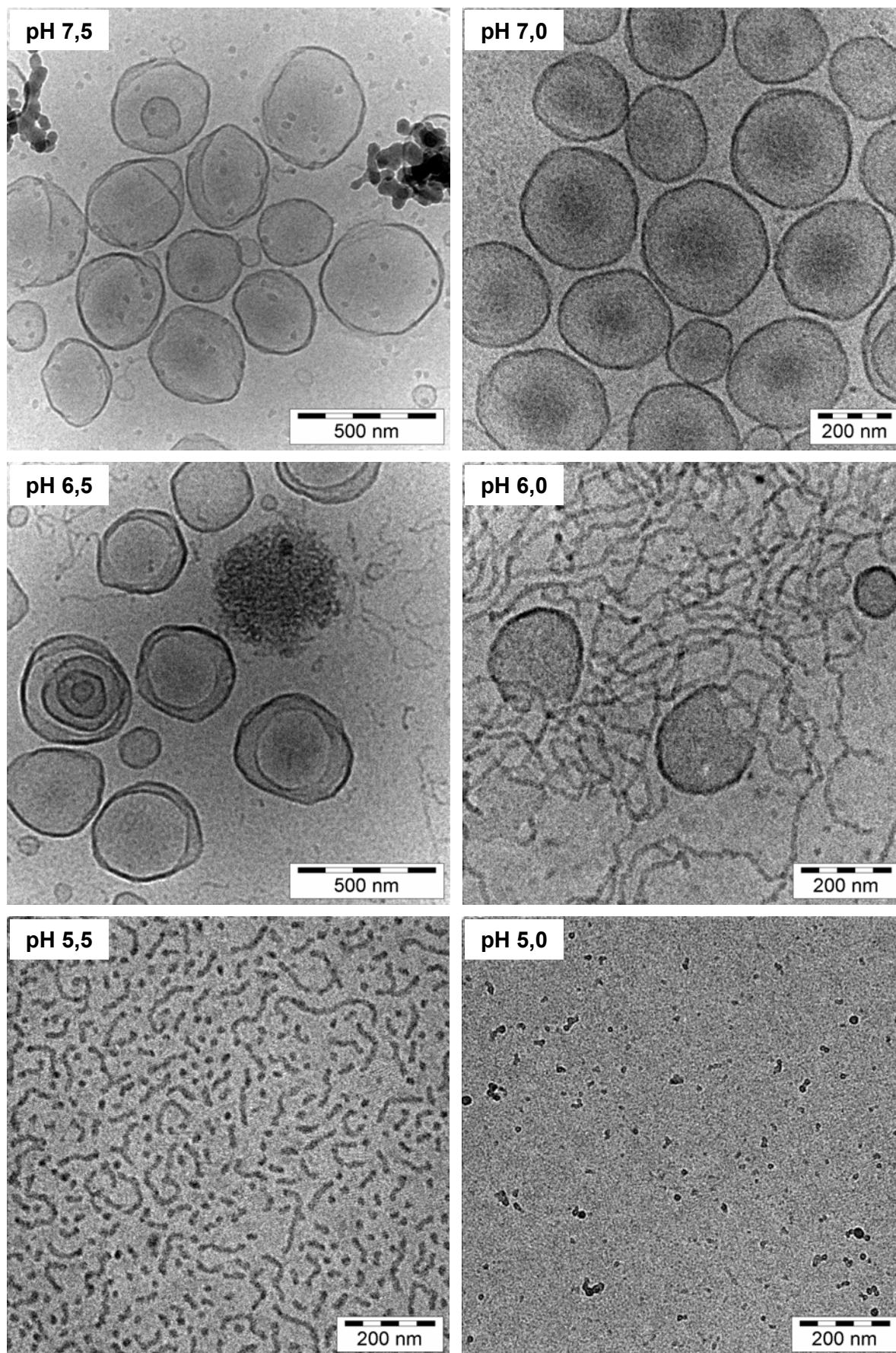
Der innerhalb weniger Sekunden stattfindende zweistufige Auflösungsprozess sehr großer unilamellarer Vesikel (mehrere  $\mu\text{m}$ ) nach Säurezugabe konnte von Borchert (Borchert et al. 2006) mit Hilfe eines Lichtmikroskopes unter Phasenkontrastbeleuchtung aufgeklärt werden. Im ersten Schritt kommt es zu einem Schrumpfen der Vesikel um bis zu 50% durch Protonierung und Herauslösen einzelner im Bilayer befindlicher Polymermoleküle. Anschließend reißt die Membran auf und löst sich vollständig auf.

Die bei verschiedenen pH-Werten vorherrschende Morphologie wurde bisher nicht untersucht. Deshalb wurde eine extrudierte Probe, deren pH-Wert ein Tag zuvor durch Säurezugabe auf einen pH-Wert zwischen 5,0 und 7,5 eingestellt wurde, im Cryo-TEM (Abbildung 4-62) untersucht. Dadurch erhält man die bei dem jeweiligen pH-Wert im Gleichgewichtszustand befindliche Aggregationsform. Der hier beobachtete Umwandlungsprozess Vesikel - Wurmmizelle - Kugelmizelle bei Absenkung des pH-Wertes lässt sich deshalb nicht mit der in der LM beobachteten zeitlichen Auflösung korrelieren.

Bei pH 7,5 und 7,0 sind ausschließlich Vesikel anzutreffen. Ab einem pH-Wert  $\leq 6,5$  sind neben Vesikeln auch Wurmmizellen zu finden, deren Anzahl bei weiterer pH-Absenkung (pH 6,0) zunimmt. Interessant ist die bei pH 6,5 zu sehende Anhäufung von Wurmmizellen, die der Größe eines Vesikels entspricht und stark an die bei Abkühlung stattfindende Umwandlung von Vesikeln in Wurmmizellen (Kap. 4.2) erinnert. Bei pH 5,5 werden ausschließlich Wurmmizellen in Koexistenz mit Kugelmizellen gefunden. Der Auflösungsprozess beginnt somit schon bei höheren pH-Werten als erwartet. Die vollständige Auflösung wird bei pH 5,0 beobachtet. Die auf diesem Bild sichtbaren dunklen Flecke stammen lediglich von Eiskontaminationen.

Die Veränderung der Probe bei Änderung des pH-Wertes lässt sich auch mit PCS (Zetamaster S<sup>®</sup>, siehe 3.3.1.1) verfolgen. Bei Absenkung des pH-Wertes kommt es zu einer Verringerung der Vesikelgröße und einem Anstieg des Polyindex sowie zu einer Verringerung der Streulichtintensität. Bei pH 5 ist schließlich das Streulichtsignal sehr niedrig und keine auswertbare Teilchengrößenbestimmung mehr möglich.

Die bei pH-Absenkung auftretende Umwandlung von Vesikeln zu Wurmmizellen und weiter zu Kugelmizellen wurde schon für zuckerbasierte stickstoffhaltige Amphiphile beobachtet (Johnsson et al. 2003, Scarzello et al. 2006). Die durch die Protonierung ausgelöste Veränderung der Morphologie (Mizellenbildung) basiert vermutlich auf einer Änderung des Packungsparameters des Polymermoleküls P2VP-PEO (siehe 1.1.2) durch die erhöhte elektrische Abstoßung des protonierten Stickstoffs.



**Abbildung 4-62: Cryo-TEM von P2VP-PEO-8 (extrudiert, 10 mg/ml in HBS) bei verschiedenen pH-Werten; 1 Tag nach Ansäuerung**

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Laufe der letzten Jahre sind so genannte Polymervesikel (Vesikel = Hohlkugel), deren Membran aus einem Assoziat amphiphiler Blockcopolymere besteht, unter der Bezeichnung Polymersomen stark ins Interesse der Forschung gerückt (Discher et al. 1999, Antonietti & Förster 2003). Verglichen mit Liposomen sind diese chemisch und mechanisch stabileren Polymervesikel bisher allerdings wenig untersucht, gelten aber aufgrund ihrer über die Polymerchemie steuerbaren Eigenschaften als mögliche Arzneistoffträger-Alternative zu Liposomen. Die vorliegende Arbeit nahm sich dieser Thematik der wenig untersuchten Polymervesikel an und analysierte speziell die Blockcopolymere PI<sub>53</sub>-PEO<sub>28</sub> (-9), PI<sub>32</sub>-PEO<sub>27</sub> (-18.2) und P2VP<sub>66</sub>-PEO<sub>46</sub> (-8) hinsichtlich ihrer vesikelbildenden Eigenschaften, ihrer Stabilität und ihrer Eignung als Arzneistoffträger.

