

Nanoparticulate carrier systems: a study on uptake and translocation in epithelial models

Doctoral Thesis

Author(s):

Koch, Annette Martina

Publication date:

2004

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004846126>

Rights / license:

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

DISS. ETH NO. 15637

**NANOPARTICULATE CARRIER SYSTEMS:
A STUDY ON UPTAKE AND TRANSLOCATION
IN EPITHELIAL MODELS**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Annette Martina Koch
Pharmacist, University of Tübingen
Born on May 14th, 1974
Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H. P. Merkle, examiner
Prof. L. Josephson, Ph. D., co-examiner
PD Dr. E. Walter, co-examiner

2004

ABSTRACT

This thesis examines interactions of various types of nanoparticulates with diverse epithelial cell models. Such *in vitro* studies, with the long-term goal to apply nanoparticles as mucosal drug delivery systems, rely on two major variables: The type of cell model and the type of nanoparticulate used. This thesis focuses on both aspects. The first experimental chapter is about the validation of a cell model, freshly excised bovine nasal mucosa, to be used to assess interactions with nanoparticles. The focus of the following three chapters differs from the preceding one in that well standardized, epithelial cell culture models were used, and interactions with a special type of surface modified nanoparticles were tested. The last chapter consists of a practical introduction and review of excised nasal mucosa models in the delivery of therapeutic agents.

As an introduction (Chapter 1), the advantages of using nanoparticles as drug delivery systems with an emphasis on mucosal applications are outlined. The chapter analyzes *in vitro* models commonly used in the literature to assess interaction of nanoparticles and epithelial cells, and discusses the impact of nanoparticle size, material and surface properties on various interactions with epithelial cells. We highlight biomimetic particulate surface designs such as the coupling of lectins and polypeptide ligands, including antibodies or truncated antibody fragments. Finally, we address surface modifications by covalent binding of membrane translocating sequence (MTS) peptides to nanoparticles as vectors for epithelial delivery.

Chapter 2 aims at the validation of an *in vitro* model to quantify the translocation of nanoparticulates across nasal mucosa. It stresses the need for *in vitro* methods for mechanistic evaluations and to precede *in vivo* studies. Promising results with nasal immunization and frequent reports about the translocation of particulates across nasal mucosa justified the emphasis on the nasal route. Excised rabbit nasal mucosa was previously used as *in vitro* model in donor-receiver studies for the assessment of particulate uptake and translocation. Continuation of such studies with excised bovine instead of rabbit nasal mucosa would provide a readily available and economic tool to optimize

particulates for nasal delivery. For comparison, translocation of polystyrene nanospheres was examined in bovine and rabbit nasal mucosa. Nasal mucosa was further characterized by permeability studies with various hydrophilic solutes, and by CLSM and SEM (only bovine tissue). Typically, the permeabilities of hydrophilic solutes in bovine nasal mucosa were inversely related to their molecular weights and the calculated hydrodynamic radii, and were of reasonable biological variability. In contrast, we found erratic variability in nanosphere translocation across bovine nasal mucosa over several orders of magnitude, whereas exemplary studies with rabbit nasal mucosa were reproducible and showed direction specificity. Upon histological evaluation cellular defects and macropores of different origin were found in bovine nasal mucosa, whereas rabbit nasal mucosa seemed to be more robust. In conclusion, bovine nasal mucosa remains a valuable *in vitro* tool to assess the nasal absorption of solutes; however, because of its erratic, macropore-controlled permeability for nanospheres, it was found to be unsuitable for translocation studies with nanospheres.

In the following chapters (Chapters 3 - 5), we abandoned the use of excised mucosae and focused on standardized epithelial cell models, avoiding the problems involved with the use of excised mucosae. Here, the focus was on the use of a special surface-modified nanoparticle to be investigated for its potential in mucosal drug delivery. Nanoparticles consisted of a superparamagnetic iron oxide core and a coating of crosslinked dextran (CLIO; crosslinked iron oxide), to which tat peptides were attached at high valency (Tat-CLIO). The idea of using MTS peptides for intracellular nanoparticle delivery was borrowed from the area of molecular imaging, where cells loaded with such nanoparticles can be tracked *in vivo* by magnetic resonance imaging, taking advantage of the superparamagnetic properties of the iron oxide.

