

Die *in vitro* und *in vivo* Stabilität des Einschlusses von Methotrexat in negativ geladenen Liposomen nach Sterilfiltration

The *in vitro* and *in vivo* Stability of the Entrapment of Methotrexate in Negatively Charged Liposomes after Sterile Filtration

J. Freise, P. Magerstedt und F. W. Schmidt

Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie (Direktor: Prof. Dr. F. W. Schmidt)
im Department Innere Medizin der Medizinischen Hochschule Hannover

Z. Naturforsch. **34 c**, 114–119 (1979) ; eingegangen am 16. August/10. November 1978

Methotrexate, Liposomes, Endocytosis, Cell Membrane

The preparation of sterile artificial liposomes (phosphatidylcholine: cholesterol: dicetylphosphate=5:5:1) by Millipore® filtration is described. Conditions for storing liposome entrapped Methotrexate have been found which allow storage of the drug in the entrapped form over a period of at least 4 months. It is shown that intravenously injected liposome entrapped Methotrexate is retained for at least 15 hours in the particulate form. During this time no free Methotrexate is detectable in the blood.

Einleitung

Liposomen – 0,1 bis 2 µm große Lipidvesikel – können mit verschiedenen groß- und kleinemolekularen Substanzen wie Enzymen, Hormonen, Zytostatika oder Chelatbildnern beladen werden. Nach systemischer Applikation und intrazellulärer Einschleusung der Liposomen durch Endozytose können incorporierte Pharmaka intrazellulär angereichert werden [1, 2].

Erste erfolgreiche Behandlungen von Patienten mit Enzymdefektkrankheiten [3–5] und Tumoren [6] zeigen die großen Möglichkeiten, die von Liposomen als Träger für Medikamente zu erwarten sind.

Der vollständige Einschluß von Pharmaka währt nur wenige Tage. Dies ist für Langzeitversuche und besonders in Hinblick auf eine spätere laufende Fertigung zur therapeutischen Anwendung nicht akzeptabel, da die Präparation, die Kontrolle und quantitative Bestimmung des Einschlusses 2 Tage dauern. Eigene tierexperimentelle Testreihen waren entsprechend langwierig [7].

Am Beispiel von Methotrexat, einem Folsäureantagonisten und weit verbreitetem Zytostatikum prüften wir die Haltbarkeit des Einschlusses in negativ geladenen Liposomen unter verschiedenen Lagerbedingungen und zusätzlich nach intravenöser Injektion bei Mäusen *in vivo*. Da Langzeitversuche in tierexperimentellen Studien sterile Liposomenpräpa-

rationen erfordern, untersuchten wir, wie weit durch eine Filtration bei 0,22 µm Porengröße eine sterile Emulsion von liposomenverkapseltem Methotrexat hergestellt werden kann.

Methoden

1. Liposomenpräparation

82,5 mg Phosphatidylcholin (Eilecithin), 43,3 mg Cholesterin plus 3 µCi [¹⁴C]Cholesterin und 12,3 mg Dicetylphosphat (Molverhältnis 5 : 5 : 1) wurden in 5 ml Chloroform/Methanol (v/v = 1/1) gelöst und im Rotationsverdampfer zu einem dünnen Lipidfilm an der Gefäßwand eingengt. Nach Zugabe einer wäßrigen Lösung von Methotrexat (25 mg Methotrexat = MTX) plus 30 µCi [³H]MTX in 5 ml 5 mM Natriumphosphatpuffer, 50 mM Natriumphosphatpuffer oder 50 mM Natriumphosphatpuffer mit 100 mM NaCl, jeweils pH 7,3, bilden sich vesikelartige Lipidmembranen, zwischen die das Medikament eingeschlossen wird. Die Emulsion der Lipide erfolgte durch Rotation und Beschallung für 3 × 15 sec mit 50 W bei Thermostabilisation auf 65 °C. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurden die MTX-haltigen Liposomen chromatographisch an Sepharose 6 B vom freien, nicht eingeschlossenen MTX abgegrenzt. Säule: 600 × 25 mm, 72 ml/h, 3,6 ml/Fraktion. Rechromatographie mit einer kleineren Säule: 350 × 18 mm, 30 ml/h, 2,5 ml/Fraktion.