Aufgrund der angestrebten Verwendung als Arzneistoffträger war es zunächst wichtig ein Herstellungsverfahren zu finden, welches Vesikel mit einer Größe  $\leq 200$  nm und enger Größenverteilung ( $PDI < 0,2$ ) lieferte. Deshalb wurden sowohl unterschiedliche mechanische Verfahren (Filmmethode, Extrusion, Hochdruckhomogenisation, Ultraschall) als auch die Detergenzentfernung auf ihre Eignung zur Herstellung von Polymervesikeln aus den amphiphilen Blockcopolymeren PI<sub>53</sub>-PEO<sub>28</sub> (-9), PI<sub>32</sub>-PEO<sub>27</sub> (-18.2) und P2VP<sub>66</sub>-PEO<sub>46</sub> (-8) hin überprüft. Die Filmmethode ermöglichte im ersten Schritt die Hydratisierung der Polymere innerhalb eines Tages und lieferte sehr große vesikuläre Strukturen, die als Ausgangspunkt für die weiteren Herstellungsmethoden dienten. Bei den mechanischen Homogenisierungsmethoden erwies sich die Extrusion für alle Polymere als beste Methode, da sie nicht nur zu einer deutlichen und reproduzierbaren Größenreduktion (150 - 200 nm) und Homogenisierung der Polymerdispersion führte, sondern auch einen geringen Materialverbrauch im Vergleich zur Hochdruckhomogenisation aufwies und die Probe im Vergleich zu Ultraschall nicht belastete. Die Größe der Vesikel wurde bei der Extrusion vor allem durch die Porengröße der Extrusionsmembran und nur geringfügig durch die Polymerkonzentration und die Art des Mediums beeinflusst. Die Extrusion der P2VP-PEO-Dispersionen konnte durch den Zusatz von 5% Ethanol (V/V) erleichtert werden. Für die Detergenzdialyse wurden vorab verschiedenste Detergenzien auf ihr

Vermögen hin getestet, mischmizellare Lösungen mit den entsprechenden Polymeren auszubilden. Während für den ungeladenen Polymertyp PI-PEO sowohl ionische als auch nichtionische Detergenzien in Frage kamen, zeigten sich für das kationische P2VP-PEO nur ionische Detergenzien wie SDS als geeignet. Die Detergenzodialyse selbst erwies sich jedoch als ungeeignetes Herstellungsverfahren, da die Größenverteilung der erhaltenen Vesikeldispersion stets sehr breit war. Zur Bewertung der Herstellungsverfahren spielte neben der Vesikelgröße die Vesikelmorphologie, die möglichst rund und unilamellar sein sollte, eine Rolle. Cryo-TEM-Untersuchungen zeigten, dass bei dem Polymer P2VP<sub>66</sub>-PEO<sub>46</sub> mit allen Herstellungsmethoden ausschließlich unilamellare Vesikel erhalten wurden, während bei PI-PEO die vorherrschende Morphologie der gebildeten Polymeraggregate durch die Herstellungsmethode beeinflusst wurde. So lieferte die Detergenzodialyse runde unilamellare PI-PEO-Vesikel, wohingegen bei den mechanischen Methoden auch andere Aggregationsformen entstanden. Bei PI<sub>53</sub>-PEO<sub>28</sub> traten neben Vesikeln Wurmmizellen auf, was darauf zurückzuführen war, dass das Blocklängenverhältnis und damit der Packungsparameter des Polymers sehr nahe an der Grenze zwischen diesen beiden Aggregationsformen lag. PI<sub>32</sub>-PEO<sub>27</sub> zeigte dagegen verschiedenste, vermutlich metastabile Vesikelformen, die oft stark eingestülpt und multilamellar waren. Während die Membranen bei PI-PEO-Vesikeln glatt und geschlossen waren, besaßen P2VP<sub>66</sub>-PEO<sub>46</sub>-Vesikel kantige Membranen mit teils offenen Membrankanten. Diese Merkmale sind auf die sehr unterschiedlichen Glasübergangstemperaturen ( $T_g$ ) der hydrophoben Polymerblöcke zurückzuführen, die für PI bei ca. -70°C und für P2VP bei ca. +100°C liegen. Eine besondere Eigenschaft des Polymers P2VP<sub>66</sub>-PEO<sub>46</sub> war seine Temperatursensitivität, die für die Entwicklung einer neuen und einfachen Herstellungsmethode (Temperatur-Methode) verwendet wurde. Es zeigte sich, dass die Kühlung einer inhomogenen Polymerdispersion für einen Tag bei 4°C und die anschließende schnelle Erwärmung auf 25°C in der Bildung sehr homogener Vesikel mit einer durchschnittlichen Größe von 80 nm resultierte. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde weiterhin untersucht, durch welche Herstellungsparameter die Vesikelendgröße beeinflusst werden kann. Hier stellte sich heraus, dass je geringer die Kühltemperatur (3-9°C) und je länger die Kühlzeit waren, desto kleinere und einheitlichere Vesikel entstanden bei Erwärmung auf 25°C, wobei nach ca. einem Tag Kühlung keine weitere Änderung der Vesikelendgröße mehr auftrat. Ebenso konnte gezeigt werden,

dass die Geschwindigkeit der anschließenden Erwärmung einen erheblichen Einfluss auf die Vesikelendgröße ausübte, die mit abnehmender Erwärmungsgeschwindigkeit umso größer wurde. Eine weitere und gleichfalls wichtige Rolle im Bezug auf die Vesikelendgröße spielte auch die Probenzusammensetzung. Dabei stieg die Vesikelendgröße jeweils mit zunehmender Polymerkonzentration an. Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass die Pufferzusammensetzung Auswirkung auf die Vesikelendgröße hatte, wobei sowohl die Pufferart wie auch die Ionenstärke von Bedeutung waren. Abschließend konnte dargestellt werden, dass das temperatursensitive Verhalten von P2VP<sub>66</sub>-PEO<sub>46</sub> in Lösung auch für andere vesikelbildende P2VP-PEOs zutraf. Aufgrund dieser Beobachtungen zu den einzelnen Herstellungsmethoden wurden deshalb die Extrusion bzw. für kleinere Vesikel die Temperaturmethode als Standardpräparationsmethode im Rahmen dieser Arbeit gewählt, worauf die weiteren Untersuchungen zu Beladung und Stabilität in dieser Arbeit beruhten.

In einem eigenen Teil der Arbeit wurde das im Verlauf der Untersuchung der Herstellungsmethoden erkannte, und in der Literatur bisher noch nicht erwähnte, temperaturabhängige Aggregationsverhalten von P2VP<sub>66</sub>-PEO<sub>46</sub> mit Hilfe von PCS- und Cryo-TEM-Untersuchungen aufgeklärt. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Vesikel bei Kühlung auf 4°C zu einem Netzwerk aus Wurmmizellen umwandelten, welche sich mit der Zeit vereinzeln und verkürzten bis nach ca. einem Tag ein Gleichgewichtszustand erreicht war. Bei anschließender Erwärmung erfolgte erneute Vesikelbildung. Als Übergangszustand während dieser Wurm-Vesikel-Umwandlung konnte die Bildung flacher Bilayerflächen (Scheibenmizelle) innerhalb einer Wurmmizelle beobachtet werden, die sich bei Erreichen eines kritischen Radius schließlich zu einem Vesikel einstülpten. Die Entstehung dieser Wurmmizellen wurde mit der Änderung des Packungsparameters des Polymermoleküls in Lösung bei Temperaturänderung begründet. Die Bildung und Verkleinerung der Wurmmizellen bei 4°C erklärte somit die durch Kühlung hervorgerufene Verkleinerung der Teilchengröße in der Polymerdispersion. Die bei der Temperatur-Methode beobachtete wachsende Vesikelendgröße sowohl bei langsamerer Erwärmung als auch bei höherer Polymerkonzentration wurde auf eine verstärkte Fusion der Wurmmizellen zurückgeführt. Das Wissen über die Umwandlung der Vesikel in Wurmmizellen ist im Hinblick auf die Lagerung der Vesikel von Bedeutung. Eine

Aufbewahrung der Polymerdispersion bei niedrigen Temperaturen (Kühlschrank) sollte deshalb nach Herstellung und Beladung mit Wirkstoffen nicht mehr erfolgen.

