

## SEPARACIÓN DE SOLUTOS NO ENCAPSULADOS EN LIPOSOMAS. COMPARACIÓN DE LA FILTRACIÓN EN GEL CON LA CENTRIFUGACIÓN EN MINICOLUMNAS DE GEL

Ortiz López, A. y Gómez Fernández, J. C.

Departamento de Bioquímica. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

Recibido: 4 junio 1986

Aceptado: 29 septiembre 1986

### RESUMEN

Se describe la separación de solutos no encapsulados en preparaciones de liposomas, por filtración en gel y por centrifugación en minicolumnas de gel, usando en ambos casos Sephadex G-50. Se comparan ambos métodos de acuerdo a diferentes criterios: % de recuperación de fosfolípido, rapidez, dilución de la muestra, etcétera, y en cuanto a su efectividad para la medida del volumen encapsulado por los liposomas, para tres tipos diferentes de vesículas: liposomas multilamelares (MLV), liposomas unilamelares sonicados (SUV) y liposomas unilamelares grandes (LUV).

Los resultados obtenidos por ambos procedimientos son similares, aunque el método de centrifugación en minicolumnas presenta varias ventajas, esencialmente mayor rapidez, ausencia de dilución de la muestra, posibilidad de usar pequeños volúmenes y posibilidad de procesar varias muestras a la vez. Los valores del volumen encapsulado determinado por los dos métodos son similares y concuerdan muy bien con los mencionados en la bibliografía.

*Palabras clave:* liposomas, filtración en gel, volumen encapsulado.

*Abreviaturas:* MLV, vesículas multilamelares; SUV, vesículas unilamelares sonicadas; LUV, vesículas unilamelares grandes; DCP, dicetilfosfato; EDTA, ácido etilendiamino-tetraacético; TES, ácido N-Tris-(hidroximetil)-metil-2-aminoetanosulfónico.

### ABSTRACT

We describe the separation of non-trapped material from a liposome preparation, both by gel-filtration and by centrifugation in Sephadex G-50 minicolumns. Both methods are compared according to different criteria: % of phospholipid recovery, sample dilution and calculation of the trapped volume for three different types of vesicles: multilamellar liposomes (MLV), sonicated unilamellar liposomes (SUV) and large unilamellar liposomes (LUV).

The results obtained for the two procedures are similar, but there are several points which favor to the centrifugation in gel minicolumns, essentially, the method is considerably faster, there is no sample dilution, small sample volume can be processed and several samples can be processed at the same time. The values for the trapped volume measured by the two methods are similar and they are in good agreement with those mentioned in the literature.

*Keywords:* liposomes, gel filtration, encapsulated volume.

*Abbreviations:* MLV, multilamellar vesicles; SUV, sonicated unilamellar vesicles; LUV large unilamellar vesicles; DCP, dicetyl phosphate; EDTA, ethylen diamino tetraacetic acid; N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethano sulfonic acid.

## INTRODUCCIÓN

El uso de liposomas en biotecnología y biomedicina se ha visto muy incrementado en los últimos años (1-4). Así, los liposomas se están mostrando como vehículos idóneos para la incorporación de moléculas a las células tanto «in vitro» como «in vivo». Cuando se trabaja «in vitro», con células en cultivo tanto animales como vegetales o microorganismos, para incorporar, esencialmente, material genético a las mismas e inducir la transformación genética (5, 6). Cuando se usan «in vivo», como vehículos transportadores de fármacos, enzimas, hormonas, etcétera, para el tratamiento de enfermedades y como métodos de diagnóstico, tanto en animales como en el hombre (7).

Se han encapsulado una amplia variedad de sustancias en liposomas, entre ellas agentes quimioterapéuticos (8-14), nucleótidos y ácidos nucleicos (15) y enzimas (16-19) y se han desarrollado métodos para la preparación de diferentes tipos de liposomas (32), vesículas multilamelares (MLV); vesículas unilamelares sonificadas (SUV) y vesículas unilamelares grandes (LUV).

