

New biomaterials derived from poly(lactic acids) : novel approaches to combine biodegradation, x-ray contrast and controlled local drug release

Citation for published version (APA):

Wang, Y. (2015). *New biomaterials derived from poly(lactic acids) : novel approaches to combine biodegradation, x-ray contrast and controlled local drug release*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20150616yw>

Document status and date:

Published: 01/01/2015

DOI:

[10.26481/dis.20150616yw](https://doi.org/10.26481/dis.20150616yw)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 06 Nov. 2024

Summary

Poly(lactic acid), which is a “green” and biocompatible material, has become an important polymeric construction material; it is eminently suitable for a wide range of applications. In the last decades, considerable efforts from both academia and industry have been devoted to the utilization of poly(lactic acid) in the biomedical field especially due to the material’s outstanding biocompatibility and biodegradability. For example, sutures, implants, scaffolds for tissue engineering and drug delivery systems have been manufactured out of poly(lactic acid). This thesis describes novel approaches to formulate poly(lactic acid)-based biomaterials with two biomedical applications in mind, biodegradable vascular scaffolds and biodegradable embolic particles for anti-tumor therapy. Both applications are drug-device combination products and have a primary mode of action that is physical.

The promising clinical results of the ABSORB bioresorbable vascular scaffold (BVS) (a stent made of poly(lactic acid), Abbott Vascular, Santa Clara, CA, USA) have indicated the safety and efficacy of BVS and demonstrated the potential of BVS as an alternative for metal stents. Concerns about the radiolucency of poly(lactic acid) scaffolds led to the research of a new contrast agent to impart radiopacity to poly(lactic acid) (**Chapters 2 and 3**).

In **Chapter 2**, a new contrast agent, (S)-2-hydroxy-3-(4-iodobenzoyloxy) propanoic acid, is studied. This compound was synthesized from Boc-L-serine and 4-iodobenzyl bromide. The new contrast agent was designed to bear structural resemblance to L-lactic acid and to contain covalently bound iodine. Characterization by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR) and analysis of the crystal structure (X-ray) certificated that the new contrast agent was pure and crystalline with extensive hydrogen bonding inside the crystal. The new contrast agent revealed no obvious cytotoxic effect on human coronary arterial endothelial cells (HCAECs), porcine skin fibroblast cells (PSFs) or porcine aortic smooth muscle cells (PSMCs) when these types of cells were incubated in medium containing different concentrations of the compound (0 to 10 mM). The new contrast agent also showed no clear negative effect on gene expression of HCAECs. Blends of poly(D,L-lactic acid) (PDLLA, medical grade) with 5% or 10% of the new contrast agent were prepared, using a twin-screw extrusion system. The thermal behavior, structure, and X-ray visibility of these blends were investigated by differential scanning calorimetry (DSC), scanning electron microscopy (SEM, in backscatter mode), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and a nanofocus X-

ray inspection system. The results revealed that these blends were homogeneous and radiopaque; the new contrast agent acted as a plasticizer on PDLA. For comparison, we also prepared PDLA blends with the commercial contrast agent sodium diatrizoate. These materials appeared to have a phase-separated structure. We further studied the biocompatibility of our blends with the new contrast agent *in vitro*, using the MTT (triazolyl blue tetrazolium bromide) and live/dead assays; the blends exhibited no toxic effect in both tests. Data in this chapter certificate that it is feasible to manufacture radiopaque, biocompatible and homogenous PDLA blends with the new contrast agent. Unfortunately, the glass transition temperatures (T_g) of the 5% and 10% PDLA blends are low (41 and 34 °C), indicating that these blends are too soft to use as stent building materials.

Chapter 3 focuses on the preparation and characterization of radiopaque poly(lactic acid) blends with higher T_g -values. In this chapter, a semi-crystalline poly(lactic acid), poly(L-lactic acid) (PLLA medical grade; $T_g = 58 - 60$ °C), was used as the polymer matrix to build blends with (S)-2-hydroxy-3-(4-iodobenzyloxy) propanoic acid. These PLLA blends had higher T_g -values (55 and 47 °C for 5% and 10% blends, respectively) than PDLA blends. SEM (in backscatter mode) images of the blends certificated the good compatibility of the new contrast agent with PLLA, i.e. these blends were homogeneous. PLLA blends containing sodium diatrizoate, prepared for comparison, had a heterogeneous structure. Addition of the new contrast agent did not have an obvious negative effect on the mechanical properties of the polymer matrix. In addition, *in vitro* cytotoxicity and thrombin generation tests demonstrated the biocompatibility and hemocompatibility of the blends containing the new contrast agent. The results in this chapter indicate the suitability of these blends for the application of bioresorbable vascular stents.