Für eine Verwendung von Polymervesikel als Arzneistoffträger ist die stabile Verkapselung von Stoffen in die Vesikel eine wichtige Voraussetzung. Deshalb wurde die Verkapselungsrate von hydrophilen Modellschubstanzen (Calcein, HPTS, FITC-Dextran 4kDa) bestimmt. In Polymervesikeln aus PI-PEO konnte nur sehr wenig Material verkapselt werden (meist < 1%). Ein Grund hierfür lag vermutlich in dem partiellen Vorhandensein von Wurmmizellen (PI<sub>53</sub>-PEO<sub>28</sub>) bzw. kollabierten Vesikeln (PI<sub>32</sub>-PEO<sub>27</sub>) nach der Extrusion, wodurch weniger Raum zur Verkapselung zur Verfügung stand. Eine Erhöhung der Einschlusseffizienz konnte nicht durch die Anwendung von Ultraschall oder Frier-Tau-Zyklen erreicht werden. Das eingeschlossene Material war jedoch stabil verkapselt und zeigte keine merkliche Freisetzung in Puffer (25°C, 37°C) oder Serum (37°C). Eine Verkapselung der niedermolekularen Marker Calcein bzw. HPTS in Vesikel aus P2VP<sub>66</sub>-PEO<sub>46</sub> konnte allerdings wegen zu schneller Freisetzung nicht bestimmt werden. Das höhermolekulare FITC-Dextran 4 kDa wurde dagegen in der mehr als 3fachen theoretisch möglichen Menge in P2VP<sub>66</sub>-PEO<sub>46</sub>-Vesikel „verkapselt“, was auf eine Wechselwirkung des Farbstoffes mit der Polymermembran zurückgeführt wurde. Weiterhin wurde die Verkapselung des basischen Zytostatikums Doxorubicin (DXR) untersucht. Die Beladung der Vesikel erfolgte über ein Remote Loading Verfahren mit Hilfe eines transmembranären Phosphat- und pH-Gradienten (Fritze et al. 2006), weshalb die Untersuchungen nur mit PI-PEO durchgeführt wurden, da P2VP-PEO-Vesikel bei niedrigem pH-Wert instabil waren. Die fertigen Polymervesikel wurden dazu mit DXR lichtgeschützt inkubiert und der Wirkstoff sollte sich während der Beladung in den Vesikeln durch Protonierung und Ausfällung anreichern. Bei einer Beladungstemperatur von 40°C konnten nur ca. 40% DXR verkapselt werden, während bei 7°C gar keine Anreicherung erfolgte, was auf die für DXR vermutlich recht dichte und dicke Polymermembran zurückzuführen ist. Aufgrund der niedrigen EE% wurde mit HPTS als pH-Sensor überprüft, ob sich überhaupt ein transmembranärer pH-Gradient durch einen Ammoniumgradienten erzeugen lässt. Es konnte mit dieser Methode gezeigt werden, dass sich ein stabiler pH-Gradient aufbaut, der jedoch kritisch zu diskutieren ist, da eine Wechselwirkung des HPTS mit dem PEO der Polymermembran beobachtet wurde.

Im Weiteren wurde die physikalische Stabilität der Vesikel sowohl während der Lagerung als auch bei Einwirken von Detergenzien und Säuren untersucht. Die Lagerung bei verschiedenen Temperaturen (2-8°C, RT, 41°C) über mehrere Monate zeigte, dass die Polymervesikel eine hinreichende physikalische Stabilität besaßen, da über den Lagerzeitraum keine starke Änderung der Vesikelgröße, Größenverteilung und Vesikelmorphologie festgestellt wurde. Die Stabilität der Vesikel gegenüber dem nichtionischen Detergenz Triton X-100, das häufig bei der Solubilisierung von Biomembranen Einsatz findet, wurde ebenfalls untersucht. Es zeigte sich, dass das Polymer P2VP-PEO eine deutlich höhere Stabilität gegenüber Triton X-100 aufwies als PI-PEO. Weiterhin wurde die durch eine Absenkung des pH-Wertes und somit durch die Protonierung des Pyridin-Stickstoffes (Änderung des Packungsparameters) hervorgerufene Auflösung der P2VP-PEO-Vesikel bei pH 5 untersucht. Dazu wurden Cryo-TEM-Untersuchungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die Auflösung über die Bildung von Wurm- und Kugelmizellen als Zwischenstufen abläuft.

Für weitergehende Untersuchungen wird die Entwicklung einer Analytikmethode für die Polymere erforderlich, mit der nicht nur Aussagen über die chemische Stabilität getroffen werden können, sondern auch die Arzneistoffträger-Zusammensetzung quantifiziert werden kann. Zukünftige *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen sollen zudem Aufschluss über die biologische Verträglichkeit und Abbaubarkeit dieser Polymervesikel geben. Weiterhin könnten sich aus einer Mischung der Polymere PI-PEO (stabile Verkapselung, quervernetzbar) und P2VP-PEO (pH-sensitiv) Vesikel mit *controlled release* Eigenschaften herstellen lassen.

## 6 Literatur

**Abraham** SA, Edwards K, Karlsson G, MacIntosh S, Mayer LD, McKenzie C, Bally MB (2002). "Formation of transition metal-doxorubicin complexes inside liposomes." *Biochim Biophys Acta* 1565: 41-54.

**Adrian** M, Dubochet J, Lepault J, McDowell AW (1984). "Cryo-electron microscopy of viruses." *Nature* 308: 32-36.

**Ahmed** F, Hategan A, Discher B, Discher D (2003). "Block copolymer assemblies with cross-link stabilization: From Single-component monolayers to bilayer blends with PEO-PLA." *Langmuir* 19: 6505-6511.

**Ahmed** F, Discher DE (2004). "Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles." *J Control Release* 96: 37-53.

**Ahmed** F, Pakunlu RI, Srinivas G, Brannan A, Bates F, Klein ML, Minko T, Discher DE (2005). "Shrinkage of a rapidly growing tumor by drug-loaded polymersomes: pH-triggered release through copolymer degradation." *Mol Pharm* 3: 340-350.

**Ahmed** F, Photos PJ, Discher DE (2006a). "Polymersomes as viral capsid mimics." *Drug Develop Res* 67: 4-14.

**Ahmed** F, Pakunlu RI, Srinivas G, Brannan A, Bates F, Klein ML, Minko T, Discher DE (2006b). "Shrinkage of a rapidly growing tumor by drug-loaded polymersomes: pH-triggered release through copolymer degradation." *Mol Pharm* 3: 340-350.

**Allen** TM (1994). "Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery." *TiPs* 15: 214-219.

**Allen** TM (1997). "Liposomes. Opportunities in drug delivery." *Drugs* 54: 8-14.

**Almgren** M, Edwards K, Karlsson G (2000). "Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures." *Colloids Surf A* 174: 3-21.

**Angelova** M, Dimitrov DS (1986). "Liposome electroformation". *Faraday Discuss Chem Soc* 81: 303-311.

**Annesini** MC, Memoli A, Petralito S (2000). "Kinetics of surfactant-induced release from liposomes: a time-dependent permeability model." *J Membr Sci* 180: 121-131.

**Antonietti** M, Förster S (2003). "Vesicles and liposomes: a self-assembly principle beyond lipids." *Adv Mater* 15: 1323-1333.

