

Organspezifische Applikation von pharmazeutisch aktiven Substanzen über zelluläre Trägersysteme

Organ Specific Application of Drugs by Means of Cellular Capsule Systems

U. Zimmermann und G. Pilwat

Institut für Chemie, Biophysikalische Chemie, Kernforschungsanlage Jülich GmbH

(Z. Naturforsch. 31 c, 732—736 [1976]; eingegangen am 24. September 1976)

Dielectric Breakdown, Red Blood Cells, Methotrexate, Controlled Drug Release, Organspecificity

It is suggested to use living cells (red blood cells, lymphocytes and leucocytes) as drug delivery systems for temporal and spatial drug administration in human therapeutics and diagnosis. The effectiveness of drug loaded cells is demonstrated for the drug methotrexate which is used in cancer treatment.

Red blood cells are loaded with methotrexate using the dielectric breakdown technique. Dielectric breakdown leads to a transient increase of permeability of the cell membrane. Red blood cells loaded with tritium-labelled methotrexate were injected into mice and the activity level was measured in several organs as a function of time. It is shown that with this drug delivery system more than 50% of the drug (after 10 min) can be accumulated in the liver and that a high activity level can be sustained in this organ for more than 3 hours. On the other hand, administration of this drug by injecting solutions in the usual manner leads only to an 25% accumulation of methotrexate (after 10 min) in the liver. The drug is excreted completely after 1 to 2 hours.

It is proposed to load red blood cells simultaneously with para- or ferromagnetic substances to obtain organ-specificity for any selected site of the body.

Einleitung

Die Entwicklung von Trägersystemen für eine zeitlich und organspezifisch kontrollierte Abgabe von pharmazeutischen Wirkstoffen und für kontrollierte enzymatisch und hormonell gesteuerte Langzeitreaktionen im menschlichen Organismus stellt zur Zeit ein hochaktuelles Forschungsgebiet auf dem pharmakologischen, chemotherapeutischen und diagnostischen Sektor dar. Die bisherigen Forschungsarbeiten konzentrierten sich auf die Entwicklung von „bioaktiven Kapseln“ unter Verwendung von künstlichen Membranen^{1, 2}.

Trotz der gewaltigen Anstrengungen, die bisher zu verzeichnen sind, ist es, bis auf ganz wenige Ausnahmen, nicht gelungen, klinisch ausgereifte, immunologisch verträgliche und kommerziell verwertbare Trägersysteme zu entwickeln. Die bisher erzielten Erfolge, aber auch das breite Spektrum von neuen pharmakologischen Effekten, das im Erfolgsfall bei der Verwendung von Trägersystemen erwartet werden kann, rechtfertigen es, nach neuen Methoden und Applikationsformen Ausschau zu halten, die eine Verbesserung der bisher bekannten therapeutischen und diagnostischen Verfahren versprechen.

1973 schlug Zimmermann (l. c.³⁻⁵; siehe auch Zimmermann *et al.*⁶) vor, Erythrozyten, aber auch Leukozyten und Lymphozyten, als Trägersysteme für Enzyme, Medikamente, Hormone, Antigene, Impfstoffe und andere Wirkstoffe zu verwenden. Die Vorteile eines derartigen Trägersystems auf zellulärer Basis liegen auf der Hand. Immunologische Abwehrreaktionen sind kaum zu befürchten, vor allem dann nicht, wenn Zellen des zu behandelnden Patienten für die Beladung mit Wirkstoffen verwendet werden oder zumindest Blut der gleichen Blutgruppe eingesetzt wird. Sofern die Probleme des Einschlusses von Wirkstoffen in Erythrozyten und anderen Zellen gelöst sind, dürfte der Zeitraum bis zur Anwendung derartiger Trägersysteme in der klinischen Therapeutik und Diagnostik relativ kurz sein, da die notwendigen Testversuche im Vergleich zu künstlichen Membransystemen zeitlich nicht so aufwendig sind. Dies trifft insbesondere dann zu, wenn pharmakologisch geprüfte und zugelassene Arzneimittel verwendet werden. Die Kosten für die Entwicklung eines solchen Trägersystems könnten deshalb denkbar gering gehalten werden.

