

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Prozess zur skalierbaren Herstellung von Nanokompartimenten aus ABA-Triblock-Copolymeren

Sarah Theresa Poschenrieder

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktor-Ingenieurs
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
Prüfer der Dissertation: 1. TUM Junior Fellow Dr. rer. nat. Kathrin Castiglione
2. Prof. Dr.-Ing. Harald Klein

Die Dissertation wurde am 15.09.2016 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 29.01.2017 angenommen.

It's not only the question, but the way you try to solve it.

Maryam Mirzakhani
(*1977)
Iranische Mathematikerin

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München im Rahmen der Nachwuchsgruppe von Frau Dr. rer. nat. Kathrin Castiglione. Sehr herzlich möchte ich mich bei verschiedenen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben:

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Kathrin Castiglione für die ausgezeichnete Betreuung und die Möglichkeit, dieses äußerst vielseitige und herausfordernde Thema bearbeiten zu können. Dank zahlreicher konstruktiver und motivierender Diskussionen und durch das mir entgegen gebrachte Vertrauen habe ich mich jederzeit in höchstem Maße sowohl unterstützt, als auch in positivstem Sinne gefordert gefühlt.

Beim Coreferenten Herrn Prof. Dr.-Ing. Harald Klein (Lehrstuhl für Anlagen- und Prozesstechnik, Technische Universität München) und beim Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik) bedanke ich mich herzlich für die Übernahme der jeweiligen Aufgabe. Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz möchte ich mich zudem für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl promovieren zu dürfen bedanken.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die Finanzierung dieses Projektes.

Ferner möchte ich mich bei folgenden Personen sehr herzlich bedanken:

Bei Sophie Solchenbach (Lehrstuhl für technische Elektrochemie) für die Durchführung der energiedispersiven Röntgenspektroskopie.

Bei Frau Dr. rer. nat. Marianne Hanzlik (Fachgebiet für Elektronenmikroskopie) für die Anfertigung der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen und vor allem für viele interessante, lehrreiche und herzliche Gespräche.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik für die konstruktive, sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und einige unvergessliche Momente. Besonderer Dank gilt meinen Kollegen aus der Nachwuchsforschungsgruppe, Tom Schwarzer, Ludwig Klermund und Florian Sedlmaier, für eine äußerst gewinnbringende Zeit und eine phantastische Zusammenarbeit. Ebenfalls besonders bedanken möchte ich mich bei

Tina Pfaffinger, Timm Severin, Martin Dorn und Dr. rer. nat. Andreas Schmieder für das intensive Korrekturlesen meiner Arbeit und die konstruktive Kritik.

Weiterhin danke ich herzlichst allen Studenten, die durch ihre motivierte Mitarbeit am Entstehen dieser Arbeit entscheidend mitgewirkt haben: Sina Schiebel, Sabine Wagner, Bettina Langer, Tobias Lehmann, Hilal Coskunirmak, Anton Rückel, Pierre Djillali, Alexander Gilg, Rebekka Dilo, David Auber, Gwendal Gränicher, The Anh Baran und Dominik Grüger.

Neben den vielen Personen, die mir fachliche und professionelle Unterstützung geschenkt haben, möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mich auf persönliche Weise unterstützt haben:

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden, die mich fern ab der Arbeit wahrnehmen, schätzen und unterstützen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für jegliche Unterstützung und für die Freiheit, meine Wege seit jeher selbst wählen, und unvoreingenommen beschreiten zu können.

Liebe Christina, ohne deine nahezu grenzenlose Geduld und deinen Rückhalt wäre diese Arbeit nicht mit so viel Freude entstanden. Dafür und für so vieles mehr danke ich dir aus tiefstem Herzen.

Danke!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	2
3	Theoretische Grundlagen	6
3.1	Polymervesikel	6
3.1.1	Anwendungsgebiete.....	7
3.1.2	Selbstorganisation von amphiphilen Block-Copolymeren	11
3.1.3	Herstellung.....	17
3.1.4	Stabilität	19
3.2	Charakterisierung von Polymervesikeln.....	21
3.2.1	Lichtstreuung	21
3.2.2	Mikroskopie.....	27
3.3	Stofftransport über Membranen	28
3.3.1	Membranen.....	28
3.3.2	Stofftransport	31
3.3.3	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient und Löslichkeit	37
3.3.4	Propranolol und Koffein als Modellmoleküle für Membran-Diffusion	38
3.4	Rührkesselreaktoren	39
3.4.1	Grundlagen des Rührens	39
3.4.2	Hydrodynamik in Rührkesselreaktoren.....	45
3.4.3	Leistungseintrag und Energiedissipation	47
3.4.4	Maßstabsübertragung	52
4	Material und Methoden	53
4.1	Allgemeines Material	53
4.2	Verwendetes ABA-Triblock-Copolymer.....	53
4.3	Herstellung von Polymervesikeln.....	54
4.3.1	Milliliter-Maßstab	54
4.3.2	Miniaturisierte Rührkesselreaktoren	55
4.3.3	Liter-Maßstab	59
4.4	Beladene Polymervesikel	62
4.4.1	Herstellung.....	62

4.4.2	Reinigung.....	62
4.4.3	Lyse	63
4.5	Mechanische und thermische Belastung von Polymervesikeln	64
4.5.1	Extrusion.....	64
4.5.2	Konstante Scherraten	64
4.5.3	Prozessbedingungen in miniaturisierten Rührkesselreaktoren	64
4.6	Belastung von Polymervesikeln in Zweiphasensystemen	65
4.6.1	Verwendete Zweiphasensysteme.....	65
4.6.2	Mikroliter-Maßstab	66
4.6.3	Milliliter-Maßstab	66
4.6.4	Miniaturisierte Rührkesselreaktoren	66
4.7	Charakterisierung von Polymervesikeln.....	67
4.7.1	Messung der statischen Lichtstreuung	67
4.7.2	Messung der dynamischen Lichtstreuung	67
4.7.3	Trübungsmessung	70
4.7.4	Elektronenmikroskopie.....	71
4.7.5	Viskositätsmessung	72
4.8	Bestimmung der Membranpermeabilität	72
4.8.1	Planare Membranen.....	72
4.8.2	Polymervesikel.....	77
4.9	Rückgewinnung des Polymers	78
4.9.1	Mehrstufiger Evaporations- und Solubilisierungsprozess	79
4.9.2	Bestimmung der Reinheit.....	79
4.10	Analytische Methoden	80
4.10.1	Bestimmung des Polymerrückstandes	80
4.10.2	Bestimmung des relativen Verlustes von verkapselten Molekülen.....	80
4.10.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	81
4.10.4	Absorptions- und Fluoreszenzmessung	82
5	Herstellung von Polymervesikeln.....	84
5.1	Verfahrensentwicklung zur Herstellung von Polymervesikeln	84
5.1.1	Dispersionsmethode	84
5.1.2	Ethanolmethode.....	92
5.1.3	Diskussion.....	99
5.2	Mechanismus der Polymersomenbildung	102
5.2.1	Polymersomenbildung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren.....	102

5.2.2	Einfluss von Temperatur, Ethanol- und Polymerkonzentration	109
5.2.3	Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl	112
5.2.4	Diskussion.....	114
5.3	Maßstabsvergrößerung der Herstellung von Polymervesikeln	117
5.3.1	Einfluss der Rührerdrehzahl.....	119
5.3.2	Einfluss der Rührerumfangsgeschwindigkeit	120
5.3.3	Maßstabsübertragung anhand des Leistungseintrags	122
5.3.4	Maßstabsübertragung anhand der dimensionslosen Froudezahl	124
5.3.5	Diskussion.....	127
5.4	Wiederaufbereitung des Polymers.....	129
5.4.1	Polymerextraktion	129
5.4.2	Verfahrensentwicklung zur Wiedergewinnung des Polymers	129
5.4.3	Rückgewinnung von mit Proteinen verunreinigtem Polymer.....	132
5.4.4	Diskussion.....	133
6	Membraneigenschaften.....	134
6.1	Unbeladene Polymervesikel	134
6.1.1	Bestimmung der Aggregationszahl über statische Lichtstreuung.....	134
6.1.2	Membranstärke	135
6.1.3	Membranviskosität	135
6.2	Beladene Polymervesikel	136
6.2.1	Bestimmung der Aggregationszahl.....	137
6.2.2	Verkapselungseffizienz	139
6.3	Diskussion.....	141
7	Stabilität von Polymervesikeln	143
7.1	Lagerstabilität.....	143
7.1.1	Unbeladene Polymervesikel.....	143
7.1.2	Beladene Polymervesikel	145
7.2	Mechanische und thermische Stabilität.....	146
7.2.1	Während des Herstellungsprozesses	146
7.2.2	Extrusion.....	148
7.2.3	Konstante Scherraten	149
7.2.4	Unter Prozessbedingungen in miniaturisierten Rührkesselreaktoren.....	151
7.3	Stabilität in Zweiphasensystemen.....	159
7.3.1	Einfluss des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten.....	159
7.3.2	Polymervesikel im Zweiphasensystem mit ionischen Flüssigkeiten.....	165

7.4	Diskussion	170
8	Permeabilität der Polymermembran.....	173
8.1	Permeabilität von planaren Polymermembranen	173
8.1.1	Bildung von gestützten planaren Polymermembranen	173
8.1.2	Permeabilität der Polymermembran gegenüber Propranolol und Koffein	175
8.1.3	Vergleich mit der Permeabilität von planaren Phospholipidmembranen ..	179
8.1.4	Membranstruktur	182
8.2	Permeabilität von Polymervesikeln	183
8.2.1	Bestimmung der Permeabilität von Polymersomen	183
8.2.2	Permeabilität von Polymersomen gegenüber Propranolol und Koffein	186
8.3	Vergleich von planaren Membranen und Polymervesikeln.....	188
8.3.1	Gegenüberstellung des PAMPA- und des Polymersomen-Systems.....	188
8.3.2	Vergleich der Permeabilitätskoeffizienten.....	191
8.4	Diskussion	192
9	Zusammenfassung.....	195
10	Ausblick	203
11	Literatur.....	204
12	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	220
12.1	Abkürzungen	220
12.2	Symbole	223
13	Anhang.....	232
13.1	Weiterführende Ergebnisse	232
13.1.1	Viskosität der Polymerlösung	232
13.1.2	Extinktionsmessungen	233
13.1.3	Zweistufige Polymersomenbildung	234
13.1.4	Verfahrenstechnische Charakterisierungen im Liter-Maßstab	235
13.1.5	Berry-Plot der statischen Lichtstreuung	249
13.1.6	Aggregationszahl beladener Polymervesikel	249
13.1.7	Permeabilitätskoeffizienten weiterer Stoffe.....	250
13.2	Verwendete Puffer und Lösungen	252
13.3	Verwendete Chemikalien.....	254
13.4	Verwendete Geräte und Software.....	260

1 Einleitung

Einer Hochrechnung der Vereinten Nationen zufolge wächst die Weltbevölkerung stärker als lange Zeit angenommen. Bereits Ende 2030 werden 8,5 Milliarden Menschen auf der Erde leben. Diese Tatsache sowie die steigende Lebenserwartung in großen Teilen der Erde (Behrends und Stallmeister, 2015) erfordern neue Möglichkeiten beispielsweise in der Lebensmittelproduktion und bei der Herstellung von pharmazeutischen Produkten. Hierbei kann die Biotechnologie einen großen Beitrag leisten. Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) hat im Jahr 2010 den Strategieprozess „Nächste Generation biotechnologischer Verfahren – Biotechnologie 2020+“ (BMBF, 2010) ins Leben gerufen. Dieser Strategieprozess soll dazu beitragen, das von der Bundesregierung festgelegte Ziel, nachwachsende Rohstoffe mit biotechnologischen Verfahren verstärkt industriell zu nutzen, zu erreichen.

Biotechnologische Produktionsverfahren finden seit einigen Jahren in verschiedenen industriellen Bereichen, wie der chemischen- und pharmazeutischen Industrie, bei der Nahrungs- und Futtermittelherstellung und in der Kosmetikbranche, Anwendung (Chmiel, 2011). Die derzeitig verfügbaren fermentativen und biokatalytischen Verfahren unterliegen jedoch einigen Restriktionen. So können zelltoxische Stoffe mit Mikroorganismen nicht hergestellt werden. Enzyme wiederum verlieren in Anwesenheit von organischen Lösemitteln, deren Einsatz bei diversen Prozessen unumgänglich ist, meist ihre Aktivität. Bislang unvermeidbare, zeit- und kostenintensive Reinigungsschritte sind weitere Nachteile klassischer Produktionsverfahren (Dechow, 1989).

Die Bemühung neue Produktionsverfahren schneller zur industriellen Anwendung zu bringen ist alleine nicht ausreichend, um das gesamte Potenzial biotechnologischer Produktionsverfahren nutzen zu können. Vielmehr ist die Entwicklung völlig neuartiger Konzepte im Sinne der nächsten Generation biotechnologischer Verfahren notwendig. Diese Vision beruht auf verfahrenstechnischen Innovationen, die über derzeitig bekannte biotechnologische Prozesse weit hinausgehen und heute noch nicht realisierbar sind. Die Entwicklung neuer Basistechnologien für ein breites Anwendungsspektrum erfordert dabei ein hohes Maß an Forschung (BMBF, 2010). Neben der gezielten Veränderung von biologischen Systemen stellt auch deren Kombination mit artifiziellen Komponenten eine vielversprechende Möglichkeit auf dem Weg zu genannten Zielen dar.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Zwei fundamentale Organisationsprinzipien der natürlichen Zelle ermöglichen das simultane Ablaufen verschiedenster chemischer Reaktionen: Kompartimentierung und selektiver Stofftransport. Dank der räumlichen Trennung unterschiedlicher Enzyme und dank der Kontrolle über die beteiligten Reaktanden können selbst Reaktionen, die eigentlich inkompatibel sind, gleichzeitig stattfinden. Durch diverse zelleigene Enzyme werden jedoch auch unerwünschte Nebenreaktionen katalysiert, woraus ein wesentlicher Nachteil der Verwendung ganzer Zellen für biokatalytische Prozesse hervorgeht. Eine Möglichkeit biokatalytische Prozesse nebenproduktfrei zu gestalten, stellt die Erzeugung von artifiziellen Reaktionskompartimenten im Nanomaßstab dar. Diese künstlichen Reaktionsräume enthalten nur die für die gewünschte Produktsynthese nötigen Komponenten, wodurch Nebenreaktionen verhindert werden sollen.

Membranvesikel können als artifizielle Reaktionskompartimente dienen. Ein prominentes Beispiel für Membranvesikel sind sogenannte Liposomen, deren Membran über Selbstassemblierung von amphiphilen Phospholipiden gebildet wird. Durch die Ausbildung einer Lipiddoppelschicht kann der wässrige Innenraum von der äußeren, wässrigen Phase separiert werden. Problematisch bei der Verwendung von Liposomen ist jedoch deren geringe Stabilität bei gleichzeitig relativ hoher Membranpermeabilität, wodurch die effiziente Rückhaltung verkapselter Moleküle erschwert wird (Hunt und Tsang, 1981; Discher *et al.*, 2002; Discher und Eisenberg, 2002). Eine stabilere und weniger permeable Alternative stellen sogenannte Polymersomen dar. Hierbei handelt es sich um polymerbasierte Membranvesikel aus selbstassemblierenden, amphiphilen Blockcopolymeren, die ihren Namen in Analogie zu ihren Pendants aus Lipiden erhielten (Discher, 1999). Polymersomen können über verschiedene Methoden hergestellt werden. Hierzu zählen die Filmrehydrierung (Kumar *et al.*, 2007), die Elektroformation (Discher, 1999), die direkte Dispersion von feststoffförmigen Polymer in der wässrigen Phase (Ahmed und Discher, 2004) oder die Zugabe einer Polymerlösung zum wässrigen Medium (Nardin *et al.*, 2000a).

Mit dem Ziel das Prinzip der Kompartimentierung und des selektiven Stofftransportes für den Aufbau leistungsfähiger, biotechnologischer Reaktionskaskaden unter Verwendung artifizieller Reaktionskompartimente nutzbar zu machen, sollen in dieser Arbeit Vesikel aus selbstassemblierenden, amphiphilen Polymeren hergestellt werden. Durch das Verkapseln von Enzymen im Vesikelinneren und über die zusätzliche Funktionalisierung der Membran können Polymersomen als Enzymmembranreaktor im Nano-Maßstab fungieren. Als Prototyp

sollen Polymervesikel aus dem ABA-Triblock-Copolymer Poly(2-methyloxazolin)₁₅-poly(dimethylsiloxan)₆₈-poly(2-methyloxazolin)₁₅, kurz PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅, dienen. Polymersomen, die aus diesem Polymer aufgebaut sind, sind für die Verwendung als Enzymmembranreaktor vielversprechend, da sie aufgrund der meist niedrigen Membranpermeabilität und der Möglichkeit Transportproteine in die Membran zu inserieren (Nardin *et al.*, 2000b; Nardin *et al.*, 2001) für die Realisierung eines selektiven Stofftransportes geeignet sind.

Bis heute werden Polymersomen überwiegend im Milliliter-Maßstab unter undefinierten Bedingungen hergestellt. Essentielle Nachteile stellen die hierbei meist resultierenden, breiten Partikelgrößenverteilungen der Polymersomendispersion dar. Um Vesikel mit definierter Größe herstellen zu können sind oftmals weitere, aufwendige Prozessschritte, wie beispielsweise die mehrstufige Extrusion (Lee *et al.*, 2001b), notwendig. Zudem ist bisher kein skalierbares Verfahren bekannt, mit dessen Hilfe Polymersomen im großen Maßstab hergestellt werden können. Dies ist jedoch eine essentielle Voraussetzung, um die Polymersomentechnologie industriell nutzbar machen zu können. Konkretes Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung eines Verfahrens für die reproduzierbare, effiziente und skalierbare Herstellung von Polymersomen. Hierfür soll der kommerziell verfügbare bioREACTOR 48, ein Bioreaktorsystem, welches an der Technischen Universität München entwickelt wurde, eingesetzt werden. In diesem System können bis zu 48 miniaturisierte Rührkesselreaktoren bei definierten Prozessbedingungen unter Verwendung von vier verschiedenen Rührertypen parallel betrieben werden (Weuster-Botz *et al.*, 2005; Puskeiler *et al.*, 2005b). Die Uniformität der aus dem zu etablierenden Prozess hervorgehenden Vesikel stellt eine wichtige Voraussetzung für die verlässliche Charakterisierung der Reaktionskompartimente und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dar. Daher liegt der Fokus auf der Produktion von Polymersomen mit monomodaler, schmaler Partikelgrößenverteilung mit geringer Polydispersität. Für ein tieferes Verständnis des etablierten Prozesses soll anschließend der Selbstassemblierungs-Mechanismus des Polymers in der wässrigen Phase identifiziert werden. Um mittelfristig Prozesse auf Basis der Polymersomentechnologie im industriellen Maßstab zu ermöglichen, soll zudem eine Maßstabsvergrößerung des etablierten Prozesses in den Liter-Maßstab erfolgen. Unter dem Aspekt einer möglichst kostengünstigen Bereitstellung der Polymersomen soll dieser Prozess unter Verwendung von herkömmlichen, verfahrenstechnischen Komponenten realisiert werden. Es soll weiterhin ein Verfahren für die effiziente Wiedergewinnung des Polymers nach dessen Verwendung zur Herstellung von Enzymmembranreaktoren etabliert werden, da dieses ein kostenintensives Ausgangsmaterial darstellt (Listenpreis PolymersourceTM 2016: 450 US-Dollar g⁻¹). Ziel hierbei ist die

Wiedergewinnung des Polymers in seiner möglichst ursprünglichen Reinheit und Qualität, um es erneut für die Herstellung von Polymersomen verwenden zu können.

Die Eigenschaften der Polymersomenmembran beeinflussen zahlreiche, grundlegende Charakteristika der Vesikel. So ist es von großem Interesse Größen wie die Anzahl der membranbildenden Polymerketten, die Stärke der Membran und die Membranviskosität zu bestimmen. Da sich die Membraneigenschaften je nach verwendetem Polymer, Vesikelgröße und anderen Einflussfaktoren stark unterscheiden können, kann nicht problemlos auf in der Literatur verfügbaren Angaben zurückgegriffen werden. Deshalb sollen die Membraneigenschaften von PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅-Polymersomen umfassend charakterisiert werden.

Es ist bekannt, dass Polymersomen im Vergleich zu Liposomen eine erhöhte Membranstabilität aufweisen (Discher, 1999). Eine systematische Untersuchung der Polymersomenstabilität bei für biotechnologische Prozesse relevanten Bedingungen erfolgte jedoch bisher nicht. Daher sollen PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅-Polymersomen verfahrenstechnisch charakterisiert werden. Ziel ist es die Eigenschaften der Polymersomen in quantitative Größen fassen zu können. Hierbei soll neben der Lagerstabilität auch die mechanische Stabilität der Polymersomen unter typischen Prozessbedingungen, die in Rührkesselreaktoren herrschen, untersucht werden. Eine systematische Untersuchung der Stabilität von Polymersomen gegenüber Lösemitteln erfolgte bislang ebenfalls nicht. Dies ist jedoch von Interesse, da einige biokatalytische Prozesse beispielsweise aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der Edukte und Produkte in Zweiphasensystemen aus wässriger Phase und organischem Lösemittel durchgeführt werden. Charakterisiert werden soll daher die Stabilität von Polymersomen gegenüber klassischen organischen Lösemitteln. Als Alternative zu klassischen organischen Lösemitteln können ionische Flüssigkeiten eingesetzt werden (Pfründer *et al.*, 2004), deren Effekt auf die Vesikelstabilität vergleichend untersucht werden soll. Die Stabilität der Polymersomen wird anhand der resultierenden Veränderung der Partikelgrößenverteilung beurteilt. Zudem liegt der Fokus auf der Rückhalteeffizienz der in den Vesikeln verkapselten Beladung.

Ein weiteres Augenmerk liegt auf der Permeabilität der Polymermembranen, welche meist niedriger als jene von Lipidvesikeln ist (Discher, 1999). Um Polymersomen zielführend als Enzymmembranreaktor verwenden zu können, muss der passive Stofftransport von beteiligten Substraten und Produkten über die Membran charakterisiert werden können. Trotz verschiedener Studien in diesem Bereich sind fast nur qualitative und nur wenig quantitative Aussagen verfügbar. Ziel ist deshalb die Bestimmung der membranspezifischen Permeabilitätskoeffizienten.

Die Arbeitspakete, die für das Erreichen der Zielsetzungen von zentraler Bedeutung sind, gestalten sich wie folgt:

- Entwicklung eines reproduzierbaren, effizienten und skalierbaren Herstellungsprozesses von Polymersomen mit monomodaler, schmaler Partikelgrößenverteilung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren
- Aufklärung des Vesikelbildungsmechanismus in miniaturisierten Rührkesselreaktoren
- Maßstabsübertragung des entwickelten Polymersomenherstellungsprozess in den Liter-Maßstab
- Entwicklung eines Verfahrens für die effiziente Wiedergewinnung des Polymers
- Untersuchung grundlegender Membraneigenschaften
- Untersuchung der Lagerstabilität von Polymersomen
- Untersuchung der temperaturabhängigen, mechanischen Stabilität von unbeladenen und beladenen Polymersomen
- Untersuchung der Stabilität von unbeladenen und beladenen Polymersomen in Zweiphasensystemen mit organischen Lösemitteln und ionischen Flüssigkeiten
- Untersuchung der Permeabilität von Polymermembranen

3 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die für diese Arbeit relevanten theoretischen Grundlagen erläutert. Dabei wird zunächst ein Überblick über Polymervesikel und ihre Charakterisierung gegeben. Anschließend wird das Prinzip der Membran-Diffusion dargelegt. Im letzten Teil dieses Kapitels werden die verfahrenstechnischen Grundlagen von Rührkesselreaktoren beschrieben.

3.1 Polymervesikel

Bei Vesikeln, aus dem Lateinischen *vesicula* für Bläschen, handelt es sich um sphärische Hohlkörper, die von einer Membranhülle gebildet werden. Diese Membran ist aus assoziierten amphiphilen Molekülen aufgebaut, weshalb Vesikel in die Gruppe der Assoziationskolloide eingegliedert werden können. Vesikel sind in der Lage in ihrem Innenraum Gastmoleküle zu verkapseln und diese so räumlich von der die Vesikel umgebenden, ebenfalls meist wässrigen, kontinuierlichen Phase zu separieren und vor dieser zu schützen. Die Vesikeltechnologie nahm in den 60er Jahren mit der Erforschung von Lipidvesikeln ihren Anfang (Bangham *et al.*, 1965). Die sogenannten Liposomen werden aus natürlichen oder synthetischen Lipiden, die aufgrund ihres amphiphilen Charakters durch Selbstassemblierung eine Lipiddoppelschicht-Membran bilden können, aufgebaut. Ende der 90er Jahre wurden Membranvesikel zum ersten Mal aus amphiphilen Polymeren, also solchen mit hydrophilen und hydrophoben Teilbereichen, hergestellt (Discher, 1999). In Analogie zu ihren Vorreitern, den Liposomen, werden Polymervesikel auch Polymersomen genannt. In Abbildung 3.1 ist der Aufbau eines Polymersoms aus der amphiphilen Membran dargestellt.

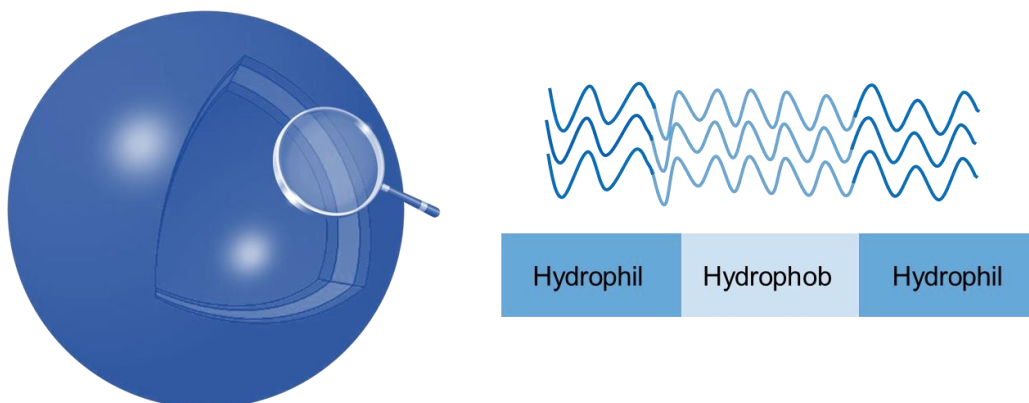


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines Polymersoms. Die Membran des Polymervesikels ist aus einem amphiphilen Polymer mit hydrophilen und hydrophoben Teilbereichen aufgebaut.

Neben der Einteilung der Vesikel auf Basis ihrer membranbildenden Grundbausteine kann die Klassifizierung von Liposomen und Polymersomen auch basierend auf ihrer Größe und der Anzahl der gebildeten Membranen erfolgen (Lasic, 1988b). Generell wird unterschieden zwischen Vesikeln, die aus nur einer Membran bestehen (*unilamellar vesicle*, UV) und Vesikeln, die aus mehreren Membranen aufgebaut sind (*multilamellar vesicle*, MLV). Dabei kann der Vesikeldurchmesser im Bereich von wenigen Nanometern (~10 nm) bis hin zu einigen Mikrometern variieren. Man unterscheidet demnach zwischen kleinen, unilamellaren Vesikeln (*small unilamellar vesicle*, SUV) mit Durchmessern < 50 nm, großen unilamellaren Vesikeln (*large unilamellar vesicle*, LUV) mit Durchmessern > 50 nm und Riesenvesikeln im Mikrometerbereich (*giant unilamellar vesicle*, GUV) (Lasic, 1998).

3.1.1 Anwendungsgebiete

In den vergangenen Jahren wurden diverse potentielle Anwendungsgebiete der Polymersomentechnologie erforscht. Insbesondere die Möglichkeit die Membraneigenschaften der Vesikel über die chemischen Eigenschaften der verwendeten Polymere zu steuern sowie die vergleichsweise hohe chemische, biologische und physikalische Membranstabilität (Discher und Eisenberg, 2002), veranlassten die Suche nach neuen Einsatzgebieten der synthetischen Vesikel. Neben der Nutzung der Polymervesikel als reine Modellmembran war und ist es das Ziel Polymersomen auch industriell nutzbar zu machen. Hierbei wird im Wesentlichen die Anwendung im medizinisch-pharmazeutischen Bereich, in der Diagnostik und in der Biotechnologie angestrebt.

Therapeutische Anwendung

Die Einsetzbarkeit von Polymersomen im therapeutischen Bereich wurde in den letzten Jahren umfangreich erforscht. Dabei sind Polymersomen vor allem als *Drug Delivery System* von großem Interesse. Bei der systemischen Therapie, wie beispielsweise der Gabe von Zytostatika bei der Chemotherapie, wird der Wirkstoff unspezifisch im gesamten menschlichen Körper verteilt, was zu unerwünschten Nebenwirkungen durch die Schädigung gesunder Zellen führt. Ein erfolgversprechender Ansatz zur Vermeidung dieser Nebenreaktionen kann die Verwendung von Polymersomen darstellen. Hierfür müssen die Vesikel zunächst selektiv am Zielgewebe im menschlichen Körper adsorbieren (*drug targeting*), um dort im zweiten Schritt ihren vorab verkapselten Wirkstoff kontrolliert freizugeben (*controlled release*). Durch die Funktionalisierung der Polymersomenoberfläche mit für das Zielgewebe spezifischen Liganden können Polymersomen im erkrankten Gewebe selektiv adsorbiert werden. So wurde beispielsweise die Oberfläche von Polymersomen aus Poly(2-methyloxazolin)-poly(dimethylsiloxan)-poly(2-methyloxazolin) (PMOXA-PDMS-PMOXA) erfolgreich mit dem

Oligonukleotid Polyguanylsäure, das als Angriffspunkt (*target*) für den Makrophagen-Rezeptor SRA1 dient, funktionalisiert (Broz *et al.*, 2005). Nach der Anreicherung der therapeutischen Polymersomen muss der Wirkstoff gezielt aus dem Inneren der Nanokapsel abgegeben werden. Dies erfordert die zielgerichtete Manipulation der Membranpermeabilität. Bei biologisch abbaubaren Polymeren wird der hydrophobe Teil der Membran mit der Zeit zersetzt. Dadurch entstehen Poren in der Vesikelhülle, welche zur Freisetzung des Wirkstoffes führen. Zu den bioabbaubaren Polymeren zählen beispielsweise Polylactid (PLA) (Meng *et al.*, 2005) und Poly(caprolacton) (PCL) (Witte mann *et al.*, 2007). Eine weitere Möglichkeit der induzierten Destabilisierung der Polymersomenmembran kann durch gezielte Oxidation des Sulfides des hydrophoben Polymers Polyphenylensulfid (PPS) zu dem hydrophileren Sulfoxid und Sulfon erfolgen. So wird beispielsweise nach Verkapselung des Enzyms Glukoseoxidase bei Zugabe von Glukose und in Anwesenheit von Sauerstoff das oxidierende Wasserstoffperoxid gebildet, was zur Ruptur der Vesikelmembran führt. Die gezielte Freisetzung des Wirkstoffes kann auch durch eine Veränderung des pHs oder einen Temperatursprung bei Einsatz von pH- oder Temperatur-sensitiven Polymeren induziert werden (Giacomelli *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007).

Diagnostik

Die Anwendbarkeit von Polymersomen in der Diagnostik konnte bereits mehrfach erfolgreich gezeigt werden. So wurden Polymersomen, in deren Membran porphyrinhaltige Fluorophore eingelagert waren, als fluoreszenzmarkierte Vesikel für diagnostische Zwecke via Nahinfrarotspektroskopie eingesetzt (Ghoroghchian *et al.*, 2007). Ebenfalls einsetzbar sind magnetische Polymersomen. Die Magnetisierung erfolgt hierbei durch die Mineralisierung der Membran mit Eisen(III)-oxid Fe_2O_3 (Lecommandoux *et al.*, 2005). Die Verwendung von Polymersomen als Bio-Sensor ist ebenfalls denkbar. Hierbei werden Polymersomen, die als Reaktionskompartiment im Nanomaßstab spezielle chemische Reaktionen ermöglichen, an planaren Oberflächen immobilisiert. So sollen diese als Biosensorchips für die Detektion biologischer Parameter (wie beispielsweise pH) eingesetzt werden (Benito, 2006).

Biotechnologie

In der Biotechnologie ist die Verwendung von Polymersomen als universell einsetzbarer Nanoreaktor von Interesse. Ziel bei der Verwendung von Polymersomen als Nanoreaktor ist die nebenproduktfreie, mehrstufige, enzymatische Umsetzung. Unerwünschte Nebenreaktionen, wie sie bei der Verwendung natürlicher Zellen bei biokatalytischen Prozessen häufig vorkommen, werden dadurch vermieden, dass die synthetischen Reaktionskompartimente nur die für die gewünschte Synthese nötigen Enzyme enthalten. Nebenreaktionen durch konkurrierende Enzyme und/oder Stoffwechselwege werden so verhindert. In Abbildung 3.2 ist exemplarisch die Funktionsweise eines funktionalisierten

Polymersoms, das eine zweistufige enzymatische Reaktion ermöglicht, dargestellt. Das Substrat kann selektiv über ein in die Polymermembran eingebettetes Transportprotein kontrolliert ins Vesikelinnere gelangen. Das dort verkapselte Enzym katalysiert die Umsetzung des Substrats zu einem Intermediat, das seinerseits die Polymermembran selektiv über ein Transportprotein passieren kann. Ein an der Vesikeloberfläche immobilisiertes Enzym katalysiert die Umwandlung des Intermediates zum Produkt.

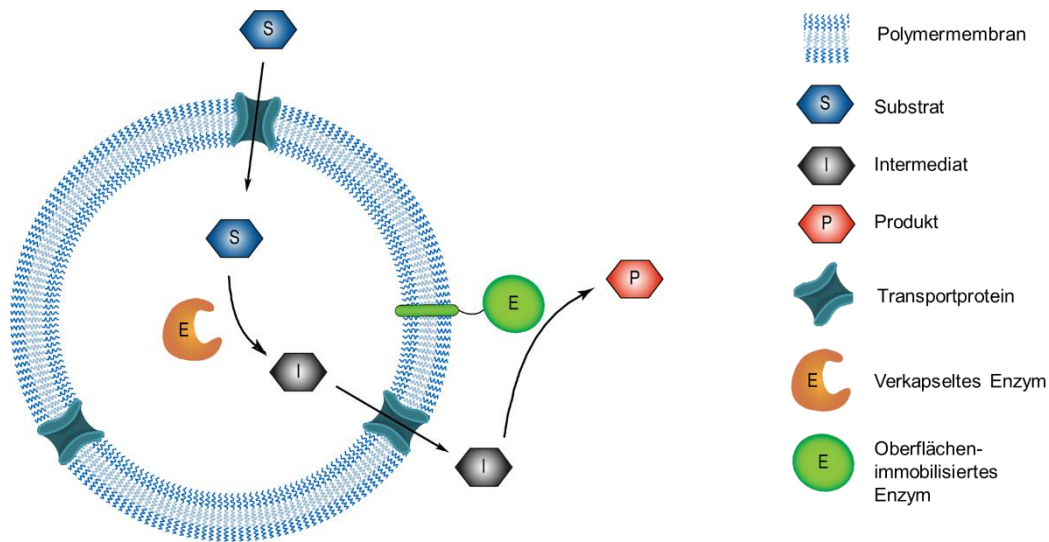


Abbildung 3.2: Funktionsweise eines Polymersoms als Enzymmembranreaktor für eine zweistufige enzymatische Reaktion: Das Substrat gelangt mit Hilfe des Transportproteins selektiv über die Membran ins Vesikelinnere, wo es über dort verkapselte Enzyme in ein Intermediat umgewandelt wird. Dieses verlässt das Vesikelinnere über ein Transportprotein. An der Polymersomenoberfläche kann es durch dort immobilisierte weitere Enzyme in einer zweiten Reaktion zum Produkt umgewandelt werden. (Abbildung: Tom Schwarzer, modifiziert).

Empfindliche Enzyme können durch die Verkapselung im Vesikelinneren von äußeren Einflüssen geschützt werden. Dabei ist die Verkapselung von diversen Proteinen wie beispielsweise bovinem Serumalbumin (BSA) (Witte mann *et al.*, 2007), Hämoglobin und Myoglobin (Lee *et al.*, 2001a) sowie der Einschluss von Enzymen wie Acetylcholinesterase (Ruyschaert *et al.*, 2005) und Glukoseoxidase (Napoli *et al.*, 2004b; Witte mann *et al.*, 2007) in Polymersomen möglich. Zudem wurde unter Verwendung poröser Polymersomen, hergestellt aus Polystyrol-polyisocyanalanin(2-thiophen-3-yl-ethyl)amid (PS-PIAT), gezeigt, dass Polymervesikel für den Einsatz als Nanoreaktor für mehrstufige Reaktion geeignet sind. Hierbei wird acetylierte Glukose von in der porösen Membran inkorporierter *Candida antarctica* Lipase B gespalten. Die frei werdende Glukose gelangt ins Vesikelinnere und wird dort von vorab verkapselter Glukoseoxidase umgesetzt. Dabei entstehendes Wasserstoffperoxid passiert die poröse Membran, wo es schließlich an der Vesikeloberfläche durch chemisch verankerte Meerrettichperoxidase umgesetzt wird. Diese Reaktion kann durch die Entstehung

eines photometrisch detektierbaren Radikalkations nachgewiesen werden (van Dongen *et al.*, 2009).

Eine weitere Möglichkeit, um den Stofftransport über die Membran zu gewährleisten, besteht in der Insertion von Transportproteinen in die Polymermembran. Für biotechnologische Anwendungen ist deren Insertion von besonderer Bedeutung, da sie aktive Komponenten natürlicher Zellen darstellen und dort den Stoffaustausch regulieren. Als Baustein für die Polymermembran eignet sich besonders das amphiphile Polymer PMOXA-PDMS-PMOXA, da hierfür die Insertion verschiedener Transportproteine bereits gezeigt werden konnte. In diese Membran können zum Beispiel die Proteine OmpF (*outer membrane protein F*) für den Transport kleiner Moleküle bis zu 0,6 kDa (Nardin *et al.*, 2000b; Koebnik *et al.*, 2000), FhuA (*ferric hydroxamate uptake protein component A*) für beispielsweise die Translokation von einzelsträngiger DNA (Koebnik *et al.*, 2000; Nallani *et al.*, 2006), LamB (*bacteriophage lambda receptor protein*) als Maltoporin (Graff *et al.*, 2002), Aquaporin Z und Aquaporin 0 (Stoenescu *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2007) für den selektiven Wassertransport und Tsx für Nukleosidtransport (Ranquin *et al.*, 2005) inseriert werden.

Die Immobilisierung von Enzymen auf der Polymersomenoberfläche ist auf unterschiedlichen Wegen realisierbar. Bislang werden Polymere überwiegend an ihren Enden funktionalisiert, um mit den zu immobilisierenden Proteinen zu interagieren (Egli *et al.*, 2011). Ebenfalls möglich ist die Funktionalisierung der Polymere mit Biotin, wodurch die Biotin-Streptavidin-Interaktion genutzt werden kann. Hierbei kommt es allerdings zu nicht-kovalenten Bindungen, was den unerwünschten Ligandenaustausch mit anderen Molekülen, die auf gleiche Weise funktionalisiert wurden, zur Folge haben kann. Relativ neu hingegen ist die Immobilisierung von Proteinen über natürliche oder artifizielle Protein- oder Peptidanker. Mit Hilfe dieser Methode kann grün fluoreszierendes Protein (*enhanced green fluorescent protein*, eGFP) das mit dem Polypeptid Cecropin A als Peptidanker fusioniert ist, erfolgreich auf Poly(isobutylen)-poly(ethylen)-poly(isobutylen) (PIB-PE-PIB) Polymersomen verankert werden (Noor *et al.*, 2012). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eGFP durch Fusion mit drei verschiedenen hydrophoben Peptidankern, nämlich der Transmembran-Domäne von eukariotischem Cytochrom *b₅*, dem viralen Lyseprotein L und dem Hefe-Syntaxin VAM3, auf der Oberfläche von PMOXA-PDMS-PMOXA Polymersomen immobilisiert werden kann. Durch spontane Insertionsprozesse wurde die vollständige Beladung der gesamten Vesikeloberfläche erzielt, ohne dass die Membranintegrität dabei beeinträchtigt worden wäre (Klermund *et al.*, 2016).

3.1.2 Selbstorganisation von amphiphilen Block-Copolymeren

Amphiphile Block-Copolymere

Polymere sind Makromoleküle, die sich aus einer Vielzahl sich wiederholender und kovalent gebundener Einzeleinheiten, den sogenannten Monomeren, zusammensetzen. Handelt es sich dabei um nur eine Art von aneinandergereihten Monomeren, so spricht man von Homopolymeren. Bei Polymeren, die aus verschiedenen Monomeren aufgebaut sind, handelt es sich hingegen um Copolymere. Innerhalb dieser Gruppe kann unter anderem zwischen alternierenden Copolymeren, in denen sich die Monomere abwechseln, zwischen statistischen Copolymeren, die eine regellose, zufällige Abfolge der einzelnen Monomere aufweisen, und Block-Copolymeren unterschieden werden. Letztere bestehen aus homogenen, kovalent aneinander gebundenen Blöcken, die von nur einer Monomer-Art gebildet werden. Je nach Anzahl der im Polymer gebundenen Blöcke spricht man beispielsweise von Di- oder Triblock-Copolymeren. Ein Triblock-Copolymer weist hierbei die allgemein gültige Struktur $A_x-B_y-C_z$ auf. Hierbei stehen A, B und C für drei Blöcke mit den unterschiedlichen Monomeren A, B und C und den jeweiligen Polymerisierungsgraden (mittlere Anzahl an Monomereinheiten im Block) X, Y und Z. Auch die Architektur der Block-Copolymere kann klassifiziert werden. So wird zwischen linearen, verzweigten oder sternförmigen Block-Copolymeren unterschieden. Ein Maß für die Einheitlichkeit der Kettenlängen wird durch den Polydispersitätsindex des Polymers PDI_p angegeben. Der minimal mögliche Grenzwert 1 bedeutet, dass sämtliche Polymerketten die identische Länge aufweisen. Definiert ist er über die gewichtsgemittelte molare Masse M_W und über die zahlengemittelte molare Masse M_N des Polymers:

$$PDI_p = \frac{M_W}{M_N} \geq 1 \quad (3.1)$$

$$M_W = \frac{\sum m_i M_i}{\sum m_i} = \frac{\sum N_{N,i} M_i^2}{\sum N_{N,i} M_i} \quad (3.2)$$

$$M_N = \frac{\sum N_{N,i} M_i}{\sum N_{N,i}} \quad (3.3)$$

PDI_p	Polydispersitätsindex des Polymers	-
M_W	Gewichtsgemittelte molare Masse	g mol^{-1}
M_N	Anzahlgemittelte molare Masse	g mol^{-1}
M_i	Molare Masse einer einzelnen Polymerkette	g mol^{-1}
m_i	Masse der Polymerketten mit molarer Masse M_i	g
$N_{N,i}$	Stoffmenge der Polymerketten mit molarer Masse M_i	mol

Eine besondere Rolle unter den Block-Copolymeren nehmen die amphiphilen Block-Copolymere ein. Hierzu zählen Copolymere, die Blöcke mit hydrophilen und Blöcke mit hydrophoben Bereichen aufweisen. Nur diese Art der Block-Copolymere ist in der Lage Polymersomen durch spontane Selbstassemblierung zu bilden. Durch die Variation der Chemie der Polymere (Modifikation der Länge und Abfolge der Blöcke) und der Art der eingesetzten Monomereinheiten, ist die gezielte Einstellung der Eigenschaften des Block-Copolymers realisierbar (Schrage, 2002).

In den vergangenen Jahren wurden aus einer Vielzahl an verschiedenen Block-Copolymeren Polymersomen gebildet. Ein knapper, bei weitem nicht vollständiger Überblick über häufig verwendete hydrophile und hydrophobe Blöcke ist in Tabelle 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1: Polymere die häufig als hydrophober oder hydrophiler Block in amphiphilen Block-Copolymeren verwendet werden und deren Abkürzungen.

Hydrophobe Blöcke		Hydrophile Blöcke	
PCL	Poly(caprolacton)	PEG	Poly(ethylenglycol)
PB	Poly(butadien)	PEO	Poly(ethylenoxid)
PPO	Poly(propylenoxid)	PGA	Poly(L-glutaminsäure)
PI	Poly(isopren)	PIAT	Polyisocyanoalanin(2-thiophen-3-yl-ethyl)amid
PEE	Poly(ethylethylen)	PMAA	Poly(methacrylsäure)
PPS	Poly(propylensulfid)	PMOXA	Poly(methyloxazolin)
PDMS	Poly(dimethylsiloxan)	PSS	Poly(styrolsulfonat)
PLA	Poly(lactat)		
PS	Poly(styrol)		
P2VP	Poly(2-vinylpyridin)		

Als Baustein für die Herstellung von Polymersomen, die als Nanoreaktoren für enzymatische Umsetzungen dienen sollen, eignet sich besonders das amphiphile Triblock-Copolymer (PMOXA-PDMS-PMOXA), Abbildung 3.3, da in dieses Polymer bereits zahlreiche Proteine integriert werden konnten (Kapitel 3.1.1).

Der mittlere hydrophobe PDMS-Block stellt eine chemisch nahezu inerte Einheit dar und findet dank seiner Biokompatibilität auch in der Medizin häufig Verwendung (Yilgor *et al.*, 1989). PDMS ist praktisch unlöslich in Wasser (Desai und Hubbell, 1991), bei Raumtemperatur flüssig und zählt zur Gruppe der Silikone. Die sehr niedrige Glasübergangstemperatur von -123 °C (Prinos und Panayiotou, 1995) und nicht vorhandene sterische Hinderungen im Molekül führen zu sehr hoher Flexibilität der Polymerkette, was vorteilhaft bei der Inserierung von Membranproteinen sein kann.

Das Polymer der äußeren Blöcke, PMOXA, zählt zu den Oxazolinen. Es ist wegen seines leicht basischen Charakters gut wasserlöslich. Je nach Substituent am C2-Atom können makromolekulare Eigenschaften, wie die Hydrophilie, gesteuert werden. Die Polymerklasse gilt als Pseudopeptid und ist im Regelfall biologisch abbaubar. PMOXA als Außenblock bietet neben dem notwendigen hydrophilen Charakter auch die Vorteile geringer Toxizität und niedriger unspezifischer Proteinbindekapazitäten (Desai und Hubbell, 1991; Woodle *et al.*, 1994; Broz *et al.*, 2005).

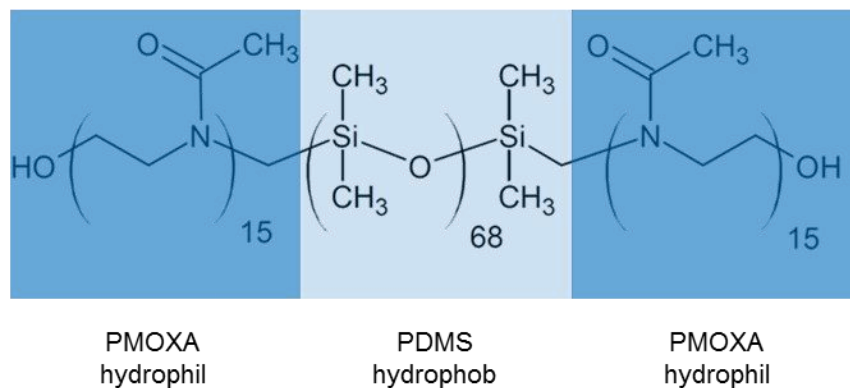


Abbildung 3.3: Amphiphiles Poly(2-methyloxazolin)-poly(dimethylsiloxan)-poly(2-methyloxazolin), kurz PMOXA-PDMS-PMOXA, Triblock-Copolymer.

PMOXA-PDMS-PMOXA wurde erstmalig aufgrund seiner Biokompatibilität und seiner niedrigen Proteinbindekapazitäten als Material für Kontaktlinsen von Ciba-Vision® hergestellt (Grumelard, 2004).

Selbstorganisation in wässriger Phase

In der Natur gibt es einige prominente Beispiele für das Prinzip der Selbstassemblierung. Darunter fallen beispielsweise die Faltung von Proteinen oder die Bildung von Lipiddoppelschichten. Das Phänomen der spontanen Bildung definierter, ausgerichteter Strukturen, getrieben durch die Existenz nicht kovalenter Kräfte, wird Selbstorganisation genannt. Selbstorganisation ist das Ergebnis einer Lokalisierung beziehungsweise Anordnung von Molekülen auf einem begrenzten Bereich, wodurch die Zahl der möglichen Anordnungen des Gesamtsystems verringert wird. Ein System, das dem Prinzip der Selbstorganisation folgt, unterliegt demnach einem Entropieverlust. Im Gegensatz zu binären Mischungen von Molekülen mit niedriger molarer Masse ist die Mischungsentropie für unterschiedliche Polymere relativ gering. Sie hängt umgekehrt proportional von der molaren Masse und damit auch vom Polymerisationsgrad des Polymers ab (Bates und Fredrickson, 1999).

Die Grundlage für die Entstehung eines geordneten Systems bilden repulsive und attraktive Wechselwirkungen zwischen einzelnen Bereichen auf molekularer Ebene. Aufgrund repulsiver Kräfte mit relativ langer Reichweite sind einzelne Bereiche des Systems bestrebt sich voneinander zu entfernen. Existieren keine entgegenwirkenden, attraktiven Kräfte, so führt dies zur makroskopischen Phasentrennung, also zur Segregation der Bereiche. Durch attraktive Kräfte mit kürzerer Reichweite, die innerhalb des Moleküls durch Bindungen aufgebaut werden, können sich die abstoßenden Bereiche nicht beliebig weit voneinander entfernen. Die Einnahme geeigneter geometrischer Anordnungen der sich abstoßenden Bereiche bewirkt die Minimierung von Kontaktstellen zwischen selbigen. Das Gesamtsystem wird so in ein stabiles, energetisches Minimum geführt. Die Bildung kolloidaler Strukturen erfolgt oberhalb der kritischen Konzentration zur Bildung von Aggregaten (CAC) (Yu *et al.*, 1998; Schrage, 2002; Kita-Tokarczyk *et al.*, 2005).

Das einfachste Beispiel der Mikrophasentrennung ist die Bildung von Mizellen. Mizellierung tritt nicht nur bei niedermolekularen Tensiden, sondern auch bei amphiphilen Block-Copolymeren in selektiven Lösemitteln auf. Dabei stellt Wasser das selektive Lösemittel für den hydrophilen Teil des Polymers dar. Für den hydrophoben Teil ist es ein schlechtes Lösemittel oder gar ein Fällungsmittel. Der wasserunlösliche, hydrophobe Bereich des amphiphilen Block-Copolymers ist bestrebt seine Kontaktstellen zum Wasser zu minimieren. Er bildet daher den Kern der Mizelle. Der hydrophile Block bildet die Hülle der Mizelle, wo er in Kontakt mit Wasser solvatisiert vorliegt. Die Aggregationszahl N_{Agg} gibt dabei an, aus wie vielen einzelnen Polymerketten das Kolloid besteht. Sie entspricht dem Verhältnis aus der molaren Masse des Aggregats $M_{Aggregat}$ und der molaren Masse des Polymers $M_{W,P}$:

$$N_{Agg} = \frac{M_{W,Agg}}{M_{W,P}} \quad (3.4)$$

N_{Agg}	Aggregationszahl	-
$M_{W,Agg}$	Molare Masse des Aggregats	g mol^{-1}
$M_{W,P}$	Molare Masse des Polymers	g mol^{-1}

Amphiphile Block-Copolymere und niedermolekulare Tenside weisen in vielerlei Hinsicht Ähnlichkeiten auf. Dabei können Tenside in wässriger Lösung nicht nur Mizellen bilden, sondern zu vielen weiteren Morphologien aggregieren. Abhängig vom Packungsparameter p können Vorhersagen über die entstehende Aggregatstruktur getroffen werden. Dabei stellt p das Verhältnis aus dem Volumen des Tensids V_{Tensid} zum Produkt aus dem mittleren

Flächenbedarf seiner hydrophilen Kopfgruppe A_{Kopf} und der Konturlänge der hydrophoben Kette l_{Kette} dar (Israelachvili *et al.*, 1976):

$$p = \frac{V_{Tensid}}{A_{Kopf} \cdot l_{Kette}} \quad (3.5)$$

p	Packungsparameter	-
V_{Tensid}	Volumen des Tensids	nm ³
A_{Kopf}	Fläche der hydrophilen Kopfgruppe	nm ²
l_{Kette}	Konturlänge der hydrophoben Kette	nm

Über dem Packungsparameter p können die resultierenden geometrischen Strukturen, wie in Tabelle 3-2 zusammengefasst, dargestellt werden.

Tabelle 3-2: Aggregatstruktur in Abhängigkeit des Packungsparameters p .

p	Molekülgeometrie	Aggregationsstruktur
$\frac{1}{3}$	Spitzer Kegel	Sphärische Mizelle
$\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$	Stumpfer Kegel	Zylindrische Mizelle
$\frac{1}{2}$ bis 1	Stumpfer Kegel	Vesikel, gekrümmte Doppelschicht
1	Zylinder	Planare Doppelschicht

Neben dem Einfluss der Eigenschaften der wässrigen Phase (beispielsweise Ionenkonzentration, Temperatur, pH) auf die Art der gebildeten Morphologie (Soo und Eisenberg, 2004) kann die entstehende Struktur vor allem auch durch die Chemie des Polymers (Art der verwendeten Blöcke, Länge des Polymers) beeinflusst werden. So werden bei einem hydrophilen Massenanteil von 25-40 % Vesikel, bei 40-50 % Wurmmizellen und bei einem hydrophilen Massenanteil von > 50 % sphärische Mizellen gebildet (Discher und Ahmed, 2006). Dabei wird der Prozess der Vesikelbildung, dessen Phänomen noch nicht in Gänze geklärt ist (Thiele *et al.*, 2010a), prinzipiell als zweistufiger Prozess angesehen (Antonietti und Forster, 2003). Es werden zwei grundlegende Mechanismen, die auf theoretischen und experimentellen Untersuchungen basieren, unterschieden (Du und O'Reilly, 2009): **Mechanismus 1** beschreibt die schnelle Bildung von sphärischen Mizellen in der wässrigen Phase im ersten Schritt. Daran schließt sich im zweiten Schritt die vergleichsweise langsame Koaleszenz der Mizellen zu größeren, zylinderförmigen oder scheibenförmigen Mizellen an. Diese intermediären Morphologien transformieren abschließend zu Vesikeln. Die

treibende Kraft ist dabei stets das Bestreben, die Oberflächenspannung zu reduzieren und eine energetisch stabile Konformation einzunehmen (Marrink und Mark, 2003; Uneyama, 2007; Rank *et al.*, 2009). **Mechanismus 2** der Vesikelbildung wurde für Polymersomen aus amphiphilen Diblock-Copolymeren beschrieben. Auch hier ist der erste Schritt die sehr schnelle Bildung von sphärischen Mizellen in der wässrigen Phase. Durch einen Kondensations-Prozess werden weitere Polymermoleküle im Inneren der Mizelle aufgenommen. Dadurch entstehen größere sphärische Bilayer-Mizellen. Diese sogenannten Semivesikel nehmen anschließend Moleküle der wässrigen Phase in ihrem Inneren auf, was zur Bildung der energetisch stabilen Vesikel führt (He und Schmid, 2006b; He und Schmid, 2006a; Du und O'Reilly, 2009).

Die Anordnung von amphiphilen Di- oder Triblock-Copolymeren in der Membran eines Polymervesikels kann unterschiedlich organisiert sein. Die Konformationen der Polymerketten können grundlegend in I-förmige oder U-förmige unterschieden werden. Je nachdem ob ein amphiphiles Di- oder Triblock-Copolymer verwendet wird und in Abhängigkeit von seiner Anordnung in der Membran, können sich dabei Bi- oder Monolayer ausbilden. Eine Membran kann auch durch Verzahnung von Diblock-Copolymeren entstehen (Battaglia und Ryan, 2005), wie in Abbildung 3.4 dargestellt. Die Einnahme der U-Konformation von Triblock-Copolymeren thermodynamisch bevorzugt (Wang *et al.*, 1992; NguyenMisra *et al.*, 1996).

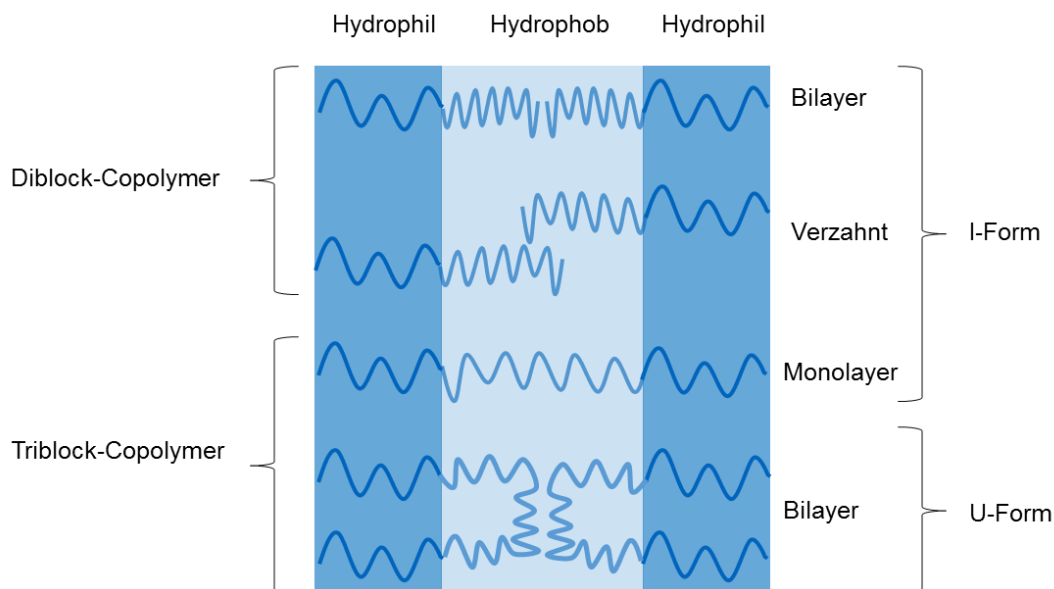


Abbildung 3.4: Anordnungsmöglichkeiten von amphiphilen Di- oder Triblock-Copolymeren in der Membran eines Polymervesikels. Die Polymere können I- oder U-förmige Konformationen einnehmen und dabei eine Mono- oder Bilayer-Membran oder eine verzahnte Membran bilden.

3.1.3 Herstellung

Alle Methoden, die für die Herstellung von Liposomen Verwendung finden, können auch für die Produktion von Polymervesikeln verwendet werden. Dabei werden lösemittelfreie Herstellungsmethoden und Methoden, die die Anwesenheit von Lösemitteln erfordern, unterschieden. Im Allgemeinen ist für die Herstellung von Vesikeln ein Energieeintrag in Form von Schütteln, Rühren oder Sonifizieren notwendig (Farquhar *et al.*, 1996).

Lösemittelfreie Methoden

Lösemittelfreie Methoden sind insbesondere dann von Interesse, wenn Lösemittelrückstände in der fertigen Polymersomendispersion bei der eigentlichen Anwendung zu Problemen führen können. Dies ist insbesondere in Hinblick auf die Toxizität bestimmter Lösemittel im biologischen oder medizinischen Anwendungsbereich relevant. Außerdem können Lösemittelrückstände zu erhöhter Membranfluidität und dadurch zu verringerter Polymersomenstabilität (Kapitel 3.1.2) oder zu unerwünschter Bildung von Aggregaten führen (Meng *et al.*, 2003).

Zu den lösemittelfreien Methoden zählen die Methode der direkten Dispersion, die Filmrehydrierung und die Elektroformation. Bei der direkten Dispersion wird das Polymer als pulverförmiger Feststoff direkt in der wässrigen Phase dispergiert beziehungsweise hydriert. Um über dieses Verfahren Polymersomen bilden zu können, ist langes und starkes Rühren notwendig (Kukula *et al.*, 2002; Ahmed und Discher, 2004). Bei der Filmrehydrierung wird das Polymer zunächst in einem geeigneten Lösemittel gelöst. Anschließend wird, zumeist unter Verwendung eines Rotationsverdampfers, das Lösemittel verdampft, so dass ein dünner Polymerfilm zurück bleibt. Durch Zugabe einer wässrigen Phase diffundiert Wasser in die Polymerschicht, was das Aufquellen derselben zur Folge hat. Dabei wird die Bildung der Vesikel entscheidend vom Diffusionsprozess des Wassers beeinflusst (Battaglia *et al.*, 2006). Oberhalb der Phasenübergangstemperatur des Polymers entsteht so bei mechanischem Energieeintrag, wie beispielsweise durch Rühren, eine Polymersomendispersion. Diese Dispersion weist meist eine hohe Dispersität, also eine breite Partikelgrößenverteilung, mit relativ kleinen multilamellaren Vesikeln auf (Kita-Tokarczyk *et al.*, 2005). Ein weiterer verfahrenstechnischer Schritt zur Verringerung der Dispersität und der Lamellarität ist daher häufig unumgänglich. Die Elektroformation ist das Mittel der Wahl, wenn unilamellare Riesenvesikel (GUVs) im Mikrometerbereich mit verhältnismäßig homogener Partikelgrößenverteilung hergestellt werden sollen. Ein vollständiger Umsatz des Polymers und hohe Ausbeuten werden mit Hilfe dieser Methode allerdings nicht erreicht (Kita-Tokarczyk *et al.*, 2005). Durch Aufsprühen einer Polymerlösung auf Elektroden wird ein dünner

Polymerfilm erzeugt. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wird die Hydrierung des Polymerfilms nach Zugabe der wässrigen Lösung erleichtert (Angelova *et al.*, 1992).

Lösemittelhaltige Methoden

Wird das Polymer zur Herstellung von Polymersomen zunächst in einem adäquaten Lösemittel, wie beispielsweise Ethanol, Chloroform oder Tetrahydrofuran, gelöst, handelt es sich um lösemittelhaltige Methoden. Dabei wird die Polymerlösung unter meist starkem Rühren zu der wässrigen Phase getropft. Vorteilhaft an dieser Methode ist die einfache und verhältnismäßig schnelle Herstellung der Polymersomen. Allerdings entstehen hierbei meist Vesikel mit einer sehr breiten Partikelgrößenverteilung (Nardin *et al.*, 2000a). Soll das Lösemittel anschließend vollständig aus dem Reaktionsansatz entfernt werden, sind weitere verfahrenstechnische Schritte notwendig. Möglich sind Dialyse oder Evaporation des Lösemittels bei Raumtemperatur und unterhalb des atmosphärischen Drucks. Die wirklich vollständige Entfernung des Lösemittels kann dabei allerdings nicht gewährleistet werden (Kita-Tokarczyk *et al.*, 2005). Eine Alternative der Lösemittelmethode stellt die sogenannte *reverse-phase* Methode dar. Hierbei wird die wässrige Phase zur Polymerlösung titriert. Anschließend wird auch bei dieser Methode, die sowohl zu kleinen unilamellaren Vesikeln (SUVs) als auch unilamellaren Riesenvesikeln (GUVs) führen kann, die Dispersion unter reduziertem Druck zur Evaporation des Lösemittels gerührt.

Postpräparative Methoden

Die meisten Herstellungsmethoden von Polymersomen führen zu breiten Partikelgrößenverteilungen. Um Polymersomen mit homogener Größe herzustellen, sind daher oft postpräparative Prozessschritte nötig. Häufig werden die Polymersomendispersionen sonifiziert (Kita-Tokarczyk *et al.*, 2005) oder gezielten Frier-Tau-Zyklen unterzogen (Napoli *et al.*, 2004a; Rank, 2007; Rank *et al.*, 2009). Die wahrscheinlich häufigste Methode zur Verringerung der Dispersität und der Vesikelgröße ist die Extrusion.

Durch die Extrusion können sehr breite Partikelgrößenverteilungen verschmälert werden, indem die Vesikel durch Membranen mit zylinderförmigen Poren mit definierter Größe gepresst werden. Sehr häufig finden dabei Membranen aus Polycarbonat (PC) Verwendung. Wie in Abbildung 3.5 dargestellt, werden die Vesikel durch die aufgebrachte Druckkraft in die Poren der Membran gepresst. Die dort wirkenden Scherkräfte führen zur Ruptur der Vesikelmembran. Beim Verlassen der Poren reformieren sich die Membranteile zu Vesikeln, die in etwa den Durchmesser der Pore aufweisen.

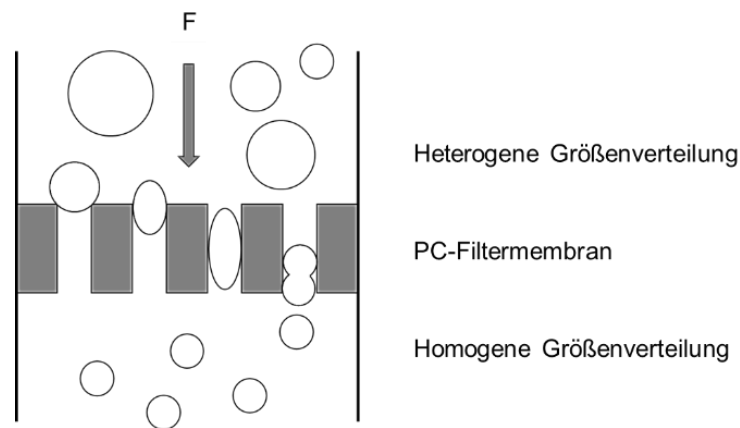


Abbildung 3.5: Funktionsweise der Extrusion: Durch Aufbringen der Kraft F werden die Vesikel mit heterogener Größenverteilung durch eine Polycarbonat-(PC)-Filtermembran mit definierter Porengröße gepresst. Nach Verlassen der Membran entspricht die mittlere Vesikelgröße in etwa dem Durchmesser der Membranporen.

3.1.4 Stabilität

Die Stabilität von Polymervesikeln kann in chemische und physikalische Stabilität unterteilt werden. Dabei ist die chemische Stabilität von der Existenz oxidierbarer Doppelbindungen oder hydrolysierbarer Bindungen im verwendeten Polymer abhängig. Ziel sind in jedem Fall die Vermeidung von unerwünschten Größenveränderungen, Aggregation oder Fusion der Vesikel sowie die nicht induzierte Freisetzung von im Vesikelinneren eingeschlossener Beladung. Die Stabilität der Polymersomen hängt allgemein stark von der Art und dem Aufbau des verwendeten Polymers ab (Soo und Eisenberg, 2004).

Grundlegend beruhen sehr viele Eigenschaften der Polymersomen nicht nur auf der Art des verwendeten Polymers, sondern auch auf der Stärke der Polymermembran. Es wurde sowohl theoretisch (Srinivas *et al.*, 2004) als auch experimentell (Bermudez *et al.*, 2002) gezeigt, dass die Membranstärke s proportional zur molaren Masse des verwendeten Polymers $M_{W,P}$ ist. Für den Proportionalitätsfaktor b wurde ein Wert von 0,55 identifiziert (Discher und Ahmed, 2006):

$$s \sim M_{W,P}^b \quad (3.6)$$

s	Membranstärke	m
$M_{W,P}$	Molare Masse des Polymers	g mol^{-1}
b	Proportionalitätsfaktor	-

Mit zunehmender Membranstärke s steigt auch die Stabilität der Membran. Für die chemische Stabilität von Polymersomen aus Poly(butadien)-poly(ethylenglycol) (PB-PEG) gegenüber

dem nicht-ionischen Lyosedetergenz Triton X-100 wurde beispielsweise ein linearer Zusammenhang mit der Membranstärke angegeben (Pata *et al.*, 2004). Zudem ist die Viskosität von Polymersomenmembranen aus diesem Polymer um den Faktor 500 höher als die herkömmlicher Lipidmembranen (Dimova *et al.*, 2002). Die Viskosität hat ihrerseits Einfluss auf die Membranfluidität, die mit steigender molarer Masse abnimmt (Lee *et al.*, 2002). Dies erklärt auch die mit zunehmender molarer Masse steigende Stabilität der Polymersomen (Bermudez *et al.*, 2002) und die damit einhergehende Abnahme der Permeabilität (Bermúdez *et al.*, 2004).

Zusammenfassend gilt für Polymersomen, dass mit steigender molarer Masse des Polymers die Stabilität der Polymersomenmembran steigt, wohingegen die Membranfluidität und die Membranpermeabilität abnimmt, wie in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt ist (Discher und Eisenberg, 2002).

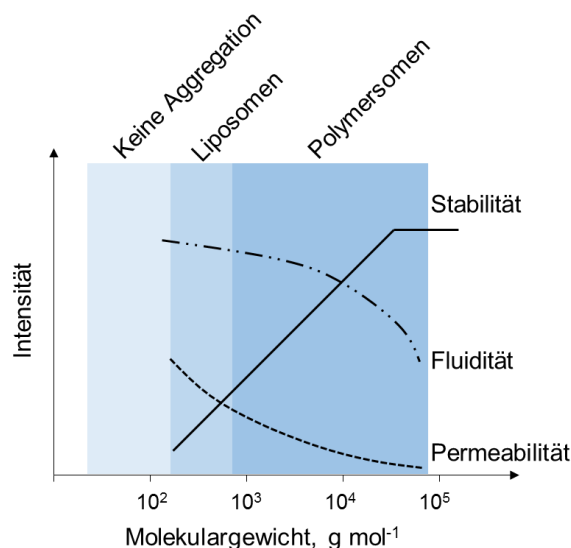


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Membraneigenschaften in Abhängigkeit von der molaren Masse der amphiphilen Monomere. Nach (Discher und Eisenberg, 2002).

Da die Löslichkeit der verwendeten Polymere in wässriger Umgebung im Allgemeinen sehr niedrig ist, assoziieren sie bereits bei sehr geringer Konzentration, was wiederum die sehr niedrige kritische Aggregationszahl (*critical aggregation number*, CAC) bedingt. So wurden für die CAC unter der Verwendung von Poly(propylensulfid)-poly(ethylenglycol) (PPS-PEG) Werte von nur 10⁻⁷ M publiziert (Napoli *et al.*, 2004b). Die Stabilität von Polymervesikeln kann außerdem postpräparativ durch Quervernetzung der Polymere deutlich erhöht werden. Die Quervernetzung ist sowohl im hydrophilen Teil des Polymers (Nardin *et al.*, 2000a) als auch im hydrophoben Bereich (Discher *et al.*, 2002), oder aber durch die Bildung interpenetrierender Polymernetzwerke (Li *et al.*, 2007) möglich.

3.2 Charakterisierung von Polymervesikeln

Da Polymersomen aufgrund ihrer Größe zur Gruppe der Kolloide zählen, können alle in der Kolloidwissenschaft angewendeten Methoden auch zur Untersuchung von Polymersomen herangezogen werden. Die Methoden können dabei in bildgebende Verfahren, wie die Mikroskopie, und in Methoden der Lichtstreuung unterteilt werden.

3.2.1 Lichtstreuung

Methoden der Lichtstreuung liefern wichtige Informationen bezüglich der Strukturaufklärung von Teilchen in einer Dispersion. Strahlung, die auf ein Teilchen trifft, wird von diesem gestreut. Die Intensität der Streuung ist von der Wellenlänge des Lichtes λ , von der Größe des streuenden Teilchens d_T und dem Streuwinkel θ abhängig. Dabei kann je nach Verhältnis von Wellenlänge zu Teilchengröße Rayleigh-, Debye-, Mie- oder Fraunhofer-Streuung unterschieden werden. Wenn die Teilchen deutlich kleiner als die Wellenlänge des auf sie treffenden Lichtes sind ($d_T < \frac{\lambda}{10}$), gilt das Gesetz der Rayleigh-Streuung.

$$I = \frac{I_0}{R^2} \cdot \frac{1 + \cos^2\theta}{2} \cdot \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \left(\frac{BI^2 - 1}{BI^2 + 2}\right)^2 \left(\frac{d_p}{2}\right)^6 \quad (3.7)$$

I	Intensität des gestreuten Lichtes	-
I_0	Intensität der Lichtquelle	-
R	Abstand zum streuenden Teilchen	m
θ	Winkel der Streulichtmessung	°
λ	Wellenlänge des Lichtes	m
BI	Brechungsindex	-
d_p	Partikeldurchmesser	m

Die Rayleigh-Approximation besagt, dass kleine Teilchen das auf sie treffende Licht in alle Richtungen isotrop, also intensitätsgleich und damit winkelunabhängig streuen (Young, 1981). Dabei hängt die Intensität von der sechsten Potenz des Teilchendurchmessers ab. Dies bedeutet, dass ein Partikel dessen Durchmesser um den Faktor zehn größer ist als der eines Vergleichspartikels, das Licht eine Million Mal intensiver streut als das kleinere Teilchen. Dieser Zusammenhang ist in einer anzahlbasierten (Abbildung 3.7 A) und einer intensitätsbasierten (Abbildung 3.7 B) Partikelgrößenverteilung von zwei Teilchen mit dem Durchmesser 5 nm beziehungsweise 50 nm gezeigt. Während in der anzahlbasierten Verteilung beide Teilchen gleich gewichtet sind, kommt das größere Teilchen in der

intensitätsbasierten Verteilung aufgrund der Rayleigh-Streuung mit sechsfacher Gewichtung zum Tragen.

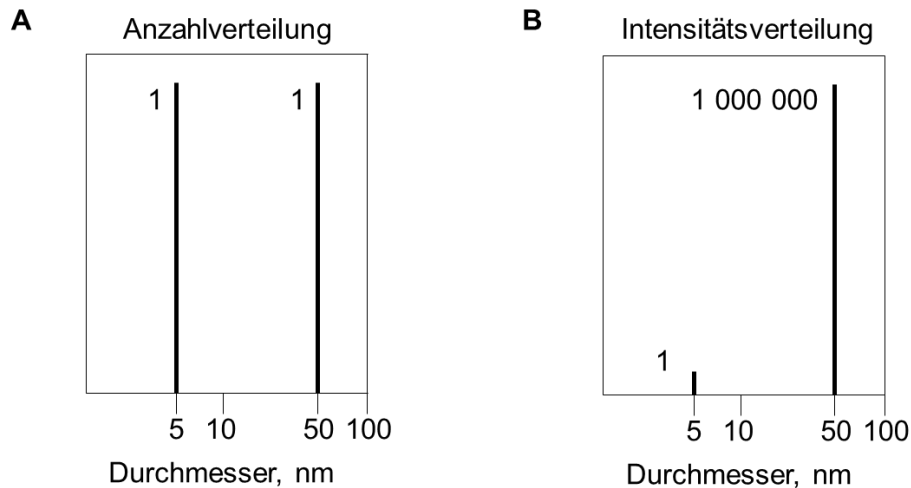


Abbildung 3.7: A) In der anzahlbasierten Partikelgrößenverteilung ist die Gewichtung unabhängig vom Durchmesser der Partikel. B) Aufgrund der Rayleigh-Streuung ist die Intensität des gestreuten Lichtes mit Faktor sechs vom Teilchendurchmesser abhängig. Nach (Malvern, 2013).

Die Lichtstreuung kann in statische (elastische) Lichtstreuung und in dynamische (quasielastische) Lichtstreuung unterteilt werden. Hierbei wird die zu untersuchende Dispersion in beiden Fällen mit einer gebündelten, einfarbigen, kohärenten Lichtquelle durchstrahlt. Verwendet wird hierfür ein Laser mit einer einzelnen Wellenlänge im Vakuum λ .

Statische Lichtstreuung

Die Messung der statischen Lichtstreuung (SLS) ermöglicht die winkelabhängige Detektion des gestreuten Lichtes im räumlichen und zeitlichen Mittel. SLS-Messungen ermöglichen die Strukturaufklärung dispergierter Partikel. Bei Messung einer Dispersion mit unterschiedlichen Konzentrationen c und bei unterschiedlichen Winkeln θ ist durch Extrapolation gegen $c \rightarrow 0$ und $\theta \rightarrow 0$ über den sogenannten Zimm-Plott die Bestimmung der molaren Masse M_W der Partikel möglich. Zudem wird auch der sogenannte zweite Virialkoeffizient A_2 , der Auskunft über die Wechselwirkung von Partikel und Dispersionsmittel gibt sowie der hydrodynamische Partikelradius R_H und der Gyrationradius R_G bestimmt.

Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS), auch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) oder quasielastische Lichtstreuung (QELS) genannt, wird für die Untersuchung der Teilchengröße und der Breite der Partikelgrößenverteilung der Teilchen in einer Dispersion herangezogen. Sedimentationseffekte müssen dabei ausgeschlossen werden können. Das durch die

dispergierten Teilchen gestreute Licht wird durchgehend in einem Winkel θ , meist 90° , gemessen. Dabei werden die Intensitätsschwankungen der Streustrahlung als Funktion der Zeit detektiert (Koppel, 1972; Thomas, 1987).

Die Grundlage der DLS-Messung ist der aus der Akustik bekannte Doppler-Effekt. Bewegt sich eine Schall- oder Lichtwellen aussendende Quelle mit einer bestimmten Geschwindigkeit relativ zum Beobachter, so erleidet die Welle beim Beobachter eine Frequenzverschiebung $w' = w \pm w_0$, wobei w der vom Beobachter gemessenen Frequenz, und w_0 der von der Quelle ausgesandten Frequenz entspricht (Qingchong, 1999). Der rotierenden, translatierenden und schwingenden Bewegung aller Moleküle in der zu untersuchenden Dispersion liegt die Brown'sche Molekularbewegung zugrunde. Sie besagt, dass alle Teilchen oberhalb des absoluten Temperaturnullpunktes umso schneller in Bewegung sind, je höher die Temperatur ist, und je kleiner die Teilchen sind (Einstein, 1905; von Smoluchowski, 1906). Demnach ist der bei der DLS-Messung gemessene Diffusionskoeffizient bei konstanter Temperatur umso kleiner, je größer die Teilchen sind und je langsamer sie sich daher bewegen. Die Bewegung der Teilchen führt folglich zur Fluktuation der Streuintensität $I(t)$. Demnach entsteht durch die Lichtstreuung ein Frequenzspektrum das gegenüber der Frequenz des Primärlichtes verschoben ist. Bei diesem Spektrum handelt es sich um das optische Doppler-Shift-Spektrum, das aus einer Summe von Lorentz-Funktionen besteht. Der Betrag des resultierenden Wellen- beziehungsweise Streulichtvektors q ist für einen fest installierten Laser und eine feste Apparateanordnung konstant und über den Brechungsindex des Dispersionsmittels BI_{Disp} zugänglich.

$$q = \frac{4\pi BI_{Disp}}{\lambda} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (3.8)$$

q	Wellenvektor	m^{-1}
BI_{Disp}	Brechungsindex des Dispersionsmittels	-
λ	Wellenlänge des Lasers in Vakuum	m
θ	Winkel der Streulichtmessung	°

Das Doppler-Shift-Spektrum könnte experimentell mit einem Interferometer bestimmt werden, wobei man jedoch auf experimentelle Schwierigkeiten stieße. Grund hierfür sind die sich im Vergleich zur Lichtgeschwindigkeit sehr langsam bewegenden Teilchen. Die hervorgerufene Frequenzverschiebung ist mit circa 10-1000 Hz sehr gering im Vergleich zur Frequenz des Lasers mit in etwa $5 \cdot 10^{14}$ Hz. So zieht man bei der DLS-Messung nicht das Frequenzspektrum heran, sondern bedient sich der entsprechenden Funktion im Zeitraum. Dabei besagt das

Wiener-Chintschin-Theorem, dass es zu einer Intensitätsverteilung im Frequenzraum eine Fourier-transformierte Funktion im reziproken Zeitraum geben muss (Wiener, 1949). Dieser Zusammenhang zwischen Frequenz- und Zeitdomäne t verknüpft das Frequenzspektrum mit der Feld-Autokorrelationsfunktion $g_1(q, t)$. Experimentell wird die Zeitanalyse in einem Korrelator durchgeführt, der die Intensitäts-Autokorrelationsfunktion der Streulichtintensität $g_2(q, t)$ berechnet. Dabei bezieht sich das Symbol $\langle \dots \rangle$ auf den Mittelwert der Produkte.

$$g_2(q, t) = \frac{\langle I(t_0) \cdot I(t_0 + t) \rangle}{\langle I(t_0) \rangle^2} \quad (3.9)$$

$g_2(q, t)$	Intensitäts-Autokorrelationsfunktion	
I	Intensität des gestreuten Lichtes	-
t_0	Frei wählbare Anfangszeit	s
t	Zeit	s

Die Intensitäts-Autokorrelationsfunktion $g_2(q, t)$ und die Feld-Autokorrelationsfunktion $g_1(q, t)$ stehen über die Siegert-Korrelation (Voigt und Hess, 1994) zusammen mit einem laserabhängigen Parameter β zueinander in Relation.

$$g_2(q, t) = 1 + \beta [g_1(q, t)]^2 \quad (3.10)$$

$g_1(q, t)$	Feld-Autokorrelationsfunktion	
β	Apparateabhängiger Parameter für Laser	-

Für monodisperse Teilchen ohne Wechselwirkung ist die Feld-Autokorrelationsfunktion $g_1(q, t)$ eine einzelne, abklingende Exponentialfunktion. Wobei sich die Abnahmerate aus dem Wellenvektor q und dem translatorischen Diffusionskoeffizienten D_{trans} der monodispersen Teilchen zusammen setzt.

$$g_1(q, t) = \exp(-q^2 D_{trans} t) \quad (3.11)$$

D_{trans}	Translatorischer Diffusionskoeffizient	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
-------------	--	----------------------------

Über die Stokes-Einstein-Relation kann der Diffusionskoeffizient D_{trans} mit dem hydrodynamischen Radius der Teilchen R_H in der Dispersion mit der dynamischen Viskosität des Dispersionsmittels η und bei der absoluten Temperatur T_0 in Verbindung gebracht werden.

k_B steht für die Boltzmann-Konstante ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ N m K}^{-1}$) (Einstein, 1905; von Smoluchowski, 1906).

$$R_h = \frac{k_B T_0}{6\pi\eta D_{trans}} \quad (3.12)$$

R_H	Hydrodynamischer Partikelradius	m
k_B	Boltzmannkonstante	N m K ⁻¹
T_0	Absolute Temperatur	K
η	Dynamische Viskosität	N s m ⁻²

Liegt ein polydisperses System vor, so ergibt sich $g_1(q, t)$ über die Definition der Wahrscheinlichkeitsfunktion $G(\Gamma)$, welche die Abklingrate Γ der Fluktuation bestimmt. Die Lösung des Problems ist in DIN ISO 13321:2004-10 festgelegt. Hierbei wird die Intensitäts-Autokorrelationsfunktion $g_2(q, t)$ für monodisperse Systeme als Exponentialfunktion dargestellt. Dabei entspricht A_0 der Basislinie mit $A_0 = \langle I \rangle^2$. B ist ein Gerätekoefizient, der als Achsenabschnitt der Autokorrelationsfunktion betrachtet werden kann.

$$g_2(q, t) = \frac{\langle I(t_0) \cdot I(t_0 + t) \rangle}{\langle I(t_0) \rangle^2} = A_0 [1 + B \exp(-2\Gamma t)] \quad (3.13)$$

A_0	Basislinie	-
B	Achsenabschnitt	-
Γ	Abklingrate	s ⁻¹

Dabei gilt für isotrope, kugelförmige Partikel $\Gamma = D_{trans} q^2$. Für polydisperse Systeme hingegen wird die Gleichung (3.13) erweitert zu:

$$g_2(q, t) = A_0 [1 + B g_1(q, t)^2] \quad (3.14)$$

Dabei verhält sich der Betrag der Feld-Autokorrelationsfunktion $g_1(q, t)$ zur normalisierten Verteilungsfunktion der Abklingrate $G(\Gamma)$ wie folgt:

$$g_1(q, t) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) \exp(-\Gamma t) d\Gamma \quad (3.15)$$

Die Verteilung der Abklingrate wird durch zwei Parameter beschrieben, nämlich der mittleren Abklingrate $\langle \Gamma \rangle$ und dem dimensionslosen Polydispersitätsindex $PDI = \frac{\mu_2}{\langle \Gamma \rangle^2}$, wobei μ_2 die Varianz darstellt. Für die Bestimmung des PDI und des harmonischen, über die Intensität gemittelten Teilchendurchmessers, das sogenannte $z - Mittel$, wird die Kumulantenanalyse herangezogen (Koppel, 1972; Frisken, 2001). Die Erweiterung des Terms $\exp(-\Gamma t)$ in Gleichung (3.15) um $\exp(-\langle \Gamma \rangle t)$ führt zu einem Polynom der Verzögerungszeit t . Durch Abbruch des Polynoms nach dem Term zweiter Ordnung kann Gleichung (3.14) approximiert werden:

$$g_2(q, t) = A_0 [1 + B \exp(-2\langle \Gamma \rangle t + \mu_2 t^2)] \quad (3.16)$$

$$\mu_2 \quad \text{Varianz} \quad \text{s}^{-2}$$

Diese Gleichung ist die Grundlage für die Bestimmung von der mittleren Abklingrate $\langle \Gamma \rangle$ und μ_2 , damit auch die Grundlage zur Bestimmung von $z - Mittel$ und PDI . Für die lineare Regression kann Gleichung (3.16) umgestellt werden:

$$y(t) = 0,5 \ln[g_2(q, t) - A_0] \cong \langle \Gamma \rangle t + \frac{\mu_2}{2} t^2 \underbrace{0,5 \ln A_0 B}_{a_0} - \underbrace{\langle \Gamma \rangle}_{a_1} t + \underbrace{0,5 \mu_2}_{a_2} t^2 \quad (3.17)$$

In vereinfachter Darstellung erhält man:

$$y(t) = a_0 - a_1 t + a_2 t^2 \quad (3.18)$$

$$a_0, a_1, a_2 \quad \text{Parameter, Polynom 2. Ordnung} \quad -$$

Für die Approximation von $y(t)$ in Gleichung (3.18) werden a_0 , a_1 und a_2 unter Anwendung der kleinsten Fehlerquadrate bestimmt. Aus a_0 kann der Wert des Ordinatenabschnitts der Autokorrelationsfunktion als Kriterium für die Qualität der Messung extrahiert werden. Das $z - Mittel$ hingegen, welches den harmonischen, intensitätsgemittelten Partikeldurchmesser darstellt, wird aus der initialen, negativen Steigung a_1 , die dem Diffusionskoeffizienten D_{trans} entspricht, wie folgt berechnet:

$$z - \text{Mittel} = \frac{1}{a_1} \cdot \frac{k_B T}{3\pi\eta} \cdot q^2 \quad (3.19)$$

$z - \text{Mittel}$ Intensitätsgemittelter Partikeldurchmesser m

Der Polydispersitätsindex ergibt sich aus a_1 und a_2 :

$$PDI = \frac{2a_2}{a_1^2} \quad (3.20)$$

PDI Polydispersitätsindex -

Mit Hilfe des sogenannten Kumulanten-Fits werden demnach ausschließlich der mittlere, intensitätsgemittelte Partikeldurchmesser und die Polydispersität der Verteilung bestimmt.

Die Partikelgrößenverteilung wird über sogenannte NNLS-Algorithmen bestimmt. NNLS steht für *non negative least square* und besagt, dass ausschließlich physikalisch sinnvolle Lösungen, also solche im positiven Zahlenraum, betrachtet werden. Einige Algorithmen, die in der Gruppe der NNLS-Algorithmen eingegliedert sind, sind CONTIN (*constrained regularization method for inverting data*) (Provencher, 1982b; Provencher, 1982a), Regularization, GP (*general purpose*) und MNM (*multiple narrow mode*) (Malvern, 2013).

3.2.2 Mikroskopie

Eine sehr wichtige Art der Charakterisierung von Polymersomen stellt die Visualisierung durch Mikroskopie dar. Hierbei können viele wichtige Aspekte wie Größe, Morphologie und Homogenität direkt abgebildet werden. Als Licht- oder Strahlungsquelle können sowohl Photonen als auch Elektronen dienen. Die Lichtmikroskopie hat den entscheidenden Vorteil, dass die Vesikel in ihrer natürlichen Umgebung, also in wässriger Phase untersucht werden können. Ein Nachteil dieser Methode jedoch ist die verhältnismäßig niedrige Auflösung. Eine deutlich höhere Auflösung ist durch die Elektronenmikroskopie gewährleistet. Hierfür muss die Vesikelprobe allerdings vorab getrocknet, gefärbt, und/oder gefroren werden. Die Probe unterliegt während der Messung zudem einem Hochvakuum. Neben der klassischen optischen Mikroskopie finden vor allem auch Fluoreszenzmikroskopie, Rasterkraftmikroskopie, oder Rasterelektronenmikroskopie Verwendung (Kita-Tokarczyk *et al.*, 2005). Die in der Vesikeltechnologie am häufigsten verwendete Art der Mikroskopie ist vermutlich die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).

Der Vorteil der Transmissionselektronenmikroskopie gegenüber der Lichtmikroskopie liegt in der deutlich höheren Auflösung. Der dichteste Abstand zweier Linien, die noch voneinander unterschieden werden können, hängt direkt proportional von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes ab. Bei Einsatz von sichtbarem Licht können daher nur Strukturen, die größer als 500 nm sind dargestellt werden. Bei der Elektronenmikroskopie hingegen werden Elektronenstrahlen, die in etwa 10^5 Mal kleinere Wellenlängen als die des sichtbaren Lichtes aufweisen, eingesetzt. Dadurch ist eine Auflösung bis ca. 2 nm möglich. Um während der Messung Interaktionen von Elektronen mit Molekülen der Luft zu vermeiden, erfolgt die Messung im Ultrahochvakuum. Folglich können Vesikel mittels dieser Methode nur nach vorhergehender Probentrocknung untersucht werden.

Eine deutlich höhere Auflösung des mikroskopischen Bildes kann durch sogenanntes negatives *Staining* (Englisch für Anfärben) erzeugt werden. Dabei wird die Probe während der Trocknung mit beispielsweise Uranylacetat, dem sogenannten *Stain*, überzogen. Auf diese Weise erscheint die Probe dunkler als der Hintergrund, wodurch eine schärfere optische Trennung ermöglicht wird.

Zur Untersuchung von wässrigen Proben ist die Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM) geeignet. Hierbei wird eine hauchdünne (~100 nm), schockgefrorene (-178 °C in flüssigem Ethan) Probe von Elektronen durchstrahlt, wodurch eine indirekte zweidimensionale Abbildung der Probe in nativem Zustand ermöglicht wird. Ein weiterer Vorteil der sich durch den extrem schnellen Zustandswechsel ergibt, ist die Unterdrückung möglicher osmotischer Effekte, die während der Probenvorbereitung auftreten, und die Struktur der ursprünglichen Probe verändern können (Kita-Tokarczyk *et al.*, 2005).

3.3 Stofftransport über Membranen

Folgendes Kapitel gibt einen Überblick über den Aufbau und die Funktion von Membranen sowie die Grundlagen des diffusiven Stofftransportes. Zudem wird kurz der Zusammenhang von Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient und Löslichkeit gegeben, bevor das Kapitel mit den wesentlichen Eigenschaften der pharmazeutischen Wirkstoffe Propranolol und Koffein, die für die passive Diffusion als Modellmolekül gewählt wurden, schließt.

3.3.1 Membranen

Aufbau

Die natürliche Zellmembran bildet die Trennschicht zwischen dem Zellinneren und der äußeren wässrigen Phase. Zudem stellt sie die Grenze zwischen Zellkompartimenten wie

Organellen und Vakuolen innerhalb der Zelle dar und grenzt diese von der äußeren, wässrigen Umgebung, dem Zytoplasma, ab. Neben der Separierung der beiden wässrigen Phasen stellt der selektive Stofftransport zwischen beiden Membranseiten eine weitere Schlüsselaufgabe der Biomembran dar. Die Hauptbestandteile einer biologischen Membran sind Lipide, überwiegend Phospholipide. Ihre Fähigkeit Membranen zu bilden, resultiert aus ihrer amphiphilen Molekülstruktur. Bereits 1925 postulierten Gorter und Grendel die Theorie, dass die Zellmembran aus einer Lipiddoppelschicht aufgebaut sei, die eine stabile Abgrenzung zwischen den wässrigen Kompartimenten darstellt. Dabei werden die hydrophoben Schwänze des amphiphilen Phospholipids durch die Molekülanordnung gegen das Wasser abgeschirmt, wohingegen die hydrophilen Kopfgruppen zum Wasser hin ausgerichtet sind (Gorter und Grendel, 1925). Abbildung 3.8 zeigt den schematischen Aufbau der Lipiddoppelschicht aus amphiphilen Phospholipiden, exemplarisch 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC).

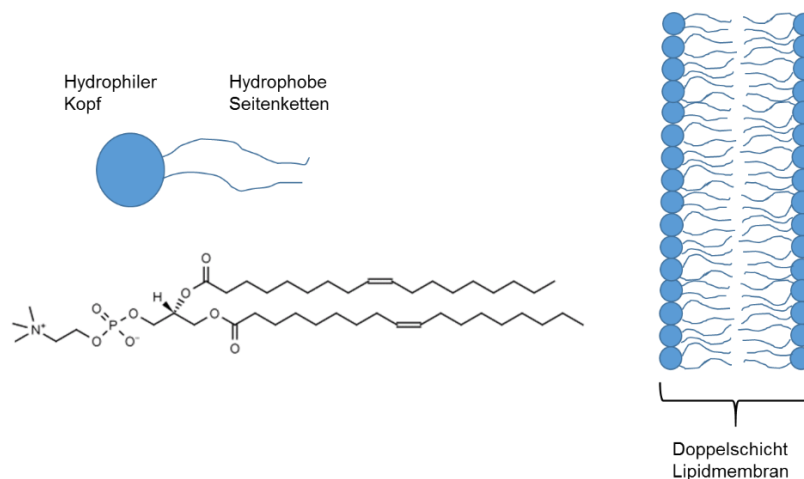


Abbildung 3.8: Aufbau einer Lipiddoppelschicht aus amphiphilen Lipiden. Exemplarisch ist das Phospholipid 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), dargestellt.

Eigenschaften

Eine Lipidmembran ist keine starre, unbewegliche Schicht, sondern wird überwiegend von hydrophoben Wechselwirkungen, die deutlich schwächer als kovalente Bindungen sind, fixiert. Der sogenannte Flip-Flop-Effekt, welcher die dreidimensionale Bewegung einzelner Lipidmoleküle durch Seitenwechsel der beiden Lipidschichten quer durch die Membran beschreibt, kommt nur selten vor, da der hydrophile Teil des Moleküls dabei den hydrophoben Bereich der Membran durchqueren muss. Die Fähigkeit der Membranschichten sich seitwärts zu bewegen wird als Membranfluidität bezeichnet. Hierdurch werden die Seitwärtsbewegung der Lipide sowie die konsekutive, laterale Bewegung beider Lipidschichten ermöglicht. Der hydrophobe Bereich der Phospholipide ist aus ungesättigten Fettsäuren aufgebaut. Die Doppelbindungen erzeugen dabei einen Knick in der Molekülstruktur, der die dichteste

Aneinanderlagerung der Lipide verhindert. Durch die resultierende erhöhte Bewegungsfreiheit der Moleküle wird die Fluidität, welche für die biologische Funktionalität der Membran ausschlaggebend ist, gesteigert. Bei abnehmender Temperatur bleibt die Fluidität der Membran zunächst erhalten, bis sie sich ab einem kritischen Wert gelartig verfestigt. Die kritische Temperatur hängt dabei von der Lipidzusammensetzung der Membran ab. Eine Verfestigung der Membran führt zu veränderten Membraneigenschaften, wie beispielsweise zu reduzierter Membranpermeabilität (Campbell, 1997; Castellana und Cremer, 2006).

Bildung artifizieller Membranen

Eine Möglichkeit die Eigenschaften der Membran zu untersuchen, stellen sogenannte schwarze Lipidmembranen (*black lipid membrane*, BLM) dar (Mueller *et al.*, 1962). Es handelt sich hierbei um artifizielle, planare Membranen, die hervorragend als Modellsystem eingesetzt werden können, um beispielsweise Stofftransportmechanismen der Membran zu analysieren. Die freistehende Membran wird in einem Loch eines hydrophoben Materials (beispielsweise Teflon) gebildet. Die entstehende, hauchdünne Schicht mit einer Ausdehnung von nur circa 4 nm kann dabei eine Fläche von mehreren Quadratmillimetern überspannen. Diese Methode bietet dabei auch die Möglichkeit die Funktionalität von in der Membran integrierten Membranproteinen zu untersuchen. Die Qualität der artifiziellen Membran kann durch Belichtung des dünnen Membranfilms und die mikroskopische Betrachtung der Reflektion des Lichtes erfolgen. Die Ausbildung der Doppelschicht der Membran führt zu einer veränderten Lichtbrechung an der Wasser-Lipid- beziehungsweise an der Lipid-Wasser-Grenzschicht. Dies kann mikroskopisch durch die Entstehung einer schwarzen Fläche beobachtet werden, welche namensgebend für die schwarzen Lipidmembranen ist (Winterhalter, 2000).

Eine Weiterentwicklung der Technologie der artifiziellen schwarzen Lipidmembranen beruht auf der Formierung der Doppelschicht in herkömmlichem Filtermaterial. Während beispielsweise Cellulose-Ester-, oder Teflon-Filter netzartige beziehungsweise unregelmäßige Strukturen aufweisen, haben Filter aus Polycarbonat zylinderförmige, den Filter durchspannende Poren. Thompson konnte 1982 zeigen, dass stabile Lipiddoppelschichten in Filterporen mit Durchmessern im Mikrometerbereich (*micro-black lipid membranes*) gebildet werden können. Die auf Strom-Spannungs-Messungen basierenden Ergebnisse zeigten, dass von der Ausbildung einer einzigen Lipiddoppelschicht pro Polycarbonat-Filterpore auszugehen ist (Thompson *et al.*, 1980; Thompson, 1982).

Polymermembranen

Amphiphile Block-Copolymere weisen ähnlich wie Lipide hydrophile und hydrophobe Teilbereiche auf. So gelang es Nardin im Jahr 2000 erstmals eine freistehende schwarze

Polymermembran aus dem Polymer PMOXA-PDMS-PMOXA zu bilden (Nardin *et al.*, 2000c). Dem experimentellen Vorbild der Herstellung von BLM folgend, wurde eine stabile Membran mit einer, im Vergleich zu Lipidmembranen, deutlich größeren Dicke von 10 nm und einer Fläche von 1 mm² gebildet. Zudem konnte gezeigt werden, dass Polymermembranen eine deutlich höhere Stabilität bei gleichzeitig niedrigerer Permeabilität aufweisen (Discher und Eisenberg, 2002). Die Insertion von Membranproteinen in funktioneller Form konnte ebenso nachgewiesen werden (Nardin *et al.*, 2000c; Gonzalez-Perez *et al.*, 2009).