Es obvio, por lo tanto, que todos estos estudios con sustancias encapsuladas se verán muy favorecidos si se dispone de un método rápido, sencillo y eficaz para la separación del material que no ha sido encapsulado en los liposomas. Usualmente se han utilizado la filtración en gel (20-22), diálisis (20, 21, 23) y filtración por Millipore (24, 25). También se ha descrito un método sencillo y eficaz que utiliza la centrifugación en minicolumnas de Sephadex G-50 (26). En el presente artículo se compara dicho método con el de filtración en gel para los tres tipos de liposomas que se han descrito, MLV, SUV y LUV. Para ello se ha encapsulado ferricianuro en los liposomas, dado que es una sustancia con un peso molecular medio y que se puede determinar fácilmente por medidas de absorbancia en el espectro visible.

Se establece la validez del método para los tres tipos de liposomas estudiados, en términos de la eliminación del material no encapsulado y del cálculo del volumen encapsulado por los liposomas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Fosfatidilcolina (Lecitina) de yema de huevo se aisló y purificó de acuerdo al método descrito por Papahadjopoulos y Miller (27). Dicitilfosfato y  $\beta$ -D-octilglucósido se obtuvieron de Sigma, Poole, U. K., Bio-beads SM-2 de Bio-Rad, Sephadex G-50 (fine) de Pharmacia, Upp-

sala, Sweden y ferricianuro potásico de Merck, Darmstadt, FRG. Todos los demás reactivos y productos fueron de grado analítico.

Para la preparación de liposomas y de tampones se usó agua bidestilada y desionizada en aparato Milli-Q de Millipore.

MLV se prepararon esencialmente de acuerdo al método descrito por Bangham y col. (20). 10  $\mu$ mol de lecitina y 1  $\mu$ mol de dicitilfosfato disueltos en cloroformo se depositaron en forma de una fina película en el fondo de un tubo de ensayo, por evaporación del disolvente bajo corriente de nitrógeno (g). Las últimas trazas de disolvente se eliminaron por evaporación a vacío durante 3-5 horas. Se añadió 1 ml de tampón NaCl 150 mM, EDTA 50  $\mu$ M, TES 10 mM pH 7.4, conteniendo ferricianuro potásico 0.2 M y la mezcla se agitó en un Vortex-mixer hasta obtener una suspensión homogénea de liposomas.

Los SUV se prepararon según se describe en (28). Una suspensión de MLV preparada según se describió anteriormente se sometió a ultrasonidos en sonicador de sonda MSE, a 12  $\mu$ m de amplitud, durante 5 minutos a 4 °C, obteniéndose una suspensión ópticamente transparente. Esta suspensión se centrifugó a 19.000 xg durante 15 minutos en el rotor SS34 de una centrífuga refrigerada Sorvall, para eliminar restos de titanio desprendidos de la sonda y liposomas grandes.

Los LUV se prepararon por el método de diálisis de detergente (29). 10  $\mu$ mol de lecitina y 1  $\mu$ mol de dicitilfosfato se depositaron en el fondo de un tubo tal y como se describió anteriormente. Se añadió 1 ml de tampón conteniendo octilglucósido en relación molar 6:1 con respecto al fosfolípido y se agitó el tubo hasta que todo el líquido quedó disuelto. El detergente se eliminó por diálisis contra 200 ml de tampón exento de detergente, a 4 °C. El tampón se cambió 4 veces a intervalos de 12 horas y se añadieron 2 gramos de Bio-beads activados en el último cambio, prolongándose la diálisis hasta obtener una suspensión lechosa de LUV (aprox. 17 horas).

Todas las preparaciones de liposomas se dejaron estabilizarse un tiempo no menor de 30 minutos a temperatura ambiente antes de ser utilizadas.

Para la preparación de la minicolumna, se dejó hinchar Sephadex G-50 (fine) durante una noche a 4 °C en el tampón descrito anteriormente. Se situó un pequeño disco de tela de nylon de poro fino en el fondo de una jeringa de insulina de 1 ml y la jeringa se llenó con Sephadex hasta obtener un volumen de lecho de aproximadamente 1 ml. La columna se situó dentro de un tubo de centrifuga de fondo cónico

y se centrifugó a 1.250 xg durante 4 minutos en una centrífuga de mesa P-Selecta (radio=10 cm), para eliminar el exceso de tampón del gel. La jeringa se transfirió a otro tubo y se aplicaron muestras de 100  $\mu$ l de la preparación de liposomas que contenía tanto ferricianuro libre como encapsulado. La columna se centrifugó ahora a 1.250 xg durante diferentes tiempos (apartado RESULTADOS Y DISCUSIÓN) obteniéndose los eluidos de liposomas libres de ferricianuro no encapsulado en el fondo del tubo. El material retenido en la columna se recogió lavando ésta con 100  $\mu$ l de tampón sin liposomas en las mismas condiciones anteriores.