Die Kriterien, die an ein optimales Trägersystem auf zellulärer Basis zu stellen sind, richten sich danach, ob eine Langzeit- oder eine organspezifische Kurzzeitapplikation erwünscht wird. Die Langzeitapplikation erfordert Beladungsverfahren für Zel-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. U. Zimmermann, Institut für Chemie 2 der Kernforschungsanlage Jülich GmbH, Postfach 1913, D-5170 Jülich 1.

len, die zu Trägersystemen mit einer langen biologischen Halbwertszeit führen. Bei der Kurzzeitapplikation werden dagegen Anforderungen an die Organspezifität des Erythrozyten-Trägersystems gestellt, die den Transport des Arzneimittels zu jedem gewünschten Organ selektiv ermöglicht.

Einschluß von Arzneimitteln in Erythrozyten-Trägersysteme

Im Prinzip stehen zwei Verfahren zur Verfügung, Erythrozyten mit Wirkstoffen zu beladen. Bei beiden Verfahren werden die Erythrozyten in einer Lösung hämolysiert, die den einzuschließenden pharmazeutischen Wirkstoff enthält. Nach der Hämolysen bleibt die Erythrozytenmembran für einen begrenzten Zeitraum, der von den Versuchsbedingungen (insbesondere von der Temperatur) abhängt, für nieder- und höhermolekulare Stoffe permeabel, die normalerweise durch die Membran des intakten Erythrozyten nicht permeieren können. Während dieser Zeit können Wirkstoffe in die Zelle eingeschleust und eingeschlossen werden.

Die osmotische Hämolysen in hypotoner Lösung wurde erfolgreich für den Einschluß von Enzymen und Wirkstoffen eingesetzt^{3,7}. Diese osmotisch induzierte Hämolysen hat allerdings empfindliche Nachteile; sie ist recht zeitaufwendig und erlaubt es in den meisten Fällen nicht, homogene Ghostzellen-Verteilungen herzustellen, wie sie für die kontrollierte Arzneimittel-Freisetzung im Organismus benötigt werden. Das Verfahren ist außerdem nur auf Erythrozyten beschränkt. Leukozyten und Lymphozyten können auf osmotischem Wege nicht beladen werden.

Das zweite Beladungsverfahren, das auf der Verwendung des dielektrischen Durchbruches von Zellmembranen beruht, läßt sich dagegen auf alle Zellen anwenden (einschließlich Zellen mit einer Zellwand) und erlaubt außerdem, aufgrund der zahlreichen Variationsmöglichkeiten, die Entwicklung eines breiten Spektrums von Trägersystemen mit unterschiedlichen Eigenschaften, wie es für die Lang- und Kurzzeitapplikation benötigt wird^{8,9}.

Bei dielektrischen Durchbruchverfahren wird die Beladung der Erythrozyten in *isotoner* Lösung durchgeführt. Die Zellen werden kurzfristig einem hohen elektrischen Feldpuls ausgesetzt (entweder in einer Pulsammer^{10,11} oder in einem Durchfluß-

