

Gy. Dékány
I. Csóka
I. Erős

Adsorption of neutral polymers on negatively charged liposomes. A novel quantitative method to measure the rate of polymer adsorption on the liposomal surface

Received: 13 October 2000
Accepted: 8 March 2001

Gy. Dékány · I. Csóka · I. Erős (✉)
Department of Pharmaceutical
Technology, University of Szeged
6720 Szeged, Eötvös u. 6, Hungary
e-mail: eros@pharma.szote.u-szeged.hu

Abstract We studied the adsorption of two neutral polymers [poly(vinyl pyrrolidone) and poly(vinyl alcohol) (PVA)] on negatively charged liposomes composed of 25:2:3 (molar ratio) soy lecithin/dicetyl phosphate/cholesterol. The liposomes were prepared in buffered solution at pH 7.4 and were mixed with the solution of the polymers in the desired polymer/lipid ratios. Adsorption was measured by determination of the equilibrium bulk concentration of the polymer. Protamine hydrochloride was used to aggregate the liposomes with polymers adsorbed on their surface and to facilitate their separation from the equilibrium bulk

solution. In the case of PVA, quantitative adsorption measurements with a specific reagent were possible. Adsorption isotherms were recorded at 25 ± 0.2 °C. It was concluded that adsorbed and non-adsorbed PVA molecules are in equilibrium even at low polymer/lipide ratios. The results were confirmed by dynamic laser light scattering, X-ray diffraction and thermal activity monitoring experiments.

Key words Liposomes · Polymer adsorption · Microcalorimetry · Particle size determination · Adsorption layer structure

Introduction

Liposomes are ideal drug carriers in the field of drug delivery systems, and many previous studies have demonstrated the enhanced efficacy of encapsulated drugs and the reduction of the side effects of drugs so entrapped in this manner [1–6]. Conventional liposomes which are not specifically modified to provide them with a long circulating ability, however, are of limited use, since they tend to be trapped by the mononuclear phagocytosing system (MPS). Many attempts have been made to avoid the MPS trapping of liposomes and to achieve longer half-lives in the bloodstream by modification of the liposomal surface. Successful results have been obtained by the modification of liposomes with poly(ethylene glycol) (PEG) derivatives [6–14]. These molecules were covalently grafted onto the surface of the liposomes and provided higher stability and a prolonged duration of circulation time for the vesicles examined.

The PEG chains are believed to prevent or diminish the adsorption of opsonizing proteins which direct the liposomes to macrophages, as a result of their conformational flexibility and water-binding ability [13, 14]. Until recently only a few studies have dealt with other polymers physically adsorbed on the surface of liposomes.

Poly(vinyl alcohol) (PVA) and a PVA modified with a hydrophobic moiety (PVA-R) were examined as a coating material for liposomes to be loaded with an anticancer drug, doxorubicin [15, 16]. Besides experiments on animals (pharmacokinetic and distribution studies) the authors performed dynamic laser light scattering (DLS) measurements and determined the coating amounts of the polymers. It was shown that PVA-R binds to liposomes with higher affinity than PVA does.

The kinetic (long-term) stability of dimyristoyl phosphatidyl choline liposomes was examined by Grohmann



Fig. 1 Preparation of liposomes

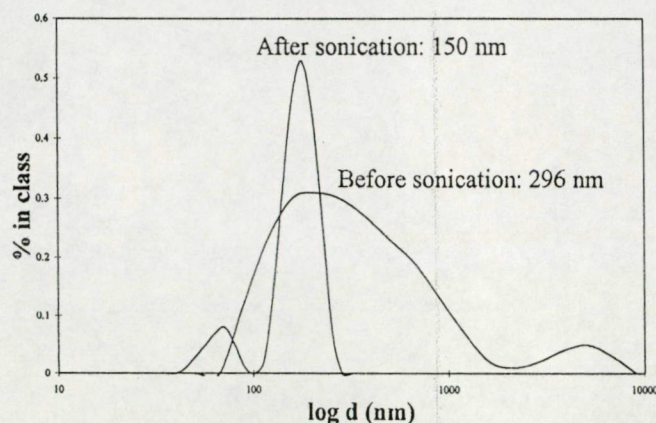
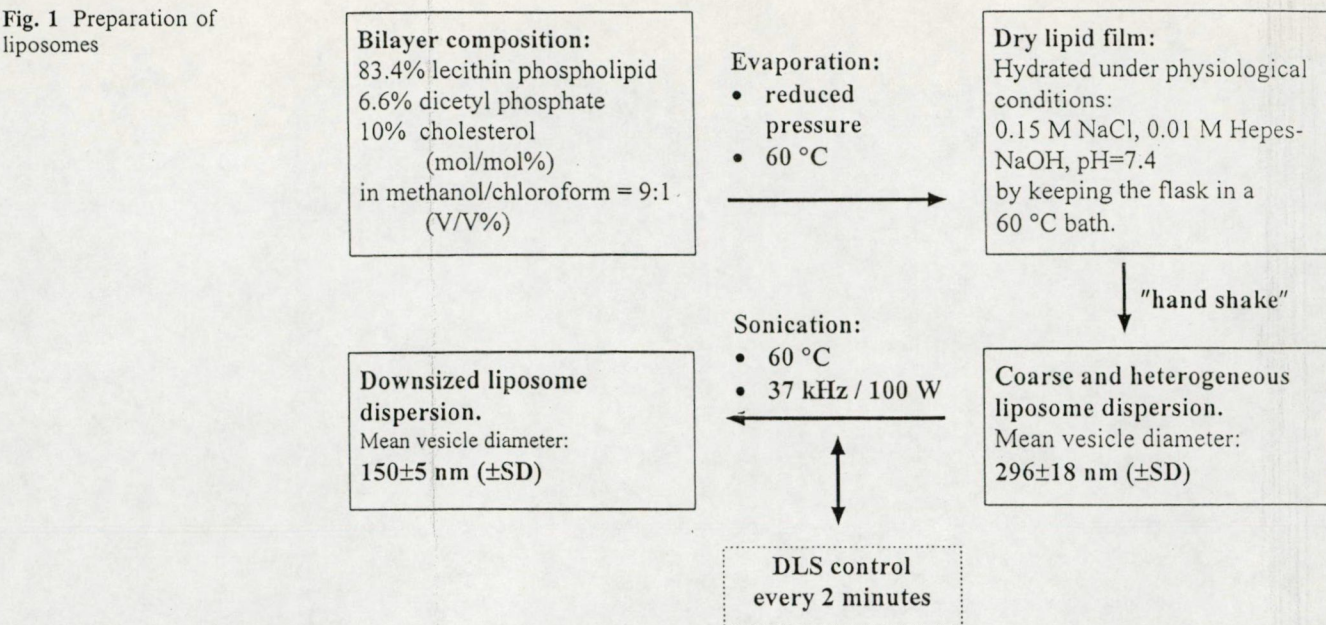


Fig. 2 Effect of treatment with a bath sonicator on the average vesicle size and the size distribution (by dynamic light scattering)

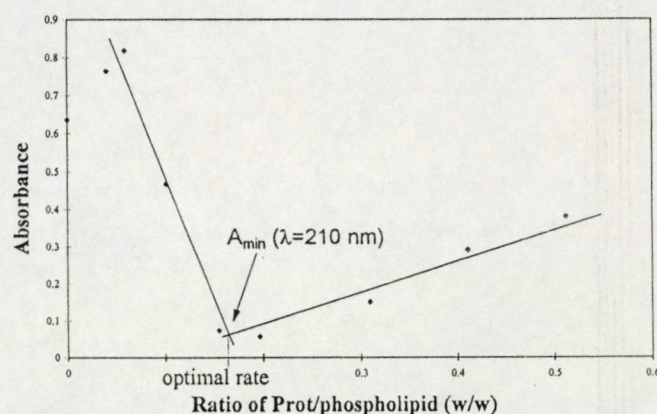


Fig. 3 Determination of the optimal protamine hydrochloride (*Prot*)/phospholipid ratio as the minimum of $A_{\min}$ in order to minimize the disturbing effect of nonprecipitated liposomes and *Prot* in the measurement of nonadsorbed poly(vinyl pyrrolidone) (*PVP*)

et al. [17], who incorporated PVA and poly(vinyl pyrrolidone) (*PVP*) derivatives into the bilayer membrane of the vesicles. These experiments were carried out at different pH values, and the enhancement of the average vesicle diameter was checked by DLS after certain time intervals for 3 months. It was concluded that the rate of the diameter increase can be significantly diminished by stabilizing the dispersions with *PVP* or *PVA* and its co-vinyl acetal, propional or butyral copolymers. In another approach differential scanning calorimetry was used to examine the polymer-liposome interactions [18].

Our primary aim was a detailed investigation of the interactions of *PVA* and *PVP* and the liposomal bilayer by DLS, X-ray diffraction (XRD) and thermal activity monitoring (TAM). We introduced a novel method,

protamine hydrochloride (*Prot*)-induced vesicle aggregation, for a quantitative evaluation of the adsorption process.

Experimental

Materials

Soy lecithin containing about 85% w/w phospholipids was produced by Lucas Mayer, Germany. Dicetyl phosphate and cholesterol were purchased from Sigma, St. Louis, Mo., USA. *PVP* K30, $M_r \approx 40,000$, and 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (*Hepes*) were products of Fluka Chemie, Switzerland. *Prot* was obtained from F. Hoffmann-La Roche, Switzerland. All other substances, *PVA*, $M_r \approx 72,000$, sodium

chloride, iodine, potassium iodide, hexadecylpyridinium chloride (HDPCl) and boric acid were purchased from Reanal, Budapest, Hungary, and were of analytical grade purity.

Methods

Preparation of liposomes

It was necessary to determine the exact phospholipid ratio in the soy lecithin used. This was performed according to the Rouser assay [19]. Liposomes consisting of 25:2:3 (molar ratio) soy lecithin phospholipid/dicetyl phosphate/cholesterol were prepared by the classic Bangham method [20] with some modifications (Fig. 1). The lipids were dissolved in a mixture of 9:1 (v/v) chloroform/methanol. A lipid film was prepared on the wall of a round-bottomed flask with a Rotadest 2118 vacuum evaporator. After the removal of all traces of organic solvent the film was hydrated with a buffer solution (pH 7.4) containing 0.15 M sodium chloride, 0.01 M HEPES and 0.005 M sodium hydroxide. The desired average vesicle diameter of 150 ± 5 nm was achieved by sonicating the dispersion with a Realsonic RS-16F ultrasonic bath. The process was checked by DLS every 2 min during this step (Fig. 2).

Different amounts of polymer were added to the dispersions of the liposomes at polymer/liposome ratios of 0.024–0.61 w/w. The liposome dispersions obtained in this way were mixed by vortexing them before they were incubated at 25 ± 0.5 °C for 2 h.

Determination of the amounts of polymer adsorbed

This step was carried out according to the Prot aggregation method described in Ref. [21]. Samples (200 μ l) were taken from each dispersion and an equal volume of Prot solution was added in order to aggregate the vesicles. These aggregated systems were diluted with the buffer solution in which the original liposomes were prepared before they were centrifuged at 2000g for 20 min.

In the case of PVA the amount of nonadsorbed polymer was determined from the supernatant with a specific reagent containing boric acid, potassium iodide and iodine [22] which forms a green compound with PVA. The optical density of this green colour was measured spectrophotometrically at 670 nm.

This measurement is more complicated in the case of PVP: in the absence of a specific chromophore-producing reagent we were forced to measure in the UV. In order to circumvent this problem we minimized the disturbing effect of unbound liposomes and Prot. We added increasing amounts of Prot to dispersions containing only liposomes and after centrifuging them we searched for the absorbance minimum at 210 nm. Figure 3 reveals the optimal ratio of Prot/phospholipid where PVP displays an absorbance maximum in 9:1 (v/v) ethanol:water. We added Prot in this Prot/phospholipid ratio to the liposome–PVP systems to be examined. This was followed by centrifugation, dilution of an aliquot of the supernatant with 96% ethanol and measurement of the concentration of nonadsorbed (equilibrium) PVP at 210 nm.

For the systems containing PVA these experiments were performed with another separation method employing a Beckmann TL 100 ultracentrifuge. In this case the vesicles were exposed to 100000g instead of Prot and centrifugation at 2000g.

We used a Kontron Uvikon 930 spectrophotometer for the measurements. The adsorption was expressed via the adsorption isotherms at 25 ± 0.2 °C by the following equation.

$$n_{\text{polymer}}^s = \frac{V}{100} \frac{c_0 - c_e}{m},$$

where n_{polymer}^s is the amount of polymer in milligrams adsorbed on 1 g liposome, c_0 is the initial concentration of polymer (milligrams per 100 cm³), c_e is the measured equilibrium concentration of polymer (milligrams per 100 cm³), V is the volume of sample (cubic

Table 1 The results of dynamic light scattering experiments for the particle diameter and the adsorbed layer thickness

Polymer/liposome (w/w)	0	0.0125	0.025	0.041	0.061	0.122	0.305	0.61
Average vesicle diameter $\pm$ standard deviation (nm)								
Poly(vinyl alcohol)	154.1 $\pm$ 0.85	164.3 $\pm$ 4.01	168.6 $\pm$ 0.90	172.7 $\pm$ 0.55	172.5 $\pm$ 2.56	170.7 $\pm$ 1.65	172.5 $\pm$ 0.66	177.7 $\pm$ 1.34
Poly(vinyl pyrrolidone)	150.1 $\pm$ 1.75	155.2 $\pm$ 1.96	151.9 $\pm$ 0.72	156.2 $\pm$ 1.89	155.0 $\pm$ 1.25	156.9 $\pm$ 0.70	157.6 $\pm$ 0.90	159.0 $\pm$ 1.53
Thickness of the layer adsorbed $\pm$ standard deviation (nm)								
Poly(vinyl alcohol)	0	10.2 $\pm$ 0.24	14.5 $\pm$ 0.08	18.6 $\pm$ 0.06	18.4 $\pm$ 0.27	16.6 $\pm$ 0.16	18.4 $\pm$ 0.07	23.6 $\pm$ 0.17
Poly(vinyl pyrrolidone)	0	5.1 $\pm$ 0.06	1.8 $\pm$ 0.01	6.1 $\pm$ 0.07	4.9 $\pm$ 0.04	6.8 $\pm$ 0.003	7.5 $\pm$ 0.04	8.9 $\pm$ 0.09

Table 2 Microcalorimetric data: total enthalpies, enthalpies of dilutions and adsorption enthalpies

Polymer/ liposome (w/w)	ΔH_{tot} (mJ)	ΔH_{dil} of liposomes (with buffer) (mJ)	ΔH_{dil} of poly (vinyl alcohol) (added to buffer) (mJ)	$\sum \Delta H_{\text{dil}}$ of poly(vinyl alcohol) and liposomes (mJ)	ΔH_{ads} (mJ)
0.04	2.16	4.88	0.56	5.44	-3.28
0.08	-0.78	3.43	-1.10	2.33	-3.11
0.12	-2.99	1.23	-2.77	-1.54	-1.45
0.16	-4.69	-1.94	-3.69	-5.63	0.95
0.20	-6.16	-4.43	-4.66	-9.09	2.93
0.24	-7.32	-5.90	-5.00	-10.90	3.58
0.28	-8.46	-7.70	-4.87	-12.57	4.11
0.32	-9.46	-9.45	-4.34	-13.79	4.33
0.36	-7.99	-9.73	-2.76	-12.49	4.50
0.40	-3.81	-4.70	-3.44	-8.14	4.33

centimetres) and m is the mass of the liposomes in the sample (grams).

DLS measurements

The DLS experiments were carried out with SEMA Tech SEM-633 equipment at a measuring angle of 90° for 100 s. The samples to be examined were diluted 15-fold with the buffer solution. The existence of adsorption was concluded on the basis of increasing average vesicle diameters (Table 1).

XRD studies

The aim of the XRD measurements was to detect the structural changes brought about by polymer adsorption in the liposome membrane. The samples were first dried in a heat box and then exposed to water vapour at 60°C for 12 h. They were measured in both dry and water-vapour-exposed conditions over angles from 1° to 8° (Philips PW1820 diffractometer Cu K α , 40 kV, 35 mA). The accuracy of the identity period (d_L) was ± 0.01 nm.

Determination of surface charge density

We used a Mutek PCD 02 particle charge detector (PCD). The original liposome dispersion and two diluted samples (3, 1.5 and 0.6% liposome, grams per 100 cm³) were titrated with 0.1 M HDPCl. The endpoint of this process was indicated by a PCD signal of 0 mV. HDPCl was used at the exact concentration and with a high grade of purity. This process was performed in the Teflon cell (10 ml) of the PCD instrument. The surface charge density is calculated by

$$Z = V_{\text{charge}}^0 c \text{HDP}^{+/m}$$

where Z is the surface charge density (milliequivalents per gram), V_{charge}^0 is the volume (cubic decimetres) of 0.1 M HDPCl at zero charge and m is the mass of the liposomes (grams).

Calorimetric measurements

The data were obtained with a thermometric thermal activity monitor (TAM Type 2277) titration microcalorimeter. A portion of the original liposome dispersion (0.333 cm³) was diluted to 2.00 cm³ with the buffer solution, and the total enthalpies (Table 2) were determined when 800 μl of 0.5% PVA was added in ten steps. The PVA/liposome ratio (weight/weight) was set from 0.04 to 0.4. The total duration of this measurement was 17 h (2 h for the baseline and 1.5 h for each step).

We also measured the dilution enthalpies of both liposomes and PVA under the same conditions as mentioned earlier. Measurements on PVP are not reported here because of the failure to achieve reproducibility of the small heat effects.

