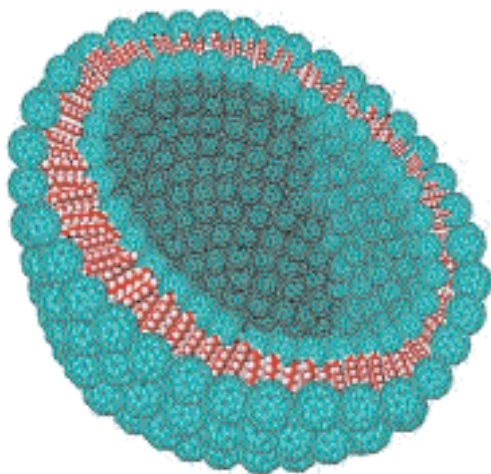




*Cristiano Bello, Giovanna Mancini, Danilo Corradini
Istituto di Metodologie Chimiche del CNR - Area della
Ricerca di Roma - Monterotondo Stazione (Roma)
danilo.corradini@imc.cnr.it*

LIPOSOMI IN ELETTROFORESI CAPILLARE

Additivi di soluzioni elettrolitiche e pseudo-fase stazionaria in sospensione

L'articolo descrive in forma sintetica i risultati degli studi recentemente intrapresi nel nostro laboratorio per valutare l'impiego dei liposomi in elettroforesi capillare di peptidi e proteine sia come additivi delle soluzioni elettrolitiche sia come pseudo-fase stazionaria in sospensione.

In particolare sono descritti i risultati degli studi condotti mediante la preparazione di liposomi unilamellari costituiti dal fosfolipide 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicerolo-3-fosfatidilcolina (POPC), i quali sono stati preparati mediante una tecnica di estrusione attraverso filtri di dimensioni appropriate. L'articolo descrive le diverse strategie che sono state predisposte per valutare l'efficacia dei liposomi nell'influencare positivamente selettività, risoluzione ed efficienza delle separazioni di peptidi e proteine in capillari di silice fusa non sottoposti a trattamento di modificazione chimica della parete interna, quando utilizzati sia come additivi sia come pseudo-fase in sospensione nella soluzione elettrolitica.

I liposomi o vescicole sono aggregati della forma sferica nelle quali una fase acquosa è interamente racchiusa da una o più membrane composte da molecole anfifile, cioè molecole in cui sono contemporaneamente presenti gruppi funzionali polari e apolari (1-2). L'interesse per questa classe di aggregati è principalmente rivolto agli usi industriali in campo cosmetico, alimentare e farmaceutico, ove trovano ampia applicazione come veicoli di farmaci (3). I liposomi sono anche largamente utilizzati come modelli delle membrane cellulari nello studio dei processi di trasporto mediante i quali le cellule regolano i processi metabolici (3). I liposomi che si ottengono dall'aggregazione di lipidi possono avere dimensioni e numero di doppi strati diversi. Vescicole multilamellari (MLV) di grandi dimensioni (500÷1.000 nm) sono costituite da doppi strati concentrici separati da un sottile strato di solvente. Liposomi unilamellari, con diametro di 100÷400 nm (LUV) e di 25÷40 nm (SUV) sono invece costituiti da un singolo doppio strato e possono essere preparati

dalle vescicole multilamellari mediante diverse tecniche (4). La cavità interiore delle vescicole può incapsulare soluzioni acquose di molecole idrosolubili che possono essere successivamente rilasciate all'esterno.

L'elettroforesi capillare è utilizzata negli studi delle interazioni tra farmaci e liposomi, e come tecnica utilizzata per valutare l'omogeneità dimensionale dei liposomi, i quali sono stati anche impiegati come modificatore dinamico della parete dei capillari di silice fusa e, in un numero limitato di applicazioni, come fase dispersa in cromatografia elettrocinetica capillare per la separazione di molecole di ridotto ingombro sterico (5-10, 12-17). Questa particolare tecnica di elettroforesi capillare, che utilizza una pseudo-fase stazionaria costituita da liposomi sospesi nella soluzione elettrolitica, è stata denominata da Hjerten, che per primo la ha proposta, LCE (Liposome Capillary Electrophoresis). L'impiego della LCE per separazioni di biopolimeri è stata recentemente da noi proposta con uno studio che ha dimostrato l'ef-

ficacia dei liposomi nella separazione di peptidi e proteine in elettroforesi capillare utilizzando capillari di silice fusa non sottoposti a modificazione chimica della parete interna (11).