To begin with, the cellular uptake efficiency and intracellular stability of Tat-CLIO was assessed in HeLa cells (Chapter 3). The study aimed at a detailed understanding of probe metabolism and transport that is required to use magnetic nanoparticles for the delivery of nanoparticle based therapeutic agents. Therefore, a dual fluorochrome version of the Tat-CLIO, termed Tat(FITC)-Cy3.5-CLIO was developed. The nanoparticle features an FITC label on the tat

peptide and a Cy3.5 dye directly attached to the crosslinked coating of dextran. This nanoparticle was rapidly internalized by HeLa cells. Cells loaded with nanoparticles for one hour retained 40-60% of their FITC and Cy3.5 labels over a period of 72 hours in label free media. Over a period of 144 hours, or approximately 3.5 cell divisions, the T2 spin-spin relaxation time of cells was not significantly changed, indicating retention of the iron oxide among the dividing cell population. Using CLSM on living cells, both dyes showed nuclear and perinuclear (broadly cytoplasmic) localization after Tat(FITC)-Cy3.5-CLIO labeling. Implications of the rapid labeling and slow excretion of the Tat(FITC)-Cy3.5-CLIO nanoparticle are discussed for cell tracking and drug delivery applications.

Next, in Chapter 4, we synthesized three peptides, a D-polyarginyl peptide (r8(FITC)), a tat peptide (Tat(FITC)), and a control peptide (Cp(FITC)), and ligated each to an amino-CLIO nanoparticle. We then examined the transport properties as effective permeability, P_{eff} , of the resulting six peptides or peptide-nanoparticles, respectively, in CaCo-2 monolayers. The transport of peptide-nanoparticles was characterized by a lag phase (0-8 hours) and a steady state phase (9-27 hours). The steady state P_{eff} values for the transport of the peptides were in the order of $r8(\text{FITC}) > \text{Tat}(\text{FITC}) = \text{Cp}(\text{FITC})$. When r8(FITC) and Tat(FITC) peptides were attached to the amino-CLIO nanoparticle, they conferred their propensity to traverse cell monolayers on the nanoparticle, whereas Cp(FITC) did not. Thus, when the r8(FITC) peptide was attached to the amino-CLIO nanoparticle, the resulting peptide-nanoparticle had a P_{eff} similar to this D-polyarginyl peptide alone. The P_{eff} of r8(FITC)-CLIO (MW ~1000 kDa) was similar to mannitol (MW 182 Da), a reference substance that is poorly transported, and with a far lower molecular weight. The P_{eff} of r8(FITC)-CLIO was 80 times higher than the control peptide-nanoparticle and 180 times higher than the reported P_{eff} for FITC-dextran (MW ~ 20 kDa). Our results indicate that the surface modification of nanoparticles can alter their transport properties through monolayers, overcoming the inverse relationship between transport and molecular weight. This opens up the possibility that nanoparticle transport may be further enhanced by surface modification and suggests the use of nanoparticle-based therapeutics in selected pharmaceutical applications.

After having described the interaction of peptides and peptide-nanoparticles with HeLa and Caco-2 cells, in Chapter 5, we extend our cell loading studies to two additional cell lines, an epithelial-type cell line, MDCK, originating from renal epithelium, and to rat brain derived microvascular endothelial cells (MVEC) at low passage. We show that the MTS peptides, Tat(FITC) and r8(FITC), were internalized by all cell types though at significantly different extent. The uptake of MTS-based peptide-nanoparticles, Tat(FITC)-CLIO and r8(FITC)-CLIO, relative to Cp(FITC)-CLIO, was dependent on cell type. It was highest with HeLa cells, significant with Caco-2 and MDCK, but absent with the third, the MVEC monolayers. Thus the uptake of free MTS peptides was substantial with all cell types studied, but the MVEC appear to have an unusual inability to internalize the MTS-based nanoparticles (Tat(FITC)-CLIO, r8(FITC)-CLIO). These results suggest that MTS-based nanoparticles might be useful for the delivery of therapeutic agents to a variety of cells if transport through the blood brain barrier is not required.

This thesis finishes up with Chapter 6, which goes back to the use of excised mucosa. It first reviews the methodologies to obtain and handle excised nasal mucosa and provide optimum conditions to ensure viability and integrity. Detailed protocols for various types of experiments with excised bovine nasal mucosa are provided. Quality control experiments, namely electrophysiological measurements, cell staining assays and permeability assessment of specific marker molecules, are discussed. A number of typical examples for the use of excised nasal mucosa in preclinical development are presented. Among those are transepithelial transport and permeability studies, using various diffusion chamber setups, and pathway visualization experiments, e.g., by CLSM. Moreover, tests to assess the activities of nasal absorption enhancers and to study nasal mucosal metabolism are being described. We further discuss the potential and the currently developing methodologies for the uptake of particulate materials by the nasal mucosa, like nano- and microparticles, for both drug and antigen delivery.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit nanopartikulären Trägersystemen zur mukosalen Applikation von Therapeutika. Experimentell wurden hierzu die Wechselwirkungen unterschiedlicher Arten von Nanopartikeln mit verschiedenartigen epithelialen Zellkulturmodellen untersucht.

