

**LIPOSOMES AS POTENTIAL DRUG CARRIERS:
BINDING AND INCORPORATION STUDIES WITH THE
NEUROLEPTIC DRUG CHLORPROMAZINE**

Dissertation
submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology
Zürich
for the degree of Doctor of Natural Sciences

presented by
Reto A. Schwendener
Pharmacist (Eidg. dipl. Apotheker ETH)
born Mai 19, 1948
from Chur (GR), Switzerland

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H. G. Weder, referee
Prof. Dr. O. Sticher, co-referee

Krause-Druck
Freiburg i. Br.
1979

8. GENERAL SUMMARY

To study the interactions of the neuroleptic drug chlorpromazine (CPZ) with lecithin model membranes (liposomes) a steady-state dialysis device was developed and characterized. The device proved furthermore to be useful for drug release and/or displacement studies, since alterations of the system examined can be monitored at any time.

The binding properties of CPZ to egg yolk lecithin liposomes prepared by sonication was investigated. The effect of CPZ binding in respect to various amounts of cholesterol and of phosphatidic acid (PA) individually present in the bilayer was examined by steady-state dialysis and in some examples also by equilibrium dialysis as method of comparison.

It was found that cholesterol reduces CPZ binding significantly, whereas PA enhances drug binding strongly. CPZ binding is a function of concentration of the added compounds.

From the results obtained a possible mechanism of the interactions of CPZ with the lipid membrane is proposed. The interactions occur electrostatically in a first step, followed by the penetration of the CPZ ring system into the lipophilic backbone of the outer lecithin layer of the membrane.

The use of liposomes as possible drug carriers was investigated by incorporating CPZ into liposomes. As vehicles of different size, sonicated liposomes as well as larger liposomes prepared by a developed dialysis method, were used.

The amount of CPZ which can be incorporated into the bilayer matrix is controllable by adding different amounts of PA to the egg yolk lecithin matrix.

Incorporation was studied by variation of PA amounts in the bilayer, by checking the effects of absolute amounts of PA present and by saturating the lipid bilayer with raising amounts of CPZ.

Analytical problems arising with the determination of amounts of incorporated drug are demonstrated and results obtained with two methods compared.

Binding parameters of CPZ incorporation were calculated and a correlation with the results from CPZ binding from outside to the liposome surface was made.

The release of incorporated CPZ from different liposome preparations was studied using the steady-state instrument.

Release showed to be very slow and dependent from liposome composition, as well as from the pH of the surrounding aqueous medium.

Release was furthermore affected by interactions of the liposomal carriers with detergents (Triton X-100) and with proteins (bovine serum albumin, BSA) which enhanced CPZ release significantly. The liposome - BSA interactions were furthermore investigated by means of gel chromatography separation procedures.

In a final part, the in vitro microsomal metabolism of incorporated CPZ was compared with the degradation of the free drug. An approximated 50% reduction of formation of the major metabolite CPZ-sulfoxide could be observed compared to free CPZ. Incorporated CPZ seems to be protected by lecithin molecules against enzymatic degradation.

In a preliminary perfusion experiment it was shown, that about 40% of CPZ incorporated into liposomes are passing through the liver, whereas free CPZ is almost quantitatively absorbed in the liver.

The performed studies with liposomes allow to conclude that such vesicles might represent an useful carrier for drugs modifying their pharmacokinetics. However it has to be mentioned, that in spite of many advantages such a therapeutic system may

have, a lot of effects, such as interactions with blood components and organic tissues might be detrimental to their application as drug carriers.

Therefore the interactions of the drug carriers as well as those of the free drugs with biological materials have to be taken into consideration and investigated very carefully in future studies.

ZUSAMMENFASSUNG

Interaktionen des Neuroleptikums Chlorpromazin (CPZ) mit Lecithin Modell Membranen (Liposomen) wurden mittels eines neu entwickelten und charakterisierten 'steady-state' Dialyse Gerätes ausgeführt.

Das Gerät zeigte sich auch nützlich in der Anwendung zur Untersuchung der Freigabe von in Liposomen eingeschlossenem CPZ und/oder zur Ausführung von Verdrängungsexperimenten.

