

Karakterisering af lægemiddelstof-liposom-vekselvirkninger i et kapillar

Liposomer er små vesikler, bestående af et dobbeltlag af fosfolipider, som omslutter et vandigt hulrum. I farmaceutisk forskning anvendes liposomer som model for biologiske membraner og som drug delivery-systemer. Kapillarelektroforese er velegnet til at opnå indsigt i lægemiddelstoffers vekselvirkninger med liposomer

Af **Jesper Østergaard, Ulrik Franzen, Eva Horn Møller, Lene Jørgensen, Claus Larsen & Henrik Jensen, Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet**
E-mail: joe@farma.ku.dk

Liposomer har i årevis været genstand for stor interesse i de farmaceutiske og biologiske videnskaber. Det skyldes især liposomers lighed med cellemembraner og deres anvendelse i drug delivery-systemer, hvor modificerede liposomer kan bidrage til transport af lægemiddelstoffer hen til det ønskede virkningssted i kroppen.

Navnet liposom oprinder af betegnelsen "fedt legeme", men der er snarere tale om en hul struktur opbygget af fosfolipider. På grund af fosfolipidernes særlige struktur har de tendens til at danne dobbeltlag i vandige opløsninger. Her vender fosfolipidernes hydrofile dele udad mod den vandige fase, mens de lipofile dele samles i dobbeltlagets midte (Figur 1).

Liposomer kan bestå af et eller flere lipiddobbeltlag adskilt af vandfyldte hulrum. Alkylkæderne i fosfolipiderne er typisk 14 til 18 kulstofatomer lange, og diameteren på unilamellære liposomer med kun ét dobbeltlag kan variere i størrelsesordenen 20 nm til 1 µm [1]. Liposomer med forskellig størrelse, ladning og

Figur 1. Skematisk repræsentation af fosfolipiderne 2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (POPC) og 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphat (DPPA), samt et unilamellært liposom. Lægemiddelstoffer, skitseret med rødt, kan befinde sig i liposomernes vandige hulrum, i lipiddobbeltlaget eller adsorberet til liposomernes overflade. Lægemiddelforskning 2007.

membranpermeabilitet kan fremstilles afhængigt af valget af lipidsammensætning.

Liposomer som lægemiddeltransportører

Lægemiddelstoffer kan indkapsles i liposomernes vandige hulrum, indbygges i lipidmembranen eller adsorberes til liposomets overflade (Figur 1). Lægemiddelstoffets placering vil primært afhænge af dets fysiske-kemiske egenskaber; primært lipofilitet, ladning, størrelse og grænsefladeaktivitet. Når lægemiddelstoffer er lejret i hulrummet, frigives de typisk ved, at liposomet nedbrydes på virkningsstedet i kroppen. Desuden

kan forbindelser, som er omsluttet af liposomets membran, undslippe ved diffusion over lipiddobbeltlaget. Hastigheden for frigivelsen er afhængig af lægemiddelstoffets egenskaber og i særdeleshed af membranens rigiditet, som igen afhænger af den anvendte fosfolipidsammensætning.

Liposomernes evne til at transportere lægemiddelstoffer gør dem til et interessant udgangspunkt for lægemiddelformuleringer. Liposomer kan indgives intravenøst, intramuskulært eller oralt, og de kan anvendes med henblik på at reducere et lægemiddelstofs toksicitet, øge dets optagelse i kroppen eller forlænge virkningen via en langsom og kontrolleret frigivelse af det aktive stof fra liposomet. Der findes i dag flere markedsførte lægemidler baseret på liposomteknologi; eksempelvis med indholdsstofferne daunorubicin, doxorubicin, amphotericin B og cytarabin [2].

Model for membraner

Liposomers lighed med biologiske membraner (cellemembraner) har gjort dem til meget anvendte modelsystemer i farmaceutisk forskning [3, 4]. Fordelingskoefficienten er en hyppigt anvendt parameter i forbindelse med forudsigelse af et lægemiddelstofs transport over fx tarmvæg og hud samt lægemiddelstoffers distribution i kroppen.

Fordelingskoefficienter udtrykkes traditionelt via lægemiddelstoffets fordeling mellem n-oktanol og vand, hvilket i dag er alment accepteret som referencesystem og bruges som en skala for lægemiddelstoffers lipofilitet. Imidlertid er der indikationer på, at bedre korrelationer kan opnås i liposomsystemer. Læge-

SVINGMØLLE MM 400

Allround mølle til de mindre prøver, bl.a. DNA/RNA og XRF analyser. Tilbereder op til 20 prøver samtidigt.

