

# *MODELLMEMBRANE (LIPOSOMEN)*

*Anwendung in ärztlicher und  
pharmazeutischer Praxis*

# Thematik

1	Struktur, Aufbau und Eigenschaften von modell- und biologischen Membranen (Gusztáv Schay)	19.09.2017
2	Struktur, Aufbau und Eigenschaften von modell- und biologischen Membranen (Gusztáv Schay)	26.09.2017
3	Herstellungsmethoden und Eigenschaften von Liposomen (Gusztáv Schay)	03.10.2017
4	Herstellungsmethoden und Eigenschaften von Liposomen (Gusztáv Schay)	10.10.2017
5	Spezielle Untersuchungsmethoden der Liposomen. Lichtstreuung (Gusztáv Schay)	17.10.2017
6	Kalorimetrische und fluoreszenzspektroskopische Techniken (Ferenc Tölgyesi)	24.10.2017
7	Spezielle Untersuchungsmethoden der Liposomen Elektronenspin-Resonanz Spektroskopie (Pál Gróf)	31.10.2017
8	Spezielle Untersuchungsmethoden der Liposomen: Atomkraft-Mikroskopie (Diese Vorlesung ist auf Englisch!) (Tamás Bozó)	07.11.2017
9	Spezielle Untersuchungsmethoden der Liposomen: Fluoreszenzmethoden (Barnabás Böcskei-Antal)	14.11.2017
10	Medizinische und pharmazeutische Anwendungen der Liposomen (Timea Feller)	21.11.2017
11	Drug-Liposomen Wechselwirkung mit speziellen Beispielen (Ádám Orosz)	28.11.2017
12	Presentationen der Studenten (Gusztáv Schay)	05.12.2017
13	Testprüfung (Gusztáv Schay)	12.12.2017

***Bedingung für Unterschrift/Kreditpunkt:***

- ✓ Anwesenheit mindestens an 75% der Vorlesungen ( Anwesenheitsliste)
- ✓ PowerPoint-Presentation in angegebenen Themen (ist aber auch in kleinen Gruppen möglich)
- ✓ Note: Testprüfung


***Vorlesungsskript ist als pdf erhältlich***

*Struktur, Aufbau und Eigenschaften  
von modell- und biologischen  
Membranen*

*Zusammenfassung von einigen  
wichtigen Eigenschaften der  
Flüssigkeiten und Flüssigkristallen*

# Charakteristiken der Flüssigkeiten

1. Im Raum: Nahordnung (Bereich beträgt sich etwa über einige hundert Moleküle)
2. in Zeit: dynamische Anordnung/Unordnung ( thermische Fluktuation)
3. physikalische Eigenschaften sind **richtungsunabhängig** (Konsequenz von 2.)
4. Hohe Anzahl der Fehlstellen
5. thermische Bewegungsart: Schwingungen
6. Translationsbewegung durch Schwingungen aus einer Fehlstelle in andere: Diffusion, innere Reibung, Fluidität
7. Diffusion  $\leftrightarrow$  Viskosität
8. Fluidität ist zur Anzahl der Fehlstellen proportional


$$D \propto 1/\eta$$

# Flüssigkristalliner(/mesomorph) Zustand

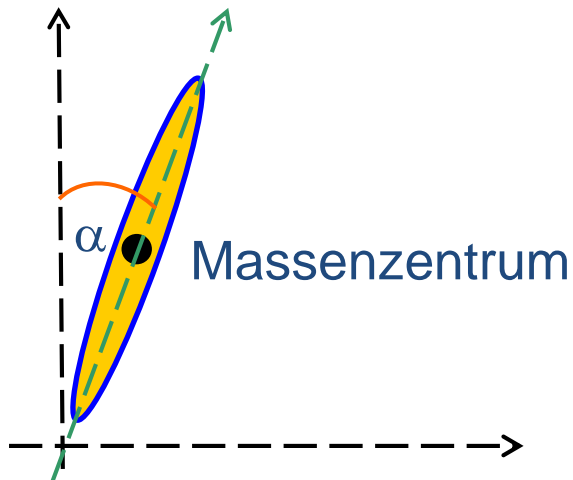
μεσομορφ=mesomorph= zwischen zwei Formen

1. Anordnung in zwei Dimensionen (vgl. mit 3D in Kristallen und Unordnung in Gasen)
2. thermische Fluktuation ist größer als in Kristallen, kleiner als in Flüssigkeiten
3. physikalische Eigenschaften sind **richtungsabhängig** (Konsequenz von 2.)
4. Anzahl der Fehlstellen liegt zwischen den Kristallen und den Flüssigkeiten
5. thermische Bewegungsart: Schwingungen+
6. Translationsbewegung durch Schwingungen aus einer Fehlstelle in andere: Diffusion, innere Reibung, Fluidität
7. Richtungsanisotropie in thermischer Bewegung

## Mesomorpher Zustand — bei stab-/fadenförmigen Molekülen



anisotrope (unterschiedliche) Wechselwirkungen,  
intermolekulare Kräfte in unterschiedlichen  
Richtungen



Beschreibung durch Anordnung:  
der Massenzentren  
der Molekülachsen

S: Ordnungsgrad  
~mittlere Anordnung der Molekülachsen

$$S = 1 - \frac{3}{2} \langle \sin^2 \alpha \rangle$$

vollständige Anordnung:  $S=1$ ; Unordnung:  $S=0$



- I. thermotrope Flüssigkristalle
- II. liotrope Flüssigkristalle

ad I.:

die spezifische mesomorphe Struktur/Phase entsteht durch eine Temperaturänderung bei einer bestimmter Temperatur

smektische Phase

nematische Phase

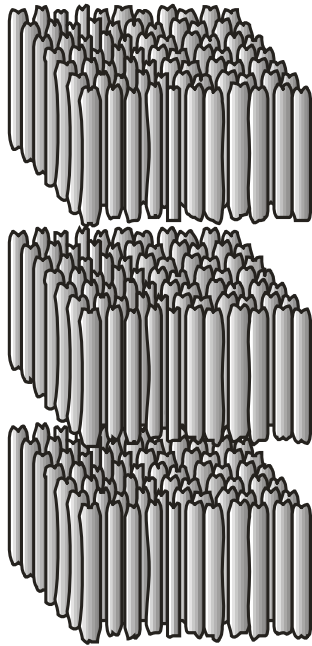
cholesterische Phase

Unterschied

a.) in Anordnung der Massenzentren

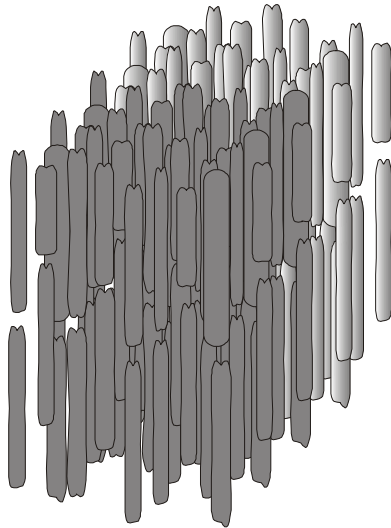
b.) räumliche Verteilung der Molekülachsen

## *smektische Phase*



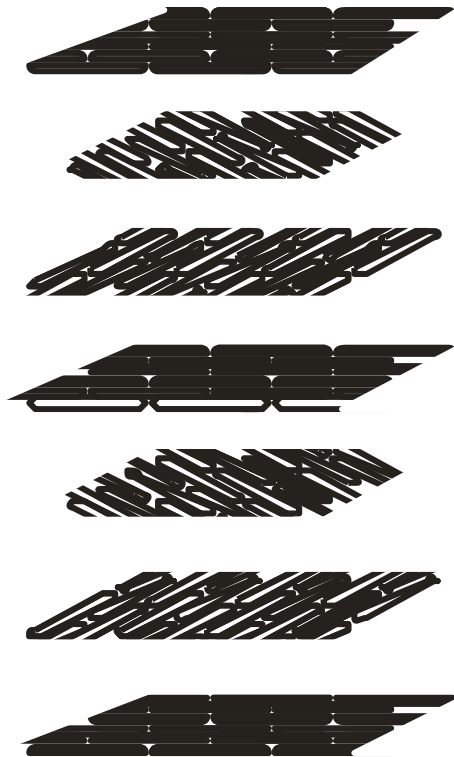
- a.) Massenzentren einer Schicht liegen in einer Ebene
- b.) Verteilung der Molekülachsen ist in kleinen Bereich beschränkt (hängt von Temp. ab)
- c.) Abstand zwischen den Schichten ist ziemlich groß

## *nematische Phase*



- a.) Massenzentren einer Schicht sind **nicht** in einer Ebene
- b.) Molekülen können sich entlang ihrer Längsachsen zueinander bewegen

# *cholesterische (gedreht nematische) Phase*



⑦

⑥

⑤

④

③

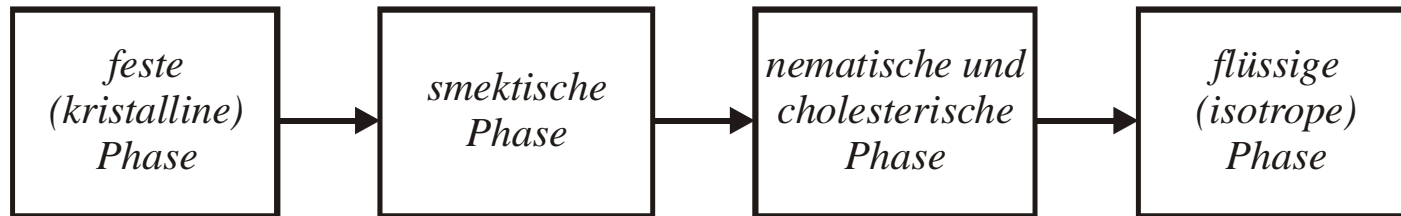
②

①



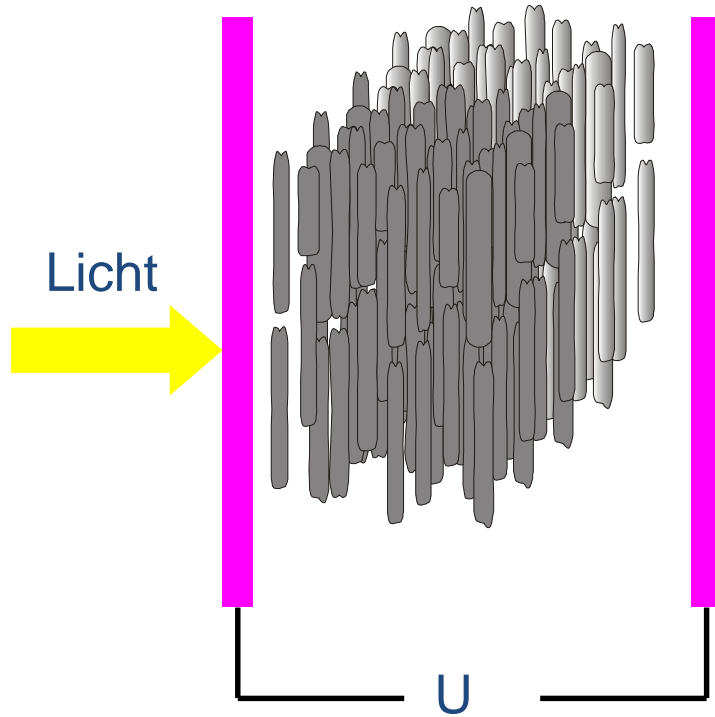
# Phasenübergang

Ordnung erhöht sich



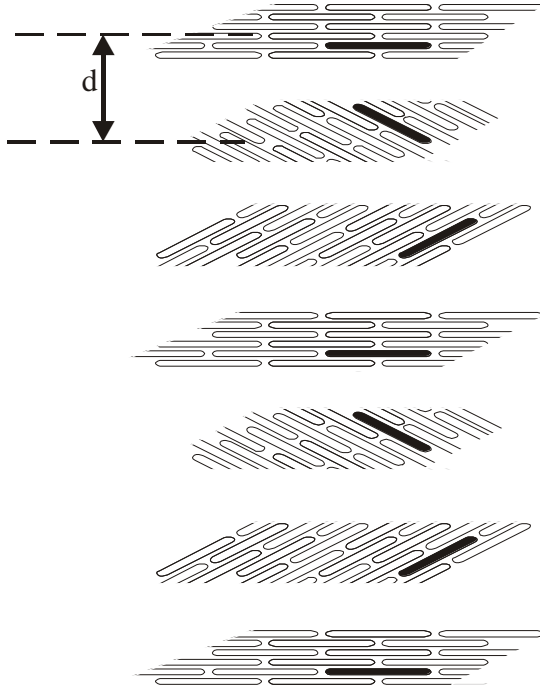
Unordnung, thermische Bewegung erhöht sich

# *Elektro-optisches Phänomen*



Änderung in **Absorption**

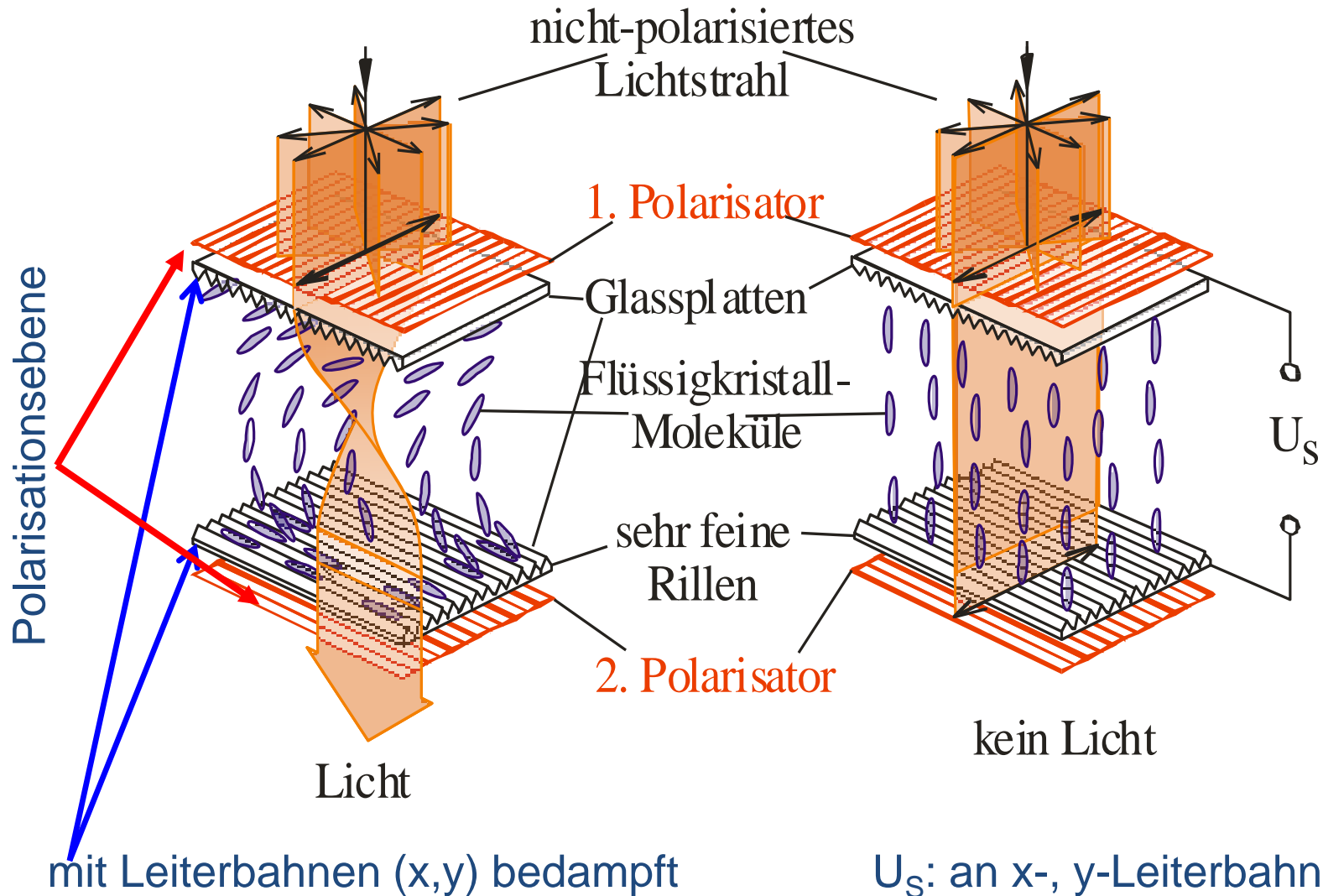
# Thermo-optisches Phänomen



$$d=d(T)$$

**Interferenz** zwischen den von unterschiedlichen Schichten reflektierten Strahlen

Kontaktthermographie



Weitere Kontrast-Verbesserung durch Thin(dünn)-Film-Transistoren



- I. thermotrope Flüssigkristalle
- II. liotrope Flüssigkristalle

ad I.:

die spezifische mesomorphe Struktur/Phase entsteht durch eine Temperaturänderung bei einer bestimmter Temperatur

smektische Phase

nematische Phase

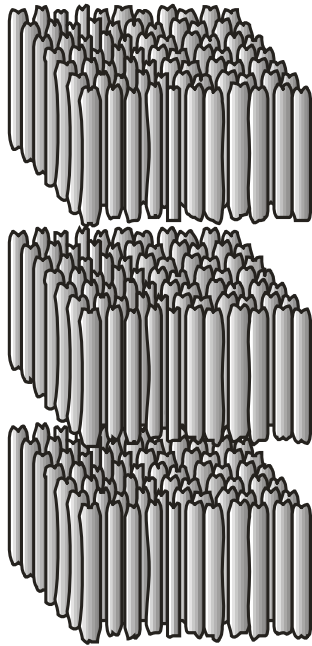
cholesterische Phase

Unterschied

a.) in Anordnung der Massenzentren

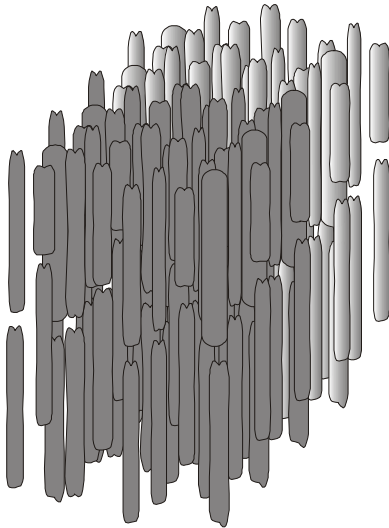
b.) räumliche Verteilung der Molekülachsen

## *smektische Phase*



- a.) Massenzentren einer Schicht liegen in einer Ebene
- b.) Verteilung der Molekülachsen ist in kleinen Bereich beschränkt (hängt von Temp. ab)
- c.) Abstand zwischen den Schichten ist ziemlich groß

## *nematische Phase*



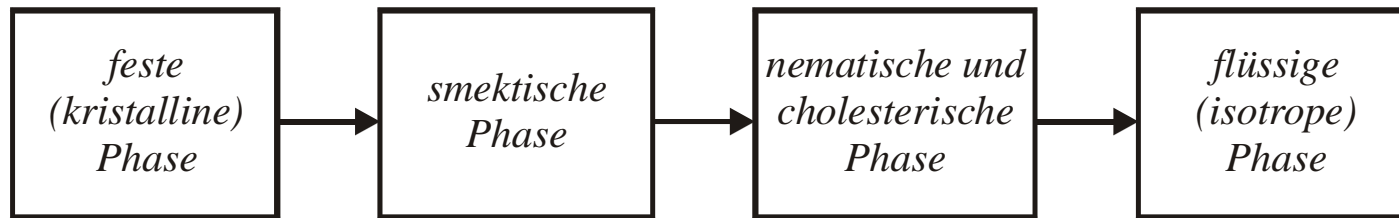
- a.) Massenzentren einer Schicht sind **nicht** in einer Ebene
- b.) Molekülen können sich entlang ihrer Längsachsen zueinander bewegen

# *cholesterische (gedreht nematische) Phase*



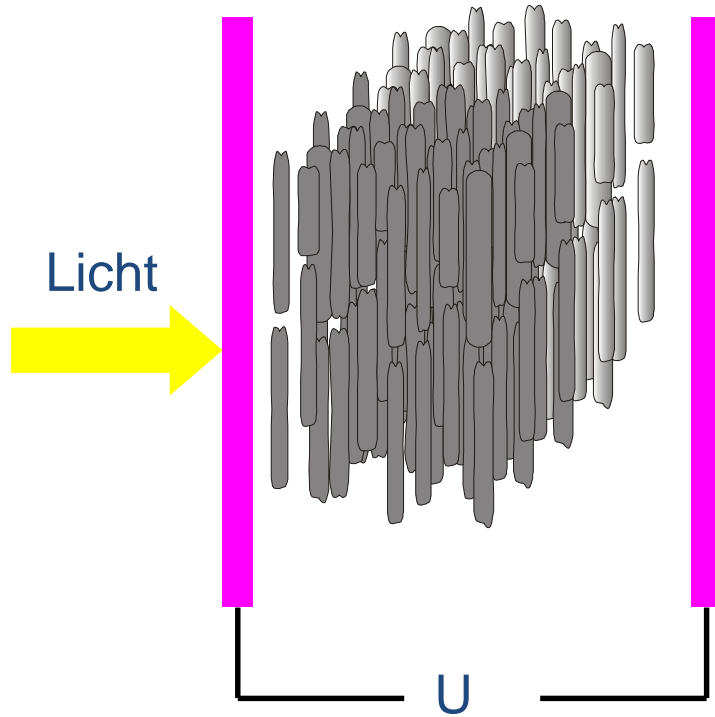
# Phasenübergang

Ordnung erhöht sich



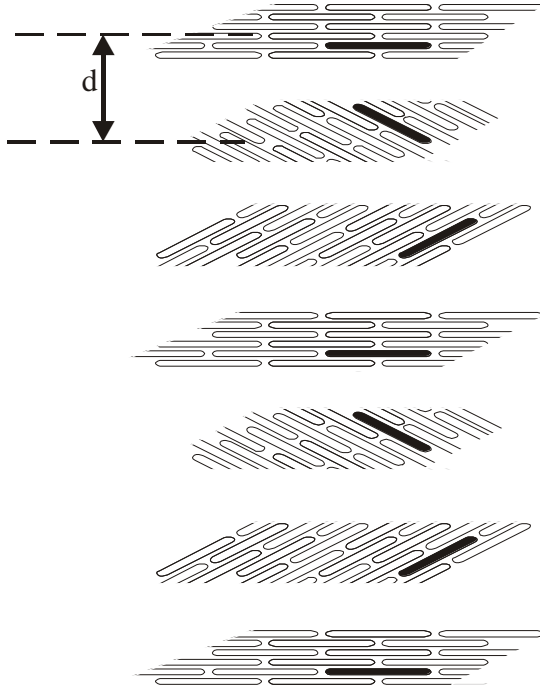
Unordnung, thermische Bewegung erhöht sich

