

DISS.ETH Nr. 11778

**Entwicklung liposomaler Arzneistoffträger zur Behandlung der  
chronischen viralen Hepatitis B mit lipophilen Nucleosidanaloga und  
Nucleinsäuren**

Abhandlung  
zur Erlangung des Titels

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

PATRIZIA ANNA PEGHINI

Eidg. Dipl. Pharm.  
geboren am 20. November 1967  
Näfels, Glarus, Schweiz

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. G. Folkers Referent  
PD Dr. R.A. Schwendener Korreferent

Zürich 1996

## SUMMARY

Chronic hepatitis B virus (HBV) infection and its consequences are major medical problems throughout the world. The infection with HBV affects about 300 million people with a particularly high incidence in Asia. In the USA about 1 million people are chronically infected with HBV causing about 10'000 deaths annually. At this time there are no satisfactory therapies available for an effective treatment of chronic hepatitis B infections. Therefore, the progression of the chronic infection to cirrhosis or to hepatocellular carcinoma are major medical problems and the development and evaluation of new therapeutic strategies is of great importance.

In this thesis various systems were examined to find new strategies for the treatment of HBV infection. The human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2 2.2.15, stably infected with HBV was used as an *in vitro* model to test different antiviral drugs. To measure an antiviral effect various viral parameters were established. The quantification of precipitated virions from cell culture supernatants and slot-blot analysis of their DNA was found to be a suitable method for a fast screening of different drugs. For further analysis of the drug efficiency the monitoring of intracellular viral DNA by Southern blotting proved to be helpful.

With this *in vitro* system various nucleotide analogs were tested. ddC and the lipophilic derivatives N<sup>4</sup>-palmddC, N<sup>4</sup>-hexadecylC-ddC and dT-N<sup>4</sup>-palmddC incorporated and administered in liposomes reduced the viral replication rate of 50 - 80 % at a concentration of 50 µM.

In a further study, the antiviral efficiency of antisense oligonucleotides (oligos) associated to cationic liposomes was examined. After the synthesis of the cationic cholesterol derivative DC-Chol this positively charged lipid was added to the liposomal formulations. DC-Chol has a low biological toxicity compared to other positively charged lipids. This can be of advantage, especially for *in vivo* treatment strategies. Fluorescent oligonucleotides delivered by cationic liposomes showed a higher cellular uptake with a preferential accumulation in the nucleus. Finally, the antiviral effect of 5'-cholesterol modified antisense oligos directed against sequences of HBV was investigated in the Hep G2 2.2.15 model. The nucleic acids were administered free or complexed with DC-Chol liposomes. However, neither the free nor the complexed oligos showed an antiviral effect.

The biological activity of liposomally transfected DNA was measured with the aid of the lac-Z reporter gene for β-galactosidase. Cationic, pH-sensitive liposomes represent a highly efficient DNA transfer vehicle. *In vitro* up to 80 % of human liver cells could be transfected with the reporter gene. In an *in vivo* distribution study in mice with radioactively labelled DNA more than 70 % of the given dose was found in the liver. Liposomally injected DNA showed a somewhat higher liver concentration compared to free DNA. The histochemical analysis of liver sections after direct intrahepatic injection of the reporter gene showed only in liposomally treated mice a partial expression of β-galactosidase, whereas free DNA showed no expression. However, no expression at all was found after intravenous injection of free or liposomally complexed DNA.

The purpose of another study was the development of hepatocyte specific liposomes. We coupled the glycoprotein asialoorosomuroid (ASOR), whose receptor is predominantly expressed on hepatocytes to the surface of small liposomes. Firstly, we optimized the coupling conditions of the protein. With heterobifunctional crosslinkers a coupling rate of 30 - 50 % was obtained. This corresponded to about 40 ASOR molecules per liposome. Afterwards, the specific amount of internalized liposomes was determined. In binding and uptake studies with iodinated ASOR the expression and activity of the receptor on different cell lines was investigated. Receptor positive cells HuH 7, Hep G2 and Hep G2 2.2.15 and receptor negative SK Hep-1 cells were used. The highest rate of receptor specific uptake of ASOR was found in Hep G2 cells. In uptake studies of ASOR liposomes using very low liposome concentrations and an excess of free ASOR, a receptor mediated uptake was measured, but unspecific internalization of liposomes seems to play an important role in their cellular uptake. A pilot study *in vivo* in mice confirmed an accumulation of asialofetuin modified liposomes in liver which was already measured *in vitro* but the difference to unmodified liposomes was not significant. We conclude that for the development of tissue specific liposomes apart from their modification with receptor specific ligands their size and composition play an important role.

## ZUSAMMENFASSUNG

Weltweit sind ca. 300 Millionen Menschen mit dem Hepatitis B Virus (HBV) mit einer hohen Inzidenz in Asien infiziert. Von den 1 Millionen in den USA chronisch mit dem HBV infizierten Patienten, sterben jährlich ca. 10'000 an den Folgen der chronischen Infektion. Zur Behandlung der chronischen Hepatitis B stehen bis heute keine befriedigenden Therapien zur Verfügung. Das Fortschreiten der chronischen Infektion zur Leberzirrhose und zum hepatozellulären Karzinom stellen demnach grosse medizinische Probleme dar. Deshalb hat die Entwicklung und Untersuchung von neuen Therapiesystemen zur Behandlung der HBV Infektion eine wichtige Bedeutung.

In der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene Therapieansätze zur Behandlung der viralen chronischen Hepatitis B entwickelt.