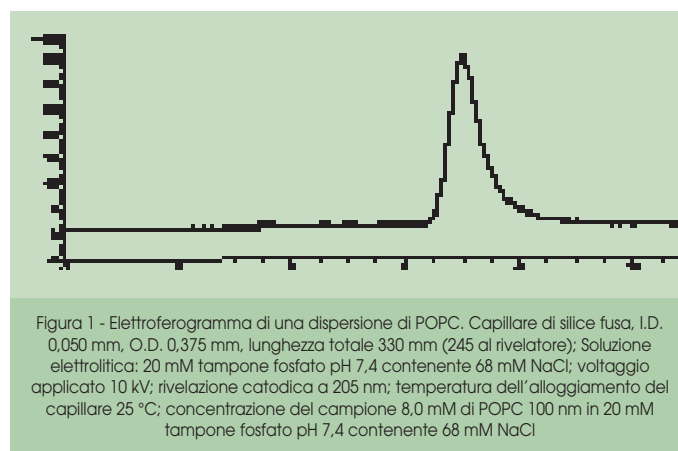
Questo articolo descrive l'azione condotta da liposomi costituiti dal fosfolipide 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicerolo-3-fosfatidilcolina (POPC) sul flusso elettroosmotico e la separazione di peptidi e proteine in capillari di silice fusa non soggetti a trattamenti di modificazione chimica della parete interna. Lo studio è stato condotto utilizzando liposomi unilamellari preparati mediante una tecnica di estrusione attraverso filtri di dimensioni appropriate ed è stato esteso all'investigazione di diverse tecniche mediante le quali utilizzare i liposomi come pseudo-fase stazionaria sospesa nella soluzione elettrolitica. Le diverse strategie valutate includono il parziale o totale riempimento del capillare con la sospensione dei liposomi, oppure l'impiego dei liposomi come additivo in sospensione della soluzione elettrolitica. Lo studio è stato condotto valutando gli effetti delle diverse strategie sperimentali sul flusso elettroosmotico e le proprietà elettroforetiche di peptidi e proteine.

Preparazione e caratterizzazione dei liposomi

Lo studio è stato condotto utilizzando vescicole unilamellari (LUV) costituite dal fosfolipide 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicerolo-3-fosfolcolina (POPC), del diametro di 100 nm. Le vescicole unilamellari sono state preparate secondo il seguente protocollo, derivato da procedure riportate in letteratura (18-19). Una quantità di POPC è disciolta in cloroformio. Il cloroformio è fatto evaporare fino a formazione di un film omogeneo di fosfolipide sulla parete interna del pallone, allontanando le ultime tracce di cloroformio a pressione ridotta. Il film è quindi idratato con tampone fosfato (pH 7,4), fino ad ottenere una concentrazione di POPC nella soluzione pari a 40 mM. La sospensione di liposomi multilamellari ottenuta è sottoposta a cinque cicli di raffreddamento a -70 °C e riscaldamento a temperatura ambiente (procedura freeze-thaw) (2) e successivamente fatta passare attraverso una membrana di policarbonato con pori di dimensioni pari a 100 nm (metodo dell'estrusione) (18-19). L'omogeneità e la distribuzione delle dimensioni della sospensione estrusa sono state verificate tramite elettroforesi capillare (CE) utilizzando un capillare di silice fusa dello stesso diametro (50 µm) e lunghezza totale (33,0 cm) di quelli utilizzati per tutti gli esperimenti.

L'elettroferogramma riportato in Figura 1 mostra che il picco del POPC ha un aspetto di tipo gaussiano indicando omogeneità del campione e una distribuzione molto stretta delle dimensioni delle vescicole (21). Questi risultati evidenziano come la CE può essere una valida alternativa al laser light scattering per verificare la

bontà delle preparazioni delle vescicole (15, 22-23). Il tempo di migrazione per il POPC nelle condizioni sperimentali indicate in Figura 1 è 7,02 minuti, mentre il picco del marker neutro (ossido di mesitile) migra a 3,2 min. Questo indica che i liposomi di POPC hanno una parziale carica negativa e migrano contro il flusso elettroosmotico, in accordo con la carica negativa del POPC evidenziata precedentemente da misure di potenziale di superficie (24) e CE (14).