La concentración de ferricianuro se midió a 420 nm, de acuerdo con un coeficiente de extinción molar de  $1.040 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Para medir el ferricianuro encapsulado en los liposomas se solubilizaron éstos por adición de Tritón X-100 al 2%.

El fósforo lipídico se determinó de acuerdo al método de Bartlett (30).

Las microfotografías electrónicas se realizaron por la técnica de tinción negativa con heptamolibdato sobre soporte de Formvar (31) en un microscopio electrónico Zeiss EM10.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las preparaciones de liposomas utilizadas en el presente trabajo se caracterizaron por técnicas de microscopía electrónica. La figura 1 muestra una microfotografía obtenida por tinción negativa de MLV, SUV y LUV, que se usaron para los estudios posteriores. Como se observa, los MLV presentan múltiples bicapas concéntricas con un tamaño medio entre 0.2 y 0.3  $\mu$ m de diámetro. Los SUV obtenidos por sonicación de MLV presentan una sola bicapa pero son considerablemente menores que los MLV, con un diámetro medio de 0.1  $\mu$ m. La microscopía electrónica de liposomas por tinción negativa es muy utilizada para comprobar la bondad de las preparaciones y debe de ser siempre un paso previo a la utilización de liposomas en otros estudios.

Para determinar el tiempo óptimo de centrifugación de las minicolumnas se utilizaron MLV conteniendo ferricianuro encapsulado y ferricianuro libre y se centrifugaron a 1.250 xg y diferentes tiempos. Para un tiempo de centrifugación de 4 minutos en el eluido apareció un máximo en la concentración de fosfolípido que coincidió con un mínimo en la de ferricianuro (ferricianuro encapsulado). Cuando estos eluidos se recentrifugaron de nuevo en las mismas condiciones en una nueva columna, se obtuvo

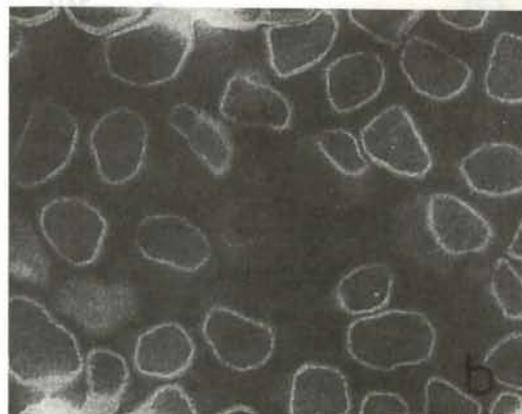
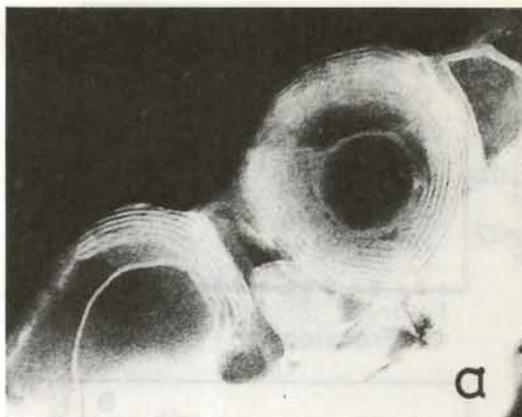


FIGURA 1. Microfotografías electrónicas de diferentes tipos de liposomas, por tinción negativa con heptamolibdato. a) MLV (x96000); b) SUV (x195000); c) LUV (x20000).

en el eluido la misma concentración de fosfolípido y de ferricianuro que antes, lo que indica que en la primera centrifugación todo el ferri-

