

DISS. ETH NO. 28387

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF
PARENTERAL LIPID EMULSIONS FROM VEGETABLE OIL
SOURCES TO REDUCE INFLAMMATORY RESPONSES

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Gregory A. Holtzhauer

MSc MIPS, ETH Zurich

born on 27.06.1993

citizen of Glarus Süd GL

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Stefanie D. Krämer, examiner

Prof. Dr. Michael Zaugg, co-examiner

Prof. Dr. Laura Nyström, co-examiner

Dr. Eliana Lucchinetti Zaugg, co-examiner

2022

SUMMARY

Lipid emulsions as an integral part of parenteral nutrition provide vital energy to prevent malnutrition when the intake or absorption of nutrients is impaired. Supply of essential fatty acids avoids deficiencies and ensures proper growth and neurological development, which is particularly important in pre-term infants. For many patients, parenteral nutrition is required for life. However, existing formulations suffer from substantial inflammatory adverse effects when used for an extended period. Adverse effects primarily affect the liver and impair its function with cholestasis, steatosis, and fibrosis with potential progression to cirrhosis.

Several underlying causes have been proposed, including the oil type and – associated with this – the ratio of $n-6$ polyunsaturated fatty acids (PUFA) to $n-3$ PUFA, a high phytosterol content and a low α -tocopherol content. Soybean oil, the most commonly used oil in lipid emulsions, is rich in $n-6$ PUFAs that are metabolized in the body to pro-inflammatory mediators. The tissue distribution with a high uptake into the liver is thought to further aggravate the observed adverse effects. Evidence has been published that oils rich in $n-3$ PUFAs cause less inflammatory adverse effects and even reverse inflammatory conditions. Available alternative formulations still come with drawbacks, including the non-sustainability due to overfishing of oceans and bear the risk of exposure to lipid-soluble environmental toxins accumulating in the food chain.

We aimed at developing intravenous lipid emulsions with a composite oil source rich in $n-3$ PUFAs achieving a more balanced tissue distribution, ultimately eliciting less adverse effects. Various formulations with different compositions were designed, manufactured and evaluated for improved *in vitro* and *in vivo* effects while maintaining compliance with regulatory requirements. Excipients interfering with steps of the lipid oxidation chain reaction were incorporated into the formulation to minimize the extent of oxidative degradation. α -Tocopherol as potent antioxidant also endogenously present in a wide variety of natural oils was added and helped reduce the degree of oxidation to similar levels found in commercially available formulations. Due to the lack of suitable assays for the quantification of degradation products from lipid oxidation and hydrolysis, in-house assays were developed. Three assays were developed or adapted for our needs to characterize the new emulsions with a focus on minimizing sample consumption and achieving rapid sample throughput.

Radioactively labelled triglyceride molecules were used to study the *in vivo* tissue distribution of lipid emulsions produced from different oil sources. Distinct tissue distributions were found based on the used oil type and the $n-6$ to $n-3$ balance. At 10 and 60 min after intravenous injection in mice, the highest uptake was seen in lung tissue, followed by the uptake in the liver and spleen. Clearance from blood and plasma was faster for the newly developed $n-3$ PUFA-rich emulsions than the soybean oil-based emulsions.

We also hypothesized that reducing the droplet size would further reduce the uptake in the liver. Several excipients were evaluated for the production of stable emulsions with smaller droplet size. However, reducing the droplet size increased the levels of lipid oxidation products. A compromise between droplet size reduction and oxidation product levels resulted in droplet sizes around 160-170 nm. The smaller droplet sizes did not substantially affect the distribution pattern *in vivo* as compared to the corresponding

emulsions with a droplet size of 280-300 nm, indicating that the oil type is the main driver governing the tissue distribution. Collectively, the feasibility of manufacturing lipid emulsions from a composite oil mixture rich in *n*-3 PUFA complying with the thresholds set by the United States Pharmacopoeia was demonstrated.

ZUSAMMENFASSUNG

Fettemulsionen als integraler Bestandteil von parenteraler Ernährung liefern lebenswichtige Energie, um Unterernährung zu verhindern, wenn die Nahrungsaufnahme oder Nährstoffabsorption im Verdauungssystem beeinträchtigt ist. Die Zufuhr essenzieller Fettsäuren beugt Mangelerscheinungen vor und gewährleistet ein normales Wachstum und eine ordnungsgemäße neurologische Entwicklung, was besonders bei der Anwendung bei Frühgeborenen wichtig ist. Bei vielen Patienten ist parenterale Ernährung lebenslang nötig. Die existierenden Formulierungen führen jedoch zu erheblichen entzündlichen Nebenwirkungen, wenn sie über einen längeren Zeitraum angewendet werden. Unerwünschte Nebenwirkungen betreffen hauptsächlich die Leber und beeinträchtigen die Funktion durch Cholestase, Steatose und Fibrose mit möglichem Fortschreiten bis hin zur Leberzirrhose.