2. Präparation von sterilen MTX-haltigen Liposomen

Die MTX-haltigen Liposomen wurden 48 h im Brutschrank bei 37 °C belassen und dann aerob und

Sonderdruckanforderungen an Dr. med. Jürgen Freise, Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie, Medizinische Hochschule Hannover, Karl-Wiechert-Allee 9, D-3000 Hannover 61.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

anaerob auf Blutagar- und Endoplaten ausgestrichen. Nach 24 h wurden eventuell gewachsene Kulturen in der Koloniform und im mikroskopischen Präparat beurteilt. Beim Nachweis von gram-negativen Stäbchen wurde eine biochemische Differenzierung mit der bunten Reihe nach Rosch II angeschlossen. Anschließend wurde jede Liposomenpräparation in zwei gleiche Mengen aufgeteilt und jeweils durch Millipore-Filter ($0,22\ \mu\text{m}$) unter gering manuell verstärktem Druck gefiltert und danach nochmals der Sterilitätsprüfung unterzogen. Vor und nach dem Filtrieren wurde jeweils durch Rechromatographie der Anteil des eingeschlossenen und des freien $[^3\text{H}]$ -MTX bestimmt und die Liposomen elektronenmikroskopisch beurteilt.

3. Bestimmung der Lagerstabilität *in vitro*

Die Liposomen mit dem eingeschlossenen MTX wurden über 120 Tage in Puffern mit verschiedener Molarität (5, 50, 150 mM) bei 4°C und 20°C Lagertemperatur und mit und ohne Zusatz von 1% Rinderalbumin, 8% Mäuseserum und 20% Humanserum gelagert.

Albumin bzw. Serum wurde erst der fertigen Liposomenfraktion zugesetzt. Der Anteil des eingeschlossenen MTX wurde anfangs in 2-tägigen, später in 1–3-wöchigen Abständen durch die Verteilung des $[^3\text{H}]$ MTX in der Rechromatographie bestimmt. Vor der Rechromatographie wurde einem Teil der gelagerten Liposomen Triton X-100 (9 Teile Liposomen-MTX-Lösung und 1 Teil Triton X-100) als Detergens zur Zerstörung der Liposomen zugesetzt, um zu gewährleisten, daß das verkapselte $[^3\text{H}]$ MTX vollständig freisetzbar war.

4. *In vivo* Stabilität des Einschusses von MTX in Liposomen

1, 3, 6 und 15 h nach intravenöser Injektion von 0,5 ml liposomenverkapselter MTX-Lösung in die Schwanzvene wurden jeweils 6 Mäuse (NMRI-Mäuse, SPF-Zucht = spez. pathogenfreie Kolonizucht, Geschlecht: weiblich, Gewicht 30–35 g, Herkunft: Zentralinstitut für Versuchstiere Hannover, Kostform: Altromin) mit Äther betäubt und durch Cavapunktion entblutet. Zu jedem Zeitpunkt wurde aus quantitativen Gründen das Blut von 3 Tieren vereinigt und die $[^3\text{H}]$ - und $[^{14}\text{C}]$ Radioaktivität im Blut bestimmt. Die Chromatographie des Plasmas ergab den prozentualen Anteil der $[^3\text{H}]$ - und $[^{14}\text{C}]$ -

Radioaktivität, der an Liposomen gebunden war oder in freier Form vorlag.

Material und Geräte

Methotrexat: Methotrexat-Trockenampullen der Fa. Lederle zur intrathekalen Injektion, 50 mg. Cyanid GmbH, München.

Cholesterin: Cholesterin p. a., Fa. Serva, Heidelberg.

Phosphatidylcholin: Lecithin aus Eiern, Fa. Merck, Darmstadt.

Dicetylphosphat: Fa. Sigma, St. Louis, USA.

$[^3\text{H}]$ MTX: 250 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$, Fa. Amersham Buchler, Buckinghamshire.

$[^{14}\text{C}]$ Cholesterin: 50 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$, Fa. Amersham Buchler, Buckinghamshire.

Ultraschall: Sonifer B 12, Fa. Branson Sonic Power Comp., Danburg, USA.

Sterilfilter: Millex Disposable Filter Unit. $0,22\ \mu\text{m}$ Millipore, S. A. Buc., France.