**Aranda-Espinoza** H, Bermudez H, Bates FS, Discher DE (2001). "Electromechanical limits of polymersomes." *Phys Rev Lett* 87: 20830-1-20830-4.

**Arifin** DR, Palmer AF (2005). "Polymersome encapsulated hemoglobin: a novel type of oxygen carrier." *Biomacromolecules* 6: 2172-2181.

**Avnir Y, Barenholz Y (2005).** "pH determination by pyranine: medium-related artifacts and their correction." *Anal Biochem* 347: 34-41.

**Bachur NR, Gordon SL, Gee MV (1978).** "A general mechanism for microsomal activation of quinine anticancer agents to free radicals." *Cancer Res* 83: 1745-1750.

**Bangham AD, Standish MM, Watkins JC (1965).** "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids." *J Mol Biol* 13: 238-252.

**Barenholz Y, Amselem S, Goren D, Cohen R, Gelvan D, Samuni A, Golden EB, Gabizon A (1993).** "Stability of liposomal doxorubicin formulations: problems and prospects." *Med Res Rev* 13: 449-491.

**Batzri S & Korn ED (1973).** "Single bilayer liposomes prepared without sonication." *Biochem Biophys Acta* 298: 1015-1019.

**Battaglia G, Ryan AJ (2005).** "Bilayers and interdigitation in block copolymer vesicles." *J Am Chem Soc* 127: 8757-8764.

**Battaglia G, Ryan AJ (2006a).** "Pathways of polymeric vesicle formation." *J Phys Chem B* 110: 10272-10279.

**Battaglia G, Ryan AJ (2006b).** "Neuron-like tubular membranes made of diblock copolymer amphiphiles." *Angew Chem Int Ed* 45: 2052-2056.

**Battaglia G, Ryan AJ, Tomas S (2006c).** "Polymeric vesicle permeability: a facile chemical assay." *Langmuir* 22: 4910-4913.

**Beijnen JH, Vanderhouwen O, Underberg WJM (1986).** "Aspects of the degradation kinetics of doxorubicin in aqueous solution." *Int J Pharm* 32: 123-131.

**Bellare JR, Davis HT, Scriven LE, Talmon Y (1988).** "Controlled environment vitrification system: an improved sample preparation technique." *J Electron Microscop Techn* 10: 87-111.

**Bellomo EG, Wyrsta MD, Pakstis L, Pochan DJ, Deming TJ (2004).** "Stimuli-responsive polypeptide vesicles by conformation-specific assembly." *Nat Mater* 3: 244-248.

**Bendas G, Rothe U, Scherphof GL, Kamps JA (2003).** "The influence of repeated injections on the pharmacokinetics and biodistribution of different types of sterically stabilized immunoliposomes." *Biochim Biophys Acta* 1609: 63-70.

**Berclaz NM (1999).** "Studies on the formation and transformation of protein-containing vesicles using cryo-transmission electron microscopy." Dissertation, Zürich.

**Bermudez H, Brannon AK, Hammer DA, Bates FS, Discher DE (2002).** "Molecular weight dependence of polymersome membrane structure, elasticity, and stability." *Macromolecules* 35: 8203-8208.

**Bermudez H**, Aranda-Espinoza H, Hammer D, Discher DE (2003). "Pore stability and dynamics in polymer membranes." *Europhys Lett* 64: 550-556.

**Bermudez H**, Hammer DA, Discher DE (2004). "Effect of bilayer thickness on membrane bending rigidity." *Langmuir* 20: 540-543.

**Bhargava P**, Zheng JX, Li P, Quirk RQ, Harris FW, Cheng SZD (2006). "Self-assembled polystyrene-block-poly(ethylene oxide) micelle morphologies in solution." *Macromolecules* 39: 4880-4888.

**Blume G**, Cevc G (1990). "Liposomes for the sustained drug release in vivo." *Biochim Biophys Acta* 1029: 91-97.

**Borchert U** (2006) „Einführung der analytischen Ultrafiltration für die Messung der Permeation und der verzögerten Freisetzung aus Polymersomen.“ Dissertation, Hamburg.

**Borchert U**, Lipprandt U, Bilanz M, Kimpfler A, Rank A, Peschka-Süss R, Schubert R, Lindner P, Förster S (2006). "pH-induced release from P2VP-PEO block copolymer vesicles." *Langmuir* 22: 5843-5847.

**Bouma J**, Beijnen JH, Bult A, Underberg WJM (1986). "Anthracycline antitumor agents - a review of physicochemical, analytical and stability properties." *Pharm Weekbl Sci* 8: 109-133.

**Brown MD**, Schätzlein A, Brownlie A, Jack V, Wang W, Tetley L, Gray AI, Uchegbu IF (2000). "Preliminary characterization of novel amino acid based polymeric vesicles as gene and drug delivery agents." *Bioconjugate Chem* 11: 880-891.

**Broz P**, Benito SM, Saw C, Burger P, Heider H, Pfisterer M, Marsch S, Meier W, Hunziker P (2005). "Cell targeting by a generic receptor-targeted polymer nanocontainer platform." *J Control Release* 102: 475-488.

**Cerritelli S**, Fontana A, Velluto D, Adrian M, Dubochet J, Maria P, Hubbell JA (2005). "Thermodynamic and kinetic effects in the aggregation behavior of a poly(ethylene glycol-b-propylene sulfide-b-ethylene glycol) ABA Triblock Copolymer." *Macromolecules* 38: 7845-7851.

**Checot F**, Lecommandoux S, Klok HA, Gnanou Y (2003). "From supramolecular polymersomes to stimuli-responsive nano-capsules based on poly(diene-b-peptide) diblock copolymers." *Eur Phys J E Soft Matter* 10: 25-35.

**Checot F**, Brulet A, Oberdisse J, Gnanou Y, Mondain-Monval O, Lecommandoux S (2005). "Structure of polypeptide-based diblock copolymers in solution: Stimuli-responsive vesicles and micelles." *Langmuir* 21: 4308-4315.

**Chen GL**, Yang L, Rowe TC, Halligan BD, Tewey KM, Liu LF (1984). "Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II." *J Biol Chem* 259: 13560-13566.

**Chen L**, Schen H, Eisenberg A (1999). "Kinetics and mechanism of the rod-to-vesicle transition of block copolymer aggregates in dilute solution." *J Phys Chem B* 103: 9488-9497.

**Choucair A**, Lim Soo P, Eisenberg A (2005). "Active loading and tunable release of doxorubicin from block copolymer vesicles." *Langmuir* 21: 9308-9313.

**Choi H-J**, Montemagno CD (2005). "Artificial organelle: ATP synthesis from cellular mimetic polymersomes." *Nano Letters* 5: 2538-2542.

**Christiano NA**, Milone MC, Ranka SS, Li GZ, Frail PR, Davis KP, Bates FS, Therien MJ, Ghoroghchian PP, June CH, Hammer DA (2007). "Tat-functionalized near-infrared emissive polymersomes for dendritic cell labeling." *Bioconjugate Chemistry* 18: 31-40.

**Daleke DL**, Hong K, Papahadjopoulos D (1990). "Endocytosis of liposomes by macrophages: binding, acidification and leakage of liposomes monitored by a new fluorescence assay." *Biochim Biophys Acta* 1024: 352-366.

**de la Maza A**, Parra JL (1996). "Solubilizing effects caused by the nonionic surfactant octyl glucoside in phosphatidylcholine liposomes." *J Am Oil Chem Soc* 73: 877-883.

**de Menezes DEL**, Pilarski LM, Allen TM (1998). "In vitro and in vivo targeting of immunoliposomal doxorubicin to human B-cell lymphoma." *Cancer Res* 58: 3320-3330.

**Desbaumes L**, Eisenberg A (1999). "Single-solvent preparation of crew-cut aggregates of various morphologies from amphiphilic diblock copolymer." *Langmuir* 15: 36-38.

**Dimova R**, Seifert U, Pouligny B, Förster S, Döbereiner HG (2002). "Hyperviscous diblock copolymer vesicles." *Eur Phys J E* 7: 241-250.

