

Diss. ETH No 14176

A Critical Evaluation of
Colloidal Delivery Systems for Drug Transfer into
Intestinal Cells *in vitro*

A dissertation
submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology
Zurich

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by

Peter Pietzonka

Pharmacist
born on December 20, 1969
citizen of Winterthur, ZH

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H.P. Merkle, examiner
Prof. Dr. P. Langguth, co-examiner
Dr. E. Walter, co-examiner

Zurich, 2001

Abstract

Colloidal drug delivery systems (CDDS) such as polymeric nanoparticles, liposomes or solid lipid nanoparticles (SLN) are delivery systems ranging in size from 10 to 1000 nm and in general consist mainly of macromolecular materials. The drug compound is encapsulated in the core or adsorbed or attached to the surface of the CDDS. CDDS are able to protect a drug compound against *in vivo* degradation, prolong its biological half-life and prevent systemic side effects by delivery of the drug to a target site.

The first chapter (Chapter 1) focuses on the one hand on the factors affecting the body distribution of CDDS after oral or parenteral administration. Plain CDDS are efficiently removed from the blood circulation by cells of the reticulo-endothelial system (RES) such as macrophages. As a consequence, using CDDS a drug is easily targeted to macrophages. In addition, cells of the RES can be exploited as a general drug depot to target adjacent cells due to passive diffusion of the drug. Specific modification of the CDDS surface in particular by antibodies leads to a selective targeting of specific tissues. On the other hand this chapter discusses the manifold interactions of CDDS with cells to analyse the mechanisms implicated in drug transport from the CDDS into the target cell, which is determined by a rather complex combination of different aspects involving active and passive transport mechanisms by the target cell and depending on the type of carrier, properties of the drug compound, and the physiological environment of the administration site. Finally, potential and limits of different test systems to examine the steps involved in the drug transfer from CDDS into and within the target cells *in vitro* are discussed.

The objective of the second chapter (Chapter 2) was to evaluate nanoparticle uptake by the Caco-2 monolayer model *in vitro*. Special

emphasis was placed on the localisation and the quantification of the uptake of fluorescently labelled polystyrene and poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles. Intracellular fluorescence was localised by fluorescence microscopy and confocal laser scanning microscopy, whereas particle uptake was analysed by the quantification of extracted nanoparticles and by extraction of the lipophilic fluorescence marker from the Caco-2 monolayers. We did not observe uptake of polystyrene and PLGA nanoparticles by Caco-2 monolayers. Instead an efficient transfer of lipophilic fluorescence markers from nanoparticles into Caco-2 cells with subsequent staining of intracellular lipophilic compartments was noticed. Whereas *in vitro* release studies using standard buffer systems showed no release of the fluorescent marker from polystyrene and PLGA nanoparticles, further *in-vitro* release studies using liposome dispersions as receiver revealed an efficient transfer of fluorescent marker into the liposome dispersion. The results suggest that rather than through particle uptake, a collision-induced process caused the transfer of lipophilic fluorescent marker by formation of a complex between the nanoparticles and the biomembranes of the Caco-2 cells or the liposomes of the release medium, respectively. In consequence, diffusion of the marker within this complex from nanoparticles into lipophilic compartments of the cell such as intracellular lipid droplets strongly affects quantitative evaluation of particle uptake.

The third chapter (Chapter 3) examines the transfer of the highly lipophilic marker Nile red from PLGA nanoparticles into Caco-2 cell monolayers. For comparison, SLN and liposomes as alternative colloidal drug delivery systems and less lipophilic model compounds, i.e. propranolol and atenolol, were investigated. Beside drug transport into Caco-2 cell monolayers the release profiles of the delivery systems in presence of a common buffer or of a common buffer system

supplemented with liposomes was determined to investigate the influence of various receivers on the release profiles. The results showed an efficient transfer of the highly lipophilic Nile red from colloidal delivery systems into Caco-2 monolayers and receivers containing liposomes, whereas the transfers of the less lipophilic drug compounds were less affected. However, the extent of drug transfer from CDDS into cells and the release profile were clearly influenced by the affinity of the drug to the delivery system. It is postulated that drug affinity to the delivery system should not surpass the affinity to the target compartment such as the cellular membrane to allow efficient drug transfer. Consequently, the administration of delivery systems may lead to a non-specific distribution of highly lipophilic drugs into lipophilic sinks such as biomembranes and/or lipophilic cell compartments.