Ergebnisse

Liposomenpräparation

Die Verteilung der Radioaktivität von $[^3\text{H}]$ MTX und $[^{14}\text{C}]$ Cholesterin nach der Ultraschallbehandlung der Liposomen wird in Abb. 1 gezeigt. $[^{14}\text{C}]$ -Cholesterin wurde vollständig in die Liposomenmembran eingebaut. $[^3\text{H}]$ MTX wurde zu weniger als 10% in den Liposomen eingeschlossen. Nach chromatographischer Trennung war freies $[^3\text{H}]$ MTX vom in Liposomen verkapseltem $[^3\text{H}]$ MTX vollständig abgegrenzt.

Bei den drei gewählten Pufferstärken ergab sich ein unterschiedlicher Einschluß. Die Konzentration des verkapselten Methotrexat betrug in den vereinten Fraktionen 20–23 (14,4 ml) in 5 mM Na-Phosphat-Puffer ($n=8$) $170 \pm 60\ \mu\text{g}/\text{ml}$, in 50 mM Na-Phosphat-Puffer ($n=7$) $140 \pm 35\ \mu\text{g}/\text{ml}$ und in 50 mM Na-Phosphat-Puffer mit 100 mM NaCl ($n=3$) $130 \pm 20\ \mu\text{g}/\text{ml}$. Die Unterschiede waren im Student-t-Test jedoch nicht signifikant. Die Cholesterinkonzentration war in allen 3 Gruppen gleich und betrug 2,4 mg/ml.

Abb. 2 zeigt die Freisetzung der Radioaktivität von $[^3\text{H}]$ MTX und $[^{14}\text{C}]$ Cholesterin aus den Liposomen durch Triton X-100.

$[^3\text{H}]$ MTX wurde schon in einer 0,5-prozentigen Triton X-100-Lösung vollständig freigesetzt. $[^{14}\text{C}]$ -Cholesterin wurde, abhängig von der Triton X-100-

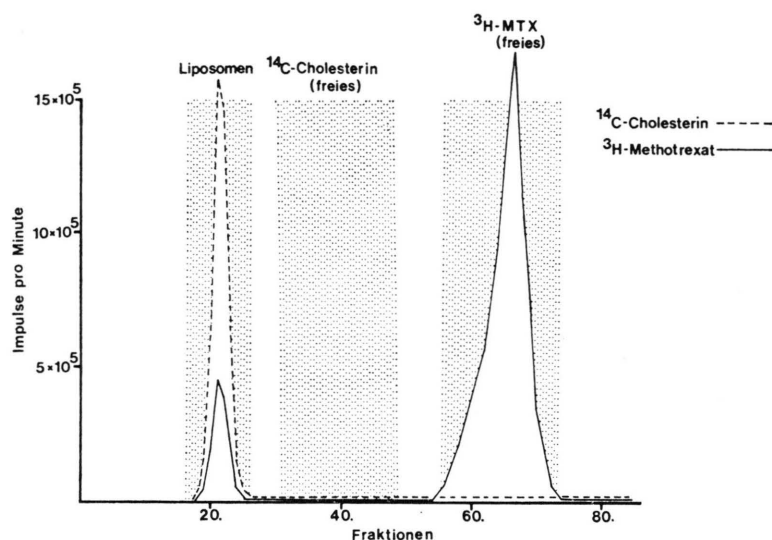


Abb. 1. Verteilung der Radioaktivität von $[^3\text{H}]\text{MTX}$ und $[^{14}\text{C}]\text{Cholesterin}$ nach der Ultraschallbehandlung der Liposomen mit dem eingeschlossenen Methotrexat vor der chromatographischen Trennung an Sepharose 6 B. Das erste Maximum (Fraktion 18–25) repräsentiert die Liposomenfraktion mit dem eingeschlossenen Methotrexat, das zweite Maximum (Fraktion 54–73) das freie Methotrexat. $[^{14}\text{C}]\text{Cholesterin}$ als Baustein der Liposomen wurde nur mit den Liposomen (Fraktion 18–25) eluiert und nicht mehr in freier Form.

Konzentration, sowohl in den Liposomenfraktionen als auch in freier Form in den Fraktionen 18 bis 28 eluiert. Die Liposomen waren nach elektronenmikroskopischer Beurteilung unilamellar bis 3-schichtig und hatten einen Durchmesser von $0,1 - 0,5 \mu\text{m}$.