# *Elektro-optisches Phänomen*



Änderung in **Absorption**

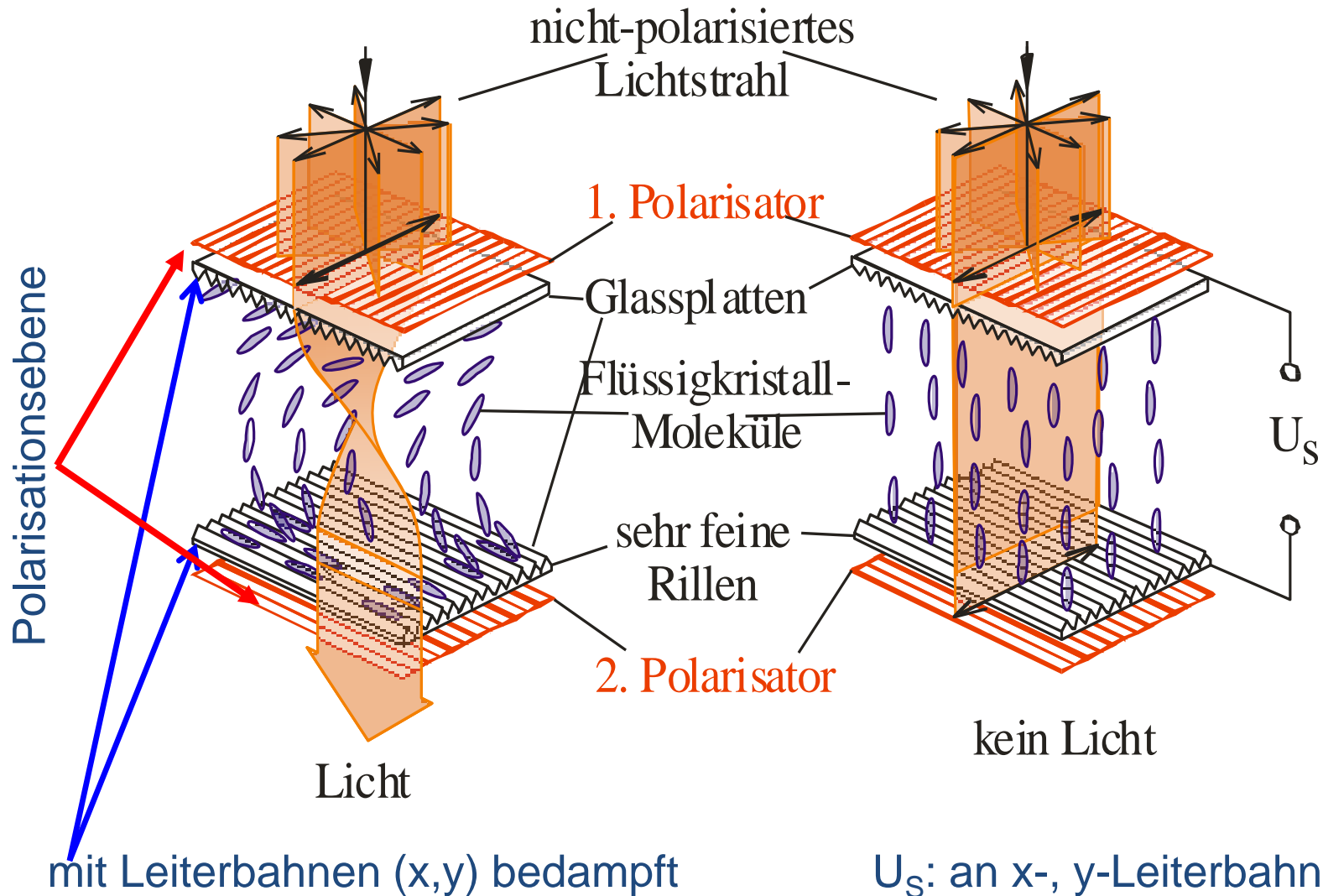
# Thermo-optisches Phänomen



$$d=d(T)$$

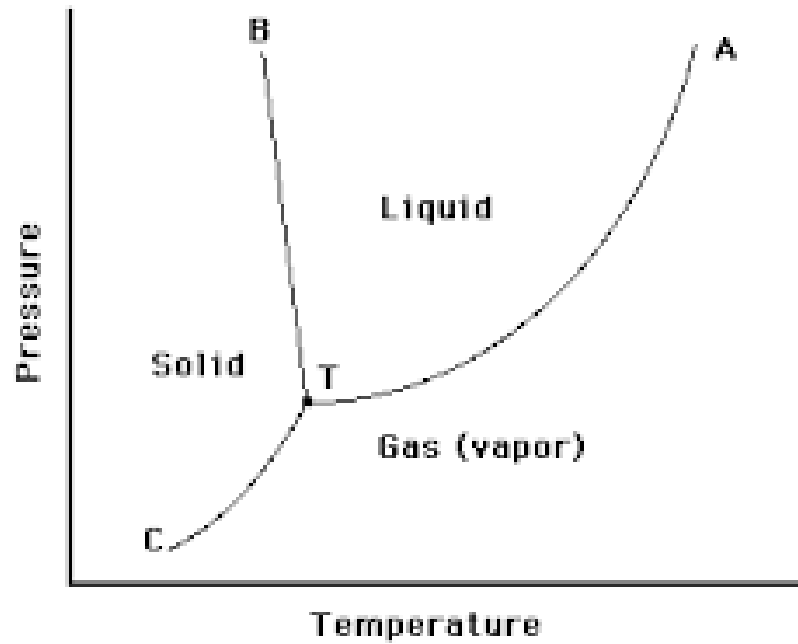
**Interferenz** zwischen den von unterschiedlichen Schichten reflektierten Strahlen

Kontaktthermographie

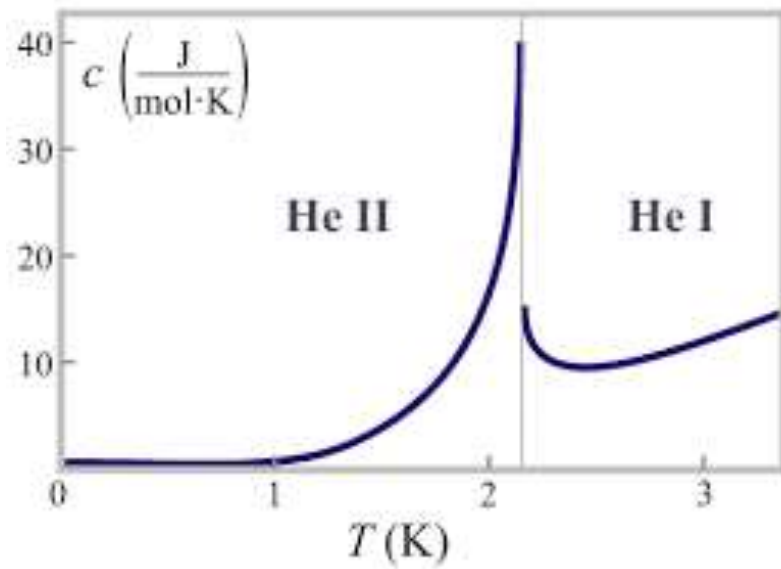


Weitere Kontrast-Verbesserung durch Thin(dünn)-Film-Transistoren

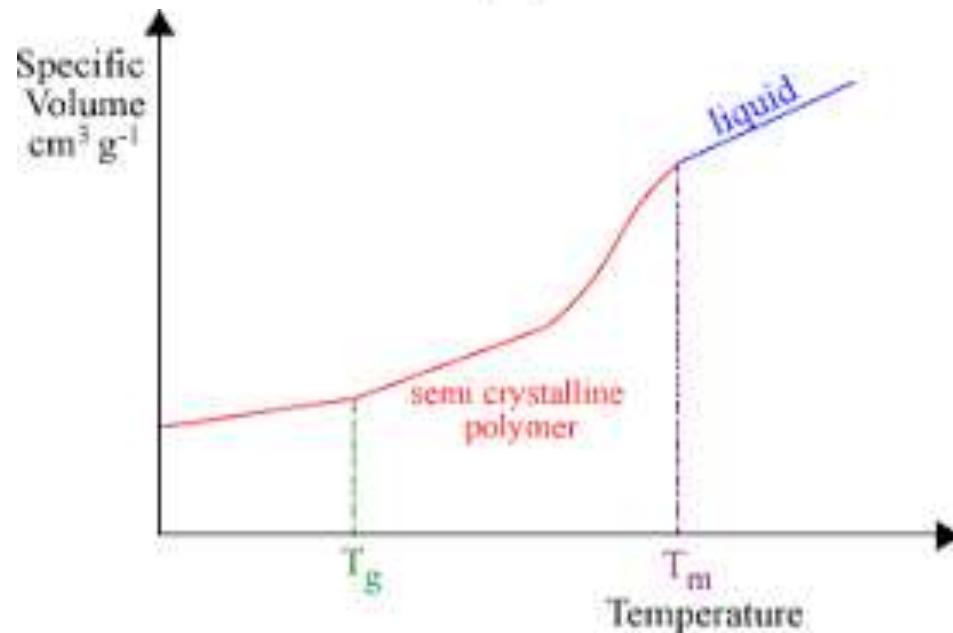




Phasendiagramm des Wassers



Bei Phasenübergänge gibt es fast immer (Typ.I.) eine grosse Veränderung.



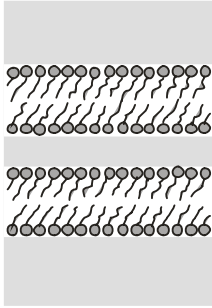
## *II. Liotrope Flüssigkristalle*

Bestehen aus zwei Komponenten:  
Lösungsmittel und gelöstes Molekül

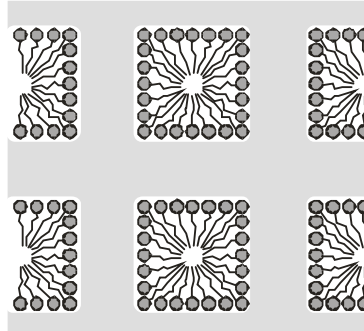
Struktur hängt von:

- ✓ Lösungsmittel
- ✓ gelöstem Molekül
- ✓ Konzentrationsverhältnis des Lösungsmitt. und der gelösten Moleküle
- ✓ Zusammensetzung der Lösung
- ✓ Konzentration der weiteren zusätzlichen Ionen, Molekülen
- ✓ pH

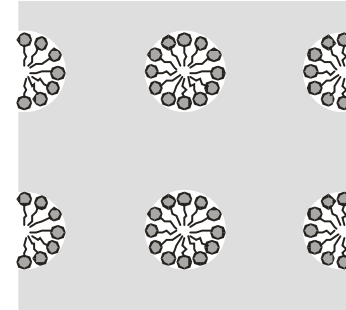
zB.: Lipidmoleküle, Nukleinsäuren, Polypeptide



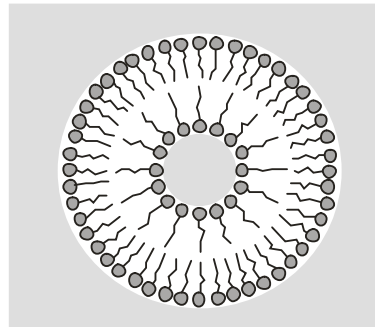
geschichtet



prismatisch

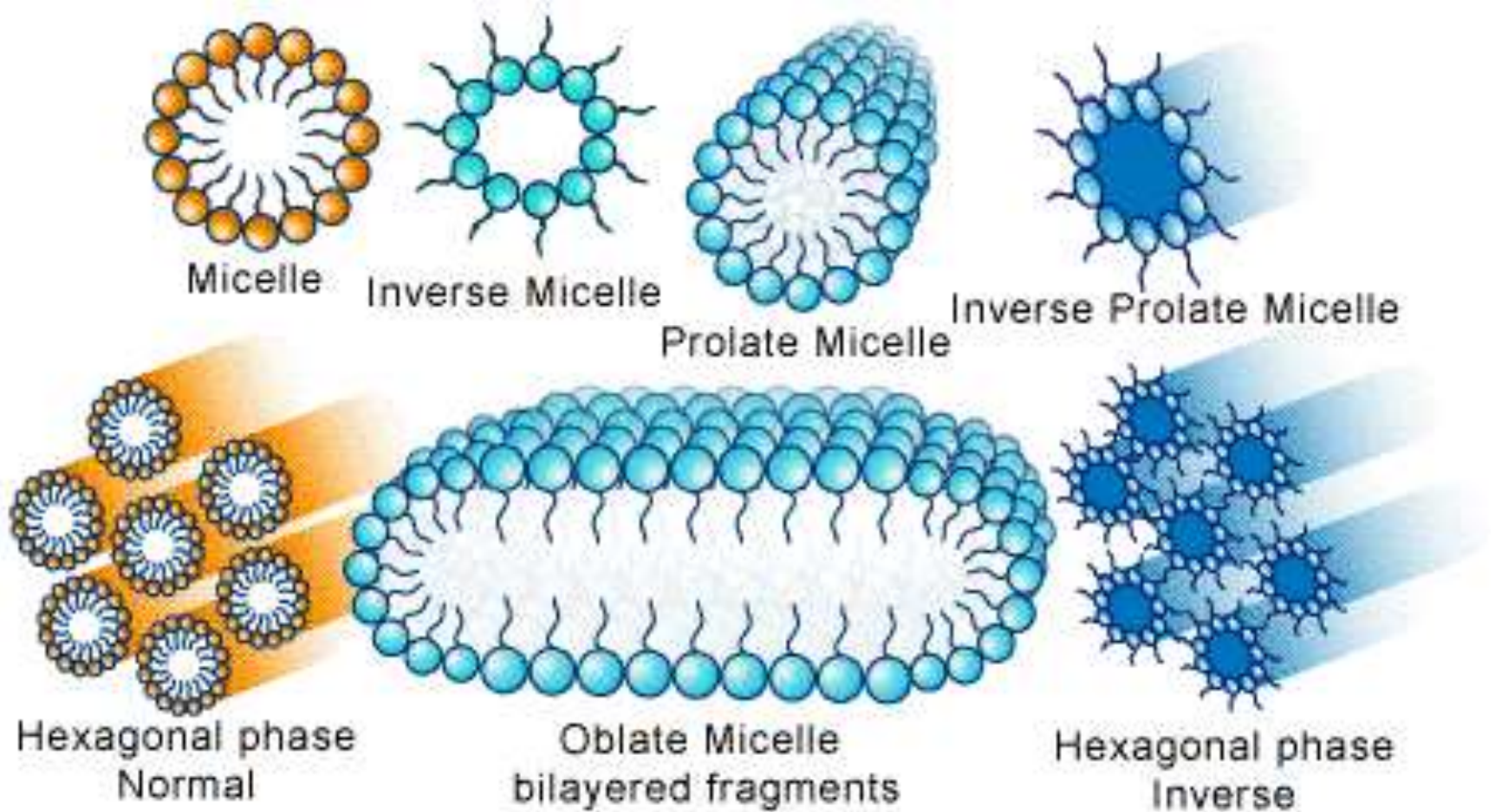


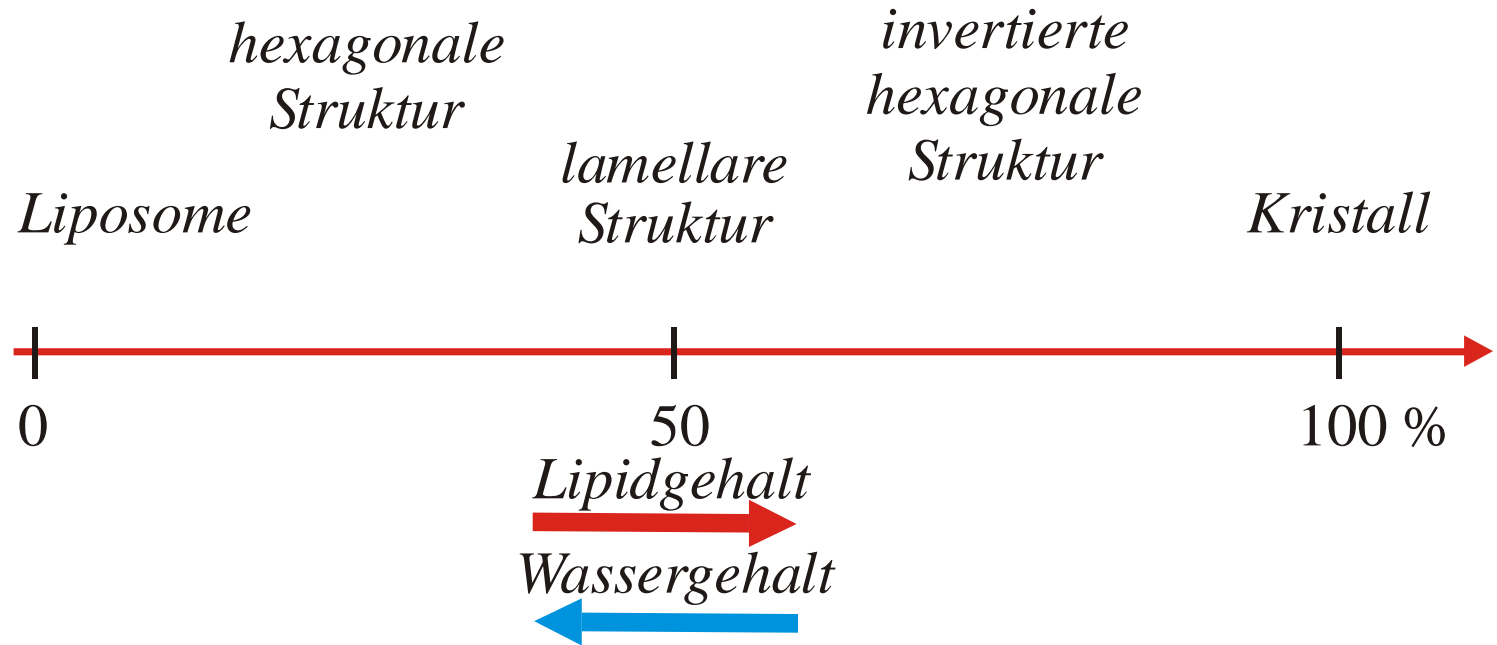
zylindrisch



tubulär/sphärisch;  
zB.: Liposome

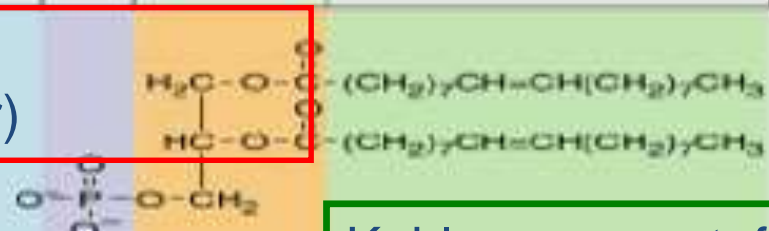
# *Liotrope flüssigkristalline Strukturen*



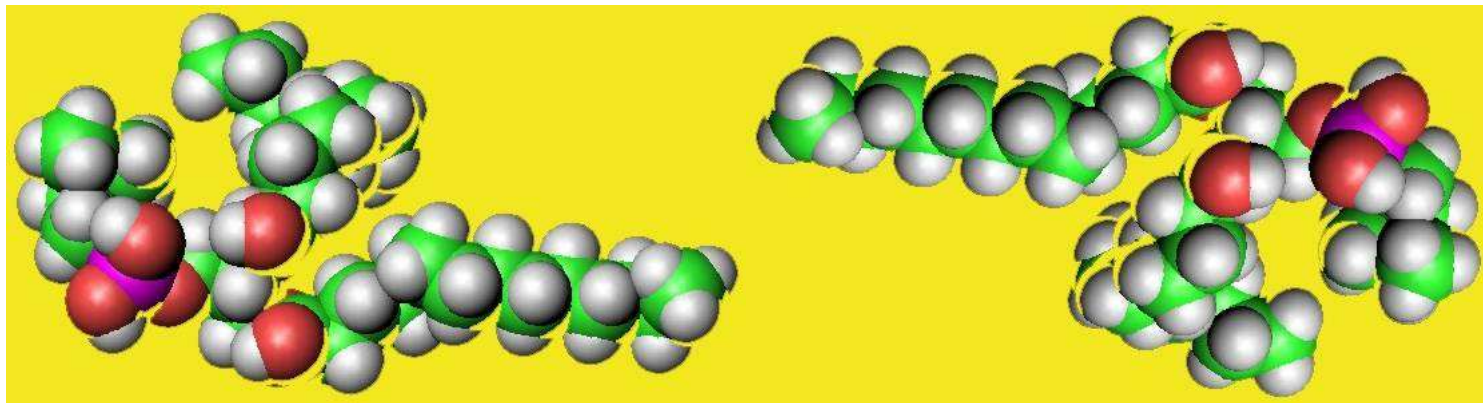
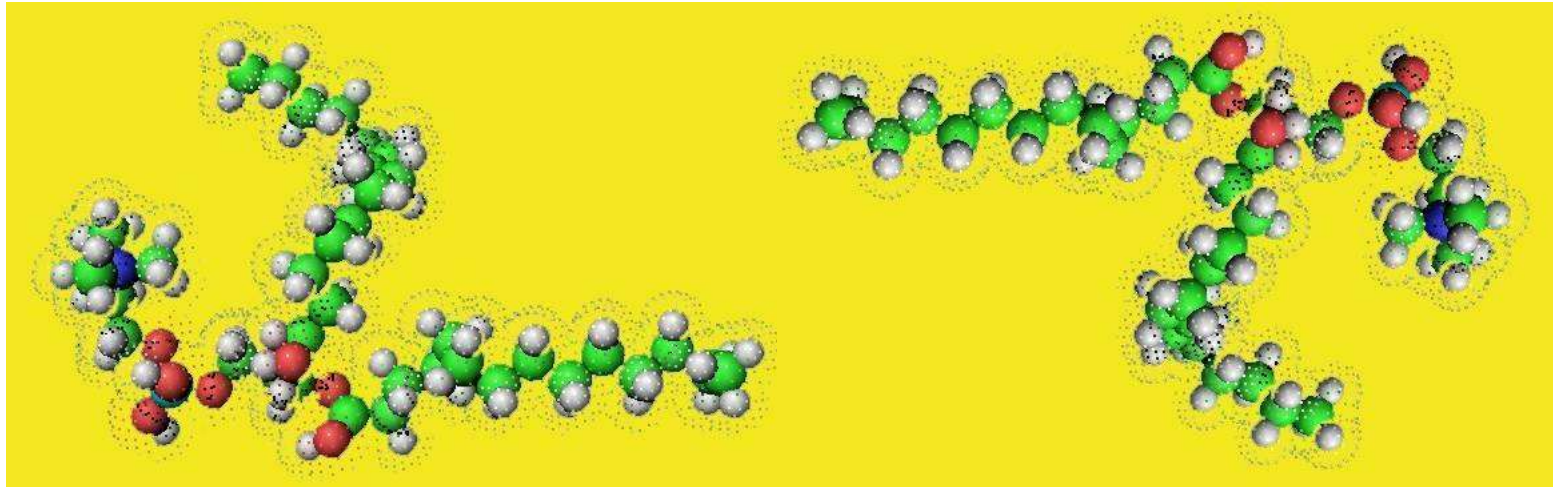




## Kohlenwasserstoffkette (apolar, hydrophob)


$$(\text{CH}_2)_9\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$$
$$\text{H}_3\text{N}^+-\underset{\text{COO}^-}{\text{CH}}-\text{CH}_2-$$
$$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$$
O[C@H]1[C@H](O)[C@H](O)[C@H](O)[C@H](O)[C@H]1O
$$\begin{array}{c}
 \text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2 \\
 | \\
 \text{H} \\
 | \\
 \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2
 \end{array}$$