LCE di peptidi

L'influenza dei liposomi sulle proprietà di migrazione elettroforetica dei peptidi è stata valutata utilizzando tre peptidi sintetici di peso formula compreso tra 931,11 e 1.296,49 Da e struttura primaria dell'angiotensina I, angiotensina II e angiotensina III (umana), differenti una dall'altra per alcuni residui amminoacidici.

Lo studio è stato condotto valutando diversi approcci. Una prima strategia è consistita nel riempire parzialmente il capillare con una sospensione di liposomi nella soluzione elettrolitica. Volumi parziali di dispersione liposomiale (plug) di concentrazione pari a 200 µM sono stati introdotti all'interno nel capillare mediante iniezioni idrodinamiche a 5 kPa (50 mbar).

Gli esperimenti sono stati eseguiti iniettando la miscela dei peptidi dopo avere riempito parzialmente il capillare con volumi di dispersione di POPC. Dopo ogni corsa il capillare è stato flussato con il BGE per 1 minuto allo scopo di rimuovere il plug di POPC introdotto nell'iniezione precedente.

La Figura 2 mostra la separazione della miscela di peptidi in assenza (pannello A) ed in presenza di un plug di POPC di concentrazione 200 µM, pari a 251 nL (pannello B) e 502 nL (pannello C). Si può notare come il tempo di migrazione dei peptidi e la loro risoluzione cresca con l'aumentare del plug introdotto

nel capillare. Tale effetto non si osserva introducendo plug equivalenti di POPC di concentrazione pari a 6 μM .

L'effetto del POPC sulla mobilità apparente dei peptidi è molto più evidente riempiendo il capillare con plug di dispersione di POPC alla concentrazione di 200 μM (Figura 3B). Il riempimento completo del capillare è stato realizzato iniettando un volume di 1.004 nL, pari a 1,55 volte il volume totale del

capillare (648 nL). Dopo ogni corsa il capillare è stato flussato con il BGE per 7 minuti prima di introdurre un nuovo plug di POPC di 1.004 nL. La deviazione standard relativa (RSD) calcolata sui tempi di migrazione ottenuti per ripetute iniezioni della miscela di peptidi evidenzia la buona ripetibilità dei valori della mobilità (Tabella).

I dati sperimentali mostrano che sia il volume del plug di POPC iniettato sia la sua concentrazione, influenzano le proprietà elettroforetiche dei peptidi utilizzati. In particolare i tempi di migrazione dei peptidi aumentano all'aumentare sia del volume sia della concentrazione della dispersione di POPC. L'ipotesi che le variazioni dei tempi di migrazione siano dovute alle interazioni dei liposomi con i peptidi è stata dimostrata dalle evidenze sperimentali sotto descritte, sebbene non sia stata esclusa l'azione di altri fattori nel determinare le variazioni dei tempi di migrazione osservate. Tra questi non sono affatto da trascurare le variazioni di EOF, viscosità del BGE e del plug di POPC introdotto, temperatura e possibili interazioni con la parete del capillare. In Figura 4 sono riportate le mobilità relative o selettività dei tre peptidi in funzione del plug di POPC di concentrazione 200 μM introdotto nel capillare.

I grafici riportati in Figura 4 rappresentano le variazioni delle mobilità relative o selettività dei peptidi in funzione del plug di POPC di concentrazione 200 μM introdotto nel capillare. L'andamento dei grafici conferma che le variazioni osservate sono il risultato di interazioni specifiche dei peptidi con il POPC piuttosto che la conseguenza di variazioni di parametri che influenzano la mobilità elettroforetica apparente degli analiti in modo non selettivo, quali EOF o viscosità del plug introdotto