Die Eigenschaften der Bindung von CPZ an Eierlecithin-Liposomen, hergestellt mittels Ultraschall, wurde untersucht. Dabei wurde die Abhängigkeit der CPZ Bindung gegenüber verschiedener Mengen von in die Liposomen eingebautem Cholesterol einerseits und Phosphatidylsäure (PA) andererseits, mittels der 'steady-state' Dialyse und in einigen Fällen auch mit der konventionellen Gleichgewichtsdialyse untersucht.

Dabei zeigte sich, dass Cholesterol die Bindung von CPZ stark reduziert, währenddem PA die Bindung beträchtlich erhöht. Die Bindung von CPZ an Liposomen ist abhängig von den Konzentrationen zugefügten Cholesterols, beziehungsweise Phosphatidylsäure. Ein möglicher Mechanismus der Interaktion von CPZ mit der Lipidmembran wird vorgeschlagen. CPZ geht vorerst polare elektrostatische Wechselwirkungen ein, um weiter mit dem lipophilen Dreiering in die Lipidschicht des äusseren Lecithinmantels der Liposomen einzudringen.

Die Verwendung von Liposomen als mögliche Arzneistoffträger wurde daraufhin untersucht, indem CPZ in Liposomen eingebaut wurde. Es wurden dazu Vesikel verschiedener Grösse hergestellt, nämlich die üblichen beschallten Liposomen und etwa doppelt so grosse Liposomen, die mittels einer selbst entwickelten Dialysiermethode hergestellt werden können.

Die Menge einbaubaren Chlorpromazins kann durch Zugabe verschiedener Konzentrationen an PA bei der Liposomenherstellung gesteuert werden. Der Einbau von CPZ in die Lipidmembran von Liposomen wurde in Abhängigkeit der zugefügten Menge PA, in Abhängigkeit der absoluten PA Menge und mittels Sättigung der Lipide mit CPZ untersucht.

Auftretende analytische Probleme bei der Bestimmung von 'absoluten' Mengen eingebauten Arzneistoffes wurden aufgezeigt und zwei dazu übliche Methoden miteinander verglichen.

Weiter wurden die Bindungsdaten der Interaktionen von CPZ an die äussere Liposomenhülle mit denen des Einschlusses von CPZ in die Lipidmembran verglichen.

Die Freigabe von eingebautem CPZ aus den Liposomen wurde mit dem 'steady-state' Dialyse Gerät untersucht.

Es zeigte sich, dass die Freigabe ein sehr langsamer Prozess darstellt, der jedoch je nach der Menge zugefügter Phosphatidylsäure und je nach dem pH Wert des Aussenmediums unterschiedlich sein kann.

Der Einfluss von Detergenzien (z.B. Triton X-100) und Proteinen (z.B. Rinderserumalbumin, BSA) auf die Freigabe wurde ebenfalls untersucht. Beide Substanzen erhöhten die Freigabemenge von CPZ beträchtlich. Die Liposomen - BSA Interaktionen wurden weiter mittels Säulenchromatographie untersucht.

Im Schlussteil der Arbeit wurde der in vitro Metabolismus von eingebautem CPZ mit freiem verglichen. Dabei konnte eine Erniedrigung der Bildung des CPZ Hauptmetaboliten, CPZ-Sulfoxyd, um ca. 50% bei eingebautem Arzneistoff ermittelt werden. Offenbar wird CPZ von den Lipiden der Liposomenmembran vor enzymatischem Abbau geschützt.

In einem als Vorversuch geltenden Experiment wurde eine Leberperfusion mit liposomal eingeschlossenem CPZ ausgeführt, um die Absorption des Arzneistoffes im Lebergewebe mit frei angebotenen CPZ vergleichen zu können. Dabei zeigte sich, dass in Liposomen eingebautes CPZ nur zu etwa 40% nach einer einzigen Leberpassage absorbiert wurde, währenddem freies CPZ fast quantitativ von der Leber aufgenommen wurde.

Die ausgeführten Untersuchungen mit Liposomen als Modellmembranen und als Arzneistoffträger zeigen, dass solche Systeme durchaus als mögliche neue Arzneiformen eingesetzt werden könnten, da sich die Pharmakokinetik der eingebauten Arzneistoffe stark ändert.

Die ungünstigen Auswirkungen von Blutbestandteilen, wie z.B. Albumin, die vor allem die Freigabe beeinflussen, machen es jedoch erforderlich, dass vor allem die Eigenschaften und das Verhalten von Liposomen im lebenden Organismus in Zukunft gründlich untersucht und weiter charakterisiert werden müssen.