**Discher BM**, Won YY, Ege DS, Lee JC, Bates FS, Discher DE, Hammer DA (1999). "Polymersomes: tough vesicles made from diblock copolymers." *Science* 284: 1143-1146.

**Discher DE & Eisenberg A (2002).** "Polymer vesicles." *Science* 297: 967-973.

**Discher B**, Bermudez H, Hammer DA, Discher DE, Won YY, Bates FS (2002). "Cross-linked polymersome membranes: vesicles with broadly adjustable properties." *J Phys Chem* 106: 2848-2854.

**Dörfler HD (2002).** „Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie.“ *Springer-Verlag*, 1. Auflage.

**Dohrn C (2003).** Diplomarbeit, Universität Hamburg.

**Dos Santos N**, Cox KA, McKenzie CA, van Baarda F, Gallagher RC, Karlsson G, Edwards K, Mayer LD, Allen C, Bally MB (2004). "pH gradient loading of anthracyclines into cholesterol-free liposomes: enhancing drug loading rates through use of ethanol." *Biochim Biophys Acta* 1661: 47-60.

**Du J & Armes SP (2005)**. "pH-responsive vesicles based on a hydrolytically self-cross-linkable copolymer." *J Am Chem Soc* 127: 12800-12801.

**Du J, Tang Y, Lewis AL, Armes SP (2005)**. "pH-sensitive vesicles based on a biocompatible zwitterionic diblock copolymer." *Langmuir* 21: 17982-17983.

**Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell A, Schultz P (1988)**. "Cryo-electron microscopy of vitrified specimens." *Q Rev Biophys* 21: 129-228.

**Egelhaaf SU, Wehrli E, Müller M, Adrian M, Schurtenberger P (1996)**. "Determination of the size distribution of lecithin liposomes: A comparative study using freeze fracture, cryoelectron microscopy and dynamic light scattering." *J Microsc* 184: 214-228.

**Egelhaaf SU, Schurtenberger P, Müller M (2000)**. "New controlled environment vitrification system for cryo-transmission electron microscopy: design and application to surfactant solutions." *J Microsc* 200: 128-139.

**Filiz V (2006)**. „Synthese und Charakterisierung von vesikelbildenden PI-PEO-Blockcopolymeren.“ Diplomarbeit, Universität Hamburg.

**Förster S, Zisenis M, Wenz E, Antonietti M (1996)**. "Micellization of strongly segregated block copolymers." *J Chem Phys* 104: 9956-9970.

**Förster S, Berton B, Hentze H-P, Krämer EMA, Lindner P (2001)**. "Lyotropic phase morphologies of amphiphilic block copolymers." *Macromolecules* 34: 4610-4623.

**Förster S, Plantenberg T (2002)**. "From self-organizing polymers to nanohybrid and biomaterials." *Angew Chem Int Ed Engl* 41: 689-714.

**Fritze A (2005)**. „Präparation und Charakterisierung von Liposomen zum passiven und aktiven Targeting.“ Dissertation, Universität Freiburg.

**Fritze A, Hens F, Kimpfler A, Schubert R, Peschka-Süss R (2006)**. "Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient." *Biochim Biophys Acta* 1758: 1633-1640.

**Gallois L, Fiallo M, Garnier-Suillerot A (1998)**. "Comparison of the interaction of doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and idarubicinol with large unilamellar vesicles: Circular dichroism study." *Biochim Biophys Acta* 1370: 31-40.

**Gan Y, Dong D, Hogen-Esch TE (1995)**. "Effects of lithium bromide on the glass transition temperatures of linear and macrocyclic poly(2-vinylpyridine) and polystyrene." *Macromolecules* 28: 383-385.

**Gerber** CE, Bruchelt G, Falk UB, Kimpfler A, Hauschild O, Kuci S, Bächli T, Niethammer D, Schubert R (2001). "Reconstitution of bacterial activity in chronic granulomatous disease cells by glucose-oxidase-containing liposomes." *Blood* 98: 3097-3105.

**Ghoroghchian** PP, Lin JJ, Brannan AK, Frail PR, Bates FS, Therien MJ, Hammer DA (2006). "Quantitative membrane loading of polymer vesicles." *Soft Matter* 2: 973-980.

**Ghoroghchian** PP, Frail PR, Li G, Zupancich, JA, Bates FS, Hammer DA, Therien MJ (2007). "Controlling bulk optical properties of emissive polymersomes through intramembranous polymer-fluorophore interactions." *Chem Mater* 19: 1309-1318.

**Giacomelli** C, Schmidt V, Borsali R (2007). "Nanocontainers formed by self-assembly of poly(ethylene oxide)-b-poly(glycerol monomethacrylate) - drug conjugates." *Macromolecules* 40: 2148-2157.

**Gill** PS, Wernz J, Scadden DT, Cohen P, Mukwaya GM, von Roenn JH, Jacobs M, Kempin S, Silverberg I, Gonzales G, Rarick MU, Myers AM, Shepherd F, Sawka C, Pike MC, Ross ME (1996). "Randomized phase III trial of liposomal daunorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in AIDS-related Kaposi's sarcoma." *J Clin Oncol* 14: 2353-2364.

**Gonzalez** YI, Kaler EW (2005). "Cryo-TEM studies of worm-like micellar solutions." *Curr Opin Coll Interf Sci* 10: 256-260.

**Gozdz** WT (2004). "Spontaneous curvature induced shape transformations of tubular polymersomes." *Langmuir* 20: 7385-7391.

**Graff** A, Sauer M, Van Gelder P, Meier W (2002). "Virus-assisted loading of polymer nanocontainer." *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5064-5068.

**Grimm** R, Typke D, Baumeister W (1998). "Improving image quality by zero-loss energy filtering: quantitative assessment by means of image cross-correlation." *J Microsc* 190: 339-349.

**Haas** U (2002). „Physik für Pharmazeuten und Mediziner.“ *WVG Stuttgart*, 2.Auflage.

**Harashima** H, Huong TM, Ishida T, Manabe Y, Matsuo H, Kiwada H (1996). "Synergistic effect between size and cholesterol content in the enhanced hepatic uptake clearance of liposomes through complement activation in rats." *Pharm Res* 13:1704-1709.

**Hartmann** L (2007). „Synthese monodisperser, multifunktionaler Poly(amidoamine) und ihre Anwendung als nicht-virale Vektoren für die Gentherapie.“ Dissertation, Universität Potsdam.

**Hauschild** S (2004). „Vesikelpräparation mit einem thermischen Tintendrucker – Eine neue Methode zur Darstellung von Liposomen und Polymersomen.“ Diplomarbeit, Universität Hamburg.

**Hauschild S**, Lipprandt U, Rumplecker A, Borchert U, Rank A, Schubert R, Förster S (2005). "Direct preparation and loading of lipid and polymer vesicles using inkjets." *Small* 12: 1177-1180.

**Hayward RC**, Utada AS, Dan N, Weitz DA (2006). "Dewetting Instability during the formation of polymersomes from block-copolymer-stabilized double emulsions." *Langmuir* 22: 4457-4461.

**He Y**, Li Z, Simone P, Lodge TP (2006). "Self-assembly of block copolymer micelles in an ionic liquid." *J Am Chem Soc* 128: 2745-2750.

**Helenius A**, Simons K (1975). "Solubilization of membranes by detergents." *Biochim Biophys Acta* 415: 29-79.

**Hope MJ**, Bally MB, Webb G, Cullis PR (1985). "Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure - characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane-potential." *Biochim Biophys Acta* 812: 55-65.

**Huang C** (1969). "Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics." *Biochemistry* 8: 344-352.

„**Hunius**-Pharmazeutisches Wörterbuch" (2004). Herausgeber: Ammon HPT, Verlag: Walter de Gruyter, Berlin, 9. Auflage.

**Hunter DG & Frisken BJ** (1998). "Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles." *Biophys J* 74: 2996-3002.

**Ishida T**, Kirchmeier MJ, Moase EH, Zalipsky S, Allen TM (2001). "Targeted delivery and triggered release of liposomal doxorubicin enhances cytotoxicity against human B lymphoma cells." *Biochim Biophys Acta* 1515: 144-158.

