

Diss. ETH No. 21413

# Liposomal Scavengers as Wide-Spectrum Antidotes

A dissertation submitted to ETH Zurich for the degree of

Doctor of Sciences

by

**VINCENT FORSTER**

M.Sc. in Bioengineering & Biotechnology, EPF Lausanne

Born on November 27<sup>th</sup>, 1984, citizen of Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Jean-Christophe Leroux, examiner

Prof. Dr. Cornelia Halin Winter, co-examiner

PD Dr. Stefanie-Dorothea Krämer, co-examiner

Fall 2013

# SUMMARY

The number of human intoxications from xenobiotics has experienced an alarming escalation in the last decade, placing poisoning as the leading external cause of death in the United States. In Switzerland, 10'000 cases of drug overdose are reported yearly, among which the late working-age adults are at highest risk. Additionally, intoxications from endogenous molecules are also life-threatening when the affected liver no longer metabolizes nutrients (*e.g.*, following hepatic encephalopathy or urea cycle disorders). In patients – especially neonates – suffering from these conditions, metabolites, such as ammonia, become highly damaging neurotoxins that can rapidly lead to cognitive impairment, seizures and cerebral palsy.

The major challenge in rescuing intoxicated patients is the prompt removal or redistribution of the offending compound away from its site of toxicity. However, specific detoxification measures are very scarce and traditional empirical supporting methods are becoming obsolete due to severe adverse effects and proven lack of efficacy. Fortunately, the overdose epidemic has fostered an outbreak of innovative parenteral nano-antidotes (“nanotidotes”) that can sequester or degrade the drug or toxin directly *in situ*. While several of these nanotidotes seem far from clinical applicability due to their high complexity, lack of versatility, and limited biocompatibility, some other systems (such as lipid emulsions and liposomes) are promising candidates with proven efficacy in clinically relevant animal models and in humans.

In this work, we have developed transmembrane pH-gradient liposomes that, upon parenteral administration, sequestered calcium channel blockers and reversed their harmful pharmacological activity. It was shown *in vitro* that the vesicles' stability in serum, and their ability to capture diltiazem and verapamil could be fine-tuned by modulating the internal pH, surface charge, and bilayer structure of the liposomes. Subsequently, we developed a rat model of poisoning that mimicked a clinical scenario. When injected up to 3 h after the oral intake of verapamil, the liposomal antidote significantly decreased the drug's hypotensive effect, with a 30% faster recovery time compared to commercially available lipid emulsions.

In addition, we demonstrated that administering these innovative nanotidotes in a peritoneal dialysis setup was an efficient means of biodetoxification for both drugs and endogenous metabolites. The potency of this platform was assessed *in vivo* for three distinct biomedical applications. With an ammonia removal surpassing by 20-fold what was achieved with traditional dialysis fluids, the liposomes-supplemented peritoneal dialysis was proposed as a promising therapy for hyperammonemic patients. This approach also efficiently extracted exogenous drugs (*i.e.*, clenbuterol and verapamil) from peripheral tissues and, in the case of verapamil, a 3-h therapy was sufficient to completely counteract the hypotensive action of the drug.

Since liposomal peritoneal dialysis limits the systemic exposure to liposomes and spares the liver from extensive metabolic overload by the withdrawal of the encapsulated xenobiotics at the end of the procedure, this approach stands as a promising antidotal treatment.

# RÉSUMÉ

Le nombre d'intoxications médicamenteuses aiguës s'est accru de façon alarmante ces dernières décennies. En effet, aux Etats-Unis, les overdoses sont devenues la cause principale de décès n'impliquant pas de maladie. En Suisse, plus de 10'000 cas d'intoxication sont recensés chaque année, principalement dans la tranche d'âge de 40 à 60 ans. En plus des composés pharmacologiquement actifs (médicaments et agents stupéfiants), certaines intoxications potentiellement létales peuvent être causées par une accumulation de métabolites endogènes (p. ex. ammoniacque) suite à des déficiences rénales ou hépatiques (p. ex. troubles du cycle de l'urée). Ainsi, l'augmentation sanguine de ces métabolites peut provoquer rapidement des dommages au niveau cérébral tels que des déficiences cognitives, des convulsions, et des infirmités motrices. Les nouveau-nés dont le cerveau est en plein développement sont particulièrement sensibles à de tels événements.

Le principal défi associé au traitement d'un patient en état d'overdose est la capacité d'extraire rapidement le composé nocif hors de son site de toxicité. A l'heure actuelle, il existe peu de méthodes efficaces pour traiter les cas de surdosages. Les antidotes spécifiques sont malheureusement peu nombreux et les mesures de détoxification traditionnelles empiriques sont de moins en moins utilisées en raison de leur faible efficacité et/ou de leurs effets indésirables. Néanmoins, la récente épidémie d'intoxications médicamenteuses a généré un regain d'intérêt dans ce domaine encourageant le développement d'antidotes injectables de

taille nanométrique (« nanotidotes ») capables de séquestrer ou de dégrader les composés toxique directement in situ. Certains de ces « nanotidotes » sont encore à l'état de prototypes et loin d'une application clinique en raison de leur complexité, d'un manque de versatilité, et d'une compatibilité biologique discutable. D'autres par contre (*i.e.*, émulsions lipidiques et liposomes) sont des candidats prometteurs ayant déjà prouvé leur efficacité soit sur des modèles animaux pertinents soit chez l'Homme.

Au cours de cette thèse de doctorat, nous avons mis au point un antidote à base de liposomes possédant un gradient de pH transmembranaire. Lors d'une administration intraveineuse, ces liposomes ont démontré leur capacité à capturer des bloqueurs de canaux calciques et à contrebalancer leur activité pharmacologique. La stabilité des liposomes et leur pouvoir de séquestration vis-à-vis du diltiazem et du vérapamil ont pu être finement calibrés en modulant le pH interne, la charge de surface, et la structure membranaire des vésicules. Par la suite, nous avons développé un modèle animal d'intoxication orale représentatif d'un scénario clinique. Sur ce modèle, l'effet hypotenseur du vérapamil a pu être significativement réduit par l'injection des liposomes, même lorsque ces derniers étaient administrés 3 h après le médicament. L'antidote liposomal a permis de diminuer de 30% le temps de récupération des animaux, un effet supérieur à celui des émulsions lipidiques commerciales.

De plus, nous avons démontré que l'administration de ces liposomes en dialyse péritonéale était une méthode de détoxification efficace tout autant pour les composés exogènes que pour les métabolites endogènes. Cette plateforme a été évaluée *in vivo* dans trois applications biomédicales distinctes. Il s'est avéré que les liposomes à gradient de pH transmembranaire pouvaient augmenter d'un facteur 20 l'extraction d'ammoniaque par rapport à une dialyse péritonéale classique. Ce système apparaît donc prometteur pour le traitement de l'hyperammonémie aiguë sévère. Notre utilisation des liposomes en dialyse péritonéale a aussi

montré une grande efficacité à extraire certains médicaments tels que le vérapamil et le clenbutérol. Dans le cas du vérapamil, une thérapie de 3 h s'est avérée suffisante pour contrebalancer complètement l'action hypotensive du médicament.

L'administration de l'antidote liposomal par la voie péritonéale est particulièrement intéressante car elle permet de limiter l'exposition systémique des liposomes. De plus, le retrait de ces derniers chargés du composé nocif en fin de traitement épargne le foie d'une surcharge métabolique potentiellement nocive.