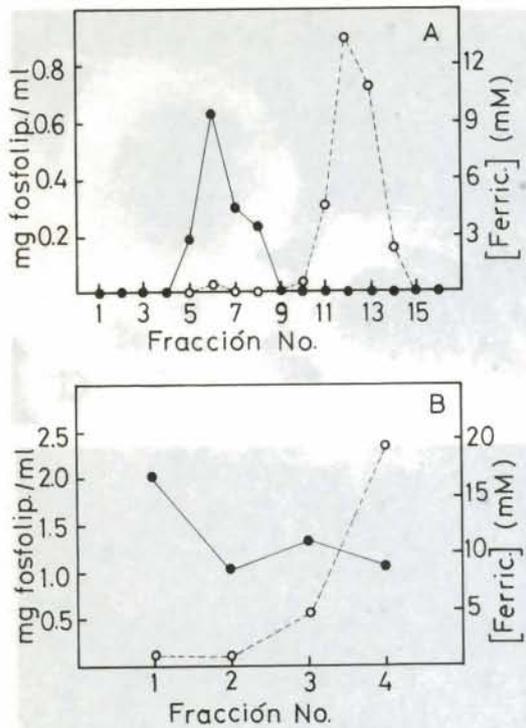


FIGURA 2. Separación de ferricianuro no encapsulado en MLV por filtración en gel (A) y por centrifugación en minicolumnas de gel (B). (○---○) Concentración de ferricianuro; (●---●) Concentración de fosfolípido.

cianuro no encapsulado había sido retirado. En los experimentos que siguen todas las preparaciones se centrifugaron a 1.250 xg durante 4 minutos a temperatura ambiente.

La figura 2A muestra el perfil cromatográfico para la filtración en gel (Sephadex G-50) de una preparación de MLV conteniendo ferricianuro potásico. La filtración se realizó del modo convencional, en una columna de 1x20 cm, a temperatura ambiente y con una velocidad de flujo de 50 ml/hr. La figura 2B muestra la separación del ferricianuro no encapsulado por centrifugación en minicolumna de Sephadex G-50 para la misma muestra. Las fracciones siguientes a la primera se obtuvieron por adición a la columna de 100 µl de tampón sin ferricianuro y centrifugación en las mismas condiciones. En las fracciones obtenidas por ambos métodos se determinó la concentración de fosfolípido y la de ferricianuro, añadiéndose Triton X-100 para determinar el ferricianuro encapsulado en los liposomas.

En la figura 2A se observan dos picos para

ferricianuro: uno correspondiente al ferricianuro libre, que eluye más retardado y otro a ferricianuro encapsulado que está asociado al pico de los liposomas y que eluye con el volumen muerto. En la figura 3B (centrifugación en minicolumnas) se observa que los liposomas se obtienen en el primer eluido, junto con una pequeña cantidad de ferricianuro que corresponde al ferricianuro encapsulado. Los siguientes lavados de la columna arrastran cada vez menos cantidad de fosfolípido, mientras que la concentración de ferricianuro va aumentando (ferricianuro libre).

Las figuras 3 y 4 muestran los resultados obtenidos para SUV y LUV que son prácticamente similares a los descritos para MLV, variando sólo cuantitativamente, pues cada tipo de liposoma tiene una capacidad de encapsulamiento diferente.

El % de recuperación de fosfolípido fue del orden del 96% para el método de filtración en gel y del 98% para la centrifugación en minico-

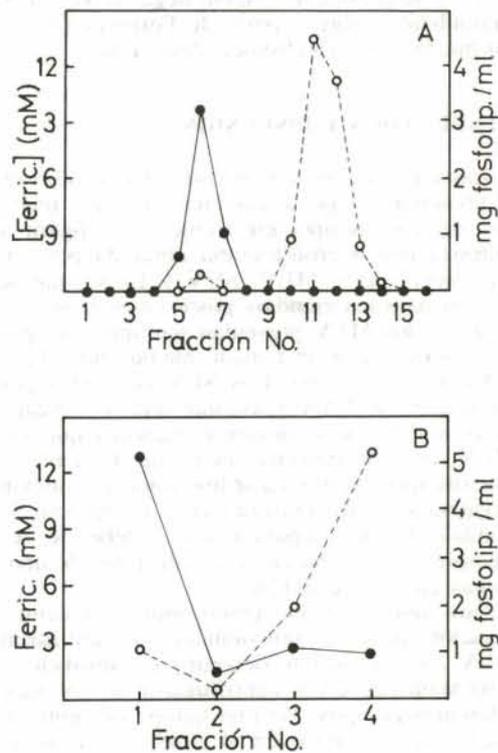


FIGURA 3. Separación de ferricianuro no encapsulado en SUV por filtración en gel (A) y por centrifugación en minicolumnas de gel (B). (○---○) Concentración de ferricianuro; (●---●) Concentración de fosfolípido.