In the fourth chapter (Chapter 4) we used excised porcine intestinal tissue obtained from the abattoir to examine the uptake and transport of polystyrene and PLGA nanoparticles in Peyer's (PP) and non-Peyer's patch (NPP) tissues. Special emphasis was placed on the integrity of the tissue for the duration of the particle uptake experiments. For that purpose, excised intestinal tissue from the abattoir transported to the laboratory was examined for morphological evaluation by light microscopy and compared to intestinal tissue from freshly slaughtered piglets. Incubation of these tissues with fluorescent PLGA and polystyrene particles revealed negligible uptake into the intercellular space with no noticeable difference between the different tissues. Similarly, yeast cells, which were used as a positive control for selective uptake into PP tissue, were found in the subepithelial area of both PP and NPP tissue. However, we observed already after 25 minutes post-mortem lysis and defoliation of the epithelial cell layer followed by a complete loss of villus architecture and, consequently,

in a complete loss of the integrity of the intestinal tissue. This may explain the limited and non-selective particle uptake when using excised intestinal tissue from the abattoir. It is concluded that the integrity of excised intestinal tissue is only guaranteed for a rather restricted period of time. Thorough monitoring of tissue viability is recommended throughout the experiments for the correct interpretation of data obtained from transport studies.

Zusammenfassung

Kolloidale Wirkstoffträger (CDDS=Colloidal Drug Delivery System) wie Polymer-Nanopartikel, Liposomen oder Lipid-Nanopartikel (SLN) sind Trägersysteme mit einem durchschnittlichen Partikeldurchmesser von 10 bis 1000 nm und bestehen im Allgemeinen aus makromolekularen Materialien. Üblicherweise wird der Wirkstoff in diese Trägersysteme verkapselt oder an die Oberfläche der Träger adsorbiert oder kovalent gebunden. CDDS sind in der Lage, Wirkstoffe gegen *in-vivo*-Metabolismus zu schützen, die biologische Halbwertszeit zu verlängern und systemische Nebenwirkungen durch einen gezielten Transport des Wirkstoffes an den Wirkort zu verringern.

Das erste Kapitel (Chapter 1) gibt einerseits einen Überblick über die Faktoren, die die Verteilung von CDDS im Körper nach parenteraler oder oraler Verabreichung beeinflussen. Einfache unbehandelte CDDS werden leicht durch Zellen des retikulo-endothelialen Systems (RES) aufgenommen. Dadurch können die Zellen des RES leicht mit Wirkstoff beladenen CDDS gezielt behandelt werden. Gleichzeitig können sie aber auch als Wirkstoff-Depot genutzt werden, da der aufgenommene Wirkstoff durch passive Diffusion an die benachbarten Zellen verteilt werden kann. Spezifische Modifizierung der CDDS-Oberfläche insbesondere durch Antikörper erlaubt einen zielgerichteten Transport der CDDS zu bestimmten Geweben. Andererseits werden in diesem Kapitel die vielfältigen Interaktionen von CDDS diskutiert, die den Wirkstofftransport in die Zelle beeinflussen. Mögliche Mechanismen werden analysiert, die in diesem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren eine Rolle spielen, wie zum Beispiel aktiver und passiver Transport der CDDS oder des Wirkstoffes durch eine Zelle, die Art des Trägersystems, die Eigenschaften des Wirkstoffes oder des physiologischen Umfeldes des Applikationsortes. Zum Schluss werden Möglichkeiten und Grenzen verschiedener *in-vitro*-

Testsysteme zur Aufklärung der einzelnen Schritte des Wirkstoff-Transports aus CDDS in die Zellen aufgezeigt.

Im zweiten Kapitel (Chapter 2) wird der Fragestellung nachgegangen, ob das Caco-2-Zellkulturmodell ein geeignetes *in-vitro*-Modell ist, um die Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen zu untersuchen. Dabei wurde spezielles Augenmerk auf das Lokalisieren und Quantifizieren von fluoreszenzmarkierten poly-(Milch-co-Glykolsäure)-(PLGA) und Polystyrol-Nanopartikel gelegt. Die intrazelluläre Fluoreszenzverteilung wurde mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht, während das Quantifizieren der Partikel Aufnahme durch Auszählen der extrahierten Partikel oder Bestimmung des extrahierten Fluoreszenzfarbstoffes aus Caco-2-Zellkulturen erfolgte. Es konnte weder eine Polystyrol- noch eine PLGA-Nanopartikel-Aufnahme nachgewiesen werden. Hingegen wurde ein effizienter Transfer der lipophilen Fluoreszenzfarbstoffe von den Nanopartikeln in die Caco-2-Zellkulturen, gefolgt von einer starken Färbung intrazellulärer lipophiler Zellkomponenten beobachtet. Während *in-vitro*-Freisetzungsstudien in Standardpuffern kaum eine Freisetzung der Fluoreszenzfarbstoffe aus den Polystyrol- und PLGA-Nanopartikeln zeigten, wurde in Gegenwart eines mit Liposomen ergänzten Freisetzungspuffers ein effizienter Farbstofftransfer ins FreisetzungsmEDIUM festgestellt. Diese Resultate führten zur Formulierung der These, dass die vermeintliche Partikel Aufnahme durch Kollision der Partikel mit der Zellmembran verursacht wird. Die Bildung eines Komplexes zwischen den Partikeln und der Membran erleichtert die Diffusion der lipophilen Fluoreszenzfarbstoffe in die lipophilen Zellkompartimente wie Zellmembranen oder intrazelluläre Lipidtröpfchen. In der Folge wird das Quantifizieren der Partikel Aufnahme sehr stark beeinflusst.