3.3.2 Stofftransport

Passiver und aktiver Stofftransport

Moleküle in einer Flüssigkeit (oder auch in Gasen) besitzen eine kinetische Energie, die sogenannte ungeordnete Molekularbewegung beziehungsweise Brown'sche Molekularbewegung, die sich unter anderem in der Form der Diffusion äußert (Einstein, 1905). Dabei unterliegt das Gesamtsystem dem Bestreben alle Moleküle gleichmäßig über den zur Verfügung stehenden Raum zu verteilen. Die Diffusion ist ein Vorgang, bei dem keine Arbeit verrichtet werden muss, da die freie Energie des Systems sinkt. Bei der Diffusion einer Substanz vom Bereich höherer zum Bereich niedrigerer Konzentration, also entlang des Konzentrationsgradienten, erhöht sich die Entropie des Systems. Den Transport durch eine Membran entlang des treibenden Konzentrationsgefälles nennt man passiven Transport. Die passive Diffusion kann dabei durch bestimmte Membranproteine erleichtert erfolgen. Transportproteine ermöglichen insbesondere auch den Transport von Ionen und größeren hydrophilen Substanzen durch das hydrophobe Innere der Membran. Aber auch bei der erleichterten Diffusion folgt die Substanz ihrem Konzentrationsgefälle. Der Stofftransport eines Moleküls in Richtung höherer Konzentrationen erfordert Energie, die von der natürlichen Zelle aufgebracht werden muss. Diese Art des Stoffaustausches wird daher als aktiver Transport bezeichnet. Die Arbeit des aktiven Transportes wird ebenfalls von speziellen, in der Membran eingelagerten Proteinen geleistet (Campbell, 1997).

Fick'sche Diffusion und Membranpermeabilität

Beim Stofftransport über eine Membran entsteht ein Konzentrationsprofil, exemplarisch dargestellt in Abbildung 3.9. Der Index D steht für die Donorseite mit höherer Konzentration und A für die Akzeptorseite auf der konzentrationsärmeren Membranseite. Der Index M symbolisiert die Konzentration an der Außenseite der Membran.

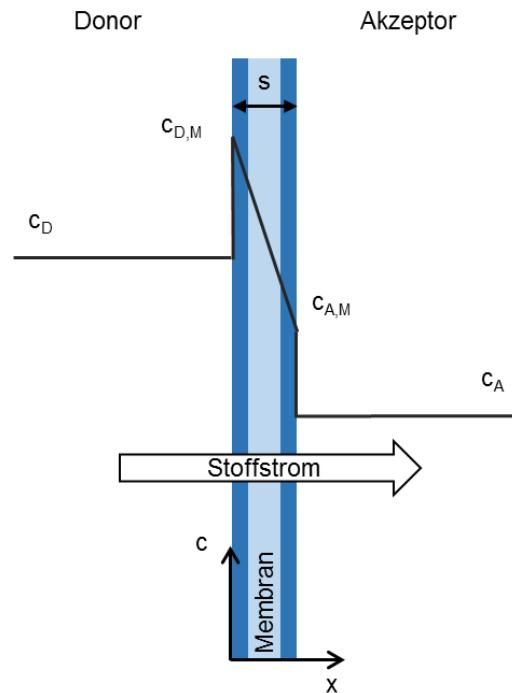


Abbildung 3.9: Konzentrationsverlauf über die Membran zwischen Donor- und Akzeptorseite. Der Gradient in der Membran wird als linear angenommen.

Zur Beschreibung des Stofftransportes über eine Membran wird die Stoffstromdichte J als die Stoffmenge definiert, die pro Zeiteinheit durch eine senkrecht zur Diffusionsrichtung stehenden Einheitsfläche wandert. Bei Erreichen des stationären Zustandes, an dem Änderung der Konzentration c über der Zeit t gleich Null ist ($\frac{dc}{dt} = 0$), wird der Konzentrationsgradient in der Membran $\frac{dc}{dx}$ als linear angenommen. Es gilt das erste Fick'sche Gesetz. Nach dem Ersten Fick'schen Gesetz ist J proportional zum Konzentrationsgradienten $\frac{dc}{dx}$ entgegen der Diffusionsrichtung. Die Proportionalitätskonstante ist der Diffusionskoeffizient D_M bei der Diffusion über die Membran.

$$J = -D_M \frac{dc}{dx} \quad (3.21)$$

J	Stoffstromdichte	$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
D_M	Diffusionskoeffizient	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
c	Konzentration	mol m^{-3}
x	x -Richtung über Membran	m

Zudem ist die zeitliche Veränderung der Stoffmenge N_N äquivalent zum Produkt aus Stoffstromdichte J und durchströmter Fläche A .

$$\frac{dN_N}{dt} = -JA \quad (3.22)$$

N_N	Stoffmenge	mol
t	Zeit	s
A	Fläche	m ²

Dabei ist die Stoffmenge N_N darstellbar über das Produkt aus Konzentration c und Volumen V ($N_N = cV$) und unter der Annahme, dass keine zeitliche Volumenänderung stattfindet ($\frac{dV}{dt} = 0$), folgt $\frac{dN_N}{dt} = \frac{dc}{dt}V$. Demnach existiert neben (3.21) eine weitere Beziehung für die Darstellung der Stoffstromdichte:

$$J = -\frac{dc}{dt} \frac{V}{A} \quad (3.23)$$

V	Volumen	m ³
-----	---------	----------------

Der Nernst'sche Verteilungskoeffizient K setzt die Konzentration in der wässrigen Phase (c_D und c_A) zu den jeweiligen Konzentrationen an den Membranoberflächen ($c_{D,M}$ und $c_{A,M}$) in Bezug.

$$K = \frac{c_{D,M}}{c_D} = \frac{c_{A,M}}{c_A} \quad (3.24)$$

K	Nernst'scher Verteilungskoeffizient	-
$c_{D,M}$	Donorkonzentration in der Membran	mol m ⁻³
$c_{A,M}$	Akzeptorkonzentration in der Membran	mol m ⁻³
c_D	Donorkonzentration in der wässrigen Phase	mol m ⁻³
c_A	Akzeptorkonzentration in der wässrigen Phase	mol m ⁻³

Aus Gleichung (3.21) und (3.24) folgt:

$$J = \frac{D_M K}{s} (c_D - c_A) \quad (3.25)$$

s Membranstärke m

Die Permeabilität ist ein kinetischer Parameter, der über den Diffusionskoeffizienten D_M , den Nernst'schen Verteilungskoeffizienten K und die Membranstärke s definiert ist:

$$Pe = \frac{D_M K}{s} \quad (3.26)$$

Pe Permeabilitätskoeffizient $m \text{ s}^{-1}$

Demnach kann der Stoffstrom über die Membran auch als Funktion der Permeabilität dargestellt werden:

$$J = Pe (c_D - c_A) \quad (3.27)$$

Die Gleichgewichtskonzentration c_{eq} des Gesamtsystems kann mit folgender Gleichung bestimmt werden:

$$c_{eq} = \frac{c_A V_A + c_D V_D}{V_A + V_D} \quad (3.28)$$

c_{eq} Gleichgewichtskonzentration mol m^{-3}

Um einen Ausdruck für die Permeabilität herzuleiten, werden Gleichung (3.23) und (3.27) zu folgender Differentialgleichung kombiniert:

$$\frac{dc}{dt} = -\frac{PeA}{V} (c_D - c_A) \quad (3.29)$$

Nach Integration von (3.29) und zusammen mit (3.28) kann schlussendlich ein experimentell zugänglicher Ausdruck für die Membranpermeabilität Pe gefunden werden. Hierfür müssen bei bekanntem Donor- und Akzeptorphasenvolumen V_D und V_A lediglich die Konzentrationen zu

beiden Seiten der Membran (c_A und c_D) nach einer bestimmten Diffusionsdauer t gemessen werden (Avdeef, 2012a).

$$Pe = -\frac{V_A V_D}{(V_A + V_D)At} \cdot \ln\left(1 - \frac{c_A}{c_{eq}}\right) \quad (3.30)$$

Da sich zu beiden Seiten der Membran eine wässrige Grenzschicht (WGS) ausbildet, stehen dem Stofftransport von der Donorseite über die Membran zur Akzeptorseite drei in Reihe geschaltete Widerstände gegenüber. Diese Diffusionsbarrieren summieren sich aus den Widerständen durch den Permeabilitätskoeffizienten der wässrigen Grenzschichten zu beiden Membranseiten ($Pe_{WGS,D}$ und $Pe_{WGS,A}$) sowie der Barriere der Membran selbst (Pe_M). Dabei wird zur Vereinfachung angenommen, dass die wässrigen Grenzschichten auf beiden Seiten dieselbe Stärke besitzen und $\frac{1}{Pe_{WGS}} = \frac{1}{Pe_{WGS,D}} + \frac{1}{Pe_{WGS,A}}$ gilt (Ruell *et al.*, 2003). Stoffe mit einem stark hydrophoben Charakter diffundieren relativ leicht durch die Phospholipidmembran. Dementsprechend stellt hier nicht der Membranwiderstand, sondern der Widerstand der wässrigen Grenzschichten die ausschlaggebende Barriere des Stofftransportes dar. Die reziproke, effektiv messbare Permeabilität Pe_{eff} entspricht der Summe aus den Widerständen der WGS und der Membran (Nielsen und Avdeef, 2004):

$$\frac{1}{Pe_{eff}} = \frac{1}{Pe_{WGS,D}} + \frac{1}{Pe_M} + \frac{1}{Pe_{WGS,A}} = \frac{1}{Pe_{WGS}} + \frac{1}{Pe_M} \quad (3.31)$$

Pe_{eff}	Effektive Permeabilität	$m\ s^{-1}$
Pe_{WGS}	Permeabilität der wässrigen Grenzschicht	$m\ s^{-1}$
Pe_M	Membranpermeabilität	$m\ s^{-1}$

Die Permeabilität ionisierbarer Moleküle ist zudem pH-abhängig. Daher wird der maximale Membranpermeabilitätskoeffizient Pe_M des ungeladenen Moleküls als der intrinsische Permeabilitätskoeffizient Pe_0 definiert. Für einfache, monoprotische Säuren (+) und Basen (-) folgender Zusammenhang zwischen Pe_M und Pe_0 (Avdeef *et al.*, 2004):

$$Pe_M = \frac{Pe_0}{10^{\pm(pH-pK_s)} + 1} \quad (3.32)$$

Pe_0	Intrinsische Permeabilität	$m\ s^{-1}$
--------	----------------------------	-------------

Modelle zur Bestimmung der Membranpermeabilität

Die Erzeugung artifizierlicher, freistehender Membranen in Form von schwarzen Lipidmembranen ermöglichte die Untersuchung der Permeation von einer Reihe einfacher Carbonsäuren über artifizierliche Membranen aus Ei-Phosphatidylcholin (PC) oder Dekan (Avdeef, 2005; Avdeef, 2012a). Mit Hilfe von BLMs wurde eine lineare Abhängigkeit der intrinsischen Permeabilität P_{e_0} vom Hexadekan-Wasser-Verteilungskoeffizienten (vergleiche auch Oktanol-Wasser-Verteilungs-Koeffizient Kapitel 3.3.3) bestimmt (Walter und Gutknecht, 1984) sowie die pH-abhängige Permeation verschiedener Toluylsäuren (Xiang und Anderson, 1994) untersucht. Ein signifikanter Nachteil dieses Modells geht aus der Instabilität der schwarzen Lipidmembranen hervor.

Membranen, die in den Poren einer Filtermembran gebildet werden, zeigen eine deutlich höhere Stabilität. Neben den 1980 von Thompson untersuchten Lipiddoppelschichten (Thompson *et al.*, 1980; Thompson, 1982), wurden auch mit Oktanol imprägnierte, mikroporöse Cellulose-Nitrat-Filter (Ghosh, 2001) oder mit Hexadekan getränkte Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Filter (Wohnsland und Faller, 2001) verwendet. Aufgrund der biologischen Vergleichbarkeit haben sich jedoch besonders filtergestützte Membranen aus Lipiden wie Ei-Lecithin oder Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) bewährt. Die gestützte Membran ist die Grundlage des 1998 von Kansy entwickelten Assays zur Bestimmung der passiven Diffusion von pharmazeutischen Wirkstoffen durch artifizierliche Membranen im Mikrotiterplattenformat (Kansy *et al.*, 1998). Das sogenannte PAMPA-System (*Parallel Artificial Permeability Assay*) ist in der kommerziellen Variante als 96-well *Sandwich*-Platte verfügbar. Das System beruht auf zwei durch eine Filtermembran getrennte Kammern, der Donor- und der Akzeptorkammer. Zwar konnte Thompson zeigen, dass sich in den zylinderförmigen Poren einer PC-Filtermembran aller Wahrscheinlichkeit nach eine einzige Lipiddoppelschicht bildet (Thompson *et al.*, 1980; Thompson, 1982), jedoch werden aufgrund der niedrigeren Permeationszeiten und der damit verkürzten Versuchsdauer überwiegend hydrophile PVDF-Filter verwendet. Die Struktur der gebildeten Membran in der netzartigen PVDF-Filterstruktur ist allerdings nicht bekannt (Avdeef, 2012a). Die Membranen können aus verschiedensten Lipiden gebildet werden. Dabei werden sehr häufig Lipidmembranen aus einer 2 % w/v DOPC-Lösung in n-Dodekan gebildet. Ein besonderer Vorteil des PAMPA-Systems ergibt sich aus der Kontrollierbarkeit der Stärke der wässrigen Grenzschicht zu beiden Membranseiten. Sowohl die Donor- als auch die Akzeptorkammer können individuell gerührt werden, wodurch der von der wässrigen Grenzschicht ausgehende Widerstand reduziert wird. Eine Verringerung der Grenzschicht von sonst 1000-4000 μm auf 25 μm ist somit möglich. Die mit Hilfe dieses Systems gemessene Permeabilität wird meist in der Einheit

cm s⁻¹ angegeben (Avdeef, 2005). Dabei wird innerhalb folgender Grenzen zwischen niedriger, moderater oder hoher Permeabilität unterschieden (Fischer *et al.*, 2007).

- Niedrig $Pe < 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$
- Moderat $0,1 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1} < Pe < 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$
- Hoch $Pe > 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$

Weitere, komplexere Modelle zur Bestimmung der Membranpermeabilität, die vor allem in klinischen Studien zur Bestimmung der oralen Aufnahme von pharmazeutischen Wirkstoffen herangezogen werden, basieren auf der Verwendung von Caco-2 Zellen oder MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) Zellen (Artursson, 1990; Avdeef und Tam, 2010). Ebenfalls für pharmazeutische Zwecke entwickelt wurden Modelle, die die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (englisch: *blood brain barrier*) berücksichtigen (Liu *et al.*, 2004).

3.3.3 Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient und Löslichkeit

Der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $\log P$ ist das Maß für die Lipophilie beziehungsweise Hydrophilie einer Substanz. Dieser gibt das Verhältnis der Konzentrationsverteilung einer Substanz in einem Zweiphasengemisch aus *n*-Oktanol und Wasser an.

$$\log P = \log \left(\frac{c_{\text{Oktanol}}}{c_{\text{Wasser}}} \right) \quad (3.33)$$

$\log P$	Dekadischer Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten	-
c_{Oktanol}	Konzentration des Stoffes in <i>n</i> -Oktanol	g cm ⁻³
$c_{\text{H}_2\text{O}}$	Konzentration des Stoffes in Wasser	g cm ⁻³

Positive Werte für $\log P$ stehen gleichsam für lipophile Substanzen, wohingegen negative Werte den hydrophilen Charakter der Substanz widerspiegeln. Je größer der dimensionslose Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient, also je lipophiler die Eigenschaften des Moleküls, desto einfacher permeiert der untersuchte Stoff über eine Membran. In direktem Zusammenhang steht damit die Löslichkeit der Substanz in Wasser, die konsequenterweise umso höher ist, je niedriger der $\log P$ ist. Pharmazeutische Wirkstoffe können in Abhängigkeit von ihrer Permeabilität und ihrer Löslichkeit in Wasser nach dem biopharmazeutischen Klassifizierungssystem in vier Gruppen eingeteilt werden, wie in Tabelle 3-3 dargestellt ist (Avdeef, 2012b).

Tabelle 3-3: Einteilung nach dem biopharmazeutischen Klassifizierungssystem.

	Hohe Löslichkeit	Niedrige Löslichkeit
Hohe Permeabilität	Klasse 1 Amphiphiler Charakter	Klasse 2 Lipophiler Charakter
Niedrige Permeabilität	Klasse 3 Hydrophiler Charakter	Klasse 4 -

3.3.4 Propranolol und Koffein als Modellmoleküle für Membran-Diffusion

Propranolol und Koffein sind pharmazeutische Wirkstoffe, die bezüglich ihrer physikochemischen Eigenschaften umfangreich untersucht wurden. Auch bezüglich ihrer Permeabilität existiert eine Vielzahl publizierter Werte. Diese Tatsache macht sie als Modellsystem für die Untersuchung der Eigenschaften unbekannter Membranen, wie beispielsweise Polymermembranen aus amphiphilen Block-Copolymeren, interessant.

Propranolol, dargestellt in Abbildung 3.10 A, zählt zur Arzneistoffgruppe der Betablocker und ist als gutlöslicher Wirkstoff mit hoher Membranpermeabilität in Klasse 1 des biopharmazeutischen Klassifizierungssystem (Tabelle 3-3) einzuordnen. Aufgrund seiner Hydrophobizität stellt die wässrige Grenzschicht einen relevanten Stofftransportwiderstand bei der passiven Diffusion dar, wohingegen die lipophile Membran selbst vergleichsweise einfach passiert wird. Mit einem pK_s (Säurekonstante) von 9,53 (Ruell *et al.*, 2003) ist Propranolol eine schwache Base. Propranolol besitzt als ionisierbarer Stoff zwei Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten, $\log P^I$ für das geladene Molekül und $\log P^N$ für das neutrale Molekül. Da die Ladungsverteilung einer Membran im Gegensatz zu Oktanol anisotrop ist, werden in diesem Fall die Membran-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P_M^I$ und $\log P_M^N$ herangezogen (Avdeef *et al.*, 1998). Dieser Koeffizient korreliert mit der Fähigkeit des Moleküls mit der Membran Wasserstoffbrücken einzugehen (van de Waterbeemd *et al.*, 1998). In Tabelle 3-4 sind die Werte der Verteilungskoeffizienten zusammengefasst.

Tabelle 3-4: Oktanol-Wasser-, und Membran-Wasser-Verteilungskoeffizienten für ionisiertes und neutrales Propranolol (Avdeef *et al.*, 1998)

$\log P^I$	$\log P^N$	$\log P_M^I$	$\log P_M^N$
0,78 ± 0,02	3,48 ± 0,01	2,61 ± 0,02	3,45 ± 0,01

Koffein, dargestellt in Abbildung 3.10 B, ist ein Alkaloid aus der Gruppe der Xanthine. Mit einem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient von $\log P = -0,07$ ist es ebenso lipid- wie auch wasserlöslich und damit nach dem biopharmazeutischen Klassifizierungssystem (Tabelle 3-3)

nicht klar einzuordnen. Weiterhin stellen dadurch die membranumschließenden, wässrigen Grenzschichten für Koffein, ebenso wie die Membran selbst, einen relevanten Stofftransportwiderstand dar. Koffein ist aufgrund seiner Struktur nicht ionisierbar (chemicalize.org), was eine pH-unabhängige Membran-Diffusion bewirkt.

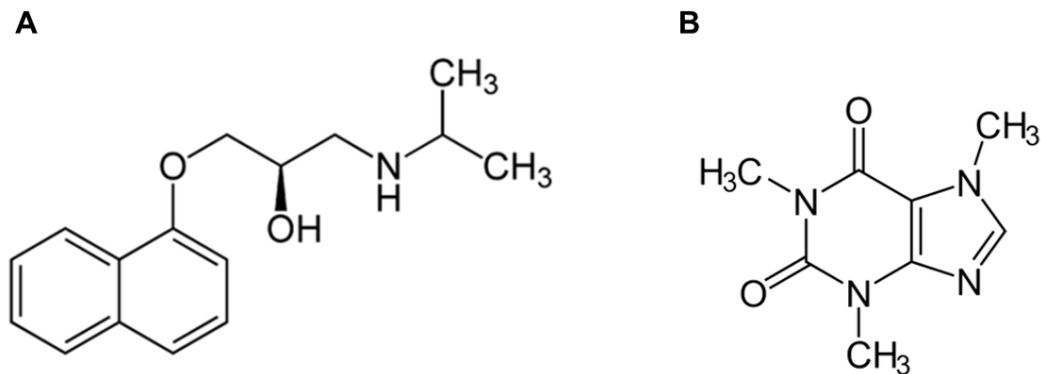


Abbildung 3.10: Struktur der als Modellmoleküle ausgewählten Wirkstoffe A) Propranolol und B) Koffein.

3.4 Rührkesselreaktoren

Der Rührkesselreaktor ist sowohl im chemischen als auch im biotechnologischen Sektor der am häufigsten verwendete Reaktortyp (Stitt, 2002). Im Folgenden werden zunächst die Grundlagen des Rührens und die Hydrodynamik in Rührkesselreaktoren erläutert. Anschließend werden wichtige Aspekte des Leistungseintrages und Grundlagen der Maßstabsübertragung diskutiert.

3.4.1 Grundlagen des Rührens

Aufgrund des sehr breiten Anwendungsspektrums müssen Rührkesselreaktoren sehr vielseitig sein. Der Rührkesselreaktor wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv verfahrenstechnisch charakterisiert, sodass ein breites Wissen über seine Einsetzbarkeit bei verschiedensten Temperaturen, Drücken und für flüssige Fluide unterschiedlichster Rheologie zur Verfügung steht (Kraume, 2003). Dabei versetzt ein auf einer rotierenden Welle fixiertes Rührorgan das Rührgut in einem Rührkessel in Bewegung, um verschiedenste Rühraufgaben zu bewältigen.

Rühraufgaben

Zu den Grundaufgaben des Rührens zählen insbesondere das Homogenisieren, Suspendieren, Dispergieren, Emulgieren, Begasen und die Intensivierung des Wärmeaustausches.

Von Homogenisieren ist die Rede, wenn ineinander lösliche Flüssigkeiten vermischt werden sollen. Dies erfolgt mit dem Ziel Temperatur- und Konzentrationsgefälle im Reaktor auszugleichen oder chemische Reaktionen durch das Zusammenführen der Reaktionskomponenten zu ermöglichen (Stieß, 2009). Das verfahrenstechnische Kriterium für diese Aufgabe ist die sogenannte Mischzeit t_M . Die Mischzeit ist die Rührdauer, die erforderlich ist, um eine gewisse Mischgüte beziehungsweise Homogenität zu erreichen. Für Flüssigkeiten mit vergleichbarer Dichte und Viskosität hängt sie hauptsächlich von den geometrischen Gegebenheiten, wie beispielsweise von Rührorgan, Rührkessel und Einbaugeometrie, ab (Zlokarnik, 1999). Die dimensionslose Darstellung der Mischzeit erfolgt über die Mischzeitenkennzahl θ_n . Sie entspricht der Anzahl an Rührerumdrehungen, die benötigt wird, um einen gewissen Homogenitätsgrad, beispielsweise 97 % ($\theta_{n,0,97}$), zu erzielen (Himmler und Schierholz, 2004).

$$\theta_n = t_M n \quad (3.34)$$

θ_n	Mischzeitenkennzahl	-
t_M	Mischzeit	s
n	Rührerdrehzahl	s ⁻¹

Es gibt diverse Methoden um die Mischzeit zu bestimmen: Dies kann zum Beispiel mit Hilfe geeigneter Sonden kontinuierlich durch die Messung der Leitfähigkeit, Temperatur oder Extinktion erfolgen. Die Bestimmung des Farbumschlages oder Entfärbungsreaktionen (Käppel, 1975; Assirelli *et al.*, 2008) sowie wie die Bestimmung des Fortschritts einer chemischen Reaktion durch Temperatur- oder pH-Änderung sind ebenfalls möglich.

Beim Suspendieren wird ein disperser Feststoff durch Aufwirbeln gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt. Bei der dispersen Phase werden molekulardisperse Systeme (Partikelgröße < 1 nm), kolloiddisperse Systeme (Partikelgröße 1 nm bis 1 µm) und grobdisperse Systeme (Partikelgröße > 1 µm) unterschieden (Stieß, 2009). Dispergieren beschreibt einerseits den Vorgang des feinen Verteilens zweier nicht ineinander löslicher Flüssigkeiten, auch Emulgieren genannt, oder das Zerteilen eines Gases in der Flüssigkeit (Begasen). Durch Rühren kann zudem die Wärmeübertragung zwischen Behälterwand oder Einbauten, die das Kühlen oder Heizen des Rührgutes bewirken sollen, effizienter erfolgen (Kraume, 2003).

Rührrüstung

Ein Rührkesselreaktor besteht aus dem Behälter, dem Rührorgan, das auf einer rotierenden Welle sitzt, und weiteren, in dieser Arbeit nicht näher erläuterten, optionalen Einbauten.

Der meist zylinderförmige Behälter kann hinsichtlich seiner Bodengeometrie unterschieden werden. Die einfachste Bauform ist dabei der Flachboden. Der Halbkugelboden ist eher selten vorzufinden, wohingegen die meisten Reaktoren aus Metall mit dem einfacher herzustellenden Klöpperboden ausgestattet sind (Abbildung 3.11 B). Durch Einbauten wie Messsonden, Wärmetauscher und vor allem Strömungsbrecher wird der in Rotation versetzten Flüssigkeit ein Widerstand entgegengesetzt. Der Widerstand ist proportional zur Fläche des Strömungsbrechers (Höhe h_{BW} und Breite b_{BW}) senkrecht zur Strömungsrichtung und zum Widerstandsbeiwert c_W . Zusammen mit dem Reaktordurchmesser D und der Anzahl an Strömungsbrechern N_{BW} kann die dimensionslose Bewehrungskennzahl BW ermittelt werden. Der vollständig bewehrte Zustand wird bei einem Wert von 0,20-0,28 erreicht (Liepe *et al.*, 1988; Puskeiler, 2004; Vieweg, 2010).

$$BW = c_W N_{BW} \frac{b_{BW} h_{BW}}{D^2} \quad (3.35)$$

BW	Bewehrungskennzahl	-
c_W	Widerstandsbeiwert	-
N_{BW}	Anzahl Strömungsbrecher	-
b_{BW}	Breite des Strömungsbrechers	m
h_{BW}	Höhe des Strömungsbrechers	m
D	Reaktordurchmesser	m

Durch den Einbau von Strömungsbrechern werden das Mitrotieren der Flüssigkeit sowie die häufig unerwünschte Trombenbildung unterdrückt und der Leistungseintrag (Kapitel 3.4.3) erhöht.

Die bis Mitte der 60er Jahre ungeordnete Vielfalt an Rührergeometrien wurde durch die Normierung der Rührorgane (DIN 28130 bis DIN 28133) erheblich vereinfacht (Ullrich und Schreiber, 1967). Gängige Rührertypen für die Anwendung niedrigviskoser Flüssigkeiten (Viskosität $\eta < 500 \text{ mPa s}$) sind Scheibenrührer, Impellerrührer, Schrägblattrührer und Propellerrührer. Bei Viskositäten im mittleren Bereich (500-5000 mPas) werden unter anderem Kreuzbalkenrührer, Gitterrührer oder Blattrührer eingesetzt. Die Durchmischung von Hochviskosem Rührgut ($\eta > 5000 \text{ mPa s}$) erfolgt häufig mit Ankerrührern oder Wendelrührern

(Zlokarnik, 1999). Die in niedrigviskosen Fluiden am häufigsten eingesetzten Scheibenrührer, Schrägblattrührer und Propellerrührer sind in Abbildung 3.11 A dargestellt.

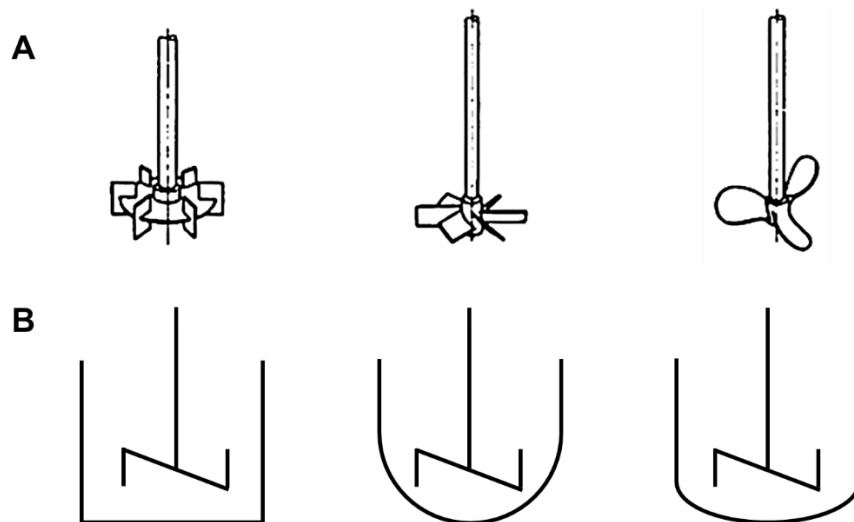


Abbildung 3.11: A) Häufig verwendete Rührertypen bei verhältnismäßig niedriger dynamischer Viskosität des Rührmediums. Von links: Scheibenrührer, Schrägblattrührer und Propellerrührer. Modifiziert nach (Zlokarnik, 1999). B) Mögliche Bodenformen eines Rührreaktors. Von links: Flachboden, Halbkugelboden und Klöpperboden.

Neben der Einteilung der Rührertypen hinsichtlich der Eigenschaften der zu durchmischenden Flüssigkeit ist besonders die Betrachtung des erzeugten Strömungsprofils notwendig. Im Reaktor sind generell die drei Hauptströmungsrichtungen radial, tangential und axial auf- oder abwärts, wie in Abbildung 3.12 in Draufsicht auf einen zylindrischen Reaktor symbolisch dargestellt, zu unterscheiden. In einem unbewehrten Reaktor ist unabhängig vom verwendeten Rührertyp die tangentiale Richtung dominierend (Nagata *et al.*, 1975; Assirelli *et al.*, 2008). Durch die Verwendung von Strömungsbrechern können durch die Wahl der Rührergeometrie die radiale oder axiale Komponente der Strömungsrichtung stärker beeinflusst werden. So entsteht bei der Verwendung von Scheibenrührern ein primär radiales Strömungsprofil von der Rührerwelle zur Reaktorwand, wohingegen Propellerrührer in Abhängigkeit des Anstellwinkels der Rührerblätter vorwiegend eine axiale auf- oder abwärts gerichtete Strömung erzeugen (Kraume, 2003). Die Strömung im Reaktor kann zudem auch durch die Positionierung des Rührers und der Rührerwelle (senkrecht, schräg, zentrisch, exzentrisch) beeinflusst werden (Stieß, 2009).

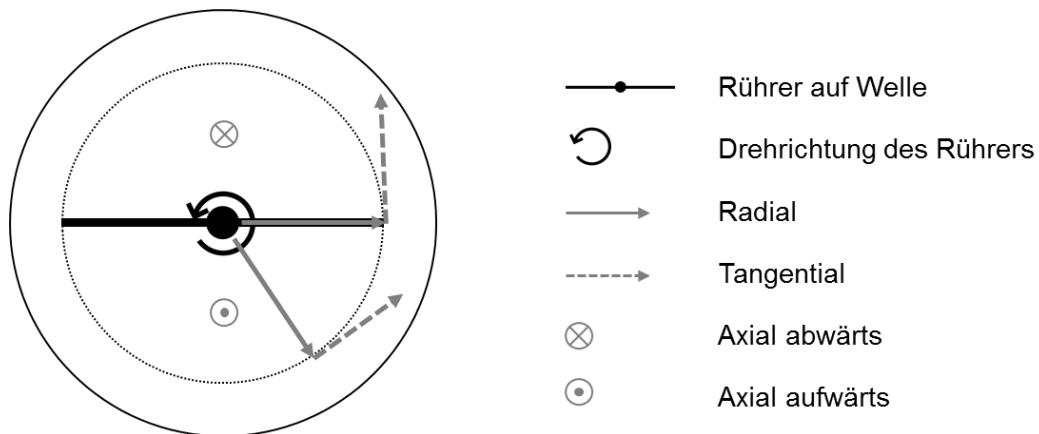


Abbildung 3.12: Mögliche Strömungsrichtungen in einem Rührreaktor. Dargestellt ist ein zylinderförmiger Reaktor in Draufsicht.

Rheologisches Verhalten von Fluiden

Die Rheologie beziehungsweise die Viskosität der zu mischenden Komponenten spielt bei der Auswahl des optimalen Rührsystems zur Erzielung einer effizienten Durchmischung bei möglichst geringer Rührarbeit eine erhebliche Rolle. Die Viskosität eines Fluids kann durch dessen Betrachtung zwischen zwei parallelen Platten mit der Fläche A beschrieben werden, wie in Abbildung 3.13 dargestellt ist. Durch das Aufbringen der horizontalen Kraft F bewegt sich die obere Platte im Abstand y relativ zur unteren, stationären Platte. Dadurch entsteht eine Verschiebung der einzelnen Flüssigkeitsschichten. Bei laminarer Strömung ist die Geschwindigkeit an der oberen Platte gleich v . Die Geschwindigkeit der untersten Schicht, die an die untere Platte grenzt, geht gegen Null.

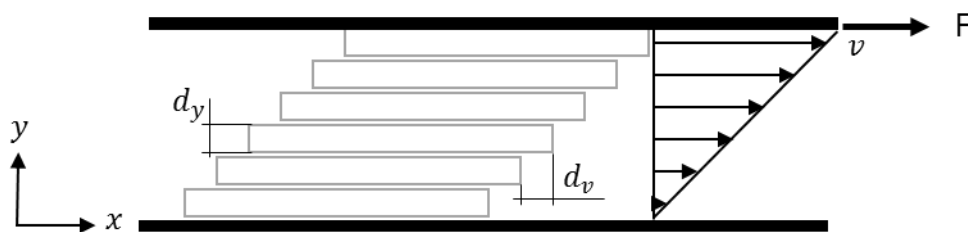


Abbildung 3.13: Lineares Geschwindigkeitsgefälle als Folge des Abgleitens übereinanderliegender Flüssigkeitsschichten. Nach (Zlokarnik, 1999).

Nach dem Newton'schen Reibungsgesetz ist die notwendige Kraft F pro Flächeneinheit A , nämlich die Schubspannung τ , proportional zur Geschwindigkeitsänderung senkrecht zur Verschiebungsrichtung. Die Proportionalitätskonstante entspricht der dynamischen Viskosität η .

$$\tau(\gamma) = \frac{F}{A} = \eta \frac{dv}{dy} \quad (3.36)$$

τ	Schubspannung	N m^{-2}
γ	Scherrate	s^{-1}
F	Kraft	N
A	Fläche	m^2
η	Dynamische Viskosität	N s m^{-2}
v	Geschwindigkeit	m s^{-1}
y	Abstand in y -Richtung	m

Die Veränderung der Geschwindigkeit v der Flüssigkeitsschichten über die Höhe y ist die sogenannte Scherrate γ .

$$\gamma = \frac{dv}{dy} \quad (3.37)$$

Somit gilt zwischen dynamischer Viskosität η , Schubspannung τ und Scherrate τ der Zusammenhang:

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma} \quad (3.38)$$

Wenn die dynamische Viskosität unabhängig von der Scherrate ist, handelt es sich um ein Newtonsches Fluid. Dabei nimmt die Schubspannung linear mit steigender Scherrate zu, wie in Abbildung 3.14 dargestellt. Die Viskosität hängt somit nur von der Temperatur ab. Bei allen anderen Fluiden spricht man von Nicht-Newtonschen Fluiden. Dabei weisen dilatante Fluide wie Stärkelösungen oder Treibsand eine zunehmende Viskosität mit steigender Scherrate auf. Bei strukturviskosen Fluiden, häufig Polymerlösungen, verhält es sich genau entgegengesetzt. Ein bekanntes Beispiel für Bingham'sche Fluide sind Ketchup und Zahnpasta. Sie verhalten sich nach der Überwindung einer Anfangsschubspannung wie Newtonsche Fluide (Stieß, 2009).

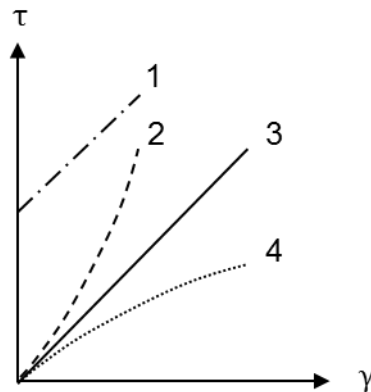


Abbildung 3.14: Verlauf der Schubspannung als Funktion der Scherrate für ein (1) Bingham'sches, (2) ein dilatantes, (3) ein Newton'sches und (4) ein strukturviskoses Fluid.

Eine seltenere Einteilung des rheologischen Verhaltens von Fluiden ist die Abhängigkeit der Viskosität von der Zeit. Nimmt diese über die Zeit ab, handelt es sich um thixotrope, im umgekehrten Fall um rheopexe Fluide.

3.4.2 Hydrodynamik in Rührkesselreaktoren

Unterschiedliche hydrodynamische Zustände in Rührkesselreaktoren entstehen durch die Rotation des Rührorgans. Die Rührerdrehzahl n kann auch über die Rührerumfangsgeschwindigkeit u_{tip} in Abhängigkeit vom Rührerdurchmesser d dargestellt werden.

$$u_{tip} = d\pi n \quad (3.39)$$

u_{tip}	Rührerumfangsgeschwindigkeit	m s^{-1}
d	Rührerdurchmesser	m
n	Rührerdrehzahl	s^{-1}

Der Turbulenzgrad wird über die dimensionslose Reynoldszahl Re beschrieben. Sie ist entscheidend von der Rührerdrehzahl n und dem Rührerdurchmesser d , aber auch von den Eigenschaften des Fluids (Dichte ρ und dynamische Viskosität η) abhängig und beschreibt das Verhältnis von Trägheitskraft zu Zähigkeitskraft. Bei standardisierten Rührreaktoren mit Strömungsbrechern geht man bei $Re > 10.000$ von vollständig turbulenter Strömung aus. Für $Re < 10$ liegt laminare Strömung vor (vergleiche auch Kapitel 3.4.3) (Zlokarnik, 1999). Die Bereiche gelten für zylindrische Behälter mit zentrisch angeordnetem Rührer und hängen von der Geometrie des Rührers und des Behälters ab.

$$Re = \frac{\rho n d^2}{\eta} \quad (3.40)$$

Re	Reynoldszahl	-
ρ	Dichte	kg m ⁻³
η	Dynamische Viskosität	N s m ⁻²

Im turbulenten Bereich wird das Strömungsprofil in unbewehrten Reaktoren überwiegend von der Rührerdrehung bestimmt und verläuft daher hauptsächlich tangential. Die Komponenten in radiale oder axiale Richtung sind eher klein, da die flüssige Phase wie ein Festkörper rotiert und die Bewegungen innerhalb gering ausfallen (Haque *et al.*, 2006). Dies führt zur Bildung der sogenannten Flüssigkeitstrombe. Die Trombe bedingt die Abnahme des Flüssigkeitsspiegels an der Rührerwelle, die als Trombentiefe h' bezeichnet wird. Die Erhöhung des Flüssigkeitsspiegels h'' an der Reaktorwand ist vergleichsweise gering und kann daher vernachlässigt werden. Die Absenkung des Spiegels an der Rührachse hängt bei gegebenen geometrischen Bedingungen (konstantes Verhältnis von Rührerdurchmesser zu Reaktordurchmesser $d D^{-1}$ und von Rührerhöhe zu Rührerdurchmesser $h d^{-1}$) vom Rührerdurchmesser d , der Rührerdrehzahl n , der Flüssigkeitsüberdeckung des Rührers im unbewegten Zustand H' , den Eigenschaften der Flüssigkeit (Dichte ρ und dynamische Viskosität η) und der Erdbeschleunigung g ab. Insbesondere die Erdbeschleunigung darf bei Rührvorgängen mit Trombenbildung nicht vernachlässigt werden. Sie kann über die dimensionslose Froudezahl Fr berücksichtigt werden.

$$Fr = \frac{n^2 d}{g} \quad (3.41)$$

Fr	Froudezahl	-
g	Erdbeschleunigung	m s ⁻²

In dimensionsloser Form gilt daher:

$$\frac{h'}{d} = f\left(Fr, Re, \frac{H'}{d}\right) \quad (3.42)$$

h'	Absenkung des Flüssigkeitsspiegels an der Rührerwelle	m
H'	Flüssigkeitsüberdeckung des unbewegten Rührers	m

Da die Bildung einer Trombe zu schlechterer Durchmischung führt (Hall *et al.*, 2004) ist ihre Existenz im Reaktor meist unerwünscht. Der Einbau von Stromstörern verhindert die sogenannte Festkörperrotation, ermöglicht so ausgeprägtere axiale und/oder radiale Strömung (abhängig vom verwendeten Rührertyp), verstärkt dadurch die Turbulenz und verbessert so die Durchmischung.

Das turbulente Strömungsfeld kann als Überlagerung von Turbulenzwirbeln unterschiedlicher Größenordnung aufgefasst werden (Kolmogorov, 1958). Die größten Wirbel werden initial vom Rührer erzeugt. Diese geben ihre kinetische Energie kaskadenartig an immer kleinere Wirbel ab. Dabei erfolgt die Weitergabe der Energie solange, bis die Viskositätskräfte bei sehr kleinen Wirbeln dominieren und die Strömungsenergie in Form von Wärmeenergie dissipiert. Dabei sind die kleinen Wirbelelemente von der Hauptströmungsrichtung unabhängig (Stieß, 2009).

3.4.3 Leistungseintrag und Energiedissipation

Leistungseintrag

Durch die Drehbewegung des Rührorganes wird Energie in die Flüssigphase eingebracht. In Abhängigkeit von der Rühraufgabe kann es von Interesse sein viel Energie (beispielsweise bei der Homogenisierung zweier Flüssigkeiten) oder wenig Energie (beispielsweise bei der Kristallisation von Proteinen oder der Kultivierung von tierischen Zellen) (Henzler und Biedermann, 1996) ins System einzubringen. Die gesamte eingebrachte Leistung P kann über das bei einer bestimmten Rührerdrehzahl n an der Rührerwelle wirkende Drehmoment M bestimmt werden und ist durch die Kräfte, die auf den Rührer wirken, zugänglich (Sánchez Pérez *et al.*, 2006).

$$P = M 2 \pi n \quad (3.43)$$

P	Leistung	W
M	Drehmoment	N m
n	Rührerdrehzahl	s ⁻¹

Betrachtet man den Rührer als umströmten Körper, kann die eingetragene Leistung aus dem Produkt der auf den rotierenden Rührer wirkenden Widerstandskraft F_w und der Geschwindigkeit v berechnet werden.

$$P = F_w v \quad (3.44)$$

F_w	Widerstandskraft	N
v	Geschwindigkeit	m s ⁻¹

Die Widerstandskraft F_w ist abhängig vom Widerstandsbeiwert c_w , der Dichte ρ des Fluids, der Strömungsgeschwindigkeit v sowie der angeströmten Fläche A .

$$F_w = c_w(Re) \frac{\rho}{2} v^2 A \quad (3.45)$$

c_w	Widerstandsbeiwert	-
ρ	Dichte	kg m ⁻³
A	Fläche	m ²

Für die charakteristische Geschwindigkeit kann an dieser Stelle die Rührerumfangsgeschwindigkeit u_{tip} , Gleichung (3.39), mit $v = u_{tip} \sim n d$ eingesetzt werden. Für die charakteristische angeströmte Fläche gilt $A \sim d^2$. Mit den genannten Zusammenhängen ergibt sich mit dem adaptierten Widerstandsbeiwert $c_w^*(Re)$ aus Gleichung (3.44) und (3.45) folgender Zusammenhang:

$$P = c_w^*(Re) \rho n^3 d^5 \quad (3.46)$$

c_w^*	Adaptierter Widerstandsbeiwert	-
d	Rührerdurchmesser	m

Die dimensionslose Leistungskennzahl beziehungsweise Newtonzahl, die dem Verhältnis von Widerstands- zu Trägheitskraft entspricht, ist folgendermaßen definiert:

$$Ne = \frac{P}{\rho n^3 d^5} \quad (3.47)$$

Ne Newtonzahl -

Aus Gleichung (3.46) und Gleichung (3.47) wird auch die Leistungscharakteristik, die besagt, dass die Newtonzahl eine Funktion der Reynoldszahl ist $Ne = f(Re)$, deutlich. Für den Fall, dass im Rührkesselreaktor eine Trombe gebildet wird oder signifikante Dichteunterschiede vorliegen, wie beispielsweise bei der Begasung, muss auch die Froudezahl mit $Ne = f(Re, Fr)$ berücksichtigt werden. Diese sogenannte Leistungscharakteristik ist spezifisch für jedes einzelne Rührersystem und muss experimentell bestimmt werden. Sie ist exemplarisch für ein bewehrtes und ein unbewehrtes System in Abbildung 3.15 dargestellt.

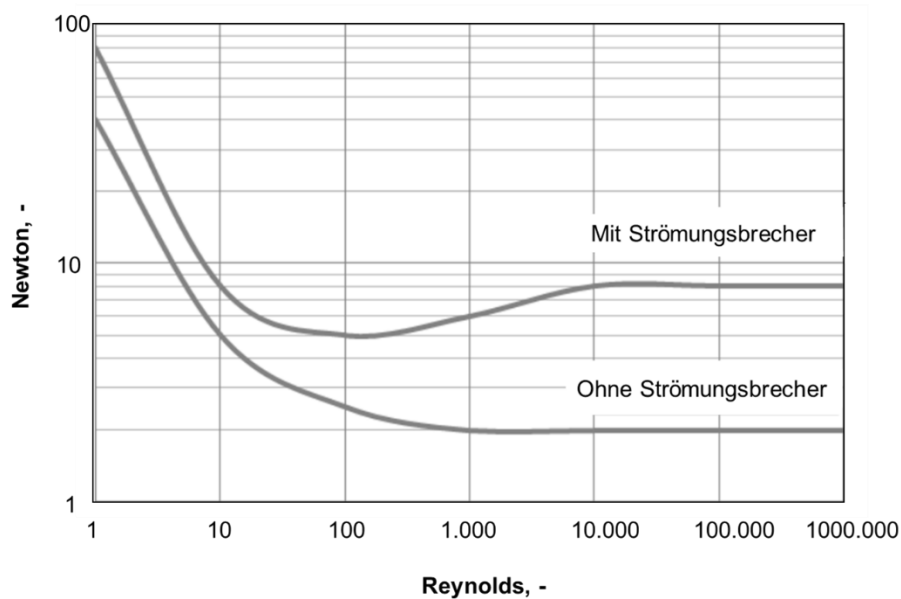


Abbildung 3.15: Exemplarischer Verlauf der Newtonzahl als Funktion der Reynoldszahl im unbewehrten und bewehrten Rührkesselreaktor. Nach (Zlokarnik, 1967).

In der Leistungscharakteristik sind drei Bereiche erkennbar. Im laminaren Strömungsbereich ($Re < 10$) fällt die Newtonzahl mit steigender Reynoldszahl linear ab ($NeRe^{-1} = const.$). Dem schließt sich der sogenannte Übergangsbereich an, der nur in unbewehrten Reaktoren deutlich erkennbar ist ($NeRe^{0,333} = const.$). In vollturbulenten Strömungen ($Re > 10.000$) ist die Newtonzahl von der Reynoldszahl unabhängig ($Ne = const.$). Der Leistungseintrag ist in bewehrten Systemen bei identischer Reynoldszahl höher, was den höheren Wert der Newtonzahl bedingt. In unbewehrten Systemen kann es aufgrund der Trombenbildung dazu

kommen, dass keine konstante Newtonzahl erreicht wird. Sie nimmt dann mit zunehmender Reynoldszahl stetig ab (Liepe, 2005).

Maximale lokale Energiedissipation

Die in die Flüssigkeit eingetragene Leistung wird nicht homogen verteilt. Sie unterliegt lokalen Schwankungen und führt demnach zu unterschiedlichen lokalen Kräften. Diese Kräfte sind besonders dann von Interesse, wenn Partikel zerkleinert, oder aber eben nicht zerstört werden sollen. Die relevante verfahrenstechnische Größe zur Beschreibung der Partikelbeanspruchung im Strömungsfeld von Rührkesselreaktoren ist die maximale Energiedissipation ε_{max} (Hinze, 1955; Zhou und Kresta, 1996; Zhou und Kresta, 1998). Sie ist ein Maß für die maximale Beanspruchung, die ein Partikel erfahren kann (Henzler und Biedermann, 1996). Dabei üben Wirbel, die ähnlich groß wie die Partikel selbst sind, die größte Belastung aus (Stieß, 2009). Die größten lokalen Energiedissipationen sind dabei in Rührernähe zu finden.

Die maximale Energiedissipation ε_{max} lässt sich nach Liepe mit Hilfe eines Dissipationsbeiwertes c_{Diss} der Rührerumfangsgeschwindigkeit u_{tip} , Gleichung (3.39), und der Länge des Strömungserzeugers senkrecht zur Hauptströmungsrichtung h berechnen (Liepe *et al.*, 1988; Vieweg, 2010):

$$\varepsilon_{max} = \frac{c_{Diss} u_{tip}^3}{h} \quad (3.48)$$

ε_{max}	Maximale Energiedissipation	W kg ⁻¹
c_{Diss}	Dissipationsbeiwert	-
u_{tip}	Rührerumfangsgeschwindigkeit	m s ⁻¹
h	Länge des Strömungserzeugers	m

Die Dissipationsbeiwerte c_{Diss} wurden für unterschiedliche Rührer und variierende Verhältnisse von Rührer- zur Reaktordurchmesser $d D^{-1}$ experimentell ermittelt. So wurde für Propellerrührer $d D^{-1} = 0,25$ und $d D^{-1} = 0,40$ der Dissipationsbeiwert $c_D = 0,08$ ermittelt. Beim 6-Blatt-scheibenrührer lag dieser Wert mit $c_D = 0,45$ für einen Rührer mit $d D^{-1} = 0,40$ und mit $c_D = 0,50$ für einen Rührer mit $d D^{-1} = 0,25$ deutlich höher (Liepe *et al.*, 1988; Vieweg, 2010).

Als Maß für die Homogenität des Energieeintrags kann die maximale Energiedissipation auf den mittleren massenbezogenen Leistungseintrag ε_ϕ bezogen werden.

$$\varepsilon_{\phi} = \frac{P}{\rho V} \quad (3.49)$$

ε_{ϕ}	Mittlere Energiedissipation	W kg ⁻¹
P	Leistungseintrag	W
ρ	Dichte	kg m ⁻³
V	Volumen	m ³

Das Verhältnis aus ε_{max} und ε_{ϕ} ist konstant und spezifisch für unterschiedliche Rührertypen. Je höher ϕ , desto inhomogener wird die Energie in den Reaktor eingetragen:

$$\phi = \frac{\varepsilon_{max}}{\varepsilon_{\phi}} = const. \quad (3.50)$$

Je nach Rührertyp ergeben sich für ϕ unterschiedliche Werte. So wurde für einen 6-Blatt-Scheibenrührer mit einem Wert von 0,25 für $d D^{-1}$ ein Verhältnis von 125 ermittelt. Für einen 6-Blatt-Scheibenrührer mit einem Wert von 0,4 für $d D^{-1}$ ist ϕ mit einem Wert von 37 deutlich niedriger (Liepe *et al.*, 1988). Damit wird deutlich, dass Rührorgane mit größerem Durchmesser die Energie gleichmäßiger in den Reaktor eintragen.

Zur Abschätzung der Energiedissipation kann auch ein Ansatz, bei dem die unterschiedlichen geometrischen Verhältnisse zum Tragen kommen, herangezogen werden. Beachtet werden hierbei nicht nur Rührer- und Reaktordurchmesser d und D sowie Rührer- und Füllstandshöhe h und H , sondern auch Anzahl z und Anstellwinkel α der Rührerblätter und die Anzahl der Rührer an der Rührerwelle z_i (Henzler und Biedermann, 1996; Henzler, 2000).

$$\frac{\varepsilon_{max}}{\varepsilon_{\phi}} \approx \frac{a}{\left(\frac{d}{D}\right)^2 \left(\frac{h}{d}\right)^{\frac{2}{3}} z^{0,6} (\sin\alpha)^{1,15} z_i^{\frac{2}{3}} \left(\frac{H}{D}\right)^{-\frac{2}{3}}} \quad (3.51)$$

a	Faktor für Bewehrung im Reaktor	-
d	Rührerdurchmesser	m
D	Reaktordurchmesser	m
h	Rührerhöhe	m
H	Füllhöhe	m
z	Anzahl Rührerblätter	-
α	Anstellwinkel der Rührerblätter	°
z_i	Anzahl der Rührer	-

Der Faktor a in Gleichung (3.51) bezieht die Bewehrung im Reaktor mit ein. Er nimmt für bewehrte Reaktoren den Wert 4 an. Bei gleichem massenbezogenem Leistungseintrag ist die maximale Energiedissipation in unbewehrten Reaktoren deutlich höher. Hierbei geht der Faktor a mit einem Wert von 16 in die Gleichung ein. (Henzler und Biedermann, 1996; Henzler, 2000).

3.4.4 Maßstabsübertragung

Für eine konkrete Rühraufgabe werden Versuche zunächst meist in einer kleineren Apparatur, der sogenannten Modellausführung, durchgeführt. Die Übertragung der Ergebnisse und Betriebsbedingungen in die größere Hauptausführung nennt man Maßstabsübertragung oder Scale-up. Zwei Grundvoraussetzungen sollten für eine erfolgreiche Vergrößerung prinzipiell gewährleistet sein: Der Modellversuch erfolgt mit demselben Rührgut, das für die Hauptausführung vorgesehen ist. Betriebsbedingungen wie beispielsweise die Temperatur, die die Stoffwerte signifikant beeinflussen, müssen daher bei beiden Maßstäben identisch sein. Weiterhin soll die Hauptausführung geometrisch ähnlich zum Modellmaßstab sein. Das bedeutet, dass alle relevanten Größenverhältnisse ($d D^{-1}$, $h d^{-1}$, $h H^{-1}$...), aber auch die Anstellwinkel der Rührerblätter in beiden Maßstäben identisch sein müssen. Sind diese beiden Kriterien erfüllt, muss das für die Rühraufgabe charakteristische beziehungsweise bestmögliche Übertragungskriterium gefunden werden. Dabei kann es sich um dimensionslose Kennzahlen oder auch um dimensionsbehaftete physikalische Größen handeln. Ergibt sich dieses Kriterium nicht plausibel aus der Rühraufgabe, so muss es aus experimenteller Erfahrung mit Rührapparaten unterschiedlicher Größe gewonnen werden. Die wichtigsten Übertragungskriterien sind identische Rührerumfangsgeschwindigkeit u_{tip} , volumenbezogener Leistungseintrag $P V^{-1}$, Wärmeübergangszahl α_H oder identische dimensionslose Kennzahlen wie Ne , Re oder Fr in beiden Maßstäben (Stieß, 2009).

4 Material und Methoden

4.1 Allgemeines Material

Alle Materialien, die üblicherweise bei bioverfahrenstechnischen Arbeiten verwendet werden, sind im Anhang (Kapitel 13) zu finden. Hierzu zählt eine genaue Auflistung der Puffer und Lösungen (Kapitel 13.2), der Chemikalien (Kapitel 13.3) sowie der Geräte und zugehöriger Software (Kapitel 13.4) zusammengefasst. Besondere Materialien, die einer genaueren Spezifikation bedürfen, sind in den jeweiligen Unterkapiteln gesondert erwähnt.

4.2 Verwendetes ABA-Triblock-Copolymer

Zur Herstellung von Polymervesikeln und Polymermembranen wurde das amphiphile ABA-Triblock-Copolymer Poly(2-methyloxazolin)-poly(dimethylsiloxan)-poly(2-methyloxazolin) (PMOXA-PDMS-PMOXA) (Kapitel 3.1.2) verwendet. Die beiden hydrophilen PMOXA-Außenblöcke des von der Firma Polymersource™ (Dorval QC, Kanada) hergestellten Polymers haben eine durchschnittliche Länge von 15, der hydrophobe PDMS-Mittelblock eine durchschnittliche Länge von 68 Monomereinheiten. Die Kettenenden des Polymers sind an beiden Seiten mit Hydroxyl-Gruppen funktionalisiert. Es ist damit im Gegensatz zu mit Methacrylat-Gruppen funktionalisierten Polymeren nicht durch radikalische Polymerisation (ausgelöst durch UV-Strahlen) quervernetzbar (Nardin und Meier, 2001). Bei den Linkern zwischen den Blöcken handelt es sich um einfache Methylgruppen. Das amphiphile Triblock-Copolymer weist eine gesamte molare Masse von 7600 g mol^{-1} ($1300\text{-}5000\text{-}1300 \text{ g mol}^{-1}$) und eine sehr niedrige Polydispersität PDI_p , Gleichung (3.1), von 1,23 auf.

Das in seiner Konsistenz bei Raumtemperatur (RT) wachsartige Polymer wurde für die feststoffförmige Verwendung bei -196 °C in einer Cryo-Mühle (CryoMill, Retsch, Haan, Deutschland) pulverisiert und anschließend zur Vermeidung von Agglomeration bei -20 °C gelagert. Für die Verwendung in flüssiger Form wurde das Polymer in gewünschtem Anteil in Ethanol (99,8 %, unvergällt) gelöst. Aus Gründen der besseren Lesbarkeit ist im Folgenden von Polymer beziehungsweise Polymerlösung die Rede, wenn pulverförmiges beziehungsweise in Ethanol gelöstes $\text{PMOXA}_{15}\text{-PDMS}_{68}\text{-PMOXA}_{15}$ gemeint ist.

4.3 Herstellung von Polymervesikeln

Polymervesikel wurden in drei verschiedenen Reaktionssystemen unterschiedlicher Maßstäbe hergestellt. Vorversuche bezüglich der Verfahrensentwicklung zur effizienten Herstellung von Polymersomen erfolgten im Milliliter-Maßstab. Die Entwicklung eines reproduzierbaren Prozesses wurde durch die Verwendung von parallel betriebenen, miniaturisierten Rührkesselreaktoren ermöglicht. Die Maßstabsübertragung des etablierten Prozesses in den Liter-Maßstab wurde im Laborrührkesselreaktor realisiert. Alle als wässrige Phase fungierenden Reaktionsmedien wurden vor der Vesikelherstellung filtriert (0,2 μm).

4.3.1 Milliliter-Maßstab

Vorversuche zur Polymervesikelherstellung erfolgten in verschließbaren zylindrischen Glasgefäßen (5 mL Nominalvolumen). Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

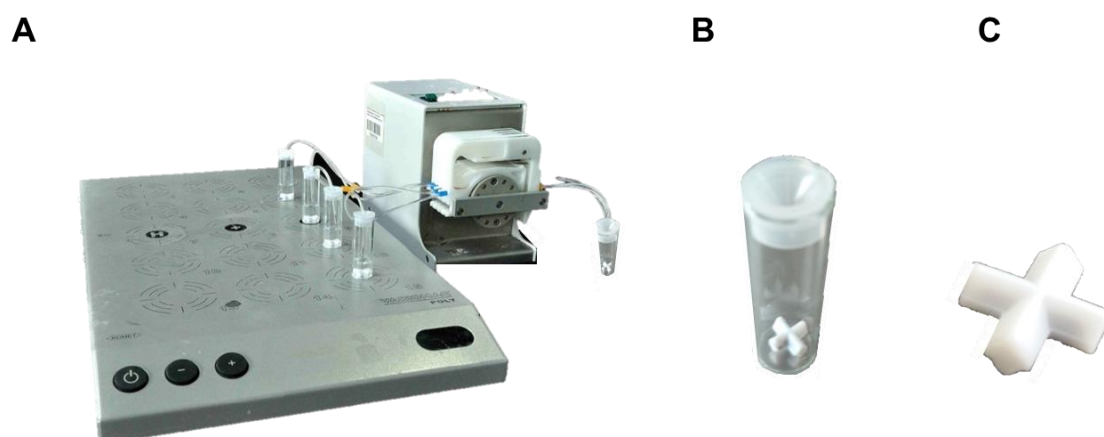


Abbildung 4.1: Versuchsaufbau zur Herstellung von Polymervesikeln im Milliliter-Maßstab. A) 15-fache, magnetische Rührplatte mit Zudosierung der Polymerlösung in die zylindrischen Glasgefäße über eine Schlauchpumpe. B) Reaktionsgefäß mit 5 mL Nominalvolumen. C) Magnetischer Kreuzbalkenrührer zur Durchmischung des Reaktionsansatzes.

Die Polymersomen wurden in 1,5 mL Acetat-, PBS-, oder Tris-Puffer bei pH 5, pH 7,4 beziehungsweise pH 9 im Siebenfachansatz (Dispersionsmethode) beziehungsweise im Vierfachansatz (Ethanolmethode) hergestellt. Für die Herstellung der Vesikel über die Dispersionsmethode wurde das pulverförmige Polymer im gewünschten Massenanteil (0,25-3 % w/v) vorgelegt und dann im Puffer dispergiert. Für die Herstellung der Vesikel mittels der Ethanolmethode wurde die Polymerlösung (2-50 % w/v) kontinuierlich mit einer Schlauchpumpe (Analog MS 4-4/12, ISMATEC, Wertheim, Deutschland) zur gerührten wässrigen Phase dosiert (0,6-34,0 mL h⁻¹). Dabei fungierte ein Schlauchverbinder (Tygon-Schläuche mit 0,25 mm Innendurchmesser, Schlauchverbinder mit 0,3 mm Innendurchmesser), der direkt in die gerührte wässrige Phase ragte, als Injektionsdüse.

Magnetische Kreuzbalkenrührer (Durchmesser: 1 cm) ermöglichten die Durchmischung in den Gefäßen bei $150\text{-}950\text{ min}^{-1}$ auf einer 15-fachen Rührplatte. Durch die Platzierung der Platte in der Klimakammer oder einem Thermoschrank lag die Reaktionstemperatur bei 4 °C beziehungsweise bei 30 °C .

4.3.2 Miniaturisierte Rührkesselreaktoren

Die Verfahrensentwicklung zur reproduzierbaren, effizienten und skalierbaren Herstellung von Polymersomen wurde in parallel betriebenen miniaturisierten Rührkesselreaktoren in einem 48-fachen Bioreaktorblock (bioREACTOR 48, 2mag, München, Deutschland) realisiert (Weuster-Botz *et al.*, 2005; Kusterer *et al.*, 2008). Sämtliche Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt.

Reaktorblock und Rührkesselreaktoren

Die Verwendung des 48-fachen Bioreaktorblocks ermöglichte die Polymersomenherstellung unter kontrollierten Prozessbedingungen. In dem Reaktorblock, dargestellt in Abbildung 4.2 A, können bis zu 48 miniaturisierte Rührkesselreaktoren, dargestellt in Abbildung 4.2 B, integriert werden.



Abbildung 4.2: A) Aufbau des 48-fachen Bioreaktorblocks. (1) Deckel mit Öffnungen für Probenahme und Zudosierung, (2) Kopfraumkühlung, (3) Öffnungen für die Milliliter-Bioreaktoren, (4) integrierter Wärmetauscher für die Kontrolle der Prozessstemperatur und magnetisch induktiver Antrieb für die Rührer. B) Unbewehrter Milliliter-Bioreaktor. Am Boden sind die Plätze für die optionale Anbringung von polymerbasierten Sensoren für die pH- beziehungsweise O_2 -Messung zu sehen.

Die zylindrischen, miniaturisierten Rührkesselreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 8-15 mL (Höhe: 86 mm, Innendurchmesser: 20 mm) sind aus Polystyrol gefertigt (2mag, München, Deutschland). In dieser Arbeit wurden sowohl unbewehrte Reaktoren als auch solche mit vier gleichmäßig verteilten Strömungsbrechern (Höhe: 59 mm, Breite: 2 mm) verwendet. Da die Herstellung von Polymervesikeln keine Sauerstoff- oder pH-Kontrolle erforderte, wurden Reaktoren ohne integrierte O_2 - oder pH-Sensoren verwendet. Die Öffnungen im Deckel des Reaktorblocks ermöglichten die individuelle Zudosierung flüssiger

Komponenten zu jedem einzelnen Reaktor. Die Beprobung erfolgte auf demselben Weg. Die integrierte Kopfraumkühlung (4 °C) minimiert Volumenverluste durch Verdunstungseffekte während des Prozesses. Die Prozesstemperatur selbst wurde durch einen integrierten Wärmetauscher im unteren Teil des Blockes kontrolliert. In diesem Bereich ist zudem der magnetisch induktive Antrieb für die Rührorgane installiert.

Der Reaktorblock wurde in dieser Arbeit sowohl als allein stehende Einheit als auch integriert in die Landschaft eines Laborroboters (FreedomEvo, Tecan, Männedorf, Schweiz) zu Automatisierungszwecken verwendet.

Rührorgane

Für den Einsatz in den miniaturisierten Rührkesselreaktoren stehen vier verschiedene Rührergeometrien zur Verfügung. Der sogenannte gasinduzierende Rührer (G), der Paddelrührer (P), der H-Rührer (H) und der S-Rührer (S) sind schematisch in Abbildung 4.3 A dargestellt.

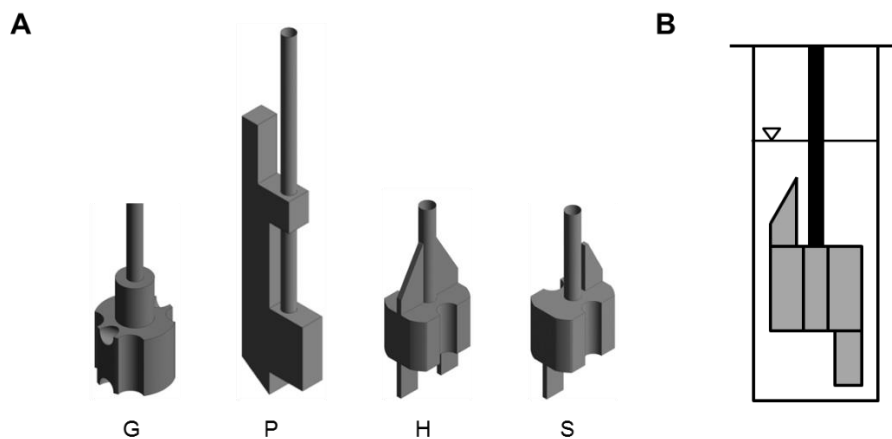


Abbildung 4.3: A) Vier verschiedene, für den 48-fachen Bioreaktorblock zur Verfügung stehende, Rührertypen. (G) Gasinduzierender Rührer, (P) Paddelrührer, (H) H-Rührer und (S) S-Rührer. B) Schema eines S-Rührers im unbewehrten Milliliterreaktor. Modifiziert nach (Brüning, 2012).

Der gasinduzierende Rührer ermöglicht den Eintrag von Gasblasen in die Flüssigphase. Er ist universell für die Kultivierung verschiedener Mikroorganismen in miniaturisierten Rührkesselreaktoren einsetzbar. Durch die Rotation des Rührers wird die Gasphase aus dem oberen Bereich des Reaktorblocks durch die hohle Rührerachse angesaugt und im Medium dispergiert. Simultan strömt die Flüssigphase am Reaktorboden in die Bohrungen des Rührers, wodurch eine starke axiale Strömung im Reaktor und hohe Turbulenzen entstehen (Puskeiler und Weuster-Botz, 2004; Puskeiler *et al.*, 2005a; Puskeiler *et al.*, 2005b). Ein hingegen überwiegend tangenciales Strömungsprofil entsteht bei Verwendung des einseitigen Paddelrührers, der aufgrund seines Durchmessers ausschließlich in unbewehrten Reaktoren

verwendet werden kann. Er wurde für die Kultivierung scherempfindlicher Mycel-bildender Mikroorganismen entwickelt (Hortsch und Weuster-Botz, 2010a; Hortsch, 2011). Der H- und der S-Rührer wiederum wurden ursprünglich für die Homogenisierung von Suspensionen mit hohem Feststoffanteil, genauer für die enzymatische Hydrolyse von suspendiertem Pflanzenmaterial, konstruiert. Dabei erzeugt der H-Rührer ein dominierendes tangenciales Strömungsprofil ohne axiale Komponente. Der S-Rührer, der geometrisch ähnlich zum H-Rührer aufgebaut ist aber nur zwei Rührerblätter aufweist, sorgt für eine effiziente Durchmischung des Reaktionsmediums oberhalb und unterhalb des Rührers. Er ruft dabei ein radiales, tangenciales sowie axiales Strömungsprofil im Rührkesselreaktor hervor (Riedlberger, 2012; Riedlberger und Weuster-Botz, 2012; Riedlberger *et al.*, 2013).

Im Inneren jedes Rührers ist ein Dauermagnet integriert, der in Kombination mit dem magnetisch-induktiven Antrieb des Reaktorblocks dessen freie Rotation um die Rührerachse ermöglicht. Die Achse ist über eine Steckverbindung am Deckel des Reaktorblocks befestigt. Ein Schema des S-Rührers im unbewehrten Rührkesselreaktor ist in Abbildung 4.3 B zu sehen. Die Rührerdrehzahl kann in Intervallen von 20 min^{-1} im Bereich bis zu maximal 4000 min^{-1} mit Hilfe eines Steuergerätes kontrolliert werden.

In Tabelle 4-1 sind wichtige Charakteristika der vier Rührertypen wie Durchmesser d , Höhe h , Verhältnis von Rührer- zu Reaktordurchmesser $d D^{-1}$, Verhältnis von Rührerhöhe zu Füllhöhe bei 12 mL Füllvolumen $h H^{-1}$, die maximal mögliche Rührgeschwindigkeit n_{max} , das Verhältnis von maximaler Energiedissipation zu mittlerem, massenbezogenen Leistungseintrag Φ , Gleichung (3.50), sowie das Strömungsprofil zusammengefasst.

Tabelle 4-1: Charakteristik des gasinduzierenden Rührers (G), des Paddelrührers (P), des H-Rührers (H) und des S-Rührers (S).

	G¹	P²	H³	S³
<i>d</i>, mm	14,5	16,2	14,4	14,4
<i>h</i>, mm	8,0	57,0	29,0	27,5
<i>dD</i>⁻¹, –	0,73	0,81	0,72	0,72
<i>hH</i>⁻¹, –	0,19	1,33	0,69	0,64
<i>n</i>_{max}, min⁻¹ ^b	4000	2000	3000	4000
$\Phi = \frac{\epsilon_{max}}{\epsilon_{\phi}}$, –	10,0 ^a	6,0 ^b	^c	7,4 ^b
Strömungsprofil	Stark axial	Überwiegend tangential	Überwiegend tangential	Axial, radial, tangential

¹ (Puskeiler, 2004; Hortsch und Weuster-Botz, 2010b), ² (Hortsch *et al.*, 2010; Hortsch und Weuster-Botz, 2010a), ³(Riedlberger, 2012; Riedlberger und Weuster-Botz, 2012; Riedlberger *et al.*, 2013)
^a In bewehrten Reaktoren, ^b in unbewehrten Reaktoren, ^c Daten nicht verfügbar

Herstellung der Polymervesikel

Polymervesikel wurden in den miniaturisierten Rührkesselreaktoren sowohl über die Dispersions- als auch über die Ethanolmethode in verschiedenen Puffern (Acetat-, PBS-, Phosphat-, Tris-Puffer) und in doppelt destilliertem Wasser (dd H₂O) bei einem Reaktionsvolumen von 10-15 mL hergestellt. Bei Herstellung der Vesikel über die Dispersionsmethode wurde das pulverförmige Polymer direkt in der wässrigen Phase dispergiert (1 % w/v in 12 mL).

Die Herstellung über die Ethanolmethode wurde auf drei verschiedenen Wegen umgesetzt:

Injektionsmethode. Für die schnelle Bereitstellung von Polymersomen mit einer Polymerkonzentration von 0,25-1,0 % w/v wurde die Polymerlösung (10-40 % w/v) mit Hilfe einer Spritze und einer Einwegkanüle über die Öffnungen im Deckel des Reaktorblocks direkt in die gerührte wässrige Phase injiziert.

Zudosierung der Polymerlösung über eine Schlauchpumpe. Für die Verfahrensentwicklung des Herstellungsprozesses wurde die Polymerlösung (15-25 % w/v) mit unterschiedlichen konstanten Zulaufzeiten (1,0-6,8 mL min⁻¹) über eine Schlauchpumpe (Analog MS 4-4/12, ISMATEC, Wertheim, Deutschland) direkt in die wässrige Phase geleitet. Ein Schlauchverbinder (Tygon-Schläuche mit 0,25 mm Innendurchmesser, Schlauchverbinder mit 0,3 mm Innendurchmesser), der direkt ins Reaktionsmedium reichte, diente hierbei als Injektionsdüse.

Zudosierung der Polymerlösung mit Hilfe eines Pipettierroboters. Um die automatisierte Polymersomenherstellung zu ermöglichen, wurde ein in die Landschaft des Laborroboters integrierter Reaktorblock eingesetzt. Die Zugabe der Polymerlösung (20 % w/v) erfolgte hierbei nicht kontinuierlich wie bei Verwendung der Schlauchpumpe, sondern intermittierend mit Hilfe des Pipettierroboters. Über dessen Ansteuerung mittels der Software FedBatch-XP (Dasgip, Jülich, Deutschland) wurden unterschiedliche, konstante, quasikontinuierliche Zulaufzeiten im Bereich von 0,25-6,8 mL min⁻¹ realisiert. Hierbei wurden über die acht teflonbeschichteten Spitzen des Pipettierroboters Einzelvolumina von 10-100 µL direkt in die gerührte wässrige Phase zugegeben. Der Arbeitsablauf wurde dabei so programmiert, dass die Spitzen des Pipettierroboters nach jeder Zugabeeinheit aus dem Reaktor zurückgezogen wurden. So wurde verhindert, dass sie unerwünschterweise als Strömungsbrecher fungieren und so das im Rührkesselreaktor vorliegende Strömungsprofil beeinträchtigen.

Probenahme

Die Probenahme erfolgte stets mit Hilfe einer 1 mL-Spritze und einer Mehrwegkanüle (Innendurchmesser: 1,5 mm) über die hierfür vorgesehene Öffnung im Reaktordeckel. Um die Homogenität der Probe zu gewährleisten, wurde sie direkt aus der gerührten, wässrigen Phase entnommen.

4.3.3 Liter-Maßstab

Die Maßstabsübertragung des Prozesses zur Herstellung von Polymersomen in Rührkesselreaktoren wurde im Laborreaktor KLF 2000 (BioEngineering, Wald, Schweiz) realisiert. Im Folgenden werden der Versuchsaufbau sowie die verwendeten Rührergeometrien genauer erläutert.

Versuchsaufbau und Herstellung der Polymervesikel

Ein Schema des Versuchsaufbaus zur Herstellung von Polymervesikeln im Liter-Maßstab im Laborreaktor (Durchmesser D : 0,10 m) ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

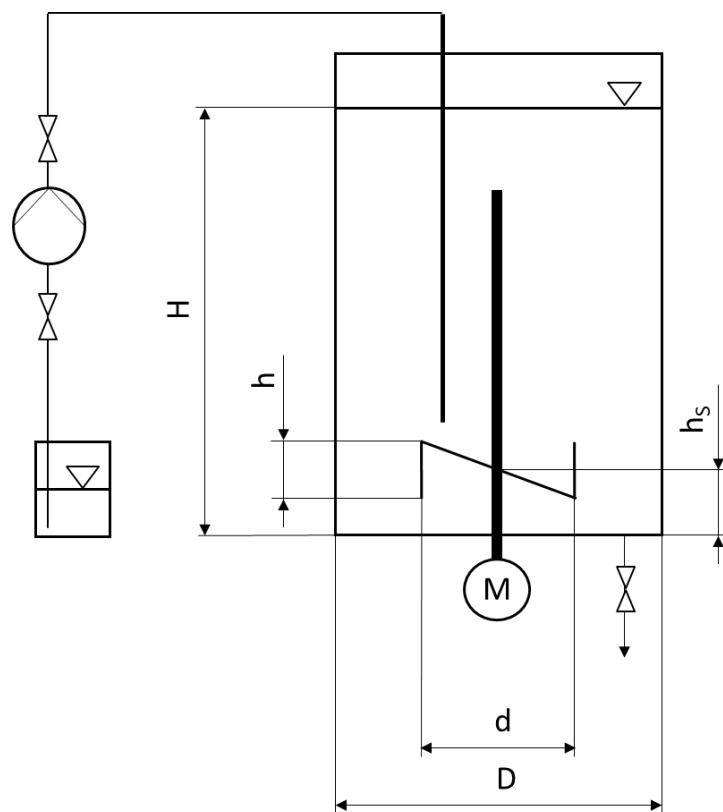


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Herstellung von Polymersomen im Liter-Maßstab. Die 20 % w/v Polymerlösung wird mit Hilfe einer Schlauchpumpe direkt in gerührtes, H_2O (Füllhöhe H) in den Reaktor (Durchmesser D) geleitet. Der Rührer (Durchmesser d , Höhe h , Einbauhöhe h_s) wird über einen Motor M unterhalb des Reaktors im Uhrzeigersinn angetrieben.

In diesem Maßstab erfolgte die Vesikelherstellung ausschließlich über die Ethanolmethode. Um eine Polymerkonzentration von 1 % w/v bei einem Reaktionsvolumen V von 1,5 L (Füllhöhe H : 0,22 m) zu erreichen, wurden 0,075 L der 20 % w/v Polymerlösung aus einem Vorratsbehälter mit Hilfe einer Schlauchpumpe (GUV-150, Meredos, Bovenden, Deutschland) über ein Zulaufrohr (Innendurchmesser: 50 mm) direkt in 1,425 L dd H₂O geleitet (Zulauftrate \dot{V} : 15 L h⁻¹). Direkt nach abgeschlossener Zudosierung der Polymerlösung wurde das Zulaufrohr aus dem Reaktor entfernt. Die verwendeten Rührertypen (Durchmesser d , Höhe h , Einbauhöhe h_s) wurden über eine Rührerwelle durch einen Motor M unterhalb des Reaktors im Uhrzeigersinn angetrieben. Die Bestimmung der Korrekturgleichung zur Berechnung der realen Rührerdrehzahl über die am Display des Steuergerätes angezeigte Rührerdrehzahl ist in Kapitel 13.1.4 zu finden. Die Probenahme erfolgte über ein Probenahmeventil am Boden des Reaktors. Die Polymervesikel wurden im unbewehrten Laborreaktor und im Reaktor mit vier gleichmäßig verteilten Strömungsbrechern (Höhe: 28 cm, Breite: 1 cm) hergestellt.







Rührer

Für die Polymersomenherstellung im Liter-Maßstab fanden fünf unterschiedliche Standardrührer, dargestellt in Tabelle 4-2, Verwendung. Klassische Scheibenrührer, die ein radiales Strömungsprofil erzeugen, wurden ebenso eingesetzt wie Propellerrührer, die eine axiale auf- oder abwärts Strömung hervorrufen. Es wurden verschiedene Rührer mit variierendem Durchmesser d und unterschiedlicher Höhe h sowie mit drei, vier oder sechs Rührerblättern unterschiedlichen Anstellwinkels α (von 20° bis 90°) eingesetzt. Die Rührer wurden je nach Anforderung an den Leistungseintrag bei einer Höhe h_s von 50 mm oder 72 mm eingebaut.

Bestimmung des Leistungseintrags

Der charakteristische Leistungseintrag der verschiedenen Rührorgane (vgl. Tabelle 4-2) im Laborrührkesselreaktor wurde differentiell über ein direkt an den Rührermotor angeschlossenes Wattmeter (2100 Digital Watt Analyzer, Valhalla Scientific, San Diego, USA) gemessen. Der Leistungseintrag wurde im Bereich von 0-2000 min⁻¹ im leeren Reaktor und im mit 1,5 L dd H₂O befüllten Reaktor bestimmt. Über die Differenz der Werte aus beiden Messungen wurde die netto in die Flüssigphase eingebrachte Leistung bestimmt.

Tabelle 4-2: Charakteristika der im Liter-Maßstab verwendeten Rührertypen R1-R5 mit Rührerdurchmesser d , Rührerhöhe h , Reaktordurchmesser D , Füllhöhe im Reaktor H , Anstellwinkel der Rührerblätter α .

Rührer	Abbildung	Strömungsprofil	d, mm	h, mm	$h d^{-1}, -$	$d D^{-1}, -$	$h H^{-1}, -$	Anzahl Rührer	$\alpha, ^\circ$
R1 ^a		Radial	40	8	0,200	0,40	0,036	6	90
R2 ^a		Axial, ab	48	12	0,250	0,45	0,054	4	20
R3 ^b		Axial, ab	54	24	0,444	0,54	0,109	3	25
Links R4a ^b		R4a: Axial, auf	65	52	0,800	0,65	0,236	3	45
Rechts R4b ^b		R4b: Axial, ab							
R 5 ^b		Axial, ab	90	35	0,388	0,90	0,159	3	25

^a BioEngineering, Wald, Schweiz, ^b Infors HT, Bottmingen, Schweiz

4.4 Beladene Polymervesikel

In dieser Arbeit wurden Polymervesikel mit Molekülen unterschiedlicher Größe beladen. Kleine Moleküle wie der Fluorophor Calcein (0,6 kDa) wurden ebenso verkapselt wie grün fluoreszierendes Protein (eGFP) (29,1 kDa) (Cormack *et al.*, 1996) und *N*-Acetylneuraminatlyase aus *Escherichia coli* K12 (NAL) (4x34,8 kDa). Die Lösungen mit den zu verkapselnden Molekülen wurden in Tris-Puffer, pH 8, (Kapitel 13.1) angesetzt.

4.4.1 Herstellung

Die Polymervesikel wurden direkt während des Herstellungsprozesses in miniaturisierten Rührkesselreaktoren (Kapitel 4.3.2) mit den gewünschten Molekülen beladen. Hierfür wurden 11,4 mL der Lösung mit der gewünschten Konzentration an zu verkapselnden Molekülen bei 4000 min⁻¹ mit dem S-Rührer in unbewehrten Rührkesselreaktoren bei 4 °C (NAL) oder 25 °C (Calcein, eGFP) gerührt. Durch die Zugabe von 0,6 mL einer 20 % w/v Polymerlösung mittels der Injektionsmethode (Kapitel 4.3.1) wurde die Verkapselung der Gastmoleküle im Inneren der Vesikel direkt während der Formierung der Polymersomen innerhalb von ca. 2 h (abhängig von der Art der Gastmoleküle) erzielt.

4.4.2 Reinigung

Dialyse

Die Dialyseschläuche wurden vor Verwendung mindestens 30 min in Tris-Puffer äquilibriert. Danach wurden diese mit der zu reinigenden Polymersomendispersion befüllt und bei 4 °C und leichtem Rühren gegen ein Puffervolumen von mindestens dem 100-fachen des Probenvolumens dialysiert. Dies wurde wiederholt, bis der zu dialysierende Stoff mit den jeweiligen analytischen Methoden außerhalb der Dialysemembran nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Für mit Calcein beladene Polymervesikel wurde ein Dialyseschlauch mit der Ausschlussgröße 12-14 kDa verwendet. Im Fall von mit Proteinen beladene Polymersomen betrug diese 300 kDa.

Größenausschlusschromatographie

Für die Reinigung der beladenen Polymersomendispersion mittels Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) wurde das poröse Material Sepharose 4B (Agarose Gelfiltrationsmedium) mit einem Trennbereich von 70-20.000 kDa verwendet. Große Partikel wie Polymervesikel dringen nicht in die Poren der stationären Phase ein. Sie verlassen demnach die Säule als erstes zusammen mit der mobilen Phase. Die deutlich kleineren, nicht verkapselten Moleküle dringen auf ihrem Weg durch die Säule in die

Poren des porösen Packungsmaterials ein und werden dadurch später eluiert. Somit wird die Retentionszeit beziehungsweise das nötige Elutionsvolumen von der Größe der Partikel bestimmt. Die SEC ermöglicht auf diese Weise die Trennung der beladenen Vesikeln von nicht verkapselten Molekülen. Eine schematische Darstellung dieser Reinigungsmethode ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

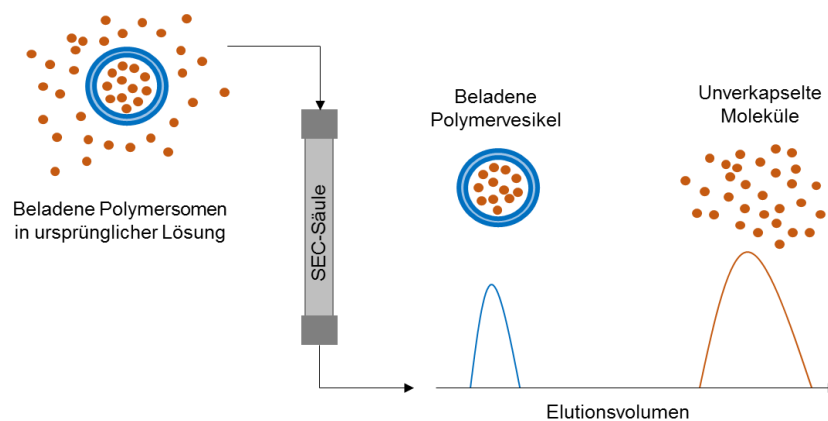


Abbildung 4.5: Reinigung von beladenen Polymervesikeln über Größenausschlusschromatographie (SEC): Die vergleichsweise großen, beladenen Polymervesikel verlassen die Säule vor den signifikant kleineren, unverkapselten Molekülen.

Bei großen zu reinigenden Volumina (10-20 mL) wurde eine 140 mL fassende SEC-Säule verwendet. Nach Equilibrierung der Säule mit mindestens zwei Säulenvolumina entgastem Tris-Puffer wurde sie mit zu reinigenden Polymersomen beladen und diese anschließend bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1} aufgetrennt. Die gereinigte Probe wurde mit Hilfe eines Fraktionierers automatisch in 5 mL Fraktionen gesammelt.

Kleine Probenvolumina (0,1-0,5 mL) wurden manuell über 2,5 mL fassende, gravitationsgetriebene und ebenfalls mit Sepharose 4B gepackte SEC-Säulen gereinigt. Diese wurden nach Equilibrierung (analog zur 140 mL SEC-Säule) manuell mit Hilfe einer Pipette beladen. Anschließend wurde die Probe ebenfalls manuell sukzessiv mit 200 μL Tris-Puffer eluiert und in Fraktionen desselben Volumens aufgetrennt.

4.4.3 Lyse

Die Lyse der beladenen Polymersomen erfolgte chemisch mit Hilfe des nicht-ionischen Tensids *n*-Octylpolyoxyethylen (OPOE). Dieses wurde zunächst als 10 % v/v Stammlösung in dd H₂O angesetzt. Um die Desintegration der Polymermembran zu erreichen, wurde sie mit der Polymersomendispersion zehnfach verdünnt. Die Endkonzentration von 1 % v/v Detergenz führte ohne Inkubationsdauer zum vollständigen Aufschluss der Vesikel.

4.5 Mechanische und thermische Belastung von Polymervesikeln

Zur Charakterisierung der mechanischen und thermischen Stabilität von unbeladenen und beladenen Polymervesikeln (0,5 % w/v oder 1,0 % w/v), hergestellt über die Injektionsmethode (Kapitel 4.4.1), wurden diese bei unterschiedlichen Temperaturen mit Scherkräften belastet. Soweit nicht anders erwähnt, erfolgten die Versuche im Dreifachansatz.

4.5.1 Extrusion

Die Extrusion erfolgte mit dem Ziel, Polymersomen mit den typischerweise bei diesem Verfahren wirkenden Scherkräften zu beanspruchen. Hierfür wurde die Dispersion mit unbeladenen oder beladenen Polymervesikeln bei Raumtemperatur (RT) mehrfach extrudiert. Dies erfolgte manuell mit einer Spritze und einer in einen Spritzenvorsatzfilter integrierbaren Einweg-Polycarbonat-Membran mit definierten Porengrößen von 0,1 μm oder 0,2 μm . Zur Verdrängung der Luftblasen aus den Nanoporen wurden die Membranen 30 min vor Verwendung im Puffer der jeweiligen Polymersomendispersion eingelegt.

4.5.2 Konstante Scherraten

Der Einfluss verschiedener konstanter Scherraten auf Polymersomendispersionen wurde mit Hilfe einer temperierbaren Doppelspaltapparatur (Rheomat RM 115, proRheo, Althengstet, Deutschland), bestehend aus zwei Messzylindern, bei 30-50 °C untersucht. Über 15 definierte Geschwindigkeitsstufen wurden in dem 2 mm breiten Spalt konstante Scherraten im Bereich von 0,266-3430 s^{-1} erzeugt. Für die Messungen wurden 15 mL der zu untersuchenden Polymersomendispersion in den Doppelspalt gefüllt. Die Probenahme von jeweils 0,5 mL im Zeitraum von bis zu 24 h erfolgten mit einer Spritze über eine Einwegkanüle direkt aus dem Doppelspalt. Die Proben wurden anschließend zur Entfernung möglicher Polymeraggregate in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen zentrifugiert (16.200xg, 6 min, RT).

4.5.3 Prozessbedingungen in miniaturisierten Rührkesselreaktoren

Stabilität unbeladener Polymersomen während der Herstellung

Die mechanische Stabilität der Polymersomen während des Herstellungsprozesses via Dispersions- und Ethanolmethode bei 25 °C wurde unter Verwendung des Paddel-Rührers, des H-Rührers und des S-Rührers (Kapitel 4.3.2) in unbewehrten Rührkesselreaktoren bei 2000-4000 min^{-1} bis zu 48 h untersucht. Die Proben (0,5 mL) wurden in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen zentrifugiert (16.200xg, 6 min, RT). Der Überstand diente der Analytik mittels DLS-Messung (Kapitel 4.7.2) wohingegen das Pellet für die Bestimmung der Polymertrockenmasse (Kapitel 4.10.1) herangezogen wurde.

Stabilität unbeladener Polymersomen nach der Herstellung

Die Stabilität von unbeladenen Polymersomen wurde in unbewehrten Reaktoren untersucht. Die Polymersomendispersion wurde durch Rotation des S-Rührers in unbewehrten Reaktoren bei 1000-4000 min⁻¹ und bei Prozesstemperaturen von 8-60 °C bis zu 48 h beansprucht. Die Proben (0,5 mL) wurden ohne Zentrifugation für die Analytik mittels DLS-Messung (Kapitel 4.7.2) und Trübungsmessung (Kapitel 4.7.3) verwendet.

Stabilität beladener Polymersomen nach der Herstellung

Es wurde die Stabilität von mit 15 mM Calcein und mit 300 µg mL⁻¹ NAL (Einfachansatz) beladenen Polymersomen untersucht. Für das Aufbringen der mechanischen Belastung wurde der S-Rührer in unbewehrten Milliliter-Reaktoren bis zu 48 h betrieben. Dabei wurden konstante Rührerdrehzahlen im Bereich von 100-1000 min⁻¹ und Prozesstemperaturen von 8-40 °C realisiert. Die Proben (0,1 mL) wurden zum einen für DLS-Messungen (Kapitel 4.7.2) und zum anderen für Fluoreszenzmessungen (Kapitel 4.10.4) beziehungsweise die Bestimmung der NAL-Konzentration (Kapitel 4.10.3) herangezogen. Um den relativen Austritt der Gastmoleküle zu bestimmen wurden die beiden letztgenannten analytischen Methoden sowohl bei unlysierten als auch bei mittels des Detergenz OPOE aufgeschlossenen Polymersomen (Kapitel 4.10.2) durchgeführt.

4.6 Belastung von Polymervesikeln in Zweiphasensystemen

Die Stabilität von unbeladenen Polymersomen (1 % w/v in dd H₂O), hergestellt über die Injektionsmethode (Kapitel 4.3.2), in Zweiphasensystemen wurde im Mikroliter- und Milliliter-Maßstab sowie in miniaturisierten Rührkesselreaktoren untersucht. Soweit nicht anders erwähnt, erfolgten die Versuche im Dreifachansatz.

4.6.1 Verwendete Zweiphasensysteme

Es wurden 23 verschiedene, nicht mit Wasser mischbare Lösemittel aus den chemischen Gruppen der Ether und Ester (Tabelle 13-19), der Ketone (Tabelle 13-20), der Alkohole (Tabelle 13-21) sowie der aliphatischen, aromatischen und chlorierten Kohlenwasserstoffe (Tabelle 13-22) zur Bildung der Zweiphasensysteme verwendet. Die Strukturformeln der Lösemittel und ihre charakteristischen Werte für ihren $\log P$ (Kapitel 3.3.3), ihren Siedepunkt T_{SP} und ihre Dichte $\rho_{20^\circ C}$ sind in Tabelle 13-19 bis Tabelle 13-22 zusammengefasst. Zudem wurden drei verschiedene ionische Flüssigkeiten mit unterschiedlichem Kation (1-Butyl-3-methyl-imidazolium [BMIM]⁺, 1-Hexyl-1-methylpyrrolidinium [HMPL]⁺, N-Hexylpyridinium

[HPYR]⁺) und jeweils demselben Anion (Bis(trifluormethylsulfonyl)imid [NTF]⁻) verwendet. In Tabelle 13-23 sind die zugehörigen Strukturformeln dargestellt.

4.6.2 Mikroliter-Maßstab

Der Einfluss des $\log P$ (Gleichung (3.33)) der 23 Lösemittel und der Einfluss der drei ionischen Flüssigkeiten [BMIM] [NTF], [HMPL] [NTF] und [HPYR] [NTF] auf die Polymersomenstabilität in Zweiphasensystemen wurde in 200 μL -Reaktionsgefäßen bei einem Gesamtvolumen von 100 μL untersucht. Die Konzentration des Lösemittels beziehungsweise der ionischen Flüssigkeit betrug dabei 1 % v/v oder 10 % v/v. Die zwei Phasen wurden in speziellen Einsätzen durch Schütteln der Reaktionsgefäße in einer Schwingmühle (3 min, 3 s⁻¹, RT) in Kontakt gebracht. Die Phasentrennung mittels Zentrifugation (16.200xg, 6 min, RT) wurde mit Hilfe derselben Einsätze durchgeführt. Die Probenahme (0,05 mL) aus der wässrigen Phase erfolgte mit einer Spritze und einer Einwegkanüle.

4.6.3 Milliliter-Maßstab

Die wässrige Polymersomendispersion und die Lösemittelphase beziehungsweise die ionische Flüssigkeit wurden im Milliliter-Maßstab in zylindrischen Glasgefäßen (5 mL Nominalvolumen) bei einem Gesamtvolumen von 1 mL in Kontakt gebracht. Der Anteil der nicht-wässrigen Phase betrug 10 % v/v beziehungsweise 20 % v/v. Die Durchmischung wurde mit einem Kreuzbalkenrührer realisiert (150 min⁻¹, 24 h, RT). Für die Phasentrennung wurde der gesamte Reaktionsansatz in 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (16.200xg, 6 min, RT). Die Probenahme (0,1 mL) aus der wässrigen Phase erfolgte mit einer Spritze und einer Einwegkanüle.

4.6.4 Miniaturisierte Rührkesselreaktoren

Es wurde die Stabilität von unbeladenen und von mit 15 mM Calcein oder mit 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NAL (Einfachansatz) beladenen Polymersomen in Gegenwart von 20 % v/v nicht-wässriger Phase untersucht. Die zwei Phasen wurden mittels des S-Rührers (Kapitel 4.3.2) bei 500 min⁻¹ und bei 25 °C in unbewehrten Reaktoren bis zu 48 h lang in Kontakt gebracht. Die Proben (0,1 mL) wurden in 200 μL -Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (16.200xg, 6 min, RT). Anschließend wurde der Verlust an Calcein (Kapitel 4.10.4) beziehungsweise NAL (Kapitel 4.10.3) anhand der wässrigen Phase bestimmt.

4.7 Charakterisierung von Polymervesikeln

4.7.1 Messung der statischen Lichtstreuung

Die Charakterisierung von Polymervesikeln mittels statischer Lichtstreuung (SLS) zur Bestimmung der Aggregationszahl, Gleichung (3.4), wurde von der Firma ALV (Langen, Deutschland) im Rahmen einer Auftragsmessung durchgeführt. Es wurde ein ALV/CGS-3 Compact Goniometer, ausgestattet mit einem grünen, frequenz-gedoppelten Neodym-dotierten Yttrium-Aluminium-Granat-Laser (Nd:YAG-Laser) (532 nm) verwendet. Hierfür wurde eine Polymersomendispersion (1 % w/v, dd H₂O) über die Injektionsmethode hergestellt (Kapitel 4.3.2) und drei Mal mit Hilfe von PC-Membranen mit einem Porendurchmesser von 200 nm extrudiert. Die Polymersomendispersionen wurden verdünnt (0,05 % w/v, 0,1 % w/v, 0,167 % w/v und 0,2 % w/v) und jeweils bei Streuwinkeln zwischen 20-150° bei 25 °C vermessen. Das für die Bestimmung notwendige Refraktionsindex-Inkrement dn/dc^{-1} der PMOXA-PDMS-PMOXA-Vesikel wurde mit dem Wert 0,188 mL g⁻¹ angenommen. Dieser Wert für Polymervesikel aus PMOXA₂₂-PDMS₇₂-PMOXA₂₂ (ähnliche Kettenlänge zu dem in dieser Arbeit verwendeten Polymer PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅) bestimmt (Nardin *et al.*, 2000a). Um die mittlere molekulare Masse eines Vesikels zu bestimmen, wurden die Daten über einen Berry-Plot (Kapitel 13.1.5) extrapoliert.

4.7.2 Messung der dynamischen Lichtstreuung

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung bei der Messung der dynamischen Lichtstreuung (DLS) ist von erheblicher Wichtigkeit. Um Fehlmessungen zu vermeiden wurden generell alle Flüssigkeiten, die zur Herstellung der Polymervesikel (Kapitel 4.3) oder zum Verdünnen der Proben verwendet wurden, filtriert (0,2 µm).