SKANLAB

Tlf: 4738 1014 · www.skanlab.com



Vind en Mercedes sportsvogn med RETSCH. Læs mere på www.retsch.com/grandprix

middelstoffers evne til at trænge over et liposoms lipidmembran og deres fordeling i en liposomholdig opløsning mellem lipidfasen og den vandige fase ved ligevægt kan derfor også bruges til at forudsige lægemiddelstoffers mulighed for at trænge gennem huden og tarmvæggen samt deres tendens til at blive indlejret i fedtvæv [3]. Hvis et lægemiddelstof har meget ringe evne til passere liposomernes lipidmembraner – og dermed cellemembraner og barrierer i organismen – vil stoffets mulighed for at komme ind i kroppen og efterfølgende nå sit virkningssted være meget ringe. Relativt simple forsøg med liposomer kan således hjælpe med til at evaluere nye potentielle lægemiddelstoffers chance for at blive til et færdigt lægemiddel.

Karakterisering af vekselvirkninger ved CE og EKC

En lang række analytiske værktøjer, omfattende fx ligevægtsdialyse, potentiometrisk titrering, mikrokolorimetri, fluorescensspektroskopi og NMR, er nødvendige for at kunne karakterisere liposomer, lægemiddelstof-liposomvekselvirkninger og liposombaserede drug delivery-systemer. Separationsbaserede metoder har fået en stadig større rolle i forbindelse med karakterisering af liposomers vekselvirkninger [5, 6]. På Institut for Farmaci og Analytisk Kemi (Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet) har vi gennem længere tid arbejdet med elektrodrive separationsmetoder til karakterisering af lægemiddelstoffers interaktioner. Kapillarelektroforese (CE) er en analytisk-kemisk teknik, som traditionelt anvendes til at separere komplekse blandinger baseret på indholdsstoffernes ladning og størrelse. Metoden er relativt hurtig og kræver meget små prøvemængder. Disse egenskaber, sammenholdt med at separationer i CE ikke beror på en stationærfase, gør CE til et attraktivt format til undersøgelse af lægemiddelstof-liposomvekselvirkninger.

Grundlæggende er der beskrevet to formater i forbindelse med analyt-liposomvekselvirkninger ved CE: elektrokinetisk-kromatografi og præligevægts-CE udført i frontalanalyse opsætning. Liposom-elektrokinetisk-kromatografi (EKC) [6, 7], som er anvendt i de fleste liposomstudier er analogt til micellar- og mikroemulsionselektrokinetisk-kromatografi [8]. Ved EKC er liposomerne suspenderet i separationsbufferen. Efter injektion af prøve samt påsætning af spænding over kapillaret vil analytterne vandre gennem kapillaret, hvor de vil tilbringe en del af tiden i bufferfasen henholdsvis i liposomfasen.

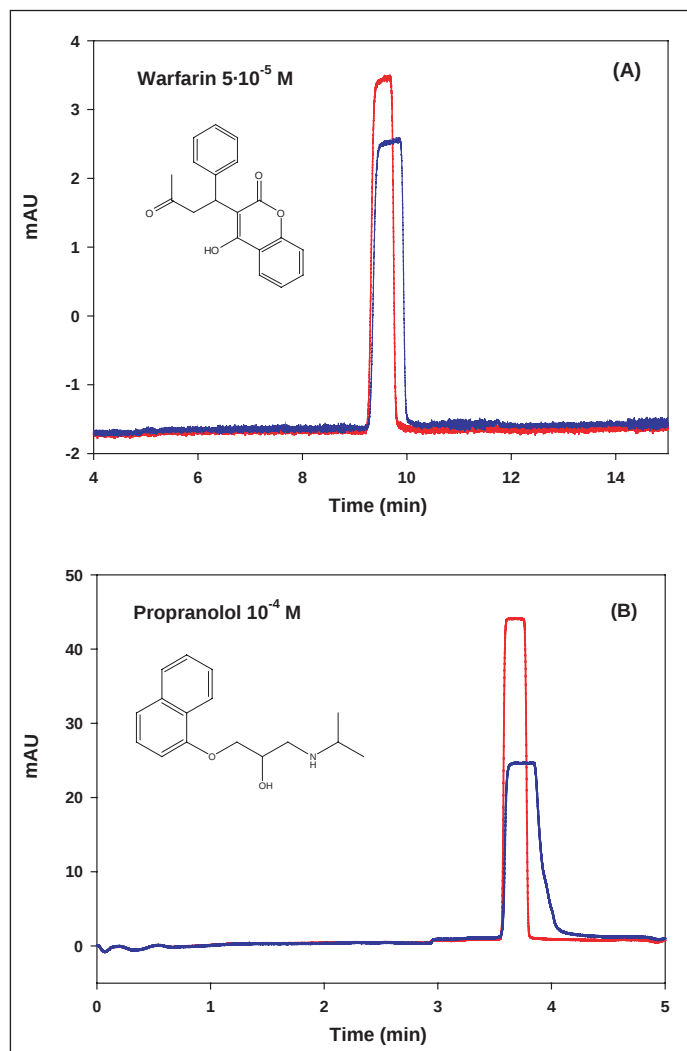
Liposomerne, som bevæger sig gennem kapillaret med en hastighed forskellig fra bufferfasen, vil have samme funktion som den stationære fase i HPLC og kaldes derfor for den pseudo-stationære fase. Separation af analytterne sker således både på baggrund af deres migrering i bufferfasen og forskellig fordeling til liposomfasen. Ændring i analytternes migreringstid (elektroforetisk mobilitet), som følge af tilsætning af liposomer til CE bufferen, udnyttes til at detektere og kvantificere fordeling til (vekselvirkning med) liposomfasen.

