

In vitro Prüfung der Toxizität und Biodegradierbarkeit ultrafeiner Arzneistoffträgersysteme

Doctoral Thesis

Author(s):

Fröhlich, Johannes Malte Maria

Publication date:

1991

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000608095>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

22. Okt. 1991

DISS. ETH Nr. 9426

**In vitro Prüfung der Toxizität und Biodegradierbarkeit
ultrafeiner Arzneistoffträgersysteme.**

ABHANDLUNG

Zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

JOHANNES MALTE MARIA FRÖHLICH

DIPL. PHARM. ETHZ

geboren am 8. Mai 1958

von der Bundesrepublik Deutschland

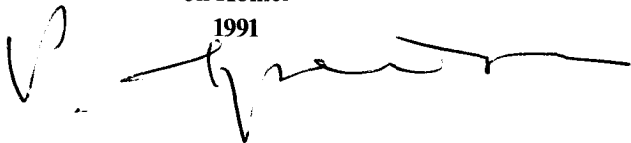
Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. P.P. Speiser, Referent

Prof. Dr. G.Zbinden, Korreferent

ok Kohler

1991

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Fröhlich', is written across the bottom of the page. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke at the end.

ZUSAMMENFASSUNG:

Zahlreiche Arzneistoffträgersysteme werden zur Optimierung der therapeutischen Eigenschaften eines Medikamentes entwickelt und patentiert. Zentrale Probleme stellen die Bioverträglichkeit, die Anreicherung in endozytierenden Zellsystemen sowie das Ausmass der Biodegradierbarkeit dar. Ziel dieser Arbeit ist es, ausgehend von einer in vivo Applikationsstudie, in vitro Testmethoden zur rascheren biopharmazeutischen Evaluation der Verträglichkeit und Biodegradierbarkeit von Biomaterialien und Trägern zu entwickeln.

Eine Auswahl verschiedener Polymerpartikel mit deutlich unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften dient als Testmaterial. Im Tierversuch werden die intravenös applizierbaren, von ihrer Toxizität und Persistenz her widersprüchlich taxierten, Poly(alkylcyanoacrylate) [PACA] mit Poly(n-butylcyanoacrylat)[PBCA] als Modell eingesetzt. Im Zellkultursystem erfolgt ein Vergleich mit kolloidalen, nanopartikulären Trägersuspensionen aus dem praktisch nicht degradierbaren Poly(methylmethacrylat) [PMMA], aus dem gut verträglichen Poly(laktat-co-glykolat) [PLGA] und aus dem noch weitgehend unbekanntem Poly(1,4-butylensuccinat)[PBS]. Für die Dispergierung der Polyester wird eine standardisierte Solvent Evaporation Methode beschrieben, die es erlaubt, Nanopartikel mit einem Durchmesser von 200 bis 500 nm herzustellen.

Die über die Vena subclavia unter Anästhesie erfolgende intravenöse Applikation der PBCA Nanopartikelsuspensionen erlaubt die Gabe von 200 mg/kg bei Ratten vom Stamm Ivanovas. Ab dieser Dosis nimmt das Risiko einer Atembeeinträchtigung deutlich zu. Die Tierversuche zeigen modellhaft die Inhomogenität und Divergenz der Wechselwirkungen solch polymerartiger Partikelstrukturen mit dem Organismus auf. Neben einer unspezifischen Anregung des Immunsystems können gemischte toxische Erscheinungen (akute Entzündungen, Ödeme, Fremdkörperreaktionen, Organatrophien, periphere Gefässverschlüsse) festgestellt werden. Hämodynamische Wechselwirkungen mit dem Organismus stehen im Zentrum des akuten Toxizitätsgeschehens.

Zur Verfolgung der Verteilung und Persistenz, insbesondere auf subzellulärer Ebene, sollen die PBCA Partikel mit einer im Elektronenmikroskop mit Hilfe der Röntgenstrahlmikroanalyse nachweisbaren Nuklidverbindung markiert werden. Die Bindung verschiedener Jod- und Goldverbindungen führt teilweise zur Suspensionsdestabilisierung respektive können nur ungenügende Quantitäten gebunden werden.