Für den Ausgang solcher *in vitro* Studien sind vor allem das eingesetzte Zellmodell sowie die Art der Nanopartikel entscheidend. Diese Arbeit setzt sich mit beiden Faktoren auseinander. Thema des ersten experimentellen Kapitels (Kapitel 2) ist die Validierung frisch exzidiertes Rindernasenschleimhaut als *in vitro* Modell, um Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit Zellen des Nasenepithels zu untersuchen. In den folgenden drei Kapiteln (Kapitel 3-5) wurden speziell modifizierte Nanopartikel an gut charakterisierten und standardisierten epithelialen Zellkulturmodellen untersucht.

Einführend werden in Kapitel 1 die Vorteile nanopartikulärer Trägersysteme für Therapeutika aufgezeigt, unter besonderer Berücksichtigung der mukosalen Applikation. Neben einer kritischen Betrachtung der gängigen Zellmodelle zur Evaluation der Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und epithelialen Oberflächen werden die Einflüsse von Grösse, Material und Oberflächenbeschaffenheit der Nanopartikel diskutiert. Weiterhin werden interessante Beispiele der Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln mit Lektinen, Polypeptiden, Antikörpern und Antikörperfragmenten sowie membrangängigen Peptiden beschrieben.

Im ersten experimentellen Kapitel (Kapitel 2) wurde frisch exzidierte Rindernasenschleimhaut als *in vitro* Modell validiert, um die Translokation von Nanopartikeln in und durch nasale Epithelzellen zu quantifizieren. Mit Hilfe solcher Modelle können Absorptionsmechanismen aufgeklärt und damit in der Literatur beschriebene *in vivo* Studien ergänzt werden. In dieser Arbeit wurde die Translokation von Polystyrol-Nanopartikeln vergleichend unter Verwendung von Rinder- und Kaninchennasenschleimhaut, einem etablierten Modell, untersucht. Die Nasenschleimhäute beider Spezies wurden anhand von Permeabilitätsbestimmungen verschiedener hydrophiler gelöster Substanzen

charakterisiert. Ergänzend wurden histologische Untersuchungen mittels konfokaler Laser Scanning- und Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt. Die Permeabilitäten der hydrophilen gelösten Substanzen waren in beiden Modellen reproduzierbar und umgekehrt proportional zu ihren Molekulargewichten. Die Ergebnisse aus Versuchen mit Nanopartikeln an Rindernasenschleimhaut wiesen dagegen eine sehr hohe Variabilität auf und liessen damit keine abschliessende Aussage zu. Experimente mit Kaninchennasenschleimhaut hingegen waren reproduzierbar. Histologisch erwies sich die Kaninchennasenschleimhaut als intaktes Nasen-epithel, wogegen die Rindernasenschleimhaut Defekte und verhältnismässig grosse Poren aufwies. Anhand von Diffusionsgleichungen an porösen Membranen wurde das uneinheitliche Verhalten der Rindernasenschleimhaut bezüglich der Permeation von gelösten Substanzen und Nanopartikeln erklärt. Somit ist exzidierte Nasenschleimhaut vom Rind zwar ein geeignetes Modell, um die nasale Absorption von gelösten Substanzen zu beschreiben, jedoch ungeeignet für die Evaluation partikulärer Systeme.

In den folgenden drei Kapiteln wurde auf den Gebrauch von exzidiierter Nasenschleimhaut verzichtet und stattdessen gut charakterisierte und standardisierte Zellmodelle verwendet. Dabei wurden sogenannte Clio-Tat (Clio = Cross-linked-iron oxide) Nanopartikel eingesetzt, bestehend aus Dextran-stabilisierten Eisenoxidkernen von ca. 50 nm Durchmesser, an deren Oberfläche durchschnittlich 20 Moleküle eines zellpenetrierenden Peptids, Tat, gebunden waren. Die Idee, solche Peptide zu einer effizienten zellulären Aufnahme von Nanopartikeln zu nutzen, stammt aus dem Bereich der bildgebenden Verfahren, welche die superparamagnetischen Eigenschaften dieser Nanopartikel dazu nutzen, mit CLIO-Tat beladene Zellen *in vivo* zu visualisieren.

Zunächst wurde die Kinetik der zellulären Aufnahme dieser Nanopartikel sowie deren Metabolismus in HeLa Zellen, einer epithelialen Tumorzelllinie, untersucht (Kapitel 3). Dazu wurden die Clio-Tat Nanopartikel mit zwei Fluoreszenzmarkern versehen. Die FITC-Markierung erfolgte in Nachbarschaft zum membrangängigen Peptid (Tat) während der Fluoreszenzmarker Cy3.5 direkt mit der Dextranhülle konjugiert wurde. Mittels Durchflusszytometrie konnte eine rasche Aufnahme von Tat(FITC)-3.5-CLIO in HeLa Zellen gezeigt werden. Nach einstündiger Inkubation mit Tat(FITC)-3.5-CLIO Nanopartikeln