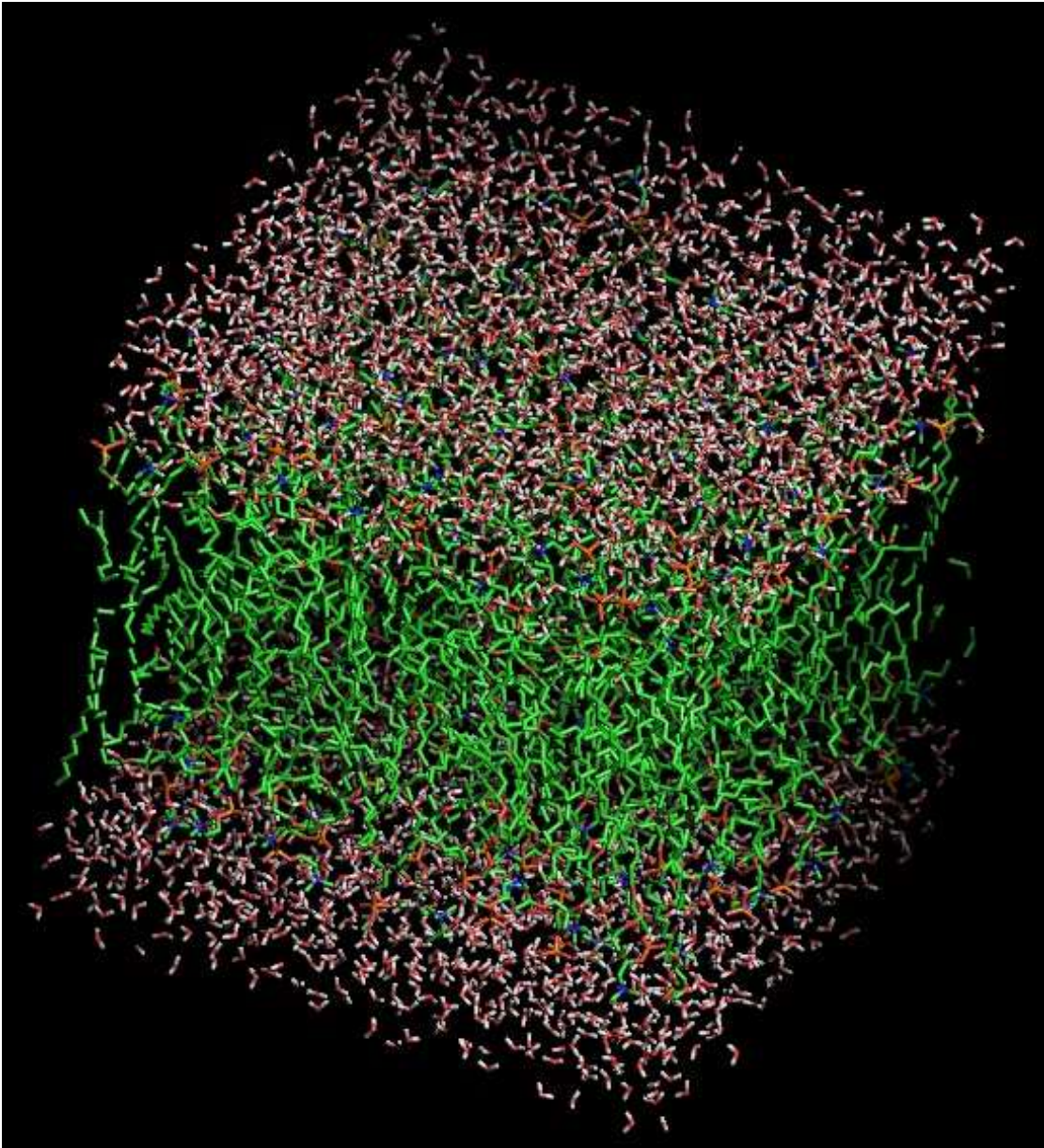




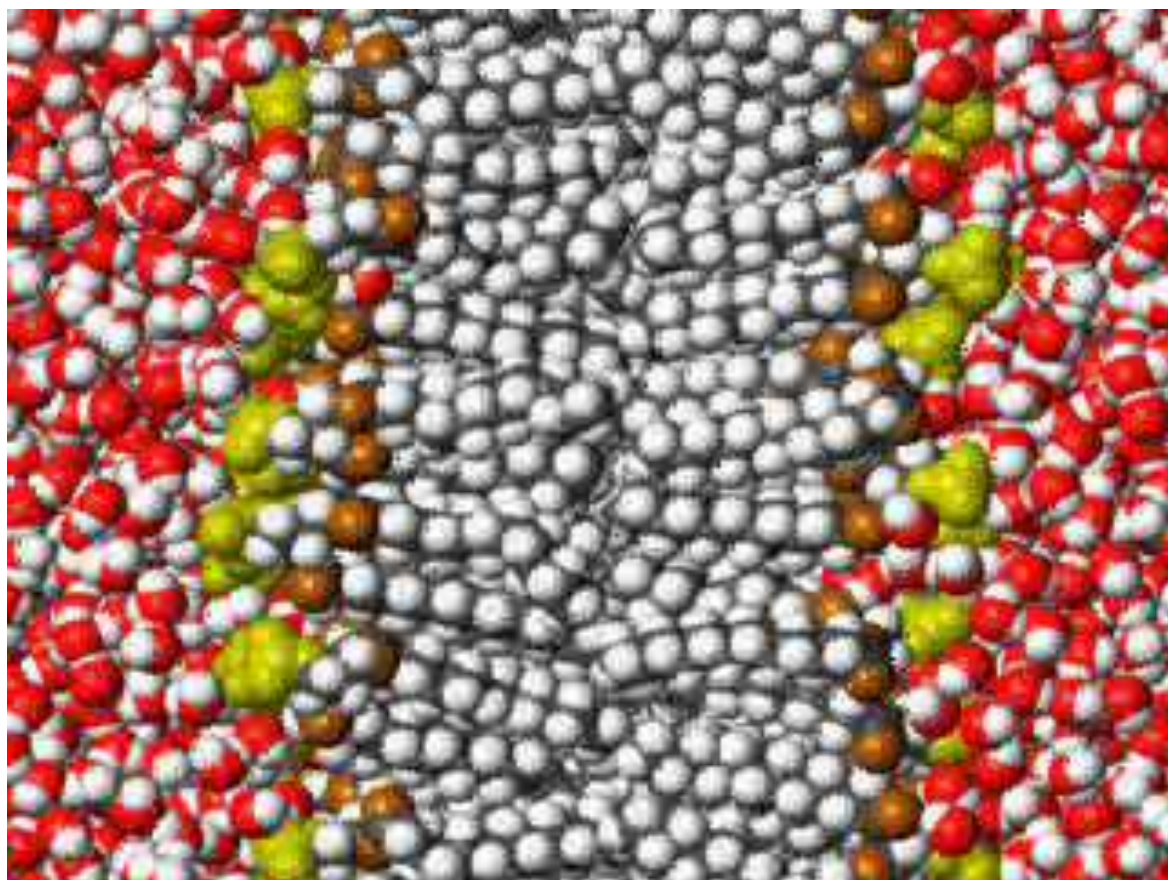
Van der Waals Radius — Radius einer gedachten *harten* Kugel welche etwa dem 90% der wirkende Kräfte entspricht.



# DPPC Doppelschicht in wässriger Dispersion



+VIDEOS...

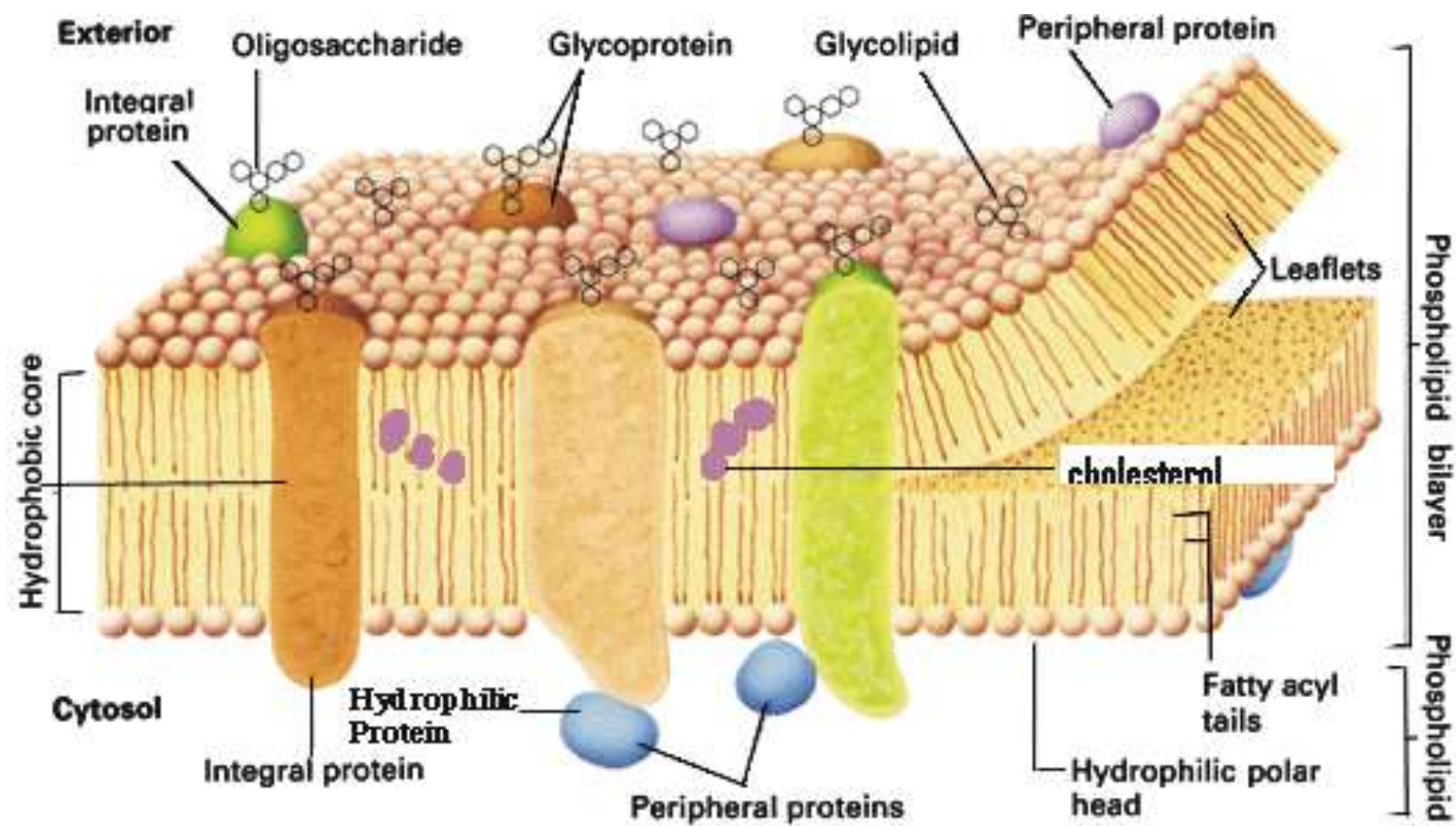


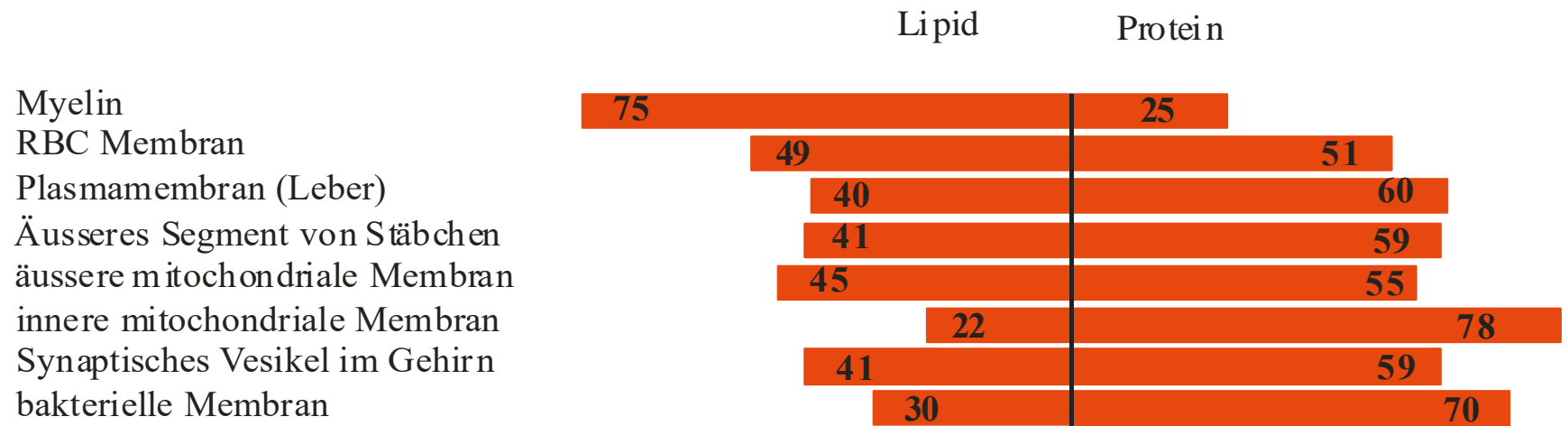
**Prozentuale Verteilung der Fettsäuren in natürlichen  
Lecithinen aus Soja, Ei und Ratte.**

Kürzel	Verbindung	Relativer Gehalt an PC [%] in Lecithin aus		
		Soja	Ei	Ratte
C16:0	Palmitinsäure	17,2	35,3	28,2
C18:0	Stearinsäure	3,8	13,5	18,0
C18:1	Ölsäure	22,6	26,8	8,4
C18:2	Linolsäure	47,8		
C18:2	cis,cis-6,9-Octadecadiensäure		5,7	19,4
C18:3	$\alpha$ -Linolensäure	8,6		
C18:3	$\gamma$ -Linolensäure		0,2	
C20:3	all cis-8,11,14-Eicosatriensäure			1,0
C20:4	Arachidonsäure		1,0	17,0
C22:5	all cis-7,10,13,16,19-Docosapentaensäure		1,3	1,5
C22:6	all-cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure		12,6	3,5

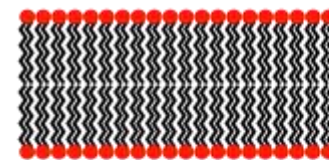
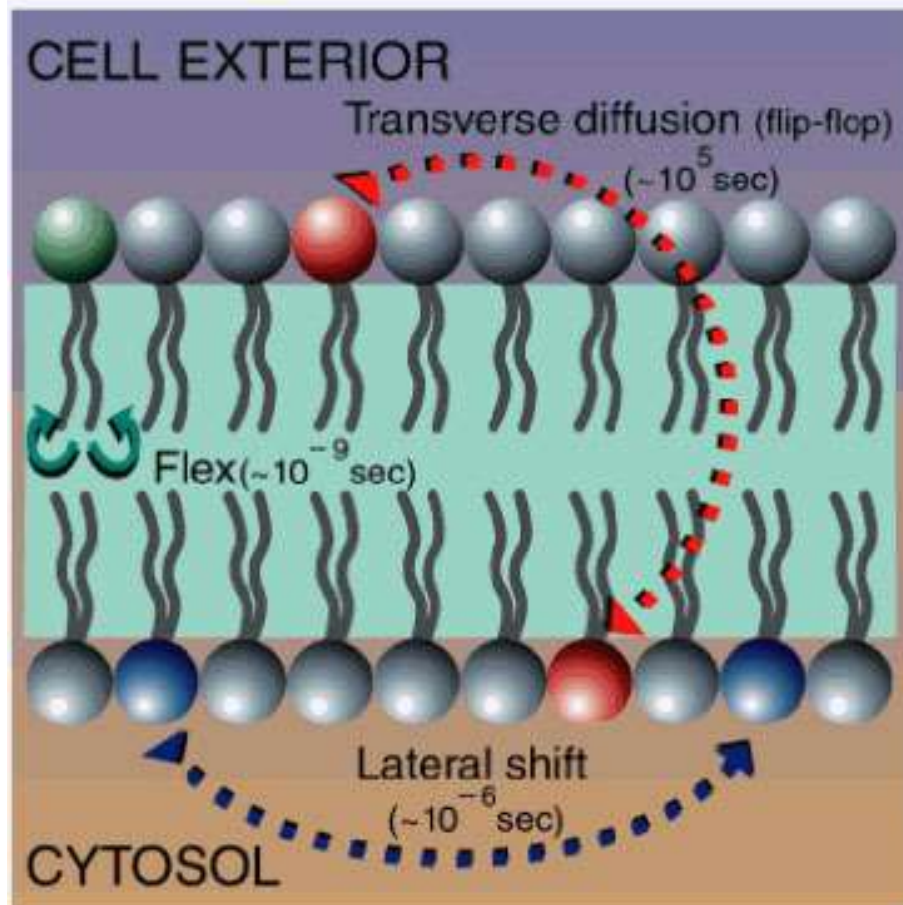
Cm:n     m: Länge der Kette; n: Anzahl d. ungesättigten Verbindungen







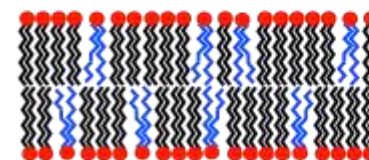
# Lipid Movement



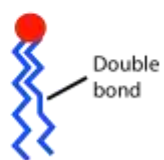
Saturated lipids only



Saturated

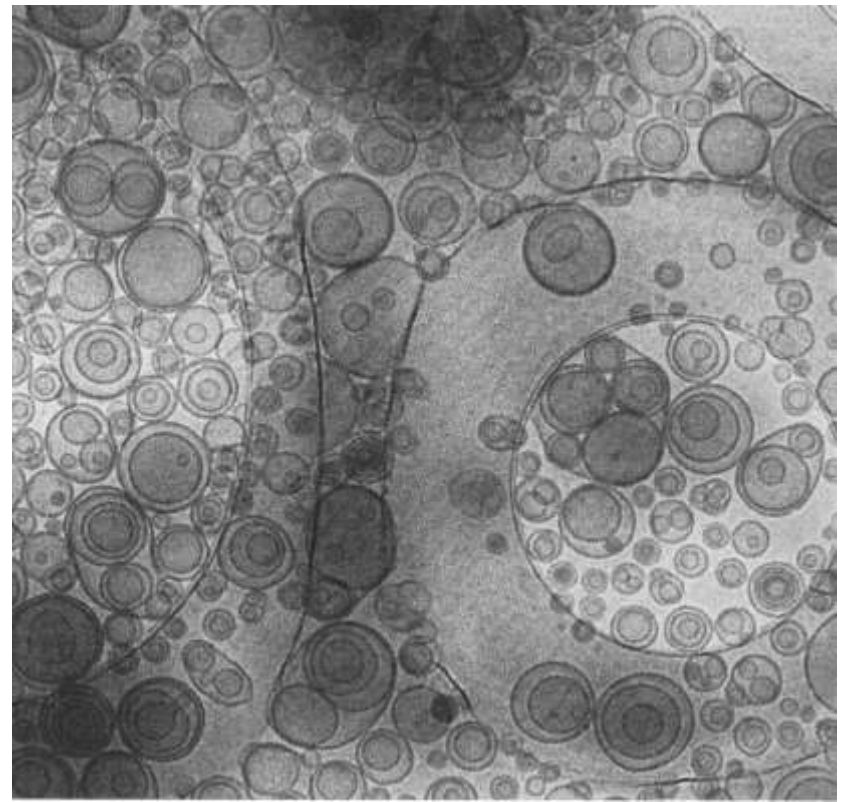


Mixed saturated and unsaturated



Monounsaturated

*Unilamellare Liposomen*  
(SUV:  $d < 100 \text{ nm}$ , LUV:  $d > 100 \text{ nm}$ ,  
GUV:  $d \gg 100 \text{ nm}$ , im  $\mu\text{m}$  Bereich)





# Multilamellare Liposomen

mehrere Schichten;  $d \sim 500$  nm

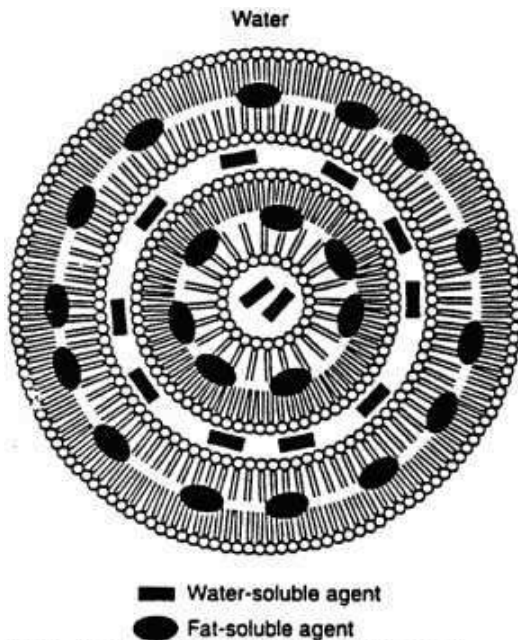
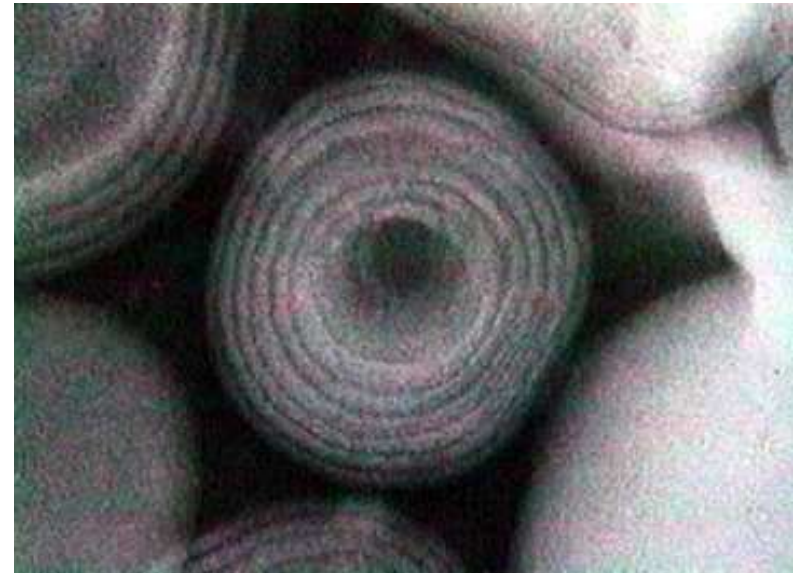
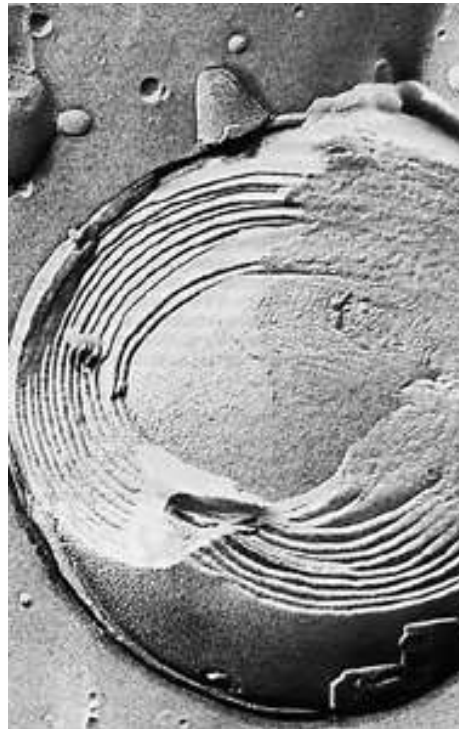
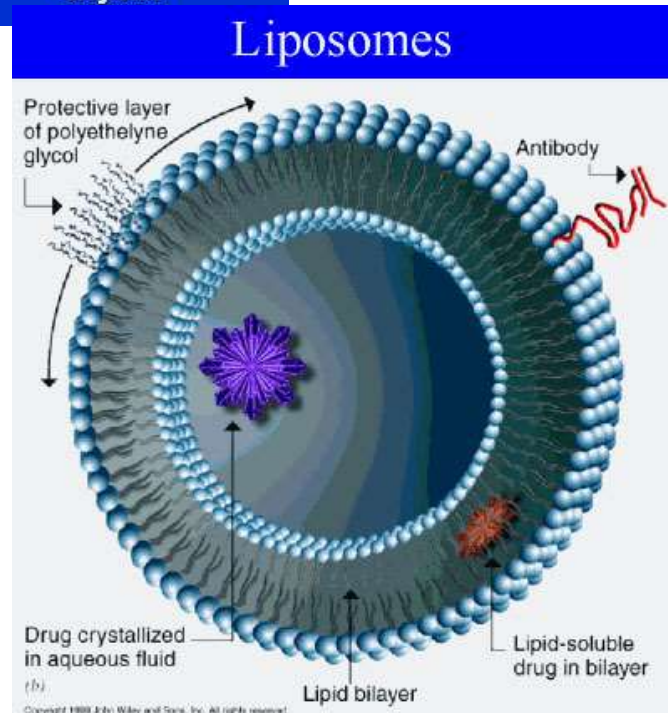
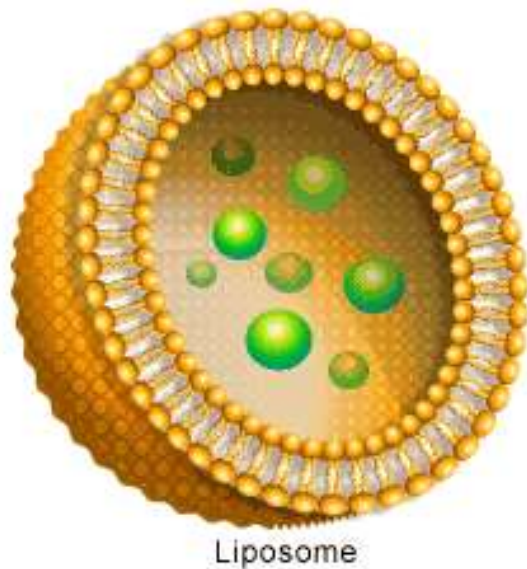
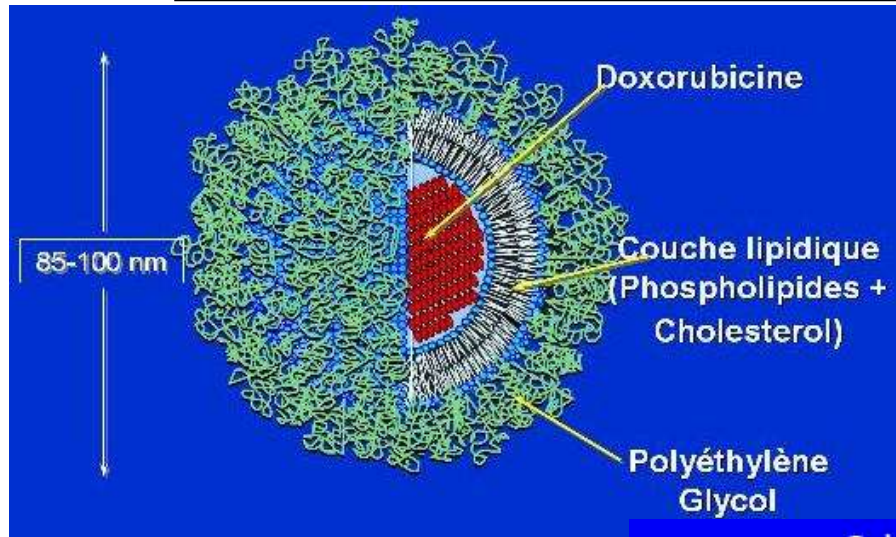


Fig 3. - Diagram of fat- and water-soluble agents encapsulated in a liposome. From Bangham AD. Liposomes: realizing their promise. Hosp Pract (Off Ed). 1992;27:51-56. Reprinted with permission from The McGraw-Hill Companies, Inc.