Sterilfiltration

Bei der Sterilkontrolle waren von sieben Liposomenpräparationen alle unsteril. Bei der doppelten Kontrolle nach der Sterilfiltration waren in 6 Doppelkontrollen sterile Verhältnisse. In einer Doppelkontrolle war eine Probe ebenfalls steril, die andere mit Hefen verunreinigt. In allen sieben Liposomenpräparationen war vor und nach der Filtration Methotrexat vollständig in den Liposomen eingeschlossen. Die Einschlußrate betrug jeweils 100%. Ein Teil der Liposomen ($7\% \pm 2\%$) war, da zu groß, nicht filtrierbar.

In vitro Stabilität des Einschlusses von MTX in Liposomen

Der Einfluß von Temperatur und Proteinschutz auf die Stabilität des Einschlusses von $[^3\text{H}]\text{MTX}$ in negativ geladenen Liposomen wird im einzelnen in Abb. 3 wiedergegeben. Bei Raumtemperatur in 5 mM Na-Phosphat-Puffer gelagerte Liposomen beginnen eingeschlossenes $[^3\text{H}]\text{MTX}$ schon innerhalb 24 Stunden freizusetzen (Nr. 9, Abb. 4). Die Lagerstabilität wurde sowohl durch Erniedrigung der Lagertemperatur auf 4°C als auch durch Erhöhung der Puffermolarität erheblich verbessert (Nr. 5, 7 und 11

der Abb. 4). Der Zusatz von Protein zum Phosphatpuffer verbesserte bei einer Lagertemperatur von 20°C weiter die Stabilität des Einschlusses (Nr. 10, 12 und 14 in Abb. 4). Wenn die Liposomen mit dem eingeschlossenen $[^3\text{H}]\text{MTX}$ in Phosphat-Puffer bei 4°C und unter Zusatz von Protein gelagert werden, so war über 120 Tage ein Freisetzen der eingeschlossenen Substanz, unabhängig von der Molarität des Puffers nicht zu beobachten (Nr. 2, 3, 4, 6, 8 der Abb. 3).

In vivo Stabilität des Einschlusses von MTX in Liposomen (Abb. 4 a – d)

Eine Stunde nach Injektion der $[^3\text{H}]\text{MTX}$ - $[^{14}\text{C}]\text{Cholesterin}$ -Liposomen waren im Gesamtblut der Mäuse noch 46%, nach 3 Stunden noch 30%, nach 6 Stunden noch 25% und nach 15 Stunden noch 3% des injizierten MTX nachweisbar, wobei $[^3\text{H}]\text{MTX}$ ausschließlich in der Liposomenfraktion eluiert wurde. Freies MTX war nicht nachweisbar. $[^{14}\text{C}]\text{Cholesterin}$ als Baustein der von uns verwandten Liposomen zeigte ein anderes zeitliches Verhalten. Nach einer Stunde wurden 39%, nach 3 Stunden 25%, nach 6 Stunden 22%, nach 15 Stunden 8% des mit den Liposomen injizierten $[^{14}\text{C}]\text{Cholesterin}$ im Gesamtblut wiedergefunden. Die Rechromatographie zeigte, daß nach 1 Stunde 96%, nach 3 Stunden 86%, nach 6 Stunden 72%, nach 15 Stunden 19% der nachgewiesenen $[^{14}\text{C}]\text{Radioaktivität}$ in den Liposomenfraktionen, der andere Teil als freies $[^{14}\text{C}]\text{Cholesterin}$ eluiert wurde.