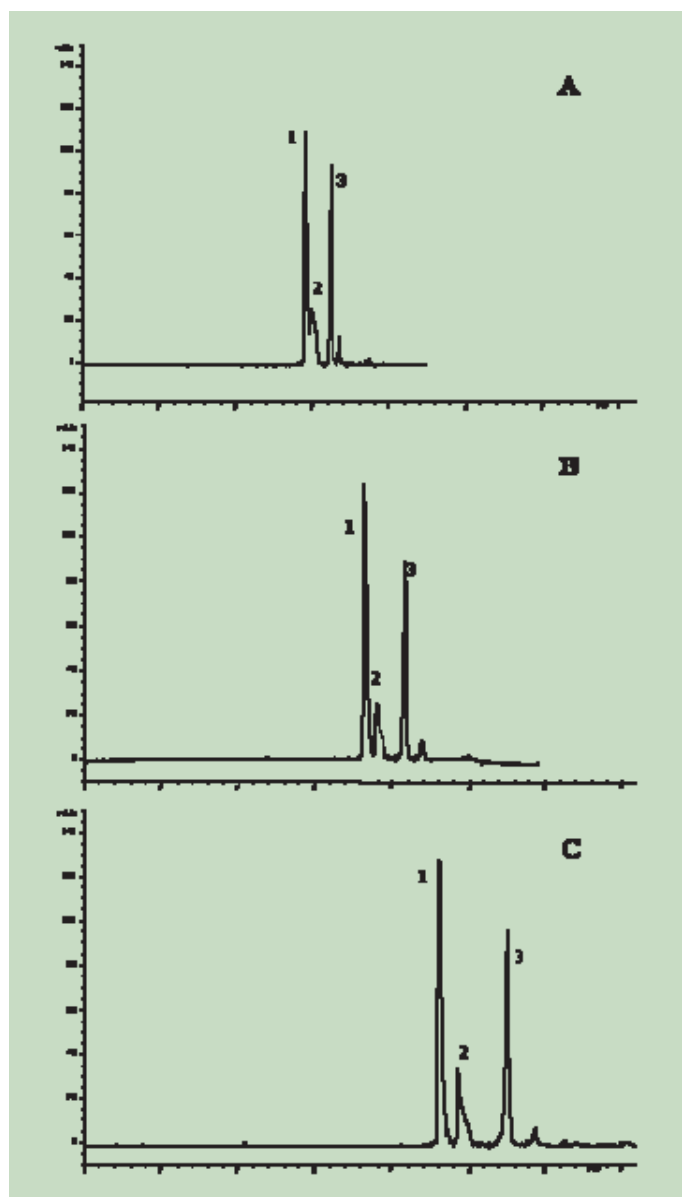


Figura 2 - Separazione di peptidi in assenza (A) e in presenza (B-C) di POPC. Capillare parzialmente riempito con 251 nL (B) e 502 nL (C) di dispersione di POPC in 20 mM tampone fosfato pH 7,4 contenente 68 mM NaCl di concentrazione 200 μM ; peptidi, angiotensina III (1), angiotensina II (2), angiotensina I (3). Capillare e condizioni sperimentali come in Figura 1, eccetto la rivelazione effettuata a 214 nm

Ripetibilità dei tempi di migrazione dei tre peptidi sintetici in LCE con il capillare completamente riempito con una dispersione di POPC di concentrazione 200 μM in BGE (20 mM tampone fosfato pH 7,40 contenente 68 mM NaCl)

Run	Tempi di Migrazione (min.)		
	Angiotensina III	Angiotensina II	Angiotensina I
1	5,43	5,77	6,71
2	5,86	6,26	7,42
3	5,84	6,21	7,36
4	5,59	5,93	6,99
$\langle t_m \rangle$ (min.)	5,68	6,04	7,12
SD	0,18	0,20	0,29
RSD (%)	3,16	3,33	4,05

t_m , tempo di migrazione; SD, deviazione standard, RSD, deviazione standard relativa

nel capillare. Ad esempio l'angiotensina I e l'angiotensina II sono simili come dimensioni e ci si aspetta che abbiano lo stesso comportamento al variare della viscosità della soluzione elettrolitica. Similmente ci si aspetta che le possibili variazioni di EOF contribuiscano allo stesso modo sulle mobilità dei tre peptidi. Al contrario, il grafico di Figura 4 mostra variazioni differenti di selettività che dipendono dal volume di dispersione di POPC iniettato e dalla coppia di peptidi.

La mobilità relativa della coppia angiotensina I/angiotensina II è poco influenzata da un piccolo volume di POPC iniettato mentre cresce significativamente quando il volume iniettato diventa più grande di 502 nL. Un comportamento simile si osserva per l'altra coppia angiotensina II/angiotensina III e la differente pendenza delle due curve conferma ulteriormente l'esistenza di interazioni selettive tra i peptidi e i liposomi introdotti nel capillare.