Results and discussion

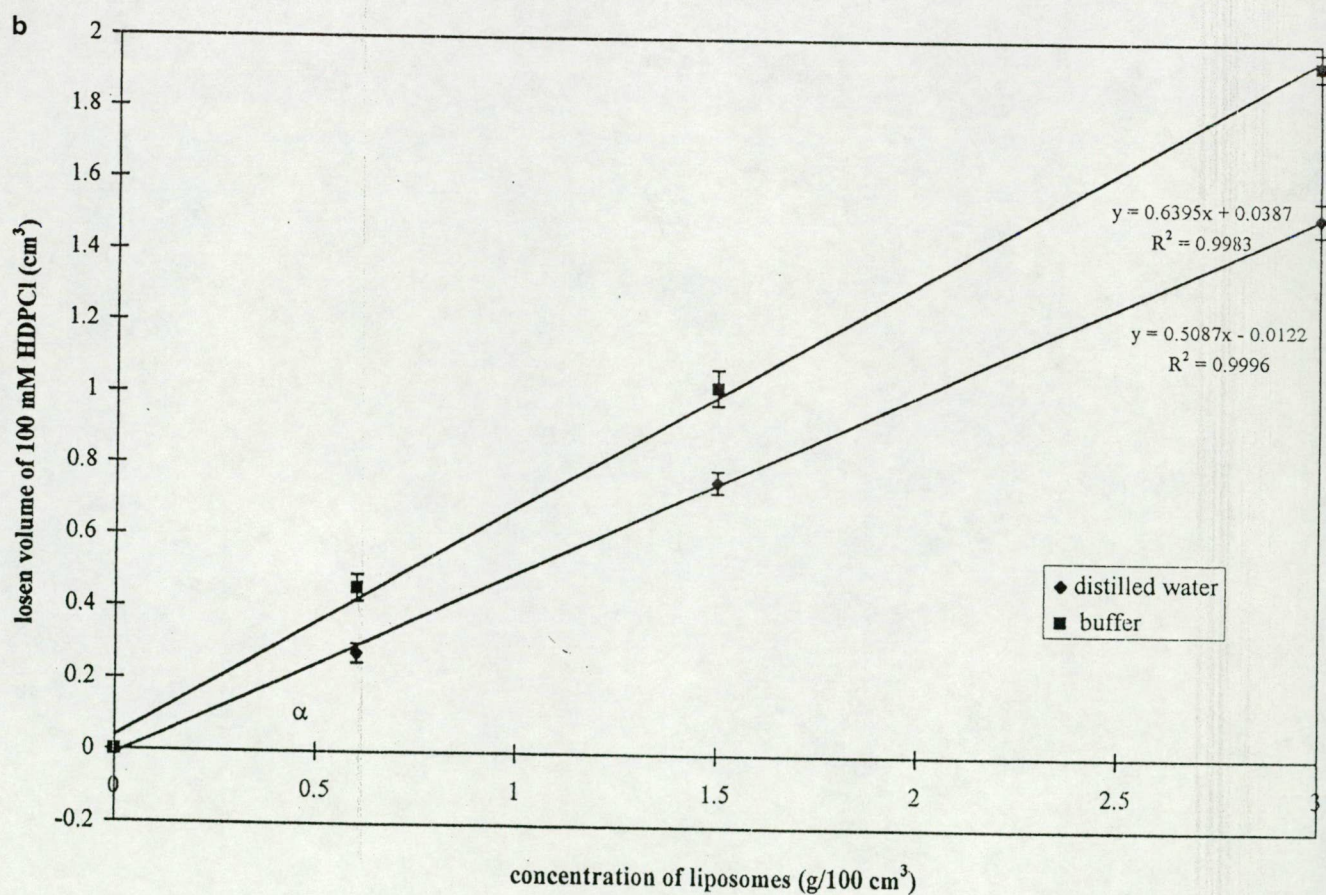
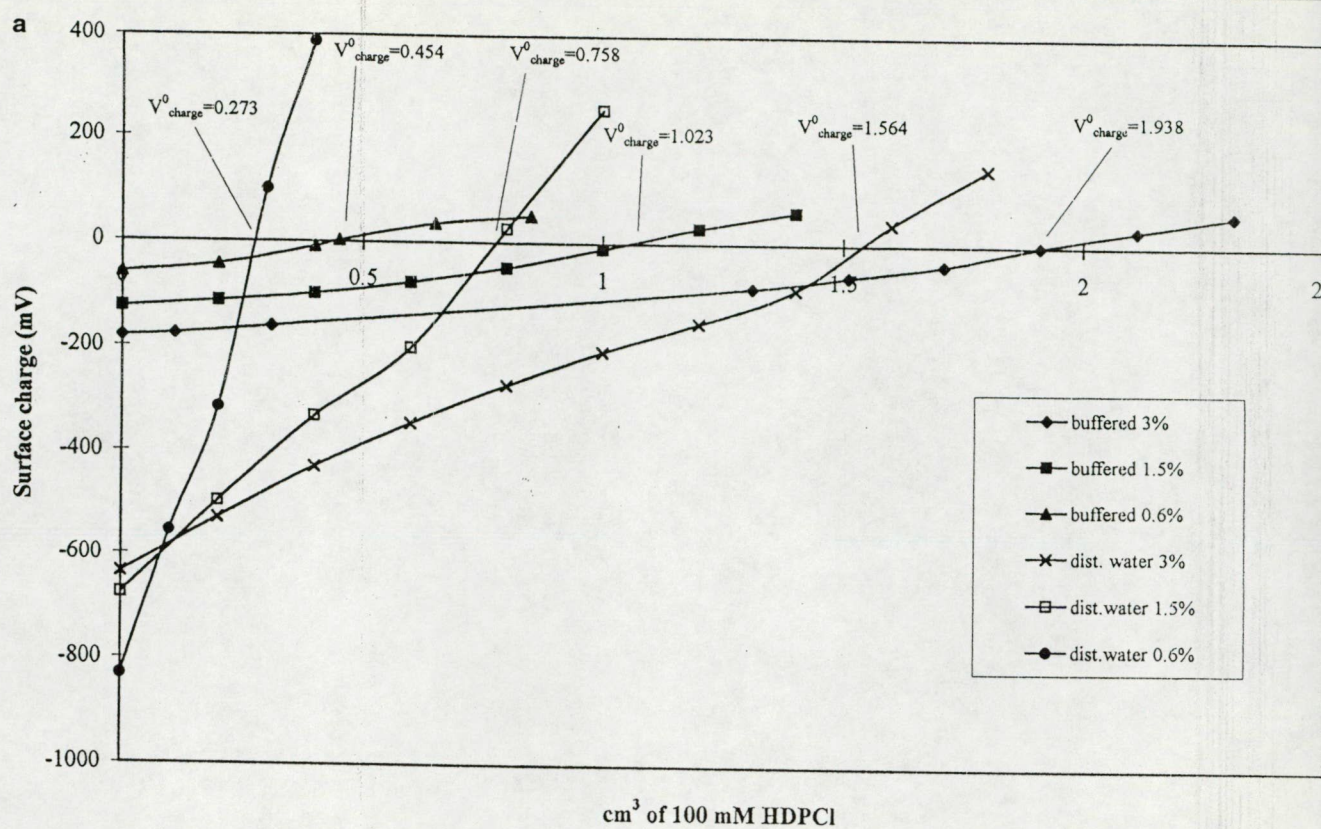
Preparation and size control

Downsized liposomes were used for our further experiments prepared according to the method shown in Fig. 1. The size distribution resulting from the DLS control revealed that the average liposome diameter decreased to 150 ± 5 nm. This relation shows that the sample treated by sonication is monodisperse, while the previous one is polydisperse containing large particles ($4.5\text{--}5.5 \mu\text{m}$) which are disaggregated by the bath sonicator (Fig. 2).

Determination of particle charge density

A simple and quick method to determine the surface charge of liposomes is as follows. Ionic polymers adsorb on oppositely charged surfaces with high affinity. In the case of negatively charged liposomes cationic polymers also adsorb well, but they cause aggregation of the dispersion by neutralizing the negative surface charges [23].

The principle of our method is that negatively charged liposomes are titrated with a cationic tenside (HDPCl) which neutralizes their surface charges. The surface charge of liposomes dispersed either in water or in buffer is negative (about 200 and 600 mV) and decreases on addition of HDPCl (Fig. 4a). A certain amount of HDPCl (V_{charge}^0) causes a zero streaming potential and further addition leads to liposomes with an opposite charge. As a consequence the stability of the liposome dispersion is lost, and the system coagulates. When such experiments were carried out on liposome dispersions,



V_{charge}^0 increased with the concentration. Plots of V_{charge}^0 against liposome concentrations are illustrated in Fig. 4b. From the slopes of the lines presented in this figure the surface charge density ($Z = \tan\alpha$) is obtained: 0.50 mEq/g for liposomes hydrated in water and 0.63 mEq/g in 0.01 M Hepes–NaOH buffer of pH 7.4.

Polymer adsorption

The absorbance values are shown as a function of the Prot/liposome (weight/weight) ratio in Fig. 4. From these data the optimal ratio (about 17% w/w) was chosen at which minimal absorbance (A_{min} 0.05) was obtained. This ratio provides the possibility to measure PVP at 210 nm.

Adsorption isotherms of the polymers are seen in Fig. 5. For PVA we compare two analytical methods. Measurement of PVA adsorption with ultracentrifugation or Prot aggregation as a separating method yielded very similar isotherms. PVA binds much better than PVP to liposomes because its hydroxyl groups bond by hydrogen bonds to the surface of the liposomes, which are rich in hydroxyl and oxo groups.

Although PVP also has a hydrogen-bonding oxo group in the pyrrolidone ring, the interaction with liposomes is weaker. The adsorption isotherm of PVP has already reached saturation at 50 mg/g.

DLS experiments

DLS measurements revealed that the adsorption of PVA and PVP enlarged the average vesicle diameter. The extent of this enlargement was 15–23 nm for PVA and 5–9 nm for PVP. Thus, the stronger adsorption of PVA can also be proved by the thickness of the adsorption layer. PVA has a higher molecular mass than PVP (72,000 relative to 40,000) and, therefore, PVA spreads more extensively and is in a well-hydrated condition in the adsorption layer. This causes the observed excellent stability for the liposome dispersions (Fig. 6, Table 1).

TAM measurements

The heat production/absorption during titration of liposomes with PVA is illustrated in Fig. 7. The first

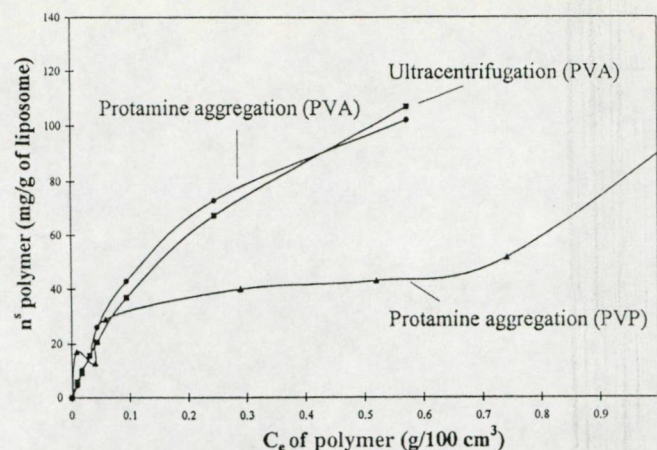


Fig. 5 Isotherms of adsorption of poly(vinyl alcohol) (PVA) and PVP on liposomes. Comparison of Prot aggregation and ultracentrifugation as separating methods in the determination of nonadsorbed PVA

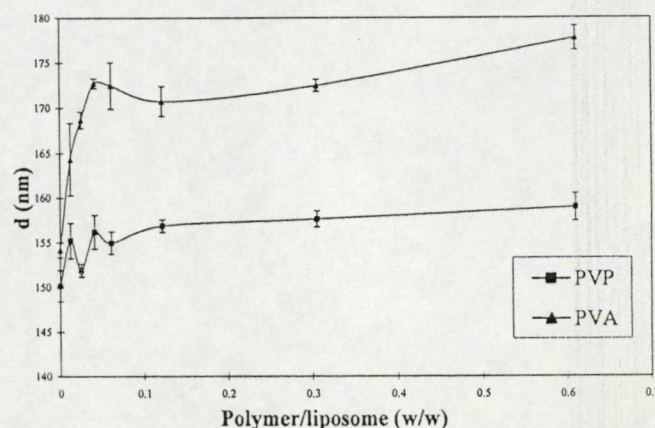


Fig. 6 Average vesicle diameter as a function of the polymer/liposome (weight/weight) (w/w) ratio (three parallel measurements)

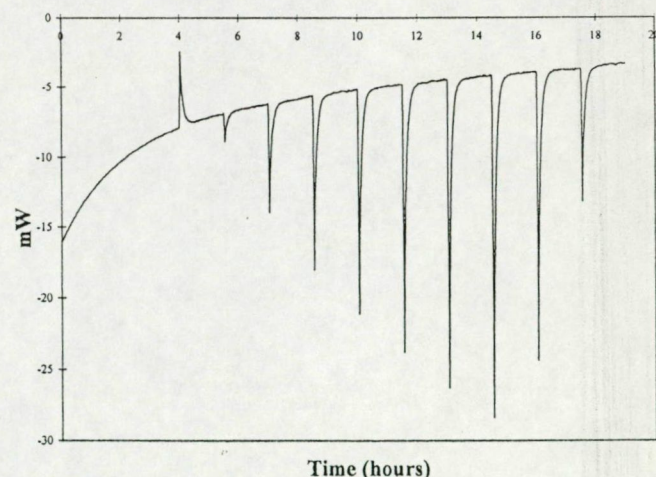


Fig. 7 Titration microcalorimetric enthalpogram of PVA/liposome 0.04–0.4 (w/w) systems from which the ΔH_{tot} values were calculated by integration of the areas under peaks

Fig. 4 a Titration of liposomes (3, 1.5, and 0.6 g liposome/100 cm³) with hexadecylpyridinium cations in buffer or in water. V_{charge}^0 was calculated from the intersection points. b Correlation between liposome concentration and the consumed volume of the titrating agent (100 mM hexadecylpyridinium chloride, HDPCI). The slopes of the regression lines ($\tan\alpha$) show the surface charge density in milliequivalents per gram (three parallel measurements)

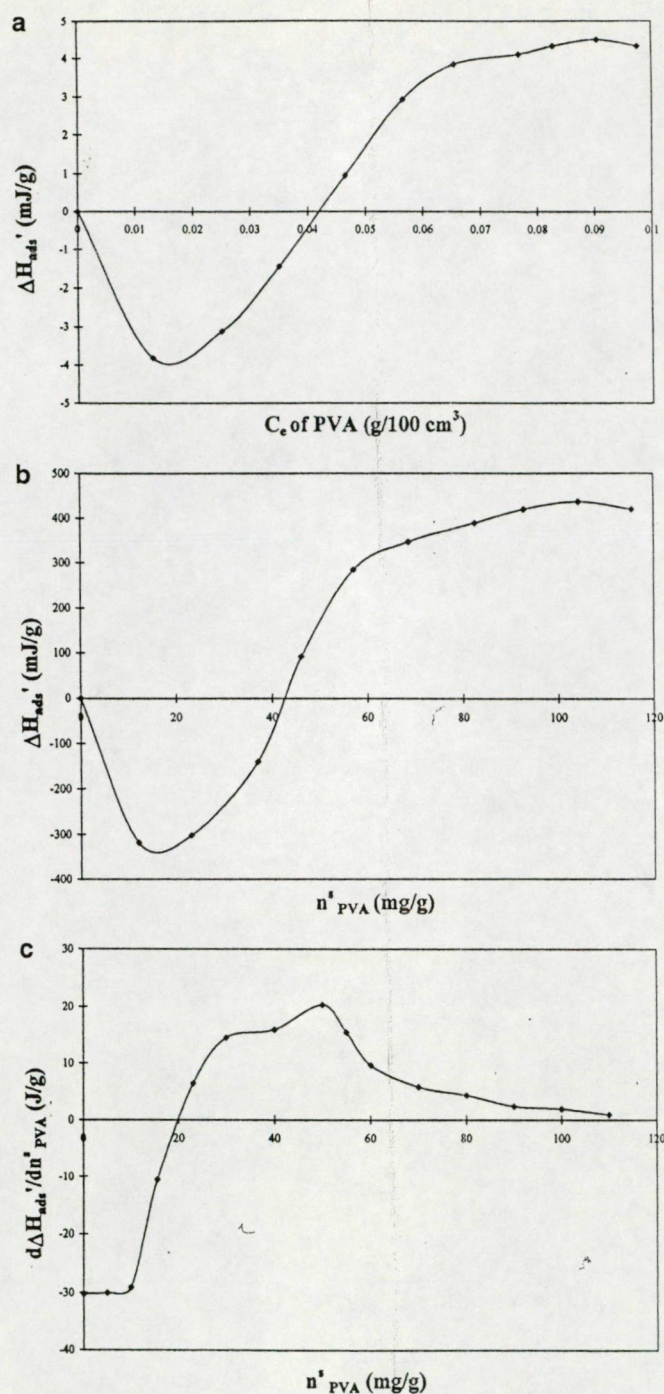


Fig. 8 a ΔH_{ads} shows exothermic interaction up to $c_e = 0.04$ g/100 cm³. The c_e values were calculated from the adsorption isotherm (Fig. 5, Prot aggregated system). b ΔH_{ads} per gram of liposome as a function of the amount of PVA adsorbed per gram of liposome (n^*_{PVA}). c Derived form of Fig. 8b. Calculation of the amount of energy liberated by the adsorption of 1 g PVA

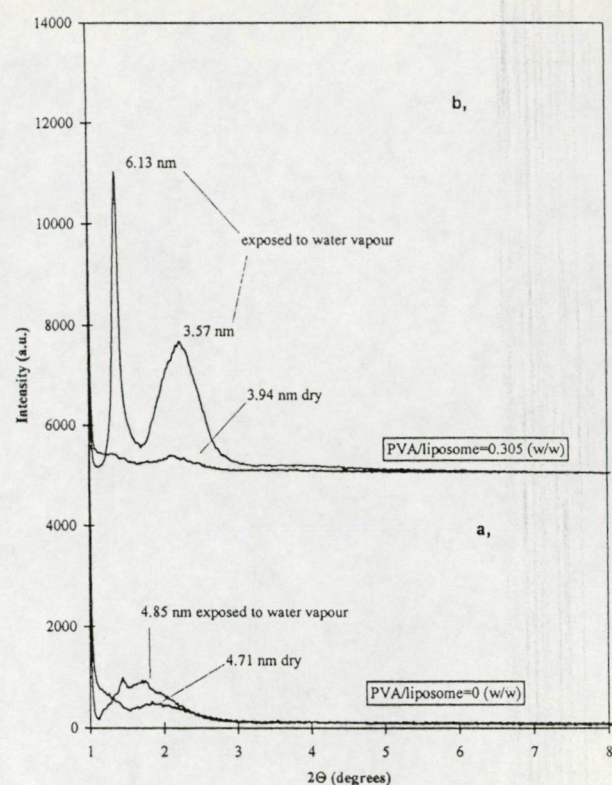


Fig. 9 X-ray diffraction (XRD) diffractograms of PVA-liposomes

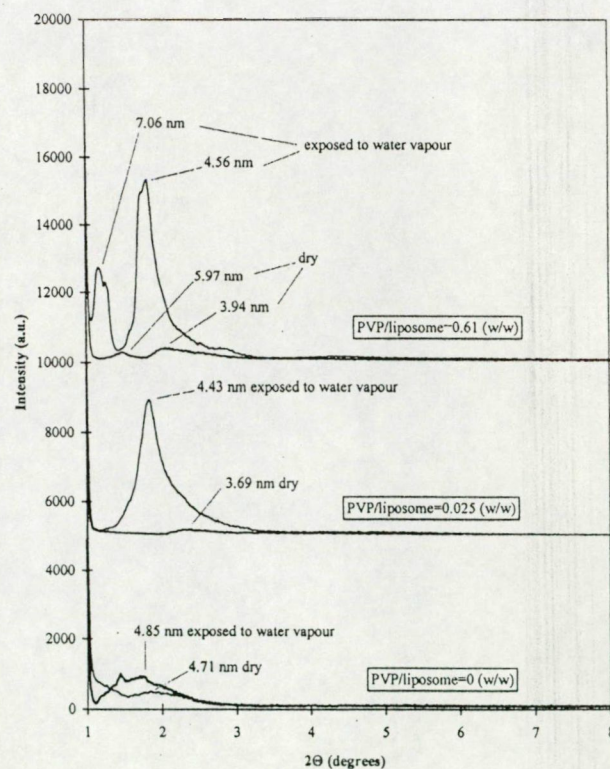
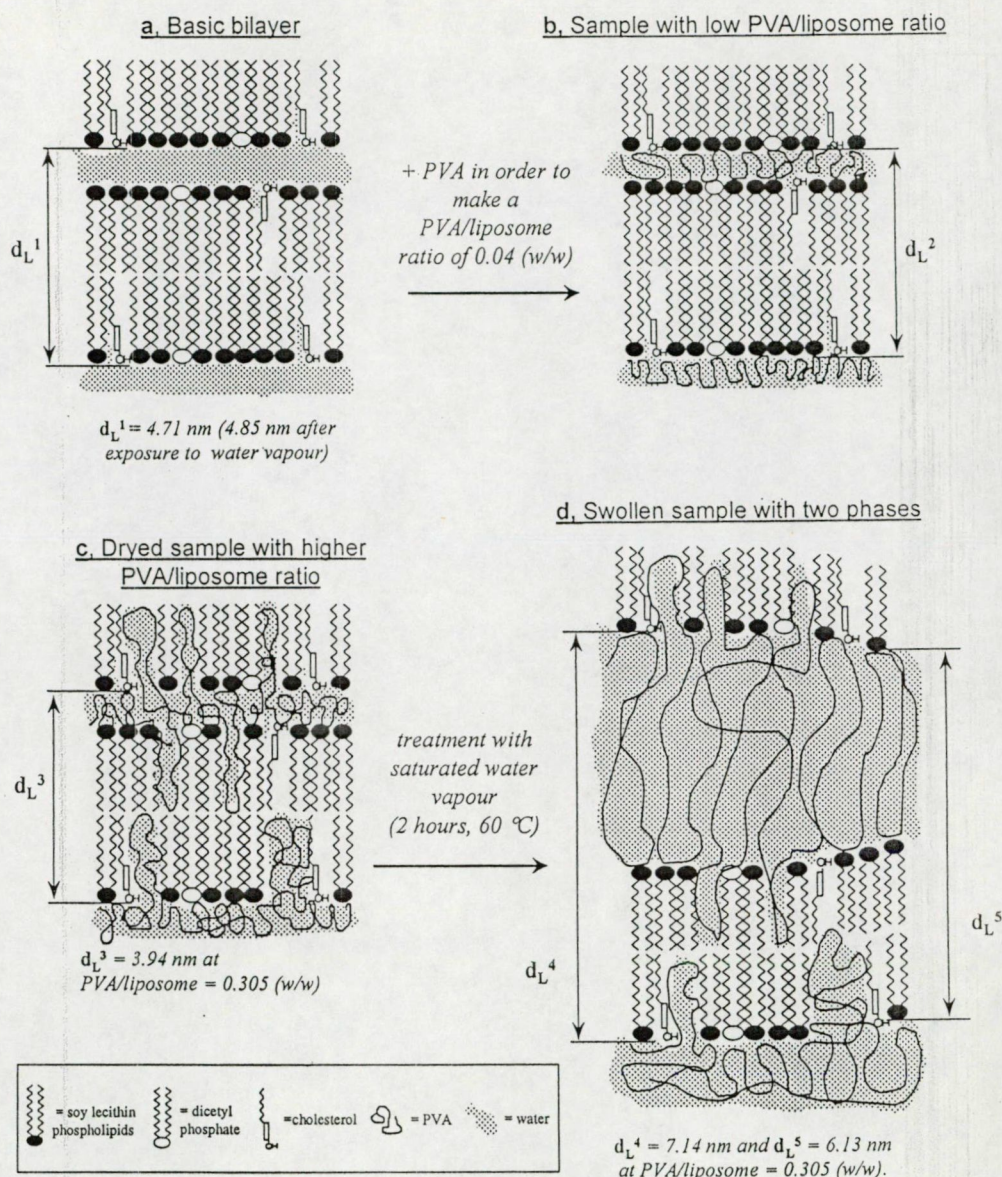


Fig. 10 XRD diffractograms of PVP-liposomes

Fig. 11a-d Schematic figure of PVA-liposome. a Without PVA and with b a small and c a high amount of PVA. d The sample in c after swelling in water vapour



peak reflects an exothermic process and the others represent endothermic effects. The enthalpy values required to obtain the adsorption enthalpy are listed in Table 2. This enthalpy is obtained from the relation

$$\Delta H_{\text{ads}} = \Delta H_{\text{tot}} - (\Delta H_{\text{dil}}(\text{PVA}) + \Delta H_{\text{dil}}(\text{liposomes})) ,$$

where ΔH_{ads} is the adsorption enthalpy and ΔH_{tot} is the total enthalpy and ΔH_{dil} is the dilution enthalpy of the components (PVA and liposomes).