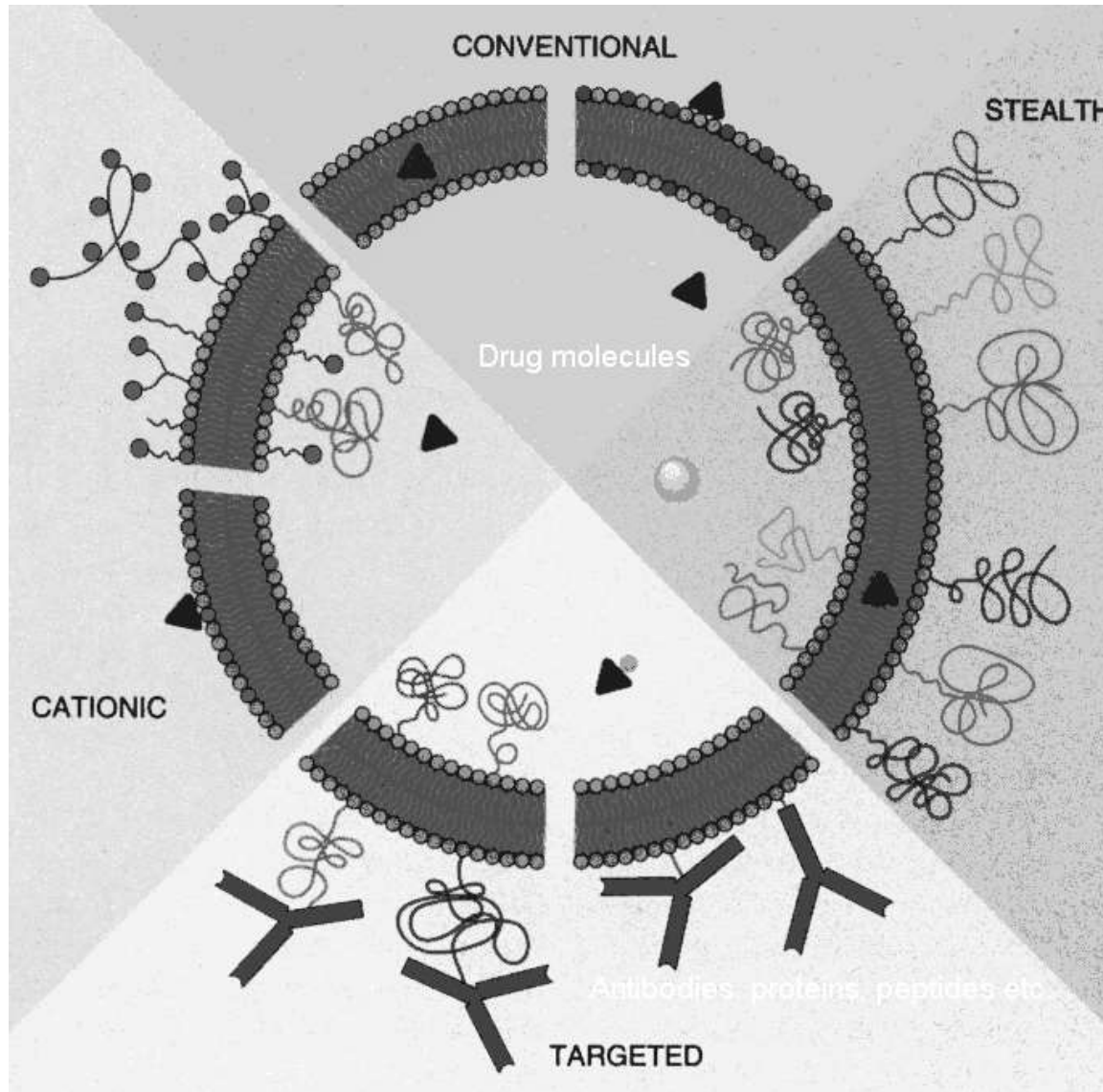




# Liposomen — Wirkstoffträger



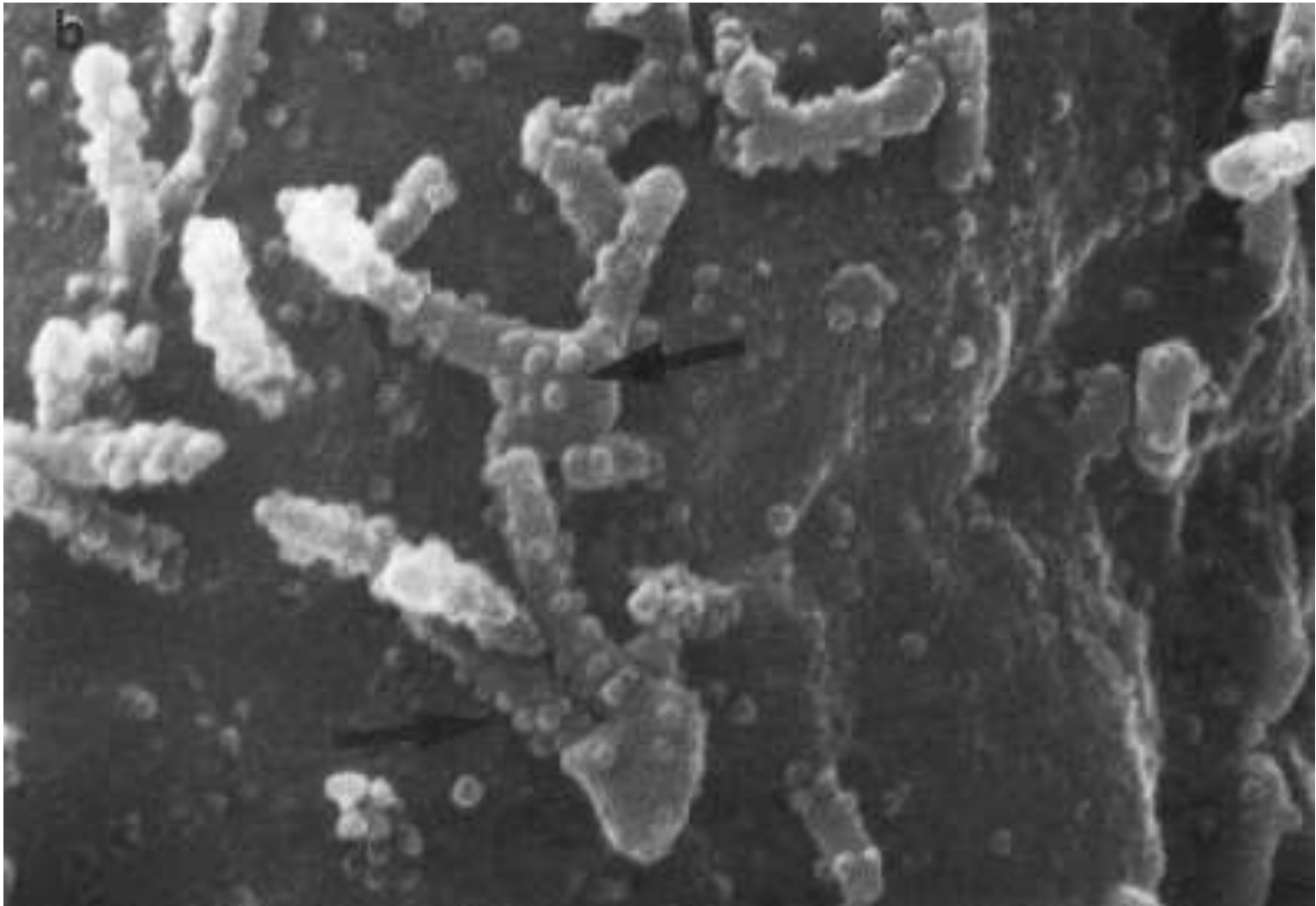
## Weitere Klassifizierung von Liposomen



(sich stehlen)

Entdeckung dieser Partikel  
durch das Monozyten-  
Macrophagen-System ist  
verhindert

# *Immunliposome*

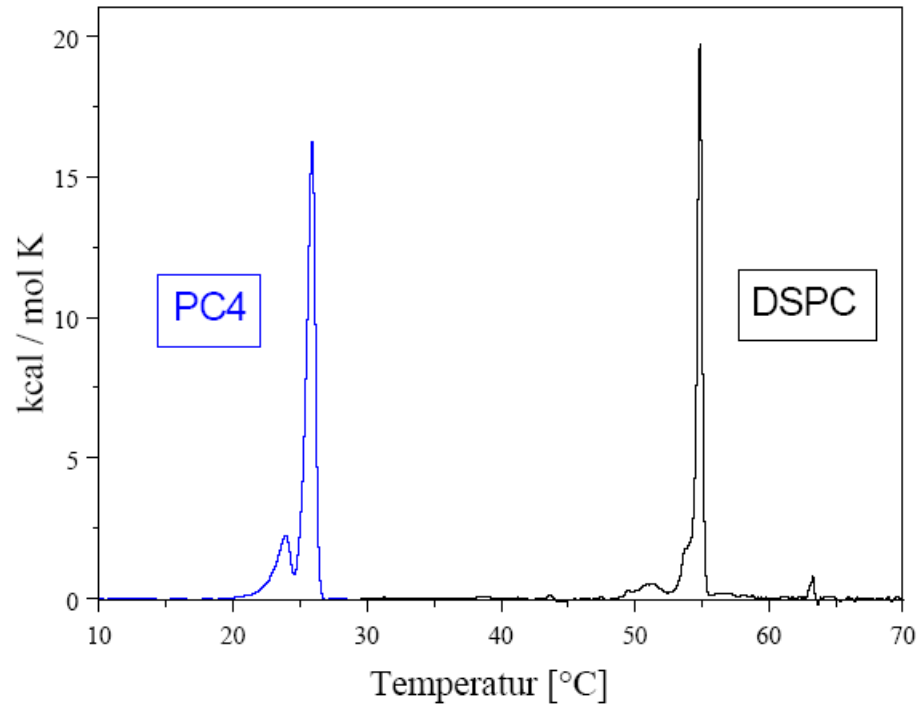


# *Strukturen, molekulare Bewegungen in Lipid-Systemen*

Phase: spezielle Anordnung/Beweglichkeit von Kopfgruppen und Kohlenwasserstoffketten der Lipidmoleküle

Phasenübergang: Änderung in Anordnung, Beweglichkeit

- charakterisiert durch Übergangstemperatur ( $T_m$ )/Enthalpie ( $\Delta H_m$ ) und ihre Halbbreite;
- hängt von Zusammensetzung (Typ von Lipid, relative Konz. des Lösungsmittel und gelöst. Lipid);
- Krümmung der Membranoberfläche!!! (Radius der Lipidvesikel)



	$T_m$ [°C]	$T_v$ [°C]	$\Delta H (T_m)$ [kJ / mol]
<b>PC4</b>	25,8	23,9	56,5
<b>DSPC</b>	54,7	51,4	46,1

PC4: Kettenlänge wie bei DSPC; bei [C4,C5] eine ungesättigte Verbindung: Ölsäure

## Phasen

$L_\alpha$  Flüssigkristalline Phase

$L_\beta$  Gelphase

$L_{\beta'}$  Gelphase mit Tiltwinkel

$P_\beta$  „Ripple Phase“ (Ripple: Falte)

$P_{\beta'}$  „Ripple Phase“ mit Tiltwinkel (Tilt: Neigung)

$L_c$  Quasikristalline Phase

$L_{c'}$  Quasikristalline Phase mit Tiltwinkel

Charakterisierung der Beweglichkeit — Fluidität

$$S = 1 - \frac{3}{2} \left\langle \sin^2 \alpha \right\rangle_{t, \Omega}$$

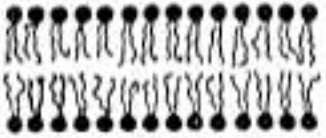

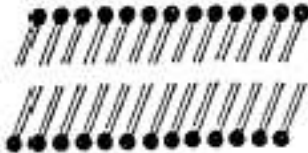
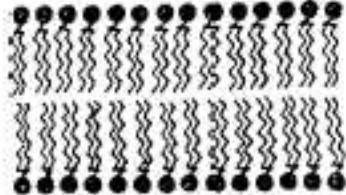
Ordnungsgrad — **zeitlicher** und räumlicher Durchschnitt der molekularen Bewegungen



Membranfluidität:

- Wechselwirkungen zw. den Kopfgruppen;
- Art der Fettsäurenketten ihrer Lipidmoleküle (Je ungesättigter oder verzweigter die Fettsäurenketten, desto niedriger ist der  $T_m$ -Wert der Lipide: höhere Fluidität für die Membran);

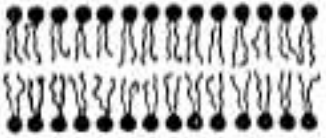

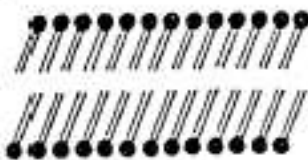
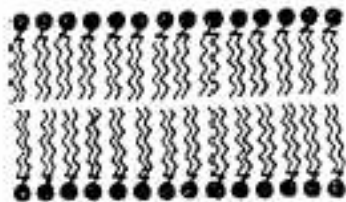
1. **Hauptumwandlung**, Phasenübergang  $P_\beta (P_{\beta'}) \rightarrow L_\alpha$ ; geordneten Kohlenwasserstoffketten mit *all-trans* Konfiguration in ungeordnete Kohlenwasserstoffketten mit hohem Anteil von *gauche*-Konformeren.
2. Unterhalb der Hauptumwandlung existiert eine **Vorumwandlung**, bei der ein Übergang von  $L_\beta (L_{\beta'}) \rightarrow P_\beta (P_{\beta'})$  stattfindet. Im Gegensatz zur Hauptumwandlung, die durch das Verschwinden der lateralen, langreichweitigen Ordnungen ausgezeichnet ist, bleiben bei der Vorumwandlung diese Ordnungen erhalten.
3. Schließlich wurde zum ersten mal die **Subumwandlung**  $L_c \rightarrow L_{\beta'}$  in vollständig hydratisierten, kristallinen DPPC Doppelschichten entdeckt.

Phase	Struktur der Doppelschicht	Gitter / Packung
$L_{\alpha}$		Fluide Ketten, <i>trans-gauche-trans</i> Konformation der Acylketten
$P_{\beta'}$		Ketten all-trans,  Zweidimensionale Kettenpackung
$L_{\beta'}$		Ketten all-trans, Neigungswinkel 30°, Zweidimensionale Kettenpackung
$L_c$		Ketten all-trans, Supergitter oder Molekülgitter

1. *Hauptumwandlung*,  
Phasenübergang  $P_{\beta}$  ( $P_{\beta'}$ )  $\rightarrow$   $L_{\alpha}$   
geordneten  
Kohlenwasserstoffketten mit *all-trans* Konfiguration in  
ungeordnete  
Kohlenwasserstoffketten mit  
hohem Anteil von *gauche*-  
Konformeren

$L_{\alpha}$  Flüssigkristalline Phase  
 $P_{\beta}$  „Ripple-Phase“  
 $P_{\beta'}$  „Ripple-Phase“ mit Tiltwinkel



Phase	Struktur der Doppelschicht	Gitter / Packung
$L_{\alpha}$		Fluide Ketten, <i>trans-gauche-trans</i> Konformation der Acylketten
$P_{\beta'}$		Ketten all-trans,  Zweidimensionale Kettenpackung
$L_{\beta'}$		Ketten all-trans, Neigungswinkel 30°, Zweidimensionale Kettenpackung
$L_c$		Ketten all-trans, Supergitter oder Molekülgitter

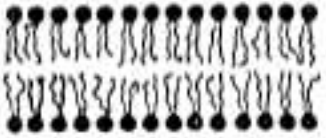

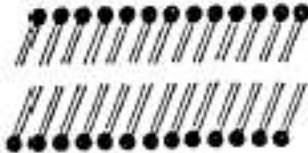
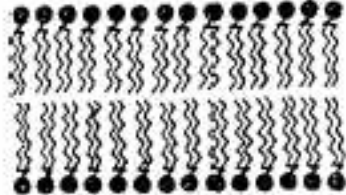
2. Unterhalb der Hauptumwandlung existiert eine **Vorumwandlung**, bei der ein Übergang von  $L_{\beta}$  ( $L_{\beta'}$ )  $\rightarrow$   $P_{\beta}$  ( $P_{\beta'}$ ) stattfindet. Im Gegensatz zur Hauptumwandlung, die durch das Verschwinden der lateralen, langreichweitigen Ordnungen ausgezeichnet ist, bleiben bei der Vorumwandlung diese Ordnungen erhalten.

$L_{\beta}$  Gelphase

$L_{\beta'}$  Gelphase mit Tiltwinkel

$P_{\beta}$  „Ripple Phase“

$P_{\beta'}$  „Ripple Phase“ mit Tiltwinkel

Phase	Struktur der Doppelschicht	Gitter / Packung
$L_{\alpha}$		Fluide Ketten, <i>trans-gauche-trans</i> Konformation der Acylketten
$P_{\beta'}$		Ketten all-trans,  Zweidimensionale Kettenpackung
$L_{\beta'}$		Ketten all-trans, Neigungswinkel 30°, Zweidimensionale Kettenpackung
$L_c$		Ketten all-trans, Supergitter oder Molekülgitter

3. *Subumwandlung*  $L_c \rightarrow L_{\beta'}$   
in vollständig hydratisierten,  
kristallinen DPPC  
Doppelschichten (der  
Wassergehalt ist **doch** ganz  
gering).

$L_c$  Quasikristalline Phase  
 $L_{\beta'}$  Gelphase mit Tiltwinkel

## Entstehung von Ripple-Strukturen:

- Entstehung der Fehlstellen entlang der Ketten
- Diffusion d. Fehlstellen zur Membranoberfläche
- Entstehung/Anhäufung d. Punktdefekten an der Oberfläche
- Umstrukturierung der Punktdefekten in Liniendefekten  
periodischer Struktur

## Änderung in Ripple-Struktur:

- Ww. der Lipidmembrane mit Pharmazeutika, Proteinen
- Ionenstärke;
- Größe der Oberfläche;  
(inhomogenität an der Membranoberfläche)



# *Herstellungsmethoden von Liposomen*



**Entwicklung und Charakterisierung von Mikroemulsionen  
zur dermalen Applikation von Arzneistoffen**

Dissertation

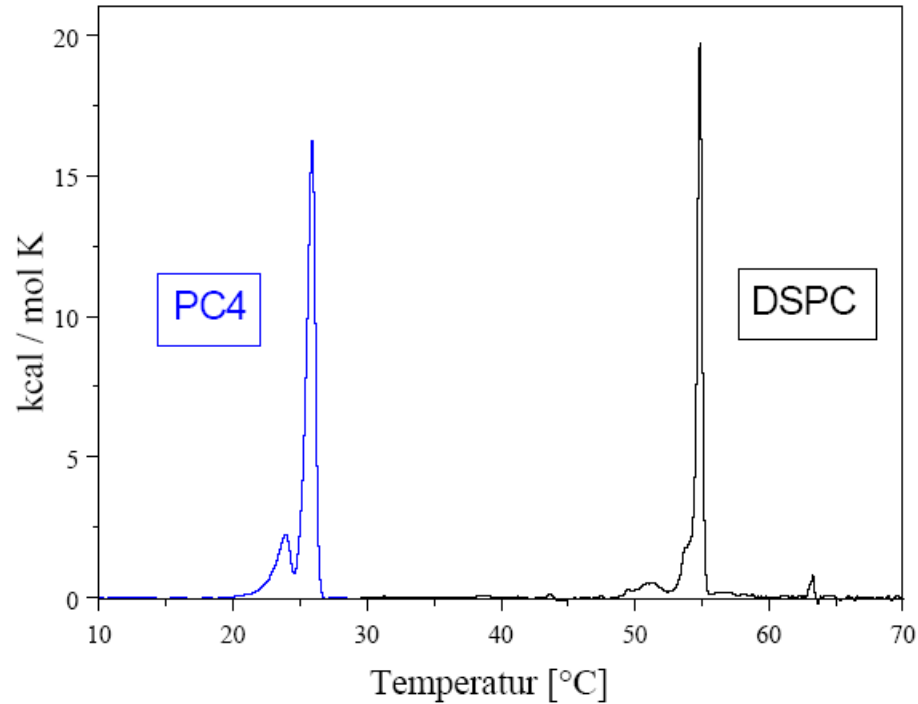
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

DISSERTATION

Entwicklung von liposomalen Gentransfervesikeln auf  
der Grundlage optimierter kationischer Lipide



	T <sub>m</sub> [°C]	T <sub>v</sub> [°C]	ΔH (T <sub>m</sub> ) [kJ / mol]
<b>PC4</b>	25,8	23,9	56,5
<b>DSPC</b>	54,7	51,4	46,1

PC4: Kettenlänge wie bei DSPC, aber bei [C4,C5] eine ungesättigte Verb.