und einer weiteren 72-stündigen Kultur in Nanopartikel-freiem Medium verblieben noch 40-60% der anfänglichen Fluoreszenzintensitäten von FITC und Cy3.5. Zellteilung führte zu einer gleichmässigen Verteilung der Nanopartikel auf die Tochterzellen. Fluoreszenzmikroskopische Aunahmen zeigten, dass die Fluoreszenzen von FITC und Cy3.5 bis zu 72 h lang kolokalisiert, vermutlich vesikulär, im Zytoplasma der HeLa Zellen vorlagen. Mittels Kernspintomographie konnte nachgewiesen werden, dass der magnetische Kern der Nanopartikel innerhalb von 7 Tagen nicht degradierte. Diese intrazelluläre Stabilität ist besonders hervorzuheben.

Wie im folgenden Kapitel (Kapitel 4) dargestellt, wurden dann drei Peptide, ein D-Polyarginin-Peptid (r8(FITC)), ein Tat-Peptid (Tat(FITC)) sowie ein Kontroll-Peptid (Cp(FITC)) synthetisiert und diese jeweils an die Oberfläche von CLIO Nanopartikeln gebunden. Dann wurde die effektive Permeabilität, P_{eff} , dieser sechs Peptide und Peptid-Nanopartikel durch Caco-2 Zellen bestimmt. Der Transport durch die Caco-2 Zellen war durch eine Lag-Phase gekennzeichnet (0-8 Stunden), gefolgt von einem Anstieg (9-27 Stunden). Für die Peptide ergab sich für die in der Anstiegsphase berechneten P_{eff} Werte folgende Reihenfolge: $r8(\text{FITC}) > \text{Tat}(\text{FITC}) = \text{Cp}(\text{FITC})$. Waren r8(FITC) und Tat(FITC) an CLIO gebunden, konnten sie immer noch die Membran passieren; Cp(FITC) dagegen nur noch in sehr geringem Masse. Der P_{eff} Wert der mit r8(FITC) modifizierten Nanopartikel, r8(FITC)-CLIO (MG ~1000 kDa), lag in der Grössenordnung von r8(FITC) und entsprach in etwa dem des Mannitol (MG 182 Da), welches bei deutlich niedrigerem Molekulargewicht eine gering permeierende Referenzsubstanz darstellt. Der P_{eff} Wert von r8(FITC)-CLIO war somit auch ungefähr 80 mal höher als der von Cp(FITC)-CLIO und 180 mal höher als der in der Literatur beschriebene P_{eff} Wert für FITC-Dextran (MG ~ 20 kDa). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln deren Transportvermögen durch Zellschichten verändern und damit den inversen Zusammenhang zwischen Transport und Molekulargewicht aufheben kann. Insofern eröffnen sich hieraus interessante Aspekte hinsichtlich der mukosalen Applikation ausgewählter Arznei- und Impfstoffe.

Ergänzend zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Peptiden und Peptid-Nanopartikeln mit HeLa und Caco-2 Zellen, wurden zwei weitere Zell-

linien berücksichtigt, nämlich eine renale epitheliale Zelllinie, MDCK, und mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Rattenhirn, MVEC (Kapitel 5). Dabei konnte gezeigt werden, dass die membrangängigen Peptide Tat(FITC) und r8(FITC) von allen Zellen aufgenommen wurden, dies allerdings in sehr unterschiedlichem Ausmass. Die mit den membrangängigen Peptiden modifizierten Nanopartikel Tat(FITC)-CLIO und r8(FITC)-CLIO wurden in HeLa, Caco-2 und MDCK Zellen, je nach Zelltyp, unterschiedlich schnell aufgenommen, eine Aufnahme in MVEC Zellen fand dagegen nicht statt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass solche mit membrangängigen Peptiden modifizierte Nanopartikel als Träger für Therapeutika eine Vielzahl von Zellen erreichen können, wobei die Blut-Hirn-Schranke möglicherweise einen begrenzenden Faktor in diesem System darstellt.

Die Übersichtsarbeit am Schluss (Kapitel 6) gibt einen Überblick über die richtige Entnahme- und Handhabung von exzidiierter Nasenschleimhaut sowie über die optimalen Bedingungen, welche Viabilität und Integrität gewährleisten. Zahlreiche typische Beispiele für den Gebrauch von exzidiierter Nasenschleimhaut im Rahmen der präklinischen Entwicklung von Therapeutika, wie Transport-, Permeations- und Metabolismusstudien werden genau beschrieben. Schliesslich wird das Potential von Nano- und Mikropartikeln als Träger für die nasale Applikation von Arznei- und Impfstoffen diskutiert, und Methoden zur *in vitro* Evaluation der nasalen Absorption partikulärer Systeme mittels exzidiierter Nasenschleimhaut beschrieben.