Polymersomendispersionen, die über die Dispersionsmethode hergestellt wurden, wurden vor der DLS-Messung zentrifugiert (16.200xg, 6 min, RT). Selbiges erfolgte für Polymersomen, die über die Ethanolmethode hergestellt und direkt mit Polymersomen aus der Dispersionsmethode verglichen wurden. Der Überstand wurde anschließend 10-fach mit dem jeweiligen Dispersionsmittel (dd H₂O oder Puffer) verdünnt. Für Proben von Polymersomen, die über die Ethanolmethode hergestellt wurden, jedoch nicht mit Proben von Polymersomen, die über die Dispersionsmethode hergestellt wurden, verglichen wurden, erfolgte keine Probenvorbereitung. Sie wurden direkt 10- oder 100-fach mit dem jeweiligen Dispersionsmittel verdünnt. Durch die Verdünnung wurde gewährleistet, dass die Probenkonzentration im optimalen Messbereich von 0,1 mg mL⁻¹ für Partikelgrößen von 10-100 nm und 0,01 mg mL⁻¹

für Partikelgrößen von 100-1000 nm (Malvern, 2013) lag. Die Proben (0,5 mL) wurden in 10 mm Halbmikro-Küvetten aus Polycarbonat vermessen. Die Filtration oder Extrusion der Polymersomendispersion, wie sie üblicherweise vor der DLS-Messung angewendet wird (Nardin *et al.*, 2000a; Nardin und Meier, 2001; Kita-Tokarczyk *et al.*, 2005), wurde nicht durchgeführt. Dadurch konnte die Beeinflussung der ursprünglichen Partikelgrößenverteilung vermieden werden.

Verwendetes Gerät und Geräteeinstellungen

Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung der Polymersomendispersion wurde ein Zetasizer Nano S ZEN 1600 (Malvern, Worcestershire, UK) verwendet. In Abbildung 4.6 ist die Funktionsweise der DLS-Messung systematisch dargestellt.

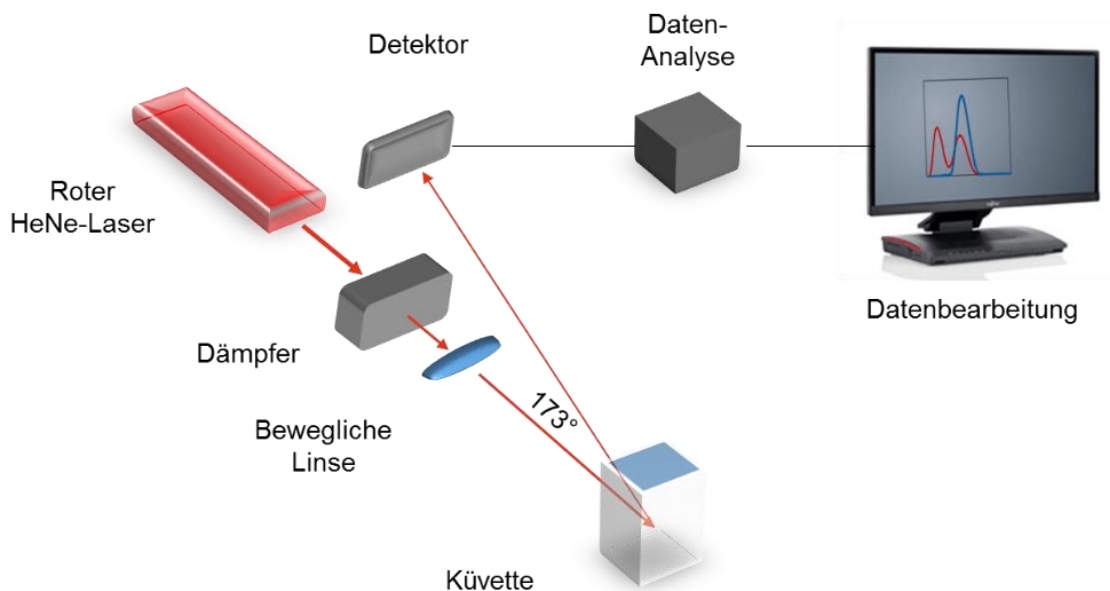


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der DLS-Messung. Die Intensität des roten Helium-Neon-Gaslaser der Wellenlänge 633 nm kann durch einen Dämpfer automatisch angepasst werden. Durch die bewegliche Linse ist der Messort in der Küvette ebenfalls automatisch optimierbar. Die Messung erfolgt bei einem Streuwinkel von 173°. Nach Erfassung der Photonen am Detektor werden die Daten analysiert und liegen dann dem Nutzer für die weitere Datenbearbeitung am Computer vor.

Dieses DLS-Gerät ist mit einem roten Helium-Neon-Gaslaser der Wellenlänge 633 nm (Laserleistung: 4 mW, Strahldurchmesser: 0,63 mm), dessen Stärke mit Hilfe eines Dämpfers von 0,0003-100 % in elf Stufen reguliert werden kann, ausgestattet. Über einen sogenannten *avalanche* Photodioden-Detektor können Partikel im Größenbereich von 0,3-10.000 nm erfasst werden. Dabei wird die NIBS® (*Non-Invasive-Back-Scatter*)-Methode angewendet. Dies bedeutet, dass das von der Probe gestreute Licht nicht wie sonst üblich im 90°-Winkel, sondern bei 173° gemessen wird. Da große Partikel das Licht überwiegend vorwärts streuen, wird durch diese Technologie gewährleistet, dass die Präsenz von kleinen Partikeln in der

Probe nicht durch die erheblich höhere Streuung von großen Partikeln maskiert wird. Zum anderen kann durch eine bewegliche Linse vor dem Laser der Messort in der Zelle variiert werden. Proben mit sehr wenigen und/oder sehr kleinen Partikeln können mit einem maximalen gemessenen Volumen bis zur Küvettenmitte gemessen werden. Dies erhöht das Verhältnis von Signal zu Messrauschen und verbessert damit die Sensitivität der Messung. Stark konzentrierte Proben oder solche mit vielen großen Partikeln können am Rand der Küvette vermessen werden. Dies verhindert messungsverfälschende Mehrfachstreuung (Malvern, 2013).

Der Laser ist nach dem Einschalten innerhalb von 30 min betriebsbereit. Um anschließend eine ausreichende Anzahl an detektierten Photonen (Zählrate ZR , $2\text{-}4\cdot 10^5$ Detektionen pro Sekunde) zu gewährleisten, wurde sowohl die Dämpfung des Lasers als auch der Messort in der Küvette bei jeder Messung automatisch mit Hilfe der Software (Zetasizer Software 7.01, Malvern, Worcestershire, UK) optimiert. Dies erlaubt nicht nur die Messung von Proben verschiedenster Partikelgrößen, sondern auch von Proben innerhalb eines weiten Konzentrationsbereiches. Die Temperierung der Probe erfolgte durch ein im Gerät integriertes Peltier-Element. Um die Messung bei $25\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ zu gewährleisten, wurden die Proben vor Beginn der Messung 60 s geräteintern äquilibriert. Für jede Probe wurden drei Messungen mit je zehn Messzyklen durchgeführt. Die Messdauer eines einzelnen Messzyklus wurde durch die Software automatisch angepasst. Alle gemessenen Parameter wurden aus drei Hauptmessungen gemittelt. Weitere Softwareeinstellungen können im Detail Kapitel 13.4 entnommen werden.

Gemessene Größen

Die mittels der detektierten Photonen generierte Autokorrelationsfunktion wurde zum einen über die Kumulanten-Analyse und zum anderen über die Verteilungs-Analyse ausgewertet. Dabei liefert die Kumulanten-Analyse Werte für das z-Mittel und den PDI, Gleichung (3.19) und Gleichung (3.20). Die intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilung wird über eine Dekonvolution der Autokorrelationsfunktion generiert. Dies erfolgte über einen NNLS Fit-Algorithmus, hier über die *General Purpose*-Funktion. Die anzahlbasierte Partikelgrößenverteilung sowie der anzahlbasierte mittlere Partikeldurchmesser d_N wurden über weitere softwarespezifische Rechenalgorithmen aus der intensitätsbasierten Partikelgrößenverteilung generiert. Zur Bestimmung der Qualität der Polymersomen wurden folgende fünf, von der Software direkt ausgegebene Qualitätsmerkmale betrachtet:

- Intensitätsbasierter, hydrodynamischer Teilchendurchmesser (z-Mittel)
- Polydispersitätsindex (PDI)
- Intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilung
- Anzahlbasierte Partikelgrößenverteilung
- Anzahlbasierter Partikeldurchmesser (d_N)

Die Breite der Verteilung wurde anhand des Wertes des PDI, wie in Tabelle 4-3 zusammengefasst, bewertet. Schmale Partikelgrößenverteilungen liegen bei einem PDI < 0,2 vor (Charcosset *et al.*, 2015).

Tabelle 4-3: Bewertung der Breite der Partikelgrößenverteilung über den PDI.

Bereich	Bewertung
0,0 < PDI < 0,05	Monodisperse Verteilung
0,1 < PDI < 0,2	Schmale Verteilung
0,2 < PDI < 0,5	Breite Verteilung
0,7 < PDI < 1,0	Sehr breite, nicht auswertbare Verteilung

Die Anzahl an Photonen, die pro Zeiteinheit detektiert wird (Zählrate ZR), gibt indirekt Aufschluss über die Quantität der in der Probe vorliegenden Polymersomen. Sie wird in der Einheit *kilo counts per second* ($kc\ s^{-1}$), also in Tausend Zählungen pro Sekunde angegeben. Die Zählrate wird automatisch bei jeder DLS-Messung bestimmt. So kann das Verhältnis der Zählrate einer belasteten Probe ZR_t zur Zählrate der unbelasteten Probe ZR_0 eine Abschätzung des relativen Verlustes an Polymersomen zwischen $t = 0$ und t geben.

$$Relative\ ZR = \frac{ZR_t}{ZR_0} \quad (4.1)$$

ZR	Zählrate	$kc\ s^{-1}$
ZR_t	Zählrate der belasteten Probe zum Zeitpunkt t	$kc\ s^{-1}$
ZR_0	Zählrate der unbelasteten Probe zum Zeitpunkt $t = 0$	$kc\ s^{-1}$

Bei unveränderter Partikelgrößenverteilung entspricht ein Wert von 1 einem Polymersomenerhalt von 100 %.

4.7.3 Trübungsmessung

Die Trübung beziehungsweise die Extinktion der Polymersomendispersion wurde bei 280 nm in 96 UV-Platten mit 96 Kavitäten (100 μ L Probenvolumen) oder mit 384 Kavitäten (50 μ L

Probenvolumen) in einem Plattenphotometer (infinite M200, Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen.

Polymervesikelbildung

Nach der Polymerzugabe über die Injektionsmethode (Kapitel 4.3.1) wurden während des Vesikelbildungsprozesses zu verschiedenen Zeitpunkten Proben (0,1 mL) entnommen. Die Extinktionsmessung erfolgte anhand der 5-fach mit dd H₂O verdünnten Proben.

Indirekte Quantifizierung nach mechanischer oder chemischer Belastung

Der relative Verlust an Polymersomen in einer Dispersion kann neben der Bestimmung der relativen Zählrate (Kapitel 4.7.2) auch durch die Bestimmung der relativen Extinktion erfolgen. Es wurde die Extinktion einer belasteten Probe zum Zeitpunkt t (E_t) zur Extinktion der unbelasteten Probe zum Zeitpunkt $t = 0$ (E_0) ins Verhältnis gesetzt.

$$\text{Relative } E_{280 \text{ nm}} = \frac{E_{280 \text{ nm},t}}{E_{280 \text{ nm},0}} \quad (4.2)$$

$E_{280 \text{ nm}}$	Extinktion bei 280nm	-
$E_{280 \text{ nm},t}$	Extinktion bei 280 nm zum Zeitpunkt t	-
$E_{280 \text{ nm},0}$	Extinktion bei 280 nm zum Zeitpunkt $t = 0$	-

Bei unveränderter Partikelgrößenverteilung entspricht ein Wert von 1 einem Polymersomenerhalt von 100 %.

4.7.4 Elektronenmikroskopie

Die Charakterisierung der Polymervesikel beziehungsweise der Polymermembran über bildgebende Verfahren wurden am Lehrstuhl für Elektronenmikroskopie (Fakultät für Chemie, TU München) durchgeführt. Hierfür wurden Polymersomen, die über die Ethanolmethode (Kapitel 4.3.2) in miniaturisierten Rührkesselreaktoren in dd H₂O hergestellt wurden (1 % w/v), verwendet.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur Probenvorbereitung wurde die Polymersomendispersion 100-fach in dd H₂O verdünnt. Anschließend wurden 2 μ L der Probe auf ein plasmabehandeltes Kupfer-Netz pipettiert und mit 2,5 % Uranylacetat überzogen. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden in einem

JEM 100 CX (JEOL, Tokyo, Japan) bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV oder in einem JEM 2011 (JEOL, Tokyo, Japan) bei 120 kV aufgenommen.

Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM)

Auf ein plasma-behandeltes Kupfernetz wurden 2 μL der 100-fach verdünnten (dd H_2O) Polymersomendispersion pipettiert. Nach 30 s Adsorptionszeit wurde die Probe vorsichtig mit einem Filterpapier abgetupft. Das Kupfernetz wurde anschließend in flüssigem Ethan bei $-178\text{ }^\circ\text{C}$ schockartig gefroren. Die mikroskopischen Bilder wurden mit einem JEM 2010 (JEOL, Tokyo, Japan) bei 120 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen.

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit Hilfe des Niedervakuum-Mikroskops JSM 5900 LV (JEOL, Tokyo, Japan) bei 15 kV aufgenommen. Die Proben wurden zuvor luftgetrocknet und mit Gold besputtert.

4.7.5 Viskositätsmessung

Die Viskosität der Polymersomendispersion (1 % w/v in dd H_2O), hergestellt über die Injektionsmethode (Kapitel 4.3.2), wurde in einem Rotationsrheometer (RheolabQC, Anton Paar GmbH, Ostfildern, Deutschland) in einer zylindrischen Doppelspalt-Vorrichtung gemessen. Die temperierbare Messzelle wurde mit 13 mL der Polymersomendispersion befüllt und vor Beginn der Messung 1 min bei 10 s^{-1} durchmischt. So wurde eine homogene Temperaturverteilung der Probe gewährleistet. Über die Ansteuerung des Rotationsrheometers mit der zugehörigen Software (Rheoplus, Anton Paar GmbH, Ostfildern, Deutschland) wurde eine lineare Zunahme der Scherrate von $10\text{-}4000\text{ s}^{-1}$ erzeugt. Die Viskosität der Polymersomendispersion wurde bei $8\text{-}40\text{ }^\circ\text{C}$ bestimmt.

4.8 Bestimmung der Membranpermeabilität

4.8.1 Planare Membranen

Die Permeabilität von planaren Membranen wurde mit Hilfe des PAMPA-Systems (Kapitel 3.3.2) bestimmt.

Funktionsweise des PAMPA-Systems

Die Basis des PAMPA-Systems wird von zwei übereinander liegenden Mikrotiterplatten mit je 96 Kavitationen gebildet. Am Boden der Kavitäten der oberen Platte befindet sich je ein Filter aus Polyvinylidendifluorid (PVDF). Gestützt durch den Filter kann in dessen Poren eine Lipid-

oder Polymermembran ausgebildet werden. Bei der Untersuchung der passiven Diffusion eines Stoffes über die Membran fungiert die untere Kavität als Donor-, und die obere Kavität als Akzeptorphase, wie in Abbildung 4.7 A dargestellt.



Abbildung 4.7: Aufbau des PAMPA-Systems. A) Der in der Donorphase gelöste Stoff wird durch passive Diffusion über in PVDF-Filtern gebildeten Membranen in die Akzeptorphase nach oben transportiert. B) PAMPA-Sandwich mit Scheibenrührern in Donor-Kavität (unten) und Akzeptor-Kavität (oben). C) Gut-Box mit magnetischem Antrieb für die Scheibenrührer.

Der zu analysierende Stoff liegt zu Beginn des Versuchs ausschließlich in der Donorphase vor. Durch passive Diffusion gelangt der Stoff mit der Zeit über die filtergestützte Membran in die darüber liegende Akzeptorphase. Dabei stellt die wässrige Grenzschicht zu beiden Seiten der Membran (Kapitel 3.3.2) insbesondere für hydrophobe Stoffe eine stärkere Diffusionsbarriere dar als die Membran selbst. Um diesen unerwünschten Effekt zu reduzieren, kann sowohl die Donor- als auch die Akzeptorphase individuell gerührt werden. Hierfür wurde jede Kavität mit einem magnetischen Scheibenrührer bestückt (Abbildung 4.7 B). Ein in der sogenannten Gut-Box (Pion, Billerica, Massachusetts, USA), dargestellt in Abbildung 4.7 C, erzeugtes magnetisches Feld versetzt jeden Scheibenrührer in Rotation um seine horizontale Achse. Da der Rührer die Membran während der Rotation nicht berührt, wird die Membran nicht beschädigt. Auf diese Weise wurden die Ausdehnung der wässrigen Grenzschicht und damit die von ihr ausgehende Stofftransportbarriere reduziert. Dabei kann die Rührerdrehzahl so variiert werden, dass die wässrige Grenzschicht auf wahlweise 25-300 μm reduziert wird. Durch zwei feuchte Schwämme in der verschlossenen Gut-Box wurde unerwünschte Verdunstung vermieden.

Versuchsdurchführung

Sämtliche Versuche wurden bei RT und bei iso-pH, also bei demselben pH in Donor- und Akzeptorphase, durchgeführt. Die Permeabilität wurde in Phosphat-Puffer bei pH 5-8 und in Tris-Puffer bei pH 9 bestimmt. Für die Permeabilitäts-Assays wurden die Puffer mit 0,5 % v/v Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Zur Charakterisierung der Membranpermeabilität wurde in

dieser Arbeit die passive Diffusion der als Modell-Moleküle gewählten Wirkstoffe Propranolol und Koffein (Kapitel 3.3.4) untersucht.

Für die Bildung von planaren Lipidmembranen wurde eine 2 % w/v 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) Lösung in *n*-Dodekan (Lagerung bei -20 °C in 0,1 mL Teilvolumina) hergestellt. Die Lösung zur Bildung der planaren Polymermembran wurde in zwei Schritten hergestellt. Zunächst wurden 60 % w/v Polymer in Chloroform gelöst. Diese Lösung wurde anschließend bis zu einer Konzentration von 2 % w/v in *n*-Dodekan verdünnt und bei Raumtemperatur gelagert.

Zur Vorbereitung des Permeabilitäts-Assays wurden zunächst die Kavitäten der unteren Mikrotiterplatte mit der Donorphase befüllt (ungerührt: 200 µL, gerührt: 180 µL). Zur Bildung der Membran wurde anschließend die Unterseite des PVDF-Filters mit 5 µL der membranbildenden Lösung benetzt. Eine gleichmäßige Verteilung der Lipid- oder Polymermembran ist durch eine sich gleichmäßig ausbildende Transparenz des PVDF-Filters zu erkennen. Die obere Mikrotiterplatte wurde im Anschluss durch seitliches Abkippen auf der unteren Mikrotiterplatte platziert. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass unterhalb des Filters keine Luftblasen entstanden. Anschließend wurden die Kavitäten der oberen Mikrotiterplatte mit demselben Puffer, in dem die Lösung der Donorphase angesetzt wurde, und mit demselben Volumen (ungerührt: 200 µL, gerührt: 180 µL) befüllt. Die Inkubationszeit in der Gut-Box betrug maximal 48 h. Gerührte Assays wurden stets bei der Rührerdrehzahl durchgeführt, die eine wässrige Grenzschicht mit 40 µm Ausmaß hervorruft (Rührerdrehzahl unbekannt). Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Konzentrationen der Modellsubstanzen in Donor- und Akzeptorphase mittels UV-Messung (Kapitel 4.10.4) bestimmt. Sämtliche Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt.

Bestimmung der Permeabilität und des dimensionslosen Konzentrationsverlaufes

Die Permeabilität wurde über Gleichung (3.28) und Gleichung (3.30) bestimmt. Die für die Berechnung notwendige Membranfläche A wurde aus dem Produkt der Fläche des PVDF-Filters (0,3 cm²) und dessen Porosität (0,7) zu 0,21 cm² bestimmt.

Um die Abnahme der Konzentration in der Donorphase beziehungsweise die Zunahme der Konzentration in der Akzeptorphase während des Diffusionsprozesses vergleichbar darstellen zu können, wurden die dimensionslosen Kennzahlen $Ak_{P_{AMPA}}$ und $Do_{P_{AMPA}}$ wie folgt definiert:

$$\begin{aligned}
 Ak_{PAMPA} &= \frac{c_{A,t}}{c_{D,0}} \\
 Do_{PAMPA} &= \frac{c_{D,t}}{c_{D,0}}
 \end{aligned}
 \tag{4.3}$$

Ak_{PAMPA}	Dimensionslose Akzeptorphasen-Kennzahl im PAMPA-System	-
Do_{PAMPA}	Dimensionslose Donorphasen-Kennzahl im PAMPA-System	-
$c_{A,t}$	Akzeptorkonzentration zum Zeitpunkt t	mol cm^{-3}
$c_{D,t}$	Donorkonzentration zum Zeitpunkt t	mol cm^{-3}
$c_{D,0}$	Donorkonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$	mol cm^{-3}

Unter der Bedingung, dass die Volumina in Donor- und Akzeptorphase stets identisch sind ($V_D = V_A$), und mit der Folge, dass die Gleichgewichtskonzentration c_{eq} (Gleichung (3.28)) maximal die halbe Donorkonzentration ($c_{eq} \leq 0,5 c_{D,0}$) erreichen kann, ergeben sich für die dimensionslosen Kennzahlen Ak_{PAMPA} und Do_{PAMPA} folgende Grenzen:

$$\begin{aligned}
 0 &\leq Ak_{PAMPA} \leq 0,5 \\
 0,5 &\leq Do_{PAMPA} \leq 1
 \end{aligned}
 \tag{4.4}$$

In Abbildung 4.8 ist schematisch der Verlauf der dimensionslosen Kennzahlen Ak_{PAMPA} und Do_{PAMPA} über die Inkubationszeit dargestellt.

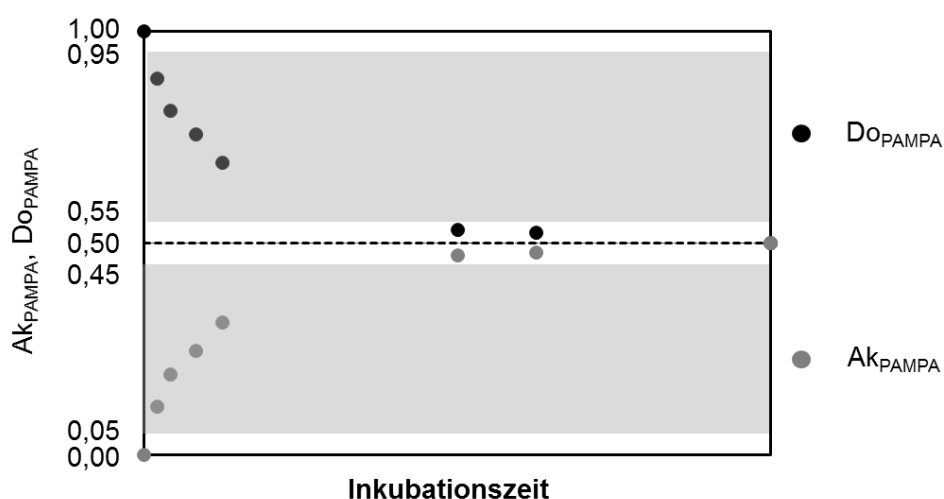


Abbildung 4.8: Dimensionsloser Konzentrationsverlauf während der passiven Diffusion im PAMPA-System. Die dimensionslose Akzeptorphasen-Kennzahl liegt im Bereich von $0 \leq Ak_{PAMPA} \leq 0,5$ und die dimensionslose Donorphasen-Kennzahl im Bereich von $0,5 \leq Do_{PAMPA} \leq 1$. Der graue Bereich hinterlegt die Werte, welche für die Berechnung der Permeabilität berücksichtigt wurden.

Die Permeabilität der Lipid- und Polymermembran gegenüber dem diffundierenden Stoff wurde nach verschiedenen Inkubationsdauern berechnet. Die Inkubationszeiten wurde dabei so gewählt, dass die Gleichgewichtskonzentration c_{eq} in der Akzeptorphase noch nicht erreicht wurde, aber eine ausreichend hohe Konzentration des Analyten für den quantitativen Nachweis vorlag. Dies war dann der Fall, wenn die dimensionslose Akzeptorphasen-Kennzahl im Bereich von $0,05 \leq A_{kPAMPA} \leq 0,45$ und die dimensionslose Donorphasen-Kennzahl im Bereich von $0,55 \leq D_{oPAMPA} \leq 0,95$ lag. Dieser Bereich ist in Abbildung 4.8 grau hinterlegt dargestellt.

Membranintegritätstest

Um sicher zu stellen, dass die in den Poren des PVDF-Filters gebildete planare Membran intakt ist, wurde im Anschluss an ausgewählte Permeabilitäts-Assays ein Membranintegritätstest, durchgeführt.

Bei planaren Lipidmembranen wurde nach dem Protokoll von Millipore (Millipore, 2005) verfahren. Direkt nach dem vorangehenden Permeabilitäts-Assay wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatten geleert. Die Kavitäten der unteren Mikrotiterplatte wurden statt dessen mit je 200 μL der Donorphase, bestehend aus 0,1 mg mL^{-1} Brilliantkresylblau (BKB) und 0,1 mg mL^{-1} Luzifergelb (LG) in PBS-Puffer (pH 7,4) mit 5 % v/v DMSO, befüllt. Nach Platzieren der oberen Mikrotiterplatte mit der zu untersuchenden Membran auf der Donorplatte wurden die Kavitäten der Akzeptorplatte mit je 200 μL PBS-Puffer (pH 7,4) mit 5 % v/v DMSO befüllt. Nach einer Inkubationsdauer von 16 h wurden die Konzentrationen der Farbstoffe Luzifergelb und Brilliantkresylblau in der Akzeptorphase bestimmt. Bei intakter Membran war eine leichte Blaufärbung der Akzeptorphase zu erkennen, da Brilliantkresylblau innerhalb dieser Inkubationszeit über die Lipidmembran diffundieren kann. Der fluoreszierende Farbstoff Luzifergelb hingegen kann innerhalb dieser Inkubationszeit nicht durch eine intakte Membran diffundieren. Seine Abwesenheit wurde durch Fluoreszenzmessung (Kapitel 4.10.4) bestimmt. Die Membran wurde dann als intakt bewertet, wenn die Fluoreszenz der Akzeptorphase jene des PBS-Puffers um nicht mehr als das Dreifache überstieg (Millipore, 2005).

Zur Überprüfung der Integrität der Polymermembran wurde in dieser Arbeit nach dem Vorbild des Protokolls von Millipore ein adaptierter Membranintegritätstest entwickelt. Hierbei bestand die Donorphase aus einer Mischung aus 0,1 mM Sulforhodamin und 0,5 mM Propranolol in Phosphatpuffer (pH 7) mit 5 % DMSO. Die Akzeptorphase bestand aus reinem Phosphatpuffer (pH 7) mit 5 % DMSO. Nach einer Inkubationszeit von 20 h wurde die Akzeptorphase bezüglich ihrer Anwesenheit von Propranolol beziehungsweise Sulforhodamin über UV-Messung (Kapitel 4.10.2) beziehungsweise Fluoreszenzmessung (Kapitel 4.10.4) untersucht.

4.8.2 Polymervesikel

Durchführung

Die unbeladenen Polymersomen (1 % w/v) wurden über die Injektionsmethode (Kapitel 4.3.2) in Phosphatpuffer bei pH 6, pH 7 und pH 8 hergestellt und anschließend einmal mit Hilfe von PC-Membranen (200 nm Porendurchmesser) manuell extrudiert. Für die Untersuchung der Permeabilität gegenüber Koffein wurde die Polymersomendispersion mit Hilfe von Zentrifugen-Filtereinheiten (Ausschlussgröße 100 kDa) von 1 % w/v zu 2 % w/v konzentriert (3.000xg, 2 h, RT).

Für den Permeabilitäts-Assay wurden 400 mM Propranolol-Lösungen oder 100 mM Koffein-Lösungen in Phosphatpuffer mit pH 5, pH 6 und pH 7 hergestellt. Anschließend wurde ein Teilvolumen der Propranolol-Lösung mit neun Teilvolumina der 1 % w/v Polymersomendispersion vermischt. Die Koffein-Lösung und die 2 % w/v Polymersomendispersion wurden zu gleichen Volumenanteilen vermischt. Direkt danach erfolgte die Reinigung mittels 2,5 mL SEC-Säule (Kapitel 4.4.2). Die Polymersomen-enthaltenden Fraktionen der Nullprobe wurden anschließend vereinigt und mit Hilfe von OPOE (Kapitel 4.4.3) lysiert. Sie dienen zur Bereitstellung eines Standards mit 8-500 μM Propranolol beziehungsweise mit 4-250 μM Koffein. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Vesikel mittels SEC von freiem Propranolol beziehungsweise Koffein getrennt. Die vereinigten Polymersomen-enthaltenden Fraktionen wurden anschließend analog der Nullprobe mit OPOE lysiert (Kapitel 4.4.3), um die Propranolol- beziehungsweise Koffein-Konzentration in den Vesikeln mit Hilfe des Standards über Absorptionsmessung (Kapitel 4.10.4) bestimmen zu können.

Bestimmung der Permeabilität und des dimensionslosen Konzentrationsverlaufs

Die Permeabilität der Polymersomen wurde über Gleichung (3.28) und Gleichung (3.30) bestimmt. Das in die Berechnung eingehende Akzeptorvolumen V_A entspricht hierbei dem gesamten inneren Vesikelvolumen aller Polymersomen $V_{V,i}$. Das Volumen der Donorphase V_D berechnet sich aus der Differenz des Probenvolumens V_∞ und dem gesamten von allen Vesikeln eingenommenen Volumen $V_{V,a}$ und entspricht gleichermaßen der Differenz aus Probenvolumen, Membranvolumen V_M und dem inneren Vesikelvolumen $V_{V,i} = V_A$ aller Vesikel.

$$V_D = V_\infty - V_{V,a} = V_\infty - V_M - V_{V,i} \quad (4.5)$$

V_D	Volumen der Donorphase	cm^3
V_∞	Probenvolumen	cm^3
$V_{V,a}$	Summe des äußeren Vesikelvolumens aller Vesikel	cm^3
V_M	Summe des Membranvolumens aller Vesikel	cm^3
$V_{V,i}$	Summe des inneren Vesikelvolumens aller Vesikel	cm^3

Um den zeitlichen Verlauf der passiven Diffusion in die Vesikel darzustellen, wurde die dimensionslose Kennzahl $Ak_{Vesikel}$ wie folgt definiert:

$$Ak_{Vesikel} = \frac{c_{V,i,t}}{c_{eq}} \quad (4.6)$$

$Ak_{Vesikel}$	Dimensionslose Akzeptorphasenkennzahl, Vesikel	-
$c_{V,i,t}$	Konzentration im Inneren der Vesikel zum Zeitpunkt t	mol cm^{-3}
c_{eq}	Gleichgewichtskonzentration	mol cm^{-3}

Mit der Bedingung, dass die Konzentration im Inneren der Polymervesikel $c_{V,i,t}$ maximal die Gleichgewichtskonzentration c_{eq} erreichen kann, gilt:

$$0 < Ak_{Vesikel} < 1 \quad (4.7)$$

4.9 Rückgewinnung des Polymers

Die hohen Kosten des verwendeten Polymers machten dessen Rückgewinnung nach dem Herstellungsprozess der Polymersomen beziehungsweise nach deren Verwendung als Enzymmembranreaktoren erforderlich. In dieser Arbeit wurden, abhängig von der vorliegenden Verunreinigung, drei Klassen an zu recycelndem Ausgangsmaterial unterschieden:

- Klasse 1: Polymer, Wasser, Ethanol und Salze
- Klasse 2: Klasse 1 und Proteine
- Klasse 3: Klasse 2 und Lösemittlrückstände sowie weitere Verunreinigungen

In dieser Arbeit wurde ausschließlich Polymer aus den Klassen 1 und 2 zurückgewonnen.

4.9.1 Mehrstufiger Evaporations- und Solubilisierungsprozess

Die Trennung des Polymers von Wasser, Ethanol, Salzen und Proteinen wurde durch einen mehrstufigen Evaporations- und Solubilisierungsprozess realisiert. Im ersten Schritt wurde der flüssige Bestandteil der Polymer-enthaltenden Suspension durch vollständiges Verdampfen im Rotationsverdampfer (Laborota 4003, Heidolph, Schwabach, Deutschland) abgetrennt. In einem Verdampfungskolben wurde die Suspension durch Temperierung des Öl-Heizbades erwärmt. Da die thermische Schädigung des Polymers vermieden werden sollte, wurde die flüssige Phase bei maximal 60 °C verdampft. Um Wasser und Ethanol bei dieser verhältnismäßig niedrigen Temperatur zum Sieden zu bringen, wurde der Druck im System mit Hilfe einer Vakuumpumpe stufenweise bis auf 30 mbar reduziert. Um zudem eine möglichst große Oberfläche der flüssigen Phase zu generieren, wurde im Verdampfungskolben durch Rotation bei bis zu 900 min⁻¹ ein Flüssigkeitsfilm ausgebildet. Verdampftes Wasser und Ethanol gelangten über die Dampfdurchführung in den Rückflusskühler und wurden dort kondensiert. Das flüssige Wasser-Ethanol-Gemisch wurde in einem Auffangkolben gesammelt und nach beendeter Evaporation verworfen. Das im Verdampfungskolben verbliebene Feststoffgemisch aus Polymer, Salzen und Proteinen wurde in Ethanol (99,8 % v/v) solubilisiert. Da Polymer in diesem Lösemittel eine deutlich höhere Löslichkeit besitzt als Salze (Pinho und Macedo, 2005) und Proteine, konnten die beiden letztgenannten durch Filtration (0,2 µm) abgetrennt werden. Zur Erhöhung der Reinheit wurden mehrere Evaporations- und Solubilisierungsprozesse hintereinander durchgeführt.

4.9.2 Bestimmung der Reinheit

Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Die Reinheit des wiedergewonnenen Polymers des Ausgangsmaterials aus Klasse 1 wurde mit Hilfe von energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDS) (JCM-6000PLUS NeoScope, JEOL, Tokyo, Japan) analysiert. Messungen wurden sowohl für neues als auch für recyceltes Polymer durchgeführt. Mit Hilfe dieser analytischen Methode ist es möglich die in der festen Probe vorliegenden Elemente zu bestimmen. Zudem wurde der prozentuale Atom- und Massenanteil der in der Probe detektierten Elemente bestimmt. Diese Messungen wurden am Lehrstuhl für Technische Elektrochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

4.10 Analytische Methoden

4.10.1 Bestimmung des Polymerrückstandes

Für die Bestimmung des Polymerrückstandes wurden 0,5 mL Probe in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen, welche vorab bis zum Erreichen eines konstanten Gewichtes bei 80 °C getrocknet wurden, zentrifugiert (16.200xg, 6 min, RT). Dabei setzten sich Polymeraggregate ab, wohingegen Polymersomen bei diesen Zentrifugalkräften beziehungsweise dieser Zentrifugationsdauer nicht abgetrennt werden können und im Überstand verbleiben. Nach Entfernung des Polymersomen-enthaltenden Überstandes wurde das Pellet bei 80 °C bis zum Erreichen eines konstanten Gewichtes getrocknet. Über die Differenz der Masse des gefüllten und des leeren Reaktionsgefäßes wurde der Polymerrückstand bestimmt.

4.10.2 Bestimmung des relativen Verlustes von verkapselten Molekülen

Der relative Austritt von Calcein oder NAL beladenen Polymersomen wurde bestimmt. Der Verlust an Calcein wurde über Fluoreszenzmessung (Kapitel 4.10.4) der unlysierten und der lysierten Probe zum Zeitpunkt $t = 0$ (F_0 und $F_{\infty,0}$) und zum Zeitpunkt t (F_t und $F_{\infty,t}$) ermöglicht. Der prozentuale Anteil an ausgetretenen Molekülen wurde über folgende Gleichung bestimmt:

$$Verlust = \left(\frac{F_t}{F_{\infty,t}} - \frac{F_0}{F_{\infty,0}} \right) \cdot 100 \% \quad (4.8)$$

F_t	Fluoreszenz der Probe zum Zeitpunkt t	-
$F_{\infty,t}$	Fluoreszenz der Probe nach Vesikellyse zum Zeitpunkt t	-
F_0	Fluoreszenz der Probe zum Zeitpunkt $t = 0$	-
$F_{\infty,0}$	Fluoreszenz der Probe nach Vesikellyse zum Zeitpunkt $t = 0$	-

Um den Verlust an NAL zu bestimmen, wurden die Enzymkonzentrationen der unlysierten und der lysierten Probe zum Zeitpunkt $t = 0$ (c_0 und $c_{\infty,0}$) und zum Zeitpunkt t (c_t und $c_{\infty,t}$) bestimmt (Kapitel 4.10.3). Der relative Verlust wurde über folgende Gleichung berechnet:

$$Verlust = \left(\frac{c_t - c_0}{c_{\infty,t} - c_0} \right) \cdot 100 \% \quad (4.9)$$

c_t	Konzentration der Probe zum Zeitpunkt t	mol cm^{-3}
$c_{\infty,t}$	Konzentration der Probe nach Vesikellyse zum Zeitpunkt t	mol cm^{-3}
c_0	Konzentration der Probe zum Zeitpunkt $t = 0$	mol cm^{-3}
$c_{\infty,0}$	Konzentration der Probe nach Vesikellyse zum Zeitpunkt $t = 0$	mol cm^{-3}

4.10.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Konzentrationsbestimmung von *N*-Acetylneuraminatlyase

Die Konzentration der *N*-Acetylneuraminatlyase (NAL) wurde über eine zweistufige enzymatische Reaktion bestimmt. Diese beruht auf der Umsetzung von *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) zu Pyruvat und *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) mit dem Enzym NAL als Biokatalysator. Im zweiten Schritt wird ManNAc in Anwesenheit von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) durch den Biokatalysator *N*-Acetylmannosamindehydrogenase aus *Flavobacterium* sp. 141-8 (MDH) zu *N*-Acetylmannosaminolacton (ManL) oxidiert. NAD^+ wird hierbei zu NADH reduziert. Da ManL in Anwesenheit von Wasser sofort hydrolysiert wird (zu 2-Acetamid-2-deoxy-D-Gluconsäure), handelt es sich bei der zweiten enzymatischen Umsetzung um eine quasi irreversible Reaktion (Horiuchi und Kurokawa, 1990). Die zweistufige Reaktion ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

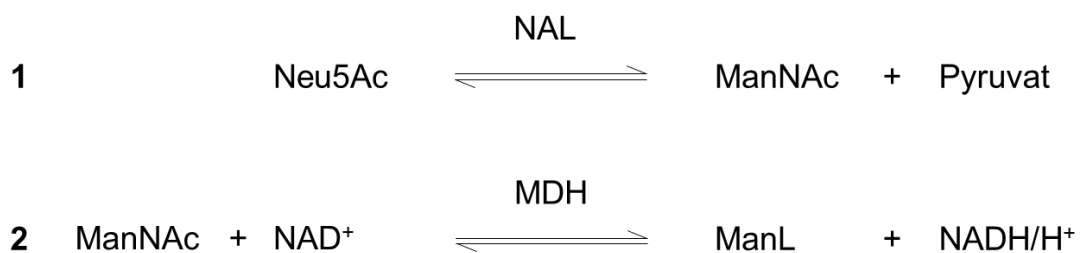


Abbildung 4.9: Zweistufige, enzymatische Umsetzung von *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) zu *N*-Acetylmannosaminolacton (ManL).

Die in Abbildung 4.9 dargestellte, zweistufige enzymatische Reaktion wurde in Tris-Puffer (pH 8) (Kapitel 13.1) durchgeführt. Für die erste enzymatische Umsetzung wurden 25 μL der Probe (mit NAL beladene Polymersomen) mit 25 μL Neu5Ac (50 mM) und 5 μL Tris-Puffer (unlysierte Probe) oder 5 μL OPOE (10 % v/v) (lysierte Probe) vermischt und 6 h bei 30 °C bei 600 min^{-1} (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Die Umsetzung des

gebildeten ManNAc erfolgte im zweiten Schritt mit 10 mM NAD⁺ in Anwesenheit von 2 µg mL⁻¹ MDH. Hierbei entstehendes NADH wurde photometrisch bei 340 nm quantifiziert. Anhand eines NAL-Standards bekannter Konzentration konnte aufgrund der stöchiometrischen Umsetzung von Neu5Ac durch die NAL auf deren Konzentration in der Probe geschlossen werden (Yamamoto-Otake *et al.*, 1991). Die Bestimmung der gebildeten NADH-Konzentration wurde über das Gesetz von Lambert Beer bestimmt:

$$E_{340\text{ nm}} = \varepsilon c_{\text{NADH}} d_{\text{Schicht}} \quad (4.10)$$

$E_{340\text{ nm}}$	Extinktion bei 340 nm	-
ε	Extinktionskoeffizient	L mol ⁻¹ cm ⁻¹
c_{NADH}	NADH-Konzentration	mol L ⁻¹
d_{Schicht}	Schichtdicke	cm

Die Schichtdicke d_{Schicht} von 100 µL Probe betrug 0,3 cm. Der Extinktionskoeffizient ε von NADH beträgt 6200 L mol⁻¹ cm⁻¹.

Bicinchoninsäure-Assay

Die Proteinkonzentrationsbestimmung im wiedergewonnenen Polymer aus Ausgangsmaterial der Klasse 2 (Polymer, Salze, Wasser, Ethanol, Proteine) erfolgte mit dem Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay). Der BCA-Assay beruht auf einer Kombination aus Biuret-Assay und Bicinchoninsäure. Hierbei wird in der sogenannten Biuret-Reaktion zwischen Proteinen und Cu²⁺ das Kupfer zu Cu⁺ reduziert. BCA wiederum bildet mit Cu⁺ eine Komplexverbindung mit einer intensiven violetten Farbe (Smith *et al.*, 1985). Dieser Komplex kann bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch über Absorptionsmessung (Kapitel 4.10) bestimmt werden. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Pierce™ BCA-Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA) nach Herstellerangaben gemessen. Als Proteinstandard diente ein im Kit enthaltener Standard aus Bovinem Serumalbumin (BSA).

4.10.4 Absorptions- und Fluoreszenzmessung

In dieser Arbeit wurden Bicinchoninsäure (BCA), Brilliantkresylblau (BKB), Propranolol, Koffein und NADH quantitativ über Absorptionsmessung bestimmt. Dies erfolgte bei Wellenlängen über 300 nm in transparenten Mikrotiterplatten. Messungen bei Wellenlängen unter 300 nm wurden in speziellen, für UV-Licht durchlässigen Platten durchgeführt. In Tabelle 4-4 sind die Absorptionsmaxima, bei welchen die Messungen durchgeführt wurden, zusammengefasst.

Tabelle 4-4: Absorptionsmaxima der mittels Absorptionsmessung quantitativ bestimmten Stoffe.

Stoff	Absorptionsmaxima, nm
BCA	562
BKB	636
Koffein	273
NADH	340
Propranolol	292

Calcein, grünfluoreszierendes Protein (eGFP), Sulforhodamin und Luzifergelb (LG) wurden über Fluoreszenzmessung (Einstrahlung von oben, *top-mode*) in schwarzen Mikrotiterplatten bei den in Tabelle 4-5 zusammengefassten Anregungs- und Emissionswellenlängen gemessen. Je nach Stärke der Fluoreszenz wurde der Verstärkungsfaktor (*gain*) zwischen den Werten 50 und 100 manuell reguliert.

Tabelle 4-5: Anregungs- und Emissionswellenlänge der mittels Fluoreszenzmessung quantitativ bestimmten Stoffe.

Stoff	Anregungswellenlänge, nm	Emission, nm
Calcein	470	515
eGFP	475	509
LG	430	538
Sulforhodamin B	565	586

Sowohl Absorption als auch Fluoreszenz wurden im Plattenphotometer (infinite M200, Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen.

5 Herstellung von Polymervesikeln

In diesem Kapitel wird die systematische Verfahrensentwicklung für die Herstellung von Polymersomen aus PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅ in miniaturisierten Rührkesselreaktoren dargestellt. Der Mechanismus der Vesikelbildung während der Polymersomenherstellung und die Maßstabsübertragung in den Liter-Maßstab werden im Anschluss erläutert.

5.1 Verfahrensentwicklung zur Herstellung von Polymervesikeln

Polymersomen können prinzipiell mittels derselben Methoden wie Liposomen hergestellt werden. In dieser Arbeit wurden Polymervesikel über zwei verschiedene Methoden, die lösemittelfreie Dispersionsmethode und die Ethanolmethode, hergestellt. Angestrebt wurde die effiziente, reproduzierbare und skalierbare Herstellung von Polymersomen mit definierter Größe. Als wichtigste Kriterien der Polymersomenqualität wurden der mittlere hydrodynamische Partikeldurchmesser (z -Mittel) und der Polydispersitätsindex (PDI) aus dynamischen Lichtstreuungsmessungen herangezogen. Oberstes Ziel war die Herstellung einer Polymersomendispersion mit möglichst niedriger Polydispersität mit einem PDI < 0,2 (Charcosset *et al.*, 2015). Zur Veranschaulichung der Polymersomenqualität dienten zudem intensitäts- und anzahlbasierte Partikelgrößenverteilungen (Kapitel 4.7.2). Die Prozessbedingungen in den Rührkesselreaktoren wurden dabei systematisch variiert. Alle im Folgenden diskutierten Ergebnisse sind in (Poschenrieder *et al.*, 2016b) veröffentlicht.

5.1.1 Dispersionsmethode

Für die Herstellung von Polymervesikeln mittels der Dispersionsmethode wurde pulverförmiges Polymer direkt in wässriger Phase im Milliliter-Maßstab oder in miniaturisierten Rührkesselreaktoren dispergiert. Diese lösemittelfreie Art der Vesikelherstellung ist vor allem dann von Interesse, wenn etwaige Lösemittelrückstände in der Polymersomendispersion toxische Effekte und andere Nachteile bezüglich des vorgesehenen Anwendungsgebiets nach sich ziehen können.

Milliliter-Maßstab

Die sinnvolle Eingrenzung der Prozessparameter erfolgte im materialsparenden Milliliter-Maßstab. Hierbei wurden die Einflüsse der Temperatur T (4 °C, 25 °C, 50 °C), des pHs (pH 5, pH 7,4, pH 9) und der Polymerkonzentration c_P (0,33 % w/v, 1 % w/v, 3 % w/v) untersucht. Zudem wurde die Rührerdrehzahl n variiert (150 min⁻¹, 550 min⁻¹, 750 min⁻¹, 950 min⁻¹) und die

Polymersomenqualität nach unterschiedlich langer Prozesszeit t (4 h, 16 h, 24 h, 48 h) untersucht. Als Referenz-Prozess diente die Polymersomenherstellung in PBS-Puffer bei

$$T = 25 \text{ °C}, \text{ pH } 7,4, c_p = 1 \text{ \% w/v}, n = 950 \text{ min}^{-1}, t = 16 \text{ h}.$$

Ausgehend von diesen Werten wurde jeweils ein Parameter geändert, während die anderen konstant gehalten wurden (*one-factor-at-a-time*). Diese Methode erlaubt zwar keine Rückschlüsse auf mögliche Wechselwirkungen der Parameter untereinander, sie ist jedoch für die Erkennung besonders signifikanter Einflüsse geeignet. Es konnte jedoch bei keinem der durchgeführten Prozesse eine schmale Partikelgrößenverteilung erzielt werden. Unabhängig vom variierten Parameter waren die resultierenden Polydispersitäten hoch. Sowohl der niedrigste erzielte PDI mit einem Wert von 0,38 ($t = 48 \text{ h}$) als auch der höchste mit $\text{PDI} = 0,51$ ($n = 150 \text{ min}^{-1}$) indizierten breite Partikelgrößenverteilungen. Über die Variation von Temperatur, pH oder Polymerkonzentration konnte kein signifikanter Einfluss auf die Polydispersität erreicht werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Lediglich durch die Rührerdrehzahl und die Prozesszeit konnte geringfügig Einfluss auf die entstehende Polymersomenqualität genommen werden, wie in Abbildung 5.1 A beziehungsweise Abbildung 5.1 B dargestellt ist.

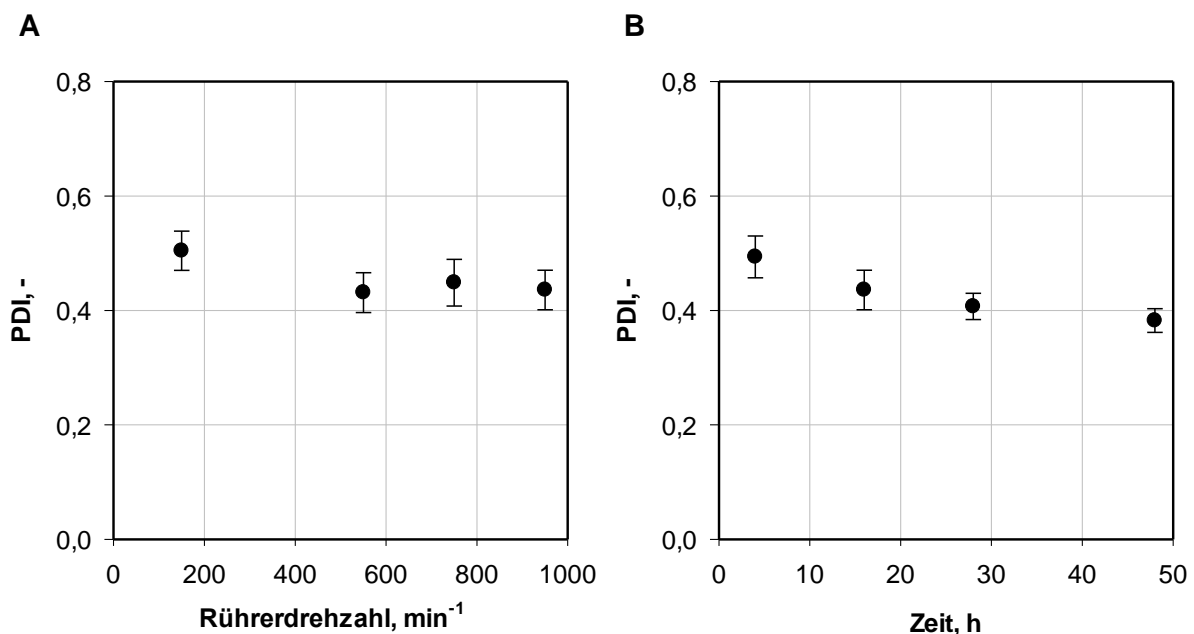


Abbildung 5.1: Verlauf des PDIs in Abhängigkeit von A) der Rührerdrehzahl und B) der Prozesszeit. Alle weiteren Parameter entsprachen den Bedingungen des Referenz-Prozesses ($T = 25 \text{ °C}$, $\text{pH } 7,4$, $c_p = 1 \text{ \% w/v}$, $n = 1000 \text{ min}^{-1}$, $t = 16 \text{ h}$). $N = 7$.

Es zeigte sich, dass sich hohe Rührerdrehzahlen n sowie lange Prozesszeiten t tendenziell positiv in Bezug auf das Erzielen von niedrigen PDIs auswirkten. Trotz verhältnismäßig langer Prozesszeiten von bis zu 48 h konnten angestrebte schmale Verteilungen mit einem PDI $< 0,2$ im Milliliter-Maßstab jedoch nicht erreicht werden. Der Milliliter-Maßstab wurde demnach zur effizienten Herstellung von Polymersomen mit definierter Größe und Qualität mittels der Dispersionsmethode als ungeeignet eingestuft. Weiteren Untersuchungen wurden daher in miniaturisierten Rührkesselreaktoren durchgeführt.

Verfahrensentwicklung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren

Da sich im Milliliter-Maßstab abzeichnete, dass die Rührerdrehzahl einen Einfluss auf die Polydispersität der erzeugten Polymersomendispersion nimmt (Abbildung 5.1 A), wurde bei der Verfahrensentwicklung zur effizienten Herstellung von Polymersomen in miniaturisierten Milliliter-Bioreaktoren ein besonderes Augenmerk auf die im Rührkesselreaktor herrschenden Strömungsbedingungen gerichtet. Dem wurde durch die Verwendung von vier unterschiedlichen Rührertypen (gasinduzierender Rührer (G), Paddelrührer (P), H-Rührer (H) und S-Rührer (S), Kapitel 4.3.2) in bewehrten und unbewehrten Reaktoren bei variierender Rührerdrehzahl ($1000-4000 \text{ min}^{-1}$) Rechnung getragen. Der Einfluss der Prozesszeit wurde dabei im Bereich von 4-48 h untersucht. Die Parameter Temperatur, pH und Polymerkonzentration, die im Milliliter-Maßstab keine Auswirkung auf die Polymersomenqualität zeigten, wurden hierbei nicht variiert und betragen konstant $T = 25 \text{ °C}$, pH 7,4 (PBS-Puffer), $c_p = 1 \text{ % w/v}$.

Einfluss der Prozesszeit. Der im Milliliter-Maßstab konstatierte positive Einfluss langer Prozesszeiten hinsichtlich niedriger PDIs (Abbildung 5.1 B) war bei Verwendung der vier Rührertypen bei 1000 min^{-1} in unbewehrten Rührkesselreaktoren, dargestellt in Abbildung 5.2 A, nur unter Verwendung des H-Rührers deutlich erkennbar. Der PDI fiel im betrachteten Zeitraum von 0,41 (4 h) auf 0,30 (48 h). Unter Verwendung des gasinduzierenden Rührers, des Paddelrührers und des S-Rührers zeigte sich bei sonst identischen Prozessbedingungen keine signifikante Abnahme der Polydispersität mit der Zeit. Dies ließ vermuten, dass die von den vier Rührertypen bei identischer Rührerdrehzahl erzeugten unterschiedlichen Strömungsprofile einen essentiellen Einfluss auf die Qualität der resultierenden Polymersomen nehmen können. In Abbildung 5.2 B verdeutlicht sich dies anhand der nach 4 h Prozessdauer exemplarisch dargestellten, unterschiedlichen intensitätsbasierten Partikelgrößenverteilungen bei Verwendung der vier Rührer bei 1000 min^{-1} .

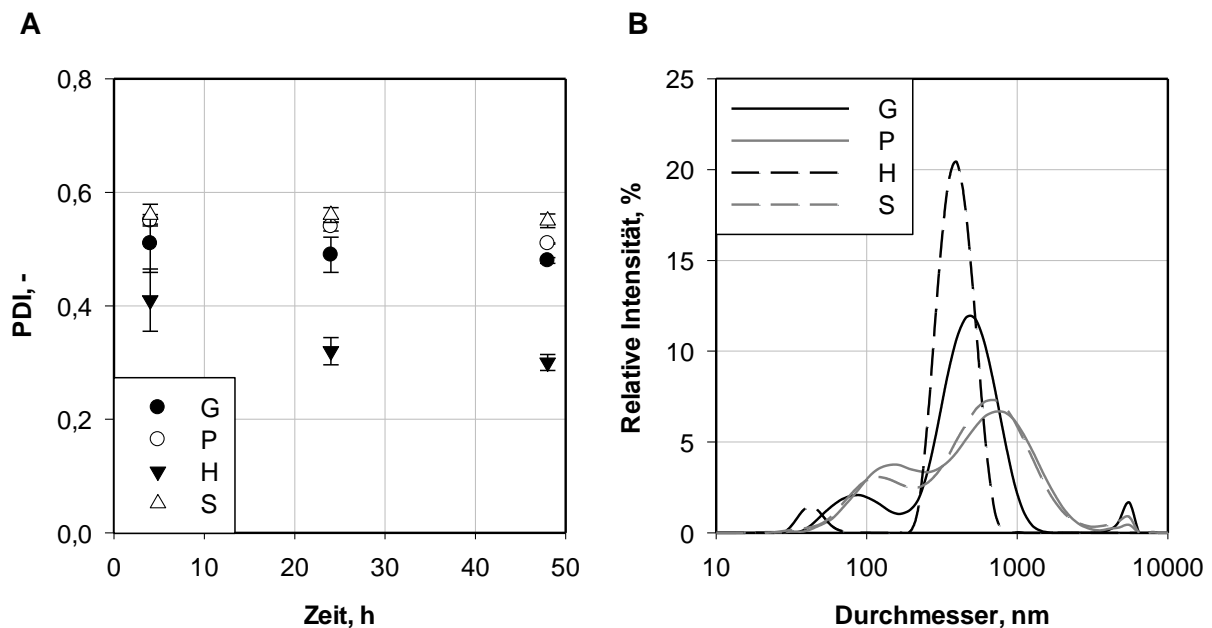


Abbildung 5.2: A) Verlauf des PDIs in Abhängigkeit der Prozesszeit und B) resultierende intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilung nach 4 h Prozesszeit bei Verwendung des gasinduzierenden Rührers (G), des Paddelrührers (P), des H-Rührers (H) und des S-Rührers (S) bei 1000 min^{-1} in unbewehrten Reaktoren. $N = 3$.

Einfluss des Reaktortyps. Neben der Verwendung verschiedener Rührertypen und der Variation der Rührerdrehzahl wurde auch durch die optionale Bewehrung im Reaktor ein relevanter Einfluss auf das erzeugte Strömungsprofil genommen. Die Verwendung von Strömungsbrechern führt aufgrund resultierender, starker Turbulenzen zu schnellerer und intensiverer Durchmischung des Mediums. So wurde erwartet, dass sich die Verwendung von bewehrten Reaktoren positiv auf das schnelle und effiziente Dispergieren des pulverförmigen Polymers auswirkt. Es zeigte sich jedoch, dass unabhängig vom verwendeten Rührertyp, der Rührerdrehzahl und der Prozesszeit bei Verwendung unbewehrter Reaktoren stets niedrigere PDIs und damit schmalere Partikelgrößenverteilungen erzielt wurden als bei Verwendung von bewehrten Reaktoren. Dies ist exemplarisch in Abbildung 5.3 A bei Verwendung der vier Rührertypen bei 2000 min^{-1} nach 24 h Prozesszeit dargestellt. Deutlich wird der negative Einfluss von Strömungsbrechern auch bei Betrachtung der zugehörigen intensitätsbasierten Partikelgrößenverteilungen, wie beispielhaft für die Verwendung des S-Rührers in Abbildung 5.3 B dargestellt. In bewehrten Reaktoren kam es zur Bildung von Agglomeraten im Mikrometerbereich (rechter Peak). Die breite Verteilung spiegelt den sehr hohen PDI von 0,45 und das relativ hohe z-Mittel von 267 nm (Ergebnis nicht dargestellt) deutlich wider. Bei identischen Prozessbedingungen und gleichzeitiger Verwendung von unbewehrten Reaktoren ergab sich eine deutlich schmalere Verteilung bei einem signifikant niedrigeren PDI von 0,23

und einem ebenfalls deutlich niedrigeren z-Mittel von 191 nm (Ergebnis nicht dargestellt). Sämtliche Ergebnisse wiesen deutlich darauf hin, dass die Herstellung von Polymersomen in unbewehrten Rührkesselreaktoren erfolgen sollte.

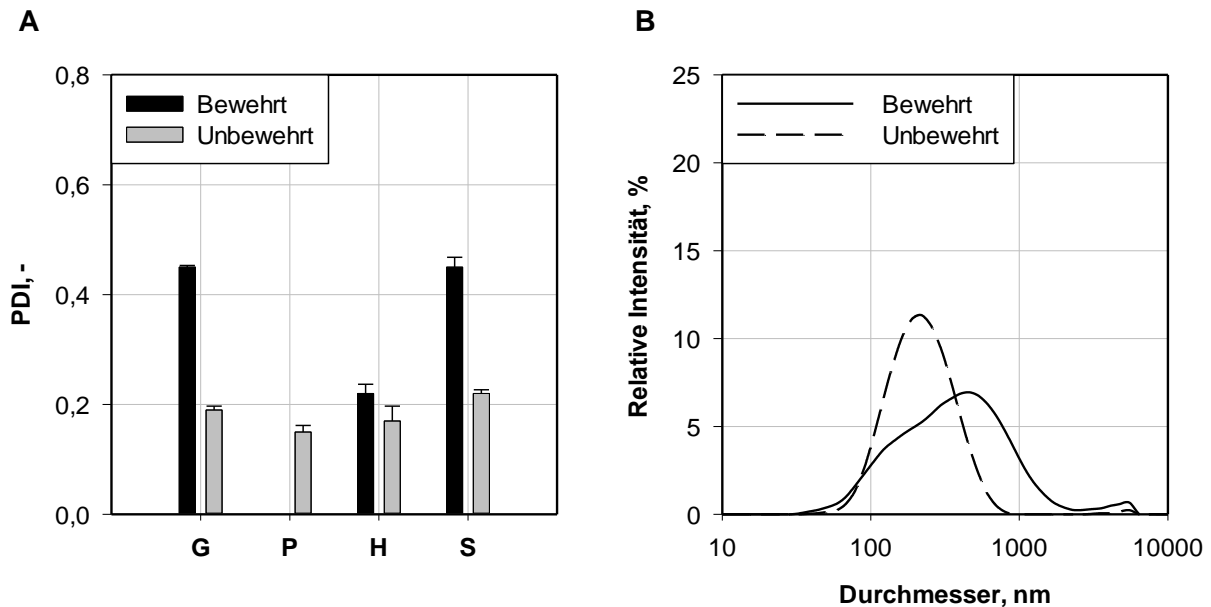


Abbildung 5.3: A) Abhängigkeit des PDI vom Reaktortyp unter Verwendung des gasinduzierenden Rührers G, des Paddelrührers P (nur in unbewehrten Reaktoren verwendbar), des H-Rührers H und des S-Rührers S. B) Resultierende intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilung bei Verwendung des S-Rührers. ($t = 24 \text{ h}$, $n = 2000 \text{ min}^{-1}$). $N = 3$.

Einfluss der Rührerdrehzahl. Trotz unterschiedlicher resultierender Partikelgrößenverteilung bei Verwendung der vier Rührertypen bei identischer Rührerdrehzahl (Abbildung 5.2 B) wurde unabhängig des Rührertyps eine Abnahme der Polydispersität mit steigender Rührerdrehzahl gezeigt. Die in unbewehrten Reaktoren maximal mögliche Rührerdrehzahl (Tabelle 4-1) führte dabei unabhängig von der Prozessdauer bei jedem Rührertyp zum jeweils niedrigsten PDI. Dies ist beispielhaft nach 24 h Prozesszeit in Abbildung 5.4 A dargestellt. Dabei wies der S-Rührer die deutlichste Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl auf. Unter Verwendung dieses Rührers in unbewehrten Reaktoren betrug der PDI nach 24 h bei 1000 min^{-1} 0,56. Bei 4000 min^{-1} war die Polydispersität mit einem PDI = 0,14 deutlich niedriger. Dies wurde auch anhand der zugehörigen Partikelgrößenverteilungen, dargestellt in Abbildung 5.4 B, deutlich. Die sehr breite Verteilung mit Partikeldurchmessern bis in den Mikrometerbereich bei einer Rührerdrehzahl von 1000 min^{-1} spiegelt das verhältnismäßig große z-Mittel von 347 nm wider (Ergebnis nicht dargestellt). Der erzielte sehr niedrige PDI von 0,14 bei 4000 min^{-1} bei einem z-Mittel von 193 nm (Ergebnis nicht dargestellt) wies auf eine monomodale, schmale Partikelgrößenverteilung hin.

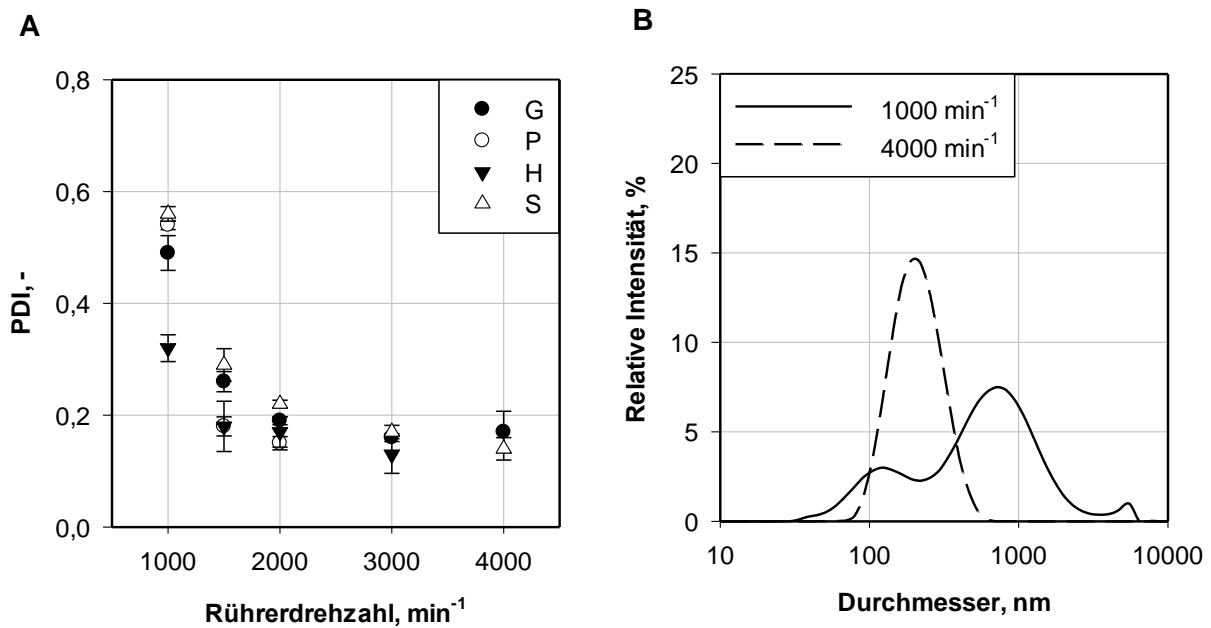


Abbildung 5.4: A) Abhängigkeit des PDI von der Rührerdrehzahl unter Verwendung des gasinduzierenden Rührers G, des Paddelrührers P (nur in unbewehrten Reaktoren verwendbar), des H-Rührers H und des S-Rührers S. B) Resultierende intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilung bei Verwendung des S-Rührers. ($t = 24 \text{ h}$, unbewehrter Reaktor). $N = 3$.

Hervorzuheben ist, dass mit allen Rührertypen in unbewehrten Reaktoren innerhalb von 24 h eine schmale Partikelgrößenverteilung mit der angestrebten niedrigen Polydispersität ($\text{PDI} < 0,2$) erreicht werden konnte. Dies war bei Einsatz des gasinduzierenden Rührers, des Paddelrührers und des H-Rührers bereits bei 2000 min^{-1} möglich. Der S-Rührer musste zum Erzielen dieses Wertes mindestens bei 3000 min^{-1} betrieben werden (Abbildung 5.4 A). Für die Entwicklung eines effizienten Prozesses wurde neben dem Erzielen niedriger Polydispersitäten auch die hierfür notwendige Prozessdauer betrachtet. Die gewünschte niedrige Polydispersität konnte nach der kürzesten betrachteten Prozesszeit von 4 h bei einer Rührerdrehzahl von 4000 min^{-1} mit dem gasinduzierenden Rührer ($\text{PDI} = 0,14$) und mit dem S-Rührer ($\text{PDI} = 0,17$) erreicht werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Anhand der gewonnenen Ergebnisse kristallisierte sich heraus, dass die alleinige Kontrolle der Rührerdrehzahl ohne genauere Betrachtung des dabei vorliegenden Strömungsprofils bei Weitem nicht ausreichend für die Entwicklung eines skalierbaren Prozesses zur effizienten Polymersomenherstellung sein würde.

Einfluss des Rührertyps. Der gasinduzierende Rührer ermöglichte durch die Erzeugung einer stark ausgeprägten axialen Strömung eine gute und schnelle Durchmischung des Reaktorinhaltes, was vorteilhaft beim Dispergieren von Feststoffen sein kann. Durch den dabei erzeugten Gaseintrag kam es jedoch auch zur Schaumbildung. Dadurch sammelte sich das

Polymerpulver teilweise oberhalb der wässrigen Phase im Schaum und stand somit für die Polymersomenherstellung nicht mehr zur Verfügung. Weiterhin weist der gasinduzierende Rührer in bewehrten Reaktoren für das Verhältnis von maximaler Energiedissipation zu volumenbezogenem Leistungseintrag $\phi = \frac{\varepsilon_{max}}{\varepsilon_{\phi}}$ (Gleichung (3.50)) einen Wert von 10 auf (Tabelle 4-1) (Hortsch und Weuster-Botz, 2010b). Dies spricht für die Erzeugung starker Scherkräfte, welche die Vesikelmembran möglicherweise zerstören können, so dass von der Verwendung dieses Rührertyps Abstand genommen wurde. Der Paddelrührer hingegen weist für ϕ einen sehr viel niedrigeren Wert von 6 auf (Hortsch *et al.*, 2010) und ist somit in der Lage die Leistung sehr gleichmäßig ins Medium einzutragen. Somit wurde die Verwendung dieses Rührers für die Herstellung von möglicherweise scherempfindlichen Polymersomen als gute Wahl in Erwägung gezogen. Bei seiner maximal möglichen Rührerdrehzahl von 2000 min⁻¹ wurden innerhalb von 24 h eine niedrige Polydispersität mit PDI = 0,17 erreicht. Noch höhere Rührerdrehzahlen, für die aufgrund der gezeigten Ergebnisse eine noch niedrigere Polydispersität erwartet worden wäre (Abbildung 5.4 A), konnten bei Verwendung dieses Rührertyps jedoch nicht realisiert werden. Daher wurde auch der Paddelrührer als optimale Rührergeometrie zur effizienten Polymersomenherstellung ausgeschlossen. Die niedrigsten PDIs wurden mit dem H-Rührer und dem S-Rührer bei den zugehörigen maximal möglichen Rührerdrehzahlen (3000 min⁻¹ beziehungsweise 4000 min⁻¹) erreicht. Innerhalb von 24 h konnten Polymersomen mit sehr niedriger Polydispersität (PDI = 0,13 beziehungsweise 0,14) hergestellt werden. Der H- und der S-Rührer zeigten sich somit für die Polymersomenherstellung ähnlich gut geeignet. In Hinblick auf die Skalierbarkeit des zu etablierenden Prozesses wurde der verfahrenstechnisch umfangreicher charakterisierte S-Rührer als optimaler Rührer für die effiziente Polymersomenherstellung ausgewählt (Ergebnisse nicht dargestellt).

Der S-Rührer erzeugt axiale, radiale und tangential Strömungen und ermöglicht somit auch in unbewehrten Reaktoren eine gute Durchmischung. Mit $\phi = 7,4$ (Riedlberger, 2012) ist zudem das Verhältnis von maximaler Energiedissipation zu volumenbezogenem Leistungseintrag nur geringfügig höher als das des scherarmen Paddelrührers. Folglich wurde für den S-Rührer eine gute Einsetzbarkeit bei der Herstellung von möglicherweise scherempfindlichen Membranvesikeln erwartet. Mit Hilfe des S-Rührers konnten in unbewehrten Reaktoren bei der maximalen Rührerdrehzahl von 4000 min⁻¹ innerhalb von nur 4 h Polymersomen mit schmaler Partikelgrößenverteilung (PDI = 0,17) erzeugt werden. Die Polydispersität konnte zudem bei längeren Prozesszeiten bis zu einem PDI = 0,13 nach 48 h verringert werden.

Umsatz des Polymers. Es wurde gezeigt, dass die Herstellung von Polymersomen mit schmaler Partikelgrößenverteilung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren möglich ist. In unbewehrten Reaktoren konnte bei Verwendung der drei Rührertypen Paddelrührer (2000 min^{-1}), H-Rührer (3000 min^{-1}) und S-Rührer (4000 min^{-1}) bei ihrer jeweiligen maximal möglichen Rührerdrehzahl jedoch kein vollständiger Umsatz des Polymerpulvers erzielt werden. Trotz langer Prozesszeiten von bis zu 48 h lag der Polymerrückstand bei 24-49 %, wie in Abbildung 5.5 dargestellt.

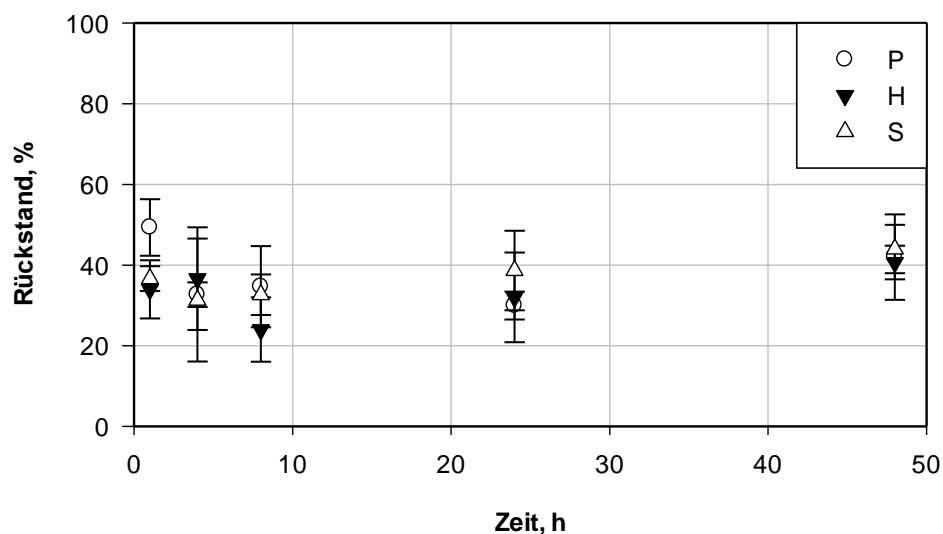


Abbildung 5.5: Polymerrückstand bei Herstellung der Polymersomen über die Dispersionsmethode. Der Paddelrührer (2000 min^{-1}), der H-Rührer (3000 min^{-1}) und der S-Rührer (4000 min^{-1}) wurden in unbewehrten Reaktoren betrieben. $N = 3$.

Anhand der Ergebnisse in Abbildung 5.5 wird deutlich, dass verlängerte Prozesszeiten innerhalb von 8 h zu erhöhter Polymerumsetzung und damit zu verringertem Polymerrückstand führten. Eine weitere Verlängerung der Prozesszeit führte jedoch zu keiner weiteren Verbesserung. So bildete der Großteil des verwendeten Polymers bei Einsatz des S-Rührers (4000 min^{-1}), welcher als optimaler Rührertyp für die Polymersomenherstellung identifiziert wurde, innerhalb von 1 h Polymersomen, so dass ein Rückstand von 37 % verzeichnet wurde. Dieser konnte bis 8 h nach Prozessbeginn auf 33 % verringert werden. Eine längere Prozesszeit führte jedoch zu gegenteiligem Effekt, sodass der Rückstand nach 48 h sogar auf 44 % anstieg. Die Gründe für dieses Verhalten werden detaillierter in Kapitel 7.2.1 diskutiert.

Standardmethode. Als optimal für die Herstellung von Polymersomen in miniaturisierten Rührkesselreaktoren wurden folgende Bedingungen festgelegt:

S-Rührer, $n = 4000 \text{ min}^{-1}$, unbewehrter Rührkesselreaktor

Die Polymersomenherstellung bei diesen Bedingungen wird daher im Folgenden als Standardmethode bezeichnet. Über die Standardmethode konnten innerhalb kurzer Zeit Polymersomen mit schmaler Partikelgrößenverteilung hergestellt werden ($t = 4 \text{ h}$: PDI = 0,17, z-Mittel = 198 nm). Der hierbei verzeichnete große Rückstand an Polymer (31 % bei $t = 4 \text{ h}$) führte jedoch dennoch zu keinem effizienten Prozess. Zhang und Eisenberg, die die Bildung von Polymersomen aus Polystyrol-Polyacrylsäure (PS-PAA) untersuchten, postulierten, dass der hohe Anteil des wasserunlöslichen hydrophoben Blocks der Grund für die unvollständige Umsetzung des feststoffförmigen Polymers sei (Zhang und Eisenberg, 1998). Für die vollständige Umsetzung des Polymers schlugen sie vor, das Polymer vor Zugabe zur wässrigen Phase in einem geeigneten Lösemittel zu lösen.

5.1.2 Ethanolmethode

Bei der Ethanolmethode wird das Polymer zunächst in Ethanol gelöst (Lösemittel-Methode) und danach der wässrigen Phase zugeführt. Bei der Verfahrensentwicklung zur Herstellung von Polymersomen über diese Methode wurden die Polymerkonzentration der Polymerlösung $c_{P,L}$ und die Zulauftrate der Polymerlösung \dot{V}_p zur wässrigen Phase betrachtet.

Vorversuche im Milliliter-Maßstab

Ein Großteil der in der Literatur veröffentlichten Methoden zur Polymersomenherstellung über die Lösemittel-Methode basiert auf dem unkontrollierten Zutropfen der Polymerlösung (beispielsweise mit einer Pipette) zur gerührten wässrigen Phase. Um eine Zudosierung der Polymerlösung unter definierten Prozessbedingungen zu ermöglichen, wurde im Milliliter-Maßstab die Verwendbarkeit einer herkömmlichen Schlauchpumpe untersucht. Erste Untersuchungen bei unterschiedlichen Polymerkonzentrationen im Zulauf (2 % w/v, 20 % w/v, 50 % w/v) legten die Verwendung einer 20 % w/v Polymerkonzentration nahe. Während sich mit einer 2 % w/v Lösung keine Vesikel bildeten (Ergebnisse nicht dargestellt), gestaltete sich die Zudosierung einer 50 % w/v Lösung aufgrund der deutlich höheren Viskosität der Polymerlösung (Kapitel 13.1.1) schwierig. Hierfür wurde eine 20 % w/v Polymerlösung mit einem Volumenstrom von $0,6 \text{ mL h}^{-1}$ kontinuierlich in die bei 950 min^{-1} gerührte wässrige Phase geleitet. In Abbildung 5.6 ist die daraus resultierende Partikelgrößenverteilung jener, die sich durch undefiniertes Zutropfen der Polymerlösung mit Hilfe einer Pipette nach 4 h ergab, vergleichend gegenüber gestellt.

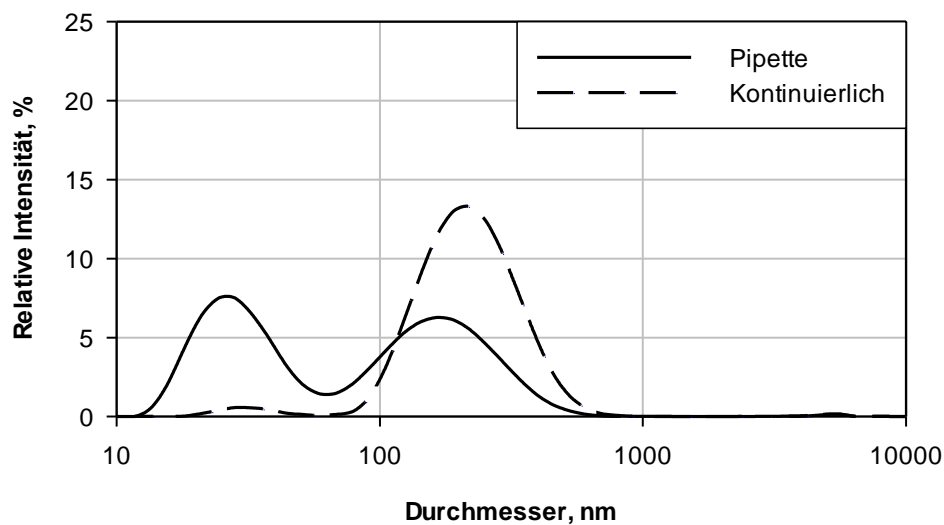


Abbildung 5.6: Intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilung nach Zutropfen der 20 % w/v Polymerlösung mit Hilfe einer Pipette und nach kontinuierlicher Zudosierung ($0,6 \text{ mL h}^{-1}$) mit Hilfe einer Schlauchpumpe. $N = 4$.

Es zeigte sich, dass die kontinuierliche Zudosierung der Polymerlösung mit Hilfe der Pumpe nicht nur möglich ist, sondern sogar Polymersomen mit besserer Qualität lieferte. So wurde bei kontinuierlichem Zulauf ein PDI von 0,3 und ein z-Mittel von 185 nm erreicht. Das undefinierte Zutropfen der Polymerlösung hingegen führte zu einer deutlich breiteren Verteilung bei einem PDI von 0,46 und der Anwesenheit kleiner Strukturen, was anhand des niedrigen z-Mittels von 54 nm deutlich wurde.

Verfahrensentwicklung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren

Der Einfluss der Polymerkonzentration im Zulauf auf die Polymersomendispersion wurde bei 15 % w/v, 20 % w/v und 25 % w/v in miniaturisierten Rührkesselreaktoren ohne Strömungsbrecher (Paddelrührer, 2000 min^{-1}) detaillierter untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Verwendung der 20 % w/v Polymerlösung zu niedrigerer Polydispersität und Ergebnissen mit besserer Reproduzierbarkeit führte als die Verwendung einer 15 % w/v oder einer 25 % w/v Polymerlösung (Ergebnisse nicht dargestellt). Die finale Ethanolkonzentration, welche in Hinblick auf mögliche toxische Effekte des Lösemittels bei der gewünschten Anwendung relevant sein kann, war hierbei mit 5 % v/v bei Herstellung einer 1 % w/v Polymersomendispersion gering.

Basierend auf den Ergebnissen der Polymersomenherstellung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren mittels der Dispersionsmethode (Kapitel 5.1.1) wurden alle weiteren Untersuchungen bei Verwendung des S-Rührers in Reaktoren ohne Stromstörer durchgeführt.

Die Polymersomendispersion (1 % w/v) wurde bei zur Dispersionsmethode identischen Bedingungen ($T = 25\text{ °C}$, $\text{pH } 7,4$, $c_P = 1\text{ % w/v}$) in PBS-Puffer hergestellt. Neben der kontinuierlichen Zudosierung der Polymerlösung mit Hilfe der Schlauchpumpe wurde zudem die automatisierte Polymerzugabe über einen Pipettierroboter untersucht. Für die Realisierung eines quasi-linearen Zulaufprofils wurde die Polymerlösung intermittierend in minimal möglichen $10\text{ }\mu\text{L}$ Volumina zugegeben. Die Polymerlösung wurde über beide Arten der Zudosierung bei $1,0\text{-}6,8\text{ mL h}^{-1}$ in die gerührte (3000 min^{-1}) wässrige Phase zugeführt. In Abbildung 5.7 sind die jeweiligen erzielten PDIs dargestellt. Der Prozess zeigte sich im untersuchten Bereich praktisch unabhängig von der Zulauftrate und der Art der Zudosierung. Da in jedem Fall schmale intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilungen mit niedrigen Polydispersitäten innerhalb von nur 4 h erreicht wurden, konnte die erfolgreiche Polymersomenherstellung über die Ethanolmethode bei definierten Prozessbedingungen demonstriert werden. Aufgrund des höheren Automatisierungsgrades wurde für weitere Untersuchungen der Pipettierroboter verwendet.

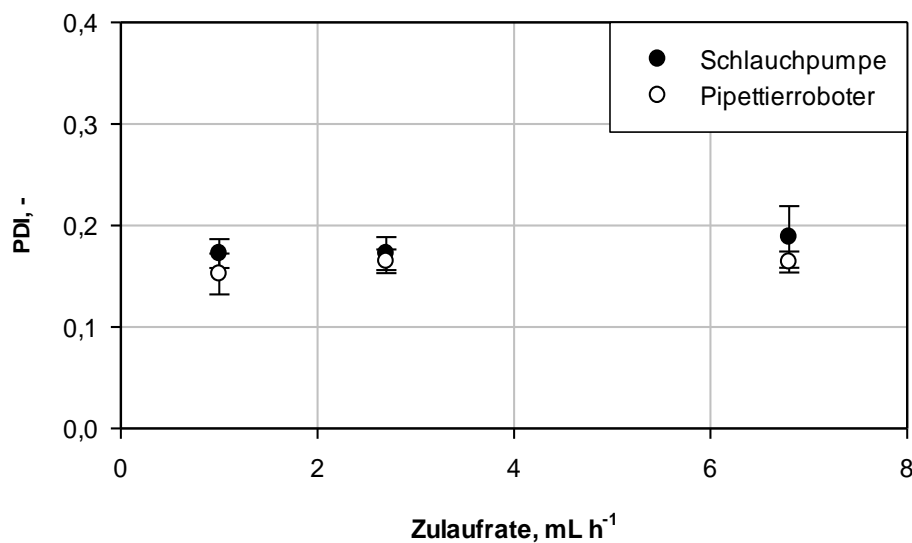


Abbildung 5.7: Abhängigkeit des PDIs von der Zulauftrate der 20 % w/v Polymerlösung bei Verwendung der Schlauchpumpe und des Pipettierroboters nach 4 h Prozesszeit (S-Rührer, 3000 min^{-1} , unbewehrter Reaktor). $N = 3$.

Prozesszeit. Der Verlauf der Polydispersität beim etablierten Polymersomenherstellungsprozess innerhalb der Prozessdauer von bis zu 48 h ist in Abbildung 5.8 A dargestellt. Hierbei wurde der S-Rührer bei 4000 min^{-1} in unbewehrten Reaktoren verwendet und die 20 % w/v Polymerlösung intermittierend mit 1 mL h^{-1} zugeführt.

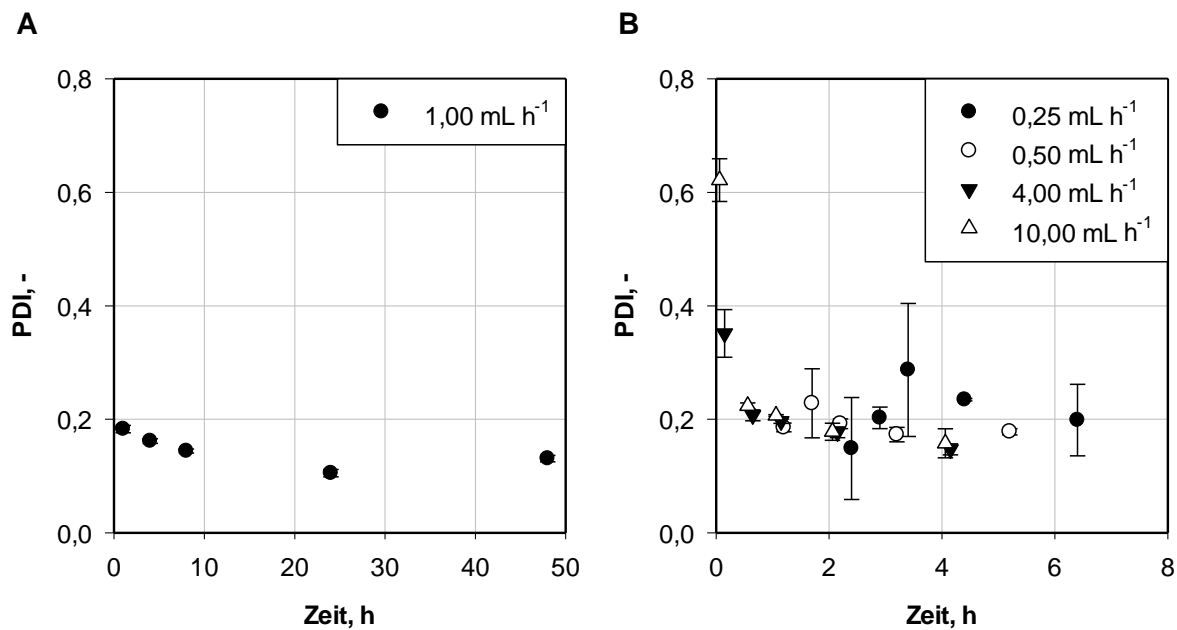


Abbildung 5.8: A) Abhängigkeit des PDIs von der Prozesszeit bei Zudosierung der 20 % w/v Polymerlösung mit 1 mL h^{-1} . B) Abhängigkeit des PDIs von der gesamten Prozesszeit (Prozesszeit beginnt mit dem Zudosierungsprozesses und endet 4 h nach vollständiger Zudosierung der Polymerlösung) bei Zudosierung der Polymerlösung mit $0,25\text{-}10,00 \text{ mL h}^{-1}$ (unbewehrter Reaktor, S-Rührer, 4000 min^{-1}). N = 3.

Die Polydispersität nahm mit zunehmender Prozesszeit kontinuierlich ab, bis sie nach 24 h den niedrigsten Wert von $\text{PDI} = 0,11$, welcher einer sehr schmalen Partikelgrößenverteilung entspricht, erreichte. Allerdings bildeten sich bei Prozesszeiten über 4 h kleine, mit bloßem Auge erkennbare, Polymeraggregate. Mit dem Fokus auf der Etablierung eines effizienten Prozesses ist jedoch die vollständige Umsetzung des Polymers zu den gewünschten Polymersomen von großer Wichtigkeit. Zudem sind kurze Prozesszeiten in Hinblick auf Herstellungskosten essentiell. Durch Prozesszeiten von bis zu maximal 4 h konnten beiden Forderungen erfüllt werden. Daher wurde der etablierte Prozess bei bis zu 4 h vertiefend untersucht. Da die Dauer, die das Zudosieren der Polymerlösung in Anspruch nimmt, die gesamte Prozesszeit beeinflussen kann, wurde der etablierte Prozess bei unterschiedlichen Zulaufzeiten von $0,25\text{-}10,0 \text{ mL h}^{-1}$ untersucht. In Abbildung 5.8 B sind die erzielten Polydispersitäten in Abhängigkeit der gesamten Prozesszeit (Prozesszeit beginnt mit dem Start des Zudosierungsprozesses und endet 4 h nach vollständiger Zudosierung der Polymerlösung) abgebildet. Die niedrigste untersuchte Zulaufzeit \dot{V} von $0,25 \text{ mL h}^{-1}$ führte zu breiten, bimodalen Partikelgrößenverteilungen mit einem sehr niedrigen z-Mittel von circa 40 nm (Ergebnisse nicht dargestellt). Dieser sehr niedrige Wert weist auf die Existenz unerwünschter Polymermizellen ohne verkapselbares, wässriges Volumen hin. Bei Zulaufzeiten von $0,50\text{-}10,00 \text{ mL h}^{-1}$ hingegen konnten innerhalb sehr kurzer Prozesszeiten von nur circa 1 h Polymersomen mit niedriger Polydispersität ($\text{PDI} < 0,2$) bei einem z-Mittel von

circa 200 nm (Ergebnisse nicht dargestellt) erzielt werden. Der Prozess zeigte sich demnach bei Zulaufsraten $> 0,50 \text{ mL h}^{-1}$ robust gegenüber der Geschwindigkeit der Polymerzudosierung. Bezogen auf das gesamten Füllvolumen V von 12 mL lässt sich somit festhalten, dass für das Verhältnis von Zulauftrate \dot{V} zu Füllvolumen $\frac{\dot{V}}{V} \geq 0,042 \text{ h}^{-1}$ gelten muss.

Robustheit des etablierten Prozesses. Der etablierte Polymersomenherstellungsprozess über die Ethanolmethode in miniaturisierten Rührkesselreaktoren wurde auf seine Robustheit gegenüber verschiedenen Prozessbedingungen untersucht. Dabei zeigte sich keine Abhängigkeit der resultierenden Polydispersität vom Reaktorvolumen im Arbeitsbereich des S-Rührers (10-15 mL) (Ergebnisse nicht dargestellt). Der Prozess wurde zudem gegenüber Variation der finalen Polymerkonzentration c_p , der Prozess Temperatur T , dem pH und der Puffermolarität untersucht. Hierfür wurde die 20 % w/v Polymerlösung bei einer Zulauftrate von 1 mL h^{-1} in die gerührte wässrige Phase (unbewehrter Reaktor, S-Rührer, 4000 min^{-1}) zugeführt. Der Prozess wurde ab Ende des Zulaufprozesses der Polymerlösung betrachtet. Für die Variation des pHs von pH 5 bis pH 8 und der Molarität von 0 mM bis 100 mM wurde doppelt destilliertes Wasser (0 mM) beziehungsweise Phosphatpuffer verwendet.

Polymerkonzentration. Für eine effiziente Polymersomenherstellung wäre neben der Erzeugung von Vesikeln guter Qualität auch eine hohe Quantität an Polymervesikeln in der Dispersion wünschenswert. Daher wurden Polymersomen bis zu einer finalen Polymerkonzentration c_p von 5 % w/v hergestellt ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, PBS-Puffer pH 7,4). Wie in Abbildung 5.9 A anhand des zeitlichen Verlaufs der Polydispersität dargestellt, zeigte sich jedoch, dass im betrachteten Zeitraum von bis zu 4 h nur bis zu einer Polymerkonzentration von 1,0 % w/v die erwünscht niedrige Polydispersität ($\text{PDI} < 0,2$) erzielt werden konnte. Bei höheren Werten nahm die Polydispersität mit zunehmender Polymerkonzentration zu. Bei einer Polymerkonzentration von 5 % w/v wies der PDI mit einem Wert von 0,32 nach 4 h auf eine relativ breite Partikelgrößenverteilung hin.

Temperatur. Die Möglichkeit Polymersomen bei unterschiedlichen Temperaturen produzieren zu können ist besonders dann relevant wenn diese als Nanoreaktoren für biotechnologische Prozesse in Anwesenheit von Enzymen fungieren sollen. Unterschiedliche Enzyme weisen variierende Temperaturstabilitäten auf, weshalb die Vesikelproduktion in einem möglichst großen Temperaturbereich realisierbar sein sollte. Aus diesem Grund wurde die Polymersomenherstellung bei 8-40 °C untersucht ($c_p = 1 \text{ } \%$ w/v, PBS-Puffer pH 7,4). Die Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 5.9 B, zeigten, dass die Temperatur im untersuchten Bereich kaum Auswirkungen auf die resultierende Vesikelqualität nahm. Die gewünschte, niedrige Polydispersität mit $\text{PDI} < 0,2$ wurde in jedem Fall spätestens nach 1 h erreicht.

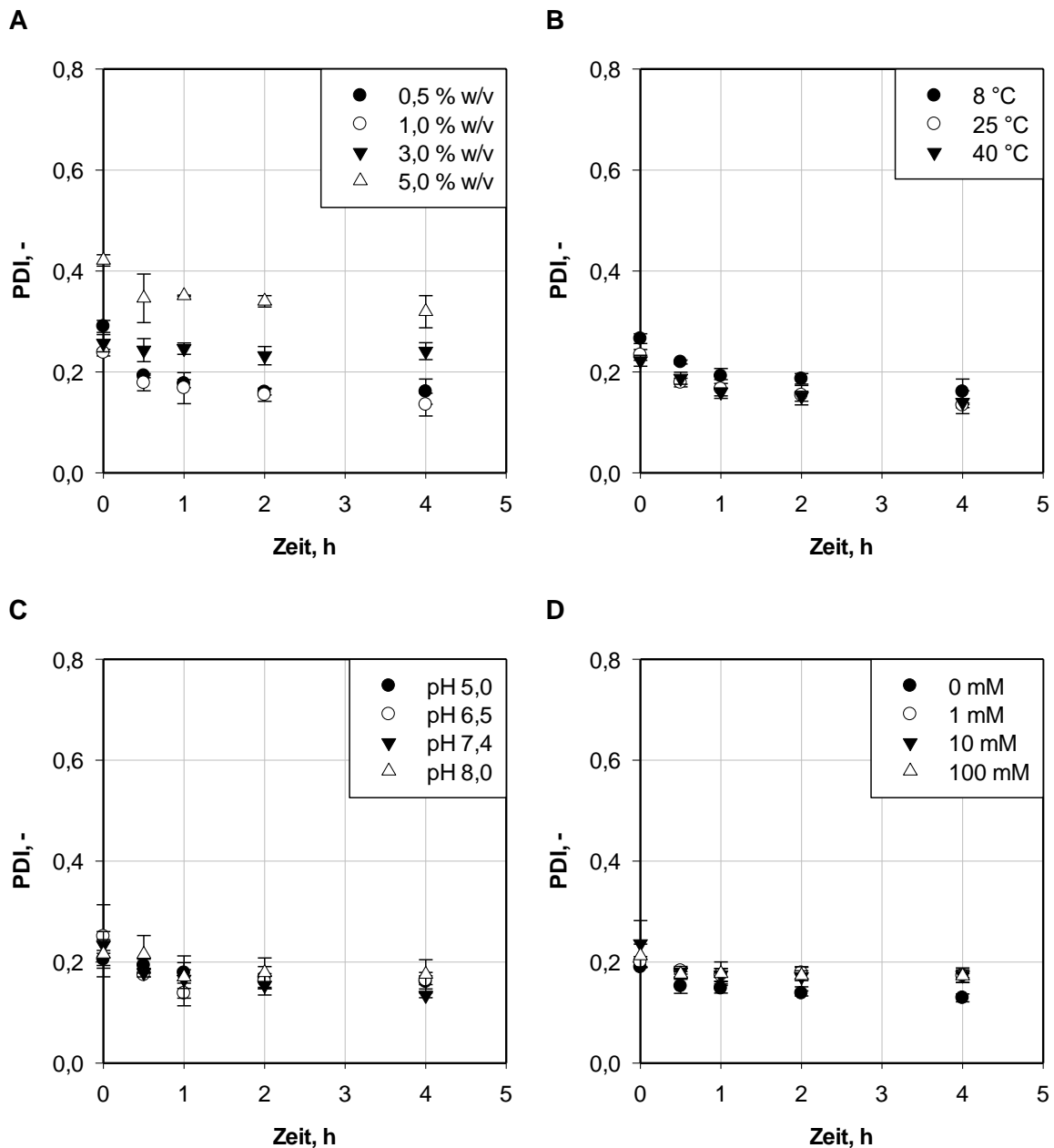


Abbildung 5.9: Abhängigkeit des PDIs von A) der finalen Polymerkonzentration ($T = 25\text{ °C}$, PBS-Puffer pH 7,4), B) der Temperatur ($c_p = 1\text{ % w/v}$, PBS-Puffer pH 7,4), C) dem pH ($c_p = 1\text{ % w/v}$, $T = 25\text{ °C}$, Phosphat-Puffer, 100 mM) und D) der Puffermolarität ($c_p = 1\text{ % w/v}$, $T = 25\text{ °C}$, dd H₂O (0mM)) beziehungsweise Phosphat-Puffer pH 7 (1-100 mM)). Die 20 % w/v Polymerlösung wurde mit 1 mL h⁻¹ intermittierend über den Pipettierroboter zudosiert (unbewehrter Reaktor, S-Rührer, 4000 min⁻¹). Prozesszeit ab Ende des Zudosierungsprozesses. N = 3.

pH und Molarität. Die Polymersomenherstellung bei variierendem pH und variierender Molarität ist für medizinische und biotechnologische Anwendungsgebiete der Polymersomentechnologie gleichermaßen wichtig. Die Qualität der hergestellten Vesikel

zeigte sich weder vom pH (Abbildung 5.9 C), noch von der Molarität der wässrigen Phase (Abbildung 5.9 D) abhängig. Im Bereich von pH 5 bis pH 8 ($c_p = 1\% \text{ w/v}$, $T = 25\text{ °C}$, Phosphat-Puffer, 100 mM) und von 1 mM bis 100 mM ($c_p = 1\% \text{ w/v}$, $T = 25\text{ °C}$, Phosphat-Puffer pH 7) konnten innerhalb von 1 h die gewünschten schmalen Partikelgrößenverteilungen ($\text{PDI} < 0,2$) erreicht werden. Lediglich die Polymersomen-dispersion, die in doppelt destilliertem Wasser (0 mM) hergestellt wurde, zeigte geringfügig niedrigere Polydispersitäten. Hierbei wurde mit einem PDI von 0,13 nach 4 h die niedrigste Polydispersität innerhalb dieser Versuchsreihe ermittelt.