Zur Untersuchung antiviral wirksamer Substanzen wurde die menschliche Leberzelllinie Hep G2 2.2.15 als *in vitro* Modell verwendet. Diese Zelllinie besitzt ein chromosomal integriertes HBV Genom und zeigt wichtige Charakteristika der chronischen humanen Hepatitis B. Zur Bestimmung eines antiviralen Effektes wurden virale Parameter validiert. Für eine Voranalyse antiviraler Arzneistoffe erwies sich die Quantifizierung der Virionen aus dem Kulturüberstand von Hep G2 2.2.15 Zellen als geeignete Methode. Die Virionen wurden dazu mit Polyethylenglykol gefällt und deren DNS mittels Slot-blot Analyse bestimmt. Die weitere Bestimmung der antiviralen Wirkung von Arzneistoffen wurde durch Quantifizierung und Darstellung der intrazellulären viralen DNS durchgeführt.

Im Hep G2 2.2.15 Modell wurde die Wirkung verschiedener Nukleotidanaloga getestet. Mit ddC und seinen lipophilen Derivate N<sup>4</sup>-palmdc, N<sup>4</sup>-hexadecyldc-ddC und dT-N<sup>4</sup>-palmdc, die verpackt in Liposomen verabreicht wurden, konnte in einer Konzentration von 50 µM *in vitro* eine Verminderung der viralen Replikation von 50 - 80 % nachgewiesen werden.

In einer weiteren Untersuchung wurde die antivirale Wirkung von Antisensoligonukleotiden untersucht, die mittels kationischer Liposomen verabreicht wurden. Dazu wurde das kationische Cholesterol-Derivat DC-Chol synthetisiert und den Liposomen beigemischt. DC-Chol zeichnet sich durch seine, vergleichsweise zu anderen kationischen Lipiden, geringe biologische Toxizität aus, was für *in vivo* Anwendungen von Vorteil sein kann. Nach Verabreichung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden mittels kationischen DC-Chol-Liposomen konnte eine erhöhte zelluläre Aufnahme und deren Akkumulation im Zellkern nachgewiesen werden. Anschliessend wurde die antivirale Wirkung von 5'-cholesterolmodifizierten Antisensoligonukleotiden gegen HBV Sequenzen im Hep G2 2.2.15 Modell untersucht. Die Nukleinsäuren wurden frei oder mit DC-Chol-Liposomen verabreicht; es konnte jedoch keine antivirale Wirkung nachgewiesen werden.

Die biologische Aktivität von liposomal transfizierter DNS wurde mittels lacZ-Reportergen der β-Galactosidase nachgewiesen. Kationische pH-sensitive Liposomen erwiesen sich als effizientes

Transfervehikel für DNS. *In vitro* konnten humane Leberzellen bis zu 80 % transfiziert werden. In Verteilungsstudien mit radioaktiv markierter DNS in der Maus wurde mehr als 70 % der liposomal verabreichten DNS in der Leber angereichert; der Unterschied zwischen liposomal und frei verabreichter DNS war jedoch klein. Nach intrahepatischer Injektion von liposomal gebundenem Reporter-gen wurde die  $\beta$ -Galactosidase in den Hepatozyten exprimiert. Dies konnte in histochemischen Färbungen von Leberorganschnitten gezeigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte freie DNS keine Expression. In einem Vorversuch konnte nach intravenöser Verabreichung weder für die liposomal gebundene noch für die freie DNS eine Expression nachgewiesen werden.

Zur Entwicklung von hepatozytenspezifischen Arzneistoffträgern wurde das Glykoprotein Asialoorosomuroid (ASOR), dessen Rezeptor von den Hepatozyten exprimiert wird, an die Liposomen gekoppelt. Nach Optimierung der Kopplungsbedingungen konnte das Protein mittels bifunktionellen Kopplungsmolekülen mit einer Effizienz von 30 - 50 % an die Liposomen gebunden werden. Dies entsprach ungefähr 40 ASOR-Molekülen pro Liposom. Anschliessend wurde die Menge spezifisch internalisierter Liposomen bestimmt. In Bindungs- und Aufnahmeexperimenten mit iodiertem ASOR wurde zuerst die Expression, respektive die Aktivität des Rezeptors auf den verwendeten Zelllinien bestimmt. Es wurden die rezeptorpositiven Hep G2, Hep G2 2.2.15 und HuH 7 Zellen und als Kontrolle die rezeptornegativen SK Hep-1 Zellen eingesetzt. Bei den Hep G2 Zellen konnte die höchste rezeptorspezifische Aufnahme von ASOR nachgewiesen werden. In Inkubationsexperimenten mit ASOR-Liposomen konnte mittels tiefer Konzentrationen von ASOR-Liposomen und eines Ueberschusses an freiem ASOR eine geringe rezeptorvermittelte Aufnahme nachgewiesen werden. Es scheint, dass unspezifische Internalisierungsvorgänge die zelluläre Aufnahme von Liposomen massgeblich beeinflussen. Untersuchungen von gewebe- oder zellspezifischen Liposomen sind deshalb *in vitro* nur beschränkt möglich. In einem Vorversuch konnte die bereits *in vitro* gemessene rezeptorvermittelte Liposomenaufnahme *in vivo* (Maus) durch eine Anreicherung von Asialofetuin-Liposomen in der Leber bestätigt werden, der Unterschied zu unmodifizierten Liposomen war jedoch nicht signifikant. Aufgrund dieser Resultate bestimmen neben der Modifikation mit Liganden, die Grösse und die Zusammensetzung der Liposomen die Gewebespezifität massgeblich mit.