Die intravenöse Applikation jodmarkierter PBCA Nanopartikel führt trotz ähnlicher physiko-chemischer Eigenschaften zu peripheren Durchblutungsstörungen (Ulcus cruris). Die Röntgenstrahlmikroanalyse des Leberparenchyms ergibt erhöhte Jodwerte, die jedoch nicht lokalisiert oder quantifiziert werden können. Damit misslingt der Markierungsversuch, der das Problem der Speicherung, Persistenz oder Biodegradation hätte aufklären können.

Die in vitro Testmethoden sollen eine unmittelbare und umfassende Untersuchung der Auswirkungen auf das RHS System erlauben. Wie beim in vivo Versuch und in Analogie zur Beurteilung der Biokompatibilität von Biomaterialien am Gesamttier werden das Aktivierungspotential, die zelluläre Toxizität und die Biodegradation (Bioverfügbarkeit) der Arzneistoffträgersysteme evaluiert. Als in vitro Modell dienen Thioglykolat-aktivierte peritoneale Rattenmakrophagen bzw. menschlichen Monozyten. Die Zytotoxizität, die funktionelle Beeinträchtigung oder Aktivierung der Endozytose, sowie die durch enzymatische Degradation erfolgende Freigabe eines an die Träger sorbierten Arzneistoffes werden für die oben genannten Polymerträger untersucht:

» PBCA weist eine starke Zunahme der Zytotoxizität bei 20 - 50 µg/ml auf; das inerte PMMA wirkt kaum zytotoxisch und PBS sowie PLGA führen erst nach 24 bis 48 Stunden zu Vitalitätsverminderungen. Eine anfängliche und bei tiefen Konzentrationen anhaltende Vitalitätserhöhung (Neutralrot) konnte insbesondere für die beiden Polyester nachgewiesen werden.

» Bei der Bestimmung der nach der Behandlung noch verbleibenden Endozytosekapazität werden den Makrophagenkulturen 2 µm grosse, opsonierte und fluoreszierende FITC Partikel angeboten. Sowohl mit Hilfe einer standardisierbaren Flowzytometriemethode sowie am Lichtmikroskop werden die Einzelzellen ausgewertet. Dabei weist PLGA ein ähnliches qualitatives Profil wie die Kontrolle auf. Die anderen Polymere hingegen zeigen entweder bei niedrigen Konzentrationen eine Stimulation oder bei höheren eine komplette Beeinträchtigung der endozytotischen Funktion. Damit sollte die Bestimmung der endozytotischen Toxizität möglich sein.

» Fluoresceindiacetat beladene PLGA und PBS Partikel werden in einer serumfreien Kultur sowohl Makrophagen als auch Monozyten verfüttert. Die fluorimetrische Analyse des Überstandes weist im Fall von PLGA auf eine vollkommene, im Fall von PBS auf eine teilweise Freigabe des gebundenen Wirkstoffes hin. Der Bursteffekt, d.h. die erhöhte Anfangsdiffusion, ist dank gleicher Herstellungstechnologie bei beiden Polymeren gleich hoch. Doch dann ergeben sich signifikant unterschiedliche Freigabekurven der beiden Polymere. Die bei den Kontrollen ganz unterschiedlich verlaufenden Kurven weisen auf einen enzymabhängigen Degradationsvorgang hin. Unter der Voraussetzung, dass beide Polymerpartikel gleichmässig zellulär aufgenommen werden, kann man folgern, dass die Biodegradation von PBS langsamer verläuft.

Die dreiteilige in vitro Prüfung partikulärer Arzneistoffträger ersetzt in keiner Weise die umfassenden sicherheitstoxikologischen Abklärungen eines Drug Delivery Systems. Ihre Bedeutung liegt vielmehr darin, dass die Polymerpartikel rasch bezüglich ihres RHS Schädigungsprofils, der Aktivierung des unspezifischen Immunsystems und ihrer Biodegradierbarkeit charakterisiert werden können.

