

DISS. ETH NO. 16033

**LOCAL DRUG DELIVERY TO PREVENT
RESTENOSIS**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

PETER KARL JOSEF BIRKENHAUER

Approbiertes Apotheker

born 27.07.1969

Citizen of the Federal Republic of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Hans P. Merkle, examiner

Prof. Zhihong Yang, co-examiner

Prof. Bruno Gander, co-examiner

2005

Zusammenfassung

Die arterielle Verschlusskrankheit (AVK) gehört zu den häufigsten Todesursachen in industrialisierten Ländern. Sie ist im Wesentlichen Folge einer Lumenverkleinerung der Herzkranzarterien im Zusammenhang mit einer voranschreitenden Arteriosklerose. Behandlungsmöglichkeiten umfassen die verschiedenen perkutanen Koronarinterventionen (percutaneous coronary interventions, PCI) wie beispielsweise die Ballondilatation (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA), oder die operative Einsetzung von Bypass-Implantaten. Obwohl sehr kostspielig, sind diese Behandlungen in industrialisierten Ländern sehr häufig: So wurden beispielsweise in Deutschland im Jahre 2000 mehr als 188 000 Ballondilatationen durchgeführt, während es 1984 erst 2 800 waren. In 68% der Fälle wurde ein Stent (kleines dünnes Metallgeflecht) mit dem Durchmesser der behandelten Koronararterie eingesetzt. Zusätzlich wurden in Deutschland Zehntausende, weltweit ca. 800 000 Bypassoperationen durchgeführt. Die „Achillesferse“ der Ballondilatation und der Bypassoperation ist die so genannte Restenose (erneute Verengung) der aufgeweiteten Gefäße an der Stelle der ursprünglichen Verengung, beziehungsweise die Stenose (Verengung) der eingesetzten Bypassimplantate an den Stellen, wo sie mit den Herzkranzgefäßen verbunden sind. Das Ergebnis von vorgenannter Stenose und Restenose ist aber gleich: Der wiederhergestellte kardiale Blutfluss ist erneut gestört. Im Allgemeinen entwickeln sich (Re)Stenosen bei 20-50% der behandelten Gefäße. Für Ballondilatationen mit und ohne Stenteinsatz liegt die Restenoserate in der Größenordnung von 22-32% bzw. 30-50%. Etwa Zweidrittel der nach PTCA restenosierenden Gefäße müssen wegen erneut auftretenden Symptomen behandelt werden, oft mit einer Bypassoperation. Im Jahre 2000 wurde in Deutschland bei 25 000 Patienten ein Folgeeingriff wegen einer (Re)Stenose vorgenommen. Es wird geschätzt, dass sich die gesamten volkswirtschaftlichen Kosten für diese erneuten Eingriffe auf 500 Millionen Euro belaufen haben.

Trotz intensiver Forschung und enormer Anstrengungen, Restenose und Stenose zu verhindern, waren die therapeutischen Fortschritte sehr langsam. Restenose nach PCI und Stenose nach Bypassoperation können bis heute durch eine Medikamenteneinnahme nicht sicher verhindert werden. Mögliche Gründe dafür können in der ungenügenden pharmakologischen Aktivität der bisher in klinischen Studien untersuchten Arzneistoffe liegen, in deren ungeeigneten An-

wendung in diesen Studien oder in der sub-therapeutischen Konzentration des Arzneistoffes am Wirkort. Dieser Arbeit liegt letztere Hypothese zugrunde. Sie wird u. a. durch Tierversuche gestützt, bei denen eine kontinuierliche intravenöse Arzneistoffabgabe über vier Wochen ebenso wie eine lokale Applikation Stenose bzw. Restenose verhindern konnte, während die orale Applikation oder tägliche subkutane Injektionen nicht erfolgreich waren.