kammersystem nach dem Coulter Counter Prinzip^{11,12}). Oberhalb einer kritischen Feldstärke kommt es zum dielektrischen Durchbruch der Zellmembran, der zu einer reversiblen und zeitlich begrenzten Permeabilitätserhöhung der Zellmembran führt. Dieser Effekt wurde erstmalig für Zellmembranen von Zimmermann *et al.*¹³ beschrieben und läßt sich durch eine elektro-mechanische Instabilität der Membran erklären^{11,14}. Er unterscheidet sich von dem seit längeren Jahren bekannten dielektrischen Durchbruch von Bilayern sowohl bezüglich der kritischen Membranspannung als auch des Mechanismus, der von Crowley¹⁵, in nicht korrekter Weise, ebenfalls durch eine elektro-mechanische Instabilität gedeutet wurde¹⁶. Die elektrisch in der Membran induzierte Permeabilitätserhöhung führt zu einem Austausch von Kalium- und Natriumionen zwischen der Innen- und Außenphase^{10,11}. Der Ausgleich in den Konzentrationsdifferenzen dieser Ionen führt zu einem Wassertransport in die Zelle. Diese schwillt infolge der osmotischen Vorgänge an. Durch Applizierung von weit überkritischen Feldstärken werden so starke Permeabilitätsänderungen in der Membran induziert, so daß das kritische hämolytische Volumen erreicht wird und die Zelle hämolysiert¹⁰. Diese elektrisch induzierte Hämolysen wird durch bivalente Anionen, wie Sulphat und Phosphat, durch Saccharose, höher molekulare Stoffe und durch EDTA verhindert^{9,11}. In Gegenwart dieser Stoffe sind deshalb höhere Feldstärken notwendig, um Hämolysen zu erreichen. Die Permeabilitätsänderungen sind in diesem Fall so signifikant, daß auch Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von der Größenordnung der DNA in die Zelle eingeschleust werden können.

Für den Einschluß von Enzymen⁸ und Arzneimitteln, über den in dieser Arbeit berichtet wird, haben sich folgende Bedingungen als optimal herausgestellt: Die Erythrozyten werden im Verhältnis 1:10 in einer Lösung I der folgenden Zusammensetzung suspendiert: 105 mM KCl, 20 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 7,6 mM Na₂HPO₄, 2,4 mM NaH₂PO₄ und 10 mM Glucose, pH 7,2. Die Zellen werden für 40 µs einer elektrischen Feldstärke von 12 kV/cm in einer Pulsammer ausgesetzt. Die Hämolysen erfolgt bei 0 °C. Bei dieser Temperatur werden die lysierten Zellen für 10 min gehalten; anschließend wird die Temperatur auf 37 °C erhöht. Nach weiteren 20 min haben die Membranen der Ghostzellen die Eigenschaften der intakten Erythrozytenmembran

sowohl in elektrischer Hinsicht als auch bezüglich ihres Permeationsverhalten zurückgewonnen^{8, 17, *}.

Die elektrisch induzierte Hämolyse wurde in dieser Arbeit verwendet, um Erythrozyten mit dem kommerziellen Arzneimittel Methotrexat zu beladen. Methotrexat (Amethopterin, 4-Amino-N¹⁰-methylpteroylglutaminsäure) gehört zu den Folsäureantagonisten, die heute neben alkylierenden Wirkstoffen zu den wirksamsten Substanzen für die Behandlung von Neoplasien (Tumoren etc.) zählen¹⁹. Die biologische Halbwertszeit von Methotrexat ist kurz. Beim Menschen wird Methotrexat innerhalb von 6 Stunden, bei der Maus innerhalb von 1 bis 2 Stunden (s.w.u.) vollständig über Niere und Darm ausgeschieden. Methotrexat muß deshalb wiederholt und in hohen Dosen appliziert werden, um Behandlungserfolge zu erzielen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche mit Methotrexat beladenen Erythrozyten wurden unter dem Gesichtspunkt angelegt, das Zytostatikum bevorzugt in die Leber zu transportieren und dort zu akkumulieren. Die Organspezifität „Leber“ läßt sich für das Erythrozyten-Trägersystem relativ leicht erhalten. Bei verändertem Volumen und bei veränderter Form werden die Erythrozyten innerhalb kurzer Zeit in der Milz abgebaut und das freigesetzte Methotrexat gelangt über das Pfortadersystem direkt zur Leber. Volumen und Form der Erythrozyten lassen sich bei der elektrischen Hämolyse relativ leicht variieren¹¹, insbesondere bei Menschenerythrozyten, die deshalb als erste Modellversuche in dieser Arbeit verwendet wurden. Die elektrische Hämolyse wurde, wie weiter oben beschrieben, in Lösung I, die 5 mM/l Methotrexat enthielt, durchgeführt. Der Resealing-(Ausheil)Prozeß wurde durch Erhöhung der Temperatur auf 37 °C vervollständigt. Die methotrexat-beladenen Ghostzellen wurden bei 10 000 × g 10 min lang abzentrifugiert und das kompakte Ghostzellen-Sediment in folgender Lösung