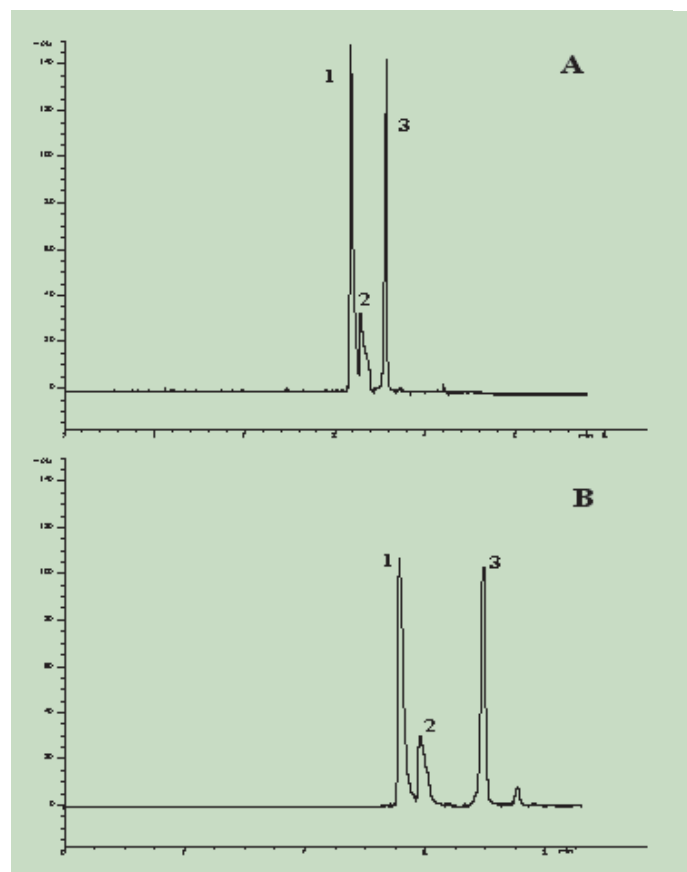


Figura 3 - Separazione di peptidi in presenza di POPC. Capillare completamente riempito con una dispersione di POPC in 20 mM tampone fosfato pH 7,4 contenente 68 mM NaCl di concentrazione 6,0 μ M (A) e 200 μ M (B). Capillare, campioni e condizioni sperimentali come in Figura 2

Influenza dei liposomi sul flusso elettroosmotico

È stata studiata la possibilità che i liposomi interagiscano con la parete del capillare influenzando il flusso elettroosmotico. Lo studio è stato condotto iniettando dispersioni di POPC con volumi variabili da 52 a 522 nL e misurando l'EOF dopo ogni iniezione del plug della dispersione di POPC alla concentrazione di 60 μ M. Il grafico del valore del flusso elettroosmotico in funzione del volume di dispersione di POPC iniettato è rappresentato in Figura 5 e mostra come l'EOF decresce all'aumentare del plug iniettato. La variazione del flusso elettroosmotico è risultata dipendere dal volume di dispersione di POPC fatta passare nel capillare. Così il passaggio nel capillare di un volume di sospensione di POPC di concentrazione di 60 μ M cinque volte maggiore del volume di soluzione elettrolitica contenuta nel capillare, determina la diminuzione della mobilità elettroforetica fino al valore di $9,08 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$, che è circa un ordine di grandezza minore del valore misurato in assenza di POPC.

Analoghi risultati sono stati ottenuti facendo fluire il capillare con la dispersione di POPC per un tempo variabile da 5 a 20 minuti, tutti tempi molto al di sopra del tempo necessario a riempire completamente il capillare (248 secondi). Questo indica che l'influenza del POPC sull'EOF è significativamente più grande quando la zona di contatto tra la dispersione liposomiale e la parete interna del capillare è estesa a tutta la lunghezza del capillare, ed è prolungata nel tempo. Non si osserva alcuna variazione apprezzabile di EOF quando la dispersione di POPC è fatta fluire nel capillare per più di 20 minuti, il che sta ad indicare il raggiunto stato di equilibrio.