Die vorliegende, galenisch orientierte Arbeit befasst sich daher mit der Entwicklung von implantierbaren bioabbaubaren Arzneistoffabgabesystemen, die geeignet sind für in der Entwicklung befindliche künstliche Gefässe. Die implantierbaren bioabbaubaren Arzneistoffabgabesysteme sollen (Re)Stenose verhindernde Arzneistoffe kontinuierlich über mindestens vier Wochen freisetzen können und müssen mit einer solchen Menge Wirkstoff beladen werden können, dass mit ihnen eine genügend hohe und lang andauernde lokale Wirkstoffkonzentration erreicht wird. Für Dexamethason (**Appendix**), Heparin (**Kapitel 2**) und dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Cerivastatin (**Kapitel 4**) wurden von uns Arzneistoffabgabesysteme entwickelt. Als primäre Arzneistoffabgabesysteme wurden bioabbaubare Poly(lactid-co-glycolid)-Mikrosphären entwickelt, in welche die Arzneistoffe einzeln eingebettet wurden. Dexamethason (von Sulzer Innotec vorgeschlagen) ist ein potentes steroidales Antiphlogistikum, welches bereits in einem zugelassenen Medizinprodukt (Herzschrittmacher) erfolgreich die Fremdkörperreaktion an der Schrittmacherelektrode reduziert und daher auch die Stenose an den Enden des künstlichen Gefässes reduzieren könnte. Heparin wurde gemeinsam von Sulzer Innotec und von mir für diese Untersuchungen ausgewählt, da für Heparin viel versprechende anti(re)stenotische Aktivitäten nachgewiesen waren und es seinerzeit für viele Autoren der Goldstandard für die medikamentöse Hemmung der Vermehrung glatter Muskelzellen (GMZ, engl. SMC) war. Cerivastatin wurde von mir ausgewählt, da es der potenteste HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor war und für andere Arzneistoffe aus dieser Substanzklasse seinerzeit in mehreren neuen Veröffentlichungen eine proliferationshemmende Wirkung auf Gefässmuskelzellen nachgewiesen wurde. Nachdem ich mit der Verkapselung von Dexamethason und Heparin begonnen hatte, testete die Berner Kardiologie Nitroglyzerin, SNAP, Forskolin, Dexamethason, Somatostatin, Verapamil, Mibefradil, TGF- β und Wortmanin auf ihre proliferationshemmende Wirkung auf menschliche venöse GMZ (hvGMZ). Für Heparin konnte eine ausreichende, für Dexamethason konnte keine ausreichende proliferationshemmende Wirkung auf hvGMZ nachgewiesen werden. So ver-

zichtete ich auf weitergehende Untersuchungen mit Dexamethason, führte aber die begonnenen Freisetzungsversuche zu Ende. Später schlug ich vor, Cerivastatin auf seine Wirkung auf hvGMZ zu testen. Die Berner Forschungsgruppe konnte zeigen, dass Cerivastatin in vitro die Vermehrung von hvGMZ hemmt, später wurde von dieser Gruppe gezeigt, dass Cerivastatin auch die Expression von endothelialer NO-Synthetase (eNOS) in kultivierten Endothel-Zellen (EC) als Antwort auf die Gabe von Ca^{2+} -Ionen erhöht, ebenso wie die NO-Abgabe aus den Zellen. Die Summe dieser für eine Verhinderung der (Re)Stenose positiven Effekte von Cerivastatin auf die hvGMZ und die vaskulären EC machten Cerivastatin zu einem viel versprechenden Kandidaten und führten zur gründlichen Bearbeitung dieses Arzneistoffes.

Das Problem der Stenose an den Enden der Gefässimplantate nach Bypassoperation ist bislang ungelöst. Dem erneuten Auftreten von Ischämiesymptomen nach Bypassimplantation wird i. d. R. dadurch vorgebeugt, dass eine grössere Anzahl künstlicher Gefässe implantiert wird, als für die Wiederherstellung des kardialen Blutflusses nötig wäre. Aber das Konzept der lokalen kontinuierlichen Arzneistoffabgabe bewährt sich seit 2003 in der klinischen Praxis mit den arzneistoffabgebenden Stents (sog. DES, drug eluting stents, **Kapitel 1**). Implantiert anstelle von unbeschichteten Metallstents nach Ballondilatation werden mit diesen nunmehr klinische Restenoseraten von 10 statt 15% erreicht.