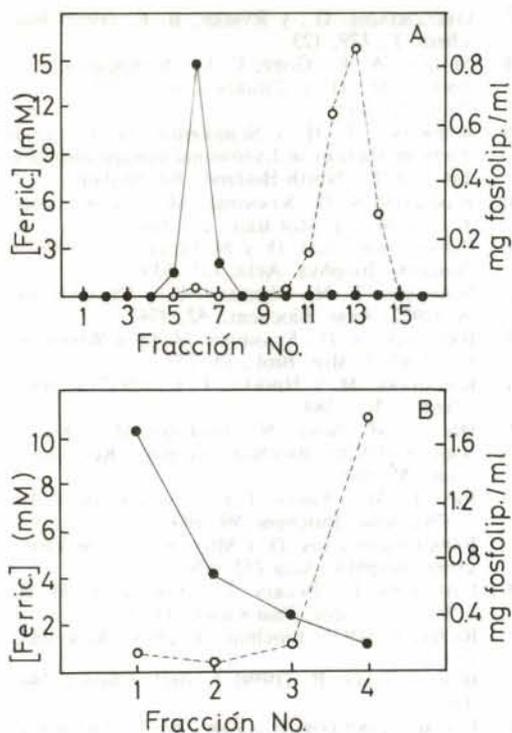


FIGURA 4. Separación de ferricianuro no encapsulado en LUV por filtración en gel (A) y por centrifugación en minicolumnas de gel (B). (○---○) Concentración de ferricianuro; (●---●) Concentración de fosfolípido.

lumnas, resultados tan similares que no se decantan a favor ni de uno ni de otro método.

Una de las ventajas fundamentales del método de centrifugación en minicolumnas de gel es su rapidez. Una filtración en gel puede durar 20 ó 25 minutos mientras que la centrifugación en minicolumnas se realiza en tan sólo 4 minutos. Otro factor muy importante es que en el método de centrifugación en minicolumnas se pueden procesar varias muestras a la vez mientras que en la filtración en gel se han de procesar una tras otra, con lo que esto supone en cuanto al tiempo necesario.

Un punto decisivo a favor de la centrifugación en minicolumnas es que no hay dilución de la muestra. Al realizar la filtración en gel de una muestra de liposomas de 1 ml el eluido de liposomas tiene un volumen del orden de 5 ml. En la centrifugación en minicolumnas se pueden procesar muestras de hasta 25 µl y no hay dilución de las mismas, lo cual es muy importante cuando se trabaja con muestras biológicas que son muy difíciles de preparar.

El volumen encapsulado para cada tipo de liposomas se calculó midiendo la cantidad de ferricianuro encapsulado en liposomas, tras separar el ferricianuro libre por los dos métodos. Dicha cantidad se puede transformar en volumen pues se conoce el coeficiente de extinción molar del ferricianuro y la concentración a la que se encuentra el ferricianuro encapsulado. La tabla 1 muestra los volúmenes encapsulados, expresados en litros/mol de fosfolípido, para MLV, SUV y LUV. Los valores obtenidos son similares por una y otra técnica y ambos concuerdan muy bien con los citados en la bibliografía (32). Esta concordancia para los valores de volumen encapsulado establece el soporte más firme para demostrar la validez de la centrifugación en minicolumnas como técnica para separar solutos no encapsulados en liposomas.

Finalmente, a las ventajas ya enunciadas del método de centrifugación en minicolumnas con respecto a otros métodos y en particular con respecto a la filtración en gel, podemos destacar que el mismo es perfectamente válido para cualquier tipo de liposomas, MLV, SUV, LUV, según queda demostrado por los resultados expuestos en el presente trabajo.

El procedimiento podría extenderse a solutos de mayor peso molecular utilizando un gel con el tamaño de partícula adecuado. Por otra parte presenta otras posibles aplicaciones, como podrían ser el estudio tanto de la salida como de la captura de sustancias por liposomas, tras la separación rápida de las mismas que quedan libres.

TABLA 1

*VOLÚMENES ENCAPSULADOS PARA DIFERENTES TIPOS DE LIPOSOMAS, MEDIDOS TRAS SEPARAR EL FERRICIANURO LIBRE POR FILTRACIÓN EN GEL Y POR CENTRIFUGACIÓN EN MINICOLUMNAS DE GEL (SEPHADEX G-50 FINE). EL VOLUMEN ENCAPSULADO SE EXPRESA EN LITROS/mol DE FOSFOLÍPIDO*

PROCEDIMIENTO	MLV	LUV	SUV
Filtración en gel	1.25±0.10	2.16±0.15	0.99±0.10
Centrifugación en minicolumnas de gel	1.29±0.12	2.24±0.09	1.06±0.08

Este trabajo se realizó como parte de un Proyecto de Investigación financiado por la CAICYT (n.º 3401-83003-01).

