

Warszawa, 24.11.2020r.

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska

mgr inż. Agata Metera

promotor: dr hab. inż. Ewa Dłuska, profesor uczelni

Środowiskowo czule emulsje wielokrotne do uwalniania chemoterapeutyków

Streszczenie

Praca dotyczy środowiskowo czułych emulsji wielokrotnych do dostarczania chemoterapeutyku w terapii guza mózgu, glejaka wielopostaciowego (ang. *glioblastoma multiforme* - GBM). Zmiana pH środowiska, z neutralnego w zdrowej tkance mózgu, na kwaśne w guzie została wykorzystana, jako bodziec zwiększenia szybkości uwalniania chemoterapeutyku z emulsyjnej postaci leku. Przedmiotem badań było opracowanie i zbadanie emulsji wielokrotnych do kontrolowanego uwalniania chlorowodoru doksorubicyny (DOX) w środowisku guza. W potencjalnej niestandardowej terapii emulsja wielokrotna z chemoterapeutykiem może być wykorzystana jako ciekły implant w leczeniu uzupełniającym po operacyjnym usunięciu guza. Wyniki badań emulsyjnej postaci leku porównano z przypadkiem stosowania DOX w roztworze (klasyczna terapia). Badano dwie stabilne emulsje typu $W_1/O/W_2$, różniące się rozmiarem kropli oraz strukturą wewnętrzną: (i) emulsja D1 - krople fazy membranowej z wieloma kroplami wewnętrznymi (ii) emulsja D2 - krople fazy membranowej z pojedynczymi kroplami wewnętrznymi. Wytwarzane emulsje charakteryzowały się wysokimi wartościami stopnia enkapsulacji DOX (97,4%, i 95,5 %). Doświadczalnie wykazano, że emulsje wielokrotne umożliwiają kontrolowane uwalnianie chemoterapeutyku zależnie od pH środowiska i rozmiaru oraz struktury kropli emulsji. Obserwowano szybsze uwalnianie DOX z emulsji w środowisku kwaśnym ($pH < 7$; warunki guza nowotworowego) w porównaniu do środowiska o odczynie neutralnym ($pH = 7,4$; warunki zdrowej tkanki mózgu). Zmiany szybkości uwalniania w środowisku o różnym pH uzyskano przez zastosowanie w składzie fazy zewnętrznej (W_2) emulsji polimeru, soli sodowej karboksymetylocelulozy (Na-CMC), który dodatkowo ma zdolność adsorpcji na powierzchni

międzyfazowej. W warunkach kwaśnego pH zachodziły zmiany przestrzennej organizacji łańcuchów polimeru ułatwiające transport DOX z kropeł emulsji (zwijanie się łańcuchów i zmniejszenie lepkości polimeru) w porównaniu do pH neutralnego. Doświadczalnie potwierdzono wpływ rozmiaru i struktury kropeł emulsji na szybkość uwalniania DOX. Z emulsji D2 o mniejszych kroplach (większa powierzchnia międzyfazowa) uwalnianie zachodziło szybciej, niż z emulsji D1 o większych kroplach. Ponadto struktura wewnętrzna emulsji D2 (pojedyncza kropla w kropli) umożliwia skrócenie drogi dyfuzji składnika do powierzchni międzyfazowej i tym samym szybsze uwolnienie DOX w porównaniu do struktury emulsji D1 (wiele kropeł wewnętrznych w kropli).

