ETH zürich

ETH Library

Cell culture sheets to study nasal peptide metabolism

the human nasal RPMI 2650 cell line model

Doctoral Thesis

Author(s):
Peter, Hagen Georg

Publication date:
1996

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-001734987

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. ETH No 11791

Cell Culture Sheets to Study Nasal Peptide Metabolism: The Human Nasal RPMI 2650 Cell Line Model

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Hagen Georg Peter
eidg. dipl. Apotheker
born April 23rd, 1962
citizen of Oberägeri, ZG

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H.P. Merkle, examiner
Prof. Dr. med. C. Gammert, co-examiner
PD Dr. P. Langguth, co-examiner

1996

Abstract

For systemically active peptides the nasal route of administration has received great attention as an alternative to disagreeable parenteral injections. The promising features are a relatively leaky epithelium, an extensive vascularization, a large surface area, the bypassing of the hepatic first-pass metabolism, and the rapid onset of action. For this route the metabolic fate of the peptides in the course of mucosal permeation is of prime importance. So far the main techniques applied in order to follow the kinetics of metabolism were human bioavailability studies, rat nasal perfusion, and tissue homogenate techniques. For screening purposes in vitro models are preferred which are easier, quicker and more economic to perform than in vivo methods.

The focus of this work is on the development and characterization of an in vitro system to study peptide metabolism in the course of nasal mucosal permeation. The model was based on cell culture sheets of the human RPMI 2650 cell line (ATCC ccl 30). This cell line originates from an anaplastic nasal septum tumour and is closely related to normal human nasal epithelium concerning its karyotype and the cytokeratin polypeptide pattern. RPMI 2650 cells were grown on non-porous membranes and after three days in culture formed tight, squamous-type sheets consisting of 3-5 layers of cuboidal cells. To perform metabolism experiments under reflection kinetics conditions these cell sheets (attached to the membrane) were mounted in a single-chamber-system (with a lateral opening). Thereby the cell sheets faced the substrate solution and the impermeable membrane behind it closed the system.

The characterization of the cell culture model in terms of peptide metabolism was mainly restricted to the enzyme class of aminopeptidases. As relatively specific model substrates for aminopeptidases, 4-methoxy-2-naphthylamides (MNA) of leucine (Leu), alanine (Ala), arginine (Arg) and glutamic acid (Glu) were chosen. Using a cytotoxicity test (MTT test) any toxic effect of the selected substrate concentrations, the expected metabolite concentrations, and the cosolvent concentrations could be excluded.

For validation of the cell culture model the metabolism experiments in cell culture sheets were compared to corresponding experiments in excised human nasal tissue. Further comparisons to metabolism experiments using

homogenates of both RPMI 2650 cells and excised tissue were also included. The kinetics of metabolite formation was determined from the change of the substrate and metabolite concentrations as a function of time.

The metabolism studies with the model substrates revealed an aminopeptidase pattern in RPMI 2650 cell culture sheets similar to the pattern in excised human nasal tissue. The pattern probably included leucine aminopeptidase, aminopeptidase N, aminopeptidase A, aminopeptidase B, and lysosomal aminopeptidase. Differences between the models concerned mainly the higher enzyme activities in cell cultures for Leu-, Ala-, and Arg-MNA. The maximum metabolic rate for Leu-MNA in cell cultures was up to eight times higher than in excised tissue. On the other hand metabolism of Glu-MNA was negligible in both models.

A previously introduced physical model to interpret experimental data (under reflection kinetics) in terms of the influence of diffusion and metabolism was applied. Model simulations confirmed that the lower metabolic rates in excised tissue were substantially due to the rate-controlling effect of Fickian diffusion. The physical model was based on the Michaelis-Menten parameters obtained in homogenate studies.

Consequently homogenate studies can provide important information, but the limitations of homogenate studies are obvious as well, i.e. (i) standardization problems of the homogenization process may result in considerable differences between the enzyme composition of homogenates and intact cells, and (ii) due to disruption of cell structures by homogenization the subcellular organization of the enzymes relative to the intracellular trafficking of a given substrate may be ignored. These limitations suggest that the results of homogenate studies should be verified in corresponding studies using intact cells where the enzymes remain within their physiological environment.

Besides metabolism studies of model substrates, metabolic stability experiments of the therapeutic peptide Hoe 140 (D-Arg[Hyp3,Thi5,D-Tic7,Oic8]-bradykinin) also were performed. Comparative studies with Hoe 140 showed complete metabolic stability for the cell culture system as well as for the excised nasal tissue model. This might be an additional indication of similar enzyme patterns in both models.

As could be shown using cell culture sheets grown on porous membranes, the cell culture model appeared to have some potential for permeation

experiments as well. This needs further evaluation. Thus, the RPMI 2650 model presents a meaningful tool for metabolism and permeation studies. Potential fields of application might be the elimination of metabolically unstable peptides from further studies, the development of stable peptide derivatives as well as formulation additives such as enzyme inhibitors, and the partial replacement of animal studies.

Zusammenfassung

Als Alternative zur wenig patientenfreundlichen und aufwendigen parenteralen Applikation systemisch wirksamer Peptide gewinnt die nasale Verabreichung zunehmend an Bedeutung. Zur Optimierung dieser Applikation im Hinblick auf den präsystemischen Metabolismus während der Passage durch die Mukosa und für das Screening sind vor allem relevante und einfache Modelle gefragt. In-vitro-Modelle erfüllen diese Anforderungen am besten, da sie in der Durchführung bedeutend einfacher, schneller und ökonomischer sind als die entsprechenden In-vivo-Verfahren.