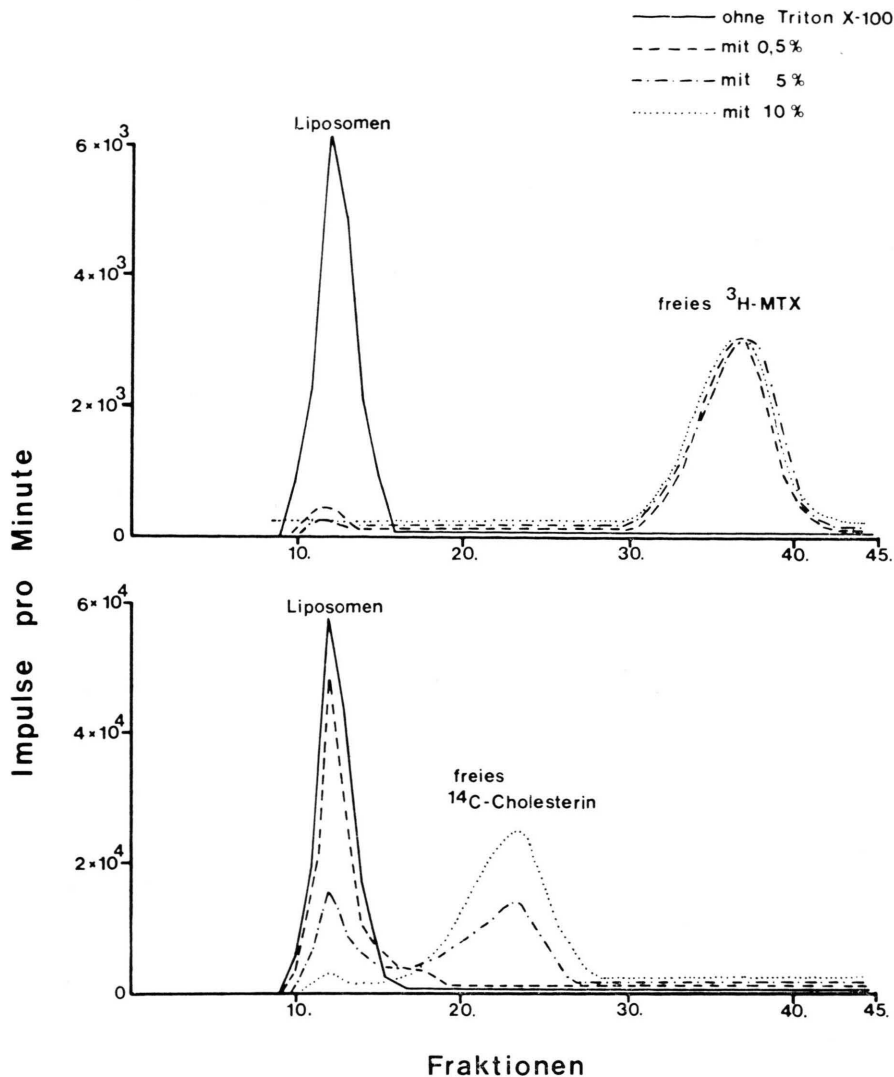


Abb. 2. Freisetzung des eingeschlossenen [^3H]Methotrexates und des Liposomenbausteines [^{14}C]Cholesterin durch steigende Konzentration von Triton X-100.

Diskussion

Liposomen, die unter Verwendung geladener Lipide hergestellt werden, haben durch die elektrische Abstoßung der einzelnen Lipiddoppelmembranen eine größere wäßrige Phase als neutrale Liposomen, so daß auch eine erhöhte Einschlußrate von hydrophilen Substanzen resultiert [8, 9]. Nach Untersuchungen von Bangham *et al.* [9] läßt sich dieser Effekt bis maximal 10 mol% geladener Lipide nachweisen. Wir haben daher negativ geladene Liposomen mit 9 mol% geladenem Dicytylphosphat verwandt. Die elektrischen Abstoßungskräfte geladener Partikel, somit auch von negativ geladenen Lipiddoppelmembranen werden in wäßrigen Lösungen

mit hoher Ionenstärke abgeschwächt, so daß die Einschlußrate in Puffern niedriger Molarität größer sein sollte als in Puffern höherer Molarität. Unsere Einschlußrate mit 5, 50 und 150 mmol Puffer unterstützten diese Hypothese. Da allgemein von einer vorgegebenen Substanz, hier MTX, wenig in den Liposomen eingeschlossen wird und der überwiegende Teil in freier Form wieder abgetrennt wird, sollte zur Erhöhung der Einschlußrate die Liposomenpräparation in Puffer niedriger Molarität erfolgen. Die Sterilfiltration bei $0,22\ \mu\text{m}$ zeigte, daß nicht nur sterile Liposomensuspensionen hergestellt werden können, sondern daß vor allem das eingeschlossene Methotrexat während der Filtration nicht freigesetzt wurde, obwohl es zu einer erheblichen Verformung der

