

Diss. ETH No. 16989

Experimental and theoretical investigations on lipid bilayer permeation

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Dr. sc. ETH Zurich

presented by
ANITA VERENA THOMAE

Dipl. pharm.
born 06.05.1979
citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Heidi Wunderli-Allenspach, examiner
Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, co-examiner
Dr. Stefanie D. Krämer, co-examiner

Zurich, 2007

Summary

The permeation across biological membranes is a key process in successful drug therapy. The diffusion across the lipid bilayer is the most important permeation mechanism of drugs. Methods to distinguish lipid bilayer permeation from other processes are rare and hence, it is not yet understood, how this process is controlled.

The present thesis is focused on the investigation of lipid bilayer permeation combining experimental and theoretical approaches. Liposomes are used to model biological membranes for the investigation of membrane-related processes, i.e. binding to and permeation across the membrane. Membrane affinities were determined using the well-established equilibrium dialysis system, while membrane permeation was tested with the Tb(III)-assay. It is based on the interaction of Tb(III) with aromatic carboxylic acids (ACAs), which results in a characteristic luminescence signal. Thus, the permeation of ACAs into Tb³⁺-loaded liposomes can directly be followed by luminescence measurements. To understand the interplay of the single rate constants, a system of differential equations to model the permeation process was developed and solved numerically.

The characterization of the Tb(III)-assay showed that the complex formation between Tb³⁺ and the ACAs is faster than the permeation process and that the degree of complexation does not affect the permeation rate. The obtained permeation coefficients were independent of the ACA concentration, but increased with increasing lipid concentration. This effect is due to the changed volume ratios in the system and were in agreement with the simulations based on the rate constants of the system.

In total, the permeation profiles of thirteen ACAs were measured with at least two different lipid compositions. For all tested ACAs except of carboxyfluorescein and carboxyfluorescein diacetate we found a significant contribution of the anionic species to the overall permeation rate. The permeation coefficients of the net neutral species ($Perm^{AH}$) were generally higher or equal as compared to the permeation coefficients of the anionic species ($Perm^{A^-}$). The differences between $Perm^{AH}$ and $Perm^{A^-}$ were 12 – 600 resulting in sigmoidal permeation profiles with two plateaus determined by the intrinsic permeation coefficients of the net neutral and anionic species. Due to the low ratio between $Perm^{AH}$ and $Perm^{A^-}$ the permeation of the tested ACAs is controlled by the anionic species at the physiological pH 7.4. These findings are in contrast to the pH-partition hypothesis, which predicts negligible permeation of ionized molecules. The permeation of the anionic species were affected by the buffer composition, but not by the bilayer state, i.e. by the bilayer fluidity.

Membrane permeation has often been directly related to membrane affinity. A decrease of the membrane affinity would thus result in a decreased permeation rate. To test this hypothesis, we determined the affinity and permeation profiles of three representative ACAs with phosphatidylcholine bilayers or membranes of phosphatidylcholine mixed with cholesterol or the charged lipids phosphatidylinositol and stearylamine, respectively. The influence of the lipid composition on the pH-dependent membrane affinity was in accordance with the membrane rigidity and possible electrostatic interactions between the acids and the lipids and was consistent for the different ACAs. However, no direct relationship between the affinity and permeation profiles

Summary

was found. This discrepancy was closer analyzed with numerical simulations of the permeation process based on the single rate constants for partitioning and translocation. The simulations were in line with our experimental findings. Depending on the single rate constants and on the geometry of the system, permeation may correlate positively, negatively or not at all with the respective affinity.

In a pilot study, multivariate analysis techniques were applied to explore the relationship between physicochemical ACA properties and the intrinsic permeation coefficients. While the solute's lipophilicity as expressed by the octanol/water partition coefficient was found to be favorable for lipid bilayer permeation, the hydrogen bond capacities and hydrophilicity parameters of the permeant need to be in an optimal range. The structure-permeation relationship study was, however, limited by the uneven distribution of some of the molecular descriptors and has to be extended in the future.

The Tb(III)-assay was also used to investigate the permeation of twelve α - and β -peptides across egg phosphatidylcholine bilayers. For this purpose, the peptides were coupled to dipicolinic acid which worked as probe for the Tb(III)-assay. The peptides contained two to six amino acids with hydrophobic side chains, except of β -octaarginin, which was used as negative control. The β -peptides permeated faster than their α -analogs, indicating different interactions with lipid bilayer.

Zusammenfassung

Ein Schlüsselprozess für die erfolgreiche Therapie mit Arzneistoffen ist die Arzneistoffpermeation durch biologische Membranen. Neben anderen Transportrouten ist die Diffusion des Arzneistoffes durch die Lipiddoppelschicht der wichtigste Permeationsmechanismus. Es gibt nur wenig Systeme, um ausschliesslich passive Membranpermeation zu testen, was das Verständnis dieses Prozesses erschwert.