Chapters 4 and 5 describe the formulation of drug-loaded biodegradable microspheres composed of PDLA with the application transarterial embolization in mind. DC Bead® (Biocompatibles, Farnham, UK) is the most widely used non-degradable embolic microspheres in this application. Concerns of possible late inflammatory foreign-body response to the presence of non-degradable particles and the fact that DC Bead® can't control the release of drugs lacking binds to the beads prompted the research on drug-eluting PDLA microspheres.

Chapter 4 is focused on PDLA microspheres loaded with the anti-tumor drugs cisplatin and/or sorafenib tosylate. These microspheres with diameter ranging between 200 and 400 μm , were fabricated by a solvent evaporation method. SEM showed that: (i) cisplatin + sorafenib tosylate loaded microspheres were

porous; (ii) control PDLA microspheres as well as cisplatin loaded microspheres had smooth surfaces; (iii) sorafenib tosylate microspheres were slightly porous at the surface. The drug release behavior of all microspheres was studied *in vitro* in phosphate buffered saline (PBS) at two pH-values (pH 7.4 and pH 6.0). Drug release rates of cisplatin + sorafenib tosylate microspheres were much faster than those of micro-spheres containing single drug, which was ascribed to the different mechanisms controlling the drug release process. The fast release of drugs from cisplatin + sorafenib tosylate microspheres results, most likely, from the porous structure which enabled fast diffusion of drug molecules through water-filled pores. The drug release of microspheres with single drug was probably controlled by the transport of drug through the dense polymer matrix, thus resulting in slow release rates. Results of *in vitro* cytotoxicity experiments and classical matrigel endothelial tube assay certificated the cytotoxic effect of cisplatin and anti-angiogenic effect of sorafenib tosylate released from the microspheres, respectively.

Chapter 5 further describes degradation (*in vitro*) of the microspheres prepared in Chapter 4. Release profiles of cisplatin and/or sorafenib tosylate from these microspheres (*in vitro* and *in vivo*) were measured. Degradation of the microspheres was characterized in phosphate-buffered saline (pH 7.4). Results revealed that the microspheres degraded slowly during the test period of 9 months. On the one hand, the slow degradation explained the slow drug release rates of microspheres loaded with single drug. On the other hand, significant release of cisplatin and sorafenib tosylate from the microspheres containing both drugs occurred *in vitro* in spite of the slow degradation, probably due to the porous structure of these microspheres. Supernatants from cisplatin + sorafenib tosylate microspheres showed both strong toxicity to cells (i.e. endothelial cells, fibroblast cells and renal tumor (Renca) cells) and strong anti-angiogenic effect in matrigel endothelial tube assay. *In vivo* therapeutic efficacy of the microspheres was evaluated using a mouse renal tumor (Renca) model. Microspheres loaded with both drugs showed the strongest anti-tumoral effect, indicating that administration of both a cytostatic agent (i.e. cisplatin) and an anti-angiogenic agent (i.e. sorafenib tosylate) inside a solid tumor might be an effective approach to achieve tumor inhibition. The data in Chapters 4 and 5 underline the promise of biodegradable drug-eluting microspheres containing cisplatin and sorafenib tosylate for intratumoral drug delivery and their potential in transarterial chemoembolization.

Chapter 6 summarizes and discusses the main conclusions of the thesis and provides outlooks for future research.

Samenvatting

Poly(melkzuur), een groen en biocompatibel materiaal, is bij uitstek geschikt voor een uitgebreide reeks van toepassingen. In de afgelopen decennia is, zowel in de academische wereld als in de industrie, gewerkt aan het gebruik van poly(melkzuur) op biomedisch gebied (bijvoorbeeld hechtdraden, implantaten, poreuze materialen voor weefsel-regeneratie en geneesmiddelafgifte systemen). De populariteit van poly(melkzuur) is terug te voeren op de uitstekende biocompatibiliteit en de voorspelbare gecontroleerde biologische afbreekbaarheid van het materiaal. Het onderzoek in dit proefschrift is verricht met het oog op de toepassing van poly(melkzuur) als constructiemateriaal voor endovasculaire stents, en als embolische deeltjes voor anti-tumor therapie. In beide toepassingen heeft het implantaat een primaire fysische functie.