Etablierter Polymersomenherstellungsprozess. Neben den anhand der Dispersionsmethode (Kapitel 5.1.1) identifizierten, optimalen Strömungsbedingungen im miniaturisierten Rührkesselreaktor (S-Rührer, 4000 min^{-1} , unbewehrter Reaktor) wurde für die Polymersomenherstellung über die Ethanolmethode die standardmäßige Verwendung einer 20 % w/v Polymerlösung eingeführt. Der etablierte Polymersomenherstellungsprozess ermöglichte die effiziente Herstellung von Polymersomen mit schmaler Partikelgrößenverteilung innerhalb sehr kurzer Prozesszeiten in einem weiten Temperatur-, pH- und Molaritätsbereich. Zudem zeigte sich eine hervorragende Reproduzierbarkeit des Prozesses, die sich in relativen Abweichungen des PDIs von $< 5\%$ widerspiegelte. Die TEM-Aufnahmen einer in doppelt destilliertem Wasser hergestellten Polymersomendispersion, dargestellt in Abbildung 5.10. zeigten, dass die erwünschten Polymervesikel in der erwarteten Größenordnung gebildet wurden.

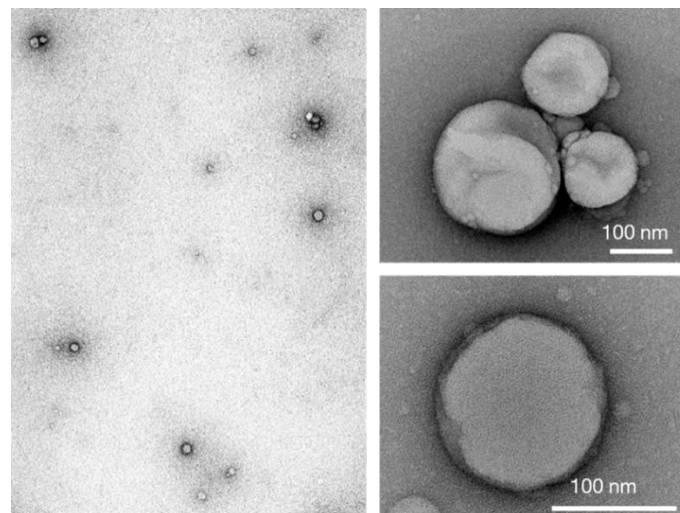


Abbildung 5.10: TEM-Aufnahmen zeigen, dass über die etablierte Methode die gewünschten Polymersomen entstehen.

In Tabelle 5-1 sind Richtlinien und valide Bereiche der untersuchten Parameter des etablierten Prozesses zusammengefasst.

Tabelle 5-1: Richtlinien des etablierten Polymersomenherstellungsprozesses.

Prozessgröße	Wert
Reaktor ¹	Unbewehrt
Rührer ¹	S-Rührer
Rührerdrehzahl ¹	4000 min ⁻¹
Prozesszeit ²	1-4 h
Reaktorvolumen ²	10-15 mL
Polymerkonzentration im Zulauf ²	20 % w/v
Zulauftrate ¹	≥ 0,5 mL h ⁻¹
Polymerkonzentration ¹	≤ 1,0 % w/v
Temperatur ³	8-40 °C
pH ³	5-8
Molarität ³	0-100 mM

¹ Bedingung, ² Richtlinie, ³ untersuchter Bereich

5.1.3 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl über die Dispersions- als auch über die Ethanolmethode in sehr kurzer Zeit Polymersomendispersionen mit niedriger Polydispersität ($PDI < 0,2$) erzielt werden können. Hierfür erwies sich der S-Rührer in unbewehrten Reaktoren als optimal. In Abbildung 5.11 sind exemplarisch die erzielten PDIs bei der Polymersomenherstellung über die Dispersions- und Ethanolmethode (Zudosierung mit Hilfe der Schlauchpumpe bei 2,7 mL h⁻¹, 3000 min⁻¹) vergleichend gegenüber gestellt.

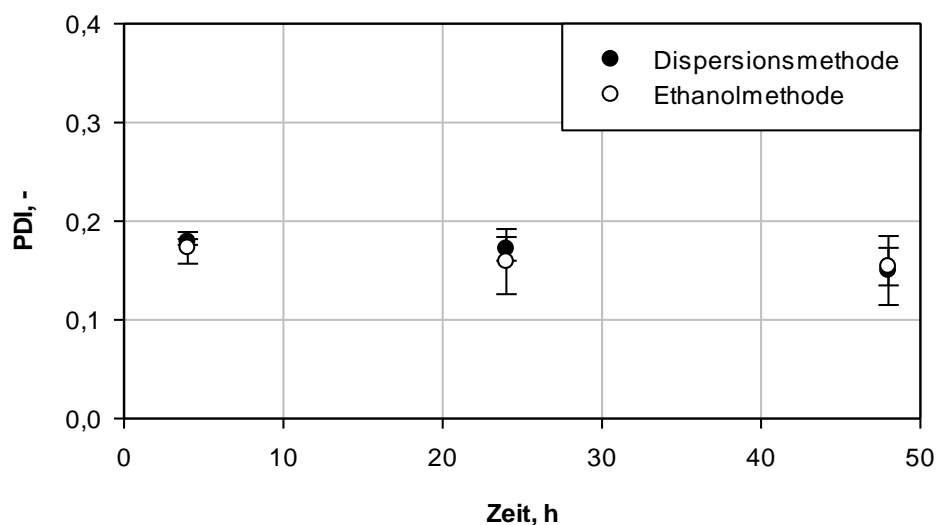


Abbildung 5.11: Abhängigkeit des PDIs von der Prozesszeit bei Polymersomenherstellung über die Dispersions- und die Ethanolmethode (unbewehrter Reaktor, S-Rührer, 3000 min⁻¹). N = 3.

Die nahezu identischen Werte in Abbildung 5.11 legen nahe, dass die resultierende Polymersomenqualität kaum von der untersuchten Herstellungsmethode, sondern überwiegend von den im Reaktor realisierten Strömungsbedingungen abhängig war. Die Größe der Vesikel (z-Mittel) konnte jedoch, wie im Folgenden noch näher diskutiert werden wird (Kapitel 5.2.4), in keinem Prozess signifikant beeinflusst werden und lag bei vorliegender niedriger Polydispersität ($PDI < 0,2$) zwischen 180 nm und 200 nm. Der Vorteil der Ethanolmethode gegenüber der Dispersionsmethode zeigte sich jedoch deutlich in den erzielten Umsätzen (Abbildung 5.5). Während bei der Dispersionsmethode ein erheblicher Polymerrückstand verzeichnet wurde, konnte über die Ethanolmethode bei Prozesszeiten bis zu 4 h ein vollständiger Umsatz erzielt werden. In Hinblick auf die Herstellung von Polymersomen in Rührkesselreaktoren im industriellen Maßstab eröffnet sich bei der Ethanolmethode ein weiterer entscheidender Vorteil. Eine Polymerlösung mit definierter Polymerkonzentration ist über eine Pumpe deutlich einfacher zu fördern und zu dosieren als es bei der Dispersionsmethode mit bei Raumtemperatur zu starker Agglomeration neigendem Polymerpulver möglich wäre. Mögliche Lösemittelrückstände in der entstehenden Polymermembran können jedoch toxische Effekte bei der gewünschten Applikation nach sich ziehen. Hierbei ist Ethanol mit seiner geringen Toxizität im Vergleich zu anderen bei der Lösemittel-Methode häufig verwendeten Lösemitteln wie Toluol oder Chloroform eine gute Wahl (Gonzalez-Perez *et al.*, 2009). Zudem wird für kosmetisch-medizinische Anwendungen von Membranvesikeln zu Zwecken der Konservierung ohnehin häufig Ethanol zugefügt (Hamann und Nothelle, 1995).

Bisher wurden Polymervesikel typischerweise überwiegend unter undefinierten Bedingungen im Labormaßstab hergestellt. Die vermutlich einfachste Art der Vesikelherstellung basiert auf dem Zutropfen einer Polymerlösung, zum Beispiel mit einer Pipette, zu einer stark gerührten wässrigen Phase. Dieses kaum reproduzierbare Vorgehen führt innerhalb von häufig langen Prozesszeiten (bis zu 72 h) zu breiten Partikelgrößenverteilungen (Nardin *et al.*, 2000a; Rank *et al.*, 2009). Um die Verteilung zu verschmälern sind meist weitere aufwendige Prozessschritte, wie beispielsweise das mehrmalige Extrudieren der Vesikeldispersion durch Polycarbonat-Membranen mit definierter Porengröße, notwendig (Nardin *et al.*, 2000a; Nardin und Meier, 2001; Kita-Tokarczyk *et al.*, 2005; Rank *et al.*, 2009). Ein entscheidender Nachteil dieser Methode zur Verbesserung der Vesikelqualität ist das geringe behandelbare Volumen (Rameez *et al.*, 2010). Um hingegen große Volumina zu extrudieren, sind hohe Drücke bis hin zu 10,5 MPa notwendig (Schneider *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1995; Rameez *et al.*, 2010). In der Polymersomendispersion verbleibende, unerwünschte Mizellen hingegen können nicht durch Extrusion beseitigt werden, sondern müssen über einen weiteren Schritt, beispielsweise über Größenausschlusschromatographie, beseitigt werden.

Um Polymersomen mit niedriger Polydispersität in einem einzigen Prozessschritt herstellen zu können, wurden bereits verschiedene, unkonventionelle Methoden etabliert. So konnte Hauschild im Jahr 2005 zeigen, dass ein handelsüblicher Tintenstrahldrucker für die Herstellung von Vesikeln mit niedriger Polydispersität verwendet werden kann. Durch das „drucken“ einer Poly(2-vinyl-pyridin)-poly(ethylenglycol) (P2VP-PEG) Lösung in eine gerührte wässrige Phase wurde eine sehr gute Kontrolle über die Vesikelgröße bei gleichzeitig guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht (Hauschild *et al.*, 2005). Fünf Jahre später wurden erfolgreich Polymersomen aus demselben Polymer in einer kreuzweise angeordneten Mikrofluidikeinheit hergestellt. Durch Variation der Volumenströme der beiden wässrigen Ströme und des Volumenstroms der Polymerlösung im Hauptkanal konnten Polymersomen mit niedriger Polydispersität erzeugt werden. Zudem konnte die Vesikelgröße im Bereich von 40 nm bis zu 2 μm variiert werden (Thiele *et al.*, 2010b; Thiele *et al.*, 2010a). Neben anderen mikrofluidischen Apparaturen (Thiele *et al.*, 2014), die auch die Polymersomenherstellung aus pH-sensitiven Polymeren ermöglichte (Brown *et al.*, 2010), wurden auch kontinuierlich betriebene Mikromischer erfolgreich für die reproduzierbare Herstellung von Polymervesikeln mit schmaler Partikelgrößenverteilung in nur einem Prozessschritt verwendet (Thiermann *et al.*, 2012; Bleul *et al.*, 2013). Mit einer finalen Polymerkonzentration von $< 0,01\%$ w/v war dabei die Ausbeute an Polymersomen bei Verwendung der Mikrofluidik deutlich niedriger als bei Einsatz des Tintenstrahldruckers. Hier betrug die Polymerkonzentration der finalen Präparation bis zu $0,65\%$ w/v (Hauschild *et al.*, 2005; Thiele *et al.*, 2010b). Ein weiterer Aspekt, der bei der Etablierung eines Prozesses zur Herstellung von Polymervesikeln nicht außer Acht gelassen werden sollte, ist die Möglichkeit der Maßstabsübertragung (Nallani *et al.*, 2006; van Rijn *et al.*, 2013). Während Mikromixer bis zum Maßstab von 100 L verfügbar sind und damit die Polymersomenproduktion theoretisch im Pilotmaßstab möglich sein müsste (Thiermann *et al.*, 2012; Capretto *et al.*, 2013; Bleul *et al.*, 2015), ist der Durchsatz von Mikrofluidikeinheiten auf den Bereich von $\mu\text{L min}^{-1}$ beschränkt (Bleul *et al.*, 2015). Demzufolge ist die Maßstabsvergrößerung dieser Methoden ausschließlich durch Parallelisierung (horizontale Maßstabsvergrößerung) möglich. Ein weiterer Nachteil besteht in den sehr geringen Dimensionen der mikrofluidischen Apparaturen, die sie gegenüber Ablagerungen und Verstopfung sensibel machen. In jedem Fall müssten für die industrielle Verwendbarkeit dieser Apparaturen weitere Studien hinsichtlich ihrer Lebensdauer durchgeführt werden. Aus genannten Gründen wird für industrielle Zwecke oftmals die Verwendung klassischer Reaktoren wie Rührkesselreaktoren, die sogenannte vertikale Strategien zur Maßstabsvergrößerung erlauben, bevorzugt (Dudukovic, 2010). Die solide Maßstabsübertragung des in miniaturisierten Rührkesselreaktoren etablierten Prozesses zur Herstellung von Polymersomen mit schmaler Partikelgrößenverteilung ist gewährleistet, da die

hierfür notwendigen Prozessparameter, wie beispielsweise Leistungseintrag und maximale Energiedissipation, bekannt sind. Das in dieser Arbeit etablierte, robuste Verfahren zur schnellen Herstellung von Polymersomen mit schmaler Partikelgrößenverteilung in nur einem Schritt stellt demnach einen bedeutenden Fortschritt in der Polymersomentechnologie dar.

In Tabelle 5-2 sind wichtige Aspekte der diskutierten Techniken zur Herstellung von Polymersomen und gegenüber gestellt.

Tabelle 5-2: Gegenüberstellung relevanter Eigenschaften der verschiedenen Techniken zur Polymersomenherstellung.

Prozessgröße	Konventionell	Drucker, Mikrofluidik	Mikromixer	In dieser Arbeit etablierter Prozess
Polydispersität	hoch	niedrig	niedrig	niedrig
Kontrolle Vesikeldurchmesser	nein	ja	unklar	nein
Reproduzierbarkeit	nein	ja	ja	ja
Finale Polymerkonzentration	1 % w/v	< 0,01 % w/v	< 0,65 % w/v	1 % w/v
Anzahl der Prozessschritte	> 1	1	1	1
Automatisierung	nein	k. A.	k. A.	ja
Maßstabsvergrößerung	nein	horizontal	unklar	vertikal

k.A. keine Angaben

5.2 Mechanismus der Polymersomenbildung

Im Folgenden wird der Mechanismus der Polymersomenbildung für den etablierten Prozess in miniaturisierten Rührkesselreaktoren (Kapitel 5.1) beleuchtet. Direkt nach Zugabe der Polymerlösung über die Injektionsmethode (Kapitel 4.3.2) zu doppelt destilliertem Wasser wurden die morphologischen Veränderungen der Polymeraggregate im Verlauf der Prozesszeit mit Hilfe von TEM-Aufnahmen und mittels Messungen der dynamischen Lichtstreuung sowie über Extinktionsmessungen untersucht.

5.2.1 Polymersomenbildung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren

Bei der Polymersomenherstellung über den etablierten Polymersomenherstellungsprozess (Kapitel 5.1.2) wurden die morphologischen Veränderungen mit der Zeit sichtbar. Während der Reaktionsansatz wenige Sekunden nach Polymerzugabe noch nahezu so transparent wie Wasser war, wurde dieser zunehmend trüber, bis er nach 60 min eine milchig weiße Färbung erreichte (Abbildung 5.12 A).

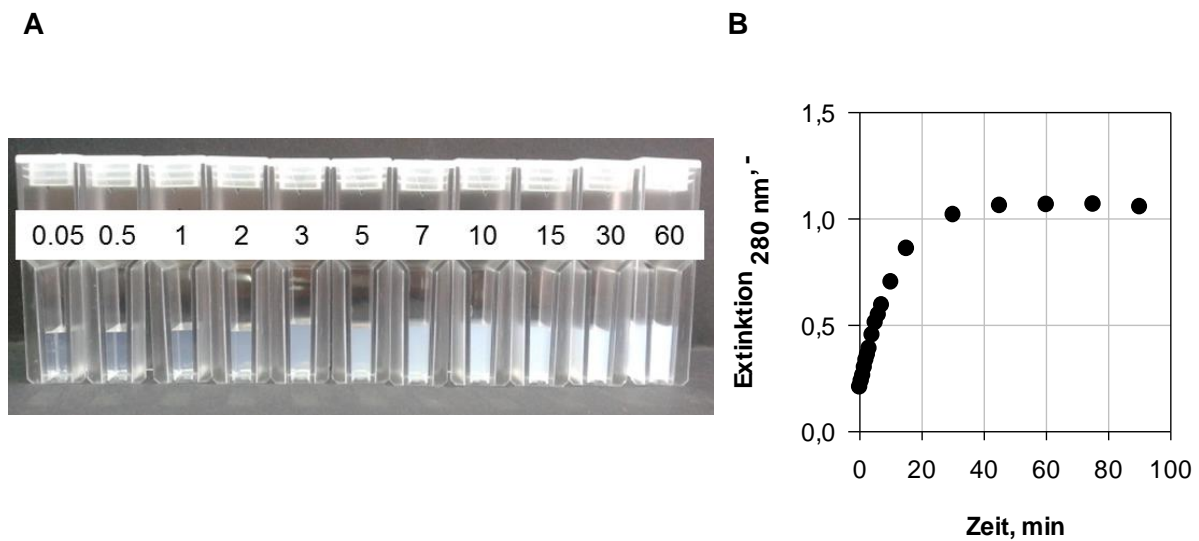


Abbildung 5.12: A) Die morphologische Veränderung der durch Selbstassemblierung entstehenden Polymeraggregate in Abhängigkeit von der Zeit (min) sind anhand der zunehmenden Trübung (Extinktion) des Reaktionsansatzes visuell erkennbar. B) Zunahme der Extinktion im Prozessverlauf.

Extinktionsmessung. Die zunehmende Trübung konnte auch über Extinktionsmessungen (280 nm), dargestellt in Abbildung 5.12 B, verfolgt werden. Hierbei nahm die Extinktion innerhalb der ersten Prozessminuten linear zu. Im weiteren Verlauf kam es zur Abflachung der Kurve. Die Extinktion schien sich einem konstanten Wert anzunähern, welcher sich nach 90 min vollständig eingestellt hatte. Die Zunahme der Extinktion im Prozessverlauf kann mit der Größenzunahme der in der Dispersion vorliegenden Polymeraggregate erklärt werden, da große Partikel das einfallende Licht deutlich stärker streuen als kleine (Kapitel 3.2.1) und damit die erhöhte Extinktion hervorrufen. Um den Vesikelbildungsprozess im zeitlichen Verlauf aufzuklären, wurden im Verlauf des Prozesses mehrere Proben entnommen und mittels TEM-Aufnahmen untersucht.

TEM-Aufnahmen. In Abbildung 5.13 sind die mikroskopischen Bilder der hundertfach verdünnten Proben während des Polymersomenherstellungsprozesses nach 2 min, 5 min, 10 min, 60 min und 120 min Prozessdauer dargestellt. Nach Zugabe des Polymers bildeten sich innerhalb kurzer Zeit sphärische Polymermizellen mit sehr kleinen Durchmessern von circa 30 nm. Zwei Minuten nach Prozessbeginn dominierte diese Morphologie (Abbildung 5.13, 2 min, links). Zu diesem Zeitpunkt hatte sich ebenfalls ein sehr geringer Anteil an größeren Aggregaten, wie Wurmizellen und Ringe gebildet (Abbildung 5.13, 2 min, rechts). Im weiteren Verlauf (5 min nach Prozessbeginn) nahm die Anzahl an Mizellen ab, wohingegen ein Progress in Richtung größerer Strukturen zu verzeichnen war. Hierbei wurde auch die Entstehung scheibenförmige Mizellen (Abbildung 5.13, 5 min, rechts) nachgewiesen.

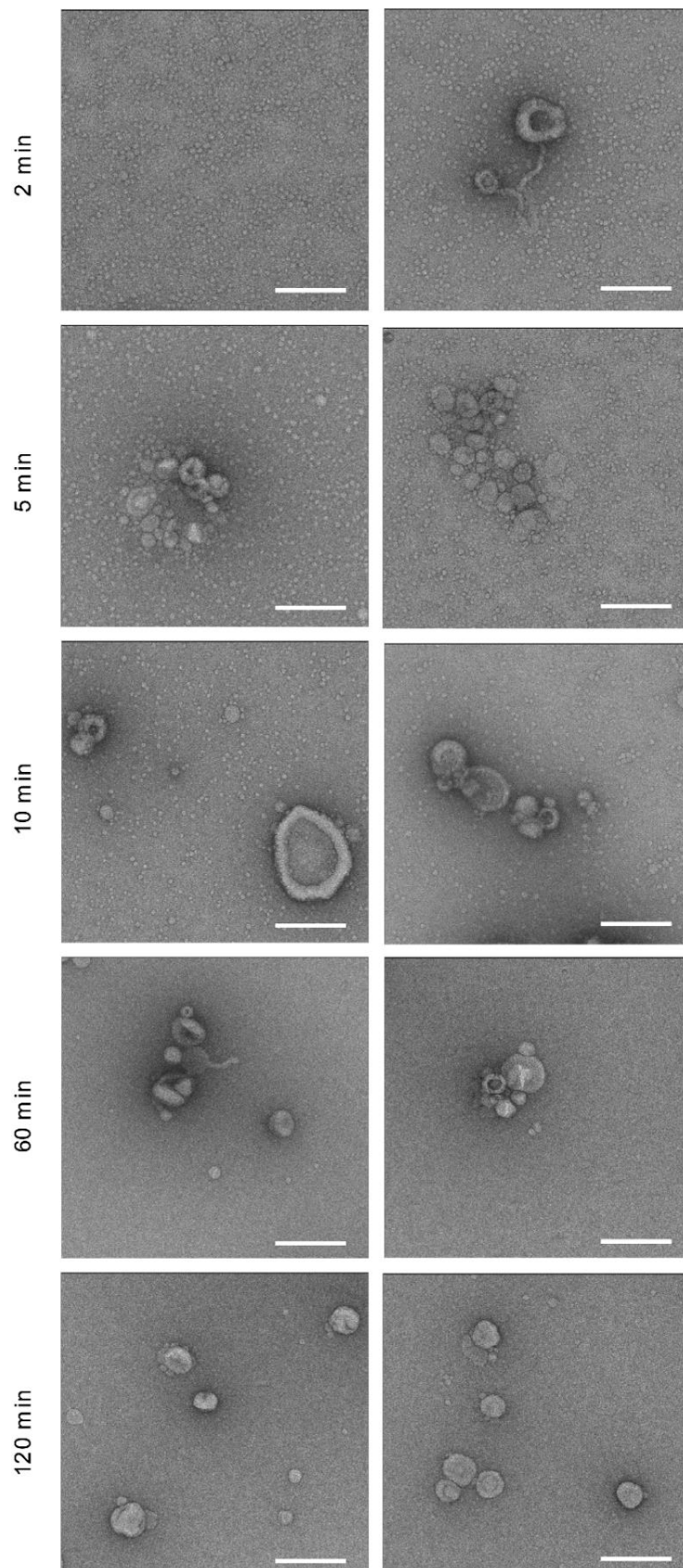


Abbildung 5.13: TEM-Aufnahmen einer hundertfach verdünnten Probe während des Polymersomenherstellungsprozesses über die etablierte Methode nach 2 min, 5 min, 10 min, 30 min, 60 min und 120 min. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 500 nm.

Nach 10 min konnten nur noch wenige sphärische Mizellen in der Probe nachgewiesen werden. Erste Polymervesikel, korbartige und ringförmige Strukturen sowie Wurmmizellen (hier nicht dargestellt) wurden identifiziert. Nach 60 min konnten keine Mizellen mehr verzeichnet werden (Abbildung 5.13, 60 min). Zu diesem Zeitpunkt waren überwiegend die gewünschten Vesikel, aber auch einige Donut-förmige und korbartige Strukturen präsent. Spätestens 120 min nach Prozessbeginn waren nahezu ausschließlich Polymersomen zu identifizieren (Abbildung 5.13, 120 min).

Die visuelle Auswertung der Proben mittels TEM-Aufnahmen war in jedem Fall subjektiv. Ohne exakte Auszählung der einzelnen Morphologien von möglichst vielen Proben je Probenahmezeitpunkt und in möglichst vielen Bereichen der für die Mikroskopie vorbereiteten Probenträger war nur eine semiquantitative Auswertung möglich. Eine Auswahl der zu verschiedenen Prozesszeitpunkten identifizierten Morphologien ist in Abbildung 5.14 dargestellt.

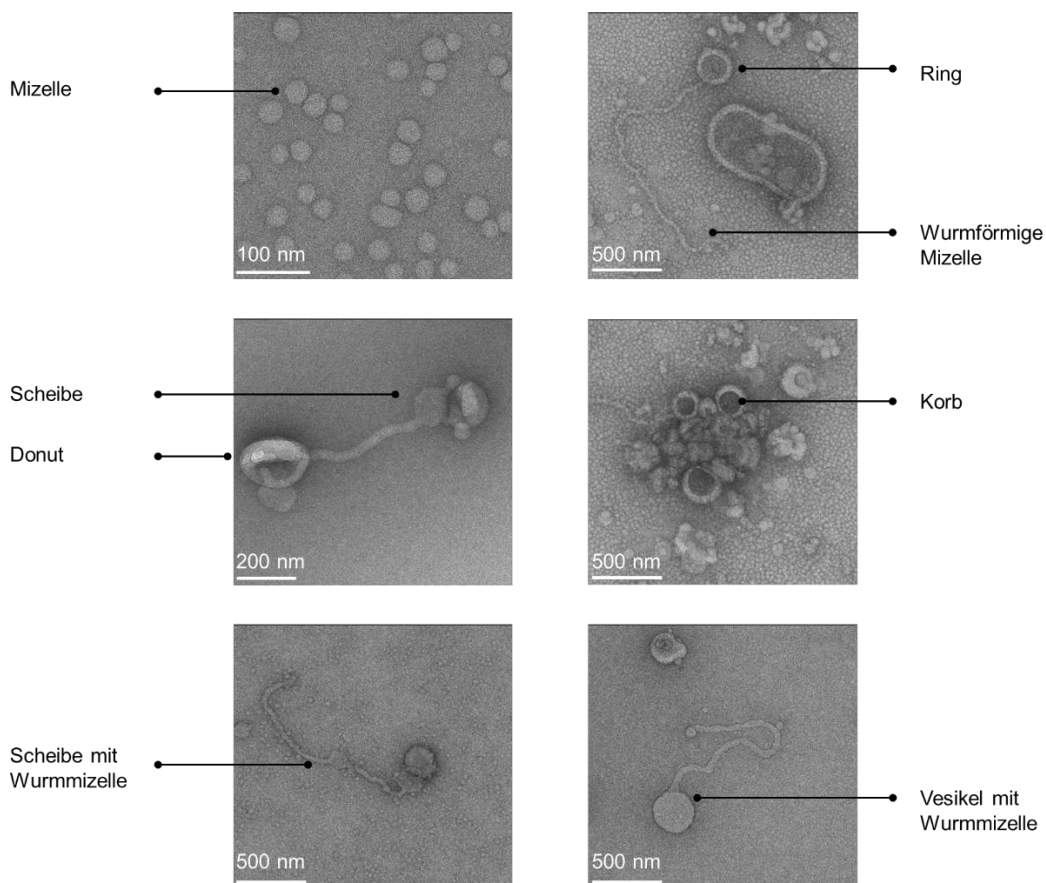


Abbildung 5.14: Auswahl der während des Herstellungsprozesses entstandenen Morphologien.

Die semiquantitative Auswertung der zu verschiedenen Zeitpunkten auftretenden Morphologien ist in Tabelle 5-3 zusammengefasst.

Tabelle 5-3: Semiquantitative Auswertung der TEM-Aufnahmen während des Polymersomenherstellungsprozesses zwischen 2 min und 120 min nach Polymerzugabe: Schwarz hinterlegte Felder symbolisieren die sehr dominante Präsenz der jeweiligen Morphologie, dunkelgrau steht für sehr viele in den Aufnahmen gesichtete Exemplare und hellgrau für vereinzelte Exemplare. Weiß symbolisiert die völlige Abwesenheit der jeweiligen Morphologie in der betrachteten Probe.

	2 min	5 min	10 min	60 min	120 min
Mizellen	Black	Dark Gray	Light Gray	White	White
Wurmmizellen	White	White	White	Dark Gray	White
Ringe & Donuts	White	White	White	Dark Gray	White
Scheiben & Körbe	White	White	White	White	Dark Gray
Vesikel	White	White	White	White	Black

Polymersomenbildungsweg. Anhand der semiquantitativen Auswertung der TEM-Aufnahmen (Tabelle 5-3) konnte der Polymersomenbildungsweg in miniaturisierten Rührkesselreaktoren aufgeklärt werden. Direkt nach Prozessbeginn waren überwiegend Mizellen präsent, deren Anzahl im Prozessverlauf stetig abnahm, bis sie nach spätestens 60 min vollständig verschwunden waren. Nach nur 5 min waren bereits erste Vesikel erkennbar, deren Anzahl stetig stieg. Innerhalb des Prozessverlaufs bis 60 min nach Prozessbeginn waren durchgehend einige wenige Wurmmizellen und Ringe, später auch Scheiben und korbartige Strukturen zu erkennen, bis nach 120 min nahezu ausschließlich Vesikel verzeichnet wurden. Anhand dieser Auswertung wurde in Zusammenhang mit den bereits bekannten existierenden Mechanismen der Vesikelbildung (Kapitel 3.1.2) auf die in Abbildung 5.15 schematisch abgebildeten Wege der Polymersomenbildung geschlossen.

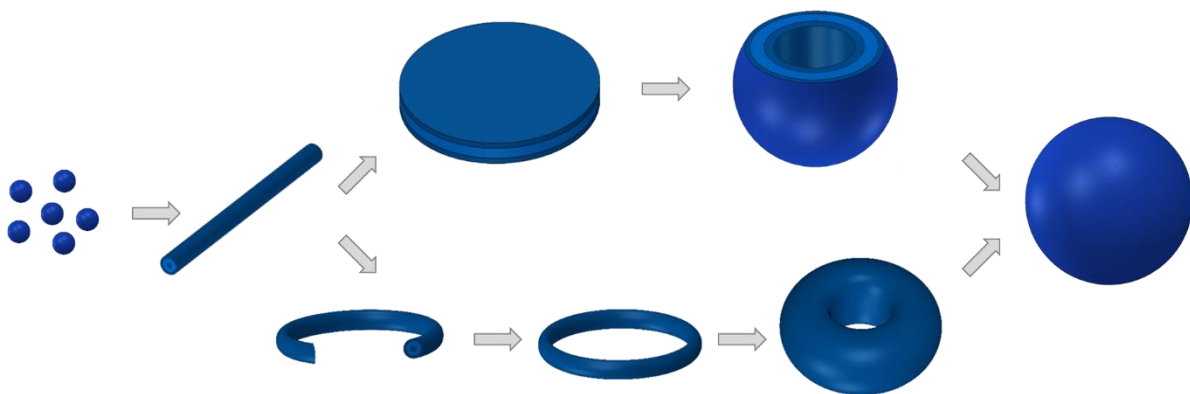


Abbildung 5.15: Wege der Vesikelbildung in Rührkesselreaktoren. Direkt nach Polymerzugabe bilden sich innerhalb kurzer Zeit sphärische Mizellen, die zu Wurmmizellen koaleszieren. Diese können ihrerseits durch weitere Koaleszenz scheibenförmige Mizellen bilden, die sich zur Verringerung der Oberflächenspannung krümmen und offene, korbartige Strukturen bilden. Diese schließen sich abschließend und bilden die Vesikel. Ein alternativer Weg der Vesikelbildung beginnt mit der Ringbildung aus Wurmmizellen. Diese wachsen zu Donut-förmigen Strukturen, die ihrerseits Vesikel ausbilden.

Ausgangspunkt der Polymersomenbildung ist die schnelle Formierung von sphärischen Polymermizellen direkt nach Zugabe der Polymerlösung. Aus diesen Mizellen bilden sich durch Fusionsprozesse Wurmizellen. Diese Wurmizellen können ihrerseits durch weitere Koaleszenz scheibenförmige Mizellen bilden. Sobald diese eine kritische Größe erreichen, wird die Energie des Gesamtsystems reduziert. Indem sich die scheibenförmigen Mizellen krümmen und halboffene, korbartige Vesikel bilden kann die Oberflächenspannung reduziert werden. Im letzten Schritt schließen sich diese und formieren schließlich die gewünschten Polymersomen. Ein alternativer Weg stellt die Bildung von Ringen, durch den Ringschluss von Wurmizellen dar. Diese Ringe wachsen zu Donut-förmigen Strukturen an, die ihrerseits durch weitere Größenzunahme die gewünschten Membranvesikel bilden.

Dynamische Lichtstreuungen. Die mittels TEM gewonnenen Erkenntnisse stehen mit den Daten der dynamischen Lichtstreuung, dargestellt in Abbildung 5.16, in Einklang. Die Zunahme der Partikelgröße während der Polymersomenbildung konnte anhand des z-Mittels, Abbildung 5.16 A, verfolgt werden. Dieses nahm ausgehend von einem Wert von circa 30 nm innerhalb von 7 min rasch zu, bis es nach 10 min einen konstanten Wert von circa 180 nm erreichte. Die Polydispersität hingegen (Abbildung 5.16 B) war zu Beginn des Prozesses, 0,5 min nach Polymerzugabe, mit $PDI = 0,67$ sehr hoch. Dies spiegelte die Koexistenz von sehr vielen kleinen Mizellen und einigen wenigen deutlich größeren Morphologien, wie sie auch anhand der TEM-Aufnahmen identifiziert wurden, wider. Im Verlauf des Prozesses nahm die Anzahl an Mizellen durch Koaleszenz und die dadurch bedingte Bildung größerer Strukturen, zunehmend ab. Die Größe der Partikel wurde dadurch einheitlicher, was anhand der stetigen Abnahme des PDIs, dargestellt in Abbildung 5.16 B, deutlich wird. Die gewünschte niedrige Polydispersität ($PDI < 0,2$) war bereits nach 30 min erreicht. Der sehr hohe Polydispersitätsindex nach 2 min ($PDI = 0,56$) wurde durch die zugehörige intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilung (Abbildung 5.16 C) sehr gut wiedergegeben. Diese war zu diesem Zeitpunkt sehr breit und trimodal. Dabei wurde die Existenz von kleinen (< 100 nm), großen (> 100 nm) und sehr großen (> 1000 nm) Partikeln deutlich. Dies deckte sich mit den Ergebnissen der mikroskopischen Aufnahmen zu diesem Zeitpunkt (Abbildung 5.13, 2 min, rechts). Zu beachten ist, dass große Partikel das Laserlicht sehr viel mehr streuen als kleine Partikel und daher in der intensitätsbasierten Partikelgrößenverteilung stärker zum Tragen kommen (Kapitel 3.2.1). In der anzahlbasierten Partikelgrößenverteilung hingegen, dargestellt in Abbildung 5.16 D, wird jedes Teilchen unabhängig von seiner Größe gleichwertig gewichtet. Hierbei wurde deutlich, dass nach 2 min Prozesszeit nahezu ausnahmslos kleine Partikel mit Durchmessern unter 100 nm in der Probe vorlagen, was sich mit den TEM-Aufnahmen zu diesem Zeitpunkt, welche überwiegend sphärische Mizellen mit Durchmessern von 30 nm zeigen (Abbildung 5.13, 2 min, links), deckt.

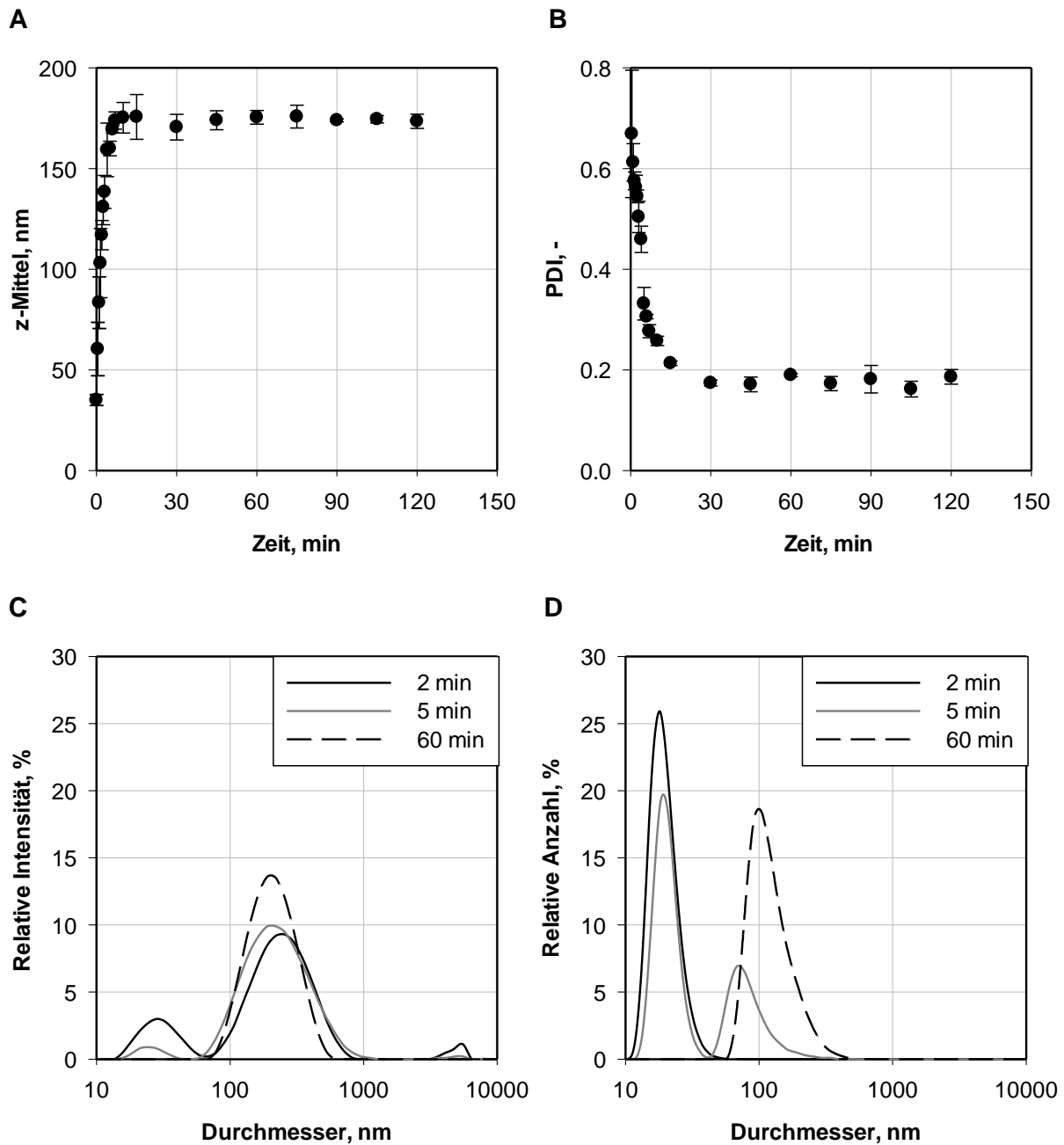


Abbildung 5.16: A) z-Mittel und B) PDI im Verlauf des Polymersomenbildungsprozesses. C) Intensitätsbasierte und D) anzahlbasierte Partikelgrößenverteilung. N = 3.

Nach 5 min Prozessdauer zeigte sich anhand der intensitätsbasierten Partikelgrößenverteilung, dargestellt in Abbildung 5.16 C, dass die Intensität der Lichtstreuung, welche durch kleine Partikel hervorgerufen wurde (linker Peak), abnahm, während es zu einem Anstieg des Peaks im Bereich von über 100 nm kam. Die Größenzunahme der Teilchen während des Prozesses wurde auch in der anzahlbasierten Verteilung, dargestellt in Abbildung 5.16 D, deutlich. Nach 60 min zeigten sich sowohl die

intensitätsbasierte, als auch die anzahlbasierte Partikelgrößenverteilung, dargestellt in Abbildung 5.16 C und Abbildung 5.16 D, monomodal. Zu diesem Zeitpunkt lagen in der Probe überwiegend Polymersomen vor, wie in Abbildung 5.13 bei 60 min dargestellt. Die intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilung spiegelt dabei das zu diesem Zeitpunkt identifizierte z-Mittel von 175 nm und den PDI von 0,19 gut wider. Anhand der anzahlbasierten Verteilung wird deutlich, dass der größte Anteil der Polymersomen bei einem Durchmesser von circa $d_N = 100$ nm lag. Im Bereich zwischen 60 min und 120 min Prozesszeit änderten sich weder z-Mittel noch PDI signifikant. Über die Auswertung der TEM-Aufnahmen konnte jedoch gezeigt werden, dass für eine vollständige Transformierung des Polymers zu Polymersomen über den etablierten Prozess (Kapitel 5.1.2) eine Prozesszeit von mehr als 60 min angestrebt werden sollte. Da der Bereich zwischen 60 min und 120 min mittels TEM nicht näher untersucht wurde, konnte der Zeitpunkt zu welchem erstmals ausschließlich Polymersomen vorlagen nicht näher eingegrenzt werden.

5.2.2 Einfluss von Temperatur, Ethanol- und Polymerkonzentration

Es ist bekannt, dass thermodynamische Einflüsse maßgebliche Auswirkungen bei der Entstehung von Strukturen aus amphiphilen Polymeren haben können (Kita-Tokarczyk *et al.*, 2005; Bleul *et al.*, 2015). Daher wurden die Einflüsse von Temperatur, Polymerkonzentration und Ethanolkonzentration auf die Geschwindigkeit der Polymersomenbildung über den etablierten Prozess (Kapitel 5.1.2) untersucht.

Temperatur. In Abbildung 5.17 A ist der Verlauf des z-Mittels bei 25 °C innerhalb der ersten Prozessminuten zu sehen. Dies stieg nach Polymerzugabe zunächst linear an. Die Steigung des z-Mittels über der Prozesszeit (Zunahmerate) kann somit als Indikator für die Geschwindigkeit der Vesikelbildung interpretiert werden. In Abbildung 5.17 B sind die Steigungen in Abhängigkeit von der Prozesstemperatur dargestellt. Die Fehlerbalken symbolisieren ein Konfidenzintervall von 90 %. Mit einer Rate von 42 nm min⁻¹ bei 8 °C, 35 nm min⁻¹ bei 25 °C und 40 nm min⁻¹ bei 40 °C konnte keine eindeutige Abhängigkeit des etablierten Prozesses von der Temperatur identifiziert werden. Denkbar wäre gewesen, dass hohe Temperaturen und die dadurch erhöhte Brown'sche Molekularbewegung zu einer erhöhten Frequenz an Stößen unter den vorliegenden Teilchen führen. Eine höhere Stoßfrequenz könnte Grund für häufigere Koaleszenz und damit schnellerer Zunahme des z-Mittels sein. Dies konnte bei der Vesikelherstellung über die etablierte Methode jedoch nicht nachgewiesen werden. Es wäre jedoch möglich, dass die Auswirkungen erhöhter Temperaturen so gering waren, dass sie durch die Überlagerung anderer Einflüsse nicht identifiziert werden konnten.

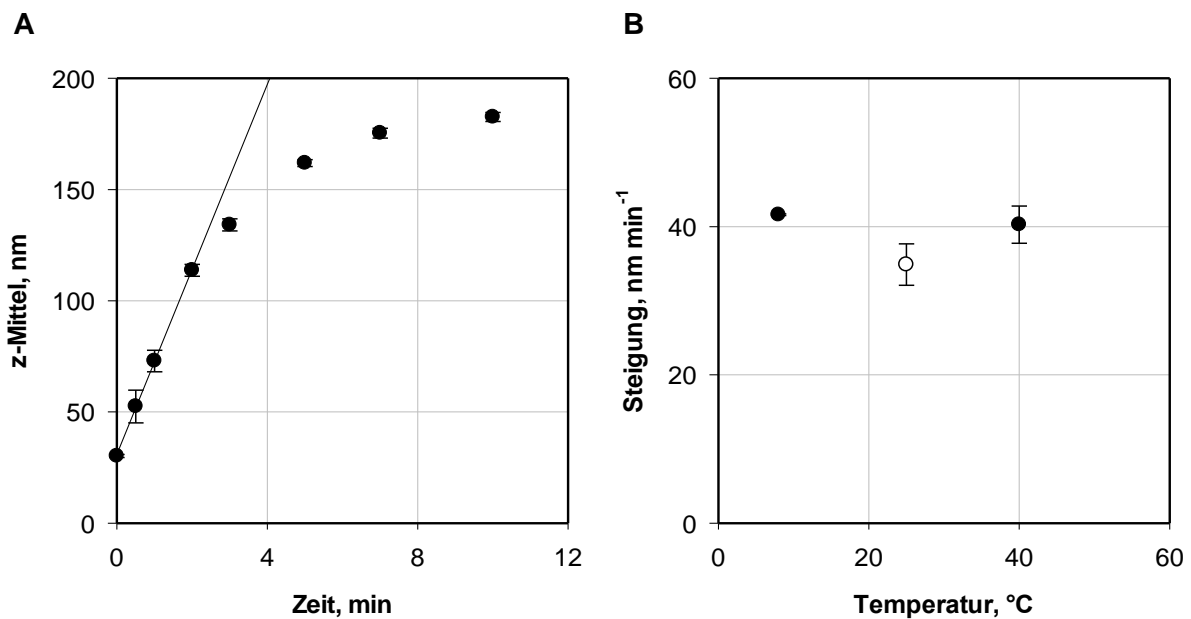


Abbildung 5.17: A) Lineare Zunahme des z-Mittels innerhalb der ersten Prozessminuten. Die Steigung des z-Mittels über der Prozesszeit kann als Indikator für die Geschwindigkeit der Vesikelbildung herangezogen werden. B) Abhängigkeit der Zunahmerate (Steigung) von der Prozesstemperatur. Der weiße Datenpunkt symbolisiert die Zunahmerate bei Standardbedingungen (25 °C). Die Fehlerbalken zeigen ein Konfidenzintervall von 90 %. N = 3.

Polymer- und Ethanolkonzentration. Neben dem Einfluss der Temperatur wurden auch die Auswirkungen der Polymerkonzentration und der Ethanolkonzentration auf die Geschwindigkeit der Polymersomenbildung untersucht. Um die Ethanolkonzentration bei Variation der Polymerkonzentration im Reaktionsansatz zwischen 0,25 % w/v, 0,5 % w/v und 1 % w/v konstant bei 5 % v/v zu halten, wurde eine 5 % w/v, 10 % w/v und 20 % w/v Polymerlösung injiziert. Die resultierenden Zunahmeraten sind in Abbildung 5.18 A dargestellt. Mit einer Zunahmerate von 17 nm min⁻¹ zeigte sich der Vesikelbildungsprozess bei einer finalen Polymerkonzentration von 0,25 % w/v deutlich langsamer als der Prozess bei Standardbedingungen mit einer finalen Polymerkonzentration von 1 % w/v. Zwischen 0,5 % w/v und 1 % w/v konnte keine signifikante Abhängigkeit der Zunahmerate von der finalen Polymerkonzentration verzeichnet werden. Die tendenziell erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit bei erhöhter Polymerkonzentration kann anhand der Stoßfrequenz begründet werden. Je höher die Polymerkonzentration zu Beginn des Prozesses ist, desto mehr sphärische Mizellen werden gebildet. Eine erhöhte Anzahl an Mizellen führt gezwungenermaßen zu mehr Stößen zwischen zwei Partikeln. Genau dies ist die Grundvoraussetzung für die Fusion von zwei Teilchen und gleichzeitig auch für die Größenzunahme der unterschiedlichen Morphologien.

Um den Einfluss der Ethanolkonzentration bei 2,5 % v/v, 3,3 % v/v und 5 % v/v bei identischer finaler Polymerkonzentration von 1 % w/v zu untersuchen, wurde eine Polymerlösung mit 40 % w/v, 30 % w/v beziehungsweise 20 % w/v injiziert. In Abbildung 5.18 B wird sehr klar deutlich, dass die Zunahmerate mit zunehmender Ethanolkonzentration abnimmt. So wurde bei einem finalen Ethanolgehalt von 2,5 % v/v eine Zunahmerate von 56 nm min⁻¹ verzeichnet, die damit signifikant über jener bei Standardbedingungen des etablierten Prozesses (5 % v/v Ethanolgehalt bei Injektion einer 20 % w/v Polymerlösung) mit 35 nm min⁻¹ lag. Ethanol stellt ein hervorragendes Lösemittel sowohl für die hydrophilen PMOXA-Blöcke als auch für den hydrophoben PDMS-Block des verwendeten amphiphilen PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅-Triblock-Copolymers dar. Durch Injektion der Polymerlösung in für den hydrophoben PDMS-Block als Fällungsmittel fungierendes Wasser, entstehen in sehr kurzer Zeit sphärische Mizellen, die ihrerseits als Startpunkt für weiterführende Selbstassemblierungsreaktionen dienen. Die Verringerung der finalen Ethanolkonzentration könnte zur schnelleren Bildung der sphärischen Mizellen führen, was wiederum in einer erhöhten Geschwindigkeit der Polymersomenbildung resultiert.

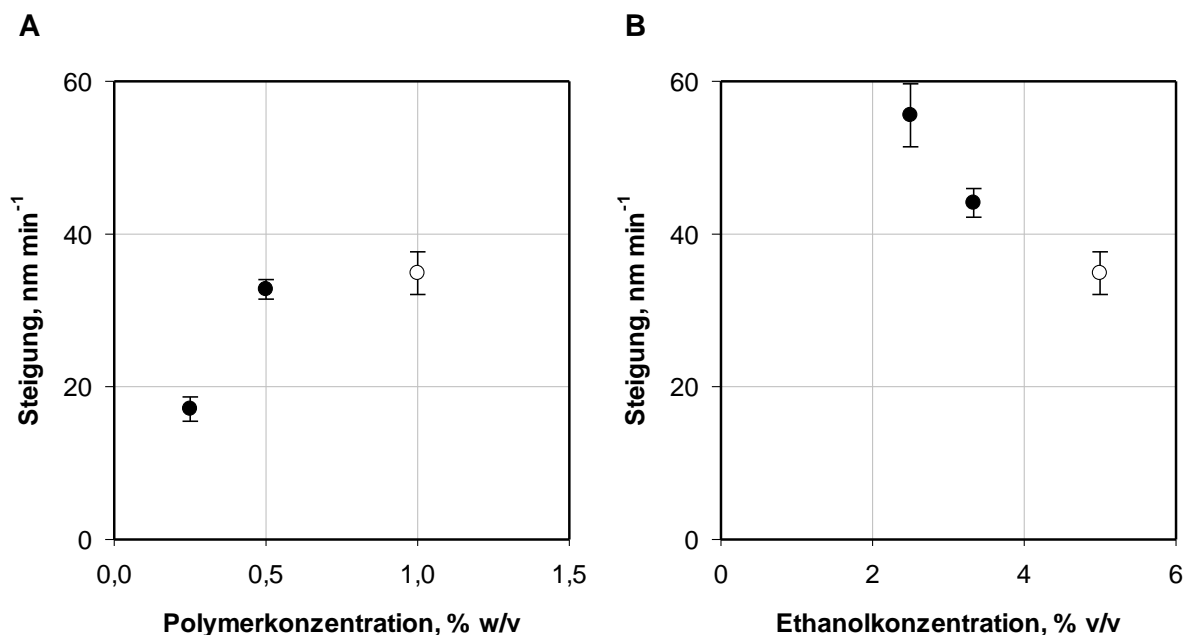


Abbildung 5.18: Abhängigkeit der Zunahmerate (Steigung) von A) der Polymerkonzentration und B) von der Ethanolkonzentration im Reaktionsansatz. Der weiße Datenpunkt symbolisiert Standardbedingungen (1 % w/v beziehungsweise 5 % v/v). Die Fehlerbalken zeigen ein Konfidenzintervall von 90 %. N = 3.

5.2.3 Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl

Bei der Entwicklung eines effizienten Verfahrens zur Polymersomenherstellung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren konnte gezeigt werden, dass hohe Rührerdrehzahlen zu schnellerer Erzielung der gewünschten niedrigen Polydispersität führen (Kapitel 5.1.1). Basierend auf diesem Erkenntnis wurde der Polymersomenbildungsprozess bei verschiedenen Rührerdrehzahlen des S-Rührers in unbewehrten Reaktoren eingehender untersucht. Alle übrigen Parameter entsprachen jenen des etablierten Prozesses (Kapitel 5.1.2) ($T = 25\text{ °C}$, $c_P = 1\% \text{ w/V}$, $c_{P,L} = 20\% \text{ w/V}$). In Abbildung 5.19 A sind die bei 2000-4000 min^{-1} linear zunehmenden z-Mittel zu Beginn des Prozesses dargestellt. Es wird deutlich, dass die Größe der Partikel (z-Mittel) mit zunehmender Rührerdrehzahl deutlich schneller zunahm. Die jeweiligen Steigungen (Zunahmeraten) sind in Abbildung 5.19 B dargestellt. Die Zunahmerate war bei 2000 min^{-1} mit 3 nm min^{-1} deutlich niedriger, als bei doppelter Rührerdrehzahl von 4000 min^{-1} , welche zu einer Zunahmerate von 35 nm min^{-1} führte. Bei 1000 min^{-1} Rührerdrehzahl nahm das z-Mittel im betrachteten Zeitraum, dargestellt in Abbildung 5.19 C, hingegen nicht mehr zu. Dies wird auch anhand der sich kaum unterscheidenden intensitätsbasierten Partikelgrößenverteilungen in Abbildung 5.19 D direkt nach Polymerzugabe (0 min) und nach 60 min deutlich. Im völlig ungerührten Reaktor (0 min^{-1}), wurde das gleiche Verhalten festgestellt (Ergebnisse nicht dargestellt). In beiden Fällen (0 min^{-1} und 1000 min^{-1}) deutete das z-Mittel mit Werten zwischen 25-40 nm während der gesamten betrachteten Prozesszeit auf die dominierende Existenz von Mizellen hin. So wurde deutlich, dass das Rühren des Reaktionsansatzes essentiell für die Vesikelbildung ist. Der Grund hierfür kann in der Partikelbewegung im Rührreaktor gefunden werden. Nur durch Rühren werden die in der wässrigen Phase entstehenden, sphärischen Mizellen so in Bewegung gebracht, dass sie zusammenstoßen und zu größeren Strukturen koaleszieren können. Dies geschieht umso schneller, je höher die Rührerdrehzahl und damit auch die Partikelgeschwindigkeit ist. Die Brown'sche Molekularbewegung der sphärischen Mizellen alleine schien für eine messbare Zunahme des z-Mittels im ungerührten Reaktor und im betrachteten Zeitraum nicht ausreichend zu sein.

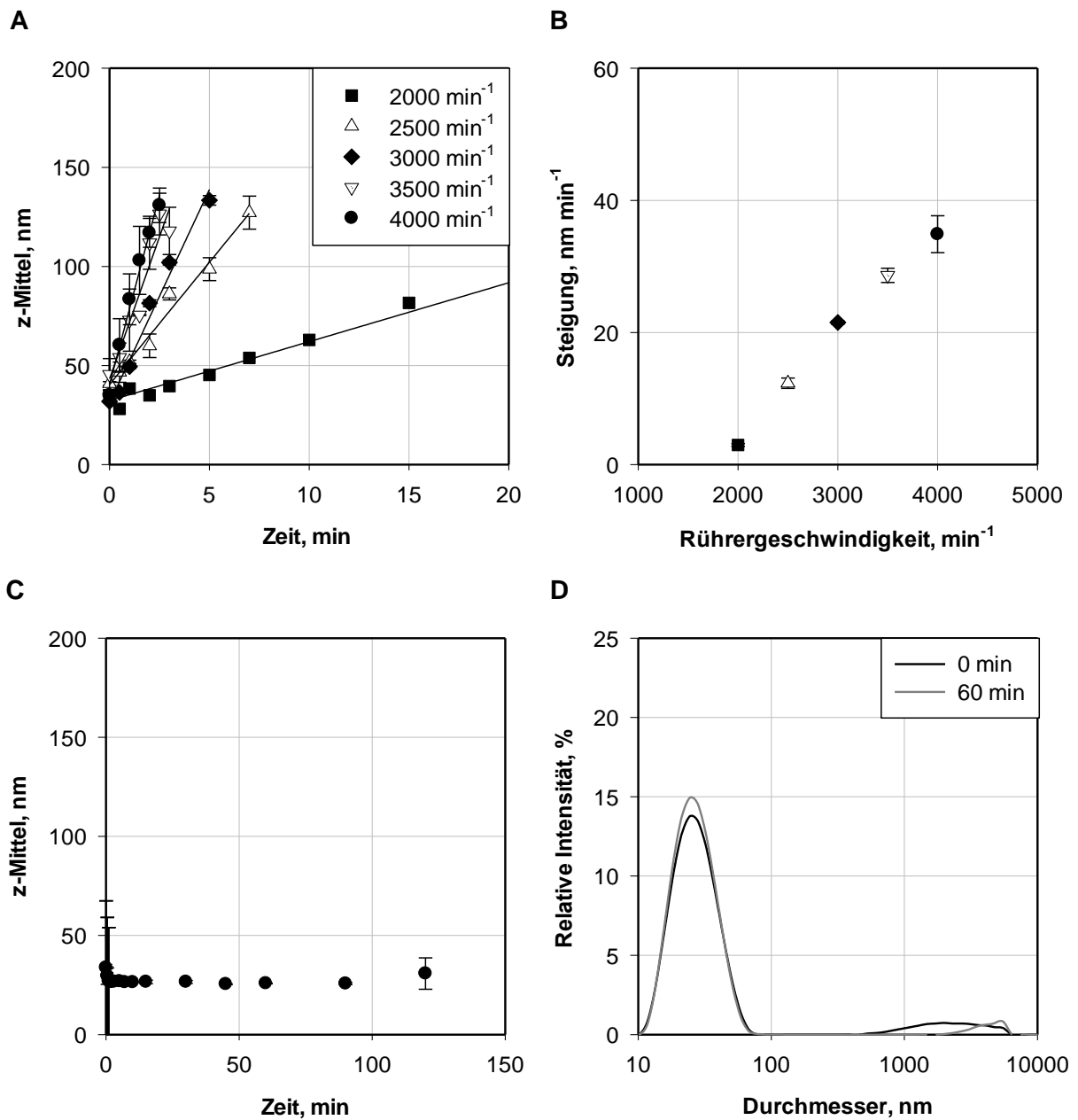


Abbildung 5.19: A) Lineare Zunahme des z-Mittels innerhalb der ersten Prozessminuten in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl. B) Abhängigkeit der Zunahmerate (Steigung) von der Rührerdrehzahl. Die Fehlerbalken zeigen ein Konfidenzintervall von 90 %. C) Zeitlicher Verlauf des z-Mittels bei einer Rührerdrehzahl von 1000 min⁻¹ und D) zugehörige intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilungen direkt nach Polymerzugabe (0 min) und nach 60 min bei 1000 min⁻¹. N = 3.

5.2.4 Diskussion

Seit Beginn der Erforschung des selbstassemblierenden Verhaltens von amphiphilen Block-Copolymeren ist bekannt, dass diese in wässriger Phase unterschiedlichste Morphologien wie sphärische Mizellen, Schläuche, wurmartige Mizellen, Ringe, scheibenförmige Mizellen, Donut-förmige Strukturen, Lamellen, Körbe, Vesikel und verschiedene Hybridformen ausbilden können (Shen und Eisenberg, 2000; Luo und Eisenberg, 2001a; Burke *et al.*, 2001; Discher und Eisenberg, 2002; Soo und Eisenberg, 2004; Discher und Ahmed, 2006). Da unter diesen Strukturen insbesondere die Vesikel eine erstrebenswerte Morphologie darstellen, wurde in dieser Arbeit die Aufklärung des Vesikelbildungsweges bei der Polymersomenherstellung über den in dieser Arbeit etablierten Prozess angestrebt und erzielt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Vesikelbildung, welche weithin als zweistufiger Mechanismus verstanden wird (Choucair *et al.*, 2003; Uneyama, 2007), prinzipiell dem in der Literatur als Mechanismus 1 beschriebenen Weg folgt. Dieser Mechanismus beruht auf der sehr schnellen Bildung von Mizellen direkt nach Zugabe der Polymerlösung. Der Anteil einzelner gelöster Polymere in der kinetischen Betrachtung des gesamten Systems kann dabei vernachlässigt werden (Choucair *et al.*, 2003). Im zweiten Schritt entstehen aus den sphärischen Mizellen wurmförmige Mizellen, die zu scheibenförmigen Mizellen transformiert werden (Antonietti und Forster, 2003). Diese können sich ihrerseits zu Vesikeln umformieren (Rank *et al.*, 2009). Hierbei konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Relaxationszeit der Transformation von sphärischen Mizellen zu wurmförmigen Mizellen in etwa 0,6-33,3 min beträgt, wohingegen für die weitere Transformierung von Wurmmizellen zu Vesikeln mit Relaxationszeiten von 5-83 min etwas länger mehr Zeit benötigt wird (Luo und Eisenberg, 2001a). Die Entstehung von Vesikeln aus scheibenförmigen Mizellen, wie sie auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, ist auf die spontane Krümmung der Scheiben zurück zu führen. Dabei definiert das Gleichgewicht zwischen der Linienspannung am Rand der Scheibe und der Biegeenergie die minimal mögliche Größe des entstehenden Vesikels. Sobald die Linienenergie die Biegeenergie übersteigt, entsteht durch resultierende spontane Krümmung der Scheiben eine offene, korbartige Struktur, die sich dann zu Vesikeln schließt (Chen *et al.*, 1999). Dies erklärt auch die Tatsache, dass der mittlere hydrodynamische Teilchendurchmesser (z -Mittel) über den in dieser Arbeit etablierten Polymersomenherstellungsprozess (Kapitel 5.1.2) kaum beeinflussbar war. Neben dem in dieser Arbeit identifizierten Vesikelbildungsweg wurden auch andere Arten der Polymersomenbildung, welche stark von der Herstellungsmethode abhängen kann (Antonietti und Forster, 2003), gezeigt. So wurde beispielsweise die Polymersomenbildung in Mikrofluidikeinheiten durch einen einfachen Keimbildungs- und Wachstumsprozess (Hauschild *et al.*, 2005) oder durch Vesikelknospung (He und Schmid, 2006a; Thiele *et al.*, 2014) erklärt. Es konnte jedoch bereits

gezeigt werden, dass, unabhängig vom Vesikelbildungsmechanismus, bei der Entstehung von Polymersomen in jedem Fall ein Kräftegleichgewicht aus drei Komponenten mitwirkt. Die Beiträge zur freien Energie werden zum einen durch das Bestreben des hydrophoben Blocks sich auszudehnen und zum anderen durch das Bestreben des hydrophilen äußeren Blocks sich zusammenzuziehen geleistet. Die dritte Komponente entsteht durch die Grenzflächenspannung zwischen hydrophobem Block und hydrophiler wässriger Umgebung (Zhang und Eisenberg, 1998). So wurde gezeigt, dass Polymersomen Strukturen im thermodynamischen Gleichgewicht darstellen können, oder aber, beispielsweise bei sehr hohem Wasseranteil, wie in dieser Arbeit energetisch eingefroren vorliegen (Shen und Eisenberg, 2000).

Die Geschwindigkeit der Polymersomenbildung kann durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst werden - angefangen bei der Art und den Eigenschaften des verwendeten Polymers selbst. Dabei spielt die Art der verwendeten Blöcke eine ebenso große Rolle wie die Polydispersität und die Blocklänge sowie das Verhältnis von hydrophobem zu hydrophilem Anteil (Luo und Eisenberg, 2001a; Luo und Eisenberg, 2001b). In dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich die Polymersomenbildung basierend auf einer einzigen Polymerart (PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅) untersucht. Daher war die Untersuchung thermodynamischer Einflüsse wie Temperatur und Polymerkonzentration, welche bei der Polymersomenbildung eine relevante Rolle spielen können (Kita-Tokarczyk *et al.*, 2005; Bleul *et al.*, 2015), von größerem Interesse. In einer Studie, die die Bildung von Polymersomen aus Poly(2-vinylpyridin)-poly(ethylenoxid) (P2VP-PEO) untersuchte, konnte gezeigt werden, dass die vorliegenden Polymerstrukturen durch einen Temperatursprung von 4 °C auf 25 °C binnen weniger Minuten geändert werden. Die Vesikel wurden hierbei über die intermediäre Bildung von wurm- und scheibenförmigen Mizellen formiert, was mit der hohen Glasübergangstemperatur des hydrophoben Blocks ($T_G = 100$ °C) und der temperaturabhängigen Löslichkeit des PEO-Blocks begründet wurde (Rank *et al.*, 2009). Für Polymere, die keine so hohe Glasübergangstemperatur aufweisen, ist die Entstehung intermediären Strukturen aus den initial entstehenden sphärischen Mizellen hingegen von kollisionsbedingten Fusionsprozessen abhängig. Nur wenn sich zwei Teilchen treffen, können sie sich zu größeren Strukturen umorganisieren. Hierbei kann die Frequenz der Stöße und damit auch die Geschwindigkeit der Vesikelbildung von der Temperatur abhängen. Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung führen höhere Temperaturen zu schnellerer Bewegung der Teilchen, was in anderen Studien als Grund für schnellere Fusionsprozesse genannt wurde (Choucair *et al.*, 2003). Dieser Effekt konnte beim etablierten Polymersomenherstellungsprozess (Kapitel 5.2.2) in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden. Neben erhöhter Temperatur kann auch die Erhöhung der Polymerkonzentration zu einer höheren Anzahl an Mizellen und

folglich zu häufigerer Kollision führen. Ein hoher Wasseranteil hingegen führt konsequenterweise zum Gegenteil. Zudem wurde gezeigt, dass im Fall hoher Wasseranteile die Mobilität der Polymerketten herabgesenkt wird, was die morphologische Strukturänderung ebenfalls erschwert (Soo und Eisenberg, 2004). In dieser Arbeit wurde nur unterhalb einer Polymerkonzentration von 0,5 % w/v eine Beschleunigung der Polymersomenbildung mit zunehmender Polymerkonzentration verzeichnet.

Unabhängig von Temperatur und Polymerkonzentration scheint generell für die Bildung kleiner, unilamellarer Vesikel (SUVs) der Eintrag von Energie in Form von Schütteln, Sonifizieren (Farquhar *et al.*, 1996) oder Rühren (Lasic, 1988a; Zhang und Eisenberg, 1999) notwendig zu sein. Hierbei ist die im System vorliegende Scherrate als eine den Vesikelbildungsprozess beeinflussende Größe bekannt (Choucair *et al.*, 2003). Obwohl Rühren häufig als essentiell für die Vesikelbildung angesehen wird, liegen diesbezüglich kaum Publikationen vor. Yu und Jiang jedoch konnten 2009 zeigen, dass die Scherrate nicht nur die Partikelgrößenverteilung der aus dem amphiphilen Block-Copolymer Poly(4-vinylpyridin)₄₃-poly(styrol)₂₆₀-poly(4-vinylpyridin)₄₃ (P4VP₄₃-PS₂₆₀-P4VP₄₃) entstehenden Ringe beeinflusst, sondern auch den Mechanismus der Ringbildung selbst (Yu und Jiang, 2009). Bei niedrigen Scherraten wurden genannte Ringe über den Ringschluss von Wurmmizellen gebildet. Bei höheren Scherraten hingegen entstanden aus Wurmmizellen Vesikel, welche zu Donutförmigen Strukturen und schließlich zu Ringen transformiert wurden. Generell muss hierbei die durch das Rühren in das System eingetragene Energie vom Gesamtsystem absorbiert werden. Dies geschieht zum einen durch die kinetische Energie, aufgrund derer die Teilchen beschleunigt werden, was wiederum zu den bereits erwähnten Kollisionen und Fusionsprozessen führt. Der Anteil absorbiertes potentieller Energie hingegen führt zur Deformierung der Teilchen und zur Erhöhung der Grenzflächenenergie (Yu und Jiang, 2009). Das Gesamtsystem antwortet auf die Erhöhung der Grenzflächenenergie durch das Bestreben die totale Grenzfläche zu minimieren, was durch die Vergrößerung der durchschnittlichen Partikelgröße geschieht. Das Wachstum der Partikelgröße erfolgt solange, bis die treibende Kraft durch das Bestreben die Grenzfläche zu reduzieren durch die Kräfte des sich zusammenziehenden hydrophilen Blocks und des sich streckenden hydrophoben Blocks überstiegen werden (Soo und Eisenberg, 2004). Große Vesikel können daher bei großen Scherraten durch ihr niedrigeres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen nur schwer gebildet werden (Yu und Jiang, 2009). Die Polydispersität der Dispersion ist ihrerseits wiederum von der Vesikelgröße abhängig. Während sphärische Mizellen meist eine sehr niedrige Polydispersität aufweisen, ist diese bei einer Dispersion aus deutlich größeren Vesikeln häufig erheblich höher (Luo und Eisenberg, 2001a).

5.3 Maßstabsvergrößerung der Herstellung von Polymervesikeln

Um die Polymersomentechnologie einen weiteren Schritt in Richtung industrielle Anwendbarkeit zu bringen, wurde der in miniaturisierten Rührkesselreaktoren etablierte, effiziente Polymersomenherstellungsprozess in den Liter-Maßstab übertragen. Hierfür wurde das in Kapitel 4.3.3 beschriebene System, bestehend aus dem Rührkesselreaktor mit und ohne Stromstörer und fünf verschiedenen Rührertypen R1-R5 (Tabelle 4-2) verwendet. Neben der Verwendung desselben Polymers für die Prozesse beider Maßstäbe ist die geometrische Ähnlichkeit des Modellsystems und der Hauptausführung eine grundlegende Voraussetzung für die Maßstabsübertragung. Dies bedeutet, dass die Verhältnisse wichtiger geometrischer Maße zueinander bei beiden Maßstäben gleich sein müssen. Im Liter-Maßstab wurde ein Flachboden-Reaktor gewählt, da auch der miniaturisierte Rührkesselreaktor einen flachen Boden aufweist. Das Verhältnis von Reaktordurchmesser D zu Füllhöhe H lag im kleinen Maßstab bei einem Reaktorvolumen von 12 mL bei einem Wert von 0,50. Durch die Wahl des Reaktionsvolumens von 1,5 L im Liter-Maßstab mit $D H^{-1} = 0,45$ konnte demzufolge geometrische Ähnlichkeit des Reaktors gewährleistet werden. In Tabelle 5-4 sind die Werte beider Reaktorsysteme.

Tabelle 5-4: Durchmesser D und Füllhöhe H des etablierten Polymersomenherstellungsprozesses in miniaturisierten Rührkesselreaktoren (12 mL) und im Liter-Maßstab (1,5 L).

	Miniaturisierter Maßstab	Liter-Maßstab
D , mm	20,3	100
H , mm	41,0	220
$D H^{-1}$, -	0,50	0,45

Die geometrische Ähnlichkeit muss bei der Maßstabsübertragung jedoch nicht nur für den verwendeten Reaktor selbst, sondern auch für die verwendeten Rührer gegeben sein. In Abbildung 5.20 A bis Abbildung 5.20 C sind das Verhältnis von Rührerdurchmesser d zu Reaktordurchmesser D , von Rührerhöhe h zu Füllhöhe H und von Rührerhöhe h zu Rührerdurchmesser d für den S-Rührer im kleinen Maßstab und für die Rührer R1-R5 im Liter-Maßstab dargestellt. Dabei wird die Herausforderung der Maßstabsübertragung des etablierten Prozesses sehr deutlich. Der S-Rührer weist eine spezielle Geometrie auf, die unter standardisierten Rührergeometrien nicht vertreten ist. Rührer R4 kommt den geometrischen Verhältnissen des S-Rührers am nächsten. Das Verhältnis von Rührer- zu Reaktordurchmesser ist hier mit einem Wert von 0,65 dem Wert des S-Rührers im miniaturisierten Rührkessel ($d D^{-1} = 0,71$) verhältnismäßig ähnlich. Die Unterschiede der beiden Maßstäbe werden bei Betrachtung von $h H^{-1}$ und $h d^{-1}$ aber auch bei R4 sehr deutlich.

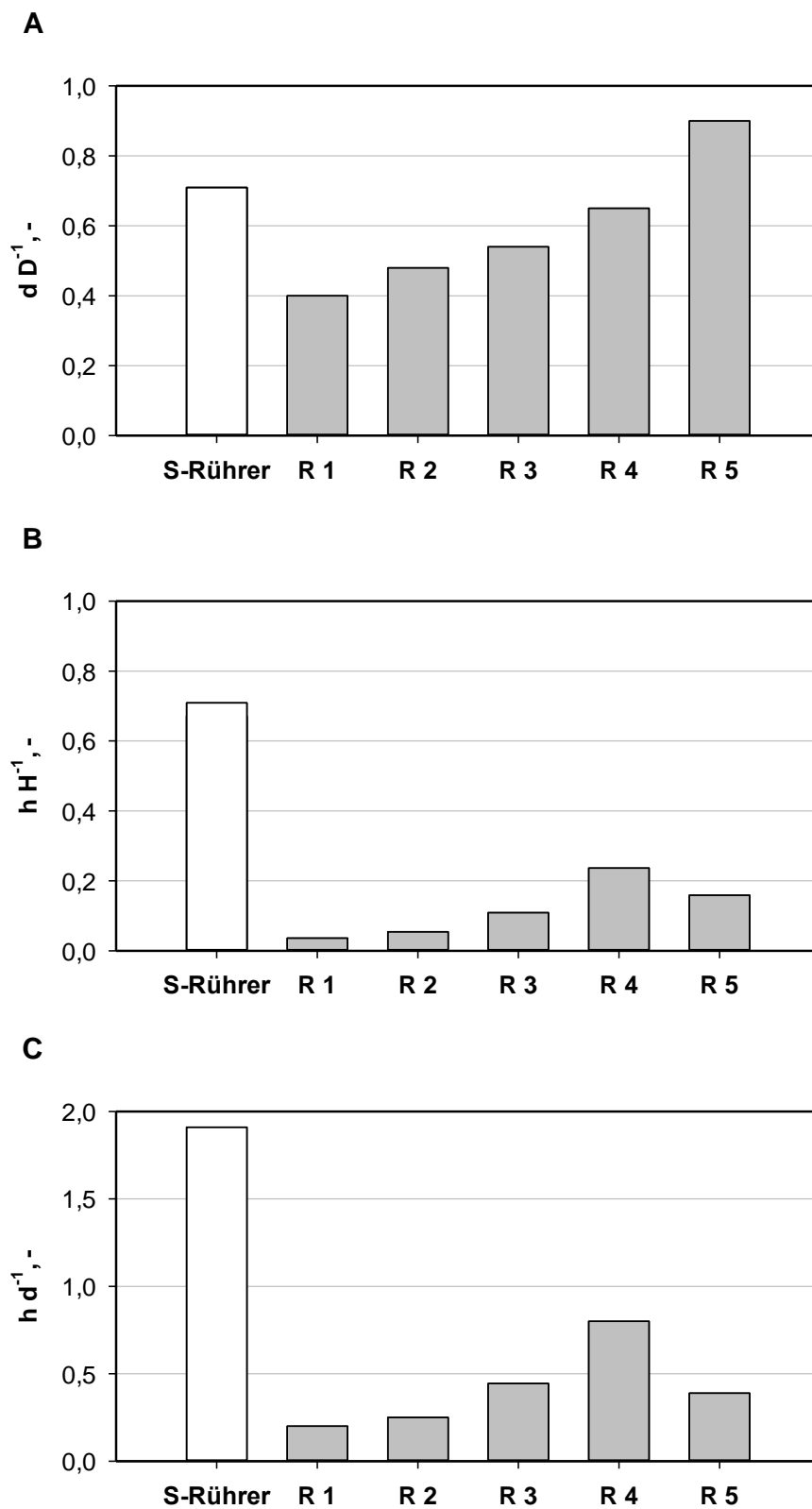


Abbildung 5.20: Verhältnis von A) Rührerdurchmesser d zu Reaktordurchmesser D , B) Rührerhöhe h zu Füllhöhe H und C) Rührerhöhe h zu Rührerdurchmesser d für den S-Rührer im miniaturisierten Rührkesselreaktor und die Rührertypen R1-R5 (Tabelle 4-2) im Liter-Maßstab.

Die Verwendung von herkömmlichen Rührern ist insbesondere in Hinblick auf die Produktionskosten ein sehr wichtiges Kriterium. Hierdurch ergab sich die Herausforderung den etablierten Polymersomenherstellungsprozess, der auf der Verwendung des S-Rührers basiert, unter Verwendung herkömmlicher Rührergeometrien in den Liter-Maßstab zu übertragen. Um hierfür eine solide Strategie bereitstellen zu können, sollten die auf den Prozess maßgeblich Einfluss nehmenden Prozessparameter beziehungsweise die geeigneten Kriterien für die Maßstabsübertragung identifiziert werden. Ziel war es im Liter-Maßstab Polymersomen mit vergleichbarer Qualität (z-Mittel, PDI) wie im kleinen Maßstab ebenso schnell herstellen zu können. Basierend auf den Kenntnissen des Vesikelbildungsmechanismus (Kapitel 5.2) wurde die zeitliche Zunahme des z-Mittels als Kriterium für die Bewertung der Geschwindigkeit des Prozesses herangezogen. Als Referenzprozess wurde der etablierte Prozess unter Verwendung des S-Rührers bei 4000 min^{-1} in unbewehrten Reaktoren herangezogen. Die Werte der bei definierten Rührerdrehzahlen gültigen Prozessparameter für R1-R5 sind in Kapitel 13.1.4 aufgeführt. Alle im Folgenden diskutierten Ergebnisse sind in (Poschenrieder *et al.*, 2016a) veröffentlicht.

5.3.1 Einfluss der Rührerdrehzahl

In miniaturisierten Rührkesselreaktoren wurde unter Verwendung vier verschiedener Rührergeometrien gezeigt, dass die Rührerdrehzahl einen herausragenden Einfluss auf die Dispersität der Polymersomendispersion hat. Der positive Einfluss hoher Rührerdrehzahlen in Hinblick auf die gewünschte niedrige Polydispersität wurde daher im Liter-Maßstab validiert. Hierfür wurden drei radial fördernde Rushton-Turbinen (R1) bei 870 min^{-1} und bei 1080 min^{-1} im unbewehrten Reaktor verwendet. Bei 870 min^{-1} wurde gerade noch kein Eintrag von Gasblasen verzeichnet. Bei 1080 min^{-1} erreichte die Flüssigkeitsstrombe gerade den obersten der drei Rührer. Noch höhere Rührerdrehzahlen hätten zu unerwünschter Rührerbegasung geführt.

In Abbildung 5.21 A ist die Zunahme des z-Mittels innerhalb einer Prozessdauer von 1440 min (24 h) abgebildet. Bei einer Rührerdrehzahl von 1080 min^{-1} war die initiale Steigung des z-Mittels über der Zeit mit einem Wert von $0,5 \text{ nm min}^{-1}$ signifikant höher als bei 870 min^{-1} mit einem Wert von $0,2 \text{ nm min}^{-1}$. So wurde deutlich, dass der Vesikelbildungsprozess auch im Liter-Maßstab durch Erhöhung der Rührerdrehzahl beschleunigt werden konnte. Nichts destotrotz konnten innerhalb der gewünschten kurzen Prozessdauer keine schmalen Partikelgrößenverteilungen erzielt werden, wie exemplarisch in Abbildung 5.21 B nach 60 min Prozesszeit dargestellt ist. Die Verteilungen waren im Vergleich zum Referenzprozess sehr breit und bimodal und zeigten die Existenz vieler kleiner Polymeraggregate im Größenbereich

von < 100 nm auf. Dabei wurde bei 1080 min^{-1} ein sehr niedriges z-Mittel von nur 51 nm, was auf die Anwesenheit unerwünschter Mizellen schließen ließ, bei sehr hoher Polydispersität ($\text{PDI} = 0,74$) verzeichnet. Innerhalb der gleichen Zeit wurde beim Referenzprozess ein z-Mittel von circa 180 nm bei niedriger Polydispersität ($\text{PDI} < 0,2$) erreicht. Außerdem war der Referenzprozess mit einer Zunahmerate von hier 31 nm min^{-1} in etwa 100 Mal schneller.

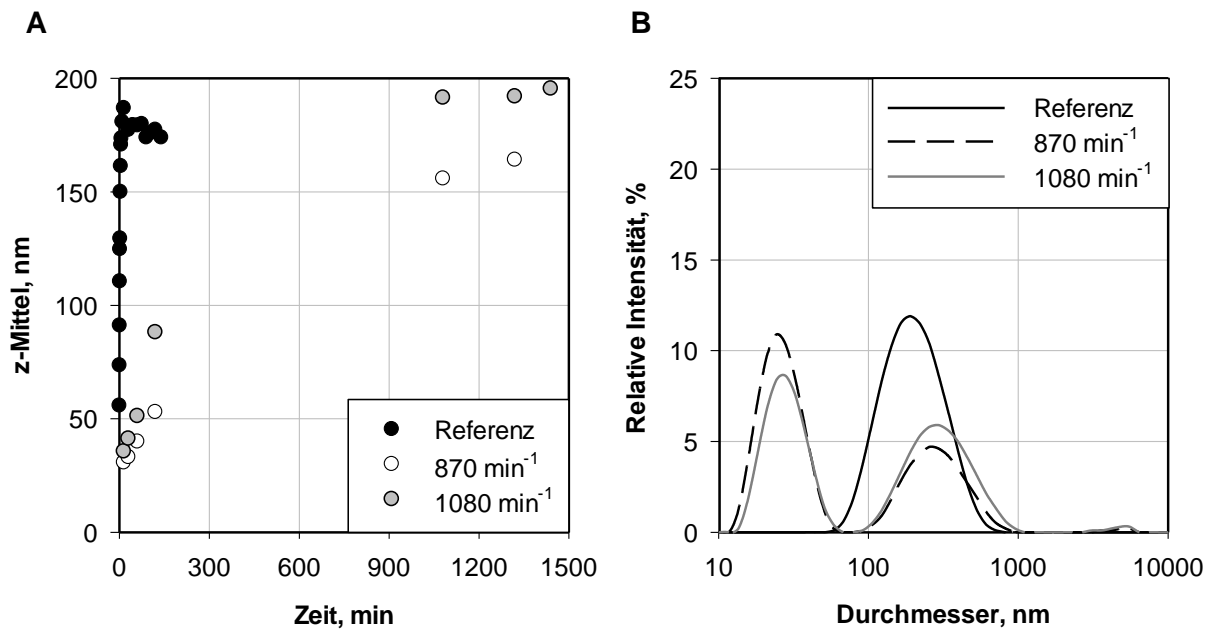


Abbildung 5.21: A) Verlauf des z-Mittels bei Verwendung von drei Rushton-Turbinen R1 in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl n . B) Zugehörige intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilungen nach 60 min Prozesszeit. Der in miniaturisierten Rührkesselreaktoren etablierte Prozess dient als Referenz. $N = 1$.

Da der Referenzprozess auf der Verwendung des radial, tangential und axial fördernden S-Rührers beruht, wurde von der weiteren Verwendung der Rushton-Turbine, die keine axiale Strömungskomponente aufweist, abgesehen. Stattdessen wurde der Fokus auf die Verwendung von axial fördernden Propellerrührern gelegt.

5.3.2 Einfluss der Rührerumfangsgeschwindigkeit

Für die Maßstabsübertragung von (biotechnologischen) Prozessen wird oftmals die Rührerumfangsgeschwindigkeit u_{tip} , Gleichung (3.39), als Maßstabsübertragungskriterium herangezogen. Insbesondere bei unbekannter Auswirkung der Scherkräfte, wie es auch bei der Herstellung von Polymersomen der Fall war, wird dieses Kriterium verwendet (Junker, 2004). Im Referenzprozess beträgt $u_{tip} = 3,02 \text{ m s}^{-1}$. Die Vesikelherstellung wurde daher bei diesem Wert unter Verwendung der vier Propellerrührer R2-R5 bei einer Einbauhöhe h_s von

72 mm untersucht. Mit Blick auf die dabei resultierenden initialen Steigungen des z-Mittels über der Zeit, dargestellt in Abbildung 5.22 A, wird deutlich, dass es sich nicht um das geeignete Kriterium für die Maßstabsübertragung handeln kann. Mit Werten zwischen $0,5 \text{ nm min}^{-1}$ und $2,5 \text{ nm min}^{-1}$ waren alle Prozesse im Liter-Maßstab deutlich langsamer als der Referenzprozess mit 31 nm min^{-1} . Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass die Zunahmerate bei identischer Rührerumfangsgeschwindigkeit nahezu linear mit der Zunahme des dimensionslosen Rührerdurchmessers $d D^{-1}$ (Abbildung 5.20 B) stieg, wie in Abbildung 5.22 B zu sehen. Demnach wurde der Vesikelbildungsprozess bei identischer Rührerumfangsgeschwindigkeit durch die Verwendung größerer Rührer beschleunigt.

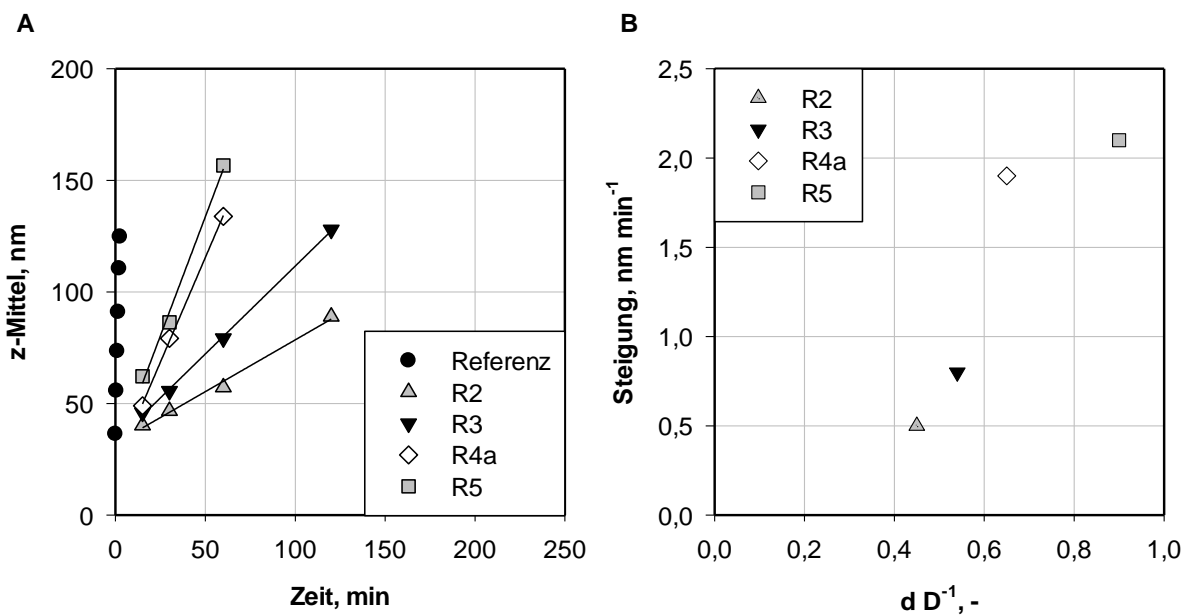


Abbildung 5.22: A) Linearer Verlauf des z-Mittels innerhalb der ersten Prozessminuten bei Verwendung der Propellerrührer R2-R5 bei identischer Rührerumfangsgeschwindigkeit $u_{tip} = 3,02 \text{ m s}^{-1}$. Der in miniaturisierten Rührkesselreaktoren etablierte Prozess dient als Referenz. B) Bei identischer Rührerumfangsgeschwindigkeit hängt die Zunahmerate (Steigung) nahezu linear vom dimensionslosen Rührerdurchmesser $d D^{-1}$ ab. $N = 1$.

In der Verfahrenstechnik kann auch die dimensionslose Reynoldszahl Re , Gleichung (3.40), für die Maßstabsübertragung eines Prozesses herangezogen werden. Bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ nahm diese mit $\rho_{H_2O,20 \text{ }^\circ\text{C}} = 1000 \text{ kg m}^{-3}$ und $\eta_{H_2O,20 \text{ }^\circ\text{C}} = 0,001 \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ beim Referenzprozess den Wert 13.824 an. Unabhängig vom verwendeten Rührertyp waren alle Rührerdrehzahlen n , die im Liter-Maßstab diese Reynoldszahl bedingen, deutlich niedriger als jene Rührerdrehzahlen, die in beiden Maßstäben die identische Rührerumfangsgeschwindigkeit von $u_{tip} = 3,02 \text{ m s}^{-1}$ erzeugten. So galt beispielsweise für Rührer R4a:

$$n(Re = 13.824) = 196 \text{ min}^{-1} < n(u_{tip} = 3,02 \text{ m s}^{-1}) = 887 \text{ min}^{-1}$$

Da sich die Rührerumfangsgeschwindigkeit u_{tip} als Kriterium für die Maßstabsübertragung als ungeeignet erwies und da ferner gezeigt wurde, dass niedrigere Rührerdrehzahlen n zu langsameren Prozessen führen (Kapitel 5.3.1), konnte folglich eine identische Reynoldszahl als geeignetes Kriterium ebenfalls ausgeschlossen werden.

5.3.3 Maßstabsübertragung anhand des Leistungseintrags

Ein weiteres Kriterium, das häufig für die Maßstabübertragung von (biotechnologischen) Prozessen herangezogen wird, ist der volumetrische Leistungseintrag $P V^{-1}$ (Brown, 1982). Für den Referenzprozess im kleinen Maßstab gilt $P V^{-1} = 12,3 \text{ W L}^{-1}$. Werden Reaktoren mit Strömungsbrechern verwendet, können im turbulenten Strömungsbereich bei einer gegebenen Rührerdrehzahl höhere Leistungseinträge realisiert werden (Kapitel 3.4.3). Bei der Verfahrensentwicklung des Polymersomenherstellungsprozesses (Kapitel 5.1) wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von Stromstörern im Reaktor mit Blick auf das schnelle Erzielen von niedrigen Polydispersitäten hinderlich ist. Um die Gültigkeit dieses Phänomens im Liter-Maßstab zu validieren, wurden zunächst Polymersomen bei $P V^{-1} = 12,3 \text{ W L}^{-1}$ in bewehrten Reaktoren hergestellt. Da Rührer R5 aufgrund seines großen Durchmessers nur in unbewehrten Reaktoren betrieben werden kann, war Rührer R4 der größte Rührertyp, der in Reaktoren mit Strömungsbrechern betrieben werden konnte. Basierend auf dem Ergebnis, dass sich große Rührerdurchmesser positiv auf die zügige Bildung von Polymersomen auswirken (Kapitel 5.3.2), wurde bei diesem Rührertyp das aussagekräftigste Ergebnis erwartet.

Die Verwendung von Rührer R4a bei einer Einbauhöhe h_s von 72 mm in bewehrten Reaktoren führte zu sehr breiten Partikelgrößenverteilungen mit hoher Polydispersität. Nach der erwünschten kurzen Prozesszeit von 60 min wurde ein sehr hoher PDI von 0,62 verzeichnet (Ergebnis nicht dargestellt), was durch die zugehörige breite intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilung in Abbildung 5.23 A wiedergegeben wird. Auch die Verlängerung der Prozesszeit auf bis zu 24 h brachte keine Verbesserung. Die Partikelgrößenverteilung war hierbei mit einem PDI von 0,59 (Ergebnis nicht dargestellt) nach wie vor sehr breit. Somit wurde auch im Liter-Maßstab deutlich, dass Stromstörer bei der Polymersomenherstellung in Rührkesselreaktoren nicht verwendet werden sollten. Aus diesem Grund wurde das Zulaufrohr, das bei der Zudosierung der Polymerlösung direkt in die gerührte wässrige Phase ragte, direkt nach Ende des Zulaufprozesses entfernt (Kapitel 4.3.3). Zusammen mit der apparativ bedingten maximalen Zulauftrate von 15 L h^{-1} , die die Zudosierung der Polymerlösung in wenigen Sekunden ermöglichte, wurde die durch das Zulaufrohr hervorgerufene Beeinträchtigung des Strömungsprofils im Reaktor minimiert.

Der geforderte volumetrische Leistungseintrag von $12,3 \text{ W L}^{-1}$ konnte im unbewehrten Reaktor nur mit Hilfe der Rührertypen R4a, R4b und R5 mit verhältnismäßig großen Durchmessern ($d D^{-1} \geq 0,65$) erreicht werden (Einbauhöhe $h_S = 50 \text{ mm}$). Die Zunahmen des z-Mittels innerhalb der ersten 15 min des Prozesses sind in Abbildung 5.23 B dargestellt. Mit Zunahmeraten von $7,7 \text{ nm min}^{-1}$ (R4a) und $5,5 \text{ nm min}^{-1}$ (R5) erfolgte die Polymersomenbildung deutlich schneller als bei konstanter Rührerumfangsgeschwindigkeit (Kapitel 5.3.2). Nichtsdestotrotz waren die im linearen Bereich ermittelten Zunahmeraten circa fünf Mal niedriger als beim Referenzprozess. Demnach wurde der volumetrische Leistungseintrag als ungeeignetes Kriterium für die Maßstabsübertragung identifiziert.

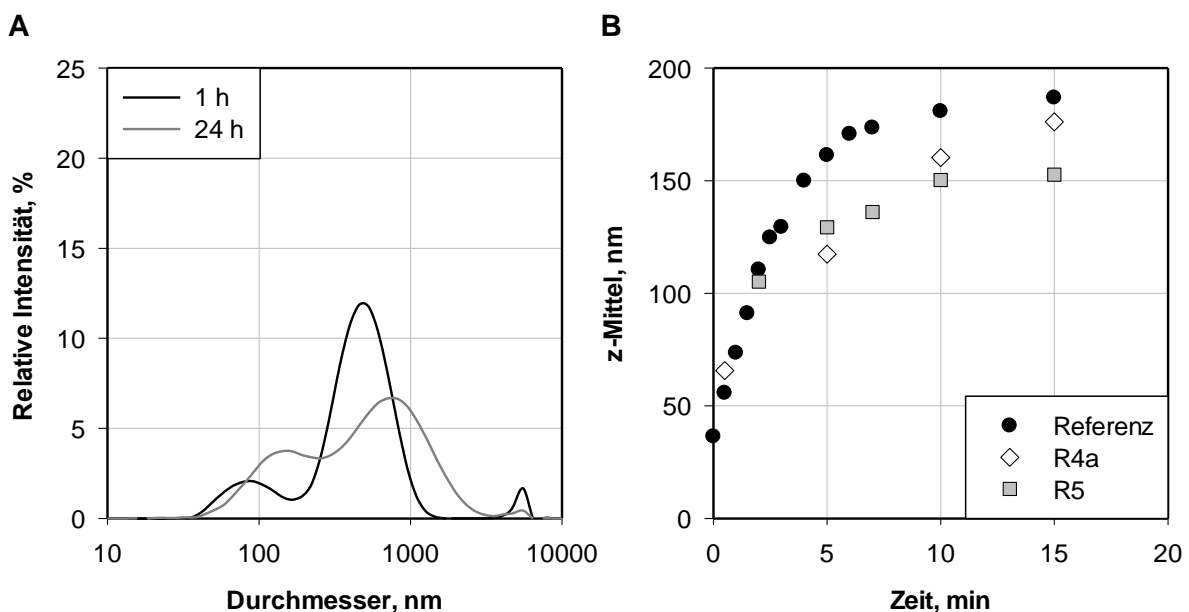


Abbildung 5.23: A) Intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilungen nach 1 h und nach 24 h Prozesszeit bei Verwendung von R4a bei einem volumetrischen Leistungseintrag von $P V^{-1} = 12,3 \text{ W L}^{-1}$ im bewehrten Reaktor. B) Verlauf des z-Mittels innerhalb der ersten Prozessminuten bei Verwendung der Propellerrührer R4a und R5 bei identischem volumetrischen Leistungseintrag von $P V^{-1} = 12,3 \text{ W L}^{-1}$ im unbewehrten Reaktor. Der in miniaturisierten Rührkesselreaktoren etablierte Prozess dient als Referenz. $N = 1$.

Die dimensionslose Newtonzahl Ne , die bei bekanntem Leistungseintrag über Gleichung (3.47) berechnet werden kann, kann ebenfalls als geeignetes Kriterium für die Maßstabsübertragung fungieren. In unbewehrten, miniaturisierten Rührkesselreaktoren erreicht der S-Rührer im turbulenten Bereich eine nahezu konstante Newtonzahl Ne von 0,9 (Riedlberger, 2012). Bei Rührer R4 und R5 im Liter-Maßstab waren die Rührerdrehzahlen n , die diese Newtonzahl bedingen würden, jedoch niedriger als jene, die für einen identischen volumetrischen Leistungseintrag $P V^{-1}$ in beiden Maßstäben sorgten. So galt beispielsweise für Rührer R4a:

$$n(Ne = 0,9) = 1484 \text{ min}^{-1} < n(P V^{-1} = 12,3 \text{ WL}^{-1}) = 1612 \text{ min}^{-1}.$$

Nachdem gezeigt wurde, dass ein identischer volumetrischer Leistungseintrag im Liter-Maßstab zu niedrigeren Zunahmeraten als im Referenzprozess führt, und nachdem ebenfalls gezeigt wurde, dass niedrigere Rührerdrehzahlen zu langsameren Polymersomenherstellungsprozessen führen (Kapitel 5.3.1), konnte folglich eine konstante Newtonzahl als Strategie zur Maßstabsübertragung ebenfalls ausgeschlossen werden.