## *Faktoren die die Liposomenstruktur beeinflussen*

**Länge** der apolaren Kette —  $T_m$

DMPC (14:0) — 24 °C

DPPC (16:0) — 41,5 °C

DSPC (18:0) — 56 °C

**Doppelverbindung** in apolarer Kette — kleinere  $T_m$

DOPC (16:1) — —27 °C

**Gemischverhältnis:**

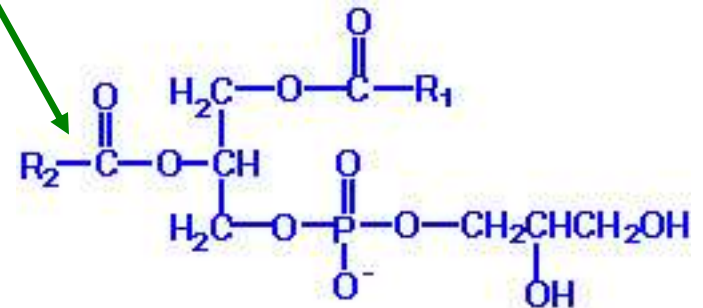
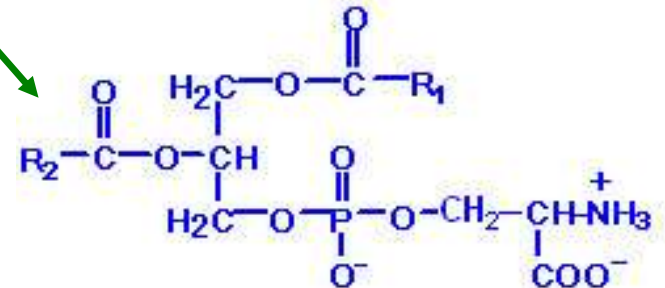
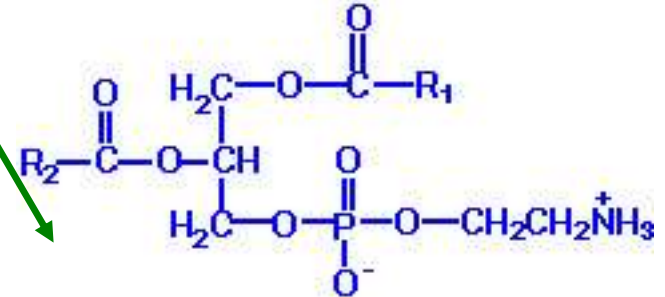
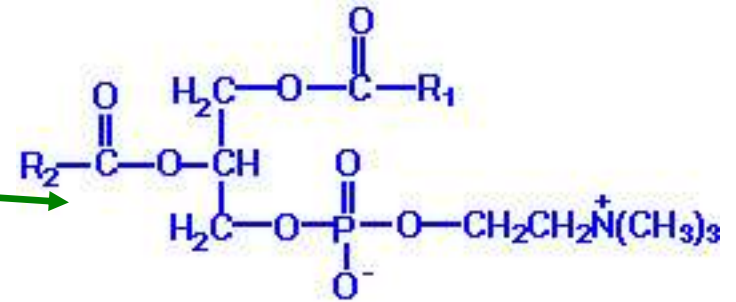
DPPC:DOPC (80:20) — -2 °C

DPPC:DOPC (70:30) — -7 °C



## Kopfgruppen:

- ungeladet (netto): PC, PE;
- negativ (PS, PG:phosphoglycerol );



- positiv (Gangliosiden,  
Stearylamin, Sphingosin,  
...,weitere künstliche Lipiden);

Im 10-30 % Verhältnis

- Einlagerungsgrad erhöht sich
- zelluläre Aufnahme erhöht sich
- Lebensdauer d. Liposomen nimmt ab.



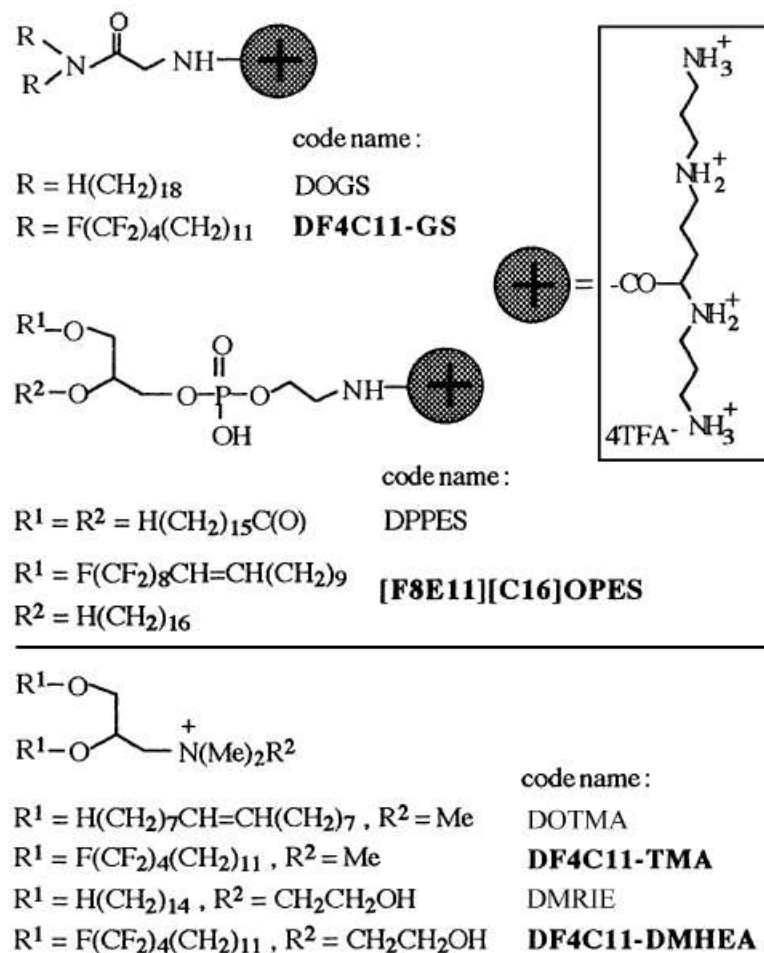
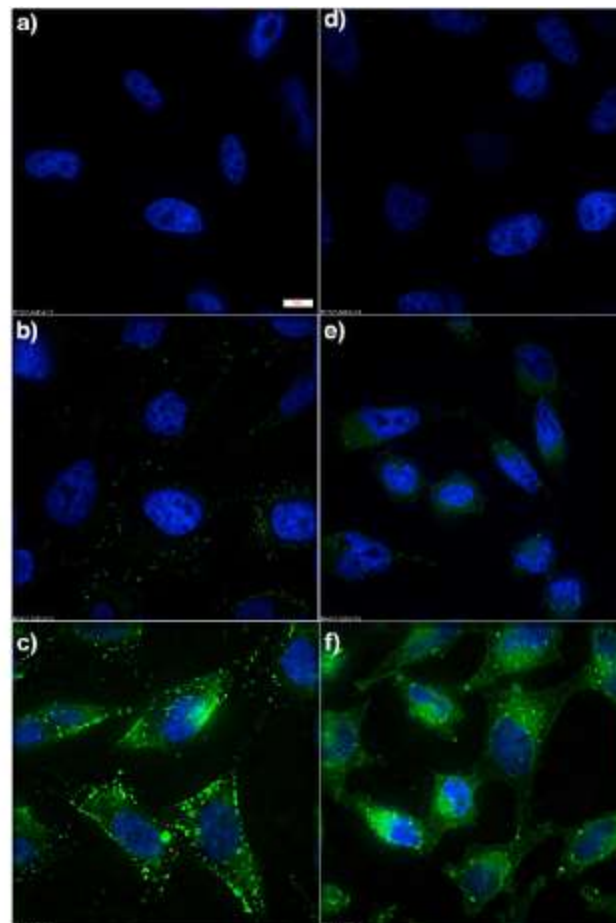



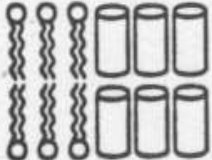



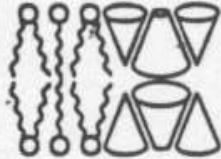


Fig. 1. Chemical structure of the fluorinated and reference cationic lipids used or mentioned in this study: DF4C11-TMA, DF4C11-DMHEA, [F8E11][C16]OPES and DF4C11-GS [6] are fluorinated analogues of DOTMA [9], DMRIE [10], DPPES [11] and DOGS [2], respectively.



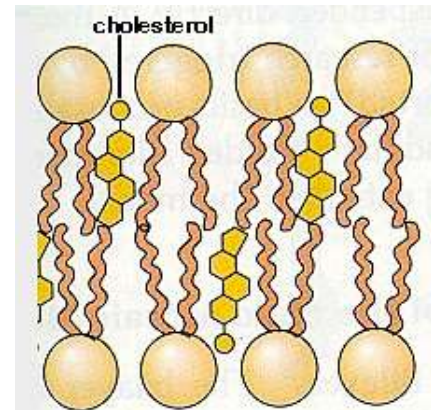


# Abhängigkeit der Liposombildung von Lipidform

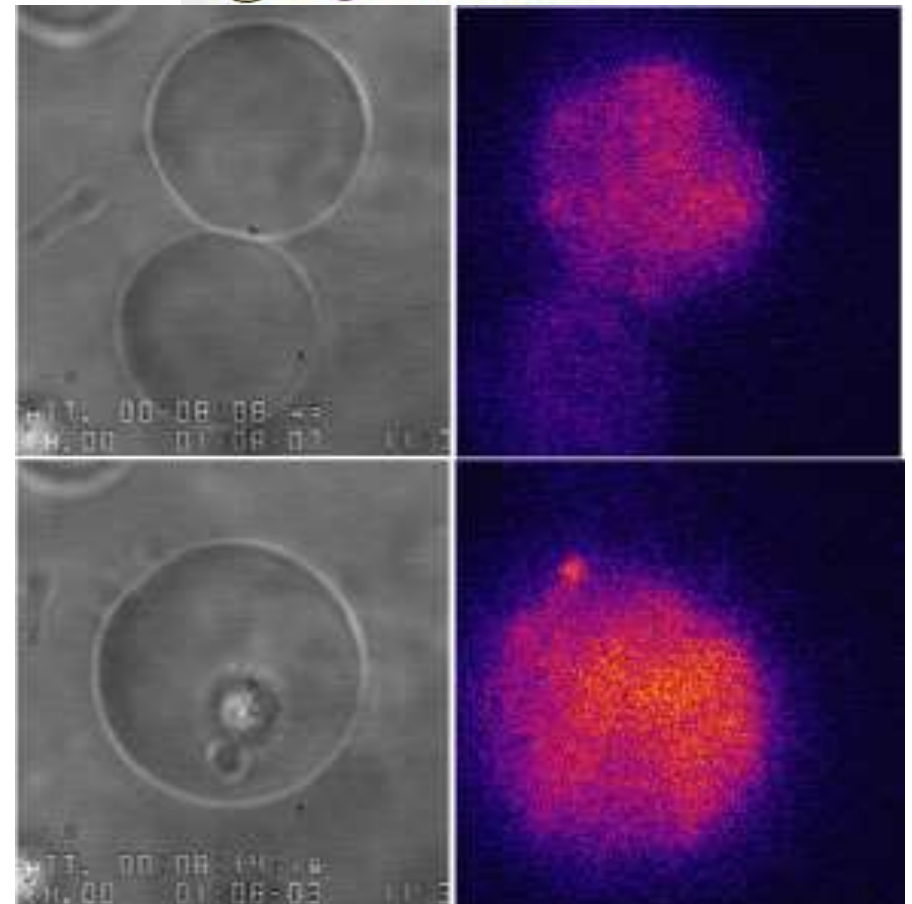
Lipids	Shape	Organization	Phase
Soaps Detergents Lysophospholipids	 Inverted cone $P < \frac{1}{3} - \frac{2}{3}$	 Micelles	Isotropic hexagonal I
Phosphatidyl- choline - serine - inositol Sphingomyelin Dicetylphosphate DODAC	 Cylinder $P \sim 1$	 Bilayer	Lamellar (Cubic)
Phosphatidyl- ethanolamine Phosphatidic acid Cholesterol Cardiolipin Lipid A	 $P > 1$		Reverse micelles hexagonal II
Mixtures Lysophosphatidyl- choline and Phosphatidyl- ethanolamine	 $P \sim 1$		Lamellar



## Cholesterin (30-50 mol %)



- Unter pH  $\rightarrow$  6,5 oder ober 8,5 Destabilisation;
- Zweiwertige Kationen  $\rightarrow$  Aggregation, Fusion

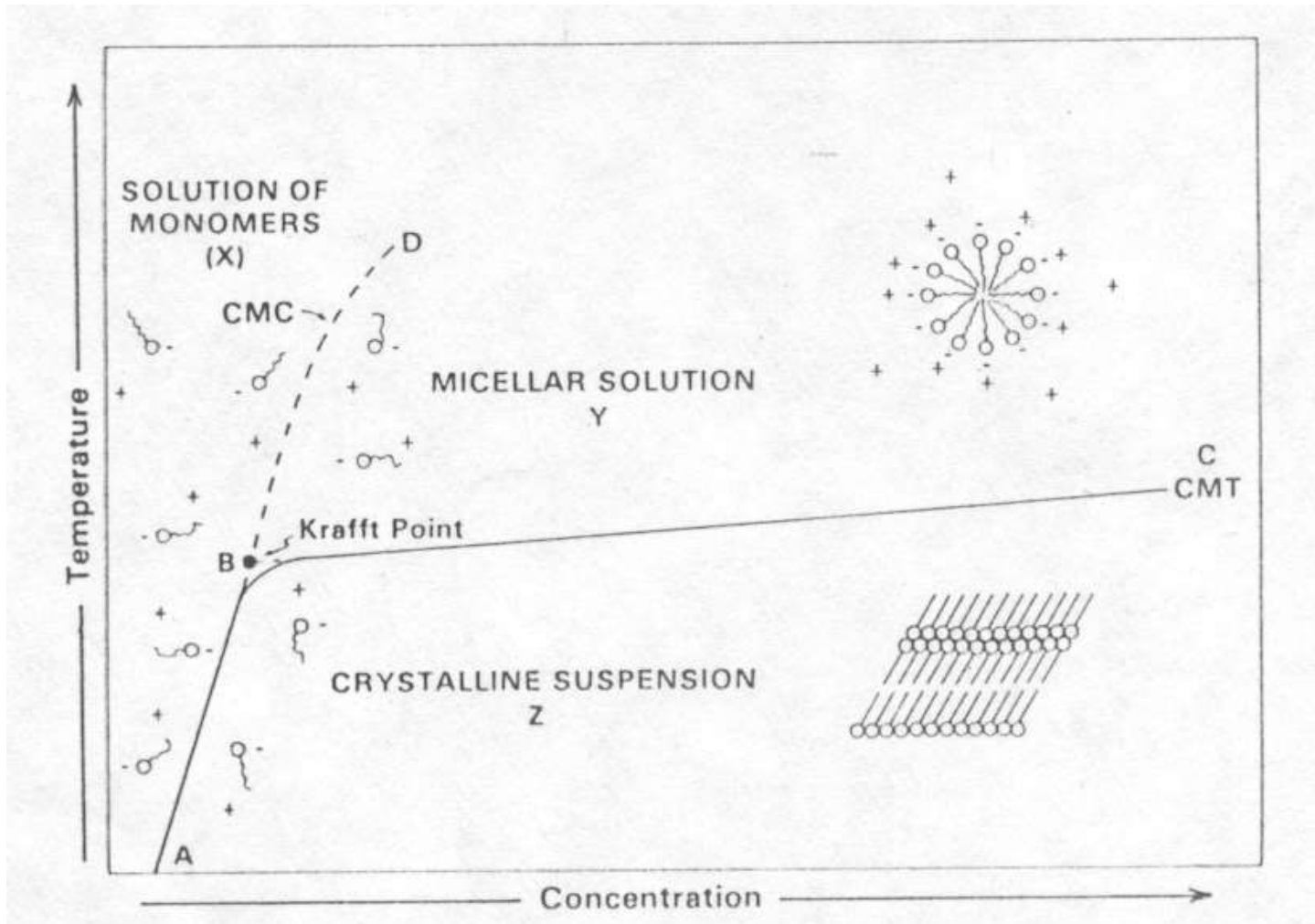


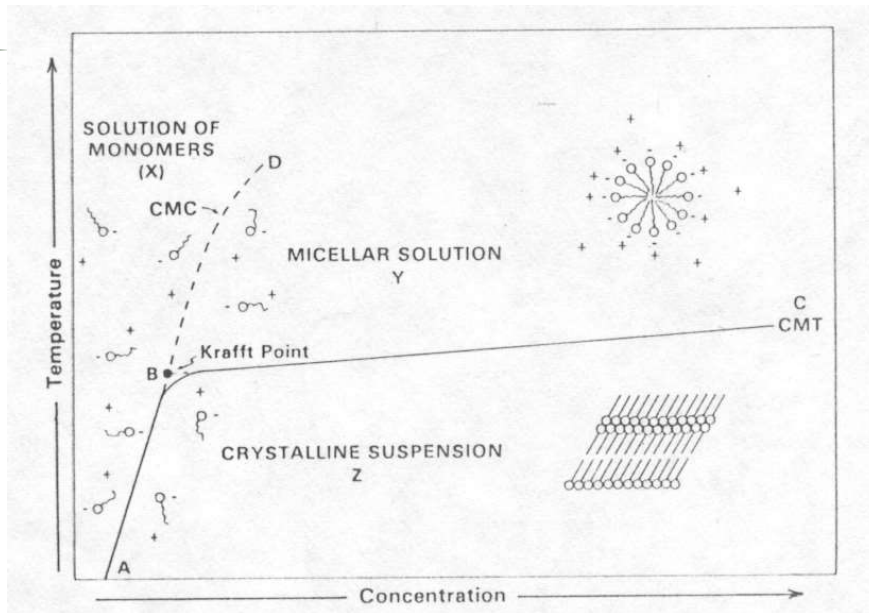


Lipid — Wasser Verhältnis:

CMC (critical micellar concentration)

CMT (critical micellar temperature)





Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC): diejenige minimale Konzentration des gelösten Moleküls, die schon Mizellenbildung verursacht.

— hängt von Temperatur, Lösungsmittel, gelöstem Molekül, ....

Triebkraft: Änderung der freien Enthalpie

— Enthalpie (Dipolkräfte zw. polaren Anteilen und Wasser)

— Entropie mal Temperatur (hydrophobe Ww. zwischen apolaren Ketten)





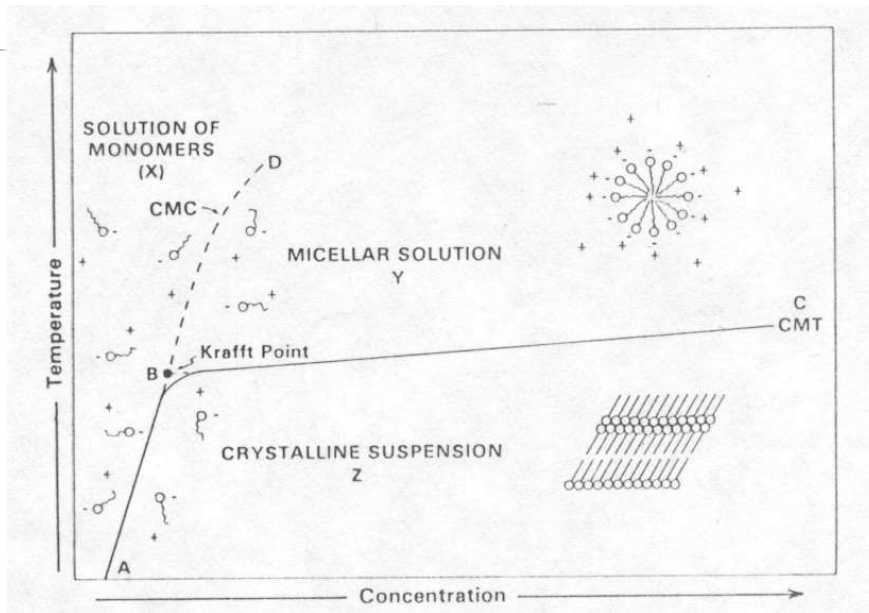
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

a.)  $\Delta H > 0$ : für spontane Prozesse —  $\Delta S > 0$ : Unordnung muss sich erhöhen

b.)  $\Delta H < 0$ : für spontane Prozesse —  $\Delta G < 0$ :  $\rightarrow \Delta S < /> 0$

a.) Entropiegesteuerte Prozesse — Ww. zw. hydrophoben Ketten

b.) Enthalpiegesteuerte Prozesse (laufen ab, **auch** wenn die Entropie nimmt ab) — Richtung hängt von Temperatur ab!