**Ishida T**, Harashima H, Kiwada H (2002). "Liposome clearance." *Biosci Rep* 22: 197-224.

**Ishida T**, Ichikawa T, Ichihara H, Sadzuka Y, Kiwada H (2004). "Effect of the physicochemical properties of initially injected liposomes on the clearance of subsequently injected PEGylated liposomes in mice." *J Control Release* 95: 403-412.

**Israelachvili JN**, Mitchell DJ, Ninham BW (1976). "Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers." *J Chem Soc Faraday Trans 2* 72: 1525-1568.

**Jain S**, Bates FS (2003). "On the origins of morphological complexity in block copolymer surfactants." *Science* 300: 460-464.

**Jain S**, Bates F (2004). "Consequences of nonergodicity in aqueous binary PEO-PB micellar dispersions." *Macromolecules* 37: 1511-1523.

**Johnsson M, Wagenaar A, Stuart MCA, Hulst R, Engberts JBFN (2003).** "Sugar-based gemini surfactants with pH-dependent aggregation behaviour: vesicle-to-micelle transition, critical micelle concentration, and vesicle surface charge reversal." *Langmuir* 19: 4609-4618.

**Kalie L (2006).** „Einfluss des Serum-Komplementsystems auf die Permeabilität von Liposomenmembranen.“ Dissertation, Freiburg.

**Kano K, Fendler JH (1978).** "Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces - pH gradients across phospholipid vesicles." *Biochim Biophys Acta* 509: 289-299.

**Kickelbick G, Bauer J, Hüsing N, Andersson M, Palmqvist A (2003).** "Spontaneous vesicle formation of short-chain amphiphilic polysiloxane-b-poly(ethylene oxide) block copolymers." *Langmuir* 19: 3198-3201.

**Kim S & Martin GM (1981).** "Preparation of cell size unilamellar liposomes with high capture volume and defined size distribution." *Biochim Biophys Acta* 646: 1-9.

**Kim Y-K (2001).** „Amphiphile Polymere als Transfektionssysteme: Synthese und *in vitro* Gentransfer.“ Dissertation, Freiburg.

**Kimura S, Kim DH, Sugiyama J, Imanishi Y (1999).** "Vesicular self-assembly of a helical peptide in water." *Langmuir* 15: 4461-4463.

**Kirby C, Clarke J, Gregoriadis G (1980).** "Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro." *Biochim J* 186: 591-598.

**Kölchens S, Ramaswami V, Birgenheier J, Nett L, O'Brien DF (1993).** "Quasi-elastic light scattering determination of the size distribution of extruded vesicles." *Chem Phys Lipids* 65: 1-10.

**Koynova R, Caffrey M (1998).** "Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines." *Biochim Biophys Acta* 1376: 91-145.

**Kuhl TL, Leckband DE, Lasic DD, Israelachvili JN (1994).** "Modulation of interaction forces between bilayers exposing short-chained ethylene oxide headgroups." *Biophys J* 66: 1479-1488.

**Kukula H, Schlaad H, Antonietti M, Förster S (2002).** "The formation of polymer vesicles or "peptosomes" by polybutadiene-block-poly(L-glutamate)s in dilute aqueous solution." *J Am Chem Soc* 124: 1658-1663.

**Kumar N, Ravikumar MNV, Domb AJ (2001).** "Biodegradable block copolymers." *Adv Drug Deliv Rev* 53: 23-44.

**Lecommandoux SB, Sandre O, Checot F, Rodriguez-Hernandez J, Perzynski R (2005).** "Magnetic nanocomposite micelles and vesicles." *Adv Mater* 17: 712-718.

**Lee JH, Lee HB, Andrade JD (1995).** "Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces." *Prog Polym Sci* 20: 1043-1079.

**Lee RJ, Wang S, Turk MJ, Low PS (1998).** "The effects of pH and intraliposomal buffer strength on the rate of liposome content release and intracellular drug delivery." *Biosci Rep* 18: 69-78.

**Lee J C-M, Bermudez H, Discher BM Sheehan MA, Won YY, Bates FS, Discher DE (2001).** "Preparation, stability, and in vitro performance of vesicles made with diblock copolymers." *Biotechnol Bioeng* 73: 135-45.

**Lee J C-M, Santore M, Bates FS, Discher DE (2002).** "From membranes to melts, rouse to reptation: diffusion in polymersomes versus lipid bilayers." *Macromolecules* 35: 323-326.

**Lee HJ, Yang SR, An EJ, Kim JD (2006).** "Biodegradable polymersomes from poly(2-hydroxyethyl aspartamide) grafted with lactic acid oligomers in aqueous solution." *Macromolecules* 39: 4938-4940.

**Leistner E (2005).** „Die Biologie der Taxane.“ *Pharmazie in unserer Zeit* 34: 98-103.

**Letchford K & Burt H (2007).** "A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes." *J Pharm Biopharm* 65: 259-269.

**Li Y, Lokitz BS, McCormick CL. (2006).** "Thermally responsive vesicles and their structural "locking" through polyelectrolyte complex formation." *Angew Chem Int Ed* 45: 5792-5795.

**Li F, Ketelaar T, Marcelis ATM, Leermakers FAM, Stuart MAC, Sudholter EJR (2007a).** "Stabilization of polymersome vesicles by an interpenetrating polymer network." *Macromolecules* 40: 329-333.

**Li S, Byrne B, Welsh J, Palmer AF (2007b).** "Self-assembled poly(butadiene)-b-poly(ethylene oxide) polymersomes as paclitaxel carriers." *Biotechnol Prog* 23: 278-285.

**Lichtenberg D, Robson RJ, Dennis EA (1983).** „Solubilization of phospholipids by detergents - structural and kinetic aspects." *Biochim Biophys Acta* 737: 285-304.

**Lichtenberg D (1985).** "Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants." *Biochim Biophys Acta* 821: 470-478.

**Lin JJ, Silas JA, Bermudez H, Milam VT, Bates FS, Hammer DA (2004).** "The effect of polymer chain length and surface density on the adhesiveness of functionalized polymersomes." *Langmuir* 20: 5493-5500.

**Lin JJ, Ghoroghchian PP, Zhang Y, Hammer DA (2006).** "Adhesion of antibody-functionalized polymersomes." *Langmuir* 22: 3975-3979.

**Lipp H-P, Bokemeyer C (2005).** „Therapie solider Tumoren: Wirksamkeit und Toxizität der Taxane.“ *Pharmazie in unserer Zeit* 34: 128-137.

**Lorenceau E**, Utada AS, Link DR, Cristobal G, Joanicot M, Weitz DA (2005). "Generation of polymersomes from double-emulsions." *Langmuir* 21: 9183-9186.

**MacDonald RC**, MacDonald R I, Menco BPM, Takeshita K, Subbarao NK, Hu L-r (1991). "Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles." *Biochim Biophys Acta* 1061: 297-303.

**Martin TJ**, Prochazka K, Munk P, Webber SE (1996). "pH-dependent micellation of poly(2-vinylpyridine)-block-poly(ethylene oxide)." *Macromolecules* 29: 6071-6073.

**Matsen MW**, Bates FS (1995). "Testing the strong-stretching assumption in a block copolymer microstructure." *Macromolecules* 28: 8884-8886.

**Maurer-Spurej E**, Wong KF, Maurer N, Fenske DB, Cullis PR (1999). "Factors influencing uptake and retention of amino-containing drugs in large unilamellar vesicles exhibiting transmembrane pH gradients." *Biochim Biophys Acta* 1416: 1-10.

**Mayer LD**, Hope MJ, Cullis PR, Janoff AS (1985). "Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles." *Biochim Biophys Acta* 817: 193-196.

**Mecke A**, Dittrich C, Meier W (2006). "Biomimetic membranes designed from amphiphilic block copolymers". *Soft Matter* 2: 751-759.

**Meier W**, Nardin C, Winterhalter M (2000). "Reconstitution of channel proteins in (polymerized) ABA triblock copolymer membranes." *Angew Chem Int Ed* 39: 4599-4602.