Neben dem volumetrischen Leistungseintrag und der Newtonzahl kann auch die maximale Energiedissipation ε_{max} die Schlüsselrolle bei der Maßstabsübertragung spielen. Insbesondere in Gegenwart von scherempfindlichen Partikeln kann diese das entscheidende Kriterium für eine erfolgreiche Skalierung sein. Das Verhältnis von maximaler Energiedissipation zu massenbezogenem Leistungseintrag Φ (Gleichung (3.49) und Gleichung (3.50)) ist ein Maß für die Inhomogenität der ins System eingetragenen kinetischen Energie. Für den Referenzprozess gilt $\Phi = 7,4$ (Riedlberger, 2012), was bei 20 °C mit $\rho_{H_2O,20\text{ °C}} = 1000 \text{ kg m}^{-3}$ einer maximalen Energiedissipation von $\varepsilon_{max} = 91,0 \text{ W kg}^{-1}$ entspricht. Im Liter-Maßstab wurde die maximale Energiedissipation mit Kenntnis des volumetrischen Leistungseintrags $P V^{-1}$ über Gleichung (3.51) berechnet. Sowohl für Rührer R4a als auch R5 waren die Rührerdrehzahlen n , die im Liter-Maßstab den geforderten Wert von $91,0 \text{ W kg}^{-1}$ hervorrufen würden deutlich niedriger als jene, die zu $P V^{-1} = 12,3 \text{ W L}^{-1}$ führten. So galt beispielsweise für Rührer R4a:

$$n(\varepsilon_{max} = 91,0 \text{ Wkg}^{-1}) = 643 \text{ min}^{-1} < n(P V^{-1} = 12,3 \text{ WL}^{-1}) = 1612 \text{ min}^{-1}.$$

Mit derselben Argumentationskette, mit der bereits die Newtonzahl als relevantes Maßstabsübertragungskriterium ausgeschlossen werden konnte, wurde die maximale Energiedissipation ebenfalls als nicht entscheidender Prozessparameter bewertet.

5.3.4 Maßstabsübertragung anhand der dimensionslosen Froudezahl

Das Betreiben zentrisch angeordneter Rührer in unbewehrten Reaktoren führt zu Trombenbildung. Sobald es, wie beim Referenzprozess, zu diesem Phänomen kommt, darf die Erdbeschleunigung $g = 9,81 \text{ m s}^{-2}$ nicht vernachlässigt werden, sondern muss über die dimensionslose Froudezahl Fr , die über Gleichung (3.41) berechnet werden kann, berücksichtigt werden. Beim Referenzprozess gilt $Fr = 6,52$. In Rührkesselreaktoren mit ausgebildeter Flüssigkeitstrombe sind die Froudezahl und die Leistungscharakteristik voneinander abhängig (Kapitel 3.4.2). Da der beim Referenzprozess vorherrschende Leistungseintrag im Liter-Maßstab in unbewehrten Reaktoren nur von den Rührern mit großen

Durchmessern ($d D^{-1} \geq 0,65$) (Einbauhöhe 50 mm) erzielt werden konnte (Kapitel 5.3.3), wurden ausschließlich Rührer R4a, R4b und R5 für die Maßstabsübertragung anhand identischer Froudezahl berücksichtigt. In Tabelle 5-5 sind die bei $Fr = 6,52$ im unbewehrten Rührkesselreaktor herrschenden charakteristischen Bedingungen zusammengefasst.

Tabelle 5-5: Charakteristische Werte bei der Polymersomenherstellung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren mit Hilfe des S-Rührers und im Liter-Maßstab mit Rührer R4a, R4b und R5 bei $Fr = 6,52$.

Rührer	n, min^{-1}	$u_{tip}, \text{m s}^{-1}$	$Re, -$	$P V^{-1}, \text{W L}^{-1}$	$Ne, -$	$\epsilon_{max}, \text{W kg}^{-1}$
S-Rührer	4000	3,02	13.824,0	12,3	0,9	91,0
R4a	1882	6,41	132.524	16,2	0,7	230
R4b	1882	6,41	132.524	13,9	0,6	200
R5	1600	7,54	216.000	17,1	0,3	545

Der Verlauf des z-Mittels innerhalb der ersten 3 min des Prozesses bei $Fr = 6,52$ für R4a und R5 ist in Abbildung 5.24 A dargestellt.

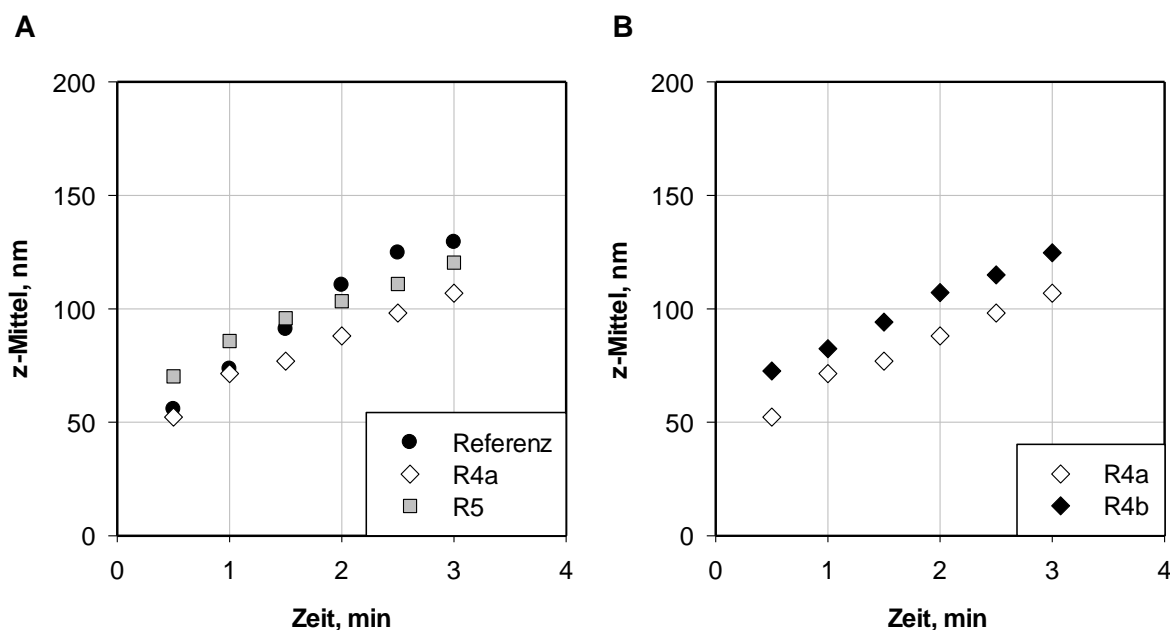


Abbildung 5.24: A) Verlauf des z-Mittels innerhalb der ersten Prozessminuten bei $Fr = 6,52$. Der in miniaturisierten Rührkesselreaktoren etablierte Prozess dient als Referenz. B) Verlauf des z-Mittels innerhalb der ersten Prozessminuten bei Verwendung der Rührer R4a und R4b. $N = 1$.

Mit einer Steigung von $20,9 \text{ nm min}^{-1}$ und $19,1 \text{ nm min}^{-1}$ nahm das z-Mittel unter Verwendung der Rührer R4a und R5 nahezu gleich schnell zu. Die Zunahme des z-Mittels bei Verwendung von Rührer R4a und R4b sind in Abbildung 5.24 B vergleichend gegenüber gestellt. Die nahezu identische Geometrie der beiden Rührertypen R4a und R4b unterscheidet sich nur in

der Orientierung der Rührerblätter, die entweder eine axiale aufwärts- oder abwärts gerichtete Strömung erzeugen. Die sehr ähnlichen Steigungen des z-Mittels über der Zeit ($20,8 \text{ nm min}^{-1}$ bei R4a und $21,2 \text{ nm min}^{-1}$ bei R4b, Abbildung 5.24 B) legten nahe, dass die Richtung der axialen Strömung keinen Einfluss auf die Polymersomenbildung hat. Jedoch zeigte sich, dass die Polymersomenbildung bei Verwendung der Propellerrührer R4a, R4b und R5 bei einer identischen Froudezahl von $Fr = 6,52$ sehr schnell, und nur geringfügig langsamer als beim Referenzprozess mit einer initialen Zunahmerate $31,0 \text{ nm min}^{-1}$ erfolgte. In Abbildung 5.25 A und Abbildung 5.25 B sind die Verläufe von z-Mittel und PDI unter Verwendung von R4a und R5 innerhalb der gesamten Prozessdauer von 90 min dem Referenzprozess gegenüber gestellt.

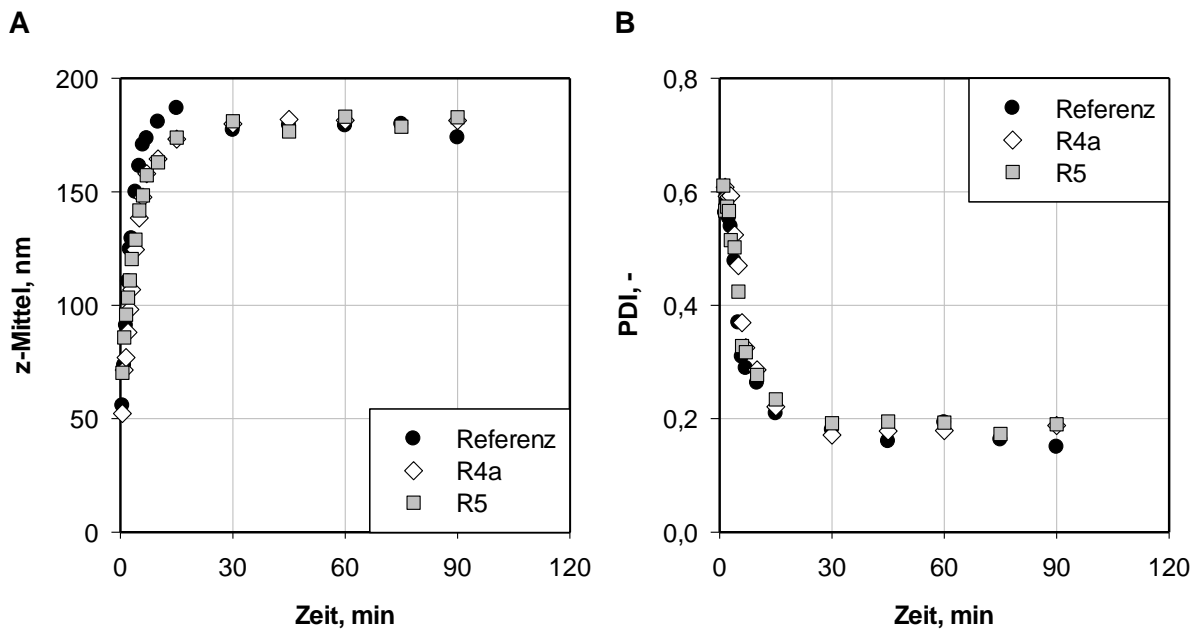


Abbildung 5.25: A) Verlauf des z-Mittels und B) des PDIs während der gesamten Prozessdauer. Der in miniaturisierten Rührkesselreaktoren etablierte Prozess dient als Referenz. $N = 1$.

Sowohl die Verwendung von Rührer R4a als auch von R5 führten zu Verläufen von z-Mittel und PDI, die jenen des Referenzprozesses sehr ähnlich waren. Das z-Mittel nahm ausgehend von 30 nm sehr schnell zu, bis ein Wert von circa 180 nm erreicht wurde. Die Polydispersität hingegen nahm von $PDI > 0,6$ im Prozessverlauf stetig ab, bis die gewünschte niedrige Polydispersität mit $PDI < 0,2$ nach 30 min erzielt wurde. Die zu diesem Zeitpunkt erreichten Werte für z-Mittel und PDI waren im Liter-Maßstab bei Verwendung von Rührer R4a (z-Mittel = 180 nm, $PDI = 0,17$) und R5 (z-Mittel = 181 nm, $PDI = 0,18$) jenen aus dem Referenzprozess (z-Mittel = 177 nm, $PDI = 0,19$) sehr ähnlich. Die zugehörigen

intensitätsbasierten Partikelgrößenverteilungen, abgebildet in Abbildung 5.26 A, waren monomodal, schmal und bei beiden Maßstäben nahezu kongruent.

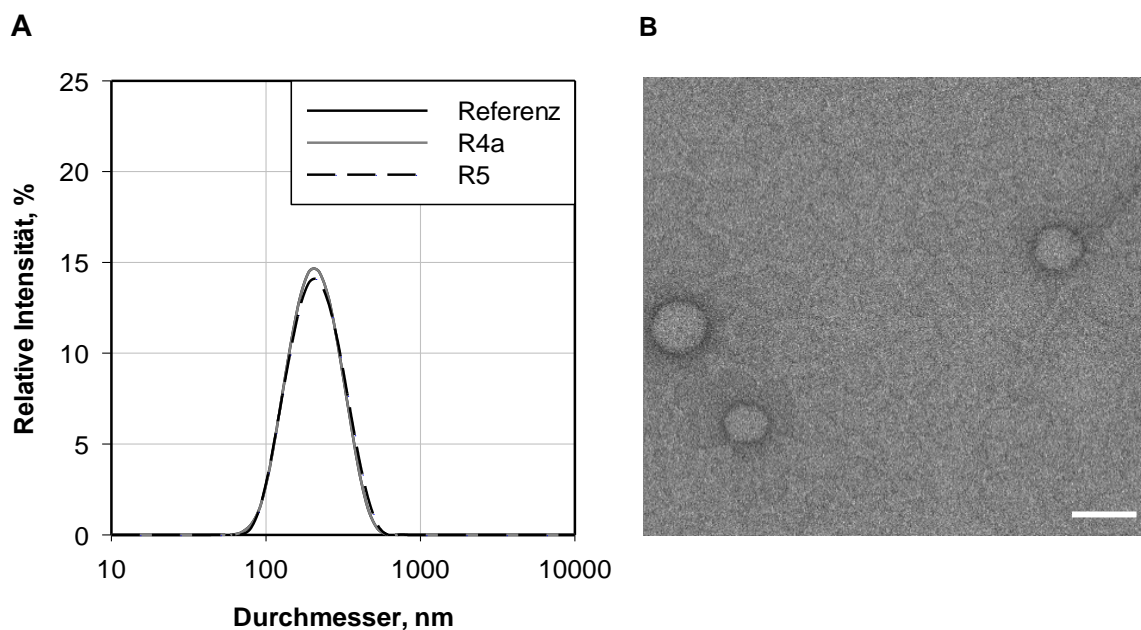


Abbildung 5.26: A) Intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilung bei Verwendung der Propellerrührer R4a und R5 nach 30 min. B) TEM-Aufnahme der im Liter-Maßstab gebildeten Polymervesikel (Probenahmezeitpunkt: 90 min). N = 1.

TEM-Aufnahmen, exemplarisch in Abbildung 5.26 B zu sehen, zeigten, dass die gewünschten Polymersomen auch im Liter-Maßstab hergestellt werden konnten. Da unerwünschte Polymeraggregate weder mit bloßem Auge noch mittels mikroskopischer Aufnahmen verzeichnet wurden, konnte auf die vollständige Umsetzung des Polymers zu Polymersomen geschlossen werden. Die Maßstabsübertragung des Polymersomenherstellungsprozesses in miniaturisierten Rührkesselreaktoren (12 mL) in den Liter-Maßstab (1,5 L) um den Faktor 125 konnte somit erfolgreich gezeigt werden.

5.3.5 Diskussion

Seit den Anfängen der Polymersomentechnologie in den 90er Jahren wurden in Anlehnung an die Herstellungsmethoden von Liposomen diverse Techniken für die Bereitstellung von Polymervesikeln entwickelt. Die meisten davon, wie beispielsweise die Filmrehydrierung, sind für den industriellen Maßstab nicht geeignet (Wagner und Vorauer-Uhl, 2011). Die erfolgreiche Anwendung spezieller Techniken zur kontrollierten Polymersomenherstellung über Tintenstrahldrucker (Hauschild *et al.*, 2005) und Mikrofluidik-Einheiten (Thiele *et al.*, 2010b; Brown *et al.*, 2010; Thiele *et al.*, 2010a; Thiele *et al.*, 2014) wurde bisher im großen Maßstab durch Parallelisierung nicht gezeigt. Die kontinuierliche Polymersomenherstellung über sogenannte Mikromixer wurde bis zu einem Durchfluss von $0,58 \text{ L h}^{-1}$ untersucht (Thiermann

et al., 2012; Bleul *et al.*, 2013). Die Verwendung von speziellen Apparaturen mit unbekannter Langzeitstabilität kann zu hohen Investitionskosten führen. So war es nicht überraschend, dass in den vergangenen Jahren der Ruf nach skalierbaren Prozessen immer wieder laut wurde (Nallani *et al.*, 2006; van Rijn *et al.*, 2013).

Für einen industriell anwendbaren Prozess ist ein Minimum an notwendigen Prozessschritten ebenso essentiell wie die Verwendung von einer möglichst überschaubaren Anzahl an bestenfalls standardisierten Komponenten (Mozafari, 2005). Die Möglichkeit Liposomen, welche Polymersomen in vielerlei Hinsicht sehr ähnlich sind, im großen Maßstab in Rührkesselreaktoren herzustellen wurde bereits mehrmals gezeigt (Hamann und Nothelle, 1995; Naeff, 1996; Wagner *et al.*, 2002; Wagner und Vorauer-Uhl, 2011; Pham *et al.*, 2012). Sehr häufig werden Liposomen über die Injektionsmethode, bei welchem die Lipidlösung über eine Düse in die wässrige Phase eingespritzt wird, hergestellt. Dieses Verfahren führt meist zu breiten Partikelgrößenverteilungen. Deshalb wird der Liposomenherstellung in Rührkesselreaktoren häufig ein Homogenisator nachgeschaltet, wodurch sich der technische Aufwand jedoch deutlich erhöht (Hamann und Nothelle, 1995). Obwohl Herstellbarkeit von Liposomen im industriellen Maßstab demonstriert wurde (Naeff, 1996), wurden die relevanten Kriterien, die für die Maßstabsübertragung von Prozessen in Rührkesselreaktoren essentiell sind, bis dato nicht veröffentlicht. In anderen Studien wurde die Umsetzbarkeit der Maßstabsübertragung teils durch bloßes Erhöhen des Reaktionsvolumens gezeigt, ohne auf die relevanten Kriterien der Maßstabsübertragung einzugehen (Pham *et al.*, 2012). Zudem wurde die notwendige Prozesszeit, die mit Fokus auf die entstehenden Investitionskosten essentiell ist, nicht berücksichtigt (Charcosset *et al.*, 2015). Während die Herstellung von Liposomen im industriellen Maßstab bereits etabliert ist, gab es hingegen bislang keine publizierten Forschungsarbeiten über die Polymersomenherstellung in Rührkesselreaktoren im großen Maßstab. Daher stellt die in dieser Arbeit gezeigte erstmalige Entwicklung eines einstufigen Polymersomenherstellungsprozesses im Liter-Maßstab einen großen Fortschritt bezüglich industrieller Anwendbarkeit der Polymersomentechnologie dar. Insbesondere die Verwendung eines standardisierten Rührkesselreaktors ist ein großer Vorteil. Aufgrund der Verfügbarkeit vom Milliliter- bis zum Kubikmeter-Maßstab ist er nicht nur prädestiniert für eine erfolgreiche Maßstabsübertragung. Die Möglichkeit bereits bestehende, standardisierte Reaktor- und Rührergeometrien nutzen zu können sind mit Fokus auf niedrige Investitionskosten ein weiterer Vorteil.

5.4 Wiederaufbereitung des Polymers

Da das in dieser Arbeit verwendete Polymer einen kostenintensiven Wertstoff darstellte (Listenpreis Polymersource™ 2016: 450 US-Dollar g⁻¹), war dessen Wiedergewinnung nach Verwendung als polymerbasierte Nanokapsel oder als Enzymmembranreaktor zwingend notwendig.

5.4.1 Polymerextraktion

Erste Voruntersuchungen zur Rückgewinnung des PMOXA-PDMS-PMOXA Polymers basierten auf dem Versuch das Polymer über ein geeignetes Lösemittel aus der wässrigen Phase zu extrahieren. Dies war mit einer Vielzahl untersuchter organischer Lösemittel nicht möglich (Ergebnisse nicht dargestellt). Wie in Abbildung 5.27 dargestellt, reicherte sich das amphiphile Polymer im besten Fall zwischen der hydrophoben, organischen Phase (hier Chloroform) und der hydrophilen wässrigen Phase an. Eine Extraktion war somit nicht realisierbar. Denkbar wäre es die polymerreiche, mittlere Phase abzutrennen. Dabei bliebe die Problematik unerwünschter Lösemittelrückstände im Polymer aber bestehen.

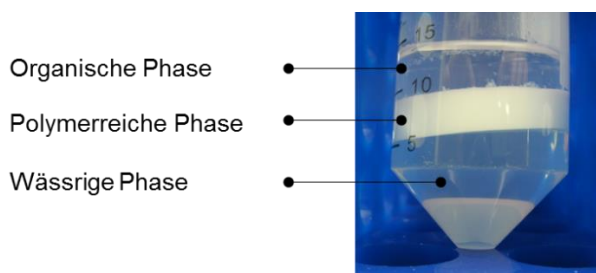


Abbildung 5.27: Das amphiphile Polymer sammelt sich zwischen der hydrophilen wässrigen und der hydrophoben organischen Phase.

5.4.2 Verfahrensentwicklung zur Wiedergewinnung des Polymers

Da sich das Vorgehen der Polymerextraktion als ungeeignet für die Wiedergewinnung des Polymers erwies, wurde ein mehrstufiger, aus wiederholten Evaporations-, Lösungs- und Präzipitationsschritten bestehender Prozess, dargestellt in Abbildung 5.28, etabliert.

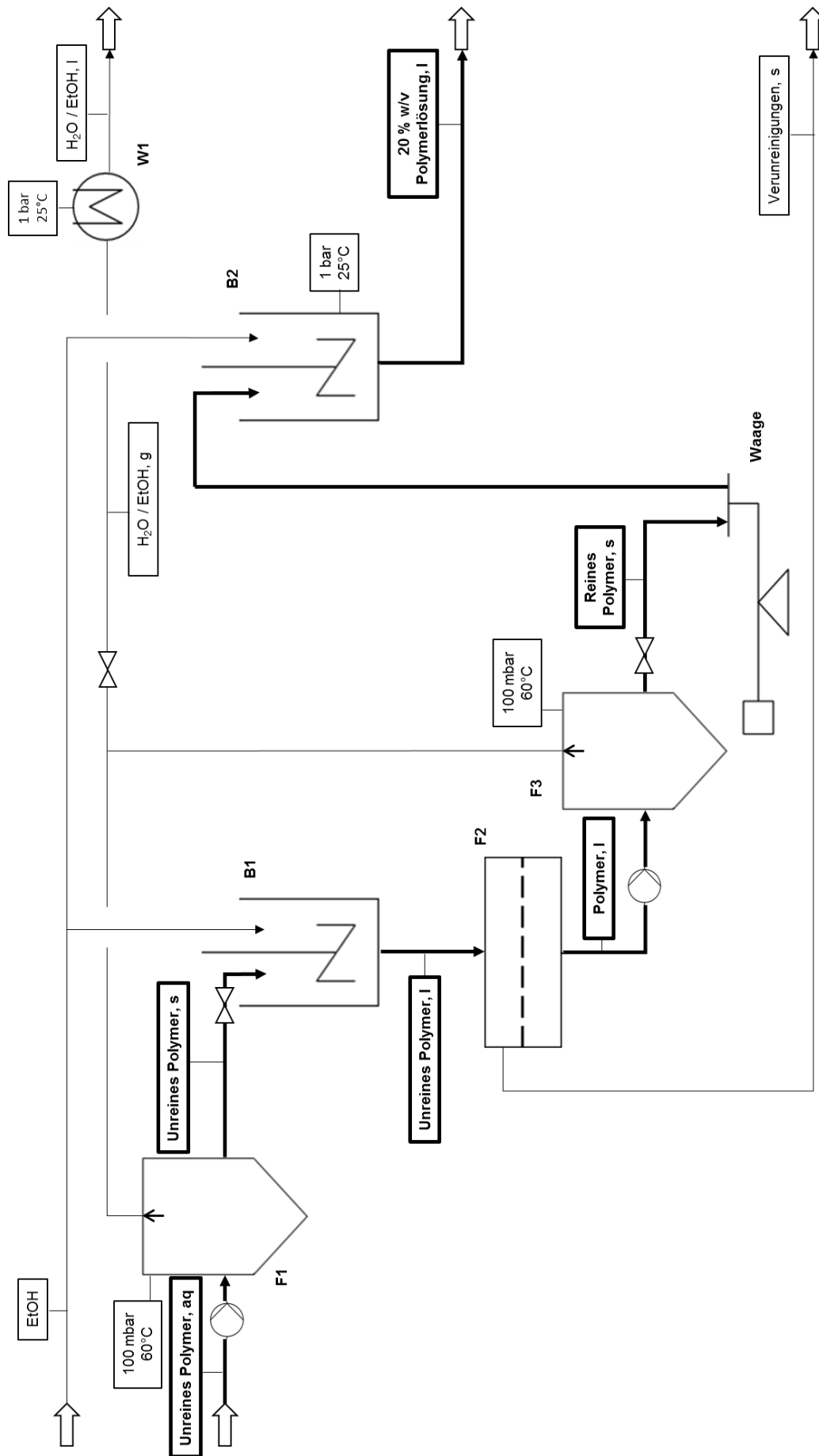


Abbildung 5.28: Verfahrensfliessbild zur Rückgewinnung von Polymer aus der Abfallklasse 1 und 2. Im Flüssigkeitsabscheider F1 wird Wasser und Ethanol verdampft bis das verunreinigte Polymer als Feststoff vorliegt. Dieser Feststoff wird im Behälter B1 in reinem Ethanol gelöst. Präzipitierte Salze und andere feststoffartige Verunreinigungen werden in F2 durch Filtration entfernt. Im Flüssigkeitsabscheider F3 wird das Filtrat erneut verdampft, bis das gereinigte Polymer feststoffartig vorliegt. Dieses kann für einen weiteren Recyclingschritt entweder zurück in den Behälter B1 oder für die Herstellung einer definierten *liquid* 20 % (w/v) Lösung in den Behälter B2 überführt werden. Die gasförmige Phase aus Wasser und/oder Ethanol wird im Wärmetauscher W1 kondensiert. aq: *aqueous* (wässrig), g: *gaseous* (gasförmig), l: *liquid* (flüssig), s: *solid* (fest)

Wasser und Ethanol der Polymersomendispersion wurden im ersten Prozessschritt verdampft (F1, 60 °C, 100 mbar). Das verunreinigte Polymer blieb hierbei als Feststoff zurück. Im zweiten Schritt wurde der so gewonnene Feststoff mit Ethanol vermennt (B1). Ziel hierbei war das selektive Lösen des in Ethanol hervorragend löslichen Polymers. Unerwünschte Salze der Pufferlösungen und andere Verunreinigungen präzipitierten aufgrund ihrer niedrigen Löslichkeit in diesem Lösemittel. Der Feststoff der resultierenden Suspension konnte in einem weiteren Filtrationsschritt (F2) problemlos abgetrennt werden. Die Polymerlösung hingegen wurde im Flüssigabscheider (F3) erneut verdampft, bis das gereinigte Polymer feststoffförmig vorlag. Hieraus konnte bei Bedarf eine definierte 20 % w/v Polymerlösung hergestellt werden (B2).

Die Reinheit des wiedergewonnenen Polymers (in fester Form) wurde mit Hilfe von energiedispersiver Röntgenspektroskopie analysiert. Dies wurde sowohl für neues als auch für recyceltes Polymer aus der Abfallklasse 1, welche Polymer, Wasser, Ethanol und verschiedene Salze enthält (Kapitel 4.9), durchgeführt. Mit Hilfe dieser analytischen Methode konnten die in der Probe vorliegenden Elemente identifiziert und deren prozentualer Atom- oder Massenanteil bestimmt werden. Reines PMOXA-PDMS-PMOXA-Polymer besteht aus den Elementen Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Silicium (Abbildung 3.3). Anhand dieser Elemente konnte der Anteil des Polymers in den Proben bestimmt werden. Die Polymersomen wurden allerdings in verschiedenen Puffersystemen in Anwesenheit von Natrium, Kalium, Phosphat und Chlorid hergestellt, die potentiell im gereinigten Polymer verbleiben können. In der Probe des recycelten Polymers wurden allerdings ausschließlich Natrium- und Chlorrückstände nachgewiesen. Mit einem Anteil von nur 0,7 % w/w, Tabelle 5-6, waren die Verunreinigungen durch Salze gering. Neben Natrium und Chlor wurden auch die Elemente Fluor und Schwefel detektiert. Diese Elemente stammten vermutlich aus der chemischen Verbindung Trifluormethansulfonanhydrid, welche in einem Synthese-Schritt bei der Herstellung des Polymers als Lösemittel verwendet wird (Nardin *et al.*, 2000a). Der Anteil von Fluor und Schwefel lag beim ursprünglichen Polymer bei 1,4 % w/w beziehungsweise 0,4 % w/v. Die Reinheit des kommerziell erworbenen Polymers betrug demnach 98,2 % w/w. Im wiedergewonnenen Polymer wurde ein Anteil an Fluor und Schwefel von 0,9 % w/w beziehungsweise 0,5 % w/v verzeichnet. Die Reinheit des wiedergewonnenen Polymers betrug somit 97,9 % w/w. Der etablierte Recyclingprozess konnte demzufolge als sehr effizient eingestuft werden. Dabei sei erwähnt, dass die gezeigten Ergebnisse aus einem einmalig durchgeführten Wiedergewinnungsprozess stammten. Durch mehrmaliges Wiederholen könnte die Reinheit des recycelten Polymers vermutlich weiter erhöht werden. In Tabelle 5-6 sind die Massenanteile der Bestandteile des neuen und des wiedergewonnenen Polymers

gegenübergestellt. Die Herstellung von Polymersomen aus wiedergewonnenem Polymer war problemlos möglich (Ergebnisse nicht dargestellt).

Tabelle 5-6: Massenanteil an Polymer, Lösemittelrückständen und Salzen im neuen und im recyceltem Polymer.

Massenanteil, %	Neues Polymer	Wiedergewonnenes Polymer
Polymer	98,2	97,9
Fluor	1,4	0,9
Schwefel	0,4	0,5
Salze	-	0,7

5.4.3 Rückgewinnung von mit Proteinen verunreinigtem Polymer

Die Rückgewinnung des Polymers aus Klasse 2, welche neben den Bestandteilen aus Klasse 1 zusätzlich auch Proteine enthält (Kapitel 4.9), wurde ebenfalls nach dem in Abbildung 5.28 dargestellten Prozessschema durchgeführt. Der Überlegung folgend, dass nicht nur Salze, sondern auch Proteine eine begrenzte Löslichkeit in Ethanol aufweisen, wurde geschlussfolgert, dass das Polymer durch schrittweise Abreicherung des Proteins durch Präzipitation gereinigt werden kann.

Die Reinigung von 500 mL der Klasse 2 mit einer anfänglichen Proteinkonzentration von $623 \mu\text{g L}^{-1}$ erfolgte in insgesamt fünf hintereinander geschalteten Wiedergewinnungsprozessen. Dabei wurde das Volumen an Ethanol schrittweise verringert um einen möglichst hohen Anteil an Protein und Salz ausfällen zu können. Die in Tabelle 5-7 gezeigte Effizienz jedes Wiedergewinnungszykluses zeigt den Anteil an insgesamt abgereichertem Protein, bezogen auf den ursprünglichen Anteil im verunreinigten Polymer.

Tabelle 5-7: Masse an Restprotein m_{Protein} nach den einzelnen Wiedergewinnungszyklen und Reinheit des Polymers bei schrittweiser Verringerung des Ethanolvolumens V_{EtOH} .

Schritt	V_{EtOH} , mL	m_{Protein} , μg	Effizienz %
0	500 (H ₂ O/EtOH)	311,5	
1	60	92,0	70,5
2	7,5	12,5	96,0
3	5,0	9,5	97,0
4	3,0	7,2	97,7
5	2,5	7,2	97,7

Die im Polymer verbleibende Masse an Restprotein konnte innerhalb von vier Zyklen von ursprünglich 312 μg auf 7,2 μg reduziert werden. Ein weiterer Schritt, bei welchem das Ethanolvolumen von 3,0 mL auf 2,5 mL nur geringfügig reduziert wurde, führte zu keiner weiteren Abreicherung des Proteins. Die gezeigten Daten resultieren nicht aus einem optimierten Wiedergewinnungsprozess. Vielmehr wurde anhand des grundlegenden Vorgehens gezeigt, dass die Wiedergewinnung des Polymers prinzipiell auch aus mit Protein verunreinigten Polymersomendispersionen möglich ist. Im Rahmen dieser Machbarkeitsstudie konnten bereits 97,7 % des Proteins abgereichert werden. Verluste an Polymer waren bei der mehrstufigen Reinigung nicht zu verzeichnen (Ergebnisse nicht dargestellt).

5.4.4 Diskussion

Bislang liegen neben den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen zur Wiedergewinnung von amphiphilen Block-Copolymeren, welche für die Bereitstellung von Enzymnanoreaktoren verwendet wurden, keine weiteren Studien vor. PMOXA-PDMS-PMOXA wurde erstmalig als Material für Kontaktlinsen von Ciba-Vision® hergestellt (Grumelard, 2004). Im Jahr 2000 wurde dieses Polymer dann zum ersten Mal für die Herstellung von Polymersomen eingesetzt (Nardin *et al.*, 2000c; Nardin *et al.*, 2000b; Nardin *et al.*, 2000a; Meier *et al.*, 2000). Bei PMOXA-PDMS-PMOXA handelt es sich um ein Spezialpolymer, das in einem relativ aufwendigen Verfahren (Nardin *et al.*, 2000a) hergestellt wird. Zudem liegt die Ursache für den hohen Preis (Listenpreis Polymersource™ 2016: 450 US-Dollar g^{-1}) vermutlich auch bei der häufig an Kundenwünsche angepassten Polymer-Synthese von nur kleinen Mengen. Die Frage nach der künftigen Notwendigkeit der Wiedergewinnung des Polymers ist demzufolge entscheidend an die Preisentwicklung geeigneter amphiphiler Blockcopolymerer, und diese wiederum an die Entwicklung der Nachfrage nach solchen Polymeren, gekoppelt.

6 Membraneigenschaften

Die Eigenschaften der Polymersomenmembran beeinflussen zahlreiche, grundlegende Charakteristika der Vesikel. So ist es von großem Interesse Größen wie die Aggregationszahl N_{Agg} , die Stärke der Membran s und die Membranviskosität η_M zu bestimmen. Zudem ist auch die Verkapselungseffizienz VE von Membranvesikeln von großer Wichtigkeit ist.

6.1 Unbeladene Polymervesikel

6.1.1 Bestimmung der Aggregationszahl über statische Lichtstreuung

Die Bestimmung der Aggregationszahl N_{Agg} , die die mittlere Anzahl an Polymermolekülen je Vesikel angibt (Gleichung (3.4)), wurde mittels statischer Lichtstreuung von der Firma ALV über den Berry-Plot (Kapitel 13.1.5) bestimmt. Untersucht wurde eine Polymersomendispersion mit schmaler Partikelgrößenverteilung ($PDI = 0,14$) und einem z-Mittel von 166 nm. Die mittlere molare Masse eines Vesikels $M_{W,V}$ wurde zu $3,266 \cdot 10^8 \text{ g mol}^{-1}$ bestimmt. Durch Kenntnis der molaren Masse des Polymers ($M_{W,P} = 7600 \text{ g mol}^{-1}$) konnte so die mittlere Aggregationszahl N_{Agg} zu 43.000 bestimmt werden, wie in Tabelle 6-1 mit weiteren Parametern der statischen Lichtstreuung gezeigt.

Tabelle 6-1: Ergebnisse der statischen Lichtstreuung für die Bestimmung der molaren Masse $M_{W,Agg}$ und Aggregationszahl N_{Agg} eines Vesikels. Die Bestimmung des Gyrationradius R_G des hydrodynamischen Radius R_H , des Verhältnisses aus R_G und R_H , sowie des zweiten Virialkoeffizienten A_2 werden bei jeder Messung mittels statischer Lichtstreuung automatisch mit bestimmt.

$M_{W,Agg}$	$3,266 \cdot 10^8 \text{ g mol}^{-1}$
N_{Agg}	43.000
R_G	151 nm
R_H	146 nm
$R_G R_H^{-1}$	1,034
A_2	$5,676 \cdot 10^{-10} \text{ mol dm}^3 \text{ g}^{-2}$

Der Trägheitsradius R_G und der hydrodynamische Radius R_H werden bei jeder Messung der statischen Lichtstreuung ebenfalls bestimmt. Das Verhältnis von R_G zu R_H lag bei 1,034, was die sphärische Form der Vesikel widerspiegelt. Der Wert 1 entspricht der geometrischen Form einer perfekten Kugel. Zudem wurde der zweite Virialkoeffizient A_2 bestimmt, der mit einem Wert von $5,676 \cdot 10^{-10} \text{ mol dm}^3 \text{ g}^{-2}$ nahezu Null ist. Dies macht deutlich, dass keine ausgeprägte

Interaktion der Polymersomen untereinander besteht. Sie stoßen sich demnach weder ab, noch ziehen sie sich gegenseitig an.

6.1.2 Membranstärke

Die Membranstärke wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von cryo-TEM-Aufnahmen, Abbildung 6.1, bestimmt. Anhand dieser konnte gezeigt werden, dass die Stärke der Vesikelmembran gleichmäßig und unabhängig von der Vesikelgröße war. Sie betrug im Mittel 14 nm.

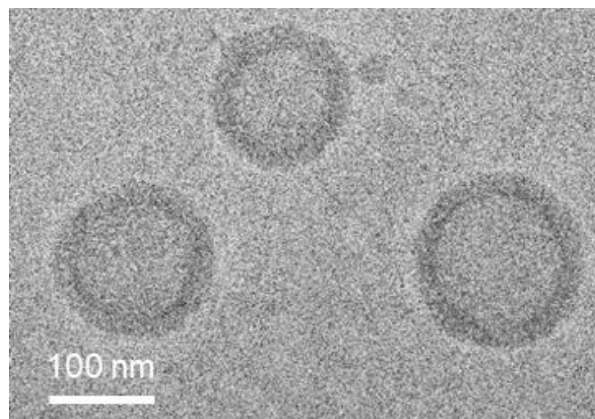


Abbildung 6.1: Die cryo-TEM-Aufnahme zeigt eine gleichmäßige Membranstärke der Polymervesikel von 14 nm.

6.1.3 Membranviskosität

Um die temperaturabhängige Viskosität der Polymersomenmembran zu untersuchen, wurde die dynamische Viskosität der Polymersomendispersion η_V und die dynamische Viskosität von reinem Wasser η_{H_2O} bei 8 °C, 25 °C und 40 °C bestimmt. Die Differenz aus beiden Werten lässt Rückschlüsse auf die Viskosität der Membran η_M zu. Anhand der in Tabelle 6-2 zusammengefassten Werte wird deutlich, dass die Viskosität der Polymersomendispersion von 8 °C bis 40 °C von 1,65 mPa s bis 0,79 mPa s stärker abnahm, als jene von Wasser. Diese sank von 1,39 mPa s auf 0,65 mPa s. Dies wird auch anhand der Differenz $\Delta\eta$ aus beiden Werten ersichtlich, die bei 8 °C mit 0,26 mPa s signifikant höher war als bei 40 °C mit 0,14 mPa s.

Tabelle 6-2: Temperaturabhängige dynamische Viskosität der 1 % w/v Polymersomendispersion η_V und von Wasser η_{H_2O} . Die Differenz aus beiden Werten lässt Rückschlüsse auf die Membranviskosität zu

$T, \text{ }^\circ\text{C}$	$\eta_V, \text{ mPa s}$	$\eta_{H_2O}, \text{ mPa s}$	$\Delta\eta, \text{ mPa s}$
8	1,65	1,39	0,26
25	1,11	0,89	0,22
40	0,79	0,65	0,14

In Abbildung 6.2 sind die Werte der Differenz aus der dynamischen Viskosität der Polymersomendispersion und jener von Wasser ($\Delta\eta = \eta_V - \eta_{H_2O}$) aus Tabelle 6-2 dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass die dynamische Viskosität der Polymersomenmembran mit steigender Temperatur abnimmt. Demnach weist die Membran bei erhöhter Temperatur auch erhöhte Fluidität auf, was in Einklang mit dem temperaturabhängigen Verhalten von natürlichen Lipidmembranen steht (Kapitel 3.3.1).

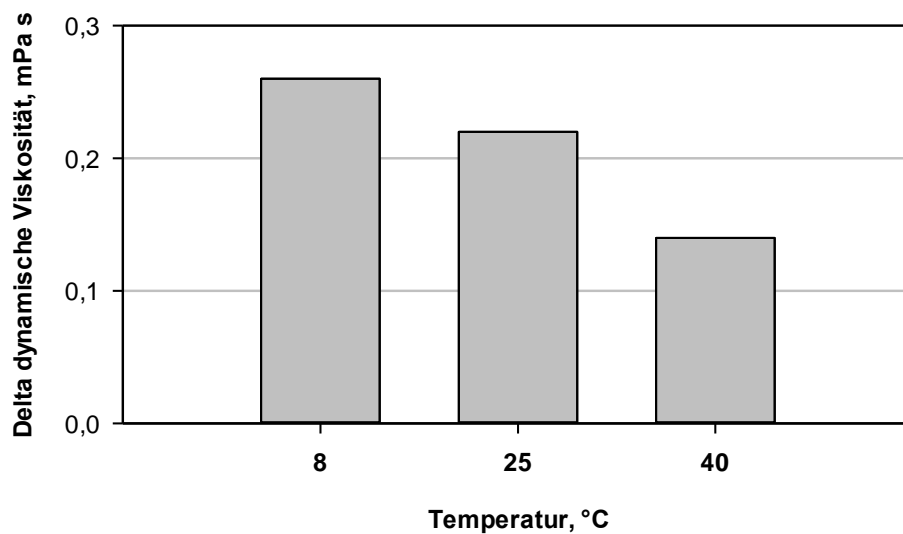


Abbildung 6.2: Differenz der dynamischen Viskosität der Polymersomendispersion und des Wassers ($\Delta\eta = \eta_V - \eta_{H_2O}$) in Abhängigkeit von der Temperatur. $N = 1$.

6.2 Beladene Polymervesikel

Die grundlegende Aufgabe eines Polymersoms liegt darin, Moleküle in seinem Inneren einzuschließen und sie von der wässrigen Umgebung räumlich zu trennen. Mit Hilfe des etablierten Polymersomenherstellungsprozesses (Kapitel 5.1.2) war die Verkapselung verschiedener Moleküle direkt während des Polymersomenherstellungsprozesses möglich. Die Gastmoleküle wurden hierfür vor Polymerzugabe in der wässrigen Phase gelöst. So konnten kleine Moleküle, wie der Farbstoff Calcein, ebenso verkapselt werden, wie auch deutlich größere Moleküle des grün fluoreszierenden Proteins (eGFP). Die Qualität der mit 15 mM Calcein beladenen Polymersomen (z -Mittel = 171 nm, PDI = 0,19) unterschied sich nur wenig von jenen, die mit $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ eGFP beladen wurden (z -Mittel = 185 nm, PDI = 0,18). Dies wurde auch anhand der intensitätsbasierten Partikelgrößenverteilungen, dargestellt in Abbildung 6.3 A, deutlich.

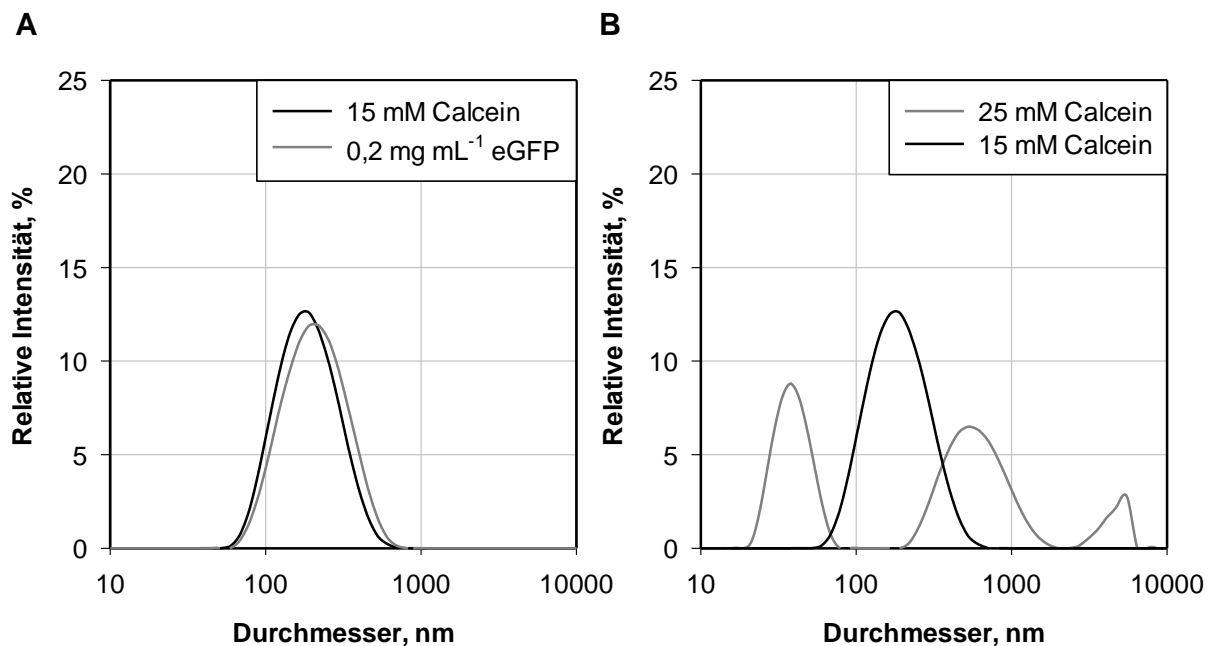


Abbildung 6.3: A) Intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilungen von mit Calcein und eGFP beladenen Polymersomen. B) Intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilungen einer mit 15 mM und mit 25 mM Calcein beladenen Dispersion.

Wie in Abbildung 6.3 B anhand der sehr breiten Partikelgrößenverteilung bei 25 mM Calcein deutlich wird, ist die erfolgreiche Verkapselung von der Konzentration der zu verkapselnden Substanz abhängig. Eine 25 mM Calcein-Lösung konnte nicht mehr erfolgreich eingeschlossen werden. Die hieraus resultierende extrem breite Verteilung ließ vermuten, dass bei diesen Bedingungen keine Vesikel gebildet werden konnten. Weitere Untersuchungen wurden demzufolge mit Polymersomen, die mit 15 mM Calcein beladen waren, durchgeführt.

6.2.1 Bestimmung der Aggregationszahl

Die Aggregationszahl N_{Agg} von mit 15 mM Calcein beladenen Polymersomen, welche mittels Dialyse gereinigt wurden, wurde experimentell bestimmt. Die Aggregationszahl N_{Agg} ergibt sich nach Umstellen von Gleichung (6.7) aus dem Quotienten der Anzahl aller Polymerketten N_P und der Anzahl an gebildeten Vesikeln N_V :

$$N_{Agg} = \frac{N_P}{N_V} \quad (6.1)$$

N_P	Anzahl Polymerketten	-
N_{Agg}	Aggregationszahl	-
N_V	Anzahl Vesikel	-

Da passive Diffusionsvorgänge von Calcein über die Polymersomenmembran während der Dialyse ausgeschlossen werden konnten (Ergebnisse nicht dargestellt), betrug die Calceinkonzentration im Vesikelinneren $c_{V,C}$ 15 mM. Durch Lyse der beladenen Polymersomen nach deren Reinigung, wurde zunächst über eine Massenbilanz das gesamte innere Vesikelvolumen bestimmt. Dabei entspricht die gesamte Masse an Calcein in den Vesikeln $m_{V,C}$ der Masse an Calcein in der Probe nach Vesikellyse $m_{\infty,C}$.

$$m_{V,C} = m_{\infty,C} \quad (6.2)$$

$m_{V,C}$	Gesamte Masse an Calcein in den Vesikeln	g
$m_{\infty,C}$	Masse an Calcein in der Probe nach Vesikellyse	g

Da Konzentration c , Masse m und Volumen V über $c = \frac{m}{V}$ in Zusammenhang stehen, kann Gleichung (6.2) umgestellt werden und das gesamte innere Vesikelvolumen aller Vesikel $V_{V,i}$ wie folgt berechnet werden:

$$V_{V,i} = \frac{c_{\infty,C} \cdot V_{\infty}}{c_{V,C}} \quad (6.3)$$

$V_{V,i}$	Summe des inneren Vesikelvolumens aller Vesikel	cm ³
$c_{\infty,C}$	Calceinkonzentration in der Probe nach Vesikellyse	g cm ⁻³
V_{∞}	Probenvolumen	cm ³
$c_{V,C}$	Verkapselte Calceinkonzentration	g cm ⁻³

Die Anzahl an Polymersomen in der Probe N_V steht mit dem inneren Vesikelvolumen eines einzelnen Vesikels $V_{V,0}$ und der Summe des inneren Vesikelvolumen aller Vesikel $V_{V,i}$ wie folgt in Zusammenhang:

$$V_{V,i} = N_V \cdot V_{V,0} \quad (6.4)$$

$V_{V,0}$ Inneres Vesikelvolumen eines einzelnen Vesikels cm^3

Das innere Vesikelvolumen kann über die Gleichung zur Berechnung des Kugelvolumens $V_{V,i} = \frac{1}{6} \pi d_{V,i}^3$ bestimmt werden. Der hierfür benötigte Innendurchmesser des Vesikels $d_{V,i}$ ergibt sich aus der Differenz des äußeren Vesikeldurchmessers $d_{V,a}$ und der doppelten Membrandicke s mit $d_{V,i} = d_{V,a} - (2 \cdot s)$. Die Bestimmung des äußeren Vesikeldurchmessers erfolgte über Messungen der dynamischen Lichtstreuung. Hierfür wurde der Wert des mittleren anzahlbasierten Vesikeldurchmessers ($d_N = d_{V,a}$) gewählt. Die Membrandicke s war aus cryo-TEM-Aufnahmen zu 14 nm bestimmt worden (Kapitel 6.1.2). Die Anzahl an Vesikel in der Probe N_V war wiederum aus dem Quotienten des berechneten, gesamten inneren Vesikelvolumens $V_{V,i}$ und dem Volumen eines einzelnen Vesikels $V_{V,0}$ über $N_V = \frac{V_{V,i}}{V_{V,0}}$ zugänglich. Die Anzahl an Polymerketten N_P konnte, wie in Gleichung (6.7) gezeigt, über die Masse des Polymers m_P , die Avogadro-Konstante N_A und die molare Masse des Polymers $M_{W,P}$ bestimmt werden.

In 1 mL einer lysierten 1 % w/v Polymersomendispersion wurde eine Calceinkonzentration $c_{\infty,C}$ von 79,6 μM gemessen. Mit Hilfe von Gleichung (6.7) bis Gleichung (6.4) konnten anschließend die Aggregationszahl N_{Agg} zu 44.690 bestimmt werden. Dieser Wert weicht um nur 3,8 % von dem über statische Lichtstreuung bestimmten Wert von 43.000 ab (Kapitel 6.1.1), wodurch die Richtigkeit der über statische Lichtstreuungen bestimmten Aggregationszahl bestätigt werden konnte. Die Werte zur Berechnung von N_{Agg} sind in Kapitel 13.1.6 zusammengefasst.

6.2.2 Verkapselungseffizienz

Die Verkapselungseffizienz $VE\%$ gibt den Anteil des verkapselten Volumens $V_{V,i}$ bezogen auf das Volumen der Polymersomendispersion (Probenvolumen) V_{∞} an. Die theoretisch mögliche Verkapselungseffizienz ist demnach wie folgt definiert:

$$VE \% = \frac{V_{V,i}}{V_{\infty}} \cdot 100 \% \quad (6.5)$$

VE	Verkapselungseffizienz	%
$V_{V,i}$	Summe des inneren Vesikelvolumens aller Vesikel	cm^3
V_{∞}	Probenvolumen	cm^3

Zur Berechnung des gesamten inneren Vesikelvolumens $V_{V,i}$ mit Gleichung (6.4) wurde zur Bestimmung der Anzahl an Vesikeln N_V in 1 mL der Dispersion die Aggregationszahl mit $N_{Agg} = 43.000$ (Kapitel 6.1.1) angenommen. Das Volumen eines Vesikels $V_{V,0}$ wurde analog zum Vorgehen zur experimentellen Bestimmung der Aggregationszahl (Kapitel 6.2.1) bestimmt. Unter der Annahme, dass zwischen Polymer und Calcein keine Interaktionen auftreten und die verkapselte Konzentration dieselbe wie außerhalb der Vesikel ist resultiert für eine 1 % w/v Polymersomendispersion $d_N = 111 \text{ nm}$ eine theoretische Verkapselungseffizienz von 0,55 %.

Aufgrund der Massenerhaltung entspricht die Masse an in den Vesikeln verkapseltem Calcein der Masse an Calcein nach Lyse der Polymersomen. Somit konnte die Verkapselungseffizienz VE experimentell auch durch die Quantifizierung der Calceinkonzentration nach Lyse der Vesikel $c_{\infty,C}$ bestimmt werden. Die Calceinkonzentration im Inneren der Vesikel $c_{V,i}$ wurde mit 15 mM angenommen, da es keine Hinweise auf eine nicht rein statistische Verkapselung der Moleküle gab.

$$VE \% = \frac{c_{\infty,C}}{c_{V,i}} \quad (6.6)$$

$c_{\infty,C}$	Calceinkonzentration in der Probe nach Vesikellyse	mol cm^{-3}
$c_{V,i}$	Verkapselte Calceinkonzentration	mol cm^{-3}

Die mit Gleichung (6.6) experimentell bestimmte Verkapselungseffizienz lag mit 0,54 % (circa 2650 Calceinmoleküle pro Polymersom) sehr nahe an der theoretisch möglichen Verkapselungseffizienz von 0,55 %. Bezieht man die experimentelle Verkapselungseffizienz auf die theoretische so ergibt sich eine Effizienz von 98,2 %. Man kann demnach davon ausgehen, dass die Calceinmoleküle den Vesikelbildungsprozess nicht stören und problemlos im Vesikelinneren eingeschlossen werden konnten.

Die Verkapselungseffizienz wurde ebenfalls für den Einschluss von $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ grün fluoreszierendem Protein bestimmt. Bei einem mittels dynamischer Lichtstreuung gemessenem anzahlbasierten Polymersomendurchmesser von $d_N = 128 \text{ nm}$ betrug die theoretische Verkapselungseffizienz $0,97 \%$. Experimentell wurde sie zu $1,02 \%$ bestimmt, was $2,3$ Molekülen pro Polymersom entspricht.

6.3 Diskussion

Unter den Membraneigenschaften ist insbesondere die Aggregationszahl N_{Agg} der Polymersomen für viele Anwendungsgebiete von großem Interesse. So kann beispielsweise die Anzahl an Polymersomen in einer Polymersomendispersion nur über diese Kenngröße bestimmt werden. Die Anzahl an Vesikeln N_V in der Dispersion entspricht dabei dem Quotienten aus der Anzahl aller Polymerketten N_P (zugänglich über die Masse des eingesetzten Polymers m_P , dessen molare Masse $M_{W,P}$ und der Avogadro-Konstante $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ über $N_P = \frac{m_P N_A}{M_{W,P}}$) und der Anzahl an Polymerketten, die ein einzelnes Vesikel bilden, was der Aggregationszahl N_{Agg} entspricht. So gilt:

$$N_V = \frac{N_P}{N_{Agg}} = \frac{\frac{m_P}{M_{W,P}} N_A}{N_{Agg}} \quad (6.7)$$

N_V	Anzahl Vesikel	-
N_P	Anzahl Polymerketten	-
N_{Agg}	Aggregationszahl	-
m_P	Masse Polymer	g
$M_{W,P}$	Molare Masse des Polymers	g mol^{-1}
N_A	Avogadro-Konstante	mol^{-1}

Die Aggregationszahl von Polymersomen aus PMOXA₂₂-PDMS₇₂-PMOXA₂₂ mit einem hydrodynamischen Radius R_H von 126 nm wurde zu einem Wert von 12.200 bestimmt (Nardin *et al.*, 2000a) und ist damit in etwa $3,5$ Mal niedriger als die der Polymersomen aus PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅ mit 43.000 .

Neben der Aggregationszahl ist auch die Kenntnis der Membranstärke der Polymersomen von Interesse. Sie ist im Allgemeinen abhängig von der Polydispersität und der Blocklänge des verwendeten Polymers (Soo und Eisenberg, 2004) und liegt im Bereich von 3 nm (Li *et al.*,

2009; Chen *et al.*, 2009) bis 40 nm (Chen *et al.*, 2009). Sie ist von enormer Wichtigkeit, da sie grundlegend für die mechanische Stabilität und die Membranpermeabilität ist. Häufig wird die Annahme getroffen, dass die Polymermembranen aus PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅ eine Stärke von circa 10 nm aufweisen (Meier *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2006), wohingegen sie bei den in dieser Arbeit hergestellten Polymersomen bei 14 nm lag. Die Polymermembran ist damit in etwa drei Mal dicker als die Membran von Liposomen, die meist mit einer Stärke von 3-5 nm angenommen wird (Le Meins *et al.*, 2011), was den Hauptgrund für die deutlich niedrigere Stabilität beziehungsweise erhöhte Permeabilität von Lipidvesikeln im Vergleich zu Polymervesikeln darstellt. Die Kenntnis der exakten Membranstärke s ist auch deshalb so wichtig, da sie das innerhalb der Vesikel für Verkapselungen zur Verfügung stehende wässrige Volumen stark beeinflusst. Zudem nimmt die Membranfluidität für Membranen aus Di- und Triblock-Copolymeren mit zunehmender Membrandicke ab (Itel *et al.*, 2014), was eine verminderte Membranpermeabilität zur Folge hat (Discher und Eisenberg, 2002).

Auch die Verkapselungseffizienz stellt in der Polymersomentechnologie eine Eigenschaft von größter Wichtigkeit dar. Sie ist ein Maß für den Anteil des durch die Polymermembran von der Umgebung getrennten Volumens, das letztendlich für Reaktionen zur Verfügung steht. Die Verkapselungseffizienz von mit Calcein beladenen Polymersomen zeigte sich in dieser Arbeit mit 0,54 % deutlich kleiner als jene von mit grün fluoreszierendem Protein beladenen Polymervesikeln mit einem Wert von circa 1 %. Für die Verkapselung von Calcein in Polymersomen aus Poly(isopren)-poly(ethylenoxid) (PI-PEO) die mit einem z-Mittel von 208 nm und einem PDI von 0,08 (nach mehrfacher Extrusion) den Calceinpolymersomen, welche in dieser Arbeit hergestellt wurden, ähneln, lag die ermittelte Verkapselungseffizienz von Calcein mit 0,6 % in einem sehr ähnlichen Bereich (Rank, 2007). Eine Steigerung der gesamten Verkapselungseffizienz wäre bei gleichbleibenden Polymersomeneigenschaften (Durchmesser, Aggregationszahl, Membranstärke) durch die Erhöhung der Vesikelkonzentration in der Polymersomendispersion möglich. So würde sich die Verkapselungseffizienz von mit Calcein beladenen Polymersomen bei einer 2 % w/v Dispersion gegenüber der untersuchten 1 % w/v Dispersion von 0,54 zu 1,08 % verdoppeln. Für die Verwendung von Polymersomen als Nanoreaktoren ist jedoch nicht nur der Anteil des eingeschlossenen Volumens, sondern vielmehr auch die Anzahl an verkapselten Molekülen von Interesse. Während von dem kleinen Farbstoffmolekül Calcein (0,6 kDa) im Schnitt über 2600 Moleküle je Vesikel verkapselt werden konnten, belief sich der Wert bei der Beladung mit grün fluoreszierendem Protein (29,1 kDa) auf circa 2 Moleküle pro Polymersom. Eine größere Anzahl an Molekülen im Vesikel wäre durch die Verkapselung einer Proteinlösung mit höherer Konzentration, was jedoch wie gezeigt den Vesikelbildungsprozess stören kann, denkbar.

7 Stabilität von Polymervesikeln

Im folgenden Kapitel werden Ergebnisse bezüglich der Lagerfähigkeit von Polymersomen gezeigt. Anschließend wird deren mechanische Stabilität sowie ihr Verhalten in Zweiphasensystemen betrachtet und diskutiert.

7.1 Lagerstabilität

Es wurde die Lagerstabilität von unbeladenen und beladenen Polymersomen untersucht. Bei der Untersuchung der unbeladenen Polymersomen wurde das Augenmerk auf die zeitliche Veränderung der Polymersomenqualität (z-Mittel und PDI) gerichtet. Die Beurteilung der Lagerstabilität von beladenen Polymersomen erfolgte primär durch die Betrachtung des Verlustes an vorab verkapseltem Calcein in Abhängigkeit von der Lagerdauer.

7.1.1 Unbeladene Polymervesikel

Um die Lagerstabilität von unbeladenen Polymersomen zu untersuchen, wurden Polymervesikel, welche über die Dispersionsmethode (Kapitel 5.1.1) und die Ethanolmethode (Kapitel 5.1.2) in PBS-Puffer hergestellt wurden, im Konzentrationsbereich von 0,001 % w/v bis 1 % w/v bei 4 °C und bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Die Polymersomendispersionen wiesen zu Beginn der Lagerung eine niedrige Polydispersität ($PDI < 0,2$) und ein z-Mittel von circa 200 nm auf. Tabelle 7-1 gibt einen Überblick über die identifizierte, mindestens mögliche Lagerdauer, innerhalb derer die Vesikel ohne Qualitätseinbußen (Abweichung von PDI und z-Mittel $< 5\%$ im Vergleich zum Ausgangswert) gelagert werden konnten.

Tabelle 7-1: Lagerstabilität von Polymervesikeln unterschiedlicher Konzentrationen bei 4 °C und Raumtemperatur (RT). Angabe der mindestens möglichen Lagerdauer. Abweichungen von z-Mittel und PDI im angegebenen Zeitraum $< 5\%$.

Konzentration, % w/v	Dispersionsmethode		Ethanolmethode	
	4 °C	RT	4 °C	RT
1	210 d	210 d	210 d	210 d
0,1	90 d	90 d	90 d	90 d
0,01	30 d	7 d	14 d	3 d
0,001	-	-	-	-

Polymervesikel, welche mit einer absoluten Polymerkonzentration von 1 % w/v direkt aus dem Reaktionsansatz vorlagen, konnten ungeachtet der untersuchten Lagertemperatur und der

Herstellungsmethode für mindestens 210 Tage ohne Qualitätsverlust gelagert werden. Bei zehnfach niedrigerer Konzentration waren diese immerhin noch mindestens 90 Tage lagerbar. Eine Auswirkung der Herstellungsmethode war erst bei niedrigeren Konzentrationen ab 0,01 % w/v zu erkennen. Hierbei waren Polymersomen, welche über die lösemittelfreie Methode hergestellt wurden, in etwa doppelt so lange lagerbar wie Polymersomen, die über die Ethanolmethode hergestellt wurden. Vermutlich hatten sich bei letztgenannten herstellungsbedingt geringe Mengen Ethanol in der Polymersomenmembran eingelagert, was die Erhöhung der Membranfluidität bedingte (Rank, 2007). Bei gleichzeitig niedriger Polymersomenkonzentration (0,01 % w/v) führte dies offensichtlich zur schnelleren Desintegration der Polymersomen. Bei dieser Konzentration, die sich nahe der kritischen Mizellbildungskonzentration von Polymersomen aus PMOXA₂₂-PDMS₇₂-PMOXA₇₂ mit einem Wert von 0,015 % w/v befindet (Nardin *et al.*, 2000a), trat ebenfalls die Auswirkung der Lagertemperatur in den Vordergrund. Hierbei waren Polymersomen bei 4 °C in etwa doppelt so lange lagerbar wie jene, die bei Raumtemperatur gelagert wurden. Bei einer Konzentration von 0,001 % w/v waren Polymersomen nicht mehr lagerbar, wie sich an dem erheblichen Anstieg von PDI und z-Mittel innerhalb von nur einem Tag herausstellte (Ergebnisse nicht dargestellt).

Weiterführende Untersuchungen zur Langzeit-Lagerstabilität erfolgten unter Betrachtung von unbeladenen Polymersomen, welche über den etablierten Polymersomenherstellungsprozess (Kapitel 5.1.2) in doppelt destilliertem Wasser hergestellt wurden. Es zeigte sich, dass die Polymersomendispersion (1 % w/v) mit einem anfänglichen z-Mittel von 200 nm und einem PDI von 0,18 mindestens ein Jahr sowohl bei 4 °C als auch bei Raumtemperatur gelagert werden konnte. Dabei nahm das z-Mittel, dargestellt in Abbildung 7.1 A innerhalb der ersten sechs Monate geringfügig ab und stabilisierte sich bei einem Wert von 185 nm. Die Abnahme des z-Mittels erfolgte bei Raumtemperatur etwas schneller als bei 4 °C. Die maximale Abweichung des z-Mittels bezogen auf den ursprünglichen Wert war mit 7,5 % dennoch verhältnismäßig gering. Der PDI, dargestellt in Abbildung 7.1 B, schwankte während der gesamten Lagerdauer mit einer mittleren Abweichung von 8 % um den Ausgangswert. Neben der Beurteilung der Lagerfähigkeit über die Parameter z-Mittel und PDI wurde der Fokus zudem auf das Auftreten möglicher Agglomerationseffekte der Polymersomen untereinander gerichtet. Eine unerwünschte Bildung von Polymeragglomeraten konnte jedoch innerhalb der gesamten Lagerdauer nicht verzeichnet werden. Dies ist mit dem über statische Lichtstreuung identifizierten zweiten Virialkoeffizienten $A_2 = 5,676 \cdot 10^{-10} \text{ mol dm}^3 \text{ g}^{-2}$ in Einklang, anhand dessen den Polymersomen ein nicht zu Agglomeration neigendes Verhalten unterstellt wurde (Kapitel 6.1.1). Demnach zeigte sich die Lagerstabilität von unbeladenen Polymersomen innerhalb des betrachteten Zeitraums nicht eingeschränkt.

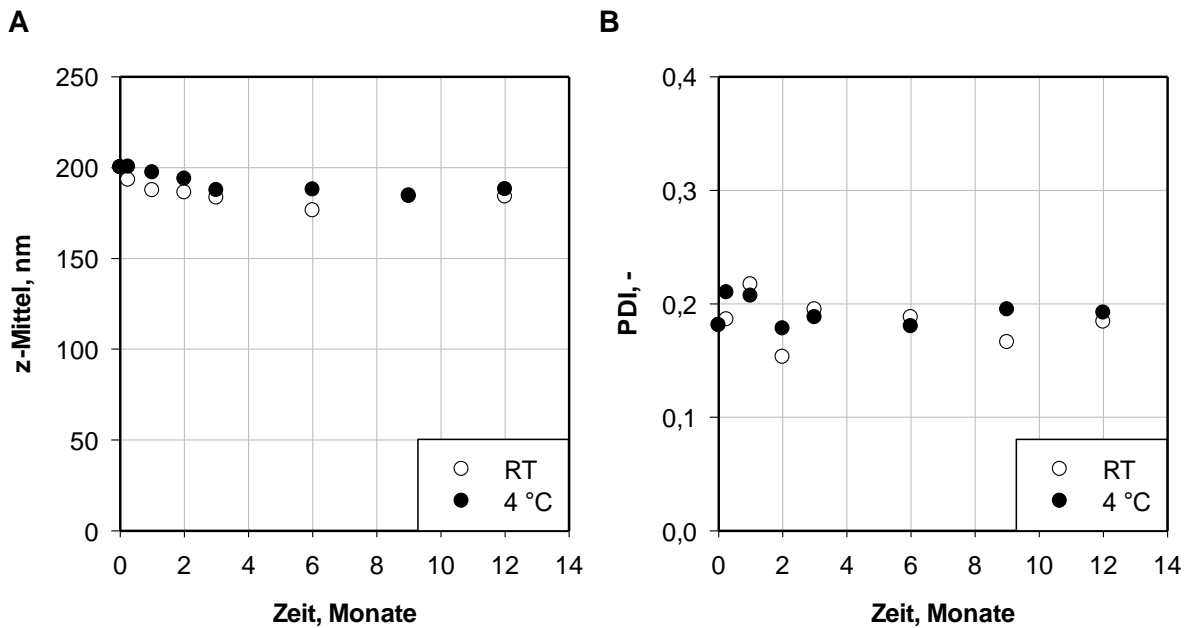


Abbildung 7.1: A) Verlauf des z-Mittels und B) des PDIs einer 1 % w/v Polymersomendispersion bei der Lagerung bei Raumtemperatur (RT) und bei 4 °C. N = 1.

7.1.2 Beladene Polymervesikel

Bei der Untersuchung der Lagerstabilität von beladenen Polymersomen ist besonders die Rückhalteeffizienz der verkapselten Moleküle von Interesse. Hierbei wurden Polymersomen, welche vorab mit 15 mM Calcein beladen und anschließend gereinigt wurden, bis zu zwei Monate bei Raumtemperatur und bei 4 °C gelagert. Der hierbei auftretende Verlust der Beladung ist in Abbildung 7.2 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Lagerungsfähigkeit mit Hinblick auf die Rückhalteeffizienz von Calcein signifikant von der Lagerungstemperatur abhing. Bei 4 °C lag der Verlust an verkapselten Calcein innerhalb von 14 Tagen bei nur 1,0 % und nahm bis zu 52 Tage nicht weiter zu. Dieser Wert war bei Polymersomen, welche bei Raumtemperatur gelagert wurden, bereits nach acht Tagen zu verzeichnen. Zudem trat hierbei bis zu einer Lagerungsdauer von 31 Tagen stetig weiter Calcein aus. Danach verlangsamte sich der Calceinverlust und erreichte nach knapp zwei Monaten einen Wert von 3,3 %. Diese Erkenntnisse machten deutlich, dass beladene Polymersomen für einen effizienten Rückhalt der verkapselten Moleküle bei niedrigen Temperaturen gelagert werden sollten. Ein Grund für den erhöhten Verlust der Beladung bei Raumtemperatur könnte die mit steigender Temperatur abnehmende Membranviskosität (Kapitel 6.1.3), sein. Die damit einhergehende erhöhte Membranfluidität führte offensichtlich zu höheren Verlusten an Calcein. Die Rückhalteeffizienz von größeren Molekülen, wie beispielsweise Enzymen, wurde nicht untersucht. Es ist jedoch naheliegend, dass größere Moleküle die Membran deutlich schlechter passieren können. Die Lagerstabilität von mit Enzymen beladenen Polymersomen hängt jedoch nicht nur von der

Rückhalteeffizienz, sondern insbesondere von der Lagerstabilität der verkapselten Enzyme ab.

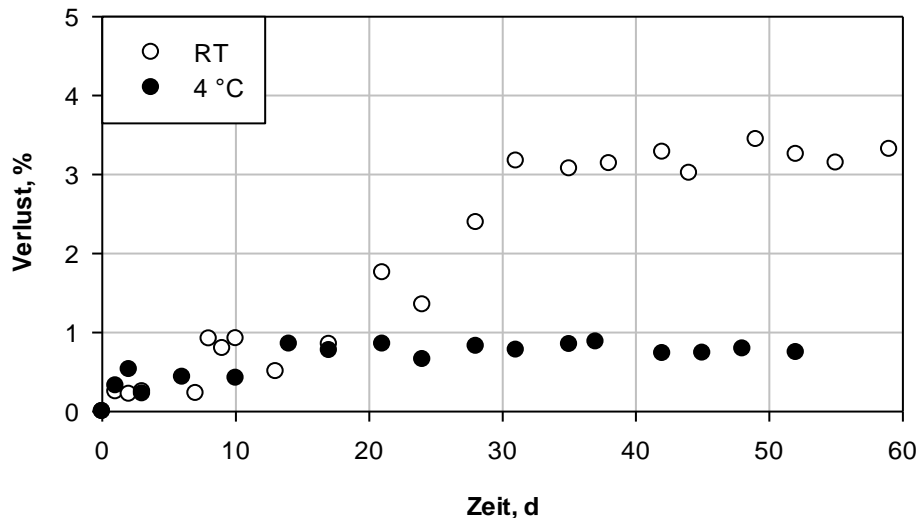


Abbildung 7.2: Zeitabhängiger Verlust an Calcein bei der knapp zweimonatigen Lagerung von mit 15 mM Calcein beladenen Polymersomen bei Raumtemperatur (RT) und bei 4°C.

7.2 Mechanische und thermische Stabilität

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Untersuchung der mechanischen und thermischen Stabilität von unbeladenen und beladenen Polymersomen. Die Beanspruchung der Membran durch Scherkräfte während des Polymersomenherstellungsprozesses wird ebenso diskutiert, wie die mechanische Beanspruchung durch Extrusion, welche bei konventionellen Polymersomenherstellungsprozessen häufig nach der Vesikelherstellung für die Verbesserung der Polymersomenqualität eingesetzt wird. Im Anschluss werden die Auswirkungen von postpräparativen, konstanten Scherraten ebenso wie die Folgen von in miniaturisierten Rührkesselreaktoren herrschenden Bedingungen untersucht.

7.2.1 Während des Herstellungsprozesses

Bereits bei der Etablierung des Polymersomenherstellungsprozesses (Kapitel 5.1) wurde sowohl bei der Herstellung über die Dispersionsmethode (Kapitel 5.1.1) als auch über die Ethanolmethode (Kapitel 5.1.2) deutlich, dass der Anteil an unerwünschten Polymeraggregaten im Reaktionsansatz ab einer bestimmten Prozessdauer stetig zunahm. Bei der Polymersomenherstellung über die Dispersionsmethode zeigte sich nach 8 h Prozessdauer eine stetige Zunahme an festem Polymer (Abbildung 5.5), wohingegen bei der

Polymersomenherstellung über die Ethanolmethode unerwünschte Polymeraggregate erstmals nach einer Prozessdauer von 4 h verzeichnet wurden (Kapitel 5.1.2). Verdeutlicht wird dies in Abbildung 7.3. Gegenübergestellt ist das visuelle Erscheinungsbild der Polymersomendispersion (Ethanolmethode) nach 1 h und nach 24 h Prozessdauer. Während sich die Dispersion zu Beginn des Prozesses mit einer typischen homogenen Trübung zeigte, bildeten sich im Verlauf des Prozesses zunehmend sedimentierende Polymeraggregate. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die scherkraftbedingte Zerstörung der Polymersomen ab einer bestimmten Prozessdauer vermutet.

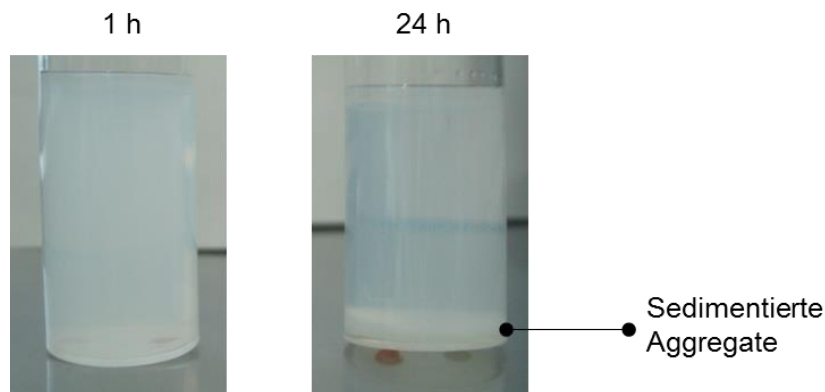


Abbildung 7.3: Polymersomendispersion während des etablierten Polymersomenherstellungsprozesses (Kapitel 5.1.2) nach 1 h und nach 24 h Prozesszeit.

Die während der Polymersomenherstellung durch den S-Rührer verursachten Scherkräfte führten bei Prozesszeiten über 4 h offensichtlich zur Zerstörung einiger Vesikel, was anhand entstehender, sedimentierender Polymeraggregate erkennbar war. Die durch die Vesikelruptur gebildeten Membranteile riefen folglich die Bildung der Polymeragglomerate hervor. Die Behauptung, dass der während des Prozesses zunehmende Anteil an unerwünschten Aggregaten auf die Zerstörung von Polymersomen zurückzuführen ist, wird durch Betrachtung der intensitätsbasierten Partikelgrößenverteilungen der Polymersomendispersionen aus Abbildung 7.3 gestützt. Die Partikelgrößenverteilung war nach einer Prozessdauer von 1 h deutlich breiter als nach 24 h, wie in Abbildung 7.4 dargestellt. Dabei erfolgte die Einschnürung der Verteilung primär von rechts, also von Seite der Polymersomen mit vergleichsweise großem Durchmesser. So lag die Vermutung nahe, dass größere Vesikel durch die im Reaktor herrschenden Scherkräfte zuerst zerstört werden. Die Zerstörung der größeren Polymersomen in der Dispersion führte hierbei zwar einerseits zur erwünschten Verschmälerung der Partikelgrößenverteilung, andererseits wurde hierdurch die Anzahl an funktionsfähigen Vesikeln herabgesetzt. Basierend auf diesem Erkenntnis wurde eine Prozesszeit von maximal 4 h bei der Polymersomenherstellung für sinnvoll erachtet (Kapitel 5.1.2).

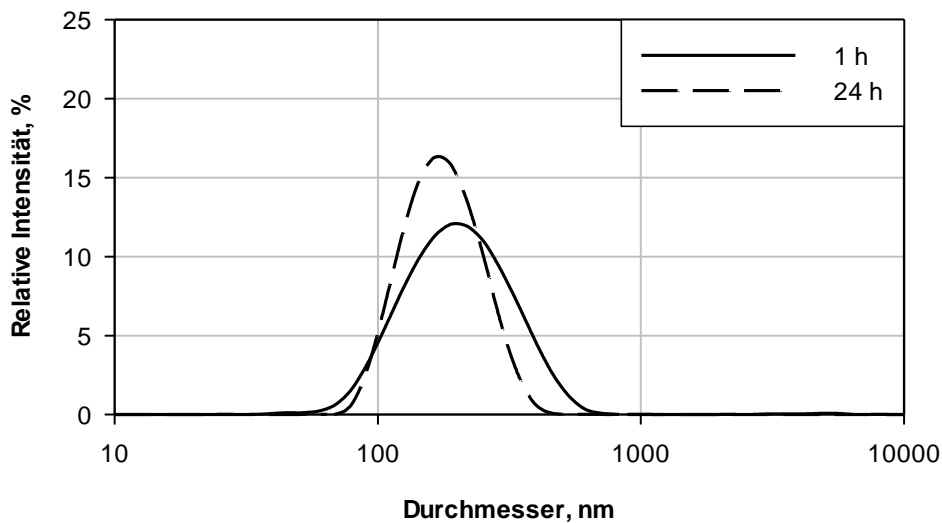


Abbildung 7.4: Intensitätsbasierte Partikelgrößenverteilung der Polymersomendispersion während des Herstellungsprozesses nach 1 h und nach 24 h.

7.2.2 Extrusion

Die Extrusion (Kapitel 3.1.3) ist eine häufig gewählte postpräparative Methode zur Verringerung der Polydispersität der Vesikeldispersion. Oftmals werden hierbei bis zu 21 Extrusions-Schritte durchgeführt und verschiedene Membranen mit abnehmenden Porendurchmessern verwendet (Rank *et al.*, 2009). Um die Auswirkungen der bei diesem Vorgehen wirkenden Scherkräfte auf Polymersomen, welche über den in dieser Arbeit etablierten Prozess (Kapitel 5.1.2) hergestellt wurden, zu untersuchen, wurde eine exemplarische mehrstufige Extrusion durch Polycarbonat-Membranen durchgeführt. Tabelle 7-2 zeigt die hierbei verzeichnete, stufenweise Verringerung von z -Mittel und PDI einer 1 % w/v Dispersion mit unbeladenen Polymersomen. Durchgeführt wurde eine viermalige Extrusion durch Membranen mit einem Porendurchmesser von 200 nm, gefolgt von einer viermaligen Extrusion durch Membranen mit 100 nm großen Poren. Innerhalb von vier Extrusions-Schritten durch Polycarbonatmembranen mit 200 nm großen Poren konnte der PDI von 0,22 auf 0,10 verringert werden. Die darauffolgende sukzessive Extrusion durch Membranen mit einem Porendurchmesser von 100 nm hingegen führte zu keiner weiteren, signifikanten Verbesserung der Polydispersität. Der PDI verringerte sich hierbei bis zu einem Wert von 0,09 nur marginal. Das z -Mittel hingegen nahm von ursprünglich 181 nm bis zu 122 nm kontinuierlich ab und schien einen konstanten Wert von circa 120 nm anzustreben. Die Polydispersität von unbeladenen Polymersomen konnte demnach erwartungsgemäß über Extrusion verringert werden.

Tabelle 7-2: z-Mittel und PDI einer Dispersion unbeladener Polymersomen nach viermaliger Extrusion durch eine Polycarbonat-Membran mit 200 nm Porengröße und darauffolgender viermaliger Extrusion durch eine Polycarbonat-Membran mit 100 nm Porengröße. N = 1.

Schritt	z-Mittel, nm	PDI, -
0	181	0,22
1	154	0,14
2	143	0,11
3	136	0,11
4	133	0,10
1	130	0,10
2	125	0,11
3	123	0,08
4	122	0,09

Die exemplarisch durchgeführte Extrusion von mit Calcein oder grün fluoreszierendem Protein beladenen Polymersomen jedoch zeigte, dass während der einmaligen Extrusion (200 nm Porendurchmesser) mehr als 50 % der Beladung verloren ging (Ergebnisse nicht dargestellt). Dies ist auf die bei diesem Vorgang wirkenden Scherkräfte zurückzuführen. Dabei wurde die Vesikelmembran in der Pore der Polycarbonat-Membran zerschert. Folglich öffnete sich das Polymersom, wodurch ein Teil der Beladung austrat. Die Extrusion von beladenen und gereinigten Polymersomen zur Verringerung der Polydispersität sollte demnach dringend vermieden werden. Um den Verlust der Beladung zu verhindern, wurde versuchsweise die Extrusion von ungereinigten und mit grün fluoreszierendem Protein beladenen Polymersomen durchgeführt. Hierbei lagen die beladenen Vesikel in der ursprünglichen Proteidlösung vor. Da sich die für die Extrusion aufzubringende Druckkraft im Vergleich zur gereinigten Polymersomendispersion stark erhöhte, stellte sich auch dieses Vorgehen als unzweckmäßig heraus. Die Herstellung von beladenen Polymersomen mit geringer Polydispersität in nur einem Prozessschritt (ohne konsekutive Extrusion) wie es über den in dieser Arbeit etablierten Prozess gezeigt werden konnte (Kapitel 6.2), scheint höchst erstrebenswert.

7.2.3 Konstante Scherraten

Um die Grenzen der mechanischen Belastbarkeit von Polymersomen unter definierten Bedingungen zu untersuchen, wurden unbeladene Polymersomen in einem Doppelspaltviskosimeter (Kapitel 4.5.2) mit konstanten Scherraten bis zu 8 h beansprucht. Zur Beurteilung der Polymersomenqualität nach der Belastung wurde neben den bekannten Größen z-Mittel und PDI zusätzlich die relative Zählrate (Gleichung (4.1)) herangezogen. Diese Größe bildet indirekt die Anzahl an intakten Partikeln ab. Eine Abnahme der Anzahl intakter Vesikel über die Dauer der mechanischen Belastung konnte somit durch die Abnahme der relativen Zählrate indiziert werden.

Um den Einfluss unterschiedlicher Scherraten ($194,7 \text{ s}^{-1}$ und 3430 s^{-1}) auf die Membranstabilität deutlicher erkennen zu können, wurden die Versuche bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Dies erfolgte basierend auf der Erkenntnis, dass die Membranfluidität mit steigender Temperatur zunimmt (Kapitel 6.1.3) und dem daraus resultierenden Verdacht, dass sich die Sensitivität der Polymersomen gegenüber Scherbeanspruchung bei erhöhten Temperaturen deutlicher zeigt. Abbildung 7.5 A beziehungsweise Abbildung 7.5 B zeigen den Verlauf von z-Mittel beziehungsweise PDI. Bei der Belastung der Polymersomen mit der höchsten untersuchten Scherrate von 3430 s^{-1} fiel das z-Mittel innerhalb von 8 h von 186 nm auf 144 nm. Dies ging mit der Abnahme des PDIs von 0,18 auf einen sehr niedrigen Wert von 0,04 einher. Die bereits getroffene Hypothese, dass größere Vesikel bei Belastungen durch Scherkräfte zuerst zerstört werden (Kapitel 7.2.1) wird hierdurch untermauert. Die relative Zählrate fiel hierbei von 1,0 auf 0,1 (Ergebnisse nicht dargestellt), was die Zerstörung eines großen Anteils der Vesikel indizierte. Bei der niedrigeren Scherrate von $194,7 \text{ s}^{-1}$ zeigten sich die Vesikel verhältnismäßig stabil. Sowohl z-Mittel als auch PDI sanken erst zwischen 4 h und 8 h Belastungsdauer von ursprünglichen 190 nm auf 181 nm beziehungsweise von 0,20 auf 0,16. Die Abnahme der relativen Zählrate von 1,0 auf 0,9 (Ergebnisse nicht dargestellt) ließ auf eine geringe Anzahl zerstörter Polymersomen schließen.

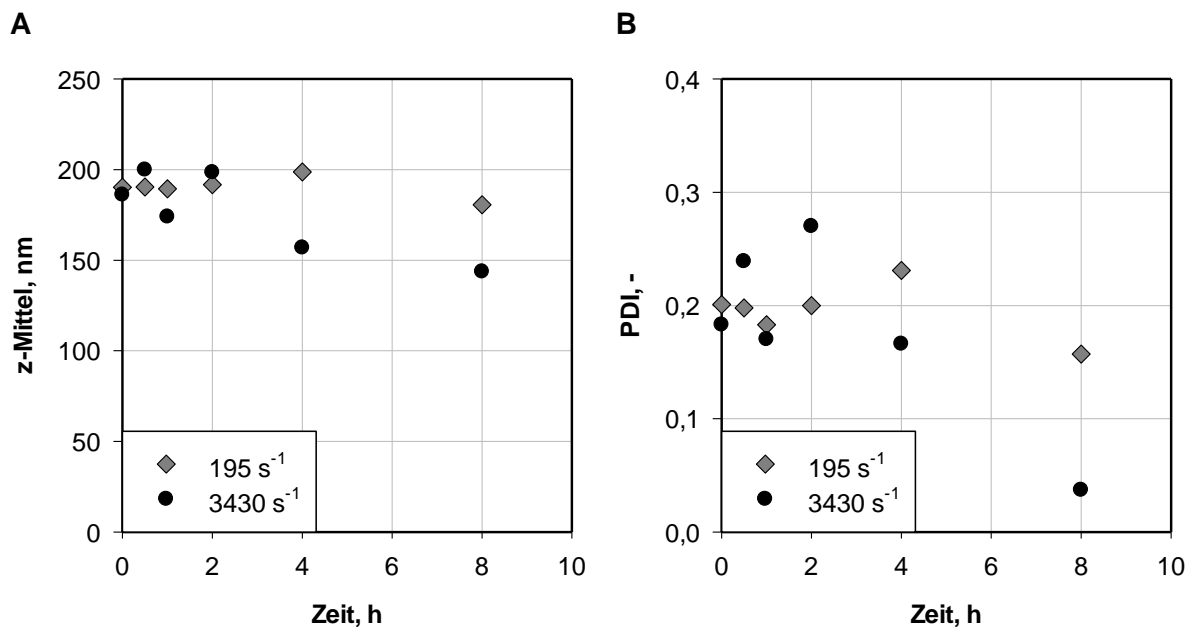


Abbildung 7.5: A) Zeitlicher Verlauf des A) z-Mittels und B) des PDIs bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ in Abhängigkeit von der Scherrate. $N = 1$.

Es schien zudem naheliegend, dass die Partikelzerstörung durch die vorherrschenden Scherraten nicht nur aufgrund von Reibungskräften zwischen Fluid und Vesikel, sondern auch

durch Kollisions- und Reibungseffekte von Vesikeln untereinander erfolgen kann. Um dies zu überprüfen wurde eine 0,5 % w/v und eine 1 % w/v Polymersomendispersion bei 30 °C und 3430 s⁻¹ belastet. Die relative Zählrate nahm bei der 0,5 % w/v Polymersomendispersion innerhalb von 8 h von 1,0 auf 0,6 geringfügiger ab, als jene der 1 % w/v Dispersion, wo eine Abnahme von 1,0 auf 0,4 zu verzeichnen war. Folglich wurde darauf geschlossen, dass eine geringere Anzahl an Polymersomen in der Dispersion zu geringerer Vesikelzerstörung führte. Dies kann anhand des niedrigeren, resultierenden Reibungseffektes der Vesikel untereinander erklärt werden. Allerdings führt eine niedrigere Polymersomenkonzentration auch zur unerwünschten Verringerung des zur Verfügung stehenden, verkapselbaren Reaktionsvolumens. Um detailliertere Aussagen bezüglich der Polymersomenstabilität treffen zu können, erfolgten weitere Untersuchungen unter Prozessbedingungen in miniaturisierten Rührkesselreaktoren.

7.2.4 Unter Prozessbedingungen in miniaturisierten Rührkesselreaktoren

Der Rührkesselreaktor ist der am häufigsten verwendete Reaktortyp in der biotechnologischen Industrie. So war es von zentralem Interesse die Folgen von rührerinduzierten Scherkräften bei unterschiedlichen Temperaturen zu untersuchen. Untersucht wurden die Folgen der Scherkräfte bei Verwendung des S-Rührers in unbewehrten Reaktoren. In einem Zeitraum von bis zu 48 h wurden die Änderungen der Vesikelqualität (z-Mittel, PDI) und der Vesikelquantität von unbeladenen und beladenen Polymersomen untersucht. Die Abnahme der Anzahl intakter Vesikel in der Polymersomendispersion wurde über die relative Extinktion (Gleichung (4.2)) abgeschätzt. Diese Größe liefert dieselbe Aussage wie die relative Zählrate, bietet aber durch die Messung in Mikrotiterplatten den Vorteil von Parallel-Messungen. Die Untersuchungen der Vesikelstabilität von beladenen Polymersomen erfolgten insbesondere mit Fokus auf die Rückhaltung der verkapselten Moleküle.

Unbeladene Polymersomen

Einfluss der Rührerdrehzahl. Die mechanische Stabilität von unbeladenen Polymersomen im Strömungsfeld von Rührkesselreaktoren erfolgte über die Erzeugung von Rührerdrehzahlen im Bereich von 1000 min⁻¹ bis 4000 min⁻¹. Abbildung 7.6 A und Abbildung 7.6 B zeigen die daraus resultierenden Verläufe von z-Mittel und PDI. Bei einer Rührerdrehzahl von 1000 min⁻¹ blieben sowohl das z-Mittel als auch der PDI und damit auch die Vesikelqualität stabil. Das z-Mittel betrug zu Beginn der Belastung 177 nm und verringerte sich innerhalb von 48 h nur marginal auf einen Wert von 173 nm. Der PDI der Polymersomendispersion wies mit einem Wert von 0,18 nach der 48-stündigen Belastung denselben Wert auf wie die unbelastete Probe. Zudem konnte bei einer Rührerdrehzahl von

1000 min^{-1} davon ausgegangen werden, dass kein Verlust an Vesikel innerhalb des betrachteten Zeitraums auftrat, was an Hand der relativen Extinktion, Abbildung 7.6 C, mit einem annähernd konstanten Wert von 1 zu erkennen ist.

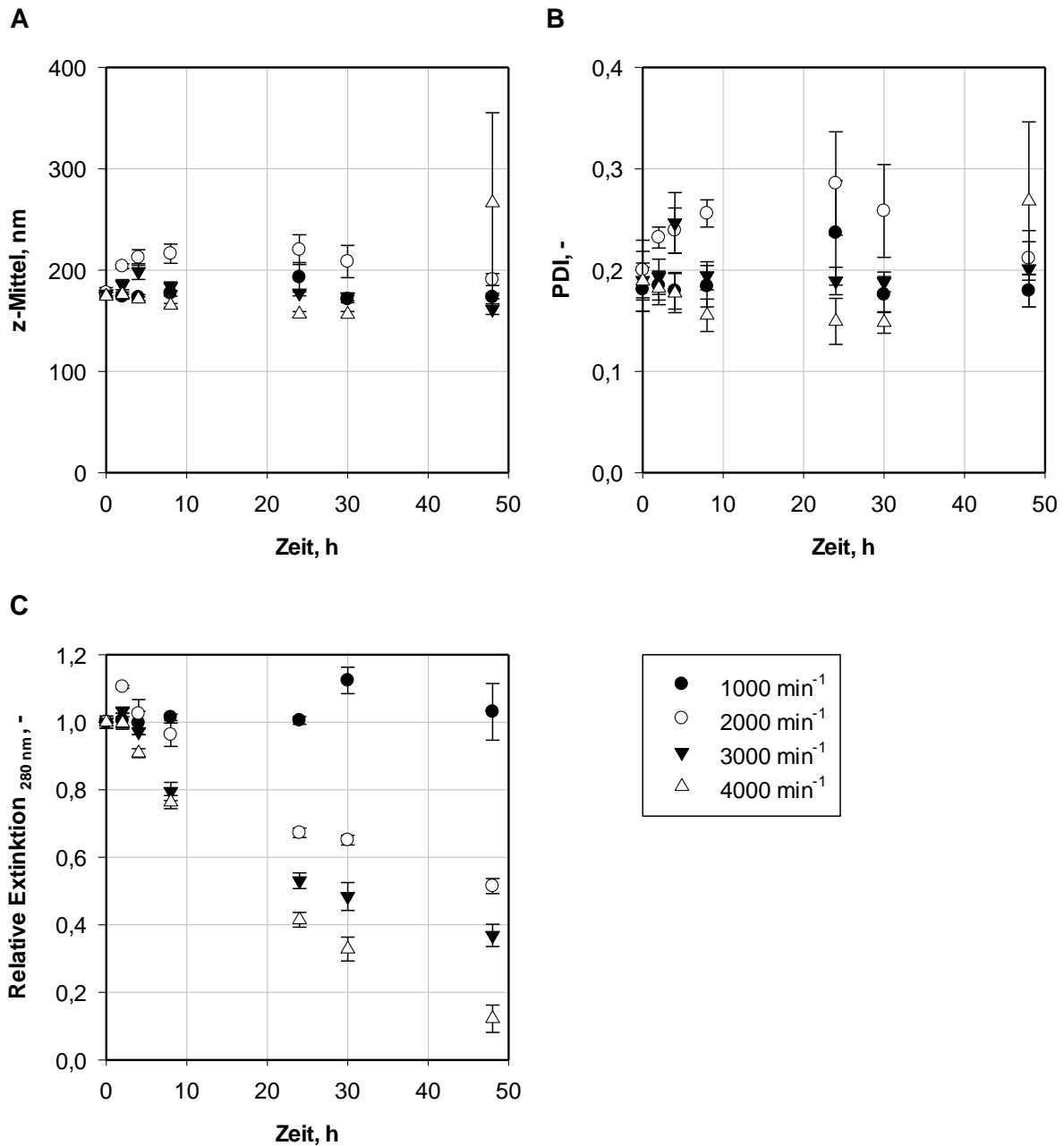


Abbildung 7.6: Zeitlicher Verlauf von A) z-Mittel B) und C) relativer Extinktion einer 1 % w/v Polymersomendispersion bei 25 °C in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl des S-Rührers im unbewehrten Rührkesselreaktor. N = 3.

Bei höheren Rührerdrehzahlen zwischen 2000-4000 min^{-1} nahm die relative Extinktion mit der Zeit deutlich ab. Dies erfolgte umso schneller, je höher die realisierte Rührerdrehzahl war, was für schnellere Vesikelzerstörung bei erhöhter Rührerdrehzahl sprach. Der Grund für die initiale Zunahme des z-Mittels (Abbildung 7.6 A) und des PDIs (Abbildung 7.6 B) bei 2000 min^{-1} blieb in diesem Kontext ungeklärt. Die gleichzeitig verzeichnete Abnahme von z-Mittel und PDI bei 3000 min^{-1} und 4000 min^{-1} hingegen kann mit der Scherkraft induzierten Zerstörung größerer Vesikel und der daraus resultierenden Verschmälerung der Partikelgrößenverteilung (Ergebnisse nicht dargestellt) erklärt werden. Bei 4000 min^{-1} nahm das z-Mittel innerhalb von 30 h von 174 nm bis 156 nm und der PDI von 0,19 bis 0,15 ab. Zwischen 30 h und 48 h hingegen war ein rapider Anstieg des z-Mittels auf 266 nm bei gleichzeitigem Anstieg des PDIs auf 0,27 zu verzeichnen. Dies ließ auf sehr ausgeprägte Zerstörung der Polymersomen innerhalb dieser verhältnismäßig langen Prozessdauer schließen.

Einfluss der Temperatur. Die universelle Verwendbarkeit von Polymersomen als Enzymmembranreaktoren setzt deren Einsetzbarkeit in einem möglichst großen Temperaturbereich voraus. Untersuchungen zur Stabilität von Polymersomen gegenüber konstanten Scherraten (Kapitel 7.2.3) zeigten jedoch, dass sich erhöhte Temperaturen bei gleichzeitig hohen Scherraten (3430 s^{-1}) negativ auf die Polymersomenstabilität auswirkten. Da in miniaturisierten Rührkesselreaktoren unter Verwendung des S-Rührers bei moderater Scherbelastung durch eine Rührerdrehzahl von 1000 min^{-1} keine Zerstörung der Polymersomen zu verzeichnen war (Abbildung 7.6), wurde der Einfluss der Temperatur im Bereich von 8 °C bis 60 °C auf die Stabilität unbeladener Polymersomen bei dieser Rührerdrehzahl vertiefend untersucht. In Abbildung 7.7 A-C sind die zeitlichen Verläufe von z-Mittel, PDI und relativer Extinktion dargestellt. Da sich im betrachteten Zeitraum von bis zu 48 h weder z-Mittel, noch PDI oder relative Extinktion signifikant änderten, kann davon ausgegangen werden, dass unbeladene Polymersomen bei den untersuchten moderaten Scherraten, welche vom S-Rührer im unbewehrten Reaktor bei 1000 min^{-1} induziert werden, bei Temperaturen von 8 °C bis 60 °C stabil sind.

