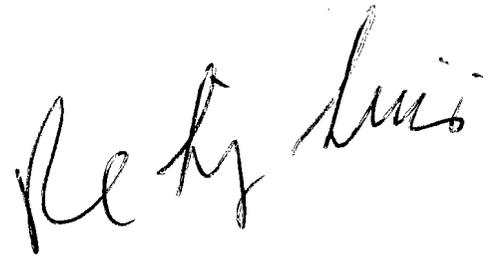


Diss. ETH Nr. 13485

# Neue liposomale Systeme als Träger von DNA und Medikamenten

ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

Vorgelegt von  
CORNELIA MARTINA HEIZ  
Dipl. Chem. ETH  
geboren am 01. Januar 1972  
von Menziken

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'P.L. Luisi', is written to the right of the author's printed name.

Angenommen auf Antrag von:  
Prof. Dr. P.L. Luisi, Referent  
Prof. Dr. J.A. Hubbell, Korreferent  
Dr. Thomas Oberholzer, Korreferent

Zürich 1999

## 1. ZUSAMMENFASSUNG UND ABSTRACT

### ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beinhaltet zwei Schwerpunktsgebiete. Einerseits wurden Alkylphosphorylnukleoside synthetisiert, die spontan supramolekulare Strukturen ausbilden können und zudem eine potentielle Fähigkeit zur molekularen Erkennung besitzen. Andererseits fand eine vertiefte Untersuchung mit Liposomen, die aus neuen Lipiden gebildet wurden, als Träger von Medikamenten und DNA statt.

Die Synthese der Alkylphosphorylnukleoside gelang durch Enzymkatalysierten Austausch der Cholin-Kopfgruppe von *n*-Hexadecylphosphocholin gegen eines von vier Nukleosiden (Cytidin, Uridin, Adenosin und Guanosin). Als Katalysator wurde Phospholipase D aus *Streptomyces sp.* verwendet. Die von den synthetisierten Alkylphosphorylnukleosiden ausgebildeten supramolekularen Aggregate in Wasser wurden in einer nächsten Phase untersucht. Es stellte sich heraus, dass sie Mizellen bilden, deren Aggregationszahl mittels analytischer Ultrazentrifuge ermittelt wurde.

Ferner wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht, ob die Mizellen eine Fähigkeit zur molekularen Erkennung haben. Dazu wurden Mizellpopulationen mit komplementären bzw. nicht komplementären Basen gemischt. Dabei konnten sowohl im Falle der komplementären als auch bei den nicht komplementären Mizellen Interaktionen gefunden werden, die jedoch deutlich schwächer waren als im Fall der Liposomen. Eine mögliche Begründung könnte dabei darin liegen, dass die Basen für eine Basenpaarung nicht in eine optimale Lage gebracht werden können. Zudem dürfte die negativ geladene Oberfläche der Mizellen eine Bindung mit den komplementären Kopfgruppen zusätzlich verhindern.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf Liposomen als Träger von Medikamenten gelegt. Dabei hat sich herausgestellt, dass die aus einem neuen Carnitin-Derivat hergestellten Liposomen ein ausgesprochen gutes Transportmittel darstellen. Die physikochemischen Untersuchungen von Palmitoyl-undecyl-L-carnitiner (PUCE) zeigten, dass die

Ausbildung von Liposomen oberhalb der Phasenübergangstemperatur von 21°C möglich ist.

Mittels CD-spektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass kationische Liposomen mit DNA supramolekulare Aggregate bilden, die je nach Zusammensetzung die Sekundär- und Tertiärstruktur von DNA unterschiedlich beeinflussen. Bestanden die Liposomen aus vollständig positiv geladenen Lipiden, bildeten sich ausgedehnte Aggregate, die ein  $\Psi$ -Spektrum entstehen liessen. Interessanterweise kollabierte das System durch Zufügen neutraler Lipide beim gleichen Ladungsverhältnis. Allerdings waren diese gemischten liposomalen Systeme unter Konstanthaltung des positiv/negativ-Verhältnisses bei höherer Lipidkonzentration wiederum stabiler. Die Ausprägung der Aggregate war jedoch nicht so gross, wie im Fall der vollständig positiv geladenen Lipide.

Die Liposomen des Carnitin-Derivates wurden im Weiteren auf ihre Stabilität im Serum überprüft. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Grösse der Liposomen eine signifikante Rolle für die Stabilität spielt. Grosse multilamellare Vesikel waren durch die Vielzahl der Lamellen länger gegen die Spaltung des Carnitinesters geschützt, während die kleinen unilamellaren Vesikel beinahe unmittelbar nach dem Kontakt mit Serum einen Niederschlag ausbildeten. Durch den Zusatz von Cholesterin konnte im *in vitro*-System eine deutliche Steigerung der Stabilität erhalten werden.

Um die Effizienz *in vivo* zu überprüfen, wurden PUCE/DNA-Komplexe unterschiedlicher Grössen in die Schwanzvene von Mäusen injiziert. Als Reporter gen wurde Luciferase verwendet. Liposomen mit einem grossen Durchmesser konnten Zellen der Lunge hervorragend und Zellen des Herzens gut transfektieren. Dagegen konnte bei Cholesterin enthaltenden Liposomen keine Grössenabhängigkeit der Transfektionsrate festgestellt werden. Allerdings war die Transfektionsrate deutlich kleiner als dies ohne Cholesterin der Fall war.