Rimuovendo il plug di POPC tramite flussaggio di BGE per 15 minuti, si ha un aumento della mobilità elettroosmotica fino al

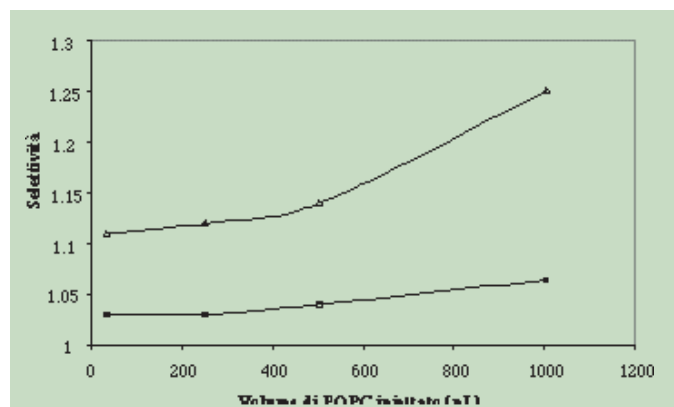


Figura 4 - Effetto del volume iniettato di una dispersione di POPC di concentrazione 200 μ M sulla selettività di peptidi (rapporto tra la mobilità apparente di (●) angiotensina II/angiotensina III e (▲) angiotensina I/angiotensina II). Capillare e condizioni sperimentali come in Figura 2

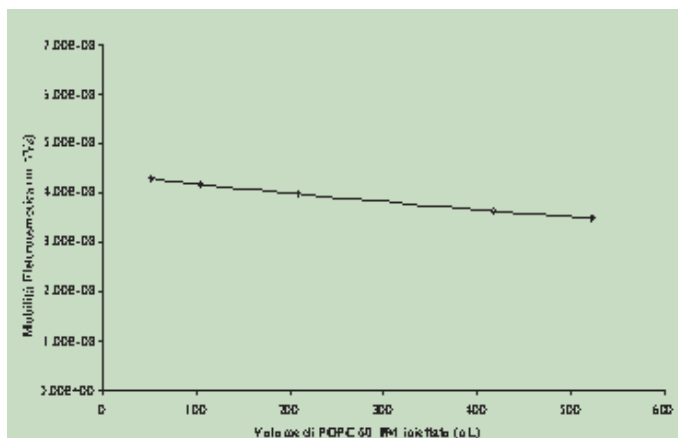


Figura 5 - Effetto del volume iniettato di una dispersione di POPC di concentrazione 60 µM sul flusso elettroosmotico. Il marker neutro è ossido di mesitile (soluzione acquosa 1,0 mg/mL). Capillare e condizioni sperimentali come in Figura 2, eccetto la rivelazione effettuata a 214 nm

valore di $3,99 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ che è un valore più basso del 6,1% del valore medio di mobilità elettroosmotica misurato prima di flushare la dispersione di POPC. Il valore di EOF torna al valore originario dopo un ulteriore flussaggio di BGE per 15 minuti, evidenziando la poca stabilità del coating dinamico del capillare ottenuto facendo fluire la sospensione di POPC all'interno del capillare. Queste osservazioni sono in accordo con i risultati riportati da recenti studi sull'uso dei liposomi come agenti per realizzare un coating dinamico di capillari di silice fusa utilizzati per la separazione di steroidi, che descrivono la scarsa stabilità del coating dinamico ottenuto con sospensioni di POPC in tampone fosfato [13].

L'indagine è stata estesa allo studio delle variazioni di EOF facendo fluire all'interno del capillare dispersioni di POPC di diversa concentrazione. Gli studi sono stati condotti facendo fluire il capillare per 20 minuti con una dispersione di POPC di concentrazione crescente (da 32 a 200 µM) e misurando l'EOF dopo ogni flussaggio. Il flusso elettroosmotico è stato misurato con riferimento al tempo di