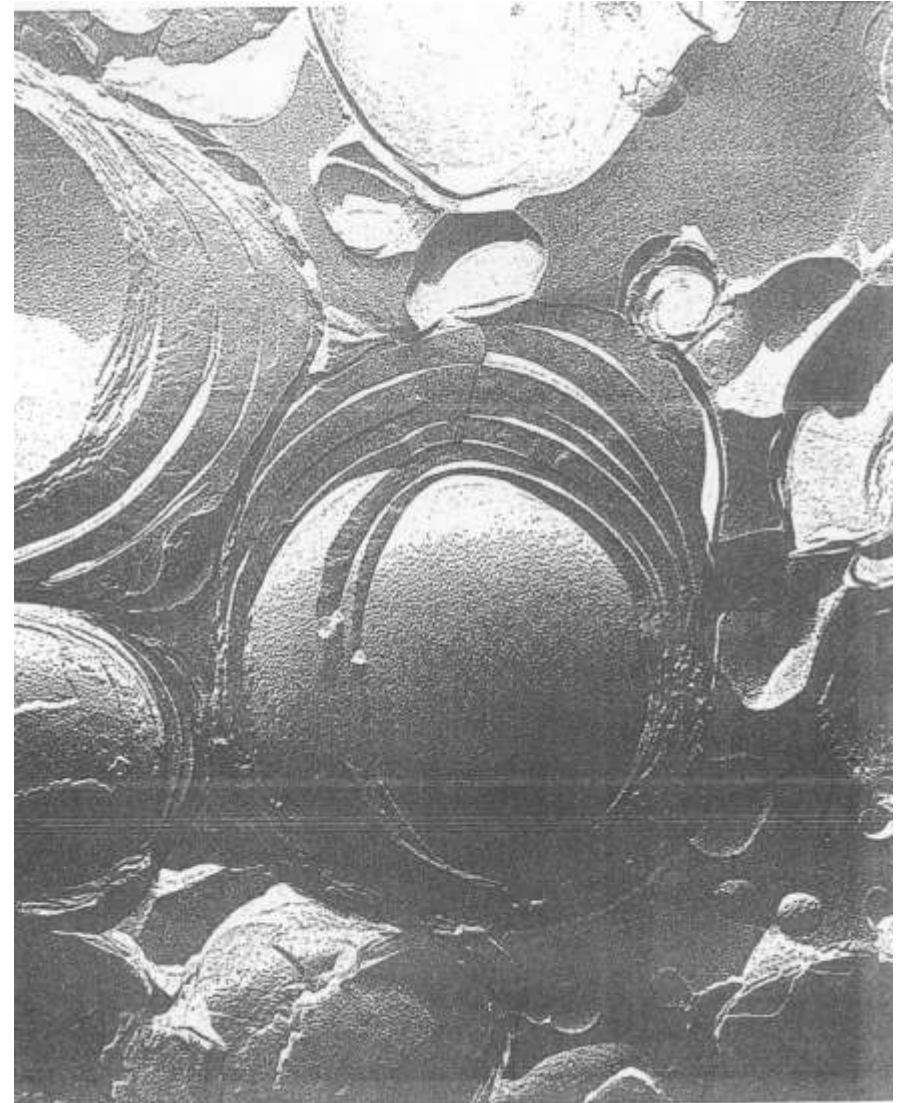
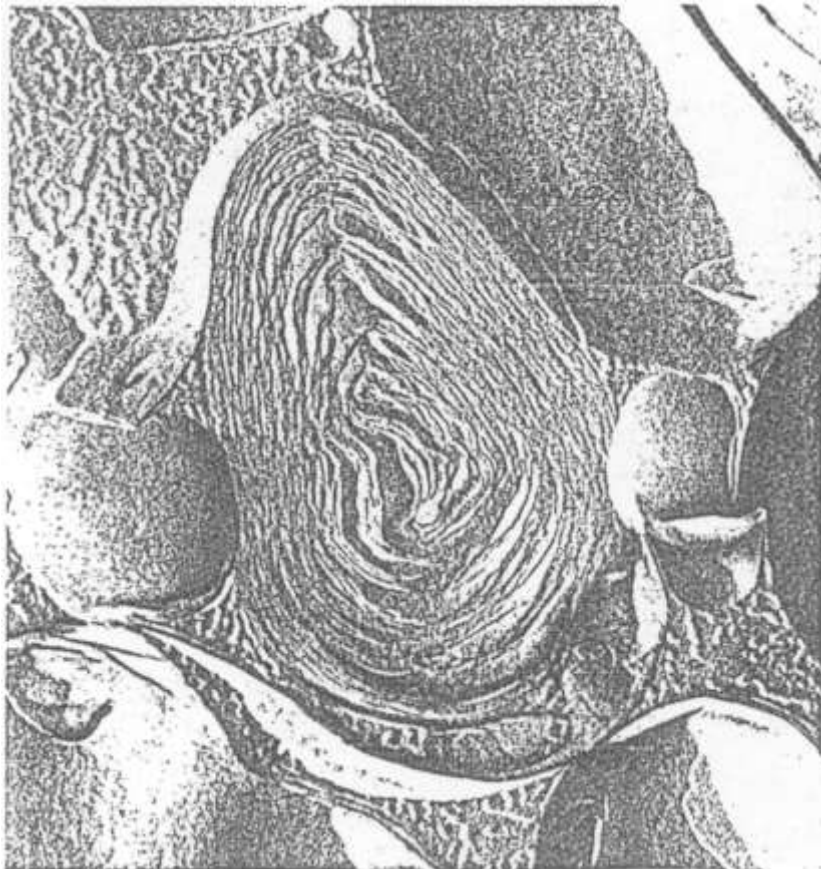
# Phasenumwandlungstemperatur zwischen flüssigkristallinem- und Mizellenzustand

Krafft-Punkt: die Temperatur, wo die Löslichkeit gleich dem CMC ist.



## Multilamellare Liposomen

mehrere Schichten;  $d \sim > 500$  nm;  
Einlagerungsgrad ist klein (im Allg.)





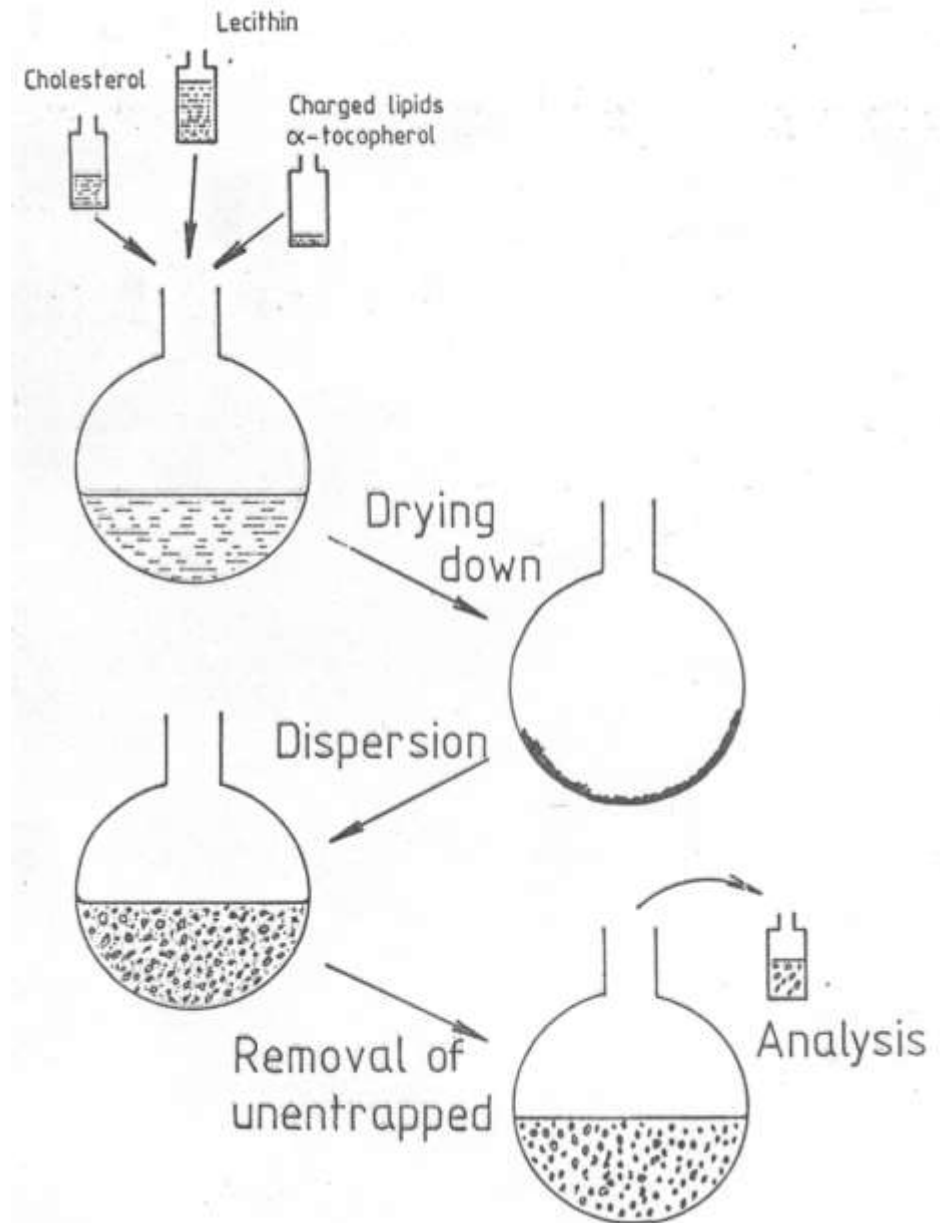


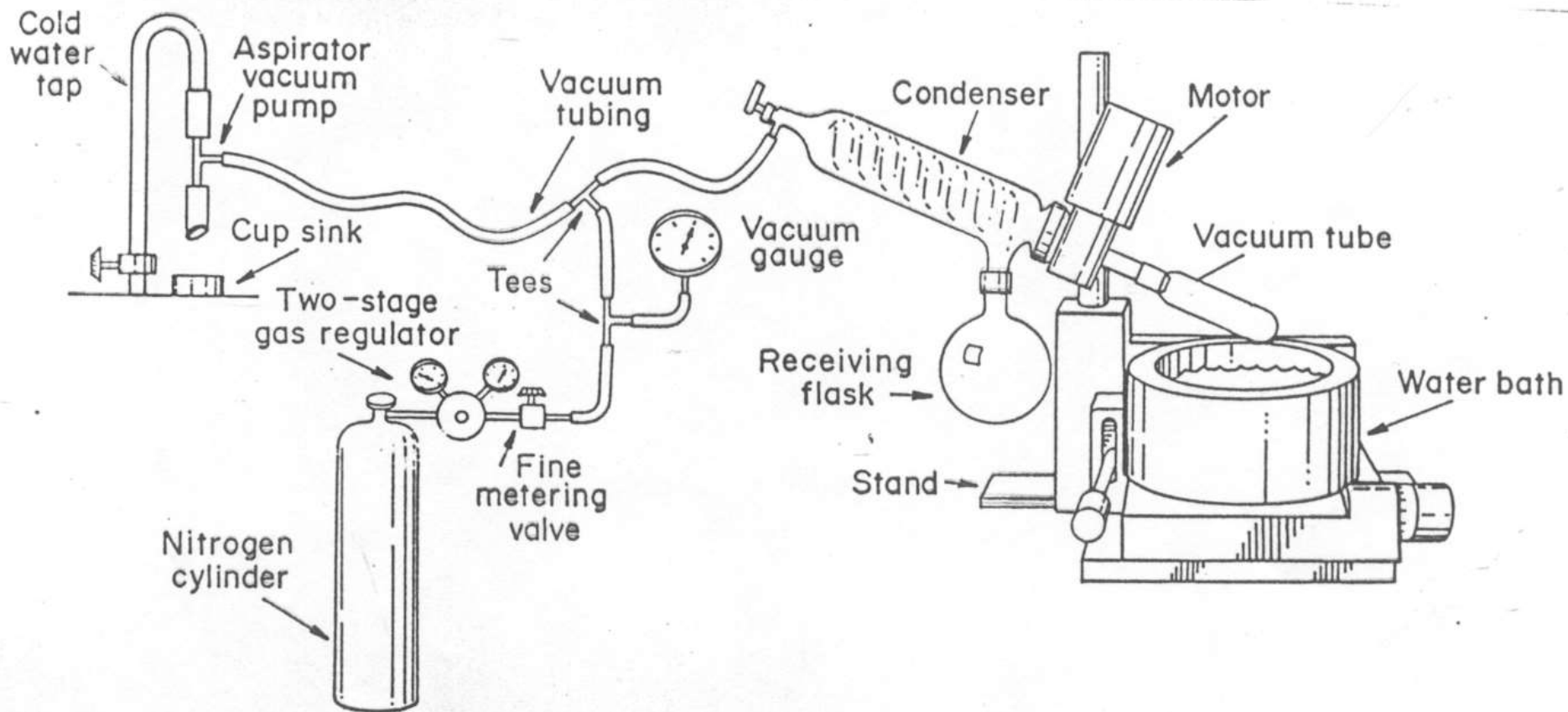
### MLV:

- Lipidlösung in organischen Lösungsmitteln;
- Verdampfen des Lösungsmittels;
- Herstellung von wässriger Dispersion;

### Homogenität:

- Einfrieren in flüssigem N<sub>2</sub> (T ~ 80 K);
- Auftauen (über T<sub>m</sub>);
- Filtrierung (erniedrigt den Durchmesser u. Anz. d. Schichten)

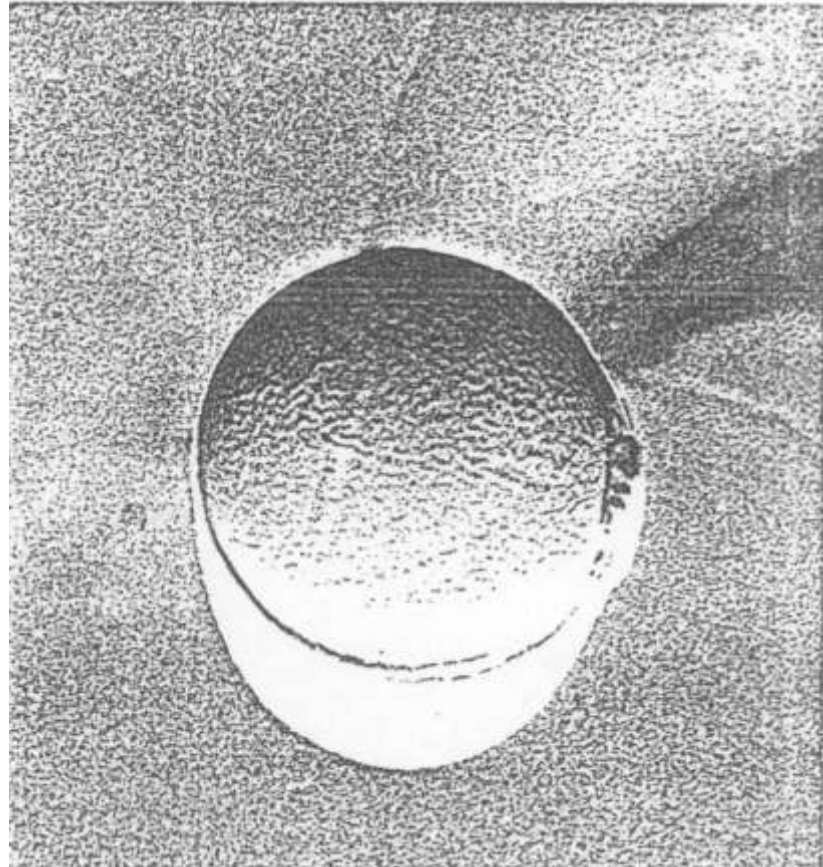




**Figure 2.** Rotary evaporator apparatus for evaporating off organic solvents. The figure shows the arrangement of rotary evaporator and water bath with a nitrogen bleed to control the vacuum. Drawing kindly provided by Dr F.J.Martin.



**SUV** (small unilamellar vesicle)  
( $d < 100$  nm, minimaler Durchm. 20-25 nm)  
— kleines Innenvolumen  
— größere Affinität für Fusion





# SUV-Herstellung:

— aus MLV mittels Beschallung mit US

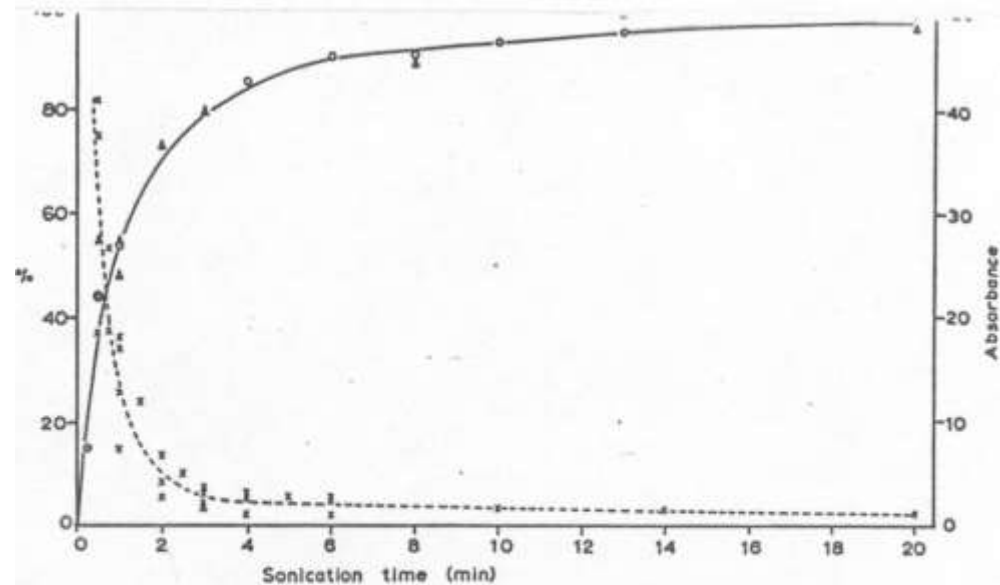
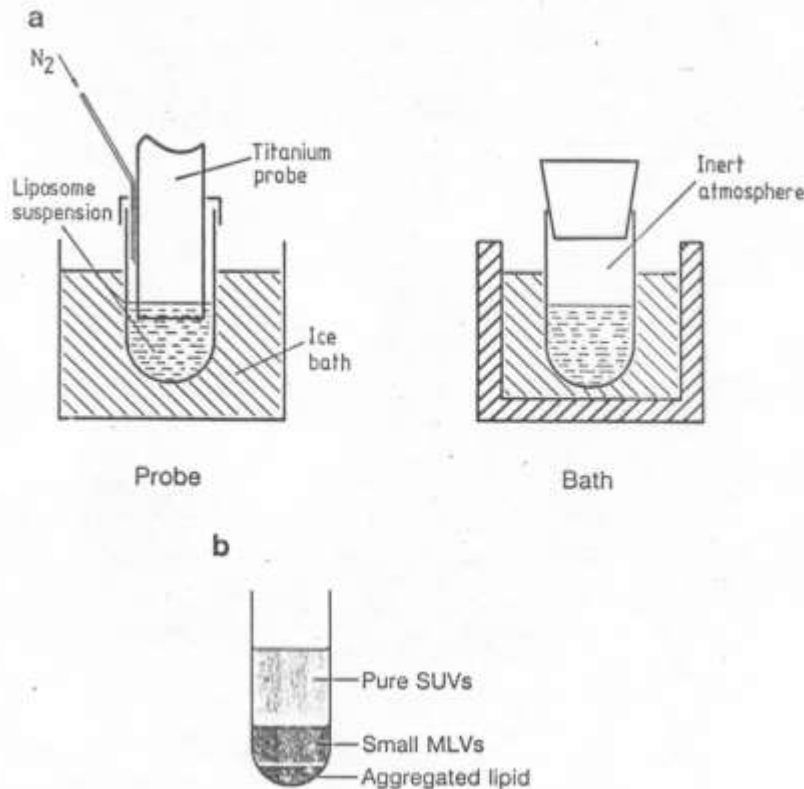


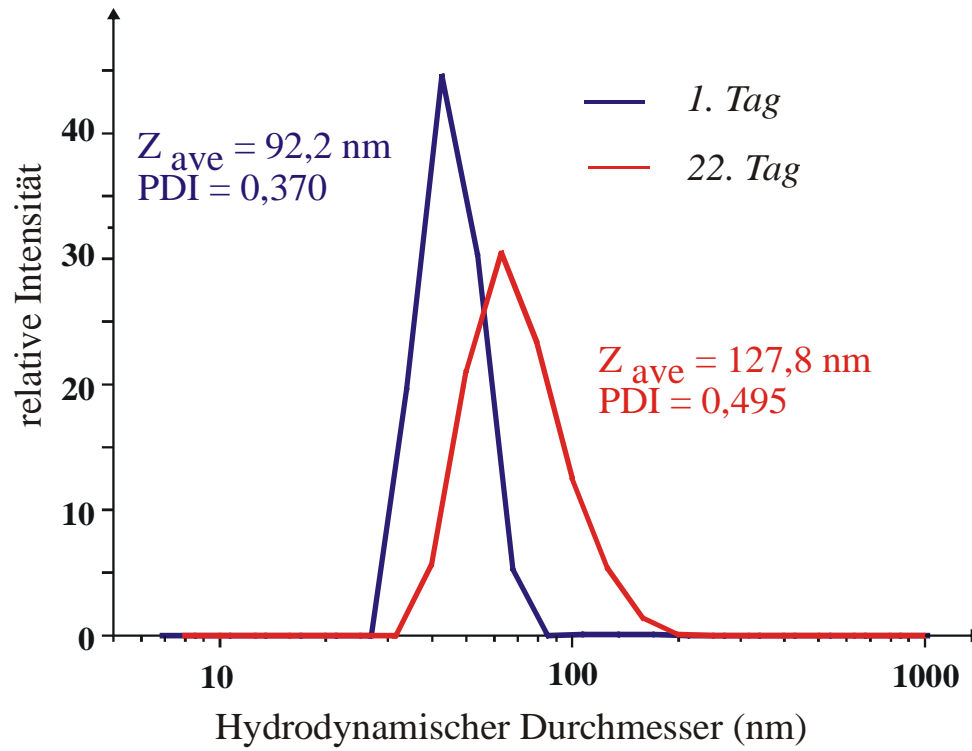
Fig. 4. Time course of sonication. Percent lecithin molecules in fraction II, Fig. 3, (○—○), percent N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> groups giving high-resolution NMR integral (Δ—Δ), and absorbance at 300 nm (×—×) as a function of sonication time of a 1% (w/v) dispersion. The solid curve through the experimental points for percent molecules in fraction II and giving a high-resolution spectrum is calculated according to the theory of Finer *et al.* (1972) described in the text.