The adsorption enthalpy is plotted against the equilibrium concentration of PVA (Fig. 8a). The interaction is exothermic up to a PVA concentration of 0.04 g/100 cm³ but is endothermic at higher concentration. An analogous representation may be seen in Fig. 8b, where the adsorption enthalpy is related to 1 g liposome

($\Delta H_{\text{ads}}'$) as a function of the amount of PVA adsorbed. This relation shows that in the initial stage of the isotherm, up to an amount of 40 mg/g adsorbed, exothermic effects are recorded. The differential adsorption enthalpy in Fig. 8c shows the adsorption enthalpy related to the unit mass of PVA.

These data clearly demonstrate a strong exothermic interaction between the liposome membranes and the segments of the PVA molecules in the initial state of the adsorption. The interaction may primarily involve hydrogen bonding (see later). At higher PVA concentrations endothermic interactions occur, which indicates that the polymer is incorporated between the alkyl chains of the bilayer. This process decreases in the structural order of the bilayers, the disorientation

of the alkyl chains being controlled by entropy. It must also be considered that there are cholesterol and dicetyl phosphate molecules between the lecithin phospholipids and the hydroxyl groups of cholesterol might favour the penetration of PVA chains into the lipid layer.

XRD results

The changes in the liposomal bilayer can also be detected by small-angle scattering (Figs. 9, 10). In the PVA-liposome systems a lamellar distance (d_L) of 4.71 nm was found. After storage in saturated water vapour a small degree of swelling was observed with $d_L = 4.85$ nm. These distances are almost the same as those reported in Refs. [24, 25], where d_L was reported to be 4.80 nm for dipalmitoyl phosphatidyl choline bilayers in the gel (L_β) phase. The layer thickness was related to the structure of the hydrated lipid membrane (Figs. 9, spectra a, 11a). At a ratio of 0.305 PVA/liposome d_L in the dry condition was 3.94 nm (Fig. 9, spectra b). This reveals that the adsorbed PVA compresses the bilayer by connecting molecules in the membrane (Fig. 11c). When this sample was exposed to water vapour, two peaks appeared at $d_L = 6.13$ nm and 3.57 nm, which are probably the (001) and (002) reflections of a highly expanded bilayer with a spacing of about 7 nm (Fig. 11d). The nonintegrality (d_{001} is not equal to $2d_{002}$) indicates a certain interstratification of somewhat differently expanded interlayer spaces, i.e. the distances from interlayer to interlayer of the expanded phase are not exactly the same. The XRD records of PVP-liposomes reveal essentially the same effects. In dry conditions PVP compresses the bilayer, while saturated water vapour expands the membrane to $d_L = 4.43$ nm. This expansion is maintained after further addition of PVP but another peak appears at

7.06 nm which is characteristic of completely expanded bilayers.

A comparison of the XRD results for the two neutral polymers with liposomes suggests that, as already proved in connection with adsorption isotherms, PVP binds more weakly on the surface of the bilayer membrane than PVA at PVP/liposome (weight/weight) ratios of 0.025 and 0.61. The expanded structure shows $d_L = 4.43$ nm and 4.56 nm. The amount of the highly expanded phase with $d_L = 7.06$ nm seems to be distinctly smaller than for PVA.

Conclusions

The interaction of neutral polymers (PVA and PVP) with the liposomal bilayer were examined. PVA is adsorbed by liposomes more strongly than PVP as a consequence of stronger hydrogen bonds. These interactions were detected by several measuring techniques. DLS demonstrated that the diameter of the liposomes was higher after stabilization with PVA; thus, the adsorption layer is thicker (10.2–23.6 nm) than in the case of PVP (5.1–8.9 nm). Microcalorimetric titration measurements revealed exothermic interactions in the initial stages of the adsorption of PVA. XRD examination of films of liposomal bilayers revealed swelling by water vapour and the influence of stabilizing polymers on the membrane structure. The results indicate that PVA binding is stronger because it allows a lower extent of expansion for the bilayer by water vapour.

Acknowledgements The authors wish to thank the staff of the Department of Colloid Chemistry, University of Szeged, and the Institute of Biochemistry, Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged, for the use of different devices and for helpful discussions. This work was supported by the Hungarian National Research Fund (OTKA) (project number: T026579).

References

1. Canto GS, Dalmora SL, Oliveria AG (1999) *Drug Dev Ind Pharm* 25:1235–1239
2. Koppenhagen FJ, Visser AJWG, Heron JN, Storm G, Crommelin DJA (1998) *J Pharm Sci* 87:707–714
3. Wasan EK, Fairchild A, Bally MB (1998) *J Pharm Sci* 87:9–14
4. Tokudome Y, Oku N, Doi K, Namba Y, Okada S (1996) *Biochim Biophys Acta* 1279:70–74
5. Gregoriadis G, Allison AC (eds) (1980) *Liposomes in biological systems*. Wiley, New York, pp 87–100
6. Storm G, Crommelin DJA (1996) *Pharm Sci Technol Today* 1:19–31
7. Jørgensen K, Vermehren C, Mouritsen OG (1999) *Pharm Res* 16:1491–1493
8. Leiseur S, Beugin-Deroo S, Ollivon M (1998) *J Colloid Interface Sci* 202:324–333
9. Lasic DD (1994) *Angew Chem* 106:1765–1779
10. Fendler JH (1985) *Isr J Chem* 25:3–10
11. Jones MN (1996) *Curr Opin Colloid Interface Sci* 1:91–100
12. Mercadal M, Domingo JC, Petriz J, Garcia J, de Madariaga MA (1999) *Biochim Biophys Acta* 1418:232–238
13. Woodle MC, Lasic DD (1992) *Biochim Biophys Acta* 1113:171–199
14. Torchilin VP, Papisov MI (1994) *J Liposome Res* 4:725–739
15. Takeuchi H, Kojima H, Toyoda T, Yamamoto H, Hino T, Kawashima Y (1999) *Eur J Pharm Biopharm* 48:123–129
16. Takeuchi H, Kojima H, Toyoda T, Yamamoto H, Hino T, Kawashima Y (1996) *Pharm Res* 13:896–901
17. Grohmann FL, Csémpesz F, Szögyi M (1998) *Colloid Poly Sci* 276:66–71
18. Grohmann FL, Szögyi M, Csémpesz F (1997) *Acta Pharm Hung* 67:267–72
19. Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A (1970) *Lipids* 5:494–496
20. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC (1965) *J Mol Biol* 13:238

-
21. New RRC (ed) (1990) *Liposomes: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, pp 127–128
 22. Pritchard JG (ed) (1970) *Poly(vinyl alcohol) basic properties and uses*. Polymer monographs, vol 4. Gordon and Breach, London, p 7
 23. Yaroslavov AA, Koulikov VY, Yaroslavova EG, Ignatiev MO, Kabanov VA (1998) *Langmuir* 14:5999–6004
 24. Fennel Evans D, Wennerström H (eds) (1994) *The colloidal domain where physics, chemistry, biology, and technology meet*. VCH, New York, pp 315–324
 25. Nagle JF, Zhang R, Tristram-Nagle S, Sun W, Petrache HI, Suter RM (1996) *J Biophys* 70:1419–1431

Interaction Between Liposomes and Neutral Polymers: Effect of Adsorption on Drug Release

György Dékány,* Ildikó Csóka, and István Erös

Department of Pharmaceutical Technology, University of Szeged,
H-6720 Szeged, Eötvös u. 6., Hungary

ABSTRACT

The processes of adsorption of two neutral polymers (poly(vinyl pyrrolidone), PVP and poly(vinyl alcohol), PVA) were investigated on liposomes composed of soy lecithin/dicetyl phosphate/cholesterol = 25:2:3 (molar ratio). The liposomes were prepared in buffered solution at pH = 7.4 and mixed with the solution of the measured polymers in the desired polymer/lipid (w/w) ratios. Adsorption was measured by determination of the equilibrium bulk concentration of the polymer. In the case of PVA quantitative adsorption measurements with a specific reagent were possible. Adsorption isotherms were recorded at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. It was concluded that adsorbed and unadsorbed PVA molecules are in equilibrium even at low polymer/lipid ratios. The results were confirmed by dynamic laser light scattering (DLS), and thermal activity monitoring (TAM) experiments. Another group of the liposomes was prepared in 60 mM ammonium sulphate (pH = 5.0) and we filled the vesicles with a test dye, acridine orange (AO) using the pH-gradient (remote loading) method. The AO release property of liposomes was tested with a special vertical diffusion cell after we had made PVA adsorb on their surface in different PVA/lipid (w/w) ratios.

Key Words: Liposomes; Drug delivery; Poly(vinyl pyrrolidone); Poly(vinyl alcohol); Polymer adsorption

*Corresponding author. Fax: 36-62-544-02; E-mail: i.dekany@chem.u-Szeged.hu

INTRODUCTION

Considerable efforts have been made in pharmaceutical research to develop new drug delivery systems that enhance the efficacy and safety of existing drugs and that underlie optimized drug therapy. Liposomes find perhaps the most extensive use as drug carriers, and many previous studies have demonstrated the enhanced efficacy of encapsulated drugs and the reduction of the side-effects of drugs so entrapped in this manner (1-6). Conventional liposomes which are not specifically modified to provide them with a long circulating ability, however, are of limited use, since they tend to be trapped by the mononuclear phagocytic system (MPS). Many attempts have been made to avoid the MPS-trapping of liposomes and to achieve longer half-lives in the bloodstream by modification of the liposomal surface. Successful results have been obtained by the modification of liposomes with poly(ethylene glycol) (PEG) derivatives (7-14). These molecules were covalently grafted onto the surface of the liposomes, and provided higher stability and a prolonged duration of circulation time for the vesicles examined. The PEG chains are believed to prevent or diminish the adsorption of opsonizing proteins which direct the liposomes to macrophages, as a result of their conformational flexibility and water-binding ability (13,14). Until recently only a few studies have dealt with other polymers physically adsorbed on the surface of liposomes.

Poly(vinyl alcohol) (PVA) and a PVA modified with a hydrophobic moiety (PVA-R), were examined as a coating material for liposomes to be loaded with an anticancer drug, doxorubicin by Takeuchi et al. (15). Besides the animal experiments (pharmacokinetic and distribution studies) they performed dynamic laser light scattering (DLS) measurements and determined the coating amounts of polymers. It was shown that PVA-R binds to liposomes with higher affinity than does PVA. In a previous study the change in the zeta potential afforded evidence of the polymer layer on the liposome surface (16).

The kinetic (long-term) stability of dimyristoyl phosphatidyl choline (DMPC) liposomes was examined by Grohmann et al. who incorporated PVA and poly(vinyl pyrrolidone)(PVP) derivatives into the bilayer membrane of the vesicles (17). These experiments were carried out at different pH values, and the enhancement of the average vesicle diameter was checked by DLS after certain time intervals for 3 months. It was concluded that the rate of diameter increase can be significantly diminished by stabilizing the dispersions with PVP or PVA and its co-vinyl acetal, propional or butyral copolymers. In another approach differential scanning calorimetry was used to

examine the polymer-liposome interactions (18). It is also very noteworthy the work of de Rubalcava et al. (19) who made a detailed examination on the interactions between liposomes and hydroxypropylmethylcellulose.

The aim of this paper was the direct investigation of the interactions of PVA and PVP and the liposomal bilayer by quantitative analytic measurements of polymer adsorption, among them the protamine (Prot)-induced vesicle aggregation, which method is a novel one. The results of DLS, and thermal activity monitoring (TAM) provided additional information, and the test dye release experiments indirectly proved the binding of PVA onto the liposomal surface.

EXPERIMENTAL

Materials

Soy lecithin containing ca. 85 % (w/w) phospholipids (PL) was produced by Lucas Mayer GmbH., Germany. Dicapryl phosphate and cholesterol were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA. The PVP K30 $M_r \approx 40000$, 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (Hepes), tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris), acridine orange hydrochloride (AO) were products of Fluka Chemie AG, Switzerland. Protamine hydrochloride (Prot) was obtained from F. Hoffmann-La Roche Ltd, Switzerland. The xerogel of Sephadex G50f (fine) was produced by Pharmacia AB, Sweden. All other substances: PVA $M_r \approx 72000$, sodium chloride, sodium hydroxide, ammonium sulphate, disodium hydrogenphosphate, potassium dihydrogenphosphate, iodine, potassium iodide, and boric acid, methanol, ethanol, chloroform, were purchased from Reanal, Budapest/Hungary and were of analytical grade purity. We used ultrapure distilled water provided by a Milli-Q RG (France) water cleaner device.

Methods

Preparation of Liposomes

The exact phospholipid content in the soy lecithin we used as basic material of the liposomes was determined according to the Rouser assay (20). Liposomes consisting of soy lecithin phospholipid/dicapryl phosphate/cholesterol = 25:2:3 (molar ratio) were prepared by the classic Bangham method (21) with some modifications. The lipids were dissolved in a mixture of chloroform/methanol = 9:1 (v/v). A lipid film was prepared on the wall of a round-bottomed flask with a Rotadest 2118 vacuum evaporator. After the removal of all traces of organic solvent the film was hydrated with a buffer

solution (pH = 7.4) containing 0.15 M sodium chloride, 0.01 M Hepes and 0.005 M sodium hydroxide or a solution containing 0.06 M ammonium sulphate (pH = 5.0). In both dispersions the desired average vesicle diameter (approximately 150 nm) was achieved by sonication with a Realsonic RS-16F ultrasonic bath. The process was checked by DLS every 2 minutes during this step. The phospholipid concentration ([PL]) of these systems was 0.04 M.

Increasing amounts of polymer (PVA or PVP) were added to liposomes prepared in the Hepes buffered solution at polymer/liposome ratios of 0.024–0.61 (w/w). The "liposome" expression is equal to the sum of the amount of phospholipid in the soy lecithin, dicetyl phosphate and cholesterol. Dispersions obtained in this way were mixed by vortexing before they were incubated at 25°C for 2 hours. At the other group of the liposomes prepared in the solution of ammonium sulphate there was AO entrapped into the vesicles first and *in vitro* drug release examinations were carried out finally.

Determination of the Amounts of Polymer Adsorbed

The principle of these examinations is shown on Figure 1. 200 μ l samples were taken from each dispersion and an equal volume of Prot solution was added in order to aggregate the vesicles (22). These aggregated systems were diluted with the buffer solution in which the original liposomes were prepared before they were centrifuged at 2000 g for 20 minutes.

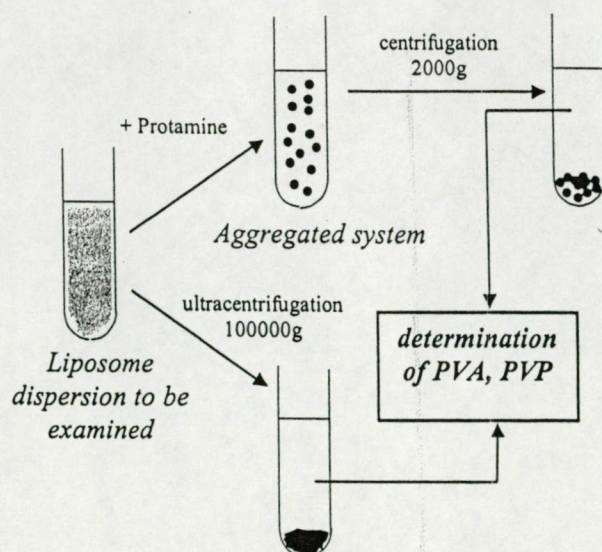


Figure 1. Scheme for the measurement of PVA and PVP concentrations in adsorption isotherm measurements.

In the case of PVA the amount of unadsorbed polymer was determined from the supernatant with a specific reagent containing boric acid, potassium iodide and iodine (23) which forms a green compound with PVA. The optical density of this green color was measured spectrophotometrically at 670 nm.

This measurement is more complicated in the case of PVP: in the absence of a specific chromophore-producing reagent we were forced to measure in the UV. In order to circumvent this problem we minimized the disturbing effect of unbound liposomes and Prot. We added increasing amounts of Prot to dispersions containing only liposomes and after centrifuging them we searched for the absorbance minimum at 210 nm. Figure 2 reveals the optimal ratio of Prot/phospholipid at where PVP displays an absorbance maximum in ethanol:water = 9:1 (v/v). We added Prot in this Prot/phospholipid ratio to the liposome-PVP systems to be examined. This was followed by centrifugation, dilution of an aliquot of the supernatant with 96 % ethanol and measurement of the concentration of unadsorbed (equilibrium) PVP at 210 nm.

For the systems containing PVA these experiments were performed with another separation method employing a Beckmann TL 100 ultracentrifuge. In this case the vesicles were exposed to 100 000 g instead of Prot and centrifugation at 2000 g.

We used a Kontron Uvikon 930 spectrophotometer for the measurements. The adsorption was expressed via the adsorption isotherms at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ by the following equation.

$$n_{\text{polymer}}^s = \frac{V}{100} \cdot \frac{C_o - C_e}{m}$$

where n_{polymer}^s = amount of polymer in mg adsorbed on 1 g of liposome, C_o = initial concentration of polymer (mg/100 ml), C_e = measured equilibrium concentration of polymer (mg/100 ml), V = volume of sample (ml), and m = mass of liposomes in the sample (g).

DLS Measurements

The DLS experiments were carried out with SEMA Tech SEM-633 equipment at a measuring angle of 90° for 100 seconds. Samples to be examined were diluted 15-fold with the buffer solution having the appropriate C_o PVA or C_o PVP concentrations. We also considered the change of the relative viscosity during these measurements. The existence of adsorption was concluded on the basis of increasing average vesicle diameters.