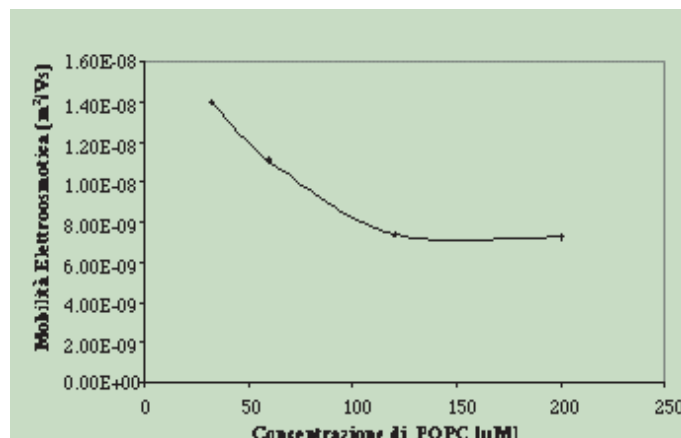


Figura 6 - Effetto della concentrazione del POPC sul flusso elettroosmotico. Il marker neutro è tetraidrofurano (soluzione acquosa 10% v/v). Capillare e condizioni sperimentali come in Figura 2, eccetto la rivelazione effettuata a 214 nm

migrazione del tetraidrofurano (soluzione acquosa al 10% v/v), che è stato utilizzato come marker neutro preferito all'ossido di mesitile in base alle presupposte minime interazioni di questo solvente con i liposomi. La dipendenza dell'EOF dalla concentrazione di POPC è riportata in Figura 6, come grafico della mobilità elettroosmotica in funzione della concentrazione di POPC nella dispersione liposomiale. Aumentando la concentrazione di POPC, la mobilità elettroosmotica decresce e la curva risultante ha un andamento tipico delle isoterme di Langmuir, suggerendo un adsorbimento del POPC nella regione di Stern del doppio strato elettrico all'interfaccia tra la parete del capillare e la soluzione elettrolitica, come osservato in precedenza con varie oligoammine [20, 25-26].

LCE di proteine basiche

Lo studio è stato anche esteso alla possibilità di separare proteine basiche in capillari di silice fusa riempiti con dispersioni di POPC a varie concentrazioni. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando quattro proteine basiche con punti isoelettrici com-

Use of Liposomes in Capillary Electrophoresis as Additives and as Pseudo-Stationary Phase in Suspension

This brief report describes the results of our recent studies carried out to evaluate the use of liposomes in capillary electrophoresis of peptides and proteins, acting as additive or as a dispensed pseudo-stationary phase with the capability of improving efficiency, selectivity and resolution. The report describes the results of our studies conducted with unilamellar liposome suspensions consisting of the phospholipid 1-palmitoyl-2-oleyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), which is prepared by an extrusion technique. The report describes the different strategies that have been employed for allowing the liposomes to act as a pseudo-stationary phase with the ability of modulating selectivity, resolution and separation performance of peptides and proteins in bare fused silica capillaries.

ABSTRACT

presi tra 9,5 (citocromo C) e 11,0 (lisozima), e pesi molecolari compresi tra 12.400 Da (citocromo C) e 25.000 Da (α -chimotripsinogeno) (27). Queste proteine adsorbono irreversibilmente sulle pareti del capillare di silice fusa quando l'elettroforesi è condotta utilizzando tampone fosfato a pH 7,4 in assenza di POPC. I risultati sono stati poco soddisfacenti anche riempiendo il capillare con dispersioni di POPC di diversa concentrazione, variabile da 6 a 200 μ M. L'efficiente separazione delle proteine è stata invece osservata utilizzando la sospensione di POPC 60 μ M nel BGE sia per eseguire il coating dinamico del capillare sia come soluzione elettrolitica per la corsa elettroforetica, come riportato in Figura 7.

A pH 7,4 le quattro proteine basiche sono cariche positivamente per cui stabiliscono intense interazioni elettrostatiche con la parete del capillare carica negativamente per la presenza di gruppi silanolo ionizzati. La presenza di queste interazioni determina l'adsorbimento delle proteine osservato in assenza di coating dinamico, il quale è, comunque, poco efficace nel sopprimere le interazioni, come evidenziato dalla scarsa efficienza comunque raggiunta per la sola azione del coating. Il sensibile incremento di efficienza osservato con l'impiego della dispersione di POPC nella soluzione elettrolitica è posto in relazione con il possibile effetto competitivo esercitato dalle cariche negative presenti sulla parete delle vescicole nei confronti delle cariche negative localizzate sulla parete del capillare, dovute alla ionizzazione dei gruppi silanolo e fonte delle deleterie interazioni con le proteine. Ciò in considerazione del maggiore sviluppo superficiale delle vescicole in confronto a quello della superficie interna del capillare.