Ferner wurde das erfolgversprechende Carnitin-Derivat noch auf seine Fähigkeit untersucht, ein Camptothecin-Derivat in seine Liposomen-Membran einzubauen. Die für die pharmazeutische Anwendung verlangte Grössenverteilung konnte weder durch die reinen PUCE-Liposomen, noch

durch die Zufügung von Laktose vor der Lyophilisation erhalten werden. Dagegen ermöglichte die Verwendung gemischter Liposomen, die sich aus POPC und PUCE zusammensetzten, die Grössenverteilung so zu kontrollieren, dass die Anforderungen eingehalten werden konnten.

Im letzten Teil der Arbeit wurde in einem weiteren Projekt in Zusammenarbeit mit dem Bundesamt für Gesundheitswesen versucht, Diacetylmorphin (DAM) in Liposomen so einzubauen, dass eine inhalative Applikation des stark bitter schmeckenden DAMs möglich ist. Dabei ist es gelungen, in grossen Mengen Diacetylmorphin in teilweise negativ geladene Liposomen einzubauen. Die negative Ladung hatte aber gleichzeitig zur Folge, dass eine Aggregationsbildung auftrat. Trotz dieser Aggregation war eine Zerstäubung durch einen Druckvernebler möglich.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Heparin in Kombination mit Hydrocortison die Angiogenese hemmen kann. Mit der Idee, Heparin an die positiv geladenen Liposomen zu binden und Hydrocortison in die Lipiddoppelschicht einzubauen, wurde zudem ein neuer Ansatz zur Weiterführung dieser Arbeit vorgeschlagen. In ersten Vorexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine Forschung in diese Richtung vielversprechend sein könnte.

## ABSTRACT

This work was divided into two main parts. The first part dealt with the synthesis of alkylphosphorylnucleosides which have molecular recognition and information storage potential of nucleosides. The second part described the use of liposomes in the field of gene and drug delivery.

The synthesis of alkylphosphorylnucleosides was performed by exchange of the choline headgroup of *n*-hexadecylphosphocholine for one of the four nucleosides (cytidine, uridine, adenosine und guanosine) using phospholipase D from *streptomyces sp.* In a next step, the relationship between the chemical structure of alkylphosphorylnucleosides and their aggregation form in aqueous medium was investigated using analytical ultracentrifugation. It was found that the synthesized amphiphiles form micelles.

The binding properties of complementary micelles were studied by CD-spectroscopy. Therefore micelle populations with complementary bases, respectively with non-complementary bases were mixed. In both cases interactions could be observed, even if they were significant weaker than in the case of liposomes. Specific interactions due to complementary base pairing could not be detected. The reason could be that the nucleoside bases were not accessible for binding. Additionally, the negatively charged surface of the micelles might inhibit the binding of complementary species because of electrostatic repulsion.

The second part of this work concentrated on liposomes as drug carriers. It was shown that liposomes of a new carnitin derivative are excellent carriers for different drugs. Physicochemical investigations of palmitoyl-undecyl-L-carnitin ester (PUCE) have shown that a formation of liposomes is possible at temperatures above 21°C.

Circular dichroism studies were conducted on DNA-liposome complexes. Substantial changes of CD spectra ( $\Psi$ -spectrum) were observed upon mixing DNA with liposomes containing 100% cationic lipids. Interestingly, the system collapsed with the same DNA/cationic lipid ratio, when a neutral lipid was added. When keeping the charge ratio constant, these liposomes

were more at higher lipid concentrations. The aggregates were smaller with neutral lipids with completely positively charged liposomes.

The stability of the liposomes of the carnitin derivative in serum was investigated. It was shown that the size of the liposomes has a significant influence on their stability. Their large number of lamellae protected multilamellar vesicles against degradation, whereas unilamellar vesicles formed a precipitate almost immediately after contact with serum. Adding cholesterol into the lipidic bilayer increased the stability in the in vitro system significantly.

PUCE/DNA complexes with different sizes were injected into the vein of mice to verify the results above, using luciferase as reporter gene. Multilamellar vesicles with a large diameter were able to transfect the lung cells as well as the heart cells, when the transfection of the lung being higher than in the heart. With liposomes containing cholesterol, no size dependence of transfection could be shown. The transfection rate was significantly lower with than without cholesterol.

Furthermore, it was possible to incorporate a camptothecin derivative in PUCE liposomes. The required size distribution could not be reached either with pure PUCE liposomes or with the addition of lactose before lyophilization. However, the use of mixed liposomes from POPC and PUCE enabled the control of the size distribution.

The last part of the work concerned the incorporation of diacetylmorphine in a large amount in partly negatively charged liposomes. However, because of the negative charge the liposomes aggregated. Despite the aggregation it was possible to nebulize the liposomes in a nebulizer with pressure.

From literature it is known that heparin in combination with hydrocortisone is able to inhibit angiogenesis. With the idea of binding heparin on the surface of positively charged liposomes and incorporation of hydrocortisone in the lipid bilayer a new approach to continue this project has been proposed. Preliminary experiments showed a promising direction of this kind of research.