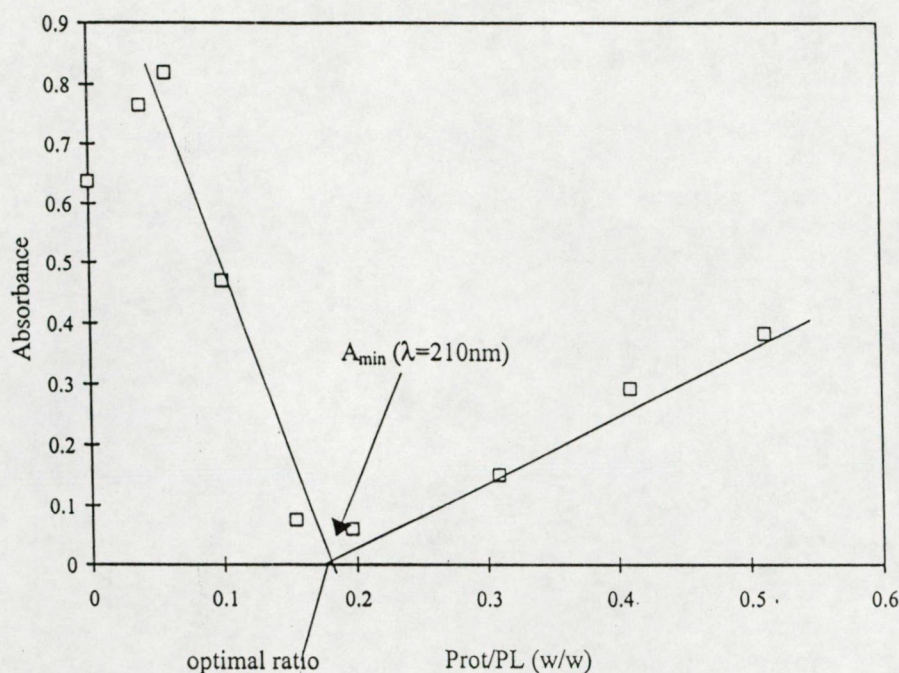


Figure 2. Determination of the optimal ratio Prot/PL (to yield the minimum interfering absorbance, A_{min}) in order to minimize the disturbing effect of nonprecipitated liposomes and protein in the measurement of unadsorbed PVP.

Calorimetric Measurements

These data were obtained with a Thermometric Thermal Activity Monitor (TAM Type 2277) titration microcalorimeter. 0.33 ml of the original liposome dispersion were diluted to 2.00 ml with the buffer solution, and the total enthalpies (Table 1) were determined when 800 μ l of 0.5% PVA were added in 10 steps. The PVA/liposome ratio (w/w) was set from 0.04 to 0.4. The total duration of this measurement was 17 hours (2 hours for the baseline and 1.5 hours for each step).

We also measured the dilution enthalpies of both liposomes and PVA under the same conditions as mentioned above. Measurements on PVP are not reported here because of the failure to achieve reproducibility of the small heat effects.

Remote Loading of AO, Determination of the Entrapment Efficiency ($E\%$)

The choice of acridine orange as drug modeling test dye can be explained by several reasons. First of all it can easily be detected spectrophotometrically because of its high molar extinction coefficient. The weak basic property ($pK_a = 9.25$) and the hydrophobic character of the base (24) form are important factors which promote the

Table 1. Summary of TAM Results

Polymer/ liposome (w/w)	C_e of PVA (g/100 ml)	ΔH_{tot} (mJ/g)	$\Sigma \Delta H_{dil}$ (mJ/g) of PVA and liposomes	ΔH_{ads} (mJ/g)
0.04	0.013	2.16	5.44	-3.28
0.08	0.025	-0.78	2.33	-3.11
0.12	0.035	-2.99	-1.54	-1.45
0.16	0.0465	-4.69	-5.63	0.95
0.20	0.0565	-6.16	-9.09	2.93
0.24	0.0655	-7.32	-10.90	3.58
0.28	0.0768	-8.46	-12.57	4.11
0.32	0.0828	-9.46	-13.79	4.33
0.36	0.0905	-7.99	-12.49	4.50
0.40	0.0975	-3.81	-8.14	4.33

ΔH_{ads} shows exothermic interaction up to approximately $C_e \text{ PVA} = 0.04 \text{ g/100 cm}^3$. The C_e values were calculated from the adsorption isotherm (Figure 5, protamine aggregated system). The standard deviation of ΔH_{ads} was $\pm 2.1\text{--}6.5\%$; $n = 3$.

loading of AO to the internal space of liposomes. Several antineoplastic agents having similar chemical structure can be transported through lipid membranes by this method (24–28).

The pH of liposome dispersion hydrated in the 0.06 M ammonium sulphate was set from 5.0 to 7.4 with 0.1 M

sodium hydroxide and after it had been divided into three equal volumes, three buffer solutions with pH 7.4 (Hepes-sodium hydroxide, Tris-hydrochloric acid, and phosphate buffer) were added so that the intra- and extraliposomal spaces remain isoosmotic. This fact was achieved by addition of sodium chloride. The [PL] was cca. 0.027 M and the concentration of the appropriate buffer was 0.01 M in each dispersions at the end of this step. AO was added to the details (2 ml) of these dispersions so that the molar ratio of AO/PL change between 0.02–0.30 and [AO] (C_1) be in the range of 0.30–4.50 mM. Due to the pH-gradient ($\Delta\text{pH} \approx 2.4$) set up between the intra- and extraliposomal areas and the incubation of the samples at 60°C for 1 hour AO can be concentrated into the intraliposomal aqueous phase (Figure 3).

The entrapment efficiency ($E\%$) of AO was determined in a similar manner as it was described before, for the quantitative measurement of the polymer adsorption. 200 μl volumes were taken from the samples and equal volume of Prot solution was mixed with them so that we set the Prot/PL (w/w ratio) to approx. 0.3. The aggregated liposomes were centrifuged at 2000 g for 20 minutes and the concentration of the non-entrapped AO

(C_2) was measured from the supernatant spectrophotometrically at 492 nm. Based on these measurements:

$$E\% = (1 - C_2/C_1) \cdot 100.$$

Since liposomes may undesirably aggregate during loading (25) it is also necessary to check the average vesicle size by DLS simultaneously with the $E\%$ examinations.

In Vitro Drug (Test Dye) Release Measurements

With the knowledge of the experimental results ($E\%$, average vesicle size) related to the remote loading procedure we made an AO loading with an optimized sample again. The non-entrapped AO was removed by passing the liposome dispersion through a Sephadex G50 gel column which was preequilibrated with 0.01 M Tris-HCl – 0.58 % sodium chloride solution. The loss of liposomes was estimated from the eluted, free of extraliposomal AO dispersions by the Rousser assay. Samples prepared in this way were mixed with PVA in the PVA/liposome = 0.05 and 0.30 w/w ratio and the amounts of the released test dye was measured using vertical diffusion cells

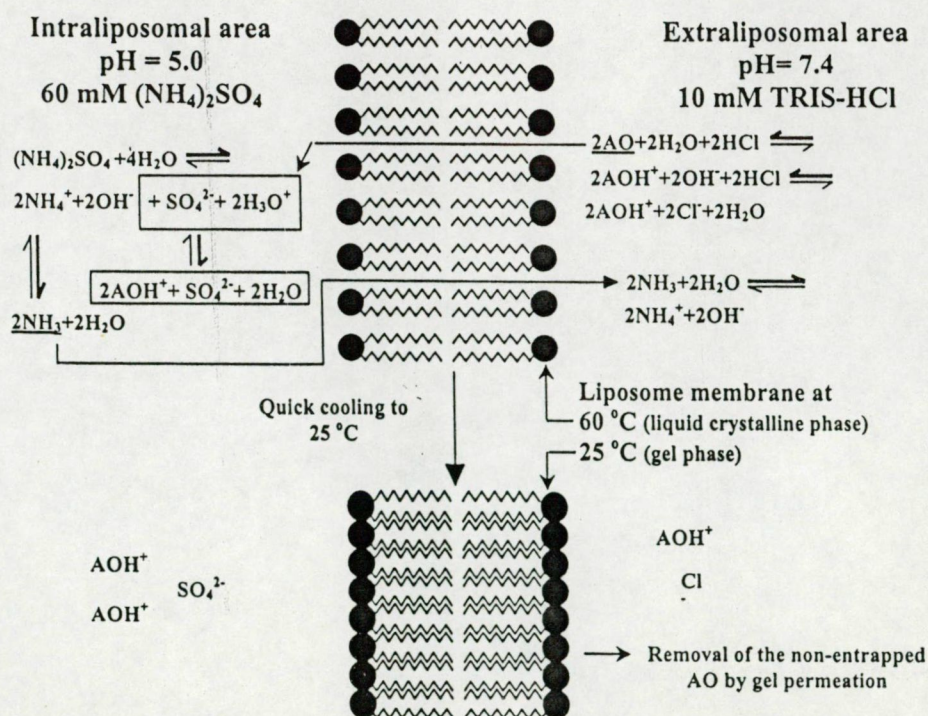


Figure 3. Mechanism of the remote loading process. The uncharged form of the weak base passes through the membrane and its sulphate salt forms in the intraliposomal space.

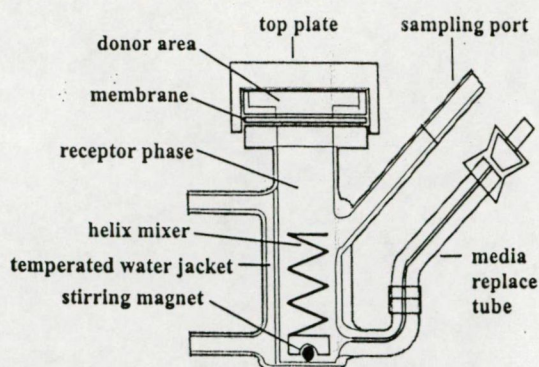


Figure 4. Vertical diffusion cell (Hanson Research Company, USA).

(Figure 4) (Hanson Research Co., USA). The samples (donor area) were separated from the receptor phase by a dialysis membrane with the average pore diameter of 2.4 nm. 800 μ l of samples were taken from the receptor phases (4.50 ml and thermostated at 37°C) with an automatic sampling device at 0.5, 1.5, 3.5, 7.5, 15.5, 20.5, 24.5, 28.5, and 32.5 hour of sampling times. The amounts of the released test dye can be calculated after the spectrophotometric measurements at 492 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Polymer Adsorption

Figure 2 depicts absorbance values as a function of the Prot/liposome (w/w) ratio. From these data the optimal ratio ($\approx 17\%$ w/w) was chosen at which minimal absorbance ($A_{min} < 0.05$) was obtained. This ratio provides the possibility to measure PVP at 210 nm.

Adsorption isotherms of the polymers are seen in Figure 5. For PVA we compare two analytical methods. Measurement of PVA adsorption with ultracentrifugation or Prot aggregation as separating method yielded very similar isotherms. PVA binds much better than PVP to liposomes because its hydroxyl groups bound by hydrogen bonds to the surface of the liposomes which are rich in hydroxyl and oxo groups. Although PVP also has H-bonding oxo group in the pyrrolidone ring, the interaction with liposomes is weaker. The adsorption isotherm of PVP has already reached saturation at 50 mg/g.

DLS Experiments

DLS measurements revealed that the adsorption of PVA and PVP enlarged the average vesicle diameter. The

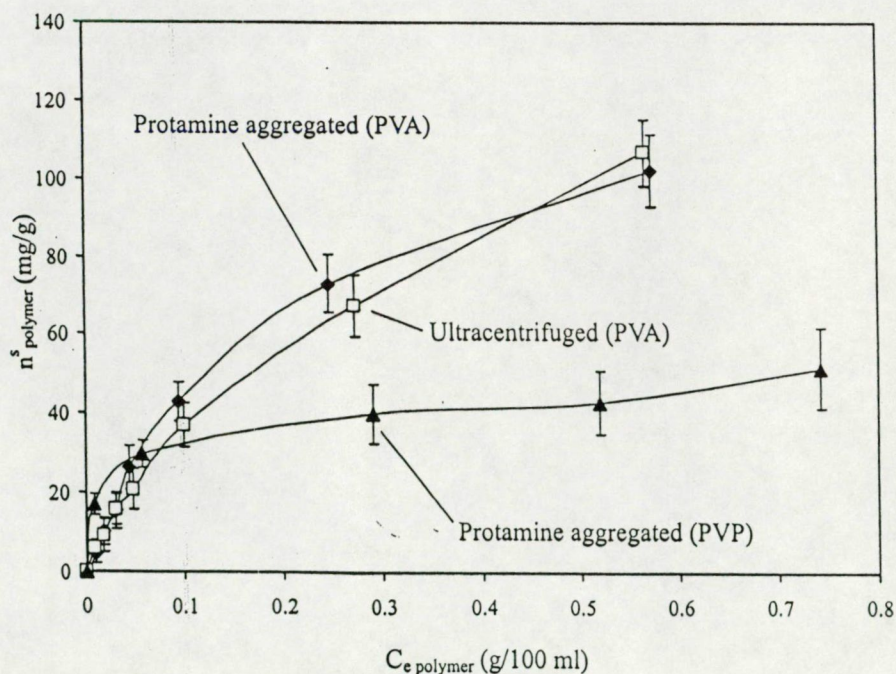


Figure 5. Isotherms of adsorption of PVA and PVP on liposomes. Comparison of Prot aggregation and ultracentrifugation as separating methods in the determination of unadsorbed PVA; $n = 3$ (three parallel measurements).

extent of this enlargement was 15–23 nm for PVA and 5–9 nm for PVP. Thus, the stronger adsorption of PVA can also be proven by the thickness of the adsorption layer. PVA has a higher molecular mass than PVP (72 000 relative to 40 000) and, therefore, PVA spreads more extensively and is in a well-hydrated condition in the adsorption layer. This causes the observed excellent stability for the liposome dispersions (Figure 6).

Calorimetric Measurements

Figure 7 illustrates the heat production/absorption during titration of liposomes with PVA. The first peak reflects an exothermic process and the others endothermic effects. In Table 1 are listed the enthalpy values required to obtain the adsorption enthalpy. This enthalpy is obtained from the relation:

$$\Delta H_{ads} = \Delta H_{tot} - (\Delta H_{dil(PVA)} + \Delta H_{dil(liposomes)})$$

where ΔH_{ads} is the adsorption enthalpy, ΔH_{tot} the total enthalpy, and ΔH_{dil} are the dilution enthalpies of the components (PVA and liposomes).

The interaction is exothermic up to a PVA concentration of 0.04 g/100 ml but endothermic at higher concentration. An analogous representation may be seen in Figure 8, where the adsorption enthalpy is related to

1 g of liposome ($\Delta H'_{ads}$) as a function of the amount of PVA adsorbed. This relation shows that in the initial stage of the isotherm, up to an adsorbed amount of 40 mg/g, exothermic effects are recorded. The differential adsorption enthalpy in Figure 9 shows the adsorption enthalpy related to the unit mass of PVA.

These data clearly demonstrate a strong exothermic interaction between the liposome membranes and the segments of the PVA molecules in the initial state of the adsorption. The interaction may primarily involve H-bonding. At higher PVA concentrations endothermic interactions occur which indicates that the polymer is incorporated between the alkyl chains of the bilayer. This process decreases in the structural order of the bilayers, the disorientation of the alkyl chains being controlled by entropy. It must also be considered that there are cholesterol and dicetyl phosphate molecules between the lecithin phospholipids and the hydroxyl groups of cholesterol might favor the penetration of PVA chains into the lipid layer.

Entrapment of AO and Test Dye Release Experiments

The results obtained from the experiments made on the remote loading process with three buffers having different quality can be seen in the Table 2. It is obvious

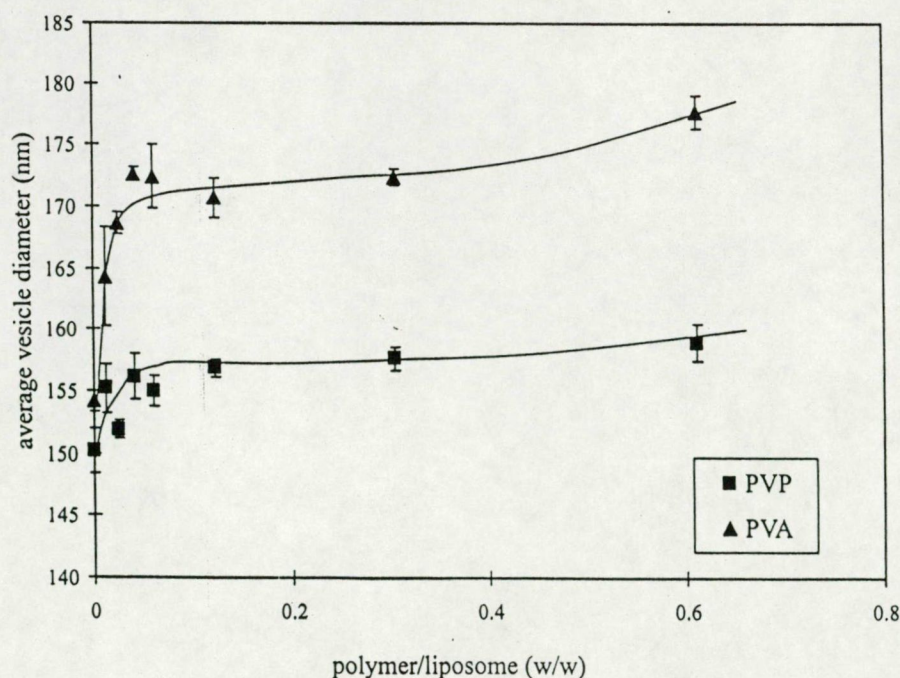


Figure 6. Average vesicle diameter as a function of the polymer/liposome (w/w) ratio; $n = 3$.

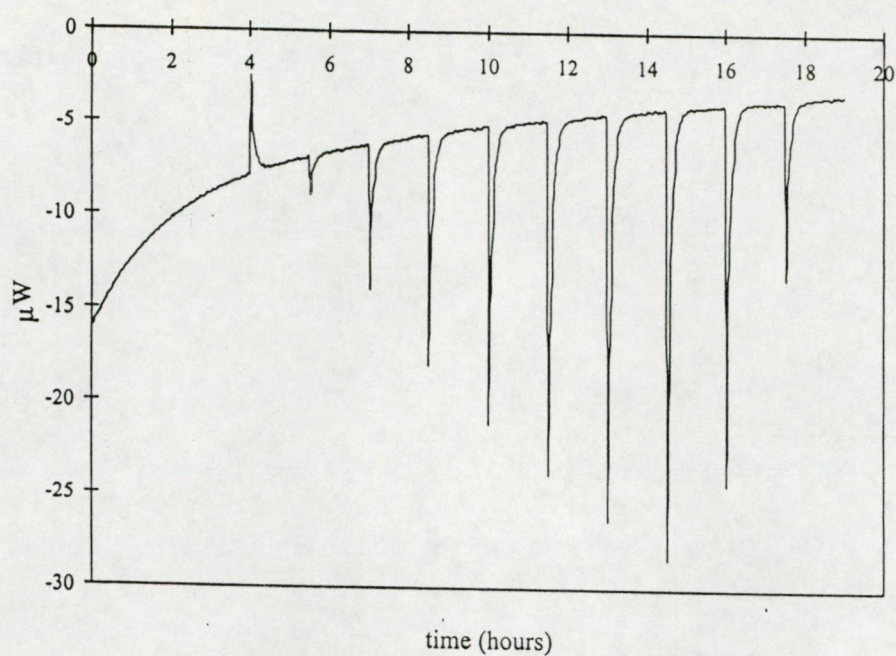


Figure 7. Titration microcalorimetric enthalpogram of PVA/liposome 0.04–0.4 (w/w) systems from which the ΔH_{tot} values were calculated by integration of the areas of the respective peaks.