# SUV-Herstellung: — aus MLV durch Extrusion

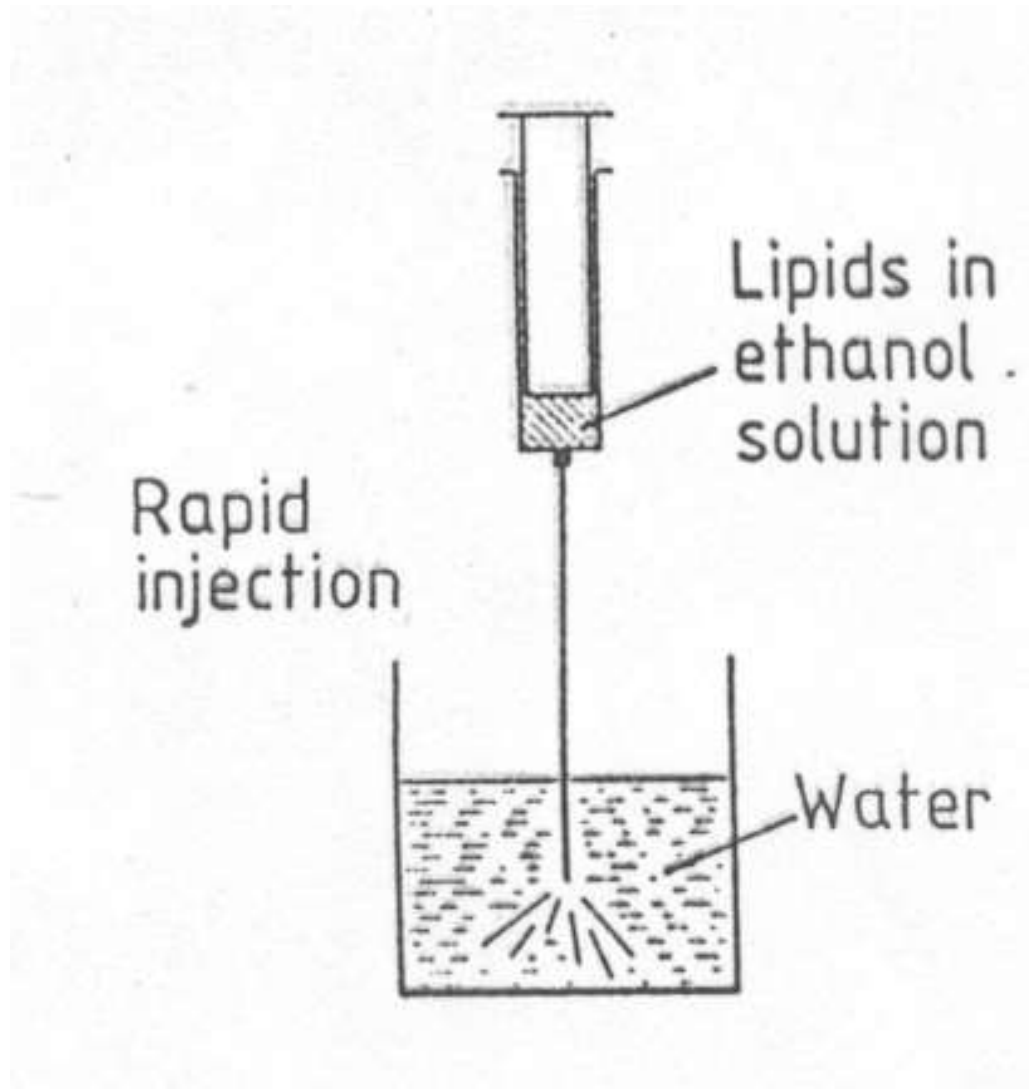








## SUV-Herstellung durch schnelle Injizierung



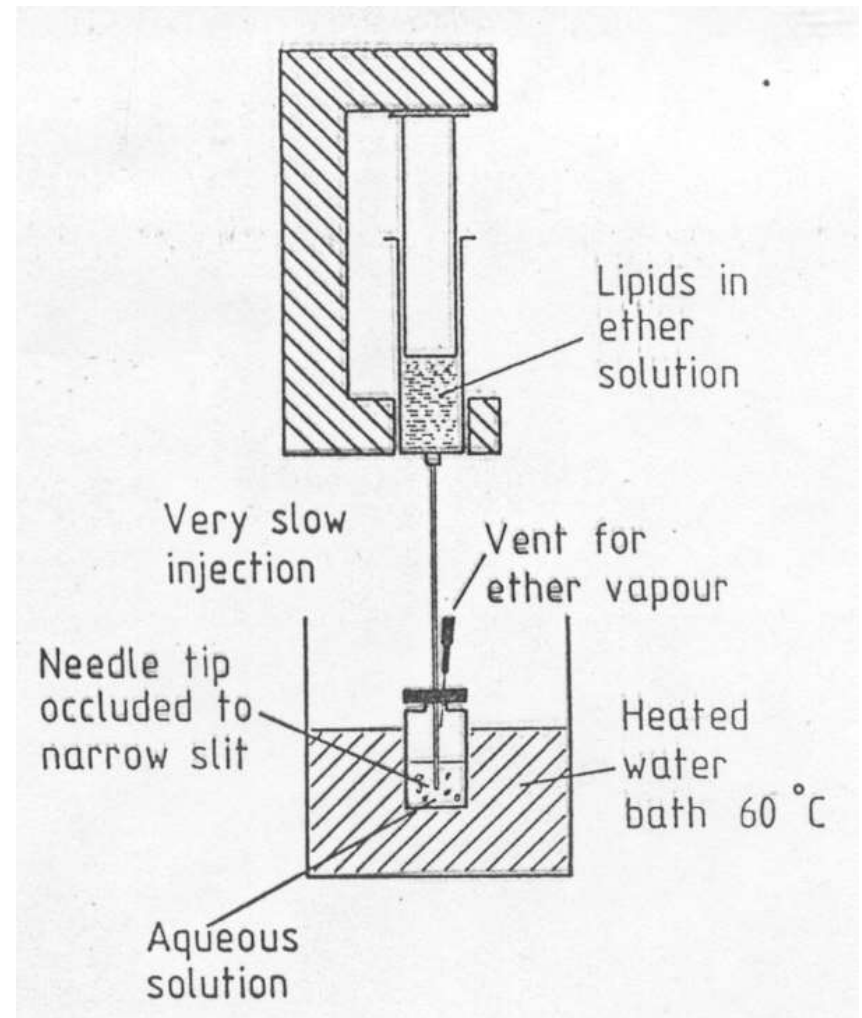


**LUV** (large unilamellar vesicle)

(D: 100 nm – 10  $\mu$ m)

Herstellung:

- aus MLV durch Extrusion;
- aus SUV durch Fusion;
- durch langsame Injizierung







## LUV- Herstellung:

— durch Umkehrphasen-Verdampfung (reversed phase evaporation)

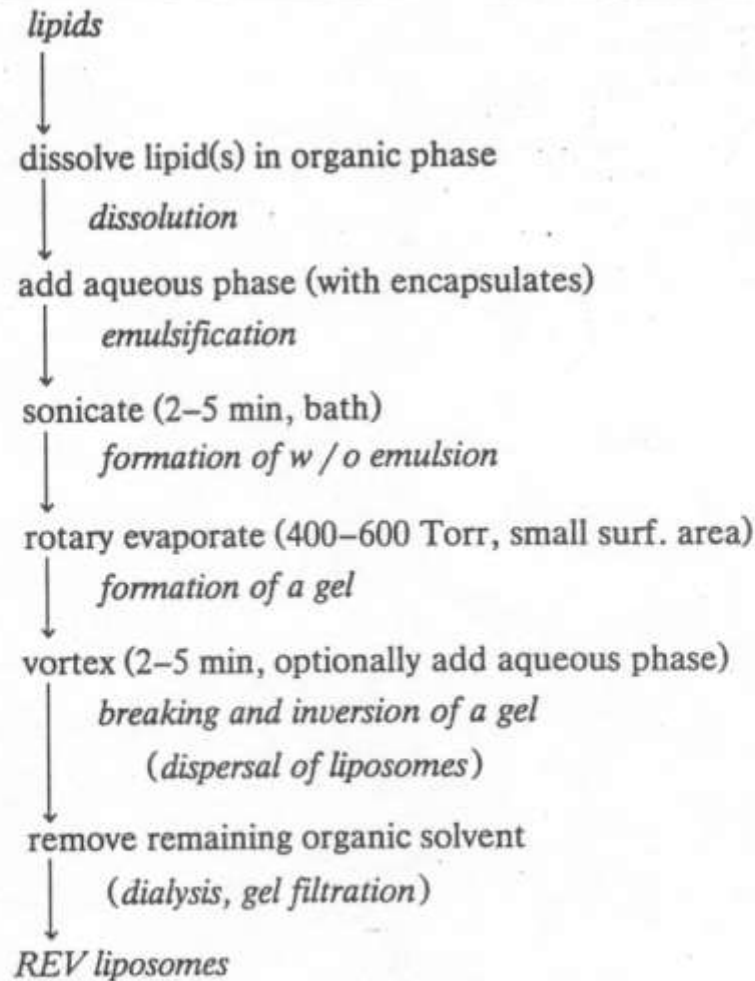
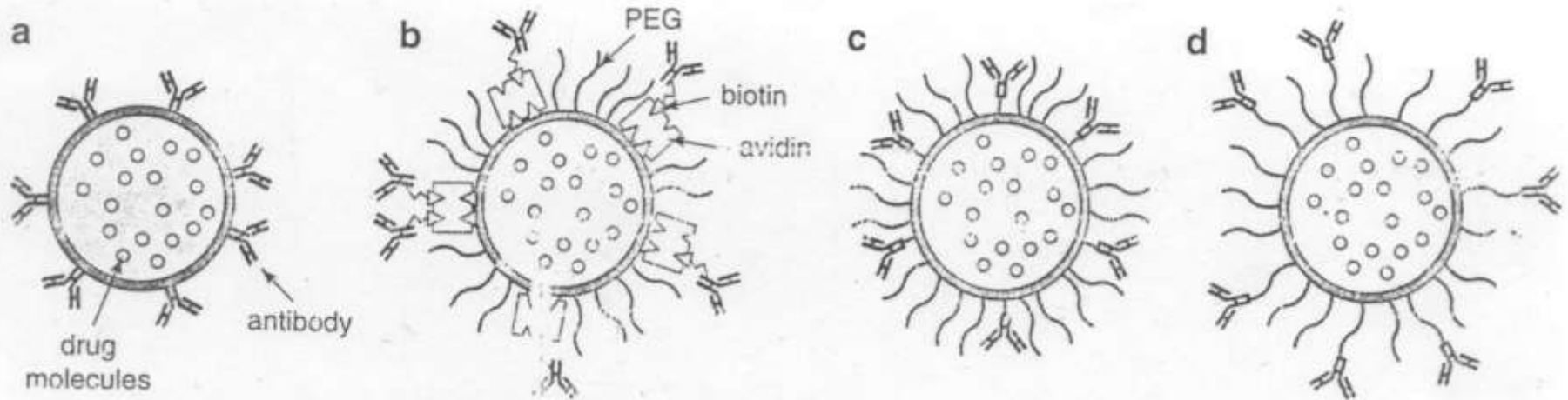


Fig. 3.16. A schematic presentation of REV method. Normally 20–60  $\mu\text{M}$  of lipid are used, 3 ml of diethylether, or 6 ml of diisopropylether or diisopropylether/chloroform 1:1 mixture, or Freon and 1 ml of aqueous phase with dissolved molecules to be encapsulated are used.

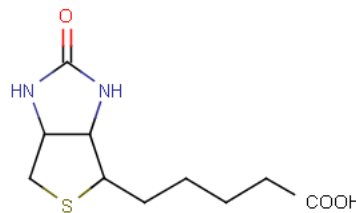


## Spezielle Liposomen „Stealth“-Liposomen

Spezielle Moleküle (z.B.: Monosialoganglyosid-GM1-, Poliethylenglykol –PEG-Verbindungen) an der Liposomenoberfläche verdecken die Liposome vor dem Immunsystem.



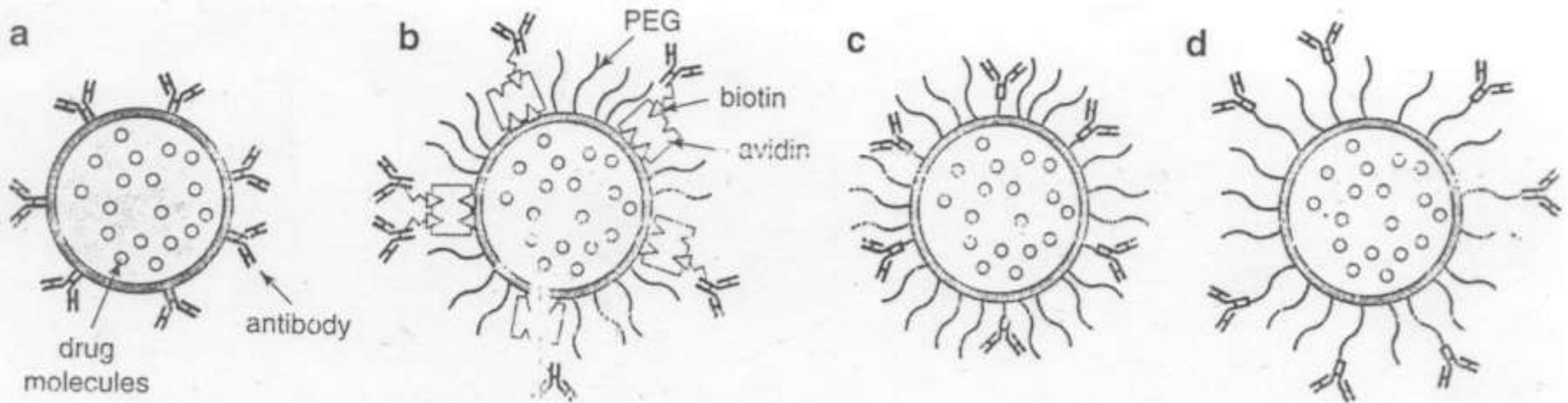
Avidin: wichtiges Protein im Ei;  
Biotin: B<sub>7</sub>





## **„Target“-Zellen-sensitive (Immun)-Liposomen**

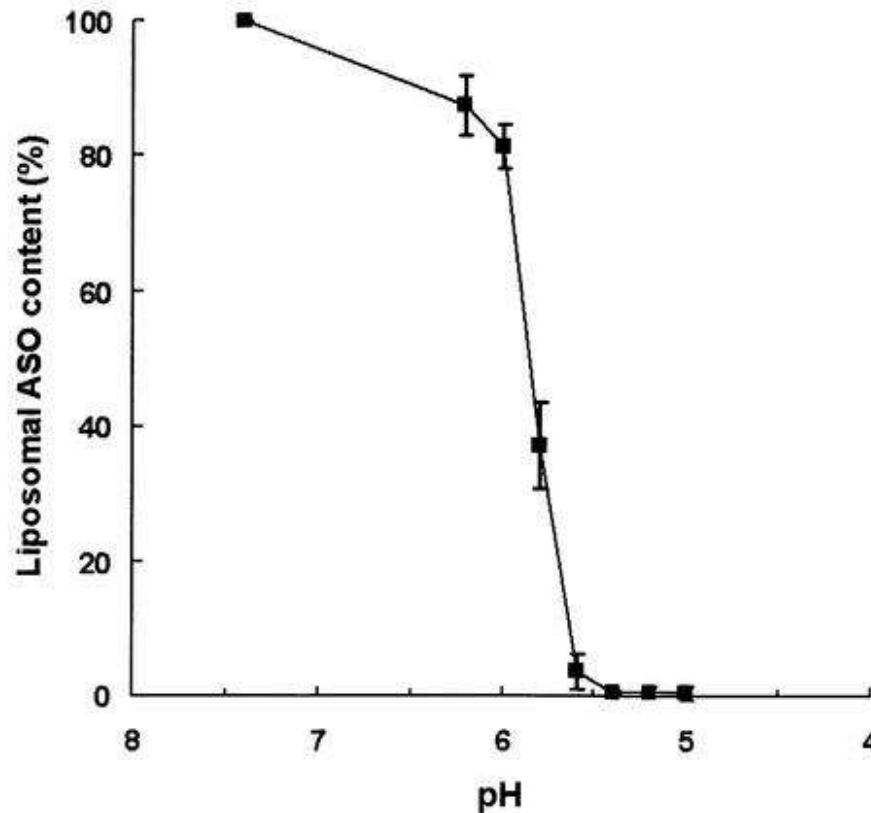
- Antikörper auf der Liposomenoberfläche
- spezifische Bindung an den Zellen mit entsprechenden Antikörperrezeptor
- die Bindung an den Rezeptor destabilisiert die Liposome;
- Entleeren des Wirkstoffes
- Ziel: Vermeiden die Lysosome





## ***pH-sensitive Liposomen***

- Leichtere Fusion bei pH 5-6,5 (z.B: in entzündeten Geweben);
- Entleeren des Gehaltes durch Endozytose;
- charakteristische Lipidkomponente: DOPE





## ***Thermosensitive Liposomen***

- $T_m$  ist ein wenig größer als die normale Körpertemperatur;
- Entleeren bei lokaler Hyperthermie
- z. B: DPPC/DSPC gemischtes LUV ( $d \sim 200$  nm)

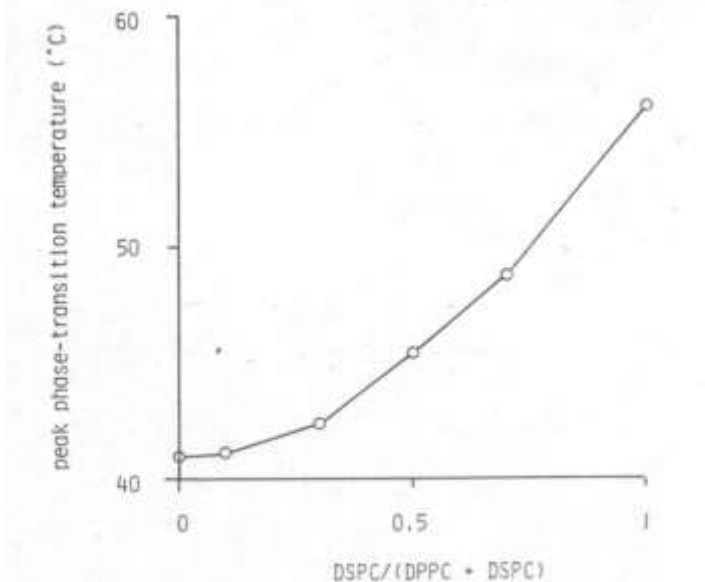


fig. 1. Peak phase-transition temperatures of DPPC/DSPC mixtures measured by differential scanning calorimetry.

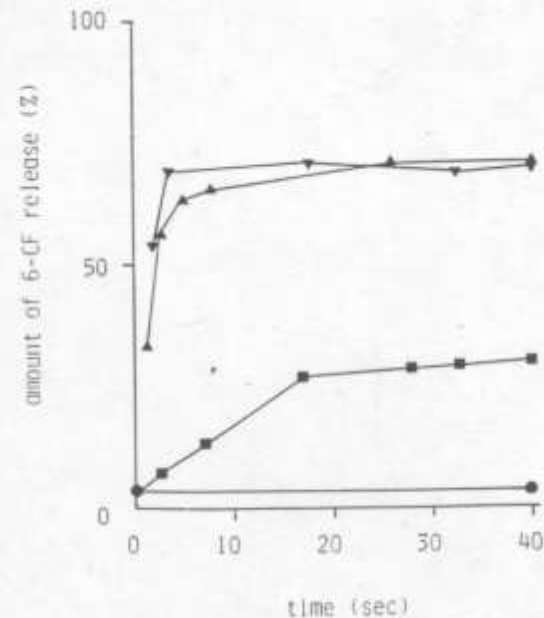


Fig. 4. Time-dependent 6-CF release from a 6-CF encapsulated thermosensitive LUV liposome (DPPC/DSPC = 9/1, w/w) when the liposome passed through a tube heated at different temperatures. The release rate was plotted against time for the liposome to pass through the heated tube. (●), 38°C; (■), 40°C; (▲), 41°C; (▼), 42°C.



# Thermosensitive Liposomen

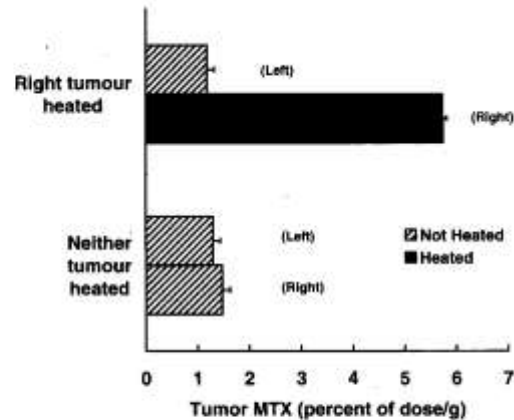


Figure 6. Incorporation of [ $^3\text{H}$ ]MTX in Lewis lung tumours of double-tumour (right and left leg) mice 4 h after tail-vein injection of liposome-encapsulated [ $^3\text{H}$ ]MTX. In the top experiment, only the right leg tumour was heated. In the bottom experiment, neither the right nor the left leg tumours were heated. (Modified with permission from Weinstein, J. N. *et al.*, 1979, Liposomes and local hyperthermia: selective delivery of methotrexate to heated tumors. *Science*, **204**, 188–191. Copyright 1979 American Association for the Advancement of Science.)

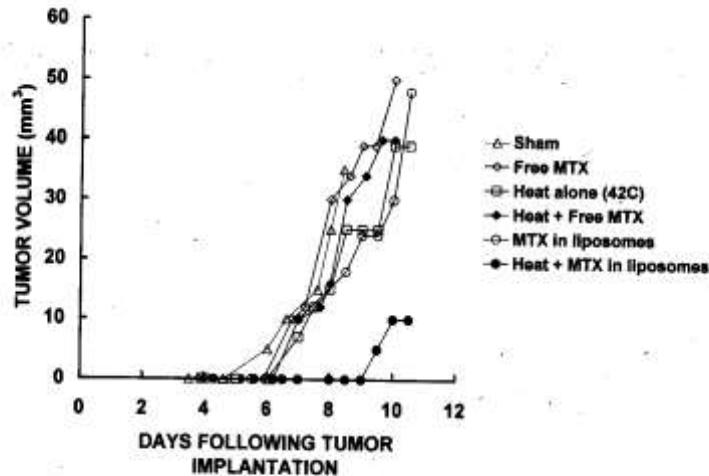


Figure 7. L1210 tumour growth in mouse feet after treatment with free or liposome-encapsulated MTX with or without heating to 42°C. Shams were given anaesthesia only. (Modified from Weinstein *et al.* 1980 with permission.)

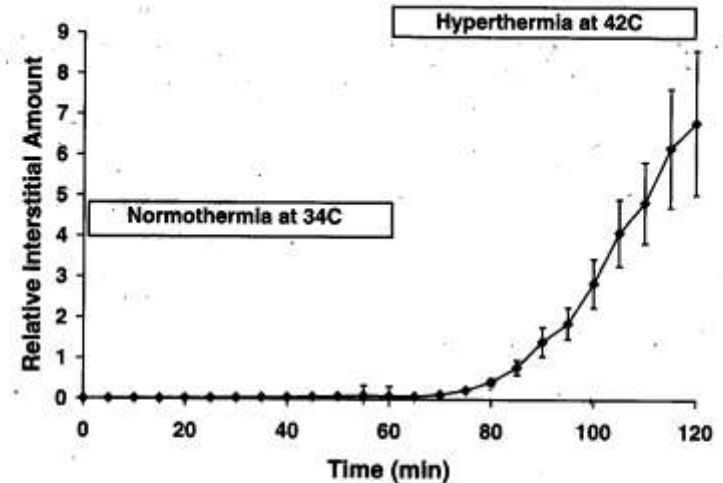
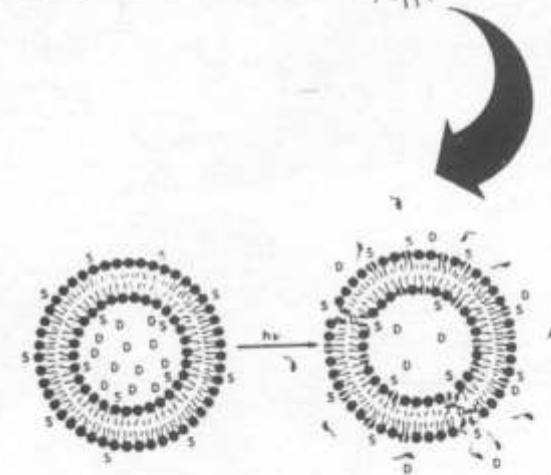
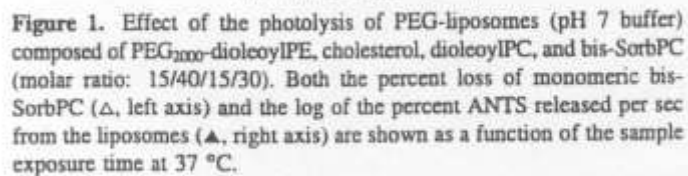


Figure 2. Extravasation of liposomes at 42°C in the tumour interstitium. The tumour was maintained at 34°C for 1 h and then heated at 42°C for another hour. Relative interstitial amount is the amount of liposomes in the tumour interstitium normalized to an initial vascular concentration of liposomes. (Modified from *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, **36**, M. H. Gaber, N. Z. Wu, K. Hong, K. H. Shi, M. W. Dewhirst, D. Papahadjopoulos, Thermosensitive liposomes: extravasation and release of contents in tumor microvascular networks, pp. 1177–1187, Copyright 1996, with permission from Elsevier Science).





- 
- The image displays two chemical structures. The top structure is labeled "bis-SorbPC" and features a central phospholipid backbone with two sorbitol headgroups and two long-chain fatty acid tails, each containing a double bond. The bottom structure is labeled "PEG<sub>2000</sub>DOPE" and shows a similar phospholipid backbone, but with one long-chain fatty acid tail and one shorter chain, and a PEG (polyethylene glycol) headgroup.



49. D.



## Magnetische Liposomen

- paramagnetische Substanzen sind in den Liposomen eingekapselt;
- externes magnetisches Feld wirkt um die Arzneimittel im erkrankten Gewebe anzureichern.