II suspendiert, die auch für die Injektion verwendet wurde (0,2 ml Ghostzellen in 5 ml Lösung): 138,6 mM NaCl, 12,3 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM NaH₂PO₄, pH 7,4.

Die Homogenität der mit Methotrexat beladenen Ghostzellen wurde mit Hilfe des dielektrischen Durchbruches unter Verwendung eines hydrodynamisch fokussierenden Coulter Counter-Systems untersucht. Diese Methode ist äußerst empfindlich, Inhomogenitäten in der Population aufzuspüren⁸. Die Verteilungskurven der beladenen Ghostzellenpopulation, die bei verschiedenen elektrischen Feldstärken in der Meßöffnung des Coulter Counters aufgenommen wurden, zeigten, daß die Population weitgehend homogen war. Die Homogenität der Population konnte durch den gleichzeitigen Einschluß von Saccharose noch erheblich und Albumin erhöht werden (Pilwat und Zimmermann, in Vorbereitung).

Organspezifität der Erythrozyten-Trägersysteme

Um die Akkumulierung von Methotrexat in den einzelnen Organen in der Maus zu verfolgen, wurde Tritium-markiertes Methotrexat (Amersham, 9,8 Ci/mmol) verwendet. Die in den Zellen eingeschlossenen Konzentrationen an inaktivem Methotrexat betragen jeweils 5 mM/l. Die beladenen Ghostzellen, die in Lösung II suspendiert waren, wurden über die Schwanzvene in die Maus injiziert (500 µl). In Kontrollversuchen wurde die gleiche Menge an Methotrexat gelöst in 500 µl der Lösung II injiziert. In einer weiteren Serie von Kontrollversuchen wurden 500 µl einer Methotrexat enthaltenden Lösung, die aber gleichzeitig unbeladene Ghostzellen enthielt, injiziert, um Anhaltspunkte für eine mögliche Absorption von Methotrexat an der Membranoberfläche zu erhalten. Die Radioaktivität wurde über 3 h in den folgenden Organen verfolgt: Niere, Darm, Herz, Lunge, Milz und Leber. Die Organe wurden in bestimmten Zeitintervallen präpariert, gefriergetrocknet, Anteile in Soluene 100 (Packard) gelöst, mit H₂O₂ entfärbt, mit Instagel (Packard) versetzt und die Radioaktivität mit einem Tricarb Szintillationsspektrometer (Packard) gemessen. Beide Kontrollversuchsserien zeigten, daß innerhalb von 10 min etwa 25% der injizierten Aktivität in der Leber akkumuliert wird (Abb. 1). Nach 1 bis 2 h ist die Aktivität in der Leber, wie auch in allen anderen Organen auf weniger als 1% abgesunken.

* Diese Versuchsbedingungen wurden vor kurzem von Auer *et al.*¹⁸ für den Einschluß von DNA übernommen. Sie sind denkbar ungeeignet, physiologisch relevante Konzentrationen von DNA einzuschließen. Ein Einschluß dieser Verbindung erfordert höhere Feldstärken, d. h. Hämolyse in Gegenwart der obengenannten Schutzstoffe. Die Autoren berichten ebenfalls nicht, welche Kriterien sie verwendet haben, um nachzuprüfen, ob unter ihren Versuchsbedingungen noch homogene Ghostzellen-Verteilungen vorliegen. Anspruchsvollere Präparationen erfordern Untersuchungen über die Homogenität der Verteilung mit Hilfe des dielektrischen Durchbruches in einem hydrodynamisch fokussierenden Coulter Counter System⁸ (siehe auch weiter unten).