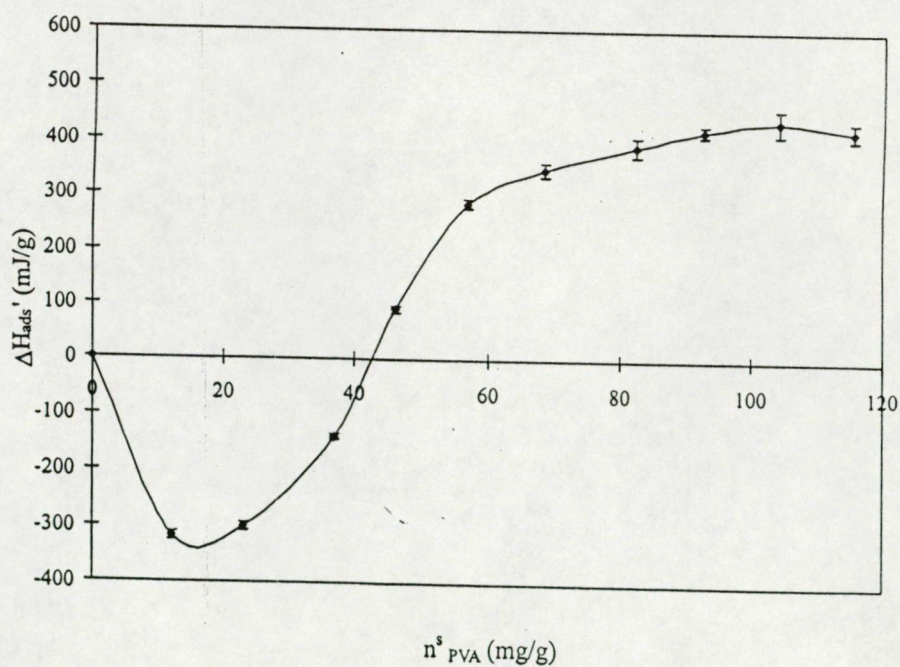


Figure 8. ΔH_{ads} per g of liposome as a function of the amount of PVA adsorbed per g liposome (n_{PVA}^s). The n_{PVA}^s values are given by C_e values of Table 1.

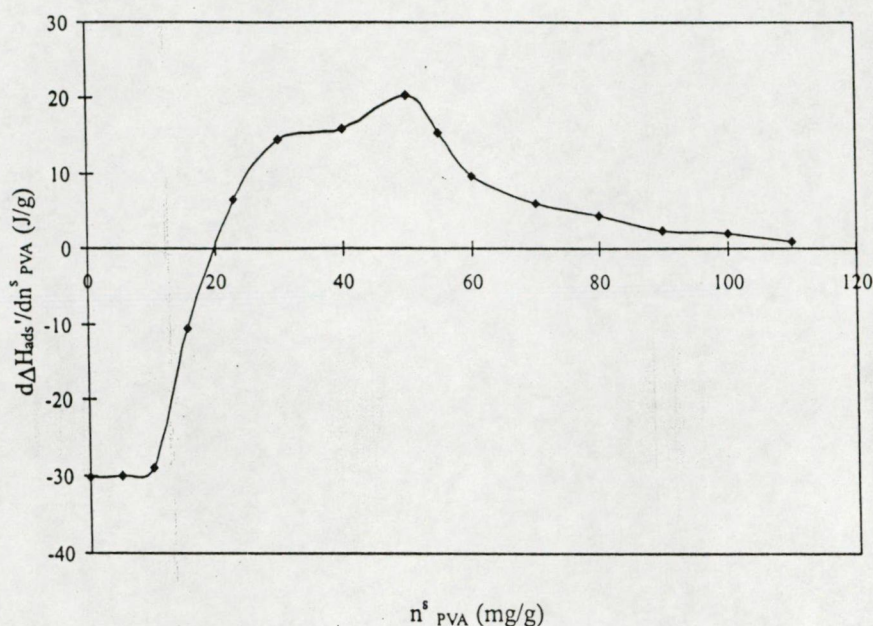


Figure 9. Derivative form of Figure 8. Calculation of the amount of energy liberated by the adsorption of 1 g PVA.

that the best performance was given by the systems buffered with Tris-HCl. Among them the sample AO/PL=0.1 (molar ratio) was found to be the most suitable for the test dye release examinations. The biggest rate of entrapment efficiency (47.8%) with the smallest increase of the liposome diameter (195.2 nm) was observed at this sample. The phenomena of vesicle enlargement is probably explained with the neutralizing effect of AO cations on the negatively charged phospholipids packed in the liposomal membrane. The negative surface charge of vesicles which maintains the stability of the real colloid system is neutralized after the addition of a certain amount of AO. This interaction is followed by aggregation.

It might be connection between the quality of the buffers used and the entrapment efficiency too. Anions in the buffer systems may form ionic pairs with AO cations inhibiting the formation and the transport of the AO base into the liposomes. Hepes molecules with acidic character may form salt with AO cations in the extraliposomal area while Tris having a basic property does not prevent them from participating in the membrane transport mechanism. Between these two extremes, the phosphate buffered system in which the hydrogen- and dihydrogenphosphate anions inhibit the AO transport into liposomes to a lesser extent than Hepes anions, due to the absence of apolar interactions and the smaller molecular size.

Table 2. Entrapment Efficiency (E%) and Average Vesicle Diameter (d) Results of the Remote Loading Process of AO into Liposomes

AO/PL (mol/mol)	Tris-HCl buffer		Phosphate buffer		Hepes-NaOH buffer	
	E% ± sd	d (nm) ± sd	E% ± sd	d (nm) ± sd	E% ± sd	d (nm) ± sd
0	0	150.8 ± 15.0	0	153.1 ± 15.6	0	153.9 ± 15.9
0.02	36.61 ± 3.11	160.2 ± 17.7	25.51 ± 3.12	162.7 ± 16.2	13.02 ± 2.13	162.4 ± 17.1
0.05	50.00 ± 4.22	164.6 ± 18.9	38.72 ± 4.21	178.4 ± 25.5	39.21 ± 3.11	174.9 ± 24.6
0.10	47.86 ± 4.61	195.2 ± 27.1	42.93 ± 3.68	314.3 ± 30.3	33.31 ± 3.75	241.1 ± 32.8
0.15	51.10 ± 4.82	296.8 ± 25.8	46.02 ± 5.01	594.1 ± 40.8	30.53 ± 4.73	326.0 ± 30.9
0.20	50.80 ± 3.73	364.2 ± 36.3	48.35 ± 4.12	1588.1 ± 51.6	33.62 ± 4.36	658.8 ± 45.6
0.25	46.54 ± 3.92	643.4 ± 42.9	43.12 ± 3.56	2220.0 ± 52.5	27.91 ± 5.12	1304.9 ± 48.6
0.30	45.45 ± 4.31	1011.9 ± 63.0	42.71 ± 4.26	2256.0 ± 96.6	26.92 ± 4.03	1905.1 ± 90.0

The data of the optimal system used for AO release experiments are shown by italicized fonts, $n = 3$.

The preparation of the optimal, AO/PL = 0.1 molar, sample was followed by the measurement of the entrapment efficiency (82.7%) and the average vesicle diameter (193.4 nm). After the non-entrapped fraction of AO had been removed by passing through the liposome dispersion in a Sephadex G50 gel column we estimated the liposome concentration by the means of [PL]. This value decreased to 12 mM. We can calculate the releasable mass of AO (m_{rel}) from the knowledge of the mass of AO added to liposomes at the remote loading step (m^0), the concentration of liposomes before ([PL_x]) and after [PL_y] the gel permeation, the volumes of the dispersions applicated to the top of the gel column (V_0) and eluted (V_1) and the actual entrapment efficiency ($E\%$) with the following formula:

$$m_{rel} = m^0 \cdot E\% \cdot V_1/V_0 \cdot [PL_y]/[PL_x]$$

After the addition of PVA to the eluted samples in 0.05 and 0.30 PVA/liposome (w/w ratio), the releasable mass of AO entrapped in liposomes was 449.33 μ g in the Hanson cell's donor phase (2 ml). The final result of test dye release is shown in Figure 10. Dispersions free of PVA retained AO according to the literature data (29) releasing 3.57% of the original entrapped amount. For the samples containing PVA we can obviously prove the AO retaining effect of PVA adsorbed on the surface of lipo-

somes. The extent of AO release decreased to 1.22% for the sample containing PVA in 0.05 PVA/liposome w/w ratio. This value does not diminish significantly at six times higher, 0.30 PVA/liposome w/w ratio, where 1.09% of AO release was detected. In order to explain this effect we should mostly look at the results achieved at the DLS experiments. Since on the surface of liposomes thicker polymer layers do not form at high PVA/liposome ratios directly proportionally, compared to the adsorbed polymer layer thicknesses measured at small PVA/liposome ratios. These layers retain AO similarly even when higher polymer amounts are added to the system.

CONCLUSIONS

The interaction of neutral polymers (PVA and PVP) with the liposomal bilayer were examined. PVA is adsorbed by liposomes more strongly than PVP as a consequence of stronger H-bonds. These interactions were detected by several measuring techniques. DLS demonstrated that the diameter of the liposomes was higher after stabilization with PVA; thus the adsorption layer is thicker (10.2–23.6 nm) than in case of PVP (5.1–8.9 nm). Microcalorimetric titration measurements revealed exothermic interactions in the initial stages of the adsorption of PVA. From test dye loading experi-

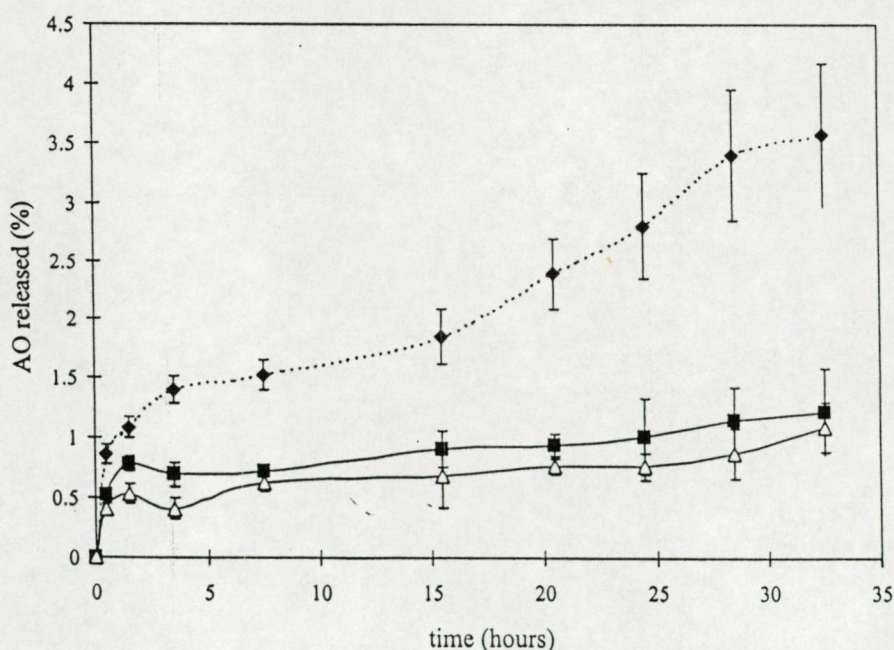


Figure 10. Efflux of acridine orange from liposomes. Without PVA: $\cdots\blacklozenge\cdots$, PVA/liposome = 0.05 (w/w): $-\blacksquare-$, PVA/liposome = 0.30 (w/w): $-\blacktriangle-$; $n = 3$.

ments we have concluded that AO can be entrapped into liposomes most effectively using media buffered with Tris-HCl, and the optimal AO/PL ratio was 0.1. The test dye release experiments were also convincing about the liposomal membrane stabilizing effect of PVA.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the staff of the Department of Colloid Chemistry, University of Szeged and the Institute of Biochemistry, Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged for the use of different devices and for helpful discussions. This work was supported by the Hungarian National Research Fund (OTKA) (project number: T026579).

REFERENCES

- Storm, G.; Crommelin, D. J. A. Liposomes: quo vadis? *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1996, 1(1), 19-31.
- Gregoriadis, G.; Allison, A. C. *Liposomes in Biological Systems*; John Wiley & Sons, Ltd., New York, 1980; 87-100 pp.
- Wasan, E. K.; Fairchild, A.; Bally, M. B. Cationic liposome-plasmid DNA complexes used for gene transfer retain a significant trapped volume, *J. Pharm. Sci.* 1998, 87(1), 9-14.
- Tokudome, Y.; Oku, N.; Doi, K.; Namba, Y.; Okada, S. Antitumor activity of vincristine encapsulated in glucuronide-modified long-circulating liposomes in mice bearing Meth A sarcoma, *Biochim. Biophys. Acta* 1996, 1279, 70-74.
- Kopenhagen, F. J.; Visser, A. J. W. G.; Herron, J. N.; Storm, G.; Crommelin, D. J. A. Interaction of recombinant interleukin-2 with liposomal bilayers, *J. Pharm. Sci.* 1998, 87(6), 707-714.
- Canto, G. S.; Dalmora, S. L.; Oliveria, A. G. Piroxicam encapsulated in liposomes: characterisation and in vitro evaluation of topical anti-inflammatory effect, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1999, 25(12), 1235-1239.
- Jørgensen, K.; Vermehren, C.; Mouritsen, O. G. Enhancement of Phospholipase A₂ catalyzed degradation of polymer grafted PEG-liposomes: effects of lipopolymer-concentration and chain-length, *Pharm. Res.* 1999, 16(9), 1491-1493.
- Leiseur, S.; Beugin-Deroo, S.; Ollivon, M. J. New sterically stabilized vesicles, *Colloid. Interf. Sci.* 1998, 202, 324-333.
- Lasic, D. D. Sterisch stabilisierte Vesikel, *Angew. Chem.* 1994, 106, 1765-1779.
- Fendler, J. H. Polymerized surfactant vesicles, *Israel J. Chem.* 1985, 25, 3-10.
- Jones, M. N. Surface properties and interactions of vesicles, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 1996, 1, 91-100.
- Mercadal, M.; Domingo, J. C.; Petriz, J.; Garcia, J.; de Madariaga, M. A. A novel strategy affords a high-yield coupling of antibody to extremities of liposomal surface-grafted PEG chains, *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1418, 232-238.
- Woodle, M. C.; Lasic, D. D. Sterically stabilized liposomes, *Biochim. Biophys. Acta* 1992, 1113, 171-199.
- Torchilin, V. P.; Papisov, M. I. Why do polyethylene glycol-coated liposomes circulate so long? *J. Liposome Res.* 1994, 4, 725-739.
- Takeuchi, H.; Kojima, H.; Toyoda, T.; Yamamoto, H.; Hino, T.; Kawashima, Y. Prolonged circulation time of doxorubicin-loaded liposomes coated with poly-(vinyl alcohol) after intravenous injection in rats, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1999, 48(2), 123-129.
- Takeuchi, H.; Kojima, H.; Toyoda, T.; Yamamoto, H.; Hino, T.; Kawashima, Y. Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes, *Pharm. Res.* 1996, 13(6), 896-901.
- Grohmann, F. L.; Csempesz, F.; Szögyi, M. Stabilization of small unilamellar DMPC-liposomes by uncharged polymers, *Colloid Polymer Sci.* 1998, 276, 66-71.
- Grohmann, F. L.; Szögyi, M.; Csempesz, F. Interaction of lipid membranes and neutral polymers by differential scanning calorimetry, *Acta Pharm. Hung.* 1997, 67(6), 267-272.
- de Rubalcava, C. G.; Rodriguez, J. L.; Duro, R.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; Seijo, B. Interactions between liposomes and hydroxypropylmethylcellulose, *Int. J. Pharm.* 2000, 203, 99-108.
- Rouser, G.; Fleischer, S.; Yamamoto, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus assay of spots, *Lipids* 1970, 5, 494-496.
- Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. *J. Mol. Biol.* 1965, 13, 238.
- New, R. R. C. *Liposomes: A Practical Approach*, Oxford Univ. Press, Oxford, 1990, 127-128.
- Pritchard, J. G. Poly(vinyl alcohol) Basic properties and uses, Gordon & Breach Science Publishers Ltd., London, Paris, New York, 1970, Polymer monographs, Vol. 4, 7 pp.
- Haran, R.; Cohen, L. K.; Barenholz, Y. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases, *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1151, 201-215.

25. Fonseca, M. J.; van Winden, E. C. A.; Crommelin, D. J. A. Doxorubicin induces aggregation of small negatively charged liposomes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1997, 43, 9–17.
26. van Winden, E. C. A.; Crommelin, D. J. A. Long term stability of freeze-dried, lyoprotected doxorubicin liposomes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1997, 43, 295–307.
27. Mayer, L. D.; Tai, L. C. L.; Bally, M. B.; Mitlenes, G. N.; Ginsberg, R. S.; Cullis, P. R. Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients, *Biochim. Biophys. Acta* 1990, 1025, 143–151.
28. Schuldiner, S.; Rottenberg, H.; Avron, M. Determination of ΔpH in Chloroplasts, *Eur. J. Biochem.* 1972, 25, 64–70.
29. Li, X.; Crabal-Lilly, D.; Janoff, A. S.; Perkins, W. R. Complexation of internalized doxorubicin into fiber bundles affects its release rate from liposomes, *J. Liposome Res.* 2000, 10(1), 15–27.

Received: July 5, 2001

Accepted: August 3, 2001

Liposzómák és neutrális polimerek kölcsönhatásának vizsgálata; a stabilizálás hatása a hatóanyag-leadásra

DÉKÁNY György, CSÓKA Ildikó, ERŐS István

SZTE Gyógyszertechnológiai Intézet, 6720 Szeged Eötvös u. 6

Bevezetés

A liposzómák kitűnő gyógyszerhordozókként használhatók fel programozott hatóanyag-leadású rendszerek készítéséhez. Eddig több olyan tanulmány készült ezen rendszerekről, amelyek azt bizonyítják, hogy a liposzómákba zárt farmakonokkal folytatott gyógyszeres terápia nagyobb hatékonyság mellett kevesebb ill. kisebb mértékű mellékhatással jár¹⁻⁶. A gyógyászatban használt liposzómákat tartalmazó készítmények egyik legintenzívebben kutatott képviselői a rákellenes szereket tartalmazó rendszerek, amelyeket általában injekció/infúzió formájában juttatnak a szervezetbe. A konvencionális liposzómák ilyen célra csak korlátozottan használhatók fel, mert ezeket a mononukleáris fagocitáló rendszer igen rövid idő alatt eltávolítja a vérkeringésből. A hosszabb keringési idő elérésére már több próbálkozás is történt a liposzómafelszín tulajdonságainak változtatásával. Sikeresnek bizonyultak a poli(etilén-glikol)(PEG)-származékokkal folytatott felületmódosítások,⁶⁻¹⁴ mely során ezen polimereket kovalens kötással kapcsolják a liposzómák felszínéhez. Ez nagyobb stabilitást és hosszabb keringési időt biztosított a vizsgált vezikuláknak. A jelenség oka feltételezhetően az, hogy a PEG-molekulák - flexibilitásuknál és vízmegkötő képességüknél fogva - megakadályozzák az opsonizáló proteinek (a fagocitózist elősegítő anyagok) kötődését, amelyek a makrofágokat így a liposzómákhoz vezetik^{13,14}. Ilyen technológiával készítik a Doxil® (Európában Caelyx®) és a DaunoXome® készítményeket doxorubicin és daunorubicin hatóanyagokkal⁶.