Das Schwergewicht der vorliegenden Arbeit erstreckt sich auf die Entwicklung und Charakterisierung eines In-vitro-Modells zur Untersuchung des Metabolismus von Peptiden beim Durchgang durch die nasale Mukosa. Die Grundlage zu diesem Modell bildeten Zellkulturschichten der humanen Nasalzellinie RPMI 2650 (ATCC ccl30). Diese Zellinie geht auf einen anaplastischen Tumor der Nasenscheidewand zurück und zeichnet sich durch eine starke Ähnlichkeit zu natürlichen nasalen Epithelzellen aus (Karyotyp, Zytokeratinmuster). Durch dreitägige Kultivierung von RPMI 2650 Zellen auf wasserdichten Membranen bildeten sich dichte, schuppenartige Zellschichten von 3-5 Lagen annähernd kubischer Zellen aus. Für Metabolismusstudien unter Reflektionsbedingungen wurden solche Zellschichten samt Membran so in die seitliche Öffnung eines Ein-Kammer-Systems eingesetzt, dass die Zellschichtoberfläche im Kontakt mit der Substratlösung stand, während die anschliessende Membran einen undurchlässigen Kammerabschluss bildete.

Die Charakterisierung des Modells bezüglich des Metabolismus von Peptiden konzentrierte sich in erster Linie auf die Untersuchung der Aminopeptidasenaktivität. Als verhältnismässig spezifische Modellsubstrate dienten 4-Methoxy-2-naphthylamide (MNA) von Leucin (Leu), Alanin (Ala), Arginin (Arg) und Glutaminsäure (Glu). Mittels Zytotoxizitätstests (MTT-Test) konnten allfällige toxische Wirkungen der gewählten Substratkonzentrationen, der erwarteten Metabolitenkonzentrationen und der Cosolvenskonzentrationen ausgeschlossen werden.

Zur Validierung des Zellkulturmodells wurden entsprechende Metabolismusstudien auch mit exzidierter humaner Nasalschleimhaut sowie mit entsprechenden Homogenaten der RPMI 2650 Zellen und des exzidierten

Epithels durchgeführt. Die Kinetik der Metabolitenbildung wurde über die zeitliche Veränderung der Substrat- und Metabolitenkonzentrationen bestimmt.

Die Ergebnisse der Metabolismusstudien liessen darauf schliessen, dass die Zellkulturschichten praktisch das gleiche Aminopeptidasemuster wie die Nasalschleimhaut aufwiesen. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um Leucin-Aminopeptidase, Aminopeptidase N, Aminopeptidase A, Aminopeptidase B, und lysosomale Aminopeptidase. Unterschiede zwischen den beiden Modellen betrafen vor allem die Enzymaktivitäten. Die maximale metabolische Rate für Leu-MNA im Gewebemodell betrug nur etwa ein Achtel der Rate im Zellkulturmodell. Auch für Ala-MNA und Arg-MNA wurden im Vergleich zum Zellkulturmodell tiefere Raten beobachtet. Der Metabolismus von Glu-MNA war jedoch in beiden Modellen praktisch vernachlässigbar.

Mit Hilfe eines kürzlich eingeführten physikalischen Modells zur Interpretation experimenteller Daten (unter Reflektionsbedingungen) bezüglich des Einflusses von Metabolismus und Diffusion konnte verdeutlicht werden, dass die niedrigeren Raten in Gewebeexperimenten zu einem wesentlichen Teil auf den geschwindigkeitslimitierenden Effekt der Fickschen Diffusion zurückzuführen waren. Für das physikalische Modell wurde hierzu auf die Michaelis-Menten Parameter aus entsprechenden Homogenatstudien zurückgegriffen.

Obwohl Homogenatstudien somit wichtige Informationen liefern können, sind die Grenzen solcher Studien offensichtlich: (i) Standardisierungsprobleme des Homogenisationsprozesses können zu beträchtlichen Abweichungen der Enzymzusammensetzung des Homogenates gegenüber ganzer Zellen führen, und (ii) infolge der Zellstrukturzerstörung durch die Homogenisation können auch Enzyme freigesetzt werden, mit denen ein bestimmtes Substrat bei der Permeation durch eine intakte Zellschicht eventuell gar nicht in Kontakt kommen würde. Aufgrund dieser Einschränkungen wurden die Ergebnisse der Homogenatstudien durch entsprechende Studien mit ganzen Zellen validiert, bei denen die Enzyme in physiologischer Umgebung verbleiben.

Neben den Modellsubstraten wurde auch das therapeutische Peptid Hoe 140 (D-Arg [Hyp3, Thi5, D-Tic7, Oic8]-bradykinin) in die Metabolismusstudien mit einbezogen. Vergleichende Studien mit Hoe 140 zeigten eine

vollständige metabolische Stabilität sowohl im Zellkultursystem als auch im exzidierten Gewebe. Dieses übereinstimmende Resultat beider Modelle wird als weiterer Hinweis darauf angesehen, dass das Enzymmuster des Zellkulturmodells demjenigen der humanen Nasalschleimhaut relativ ähnlich ist.

Da das Zellkulturmodell zusätzlich auch für Permeationsstudien geeignet scheint, wie mit auf porösen Membranen gezüchteten RPMI 2650 Zellkulturschichten im Ansatz gezeigt werden konnte, stellt dieses Modell ein aussagekräftiges Instrument für Metabolismus- und Permeationsstudien dar. Unterstützt durch dieses Modell könnten sich unter anderem instabile Peptide von weiteren Studien ausschliessen lassen, auch ergeben sich Möglichkeiten stabilere Peptidderivate sowie Formulierungshilfsstoffe wie z.B. Enzyminhibitoren zu entwickeln sowie ethisch fragliche Tierstudien zu reduzieren.