



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Einfluss von Stabilisatoren und Herstellungsmethoden
auf die Ligandendichte von PLGA-Mikrosphären“

verfasst von / submitted by

Sandra Kubin

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor und Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth für die freundliche Aufnahme und der ausgezeichneten Betreuung recht herzlich bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank meiner Betreuerin Frau Mag. Dr. Xue Yan Wang, die sich immer sehr um mich bemühte und mich während der Ausarbeitung meiner Diplomarbeit tatkräftig unterstützte.

Insbesondere möchte ich mich bei meiner Familie sowie meinen Freunden bedanken, die mir stets aufmunternde Worte zukommen ließen und mich immer wieder motiviert haben nicht aufzugeben. Vor allem meiner Mutter ein herzliches Danke, die mich immer unterstützte und immer für mich da war, aber auch meinem Vater ein herzliches Danke, der mir bei der Korrektur der Diplomarbeit sehr hilfreich zur Seite stand und auch sonst bei diversen Fragen Zeit für mich fand.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Roland, der mich mit seiner Engelsgeduld und seinen mitfühlenden Worten, während meiner gesamten Studienzeit, immer unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
2	Grundlagen	7
2.1	Poly (D, L-Milchsäure-co-Glykolsäure)	7
2.2	Mikro- und Nanopartikel	8
2.3	Tenside.....	9
2.4	Arzneimittel-Targeting.....	11
2.5	Konjugation-Targeting	12
3	Ergebnisse.....	15
4	Zusammenfassung.....	37
4.1	Abstract – deutsche und englische Version	38

1 Einleitung

In den letzten Jahren hat sich die pharmazeutische Forschung auf die Entwicklung von partikulären Formulierungen als vielversprechende, neuartige Arzneiformen fokussiert. Insbesondere mit sensitiven Arzneistoffen aus der Biotechnologie-Pipeline soll dadurch eine verlängerte Wirkstofffreisetzung und eine verbesserte Bioverfügbarkeit erzielt werden. Zusätzlich können durch verschiedene Herstellungstechniken sowohl hydrophile als auch hydrophobe Arzneistoffe mit unterschiedlicher Molekülmasse eingebaut werden. Darüber hinaus können durch strukturelle Oberflächenmodifikation der Partikel mit bio-rekognitiven Liganden die inkorporierten Arzneistoffe spezifisch zu Zellen bzw. Geweben transportiert werden. Dies bewirkt letztendlich eine erhöhte Wirksamkeit bei gleichzeitiger Dosisreduktion und folglich weniger Nebenwirkungen für den Patienten [1, 2].

Zur Herstellung von Mikropartikeln wird häufig das Polymer Poly (D, L-Lactid-co-Glykolid, PLGA) vom H-Typ mit freien Carboxylatgruppen verwendet, das aufgrund seiner Biokompatibilität und biologischen Abbaubarkeit [10], oral [3], parenteral [4], dermatologisch [5], pulmonal [6], nasal [7], und okular [8] eingesetzt werden kann. Die am häufigsten eingesetzten Methoden zur Herstellung von PLGA Mikropartikeln sind Sprühtrocknung und Lösungsmittelverdampfung. Bei der Sprühtrocknung werden die Tröpfchen der zerstäubten PLGA-Lösung im warmen Luftstrom getrocknet [11, 12]. Beim Lösungsmittelverdampfungsverfahren wird ein lipophiler API (aktiver pharmazeutischer Inhaltsstoff) in der organischen Lösung des Polymers gelöst (Einfachemulsions-Technik), während ein hydrophiler API in einer wässrigen Phase gelöst und anschließend in der organischen PLGA Phase emulgiert wird (Doppelemulsions-Technik). Dann wird die organische Lösung oder die Emulsion in einer (zweiten) äußeren wässrigen Phase emulgiert, sodass entweder eine o/w Emulsion oder eine w/o/w Doppelemulsion entsteht. Durch Verdampfen des organischen Lösungsmittels steigt die Dichte in den Flüssigkeitströpfchen, die schließlich zu stabilen Partikeln aushärten. Generell erfordern beide Methoden Stabilisatoren, um dem Brechen der Emulsion und der Aggregation der entstandenen Partikel entgegenzuwirken. Der Nachteil dieser Tenside besteht darin, dass sie auf der Oberfläche adsorbiert werden und somit funktionelle Gruppen abschirmen können, die wiederum

bei der Oberflächenmodifikation für die kovalente Ligandenbindung wichtig sind [11, 12]. Häufig werden Polyvinylalkohol (PVA) und Poloxamere wie zum Beispiel Poloxamer 188 (Pluronic® F-68) als Stabilisatoren eingesetzt, die während der Herstellung in die Partikeloberfläche eingebaut werden und dadurch Größe, Zetapotential, Mucoadhäsion aber auch die Oberflächenfunktionalisierung beeinflussen können [13, 14]. Zur Oberflächenmodifikation kann die Carbodiimid Methode eingesetzt werden, wodurch beispielsweise Fluorescein-markiertes Weizenlektin (F-WGA, fluorescein-labeled wheat germ agglutinin) über seine Aminogruppen an Carboxylgruppen auf der Oberfläche von PLGA-Mikropartikeln amidartig gebunden werden kann [15].