Ezen eredményeken kívül csak kevés olyan polymerről tudunk, amelyek a fent leírtakhoz hasonlóan kovalens kötással kapcsolódnak, vagy egyszerűen fizikai adszorpcióval kötődnek liposzómák felszínéhez. A poli (vinil-alkohol) (PVA) és a PVA-R (alkilláncsal kapcsolt PVA) stabilizáló hatását Takeuchi¹⁵ és mtsai. tanulmányozták doxorubicinnel töltött liposzómákon. A farmakokinetikai vizsgálatok mellett dinamikus lézerefényszórás (DLS)-méréseket is végeztek a liposzóma átmérő tanulmányozására, valamint a minták ultracentrifugálása után a felülészók analízise alapján meghatározták a felületen megkötött

polimerek mennyiségét is. Megállapították, hogy a PVA-R sokkal nagyobb affinitással kötődik a liposzómákhoz mint a PVA, annak köszönhetően, hogy az „R” alkilláncok a liposzómamembrán hidrofób régiójában foglalnak helyet. Takeuchi és mtsai. egy régebbi munkájukban az elektrokinetikai potenciál változását használták fel a polimeradszorpció nyomonkövetésére¹⁶. Dimirisztoil-foszfadil-kolin-liposzómák kinetikai stabilitását vizsgálták Grohmann és mtsai., PVA- és poli(vinil-pirrolidon)(PVP)-származékokat beépítve a vezikulák membránjába¹⁷. Kísérleteiket különböző fiziológias pH értékek mellett végezték és az átlagos vezikula-átmérőt bizonyos időközönként 3 hónapon át mérték DLS segítségével. Megállapították, hogy a növekedés mértéke (stabilitás csökkenése fúzió, aggregáció következtében) jelentősen csökkenthető PVP-vel, PVA-val ill. ezek ko-vinil-acetál, propionál, butirál kopolimereinek segítségével. Termoanalitikai módszereket alkalmazva szintén vizsgálták a polimer-liposzóma kölcsönhatásokat¹⁸.

Ezen közlemény célja, az előbb említett tanulmányok eredményeinek ismeretében, a PVA és a PVP liposzómákon történő adszorpciójának kvantitatív vizsgálata az alábbi módszerek felhasználásával:

1. Az adszorbeált polimer mennyiségének meghatározása protaminaggregációval és ultracentrifugálás segítségével
2. A vezikula átmérőjének meghatározása dinamikus lézerefényszórással (DLS)
3. Titrációs mikroklorimetriás vizsgálat a polimer/liposzóma kölcsönhatás hőeffektusának jellemzésére
4. Röntgendiffrakciós mérés a polimerek adszorpciója okozta szerkezetváltozás vizsgálatára a liposzómamembránban (XRD)
5. A liposzómák narancsakridinnel történő töltése utáni in vitro hatóanyag-leadás vizsgálata.

Kísérleti rész

Anyagok

Liposzómáink fő alkotója szójalecitin volt, amely a német Lucas Mayer GmbH. gyártmánya. A dicetil-foszfát és a koleszterin a Sigma termékei. (St. Louis MO. USA) A PVP K30 relatív móltömege (M_r) ≈ 40000 , a 4-(2-hidroximetil) piperazinil-1- etán-szulfonsav (a továbbiakban Hepes), a narancs-akridin-hidroklorid (NA), a Tris (hidroximetil) aminometán (Tris) a Fluka Chemie AG. (Svájc) termékei. A protamin-hidrokloridot (prot) az F. Hoffmann-La Roche Ltd, (Svájc) gyártotta. A gélszűréshez használt Sephadex G50f xerogélt a Pharmacia AB-tól (Svédország) szereztük be. A PVA $M_r \approx 72000$, nátrium-klorid, dinátrium-hidrogénfoszfát, kálium-dihidrogénfoszfát, bórsav, ammónium-szulfát, kálium-jodid, hexadecil-piridinium-klorid, metanol, etanol, kloroform a Reanal termékei (Budapest), és analitikai tisztasággal rendelkeznek.

Módszerek

1. Liposzómakészítés

A szójalecitin foszfolipid (PL) tartalmának meghatározását a helyes liposzóma-összetétel megválasztása érdekében a Rousser-féle foszfolipid-analítika¹⁹ szerint végeztük el. Ez 85 ± 1.2 %-nak adódott. A fennmaradó kb. 15 %-nyi anyaghányad főleg glikolipidek, szterolok, tokoferolok és szénhidrátok elegyből áll²⁰. A liposzómák a Bangham-módszer²¹ szerint készültek és összetételük lecitin-foszfolipid / dicetil-foszfát / koleszterin = 25:2:3 (mólarány) volt. A lipideket először feloldottuk kloroform/metanol = 9:1 elegyében, majd lipidfilmet készítettünk egy gömblombik falára úgy, hogy a szerves oldószert Rotadest 2118 típusú vákuumbepárló készülékkel eltávolítottuk. A képződött lipidfilmet hidratáltuk, a célnak megfelelően, vagy pH = 7.4 -es közeggel, melynek összetétele: 0.15 M nátrium-klorid, 0.01 M Hepes, 0.005 M nátrium hidroxid (Hepes-puffer), vagy pH = 5.0-ös közeggel, mely 60 mM-os ammónium-szulfát volt, vagy desztillált vízzel (pH ≈ 7). Az így nyert diszperziók foszfolipid-koncentrációja kb. 40 mM (3 % w/v) volt. A kívánt vezikulaátmérőt (150 ± 10.2 nm) ultrahangfürdős kezeléssel (szonikálás) érték el. A szonikálás minden 2. percében DLS-el ellenőriztük a részecskeméretet és végül 14 perc után a 5. ábrának (ld. eredményeknél)

megfelelő eloszlást kaptuk A Hepes pufferben (pH = 7.4) készült liposzómák egy részéhez különböző mennyiségű polimert adtunk polimer/liposzóma 0.024-0.61 (w/w) arányban, majd Vortex-készülékkel történő keverés után 2 órát 25 °C-on állni hagytuk. Másik részükhöz polimert nem adtunk, és ezeket használtuk a mikrokalorimetriás és a felületi-töltéssűrűség-mérésekhez. A 60 mM-os ammónium-szulfát-oldatban diszpergált liposzómákba később narancsakridint zártunk és további köztes preparatív eljárások után in vitro hatóanyag-leadást vizsgáltunk. A desztillált vízzel hidratált liposzómákat csak a felületi töltéssűrűség meghatározásához használtuk.

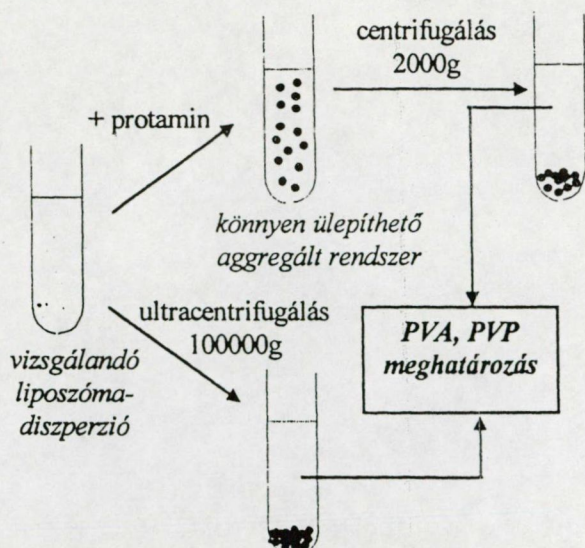
2. A liposzómák felületi töltéssűrűségének meghatározása

A fent leírt módon készített, Hepes puffer és desztillált víz diszperziós közegű negatív felületi töltésű liposzómák felületi töltéssűrűségét Z (mekV/g) Műtek PCD 02 (PCD) áramláskinetikai potenciálmérővel határoztuk meg. Az eredeti diszperziókat (3 %, [PL] ≈ 40 mM) és azok két hígítását 1.5 % és 0.6 % (w/v) a készülék 10 cm³-es teflon mérőcellájában 100 mM-os, kristályosítással tisztított hexadecil-piridinium-klorid (HDPCl) oldattal titráltuk, és egyidejűleg az áramláskinetikai potenciált is mértük. A folyamat végpontját a PCD 0 mV potenciál értékkel jelezte.

3. A liposzómákon adszorbeálódott polimer mennyiségének meghatározása

Ezt az analitikai feladatot a protamin-aggregációs módszerrel²² oldottuk meg (1. ábra). Az ismert polimer/liposzóma (w/w) arányú diszperziókból 200 μ l-es mintákat vettünk, majd egyenlő térfogatú protamin-hidroklorid-oldatot (prot/PL ≈ 0.3 w/w) adtunk hozzá a liposzómák aggregáltatása céljából. Az aggregált rendszereket Hepes-pufferrel hígítottuk és 2-3 perc állás után 2000 g-vel 20 percig centrifugáltuk. A nem adszorbeált polimerek egyensúlyi koncentrációit (C_e) a felülúszóból határoztuk meg. A PVA-t egy specifikus reagens segítségével (összetétele: bórsav 1.20 g/100 cm³, kálium-jodid 0.150 g/100 cm³, jód 0.076 g/100 cm³) mértük spektrofotometriásan, 670 nm hullámhossznál²³ Kontron Uvikon 930-as spektrofotométerrel.

Ez a mérés bonyolultabb a PVP esetén. Mivel kromofórképző vegyület hiányában kénytelenek vagyunk az UV-tartományban mérni, minimálni kell a protaminaggregáció során meg nem



1. ábra A polimerek adszorpciós egyensúlyi koncentrációinak mérése polimer/liposzóma = 0.024-0.61 (w/w) rendszerekben.

kötött liposzómák és protamin zavaró hatását. A módszer lényege, hogy egy külön kísérletben növekvő mennyiségű protamint adtunk a csak liposzómákat tartalmazó diszperziókhoz és miután lecentrifugáltuk azokat, kerestük a legkisebb abszorbanciájú felülúszóval rendelkező mintát. A kapott abszorbancia minimum mutatja a protamin/foszfolipid optimális arányát azon a hullámhosszon, amelyen a PVP kvantitatívan meghatározható (210 nm) etanol : víz = 9:1 elegyben (2. ábra). Ezen kísérlet alapján protamint adtunk a mérendő liposzóma-PVP rendszerekhez az $A_{\min}$ alapján meghatározott prot/PL arányban, (0.17 w/w) és miután lecentrifugáltuk azokat, a felülúszók adott térfogatát 96 %-os alkohollal 10-szeresére hígítva mértük 210 nm-en.

A protaminnal történő aggregációs módszer ellenőrzése érdekében a PVA-t tartalmazó rendszereknél referenciaként elvégeztük ugyanezeket a kísérleteket ultracentrifugálással is, Beckmann TL 100 ultracentrifuga segítségével. Ebben az esetben a 2000 g + protamin helyett 100000 g-t alkalmaztunk a szeparáláshoz és centrifugálás után meghatároztuk az egyensúlyi koncentrációt. Az adszorpció mértékét adszorpciós izotermákkal adtuk meg 25 ± 1 °C-on. Eredményeinket az alábbi egyenlettel számítottuk:

$$n_{\text{polimer}}^s = V \cdot (C_0 - C_e) / 100m$$

ahol:

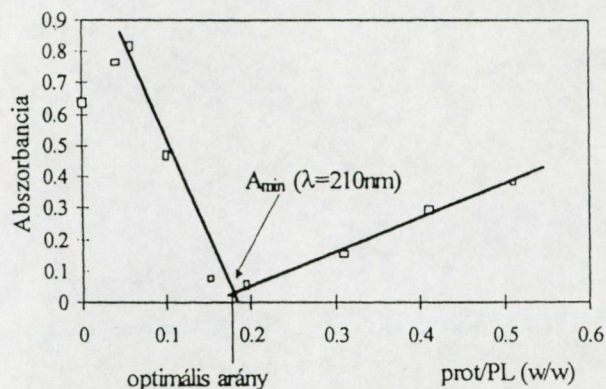
n_{polimer}^s = az adszorbeált polimer mennyisége 1 g liposzómán,

C_0 = a polimer kezdeti koncentrációja az összeméréskor ($\text{mg}/100 \text{ cm}^3$),

C_e = a polimer egyensúlyi koncentrációja ($\text{mg}/100 \text{ cm}^3$),

V = a minta térfogata (cm^3),

m = a liposzómák tömege a mintában (g).



2. ábra Az optimális prot/PL arány keresése a $C_e(\text{PVP})$ értékek meghatározásához.

4. Dinamikus lézerefényszórás-mérések (DLS)

Dinamikus lézerefényszórás - méréseinket SEMA Tech SEM-633 típusú készülékkel végeztük 90 °-os mérési szög és 100 másodperces mérési időtartam mellett. A vizsgálandó mintákat kb. 15-szörösre hígítottuk mindig az adott mintának megfelelő $C_0(\text{PVA})$ vagy $C_0(\text{PVP})$ koncentrációjú Hepes-pufferrel. A polimerkoncentráció növekedésével járó relatívviskozitás-változást figyelembe vettük.

5. Röntgendiffrakciós mérések (XRD)

XRD méréseink célja a liposzóma-polimer-rendszerek esetében az, hogy megfigyeljük azokat a szerkezetváltozásokat, amelyeket a polimerek okoznak az eredeti liposzómamembránon. A vizsgálatokhoz üveglapra cseppentett mintáinkat először szárítószekrényben 80 °C-on beszárítottuk, majd az ezt követő mérések után telített vízgőzben tároltuk 60 °C-on 12 órát. Az így kezelt mintákat ismét megmértük 1-8 fokos mérőszög-intervallumban Philips PW1820 diffraktométerrel ($\text{Cu K}\alpha$ sugárzásnál, $\lambda = 1.54 \text{ nm}$, 40 kV, 35 mA). A d_L lamellatávolság értékeket a Bragg-egyenlettel számítottuk $\pm 0.05 \text{ nm}$ pontossággal.

6. A PVA-adszorpció hőeffektusának mérése

A polimer/liposzóma kölcsönhatásokat Thermometric Thermal Activity Monitor (TAM Type 2277) titrációs mikrokáloriméterrel mértük. A Hepes puffer oldattal hidratált 2.00 cm^3 liposzóma-

diszperzióhoz a mérőcellában 800 μl 0.5 %-os PVA-t adagoltunk 10 lépésben. Az adszorpció következtében felszabaduló/elnyelődő hő (ΔH_{ad}) mértük. A PVA/liposzóma (w/w) arány 0.04-től 0.4-ig változott a mérés folyamán. A teljes mérési idő 17 órát vett igénybe. Megmértük a hígulásból származó entalpiaváltozásokat is mind liposzómákra és PVA-ra a fent leírt paraméterek mellett.

7. A tesztanyag (NA) liposzómákba zárása aktív töltéssel²⁹⁻³³, a bezárási hatékonyság (E%) meghatározása.

A narancsakridint tesztanyagként elsősorban nagy moláris extinkciós koefficiense, ill. az ezzel összefüggésben lévő könnyű spektrofotometriás detektálhatósága miatt választottuk. A választásnál szempont volt még gyenge bázicitása, valamint a bázisforma hidrofób jellege is, mely lehetővé teszi az aktív liposzómatöltést³³.

A 60 mM-os ammónium-szulfát-oldattal hidratált liposzómadiszperziók - amelyekben a foszfolipid koncentráció ([PL]) ≈ 40 mM- pH-ját 5.0-ról 7.4-re állítottuk 100 mM-os nátrium-hidroxid-oldattal, majd ezt a törzsdiszperziót három egyenlő térfogatú részre osztottuk és ezekhez különböző minőségű pufferoldatokat (Hepes-NaOH, Tris-HCl, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4) adtunk úgy, hogy közben az intra- és extraliposzomális terek izoozmotikusak legyenek. Ezt számított mennyiségű nátrium-klorid hozzáadásával érték el. Az így keletkezett diszperziókban a [PL] ≈ 27 mM, a puffer koncentrációja pedig 10 mM lett az extraliposzomális terekben.

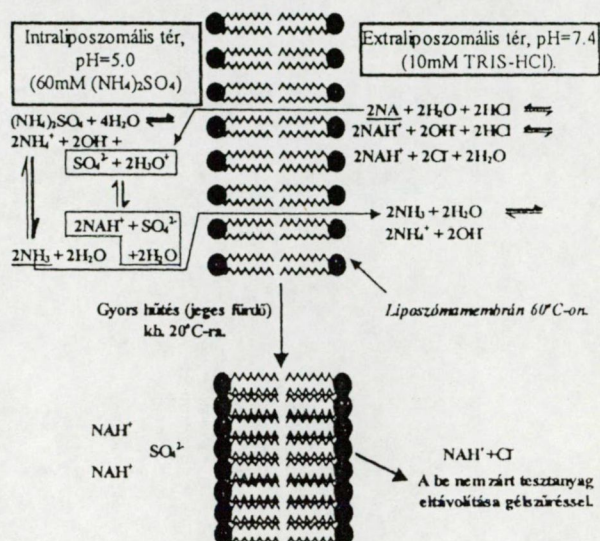
Ezt követően a diszperziók 2 cm^3 -es részleteihez NA-törzsolatot adagoltunk úgy, hogy a NA/PL molarány 0.02-0.30 között változzon, a [NA] pedig 0.30-4.50 mM (C_1) között legyen. A fent leírt módon létesített pH-gradiens ($\Delta\text{pH} \approx 2.4$), valamint a minták 1 órás, 60 °C-os inkubálásának hatására a NA, mely egy gyenge bázis ($\text{pK}_a = 9.25$)³³, az intraliposzomális térbe koncentrálható (3. ábra). A művelet szobahőmérsékletre történő jeges (gyors) hűtéssel végződik.

A NA bezárási hatékonyságát (E%) az adszorbeált polimer mennyiségének méréséhez hasonló módon határoztuk meg. Az egyes mintákból 200 μl -es térfogatokat vettünk ki, majd egyenlő térfogatú protamin-hidroklorid-oldatot adtunk hozzájuk, annak megfelelően, hogy a prot/PL ≈ 0.3 (w/w) legyen. Az aggregált liposzómákat 2000 g-vel 20 percig centrifugáltuk, majd a felülúszóból meghatároztuk a be nem zárt NA koncentrációját

(C_2) 492 nm-en. A mérések alapján:

$$E\% = (1 - C_2/C_1) \cdot 100.$$

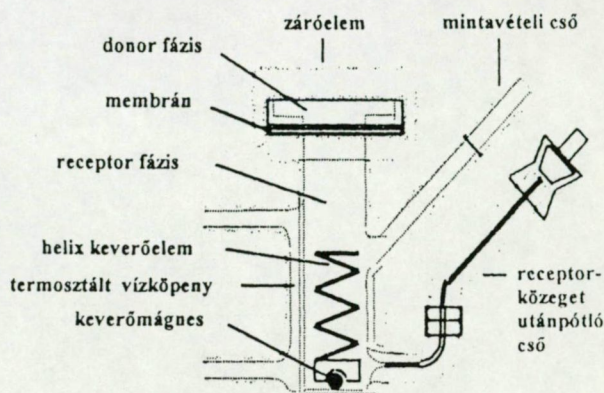
Mivel az aktív töltéses procedura alatt a liposzómák aggregálódhatnak³⁰, az E% mérése mellett szükség van a diszperziókat alkotó vezikulák átlagos átmérőjének ellenőrzésére is DLS-méréssel.



3. ábra: Az aktív töltés mechanizmusa. A gyenge bázis protonátlan formája átjut a membránon, és az intraliposzomális térben szulfátosója képződik.

8. In vitro hatóanyag (tesztanyag)-leadás-vizsgálat

Az aktív töltésre vonatkozó kísérleti eredmények (E%, átlagos vezikulaátmérő) ismeretében egy új mintával ismét aktív töltést végeztünk, majd ezután a be nem zárt tesztanyagot gélzúréssel eltávolítottuk (Sephadex G50f gélágy, 10 mM-os Tris-HCl - 0.58 % NaCl oldattal kiegyenlítve). Mivel a gélzúrés során bekövetkező liposzóma-vesztés előre nem számítható, az így nyert, extraliposzomális közegében NA-mentesnek tekinthető, gélzúréssel eluált diszperzió liposzóma-



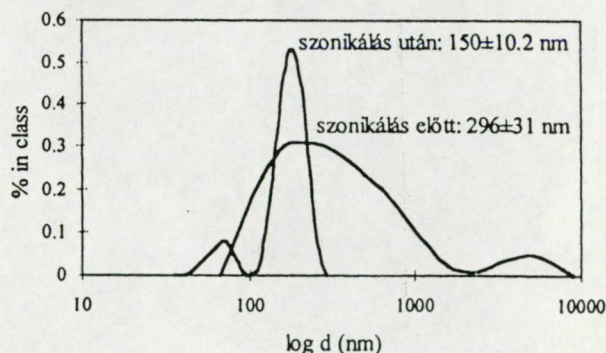
4. ábra: Hanson®-féle vertikális diffúziós cella

tartalmát [PL] formájában a Rouser-féle foszfolipid-analitika segítségével határoztuk meg. Az így előkészített mintához PVA/liposzóma = 0.05 és 0.30 (w/w) arányban PVA-t adtunk. A leadott tesztanyag mennyiségét a Hanson®-féle vertikális diffúziós cellás (4. ábra) készülékkel határoztuk meg. A 800 µl-es mintákat egy automata mintavevő vette a receptor-fázisból (4.5 cm³, 37 °C-on termosztált) 0.5, 1.5, 3.5, 7.5, 15.5, 20.5, 24.5, 28.5, 32.5 órás mintavételi időpontoknál, majd 492 nm-en egyenként megmértük azok abszorbanciáját. A mérési adatokból a leadott tesztanyag mennyisége számítható.