Im dritten Kapitel (Chapter 3) wurde der Transfer des hoch lipophilen Fluoreszenzmarkers Nilrot von PLGA-Nanopartikeln in Caco-2-Zellkulturen untersucht. Zum Vergleich wurden neben PLGA-Nanopartikeln auch beladene SLN- und Liposomen-Formulierungen und neben Nilrot die weniger lipophilen Modellsubstanzen Propranolol und Atenolol getestet. Neben dem Transport der Modellsubstanzen in Caco-2-Zellkulturen wurden Freisetzungsprofile in verschiedenen Freisetzungsmitteln erstellt, um deren Einfluss auf die Freisetzungskinetik festzustellen. Als Freisetzungsmitteln wurden konventionelle Puffersysteme und Puffersysteme, die mit Liposomen angereichert wurden, eingesetzt. Die Resultate zeigten einen effizienten Transport in Caco-2-Zellkulturen und eine rasche Freisetzung aus sämtlichen Nilrot-Formulierungen in Gegenwart von Liposomen enthaltenden Puffersystemen. Der Transport der weniger lipophilen Modellsubstanzen war durch die Gegenwart Liposomen-haltiger Puffersysteme weniger beeinflusst. Allerdings war das Ausmass des Wirkstofftransportes in die Zellkulturen sehr stark von der Affinität der Modellsubstanz zum Trägersystem abhängig. Aus diesem Grund wird postuliert, dass die Affinität des Wirkstoffes zum kolloidalen Trägersystem nicht grösser als die Affinität zur Zielkompartiment sein sollte, um einen effizienten Wirkstofftransfer zu erreichen. Daher kann die Verabreichung eines Trägersystems mit einem lipophilen Wirkstoffes zu einer unspezifischen Verteilung des Wirkstoffes in lipophile Zell- oder Gewebekompartimente führen.

Im letzten Kapitel (Chapter 4) wurde intestinales Gewebe des Schweines aus dem örtlichen Schlachthof auf die Eignung als Modell zur Untersuchung der Aufnahme von Polystyrol- und PLGA-Nanopartikeln in Peyersche (PP) und nicht-Peyersche (NPP) Platten geprüft. Dabei bildete die Erhaltung der Integrität des Gewebes während der Partikelaufnahme-Experimente einen besonderen Schwer-

punkt. Zu diesem Zweck wurde intestinales Gewebe des Schweins aus dem lokalen Schlachthof nach dem Transport zum Institut mittels Lichtmikroskopie auf morphologische Veränderungen untersucht und mit intestinalem Gewebe von unmittelbar frisch geschlachteten Ferkeln verglichen. Nach Inkubation von Gewebe aus dem Schlachthof mit Nanopartikeln konnten lediglich vernachlässigbare Mengen von Partikeln im Interzellulärraum des subepithelialen Gewebes nachgewiesen werden. Ein Unterschied zwischen den PP- und NPP-Gewebe war nicht festzustellen. Versuche mit Hefezellen, die als positive Kontrolle für eine selektive Aufnahme in Peyersche Platten benutzt wurden, wurden ebenfalls im subepithelialen Gewebe sowohl von PP als auch NPP gefunden. Die morphologischen Untersuchungen ergaben, dass nach bereits 25 Minuten *post mortem* eine starke Lyse und ein Ablösen der Epithelschicht gefolgt von einer völligen Zerstörung des Epithels und damit dem Verlust der Integrität des Gewebes auftrat. Diese Beobachtungen könnten die limitierte und unselektive Aufnahme von Partikeln in intestinales Gewebe bei Verwendung von Schlachtabfällen erklären. Wir schlussfolgern daraus, dass die vollständige Integrität des Gewebes nur während eines stark beschränkten Zeitraumes vollständig erhalten bleibt, und empfehlen daher, während Experimenten mit intestinalem Gewebe die Viabilität gründlich zu überwachen, um eine korrekte Interpretation der Daten zu ermöglichen.