Ud fra disse mobilitetsændringer kan retentionsfaktoren - og med kendskab til fasevolumenforholdet også fordelingskoefficienten bestemmes under passende betingelser. Liposom-EKC er velegnet til karakterisering af svage vekselvirkninger på grund af den høje separationseffektivitet i CE og EKC. En ulempe forbundet med at have liposomerne suspenderet i separationsbufferen er et dårligt signal-støjforhold, idet liposomerne afhængigt af deres størrelse i større eller mindre grad vil sprede det indsendte UV-lys.

Frontalanalyse-CE

Frontalanalyse-CE [9-11] er grundlæggende forskellig fra EKC-formatet, idet separationsbufferen ikke indeholder liposom og analyt (lægemiddelstof). Prøven indeholder til gengæld begge de interagerende specier, samt efter opnåelse af ligevægt, læge-

middelstof associeret med liposomfasen. Ved introduktion af et passende stort prøvolumen iagttages "plateau"-toppe som vist i elektroferogrammerne i Figur 2 i stedet for de sædvanlige karakteristiske smalle og skarpe toppe.



Figur 2. Elektroferogrammer. Fordeling af lægemiddelstoffer (A) warfarin og (B) propranolol til 80:20 mol% POPC/DPPA liposomer (A): 2,5 mg lipid/mL, (B): 0,25 mg lipid/mL i 10 mM HEPES-buffer tilsat 50 mM KCl. Røde UV-signaler er standardprøver uden liposom og blå UV-signaler er lægemiddelstof blandet med liposomopløsning. Højden af UV-signalerne er proportionale med koncentrationen af lægemiddelstof i den vandige fase. Det vil sige, at jo større reduktionen af UV-signal er for lægemiddelstoffet ved tilstedeværelse af liposomer desto større affinitet har stoffet for liposomfasen. CE betingelser: Ikke-coated silicakapillar (48,5 cm x 50 μ m i.d., 40 cm effektiv længde), injektion: hydrodynamisk i 20 s (50 mbar), kørselsbuffer: 10 mM HEPES pH 7,40 tilsat 50 mM KCl, spænding: +15 kV (~45 μ A), kapillartemperatur indstillet til 25°C, detektion: 308 nm (warfarin) og 214 nm (propranolol).

Det relativt store prøvolumen, 20 – 100 nL, afhængigt af kapillardimensionerne, medfører, at bindingsligevægten opretholdes under separationen af frit lægemiddelstof fra liposomzonen. For en detaljeret gennemgang af frontalanalyse-CE princippet henvises til [10, 11]. Resultatet af et frontalanalyse-forsøg ses i Figur 2: Højden af plateauet er proportional med koncentrationen af frit lægemiddelstof i prøven indeholdende lægemiddelstof og liposom. Efterfølgende analyse af en standard med samme totale lægemiddelstofkoncentration som prøvens tillader umiddelbart bestemmelse af den fri fraktion af lægemiddelstof i liposomsuspensionen og dermed estimering af liposom-buffer-fordelingskoefficienten. Elektroferogrammerne i Figur 2A og B illustrerer således fordelingen af henholdsvis negativt og positivt ladet lægemiddelstof til 80:20 mol% POPC/

DPPA liposomer ved pH 7,4 og 25°C [Franzen *et al.* Manuskript under udarbejdelse].

På tilsvarende vis er lipofiliteten af en række lægemiddelstoffer bestemt i form af tilsyneladende fordelingskoefficienter. I denne serie af forsøg er det endvidere fundet, at resultaterne genereret ved CE stemmer nøje overens med resultater opnået ved hjælp af ligevægtsdialyse af lægemiddelstof-liposomsuspensionerne. Anvendelse af CE i stedet for eksempelvis ligevægtsdialyse og ultrafiltrering er forbundet med et lavere tidsforbrug og mindre prøvevolumina. Forudsætningerne for anvendelse af frontalanalyse-formatet er hurtig bindingskinetik, at lægemiddelstoffet kan separeres fra liposomerne og at lægemiddelstoffet kan detekteres, typisk ved UV-spektrofotometri. Studierne præsenteret i Figur 2 er udført med netto negativt ladede liposomer, hvilket efterligner det overskud af negativ ladning som cellemembraner har. Negativt ladede liposomer besidder en fordel i forhold til anvendelse af de sammensmeltede silicakapillarer som er standard i CE, fordi de ikke absorberer til kapillærvæggen. Adsorption af liposom til kapillærvæggen kan være ødelæggende for affinitetsbestemmelserne og kørselsbetingelserne må derfor optimeres for hvert liposom-buffersystem.