A mérési eredmények értékelése

1. A részecskeméret és a felületi töltés jellemzése

A liposzómák méretének csökkentését ultrahangos kezeléssel vizsgáltuk. Az 5. ábrán bemutatott részecskeméret-eloszlási függvény azt mutatja, hogy a szonikálás hatására az átlagos liposzómaméret 150±10.2 nm-re (±sd) csökken. Az eloszlási függvényből kitűnik, hogy a szonikálással készült minta közel monodiszperz, míg az előző minta polidiszperz és 4500-5500 nm mérettartományban tartalmaz olyan nagy méretű részecskéket, amelyek a szonikálás hatására dezaggregálódnak.



5. ábra: A szonikálás hatása a liposzómák részecskeméret-eloszlására

A kationos polimerek jól megkötődnek a negatív töltésű liposzómák felületén, de ugyanakkor aggregálják is a rendszert a negatív felületi töltés semlegesítésével, amely a diszperzió stabilitásáért felel³⁴. A felületi töltés meghatározására alkalmas készülékben a negatív töltésű liposzómákat a készülék áramlaskinetikai potenciált mérő teflon-cellájában ismert töménységű (és nagy tisztaságú) kationos tenziddel titráljuk, amely semlegesíti a liposzóma negatív töltéseit. A 6a ábrán láthatjuk, hogy a desztillált vízben, ill. pufferben diszpergált

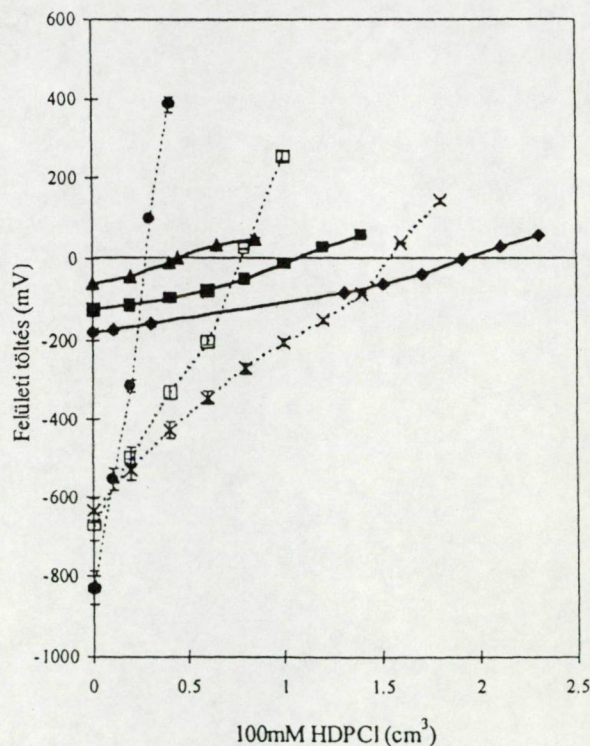
liposzóma töltése negatív (200-600 mV), amely a kationos tenzid adagolása következtében csökken. Adott mennyiségű ($V^0_{\text{töltés}}$) HDPCl adagolásával elérjük a zérus potenciált ill. további tenzid-adagolással áttöltjük a liposzómák felületét. A tenzid adagolása következtében a liposzómadiszperzió stabilitása megszűnik, a rendszer koagulál. A $V^0_{\text{töltés}}$ értékekből az alábbi egyenlet szerint számíthatjuk ki a liposzómák felületi töltéssűrűségét:

$$Z = V^0_{\text{töltés}} \cdot C_{\text{HDP}}^+ / m$$

ahol: Z = a töltéssűrűség (mekv/g),

$V^0_{\text{töltés}}$ = a 100 mM-os HDPCl fogyása (cm³) 0 mV potenciálnál,

m = a liposzómák tömege a mérőcellában (g).



◆ : pufferolt 3% $V^0_{\text{töltés}} = 1.938 \pm 0.038 \text{ cm}^3$

■ : pufferolt 1.5% $V^0_{\text{töltés}} = 1.023 \pm 0.049 \text{ cm}^3$

▲ : pufferolt 0.6% $V^0_{\text{töltés}} = 0.454 \pm 0.036 \text{ cm}^3$

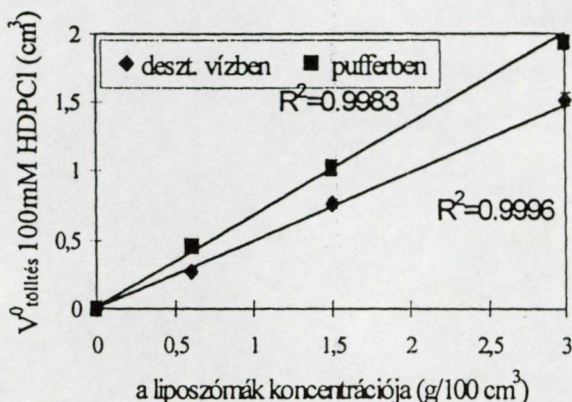
--x-- : deszt. víz 3% $V^0_{\text{töltés}} = 1.564 \pm 0.046 \text{ cm}^3$

--□-- : deszt. víz 1.5% $V^0_{\text{töltés}} = 0.758 \pm 0.031 \text{ cm}^3$

--●-- : deszt. víz 0.6% $V^0_{\text{töltés}} = 0.273 \pm 0.026 \text{ cm}^3$

6a ábra: Különböző koncentrációjú (0.6-3%) liposzómák titrálása HDP⁺ kationokkal. A pontos $V^0_{\text{töltés}}$ értékeket a regressziós egyenesek egyenleteivel számítottuk ki.

Ha a méréseket növekvő koncentrációjú liposzómadiszperziókkal végezzük, arányosan növekvő $V^0_{\text{töltés}}$ értékeket kapunk. Ha ezeket a zérus potenciálhoz tartozó HDPCL-fogyásértékeket ábrázoljuk a liposzómakoncentráció függvényében, akkor a 6b ábrát kapjuk. Az ábrán szereplő egyenesek meredekségéből $\text{tg}\alpha = Z$, a liposzóma



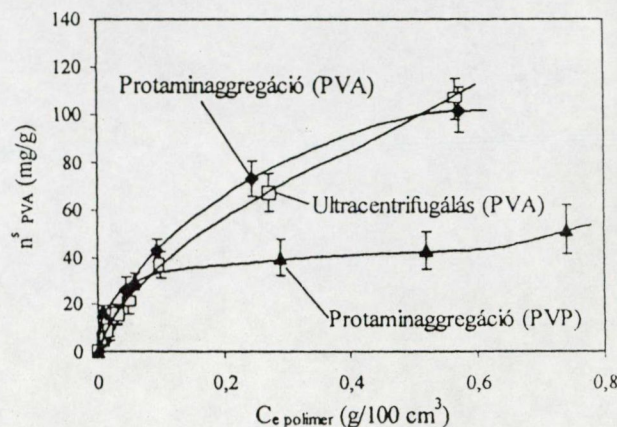
6b ábra: Lineáris korreláció a liposzóma koncentrációja és a HDPCL-fogyása között. A regressziós egyenesek meredekségei ($\text{tg}\alpha$) adják a „Z” értékeket mekv/g-ban.

felületi töltéssűrűsége számítható. Ez $Z = 0.50$ mekv/g a desztillált vizes és $Z = 0.64$ mekv/g a pufferolt rendszerekre. Figyelembe véve a mintákban lévő liposzómákat alkotó molekulák számát 352.13 mekv/mol és 450.73 mekv/mol értékeket kapunk. Ez megfelel 0.453 elektrontöltés/molekulának.

2. A polimer/liposzóma kölcsönhatások jellemzése

Következő feladatunk az, hogy a negatív töltésű liposzóma felületén a semleges PVA és PVP polimerek adszorpcióját meghatározzuk. Az adszorbeált polimer mennyiségének kiszámításához ismerni kell az adszorpció következtében jelentkező koncentrációváltozás értékét. Ezt az analitikai feladatot a kísérleti részben bemutatott módszerekkel oldottuk meg. A 2. ábrán láthatjuk azt az összefüggést, amely a $\lambda = 210$ nm-nél meghatározott abszorbanciát mutatja a protamin-koncentráció függvényében. A mérési adatok alapján kiválasztottuk azon minimális abszorbancia értékhez tartozó protamin/liposzóma arányt (0.17 w/w) amely a liposzómákat kicsapja úgy, hogy a rendszerben $A_{\text{min}} < 0.05$. Ez lehetővé teszi a PVP meghatározását $\lambda = 210$ nm-nél. A 7. ábrán láthatjuk polimerek adszorpciós izotermáit a különböző analitikai módszereket összehasonlítva. Megállapítható, hogy a PVA adszorpciója úgy az ultracentrifugálás, mint a protaminaggregáció elválasztó módszerként való alkalmazása esetén közel azonos izoterma

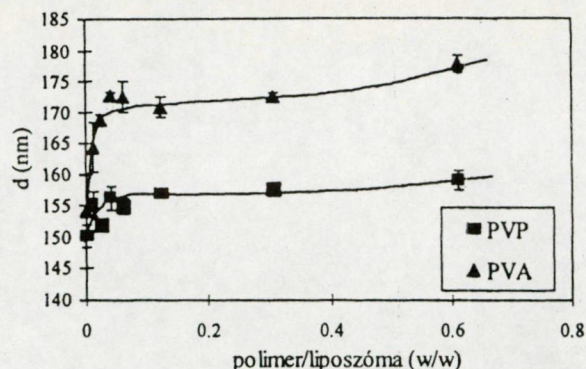
adatokat eredményez, és jelentős mennyiségű polimer kötődik meg a membrán felületén. A PVA sokkal jobban kötődik liposzómákhoz, mint a PVP, mivel a PVA-molekulák hidroxilcsoportjai jól kapcsolódhatnak a liposzóma felületéhez, tekintettel annak hidrofíl jellegére és a szerkezetében lévő OH-csoportokra, amelyek H-hídkötéseket alakíthatnak ki. A PVP-vel való adszorpciós kölcsönhatás mértéke gyengébb, az izoterma már 50 mg/g értéknél telítési tartományt mutat.



7. ábra: A PVA és a PVP adszorpciós izotermái. A protaminaggregációs és az ultracentrifugálás módszer összehasonlítása.

Fényszórásmérésekkel a polimeradszorpciós egyensúlyban is megvizsgáltuk a PVA-val és PVP-vel stabilizált liposzómadiszperziókat. Megállapítottuk, hogy a polimerek adszorpciója növeli a liposzóma átmérőjét. Az átmérőnövekedés mértéke PVA-val történt stabilizálás esetén 15-23 nm, míg PVP esetében 5-9 nm. Tehát az erősebb PVA-liposzóma kölcsönhatás az adszorpciós rétegvastagságból is adódik. Ez a különbség a semleges polimerek molekulatömegével is magyarázható. Mivel a PVA $M_r = 72000$ és a PVP $M_r = 40000$, ezért a nagyobb móltömegű PVA az adszorpciós rétegben nagyobb kiterjedésű és jól hidratált állapotban van (8. ábra).

A mikrokolorimetriás vizsgálatokat titrációs üzemmódban végeztük (TAM), melynek során a liposzómákhoz adagoltuk állandó keverés közben a PVA-t. A 9. ábrán láthatjuk azt az entalpogramot, amelyen a hőfejlődési ill. hőelnyelési (exoterm és endoterm) effektusok láthatók. Az ábrán az első csúcs exoterm a többi növekvő mértékben endoterm hőeffektusokat mutat. Ennek és a következő kísérleteknek az eredményei a 1. táblázatban találhatók, ahol a bruttó entalpiaváltozások mellett megadtuk a korrekciókhoz szükséges hígítási entalpiákat is a liposzómákra ill. a PVA-ra vonatkozóan.



8. ábra: Az átlagos vezikulaátmérő változása a polimer/liposzóma arány függvényében

Ezen korrekciók után az adszorpcióra vonatkozó entalpiaváltozás $\Delta H_{\text{ads}}(\text{mJ})$:

$$\Delta H_{\text{ads}} = \Delta H_{\text{tot}} - (\Delta H_{\text{dil}}(\text{PVA}) + \Delta H_{\text{dil}}(\text{liposzómák}))$$

ahol: ΔH_{tot} = bruttó (mért) entalpia,

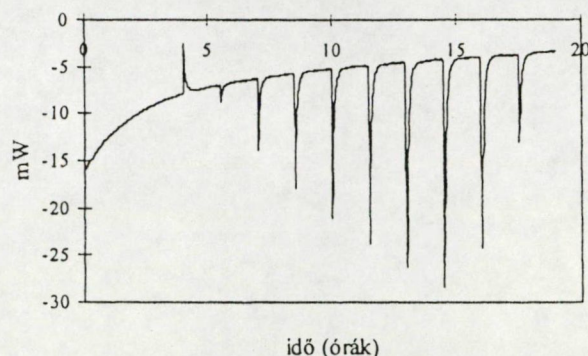
ΔH_{dil} = a komponensek hígítási entalpiái (PVA és liposzómák).

A ΔH_{ads} értékek az egyensúlyi PVA-koncentráció függvényében a 10a ábrán találhatók. Az ábrából kitűnik, hogy a korrekciók után a kölcsönhatás 0.04 g/100 ml PVA-koncentrációig exoterm, majd tovább növelve a koncentrációt endoterm hőeffektusokat kapunk. Méréseink hibája $\pm 2.1 - \pm 6.5 \%$ volt ($n=3$). A 10b ábrán a ΔH_{ads} értékeket 1 g liposzómára vonatkoztattuk az adszorbeált PVA mennyiségének függvényében. Az ábrából tehát megállapítható, hogy az izoterma kezdeti szakaszán (40mg/g adszorbeált mennyiségig) exoterm hőeffektusok regisztrálhatók. A 10c ábrán a differenciális adszorpciós entalpia függvénye látható, amely az egységnyi tömegű PVA adszorpciójakor létrejövő entalpiaváltozást mutatja. Ezek az adatok egyértelműen azt mutatják, hogy az adszorpció kezdeti tartományában erős exoterm kölcsönhatással számolhatunk a liposzómamembrán és a polimer molekulák szegmensei között. Ezek a kölcsönhatások elsősorban hidrogénhíd-kötések lehetnek. Nagyobb PVA-koncentrációknál endoterm kölcsönhatások vannak, amelyek arra utalnak, hogy a polimer beépül a liposzómális kettősréteg membrán-alkilláncai közé is, amelyek rendezettsége csökken. Úgy tűnik tehát, hogy az alkilláncok dezorientációja entrópiaszabályzott folyamat.

Dipalmitoil-foszfátidil-kolin (DPPC)- liposzómák szerkezetváltozásait tanulmányozták kisszögű röntgen- és neutronszerzés (SAXS és SANS)-vizsgálatokkal Bóta és mtsai²⁴⁻²⁸ az előátmenet

hőmérséklettartományában ($L_{\beta'}-P_{\beta'}$). Polimerek és liposzómák kölcsönhatását igazoló hasonló mérések azonban eddig még nem ismertek.

A liposzómamembránok szerkezetében bekövetkező változásokat röntgendiffrakcióval is követhetjük a kisszögű reflexiók tartományában. Következő dolgozatunkban már a kisszögű röntgenszerzés (SAXS) detektálására alkalmas Kratky-kamerával történő méréseinkről is beszámolhatunk. A diffrakciós felvételeket diffraktométerrel, 1-8 fok szögtartományban készítettük, ezek a 11. és 12. ábrán láthatók. A 11. ábrán a PVA-liposzóma rendszereket mutatjuk, amelyeknél az alapréteg lamellatávolsága (d_L) 4.71 nm és ezt a réteget vízgőzzel telítve minimális duzzadást, 4.85 nm-t kapunk. Ez a távolság lényegében a hidratált lipidmembrán szerkezetének felel meg („a” szekció) és egyezik az irodalomban említett dipalmitoil-foszfátidil-kolinból képzett liposzómamembránok lamellatávolságával ($d_L = 4.80$



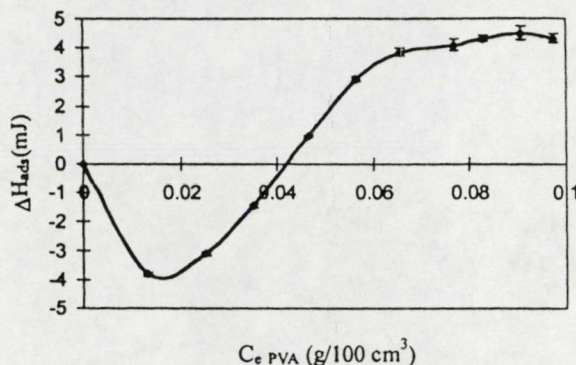
9. ábra: A liposzóma/PVA 0.04-0.4 (w/w) rendszerek entalpogramja, amelyből a ΔH_{tot} értékeket számítottuk a csúcsok alatti területek integrálásával.

PVA/ liposzó- ma (w/w)	ΔH_{tot} (mJ)	ΔH_{dil} (mJ) liposzó- mák (pufferrel titr.)	ΔH_{dil} (mJ) PVA (pufferbe adagolva)	$\Sigma \Delta H_{\text{dil}}$ (mJ) PVA+ liposzó- mák	ΔH_{ads} (mJ)
0.04	2.16	4.88	0.56	5.44	-3.28
0.08	-0.78	3.43	-1.10	2.33	-3.11
0.12	-2.99	1.23	-2.77	-1.54	-1.45
0.16	-4.69	-1.94	-3.69	-5.63	0.95
0.20	-6.16	-4.43	-4.66	-9.09	2.93
0.24	-7.32	-5.90	-5.00	-10.90	3.58
0.28	-8.46	-7.70	-4.87	-12.57	4.11
0.32	-9.46	-9.45	-4.34	-13.79	4.33
0.36	-7.99	-9.73	-2.76	-12.49	4.50
0.40	-3.81	-4.70	-3.44	-8.14	4.33

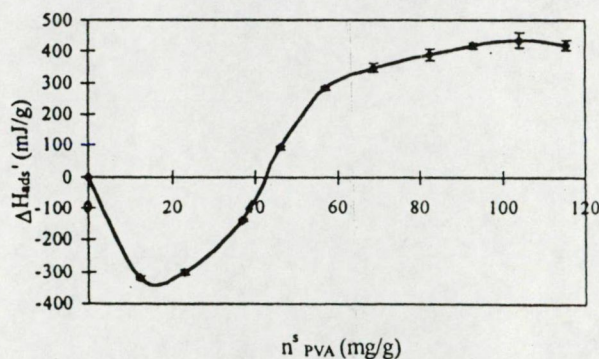
1. táblázat: a TAM-eredmények összefoglalása.

nm)^{35,36}. További kísérleteinkben a PVA-t adszorbeáltattuk 0.305 PVA/ liposzóma (w/w) arányban a liposzómák felületén. Az eredményeket bemutató rétegfelvétel az ábra „b” szekciójában található. A szárított rétegtávolság 3.94 nm ami arra utal, hogy az adszorbeált polimer tömöríti a membránszerkezetet, összekötve a membránban lévő molekulákat. Ezt bizonyítja az is, hogy vízgőzzel telítve ugyanezt a réteget továbbra is kapunk egy 3.57 nm-es (tömörített, rögzített) szerkezetet ill. a

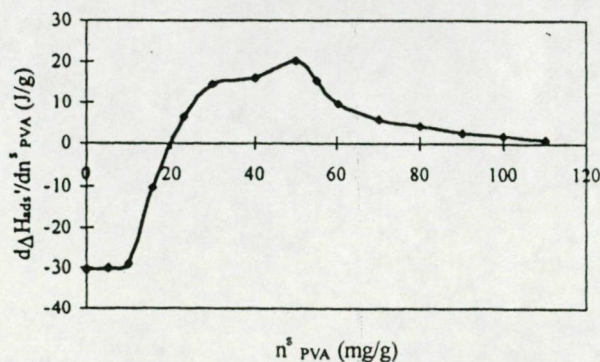
jó duzzadás következtében egy 6.13 nm-es éles csúcs szintén jelentkezik. Ez azt jelenti, hogy a PVA-val stabilizált membránszerkezetben lényegében két különböző fázis van jelen, az egyik a PVA által rögzített összekapcsolt membrán, a másik fázis pedig egy, a víz hatására kiterjedt membrán réteg. A 12. ábrán bemutatott PVP-liposzóma struktúrákra vonatkozó XRD-felvételek, lényegében ugyanezt az effektust mutatják. A PVP szintén száraz állapotban összetömöríti a kétrétegű membránt, majd vízgőzzel való telítés hatására ez a membrán a PVP-



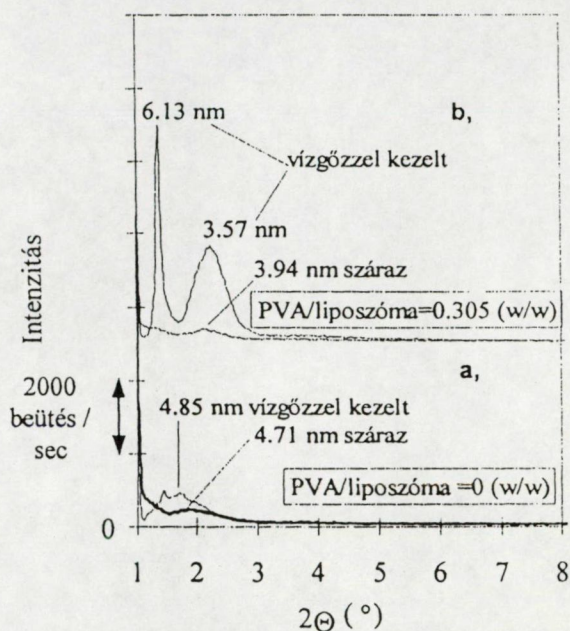
10a ábra: A ΔH_{ads} értékek exoterm kölcsönhatást jeleznek 0.04 g/100 cm³-ig. $C_e PVA$ adatokat az adszorpciós izotermából számoltuk ki (7. ábra).