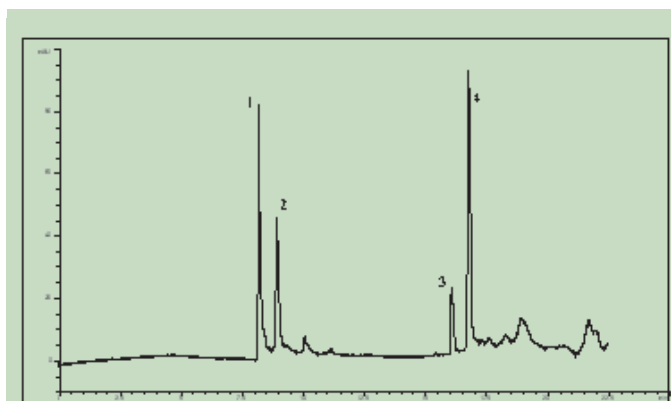


Figura 7 - Separazione di proteine basiche mediante LCE. Capillare completamente riempito con una dispersione di POPC di concentrazione 60 μ M in 20 mM tampone fosfato pH 7,4 contenente 68 mM NaCl, impiegata anche come soluzione elettrolitica. Proteine, lisozima (1), citocromo C (2), ribonucleasi A (3), α -chimotripsinogeno (4). Tutte le condizioni come in Figura 2

Conclusioni

Gli studi condotti nel nostro laboratorio hanno evidenziato che la LCE può essere utilmente impiegata per separare peptidi e proteine in capillari di silice fusa non sottoposti a trattamento di modificazione chimica della parete interna, anche a valori di pH in ambiente debolmente alcalino (pH 7,4). La presenza di interazioni selettive osservate tra peptidi di struttura primaria simile e il POPC dimostra la possibilità di utilizzare i liposomi come pseudo fasi stazionarie sospese nella soluzione elettrolitica. Gli studi in corso sono diretti a sintetizzare liposomi di composizione chimica opportunamente progettata per stabilire interazioni selettive con specifiche classi di peptidi e proteine.

Bibliografia

- (1) A. Sharma, U.S. Sharma, *Int. J. Pharm.*, 1997, **154**, 123.
- (2) S. Vemuri, C.T. Rhodes, *Pharm. Acta Helv.*, 1995, **70**, 95.
- (3) D.D. Lasic, *Liposome: From Physics to Application*, Elsevier, 1993.
- (4) *Liposome Technology*, G. Gregoriadis (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 1984.
- (5) Y. Zhang *et al.*, *Electrophoresis*, 1995, **16**, 1519.
- (6) D. Chen *et al.*, *J. Pharm. Biomed.*, 2000, **22**, 791.
- (7) S.T. Burns *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2002, **973**, 167.
- (8) J. McKeon, M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. A*, 2003, **1004**, 39.
- (9) G. Manetto *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2003, **990**, 281.
- (10) Y. Kuroda *et al.*, *J. Pharm. Biomed.*, 2003, **30**, 1869.
- (11) D. Corradini *et al.*, *Chromatographia*, in corso di stampa.
- (12) J.M. Cunliffe *et al.*, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 776.
- (13) J.T. Hautala *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2003, **1004**, 81.
- (14) S.K. Wiedmer *et al.*, *Electrophoresis*, 2001, **22**, 1305.
- (15) M.A. Roberts *et al.*, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 3434.
- (16) S. Terabe *et al.*, *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 111.
- (17) T. Welsh, D. Michalke, *J. Chromatogr. A*, 2003, **1000**, 935.
- (18) M.J. Hope *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **812**, 55.
- (19) M.J. Hope *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, **858**, 161.
- (20) D. Corradini *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2003, **1013**, 221.
- (21) S. Radko, A. Chrambach, *J. Chromatogr. A*, 1999, **722**, 1.
- (22) S.P. Radko *et al.*, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5955.
- (23) S.P. Radko *et al.*, *J. Chromatogr. B*, 2001, **761**, 69.
- (24) K. Makino *et al.*, *Biophys. Chem.*, 1991, **41**, 175.
- (25) D. Corradini, G. Cannarsa, *Electrophoresis*, 1995, **16**, 630.
- (26) D. Corradini, L. Spreccacenero, *Chromatographia*, 2003, **58**, 1.
- (27) P.G. Righetti, T. Caravaggio, *J. Chromatogr.*, 1976, **127**, 1.