Mehrere zugrundeliegende Ursachen wurden dafür vorgeschlagen, unter anderem die Art des Öls und – damit verbunden – das Verhältnis von $n-6$ mehrfach ungesättigten Fettsäuren (englisch "polyunsaturated fatty acids", PUFA) zu $n-3$ PUFA, ein hoher Phytosterolgehalt und ein niedriger α -Tocopherolgehalt. Sojabohnenöl als das am häufigsten in Fettemulsionen verwendete Öl, ist reich an $n-6$ PUFA, die im Körper zu entzündungsfördernden Mediatoren umgewandelt werden. Es wird vermutet, dass die Verteilung der Lipidemulsion im Gewebe mit einer hohen Aufnahme in der Leber die beobachteten schädlichen Auswirkungen noch verstärkt. Es gibt Belege dafür, dass Öle, die reich an $n-3$ PUFAs sind, geringere entzündliche Nebenwirkungen hervorrufen und im Gegenzug entzündliche Zustände mildern können. Die verfügbaren alternativen Formulierungen haben jedoch nach wie vor Nachteile, u.a. sind sie nicht ökologisch nachhaltig wegen Überfischung der Meere und bergen das Risiko einer Exposition gegenüber fettlöslichen Umweltgiften, die sich über die Nahrungskette anreichern.

Wir verfolgten das Ziel, intravenöse Fettemulsionen zu entwickeln mit einer aus verschiedenen Ölen zusammengesetzten Ölkomponente, die reich an $n-3$ PUFAs ist, um so eine ausgewogenere Verteilung im Gewebe zu erreichen und letztlich weniger unerwünschte Wirkungen hervorzurufen. Dazu wurden verschiedene Formulierungen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen konzipiert, hergestellt und auf verbesserte *in vitro*- und *in vivo*-Wirkungen hin untersucht, unter gleichzeitiger Einhaltung der regulatorischen Anforderungen. Um das Ausmass des oxidativen Abbaus zu minimieren wurden Hilfsstoffe, die in die Lipidoxidationskettenreaktion eingreifen und diese hemmen, in die Formulierung eingebaut. α -Tocopherol als ein starkes Antioxidans, welches auch endogen in einer Vielzahl natürlicher Öle vorhanden ist, trug dazu bei, den Oxidationsgrad auf ein Niveau zu senken, das mit demjenigen in kommerziell erhältlichen Formulierungen vergleichbar ist. In Ermangelung geeigneter Methoden für die Quantifizierung von Abbauprodukten aus Lipidoxidation und -hydrolyse wurden in unseren Laboren drei Assays entwickelt. Diese wurden so entwickelt bzw. auf unsere Bedürfnisse angepasst, um die neuen Emulsionen effizient zu charakterisieren, wobei der Schwerpunkt auf der Minimierung des Substanzverbrauchs und dem Erreichen eines hohen Probendurchsatzes lag.

Radioaktiv markierte Triglyceridmoleküle wurden verwendet um die *in vivo*-Gewebeverteilung von aus verschiedenen Ölquellen hergestellten Lipidemulsionen zu untersuchen. Je nach verwendeter Ölquelle und dem Verhältnis von $n-6$ zu $n-3$ PUFA wurden unterschiedliche Gewebeverteilungen festgestellt. Sowohl nach 10 als auch 60 Minuten nach der intravenösen Verabreichung in Mäusen wurde die höchste Aufnahme im Lungengewebe beobachtet, gefolgt von der Aufnahme in der Leber und Milz. Die neu entwickelten $n-3$ PUFA-reichen Emulsionen wurden schneller aus dem Blut und Plasma aufgenommen als die Emulsionen auf Sojabohnenölbasis.

Wir vermuteten, dass eine Verringerung der Tröpfchengröße die Aufnahme in die Leber weiter reduzieren würde. Es wurden mehrere Hilfsstoffe für die Herstellung stabiler Emulsionen mit kleinerer Tröpfchengröße untersucht. Die Verringerung der Tröpfchengröße führte jedoch zu einem Anstieg der Lipidoxidationsprodukte. Ein Kompromiss zwischen der Verringerung der Tröpfchengröße und der Bildung von Oxidationsprodukten ergab Formulierungen mit einer Tröpfchengröße von etwa 160-170 nm. Die kleineren Tröpfchengrößen hatten keinen wesentlichen Einfluss auf das Verteilungsmuster *in vivo* im Vergleich zu den entsprechenden Emulsionen mit einer Größe von 280-300 nm. Dies deutete darauf hin, dass der Öltyp der Haupteinflussfaktor für die Gewebeverteilung ist. Insgesamt konnte die Machbarkeit der Herstellung von Lipidemulsionen aus einer zusammengesetzten Ölmischung, die reich an *n*-3 PUFA ist, unter Einhaltung der vom amerikanischen Arzneibuch festgelegten Grenzwerte gezeigt werden.