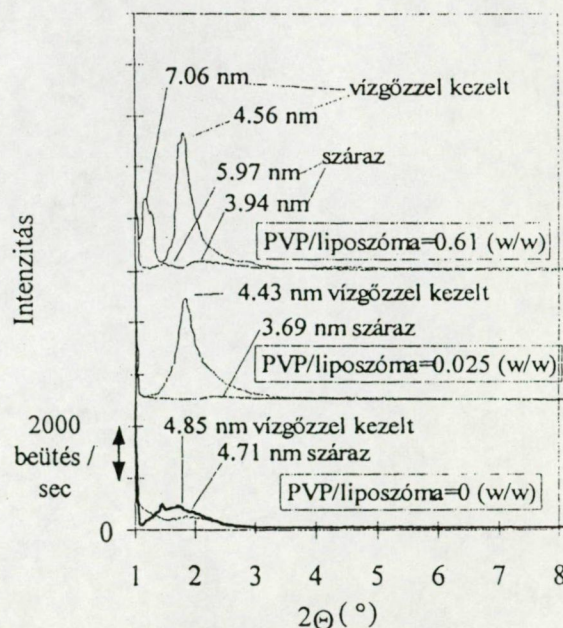
10b ábra: ΔH_{ads} értékek ábrázolása az 1 g liposzómára adszorbeált PVA-mennyiségének függvényében.



10c ábra: A 10b ábra derivált formája. Ez az összefüggés lehetőséget ad az 1 g PVA adszorpciójához felszabaduló energia kiszámítására.



11. ábra: A PVA-liposzóma rendszerek röntgen-diffraktogramjai (XRD). A „b” részben jól látható a két fázis elkülönülése vízgőz hatására.

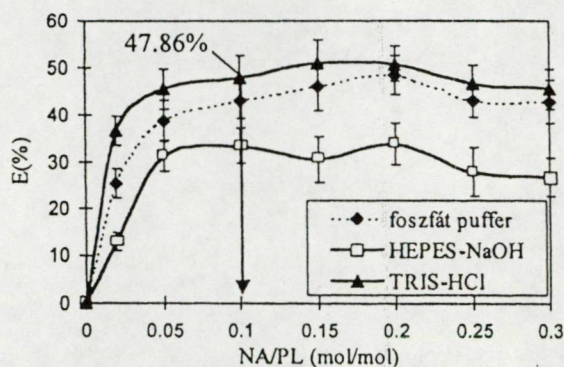


12. ábra: A PVP-t tartalmazó rendszerek diffraktogramjai.

vel együtt kiterjed 4.43 nm-re. A további PVP-adagolás ezt a kiterjedtséget megtartja, de újabb csúcs jelentkezik 7.06 nm-nél, ami a teljesen kiterjedt membránra jellemző. A két semleges polimerliposzóma kölcsönhatást összevetve az XRD-felvételekből kitűnik, hogy a PVP – az adszorpciós izotermáknál már bizonyított módon – gyengébben kötődik a kettősrétegű membránfelülethez, mivel a 0.025 ill 0.61 arányoknál is jelentkezik a 4.43 nm ill. 4.56 nm-es kiterjedt állapot. Ez az érték mindössze csak 3.57 nm a PVA esetén, annak erősebb kötődése miatt.

3. A hatóanyag bezárása és leadásának vizsgálata

A három különböző pufferrel végzett aktiválás-vizsgálatok eredményei a 13., 14. ábrákon

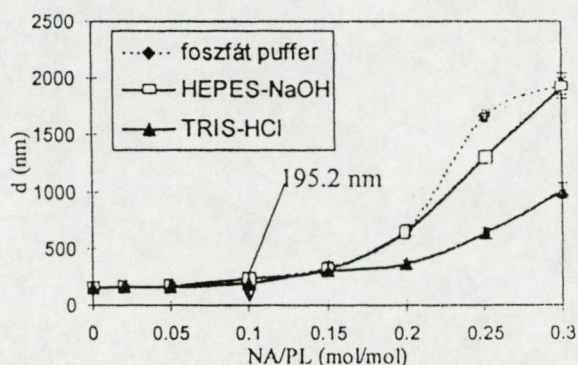


13. ábra: A narancs akridin bezárási hatékonyságának változása a NA/PL (mol/mol) arány növekedésének függvényében.

találhatók. Az eredményekből egyértelműen kitűnik, hogy a legoptimálisabb teljesítményt a Tris-HCl-al pufferolt rendszerek nyújtották. Ezek közül is a NA/PL = 0.1 molarányú összetételt találtuk a legmegfelelőbbnek a további, hatóanyag-leadás-vizsgálatokhoz. Ennél a mintánál kellően nagy bezárási hatékonyság mellett (47.86%) a legkisebb mértékű részecskeméret-növekedést (195.2 nm-re) tapasztaltuk.

A részecskeméret-növekedést valószínűleg az okozza, hogy a narancs-akridiniumionok pozitív töltésüknél fogva áttöltik a negatív felületi töltéssel rendelkező liposzómákat. A negatív töltés, mely a valódi kolloid rendszer stabilitását fenntartja semlegesítődik, és az ezt követő aggregáció így részecskeméret-növekedést eredményez. A pufferek minőségének hatása a bezárási hatékonyságra pedig azzal lehet összefüggésben, hogy a pufferrendszerekben lévő anionok milyen affinitással alkotnak ionpárt a narancs-akridiniumionokkal, gátolva így a membrántranszportot. A Hepes-

molekulák savas karakterüknél fogva sőt képezhetnek a bázikus NA-ionokkal az extraliposzómális térben, a Tris viszont szintén bázisként viselkedve nem tartja vissza azokat. Ezen két szélsőség között helyezkedik el a foszfát- pufferes rendszer, amelyben a hidrogén- és dihidrogénfoszfát- anionok kisebb méretűk és



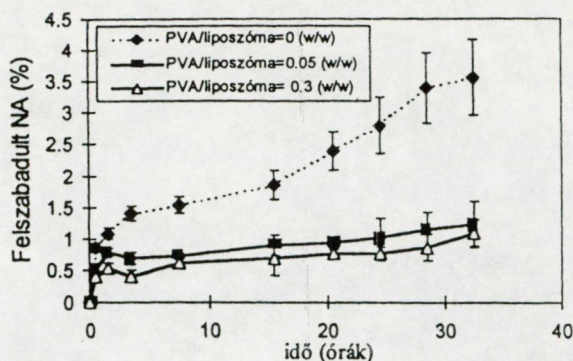
14. ábra: Az átlagos vezikula átmérő növekedése a NA/PL (mol/mol) függvényében.

a szervesen tulajdonságukból adódó kevesebb apoláris kölcsönhatás következtében kevésbé akadályozzák a NA liposzómákba jutását.

A 13., 14. ábrák alapján kiválasztott optimális NA/PL molarányú új minta elkészítése után ismét bezárási hatékonyságot mértünk, amely ezúttal igen jónak, 82.7%-nak adódott, és az átlagos vezikula- átmérő sem lett nagyobb, mint 193.4 nm. A be nem zárt NA eltávolítását szolgáló gélzsűrés utáni PL- analitika segítségével megállapítottuk, hogy a liposzómák koncentrációja foszfolipidekre nézve kb. 12 mM az eluatumban. A NA eredetileg bemért tömegének (m^0), a liposzómadiszperzió gélzsűrés előtti ($[PL_x]$) és utáni ($[PL_y]$) koncentrációinak, valamint az aktuális E%-nak és a géloszlopra felvitt (V_0) és eluált (V_1) térfogatoknak ismeretében a leadható tesztanyag tömege (m_{rel}) számítható:

$$m_{rel} = m^0 \cdot E\% \cdot V_1/V_0 \cdot [PL_y]/[PL_x]$$

A PVA 0.05 és 0.30 PVA/liposzóma (w/w) arányú hozzáadása okozta hígulást is beszámítva a Hanson®-féle cella 2 cm³-es donor fázisában 449.33 µg leadható NA volt liposzómába zárt állapotban. A hatóanyagleadás-vizsgálat végső eredménye a 15. ábrán látható. A PVA-mentes diszperziók az irodalmi adatoknak megfelelően tartották vissza a tesztanyagot³⁷, 30 óra után 3.57 %-át leadva az eredeti mennyiségnek. A PVA-t tartalmazó mintánál viszont egyértelműen kimutatható az adszorbeálódó PVA NA-t visszatartó hatása.



15. ábra: A narancsakridin kiáramlása a vizsgált liposzómákból.

Az eddigi vizsgálatok eredményeit megerősítik a PVA/liposzóma 0.05 és 0.30 (w/w) összetételű mintákra kapott adatok. A kisebb, 0.05 tömegarányánál tapasztalt NA-leadás mértéke (1.22 %) nem csökkent le jelentősen a jóval nagyobb, 0.30 tömegarányánál sem, ahol a NA-leadás mértéke 1.09 %. Ezen adatokra leginkább a DLS-eredményeknél célszerű itt magyarázatot keresnünk, ugyanis nagy PVA/liposzóma arányánál sem adszorbeálódik arányosan vastagabb polimerreteg a vezikulák felszínére, mint kicsinél. A hatóanyag leadásánál ezen rétegek egyformán tartják vissza a NA-t a PVA/liposzóma tömegarányától függetlenül.

A cikk szerzői köszönettel tartoznak a SZTE TTK Kolloidkémiai Tanszéke munkatársainak és az MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetében Török Zsoltnak segítségükért, valamint a műszerek használatáért. Ezt a munkát az OTKA is támogatta, (Project No. T-026579).

Összefoglalás

Neutrális polimerek (PVA és PVP) kölcsönhatását tanulmányoztuk liposzómás membránokon és megállapítottuk az adszorpciós izotermákból, hogy az erősebb hidrogénhid-kölcsönhatások miatt a PVA nagyobb mértékben adszorbeálódik, mint a PVP. A polimer-membrán kölcsönhatást több párhuzamos mérés technikával követtük és ezek közül a fényszórásmérés meggyőzött bennünket arról, hogy a PVA-val való stabilizálás során a liposzómák átmérője nagyobb, tehát az adszorpciós réteg vastagabb, mint a PVP-vel való kölcsönhatás esetén. A titrációs mikrokálorimetriás mérésekkel bizonyítottuk, hogy az adszorpciós izoterma kezdeti szakaszán exotermek a kölcsönhatások. A liposzómákból készített filmek XRD-vizsgálataiból kitűnik, hogy a vízgőz hatására történő duzzasztással igazolni tudjuk a

membránszerkezetben jelen lévő stabilizáló polimer szerkezetet befolyásoló hatását. Ezek szerint a PVA erősebben kötődve a membránhoz, a vízgőzzel való duzzasztás hatására kisebb kiterjedést enged meg a kettősréteg membránnak, mint a PVP. Az aktív-töltés-vizsgálatoknál megállapítottuk, hogy tesztanyagunk (NA) a Tris-HCl-al puffertolt közeg segítségével zárható liposzómákba a leghatékonyabb módon. A hatóanyag-leadás-vizsgálatok, szintén alátámasztották a polimerek stabilizáló hatását.

Interaction between liposomes and neutral polymers; effect of stabilizing on drug release.
Gy. Dékány, I. Csóka, I. Erős

Interactions of neutral polymers (PVA and PVP) with liposomal membranes were investigated, and based on the adsorption isotherms we have found out that PVA adsorbs in higher rate than PVP due to the stronger H-bridge bonds. The polymer-membrane interactions were detected by several measuring techniques and among them the dynamic laser light scattering convinced us that in case of stabilizing liposomes with PVA the average diameter of liposomes is larger, thus the layer adsorbed is thicker than when they are interacted with PVP. Titration microcalorimetric measurements were only made on the systems containing PVA proving the existence of exothermic interactions at the beginning of the adsorption process. XRD studies on films made of liposomes and swollen by exposure to water vapour proved the structure-modifying effect of the polymer present in the membrane. PVA allows smaller expansion to the membrane bilayer than PVP via swelling with water vapour. From remote loading experiments we have concluded that our test compound, acridine orange (marked as NA in the text) can be entrapped in liposomes most effectively in media buffered with Tris-HCl. The optimal NA/PL ratio was found to be 0.1. Drug release experiments also confirmed the stabilizing effect of the polymer.

IRODALOM

- 1 G.S. Canto, S.L. Dalmora, A.G. Oliveria
Drug development and Industrial Pharmacy, 25 (12), 1235-1239 (1999)
- 2 F.J. Koppenhagen, A.J.W.G. Visser, J.N. Herron, G. Storm, D.J.A. Crommelin
J. of Pharm. Sci., 87 (6), 707-714 (1998)
- 3 E.K. Wasan, A. Fairchild, M.B. Bally
J. of Pharm. Sci., 87 (1), 9-14 (1998)
- 4 Y. Tokudome, N. Oku, K. Doi, Y. Namba, S. Okada
Biochim. Biophys. Acta, 1279, 70-74 (1996)

- ⁵ G. Gregoriadis, A.C. Allison (ed): Liposomes in Biological Systems, pp 87-100 (1980)
- ⁶ G. Storm, D.J.A. Crommelin
Pharmaceutical Science & Technology Today, 1 (1), 19-31 (1996)
- ⁷ K. Jørgensen, C. Vermehren, O.G. Mouritsen
Pharm. Res., 16 (9) 1491-1493 (1999)
- ⁸ S. Leiseur, S. Beugin-Deroo, M. Ollivon
Proc. Symposium on "Lipid and Surfactant Dispersed Systems", Moscow, 26-28 September 1999
- ⁹ D.D. Lasic
Angew. Chem., (106) 1765-1779 (1994)
- ¹⁰ J.H. Fendler
Israel J. Chem., (25) 3-10 (1985)
- ¹¹ M.N. Jones
Current Opinion in Colloid & Interface Science, 1:91-100 (1996)
- ¹² M. Mercadal, J.C. Domingo, J. Petriz, J. Garcia, M.A. de Madariaga
Biochim. Biophys. Acta, 1418, 232-238 (1999)
- ¹³ M.C. Woodle, D.D. Lasic
Biochim. Biophys. Acta, 1113, 171-199 (1992)
- ¹⁴ V.P. Torchilin, M.I. Papisov
J. Liposome Res., 4, 725-739 (1994)
- ¹⁵ H. Takeuchi, H. Kojima, T. Toyoda, H. Yamamoto, T. Hino, Kawashima Y.
Eur. J. Pharm. Biopharm., 48 (2) 123-9 (1999)
- ¹⁶ H. Takeuchi, H. Yamamoto, T. Niwa, T. Hino, Kawashima Y.
Pharm. Res., 13 (6) 896-901 (1996)
- ¹⁷ F.L. Grohmann, F. Csémpesz, M. Szögyi
Colloid Polymer Sci., 276, 66-71 (1998)
- ¹⁸ F.L. Grohmann, M. Szögyi, F. Csémpesz
Acta Pharm. Hung., 67 (6) 267-72 (1997)
- ¹⁹ G. Rouser, S. Fleischer, A. Yamamoto
Lipids 5, 494-496 (1970)
- ²⁰ Stern Lecithin & Soja GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany (company report) Food Tech Europe September 122-125 (1994)
- ²¹ A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins
J. Mol. Biol., 13, 238 (1965)
- ²² R.R.C. New (ed): Liposomes: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, pp 127-128 (1990)
- ²³ J.G. Pritchard (ed): Poly(vinyl alcohol) Basic properties and uses, polymer monographs volume 4 pp7 (1970)
- ²⁴ A. Bóta, M. Kriechbaum, P. Laggner
Models in Chemistry, 134 (2-3), 299-315 (1997)
- ²⁵ T. Drucker, A. Bóta, S. Borbély
Physica B 276-278 (2000) 503-504
- ²⁶ A. Bóta, M. Kriechbaum
Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 141 (1998) 441-448
- ²⁷ A. Bóta, T. Drucker, M. Kriechbaum, Zs. Pálfi, G. Réz
Langmuir 15 (1999) 3101-3108
- ²⁸ A. Bóta, T. Drucker, M. Kriechbaum
Olaj, Szappan, Kozmetika 47 (5) 244-250 (1998)
- ²⁹ E.C.A. van Winden, D.J.A. Crommelin
Eur. J. Pharm. Biopharm., 43 (1997) 295-307
- ³⁰ M.J. Fonseca, E.C.A. van Winden, D.J.A. Crommelin
Eur. J. of Pharm. Biopharm., 43 (1997) 9-17
- ³¹ S. Schuldiner, H. Rottenberg, M. Avron
Eur. J. Biochem., 25 (1972) 64-70
- ³² L.D. Mayer, L.C.L. Tai, M.B. Bally, G.N. Mitilenes, R.S. Ginsberg, P.R. Cullis
Biochim. Biophys. Acta, 1025 (1990) 143-151
- ³³ G. Haran, R. Cohen, L.K. Bar, Y. Barenholz
Biochim. Biophys. Acta, 1151 (1993) 201-215
- ³⁴ A.A. Yaroslavov, V. Y. Koulikov, E.G. Yaroslavova M.O. Ignatiev, V.A. Kabanov
Langmuir, 14, 5999-6004 (1998)
- ³⁵ D. Fennel Evans, Håkan Wennerström (ed): The colloidal domain where physics, chemistry, biology, and technology meet, pp 315-324 VCH Publishers, Inc. (1994)
- ³⁶ J.F. Nagle, R. Zhang, S. Tristam-Nagle, W. Sun, H.I. Petrache and R.M. Suter
J. Biophys., (70) 1419-1431 (1996)
- ³⁷ X. Li, D. Crabal-Lilly, A. S. Janoff, W. R. Perkins
J. Liposome Res., 10(1), 15-27 (2000)

Szeged, SzTE, Gyógyszer technológiai Intézet
Érkezett: 2001. II. 2.
Közlésre elfogadtuk: 2001. V. 3.