W ramach pracy wykonano badania *in vitro* z wykorzystaniem komórek glejaka: (i) cytotoksyczności emulsyjnej postaci DOX w porównaniu do cytotoksyczności roztworu DOX (klasyczna terapia), (ii) szybkości uwalniania DOX i konsumpcji leku przez komórki. Jako miarę cytotoksyczności badanej postaci i dawki leku przyjęto zmniejszenie przeżywalności komórek glejaka, w warunkach dostarczania leku. Badano trzy różne linie komórek glejaka wielopostaciowego: U87 MG, LN229, T98G. Badania emulsyjnego nośnika bez chemoterapeutyku nie wykazały cytotoksycznego działania składników emulsji. Spadek przeżywalności komórek nowotworowych glejaka poddanych działaniu emulsji D1 z DOX o stężeniu $0,01 \cdot 10^{-9} - 0,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol/m}^3$, wynosił odpowiednio: 63 → 1% U87 MG, 57 → 5% LN229, 59 → 29% T98G. Dla przypadku emulsji D2 z DOX o tych samych stężeniach spadek przeżywalności komórek linii glejaka był mniejszy i wynosił: 99 → 16% U87 MG, 100 → 28% LN229, 89 → 40% T98G. Natomiast porównawcze badania przeżywalności komórek glejaka poddawanych działaniu DOX w roztworze wykazały spadek w zakresie 100 → 24%. Wyniki te potwierdziły większą cytotoksyczność (mniejszą przeżywalność komórek) i tym samym skuteczność emulsyjnej postaci leku (zarówno dla emulsji D1 jak i D2) w porównaniu do terapii klasycznej. Ponadto emulsyjna postać DOX wpływała na zmniejszenie przeżywalności komórek nowotworowych przy zastosowaniu DOX o stężeniu poniżej $0,1 \cdot 10^{-9} \text{ mol/m}^3$. Tak niskie dawki były nieskuteczne w przypadku wprowadzania do środowiska komórek tradycyjnego roztworu DOX. Doświadczalnie wyznaczone profile uwalniania DOX, w środowisku linii komórek glejaka oraz bez obecności komórek, wykorzystano do określania szybkości ubytku DOX, który odpowiada konsumpcji/eliminacji DOX przez komórki glejaka. Na tej podstawie wyznaczono zastępcze stałe szybkości konsumpcji DOX uwalnianej z emulsji przez komórki glejaka i porównawczo dla komórek w roztworze DOX (dawki DOX: $0,1 \cdot 10^{-9} - 0,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol/m}^3$). Otrzymane wartości stałych konsumpcji DOX w emulsji dla

badanych linii glejaka wynosiły: $1,04 \cdot 10^{-3}$ - $13,40 \cdot 10^{-3}$ 1/h i były większe od stałych konsumpcji DOX w roztworze które wynosiły od $7,22 \cdot 10^{-6}$ - $2,33 \cdot 10^{-5}$ 1/h. Większe wartości stałej szybkości konsumpcji DOX w postaci emulsyjnej, w porównaniu z klasycznym roztworem DOX, świadczą o większej efektywności emulsyjnej postaci DOX, co potwierdzają badania cytotoksyczności obu postaci leku (emulsja i roztwór).

Wyniki badań doświadczalnych posłużyły do wyznaczenia parametrów modelu dyfuzji i konsumpcji składnika (DOX) w środowisku komórek nowotworowych. Porównanie wyników symulacji z doświadczalnymi profilami uwalniania DOX w środowisku komórek glejaka, wykazało zgodność świadczącą o poprawnym wyznaczeniu parametrów procesu będących parametrami modelu. Model matematyczny procesu uwalniania i konsumpcji DOX z nośnika emulsyjnego, może być wygodnym narzędziem w planowaniu czasu leczenia oraz dawki chemoterapeutyku, i tym samym szybkości jego uwalniania w potencjalnej onkoterapii glejaka mózgu.

Słowa kluczowe: emulsje wielokrotne, proces uwalniania, glejak wielopostaciowy, dyfuzja składnika, konsumpcja leku, model matematyczny

Environmentally responsive multiple emulsions for the release of chemotherapeutic agents