## BIBLIOGRAFÍA

1. TYRRELL, D. A., HEATH, T. D., COLLEY, C. M. y RYMAN, B. E. *Biochim. et Biophys. Acta* (1976), **457**, 259.
2. COLLEY, C. M. y RYMAN, B. E. *TIBS* (1976), 203.
3. PAGANO, R. E. y WEINSTEIN, J. N., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* (1978), **7**, 435.
4. FRALEY, R. y PAPAHDIOPOULOS, D., *TIBS* (1981), 77.
5. FRALEY, R., SUBRAMANI, S., BERG, P. y PAPAHDIOPOULOS, D., *J. Biol. Chem.* (1980), **255**, 10431.
6. DESHAYES, A., HERRERA-ESTRELLA, L. y CABO-CHE, M., *The EMBO Journal*, **4**, 2731.
7. ALVING, C. R. y SWARTZ, Jr. G. M. (1981) en «Liposome Technology», **2**, 55.
8. KIMELBERG, H. K. (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **448**, 531.
9. COLLEY, C. M. y RYMAN, B. E. (1975), *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 157.
10. PAPAHDIOPOULOS, D., POSTE, G., VAIL, W. J. y BIEDLER, J. L. (1976), *Cancer Res.*, **36**, 2988.
11. RAHMAN, Y., LERNY, E. A., TOLLAKSEN, E. L., WRIGHT, B. J., NANCE, S. L. y THOMSON, J. F. (1974), *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **146**, 1173.
12. SEGAL, A. W., GREGORIADIS, G., y BLACK, C. D. V. (1975), *Clin. Sci. Mol. Med.*, **49**, 99.
13. GREGORIADIS, G. (1974), *Biochem. Soc. Trans.*, **2**, 117.
14. MAYHEW, E., PAPAHDIOPOULOS, D., RUSTUM, Y. M. y DAVE, C. (1976), *Cancer Res.*, **36**, 4406.
15. PAPAHDIOPOULOS, D., POSTE, G., MAYHEW, E. (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **363**, 404.
16. WISSMAN, G., COHEN, C. y HOFFSTEIN, S. (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **498**, 375.
17. GREGORIADIS, G., y RYMAN, B. E. (1972) *Biochem. J.*, **129**, 123.
18. MAGEL, W. E., GOFF, C. G., SCHOKNECHT, J., SMITH, M. D. y CHERIAN, K. (1974) *J. Cell Biol.*, **63**, 492.
19. ROERDINK, F. H. y SCHERPHOF, G. L. (1974) *Enzyme therapy in Lysosomal storage diseases*, pp. 179-181, North-Holland, Amsterdam.
20. BANGHAM, A. D., STANDISH, M. D. y WATKINS, J. C. (1965), *J. Mol. Biol.*, **13**, 238.
21. PAPAHDIOPOULOS, D. y NATKINS, J. C. (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 639.
22. SORENSEN, E. N., WISSMAN, G. y VIDAVER, G. A. (1977) *Anal. Biochem.*, **82**, 376.
23. BANGHAM, A. D., STANDISH, M. M. y WISSMAN, G. (1965) *J. Mol. Biol.*, **13**, 253.
24. KASAHARE, M. y HINKLE, P. C. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 7384.
25. HIRATA, M., SONE, N., YOSHIDA, M. y KAGAWRA, Y. (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 665.
26. FRY, D. W., WHITE, J. C. y GOLDMAN, I. D. (1978), *Anal. Biochem.*, **90**, 809.
27. PAPAHDIOPOULOS, D. y MILLER, N. (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 624.
28. SAUNDERS, L., PERRIN, J. y GAMMACK, D. B. (1962), *J. Pharm. Pharmacol.*, **14**, 567.
29. RAZIN, S. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 241.
30. BARTLETT, G. R. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 460.
31. PAPAHDIOPOULOS, D., VAIL, W. J., JACOBSON, K. y POSTE, G. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **394**, 483.
32. SZOKA, Jr. F. y PAPAHDIOPOULOS, D. (1980), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, (1980), **9**, 467.