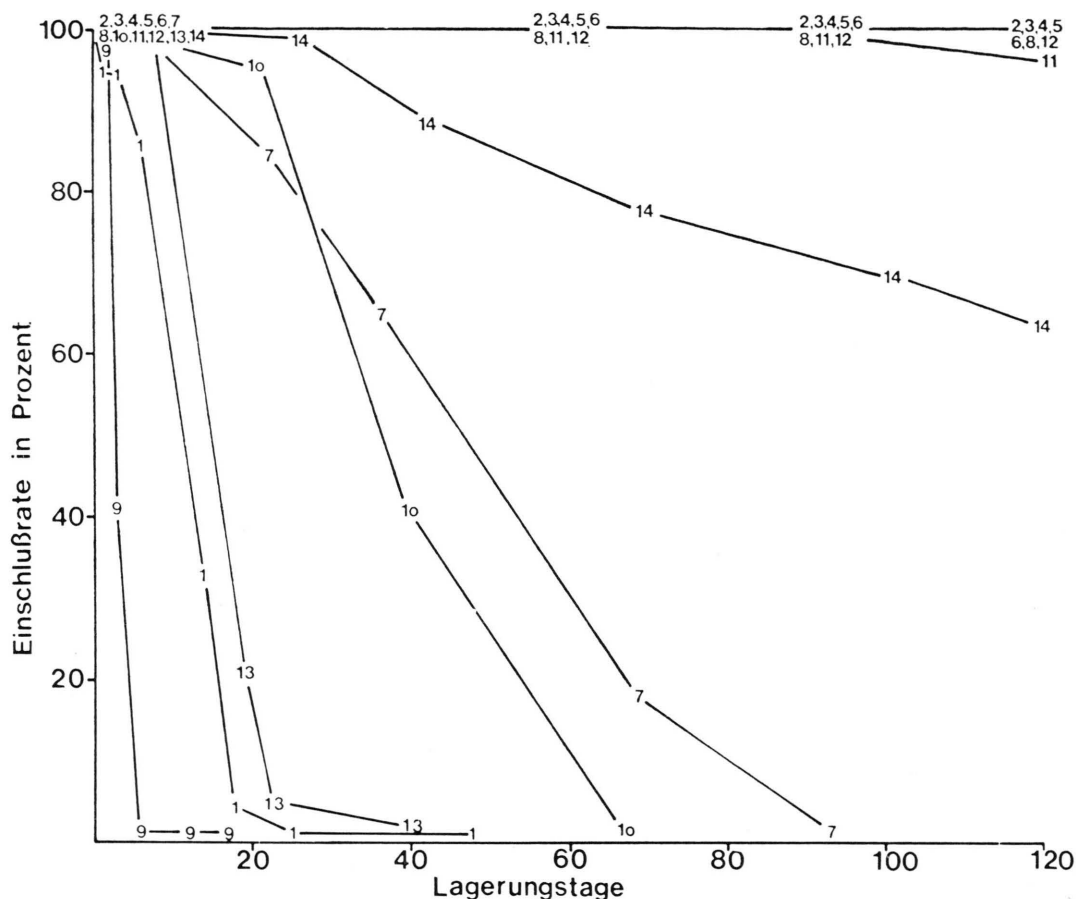


Abb. 3. Bestimmung der Stabilität des Einschusses für Methotrexat in Liposomen während einer Lagerzeit bis maximal 120 Tagen bei einer Lagertemperatur von 4 °C und 20 °C und in Phosphatpuffern mit verschiedenen Molaritäten und mit und ohne Zusatz von Protein.

n =Anzahl der jeweils gelagerten Proben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Mittelwerte angegeben. Na-P-Puffer, Na-Phosphat-Puffer; RA, Rinderalbumin; HS, Humanserum; MS, Mäuseserum.