Abstract

The paper concerns environmentally responsive multiple emulsions for chemotherapeutic drug delivery in the treatment of brain tumour (glioblastoma multiforme - GBM). The change in pH of the environment, from neutral in healthy brain tissue to acidic in the tumour, has been used as a stimulus for the release of the drug from the emulsions. The subject of the study was to develop and investigate multiple emulsions as a carrier for the controlled release of doxorubicin hydrochloride (DOX). In a potential non-standard therapy, a multiple emulsion with an anticancer drug can be used as a liquid implant for follow-up treatment, after surgical removal of the tumour. The results of the study of the emulsion form of DOX were compared with the case of DOX in a solution (classical therapy). Two stable emulsions of $W_1/O/W_2$ type differing in droplets' sizes and internal structure were tested: (i) emulsion D1 - a large membrane drop with multiple inner drops, (ii) emulsion D2 - a small membrane drop with single inner drop. The created emulsions were characterized by high values of DOX encapsulation efficiency (97.4%, and 95.5%). The influence of (i) pH of the release environment, and (ii) droplet size and structure, on DOX release rates from the emulsion was determined experimentally. The changes in the drug release rates in the environment with different pH were obtained by the use of the polymer - sodium carboxymethylcellulose salt (Na-CMC) in the composition of the outer phase (W_2), which additionally has the ability to adsorb at the interface. In an acidic environment ($pH < 7$; cancer tumour conditions), DOX is released faster than in a neutral environment ($pH = 7.4$; healthy brain tissue conditions). Under the acidic pH conditions, changes in the spatial organisation of the polymer chains occurred, facilitating the transport of DOX from the emulsion droplets (chain curling and reduction of polymer viscosity) as compared to the neutral pH. The release rate of DOX is also influenced by the size and structure of emulsion droplets. The release rates from an emulsion with smaller droplets (emulsion D2) occurred faster than from emulsion with larger droplets (D1 emulsion). An emulsion with a smaller droplet size has a larger interphase area. In addition, the internal structure of D2 emulsion (single drop in drop) enables the component's diffusion path to be

shortened to the interface, and thus the faster release of DOX compared to the structure of D1 emulsion (many internal droplets in drop). As part of the work, *in vitro* tests were performed with the use of glioblastoma multiforme (GBM) cells: (i) emulsion cytotoxicity of the DOX form in relation to the classical DOX form in solution, (ii) release rates and consumption of DOX in the GBM cell environment. In this part of the study three different lines of GBM cells were used: U87 MG, LN229, T98G. Studies on emulsion carrier without chemotherapeutic agent showed no cytotoxic effect of the emulsions' components. In case of testing the emulsion form of DOX (DOX concentration $0.01 \cdot 10^{-9} - 0.5 \cdot 10^{-9} \text{ mol/m}^3$), the viability of the GBM cells was in the range: (i) for D1 emulsion 63→ 1% U87 MG, 57→ 5% LN229, 59→ 29% T98G, and (ii) for D2 emulsion 99 →16 % U87 MG, 100→28% LN229, 89→40% T98G. Tests of DOX in the form of classical solution showed viability of the GBM cells in the range of 100 → 24 %. These results confirmed higher cytotoxicity (lower cell viability) and thus the effectiveness of the emulsion form of the drug (both for D1 and D2 emulsions) as compared to classical therapy. Moreover, the emulsion form of DOX decreased GBM cell viability with DOX in doses below $0.1 - 10^{-9} \text{ mol/m}^3$, such low doses were ineffective when a traditional DOX solution was applied. The experimentally determined profiles of DOX release, in the environment of GBM cell line and without cells, were used to determine the rates of DOX loss corresponding to the consumption/elimination of DOX by GBM cells. On this basis, apparent constants of DOX consumption rates by GBM cells for emulsion form of the drug were determined and compared with the case of cells in DOX solution (DOX doses: $0.1 \cdot 10^{-9} - 0.5 \cdot 10^{-9} \text{ mol/m}^3$). The obtained values of constants of DOX consumption in emulsion for the GBM cells were: $1.04 \cdot 10^{-3} - 13.40 \cdot 10^{-3} \text{ 1/h}$ and were higher than the consumption constants of DOX in solution: $7.22 \cdot 10^{-6} - 2.33 \cdot 10^{-5} \text{ 1/h}$. Higher values of constant consumption rates of DOX in emulsion form, as compared to classical DOX solution, showed higher efficiency of emulsion form of DOX, which is confirmed by cytotoxicity studies of both forms of the drug (DOX in emulsion and in solution).

The results of experimental studies were used to determine the parameters of the model of diffusion and consumption of the drug (DOX) in the GBM cells environment. The simulation results and experimental profiles of DOX release in GBM cells environment showed a consistence which proved correct determination of process parameters - parameters of the model. The mathematical model of the process of DOX release and consumption from the emulsion, can be a convenient tool in planning the time of therapy and dose of

the chemotherapeutic agent, and thus the release rates in potential brain glioblastoma oncotherapy.

Key words: multiple emulsions, release process, glioblastoma multiforme, component diffusion, drug consumption, mathematical model