**Meng F**, Hiemstra C, Engbers GHM, Feijen J (2003). "Biodegradable polymersomes." *Macromolecules* 36: 3004-3006.

**Meng F**, Engbers GHM, Feijen J (2005). "Biodegradable polymersomes as a basis for artificial cells: encapsulation, release and targeting." *J Control Release* 101: 187-198.

**Milsmann MH**, Schwendener RA, Weder HG (1978). "The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis." *Biochim Biophys Acta* 512: 147-155.

**Miron T**, Wilchek M (1993). "A simplified method for the preparation of succinimidyl carbonate polyethylene glycol for coupling to proteins." *Bioconjugate Chem* 4: 568-569.

**Mui B**, Chow L, Hope MJ (2003). "Extrusion technique to generate liposomes of defined size." *Methods Enzymol* 367: 3-14.

**Najafi F**, Sarbolouki MN (2003). "Biodegradable micelles/polymersomes from fumaric/sebacic acids and poly(ethylene glycol)." *Biomaterials* 24: 1175-1182.

**Nallani M**, Benito S, Onaca O, Graff A, Lindemann M, Winterhalter M, Meier W, Schwaneberg U (2005). "A nanocompartment system (Synthosome) designed for biotechnological applications." *J Biotech* 123: 50-59.

**Napoli A**, Tirelli N, Wehrli E, Hubbell JA (2002). "Lyotropic behavior in water of amphiphilic ABA triblock copolymers based on poly(propylene sulfide) and poly(ethylene glycol)." *Langmuir* 18: 8324-8329.

**Napoli A**, Valentini M, Tirelli N, Müller M, Hubbell JA (2004a). "Oxidation-responsive polymeric vesicles." *Nat Mater* 3: 183-189.

**Napoli A**, Boerakker MJ, Tirelli N, Nolte RJM, Sommerdijk N, Hubbell JA (2004b). "Glucose-oxidase based self-destructing polymeric vesicles." *Langmuir* 20: 3487-3491.

**Nardin C**, Hirt T, Leukel J, Meier W (2000). "Polymerized ABA triblock copolymer vesicles." *Langmuir* 16: 1035-1041.

**Nardin C**, Widmer J, Winterhalter M., Meier W (2001). "Amphiphilic block copolymer nanocontainers as bioreactors." *Eur Phys J E* 4: 403-410.

**Nardin C**, Bolikal D, Kohn J (2004). „Nontoxic block copolymer nanospheres: Design and characterization." *Langmuir* 20: 11721-11725.

**Nayar R**, Hope MJ, Cullis PR (1989). "Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique." *Biochim Biophys Acta* 986: 200-206.

**Needham D**, McIntosh, Lasic DD (1992). "Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes." *Biochim Biophys Acta* 1108: 40-48.

**New RRC**, Rickwood D, Hames BD (1990). "Liposomes , a practical approach." New RRC (Ed), Press Ltd, Oxford, England.

**Olson F**, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D (1979). "Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes." *Biochim Biophys Acta* 557: 9-23.

**Onaca O**, Nallani M, Ihle S, Schenk A, Schwaneberg U (2006). "Functionalized nanocompartments (Synthosomes): Limitations and prospective applications in industrial biotechnology." *Biotechnol J* 1: 795-805.

**Park YS** (2000). "Tumor-directed targeting of liposomes." *Biosci Rep* 22: 267-281.

**Partearroyo MA**, Alonso A, Goni FM, Tribout M, Paredes S (1996). "Solubilization of phospholipid bilayers by surfactants belonging to the Triton X series: Effect of polar group size." *J Coll Interf Sci* 178: 156-159.

**Pata V**, Dan N (2003). "The effect on chain length on protein solubilization in polymer-based vesicles (polymersomes)." *Biophys J* 85: 2111-2118.

**Pata V, Ahmed F, Discher D E, Dant N (2004).** "Membrane solubilization by detergent: resistance conferred by thickness." *Langmuir* 20: 3888-3893.

**Patel DJ, Kozlowski SA, Rice JA (1981).** "Hydrogen bonding, overlap geometry, and sequence specificity in anthracycline antitumor antibiotic. DNA complexes in solution." *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3333-3337.

**Peschka R, Purmann T, Schubert R (1998).** "Cross-flow filtration – an improved detergent removal technique for the preparation of liposomes." *Int J Pharm* 162: 171-183.

**Philippot JR (1985).** "Extemporaneous preparation of large unilamellar liposomes." *Biochim Biophys Acta* 821: 79-84.

**Photos PJ, Bacakova L, Discher B, Bates FS, Discher DE (2003).** "Polymer vesicles in vivo: correlations with PEG molecular weight." *J Control Release* 90: 323-334.

**Pidgeon C (1993).** "Preparation of MLV by REV method: vesicle structure and optimum solute entrapment." in: *Liposome Technology*, 2<sup>nd</sup> edition, volume 1: Chapter 6, Gregoriadis G (Ed), CRS Press Inc, Boca Raton.

**Putaux J-L, Minatti E, Lefebvre C, Borsali R, Schappacher M, Deffieux A (2005).** "Vesicles made of PS-PI cyclic diblock-copolymers: In situ freeze-drying cryo-TEM and dynamic light scattering experiments." *Faraday Discuss* 128: 163-178.

**Qin SH, Geng Y, Discher DE, Yang S (2006).** "Temperature-controlled assembly and release from polymer vesicles of poly(ethylene oxide)-block-poly(N-isopropylacrylamide)." *Adv Mater* 18: 2905-2909.

**Quarti N, Viville P, Lazzaroni R, Minatti E, Schappacher M, Deffieux A, Putaux J-L, Borsali R (2005).** "Micellar aggregation in blends of linear and cyclic poly(styrene-b-isoprene) diblock copolymers." *Langmuir* 21: 9085-9090.

**Ranck JL, Keira T, Luzzati V (1977).** "Novel packing of hydrocarbon chains in lipids - low-temperature phases of dipalmitoyl phosphatidyl-glycerol." *Biochim Biophys Acta* 488: 432-441.

**Ranquin A, Versees W, Meier W, Steyaert J, Van Gelder P (2005).** "Therapeutic nanoreactors: Combining chemistry and biology in a novel triblock copolymer drug delivery system." *Nano Letters* 5: 2220-2224.

**Rawle A, Nitzsche R (Mitarb.) (1994).** „Partikel im Laserlicht: PCS in 30 Minuten.“ Firmeninformationsschrift, Malvern Instruments GmbH, Herrenberg

**Reinecke AA, Döbereiner H-G (2003).** "Slow relaxation dynamics of tubular polymersomes after thermal quench." *Langmuir* 19: 605-608.

**Reiner JE, Wells JM, Kishore RB, Pfefferkorn C, Helmerson K (2006).** "Stable and robust polymer nanotubes stretched from polymersomes." *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1173-1177.

**Rhoden V**, Goldin SM (1979). "Formation of unilamellar lipid vesicles of controllable dimensions by detergent dialysis." *Biochemistry* 18: 4173-4176.

**Rivnay B**, Bayer EA, Wilchek M (1987). "Use of avidin-biotin-technology for liposome targeting." *Methods Enzymol* 149: 119-123.

**Rodriguez-Hernandez J**, Lecommandoux S (2005). "Reversible inside-out micellization of pH-responsive and water-soluble vesicles based on polypeptide diblock copolymers." *J Am Chem Soc* 127: 2026-2027.

**Rumplecker A** (2003). „Wirkstofffreisetzung aus Vesikeln amphiphiler Blockcopolymeren.“ Diplomarbeit, Universität Hamburg.

**Ruysschaert T**, Sonnen AF, Haefele T, Meier W, Winterhalter M, Fournier D (2005). "Hybrid nanocapsules: interactions of ABA block copolymers with liposomes." *J Am Chem Soc* 127: 6242-6247.

**Saibil HR** (2000). "Conformational changes studied by cryo-electron microscopy." *Nature Structural Biology* 7: 711-714.

**Salem AK**, Cannizzaro SM, Davies MC, Tendler SJ, Roberts CJ, Williams PM, Shakesheff KM (2001). "Synthesis and characterisation of a degradable poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) copolymer with biotinylated end groups." *Biomacromolecules* 2: 575-580.