De veelbelovende klinische resultaten van de ABSORB (BVS) “scaffold”, een door Abbott Vascular (Santa Clara, CA, USA) gemaakte stent van, poly(melkzuur), bewezen de veiligheid en werkzaamheid van poly(melkzuur), en toonden het potentieel van BVS als een alternatief voor metalen stents. De transparantie voor röntgenstralen van poly(melkzuur), leidde tot ons onderzoek naar een nieuw contrastmiddel waarmee radiopaciteit geïntroduceerd kan worden in poly(melkzuur) (**Hoofdstukken 2 en 3**).

In **Hoofdstuk 2** wordt de synthese van een nieuw contrastmiddel (S)-2-hydroxy-3-(4-iodobenzoyloxy) propanoic zuur beschreven; start-materialen zijn Boc-L-Serine en 4-iodobenzylbromide. Het nieuwe contrastmiddel was zo ontwikkeld dat de structurele gelijkheid met L-melkzuur werd behouden en jodium covalent werd gebonden. Proton kernspinresonantie en röntgendiffractie toonden aan dat het nieuwe contrastmiddel zuiver en kristallijn is (met waterstofbruggen binnen het kristal). Het nieuwe contrastmiddel was niet cytotoxisch voor humane coronaire arteriële endotheelcellen (HCAECs), varkenshuid fibroblastcellen, of gladde spiercellen van de varkensorta wanneer deze cellen werden geïncubeerd in medium met verschillende concentraties van het nieuwe contrastmiddel (0 tot 10 mM). Het nieuwe contrastmiddel toonde ook geen duidelijk negatief effect op genexpressie van HCAECs. Door middel van extrusie, waarbij gebruik gemaakt werd van een extruder met een dubbele schroef, werden mengsels van poly(D,L-melkzuur) (PDLLA) met 5% en 10% van het nieuwe contrastmiddel gemaakt. Thermisch gedrag, structuur en röntgenzichtbaarheid van deze mengsels werden onderzocht met ‘differential scanning calorimetry’ (DSC), ‘scanning electron

microscopy' (SEM), 'X-ray photoelectron spectroscopy' (XPS) en een 'nanofocus X-ray inspection system'. De analyses toonden aan dat de mengsels homogeen en radiopaak zijn, en dat het nieuwe contrastmiddel als weekmaker fungeert. Ter vergelijking werden PDLA blends met natrium diatrizoaat (een commercieel contrastmiddel) gemaakt; maar dit resulteerde in fase-gescheiden structuren. Verder hebben we de biocompatibiliteit van de mengsels met het nieuwe contrastmiddel bestudeerd door middel van *in vitro* MITT en live/dead testen, waarbij er geen toxische effecten van de mengsels konden worden aangetoond. De gegevens in dit hoofdstuk bewijzen dat het mogelijk is om radiopake, biocompatibele en homogene PDLA mengsels met het nieuwe contrastmiddel te vervaardigen. Echter, de glastransitietemperatuur (T_g) van de 5% en 10% PDLA mengsels is erg laag (41 en 34 °C, respectievelijk). De verkregen materialen zijn dus te zacht (rubberachtig) om als poreus, biologisch afbreekbaar materiaal voor stents gebruikt te kunnen worden.

Hoofdstuk 3 is gericht op de synthese en karakterisatie van radiopake poly(melkzuren) mengsels met hogere T_g -waarden. Het semi-kristallijne poly(melkzuur), poly(L-melkzuur) (PLLA, $T_g = 58 - 60$ °C) is gebruikt als polymeermatrix om mengsels met het nieuwe contrastmiddel te maken. Deze PLLA mengsels hadden inderdaad hogere T_g -waarden (55 en 47 °C voor 5% en 10% mengsels, respectievelijk) dan PDLA mengsels. SEM beelden toonden homogeniteit van de blends van het nieuwe contrastmiddel en PLLA. Ter vergelijking werden ook PLLA blends met natrium diatrizoaat gemaakt; deze materialen waren heterogeen (fase-gescheiden). Toevoeging van het nieuwe contrastmiddel heeft geen negatief effect op de mechanische eigenschappen van de polymeermatrix. Ook toonden *in vitro* cytotoxiciteit- en trombinegeneratietesten de biocompatibiliteit en hemocompatibiliteit van het nieuwe contrastmiddel aan. De resultaten in dit hoofdstuk geven aan dat deze mengsels een hoge potentie hebben voor toepassing in bioresorbere vasculaire stents.