Heparin, ein sehr hydrophiles, polysulfatiertes und sauer reagierendes Aminoglykosid, wurde mittels Sprühtrocknung in Poly(lactid-co-glycolid)-Mikrosphären (PLGA50:50 und PLGA75:25) eingebettet (**Kapitel 2**). Dazu wurden verschiedene Mengen unterschiedlich konzentrierter (1-20%) wässriger Heparinlösung in unterschiedliche Mengen von 2,5-5% (w/w) organischer PLGA-Lösung (Lösungsmittel Ethylformiat) mittels Ultraschall emulgiert. Es resultierten W/O-Emulsionen mit einem W-Anteil von 0,7-35,7%. Die Verkapselungseffizienz von Heparin in den Mikrosphären lag anteilig zwischen 3 und 73% der eingesetzten Menge Arzneistoffs und war abhängig vom Wasseranteil der W/O-Emulsion, der Viskosität der W-Phase, dem verwendeten Polymer sowie der Ausgangsmenge an Heparin. Die In-vitro-Wirkstofffreisetzung aus den Mikrosphären dauerte bis zu 56 Tage und verlief in drei Phasen, wobei der zeitliche Beginn und die Länge der drei Phasen v. a. vom verwendeten Polymertyp abhängig waren. Das Ausmass der initialen Freisetzung (Phase 1) war vor allem

abhängig vom Wasseranteil der zur Herstellung verwendeten W/O-Emulsion, der Viskosität der W-Phase, der Ausgangsmenge an Heparin und den Freisetzungsbedingungen. Nach der initialen Freisetzung verringerte sich die Freisetzungsgeschwindigkeit sehr stark (Phase 2). Der Beginn der dritten Phase fiel mit dem Zeitpunkt des beschleunigten Polymerabbaus zusammen.

Die Aktivität von mikroverkapseltem und wieder freigesetztem Heparin wurde *in vitro* an hvGMZ geprüft (**Kapitel 3**). Die hvGMZ stammten aus Gefäßresten von Patienten, die sich einer Bypassoperation unter Verwendung eigener Venen unterzogen hatten. Kultivierte hvGMZ gelten zurzeit als bestes *In-vitro*-Modell für die Stenose nach Bypassimplantation zur *In-vitro*-Testung potenzieller Arzneistoffe auf ihre Wirksamkeit. Der Einbau von ³H-Thymidin wurde als Mass für die Zellvermehrung bestimmt. Der ³H-Thymidin-Einbau erhöhte sich deutlich nach Zugabe von PDGF-BB (platelet derived growth factor-BB, Konzentration 5 ng/ml) oder Kälberserum (Konzentration 5%). Die Aktivität von mikroverkapseltem und *in vitro* wieder freigesetztem Heparin konnte anhand der Hemmung der Zellvermehrung der hvGMZ bestimmt werden. Die durch PDGF-BB stimulierte Vermehrung der hvGMZ wurde durch freies (Positivkontrolle) und aus Mikrosphären freigesetztes Heparin gleichermaßen (um 50%; $p < 0.05$; $n = 9-11$) gehemmt. Das als Negativkontrolle verwendete Medium, in welchem Placebo-Mikrosphären inkubiert worden waren, beeinflusste den Einbau von ³H-Thymidin in hvGMZ hingegen nicht. Wurden die hvGMZ mit Kälberserum statt mit PDGF-BB stimuliert, waren die Ergebnisse sehr ähnlich (50% Verminderung der hvGMZ-Vermehrung; $p < 0.05$; $n = 6$). Diese Ergebnisse zeigen, dass Heparin in aktiver Form mikroverkapselt und *in vitro* wieder freigesetzt wurde. In einem nächsten Schritt müsste nun das therapeutische Potential der hergestellten Mikrosphären mit Hilfe der gängigen *In-vivo*-Modelle abgeklärt werden.