**Sauer M**, Haefele T, Graff A, Nardin C, Meier W (2001). "Ion-carrier controlled precipitation of calcium phosphate in giant ABA triblock copolymer vesicles." *Chem Commun*: 2452-2453.

**Scarzello M**, Klijn JE, Wagenaar A, Stuart MCA, Hulst R, Engberts JBFN (2006). "pH-dependent aggregation properties of mixtures of sugar-based gemini surfactants with phospholipids and single-tailed surfactants." *Langmuir* 22: 2558-2568.

**Schillen K**, Bryskhe K, Melnikova YS (1999). "Vesicle Formed from a poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) triblock copolymer in dilute aqueous solution." *Macromolecules* 32: 6885-6888.

**Schmidtgen MC**, Drechsler M, Lasch J, Schubert R (1998). "Energy-filtered cryotransmission electron microscopy of liposomes prepared from human stratum corneum lipids." *J Microsc* 191: 177-186.

**Schubert R**, Beyer K, Wolburg H, Schmidt KH (1986). "Structural changes in membranes of large unilamellar vesicles after binding of sodium cholate." *Biochemistry* 25: 5263-5269.

**Schubert R** (1989). "Relationship between the structure of bile salts and their interaction with membrane lipids." *Proceedings of MoBBEL* 4: 1-17.

**Schubert R**, Wolburg H, Schmidt K-H, Roth HJ (1991). "Loading of preformed liposomes with high trapping efficiency by detergent-induced formation of transient membrane holes." *Chem Phys Lipids* 58: 121-129.

**Schubert R (2003).** "Liposome preparation by detergent removal." *Methods Enzymol* 367: 46-70.

**Schurtenberger P, Mazer N, Waldvogel S, Kanzig W (1984).** "Preparation of monodisperse vesicles with variable size by dilution of mixed micellar solutions of bile salt and phosphatidylcholine." *Biochim Biophys Acta* 775: 111-114.

**Shen H, Eisenberg A (1999).** "Morphological phase diagram for a ternary system of block copolymer PS-*b*-PAA/Dioxane/H<sub>2</sub>O." *J Phys Chem B* 103: 9473-9487.

**Seifert U, Berndl K, Lipowsky R (1991).** "Shape transformations of vesicles - phase-diagram for spontaneous-curvature and bilayer-coupling models." *Physical Review A* 44: 1182-1202.

**Senior JH (1987).** "Fate and behaviour of liposomes in vivo: a review of controlling factors." *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 3: 123-193.

**Soo PL, Eisenberg A (2004).** "Preparation of block copolymer vesicles in solution." *J Polym Sci Part B* 42: 923-938.

**Srinivas G, Discher DE, Klein ML (2004).** "Self-assembly and properties of diblock copolymers by coarse-grain molecular dynamics." *Nature Materials* 3: 638-644.

**Srinivas G, Discher DE, Klein ML (2005).** "Key roles for chain flexibility in block copolymer membranes that contain pores or make tubes." *Nano Lett* 5: 2343-2349.

**Stauch O (2002).** „Auswirkungen eines Polymerskeletts auf liposomale Membranen.“ Dissertation, Universität Freiburg.

**Stoenescu R, Graff A, Meier W (2004).** "Asymmetric ABC-triblock copolymer membranes induce a directed insertion of membrane proteins." *Macromol Biosci* 4: 930-935.

**Szoka F, Papahadjopoulos D (1978).** "Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation." *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4194-4198.

**Szwark M, Levy M, Milkovich R (1956).** "Polymerization initiated by electron transfer to monomer. A new method of formation of block polymers." *J Am Chem Soc* 78: 2656-2657.

**Talmon Y (1996).** "Transmission electron microscopy of complex fluids: the state of the art." *Ber Bunsenges Phys Chem* 100: 364-372.

**Thibault RJ, Uzun O, Hong R, Rotello V (2006).** "Recognition-controlled assembly of nanoparticles using photochemically crosslinked recognition-induced polymersomes." *Adv Mater* 18: 2179-2183.

**Timmann A (2005).** „Untersuchung des lyotropen Phasenverhaltens und der Solubilisierung von Polyisopren-block-polyethylenoxid-copolymeren mittels Röntgenkleinwinkelstreuung.“ Dissertation, Universität Hamburg.

**van Bambeke** F, Kerkhofs A, Schanck A, Remacle C, Sonveaux E, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP (2000). "Biophysical studies and intracellular destabilization of pH-sensitive liposomes." *Lipids* 35: 213-223.

**van Etten** EWM, ten Kate MT, Snijders SV, Bakker-Woudenberg IAJM (1998). "Administration of liposomal agents and blood clearance capacity of the mononuclear phagocyte system." *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1677-1681.

**Vinson** PK, Talmon Y, Walter A (1989). "Vesicle-micelle transition of phosphatidylcholine and octyl glucoside elucidated by cryo-transmission electron microscopy." *Biophys J* 56: 669-681.

**Witte mann** A, Azzam T, Eisenberg A (2007). "Biocompatible polymer vesicles from biamphiphilic triblock copolymers and their interaction with bovine serum albumin." *Langmuir* 23: 2224-2230.

**Won** YY, Davis H, Bates F, Agamalian M, Wignall GD (2000). "Segment distribution of the micellar brushes of poly(ethylene oxide) via small-angle neutron scattering." *J Phys Chem B* 104: 7134-7143.

**Won** YY, Brannan A, Davis HT, Bates F (2002). "Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) of micelles and vesicles formed in water by poly(ethylene oxide)-based block copolymers." *J Phys Chem B* 106: 3354-3364.

**Xu** X, Oliveira M, Ferreira JM (2003). "Effect of solvent composition on dispersing ability of reaction sialon suspensions." *J Colloid Interface Sci* 259: 391-397.

**Yang** J, Pinol R, Gubellini F, Levy D, Albouy PA, Keller P, Li MH (2006). "Formation of polymer vesicles by liquid crystal amphiphilic block copolymers." *Langmuir* 22: 7907-7911.

**Zhang** L, Eisenberg A (1996). "Multiple morphologies and characteristics of 'crew-cut' micelle-like aggregates of polystyrene-b-poly(acrylic acid) diblock copolymers in aqueous solutions." *J Am Chem Soc* 118: 3168-3181.

**Zheng** Y, Won YY, Bates F, Davis HT, Scriven LE, Talmon Y (1999). "Directly resolved core-corona structure of block copolymer micelles by cryo-transmission electron microscopy." *J Phys Chem B* 103: 10331-10334.

**Zhou** YF, Yan DY, Dong WY, Tian Y (2007). "Temperature-responsive phase transition of polymer vesicles: Real-time morphology observation and molecular mechanism." *J Phys Chem B* 111: 1262-1270.



# WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

## ***Persönliche Angaben***

|                      |                       |
|----------------------|-----------------------|
| Name:                | Anja Rank             |
| Geburtsdatum:        | 26.10.1978            |
| Geburtsort:          | Ebersdorf / Thüringen |
| Familienstand:       | ledig                 |
| Staatsangehörigkeit: | deutsch               |

## ***Ausbildung***

### **Schule**

|             |                                         |
|-------------|-----------------------------------------|
| 1985 – 1991 | Adolf-Diesterweg-Oberschule, Lobenstein |
| 1991 – 1993 | Reichard-Gymnasium, Lobenstein          |
| 1993 – 1997 | Goethe-Gymnasium, Gera                  |

### **Studium**

|             |                                                                                                               |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1997 – 2001 | Studium der Pharmazie an der<br>Friedrich-Schiller-Universität Jena                                           |
| 2002 – 2003 | Pharmaziepraktikum bei Hoffmann la Roche in Grenzach-<br>Wyhlen und i.d. Apotheke am Nollendorfer Hof in Jena |
| 2003        | Erteilung der Approbation als Apothekerin                                                                     |

### **Promotion**

|                |                                                                                                                                                                   |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| seit Juli 2003 | Promotion am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie<br>und Biopharmazie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg<br>unter der Leitung von Prof. Dr. R. Schubert |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