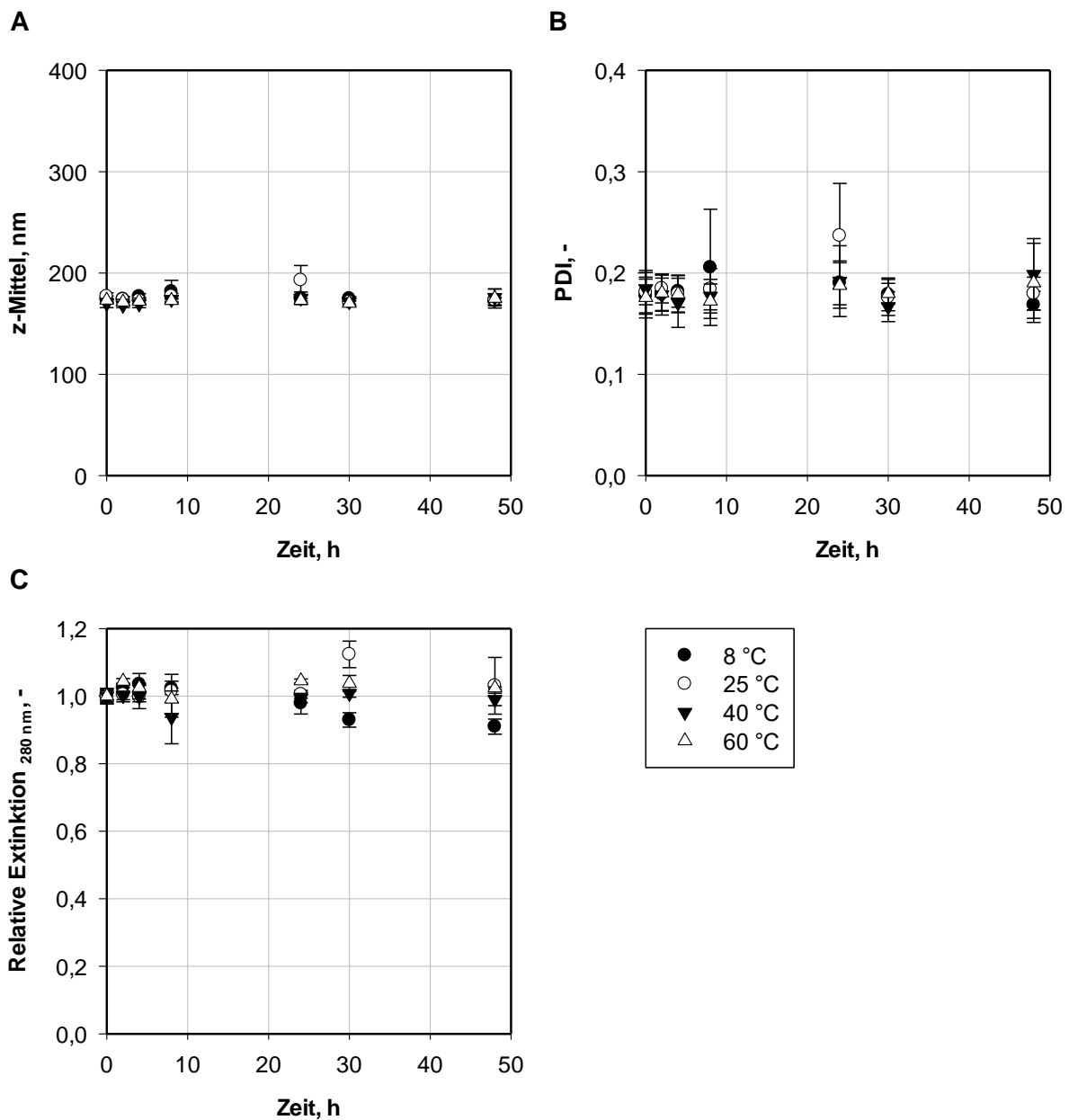


Abbildung 7.7: Zeitlicher Verlauf von A) z-Mittel B) und C) relativer Extinktion einer 1 % w/v Polymersomendispersion bei Verwendung des S-Rührers im unbewehrten Rührkesselreaktor bei 1000 min⁻¹ in Abhängigkeit von der Prozesstemperatur. N = 3.

Beladene Polymersomen

Die Untersuchung der mechanischen und thermischen Stabilität unbeladener Polymersomen zeigte, dass eine Belastung bei Temperaturen von 8 °C bis 60 °C und bei Verwendung des S-Rührers in unbewehrten Reaktoren bei einer Rührerdrehzahl von 1000 min⁻¹ keinen signifikanten Verlust der Vesikelqualität oder der Vesikelquantität nach sich zog. Um Polymersomen effizient als Enzymmembranreaktor einsetzen zu können, muss jedoch auch die möglichst vollständige Rückhaltung der vorab verkapselten Beladung gewährleistet

werden können. Aus diesem Grund wurde die Rückhaltung des verkapselten Farbstoffs Calcein und des Enzyms *N*-Acetylneuraminatlyase bei variierender Rührerdrehzahl und bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht.

Einfluss der Rührerdrehzahl. Die mit Calcein beladenen Polymersomen wurden bei Rührerdrehzahlen von 100 min^{-1} bis 1000 min^{-1} bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zu 48 h belastet. Innerhalb dieses Zeitraums und bei dieser Temperatur spielen passive Diffusionsvorgänge von Calcein über die Vesikelmembran keine Rolle (Kapitel 7.1.2), so dass davon auszugehen war, dass sämtliche verzeichneten Verluste ausschließlich auf die mechanische Beanspruchung der Polymersomen zurückzuführen sind. Unabhängig von der Rührerdrehzahl nahmen die Werte von z -Mittel und PDI innerhalb des betrachteten Zeitraums nur marginal mit Abweichungen im Bereich von $< 5 \%$ ab (Ergebnisse nicht dargestellt). Dies legte nahe, dass die mit Calcein beladenen Polymersomen bei diesem Belastungsgrad, ebenso wie unbeladene Polymersomen, stabil blieben. Folglich wurde der Fokus auf den Verlust der Beladung, dargestellt in Abbildung 7.8 A, gerichtet.

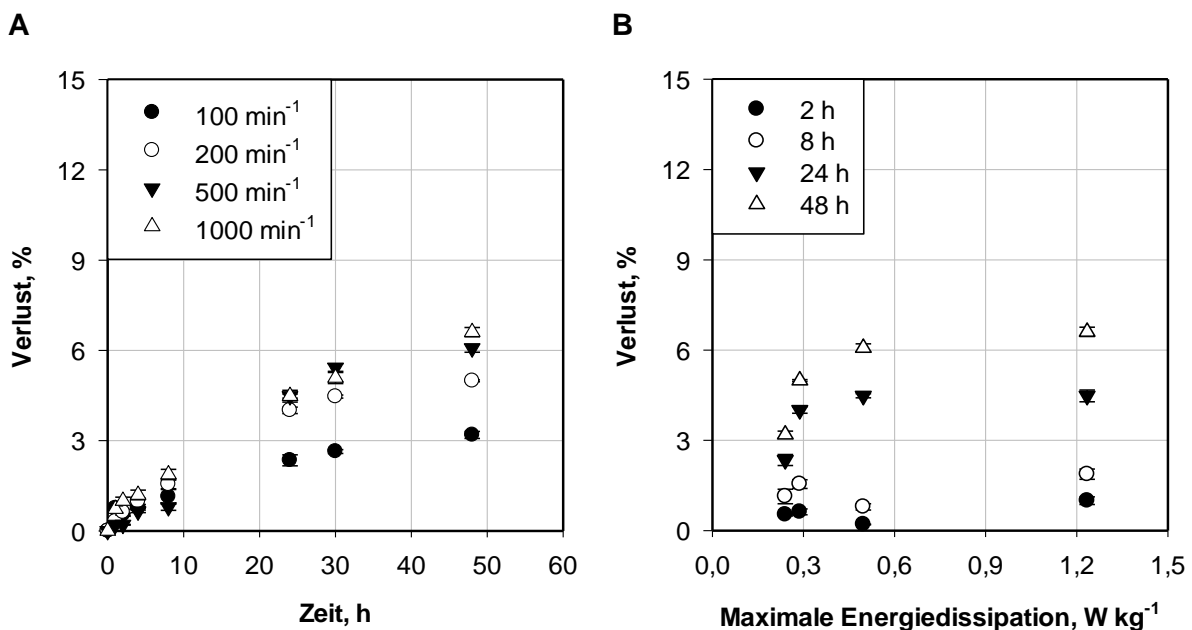


Abbildung 7.8: A) Verlust an Calcein im zeitlichen Verlauf bei Rührerdrehzahlen von 100-1000 min^{-1} und B) bei konstanter Prozesszeit in Abhängigkeit von der maximalen Energiedissipation bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$. $N = 3$.

Anhand von Abbildung 7.8 A wird deutlich, dass selbst bei der niedrigsten untersuchten Rührerdrehzahl von 100 min^{-1} von Beginn an kontinuierlich Calcein austrat. Bei höheren Rührerdrehzahlen wurde generell ein höherer Verlust an Beladung verzeichnet. Dabei lag der Calceinverlust nach 48 h zwischen 3,2 % bei 100 min^{-1} und 6,6 % bei 1000 min^{-1} . Möglich wäre

das Auftreten von scherinduzierten lokalen Defekten in der Polymersomenmembran, welche zur kontinuierlichen Freisetzung von Calcein führten, ohne die Zerstörung der Vesikel hervorzurufen. Die erhöhte Calceinfreisetzung bei höheren Rührerdrehzahlen spräche hierbei für häufigeres oder ausgeprägteres Auftreten dieser Defekte bei größerer Scherbeanspruchung.

Die Scherbeanspruchung in Rührkesselreaktoren ist nicht konstant. Vor allem in der Nähe des Rührers treten große lokale Kräfte auf, die mit zunehmender Entfernung vom Rührer abnehmen (Kraume, 2003). Ein wichtiger verfahrenstechnischer Parameter zur Charakterisierung der hydrodynamischen Partikelbeanspruchung ist die maximale lokale Energiedissipation ε_{max} (Kapitel 3.4.3). Für deren Bestimmung steht bei Verwendung des S-Rührers bei moderaten Rührerdrehzahlen bis zu 2100 min^{-1} in unbewehrten Reaktoren eine empirisch bestimmte Gleichung zur Verfügung (Riedlberger, 2012):

$$\varepsilon_{max} = \exp\left(\frac{n - 884,3 \text{ min}^{-1}}{550,3 \text{ min}^{-1}}\right) \quad (7.1)$$

ε_{max}	Maximale Energiedissipation	W kg^{-1}
n	Rührerdrehzahl	min^{-1}

In Abbildung 7.8 B ist der prozentuale Verlust an Calcein bei konstanten Prozesszeiten in Abhängigkeit von der im Reaktor herrschenden maximalen Energiedissipation, welche über Gleichung (7.1) bestimmt wurde, dargestellt. Bei einer Belastungsdauer von bis zu 8 h schien der Calceinverlust nur geringfügig von der maximalen Energiedissipation abhängig zu sein. Ab einer Belastungsdauer von 24 h jedoch zeigte sich der Einfluss dieser Größe. Dabei stieg der Verlust an Calcein mit zunehmender maximaler Energiedissipation im Bereich von $0,24 \text{ W g}^{-1}$ (100 min^{-1}) bis $0,50 \text{ W kg}^{-1}$ (500 min^{-1}) von 2,3 % auf 4,5 % (24 h) beziehungsweise von 3,2 % auf 6,1 % (48 h) deutlich an. Bei einer weiteren Erhöhung der Scherbeanspruchung bis zu einer maximalen Energiedissipation von $1,23 \text{ W kg}^{-1}$ (1000 min^{-1}) blieb der Calceinverlust hingegen nahezu konstant. Demnach empfiehlt sich insbesondere bei notwendigen längeren Prozesszeiten die Wahl möglichst niedriger Rührerdrehzahlen.

Einfluss der Temperatur. Da verschiedene biokatalytische Prozesse ihre optimale Effizienz bei verschiedenen Temperaturen erreichen, wurde neben der mechanischen Belastbarkeit von beladenen Polymervesikeln auch deren thermische Stabilität untersucht. Die Belastung erfolgte bei einer Rührerdrehzahl von 200 min^{-1} bei $8 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Abbildung 7.9 A zeigt die hieraus resultierenden Verluste der Beladung.

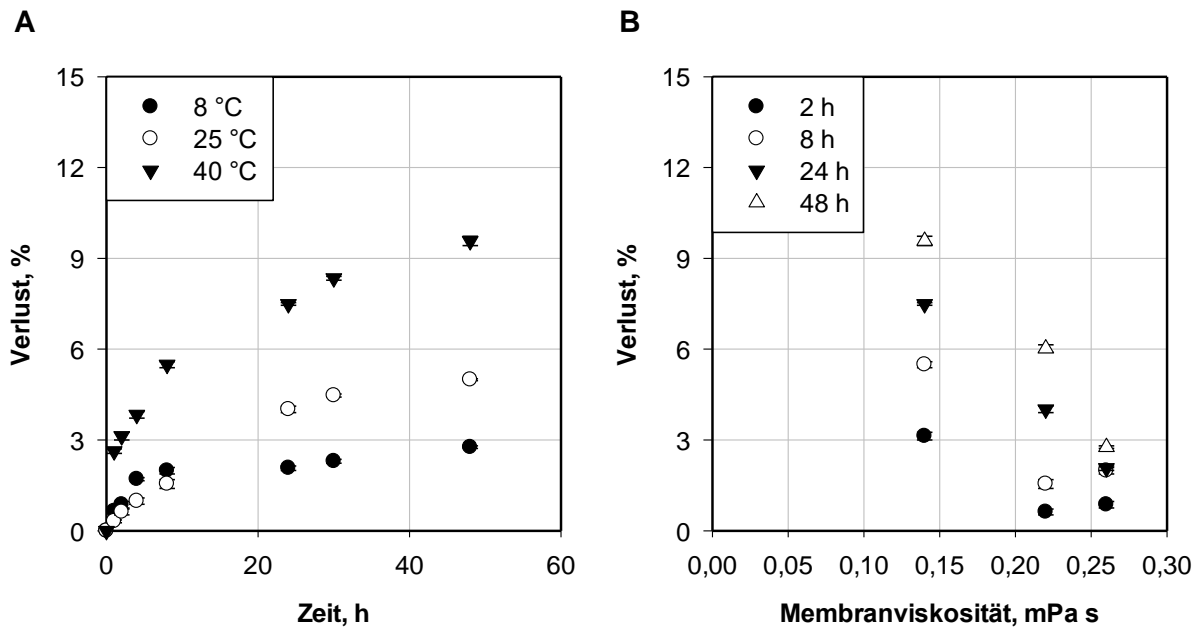


Abbildung 7.9: A) Verlust an Calcein im zeitlichen Verlauf bei Temperaturen von 8-40 °C und bei B) konstanter Prozesszeit in Abhängigkeit von der Membranviskosität bei einer konstanten Rührerdrehzahl von 200 min⁻¹. N = 3.

In Abbildung 7.9 A wird deutlich, dass die Temperatur einen großen Einfluss auf die Rückhalteeffizienz der Calceinmoleküle zeigte. Dabei war ein zunehmender Verlust der Beladung mit zunehmender Temperatur zu verzeichnen. So lag nach 48 h der Calceinverlust bei 8 °C mit 2,8 % unter jenem bei 25 °C (5,0 %), welcher wiederum niedriger war als jener bei 40 °C (9,6 %). Bei der höchsten untersuchten Temperatur von 40 °C war zudem bereits innerhalb der ersten Stunde ein verhältnismäßig hoher Calceinverlust von 2,6 % zu verzeichnen. Hierbei war ein direkter Zusammenhang der temperaturabhängigen Rückhalteeffizienz mit der in dieser Arbeit gezeigten temperaturabhängigen Membranviskosität (Kapitel 6.1.3) naheliegend. Der hohe Beladungsverlust bei 40 °C kann mit der hierbei vorliegenden niedrigen Membranviskosität und einhergehender erhöhter Membranfluidität, welche die erleichterte Freisetzung der Calceinmoleküle bedingt, erklärt werden. In Abbildung 7.9 B ist daher der Calceinverlust in Abhängigkeit von der Membranviskosität dargestellt. Dabei konnte bis zu 8 h Prozessdauer keine eindeutige Abhängigkeit des Calceinverlustes von der Membranviskosität verzeichnet werden. Bei Prozesszeiten von 24 h bis 48 h hingegen zeichnete sich eine lineare Abnahme des Calceinverlustes mit zunehmender Membranviskosität ab. Bemerkenswert war, dass selbst bei der maximalen Belastungsdauer von 48 h bei keiner der untersuchten Temperaturen Vesikelzerstörung nachgewiesen werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt). Der dennoch teilweise hohe Verlust der Beladung machte ersichtlich, dass die temperaturabhängigen

Membraneigenschaften einen deutlichen Einfluss auf die Rückhalteeffizienz von verkapselten Molekülen bedingen. Demnach müssen für eine effiziente Molekülrückhaltung nicht nur die Stabilität der Vesikel als abgegrenzte Einheit, sondern zwingend auch die Eigenschaften der Membran selbst berücksichtigt werden.

Rückhaltung von *N*-Acetylneuraminatlyase. Da erwartet wurde, dass kleine Moleküle wie Calcein die Membran generell leichter passieren können als deutlich größere Moleküle, wurde beispielhaft die Rückhalteeffizienz von mit *N*-Acetylneuraminatlyase (4x34,8 kDa) beladenen Polymersomen in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl und der Temperatur untersucht. In Abbildung 7.10 A sind die verzeichneten Verluste der Beladung bei einer Rührerdrehzahl von 200 min⁻¹ und 500 min⁻¹ bei 25°C gegenübergestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass erhöhte Scherkräfte auch bei mit *N*-Acetylneuraminatlyase beladenen Polymersomen zu erhöhten Verlusten führten. So war der Verlust bei einer Rührerdrehzahl von 500 min⁻¹ nach 48 h mit 1,9 % mehr als doppelt so hoch als bei 200 min⁻¹. Hier lag ein Verlust von 0,9 % vor. Auch der negative Einfluss erhöhter Temperaturen, welcher bereits bei mit Calcein beladenen Polymersomen verzeichnet wurde, zeichnete sich deutlich ab, wie in Abbildung 7.10 B dargestellt. Bei einer Rührerdrehzahl von 200 min⁻¹ ging bei 40 °C mit einem Verlust von 2,0 % innerhalb von 48 h circa zwei Mal so viel der Beladung verloren als bei 25 °C mit 0,9 %.

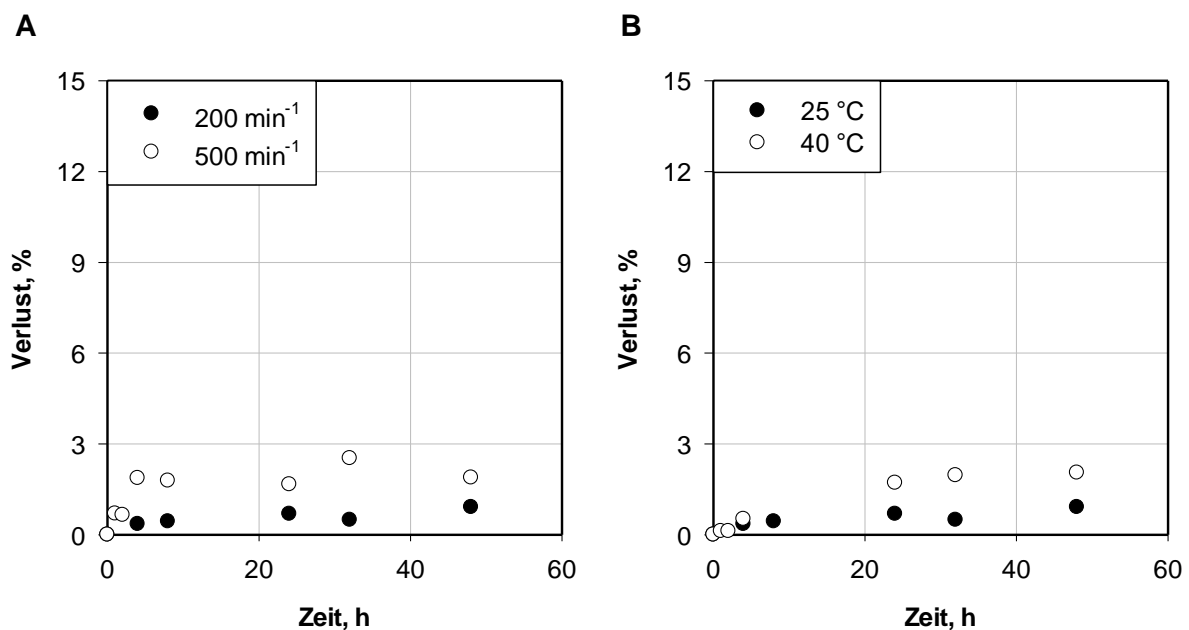


Abbildung 7.10: Verlust an *N*-Acetylneuraminatlyase im zeitlichen Verlauf A) in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl bei 25 °C und B) in Abhängigkeit von der Temperatur bei einer Rührerdrehzahl von 200 min⁻¹. N = 1.

Es konnte gezeigt werden, dass sich erhöhte Scherraten und erhöhte Temperaturen sowohl auf die Rückhalteeffizienz von Calcein als auch *N*-Acetylneuraminatlyase negativ auswirkten. Insgesamt jedoch blieb der Verlust des Enzyms deutlich hinter jenem von Calcein zurück. So trat bei 40 °C und 200 min⁻¹ nach 48 h fast fünf Mal weniger *N*-Acetylneuraminatlyase (2 %) als Calcein (9,6 %) aus. Generell wurde umso weniger Beladung freigesetzt, je kürzer die Prozesszeit, je niedriger die Temperatur und je geringer die Rührerdrehzahlen waren.

7.3 Stabilität in Zweiphasensystemen

Die oftmals schlechte Wasserlöslichkeit von Edukten und Produkten stellt eine große Herausforderung bei vielen biokatalytischen Prozessen dar. Daher werden Biotransformationen häufig in Zweiphasensystemen durchgeführt. Die wässrige Phase, welche den Biokatalysator enthält, wird hierbei mit organischen Lösemitteln mit gelöstem Edukt in Kontakt gebracht. Auf diese Weise gelangt das Edukt zum Biokatalysator und das gebildete Produkt in die organische Phase. Als Alternative für gewöhnliche Lösemittel kann auch mit Hilfe von nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten ein Zweiphasensystem gebildet werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Zellmembran von Mikroorganismen durch einige ionische Flüssigkeiten weniger stark beeinträchtigt wird als durch herkömmliche Lösemittel (Pfruender *et al.*, 2004). Daher wurde das Verhalten von Polymersomen in Zweiphasensystemen mit organischen Lösemitteln und mit ionischen Flüssigkeiten untersucht. Hierfür wurde die wässrige Polymersomendispersion mit der zweiten Phase im geschüttelten oder gerührten Reaktionssystem inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte anschließend durch Zentrifugation.

7.3.1 Einfluss des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten

Unbeladene Polymersomen

Um eine grundlegende Abschätzung der Stabilität von unbeladenen Polymersomen gegenüber organischer Lösemittel zu ermöglichen wurden unterschiedliche Zweiphasensysteme betrachtet. Hierfür wurde die Verwendbarkeit von 23 Lösemitteln aus unterschiedlichen Lösemittelklassen (Alkohole, Ester, Ether, Ketone, aromatische, halogenierte und cyclische Kohlenwasserstoffe sowie Alkane) im Mikroliter-Maßstab validiert. Der Fokus lag hierbei im Besonderen auf den Folgen des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P$) (siehe Tabelle 13-19 bis Tabelle 13-22).

Selektion geeigneter Lösemittel. Um bei der Selektion potentiell geeigneter Lösemittel den Effekt der organischen Phase, jedoch nicht die Auswirkungen der mechanischen Belastung zu

identifizieren, wurden die zwei Phasen durch sehr langsames Schütteln bei einer Frequenz von 3 s^{-1} für nur 3 min in Kontakt gebracht. Die ursprüngliche Polymersomendispersion wies ein z-Mittel von 160 nm und einen PDI von 0,15 auf. In Abbildung 7.11 A sind die z-Mittel nach Kontakt mit 10 % v/v der jeweiligen organischen Phase in Abhängigkeit des $\log P$ und der unterschiedlichen Lösemittelklassen dargestellt. Die horizontale Linie symbolisiert das z-Mittel der ursprünglichen, unbelasteten Polymersomendispersion. Mit abnehmendem $\log P$, also mit zunehmender Hydrophilie des Lösemittels, nahm das z-Mittel ab. Am deutlichsten war dies bei Verwendung von 2-Butanol mit $\log P = 0,65$ erkennbar. Hier ließ das resultierende sehr niedrige z-Mittel von 27 nm vermuten, dass die Polymersomen zu Mizellen transformiert wurden. Die Gruppe der Alkane mit $\log P > 3$ zeigte hingegen kaum Auswirkung auf das resultierende z-Mittel. Auch bei Betrachtung der Polydispersität (PDI) der Polymersomendispersion nach Kontakt mit der organischen Phase, dargestellt in Abbildung 7.11 B, wird deutlich, dass Alkane kaum Einfluss auf die Breite der Partikelgrößenverteilung nahmen. Die PDIs entsprachen hierbei annähernd dem Wert der ursprünglichen Vesikeldispersion (Referenz) mit $\text{PDI} = 0,15$. Auch bei Betrachtung der Polydispersität wurde deutlich, dass niedrige Werte des $\log P$ zu verstärkter Schädigung der Polymersomen führten. So führte der Kontakt mit Lösemitteln mit $\log P < 3$ unabhängig von der Lösemittelklasse in fast allen Fällen zu deutlichen Abweichungen von der ursprünglichen Polydispersität. Dabei erhöhte sich diese in den meisten Fällen signifikant bis hin zu $\text{PDI} = 0,31$ bei Verwendung von 1-Butanol. Um die Vesikelquantität der Polymersomen vor und nach Kontakt mit den tendenziell wenig schädigenden Alkanen abschätzen zu können, wurde zudem die relative Zählrate (Gleichung (4.1)) herangezogen. Diese betrug unabhängig vom verwendeten Alkan stets nahezu 1,0, was für einen fast vollständigen Polymersomenerhalt sprach (Ergebnisse nicht dargestellt).

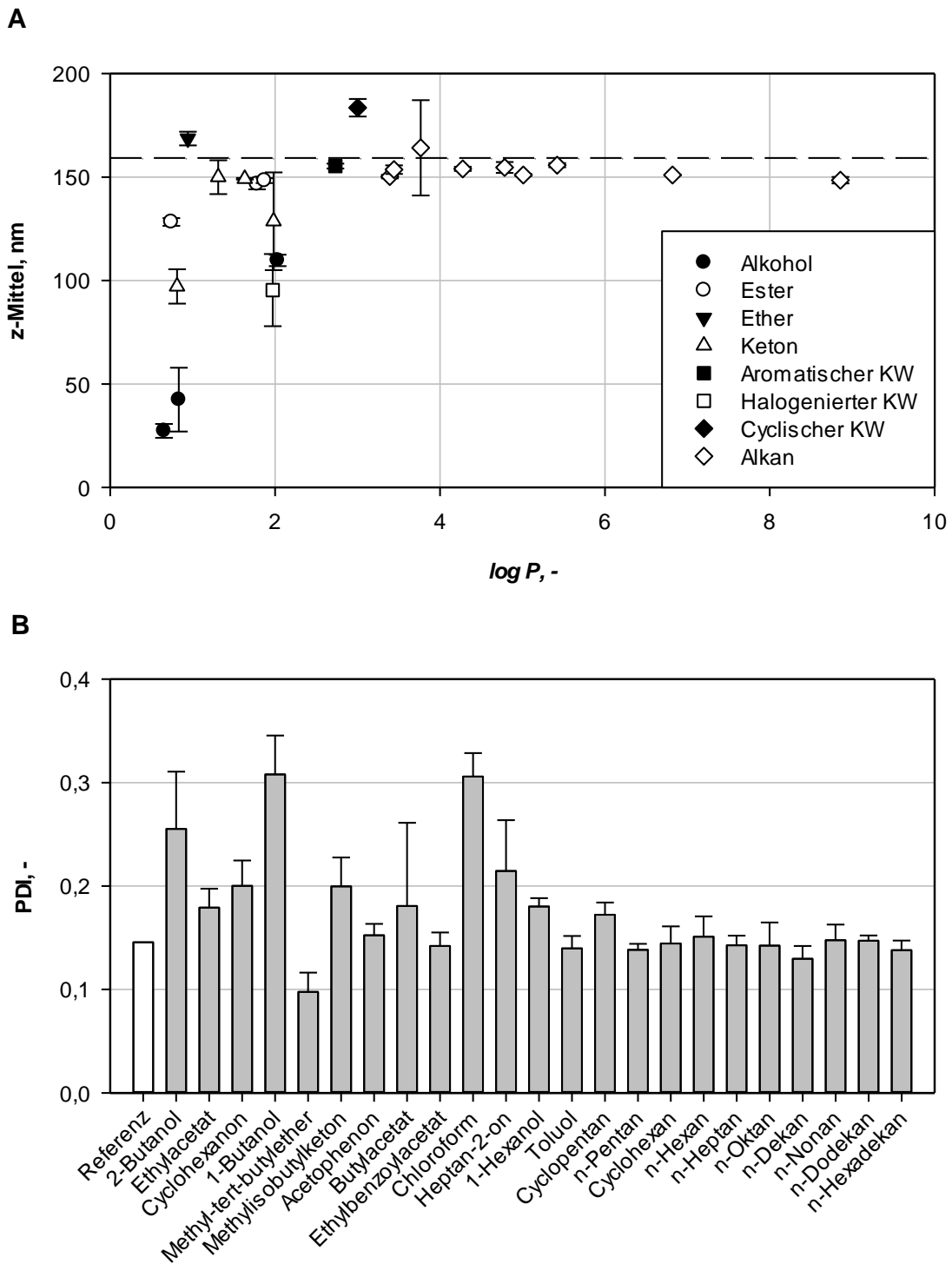


Abbildung 7.11: A) z-Mittel in Abhängigkeit des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P$ des verwendeten Lösemittels aus unterschiedlichen Lösemittelklassen (KW: Kohlenwasserstoff). Die horizontale Linie symbolisiert das z-Mittel der unbelasteten Probe. B) PDI nach Kontakt der unbelasteten Polymersomendispersion (Referenz) mit den unterschiedlichen Lösemitteln (angeordnet nach steigendem $\log P$). Der Kontakt der Polymersomendispersion mit 10 % v/v des Lösemittels erfolgte bei einer Schüttelfrequenz von 3 s^{-1} für 3 min. $N = 3$.

Da die Charakterisierung der Polymersomenstabilität bei für biotechnologische Prozesse relevanten Bedingungen angestrebt war, erfolgte die weitere Eingrenzung potentiell einsetzbarer organischer Lösemittel nicht im geschüttelten Mikroliter-Maßstab, sondern im gerührten Milliliter-Maßstab. Um die Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse aus dem Mikroliter-Maßstab in den Milliliter-Maßstab zu validieren, wurden fünf verschiedene Lösemittel mit $\log P < 3$ (2-Butanol, Ethylacetat, Cyclohexanon, Methyl-*tert*-butylether) und drei Lösemittel mit $\log P > 3$ (Cyclohexan, *n*-Hexan, *n*-Dodekan) ausgewählt. Mit dem Ziel den Einfluss der organischen Phase eindeutig erkennen zu können, wurde das Zweiphasensystem zur Minimierung der zusätzlichen mechanischen Belastung auf die Vesikelstabilität bei einer geringen Rührerdrehzahl von 150 min^{-1} in Kontakt gebracht. In Abbildung 7.12 sind die resultierenden z-Mittel der Polymersomendispersion nach 1 h Kontakt mit 10 % v/v unterschiedlicher Lösemittel im Milliliter-Maßstab dargestellt. Die im Mikroliter-Maßstab erzielten sehr ähnlichen Ergebnisse zeigten, dass die Erkenntnisse der Lösemittel-Selektion auf den Milliliter-Maßstab übertragbar waren.

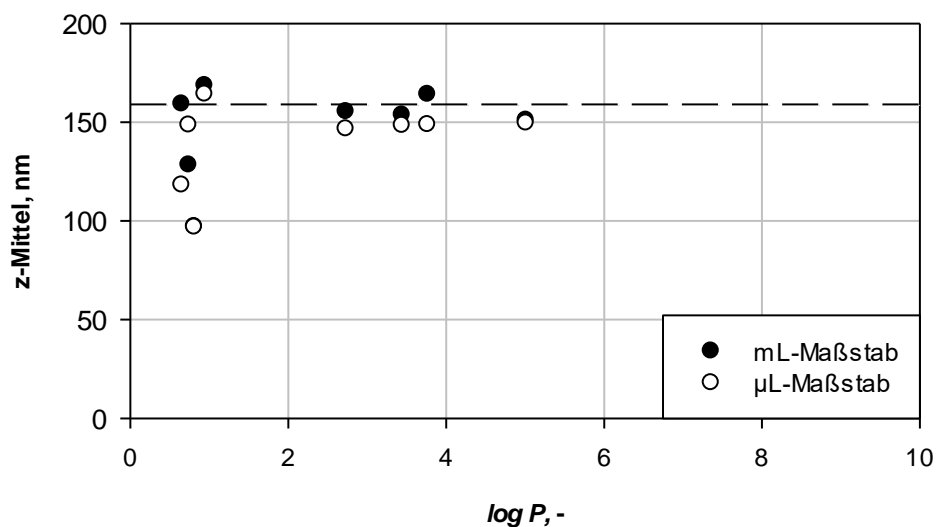


Abbildung 7.12: Resultierende z-Mittel in Abhängigkeit des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P$) des verwendeten Lösemittels. Polymersomendispersion mit 10 % v/v des Lösemittels erfolgte im Mikroliter-Maßstab (μL) bei einer Schüttelfrequenz von 3 s^{-1} für 3 min und im Milliliter-Maßstab (mL) bei einer Rührerdrehzahl von 150 min^{-1} für 1 h. $N = 3$.

Einfluss der Kontaktdauer. Sowohl im Mikroliter- als auch im Milliliter-Maßstab zeigte sich, dass die Gruppe der Alkane mit hohem $\log P$ die geringste Schädigung an unbeladenen Polymersomen verursachten. Um mögliche Einflüsse des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten im Bereich von $\log P > 3$ detaillierter identifizieren zu können, wurden exemplarisch die Zweiphasensysteme aus *n*-Hexan ($\log P = 3,8$) und *n*-Dodekan ($\log P = 6,8$) im Milliliter-Maßstab näher untersucht.

Bei der Verwendung von *n*-Hexan und *n*-Dodekan mit 10 % v/v und 20 % v/v konnte kein signifikanter Einfluss des Phasenanteils auf die Vesikelqualität (z-Mittel, PDI) verzeichnet werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Da verschiedene biokatalytische Prozesse im Zweiphasensystem die Verwendung von 20 % v/v der organischen Phase vorsehen (Pfründer *et al.*, 2004), wurde dieser Phasenanteil verwendet um die Auswirkungen der Kontaktdauer bis zu 24 h zwischen Polymersomen und *n*-Hexan beziehungsweise *n*-Dodekan im Milliliter-Maßstab bei 150 min^{-1} zu untersuchen. Es zeigte sich, dass sich das z-Mittel der Polymersomendispersion bei Prozesszeiten bis zu 4 h weder bei Verwendung von *n*-Hexan (Abbildung 7.13 A) noch bei Einsatz von *n*-Dodekan (Abbildung 7.13 C) signifikant im Vergleich zur ursprünglichen Polymersomendispersion (Referenz) änderte. Längere Prozesszeiten bis zu 24 h hingegen führten in beiden Fällen zu einer deutlichen Zunahme des z-Mittels. So stieg das z-Mittel innerhalb dieser Zeit bei Einsatz von *n*-Hexan von 165 nm auf 197 nm an. Auch die Polydispersität, dargestellt in Abbildung 7.13 B und Abbildung 7.13 D, nahm mit zunehmender Kontaktdauer nahezu ausnahmslos zu. So wurde die Verwendung von beladenen Polymersomen im Zweiphasensystem mit Alkanen nur für verhältnismäßig kurze Prozesszeiten von bis zu 4 h in Erwägung gezogen.

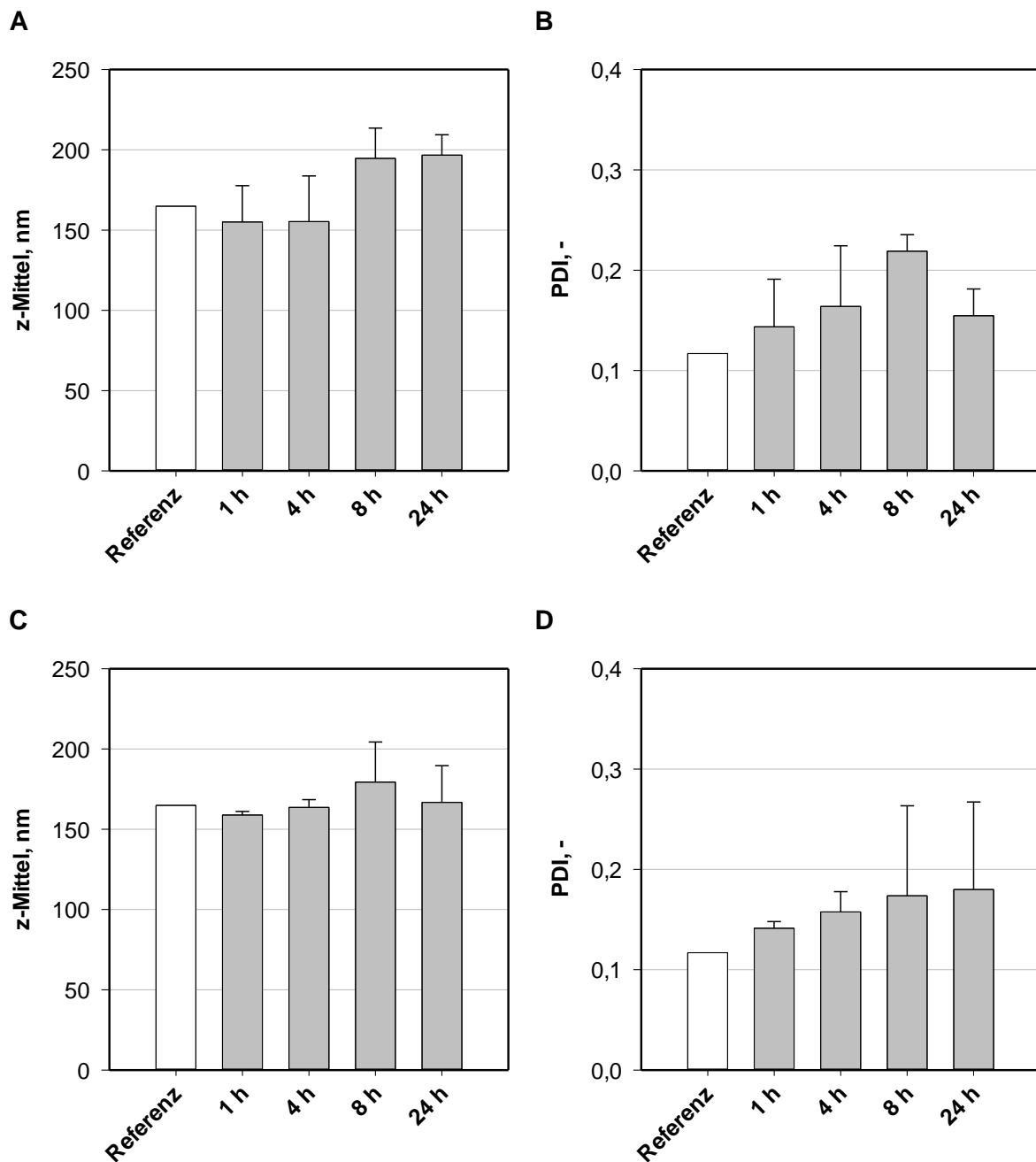


Abbildung 7.13: A), C) z-Mittel und B), D) PDI bei Kontakt der ursprünglichen Polymersomendispersion (Referenz) mit 20 % v/v *n*-Hexan A), B) und 20 % v/v *n*-Dodekan C), D) bei einer Rührerdrehzahl von 150 min^{-1} im Milliliter-Maßstab in Abhängigkeit von der Kontaktzeit. $N = 3$.

Beladene Polymersomen

Um die Einsetzbarkeit von beladenen Polymersomen im Zweiphasensystem mit Alkanen zu beurteilen, wurde die Rückhalteeffizienz von mit Calcein beladenen Polymersomen im miniaturisierten Rührkesselreaktor untersucht. Wie in Abbildung 7.14 zu erkennen, kam es

dabei jedoch innerhalb von sehr kurzen Prozesszeiten (< 1 h) zu unerwünschten Wechselwirkungen der beladenen Polymersomen mit der organischen Phase.

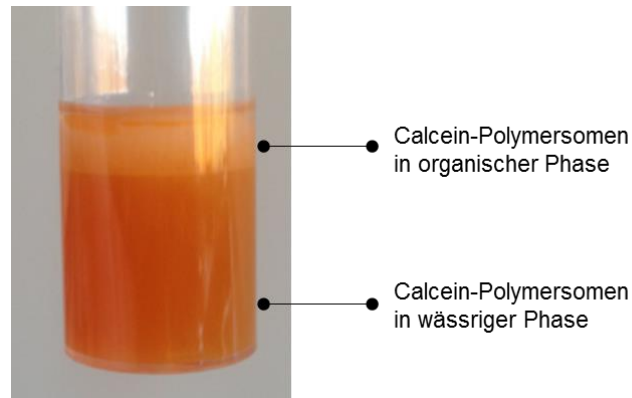


Abbildung 7.14: Unscharfe Phasengrenze zwischen der oberen organischen Phase (*n*-Dodekan) und der unteren wässrigen Phase.

Die sonst transparente obere Phase aus *n*-Dodekan färbte sich orange, was für eine erhebliche Interaktion der beladenen Polymersomen mit der organischen Phase sprach. Eine deutliche Phasentrennung war nicht mehr realisierbar. Basierend auf den gezeigten Ergebnissen wurde darauf geschlossen, dass die in dieser Arbeit hergestellten, beladenen Polymersomen im Zweiphasensystem mit organischen Lösemitteln prinzipiell deutlich zu instabil sind, um biokatalytische Prozesse zu realisieren.

7.3.2 Polymervesikel im Zweiphasensystem mit ionischen Flüssigkeiten

Unbeladene Polymersomen

Da sich die Einsetzbarkeit von Polymersomen im Zweiphasensystem mit organischen Lösemitteln als nicht sinnvoll erwies, wurde die Verwendung ionischer Flüssigkeiten als zweite Phase näher untersucht. Das Augenmerk wurde auf die drei ionischen Flüssigkeiten N-Hexylpyridinium-bis(trifluormethylsulfonyl)imid [HPYR] [NTF], 1-Butyl-3-methylimidazolium-bis(trifluormethylsulfonyl)imid [BMIM] [NTF] und 1-Hexyl-1-methyl-pyrrolidinium-bis(trifluormethylsulfonyl)imid [HMPL] [NTF] (Tabelle 13-23) gelegt.

Einfluss verschiedener ionischer Flüssigkeiten. Nach Kontakt der unbeladenen Polymersomen mit 10 % v/v der ionischen Flüssigkeiten im Mikroliter-Maßstab ließ sich anhand der resultierenden Vesikelqualität (z-Mittel und PDI) keine haltbare Aussage über deren Eignung treffen (Ergebnisse nicht dargestellt). Um aussagekräftigere Ergebnisse zu erzielen, wurde die Polymersomendispersion zudem im Milliliter-Maßstab mit 10 % v/v der ionischen Flüssigkeiten in Kontakt gebracht (1 h, 150 min⁻¹). Die resultierenden z-Mittel und PDIs sind in Abbildung 7.15 dargestellt.

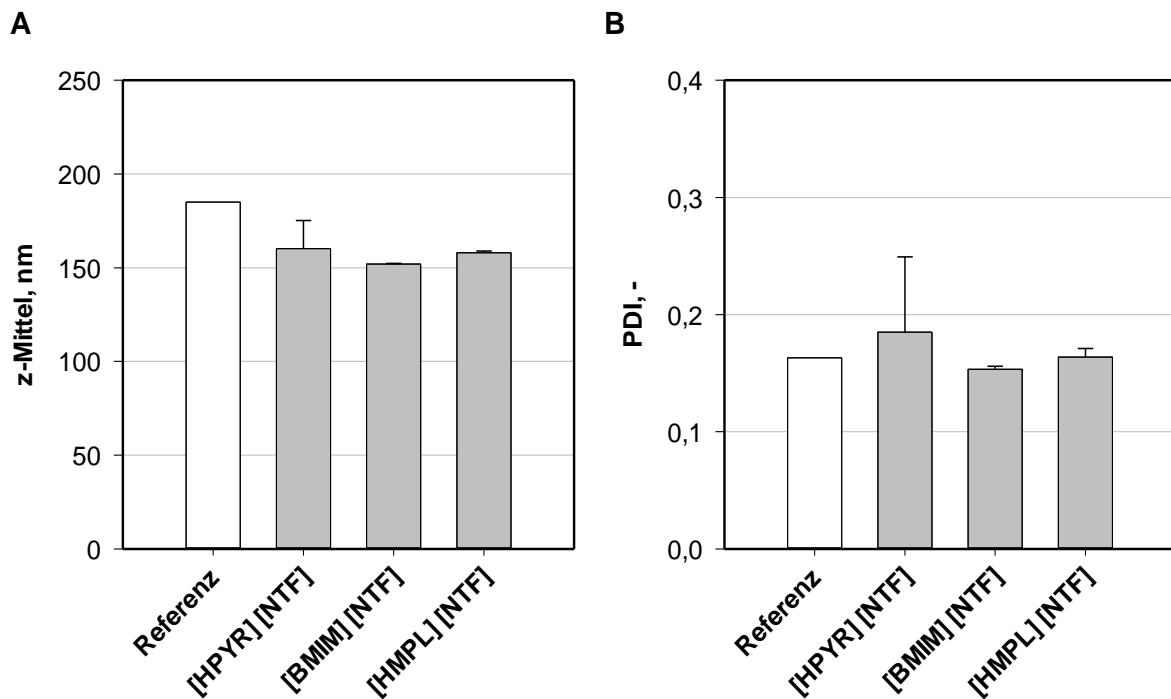


Abbildung 7.15: A) z-Mittel und B) PDI bei Kontakt der ursprünglichen Polymersomendispersion (Referenz) für 1 h bei einer Rührerdrehzahl von 150 min^{-1} im Milliliter-Maßstab in Abhängigkeit von der ionischen Flüssigkeit (10 % v/v). N = 3.

Das z-Mittel nahm bei Kontakt mit allen drei ionischen Flüssigkeiten ab, wie in Abbildung 7.15 A dargestellt. Dies zeigte sich unter Verwendung von [BMIM] [NTF] am deutlichsten. Hier fiel das z-Mittel von ursprünglich 185 nm (Referenz) auf 159 nm. Der PDI, dargestellt in Abbildung 7.15 B, änderte sich hierbei nicht signifikant. Aufgrund der vergleichsweise schlechteren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter Verwendung von [HPYR] [NTF] wurde diese ionische Flüssigkeit nicht weiter verwendet. Keine der anderen beiden ionischen Flüssigkeiten konnte eindeutig als besser geeignet identifiziert werden. Da jedoch sowohl das z-Mittel als auch der PDI unter Einsatz von [HMPL] [NTF] tendenziell die geringsten Veränderungen erfuhr, wurde diese ionische Flüssigkeit im weiteren Verlauf der Untersuchungen verwendet.

Einfluss der Kontaktdauer. Bei der exemplarischen Verwendung von 20 % v/v [HMPL] [NTF] zeigte sich nach 1 h Kontaktdauer im Milliliter-Maßstab gegenüber einem niedrigeren Phasenanteil von 10 % v/v keine signifikante Verschlechterung der Polymersomendispersion (Ergebnisse nicht dargestellt). Da in verschiedenen Studien 20 % v/v ionische Flüssigkeit verwendet wurden (Pfründer *et al.*, 2004; Bräutigam *et al.*, 2007; Bräutigam *et al.*, 2009), erfolgten sämtliche Untersuchungen zum Einfluss der Kontaktdauer bei diesem Phasenanteil. Untersuchungen im Milliliter-Maßstab zeigten, dass die bereits erwähnte Abnahme des

z-Mittels (Abbildung 7.16 A) bei Erstkontakt der Polymersomendispersion mit der ionischen Flüssigkeit ein spezifisches Phänomen darzustellen schien. Das z-Mittel fiel innerhalb von nur 1 h von 165 nm auf 133 nm und änderte sich anschließend bis zu 8 h kaum. Der PDI (Abbildung 7.16 B) nahm im Verlauf des Prozesses von anfänglich 0,12 bis zu 0,15 (24 h) zu.

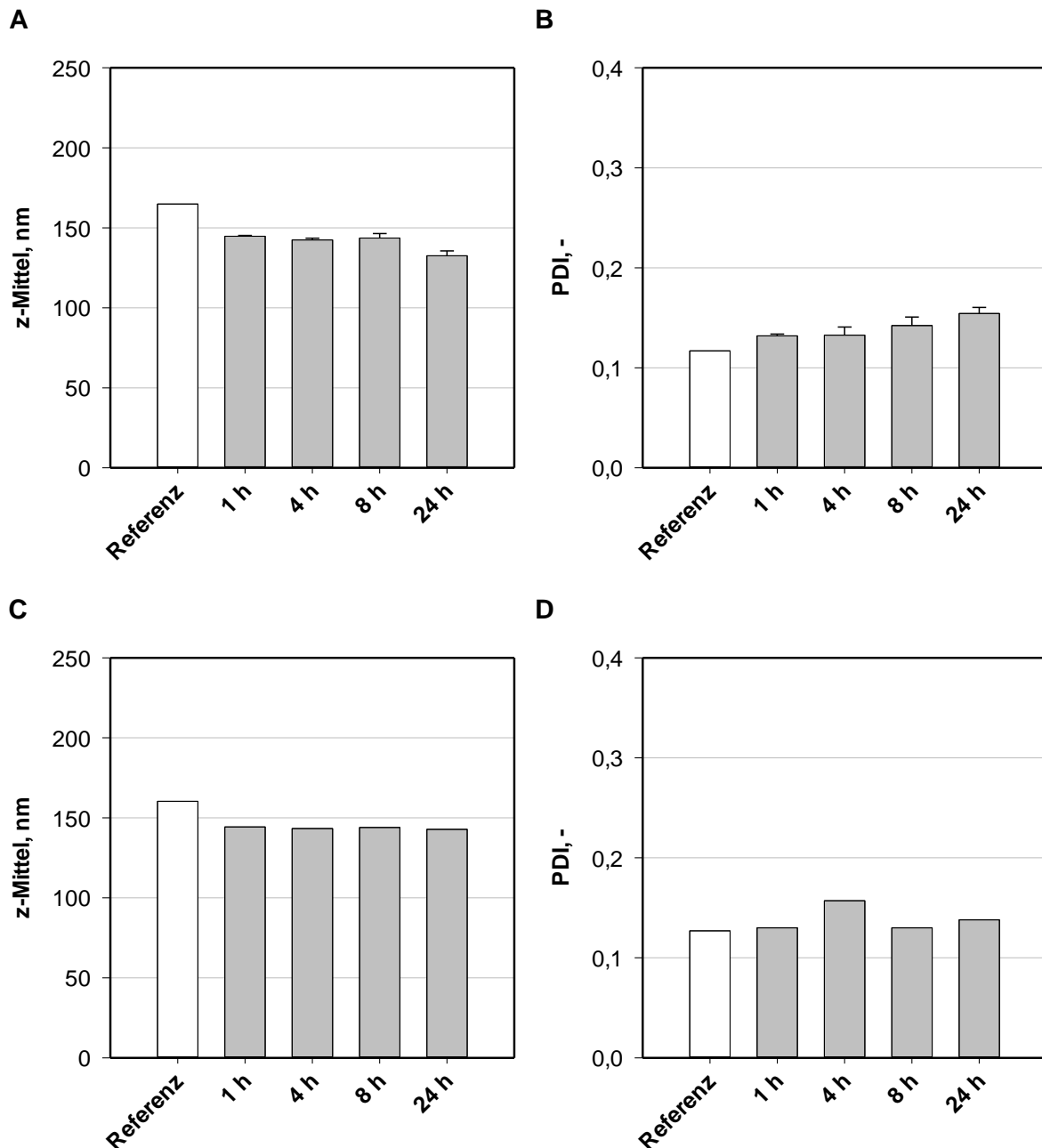


Abbildung 7.16: A), C) z-Mittel und B), D) PDI bei Kontakt der ursprünglichen Polymersomendispersion (Referenz) mit 20 % v/v der ionischen Flüssigkeit [HMPL] [NTF] im A), B) Milliliter-Maßstab bei einer Rührerdrehzahl von 150 min^{-1} ($N = 3$) und C), D) im unbewehrten miniaturisierten Rührkesselreaktor bei Verwendung des S-Rührers bei 500 min^{-1} ($N = 1$) in Abhängigkeit von der Kontaktzeit.

Um die gewonnenen Ergebnisse unter für biokatalytische Prozesse relevanten Bedingungen zu validieren, wurden die Auswirkungen von 20 % v/v [HMPL] [NTF] im Verlauf von bis zu 24 h Kontaktdauer zudem in miniaturisierten Rührkesselreaktoren untersucht. Hierfür wurde der S-Rührer bei einer Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} im unbewehrten Rührkesselreaktor verwendet. Die sprunghafte Abnahme des z-Mittels (Abbildung 7.16 C) innerhalb von nur 1 h, hier von 160 nm auf 144 nm, zeigte sich erneut. Im weiteren Verlauf bis zu 24 h änderte sich das z-Mittel kaum. Der PDI (Abbildung 7.16 D) nahm im miniaturisierten Rührkesselreaktor mit zunehmender Prozesszeit nicht zu, sondern blieb mit einem Wert von circa 0,13 annähernd konstant.

Die phänomenologische, rapide Abnahme des z-Mittels der Polymersomendispersion bei Erstkontakt mit der ionischen Flüssigkeit kann möglicherweise über das thermodynamische Gleichgewicht des Gesamtsystems erklärt werden. Dieses könnte durch die ionische Flüssigkeit so verändert worden sein, dass der mittlere stabile Polymersomendurchmesser herab gesetzt wurde.

Beladene Polymersomen

Da sich die in dieser Arbeit untersuchten Polymersomen trotz der verzeichneten Abnahme des z-Mittels bei Kontakt mit 20 % v/v [HMPL] [NTF] makroskopisch unverändert zeigten, wurde zudem die Stabilität von beladenen Polymersomen im unbewehrten miniaturisierten Rührkesselreaktor untersucht. Der Fokus dieser Untersuchungen lag auf der Rückhaltung der vorab verkapselten Moleküle. Wie in Abbildung 7.17 zu erkennen, zeigte sich, dass sich eine klare Phasengrenze zwischen der wässrigen Phase der mit Calcein beladenen Polymersomendispersion und der ionischen Flüssigkeit bildete. Unerwünschte Interaktionen zwischen Polymer und der nicht wässrigen Phase wurden daher ausgeschlossen.

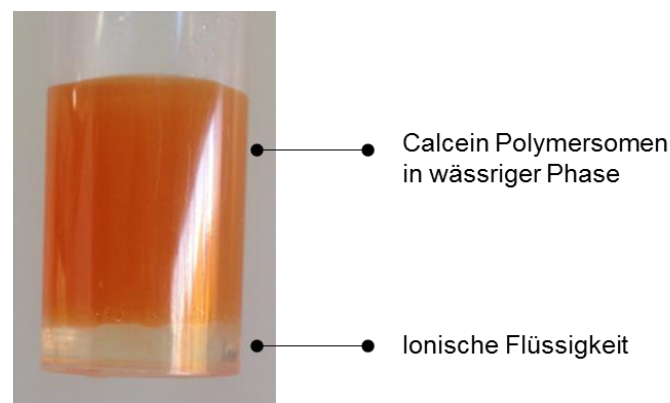


Abbildung 7.17: Die Phasentrennung zwischen ionischer Flüssigkeit (unten) und der wässrigen Phase aus mit Calcein beladenen Polymersomen (oben) ist deutlich zu erkennen.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse wurden die Auswirkungen von 20 % v/v [HMPL] [NTF] unter Verwendung des S-Rührers im unbewehrten Reaktor bei 500 min^{-1} auf die Molekülfreisetzung untersucht. In Abbildung 7.18 ist der Verlust der Beladung von mit Calcein beziehungsweise von mit *N*-Acetylneuraminatlyase beladenen Polymersomen bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ im Prozessverlauf dargestellt. Die gezeigten Daten stellen hierbei ausschließlich den Verlust, welcher aus dem Kontakt mit der ionischen Flüssigkeit resultiert, dar. Verluste, die aus den zusätzlichen mechanischen und thermischen Belastungen bei den gewählten Prozessbedingungen (S-Rührer, 500 min^{-1} , unbewehrter Reaktor, $25 \text{ }^\circ\text{C}$) resultierten, wurden subtrahiert. Es ist zu erkennen, dass das verhältnismäßig kleine Molekül Calcein (0,6 kDa) innerhalb von nur 1 h schubartig austrat. Hierbei ging mit 11,6 % bereits ein großer Anteil der Beladung verloren. Denkbar ist der direkte Zusammenhang der sprunghaften Verringerung des z-Mittels (hier von 174 nm bei Prozessbeginn zu 167 nm am Prozessende) mit dem stoßartigen Verlust an Calcein. Durch die Verringerung des Vesikeldurchmessers kommt es möglicherweise zu spontanem Auftreten von ausgeprägten, lokalen Membrandefekten, was die pulsartige Calceinfreisetzung erklären könnte. Im weiteren Prozessverlauf nahm der Calceinverlust stetig zu, bis er nach 48 h bei 36 % v/v lag. Der Bruttoverlust, der durch die zusätzliche mechanische und thermische Belastung erfolgte, lag sogar bei 42,2 % (Ergebnisse nicht dargestellt).

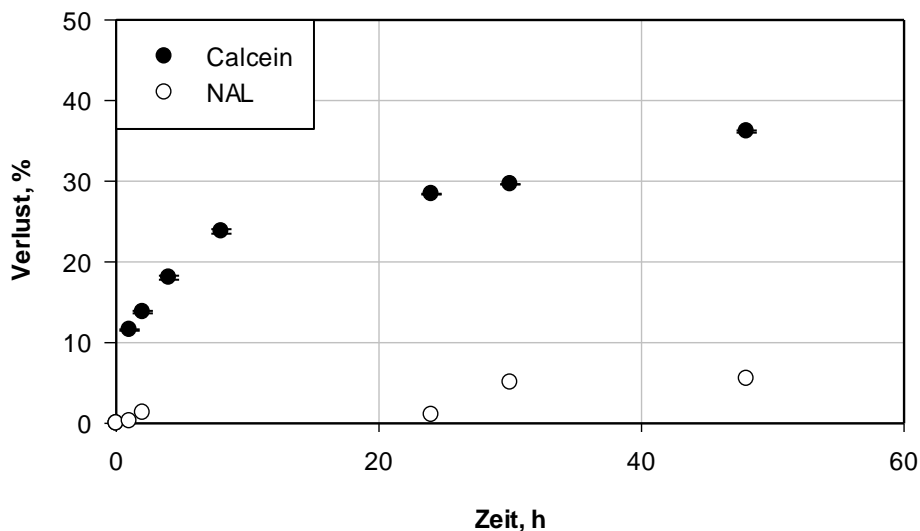


Abbildung 7.18: Verlust an Calcein ($N = 3$) und *N*-Acetylneuraminatlyase (NAL) ($N = 1$) im zeitlichen Verlauf bei Verwendung des S-Rührers bei 500 min^{-1} im unbewehrten Rührkesselreaktor und bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ nach Kontakt mit 20 % v/v der ionischen Flüssigkeit [HMPL] [NTF]. Die gezeigten Werte stellen die Differenz aus dem gesamten Verlust und dem durch mechanische und thermische Beanspruchung (500 min^{-1} , $25 \text{ }^\circ\text{C}$) hervorgerufenen Verlust dar.

Auch die mit *N*-Acetylneuraminatlyase beladenen Polymersomen zeigten bei Kontakt mit der ionischen Flüssigkeit eine deutliche Abnahme des z-Mittels von 174 nm bei Prozessbeginn zu 157 nm am Prozessende (Ergebnisse nicht dargestellt), was die bereits erläuterte Verringerung des verkapselbaren Volumens nach sich zieht. Dennoch war hierbei, wie in Abbildung 7.18 zu erkennen, kein pulsartiger Verlust der Beladung zu verzeichnen. Der Verlust, der durch den Kontakt mit der ionischen Flüssigkeit hervorgerufen wurde, betrug nach 1 h nur 0,2 % und nahm bis nach 48 h bis zu 5,5 % zu. Der gesamte Verlust, der durch zusätzliche mechanische und thermische Beanspruchung hervorgerufen wurde, lag hierbei bei 7,4 % (Ergebnisse nicht dargestellt). Insgesamt wurde von *N*-Acetylneuraminatlyase innerhalb von 48 h circa fünf Mal weniger freigesetzt als es bei Calcein der Fall war. Eine mögliche Ursache könnte in der Größe der jeweiligen Moleküle gesucht werden. So ist davon auszugehen, dass das verhältnismäßig große Enzym (4x34,8 kDa) die Polymermembran insgesamt deutlich schlechter passieren kann als das sehr viel kleinere Calcein (0,6 kDa). Als mögliche Ursache für den Verlust der Beladung können lokale Membrandefekte, welche bedingt durch den Kontakt mit der ionischen Flüssigkeit entstehen könnten, genannt werden. Auf diese Weise werden die Polymersomen zwar nicht zerstört, sind jedoch aufgrund mangelnder Rückhalteeffizienz für den Einsatz in Zweiphasensystemen dennoch nicht geeignet.

7.4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass unbeladene Polymersomen, welche über die etablierte Standardmethode (Kapitel 5.1.2) hergestellt wurden, ohne Qualitätsverluste bis zu mindestens einem Jahr gelagert werden konnten. Diese sehr gute Lagerfähigkeit der unbeladenen Polymersomen aus PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅ entspricht der für Polymersomen aus ABA-Triblock-Copolymeren bekannten Lagerstabilität (Nardin und Meier, 2001). Studien bezüglich langfristiger Lagerfähigkeit von beladenen PMOXA-PDMS-PMOXA-Polymersomen, bei welchen insbesondere auch die Rückhalteeffizienz der Beladung von Interesse ist, sind nicht bekannt. Bei der Betrachtung von Polymersomen, welche für die Verwendung als Enzymmembranreaktor mit Enzymen beladen sind, kann jedoch nicht nur die Rückhalteeffizienz, sondern insbesondere die Lagerstabilität der verkapselten Enzyme selbst den limitierenden Faktor darstellen.

Die mechanischen Eigenschaften von Polymersomen wurden bislang überwiegend über die Methode der Mikropipetten-Aspiration bestimmt (Rawicz *et al.*, 2000; Olbrich *et al.*, 2000). Hierbei wird die Einsauglänge des Vesikels in die Mikropipette in Abhängigkeit vom Ansaugdruck gemessen. Anhand der bekannten Geometrie der Pipette sowie des bekannten

Vesikeldurchmessers kann so die prozentual eingesaugte Fläche in Abhängigkeit des Saugdrucks berechnet werden. Die Vesikelstabilität wird anhand der maximal möglichen Flächenänderung bis zur Vesikelruptur beurteilt. Auf diese Weise konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die maximal mögliche Flächenänderung des Polymersoms proportional zur molekularen Masse des verwendeten amphiphilen Polymers ist (Discher und Eisenberg, 2002; Bermudez *et al.*, 2002). Somit ermöglicht diese Methode die Selektion geeigneter amphiphiler Block-Copolymere zur Herstellung von möglichst stabilen Vesikeln. Die Untersuchung der Stabilität von Polymersomen aus einer einzigen Polymerart unter bestimmten Prozessbedingungen oder die Bestimmung der Rückhalteeffizienz von verkapselter Beladung, wie es in dieser Arbeit untersucht wurde, erlaubt diese Methode jedoch nicht. Neben der durch Scherkräfte hervorgerufenen Vesikelzerstörung wurde in verschiedenen Studien auch die scherinduzierte Vesikelfusion sowohl bei Liposomen (Bernard *et al.*, 2005) als auch bei Polymersomen (Chang *et al.*, 2014) nachgewiesen. In dieser Arbeit gab es jedoch keine Hinweise auf das Auftreten von Fusionsprozessen.

Bei natürlichen Membranen aus Phospholipiden ist die Abhängigkeit des schädigenden Einflusses eines Lösemittels vom Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P$ bekannt (Khmelnitsky *et al.*, 1991). Da das Verhalten von Polymersomen gegenüber unterschiedlicher Lösemittel bislang unklar war, wurden die in dieser Arbeit aus PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅ hergestellten Polymersomen hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber einer Reihe verschiedener Lösemittel systematisch untersucht. Die Vermutung, dass vor allem polare Lösemittel mit einem niedrigen $\log P$ aufgrund der guten Löslichkeit des Blockcopolymers zu einer Schädigung der Polymersomenmembran führen könnten, bestätigte sich. Alkane mit hohem $\log P$ hingegen führten zu keiner starken Veränderung der Polymersomenqualität (z -Mittel, PDI). Nichtsdestotrotz zeigten sich beladene Polymersomen im Zweiphasensystem mit Alkanen als unbrauchbar, da hierbei keine klare Phasentrennung erreicht werden konnte und ein großer Teil der Beladung verloren ging. Als Alternative zu organischen Lösemitteln wurde die Stabilität von Polymersomen auch im Zweiphasensystem mit ionischen Flüssigkeiten untersucht. Da Polymersomen aus Poly(butadien)-poly(ethylenoxid) (PB-PEO) und aus einem Blockcopolymer mit einem zwitterionischen und einem Poly(styrol)-Block (PS) nicht nur in wässriger Phase, sondern auch in ionischen Flüssigkeiten hergestellt werden können (Bai und Lodge, 2010; Maddikeri *et al.*, 2011; So und Lodge, 2014), wurde es in Erwägung gezogen, dass ein zerstörungsfreier Kontakt der Polymersomendispersion mit ionischen Flüssigkeiten realisiert werden kann. Insbesondere mit Fokus auf die Rückhaltung von vorab verkapselten Molekülen konnte dies nicht bestätigt werden. Die resultierende phänomenologische Verringerung des z -Mittels mit vermutlich einhergehendem Auftreten von Membrandefekten führte innerhalb nur 1 h zum Austritt von über 10 % der Beladung. Da bekannt ist, dass

Polymere mit größeren Kettenlängen zu einer höheren Membranstärke führen, was wiederum eine erhöhte Membranstabilität gegenüber dem Einfluss von Detergenzien bewirken kann (Pata *et al.*, 2004), wäre die Verwendung eines PMOXA-PDMS-PMOXA Blockcopolymers mit deutlich größerer Kettenlänge denkbar. Da in dieser Arbeit jedoch der Kontakt mit Lösemitteln zu nahezu vollständigem Ladungsverlust führte, scheint die Realisierung der vollständigen Rückhaltung mit einem Polymer längerer Kettenlänge unwahrscheinlich. Demnach wäre als weitere Alternative die Verwendung von einem quervernetzbaaren Polymer denkbar. Polymersomen, deren Membran postpräparativ durch radikalische Polymerisierung des verwendeten Polymers vernetzt wurden, wiesen generell eine deutlich höhere Stabilität auf (Nardin *et al.*, 2000a) und könnten möglicherweise auch dem Kontakt mit ionischen Flüssigkeiten standhalten.

8 Permeabilität der Polymermembran

Polymersomen weisen im Vergleich zu Liposomen neben höherer Stabilität auch den Vorteil geringerer Membranpermeabilität auf (Discher und Eisenberg, 2002). Im Rahmen der Nutzbarmachung von Polymervesikeln als Enzymmembranreaktor ist eine möglichst niedrige Membranpermeabilität wünschenswert. Nur so kann durch die Insertion von Transportproteinen in die Membran ein selektiver Stofftransport erzielt werden. Zwar wurde bereits gezeigt, dass verschiedenste Transmembranproteine erfolgreich in Polymersomen aus dem Polymer PMOXA-PDMS-PMOXA inseriert werden können (Kapitel 3.1.1), eine systematische Untersuchung der Membranpermeabilität gegenüber verschiedener Stoffe erfolgte jedoch bislang nicht. Da der Stofftransport über die Membran sowohl von dem aufgebauten Konzentrationsgradienten und der für den Stofftransport zur Verfügung stehenden Membranfläche als auch dem betrachteten Zeitraum abhängt, ist die Angabe von Permeabilitätskoeffizienten erstrebenswert. Im Folgenden wird daher die Permeabilität von planaren Polymermembranen und von Polymersomen aus PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅ diskutiert und mit jener von artifiziellen, planaren Lipidmembranen verglichen. Ermittelt wurde in jedem Fall die effektive Permeabilität Pe_{eff} (Gleichung (3.31)), die aus Gründen der besseren Lesbarkeit im Folgenden mit Pe bezeichnet wird. Um die Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu ermöglichen, sind die Permeabilitätskoeffizienten nicht in der SI-Einheit $m\ s^{-1}$ sondern in $cm\ s^{-1}$ angegeben.

8.1 Permeabilität von planaren Polymermembranen

Die Permeabilität der Polymermembranen wurde mit Hilfe eines *Parallel Artificial Membrane Permeability Assays* (PAMPA), welcher ursprünglich für die Untersuchung planarer Lipidmembranen entwickelt wurde (Kansy *et al.*, 1998) (Kapitel 4.8.1), untersucht. Hierbei werden innerhalb einer Filtermembran gestützte Membranen gebildet, welche innerhalb einer *Sandwich*-Mikrotiterplatte die Donor- von der Akzeptor-Phase trennt. Durch die zeitabhängige Bestimmung der Konzentration des untersuchten Stoffes in beiden Kompartimenten wurde über Gleichung (3.28) und Gleichung (3.30) der Permeabilitätskoeffizient bestimmt.

8.1.1 Bildung von gestützten planaren Polymermembranen

Die Verwendung des PAMPA-Systems zur Bestimmung der Permeabilität planarer Phospholipidmembranen ist weitreichend etabliert (Avdeef, 2005). Hierbei wird meist eine 2 % w/v Lipidlösung in (*n*-Dodekan) auf die Filtermembran aufgetragen, wodurch in der

netzartigen Struktur des Filters die artifiziellen Lipidmembranen gebildet werden (Ruell *et al.*, 2003). Da es sich sowohl bei Phospholipiden als auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten Polymer um amphiphile Moleküle handelt, war die Überlegung mit Hilfe des PAMPA-Systems auch artifizielle, planare Polymermembranen bilden zu können naheliegend.

Herstellung planarer Polymermembranen

Um stabile Polymermembranen in einem Bereich von pH 5 bis pH 9 bilden zu können, wurden verschiedene Lösemittel zur Bereitstellung der membranbildenden Lösung in Erwägung gezogen. Hierfür wurde die Anwendung von Ethanol, Chloroform, Toluol und *n*-Dodekan untersucht. Ethanol fand Verwendung, da dieses Lösemittel in dieser Arbeit bereits bei der Herstellung der Polymersomen eingesetzt wurde (Kapitel 5.1.2). Die Verwendbarkeit von Chloroform und Toluol hingegen wurde untersucht, da mit Hilfe dieser Lösemittel bereits die Herstellung einer intakten, freistehenden Polymermembran aus dem Polymer PMOXA-PDMS-PMOXA gezeigt werden konnte (Nardin *et al.*, 2000c). Der Einsatz von *n*-Dodekan wiederum war in Anlehnung an die Bildung von filtergestützten artifiziellen Lipidmembranen naheliegend. Neben der Verwendung der unterschiedlichen Lösemittel wurde die Polymerkonzentration der membranbildenden Lösung im Bereich von 0,5 % w/v bis 5,0 % w/v variiert. Zudem wurde es in Betracht gezogen, dass für die Bildung intakter Membranen eine Trocknungsdauer nötig sein könnte. Untersuchungen hierzu fanden im Bereich bis zu 18 h statt.

Der Großteil aller durchgeführten Versuche führte, unabhängig von Lösemittelart, Polymerkonzentration und Membrantrocknungszeit, nicht zur dauerhaften Phasentrennung zwischen Donor- und Akzeptorphase. Insbesondere unter Verwendung von Ethanol kam es zu keiner Zeit zur erwünschten Trennung der Kompartimente, was durch die Hydrophilie von Ethanol und die dadurch bedingte Destabilisierung der Polymermembran erklärt werden kann. Zudem waren niedrige Polymerkonzentrationen < 1 % w/v gänzlich ungeeignet. Auch neutrales bis saures Milieu in der wässrigen Donor- und Akzeptorphase sowie sehr lange Membrantrocknungszeiten (18 h) schienen einen negativen Effekt auf die Membranintegrität zu zeigen (Ergebnisse nicht dargestellt). Da sämtliche genannten Versuche zur Herstellung einer intakten, planaren Polymermembran scheiterten, wurde es in Erwägung gezogen, Polymermembranen über dieselbe Methode wie planare Lipidmembranen, welche auf der Verwendung einer 2 % w/v DOPC-Lösung in *n*-Dodekan beruht (Kapitel 4.8.1), herzustellen. Eine identische Herstellungsmethode beider Membranarten war insbesondere auch mit Hinblick auf deren direkte Vergleichbarkeit wünschenswert. Das verwendete Polymer löste sich jedoch im Gegensatz zum verwendeten Phospholipid (DOPC) nur bis zu maximal 0,5 % w/v im Lösemittel *n*-Dodekan. Daher wurde das Polymer zunächst zu 60 % w/v in Chloroform gelöst und anschließend in *n*-Dodekan zu 2 % w/v verdünnt. Durch Auftragen

dieser membranbildenden Lösung auf die Filtermembran konnte analog zum Herstellungsverfahren von planaren Lipidmembrane, eine intakte Trennschicht zwischen Donor- und Akzeptorkompartiment im Bereich von pH 5 bis pH 9 erzielt werden. Eine Trocknungszeit war hierfür bei keiner der beiden Membranarten notwendig.

Membranintegrität

Neben der makroskopischen Unversehrtheit der Membran wurde auch deren mikroskopische Integrität untersucht. Hierfür wurde ein Membranintegritäts-Assay etabliert. Dieser beruhte zum einen auf dem Wissen, dass der Wirkstoff Propranolol (Kapitel 3.3.4) in neutralem und basischem Milieu gut durch Lipidmembranen diffundieren kann (Avdeef und Tsinman, 2006). Zum anderen basierte er darauf, dass bekannt ist, dass Sulforhodamin B Polymersomenmembranen aus PMOXA-PDMS-PMOXA nicht passieren kann (Ben-Haim *et al.*, 2008). dass Sulforhodamin B sollte im betrachteten Zeitraum von bis zu 20 h nicht in der Lage sein intakte, planare Polymermembranen zu passieren, wohingegen die Nachweisbarkeit des passiven Stofftransportes von Propranolol erwartet wurde. Nach 20 h Inkubationszeit der planaren Polymermembran mit einer Lösung aus 0,5 mM Propranolol und 0,1 mM Sulforhodamin B (Phosphatpuffer, pH 7) konnte, wie erwartet, in der Akzeptorphase zwar Propranolol, aber kein Sulforhodamin B nachgewiesen werden. Bei der Inkubation einer Membran, welche ausschließlich aus *n*-Dodekan, also ohne Polymer, gebildet wurde, konnte hingegen die Diffusion des Fluorophors nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Diese Ergebnisse legten die Integrität der gebildeten artifiziellen Polymermembran mit Hilfe des PAMPA-Systems nahe und zeigten, dass über die in dieser Arbeit etablierten Methode intakte, planare Polymermembranen gebildet werden können.

8.1.2 Permeabilität der Polymermembran gegenüber Propranolol und Koffein

Für die Charakterisierung der Permeabilität von planaren PMOXA-PDMS-PMOXA-Membranen wurde der passive Stofftransport der zwei Modellwirkstoffe Propranolol und Koffein in Abhängigkeit des pHs untersucht. Propranolol ist im Rahmen diverser Studien zu Lipid-membranen als gut, Koffein als moderat diffundierend bekannt (Avdeef und Tsinman, 2006).

Dimensionsloser Konzentrationsverlauf

Der passive Stofftransport eines Stoffes von der Donorphase über die Membran in die Akzeptorphase kann über den zeitlichen Verlauf der dimensionslosen Donor-beziehungsweise Akzeptorphasenkennzahl (Do_{PAMPA} und Ak_{PAMPA} , Gleichung (4.3))

dargestellt werden. Dies ermöglicht den direkten Vergleich des zeitlichen Verlaufs der passiven Diffusion unterschiedlicher Moleküle in verschiedenen Systemen.

Einfluss der wässrigen Grenzschicht. Beim passiven Stofftransport über Membranen spielt nicht nur der Stofftransportwiderstand der Membran selbst, sondern auch die Widerstände, welche von den die Membran umgebenden wässrigen Grenzschichten ausgehen, eine wichtige Rolle. Durch Rühren der wässrigen Phase können letztgenannte reduziert werden. In Abbildung 8.1 A und Abbildung 8.1 B sind die resultierenden Verläufe bei Untersuchung des Stofftransportes von Propranolol beziehungsweise Koffein bei pH 9 (Tris-Puffer) im ungerührten und im gerührten PAMPA-System dargestellt. Beim passiven Stofftransport von Propranolol war sowohl im gerührten als auch im ungerührten Versuch eine rasche Abnahme der dimensionslosen Donorphasenkennzahl Do_{PAMPA} beziehungsweise eine ebenso schnelle Zunahme der Akzeptorphasenkennzahl Ak_{PAMPA} zu verzeichnen. Dies ist dadurch zu erklären, dass bei pH 9 ein verhältnismäßig großer Anteil (22,8 %) der Propranololmoleküle ungeladen vorliegt ($pK_s = 9,53$). Daher kann Propranolol die hydrophobe Membran im basischen Milieu vergleichsweise leicht passieren. Demzufolge stellte bei diesen Bedingungen nicht nur die Membran selbst, sondern auch die hydrophilen, wässrigen Grenzschichten zu beiden Seiten der Membran (Abbildung 3.9) einen einflussreichen Stofftransportwiderstand dar. So war innerhalb einer Inkubationszeit von 4 h mit einem Wert der dimensionslosen Akzeptorphasenkennzahl Ak_{PAMPA} von 0,24 im ungerührten Versuch deutlich weniger Propranolol über die planare Polymermembran diffundiert als im gerührten Ansatz. Hier wurde nach derselben Inkubationsdauer ein deutlich höherer Wert von 0,44 gemessen. Durch das Rühren der Donor- und der Akzeptorphase konnten die wässrigen Grenzschichten demzufolge erfolgreich minimiert werden, was zu einem deutlich schnelleren Stofftransport führte. Die horizontale Linie in Abbildung 8.1 A bei $Ak_{PAMPA} = Do_{PAMPA} = 0,5$ symbolisiert das Erreichen des Gleichgewichtszustandes. Die Abnahme der jeweiligen dimensionslosen Konzentration der Donorphase (Do_{PAMPA}) verlief in Bezug auf diese Linie annähernd spiegelverkehrt. Dies ließ darauf schließen, dass sämtliche Propranolol-Moleküle beim passiven Stofftransport über die Membran die Akzeptorphase erreichten. Signifikante Membranretention, welche das Zurückhalten der diffundierenden Moleküle im Inneren der Membran beschreibt, konnte somit ausgeschlossen werden. Bei Betrachtung des passiven Stofftransportes von Koffein, dargestellt in Abbildung 8.1 B, zeigte sich im gerührten PAMPA-System kein relevanter Unterschied zum ungerührten System. Die Diffusion erfolgte demnach unabhängig von der Ausprägung der wässrigen Grenzschicht in etwa gleich schnell, was an den ähnlichen dimensionslosen Konzentrationsverläufen zu erkennen ist. Die wässrige Grenzschicht hatte demzufolge kaum einen Einfluss auf den Stofftransport des Wirkstoffes Koffein. Unabhängig

von der Ausprägung der wässrigen Grenzschichten war die Gleichgewichtskonzentration nach 48 h mit $Ak_{PAMPA} = 0,31$ (ungerührt) und $Ak_{PAMPA} = 0,29$ (gerührt) noch nicht erreicht.

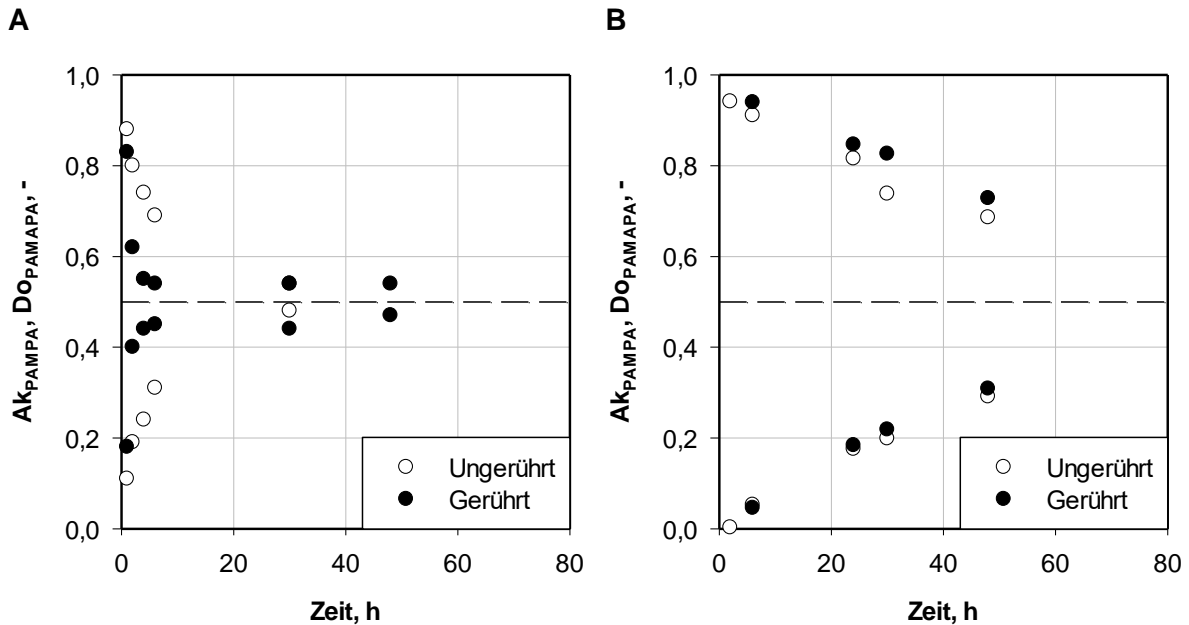


Abbildung 8.1: Dimensionsloser Konzentrationsverlauf der Donor- und Akzeptorphase (D_{OPAMPA} , Ak_{PAMPA}) bei Untersuchung des passiven Stofftransportes von A) Propranolol und B) Koffein über künstliche Polymermembranen bei pH 9 im ungerührten und gerührten PAMPA-System. Relativer Fehler $< 5\%$. $N = 5$.

Einfluss des pHs. Propranolol ist eine ionisierbare Base. Demnach nimmt der Anteil ungeladener Moleküle mit zunehmendem pH zu (Kapitel 3.3.4). Deshalb wurde die passive Diffusion von Propranolol bei pH 5 bis pH 9 untersucht, wie in Abbildung 8.2 A dargestellt. Die dimensionslosen Konzentrationsverläufe der Donor- und der Akzeptorphase im gerührten PAMPA-System zeigten deutlich, dass Propranolol die Polymermembran bei pH 9 (Tris-Puffer) sehr viel schneller passierte, als im sauren Milieu bei pH 5 (Phosphatpuffer). Der sehr langsame Stofftransport im sauren Bereich wurde anhand der nur sehr geringen Abnahme von D_{OPAMPA} von 1,0 zu 0,9 beziehungsweise der nur marginalen Zunahme der dimensionslosen Akzeptorphasen-Kennzahl Ak_{PAMPA} von 0 zu 0,01 nach 48 h deutlich. Geht man davon aus, dass keine Membranretention auftritt, müsste Ak_{PAMPA} deutlich höher bei einem Wert von 0,1 liegen. Der sehr langsame Stofftransport in saurem Milieu bei pH 5 ist damit zu begründen, dass bei diesem pH über 99,99 % der Propranololmoleküle geladen vorliegen und diese die hydrophobe Membran nur schlecht passieren können. Die Geschwindigkeit des Stofftransportes im neutralen Milieu bei pH 7 (Phosphatpuffer) (99,7 % der Moleküle liegen geladen vor) lag mit $D_{OPAMPA} = 0,74$ und $Ak_{PAMPA} = 0,16$ nach 4 h zwischen jenen bei pH 5 und pH 9. Koffein als nicht ionisierbarer Wirkstoff wurde als Referenz ebenfalls bezüglich seines pH-abhängigen passiven Stofftransportes, dargestellt in Abbildung 8.2 B, untersucht.

Die passive Diffusion dieses Wirkstoffes über planare Polymermembranen erfolgte erwartungsgemäß unabhängig vom pH, was anhand der sehr ähnlichen Verläufe von DO_{PAMPA} und Ak_{PAMPA} bei pH 5 bis pH 9 erkennbar ist. Mit $DO_{PAMPA} = 0,67$ und $Ak_{PAMPA} = 0,33$ nach 4 h Inkubationszeit erfolgte der passive Stofftransport etwas langsamer als jener von Propranolol bei pH 7, aber schneller als jener von Propranolol bei pH 5.

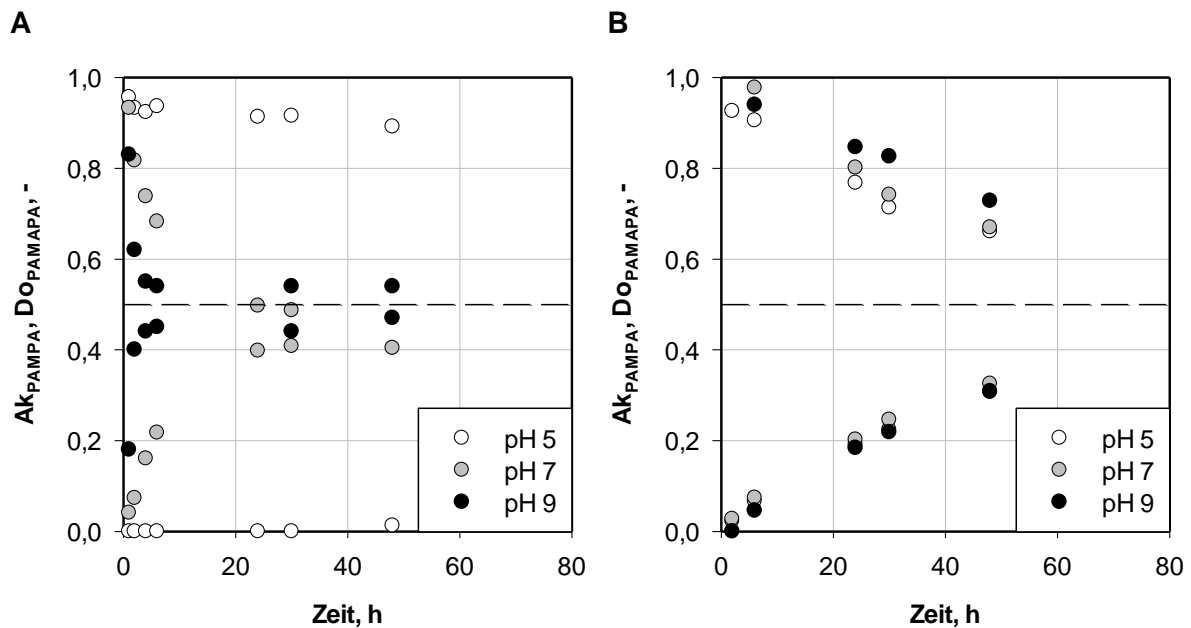


Abbildung 8.2: Dimensionsloser Konzentrationsverlauf der Donor- und Akzeptorphase (DO_{PAMPA} , Ak_{PAMPA}) bei Untersuchung des passiven Stofftransportes von A) Propranolol und B) Koffein über künstliche Polymermembranen im gerührten PAMPA-System bei pH 5, pH 7 und pH 9. Relativer Fehler < 5 %. N = 5.

Permeabilitätskoeffizienten

Um die Eigenschaften einer Membran bezüglich ihrer Permeabilität gegenüber verschiedener Stoffe in quantitative Größen fassen zu können, ist die Angabe von Permeabilitätskoeffizienten nützlich. In Abbildung 8.3 sind die negativ dekadischen Logarithmen der effektiven Permeabilität ($-\log Pe$), welche über die ermittelten, zeitabhängigen Konzentrationen in Donor- und Akzeptorphase bei der passiven Diffusion von Propranolol und Koffein berechnet wurden, dargestellt.

In Abbildung 8.3 A wird die bereits diskutierte pH-Abhängigkeit der Polymermembran gegenüber Propranolol deutlich. Die Permeabilität nahm im gerührten Assay von $-\log Pe = 7,00$ (cm s^{-1}) bei pH 5 bis $-\log Pe = 4,17$ (cm s^{-1}) bei pH 9 stetig zu. Zudem konnte durch Rühren der Einfluss des Stofftransportwiderstandes, welcher von den wässrigen Grenzschichten ausging, deutlich minimiert werden. Die effektiv gemessene Permeabilität war im ungerührten PAMPA-System bei pH 9 mit $-\log Pe = 4,57$ (cm s^{-1}) signifikant niedriger als

im gerührten $-\log Pe = 4,17$ (cm s^{-1}). Die Permeabilität der Polymermembran gegenüber Koffein war, wie ebenfalls bereits diskutiert, weder vom pH, noch vom Rührzustand abhängig. Sie lag bei einem nahezu konstanten Wert von $-\log Pe = 5,60$ (cm s^{-1}) (Abbildung 8.3 B).

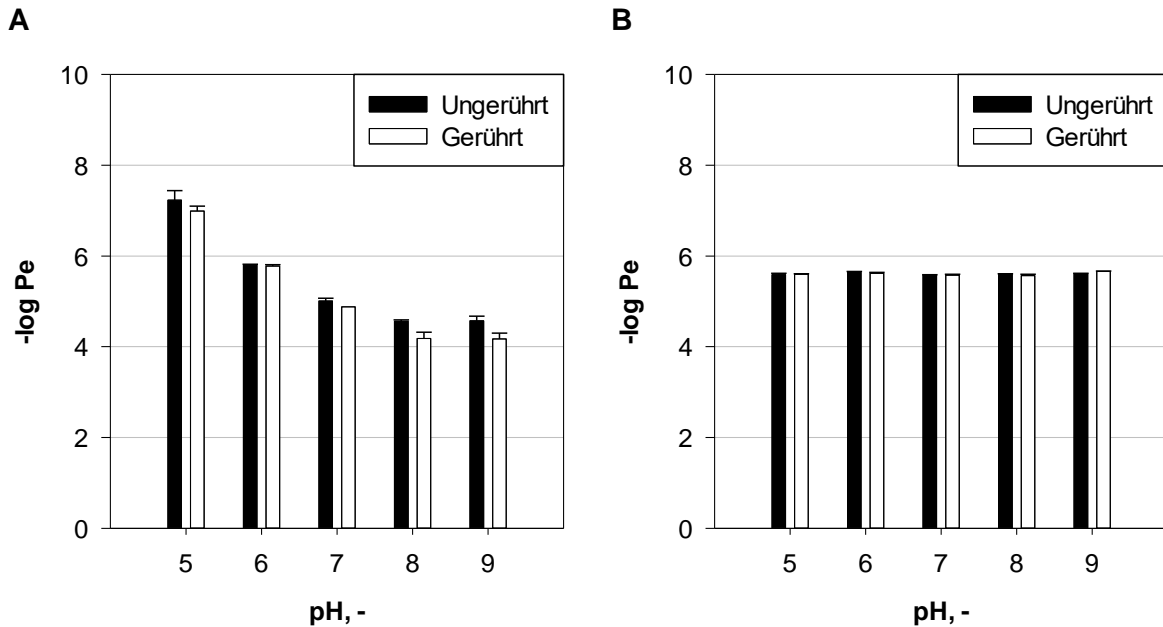


Abbildung 8.3: Negativ dekadischer Logarithmus der Permeabilitätskoeffizienten Pe (cm s^{-1}) von planaren Polymermembranen gegenüber A) Propranolol und B) Koffein in Abhängigkeit des pHs und des Rührzustandes.

8.1.3 Vergleich mit der Permeabilität von planaren Phospholipidmembranen

Um die Größenordnung der in dieser Arbeit bestimmten Permeabilitätskoeffizienten der planaren Polymermembranen einordnen zu können, wurden sie mit den Permeabilitätskoeffizienten von herkömmlichen, planaren Lipidmembranen (2 % w/v DOPC in *n*-Dodekan) verglichen. Die Integrität der gebildeten Lipidmembranen wurde über einen bereits etablierten Farbstoff-Assay, bestehend aus den Komponenten Luzifergelb und Brilliantkresylblau (Kapitel 4.8.1), verifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass der Farbstoff Brilliantkresylblau über die Lipidmembran transportiert werden kann, wohingegen der Fluorophor Luzifergelb nicht über selbige diffundieren konnte. Dies bestätigte die Integrität der gebildeten Lipidmembran.

In Abbildung 8.4 sind die Permeabilitätskoeffizienten der Polymermembranen im ungerührten PAMPA-System in Abhängigkeit vom pH jenen von planaren Lipidmembranen gegenübergestellt. Wie in Abbildung 8.4 A dargestellt, wirkten sich die physikochemischen Eigenschaften von Propranolol bezüglich des passiven Stofftransports bei beiden Membranarten in gleicher Weise aus. Je höher der pH war, desto höher war der Anteil an ungeladenen Propranololmolekülen und desto leichter konnte der Wirkstoff sowohl die

Polymer- als auch die Lipidmembran passieren. Dies zeigte sich anhand der zunehmenden Permeabilität mit steigendem pH von $-\log Pe = 7,23$ (cm s^{-1}) (Polymermembran) beziehungsweise $-\log Pe = 6,29$ (cm s^{-1}) (Lipid-membran) bei pH 5 zu $-\log Pe = 4,57$ (cm s^{-1}) (Polymermembran) beziehungsweise $-\log Pe = 4,41$ (cm s^{-1}) (Lipidmembran) bei pH 9 deutlich.

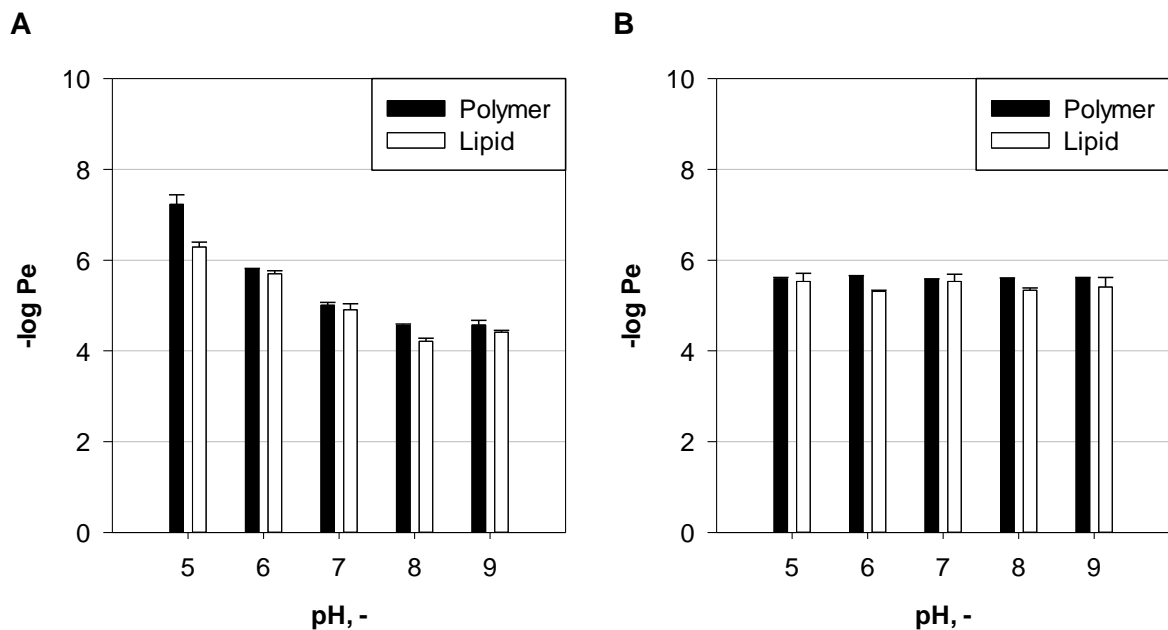


Abbildung 8.4: Negativ dekadischer Logarithmus der Permeabilitätskoeffizienten Pe (cm s^{-1}) von planaren Polymer- und Phospholipidmembranen aus DOPC gegenüber A) Propranolol und B) Koffein im ungerührten PAMPA-System in Abhängigkeit des pHs.

Auch die nicht ionisierbare Struktur von Koffein wirkte sich bei der passiven Diffusion durch planare Lipidmembranen ähnlich wie bei Polymermembranen aus. Die gemessenen Permeabilitätskoeffizienten, dargestellt in Abbildung 8.4 B, waren im Bereich von pH 5 bis pH 9 mit einem Wert von circa $-\log Pe = 5,6$ (cm s^{-1}) (Polymermembran) beziehungsweise $-\log Pe = 5,4$ (cm s^{-1}) (Lipidmembran) konstant. Wie bereits diskutiert, lag die pH-abhängige beziehungsweise pH-unabhängige Permeabilität der beiden Membranarten gegenüber Propranolol und Koffein jedoch nicht an den Membraneigenschaften selbst, sondern vielmehr an den physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Wirkstoffe. Von größerer Bedeutung war folglich der direkte Vergleich der Permeabilität der Polymermembran mit jener der Lipidmembran. In Abbildung 8.5 A und Abbildung 8.5 B sind die Verhältnisse der Permeabilitätskoeffizienten der Lipidmembran Pe_{Lipid} zu jenen der Polymermembran $Pe_{Polymer}$ in Abhängigkeit von pH und Rührzustand für Propranolol und Koffein dargestellt. Die

gestrichelten, horizontalen Linien symbolisieren $Pe_{Lipid} \cdot Pe_{Polymer}^{-1} = 1$, was einer identischen Permeabilität von Polymer- und Lipidmembran entspricht.