- | | |
|---|---|
| 1. 5 mM Na-P-Puffer, 4 °C, $n=5$; | 9. 5 mM Na-P-Puffer, 20 °C, $n=2$; |
| 2. 5 mM Na-P-Puffer mit 1% RA, 4 °C, $n=3$; | 10. 5 mM Na-P-Puffer mit 1% RA, 20 °C, $n=2$; |
| 3. 5 mM Na-P-Puffer mit 8% MS, 4 °C, $n=3$; | 11. 50 mM Na-P-Puffer, 20 °C, $n=3$; |
| 4. 5 mM Na-P-Puffer mit 20% HS, 4 °C, $n=3$; | 12. 50 mM Na-P-Puffer mit 1% RA, 20 °C, $n=2$; |
| 5. 50 mM Na-P-Puffer, 4 °C, $n=3$; | 13. 50 mM Na-P-Puffer mit 100 mM NaCl, 20 °C, $n=3$; |
| 6. 50 mM Na-P-Puffer mit 1% RA, 4 °C, $n=3$; | 14. 50 mM Na-P-Puffer mit 100 mM NaCl und 1% RA, 20 °C, $n=2$. |
| 7. 50 mM Na-P-Puffer mit 100 mM NaCl, 4 °C, $n=3$; | |
| 8. 50 mM Na-P-Puffer mit 100 mM NaCl und 1% RA, 4 °C, $n=4$; | |

Liposomen bei der Filtration kommen muß, da der Liposomendurchmesser größer als 0,22 μm ist, was für deren überraschende Elastizität spricht.

Der Einschluß von MTX in Liposomen erwies sich unter Proteinschutz und bei einer Lagertemperatur von 4 °C als so stabil, daß über 120 Tage kein Freisetzen von MTX erfolgte. Zwei Chargen lagern unter diesen Bedingungen bereits 235 Tage. Der Grund für diese Stabilitätssteigerung der Liposomen

für eingeschlossenes MTX kann nach den reinen Lagerungsversuchen nicht angegeben werden. Es ist zu diskutieren, ob Proteinmoleküle zwischen die Lipidmoleküle eingelagert werden oder ob um die Liposomen ein dünner Proteinmantel gelegt wird.

Schneller als das eingeschlossene [^3H]MTX wurde [^{14}C]Cholesterin aus dem Blut eliminiert und war außerdem nach 1 Stunde in freier Form im Blut nachweisbar. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Kimmelberg [10], der an Primaten ebenfalls