Der HMG-CoA-Reduktasehemmer Cerivastatin wurde, ähnlich wie Heparin, mittels Sprühtrocknung in PLGA-Mikrosphären eingebettet (**Kapitel 4**). Cerivastatin besitzt eine offene Laktonstruktur (β , δ -Dihydroxycarbonsäure) und gilt daher als säureempfindlich. Um die Stabilität von in PLGA-Mikrosphären verkapseltem Cerivastatin günstig zu beeinflussen, insbesondere während der säurefreisetzenden Polymerhydrolyse, wurde basisch reagierendes CaCO₃ mitverkapselt. Da mitverkapseltes CaCO₃ die Polymerdegradation verzögern kann, wurde ein schnell degradierendes PLGA in die Untersuchungen mit einbezogen.

Kapitel 4 zeigt, dass eine zunehmende Cerivastatinbeladung (5-15%) der Mikrosphären den Polymerabbau nur geringfügig beschleunigte. SEM-Bilder zeigen, dass Cerivastatin die Glasübergangstemperatur der Mikrosphären deutlich senkte, mitverkapseltes CaCO_3 (15-20%, bezogen auf die Polymermasse) die Glasübergangstemperatur aber leicht erhöhte. Gleichzeitig verzögerte CaCO_3 den Polymerabbau deutlich, proportional zur Beladung. Die Beladungseffizienz von Cerivastatin nahm mit der Hydrophilie des verwendeten Polymers zu (PLGA 75:25 < PLGA50:50 < PLGA50:50H), ebenso wie die Freisetzungsgeschwindigkeit; die Freisetzungsdauer von Cerivastatin nahm hingegen ab. Das Freisetzungsprofil selbst war von der Zusammensetzung der Mikrosphären abhängig. Mikrosphären aus PLGA50:50H ohne und Mikrosphären aus PLGA50:50H, PLGA50:50 und PLGA75:25 mit mitverkapseltem CaCO_3 zeigten Freisetzungsprofile nahe erster Ordnung über 3-9 Wochen mit einer fast 80%igen Freisetzung nach rund einer Woche (PLGA50:50H ohne CaCO_3) oder einer 35–55%igen Freisetzung (PLGA50:50H, PLGA50:50 und PLGA75:25 mit mitverkapseltem CaCO_3). Hingegen zeigten PLGA50:50 bzw. PLGA75:25 Mikrosphären ohne Zusätze eine pulsatile bzw. eine nahezu konstante Freisetzung nullter Ordnung über 9 Wochen. Das Ziel, ein lokales Arzneistoffabgabesystem für Cerivastatin zu entwickeln, wurde folglich erreicht. In einem nächsten Schritt müsste nun das therapeutische Potenzial der hergestellten Mikrosphären mit Hilfe der gängigen In-vivo-Modelle abgeklärt werden.

Abstract

This thesis is divided into four chapters: 1) a review of past and present restenosis research; 2) a technological chapter describing the microencapsulation of heparin into PLGA; 3) a study on the effects of microencapsulated heparin on smooth muscle cells from human saphenous vein explants (hsvSMC) obtained from patients undergoing coronary bypass surgery; 4) a technological chapter on the microencapsulation of SMC growth inhibiting and the EC-function improving drug cerivastatin into PLGA.

Restenosis is still the Achilles' heel of therapeutic interventions in the context of coronary artery diseases (CAD). The problem of restenosis, for example after percutaneous coronary intervention (PCI), was noticed with the earliest PCI studies in the late 1970's to early 1980's. **Chapter 1** provides an overview about various therapeutic approaches to prevent and treat restenosis. They encompass the use of drugs inhibiting smooth muscle cell proliferation or normalizing vascular blood flow as well as γ -irradiation and photodynamic therapy to destroy directly the fast proliferating SMC. Explanations for the sometimes modest and contradictory clinical data are given, and the latest therapeutic trends like coated stents are discussed.