Små prøvemængder

Muligheden for at håndtere meget små volumenmængder af et lægemiddelstof i liposomsystemer ved anvendelse af frontalanalyse-CE forventes, ud over bestemmelse af fordelingskoefficienter, at kunne benyttes i studier af liposombaserede drug delivery-systemer. Forudsat at følsomheden er høj nok, den evigt tilbagevendende akilleshæl for CE, vil inkorporeringseffektivitet samt lægning af lægemiddelstof fra liposom-

formuleringer over tid kunne studeres ved frontalanalyse-CE. Dette er potentielt af stor interesse i formuleringsudvikling og i færdigvarekontrol, hvor kun ganske små prøvemængder vil være tilgængelige. I en række igangværende studier undersøges det appetitregulerende peptidhormon ghrelins interaktion med 3 eksperimentelle liposomformuleringer ved hjælp af CE med henblik på at opklare formuleringernes indflydelse på den observerede farmakokinetik. På grund af ghrelins høje pris vil de fleste andre metoder være udelukket til udførelse af disse interaktionsstudier. Alt i alt indikerer de initiale erfaringer med håndtering af liposomer i kapillarer, at CE vil være et attraktivt format for karakterisering af liposomer og deres vekselvirkninger med lægemiddelstoffer.

Referencer:

- [1] Lasic, D. D., *Biochem. J.* 1988, 256, 1-11.
- [2] Torchillin, V. P., *Nature Reviews* 2005, 4, 145-160.
- [3] Avdeef, A., *Curr. Topics Med. Chem.* 2001, 1, 277-351.
- [4] Mouritsen, O. G., Andersen, H. K., Andersen, J. S., Davidsen, J., Nielsen, L. K., Jørgensen, K., in: Testa, B., van de Waterbeemd, H., Folkers, G., Guy, R. (Ed.), *Pharmacokinetic optimization in drug research. Biological, physicochemical, and computational strategies*, Weinheim, 2001, pp. 33-49.
- [5] Gómez-Hens, A., Fernández-Romero, J. M., *Trends Anal. Chem.* 2006, 25, -167.
- [6] Wiedmer, S. K., Jussila, M. S., Riekkola, M.-L., *Trends Anal. Chem.* 2004, 23, 562-582.
- [7] Bilek, G., Kremser, L., Blaas, D., Kenndler, E., *J. Chromatogr. B* 2006, 841, 38-51.
- [8] Østergaard, J., *Anal. Sci.* 2007, 23, 489-492.
- [9] Østergaard, J., Jensen, H., *Dansk Kemi* 2004, 85, 32-35.
- [10] Østergaard, J., Heegaard, N. H. H., *Electrophoresis* 2003, 24, 2903-2913.
- [11] Østergaard, J., Heegaard, N. H. H., *Electrophoresis* 2006, 27, 2590-2608.

Nyt fra... Nature

Vandrensning ved direkte osmose

Rent vand er et stigende globalt problem som *nature* havde som tema 20. marts. En teknik der er på vej er det omvendte af den gammeldags "Omvendt osmose", der i princippet går ud på at trykke rent vand ud af en saltopløsning (*in casu* havvand) ved hjælp af højt tryk og en passende membran. Det omvendte af omvendt osmose må vel kunne kaldes "direkte osmose".

Osmose kræver en gradient henover en membran. Den etableres ved at opløse CO₂ og NH₃ i rent vand indtil man

har en passende høj koncentration af NH₄CO₃. Nu siver vand fra saltvand ind i denne opløsning ved direkte osmose. Efter en passende tid afbrydes processen. Opløsningen af NH₄CO₃ opvarmes til 58° hvorved saltet spaltes til CO₂ og NH₃ og rent vand bliver tilbage.

nature: "purification with a pinch of salt" 20. March 2008

ThP



**Få mailbesked,
når der er nyheder på
dit fagområde**

Tilmeld dig på www.techmedia.dk

TechMedia

www.pumpegruppen.dk Tlf. +45 45 93 71 00
Fax +45 45 93 47 55



info@pumpegruppen.dk

Velkommen i familien

PUMPEGRUPPEN A/S byder Alldos velkommen i Grundfos familien og introducerer samtidig 2 nye modeller i den velkendte DIGITAL DOSING-serie. GRUNDFOS ALLDOS dækker nu hele området 0,002-3000l/h, og 2-200 bar.

PUMPE
GRUPPEN A/S