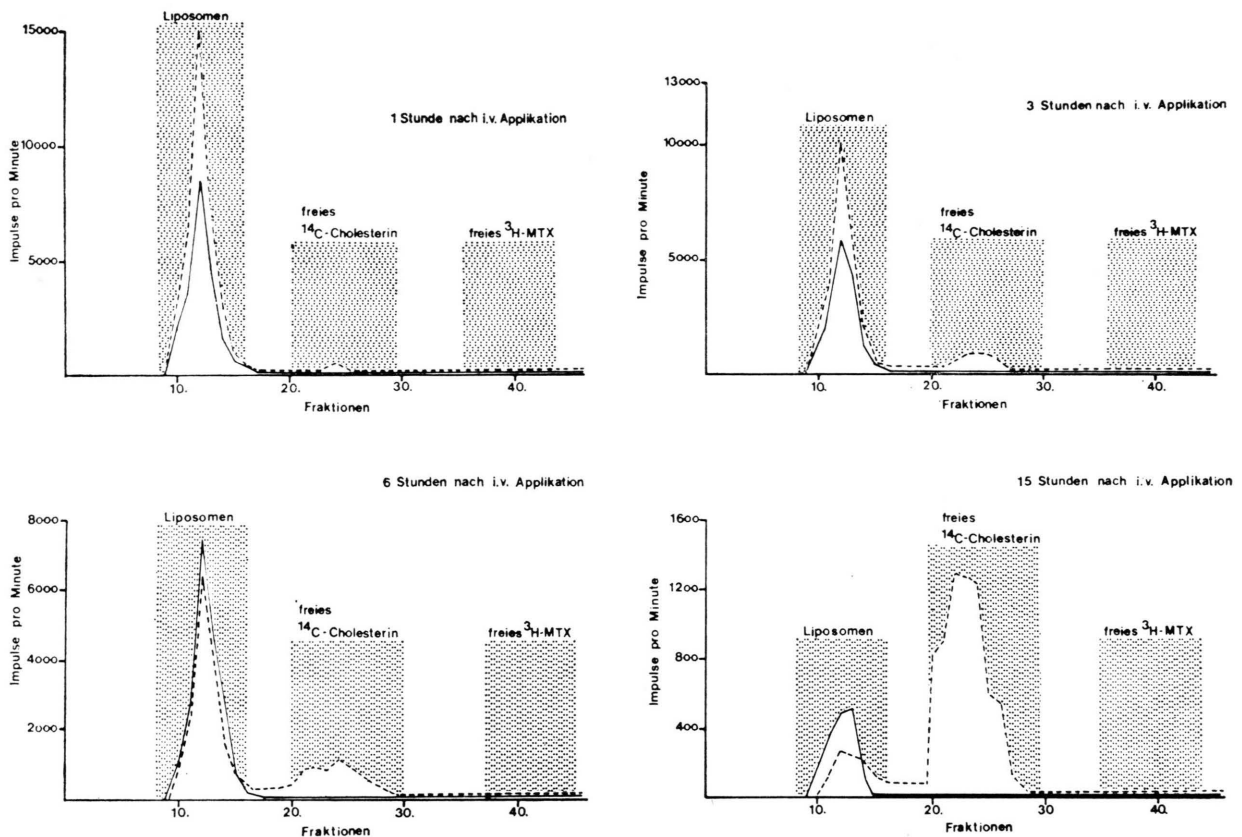


Abb. 4 a–d. Die zeitlich unterschiedlich schnelle Elimination des Liposomenbausteines [^{14}C]Cholesterin und des eingeschlossenen [^3H]MTX aus dem Blut von Ratten über 15 h. Freies [^3H]MTX konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden, [^{14}C]Cholesterin dagegen lag, in Abhängigkeit von der Zeit, zunehmend in freier Form vor. Nach 15 h wurde [^{14}C]Cholesterin zu über 80% in freier Form nachgewiesen.

nachwies, daß [^{14}C]Cholesterin schneller aus dem Blut eliminiert wird als das eingeschlossene Pharmakon. Es muß ein Austausch zwischen den Cholesterinmolekülen der Liposomen und darüber hinaus dem Cholesterin der Zellmembranen stattfinden, ohne daß die strukturelle Integrität oder die Permeabilitätseigenschaften der Liposomenmembran beeinträchtigt werden.

Der selektive Austausch von Cholesterin wird auch von Papahadjopoulos *et al.* [11] angenommen, da eine Anzahl von Geweben von [^{14}C]Cholesterin-[^3H]-dipalmitoyl-Liposomen mehr [^{14}C]- als [^3H]Radioaktivität aufnehmen. Nach Cooper *et al.* [12] und Gregoriadis *et al.* [6] und Bruckdorfer *et al.* [13] wird *in vitro* Cholesterin der Liposomen vor allem bevorzugt von Erythrozytenmembranen eingelagert.

- [1] G. Gregoriadis, *New Engl. J. Med.* **295**, 704–710 und **295**, 765–770 (1976).
- [2] D. A. Tyrell, T. D. Heath, C. M. Colley u. Brenda E. Ryman, *Biochim. Biophys. Acta* **457**, 259–302 (1976).
- [3] J. Braidman u. G. Gregoriadis, *Biochemical Society Transactions*, 561st Meeting Leeds 1976, 259–261.
- [4] B. E. Ryman, *Conference on Liposomes and Their Uses in Biology and Medicine*, Sept. 1977, 14–16, The New York Academy of Sciences.
- [5] B. E. Ryman, *Symposium on the Potential of Liposomes as Drug Carriers*, 2.–3. März 1978, Batelle Institut, Genf.
- [6] G. Gregoriadis, C. P. Swain, E. J. Wills u. A. S. Tavill, *The Lancet* **29**, 1313–1316 (1974).
- [7] J. Freise, P. Magerstedt, G. Schäfer u. F. W. Schmidt, *Eur. J. Cancer*, in press.
- [8] G. Sessa u. G. Weissmann, *J. Biol. Chem.* **245**, 3295–3301 (1970).
- [9] A. D. Bangham, J. de Gier u. G. D. Greville, *Chem. Phys. Lipids* **1**, 225–246 (1966).
- [10] H. K. Kimmelberg, *Biochim. Biophys. Acta* **448**, 531–550 (1976).
- [11] D. Papahadjopoulos, G. Poste u. E. Mayhew, *Biochim. Biophys. Acta* **363**, 404–418 (1974).
- [12] R. A. Cooper, E. C. Arner, J. S. Wiley u. S. J. Shattil, *J. Clin. Invest.* **55**, 115–126 (1975).
- [13] K. R. Bruckdorfer, J. M. Graham u. C. Greene, *Eur. J. Biochem.* **4**, 512–518 (1968).