Die vorliegende Dissertation untersucht die Permeation von arzneistoffähnlichen Molekülen und kleinen Peptiden durch die Lipiddoppelschicht. Dazu wurden experimentelle und theoretische Ansätze kombiniert. Liposomen dienen als Modelle der biologischen Membran, um membran-bezogene Prozesse wie z.Bsp. Membranaffinitäten und Membranpermeationen zu analysieren. Membranaffinitäten wurden mittels der Gleichgewichtsdialyse bestimmt, welche ein etabliertes Testsystem darstellt. Zur Untersuchung der Membranpermeation kam eine neuartige experimentelle Methode, der Tb(III)-assay, zum Einsatz. Diese Methode basiert auf der Wechselwirkung von Tb(III) mit aromatischen Carbonsäuren (ACAs), welche ein charakteristisches Lumineszenzsignal zur Folge hat. Die Permeation von ACAs in Tb³⁺-gefüllte Liposomen kann daher direkt durch Lumineszenzmessungen verfolgt werden. Um das Verständnis über das Zusammenspiel der einzelnen Geschwindigkeitskonstanten im Gesamtpermeationsprozess zu erleichtern, wurde zusätzlich ein Differentialgleichungssystem aus einem 3-Stufen-Permeationsmodell hergeleitet und numerisch gelöst.

Die Charakterisierung des Tb(III)-assays zeigte, dass die Komplexbildung zwischen Tb³⁺ und den ACAs schneller ist als die Permeation durch die Lipiddoppelschicht. Weiterhin wird die Permeationsrate nicht durch die Komplexbildungskonstante beeinflusst. Die gemessenen Permeationskoeffizienten waren unabhängig von der ACA-Konzentration, stiegen jedoch mit zunehmender Lipidkonzentration. Dies ist durch die veränderten Volumenverhältnisse im System bedingt. Die gemessene Abhängigkeit stimmt überein mit den theoretischen Simulationen, welche auf den verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten im System aufbauten.

Die Permeationsprofile von insgesamt 13 ACAs wurden mit mindestens zwei verschiedenen Membranzusammensetzungen gemessen. Die Permeationsrate von allen ACAs ausser Carboxyfluorescein und Carboxyfluoresceindiacetat wurde wesentlich durch die Permeation der ionisierten Molekülspezies beeinflusst. Die Permeationskoeffizienten der ungeladenen Spezies ($Perm^{AH}$) waren 12 bis 600 mal höher oder gleich den Permeationskoeffizienten der anionischen Spezies ($Perm^{A^-}$). Die resultierenden Permeationsprofile verliefen sigmoidal mit zwei Plateaus, die durch die intrinsischen Permeationskoeffizienten der neutralen und anionischen Spezies bestimmt wurden. Bedingt durch den kleinen Unterschied zwischen $Perm^{AH}$ und $Perm^{A^-}$ wird bei physiologischem pH 7.4 die Gesamtpermeationrate durch die Permeation der anionischen Spezies bestimmt. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zur sogenannten pH-Verteilungs-Hypothese, welche von einer vernachlässigbar kleinen Permeation ionisierter Moleküle ausgeht. Die Permeation ionisierter Moleküle wurde beeinflusst durch die Wahl der Puffer, war jedoch unabhängig von der Fluidität der Lipiddoppelschicht.

Membranpermeation wird oft in direkten Zusammenhang mit der Membranaffinität eines Moleküls gebracht. Demnach würde eine Verminderung der Affinität eine verlangsamte Per-

meation verursachen. Um diese Hypothese zu untersuchen, bestimmten wir die Affinitäts- und Permeationsprofile von drei repräsentativen ACAs mit Phosphatidylcholin-Liposomen und mit Membranen, die eine Mischung aus Phosphatidylcholin und Cholesterol oder den geladenen Lipiden Phosphatidylinositol und Stearylamin enthielten. Der Einfluss der Lipidzusammensetzung auf die pH-abhängige Membranaffinität folgte leicht interpretierbaren Regeln bezüglich der Membranrigidität und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Testsubstanzen und den Membranen. Die Effekte der einzelnen Lipide waren ähnlich für die unterschiedlichen ACAs. Es konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen den Affinitäts- und Permeationsprofilen gefunden werden. Dieser scheinbare Widerspruch konnte näher analysiert werden durch die numerische Simulation des Permeationsprozesses als Wechselspiel der einzelnen Geschwindigkeitskonstanten für die Verteilung in die Lipiddoppelschicht und den Übertritt zwischen den Lipidschichten. In Abhängigkeit von den Geschwindigkeitskonstanten und den Systemdimensionen kann eine Abnahme der Membranaffinität zu einer Zunahme oder Abnahme der Membranpermeation führen, oder kann auch ohne Effekt bleiben.

In einer Pilotstudie wurde der Zusammenhang zwischen den physikochemischen Eigenschaften der ACAs und ihren Permeationskoeffizienten mittels multivariater Analysetechniken untersucht. Die Lipophilie der Moleküle, welche als Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient gemessen wurde, war ein begünstigender Faktor für die Membranpermeation. Die Analyse zeigte weiterhin, dass für die Hydrophilie und die Wasserstoffbrückenkapazitäten der Moleküle ein optimaler Bereich existiert. Diese Studie war jedoch limitiert durch die unausgeglichene Verteilung von einigen Eigenschaftsvariablen und sollte deshalb systematisch erweitert werden.

Der Tb(III) assay wurde weiterhin eingesetzt, um die Permeation von zwölf α - und β -Peptiden über Phosphatidylcholinmembranen zu untersuchen. Dazu wurde Dipicolinsäure als Tb(III)-Sonde an die Peptide gekoppelt. Die Peptide bestanden aus zwei bis sechs Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten, ausserdem wurde β -octaarginin als Negativkontrolle getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass die β -Peptide schneller permeieren als ihre α -verknüpften Analoga. Dies weist darauf hin, dass β -Peptide anders mit der Lipidmembran in Wechselwirkung treten als α -Peptide.