For some researchers, heparin is still the gold standard of the SMC-growth inhibiting drugs. **Chapter 2** describes the microencapsulation of heparin into poly(lactide-co-glycolide) [PLGA] to obtain a drug delivery system that can be locally deposited in the context of venous bypass graft failure or restenosis development after PCI. Heparin, a very hydrophilic polysulfated aminoglycosid, was microencapsulated into PLGA50:50 and PLGA75:25 by spray-drying. Variable amounts of 1-20% aqueous heparin solutions were finely dispersed in 2.5-5.0% (w/w) PLGA solutions in ethyl formate to form W/O-dispersions with W-contents of 0.7-35.7%. Encapsulation efficiencies of 3 to 73% were achieved, depending mainly on the W-content in the W/O-dispersion, the viscosity of the W-phase, the polymer type, and nominal heparin loading. Heparin release from the microspheres lasted for up to 56 days and followed mostly a triphasic release pattern. The extent of initial burst release depended mainly on the W-content in the W/O-dispersion, the viscosity of the W-phase, the polymer type, and nominal heparin loading. Conversely, the onset and duration of the second dormant release phase and of the third phase of re-increase release rate depended only on

the PLGA type. This study emphasizes the importance of manufacturing parameters for the control and optimization of heparin microencapsulation.

Chapter 3 describes *in vitro* activity testing of heparin-loaded microspheres on hsvSMC. Placebo and heparin-loaded PLGA microspheres were incubated in an isoosmolar PBS buffer at 37 °C, and supernatant samples were withdrawn at regular intervals for activity testing of released heparin. The hsvSMC were from saphenous vein explants obtained from patients undergoing coronary bypass surgery. Proliferation of hsvSMC, as measured by ³H-thymidine incorporation, was markedly stimulated by platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) (5 ng/ml) or serum (5%). Proliferation of hsvSMC was equally reduced (50%; p<0.05; n=9-11) by native heparin and heparin released from PLGA microspheres, while the incubation medium from placebo PLGA microspheres exerted no effect on ³H-thymidine incorporation in hsvSMC. Similar results were also obtained when hsvSMC were stimulated with 5% serum instead of PDGF-BB (50%; p<0.05; n=6). Thus, heparin released from these PLGA microspheres effectively reduced hsvSMC proliferation that had been stimulated with either PDGF or serum. This justifies further studies in animals to test whether local application of these heparin-loaded microspheres can prevent restenosis development.

Chapter 4 describes the development of a controlled drug delivery system for localized delivery of cerivastatin. Cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, has been shown to inhibit *in vitro* hsvSMC proliferation and to increase the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in cultivated endothelial cells (EC), in response to Ca²⁺ ionophore, and also to augment the NO-release from the cells. Thus, the positive effects of cerivastatin on vascular EC and SMC were considered important for therapeutic effects in the context of a vascular graft or PTCA. Consequently, cerivastatin was microencapsulated into PLGA microspheres by spray-drying. Because of the postulated instability of the open lactone of cerivastatin in acidic environments, CaCO₃ (as calcium carbonicum praecipitatum) was co-encapsulated to neutralize the acidic environment in the PLGA microspheres that develops upon polymer hydrolysis. A fast degrading PLGA was included in the investigation due to the expected increase in degradation time due to the co-encapsulated CaCO₃. Cerivastatin influenced the polymer degradation time only slightly, but lowered the glass transition temperature (T_g) as SEM pictures revealed. Co-encapsulated CaCO₃ increa-

sed the T_g according to the SEMs and prolonged the polymer related degradation time markedly depending on the concentration. For example, 15% nominal CaCO_3 loading prolonged a 30% reduction in molecular weight of PLGA50:50 by 25 days. The encapsulation efficiency and also the release rate increased with polymer hydrophilicity: PLGA75:25 < PLGA50:50 < PLGA50:50H. The release kinetics depended on the polymer and on the co-encapsulated additives. PLGA 50:50H microspheres, with or without co-encapsulated CaCO_3 , as well as PLGA50:50 and PLGA75:25 microspheres with co-encapsulated CaCO_3 released cerivastatin according to a near-first order square root of time like kinetics. PLGA50:50H without additives released 80% during the first week when using PLGA50:50H, PLGA50:50 und PLGA75:25 with co-encapsulated CaCO_3 35-55% were released in the first week. Whereas PLGA50:50 and PLGA75:25 microspheres without co-encapsulated CaCO_3 showed a pulsatile and a zero order like kinetics over nine weeks, respectively. In conclusion, the PLGA formulations developed appeared pharmaceutically well suited for further *in vivo* testing.