### Adriamycin

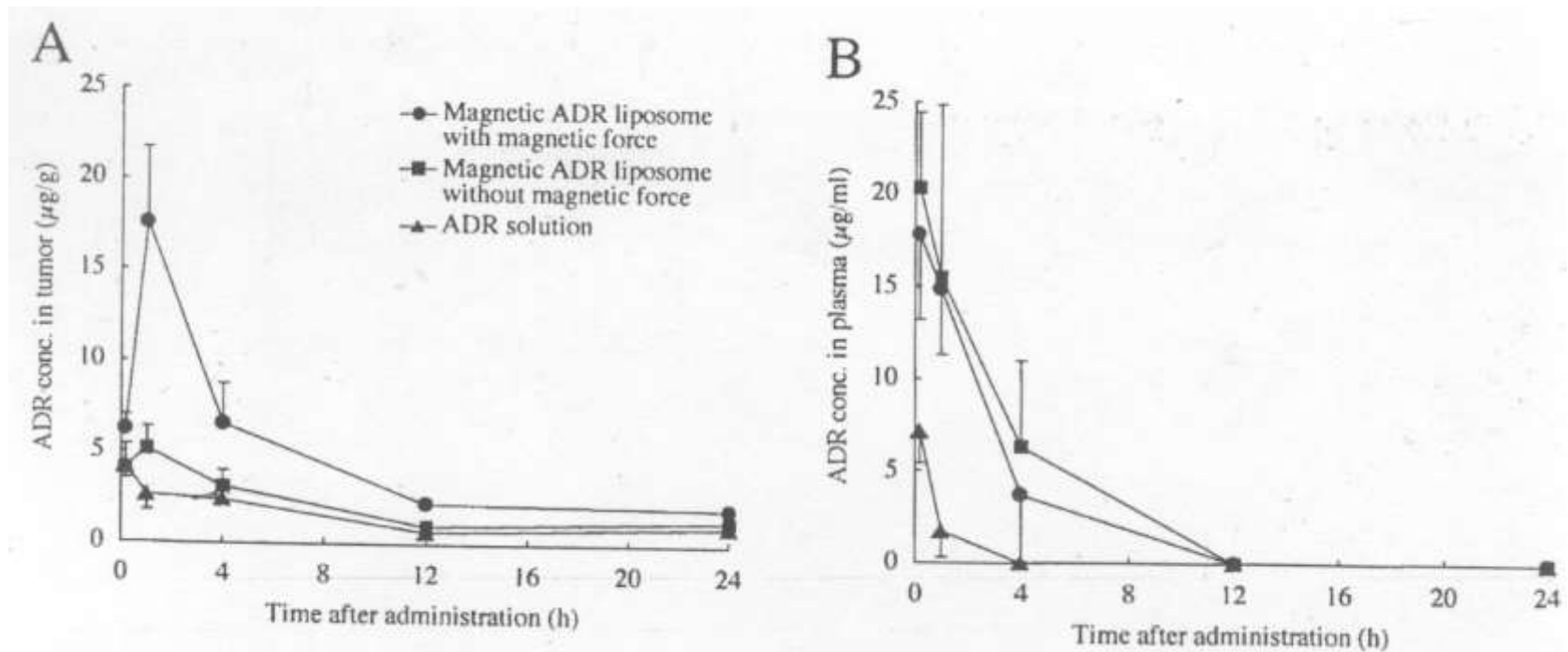


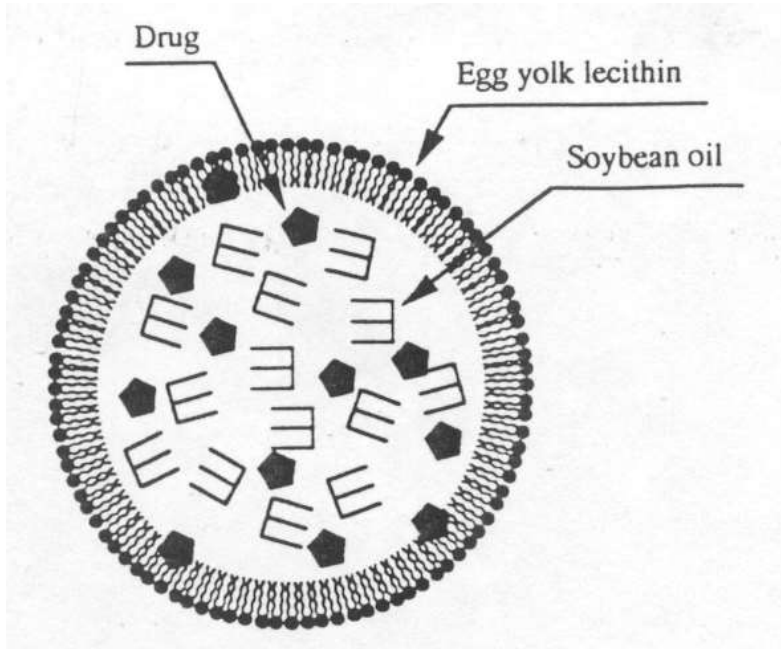
Figure 4. Time courses of ADR concentrations in A, tumor; B, plasma; C, liver; D, lung; E, heart; F, kidney following intravenous administration of ADR preparations via different administration modalities in osteosarcoma-bearing hamsters. Hamsters were studied 7 days after inoculation of osteosarcoma (tumor size was approximately 10 mm in diameter). The dose of ADR was fixed at 5 mg/kg body weight. One day prior to the animal study, a magnet with a magnetic field strength of 0.4 tesla was implanted in tumors in the magnetic ADR liposome group with magnetic force and in the ADR solution group. A non-magnetic neodymium alloy was also implanted in tumors in the magnetic ADR liposome group without magnetic force. Each value represents the mean  $\pm$  SD of 4 trials.





## Lipid-Mikrovesikel

- lipid Monolayer (d = 200 – 300 nm)
- Einlagerung von lipophil Molekülen;
- im Wasser und auch im Fett unlösbare Molekülen befinden sich in Lecithin-Schicht
- ist nicht geeignet für Transport von hydrophil Molekülen



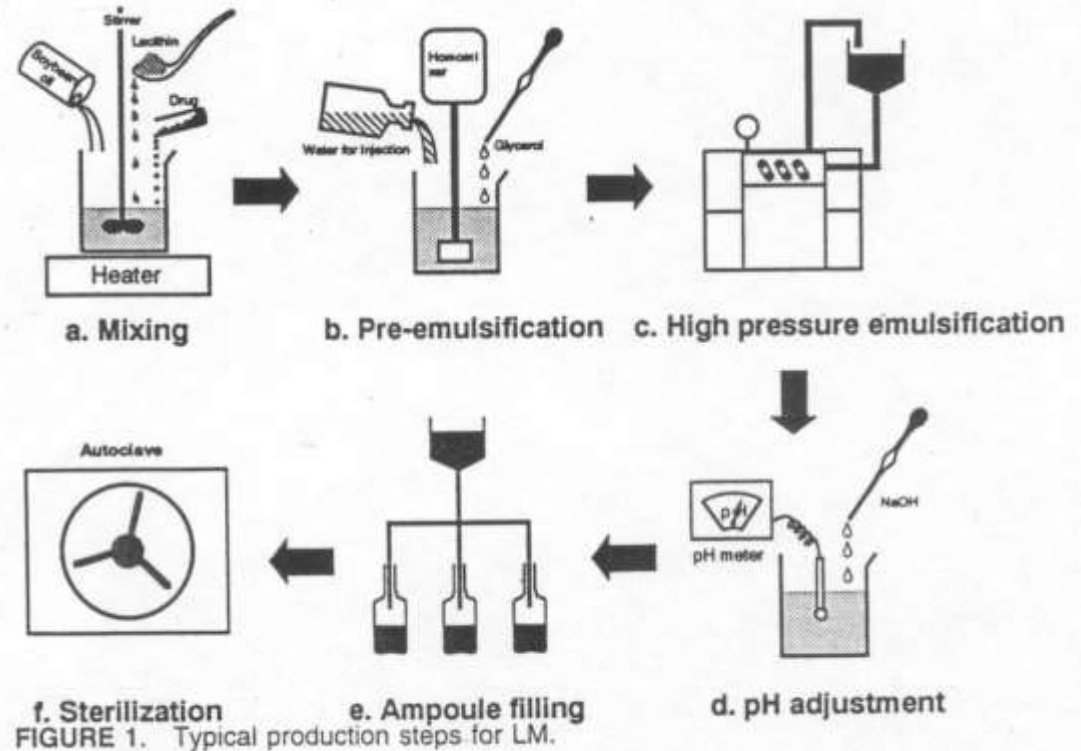
### Typical Components for LM

Soybean oil	50 ~ 200 mg
Egg yolk lecithin	12 ~ 18 mg
Glycerol	22 ~ 25 mg
Cosurfactant <sup>a</sup>	
NaOH	Adjusted to 5 ~ 7 of pH
Water for injection	Adjusted to 1 ml

<sup>a</sup> Fatty acid such as oleic acid.



# Lipid-Mikrovesikel



## Commercially Available LM for DDS

LM	Drug	Content	Company
Limethason	Dexamethasone palmitate	4.0 mg	Green Cross
Liple	Prostaglandin E <sub>1</sub>	10 µg	Green Cross
Palux	Prostaglandin E <sub>1</sub>	10 µg	Taisho
Lipfen	Flurbiprofen axetil	50 mg	Green Cross
Ropion	Flurbiprofen axetil	50 mg	Kaken



SEMMELWEIS UNIVERSITÄT  
Institut für Biophysik und Strahlenbiologie  
1094 Budapest, IX. Tűzoltó u. 37-47.

## Medizinische Anwendung von Modellmembranen - **Liposomen in der Spektroskopie**

Barnabás Böcskei-Antal  
2020

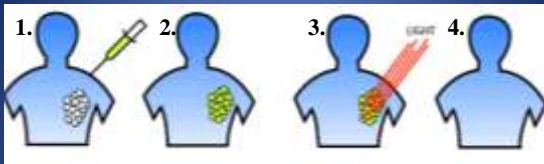
## Was für eine Rolle können die Liposomen spielen?

### Transport von Stoffe

- Wirkstoffträger
- Kontrastmittelträger

### Zellmembran Modelle

## **Photodynamische Therapie (PDT)**

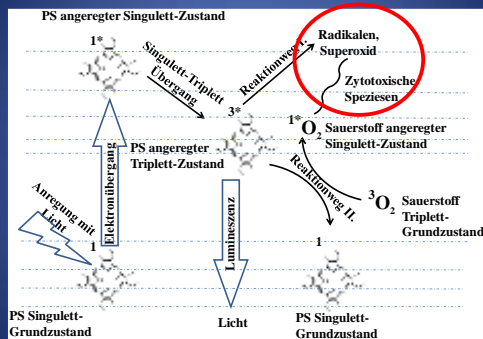


- 1. Photosensibilisator verabreichen
- 2. Anreicherung im Tumor/ in der Gewebeveränderung
- 3. Mit Licht geeigneter Wellenlänge bestrahlen
- 4. Photophysikalische Prozesse → Schädigung

## **Anwendungen von PDT**

- » Sterilization von Blutproben
- » Dermatologie: Psoriasis, Hyperkeratosen
- » Altersabhängigen Makuladegeneration (AMD)
- » Therapie von malignen Tumoren
- » Atherosclerotische Plaque

## Die Photodynamische Reaktion



## Die Effektivität der PDT

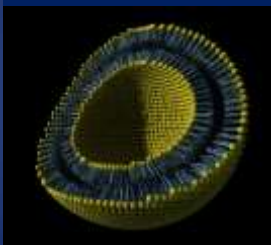
Die Assoziation der Photosensibilisatoren zu den Zellenmembranen spielt eine wichtige Rolle in den Photodynamischen Reaktionen. Bindung und Verteilung der Sensibilisatoren ist in der PDT wichtig.

### Ziel: Untersuchung

- I. der Position den Photosensibilisatoren in Lipiddoppelschicht
- II. der Bindung den Photosensibilisatoren zu den Membranen
- III. Messung der erzeugenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

## Die Modellmembranen

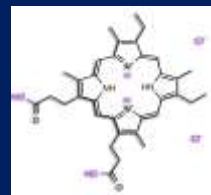
### Kleine Unilamellare Vesikel (SUV)



- Monokomponente SUV:
  - DMPC (14)
  - DPPC (16)
  - DSPC (18)
- Multikomponente SUV:
  - DPPC-DOPC (18)

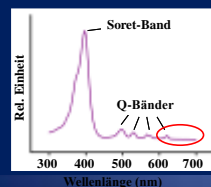
Liposomen sind durch Ultraschallung von PBS Lösung auf zuvor getrockneten Lipidfilmen hergestellt.

## Die Photosensibilisatoren



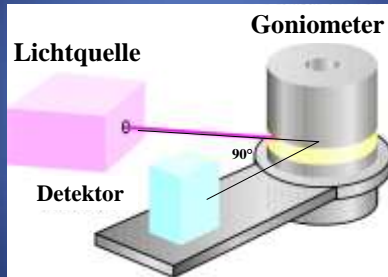
### Mesoporphyrine IX

- Dihidroklorid (MPCI)
- Dimetilester (MPE)
  - lipophiler als MPCI



Absorptionsspektrum der Porphyrinen

## Dynamische Lichtstreuung I. - Größenbestimmung



## Diffusion

Die charakteristische Größe der bewegenden Teilchen ist der **Diffusionskoeffizient** ( $D$ ).

Fick I.:

$$J_v = -D \cdot \frac{dc}{dx}$$

Bei kugelförmigen Teilchen → Einstein-Stokes Beziehung

$$D = \frac{kT}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

$k$  – Boltzmann-Konstante  
 $T$  – Temperatur  
 $\eta$  – Viskosität des Mediums  
 $r$  – Radius des Teilchens

## Dynamische Lichtstreuung II.

Die Messung von der Intensitätsfluktuation des gestreuten Lichtes.



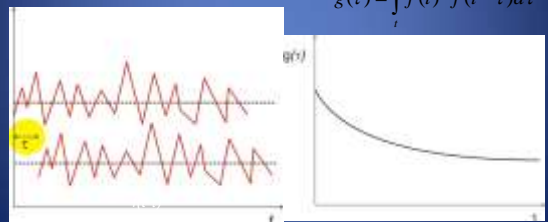
Die Ursache:  
 Die zufällige Bewegung der Teilchen, Diffusion.

## Die Autokorrelationsfunktion

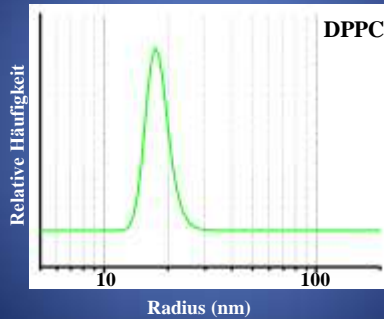
Die ursprüngliche Funktion wird mit  $\tau$  verschiebt.

$$g(\tau) = \sum_t f(t) \cdot f(t - \tau)$$

$$g(\tau) = \int_t f(t) \cdot f(t - \tau) d\tau$$



## Größenverteilung der Liposomen DLS



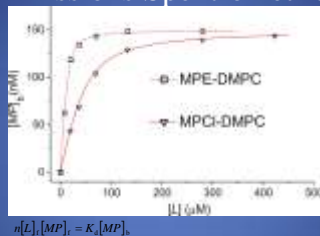
## Verwendete spektroskopische Methoden

Bindungsvermögen der Photosensibilisatoren →  
**Emissions Spektrometrie**

Orientation der Photosensibilisatoren →  
**FLN Spektroskopie**

ROS Detektion →  
**Absorptions Spektrometrie**

## Bindungskurven – Emissions Spektrometrie



$$n[L], [MP]_s = K_s [MP]_0$$

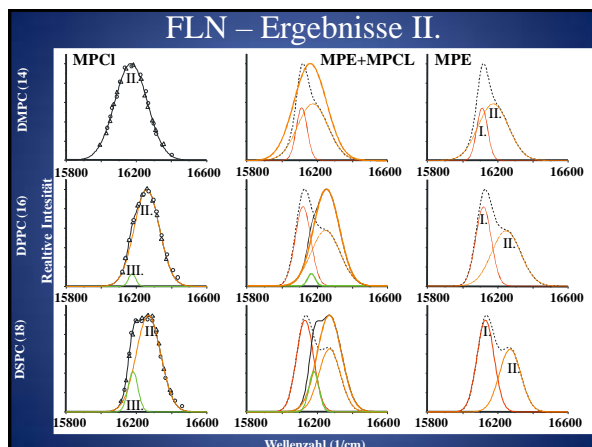
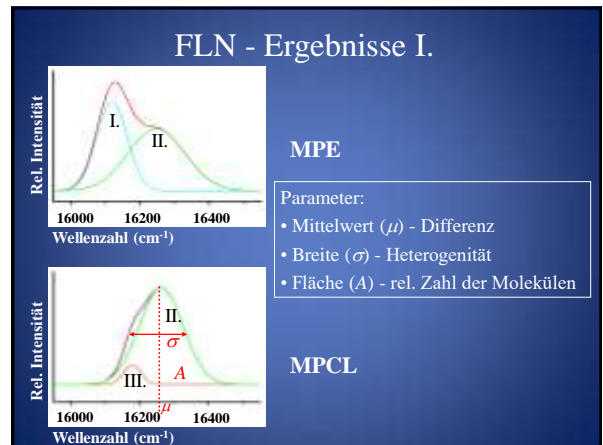
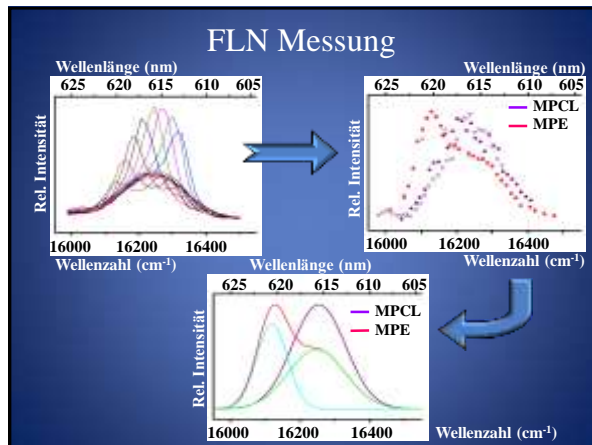
$$[MP]_s = \frac{1}{2} \{n[L] + [MP] + K_s - \sqrt{(n[L] + [MP] + K_s)^2 - 4n[L][MP]}\} \quad K_b = n/K_d$$

Bindungskonstante MPCl:  $1,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$       Bindungskonstante MPE:  $4,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$

## Fluorescence Line Narrowing Spektroskopie FLN

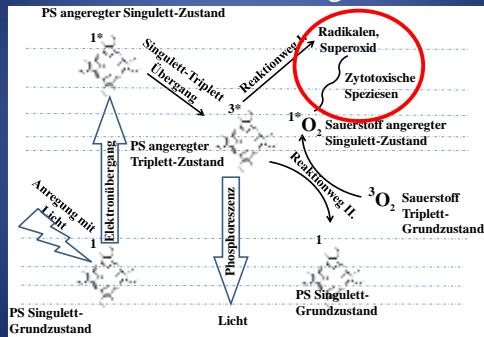
- Selektive Anregung
  - Gute Auflösung - Laserlicht
  - Niedrige Temperatur ~ 10 K
- Momentaufnahme von der Teilchenpopulationen



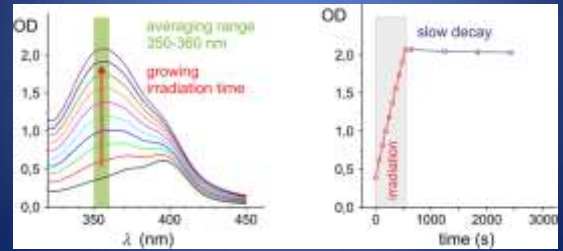




## Die Photodynamische Reaktion – als Erinnerung



## ROS in der wässrigen Umgebung



Danke die Aufmerksamkeit!

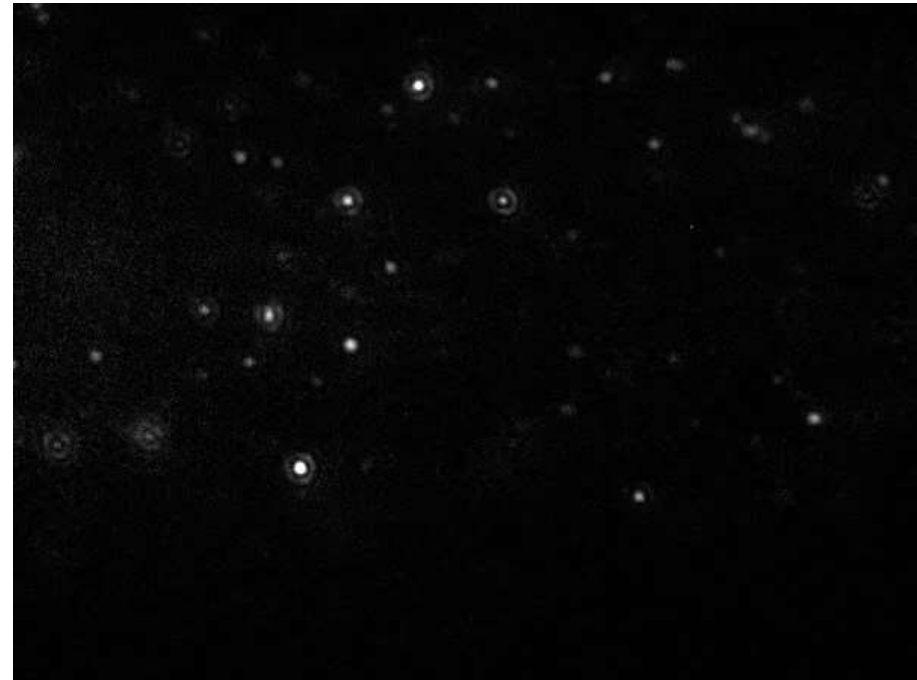
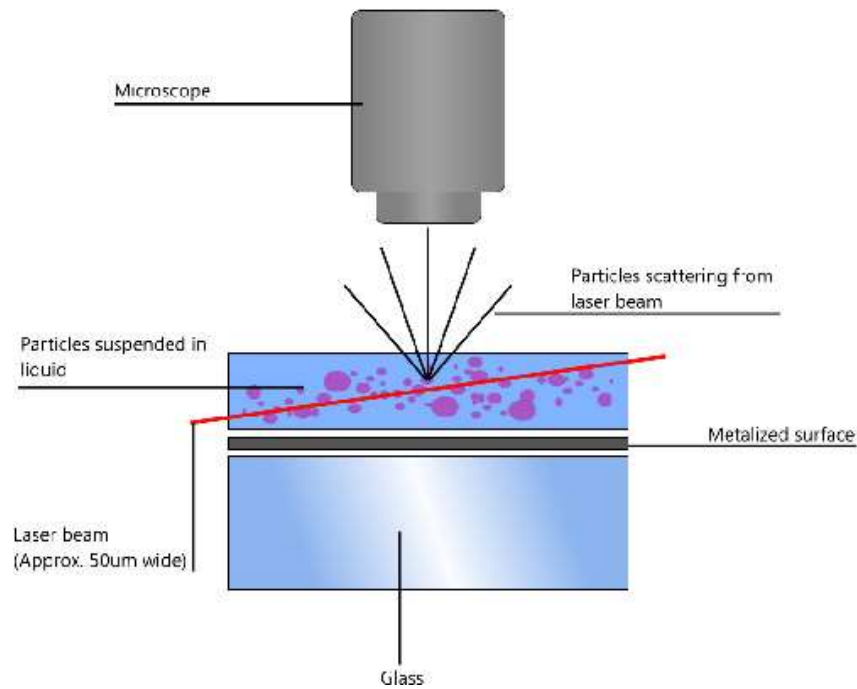




Fluidität des Membrans ist verfolgbar mit nano-Teilchen

(z.B. Goldkugelchen)

# Nanoparticle tracking analysis (NTA): Nanotelichenverfolgungsanalyse



Gold nano-kugeln werden unter dem Mikroskop gefolgt. Die sind zu Teilchen gebunden, die innerhalb des Lipidmembranes diffundiert. Die unterschiedliche Membranbereiche sind trennbar basierend auf die bekommene Diffusionskonstanten.