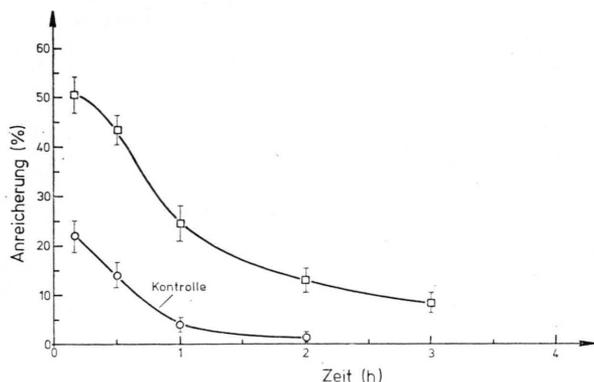


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf von mit Tritium markiertem Methotrexat in der Leber von Mäusen. Erythrozyten wurden elektrisch in isotoner Lösung hämolysiert (12 kV/cm; Pulslänge 40 μ s) und mit 5 mM/l Methotrexat beladen, das mit Tritium markiert war. 0,2 ml dieser mit Methotrexat beladenen Ghostzellen wurden in 5 ml der isotonen Lösung II (siehe Text) suspendiert. 500 μ l dieser Ghostzellensuspension wurden in die Schwanzvene injiziert und der Aktivitätspegel in der Leber als Funktion der Zeit bestimmt (Quadrate). In Kontrollversuchen wurden 500 μ l einer Methotrexat-Lösung der gleichen Aktivität und Konzentration injiziert und der zeitliche Verlauf der Aktivität in der Leber verfolgt (Kreise). Die Werte sind Mittelwerte von 10 Versuchen. Die vertikalen Linien entsprechen der Standardabweichung der Einzelwerte.

Die Kinetik der Methotrexatelimination wie auch die Verteilung des Methotrexat im Organismus ändern sich signifikant, wenn mit Methotrexat beladene Ghostzellen injiziert werden (Abb. 1). Nach etwa 10 min finden sich 50% der injizierten Methotrexataktivität in der Leber (Mittelwerte aus 10 Versuchen; die vertikalen Linien bezeichnen die Standardabweichung der Einzelmessungen). Nach 1 h befinden sich noch über 25%, nach einer weiteren Stunde noch 15% in der Leber. Selbst nach 3 h werden noch 10% der Aktivität in der Leber nachgewiesen.

Die Aktivität in den übrigen Organen lag bei allen Versuchen zwischen 0,1 und 2% (bezogen auf die injizierte Aktivitätsmenge).

Diese Experimente belegen in eindrucksvoller Weise, daß pharmazeutisch aktive Substanzen über

das Erythrozyten-Trägersystem bevorzugt in die Leber transportiert werden können. Dieses Ergebnis dürfte weitreichende Konsequenzen für die Behandlung von Lebertumoren, aber auch für die Diagnostik haben.

A priori ist die Organspezifität der Erythrozyten-Trägersysteme auf Leber und Milz begrenzt. Eine Anwendung dieses Trägersystems in therapeutischer und diagnostischer Hinsicht würde dadurch erheblich limitiert. Diese Begrenzung in der Organspezifität läßt sich in eleganter Weise umgehen, wenn man gleichzeitig mit dem Wirkstoff paramagnetische oder ferromagnetische Substanzen einschließt. Durch Applikation externer, lokaler Magnetfelder lassen sich dann beladene Ghostzellen, die sich in Form, Volumen, Oberflächenladung und Antigenstruktur von intakten Erythrozyten möglichst nicht unterscheiden (und deshalb ohne sofortigen Abbau die Milz passieren), zu einer beliebigen Stelle im Organismus transportieren. Die Freisetzung des Wirkstoffes aus den Ghostzellen an selektiv, durch das lokale Magnetfeld vorgegebenen Stellen im Organismus, läßt sich entweder durch Permeabilitätsänderungen der Membran, die im elektrischen Feld induziert werden, erzeugen, oder durch den Einschluß von membranabbauenden Enzymen erreichen.