ABSTRACT:

Numerous drug delivery systems are being developed in order to optimize the therapeutic benefit of a drug. Biocompatibility and biodegradability as well as the enrichment and interactions within the RES still represent the main difficulties to overcome. The purpose of this study is to develop in vitro testing methods that allow the much quicker evaluation and comparison of the biopharmaceutical properties of drug-delivery systems. Major complications of these polymeric nanoparticles are first evaluated in rats in order to show their possible functional and pathomorphological features.

A new solvent evaporation method allows to standardize the production of nanoparticulate colloidal suspensions. This permits the cellular testing of different biomaterials under the same circumstances. Poly(D,L lactic-co-glycolic acid) [PLGA] and poly(1,4-butylensuccinate) [PBS] particles of 200 to 500nm diameter are thus prepared. Poly(n-butylcyanoacrylate) [PBCA] and poly(methylmethacrylate) [PMMA] suspensions on the other hand are obtained by polymerizing the monomers in an aqueous surrounding. The acute and subacute complications attributable to PBCA nanoparticles were analyzed by infusing slowly 200 mg/kg PBCA to Ivanovas and Wistar rats. Episodes of acute inflammation, edema, breathing difficulties and organ atrophy could be reported.

Particle agglomeration, suspension instability and hemodynamic effects seem to explain most of these events. Besides the vast, inhomogeneous and mixed toxicity profile noted, the *in vivo* experiments couldn't confirm that the interactions with the RES must be considered as the main factor contributing to biocompatibility of polymer particles applied intravascularly.

The entrapment of a marker within the polycyanoacrylate particles for pursuing the subcellular distribution and the disappearance by degradation, couldn't be realized. The sorptive or covalent binding of iodine or gold compounds, which can be detected by dispersive X-ray microanalysis in the electron microscope, is either to low/reversible or unstabilizes the suspensions. Iodine entrapped PBCA particles were applied intravenously, but provided a considerable higher risk of occlusions in small vessels. The X-ray microanalysis of the liver parenchyma traces higher iodine peaks. The deposits can't be localized and quantification is impossible.

The suitability of cellular *in vitro* tests in order to evaluate the cytotoxicity, the endocytotic impairment and the biodegradation of particular drug carriers is investigated. Thioglycolate activated peritoneal macrophages and human monocytes serve as RES model:

The lactate dehydrogenase leakage is compared with the neutral red dye uptake. PBCA reveals a sharp increase of cytotoxicity in both cases between 20 and 50 µg/ml, while PMMA is inert. PBS and PLGA treated cells respond only after 24 to 48 hours with a loss of vitality. At the beginning and especially with lower concentrations these two polyesters even result to increase neutral red dye vitality.

The colloidal drug delivery systems are generally removed by the RES. A key step in this process is endocytosis which can be measured in macrophages by exposure to opsonized fluorescent FITC latex particles. With the help of a flow cytometer we are able to define subpopulations of cells according to their fluorescence intensity and depending on the number of ingested particles, thus defining the endocytotic functioning.

By incubating the cells previously with different biodegradable drug delivery systems the latex endocytosis will give us an answer about interactions on the cellular level. While PLGA results to have almost the same profile as the control, the other polymers either stimulate endocytosis (PMMA, PBS, PBCA low dosage) or block this function completely (PBCA higher dosage). Ulterior methodic optimizations should allow to measure and compare the "endocytotic toxicity".

The fluorimetric assay of serumfree media cultured macrophages and monocytes treated with PLGA and PBS carrying fluoresceindiacetate (FDA) permits to examine the esterase dependent extracellular release of fluorescein. In both cases the maximum extracellular fluorescence is attained after two to three days, but in the case of PBS the release is incomplete. The manufacturing technology, the particle size, the burst-effect, the cytotoxicity and the cellular uptake being the same for both polyesters, we might relate the incomplete release to a slower enzymatic erosion.

The suggested cellular *in vitro* techniques allow to validate toxicity, endocytotic impairment and biodegradation in the case of the four polymeric biomaterials studied. These tests should be introduced into reasonable drug delivery development and thus allow to consider besides toxicity the pharmacodynamic profile in a preliminary phase of research.