Hoofdstukken 4 en 5 gaan over biomedische toepassing van poly(melkzuur) als embolische deeltjes. DC Beads (Biocompatibles, Farnham, UK) is het meest gebruikte, niet afbreekbare product voor trans-arteriële embolisatie. De kans op een late ontstekingsreactie op vreemd materiaal door de aanwezigheid van niet-afbreekbare deeltjes en het feit dat de afgifte van geneesmiddel door de DC Beads niet gecontroleerd kan plaatsvinden, vormden de aanleiding tot ons onderzoek naar bioresorbere microsferen die geneesmiddelen afgeven.

Hoofdstuk 4 beschrijft de productie van PDLLA microsferen met, een diameter tussen de 200 en 400 μm , geladen met anti-tumor geneesmiddel (cisplatine en/of sorafenib tosylaat). De microsferen zijn gemaakt door middel van de oplosmiddel-verdampingsmethode. Uit SEM analyse bleek dat (i), cisplatine + sorafenib tosylaat microsferen poreus waren; (ii), PDLLA microsferen en cisplatine microsferen een glad oppervlak hadden; (iii), sorafenib tosylaat microsferen enigszins poreus waren aan het oppervlak. Van alle microsferen werd het geneesmiddelafgiftegedrag *in vitro* onderzocht in een fosfaat gebufferde zoutoplossing bij twee pH-waarden (pH 7,4 en pH 6,0). De geneesmiddelafgifte van cisplatine + sorafenib tosylaat microsferen bleek veel sneller te verlopen dan in het geval van microsferen met maar één enkel geneesmiddel. Dit is waarschijnlijk te wijten aan een verschil in afgiftemechanisme. De snelle geneesmiddelafgifte van cisplatine + sorafenib tosylaat microsferen kan voortvloeien uit de bijdrage die de poreuze structuur levert aan een snelle diffusie in een waterige omgeving. De geneesmiddelafgifte van microsferen met één enkel medicijn vond waarschijnlijk plaats door transport van het medicijn door een minder poreuze oppervlakte, resulterend in langzamere afgiftesnelheden. De resultaten van de cytotoxiciteit experimenten en de 'classical matrigel endothelial tube assay' test ondersteunden het cytotoxische effect van cisplatine en het anti-angiogenese effect van sorafenib tosylaat.

In **Hoofdstuk 5** wordt beschreven hoe de afbraak van de in hoofdstuk 4 gesynthetiseerde microsferen *in vitro* onderzocht werd. Tevens wordt het *in vitro* en *in vivo* afgifteprofiel van cisplatine en/of sorafenib tosylaat uit deze microsferen beschreven. Degradatie van de microsferen werd gedurende 9 maanden gekarakteriseerd in een fosfaat gebufferde zoutoplossing (pH 7.4). Het bleek dat de microsferen gedurende de gehele onderzoeksperiode langzaam afbraken. De traagheid van de degradatie verklaart de langzame geneesmiddelafgifte van de microsferen geladen met een enkel medicijn. Anderzijds werd waargenomen dat microsferen die zowel cisplatine als sorafenib tosylaat bevatten een significante geneesmiddelafgifte hebben *in vitro*, dit ondanks de langzame degradatie. Waarschijnlijk kan dit worden toegeschreven aan de poreuze structuur van deze microsferen. Supernatanten van cisplatine + sorafenib tosylaat bevattende microsferen vertoonden zowel hoge toxiciteit voor cellen (bijvoorbeeld endotheelcellen, fibroblastcellen en Renca tumorcellen) als sterke anti-angiogenese werking. De *in vivo* therapeutische werkzaamheid van de microsferen werd geëvalueerd met behulp van een muis niertumormodel (Renca tumormodel). Microsferen geladen met beide geneesmiddelen toonden het sterkste anti-tumor

effect. Dit geeft aan dat toediening van zowel een cytostatisch middel (bijvoorbeeld cisplatine) als een angiogenese remmer (bijvoorbeeld sorafenib tosylaat) binnenin een tumor een duidelijk remmend effect heeft op de tumorgroei. De gegevens in Hoofdstuk 4 en 5 benadrukken dat biologisch afbreekbare geneesmiddelaafgevend microsferen die geladen zijn met cisplatine en sorafenib tosylaat, een hoge potentie hebben voor intra-tumorale geneesmiddelaafgifte.

In **Hoofdstuk 6** worden de belangrijkste conclusies van het proefschrift en ook de toekomstige richtingen voor het onderzoek naar het gebruik van poly(melkzuur) als coronaire stents en embolische microsferen beschreven.