Die Applikationsmöglichkeiten dieses Systems, dessen Wirkungsweise hier für die Leber demonstriert wurde, läßt sich noch erweitern, wenn zusätzlich Liposomen in die Erythrozyten eingeschlossen werden. Über Liposomen können Stoffe in das Gewebe eines Organs transportiert werden, so daß die Möglichkeit besteht, über ein solches Mehrkomponententrägersystem Wirkstoffe in bestimmte Gewebe eines spezifischen Organs zu transportieren.

Herrn Prof. W. Schmidt, Herrn Dr. Freise, Medizinische Hochschule Hannover und Dr. Bauer, DFVLR, Köln-Porz, danken wir für viele wertvolle Diskussionsbeiträge. Fernerhin gilt unser Dank Frl. K. Bock und Herrn H. J. Buers für ihren unermüdlischen und hervorragenden Einsatz bei der Durchführung dieser Arbeiten.

Diese Arbeiten werden vom BMFT unter dem Aktenzeichen Nr. BCT 112 gefördert.

¹ Alan S. Michaels, William J. Mader, u. Charles R. Manning, in Proceedings of the 35th International Congress of Pharmaceutical Sciences, Dublin, Ireland, September 1–5, 1975, in press.

² O. R. Zaborsky, Immobilized Enzymes, CRC Press, Cleveland, Ohio 1973.

³ U. Zimmermann, Deutsches Patentamt, Auslegeschrift 2326161 vom 23. 5. 1973.

⁴ U. Zimmermann, Jahresbericht der Kernforschungsanlage Jülich GmbH, 55 [1973].

⁵ U. Zimmermann, Chem. Eng. News, Feb. 24, p. 21 [1975].

⁶ U. Zimmermann, G. Pilwat u. F. Riemann, Deutsche Patentanmeldung P 24 05 119.2-41 vom 2. 2. 1974.

⁷ G. M. Ihler, R. H. Glew u. F. W. Schnure, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 70, 2663 [1973].

- ⁸ U. Zimmermann, F. Riemann u. G. Pilwat, *Biochim. Biophys. Acta* **436**, 460 [1976].
- ⁹ U. Zimmermann, G. Pilwat, Chr. Holzappel u. K. Rosenheck, *J. Membrane Biol.*, in press.
- ¹⁰ F. Riemann, U. Zimmermann u. G. Pilwat, *Biochim. Biophys. Acta* **394**, 449 [1975].
- ¹¹ U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Beckers u. F. Riemann, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **3**, 58 [1976].
- ¹² U. Zimmermann, G. Pilwat u. F. Riemann, *Biophys. J.* **14**, 881 [1974].
- ¹³ U. Zimmermann, J. Schultz u. G. Pilwat, *Biophys. J.* **13**, 1005 [1973].
- ¹⁴ H. G. L. Coster u. U. Zimmermann, *J. Membrane Biol.* **22**, 73 [1974].
- ¹⁵ J. M. Crowley, *Biophys. J.* **13**, 711 [1973].
- ¹⁶ R. Benz, O. Fröhlich, P. Läger u. M. Montal, *Biochim. Biophys. Acta* **394**, 323 [1975].
- ¹⁷ U. Zimmermann, G. Pilwat u. F. Riemann, *Biochim. Biophys. Acta* **375**, 209 [1975].
- ¹⁸ D. Auer, G. Brandner u. W. Bodemer, *Naturwissenschaften* **63**, 391 [1976].
- ¹⁹ I. M. Ariel u. G. T. Pack, in *Recent Results in Cancer Research* (G. T. Pack and A. H. Ismaili, eds.), p. 277, Springer-Verlag, Heidelberg.