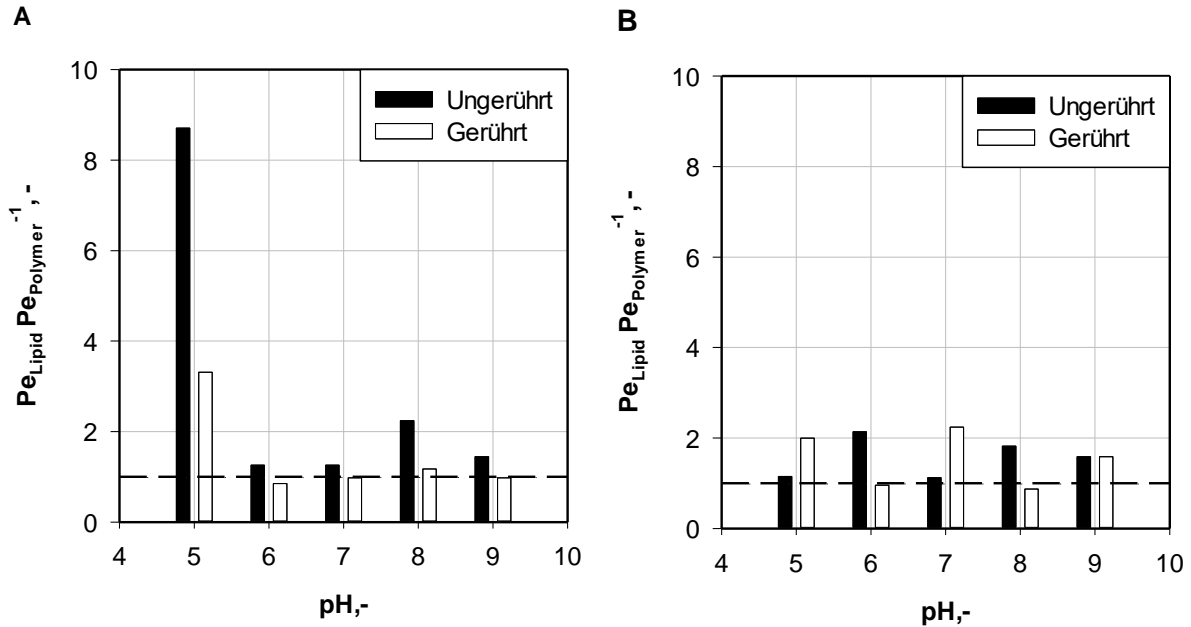


Abbildung 8.5: Verhältnisse der Permeabilitätskoeffizienten der Lipidmembran Pe_{Lipid} zu jenen der Polymermembran $Pe_{Polymer}$ von A) Propranolol und B) Koffein in Abhängigkeit vom pH und des Rührzustandes. Die gestrichelten Linien symbolisiert $Pe_{Lipid} \cdot Pe_{Polymer}^{-1} = 1$, was einer identischen Permeabilität von Polymer- und Lipidmembran entspricht.

In Abbildung 8.5 A wird deutlich, dass die Polymermembran insbesondere im ungerührten PAMPA-System einen deutlich größeren Stofftransportwiderstand gegenüber dem Wirkstoff Propranolol bot als ihr Pendant aus Lipiden. Dies zeigte sich anhand der durchwegs höheren Werte von $Pe_{Lipid} \cdot Pe_{Polymer}^{-1}$, verglichen mit jenen, welche im ungerührten PAMPA-System bestimmt wurden. Besonders deutlich wurde dies bei pH 5. Hier zeigte sich die Polymermembran fast 9 Mal weniger permeabel als jene aus Lipid. Zwischen pH 6 und pH 9 lag dieser Faktor bei Werten zwischen 1,3 und 2,4. Bei Minimierung der wässrigen Grenzschichten durch Rühren relativierte sich dieses Verhalten. Im sauren Milieu bei pH 5 wies die Polymermembran nur noch einen 3,3-fach höheren Stofftransportwiderstand als die Lipidmembran auf. Bei pH 6 bis pH 9 waren die gemessenen Permeabilitätskoeffizienten der beiden Membranen in etwa gleich, was anhand der Werte im Bereich von 0,9 bis 1,2 ersichtlich wird. Die gezeigten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Membran aus dem Polymer PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅ insbesondere im sauren Milieu eine deutlich niedrigere Permeabilität aufwies, als die Lipidmembran aus DOPC. Zudem kann vermutet werden, dass die wässrigen Grenzschichten, welche sich zu beiden Seiten der Polymermembran bildeten, ausgeprägter waren als jene, die sich um die Lipidmembran bildeten. Dies wird anhand der

bei allen pHs identifizierten höheren Werte für $Pe_{Lipid} \cdot Pe_{Polymer}^{-1}$ im ungerührten System, verglichen mit jenen im gerührten System, deutlich. Das pH-unabhängige Verhalten von Koffein zeigte sich auch beim Vergleich der Permeabilitätskoeffizienten der beiden Membrantypen, dargestellt in Abbildung 8.5 B. Unabhängig von pH und Rührzustand war die Lipidmembran im Mittel in etwa 1,6 Mal permeabler als die Polymermembran.

8.1.4 Membranstruktur

Die Erfindung des ursprünglichen PAMPA-Systems basierte auf der Entdeckung, dass sich in zylinderförmigen Poren einer Polycarbonat-Filtermembran eine einzelne Lipiddoppelschicht bildet (Thompson *et al.*, 1980; Thompson, 1982). Die Struktur der Lipidmembranen in PVDF-Filtern, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden, ist hingegen nicht bekannt (Avdeef, 2012a). Um die Struktur der mit Hilfe der Filter gebildeten Polymermembranen aufzuklären, wurden diese über Rasterelektronenmikroskopie untersucht. In Abbildung 8.6 A ist die Struktur des PVDF-Filters zu sehen. In Abbildung 8.6 B ist die Struktur der Polymermembran, welche im PVDF-Filter gebildet wurde, dargestellt.

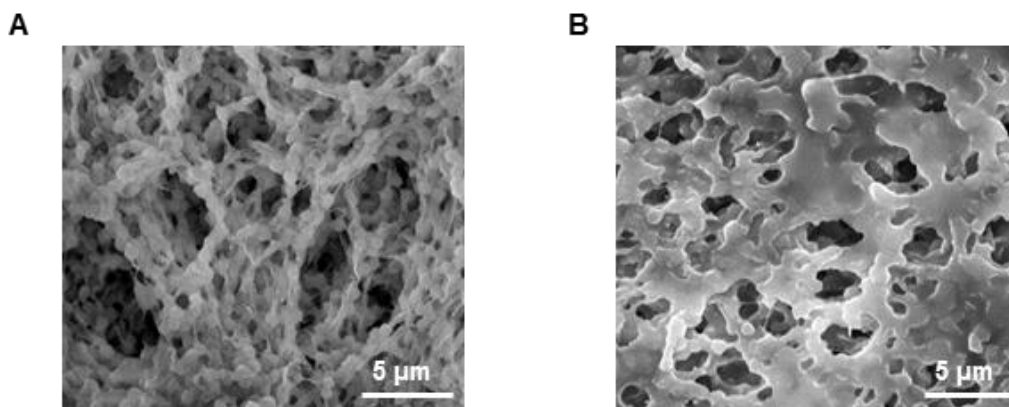


Abbildung 8.6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des A) PVDF-Filters des PAMPA-Systems und B) der gebildeten Polymermembran.

Anhand von Abbildung 8.6 B wird deutlich, dass es sich bei der im PVDF-Filter gebildeten Polymermembran keinesfalls um eine einzelne Membran handelte. Vielmehr zeigte sich eine netzartige Struktur, die aus mehreren Ebenen aufgebaut war. Obwohl die membranbildende Lösung nur an der Oberseite des PVDF-Filters aufgetragen wurde, zeigte sich bei Betrachtung des Filters von beiden Seiten (oben und unten) dieselbe Struktur. Dies ließ vermuten, dass die Morphologie der Polymermembran innerhalb des Filters, welche optisch durch die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme nicht zugänglich war, derselben wie der in Abbildung 8.6 B dargestellten Struktur entsprach. Der mehrschichtige und netzartige Aufbau der Polymermembran deutete darauf hin, dass die im PAMPA-System identifizierten

Permeabilitätskoeffizienten der Polymermembran nicht eins zu eins auf die Membran von Polymersomen, welche eine einzige, kontinuierliche Membran aufweisen, übertragbar sind. Die im PAMPA-System durch die membranbildende Lösung auf dem Filter ausgebildete Schicht aus *n*-Dodekan (Nielsen und Avdeef, 2004), die neben der planaren Polymermembran insbesondere gegenüber hydrophilen Stoffen einen zusätzlichen Stofftransportwiderstand bewirkt, verhinderte die direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse ebenfalls, da diese Lösemittelschicht bei Polymersomen nicht vorhanden ist. Das PAMPA-System wurde demzufolge für die Hoch-Durchsatz-Analyse der Permeabilität von Polymersomenmembranen als nicht geeignet befunden.

8.2 Permeabilität von Polymervesikeln

Um quantitativ haltbare Aussagen über die Permeabilität der Polymersomen, welche über die in dieser Arbeit etablierten Methode (Kapitel 5.1.2) hergestellt wurden, liefern zu können, war die Etablierung einer neuen Methode notwendig. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Permeabilitätskoeffizienten gegenüber der als Modellsustanzen gewählten Wirkstoffe Propranolol und Koffein (Kapitel 3.3.4).

8.2.1 Bestimmung der Permeabilität von Polymersomen

Für die Permeabilitätsbestimmung von Polymersomen wurde in dieser Arbeit eine neue Methode, dargestellt in Abbildung 8.7, entwickelt. Diese beruht auf der Untersuchung des passiven Stofftransportes eines im wässrigen Außenraum gelösten Stoffes in unbeladene Vesikel hinein. Hierfür wurden leere Polymersomen mit Propranolol- oder Koffein-haltigen Lösungen zum Zeitpunkt $t = 0$ (Abbildung 8.7 A) vermengt. Um den danach beginnenden, passiven Stofftransport ins Vesikelinnere bestimmen zu können, wurde die intravesikuläre Konzentration in definierten Zeitintervallen $t_1 - t_n$ (Abbildung 8.7 B, C) bestimmt. Hierfür wurden die Polymersomen über Größenausschlusschromatographie von der sie umgebenden Substanz getrennt. Die Dauer der Chromatographie war mit maximal 5 min im Vergleich zur gesamten Inkubationsdauer von 24-500 h so gering, dass eine Verfälschung der Messwerte durch einen möglichen Wiederaustritt des untersuchten Stoffes während der Reinigung ausgeschlossen wurde. Für die Messung der zeitabhängigen Propranolol- beziehungsweise Koffein-Konzentration im Inneren der Polymersomen wurden diese mit Hilfe von Detergenzien (Kapitel 4.4.3) aufgeschlossen. Die Berechnung der Permeabilität erfolgte anschließend analog zur Bestimmung der Permeabilität von planaren Membranen mit Hilfe von Gleichung

(3.30) und mit der Annahme, dass keine Membranretention auftritt ($c_{eq} = \frac{c_{D,0} V_D}{V_A + V_D}$). Im Folgenden wird die Bestimmung der in die Berechnung eingehenden Werte erläutert.

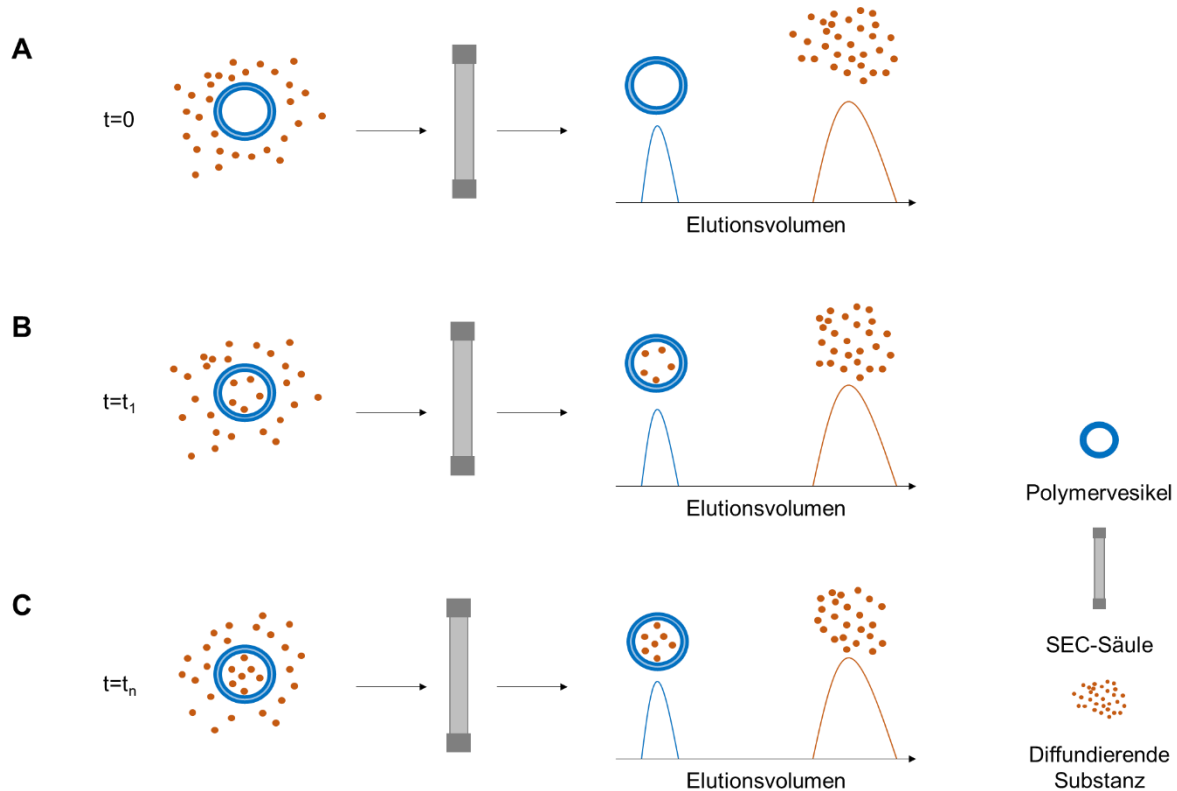


Abbildung 8.7: A) Zum Zeitpunkt $t = 0$ werden unbeladene Polymersomen mit der zu untersuchenden Substanz vermengt und direkt im Anschluss über eine 2,5 mL SEC-Säule gereinigt. Die Fraktionen, die die noch unbeladenen Polymersomen enthalten dienen zur Herstellung eines Standards mit definierten Konzentrationen der zu quantifizierenden Substanz. B) und C) Nach dem Zeitpunkt $t = 0$ beginnt die passive Diffusion der Substanz in die leeren Vesikel hinein. Zu definierten Zeitpunkten t_1 bis t_n werden die Polymersomen mittels SEC von der sie umgebenden Substanz gereinigt. Nach Lyse der beladenen Vesikel kann über den Standard die Konzentration der zu untersuchenden Substanz im Inneren der Polymersomen bestimmt werden.

Der Bezug zwischen Probenvolumen V_∞ und der in die Berechnung eingehenden Volumina der Donorphase V_D und der Akzeptorphase V_A wurde über Gleichung (4.5) hergestellt. Das Akzeptorphasenvolumen entspricht dabei dem gesamten inneren Vesikelvolumen, welches über das Produkt der in der Probe vorliegenden Vesikelanzahl N_V und dem inneren Vesikelvolumen eines einzelnen Polymersoms $V_{V,0}$ über $V_A = N_V V_{V,0}$ bestimmt wurde. Die Vesikelanzahl in der Probe konnte mit Hilfe der in dieser Arbeit bestimmten Aggregationszahl $N_{Agg} = 43.000$ (Kapitel 6.1.1) über Gleichung (6.7) berechnet werden. Das innere Vesikelvolumen eines einzelnen Polymersoms hingegen wurde mit der über cryo-TEM Messungen bestimmten Membrandicke $s = 14$ nm (Kapitel 6.1.2) und dem über Messungen

der dynamischen Lichtstreuung bestimmten mittleren anzahlbasierten Partikeldurchmesser d_N , welcher dem äußeren Vesikeldurchmesser d_a entspricht ($d_N = d_a$), wie folgt bestimmt:

$$V_{V,0} = \frac{1}{6} \pi (d_N - 2s)^3 \quad (8.1)$$

$V_{V,0}$	Inneres Vesikelvolumen eines einzelnen Vesikels	cm^3
d_N	Anzahlbasierter Partikeldurchmesser	cm
s	Membranstärke	cm

Die gesamte für den Stofftransport zur Verfügung stehende Fläche A wurde über das Produkt der Anzahl aller Polymersomen N_V und der äußeren Membranoberfläche eines einzelnen Polymersoms $A_{V,0}$ über $A = N_V A_{V,0}$ berechnet. Die Oberfläche eines einzelnen Polymersoms konnte wiederum über den anzahlbasierten Polymersomendurchmesser d_N über folgende Gleichung berechnet werden:

$$A_{V,0} = \pi d_N^2 \quad (8.2)$$

$A_{V,0}$	Membranoberfläche eines einzelnen Polymersom	cm^2
-----------	--	---------------

Die für die Berechnung der Polymersomenpermeabilität notwendigen Werte sind exemplarisch für 1 mL (= 1 cm^3) einer 1 % w/v Polymersomendispersion aus PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅ mit einem anzahlbasierten, mittleren Polymersomendurchmesser von $d_N = 100$ nm in Tabelle 8-1 zusammengefasst.

Tabelle 8-1: Gesammelte Werte für die Berechnung der Polymersomenpermeabilität

Symbol	Bezeichnung	Wert
V_∞	Probenvolumen	1 cm^3
c_P	Polymerkonzentration	1 % w/v
d_N	Anzahlbasierter Partikeldurchmesser	100 nm
N_V	Vesikelanzahl	$1,84 \cdot 10^{13}$
$V_{V,0}$	Inneres Vesikelvolumen eines einzelnen Vesikels	$1,95 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^3$
V_A	Akzeptorphasenvolumen	$3,6 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3$
V_D	Donorphasenvolumen	$9,9 \cdot 10^{-1} \text{ cm}^3$
$A_{V,0}$	Membranoberfläche eines einzelnen Polymersoms	$3,14 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2$
A	Gesamte Fläche	5789 cm^2

8.2.2 Permeabilität von Polymersomen gegenüber Propranolol und Koffein

Basierend auf der in dieser Arbeit etablierten Methode zur Bestimmung der Polymersomenpermeabilität (Kapitel 8.2.1) wurde der passive Stofftransport der Modellstoffe Propranolol und Koffein in leere Polymersomen hinein untersucht. Die Polymersomen, welche für die Untersuchung der Permeabilität bei pH 6, pH 7 und pH 8 (Phosphatpuffer) hergestellt wurden, wiesen ein z -Mittel von circa 175 nm, einen PDI < 0,2 und einen anzahlbasierten Durchmesser d_N im Bereich von 85 nm bis 101 nm auf (Ergebnisse nicht dargestellt).

Dimensionsloser Konzentrationsverlauf

Um den passiven Stofftransport von Propranolol und Koffein über die Polymersomenmembran miteinander vergleichen zu können, wurde der dimensionslose Konzentrationsverlauf der Akzeptorphase $Ak_{Vesikel}$ über Gleichung (4.6) bestimmt. $Ak_{Vesikel}$ kann nach Gleichung (4.7) maximal den Grenzwert 1 erreichen, was gleichbedeutend mit dem Erreichen der Gleichgewichtskonzentration c_{eq} ist.

Bei der passiven Diffusion von Propranolol, dargestellt in Abbildung 8.8 A, wurde in saurem Milieu bei pH 6 innerhalb von 70 h mit $Ak_{Vesikel} = 0,49$ in etwa die halbe Gleichgewichtskonzentration erreicht. In neutralem Milieu bei pH 7 war ein schnellerer Stofftransport als bei pH 6 zu verzeichnen. Mit $Ak_{Vesikel} = 0,67$ war hierbei innerhalb der identischen Inkubationszeit (70 h) deutlich mehr Propranolol ins Vesikellinnere gelangt. In basischem Milieu bei pH 8 erfolgte der Stofftransport sogar noch schneller. Hier wurde die halbe Gleichgewichtskonzentration mit $Ak_{Vesikel} = 0,50$ bereits nach 24 h verzeichnet. Die charakteristischen, physikochemischen Eigenschaften von Propranolol mit resultierendem pH-abhängigen passivem Stofftransport wurden demnach auch bei der Untersuchung der Permeabilität der sphärischen Polymersomenmembranen ersichtlich. In Abbildung 8.8 B ist der dimensionslose Konzentrationsverlauf $Ak_{Vesikel}$ bei der passiven Diffusion von Koffein dargestellt. Hierbei konnte im betrachteten Zeitraum von bis zu 525 h keine pH-abhängige Diffusion des Wirkstoffes verzeichnet werden. Die nichtionisierbare Struktur von Koffein mit resultierender pH-unabhängigem Verhalten konnte demnach anhand der etablierten Methode zur Bestimmung der Polymersomenpermeabilität ebenfalls gezeigt werden. Im neutralen Milieu bei pH 7 war nach einer Inkubationszeit von knapp 70 h eine dimensionslose Akzeptorphasenkennzahl von $Ak_{Vesikel} = 0,04$ zu verzeichnen. Bei der Diffusion von Propranolol bei selben pH war nach identischer Inkubationszeit ein circa 17-fach höherer Wert bestimmt worden. So wird deutlich, dass Koffein die Polymersomenmembran in neutralem Milieu deutlich langsamer passierte als Propranolol.

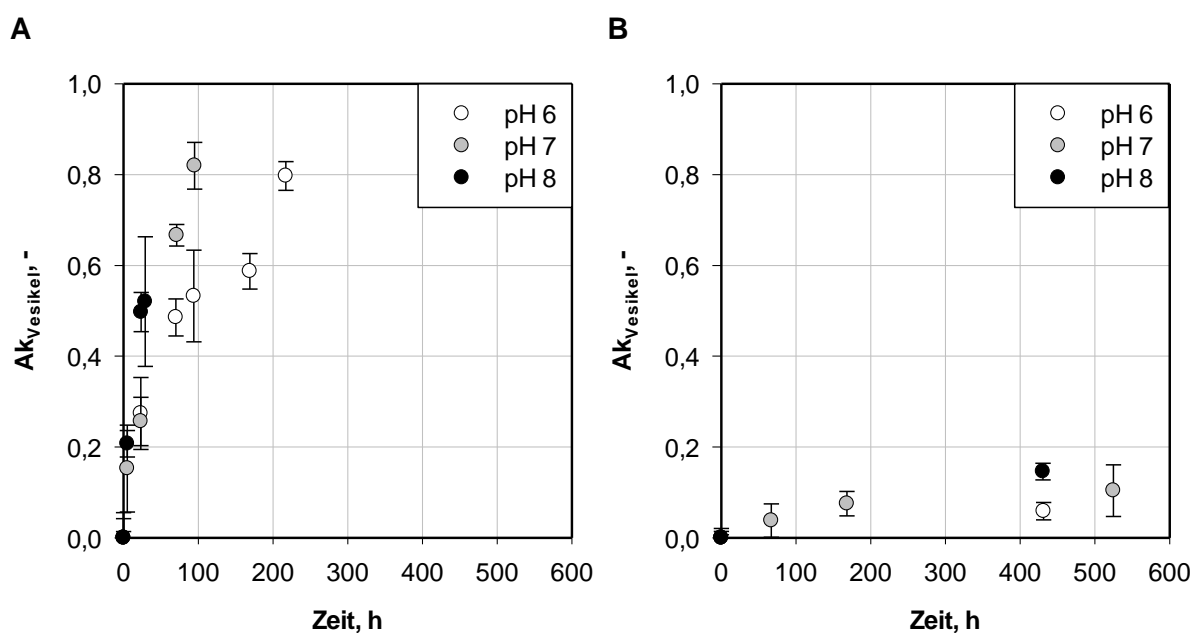


Abbildung 8.8: Dimensionsloser Konzentrationsverlauf der Akzeptorphase ($Ak_{Vesikel}$) bei Untersuchung des passiven Stofftransportes von A) Propranolol und B) Koffein über die Polymersomenmembran bei pH 6 bis pH 8. N = 3.

Die Gesamtheit der gewonnenen Ergebnisse bezüglich der Auswirkungen der physikochemischen Eigenschaften von Propranolol und Koffein auf den passiven Stofftransport über Polymersomenmembranen war mit den vorab anhand planarer Membranen gewonnenen Erkenntnissen in Einklang (Kapitel 8.1). So konnte auf die Funktionalität der etablierten Methode zur Untersuchung der Permeabilität von Polymersomen geschlossen werden.

Permeabilitätskoeffizienten

Neben der Untersuchung des dimensionslosen Konzentrationsverlaufs im Vesikelinneren wurde zudem zu jeder untersuchten Inkubationszeit der Permeabilitätskoeffizient Pe der Polymersomenmembran bestimmt. Abbildung 8.9 zeigt das Mittel aus allen bestimmten Koeffizienten. Die pH-abhängige Permeabilität der Polymersomenmembran gegenüber Propranolol wird bei Betrachtung der Permeabilitätskoeffizienten in Abbildung 8.9 erneut deutlich. Mit $-\log Pe = 11,33$ (cm s^{-1}) war die Permeabilität in basischem Milieu bei pH 8 in etwa 3,4 Mal höher als in saurem Milieu bei pH 6 mit $-\log Pe = 11,86$ (cm s^{-1}). Die Permeabilitätskoeffizienten der Polymersomenmembran gegenüber Koffein zeigten sich pH-unabhängig und lagen im Mittel bei $-\log Pe = 13,66$ (cm s^{-1}). In neutralem Milieu bei pH 7 war die Polymersomenmembran gegenüber Koffein demnach circa 100 Mal weniger permeabel als gegenüber Propranolol.

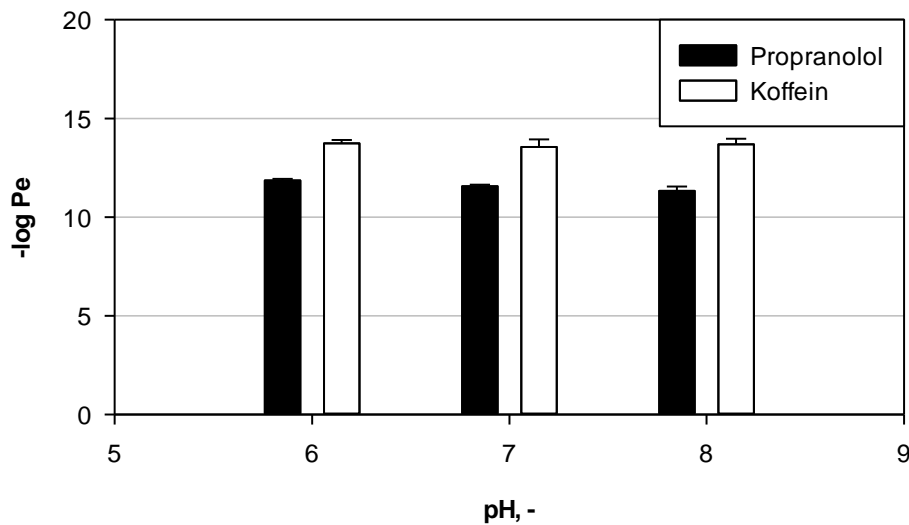


Abbildung 8.9: Negativ dekadischer Logarithmus der Permeabilitätskoeffizienten Pe (cm s^{-1}) von Polymersomen gegenüber Propranolol und Koffein in Abhängigkeit des pHs.

8.3 Vergleich von planaren Membranen und Polymervesikeln

In dieser Arbeit wurden sowohl die Permeabilitätskoeffizienten von planaren Polymermembranen (Kapitel 8.1) als auch von Polymersomen (Kapitel 8.2) bestimmt. Für einen sinnvollen Vergleich der identifizierten Koeffizienten werden zunächst die Charakteristika der beiden zugehörigen Methoden gegenübergestellt.

8.3.1 Gegenüberstellung des PAMPA- und des Polymersomen-Systems

Bei der Berechnung der Permeabilitätskoeffizienten über Gleichungen (3.28) und (3.30) gehen neben der zeitabhängigen Konzentration in Donor- und Akzeptorphase ($c_{D,t}$ und $c_{A,t}$) vor allem auch die Volumina von Donor- und Akzeptorphase (V_D und V_A) sowie die für den Stoffaustausch zur Verfügung stehende Fläche A ein. Im PAMPA-System sind die Volumina für Donor und Akzeptor identisch und durch die Größe der Kavität der *Sandwich*-Mikrotiterplatten definiert. Im Polymersomen-System hingegen wurden V_D und V_A über Gleichung (4.5) und Gleichung (8.1) berechnet. Die für den Stoffaustausch zur Verfügung stehende Fläche A wurde im PAMPA-System über das Produkt aus Filterfläche und Filterporosität bestimmt (Kapitel 4.8.1), wohingegen im Polymersomen-System die Membranoberfläche aller in der Probe vorliegenden Polymersomen über Gleichung (8.2) berechnet wurde. Um die direkte Gegenüberstellung der beiden Systeme zu ermöglichen, wurde das ungerührte PAMPA-System mit einem gesamten Volumen von 0,4 mL (je 0,2 mL in Donor- und Akzeptorkompartiment) mit einer Polymersomendispersion mit demselben

Probenvolumen V_{∞} verglichen. Für die 1 % w/v Polymersomendispersion wurde ein mittlerer anzahlbasierter Partikeldurchmesser $d_N = 100$ nm angenommen. In Tabelle 8-2 sind die resultierenden, zur Permeabilitätsberechnung notwendigen Werte für das PAMPA- und das Polymersomen-Systems gegenübergestellt.

Tabelle 8-2: Gegenüberstellung der zur Berechnung der Permeabilitätskoeffizienten notwendigen Größen bei planaren Polymermembranen im PAMPA-System und bei Polymersomen.

	PAMPA	Polymersomen
Anmerkung	ungerührt	1 % w/v Dispersion mit $d_N = 100$ nm
V_{∞}, cm^3	0,4	0,4
V_A, cm^3	0,2	$1,44 \cdot 10^{-3}$
V_D, cm^3	0,2	$3,96 \cdot 10^{-1}$
A, cm^2	0,21	2316
t, h	0,5-48	Abhängig von der Lagerstabilität der Polymersomen

Beim direkten Vergleich der Werte in Tabelle 8-2 sticht insbesondere die für den Stoffaustausch zur Verfügung stehende Fläche A hervor. Bei Betrachtung des gesamten Volumens von 0,4 mL betrug sie im PAMPA-System $0,21 \text{ cm}^2$ (Kapitel 4.8.1), wohingegen sie im Polymersomen-System mit 2316 cm^2 in etwa 10.000 Mal größer war. Dies wies bereits darauf hin, dass Polymersomen insbesondere zur Untersuchung sehr niedriger Permeabilitäten gut geeignet sein könnten, da hier eine besonders große Fläche für den passiven Stofftransport zur Verfügung steht. Um dies zu validieren, wurden dimensionslose Konzentrationsverläufe beider Systeme verglichen.

Für den direkten Vergleich der dimensionslosen Konzentrationsverläufe der Akzeptorphasen im PAMPA- und im Polymersomen-System, wurde die für beide Systeme gültige Akzeptorphasenkennzahl Ak mit $0 < Ak < 1$ eingeführt. Diese wurde nach Umformung von Gleichung (3.30) in Abhängigkeit des Permeabilitätskoeffizienten Pe wie folgt bestimmt:

$$Ak = \frac{c_{A,t}}{c_{eq}} = 1 - \exp\left(-\frac{Pe(V_A + V_D)At}{V_A V_D}\right) \quad (8.3)$$

Ak	Dimensionslose Akzeptorphasenkennzahl	-
$c_{A,t}$	Konzentration in der Akzeptorphase zum Zeitpunkt t	mol cm ⁻³
c_{eq}	Gleichgewichtskonzentration nach Gleichung (3.28)	mol cm ⁻³
Pe	Permeabilitätskoeffizient	cm s ⁻¹
V_A	Volumen der Akzeptorphase	cm ³
V_D	Volumen der Donorphase	cm ³
A	Fläche	cm ²
t	Zeit	s

In Abbildung 8.10 sind die über Gleichung (8.3) berechneten Verläufe von Ak bei einem exemplarisch gewählten Permeabilitätskoeffizienten von $-\log Pe = 5,00$ (cm s⁻¹) (hohe Permeabilität) und $-\log Pe = 11,00$ (cm s⁻¹) (geringe Permeabilität) für planare Membranen im PAMPA-System und für Polymersomen gegenübergestellt. Bei $-\log Pe = 5,00$ (cm s⁻¹), dargestellt in Abbildung 8.10 A, ist der Stofftransport anhand der dimensionslosen Kennzahl Ak im PAMPA-System innerhalb von 48 h Inkubationszeit gut zu bestimmen. Im Polymersomen-System hingegen wäre die Konzentrationsbestimmung in der Akzeptorphase aufgrund der signifikant höheren Stoffaustauschfläche nur bei Inkubationszeiten im Bereich von Zehntelsekunden möglich, was anhand des zugehörigen sprunghaften Anstiegs von Ak ersichtlich ist. Bei einer um fünf Größenordnungen niedrigen Permeabilität mit $-\log Pe = 11,00$ (cm s⁻¹) wäre wiederum die passive Diffusion im PAMPA-System innerhalb der möglichen Inkubationsdauer von 48 h kaum nachweisbar. Dies wird anhand des zugehörigen, nahezu horizontalen Verlaufs von Ak in Abbildung 8.10 B deutlich. Solch niedrige Permeabilitäten sind im Polymersomen-System hingegen problemlos quantifizierbar. Anhand dieser Gegenüberstellung wurde klar, dass die beiden Systeme zur Untersuchung der Membranpermeabilität für Stoffflüsse unterschiedlicher Größenordnung geeignet sind.

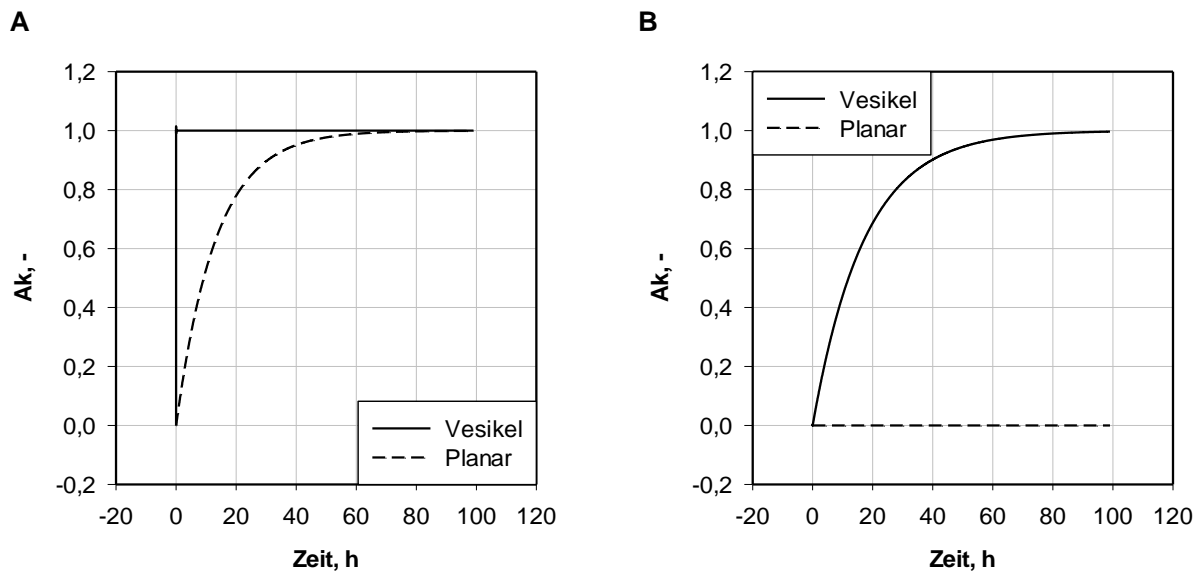


Abbildung 8.10: Verlauf der dimensionslosen Akzeptorphasenkennzahl A_k im PAMPA-System und bei einer 1 % w/v Polymersomendispersion mit einem anzahlbasierten mittleren Partikeldurchmesser $d_N = 100 \text{ nm}$ bei einer Permeabilität von A) $-\log Pe = 5,00 \text{ (cm s}^{-1}\text{)}$ und B) $-\log Pe = 11,00 \text{ (cm s}^{-1}\text{)}$.

8.3.2 Vergleich der Permeabilitätskoeffizienten

Der direkte Vergleich der in dieser Arbeit identifizierten Permeabilitätskoeffizienten von planaren Polymermembranen (Kapitel 8.1) und Polymersomen (Kapitel 8.2) bei der passiven Diffusion von Propranolol und Koffein ist Abbildung 8.11 A beziehungsweise Abbildung 8.11 B dargestellt. Erkennbar ist, dass sich die Polymersomenmembran unabhängig vom verwendeten Modellsstrat um mehrere Größenordnungen weniger permeabel als jene von planaren Polymermembranen erwies. Im neutralen Milieu bei pH 7 war die Polymersomenmembran mit $-\log Pe = 11,57 \text{ (cm s}^{-1}\text{)}$ in etwa 3,6 Millionen Mal weniger permeabel als die planare Polymermembran im ungerührten PAMPA-System mit $-\log Pe = 5,01 \text{ (cm s}^{-1}\text{)}$. Bei der passiven Diffusion von Koffein bei pH 7 wurde ein noch höherer Faktor verzeichnet. Hier zeigte sich die Polymersomenmembran mit $-\log Pe = 13,56 \text{ (cm s}^{-1}\text{)}$ um circa 95 Millionen Mal weniger permeabel als die planare Polymermembran mit $-\log Pe = 5,58 \text{ (cm s}^{-1}\text{)}$.

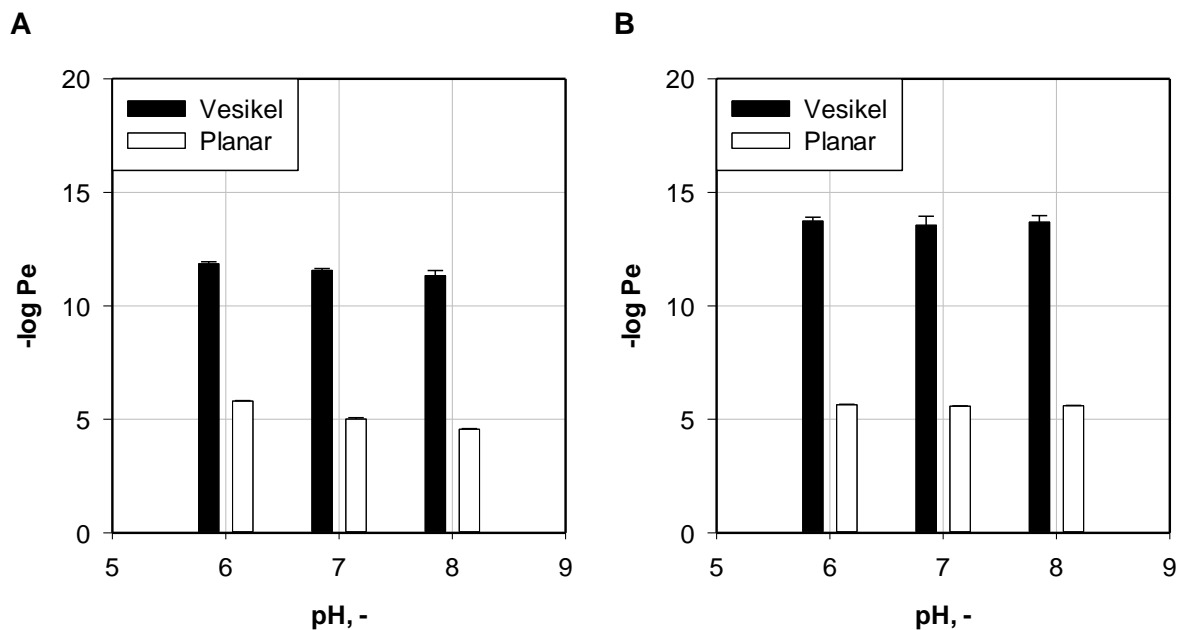


Abbildung 8.11: Negativ dekadischer Logarithmus der Permeabilitätskoeffizienten Pe (cm s^{-1}) von planaren Polymermembranen im ungerührten PAMPA-System und von Polymervesikeln gegenüber A) Propranolol und B) Koffein in Abhängigkeit des pHs.

Anhand der in dieser Arbeit identifizierten Permeabilitätskoeffizienten zeigte sich, dass das etablierte Polymersomen-System sehr gut für die Untersuchung von Membranen mit niedriger Permeabilität geeignet ist. Das PAMPA-System, welches ursprünglich für die Untersuchung von planaren Lipidmembranen entwickelt wurde, ist hingegen für die Charakterisierung der Polymersomenmembran ungeeignet.

8.4 Diskussion

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten Modelstoffen Propranolol und Koffein wurde für die Untersuchung der Permeabilität von Membranvesikeln in verschiedenen Studien der Fluorophor Calcein herangezogen (Heerklotz und Seelig, 2007; Litvinchuk *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2009; Maherani *et al.*, 2013). Um die in der vorliegenden Arbeit bestimmte Permeabilität von Polymermembranen anhand der in anderen Studien publizierten Werte einordnen zu können, wurde zusätzlich die Bestimmung der Membranpermeabilität gegenüber Calcein angestrebt. Trotz der hervorragenden Nachweisbarkeit des Fluorophors war die passive Diffusion über planare Lipidmembranen im PAMPA-System, für welche eine verhältnismäßig hohe Membranpermeabilität gezeigt werden konnte (Kapitel 8.1.3), so gering, dass innerhalb der maximal möglichen Inkubationsdauer von 48 h in der Akzeptorphase kein Calcein nachgewiesen werden konnte. Über die Nachweisgrenze konnte lediglich der

Grenzwert von $-\log Pe > 11,8$ (cm s^{-1}) bestimmt werden, was beutet, dass der tatsächliche Permeabilitätskoeffizient von DOPC-Membranen gegenüber Calcein weit niedriger liegen kann. Für Liposomen, welche aus demselben Phospholipid (DOPC) hergestellt wurden, wurde hingegen ein Permeabilitätskoeffizient von $-\log Pe = 10,6$ (cm s^{-1}) berichtet (Maherani et al., 2013). Für Lipidvesikel aus DOPC wurde demzufolge eine mehr als 10-fach höhere Permeabilität nachgewiesen, als es im Rahmen dieser Arbeit für planare DOPC-Membranen gezeigt werden konnte. Dies macht erneut deutlich, dass planare Membranen, welche im PAMPA-System gebildet wurden, kaum Rückschlüsse auf die tatsächlichen Permeabilitätskoeffizienten von Membranvesikeln zulassen.

Polymersomen aus PMOXA-PDMS-PMOXA erwiesen sich im Rahmen verschiedener Studien für eine Mehrzahl der bislang untersuchten Moleküle als impermeabel. Für einige Stoffe hingegen, wie beispielsweise Superoxidanionen und Guanidinhydrochlorid, konnte gezeigt werden, dass sie die Vesikelmembran passieren können (Renggli et al., 2011). Daraus wurde gefolgert, dass die Permeabilität von Polymersomenmembranen für jeden einzelnen Stoff getrennt betrachtet werden muss. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit entwickelten Methode basiert die Bestimmung der Permeabilität von Polymersomen häufig auf der passiven Diffusion eines vorab verkapselten Stoffes aus dem Vesikelinneren in den wässrigen Außenraum (Heerklotz und Seelig, 2007; Patel et al., 2009; Maherani et al., 2013). Problematisch bei diesem Vorgehen ist jedoch die Voraussetzung, dass der zu untersuchende Stoff in ausreichend hoher Konzentration verkapselbar sein muss. Nur wenn dies der Fall ist, kann die zeitliche Konzentrationsänderung außerhalb der Vesikel gemessen werden. Dies ist oft nicht gegeben, da hohe Konzentrationen den Vesikelbildungsprozess während der Verkapselung stören können, wie in Kapitel 6.2 gezeigt. Ein weiterer Aspekt, welcher die Bestimmung der Permeabilität mittels des Stofftransports vom Vesikelinneren nach außen erschwert, liegt in der Nachweisbarkeit der zu untersuchenden Substanz. Bei einer exemplarischen Verkapselungseffizienz VE von 1 %, wie sie in dieser Arbeit bei mit grün fluoreszierendem Protein beladenen Polymersomen bestimmt wurde (Kapitel 6.2.2), läge bei vollständiger Freisetzung des Stoffes außerhalb der Vesikel eine 100-fach niedrigere Konzentration vor. Soll nun der Austritt von 1 % der vorab verkapselten Substanz nachgewiesen werden, muss diese bei einer 10.000-fach niedrigeren Konzentration als jene die verkapselt wurde, detektierbar sein. Dies kann je nach Substanz und Messmethode Schwierigkeiten mit sich bringen.

Der Permeabilitätskoeffizient einer Membranart stellt bei Betrachtung des passiven Stofftransportes einer bestimmten Substanz eine Stoffkonstante dar, welche unabhängig von der Stoffstromrichtung (von außen ins Vesikelinnere oder von innen nach außen) ist. So wurde es in dieser Arbeit in Anlehnung an das Vorgehen anderer Studien angestrebt, die

Permeabilitätskoeffizienten, welche über den passiven Stofftransport in leere Vesikel hinein bestimmt wurden, durch den umgekehrten Fall, nämlich der Permeabilitätsbestimmung über den passiven Stofftransport der vorab verkapselten Substanz aus den Vesikeln heraus, zu validieren. Dieses Vorhaben scheiterte jedoch daran, dass weder Propranolol, noch Koffein in ausreichend hoher Konzentration verkapselbar waren. Während sich bei dem Versuch die nötige Konzentration von 0,1 M Propranolol zu verkapseln nahezu ausschließlich Mizellen bildeten (Ergebnisse nicht dargestellt), war die Beladung der Polymersomen mit derselben Konzentration an Koffein aufgrund unerwünschter Interaktion des Polymers mit dem Wirkstoff und daraus resultierender Kristallbildung ebenfalls nicht möglich. Folglich hätte die Permeabilität der Polymersomenmembran gegenüber Propranolol und Koffein mittels konventioneller Methoden nicht bestimmt werden können, was den Vorteil der in dieser Arbeit etablierten Methode erneut verdeutlicht. Die Permeabilitätskoeffizienten der Polymersomenmembran gegenüber Propranolol und Koffein lag im Bereich von $-\log Pe = 11,33-13,73$ (cm s^{-1}). Da die Permeabilität von Phospholipidmembranen gegenüber ungeladene Moleküle vergleichbarer Größe bei Werten im Bereich von $-\log Pe = 7-8$ (cm s^{-1}) liegt (Alberts *et al.*, 1994), konnte gezeigt werden, dass die Permeabilität der Polymersomenmembran um mehrere Größenordnungen niedriger ist.

9 Zusammenfassung

Ein wesentlicher Nachteil bei der Verwendung von ganzen Zellen in biokatalytischen Prozessen ist das Auftreten unerwünschter Nebenreaktionen, die durch zelleigene Enzyme katalysiert werden können. Der alternative Einsatz von artifiziellen Reaktionskompartimenten im Nanomaßstab stellt eine Möglichkeit zur Verwirklichung von nebenproduktfreien, biokatalytischen Prozessen dar. Die künstlichen Nanokompartimente sollen nur die für die gewünschte Produktsynthese nötigen Komponenten enthalten, wodurch unerwünschte Nebenreaktionen verhindert werden können. Aufgrund der räumlichen Trennung unterschiedlicher Enzyme und dank der Kontrolle über die beteiligten Reaktanden können selbst Reaktionen, die eigentlich inkompatibel sind, gleichzeitig stattfinden. Polymerbasierte Membranvesikel, sogenannte Polymersomen, können hierbei durch das Verkapseln von Enzymen in ihrem Inneren und über die zusätzliche Funktionalisierung ihrer Membran als Enzymmembranreaktor im Nano-Maßstab fungieren. Über konventionelle Herstellungsmethoden, welche bislang überwiegend bei undefinierten Prozessbedingungen im Milliliter-Maßstab stattfinden, können Polymersomen mit definierter Größe meist nur in zeitaufwendigen, mehrstufigen Prozessen erzielt werden (Nardin *et al.*, 2000a; Nardin *et al.*, 2000b; Rank *et al.*, 2009). Des Weiteren existiert bis dato kein Verfahren, welches die kontrollierte und effiziente Herstellung von Polymersomen mit schmaler Partikelgrößenverteilung im großen Maßstab und in nur einem Prozessschritt ermöglicht, was jedoch unabdingbar für die industrielle Anwendbarkeit der Polymersomentechnologie ist. Quantitative Größen zur Polymersomenstabilität bei für biokatalytische Prozesse relevanten Bedingungen liegen bislang ebenso wenig vor, wie umfassende Studien bezüglich der membranspezifischen Permeabilitätskoeffizienten. Zielsetzung dieser Arbeit war daher die Herstellung und Charakterisierung von Polymersomen aus selbstassemblierenden, amphiphilen ABA-Triblock-Copolymeren. Verwendet wurde hierfür das Polymer PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅, da für Polymersomen aus diesem Polymer bereits die erfolgreiche Insertion von Membranproteinen, welche für die Realisierung eines selektiven Stofftransportes essentiell ist, gezeigt werden konnte (Nardin *et al.*, 2000b).

Die Entwicklung eines Verfahrens zur reproduzierbaren, effizienten und skalierbaren Polymersomenherstellung erfolgte im kommerziell verfügbaren Bioreaktorsystem bioREACTOR 48, einem Reaktorblock, in welchem bis zu 48 miniaturisierte Rührkesselreaktoren (10-15 mL) unter definierten Prozessbedingungen parallel betrieben werden können. Wichtigstes Kriterium bei der Verfahrensentwicklung war das Erzielen schmaler Partikelgrößenverteilungen mit niedrigem Polydispersitätsindex ($PDI < 0,2$), was

mittels dynamischer Lichtstreuungsmessungen (DLS) untersucht wurde. Bei der Polymersomenherstellung über die Methode der direkten Dispersion, bei welcher pulverförmiges Polymer direkt in der wässrigen Phase dispergiert wird, stellte sich heraus, dass die Strömungsbedingungen im Rührkesselreaktor signifikante Auswirkungen auf die resultierende Polymersomenqualität zeigten. Durch systematische Untersuchungen unter Verwendung der vier Rührertypen gasinduzierender Rührer, Paddelrührer, H-Rührer und S-Rührer bei Rührerdrehzahlen zwischen 1000 min^{-1} und 4000 min^{-1} in bewehrten und unbewehrten Reaktoren, konnten optimale Strömungsbedingungen identifiziert werden. Es zeigte sich, dass, unabhängig von Rührertyp, Rührerdrehzahl und Prozessdauer, in Reaktoren ohne Strömungsbrecher stets niedrigere Polydispersitäten als in bewehrten Reaktoren erzielt wurden. Zudem konnte für jeden Rührertyp gezeigt werden, dass bei der jeweiligen maximal möglichen Rührerdrehzahl die individuell niedrigsten PDIs resultieren. Die Verwendung des S-Rührers zeigte sich unter den Aspekten Herstellung von Polymersomen mit niedriger Polydispersität, kurzer Prozesszeit und Erzielen reproduzierbarer Ergebnisse als optimal. Bei der Polymersomenherstellung über die Dispersionsmethode führte die Verwendung des S-Rührers bei 4000 min^{-1} in unbewehrten Reaktoren innerhalb von nur 4 h zu einer schmalen Partikelgrößenverteilung mit $\text{PDI} = 0,17$. Da jedoch über die Dispersionsmethode kein vollständiger Umsatz des Polymers erreicht wurde, erfolgte die weiterführende Entwicklung des Prozesses über die Ethanolmethode, bei welcher eine ethanolische Polymerlösung der wässrigen Phase zugeführt wird. Die Verwendung einer 20 % w/v Polymerlösung erlaubte die definierte Zudosierung des Polymers sowohl mit Hilfe einer handelsüblichen Schlauchpumpe als auch automatisiert über einen Pipettierroboter. Dabei zeigte sich der etablierte Standardprozess (S-Rührer, 4000 min^{-1} , unbewehrter Reaktor, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 % v/v Polymerlösung, 1 % w/v Polymersomendispersion, 1-4 h) robust gegenüber Variationen der Zulaufstraten im Bereich von $0,5\text{-}10,0 \text{ mL h}^{-1}$. Zudem konnte die Polymersomendispersion über den etablierten Prozess in einem weiten Temperatur- ($8\text{-}40 \text{ }^\circ\text{C}$), pH- (pH 5 bis pH 8) und Molaritätsbereich ($0\text{-}100 \text{ mM}$) produziert werden, was für den universellen Einsatz von Polymersomen als Enzymmembranreaktoren notwendig ist. Eine niedrige Polydispersität ($\text{PDI} < 0,2$) wurde nach nur circa 1 h erreicht. Der mittlere Partikeldurchmesser (z-Mittel), welcher mittels DLS-Messungen bestimmt wurde, betrug hierbei in etwa 200 nm. Mit Abweichungen von $< 5\%$ bezogen auf PDI und z-Mittel war außerdem eine hervorragende Reproduzierbarkeit des Prozesses gewährleistet. Während mittels transmissionselektronenmikroskopischer (TEM) Aufnahmen die Existenz der Polymersomen visualisiert werden konnte, konnte die Membranstärke s der Vesikel über cryo-TEM Messungen zu 14 nm bestimmt werden. Die mittlere Aggregationszahl N_{Agg} , welche die mittlere Anzahl an Polymerketten pro Vesikel wiedergibt, wurde über statische Lichtstreuungsmessungen bestimmt und betrug 43.000. Zudem

konnten über den etablierten Prozess sowohl kleinere Moleküle wie Calcein (0,6 kDa) als auch deutlich größere Moleküle wie grün fluoreszierendes Protein (29,1 kDa) und das Enzym *N*-Acetylneuraminatlyase (4x34,8 kDa) erfolgreich verkapselt werden.

Für ein tieferes Verständnis des etablierten Prozesses wurde die Aufklärung des Polymersomenbildungsweges angestrebt. Über TEM-Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Polymersomenherstellung konnte der Mechanismus der Vesikelbildung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren aufgeklärt werden: Direkt nach Polymerzugabe zur wässrigen Phase bildeten sich sphärische Mizellen mit einem Durchmesser von circa 30 nm. Durch Fusionsprozesse bildeten diese wiederum innerhalb von maximal 2 min wurmförmige Mizellen. Ausgehend von dieser Morphologie wurden zwei alternative Vesikelbildungsmechanismen identifiziert. Wurm Mizellen waren einerseits in der Lage sich zu Ringen zu schließen und über das Anwachsen zu Donut-förmigen Strukturen schlussendlich die gewünschten Vesikel zu formieren. Über einen alternativen Weg konnten Wurm Mizellen durch weitere Fusionsprozesse scheibenförmige Mizellen bilden, welche sich ab einer kritischen Größe krümmten und korbartige Strukturen bildeten. Durch vollständiges Schließen dieser Körbe entstanden final die gewünschten Vesikel. Die Größenzunahme der unterschiedlichen Morphologien konnte zudem über die Zunahme des z -Mittels (intensitätsbasierter Partikeldurchmesser) verfolgt werden. Anhand der Steigung des initial mit der Zeit linear zunehmenden z -Mittels konnte die Geschwindigkeit der Polymersomenbildung bestimmt werden. Einen sehr deutlichen Einfluss zeigte hierbei die Rührerdrehzahl. Unterhalb von 1000 min^{-1} konnte keine Zunahme der Partikelgröße über die Zeit (Zunahmerate) verzeichnet werden. Während bei 2000 min^{-1} hingegen ein Wert von 3 nm min^{-1} verzeichnet wurde, war die Zunahmerate bei der doppelten Rührerdrehzahl circa zehn Mal höher.

Um die Polymersomentechnologie für industrielle Anwendungen verfügbar zu machen, wurde die Maßstabs-Übertragung des etablierten Prozesses in den Liter-Maßstab (1,5 L) angestrebt. Verwendet werden sollten hierfür herkömmliche, verfahrenstechnische Komponenten, was essentiell für ein kostengünstiges Verfahren ist. Ziel war es, den etablierten Prozess im Liter-Maßstab ebenso schnell und effizient durchführen zu können, wie im kleinen Maßstab. Bei der Polymersomenherstellung im Liter-Maßstab zeigte sich erneut, dass Reaktoren ohne Strömungsbrecher verwendet werden müssen, da im bewehrten Reaktor auch bei langen Prozesszeiten bis zu 48 h keine schmalen Partikelgrößenverteilungen erzielt werden konnten. Zudem führten auch im Liter-Maßstab höhere Rührerdrehzahlen zu schnellerer Polymersomenbildung. Durch systematische Untersuchungen konnte eine erfolgreiche Maßstabs-Übertragung basierend auf der Rührerumfangsgeschwindigkeit u_{tip} , der Reynoldszahl Re , dem volumetrischen Leistungseintrag $P V^{-1}$, der Newtonzahl Ne sowie der

maximalen Energiedissipation ε_{max} ausgeschlossen werden. Da beim etablierten Prozess aufgrund der Verwendung unbewehrter Reaktoren und resultierender Trombenbildung die Erdbeschleunigung g nicht vernachlässigt werden darf, wurde die Maßstab-Übertragung über die dimensionslose Froudezahl $Fr = \frac{n^2 d}{g}$ angestrebt. Verwendet wurden drei unterschiedliche, herkömmliche Propellerrührer mit verhältnismäßig großem dimensionslosen Durchmesser mit $d D^{-1} \geq 0,65$, welche jenem des S-Rührers mit $d D^{-1} = 0,70$ ähnlich waren. Der Betrieb dieser Rührer bei derselben Froudezahl wie im kleinen Maßstab ($Fr = 6,52$) führte mit Zunahmeraten von jeweils 21 nm min^{-1} zu nahezu identisch schneller Polymersomenbildung. Zudem wurden monomodale, schmale Partikelgrößenverteilungen mit $PDI < 0,2$ und einem z-Mittel von circa 180 nm nach circa einer Stunde erreicht. Der Prozess im Liter-Maßstab war demnach ähnlich schnell, wie der etablierte Referenzprozess mit einer Zunahmerate von 31 nm min^{-1} . Über TEM-Aufnahmen konnte zudem, wie in Abbildung 9.1 dargestellt, gezeigt werden, dass die gewünschten Polymersomen hergestellt wurden. Somit konnte die erfolgreiche Maßstabsvergrößerung um Faktor 125 vom kleinen Maßstab (12 mL) in den Liter-Maßstab ($1,5 \text{ L}$) unter Verwendung von herkömmlichen Komponenten und basierend auf soliden dimensionslosen Größen (Fr und $d D^{-1}$) gezeigt werden.

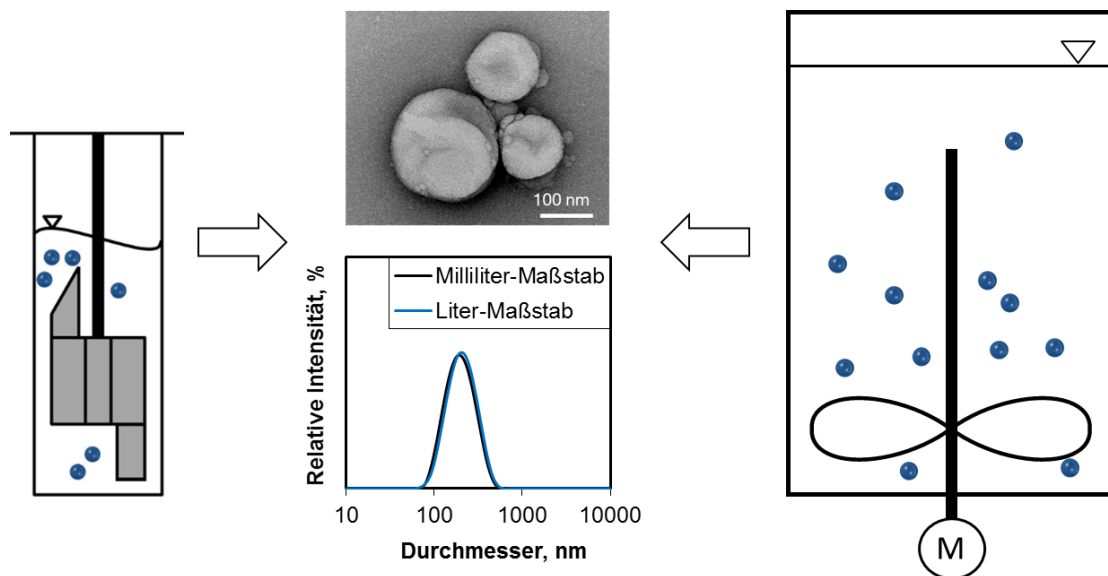


Abbildung 9.1: Über den in miniaturisierten Rührkesselreaktoren etablierten Prozess (S-Rührer, 4000 min^{-1} , unbewehrter Reaktor) konnten Polymersomen mit monomodaler, schmaler Partikelgrößenverteilung erzielt werden. Das Verfahren wurde unter Verwendung von Propellerrührern mit verhältnismäßig großen dimensionslosen Durchmessern mit $d D^{-1} \geq 0,65$ und anhand der dimensionslosen Froudezahl $Fr = 6,52$ erfolgreich in den Liter-Maßstab übertragen. TEM-Aufnahmen zeigen die hergestellten Polymersomen.

Da das verwendete Polymer $\text{PMOXA}_{15}\text{-PDMS}_{68}\text{-PMOXA}_{15}$ ein kostenintensives Ausgangsmaterial darstellte (Listenpreis Polymersource™ 2016: $450 \text{ US-Dollar g}^{-1}$), war die Entwicklung

eines effizienten Wiedergewinnungsprozesses essentiell. Hierfür wurde ein mehrstufiger Prozess aus sukzessiven Evaporations-, Präzipitations- und Filtrations-Schritten etabliert. Der wässrige Anteil der Polymersomendispersion wurde hierfür im ersten Schritt vollständig verdampft. Im zweiten Schritt konnte das Polymer selektiv in Ethanol gelöst werden, wohingegen der größte Anteil an Salzen und anderen Verunreinigungen als Feststoff ausfiel und so über einen anschließenden Filtrationsschritt abgetrennt werden konnte. Durch Verdampfen des Ethanols aus der Polymerlösung konnte das Polymer in seiner ursprünglichen Form zurückgewonnen werden. Untersuchungen mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie zeigten, dass die Reinheit des wiedergewonnenen Polymers mit 97,9 % nur knapp unter jener von neuem Polymer mit einer Reinheit von 98,2 % lag. Mit Hilfe desselben Prozesses konnte außerdem Polymer aus mit Protein verunreinigten Polymersomendispersionen zurückgewonnen werden. Hierfür wurde der etablierte Wiedergewinnungsprozess mehrfach wiederholt. Dabei wurde das Volumen an Ethanol, in welchem das Polymer hervorragend, Proteine aber kaum löslich sind, bei jedem Zyklus verringert. Auf diese Weise konnte das Polymer einer Polymersomendispersion, welche mit $623 \mu\text{g L}^{-1}$ Protein verunreinigt war, innerhalb von vier Zyklen mit einer Reinheit von 97,7 % wiedergewonnen werden.

Hinsichtlich der Verwendbarkeit von Polymersomen für industrielle Zwecke ist deren Lagerstabilität von großem Interesse. Deshalb wurde die Lagerfähigkeit von unbeladenen und beladenen Polymersomen untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine 1 % w/v Dispersion unbeladener Polymersomen, welche über den etablierten Prozess mittels Ethanolmethode hergestellt wurden, mindestens 1 Jahr bei 4 °C und bei Raumtemperatur gelagert werden konnte. Die mittlere Abweichung vom ursprünglichen z-Mittel und PDI lag bei maximal 8 %. Unerwünschte Agglomeration der Vesikel untereinander trat hierbei nicht auf. Bei Polymersomendispersionen mit niedrigerer Polymerkonzentration verkürzte sich die Lagerdauer erheblich und betrug bei einer 0,01 % w/v Dispersion nur noch wenige Tage. Für mit Calcein beladene Polymersomen wurde gezeigt, dass bei 4 °C eine gute Rückhalteeffizienz gewährleistet ist, da innerhalb von zwei Monaten nur 1 % der Beladung verloren ging.

Um Polymersomen effizient als Enzymmembranreaktoren einsetzen zu können, müssen diese eine gewisse Stabilität gegenüber mechanischen Belastungen aufweisen. Daten zur mechanischen Stabilität bei für biotechnologische Prozesse relevanten Bedingungen gab es bis dato nicht. Deshalb wurde die Polymersomenstabilität unter relevanten Prozessbedingungen systematisch untersucht. Verwendet wurde hierfür der S-Rührer in unbewehrten miniaturisierten Rührkesselreaktoren. Bei Rührerdrehzahlen über 1000 min^{-1}

erfolgte die Vesikelschädigung umso schneller, je höher die Rührerdrehzahl war. Unterhalb von 1000 min^{-1} hingegen zeigten sich unbeladene Polymersomen in einem weiten Temperaturbereich von $8 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $60 \text{ }^\circ\text{C}$ stabil. Hierbei war innerhalb von 48 h Belastungsdauer weder ein Verlust der Vesikelquantität noch der Vesikelqualität (z-Mittel, PDI) zu verzeichnen. Dennoch konnte bei diesen Bedingungen keine vollständige Rückhaltung von vorab verkapselten kleinen Molekülen wie Calcein (0,6 kDa) und deutlich größeren Molekülen wie *N*-Acetylneuraminatlyase (4x34,8 kDa) gewährleistet werden. Dabei nahm der Beladungsverlust sowohl mit zunehmender Prozesszeit als auch mit zunehmender Rührerdrehzahl zu und betrug bei mit Calcein beladenen Polymersomen bei einer Rührerdrehzahl von 1000 min^{-1} nach 48 h 6,6 %. Eine eindeutige Abhängigkeit von der im Rührkesselreaktor wirkenden maximalen Energiedissipation konnte jedoch nicht festgestellt werden. Da die Polymersomen bei den untersuchten mechanischen Belastungen nicht zerstört wurden, wurde auf das Auftreten lokaler Membrandefekte geschlossen. Diese könnten die Molekülfreisetzung bewirkt haben, ohne dass es dabei zur Ruptur und vollständigen Zerstörung der Vesikel gekommen wäre. Neben der mechanischen Belastung wirkten sich auch erhöhte Temperaturen negativ auf die Rückhalteeffizienz aus. So ging bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zu circa 3,5 Mal mehr Beladung verloren, als bei $8 \text{ }^\circ\text{C}$. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der mit steigender Temperatur abnehmenden Membranviskosität, welche anhand unbeladener Vesikel in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Verminderte Membranviskosität geht mit erhöhter Membranfluidität einher, welche der Grund für höhere Molekülverluste sein kann. Unabhängig von der thermischen und mechanischen Belastung konnten die deutlich größeren Moleküle der *N*-Acetylneuraminatlyase mit circa 2-5 Mal niedrigeren Verlusten wesentlich besser zurückgehalten werden als Calcein.

Unter anderem aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von einigen Edukten und Produkten kann es sinnvoll sein, biokatalytische Prozesse im Zweiphasensystem mit organischen Lösemitteln oder ionischen Flüssigkeiten durchzuführen. Da Enzyme in Gegenwart eben dieser häufig ihre Aktivität verlieren, wäre es von großem Interesse, wenn sie innerhalb von Polymersomen durch Verkapselung geschützt werden könnten. Hierfür ist es jedoch zwingend nötig, dass die Polymersomen selbst stabil gegenüber der zweiten, nicht wässrigen Phase sind. Bei der Untersuchung der Stabilität von Polymersomen im Zweiphasensystem mit diversen unterschiedlichen Lösemitteln zeigte sich der Einfluss des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P$) deutlich. Je niedriger der $\log P$ beziehungsweise je hydrophiler das Lösemittel war, desto stärker wurden die Polymersomen unter Bildung von Mizellen desintegriert. Alkane wie *n*-Hexan und *n*-Dodekan mit hohen $\log P$ Werten hingegen schädigten unbeladene Polymersomen kaum. Dennoch zeigte sich auch diese Lösemittelklasse für den Einsatz in Kombination mit Polymersomen gänzlich ungeeignet, da

sie zu nahezu vollständigem Verlust des vorab verkapselten Calceins führten. Makroskopisch völlig unbeschädigt blieben die Polymersomen in Gegenwart von 20 % v/v der ionischen Flüssigkeit [HMPL] [NTF]. Im Gegensatz zum Zweiphasensystem mit *n*-Dodekan war eine scharfe Phasengrenze zur Polymersomendispersion erkennbar. Phänomenologisch schien jedoch die sprunghafte Verringerung des z-Mittels der Polymersomendispersion um circa 20 nm nach Erstkontakt mit der ionischen Flüssigkeit zu sein. Die Verringerung der Vesikeldurchmesser führte zwangsläufig auch zu einem geringeren verkapselbaren Volumen, was zusammen mit den hierbei vermutlich auftretenden Membrandefekten Grund für den schubartigen Calceinverlust von 11,6 % innerhalb von nur 1 h (S-Rührer, 200 min⁻¹, unbewehrter Reaktor, 25 °C) gewesen sein könnte. Demnach sind Polymersomen aus PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅ auch im Zweiphasensystem mit [HMPL] [NTF] nicht stabil.

Um das Prinzip des selektiven Stofftransportes bei der Verwendung von Polymersomen als Enzymmembranreaktor effizient einsetzen zu können, muss die Permeabilität der Membran charakterisiert werden können. In Anlehnung an das kommerziell verfügbare PAMPA-System (*Parallel Artificial Permeability Assay*), mit Hilfe dessen die Permeabilität von planaren Lipidmembranen im Hochdurchsatz-Verfahren bestimmt werden kann, wurde eine Methode zur Herstellung von planaren PMOXA₁₅-PDMS₆₈-PMOXA₁₅-Membranen entwickelt. Diese zeigten sich gegenüber den als Modellstoffe gewählten Wirkstoffen Propranolol und Koffein im untersuchten Bereich von pH 5 bis pH 9 knapp halb so permeabel wie herkömmliche, planare Phospholipidmembranen. Da sich die Struktur der planaren Polymermembran jedoch als netzartig und mehrschichtig erwies, konnte die direkte Übertragung der gewonnenen Ergebnisse auf das Permeabilitätsverhalten von Polymersomen nicht erfolgen. Daher wurde eine neue Methode zur Bestimmung der Polymersomenpermeabilität entwickelt. Im Gegensatz zu den in der Literatur häufig gezeigten Methoden, welche den Stofftransport des verkapselten Stoffes aus den Vesikeln heraus vorsieht, basiert die in dieser Arbeit entwickelte Methode auf der Bestimmung des Stofftransportes in leere Vesikel hinein. Dies brachte den Vorteil mit sich, dass der Stoff nicht in hohen Konzentrationen verkapselbar sein muss, was, wie in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt, problematisch oder nicht machbar sein kann. Die Bestimmung der Permeabilitätskoeffizienten P_e erfolgte hierbei über die Bestimmung der zeitlichen Konzentrationszunahme im Vesikelinneren. Aufgrund der Kenntnis der Aggregationszahl N_{Agg} (43.000) und der Membranstärke s (14 nm) der Polymersomen konnten die für die Berechnung notwendigen Werte der gesamten Membranoberfläche und des gesamten verkapselbaren Volumens bestimmt werden. Die identifizierten Permeabilitätskoeffizienten der Polymersomenmembran gegenüber der Modellsubstanzen Propranolol und Koffein waren im Einklang mit deren vorab untersuchten physikochemischen Eigenschaften und bestätigten somit die Funktionalität der etablierten Methode. So zeigte sich

die Membran gegenüber Propranolol mit $-\log Pe = 11,33$ (cm s^{-1}) bei pH 8 circa 3,4 Mal mehr permeabel als bei pH 6 ($-\log Pe = 11,86$ (cm s^{-1})). Die Membranpermeabilität gegenüber des nichtionisierbaren Koffeins war mit $-\log Pe = 13,66$ (cm s^{-1}) deutlich niedriger. Somit konnte gezeigt werden, dass die Permeabilität der Polymersomenmembran um mehrere Größenordnungen niedriger als die Permeabilität von Phospholipidmembranen ist. Für ungeladene Moleküle vergleichbarer Größe liegt diese im Bereich von $-\log Pe = 7-8$ (cm s^{-1}) (Alberts *et al.*, 1994).

10 Ausblick

Das in dieser Arbeit etablierte Verfahren zur Herstellung von Polymersomen hatte gezeigt, dass insbesondere die im Reaktor vorherrschenden Strömungsbedingungen einen außergewöhnlich starken Einfluss auf die resultierende Polymersomenqualität nehmen. Weitere Untersuchungen belegten, dass der etablierte Prozess robust gegenüber verschiedenen Zulaufstraten der Polymerlösung ist. Nichtsdestotrotz wäre eine detailliertere Untersuchung der Auswirkung verschiedener Arten des Zulaufs von Interesse. Hierbei könnten die Folgen unterschiedlicher Dosierprofile (konstant, linear, Stufenprofil, Exponentialprofil) auf den Vesikelbildungsprozess beziehungsweise die resultierende Vesikelqualität näher betrachtet werden. Weiterhin könnte das Zuführen der Polymerlösung in die wässrige Phase über Injektionsdüsen, wie es bei der Liposomenherstellung häufig angewendet wird (Hamann und Nothelle, 1995), in Erwägung gezogen werden. Ein weiterer essentieller Aspekt bei der Polymersomenherstellung ist die resultierende Polymersomenquantität. In dieser Arbeit konnte in einem Prozessschritt eine maximale Konzentration von 1 % w/v bei gleichzeitig guter Vesikelqualität erzielt werden. Höhere Polymerkonzentrationen gingen mit der Bildung von unerwünschten Mizellen und resultierenden breiten Partikelgrößenverteilungen einher. Interessant wäre daher die Betrachtung eines mehrstufigen Polymersomenherstellungsprozesses (Kapitel 13.1.3). Hierbei könnte am Ende des ursprünglichen Prozesses, wenn ausschließlich Polymersomen in der Dispersion vorliegen, erneut Polymerlösung zudosiert werden. Denkbar wäre es, dass sich hierbei erneut Polymersomen bilden. So könnte die Konzentration der Polymersomen im Reaktionsansatz möglicherweise stufenweise in nur einem Prozess erhöht werden.

Die in dieser Arbeit hergestellten Polymersomen erwiesen sich als ausreichend stabil gegenüber mechanischen Belastungen, wie sie bei biokatalytisch relevanten Prozessen vorherrschen. In Zweiphasen-Systemen mit ionischen Flüssigkeiten zeigten sie sich makroskopisch ebenfalls stabil, verloren aber binnen kurzer Zeit einen großen Teil ihrer Beladung. Denkbar wäre hier die Verwendung eines PMOXA-PDMS-PMOXA Polymers mit funktionalisierten Endgruppen, welche die postpräparative Quervernetzung der Polymerketten im formierten Polymersom erlauben. Diese Quervernetzung kann zu einer erheblichen Steigerung der Stabilität führen (Nardin *et al.*, 2000a), welche auch den Einsatz von Polymersomen in Gegenwart von ionischen Flüssigkeiten, wie er in dieser Arbeit nicht möglich war, gestatten könnte.

11 Literatur

- Ahmed, F., Discher, D. E. 2004. Self-porating polymersomes of PEG–PLA and PEG–PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles. *Journal of Controlled Release*, 96, 37-53.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. 1994. Molecular biology of the cell. In: Alberts, B. (ed.) *Molecular biology of the cell*. New York und London: Garland Publishing Inc.
- Angelova, M. I., Soléau, S., Méléard, P., Faucon, F., Bothorel, P. 1992. Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. 89, 127-131.
- Antonietti, M., Forster, S. 2003. Vesicles and liposomes: A self-assembly principle beyond lipids. *Advanced Materials*, 15, 1323-1333.
- Artursson, P. 1990. Epithelial Transport Of Drugs In Cell Culture. I: A Model For Studying The Passive Diffusion Of Drugs Over Intestinal Absorbive (Caco-2) Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79, 476-482.
- Assirelli, M., Bujalski, W., Eaglesham, A., Nienow, A. W. 2008. Macro- and micromixing studies in an unbaffled vessel agitated by a Rushton turbine. *Chemical Engineering Science*, 63, 35-46.
- Avdeef, A. 2005. The rise of PAMPA. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 1, 325-42.
- Avdeef, A. 2012a. *Absorption and Drug Development, Solubility, Permeability, and Charge State*, Wiley.
- Avdeef, A. 2012b. Transport Model. In: Avdeef, A. (ed.) *Absorption and Drug Development, Solubility, Permeability and Charge State*. Hoboken, New Jersey: Wiley & Sons.
- Avdeef, A., Box, K. J., Comer, J. E., Hibbert, C., Tam, K. Y. 1998. pH-metric logP 10. Determination of liposomal membrane-water partition coefficients of ionizable drugs. *Pharm Res*, 15, 209-15.
- Avdeef, A., Nielsen, P. E., Tsinman, O. 2004. PAMPA--a drug absorption in vitro model 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates. *Eur J Pharm Sci*, 22, 365-74.
- Avdeef, A., Tam, K. Y. 2010. How Well Can the Caco-2/Madin–Darby Canine Kidney Models Predict Effective Human Jejunal Permeability?†. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 3566-3584.

- Avdeef, A., Tsinman, O. 2006. PAMPA--a drug absorption in vitro model 13. Chemical selectivity due to membrane hydrogen bonding: in combo comparisons of HDM-, DOPC-, and DS-PAMPA models. *Eur J Pharm Sci*, 28, 43-50.
- Bai, Z., Lodge, T. P. 2010. Polymersomes with Ionic Liquid Interiors Dispersed in Water. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 16265-16270.
- Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C. 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*, 13, 238-52.
- Bates, F. S., Fredrickson, G. H. 1999. Block Copolymers—Designer Soft Materials. *Physics Today*, 52, 32.
- Battaglia, G., Ryan, A. J. 2005. Bilayers and Interdigitation in Block Copolymer Vesicles. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 8757-8764.
- Battaglia, G., Ryan, A. J., Tomas, S. 2006. Polymeric vesicle permeability: a facile chemical assay. *Langmuir*, 22, 4910-3.
- Behrends, C., Stallmeister, U. 2015. Soziale und demografische Daten weltweit. *Datenreport der Stiftung Weltbevölkerung*. Göttingen: Deutsche Stiftung Weltbevölkerung.
- Ben-Haim, N., Broz, P., Marsch, S., Meier, W., Hunziker, P. 2008. Cell-specific integration of artificial organelles based on functionalized polymer vesicles. *Nano Lett*, 8, 1368-73.
- Benito, S. M. 2006. *Functionalized Polymer Nanocontainers for Targeted Drug Delivery*. Universität Basel.
- Bermudez, H., Brannan, A. K., Hammer, D. A., Bates, F. S., Discher, D. E. 2002. Molecular weight dependence of polymersome membrane structure, elasticity, and stability. *Macromolecules*, 35, 8203-8208.
- Bermúdez, H., Hammer, D. A., Discher, D. E. 2004. Effect of Bilayer Thickness on Membrane Bending Rigidity. *Langmuir*, 20, 540-543.
- Bernard, A. L., Guedeau-Boudeville, M. A., Marchi-Artzner, V., Gulik-Krzywicki, T., Di Meglio, J. M., Jullien, L. 2005. Shear-induced permeation and fusion of lipid vesicles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 287, 298-306.
- Bleul, R., Thiermann, R., Marten, G. U., House, M. J., Pierre, T. G. S., Häfeli, U. O., Maskos, M. 2013. Continuously manufactured magnetic polymersomes – a versatile tool (not only) for targeted cancer therapy. *Nanoscale*, 5, 11385.
- Bleul, R., Thiermann, R., Maskos, M. 2015. Techniques To Control Polymersome Size. *Macromolecules*, 48, 7396-7409.
- Bräutigam, S., Bringer-Meyer, S., Weuster-Botz, D. 2007. Asymmetric whole cell biotransformations in biphasic ionic liquid/water-systems by use of recombinant

- Escherichia coli with intracellular cofactor regeneration. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18, 1883-1887.
- Bräutigam, S., Dennewald, D., Schürmann, M., Lutje-Spelberg, J., Pitner, W.-R., Weuster-Botz, D. 2009. Whole-cell biocatalysis: Evaluation of new hydrophobic ionic liquids for efficient asymmetric reduction of prochiral ketones. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 310-316.
- Brown, D. E. 1982. Industrial-Scale Operation of Microbial Processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 32, 34-46.
- Brown, L., McArthur, S. L., Wright, P. C., Lewis, A., Battaglia, G. 2010. Polymersome production on a microfluidic platform using pH sensitive block copolymers. *Lab on a Chip*, 10, 1922-1928.
- Broz, P., Benito, S. M., 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. *Journal of Controlled Release*, 102, 475-488.
- Brüning, S. 2012. *Strömungssimulation als Werkzeug zur Bioreaktorcharakterisierung*. Technische Universität München.
- Burke, S., Shen, H., Eisenberg, A. 2001. Multiple vesicular morphologies from block copolymers in solution. *Macromolecular Symposia*, 175, 273-284.
- Campbell, N. A. 1997. Membranen: Struktur und Funktion. In: Campbell, N. A. (ed.) *Biologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Capretto, L., Carugo, D., Mazzitelli, S., Nastruzzi, C., Zhang, X. 2013. Microfluidic and lab-on-a-chip preparation routes for organic nanoparticles and vesicular systems for nanomedicine applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 1496-1532.
- Castellana, E. T., Cremer, P. S. 2006. Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design. *Surface Science Reports*, 61, 429-444.
- Chang, H.-Y., Sheng, Y.-J., Tsao, H.-K. 2014. Structural and mechanical characteristics of polymersomes. *Soft Matter*, 10, 6373.
- Charcosset, C., Juban, A., Valour, J.-P., Urbaniak, S., Fessi, H. 2015. Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices. *Chemical Engineering Research and Design*, 94, 508-515.
- Chen, L., Shen, H., Eisenberg, A. 1999. Kinetics and Mechanism of the Rod-to-Vesicle Transition of Block Copolymer Aggregates in Dilute Solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103, 9488-9497.
- Chen, Q., Schönherr, H., Vancso, G. J. 2009. Block-Copolymer Vesicles as Nanoreactors for Enzymatic Reactions. *Small*, 5, 1436-1445.

- Chmiel, H. 2011. Vorwort zur 3. Auflage Bioprozesstechnik. *In: Chmiel, H. (ed.) Bioprozesstechnik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Choucair, A. A., Kycia, A. H., Eisenberg, A. 2003. Kinetics of fusion of polystyrene-b-poly(acrylic acid) vesicles in solution. *Langmuir*, 19, 1001-1008.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., Falkow, S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173, 33-38.
- Dechow, F. J. 1989. Introduction. *In: Dechow, F. J. (ed.) Separation and Purification Techniques in Biotechnology*. New Jersey: Noyes Publications.
- Desai, N. P., Hubbell, J. A. 1991. Solution Technique to Incorporate Polyethylene Oxide and Other Water-Soluble Polymers into Surfaces of Polymeric Biomaterials. *Biomaterials*, 12, 144-153.
- Dimova, R., Seifert, U., Pouligny, B., Forster, S., Dobereiner, H. G. 2002. Hyperviscous diblock copolymer vesicles. *European Physical Journal E*, 7, 241-250.
- Discher, B. M. 1999. Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. *Science*, 284, 1143-1146.
- Discher, B. M., Bermudez, H., Hammer, D. A., Discher, D. E., Won, Y.-Y., Bates, F. S. 2002. Cross-linked Polymersome Membranes: Vesicles with Broadly Adjustable Properties. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106, 2848-2854.
- Discher, D. E., Ahmed, F. 2006. Polymersomes. *Annu Rev Biomed Eng*, 8, 323-41.
- Discher, D. E., Eisenberg, A. 2002. Polymer vesicles. *Science*, 297, 967-73.
- Du, J. Z., O'reilly, R. K. 2009. Advances and challenges in smart and functional polymer vesicles. *Soft Matter*, 5, 3544-3561.
- Dudukovic, M. P. 2010. Reaction engineering: Status and future challenges. *Chemical Engineering Science*, 65, 3-11.
- Egli, S., Schlaad, H., Bruns, N., Meier, W. 2011. Functionalization of Block Copolymer Vesicle Surfaces. *Polymers*, 3, 252-280.
- Einstein, A. 1905. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik*, 322, 549-560.
- Farquhar, K. D., Misran, M., Robinson, B. H., Steytler, D. C., Morini, P., Garrett, P. R., Holzwarth, J. F. 1996. The kinetics and mechanism of micelle-vesicle transitions in aqueous solution. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 8, 9397-9404.

- Fischer, H., Kansy, M., Avdeef, A., Senner, F. 2007. Permeation of permanently positive charged molecules through artificial membranes--influence of physico-chemical properties. *Eur J Pharm Sci*, 31, 32-42.
- Friskén, B. J. 2001. Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Applied Optics*, 40, 4087.
- Ghoroghchian, P. P., Frail, P. R., Li, G., Zupancich, J. A., Bates, F. S., Hammer, D. A., Therien, M. J. 2007. Controlling Bulk Optical Properties of Emissive Polymerosomes through Intramembranous Polymer-Fluorophore Interactions. *Chemistry of Materials*, 19, 1309-1318.
- Ghosh, R. 2001. Novel membranes for simulating biological barrier transport. *Journal of Membrane Science*, 192, 145-154.
- 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.
- Gonzalez-Perez, A., Stibius, K. B., Vissing, T., Nielsen, C. H., Mouritsen, O. G. 2009. Biomimetic triblock copolymer membrane arrays: a stable template for functional membrane proteins. *Langmuir*, 25, 10447-50.
- Gorter, E., Grendel, F. 1925. On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *J Exp Med*, 41, 439-43.
- Graff, A., Sauer, M., Van Gelder, P., Meier, W. 2002. Virus-assisted loading of polymer nanocontainer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 5064-5068.
- Grumelard, J. 2004. *Biometric Superstructures from Amphiphilic ABA - Triblock Copolymers*. Universität Basel.
- Hall, J. F., Barigou, M., Simmons, M. J. H., Stitt, E. H. 2004. Mixing in Unbaffled High-Throughput Experimentation Reactors. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43, 4149-4158.
- Hamann, H. J., Nothelle, R. 1995. Liposomen - Strukturen und Herstellungsverfahren. *Chemie Ingenieur Technik*, 67, 1082-1083.
- Haque, J. N., Mahmud, T., Roberts, K. J., Rhodes, D. 2006. Modeling Turbulent Flows with Free-Surface in Unbaffled Agitated Vessels. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45, 2881-2891.
- Hauschild, S., Lipprandt, U., Rumpelcker, A., Borchert, U., Rank, A., Schubert, R., Forster, S. 2005. Direct preparation and loading of lipid and polymer vesicles using inkjets. *Small*, 1, 1177-1180.
- He, X. H., Schmid, F. 2006a. Dynamics of spontaneous vesicle formation in dilute solutions of amphiphilic diblock copolymers. *Macromolecules*, 39, 2654-2662.

- He, X. H., Schmid, F. 2006b. Using prenucleation to control complex copolymeric vesicle formation in solution. *Macromolecules*, 39, 8908-8910.
- Heerklotz, H., Seelig, J. 2007. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 36, 305-314.
- Henzler, H. J. 2000. Particle Stress in Bioreactors. In: Schügerl, K., Kretzmer, G., Henzler, H. J., Kieran, P. M., Kretzmer, G., Macloughlin, P. E., Malone, D. M., Schumann, W., Shamlou, P. A. & Yim, S. S. (eds.) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Henzler, H. J., Biedermann, A. 1996. Model studies on particle stress in reactors. *Chemie Ingenieur Technik*, 68, 1546-1561.
- Himmler, K., Schierholz, W. F. 2004. Mischvorgänge: Klassische Methoden und Computational Fluid Dynamics in der industriellen Praxis. *Chemie Ingenieur Technik*, 76, 212-219.
- Hinze, J. O. 1955. Fundamentals of the Hydrodynamic Mechanism of Splitting in Dispersion Processes. *Aiche Journal*, 1, 289-295.
- Horiuchi, T., Kurokawa, T. 1990. N-acetylmannosamine dehydrogenase, process for its production, method for quantitatively analyzing N-acetylmannosamine or sialic acid, and kit for the quantitative analysis. Google Patents.
- Hortsch, R. 2011. *Miniaturisierte Rührreaktoren zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen*. Technische Universität München.
- Hortsch, R., Stratmann, A., Weuster-Botz, D. 2010. New milliliter-scale stirred tank bioreactors for the cultivation of mycelium forming microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, n/a-n/a.
- Hortsch, R., Weuster-Botz, D. 2010a. Milliliter-Scale Stirred Tank Reactors for the Cultivation of Microorganisms. *Advances in Applied Microbiology, Vol 73*, 73, 61-82.
- Hortsch, R., Weuster-Botz, D. 2010b. Power consumption and maximum energy dissipation in a milliliter-scale bioreactor. *Biotechnol Prog*, 26, 595-9.
- Hunt, C. A., Tsang, S. 1981. α -Tocopherol retards autoxidation and prolongs the shelf-life of liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 8, 101-110.
- Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J., Ninham, B. W. 1976. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 72, 1525-1568.
- Itel, F., Chami, M., Najer, A., Lörcher, S., Wu, D., Dinu, I. A., Meier, W. 2014. Molecular Organization and Dynamics in Polymersome Membranes: A Lateral Diffusion Study. *Macromolecules*, 47, 7588-7596.

- Junker, B. H. 2004. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *J Biosci Bioeng*, 97, 347-64.
- Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K. 1998. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem*, 41, 1007-10.
- Käppel, M. 1975. Bestimmung der Mischgüte beim Homogenisieren von Flüssigkeiten. *Chemie Ingenieur Technik*, 47, 395-395.
- Khmelnitsky, Y. L., Mozhaev, V. V., Belova, A. B., Sergeeva, M. V., Martinek, K. 1991. Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. *European Journal of Biochemistry*, 198, 31-41.
- Kita-Tokarczyk, K., Grumelard, J., Haefele, T., Meier, W. 2005. Block copolymer vesicles—using concepts from polymer chemistry to mimic biomembranes. *Polymer*, 46, 3540-3563.
- Klermund, L., Poschenrieder, S. T., Castiglione, K. 2016. Simple surface functionalization of polymersomes using non-antibacterial peptide anchors. *Journal of Nanobiotechnology*, 14.
- Koebnik, R., Locher, K. P., Van Gelder, P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*, 37, 239-253.
- Kolmogorov, A. N. 1958. Die lokale Struktur der Turbulenz in einer inkompressiblen zähen Flüssigkeit bei sehr großen Reynoldsschen Zahlen. In: Goering, H. (ed.) *Sammelband zur statistischen Theorie der Turbulenzen*. Berlin: Akademie-Verlag
- Koppel, D. E. 1972. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy - Method of Cumulants. *Journal of Chemical Physics*, 57, 4814-4820.
- Kraume, M. 2003. Homogenisieren in Rührbehältern. In: Kraume, M. (ed.) *Mischen und Rühren: Grundlagen und moderne Verfahren*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Kukula, H., Schlaad, H., Antonietti, M., Forster, 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, 1658-63.
- Kumar, M., Grzelakowski, M., Zilles, J., Clark, M., Meier, W. 2007. Highly permeable polymeric membranes based on the incorporation of the functional water channel protein Aquaporin Z. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20719-24.
- Kusterer, A., Krause, C., Kaufmann, K., Arnold, M., Weuster-Botz, D. 2008. Fully automated single-use stirred-tank bioreactors for parallel microbial cultivations. *Bioprocess Biosyst Eng*, 31, 207-15.
- Lasic, D. D. 1988a. The Mechanism of Vesicle Formation. *Biochemical Journal*, 256, 1-11.

- Lasic, D. D. 1988b. The Spontaneous Formation of Unilamellar Vesicles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 124, 428-435.
- Lasic, D. D. 1998. Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol*, 16, 307-21.
- Le Meins, J. F., Sandre, O., Lecommandoux, S. 2011. Recent trends in the tuning of polymersomes' membrane properties. *Eur Phys J E Soft Matter*, 34, 1-17.
- Lecommandoux, S., Sandre, O., Chécot, F., Rodriguez-Hernandez, J., Perzynski, R. 2005. Magnetic Nanocomposite Micelles and Vesicles. *Advanced Materials*, 17, 712-718.
- Lee, J. C. M., Bermudez, H., Discher, B. M., Sheehan, M. A., Won, Y.-Y., Bates, F. S., Discher, D. E. 2001a. Preparation, stability, and in vitro performance of vesicles made with diblock copolymers. *Biotechnology and Bioengineering*, 73, 135-145.
- Lee, J. C. M., Bermudez, H., Discher, B. M., Sheehan, M. A., Won, Y. Y., Bates, F. S., Discher, D. E. 2001b. Preparation, stability, and in vitro performance of vesicles made with diblock copolymers. *Biotechnology and Bioengineering*, 73, 135-145.
- Lee, J. C. M., Santore, M., Bates, F. S., Discher, D. E. 2002. From Membranes to Melts, Rouse to Reptation: Diffusion in Polymersome versus Lipid Bilayers. *Macromolecules*, 35, 323-326.
- Li, F., Ketelaar, T., Marcelis, A. T. M., Leermakers, F. a. M., Cohen Stuart, M. A., Sudhölter, E. J. R. 2007. Stabilization of Polymersome Vesicles by an Interpenetrating Polymer Network. *Macromolecules*, 40, 329-333.
- Li, F., Prévost, S., Schweins, R., Marcelis, A. T. M., Leermakers, F. a. M., Cohen Stuart, M. A., Sudhölter, E. J. R. 2009. Small monodisperse unilamellar vesicles from binary copolymer mixtures. *Soft Matter*, 5, 4169.
- Liepe, F. 2005. Mischprozesse: Abschnitte 8.3 - 8.3.3. In: Schubert, H. (ed.) *Handbuch der mechanischen Verfahrenstechnik*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Liepe, F., Meusel, W., Möckel, H. O., Platzer, B., Weißgärber, H. 1988. Stoffvereinigung in Fluiden Phasen. In: Weiß, S., Berghoff, W., Grah, E., Gruhn, G., Güsewell, M., Plötner, W., Robel, H. & Schubert, M. (eds.) *Verfahrenstechnische Berechnungsmethoden*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Litvinchuk, S., Lu, Z., Rigler, P., Hirt, T. D., Meier, W. 2009. Calcein Release from Polymeric Vesicles in Blood Plasma and PVA Hydrogel. *Pharmaceutical Research*, 26, 1711-1717.
- Liu, X., Tu, M., Kelly, R. S., Chen, C., Smith, B. J. 2004. Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability. *Drug Metab Dispos*, 32, 132-9.
- Luo, L. B., Eisenberg, A. 2001a. Thermodynamic size control of block copolymer vesicles in solution. *Langmuir*, 17, 6804-6811.

- Luo, L. B., Eisenberg, A. 2001b. Thermodynamic stabilization mechanism of block copolymer vesicles. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 1012-1013.
- Maddikeri, R. R., Colak, S., Gido, S. P., Tew, G. N. 2011. Zwitterionic Polymersomes in an Ionic Liquid: Room Temperature TEM Characterization. *Biomacromolecules*, 12, 3412-3417.
- Maheerani, B., Arab-Tehrany, E., Kheirilomoom, A., Geny, D., Linder, M. 2013. Calcein release behavior from liposomal bilayer; influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. *Biochimie*, 95, 2018-2033.
- Malvern 2013. Zetasizer Nano User Manual. Worcestershire, UK: Malvern.
- Marrink, S. J., Mark, A. E. 2003. Molecular Dynamics Simulation of the Formation, Structure, and Dynamics of Small Phospholipid Vesicles. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 15233-15242.
- Meier, W., Nardin, C., Winterhalter, M. 2000. Reconstitution of channel proteins in (polymerized) ABA triblock copolymer membranes. *Angewandte Chemie-International Edition*, 39, 4599-+.
- Meng, F., Engbers, G. H., Feijen, J. 2005. Biodegradable polymersomes as a basis for artificial cells: encapsulation, release and targeting. *J Control Release*, 101, 187-98.
- Meng, F., Hiemstra, C., M., E. G. H., Feijen, J. 2003. Biodegradable Polymersomes. *Macromolecules*, 36, 3004-3006.
- Mozafari, M. R. 2005. Liposomes: An overview of manufacturing techniques. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 10, 711-719.
- Mueller, P., Rudin, D. O., Ti Tien, H., Wescott, W. C. 1962. Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System. *Nature*, 194, 979-980.
- Naeff, R. 1996. Feasibility of topical liposome drugs produced on an industrial scale. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18, 343-347.
- Nagata, S., Nishikawa, M., Inoue, A., Okamoto, Y. 1975. Turbulence in Non-Baffled Mixing Vessel. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 8, 243-248.
- Nallani, M., Benito, S., Onaca, O., Graff, A., Lindemann, M., Winterhalter, M., Meier, W., Schwaneberg, U. 2006. A nanocompartment system (Synthosome) designed for biotechnological applications. *J Biotechnol*, 123, 50-9.
- Napoli, A., Boerakker, M. J., Tirelli, N., Nolte, R. J., Sommerdijk, N. A., Hubbell, J. A. 2004a. Glucose-oxidase based self-destructing polymeric vesicles. *Langmuir*, 20, 3487-91.

- Napoli, A., Valentini, M., Tirelli, N., Muller, M., Hubbell, J. A. 2004b. Oxidation-responsive polymeric vesicles. *Nat Mater*, 3, 183-9.
- Nardin, C., Hirt, T., Leukel, J., Meier, W. 2000a. Polymerized ABA triblock copolymer vesicles. *Langmuir*, 16, 1035-1041.
- Nardin, C., Meier, W. G. 2001. Polymerizable amphiphilic block copolymers: From nanostructured hydrogels to nanoreactors and ultrathin films. *Chimia*, 55, 142-146.
- Nardin, C., Thoeni, S., Widmer, J., Winterhalter, M., Meier, W. 2000b. Nanoreactors based on (polymerized) ABA-triblock copolymer vesicles. *Chemical Communications*, 1433-1434.
- Nardin, C., Widmer, J., Winterhalter, M., Meier, W. 2001. Amphiphilic block copolymer nanocontainers as bioreactors. *European Physical Journal E*, 4, 403-410.
- Nardin, C., Winterhalter, M., Meier, W. 2000c. Giant free-standing ABA triblock copolymer membranes. *Langmuir*, 16, 7708-7712.
- Nguyenmisra, M., Misra, S., Mattice, W. L. 1996. Bridging by end-adsorbed triblock copolymers. *Macromolecules*, 29, 1407-1415.
- Nielsen, P. E., Avdeef, A. 2004. PAMPA--a drug absorption in vitro model 8. Apparent filter porosity and the unstirred water layer. *Eur J Pharm Sci*, 22, 33-41.
- Noor, M., Dworeck, T., Schenk, A., Shinde, P., Fioroni, M., Schwaneberg, U. 2012. Polymersome surface decoration by an EGFP fusion protein employing Cecropin A as peptide "anchor". *J Biotechnol*, 157, 31-7.
- Olbrich, K., Rawicz, W., Needham, D., Evans, E. 2000. Water Permeability and Mechanical Strength of Polyunsaturated Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, 79, 321-327.
- Pata, V., Ahmed, F., Discher, D. E., Dan, N. 2004. Membrane solubilization by detergent: Resistance conferred by thickness. *Langmuir*, 20, 3888-3893.
- Patel, H., Tscheka, C., Heerklotz, H. 2009. Characterizing vesicle leakage by fluorescence lifetime measurements. *Soft Matter*, 5, 2849.
- Pfruender, H., Amidjojo, M., Kragl, U., Weuster-Botz, D. 2004. Efficient Whole-Cell Biotransformation in a Biphasic Ionic Liquid/Water System. *Angewandte Chemie International Edition*, 43, 4529-4531.
- Pfründer, H., Amidjojo, M., Kragl, U., Weuster-Botz, D. 2004. Effiziente Ganzzell-Biotransformation im zweiphasigen System ionische Flüssigkeit/Wasser. *Angewandte Chemie*, 116, 4629-4631.

- Pham, T. T., Jaafar-Maalej, C., Charcosset, C., Fessi, H. 2012. Liposome and niosome preparation using a membrane contactor for scale-up. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94, 15-21.
- Pinho, S. P., Macedo, E. A. 2005. Solubility of NaCl, NaBr, and KCl in Water, Methanol, Ethanol, and Their Mixed Solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 50, 29-32.
- Poschenrieder, S. T., Schiebel, S. K., Castiglione, K. 2016a. Polymersomes for biotechnological applications: large-scale production of nano-scale vesicles. *Engineering in Life Sciences*.
- Poschenrieder, S. T., Wagner, S. G., Castiglione, K. 2016b. Efficient production of uniform nanometer-sized polymer vesicles in stirred-tank reactors. *Journal of Applied Polymer Science*, 133, 43274.
- Prinos, J., Panayiotou, C. 1995. Glass-Transition Temperature in Hydrogen-Bonded Polymer Mixtures. *Polymer*, 36, 1223-1227.
- Provencher, S. W. 1982a. A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Computer Physics Communications*, 27, 213-227.
- Provencher, S. W. 1982b. CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications*, 27, 229-242.
- Puskeiler, R. 2004. *Miniaturisierte Parallelreaktoren zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung*. Technische Universität München.
- Puskeiler, R., Kaufmann, K., Weuster-Botz, D. 2005a. Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 512-523.
- Puskeiler, R., Kusterer, A., John, G. T., Weuster-Botz, D. 2005b. Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): reproducibility of parallel fed-batch cultivations with *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42, 227-235.
- Puskeiler, R., Weuster-Botz, D. 2004. Millilitre-scale stirred tank reactors: Cultivation of *Escherichia coli*. *Chemie Ingenieur Technik*, 76, 1815-1819.
- Qingchong, L. 1999. Doppler measurement and compensation in mobile satellite communications systems. 1, 316-320.
- Rameez, S., Bamba, I., Palmer, A. F. 2010. Large scale production of vesicles by hollow fiber extrusion: a novel method for generating polymersome encapsulated hemoglobin dispersions. *Langmuir*, 26, 5279-85.

- Rank, A. 2007. *Herstellung und Charakterisierung von Vesikeln aus amphiphilen Blockcopolymeren*. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.
- Rank, A., Hauschild, S., Forster, S., Schubert, R. 2009. Preparation of Monodisperse Block Copolymer Vesicles via a Thermotropic Cylinder-Vesicle Transition. *Langmuir*, 25, 1337-1344.
- 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 Lett*, 5, 2220-4.
- Rawicz, W., Olbrich, K. C., McIntosh, T., Needham, D., Evans, E. 2000. Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, 79, 328-339.
- Renggli, K., Baumann, P., Langowska, K., Onaca, O., Bruns, N., Meier, W. 2011. Selective and Responsive Nanoreactors. *Advanced Functional Materials*, 21, 1241-1259.
- Riedlberger, P. 2012. *Miniaturisierte Rührreaktoren zur enzymatischen Hydrolyse von suspendierten Pflanzenmaterialien*. Technische Universität München.
- Riedlberger, P., Bruning, S., Weuster-Botz, D. 2013. Characterization of stirrers for screening studies of enzymatic biomass hydrolyses on a milliliter scale. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, 927-935.
- Riedlberger, P., Weuster-Botz, D. 2012. New miniature stirred-tank bioreactors for parallel study of enzymatic biomass hydrolysis. *Bioresource Technology*, 106, 138-146.
- Ruell, J. A., Tsinman, K. L., Avdeef, A. 2003. PAMPA—a drug absorption in vitro model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20, 393-402.
- Ruysschaert, T., Sonnen, A. F. P., Haefele, T., Meier, W., Winterhalter, M., Fournier, D. 2005. Hybrid Nanocapsules: Interactions of ABA Block Copolymers with Liposomes. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 6242-6247.
- Sánchez Pérez, J. A., Rodríguez Porcel, E. M., Casas López, J. L., Fernández Sevilla, J. M., Chisti, Y. 2006. Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, 124, 1-5.
- Schneider, T., Sachse, A., Rossling, G., Brandl, M. 1994. Large-Scale Production of Liposomes of Defined Size by a New Continuous High-Pressure Extrusion Device. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 20, 2787-2807.
- Schneider, T., Sachse, A., Rossling, G., Brandl, M. 1995. Generation of Contrast-Carrying Liposomes of Defined Size with a New Continuous High-Pressure Extrusion Method. *International Journal of Pharmaceutics*, 117, 1-12.
- Schrage, S. 2002. *Selbstorganisation von Ionomeren zu phasenseparierten Vesikeln*. Universität Potsdam.

- Shen, H., Eisenberg, A. 2000. Control of Architecture in Block-Copolymer Vesicles. *Angewandte Chemie*, 39, 3310-3312.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.
- So, S., Lodge, T. P. 2014. Rate of Molecular Exchange through the Membranes of Ionic Liquid Filled Polymersomes Dispersed in Water. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118, 21140-21147.
- Soo, P. L., Eisenberg, A. 2004. Preparation of block copolymer vesicles in solution. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 42, 923-938.
- Srinivas, G., Discher, D. E., Klein, M. L. 2004. Self-assembly and properties of diblock copolymers by coarse-grain molecular dynamics. *Nat Mater*, 3, 638-44.
- Stieß, M. 2009. Mechanische Verfahrenstechnik - Partikeltechnologie 1. Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- Stitt, E. H. 2002. Alternative multiphase reactors for fine chemicals - A world beyond stirred tanks? *Chemical Engineering Journal*, 90, 47-60.
- Stoenescu, R., Graff, A., Meier, W. 2004. Asymmetric ABC-Triblock Copolymer Membranes Induce a Directed Insertion of Membrane Proteins. *Macromolecular Bioscience*, 4, 930-935.
- Thiele, J., Abate, A. R., Shum, H. C., Bachtler, S., Forster, S., Weitz, D. A. 2010a. Fabrication of Polymersomes using Double-Emulsion Templates in Glass-Coated Stamped Microfluidic Devices. *Small*, 6, 1723-1727.
- Thiele, J., Chokkalingam, V., Ma, S. H., Wilson, D. A., Huck, W. T. S. 2014. Vesicle budding from polymersomes templated by microfluidically prepared double emulsions. *Materials Horizons*, 1, 96-101.
- Thiele, J., Steinhauser, D., Pfohl, T., Forster, S. 2010b. Preparation of Monodisperse Block Copolymer Vesicles via Flow Focusing in Microfluidics. *Langmuir*, 26, 6860-6863.
- Thiermann, R., Mueller, W., Montesinos-Castellanos, A., Metzke, D., Löb, P., Hessel, V., Maskos, M. 2012. Size controlled polymersomes by continuous self-assembly in micromixers. *Polymer*, 53, 2205-2210.
- Thomas, J. C. 1987. The Determination of Log Normal Particle-Size Distributions by Dynamic Light-Scattering. *Journal of Colloid and Interface Science*, 117, 187-192.
- Thompson, M. 1982. Structure and Electrochemical Properties of Microfiltration Filter-Lipid Membrane Systems. *Anal. Chem.*, 76-81.

- Thompson, M., Krull, U. J., Worsfold, P. J. 1980. The Structure and Electrochemical Properties of a Polymer-Supported Lipid Biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 117, 133-145.
- Ullrich, H., Schreiber, H. 1967. Rühren in zähen Flüssigkeiten. *Chemie Ingenieur Technik - CIT*, 39, 218-224.
- Uneyama, T. 2007. Density functional simulation of spontaneous formation of vesicle in block copolymer solutions. *Journal of Chemical Physics*, 126.
- Van De Waterbeemd, H., Camenisch, G., Folkers, G., Chretien, J. R., Raevsky, O. A. 1998. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *Journal of Drug Targeting*, 6, 151-165.
- Van Rijn, P., Tutus, M., Kathrein, C., Zhu, L., Wessling, M., Schwaneberg, U., Boker, A. 2013. Challenges and advances in the field of self-assembled membranes. *Chem Soc Rev*, 42, 6578-92.
- Van Dongen, S. F. M., Nallani, M., Cornelissen, J. J. L. M., Nolte, R. J. M., Van Hest, J. C. M. 2009. A Three-Enzyme Cascade Reaction through Positional Assembly of Enzymes in a Polymersome Nanoreactor. *Chemistry - A European Journal*, 15, 1107-1114.
- Vieweg, R. 2010. Verfahrenstechnische Berechnungsmethoden Teil 4: Stoffvereinigen in fluiden Phasen - Ausrüstungen und ihre Berechnung von einem Autorenkollektiv unter Federführung von F. Liepe. *Zeitschrift für Chemie*, 28, 417-418.
- Voigt, H., Hess, S. 1994. Comparison of the intensity correlation function and the intermediate scattering function of fluids: a molecular dynamics study of the Siegert relation. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 202, 145-164.
- Von Smoluchowski, M. 1906. Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen. *Annalen der Physik*, 326, 756-780.
- Wagner, A., Vorauer-Uhl, K. 2011. Liposome technology for industrial purposes. *J Drug Deliv*, 2011, 591325.
- Wagner, A., Vorauer-Uhl, K., Katinger, H. 2002. Liposomes produced in a pilot scale: production, purification and efficiency aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 54, 213-219.
- Walter, A., Gutknecht, J. 1984. Monocarboxylic acid permeation through lipid bilayer membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 77, 255-264.
- Wang, Y. M., Mattice, W. L., Napper, D. H. 1992. Simulation of the Self-Assembly of Symmetrical Triblock Copolymers in Dilute-Solution. *Macromolecules*, 25, 4073-4077.
- Weuster-Botz, D., Puskeiler, R., Kusterer, A., Kaufmann, K., John, G. T., Arnold, M. 2005. Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28, 109-119.

- Wiener, N. 1949. *Extrapolation, Intrapolation and Smoothing of Stationary Time Series*, Cambridge, Massachusetts, M.I.T. Press.
- Winterhalter, M. 2000. Black lipid membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 250-255.
- Wittemann, A., Azzam, T., Eisenberg, A. 2007. Biocompatible polymer vesicles from biamphiphilic triblock copolymers and their interaction with bovine serum albumin. *Langmuir*, 23, 2224-30.
- Wohnsland, F., Faller, B. 2001. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J Med Chem*, 44, 923-30.
- Wong, D., Jeon, T.-J., Schmidt, J. 2006. Single molecule measurements of channel proteins incorporated into biomimetic polymer membranes. *Nanotechnology*, 17, 3710-3717.
- Woodle, M. C., Engbers, C. M., Zalipsky, S. 1994. New Amphipatic Polymer Lipid Conjugates Forming Long-Circulating Reticuloendothelial System-Evading Liposomes. *Bioconjugate Chemistry*, 5, 493-496.
- Xlang, T.-X., Anderson, B. D. 1994. Substituent Contributions to the Transport of Substituted-p-Toluic Acids Across Lipid Bilayer Membranes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83, 1511-1518.
- Yamamoto-Otake, H., Koyama, Y., Horiuchi, T., Nakano, E. 1991. Cloning, sequencing, and expression of the N-acyl-D-mannosamine dehydrogenase gene from *Flavobacterium* sp. strain 141-8 in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 57, 1418-22.
- Yilgor, I., Steckle, W. P., Yilgor, E., Freelin, R. G., Riffle, J. S. 1989. Novel Triblock Siloxane Copolymers - Synthesis, Characterization, and Their Use as Surface Modifying Additives. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 27, 3673-3690.
- Young, A. T. 1981. Rayleigh scattering. *Applied Optics*, 20, 533.
- Yu, H. Z., Jiang, W. 2009. Effect of Shear Flow on the Formation of Ring-Shaped ABA Amphiphilic Triblock Copolymer Micelles. *Macromolecules*, 42, 3399-3404.
- Yu, Y. S., Zhang, L. F., Eisenberg, A. 1998. Morphogenic effect of solvent on crew-cut aggregates of amphiphilic diblock copolymers. *Macromolecules*, 31, 1144-1154.
- Zhang, L., Eisenberg, A. 1999. Thermodynamic vs Kinetic Aspects in the Formation and Morphological Transitions of Crew-Cut Aggregates Produced by Self-Assembly of Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Block Copolymers in Dilute Solution. *Macromolecules*, 32, 2239-2249.
- Zhang, L. F., Eisenberg, A. 1998. Formation of crew-cut aggregates of various morphologies from amphiphilic block copolymers in solution. *Polymers for Advanced Technologies*, 9, 677-699.

- Zhou, G. W., Kresta, S. M. 1996. Impact of tank geometry on the maximum turbulence energy dissipation rate for impellers. *Aiche Journal*, 42, 2476-2490.
- Zhou, G. W., Kresta, S. M. 1998. Correlation of mean drop size and minimum drop size with the turbulence energy dissipation and the flow in an agitated tank. *Chemical Engineering Science*, 53, 2063-2079.
- Zhou, Y., Yan, D., Dong, W., Tian, Y. 2007. Temperature-Responsive Phase Transition of Polymer Vesicles: Real-Time Morphology Observation and Molecular Mechanism. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111, 1262-1270.
- Zlokarnik, M. 1967. Eignung von Rührern zum Homogenisieren von Flüssigkeitsgemischen. *Chemie Ingenieur Technik*, 39, 539-548.
- Zlokarnik, M. 1999. *Rührtechnik*, Berlin, Heidelberg, New York, Springer.

Konsultierte Webseiten

Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), 2010

aufgerufen: September 2016

www.bmbf.de/foerderungen/bekanntmachung-655.html

Chemicalize, 2015 (*log P* Bestimmung)

aufgerufen: September 2016

www.chemicalize.org

Millipore, 2005 (Membranintegritätstest von planaren Lipidmembranen)

aufgerufen: April 2013

[http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/2147fb6da40eb49885256fb8007456fd/\\$FILE/PC1454EN00.pdf.com](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/2147fb6da40eb49885256fb8007456fd/$FILE/PC1454EN00.pdf.com)

Polymersource™, 2016 (Listenpreis von PMOXA-PDMS-PMOXA Polymeren)

aufgerufen: September 2016

www.polymersource.com

12 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

12.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung
aq	<i>Aqueous</i> (wässrig)
BCA	Bicinchoninsäure
BKB	Brilliantkresylblau
BLM	<i>Black lipid membrane</i> (Schwarze Lipidmembran)
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMIM	1-Butyl-3-methyl-imidazolium
BSA	Bovines Serumalbumin
CMP	Cytidin-5´-Monophosphat
CMP-Neu5Ac	CMP- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
CONTIN	<i>Constrained regularization method for inverting data</i>
dd	Doppelt destilliert
DIN	Deutsches Institut für Normung
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Dynamische Lichtstreuung)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
ECAA	Ethyl-4-chlor-acetoacetat
ECHB	Ethyl-(S)-4-chlor-3-hydroxybutyrat
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> (Grün fluoreszierendes Protein)
g	<i>Gaseous</i> (gasförmig)
G	Gasinduzierender Rührer
GC	Gaschromatographie
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GP	<i>General Purpose</i>
gr	Gerührt
GUV	<i>Giant unilamellar vesicle</i>
H	H-Rührer
HMPL	1-Hexyl-1-methylpyrrolidinium

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPYR	N-Hexylpyridinium
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (Internationale Organisation für Normung)
KW	Kohlenwasserstoff
I	<i>Liquid</i> (flüssig)
LG	Luzifergelb
LM	Lösemittel
M	Motor
ManNAc	N-Acetylmannosamin
MDH	N-Acetylmannosamin-Dehydrogenase
MLV	<i>Multilamellar vesicle</i>
MNM	<i>Multiple narrow mode</i>
N	Anzahl Versuche
NAL	N-Acetylneuraminatlyase
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
NIBS®	<i>Non-Invasive-Back-Scatter</i>
NNLS	<i>Non negative last square</i>
NTF	Bis(trifluormethylsulfonyl)imid
OPOE	n-Octylpolyoxyethylen
P	Paddelrührer
P2VP	Poly(2-vinylpyridin)
PAMPA	<i>Parallel Artificial Permeability Assay</i>
PB	Poly(butadien)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PC	Polycarbonat
PCL	Poly(caprolacton)
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex
PDMS	Poly(dimethylsiloxan)
PEG	Poly(ethylenglycol)
PEO	Poly(ethylenoxid)
PGA	Poly(L-glutaminsäure)
PI	Poly(isopren)
PIAT	Polyisocyanolanin(2-thiophen-3-yl-ethyl)amid

pKs	Säurekonstante
PLA	Poly(lactat)
PMAA	Poly(methacrylsäure)
PMOXA	Poly(methyloxazolin)
PPO	Poly(propylenoxid)
PS	Poly(styrol)
PSS	Poly(styrensulfon)
PVDF	Poly(vinyldifluorid)
QELS	Quasielastische Lichtstreuung
R	Rückstand
RT	Raumtemperatur
s	<i>Solid</i> (fest)
S	S-Rührer
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)
SLS	<i>Static light scattering</i> (statische Lichtstreuung)
SUV	<i>Small unilamellar vesicle</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ug	Ungerührt
UV	<i>Uniamellar vesicle</i>
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
WGS	Wässrige Grenzschicht

12.2 Symbole

A

a	Faktor für Bewehrung im Reaktor	-
A	Fläche	m^2
A_{Kopf}	Fläche der hydrophilen Kopfgruppe	cm^2
$A_{V,0}$	Membranoberfläche eines einzelnen Vesikels	nm^2
a_0, a_1, a_2	Parameter für Polynom 2. Ordnung	-
A_0	Basislinie (DLS-Messung)	-
A_2	2. Virialkoeffizient (SLS-Messung)	$\text{mol dm}^3 \text{g}^{-2}$
Ak	Dimensionslose Akzeptorphasenkennzahl	-
Ak_{PAMPA}	Dimensionslose Akzeptorphasenkennzahl, PAMPA	-
$Ak_{Vesikel}$	Dimensionslose Akzeptorphasenkennzahl, Vesikel	-

B

b	Proportionalitätsfaktor	-
B	Achsenabschnitt (DLS-Messung)	-
b_{BW}	Breite des Strömungsbrechers	-
BI	Brechungsindex	-
BI_{Disp}	Brechungsindex des Dispersionsmittels	-
BW	Bewehrungskennzahl	-

C

c	Konzentration	mol m^{-3}
c_A	Akzeptorkonzentration in der wässrigen Phase	mol m^{-3}
$c_{A,M}$	Akzeptorkonzentration in der Membran	mol m^{-3}

$c_{A,t}$	Akzeptorkonzentration zum Zeitpunkt t	mol cm^{-3}
c_D	Donorkonzentration in der wässrigen Phase	mol m^{-3}
$c_{D,M}$	Donorkonzentration in der Membran	mol m^{-3}
$c_{D,t}$	Donorkonzentration zum Zeitpunkt t	mol cm^{-3}
$c_{D,0}$	Donorkonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$	mol cm^{-3}
c_{eq}	Gleichgewichtskonzentration	mol m^{-3}
c_{H_2O}	Konzentration des Stoffes in Wasser	g cm^{-3}
c_{NADH}	NADH-Konzentration	mol L^{-1}
$c_{Oktanol}$	Konzentration des Stoffes in n -Oktanol	g cm^{-3}
c_P	Polymerkonzentration	% w/v
$c_{P,L}$	Konzentration der Polymerlösung	% w/v
$c_{V,i,t}$	Konzentration im Inneren der Vesikel zum Zeitpunkt t	mol cm^{-3}
$c_{V,C}$	Verkapselte Calceinkonzentration	mol cm^{-3}
c_{Diss}	Dissipationsbeiwert	-
c_W	Widerstandsbeiwert	-
c_W^*	Adaptierter Widerstandsbeiwert	-
c_t	Konzentration der Probe zum Zeitpunkt t	mol cm^{-3}
c_0	Konzentration der Probe zum Zeitpunkt $t = 0$	mol cm^{-3}
$c_{\infty,t}$	Konzentration der Probe nach Vesikellyse zum Zeitpunkt t	mol cm^{-3}
$c_{\infty,C}$	Calceinkonzentration in der Probe nach Vesikellyse	mol cm^{-3}
$c_{\infty,0}$	Konzentration der Probe nach Vesikellyse zum Zeitpunkt $t = 0$	mol cm^{-3}

D

d	Rührerdurchmesser	m
D	Reaktordurchmesser	m
d_N	Anzahlbasierter Partikeldurchmesser	m
d_p	Partikeldurchmesser	m
$d_{Schicht}$	Schichtdicke	cm
$d_{V,a}$	Außendurchmesser des Vesikels	m
$d_{V,i}$	Innendurchmesser des Vesikels	m
D_M	Diffusionskoeffizient	$m^2 s^{-1}$
D_{trans}	Translatorischer Diffusionskoeffizient	$m^2 s^{-1}$
DO_{PAMPA}	Dimensionslose Donorphasen-Kennzahl, PAMPA-System -	

E

$E_{280 nm}$	Extinktion bei 280 nm	-
$E_{280 nm,t}$	Extinktion bei 280 nm zum Zeitpunkt t	-
$E_{280 nm,0}$	Extinktion bei 280 nm zum Zeitpunkt $t = 0$	-

F

F	Kraft	N
F_t	Fluoreszenz der Probe zum Zeitpunkt t	-
F_w	Widerstandskraft	N
F_0	Fluoreszenz der Probe zum Zeitpunkt $t = 0$	-
$F_{\infty,t}$	Fluoreszenz der Probe nach Vesikellyse zum Zeitpunkt t	-
$F_{\infty,0}$	Fluoreszenz der Probe nach Vesikellyse zum Zeitpunkt $t = 0$	-

Fr	Froudezahl	-
G		
g	Erdbeschleunigung	m s^{-2}
$G(\Gamma)$	Wahrscheinlichkeitsfunktion	-
$g_1(q, t)$	Feld-Autokorrelationsfunktion	-
$g_2(q, t)$	Intensitäts-Autokorrelationsfunktion	-
H		
h	Rührerhöhe/Länge des Strömungserzeugers	m
H	Füllhöhe	m
h_{BW}	Höhe des Strömungsbrechers	m
h_S	Einbauhöhe des Rührers	m
h'	Absenkung des Flüssigkeitsspiegels an der Rührerwelle	m
H'	Flüssigkeitsüberdeckung des unbewegten Rührers	m
I		
I	Intensität des gestreuten Lichtes	-
I_0	Intensität der Lichtquelle	-
J		
J	Stoffstromdichte	$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
K		
k	Konstante Exponentialfunktion	-
K	Nernst'scher Verteilungskoeffizient	-
k_B	Boltzmannkonstante	N m K^{-1}

L

l_{Kette} Konturlänge der hydrophoben Kette nm

M

M Drehmoment N m

m_i Masse der Polymerketten mit molarer Masse M_i g

m_P Masse Polymer g

$m_{Protein}$ Masse Protein g

$m_{V,C}$ Gesamte Masse an Calcein in den Vesikeln g

M_i Molare Masse einer einzelnen Polymerkette g mol^{-1}

M_N Anzahlgemittelte molare Masse g mol^{-1}

M_W Gewichtsgemittelte molare Masse g mol^{-1}

$M_{W,Agg}$ Molare Masse des Aggregats g mol^{-1}

$M_{W,P}$ Molare Masse des Polymers g mol^{-1}

$M_{W,V}$ Molare Masse eines Vesikels g mol^{-1}

$m_{\infty,C}$ Masse an Calcein in der Probe nach Vesikellyse g

N

n Rührerdrehzahl s^{-1}

n_{max} Maximal mögliche Rührerdrehzahl s^{-1}

N_A Avogadro-Konstante mol^{-1}

N_{Agg} Aggregationszahl -

N_{BW} Anzahl Strömungsbrecher -

N_N Stoffmenge mol

$N_{N,i}$ Stoffmenge der Polymerketten mit molarer Masse M_i mol

N_P	Anzahl Polymerketten	-
N_V	Anzahl Vesikel	-
Ne	Newtonzahl	-
P		
p	Packungsparameter	-
P	Leistung	W
PDI	Polydispersitätsindex	-
PDI_P	Polydispersitätsindex des Polymers	-
Pe	Permeabilitätskoeffizient	m s^{-1}
Pe_{eff}	Effektive Permeabilität	m s^{-1}
Pe_{Lipid}	Permeabilitätskoeffizient der Lipidmembran	cm s^{-1}
Pe_M	Membranpermeabilität	m s^{-1}
$Pe_{Polymer}$	Permeabilitätskoeffizient der Polymermembran	cm s^{-1}
Pe_0	Intrinsische Permeabilität	m s^{-1}
Pe_{WGS}	Permeabilität der wässrigen Grenzschicht	m s^{-1}
$\log P$	Dekadischer Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten	-
Q		
q	Wellenvektor	m^{-1}
R		
R	Abstand zum streuenden Teilchen	m
R_G	Gyrationsradius/ Trägheitsradius	m
R_H	Hydrodynamischer Partikelradius	m
R^2	Bestimmtheitsmaß	-

Re	Reynoldszahl	-
S		
s	Membranstärke	m
T		
T	Temperatur	°C
T_{SP}	Siedetemperatur	°C
T_0	Absolute Temperatur	K
t	Zeit	s
t_M	Mischzeit	s
t_0	Frei wählbare Anfangszeit	s
ΔT	Temperaturdifferenz	°C
U		
u_{tip}	Rührerumfangsgeschwindigkeit	m s ⁻¹
V		
v	Geschwindigkeit	m s ⁻¹
V	Volumen	m ³
V_A	Volumen der Akzeptorphase	cm ³
V_D	Volumen der Donorphase	cm ³
V_{EtOH}	Ethanolvolumen	mL
V_M	Summe des Membranvolumens aller Vesikel	cm ³
V_{Tensid}	Volumen des Tensids	nm ³
$V_{V,a}$	Summe des äußeren Vesikelvolumens aller Vesikel	cm ³
$V_{V,i}$	Summe des inneren Vesikelvolumens aller Vesikel	cm ³

$V_{V,0}$	Inneres Vesikelvolumen eines einzelnen Vesikels	cm^3
V_0	Konstante Exponentialfunktion	-
V_∞	Probenvolumen	cm^3
\dot{V}_P	Zulauftrate der Polymerlösung	L h^{-1}
VE	Verkapselungseffizienz	%
VR	Verdünnungsrate	h^{-1}
W		
w	Gemessene Frequenz	s^{-1}
w_0	Ausgesendete Frequenz	s^{-1}
w'	Frequenzverschiebung	s^{-1}
X		
x	x -Richtung über Membran	m
Y		
y	Abstand in y -Richtung	m
y_0	Konstante Exponentialfunktion	-
Z		
z	Anzahl Rührerblätter	-
z_i	Anzahl der Rührer	-
$z - \text{Mittel}$	Harmonischer, intensitätsgemittelter Partikeldurchmesser	m
ZR	Zählrate	-
ZR_t	Zählrate der belasteten Probe zum Zeitpunkt t	kc s^{-1}
ZR_0	Zählrate der unbelasteten Probe zum Zeitpunkt $t = 0$	kc s^{-1}

Griechische Symbole

α	Anstellwinkel der Rührerblätter	°
α_H	Wärmeübergangszahl	$\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$
β	Apparateabhängiger Parameter für Laser	-
γ	Scherrate	s^{-1}
ε	Extinktionskoeffizient	$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
ε_{max}	Maximale Energiedissipation	W kg^{-1}
ε_ϕ	Mittlere Energiedissipation	W kg^{-1}
η	Dynamische Viskosität	N s m^{-2}
η_{H_2O}	Dynamische Viskosität von Wasser	N s m^{-2}
η_M	Dynamische Viskosität der Membran	N s m^{-2}
η_V	Dynamische Viskosität der Polymersomendispersion	N s m^{-2}
λ	Wellenlänge des Lichtes	m
μ_2	Varianz	s^{-2}
ρ	Dichte	kg m^{-3}
τ	Schubspannung	N m^{-2}
Γ	Abklingrate	s^{-1}
θ	Winkel der Streulichtmessung	°
θ_n	Mischzeitenkennzahl	-
Φ	Verhältnis von zu maximaler zu mittlerer Energiedissipation	-

13 Anhang

13.1 Weiterführende Ergebnisse

13.1.1 Viskosität der Polymerlösung

Die dynamische Viskosität von flüssigen Fluiden nimmt mit steigender Temperatur ab. Im Falle der Polymerlösung war diese zudem von der Polymerkonzentration abhängig. Da im Rahmen des Herstellungsprozesses von Polymersomen über die Ethanolmethode verschiedene Konzentrationen untersucht wurden (Kapitel 5.1.2), wurde die dynamische Viskosität einer 10 % w/v, einer 20 % w/v und einer 50 % w/v Polymerlösung bei Temperaturen von 4 °C bis 60 °C in Abhängigkeit von der Scherrate untersucht (Rheomat RM 115, proRheo, Althengstett Deutschland). Anhand der in Abbildung 13.1 deutlich abnehmenden Viskosität bei zunehmender Scherrate zeigte sich das strukturviskose Verhalten der Polymerlösung.

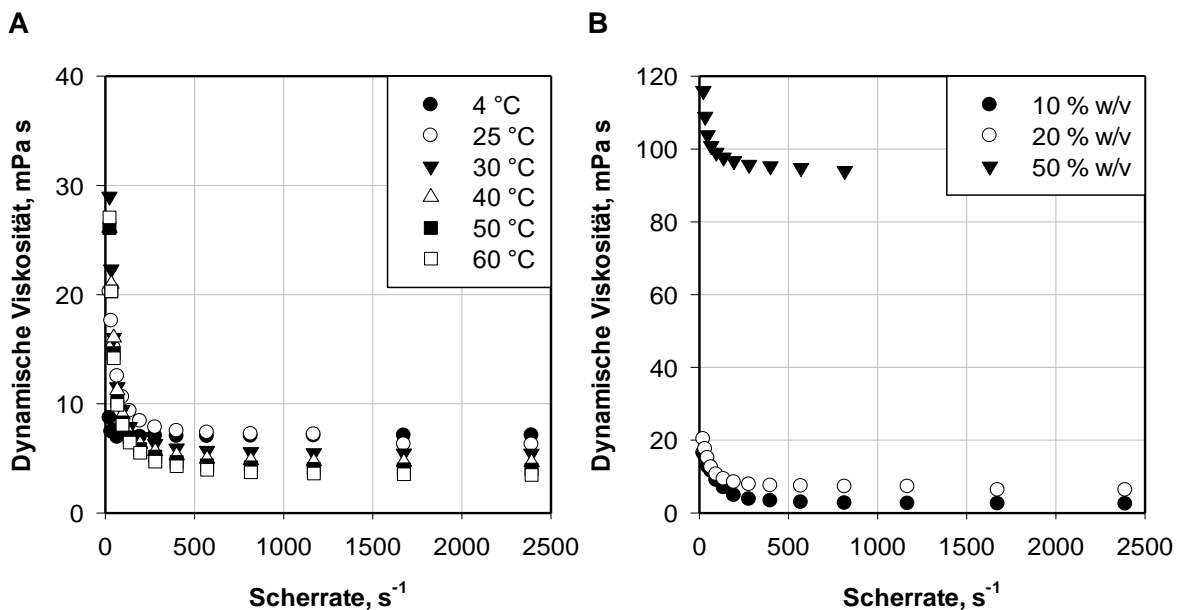


Abbildung 13.1: A) Verlauf der dynamischen Viskosität einer 20 % w/v Polymerlösung über der Scherrate in Abhängigkeit von der Temperatur. B) Verlauf der dynamischen Viskosität der Polymerlösung über der Scherrate bei 25 °C in Abhängigkeit von der Konzentration.

Bei hohen Scherraten ($\gamma > 1000 \text{ s}^{-1}$) näherte sich die dynamische Viskosität einem konstanten Wert an. So lag die dynamische Viskosität der 20 % w/v Polymerlösung bei einer Scherrate von 2390 s^{-1} zwischen $7,1 \text{ mPa s}$ bei 4 °C und $3,5 \text{ mPa s}$ bei 60 °C (Abbildung 13.1 A). Einen deutlich höheren Einfluss auf die dynamische Viskosität zeigte die Polymerkonzentration. Bei

einer Scherrate von 2390 s^{-1} und bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ lag diese bei einer 10 % w/v Lösung mit 2,5 mPa s unter jener der 20 % w/v Lösung mit 6,2 mPa s. Bei einer Konzentration von 50 % w/v stieg die dynamische Viskosität auf hohe Werte von circa 100 mPa s (Abbildung 13.1 B).

13.1.2 Extinktionsmessungen

In dieser Arbeit konnte im Rahmen der Aufklärung des Vesikelbildungsprozesses (Kapitel 5.2) bereits gezeigt werden, dass, neben der dynamischen Lichtstreuung auch die Extinktion für die Charakterisierung der Polymersomendispersion herangezogen werden kann. Daher wurde das Extinktionsspektrum einer 1 % w/v Polymersomendispersion, welche über den etablierten Prozess (Kapitel 5.1.2) hergestellt wurde, im Bereich von 230 nm bis 400 nm aufgenommen. Wie in

Abbildung 13.2 A dargestellt, fiel die Extinktion zwischen 230 nm und 270 nm stark ab. Im Bereich von circa 270 nm bis 320 nm zeigte sich ein Plateau, bevor die Extinktion bei höheren Wellenlängen wiederum stark abnahm. In dieser Arbeit wurde die Extinktion der Vesikeldispersionen innerhalb des genannten Plateaus bei 280 nm gemessen.

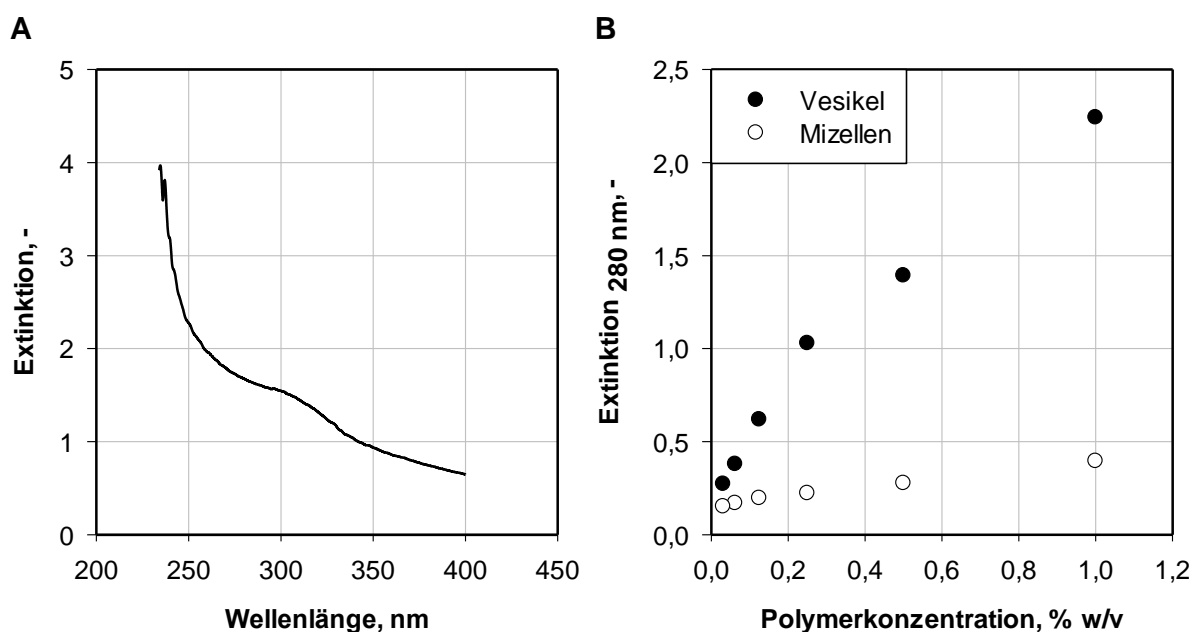


Abbildung 13.2: A) Extinktionsspektrum einer 1 % w/v Polymersomendispersion. B) Konzentrationsabhängige Extinktion der Mizell- und Vesikeldispersion bei 280 nm.

Neben der Abhängigkeit der Extinktion von der Wellenlänge wurde auch der Einfluss der Partikelgröße bei variierender Polymerkonzentration untersucht. In

Abbildung 13.2 B sind die konzentrationsabhängige Extinktion einer Dispersion, welche überwiegend Mizellen enthält (z -Mittel = 28 nm, PDI = 0,13), und die Extinktion einer Polymersomendispersion (z -Mittel = 190 nm, PDI = 0,19) bei 280 nm dargestellt. Die Extinktion der Vesikeldispersion lag erwartungsgemäß deutlich über der Extinktion der Dispersion die überwiegend kleine Strukturen enthielt, da große Vesikel das Licht stärker streuen als kleine Mizellen. Von besonderem Interesse aber war die Erkenntnis, dass die Extinktion beider Dispersionen mit zunehmender Polymerkonzentration bis zu einem Wert von mindestens 0,25 % w/v linear anstieg. Dies ermöglichte die indirekte Quantifizierung der Polymersomen über eine Standardgerade.

13.1.3 Zweistufige Polymersomenbildung

Im Rahmen der Etablierung eines effizienten Polymersomenherstellungsprozesses (Kapitel 5.1.2) wurde gezeigt, dass Polymervesikel mit niedriger Polydispersität (PDI < 0,2) nur bis zu einer Polymerkonzentration von 1 % w/v gebildet werden konnten. Eine höhere Polymerkonzentration bei gleichzeitigem Erzielen von Polymersomen mit guter Qualität würde das verkapselbare Gesamtvolumen innerhalb der Polymersomendispersion deutlich erhöhen. So wurde der Versuch der zweistufigen Herstellung einer 2 % w/v Polymersomendispersion unternommen. Hierfür wurde zunächst in Stufe 1 über das etablierte Verfahren über die Injektionsmethode eine 1 % w/v Polymersomendispersion hergestellt. Nach 120 min Prozessdauer war eine niedrige Polydispersität mit PDI = 0,19 erzielt. Die Extinktion, dargestellt in Abbildung 13.3, verlief bis zu diesem Zeitpunkt ähnlich wie jene, die in Kapitel 5.2.1 anhand von Abbildung 5.12 B diskutiert wurde.

Die zunehmende Extinktion bildet die zeitliche Zunahme der Partikeldurchmesser ab, da größere Partikel das einfallende Licht mehr streuen, was zu erhöhter Extinktion führt. In Stufe 2 wurde nach 120 min die Polymerkonzentration durch erneute Zugabe einer 20 % w/v Polymerlösung auf 2 % w/v erhöht. Danach stieg der Wert der Extinktion erneut rasch an und folgte in den weiteren 120 min einem qualitativ ähnlichen Verlauf wie in Stufe 1. Dies deutet darauf hin, dass durch die erneute Zugabe der Polymerlösung neue Strukturen entstanden, die ihrerseits im zeitlichen Verlauf ebenfalls an Größe zunahmten. Nach einer gesamten Prozessdauer von 240 min lag eine Partikelgrößenverteilung mit einem z -Mittel von 178 nm und PDI = 0,22 vor. Die gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass es möglich sein könnte Polymersomendispersionen mit Konzentrationen > 1 % w/v in einem mehrstufigen Prozess herzustellen. Weitere Untersuchungen in diesem Bereich, begleitet von TEM-Aufnahmen, könnten die Art nach der 2. Stufe vorliegenden Morphologien klären.

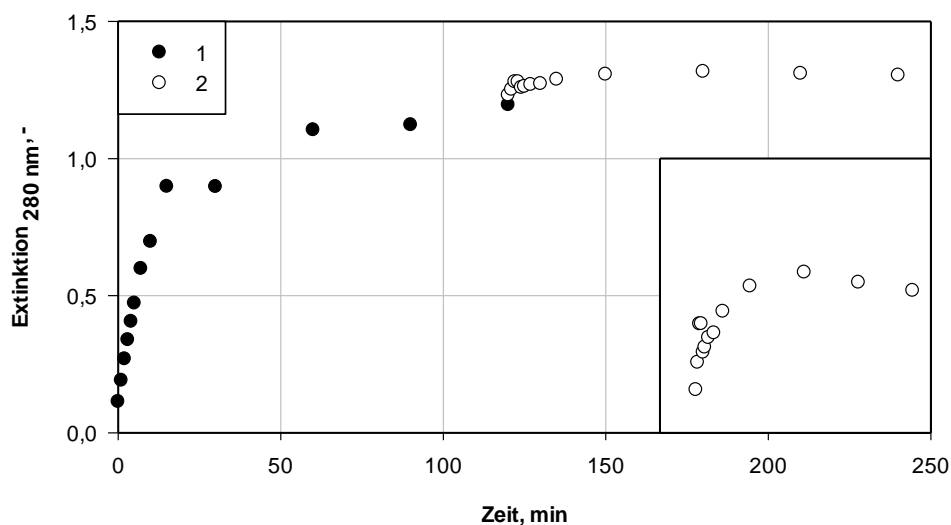


Abbildung 13.3: Verlauf der Extinktion während der zweistufigen Polymersomenherstellung. In Stufe 1 wurde über das etablierte Prozess eine 1 % w/v Polymersomendispersion hergestellt. Nach 120 min wurde in Stufe 2 die Polymerkonzentration im Reaktionsansatz sprunghaft von auf 2 % w/v erhöht.

13.1.4 Verfahrenstechnische Charakterisierungen im Liter-Maßstab

Korrekturgleichung der Rührerdrehzahl

Die am Steuergerät der Rührerwelle angezeigte Rührerdrehzahl $n_{Anzeige}$ entsprach nicht der tatsächlichen Rührerdrehzahl n . Um diese zu bestimmen, wurde eine Korrekturgleichung aufgestellt. Hierfür wurde ein handelsüblicher Fahrradtachometer (BC5.12, Sigma, Deutschland) verwendet. Durch Montage des Magneten am Rührer, und Installation des Sensors an der Reaktorinnenwand konnte die Korrelation zwischen n_{real} und $n_{Anzeige}$ im Drehzahlbereich bis zu 1200 min^{-1} aufgestellt werden:

$$n = (1,1603 \cdot n_{Anzeige}) + 35,34 \quad (13.1)$$

n	Tatsächliche Rührerdrehzahl	min^{-1}
$n_{Anzeige}$	Angezeigte Rührerdrehzahl	min^{-1}

Rührercharakteristik

Referenz: S-Rührer im miniaturisierten Rührkesselreaktor. In Tabelle 13-1 sind die verfahrenstechnischen Parameter des S-Rührers (Tabelle 4-1) aufgelistet. Die Parameter wurden wie folgt bestimmt beziehungsweise berechnet:

- Rührerdrehzahl n : Anzeige am Steuergerät
- Rührerumfangsgeschwindigkeit u_{tip} : Gleichung (3.39)
- Reynoldszahl Re : Gleichung (3.40) mit $\rho_{H_2O,20^\circ C} = 1000 \text{ kg m}^{-3}$ und $\eta_{H_2O,20^\circ C} = 0,001 \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
- Volumetrischer Leistungseintrag $P V^{-1}$
 - $n \leq 2100 \text{ min}^{-1}$: Experimentelle Bestimmung (Riedlberger, 2012)
 - $n > 2100 \text{ min}^{-1}$: Über $Ne Re^{0,333} = 19,2 = \text{const.}$ Wert gemittelt im turbulenten Strömungsbereich innerhalb von $n = 1200 \text{ min}^{-1}$ bis $n = 2100 \text{ min}^{-1}$
- Newtonzahl Ne : Gleichung (3.47) mit $\rho_{H_2O,20^\circ C} = 1000 \text{ kg m}^{-3}$
- Maximale Energiedissipation ε_{max} : Gleichung (3.51) mit $a = 4$ (bewehrter Reaktor) und $a = 16$ (unbewehrter Reaktor)
- Froudezahl Fr : Gleichung (3.41) mit $g = 9,81 \text{ m s}^{-2}$

Tabelle 13-1: Verfahrenstechnische Parameter bei Verwendung des S-Rührers im unbewehrten, miniaturisierten Rührkesselreaktor.

n , -	u_{tip} , $m\ s^{-1}$	Re , -	$P V^{-1}$, $W\ L^{-1}$	$Ne\ Re^{0,333}$, -	ϵ_{max} , $W\ kg^{-1}$	Fr , -
0	0,00	0	0,0	0,0	0,0	0,00
200	0,15	691	0,0	80,8	0,1	0,02
300	0,23	1037	0,0	41,0	0,2	0,04
400	0,30	1382	0,0	33,8	0,3	0,07
500	0,38	1728	0,1	35,0	0,6	0,10
600	0,45	2074	0,2	38,7	1,2	0,15
700	0,53	2419	0,2	30,0	1,4	0,20
800	0,60	2765	0,2	24,0	1,5	0,26
900	0,68	3110	0,3	21,9	1,9	0,33
1000	0,75	3456	0,3	22,0	2,6	0,41
1100	0,83	3802	0,4	18,8	2,8	0,49
1200	0,90	4147	0,5	19,0	3,6	0,59
1300	0,98	4493	0,6	19,0	4,5	0,69
1400	1,06	4838	0,7	18,9	5,4	0,80
1500	1,13	5184	0,9	19,6	6,8	0,92
1600	1,21	5530	1,1	20,1	8,3	1,04
1700	1,28	5875	1,3	20,5	9,9	1,18
1800	1,36	6221	1,5	20,0	11,2	1,32
1900	1,43	6566	1,7	18,9	12,3	1,47
2000	1,51	6912	1,9	18,5	13,8	1,63
2100	1,58	7258	2,0	17,6	14,9	1,80
2200	1,66	7603	2,5	19,2	18,4	1,97
2400	1,81	8294	3,1	19,2	23,2	2,35

Tabelle 13-1 Fortsetzung: Verfahrenstechnische Parameter bei Verwendung des S-Rührers im unbewehrten, miniaturisierten Rührkesselreaktor.

n , -	u_{tip} , $m\ s^{-1}$	Re , -	$P V^{-1}$, $W\ L^{-1}$	$Ne\ Re^{0,333}$, -	ε_{max} , $W\ kg^{-1}$	Fr , -
2500	1,88	8640	3,5	19,2	25,9	2,55
2600	1,96	8986	3,9	19,2	28,8	2,76
2800	2,11	9677	4,7	19,2	35,1	3,20
3000	2,26	10368	5,7	19,2	42,2	3,67
3200	2,41	11059	6,8	19,2	50,1	4,18
3400	2,56	11750	8,0	19,2	58,9	4,71
3500	2,64	12096	8,6	19,2	63,6	4,99
3600	2,71	12442	9,3	19,2	68,6	5,28
3800	2,87	13133	10,7	19,2	79,2	5,89
4000	3,02	13824	12,3	19,2	90,8	6,52

Rührer im Liter-Maßstab. In Tabelle 13-2 bis Tabelle 13-10 sind die verfahrenstechnischen Parameter der Rührer R1 bis R5 aus Tabelle 4-2 aufgelistet. Die Parameter wurden wie folgt bestimmt beziehungsweise berechnet:

- Reale Rührerdrehzahl n : Siehe Kapitel 13.1.4
- Rührerumfangsgeschwindigkeit u_{tip} : Gleichung (3.39)
- Reynoldszahl Re : Gleichung (3.40) mit $\rho_{H_2O,20\ ^\circ C} = 1000\ kg\ m^{-3}$ und $\eta_{H_2O,20\ ^\circ C} = 0,001\ kg\ m^{-2}\ s^{-1}$
- Volumetrischer Leistungseintrag $P V^{-1}$: Siehe Kapitel 4.3.3 mit $V = 1,5\ L$
- Newtonzahl Ne : Gleichung (3.47) mit $\rho_{H_2O,20\ ^\circ C} = 1000\ kg\ m^{-3}$
- Maximale Energiedissipation ε_{max} : Gleichung (3.51) mit $a = 4$ (bewehrter Reaktor) und $a = 16$ (unbewehrter Reaktor)
- Froudezahl Fr : Gleichung (3.41) mit $g = 9,81\ m\ s^{-2}$

Tabelle 13-2: Verfahrenstechnische Parameter bei Verwendung von drei Rührertypen R1 (Tabelle 4-2) bei $h_{S,1}=0,06$ m, $h_{S,2}=0,12$ m, $h_{S,2}=0,18$ m im unbewehrten Reaktor.

$n,$ -	$u_{tip},$ $m\ s^{-1}$	$Re,$ -	$P V^{-1},$ $W\ L^{-1}$	$Ne,$ -	$\epsilon_{max},$ $W\ kg^{-1}$	$Fr,$ -
0	0,00	0	0,0	0,0	0,0	0,00
47	0,10	1252	2,4	74768,9	198,4	0,00
59	0,12	1561	2,0	31535,3	162,3	0,00
82	0,17	2180	1,3	7721,6	108,2	0,01
105	0,22	2799	1,6	4257,1	126,2	0,01
186	0,39	4965	2,0	980,7	162,3	0,04
267	0,56	7130	2,2	367,8	180,3	0,08
325	0,68	8678	1,1	102,0	90,2	0,12
383	0,80	10225	2,0	112,3	162,3	0,17
499	1,05	13319	1,1	28,2	90,2	0,28
615	1,29	16413	1,8	24,1	144,3	0,43
731	1,53	19507	2,0	16,2	162,3	0,61
848	1,78	22601	2,4	12,7	198,4	0,81
964	2,02	25695	2,2	7,9	180,3	1,05
1080	2,26	28789	2,2	5,6	180,3	1,32
1196	2,50	31883	1,8	3,3	144,3	1,62
1312	2,75	34977	1,3	1,9	108,2	1,95
1428	2,99	38071	1,8	1,9	144,3	2,31
1544	3,23	41165	1,8	1,5	144,3	2,70
1660	3,48	44259	2,0	1,4	162,3	3,12
1776	3,72	47353	2,7	1,5	216,4	3,57

Tabelle 13-3: Verfahrenstechnische Parameter bei Verwendung von Rührertyp R2 (Tabelle 4-2) bei $h_s=0,072$ m im unbewehrten Reaktor.

$n,$ -	$u_{tip},$ $m\ s^{-1}$	$Re,$ -	$P V^{-1},$ $W\ L^{-1}$	$Ne,$ -	$\varepsilon_{max},$ $W\ kg^{-1}$	$Fr,$ -
0	0,00	0	0,0	0,0	0,0	0,00
47	0,12	1803	1,1	13658,2	385,5	0,00
59	0,15	2248	1,1	7040,7	385,5	0,00
82	0,21	3139	1,6	3620,3	539,6	0,01
105	0,26	4030	1,1	1222,0	385,5	0,01
186	0,47	7149	1,3	262,7	462,5	0,05
267	0,67	10268	2,0	133,0	693,8	0,10
325	0,82	12496	1,8	65,6	616,7	0,14
383	0,96	14723	2,2	50,1	770,9	0,20
499	1,26	19179	2,0	20,4	693,8	0,34
615	1,55	23634	2,4	13,3	848,0	0,51
731	1,84	28090	2,7	8,7	925,1	0,73
848	2,13	32545	3,3	7,0	1156,4	0,98
964	2,42	37000	5,6	7,9	1927,3	1,26
1080	2,71	41456	7,3	7,4	2544,0	1,58
1196	3,00	45911	8,0	6,0	2775,3	1,94
1312	3,30	50367	8,9	5,0	3083,6	2,34
1428	3,59	54822	9,8	4,3	3392,0	2,77
1544	3,88	59278	10,0	3,5	3469,1	3,24
1660	4,17	63733	10,7	3,0	3700,4	3,74
1776	4,46	68188	12,7	2,9	4394,2	4,29
1892	4,75	72644	14,4	2,7	5010,9	4,86
2008	5,05	77099	16,0	2,5	5550,6	5,48
2124	5,34	81555	16,4	2,2	5704,7	6,13

Tabelle 13-4: Verfahrenstechnische Parameter bei Verwendung von Rührertyp R3 (Tabelle 4-2) bei $h_s=0,072$ im unbewehrten Reaktor.

$n,$ -	$u_{tip},$ $m\ s^{-1}$	$Re,$ -	$P V^{-1},$ $W\ L^{-1}$	$Ne,$ -	$\varepsilon_{max},$ $W\ kg^{-1}$	$Fr,$ -
0	0,00	0	0,0	0,0	0,0	0,00
47	0,13	2281	n/a	n/a	n/a	0,00
59	0,17	2845	n/a	n/a	n/a	0,01
82	0,23	3973	n/a	n/a	n/a	0,01
105	0,30	5101	n/a	n/a	n/a	0,02
186	0,53	9048	n/a	n/a	n/a	0,05
267	0,76	12995	n/a	n/a	n/a	0,11
325	0,92	15815	n/a	n/a	n/a	0,16
383	1,08	18634	n/a	n/a	n/a	0,22
499	1,41	24273	n/a	n/a	n/a	0,38
615	1,74	29912	n/a	n/a	n/a	0,58
731	2,07	35551	n/a	n/a	n/a	0,82
848	2,40	41190	n/a	n/a	n/a	1,10
964	2,72	46829	n/a	n/a	n/a	1,42
1080	3,05	52468	n/a	n/a	n/a	1,78
1196	3,38	58106	n/a	n/a	n/a	2,19
1312	3,71	63745	n/a	n/a	n/a	2,63
1428	4,04	69384	0,2	0,1	49,3	3,12
1544	4,36	75023	1,1	0,2	246,6	3,64
1660	4,69	80662	1,1	0,2	246,6	4,21
1776	5,02	86301	1,1	0,1	246,6	4,82
1892	5,35	91940	1,3	0,1	296,0	5,47
2008	5,68	97579	2,4	0,2	542,6	6,16
2124	6,00	103218	2,7	0,2	591,9	6,90

n/a: Der Leistungseintrag konnte aufgrund der Messgrenze des Wattmeters nicht bestimmt werden. Folglich konnten Ne und ε_{max} nicht berechnet werden.

Tabelle 13-5: Verfahrenstechnische Parameter bei Verwendung von Rührertyp R4a (Tabelle 4-2) bei $h_s=0,072$ im unbewehrten Reaktor.

$n,$ -	$u_{tip},$ $m\ s^{-1}$	$Re,$ -	$P V^{-1},$ $W\ L^{-1}$	$Ne,$ -	$\varepsilon_{max},$ $W\ kg^{-1}$	$Fr,$ -
0	0,00	0	0,0	0,0	0,0	0,00
103	0,35	7280	n/a	n/a	n/a	0,02
197	0,67	13889	n/a	n/a	n/a	0,07
291	0,99	20498	n/a	n/a	n/a	0,16
385	1,31	27107	n/a	n/a	n/a	0,27
479	1,63	33716	n/a	n/a	n/a	0,42
573	1,95	40325	0,4	0,6	24,2	0,60
667	2,27	46934	0,7	0,6	39,5	0,82
760	2,59	53544	1,6	1,0	90,4	1,06
854	2,91	60153	1,8	0,8	104,4	1,34
948	3,23	66762	2,8	0,9	162,9	1,65
1042	3,55	73371	3,3	0,8	190,9	2,00
1136	3,87	79980	5,0	1,0	287,7	2,37
1230	4,19	86589	6,1	0,9	347,5	2,78
1324	4,50	93198	6,8	0,8	389,5	3,22
1417	4,82	99807	7,9	0,8	453,1	3,70
1511	5,14	106417	9,0	0,7	515,5	4,20
1605	5,46	113026	10,1	0,7	576,6	4,74
1699	5,78	119635	12,1	0,7	691,2	5,31
1793	6,10	126244	13,4	0,6	766,3	5,92
1887	6,42	132853	14,4	0,6	827,4	6,55

n/a: Der Leistungseintrag konnte aufgrund der Messgrenze des Wattmeters nicht bestimmt werden. Folglich konnten Ne und ε_{max} nicht berechnet werden.

Tabelle 13-6: Verfahrenstechnische Parameter bei Verwendung von Rührertyp R4a (Tabelle 4-2) bei $h_s=0,050$ im unbewehrten Reaktor.

$n,$ -	$u_{tip},$ $m\ s^{-1}$	$Re,$ -	$P V^{-1},$ $W\ L^{-1}$	$Ne,$ -	$\varepsilon_{max},$ $W\ kg^{-1}$	$Fr,$ -
0	0,00	0	0,0	0,0	0,0	0,00
103	0,35	7280	n/a	n/a	n/a	0,02
197	0,67	13889	0,1	4,0	6,4	0,07
291	0,99	20498	0,3	3,5	17,8	0,16
385	1,31	27107	0,6	2,9	34,4	0,27
479	1,63	33716	0,8	2,1	47,1	0,42
573	1,95	40325	1,2	1,7	66,2	0,60
667	2,27	46934	1,7	1,6	99,3	0,82
760	2,59	53544	2,5	1,6	143,8	1,06
854	2,91	60153	3,4	1,5	194,8	1,34
948	3,23	66762	4,6	1,5	266,0	1,65
1042	3,55	73371	5,6	1,4	319,5	2,00
1136	3,87	79980	6,7	1,3	384,4	2,37
1230	4,19	86589	7,9	1,2	453,1	2,78
1324	4,50	93198	9,1	1,1	519,3	3,22
1417	4,82	99807	9,7	1,0	555,0	3,70
1511	5,14	106417	10,9	0,9	625,0	4,20
1605	5,46	113026	12,2	0,8	701,4	4,74
1699	5,78	119635	13,5	0,8	772,6	5,31
1793	6,10	126244	14,6	0,7	838,8	5,92
1887	6,42	132853	16,2	0,7	930,5	6,55

n/a: Der Leistungseintrag konnte aufgrund der Messgrenze des Wattmeters nicht bestimmt werden. Folglich konnten Ne und ε_{max} nicht berechnet werden.

Tabelle 13-7: Verfahrenstechnische Parameter bei Verwendung von Rührertyp R4a (Tabelle 4-2) bei $h_s=0,072$ im bewehrten Reaktor.

n , -	u_{tip} , $m\ s^{-1}$	Re , -	$P V^{-1}$, $W\ L^{-1}$	Ne , -	ε_{max} , $W\ kg^{-1}$	Fr , -
0	0,00	0	0,0	0,0	0,0	0,00
47	0,16	3306	n/a	n/a	n/a	0,00
59	0,20	4123	n/a	n/a	n/a	0,01
82	0,28	5757	n/a	n/a	n/a	0,01
105	0,36	7391	n/a	n/a	n/a	0,02
186	0,63	13110	n/a	n/a	n/a	0,06
267	0,91	18829	0,67	9,74	9,55	0,13
325	1,11	22914	0,67	5,40	9,55	0,19
383	1,30	26999	2,00	9,91	28,64	0,27
499	1,70	35169	3,33	7,47	47,73	0,46
615	2,09	43340	6,44	7,72	92,28	0,70
731	2,49	51510	10,44	7,45	149,56	0,98
848	2,88	59680	16,44	7,54	235,48	1,32
964	3,28	67850	23,56	7,35	337,31	1,71
1080	3,67	76020	33,11	7,35	474,15	2,15
1196	4,07	84191	44,00	7,19	630,08	2,63
1312	4,46	92361	54,67	6,76	782,82	3,17

n/a: Der Leistungseintrag konnte aufgrund der Messgrenze des Wattmeters nicht bestimmt werden. Folglich konnten Ne und ε_{max} nicht berechnet werden.

Tabelle 13-8: Verfahrenstechnische Parameter bei Verwendung von Rührertyp R4b (Tabelle 4-2) bei $h_s=0,050$ im unbewehrten Reaktor.

$n,$ -	$u_{tip},$ $m\ s^{-1}$	$Re,$ -	$P V^{-1},$ $W\ L^{-1}$	$Ne,$ -	$\varepsilon_{max},$ $W\ kg^{-1}$	$Fr,$ -
0	0,00	0	0,0	0,0	0,0	0,00
103	0,35	7280	0,9	224,7	50,9	0,02
197	0,67	13889	1,0	37,2	58,6	0,07
291	0,99	20498	1,3	15,1	76,4	0,16
385	1,31	27107	1,4	7,1	82,7	0,27
479	1,63	33716	1,8	4,6	103,1	0,42
573	1,95	40325	2,3	3,4	131,1	0,60
667	2,27	46934	2,9	2,8	168,0	0,82
760	2,59	53544	4,1	2,6	235,5	1,06
854	2,91	60153	5,0	2,2	285,1	1,34
948	3,23	66762	5,8	1,9	334,8	1,65
1042	3,55	73371	6,8	1,7	388,2	2,00
1136	3,87	79980	7,5	1,4	427,7	2,37
1230	4,19	86589	7,9	1,2	454,4	2,78
1324	4,50	93198	8,9	1,1	509,2	3,22
1417	4,82	99807	9,4	0,9	539,7	3,70
1511	5,14	106417	10,2	0,8	581,7	4,20
1605	5,46	113026	11,3	0,8	646,6	4,74
1699	5,78	119635	11,8	0,7	673,4	5,31
1793	6,10	126244	12,9	0,6	737,0	5,92
1887	6,42	132853	13,9	0,6	796,8	6,55

Tabelle 13-9: Verfahrenstechnische Parameter bei Verwendung von Rührertyp R5 (Tabelle 4-2) bei $h_s=0,072$ im unbewehrten Reaktor.

$n,$ -	$u_{tip},$ $m s^{-1}$	$Re,$ -	$P V^{-1},$ $W L^{-1}$	$Ne,$ -	$\varepsilon_{max},$ $W kg^{-1}$	$Fr,$ -
0	0,00	0	0,0	0,0	0,0	0,00
103	0,49	13956	1,1	55,2	97,1	0,03
197	0,93	26627	0,8	5,9	71,8	0,10
291	1,37	39298	1,0	2,3	91,2	0,22
385	1,81	51969	1,2	1,2	108,7	0,38
479	2,26	64639	1,9	0,9	163,0	0,58
573	2,70	77310	2,6	0,8	227,1	0,84
667	3,14	89981	3,9	0,7	339,7	1,13
760	3,58	102652	5,6	0,7	489,1	1,47
854	4,03	115322	7,6	0,7	667,7	1,86
948	4,47	127993	9,4	0,6	821,1	2,29
1042	4,91	140664	11,5	0,6	1003,5	2,77
1136	5,35	153335	13,6	0,5	1186,0	3,29
1230	5,79	166005	15,4	0,5	1343,2	3,85
1324	6,24	178676	16,1	0,4	1409,2	4,46
1600	7,54	216000	27,0	0,4	2358,4	6,52

Tabelle 13-10: Verfahrenstechnische Parameter bei Verwendung von Rührertyp R5 (Tabelle 4-2) bei $h_s=0,050$ im unbewehrten Reaktor.

$n,$ -	$u_{tip},$ $m\ s^{-1}$	$Re,$ -	$P V^{-1},$ $W\ L^{-1}$	$Ne,$ -	$\varepsilon_{max},$ $W\ kg^{-1}$	$Fr,$ -
0	0,00	0	0,0	0,0	0,0	0,00
103	0,49	13956	n/a	n/a	n/a	0,03
197	0,93	26627	0,4	2,9	34,9	0,10
291	1,37	39298	0,6	1,3	50,5	0,22
385	1,81	51969	0,8	0,7	67,9	0,38
479	2,26	64639	1,8	0,9	161,1	0,58
573	2,70	77310	2,7	0,8	236,8	0,84
667	3,14	89981	4,0	0,7	349,4	1,13
760	3,58	102652	5,3	0,7	463,9	1,47
854	4,03	115322	7,3	0,6	638,6	1,86
948	4,47	127993	9,2	0,6	799,7	2,29
1042	4,91	140664	11,3	0,5	984,1	2,77
1136	5,35	153335	13,4	0,5	1170,5	3,29
1230	5,79	166005	15,2	0,4	1331,6	3,85
1324	6,24	178676	16,4	0,4	1432,5	4,46
1600	7,54	216000	17,1	0,2	2183,7	6,52

n/a: Der Leistungseintrag konnte aufgrund der Messgrenze des Wattmeters nicht bestimmt werden. Folglich konnten Ne und ε_{max} nicht berechnet werden.

Mischzeit

Es wurde die Mischzeit der Rührertypen R4a, R4b und R5 (Tabelle 4-2) untersucht. Dies erfolgte anhand einer Farbumschlagreaktion. Hierfür wurde der Reaktor mit einer wässrigen Lösung eines dunkelvioletten Iod-Stärke Komplexes ($750\ \mu M$ Iod, $1\ g\ L^{-1}$ Stärke) befüllt. Dieser wurde durch die impulsartige Zugabe von $5\ mL$ einer $5\ mM$ Natriumthiosulfat-Lösung basierend auf der Redoxreaktion $I_2 + 2\ S_2O_3^{2-} \rightarrow S_4O_6^{2-} + 2\ I^-$ entfärbt. Die vollständige Homogenität im Reaktor galt dann als erreicht, sobald in allen Zonen des Reaktors eine farblose Lösung aus $S_4O_6^{2-}$ und $2\ I^-$ Ionen vorlag. Dieser Zeitpunkt wurde als die charakteristische Mischzeit t_M definiert, welche abhängig von der Rührerdrehzahl ist. Das Erreichen der vollständigen Homogenität im Reaktor wurde mit Hilfe der Software Avidemux, welche eine Videobildanalyse mit einer Auflösung im hundertstel Sekunden Bereich ermöglicht, bestimmt.

In Abbildung 13.4 sind die für die Rührer R4a, R4b und R5 bestimmten Mischzeiten in Abhängigkeit von der Froudezahl Fr dargestellt. Ab dem Bereich $Fr > 4$ wies Rührer R5

durchgehend die niedrigsten Mischzeiten auf, was mit dem verhältnismäßig großen dimensionslosen Rührerdurchmesser von $d D^{-1} = 0,9$ im Vergleich zu Rührer R4a und R4b mit $d D^{-1} = 0,65$ zu begründen ist. Auffallend war auch, dass für den abwärts fördernden Rührer R4b bei $Fr > 5$ im Mittel 0,5 s längere Mischzeiten verzeichnet wurden als für den aufwärts fördernden Rührer R4a.

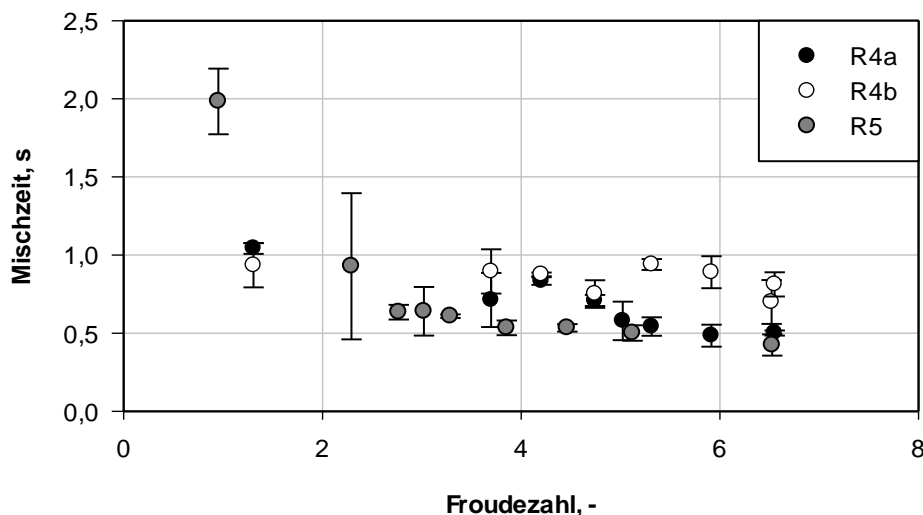


Abbildung 13.4: Mischzeit in Abhängigkeit vom Rührertyp und der Froudezahl. $N = 3$.

Die Mischzeiten bei $Fr = 6,52$, welche dem Übertragungskriterium der Maßstabsübertragung entspricht (Kapitel 5.3.4), sind in Tabelle 13-11 zusammengefasst.

Tabelle 13-11: Mischzeiten der Rührertypen R4a, R4b und R5 bei $Fr = 6,52$.

Rührer	Mischzeit t_M , s
R4a	$0,50 \pm 0,02$
R4b	$0,81 \pm 0,08$
R5	$0,42 \pm 0,07$

13.1.5 Berry-Plot der statischen Lichtstreuung

Die Messung der statischen Lichtstreuung (Kapitel 4.7.1) wurde über den sogenannten Berry-Plot, dargestellt in Abbildung 13.5, von der Firma ALV (Langen, Deutschland) ausgewertet.

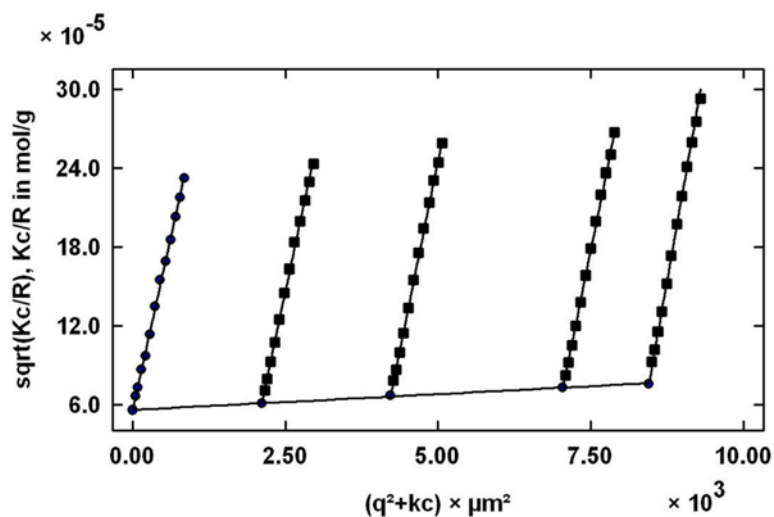


Abbildung 13.5: Berry-Plot zur Bestimmung der molaren Masse von Polymersomen $M_{W,Agg}$.

13.1.6 Aggregationszahl beladener Polymervesikel

In Tabelle 13-12 sind die Werte für die Berechnung der Aggregationszahl N_{Agg} von mit 15 mM Calcein beladenen Polymersomen (Kapitel 6.2.1) zusammengefasst.

Tabelle 13-12: Gesammelte Werte für die Berechnung der Aggregationszahl N_{Agg} von mit 15 mM Calcein beladenen Polymersomen.

Symbol	Bezeichnung	Wert
$c_{\infty,C}$	Calceinkonzentration in der Probe nach Vesikellyse	$79,6 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$
$c_{V,C}$	Verkapselte Calceinkonzentration	15 mM
V_{∞}	Probenvolumen	1 cm^3
$V_{V,i}$	Summe des inneren Vesikelvolumens aller Vesikel	$0,0053 \text{ cm}^3$
$d_{V,a}$	Außendurchmesser des Vesikels	111 nm
s	Membranstärke	14 nm
$d_{V,i}$	Innendurchmesser des Vesikels	83 nm
$V_{V,0}$	Inneres Vesikelvolumen eines einzelnen Vesikels	$2,99 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^3$
m_P	Masse Polymer	0,01 g
$M_{W,P}$	Molare Masse des Polymers	7600 g mol^{-1}
N_A	Avogadro-Konstante	$6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
N_P	Anzahl Polymerketten	$7,924 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-3}$
N_V	Anzahl Vesikel	$1,773 \cdot 10^{13} \text{ cm}^{-3}$
N_{Agg}	Aggregationszahl	44687

13.1.7 Permeabilitätskoeffizienten weiterer Stoffe

In dieser Arbeit wurde die Permeabilität von planaren Lipidmembranen (DOPC) und planaren Polymermembranen (PMOXA-PDMS-PMOXA) nicht nur gegenüber der gewählten Modellwirkstoffe Propranolol und Koffein (Kapitel 8.1), sondern auch gegenüber weiteren Stoffen bestimmt. Die Permeabilitätskoeffizienten wurden wiederum über die Konzentrationsbestimmung der Donor- und Akzeptorphase im PAMPA-Systems (Kapitel 4.8.1) über Gleichung (3.28) und Gleichung (3.30) bestimmt.

Substrate und Produkt der Synthese von CMP-*N*-Acetylneuraminsäure

Die Konzentrationsbestimmung der für die Synthese von Cytidin-5'-Monophosphat-*N*-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) notwendigen Substrate *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc), *N*-Acetylmannosamin (ManNAc), *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), Pyruvat sowie CMP-Neu5Ac selbst erfolgte über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Hierfür wurde das Agilent 1100 HPLC-System mit einer Micro-Guard Cation Cartridge Vorsäule und einer Aminex HPX87-Säule verwendet. Die Betriebstemperatur betrug 60 °C und die Flussrate lag bei 0,5 mL min⁻¹. 20 µL Probe wurden mit Hilfe des Laufpuffers (5 mM Schwefelsäure) eluiert und bei 210 nm analysiert.

Es wurde sowohl die Permeabilität von planaren Lipid- als auch planaren Polymermembranen gegenüber CMP-Neu5Ac, GlcNAc, ManNAc, Neu5Ac und Pyruvat bei pH 6, pH 7 und pH 8 (Phosphatpuffer) bestimmt. In keinem der durchgeführten Versuche konnte der untersuchte Stoff innerhalb der im PAMPA-System maximal möglichen Inkubationszeit von 48 h in der Akzeptorphase bestimmt werden. Die in Tabelle 13-13 angegebenen Permeabilitätskoeffizienten stellen demnach Grenzwerte, welche mittels der Nachweisgrenze bestimmt wurden, dar. Die tatsächliche Permeabilität kann somit weit niedriger sein.

Tabelle 13-13: Grenzwerte des negativ dekadischen Logarithmus der Permeabilitätskoeffizienten (cm s⁻¹) von planaren Lipid- und Polymermembranen bei pH 6, pH 7 und pH 8.

Stoff	$-\log Pe$ (cm s ⁻¹)
CMP-Neu5Ac	> 7,0
GlcNAc	> 9,7
ManNAc	> 10,0
Neu5Ac	> 8,9
Pyruvat	> 9,5

Substrat und Produkt der Synthese eines chiralen Alkohols

Untersucht wurde die Permeabilität von planaren Lipid- und Polymermembranen gegenüber Ethyl-(S)-(-)-4-chloro-3-hydroxybutyrat (ECHB) und Ethyl-4-chlor-acetoacetat (ECAA). Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten über Gaschromatographie (Cp-3800, VARIAN, Deutschland) und über eine Kapillarsäule (Lipodex E, 0,2 mm Innendurchmesser, MARCHERY-NAGEL, Düren, Deutschland). Vor der Analyse wurden die zu untersuchenden Stoffe mit Hilfe von Ethylacetat mit 7,2 mM Acetophenon als internem Standard 1:1 extrahiert. Das Probevolumen betrug 5 μL mit einem *inlet-split* von 50. Als Trägergas wurde Helium verwendet. Der Gasstrom betrug hierbei 4 mL min^{-1} und als Temperaturprogramm wurde eingestellt: 10 Minuten isotherm bei 105 $^{\circ}\text{C}$. Die Injektor- und Detektortemperatur wurde auf 250 $^{\circ}\text{C}$ eingestellt. Als Detektor wurde ein Flammenionisationsdetektor (FID) eingesetzt.

In Tabelle 13-14 sind die identifizierten Permeabilitätskoeffizienten von planaren Lipid- und Polymermembranen im ungerührten (ug) und gerührten (gr) PAMPA-System gegenüber ECAA und ECHB zusammengefasst.

Tabelle 13-14: Negativ dekadischer Logarithmus der Permeabilitätskoeffizienten (cm s^{-1}) von planaren Lipid- und Polymermembranen.

	pH	Polymermembran		Lipidmembran	
		ug	gr	ug	gr
ECAA	5	-	-	4,75	4,36
	7	4,77	4,27	4,80	4,29
	9	-	-	7,73	4,35
ECHB	5	5,01	4,73	4,75	4,36
	7,4	5,16	4,84	4,58	4,29
	9	5,59	4,47	4,73	4,35

13.2 Verwendete Puffer und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer wurden in VE-Wasser hergestellt. Dabei wurde der pH bei der jeweiligen Verwendungstemperatur eingestellt. Alle Puffer wurden standardmäßig filtriert (0,2 µm). Für die Verwendung bei der Größenausschlusschromatographie wurden sie zusätzlich entgast. Pufferlösungen, die für Messungen der Permeabilität im PAMPA-System verwendet wurden, wurden mit 0,5 % DMSO, jene für Membranintegritätstest mit 5 % v/v DMSO versetzt.

Tabelle 13-15: Allgemeine Puffer

Puffer	Chemikalie	Konzentration, mM
Acetat, pH 5	Na-Acetat	10
	Essigsäure	10
PBS, pH 7,4	NaCl	137
	KCl	2,7
	Na ₂ HPO ₄	10
	KH ₂ PO ₄	1,8
Tris, pH 8, pH 9	Tris-HCl	10

Tabelle 13-16: Stamm-Lösungen für Phosphatpuffer

Stamm-Lösung	Chemikalie	Konzentration, g L ⁻¹
A	KH ₂ PO ₄	9,078
B	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	11,876

Tabelle 13-17: Phosphatpuffer mit unterschiedlichem pH

pH, -	Konzentration Stamm-Lösung A, % v/v	Konzentration Stamm-Lösung B, % v/v
5	99,05	0,95
6	87,9	12,1
7	38,8	61,2
8	3,1	96,9

Tabelle 13-18: Verwendete Lösungen

Lösung	Chemikalie	Konzentration
Calcein	Calcein in Tris-Puffer, pH 8	15 mM
eGFP	eGFP in Tris-Puffer, pH 8	0,2 mg mL ⁻¹
NAL	NAL in Tris-Puffer, pH 8	0,3 mg mL ⁻¹
Lösung für Lipidmembran	DOPC in <i>n</i> -Dodekan	2 % w/v
Lösung für Polymermembran	A) PMOXA-PDMS-PMOXA in Chloroform B) Lösung A) in <i>n</i> -Dodekan	60 % w/v 2 % w/v Endkonzentration
Membranintegritätstest, Lipid	BKB LG DMSO in PBS-Puffer, pH 7,4	0,1 mg mL ⁻¹ 0,1 mg mL ⁻¹ 5 % v/v
Membranintegritätstest, Polymer	Sulforhodamin B Propranolol DMSO in Phosphat-Puffer, pH 7	0,1 mM 0,5 mM 5 % v/v
Stammlösung für Vesikel-Lyse	OPOE in dd H ₂ O	10 % v/v

13.3 Verwendete Chemikalien

Tabelle 13-19: Charakteristika der für die Zweiphasensysteme verwendeten Ether und Ester.

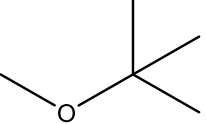
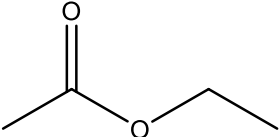
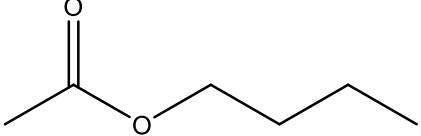
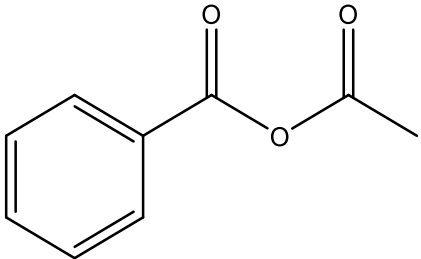
Klasse	Name	Strukturformel	$\log P$, –	T_{SP} , °C	$\rho_{20\text{ °C}}$, kg m^{-3}
Ether	Methyl- <i>tert</i> -butylether		0,940	55	740
	Ethylacetat		0,739	77	900
	Butylacetat		1,780	127	880
Ester	Ethylbenzoylacetat		1,870	265	1110

Tabelle 13-20: Charakteristika der für die Zweiphasensysteme verwendeten Ketone.

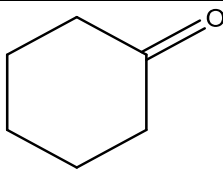
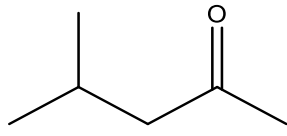
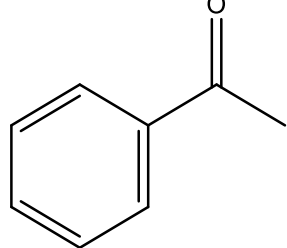
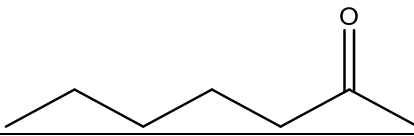
Klasse	Name	Strukturformel	$\log P$, –	T_{SP} , °C	$\rho_{20\text{ °C}}$, kg m^{-3}
Ketone	Cyclohexanon		0,810	156	950
	Methylisobutylketon		1,310	116	800
	Acetophenon		1,630	202	1030
	Heptan-2-on		1,980	151	820

Tabelle 13-21: Charakteristika der für die Zweiphasensysteme verwendeten Alkohole.

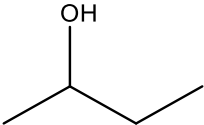
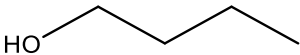
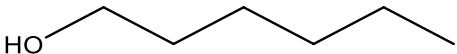
Klasse	Name	Strukturformel	$\log P$, –	T_{SP} , °C	$\rho_{20^\circ C}$, $kg\ m^{-3}$
Alkohole	2-Butanol		0,650	99	810
	1-Butanol		0,830	118	810
	1-Hexanol		2,030	157	820

Tabelle 13-22: Charakteristika der für die Zweiphasensysteme verwendeten Kohlenwasserstoffe.

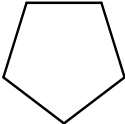
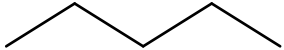
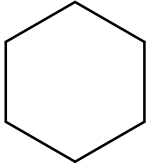

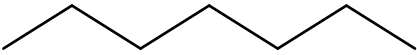
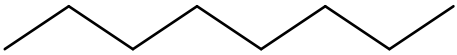
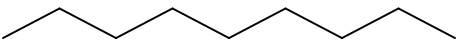
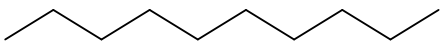
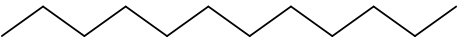
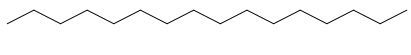
Klasse	Name	Strukturformel	$\log P$, –	T_{SP} , °C	$\rho_{20^\circ C}$, $kg\ m^{-3}$
Aliphatisch	Cyclopentan		3,000	49	740
	<i>n</i> -Pentan		3,390	36	630
	Cyclohexan		3,440	81	780
	<i>n</i> -Hexan		3,764	69	660
	<i>n</i> -Heptan		4,274	98	680
	<i>n</i> -Oktan		4,783	126	700
	<i>n</i> -Nonan		5,420	151	720
	<i>n</i> -Dekan		5,010	174	730
	<i>n</i> -Dodekan		6,821	216	750
	<i>n</i> -Hexadekan		8,859	287	770

Tabelle 13-22 Fortsetzung: Charakteristika der für die Zweiphasensysteme verwendeten Kohlenwasserstoffe.

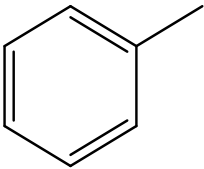
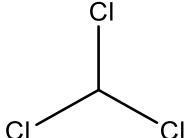
Klasse	Name	Strukturformel	$\log P$, –	T_{SP} , °C	$\rho_{20\text{ }^\circ\text{C}}$, kg m^{-3}
Aroma-tisch	Toluol		2,730	111	870
Halo-carbon	Chloroform		1,970	61	1480

Tabelle 13-23: Kationen und Anion der verwendeten ionische Flüssigkeiten.

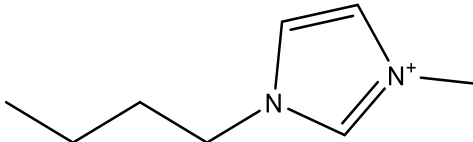
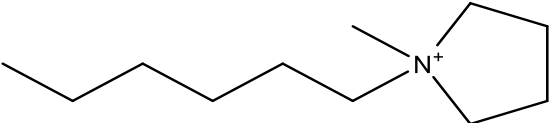
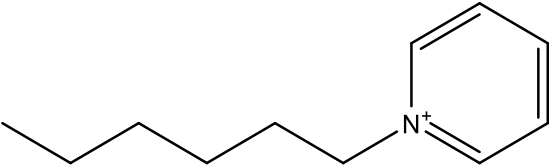
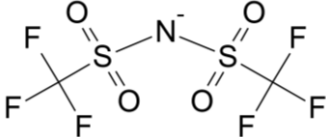
Name	Strukturformel	Abkürzung
1-Butyl-3-methyl-imidazolium		[BMIM] ⁺
1-Hexyl-1-methylpyrrolidinium		[HMPL] ⁺
N-Hexylpyridinium		[HPYR] ⁺
Bis(trifluormethylsulfonyl)imid		[NTF] ⁻

Tabelle 13-24: Für Zweiphasensysteme verwendete Lösemittel

Lösemittel	Hersteller	Produktnummer
1-Butanol	VWR	11B280507
1-Hexanol	Merck	8.04393
2-Butanol	Merck	1.09630
Acetophenon	Merck	8.00028
Butylacetat	Merck	1.09652
Chloroform	Sigma-Aldrich	SHBF35530
Cyclohexan	Roth	CP81.1
Cyclohexanon	VWR	23235.291
Cyclopentan	Merck	8.18770
Ethanol, 99,8%	Roth	9065.4
Ethylacetat	Roth	6784.4
Ethylbenzoylacetat	Merck	8.01808
Heptan-2-on	Merck	8.18711
Methylisobutylketon	Merck	3666635
Methyl- <i>tert</i> -butylether	Merck	1.01849
<i>n</i> -Dekan	Sigma-Aldrich	08421TD-387
<i>n</i> -Dodekan	Merck	8.20543
<i>n</i> -Heptan	Fluka	51745
<i>n</i> -Hexadekan	Sigma-Aldrich	H-0255
<i>n</i> -Hexan	Roth	T908.1
<i>n</i> -Nonan	Merck	806838
<i>n</i> -Oktan	Fluka	74822
<i>n</i> -Pentan	Merck	1.07177
Toluol	Sigma-Aldrich	5ZBE0505V

Tabelle 13-25: Verwendete ionische Flüssigkeiten

Ionische Flüssigkeit	Hersteller	Produktnummer
[BMIM] [NTF]	Merck	490092
[HMPL] [NTF]	Merck	490100
[HPYR] [NTF]	Merck	490124

Tabelle 13-26: Verwendete Farbstoffe und Fluorophore

Farbstoff, Fluorophor	Hersteller	Produktnummer
Brilliantkresylblau	Roth	5162.1
Calcein	VWR	L10255.06
Luzifergelb	VWR	BTIU80016
Sulforhodamin B	VWR	BTIU80100

Tabelle 13-27: Verwendete pharmazeutische Wirkstoffe für Permeabilitätsmessungen

Wirkstoff	Hersteller	Produktnummer
Furosemid	Sigma-Aldrich	F4381
Koffein	VWR	39214.14
Propranolol	VWR	H26645.06

Tabelle 13-28: Verwendete Substrate und Produkte für Permeabilitätsmessungen

Wirkstoff	Hersteller	Produktnummer
CMP-Neu5Ac	Sigma-Aldrich	C8271
ECAA	Merck	532079314
ECHB	Sigma-Aldrich	460524
GlcNAc	Roth	8993
ManNAc	Roth	5525
Neu5Ac	Calbochem	110138
Pyruvat	Roth	8793

Tabelle 13-29: Verwendete Chemikalien für Membran-bildende Lösung

Chemikalie	Hersteller	Produktnummer
DOPC	Sigma	P6354
PMOXA-PDMS-PMOXA	Polymersource™	-

Tabelle 13-30: Verwendete Enzyme, bereitgestellt von Ludwig Klermund

Enzym	Klasse	Organismus
MDH	EC 1.1.1.23	<i>Flavobacterium</i> sp. 141-8
NAL	EC 4.1.3.3	<i>Escherichia coli</i> K12

Tabelle 13-31: Verwendete allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Produktnummer
Agarose 4B	GE Healthcare	17-0120-01
BCA-Kit	Thermo Fisher	23225
Benztraubensäure Natriumsalz	Roth	131170224
Chlorwasserstoffsäure	Roth	NE57.2
Dimethylsulfoxid	Roth	4720.4
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth	2D007934
Essigsäure	Merck	100056
Ethanol (99,8 %)	Roth	9065.4
Ethylacetat	Roth	7338.1
Iodlösung 0,5 M	VWR	1.09098
Iotect® Iod-Indikator AnalaR NORMAPUR®	VWR	28610.187
Kaliumchlorid	Roth	110150408
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	412190469
Natriumacetat	Roth	19571081
Natriumchlorid	Roth	400162007
Natriumdihydrogenphosphat	Roth	412190469
Natriumthiosulfat	Roth	HN25.1
Nicotinamidadenindinukleotid	Roth	AE11
<i>n</i> -Octylpolyoxyethylen	Bachem	4031122
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth	4855
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan hydrochlorid	Roth	9090

13.4 Verwendete Geräte und Software

Tabelle 13-32: Verwendete Komponenten für Milliliter-Maßstab

Komponente	Hersteller	Spezifikation
Magnetrührplatte	NeoLab	Variomag Poly 15
Reaktionsgefäß	Roth	H3061
Kreuzbalkenrührer	VWR	442-0394

Tabelle 13-33: Verwendete Komponenten für miniaturisierte Rührkesselreaktoren

Komponente	Hersteller	Spezifikation
Reaktorblock	2mag	bioREACTOR 48
Rührersteuerung	2mag	-
Einwegbioreaktor	PreSens	Ohne Sensoren (HTBD)
Rührer	2mag	Gasinduzierender Rührer
Rührer	2mag	Paddelrührer
Rührer	2mag	H-Rührer
Rührer	2mag	S-Rührer
Reaktorblock Temperierung	PSL Systemtechnik	Haake W15
Kopfraumkühlung	Julabo	ME-12 Umwälzthermostat
Laborroboter	Tecan	Freedom EVO
Schlauchpumpe	ISMATEC	Analog MS 4-4/12
Schläuche	IDEX Health&Science	Tygon 3-Stopper orange/blau
Schlauchverbinder, Injektoren	Proliquid	18/8

Tabelle 13-34: Verwendete Komponenten für Liter-Maßstab

Komponente	Hersteller	Spezifikation
Laborreaktor	BioEngineering	KLF 2000
Schlauchpumpe	Meredos	GUV-150
Scheibenrührer (R1)	BioEngineering	-
Propellerrührer (R2)	BioEngineering	30712.1
Propellerrührer (R3-R5)	Infors HT	-

Tabelle 13-35: Verwendete Komponenten für Permeabilitätsmessungen im PAMPA-System

Komponente	Hersteller	Spezifikation
Inkubationsbox	pION	Gut-Box
<i>Sandwich</i> -Mikrotiterplatte	pION	Stirwell PAMPA <i>Sandwich</i>
Rührer	pION	Magnetische Scheibenrührer

Tabelle 13-36: Spezielle Geräte

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Gaschromatograph	Varian	CP-3800
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	Agilent	1100 HPLC-System
Dynamische Lichtstreuung	Malvern	Zetasizer Nano S
Laborroboter	Tecan	Genesis Workstation 150
Größenausschlusschromatographie 140 mL-Leersäule	Kronlab	TAC25/500L PE0-AB-2
Transmissionselektronenmikroskop	JEOL	JEM 100 CX
Transmissionselektronenmikroskop	JEOL	JEM 2011
Rasterelektronenmikroskop	JEOL	JSM 5900 LV
Energiedispersives Röntgenspektroskop	JEOL	JCM-6000PLUS NeoScope

Tabelle 13-37: Allgemeine Geräte

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Analysenwaage	Satorius	ED124S
Analysenwaage	Ohaus	Explorer 10 mg-210 g
Analysenwaage	Mettler Toledo	AC 88 Delta Range
Direktverdrängerpipette 100-1000 µL	Gilson	MICROMAN M1000
Direktverdrängerpipette 10-100 µL	Gilson	MICROMAN M100
Direktverdrängerpipette 1-10 µL	Gilson	MICROMAN M10
Einkanal-Pipette 1000-10000 µL	Brand	Transferpette S D-10000
Einkanal-Pipette 100-1000 µl	Brand	Transferpette S D-1000
Einkanal-Pipette 10-100 µL	Brand	Transferpette S D-100
Einkanal-Pipette 10-100 µL	Brand	Transferpette S D-100
Einkanal-Pipette 20-200 µL	Brand	Transferpette S D-200
Einkanal-Pipette 2-20 µL	Brand	Transferpette S D-20
Heizbad	Thermo Scientific	Haake W15 mit Thermostat C10
Heizblock	Eppendorf	Mastercycler gradient
Konzentratorröhrchen	Millipore	UFC910024
Kugelmühle	Retsch	MixerMill MM200

Tabelle 13-37 Fortsetzung: Allgemeine Geräte

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Kugelmühle (cryo)	Retsch	CryoMill
Küvetten	Ratiolab	Halbmikro PS
Magnetührplatte	Janke & Kunkel	IKAMAG Combi-Mag Ret
Magnetührplatte	NeoLab	Variomag Poly 15
Mehrfachdispenser	Brand	HandyStep electronic
Mikrotiterplatte, schwarz	Corning	CORN3340 (96 well)
Mikrotiterplatte, transparent	Nunc	256510 (96 well)
Mikrotiterplatte, UV	Brand	781620 (384 well)
Mikrotiterplatte, UV	Brand	781614 (96 well)
Mikrotiterplatte, weiß	Corning	CORN3884 (96 well)
Mikrotiterplatte-Reader	Tecan	Infinite M200
Mikrotiterschüttler	IKA	MTS 2/4 digital
PC-Membran, 13 mm	Millipore	GTTP01300, 0,2 µm
PC-Membran, 13 mm	Millipore	VCTP01300, 0,1 µm
pH-Meter	Schott Instruments	Lab 850
pH-Sonde	Schott Instruments	pH Elektrode Blueline
Plattenphotometer	Tecan	Infinite 200 Pro
Rotationsverdampfer	Heidolph	Laborota 4003
Rotationsviskosimeter	Anton Parr	Rheolab QC
Rotationsviskosimeter	proRheo	Rheomat RM 115
SEC-Säulen, 2,5 mL	MoBiTec	S10121
Sterilfilter	Millipore	Steritop Express Plus 0,2 µm
Thermoschrank	Memmert	Kühlbrutschrank IPP500
Thermoschrank	Memmert	Trockenschrank Tv50uL
Thermoschrank	Memmert	Kühlbrutschrank IPP500
Thermoschrank	Memmert	Trockenschrank Tv50uL
Trockenschrank	Binder	E28
Ultraschallgerät	Bandelin Sonopuls	HD 2070
Ultraschallsonde	Bandelin Sonopuls	MS72
Vortexmischer	Neolab	D-6012
Zentrifuge	Hettich	Mikro 20
Zentrifuge	Hettich	4910 Rotixa 50RS
Zentrifuge	Thermos Fisher	Heraeus biofuge stratos

Tabelle 13-38: Spezielle Software

Anwendung	Hersteller	Software
Laborroboter	Tecan	Gemini V4.2.17.304
Prozesssteuerung Laborroboter	DASGIP	Fedbatch-XP 1.0.248
Plattenphotometer	Tecan	Magellan V6.6
Dynamische Lichtstreuungsmessung	Malvern	Zetasizer 7.01
Viskositätsmessung	AntonPaar	RheoCompass

Tabelle 13-39: Software-Einstellungen für dynamische Lichtstreuungsmessung mit Zetasizer Nano S (Malvern, Worcestershire, UK)

Eingabeparameter	Einstellung	Anmerkung/Bedeutung
Measurement type	<i>Size</i>	-
Instrument configuration	Narrow bound filter fitted = <i>No</i>	Gerätespezifische Einstellung für Zetasizer Nano S
	High temperature capable = <i>No</i>	
Sample	Sample name	Probe benennen
Material	RI = ?	Brechungsindex RI nur für volumenbasierte Partikelgrößenverteilung notwendig
	Absorption = <i>0,01</i>	0,0 für Emulsionen 0,01 für Latex 0,3 für farbige Proben 0,9 für blaue/schwarze Proben
Dispersant/Solvent	<i>Complex solvent</i>	Eingabe des Volumenanteile der Lösemittel und Konzentration der Salze im Dispersionsmittel → Brechungsindex und dynamische Viskosität des Dispersionsmittels werden automatisch berechnet → für verschiedene Dispersionsmittel werden unterschiedliche SOPs benötigt
General Options	Mark-Houwink parameter = ?	Mark-Houwink-Parameter werden für Größenbestimmungen nicht benötigt
	Sample viscosity options = <i>Use dispersant viscosity as sample viscosity</i>	Für $c < 0,1$ %: sample viscosity = dispersant viscosity Für $c > 0,1$ %: sample viscosity extra bestimmen → Proben verdünnen um Viskositätsmessung zu umgehen
Temperatur	T = 25°C	Zetasizer kann Probe heizen und kühlen
	Equilibration time = <i>60 s</i>	Zeitraum in dem die Temperatur in der Küvette an den Sollwert angeglichen wird
Cell	<i>Standard cell</i>	Es können konventionelle Polystyrol-Küvetten verwendet werden

Tabelle 13-39 Fortsetzung: Software-Einstellungen für dynamische Lichtstreuungsmessung mit dem Zetasizer Nano S (Malvern, Worcestershire, UK)

Eingabeparameter	Einstellung	Anmerkung/Bedeutung
Measurement	Angle of detection = 173°	Zetasizer Nano S kann ausschließlich in diesem Winkel messen
	Measurement duration = <i>Automatic</i>	Anzahl der Einzelmessungen (Run) je Messung wird von Software automatisch optimiert
	Number of Measurements = 3	Jede Probe wird drei Mal vermessen (technisches Replikat)
	Delay between Measurements = 0	
Advanced	Position = <i>Automatic</i>	Sowohl Messort in der Küvette (Position) als auch Abschwächungsfaktor des Lasers (Attenuation) werden für jede Messung automatisch neu bestimmt → Optimale Messergebnisse bei längerem Zeitaufwand
	Attenuation = <i>Automatic</i>	
Data Processing	Analysis Model = <i>General Purpose</i>	Für Proben mit unbekanntem Eigenschaften
Export	<i>Frequency distribuion</i>	Datenausgabe als Intensitätsverteilung