In der vorliegenden Diplomarbeit sollen WGA-modifizierte Mikropartikel aus PLGA nach der Doppelemulsions-Lösungsmittelverdampfungstechnik hergestellt werden und dabei drei Typen von Tensiden als Stabilisatoren eingesetzt werden: PEMA (Poly(ethylen-alt-maleinsäure)), Pluronic® F-68 (Poloxamer 188) und PVA (Polyvinylalkohol) mit einer Molmasse von 31000 und 205000 Dalton. Um die Dichte der Carboxylgruppen auf der Partikeloberfläche zu erhöhen, aber auch um die Partikel zu stabilisieren, soll PEMA eingesetzt werden [16, 17]. Es sollen auch sprühgetrocknete PLGA-Mikropartikel ohne Tenside hergestellt werden, um den Einfluss der jeweiligen Stabilisatoren auf die Ligandendichte auf der Oberfläche vergleichen zu können [3]. Zusätzlich soll die Bindungsrate der Partikel an Caco-2 Monolayer fluorimetrisch untersucht werden, die ein etabliertes Modell des menschlichen Darmepithels darstellen, so dass auch die Erhaltung der Bioadhäsivität des Liganden nach der Oberflächenmodifikation beurteilt werden kann.

References:

- [1] O. M. Koo, I. Rubinstein, and H. Onyuksel, *Nanomedicine*, 1, 193, **(2005)**
- [2] I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, *Adv. Drug Delivery Rev.* 54, 631, **(2002)**
- [3] G. Ratzinger, X. WANG, M. Wirth, and F. Gabor, *J. Control. Release*, 147, 187 **(2010)**
- [4] G.S. Das, G.H.R. Rao, R.F. Wilson, and T. Chandy, *Drug Delivery* 7, 129, **(2000)**
- [5] E.G. De Galon, M.J. Blanco-Prieto, P. Ygartua, and S. Santoyo, *J. Control. Release* 75, 191, **(2001)**
- [6] R.M. Seguin, and N. Ferrari, *Expert Opin. Investig. Drugs* 18, 1505, **(2009)**
- [7] N. Csaba, A. Sanchez, and M.J. Alonso, *J. Control. Release* 113, 164, **(2006)**

- [8] T. Moritera, Y. Ogura, N. Yoshimura, Y. Honda, R. Wada, S. Hyon, and Y. Ikada, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 33, 3125, **(1992)**
- [10] J.M. Anderson, and M.S. Shive, M.S., Adv. Drug Delivery Rev. 28, 5, **(1997)**
- [11] R.C. Mundargi, V.R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel, and T.M. Aminabhavi TM, J. Control. Release 125, 193, **(2008)**
- [12] R.A. Jain, Biomaterials 21, 2475, **(2000)**
- [13] P.D. Scholes, A.G.A. Coombes, L. Illum, S.S. Davis, J.F. Watts, C. Ustariz, M. Vert, and M.C. Davis, Int. J. Pharm. 59, 261, **(1999)**
- [14] S. Feng, and G. Huang, J. Control. Release 71, 53, **(2001)**
- [15] G.T. Hermanson, Editor, *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, San Diego, **(1996)**
- [16] M.E. Keegan, J.L. Falcone, T.C. Leung, and W.M. Saltzman, Macromolecules, 37, 9779, **(2004)**
- [17] M.E. Keegan, S.M. Royce, T. Fahmy, and W.M. Saltzman, J. Control. Release 110, 572, **(2006)**

2 Grundlagen

2.1 Poly (D, L-Milchsäure-co-Glykolsäure)

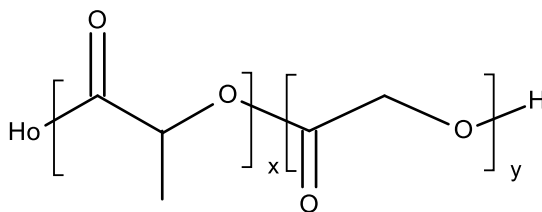


Abbildung 1: PLGA-Struktur

Poly (D, L-Milchsäure-co-Glykolsäure, PLGA) ist ein biokompatibles und biologisch abbaubares Copolymer aus Lactid und Glycolid (Abb. 1), das häufig in Arzneiformen für gezielte Arzneimittelfreisetzung und als scaffold in der Geweberegeneration eingesetzt wird [1]. Die physikalischen, chemischen und die biologischen Eigenschaften von PLGA bestimmen die mechanische Festigkeit, die Eigenschaften der Arzneiformulierung sowie die Wirkstofffreisetzung aus der Polymermatrix [2]. Das Polymer wird durch Ringöffnungspolymerisation aus den zyklischen dimeren Anhydriden, D, L-Lactid und Glycolid, in Gegenwart von Sn (II) -2-ethyl-hexanoat, Zn oder Zn-Lactat als Katalysator hergestellt. Aufgrund von toxikologischen Bedenken gegenüber Zinn und der Veresterung der endständigen

Hydroxylgruppen, die zusätzlich die Lipophilie des Polymers erhöht, werden die beiden Zink-Katalysatoren bevorzugt eingesetzt [1]. Die Polymerisation wird entweder durch Zugabe von Milchsäure, was ein Polymer mit einer freien Carbonsäure-Endgruppen („non-capped“) ergibt oder durch Zusatz von Milchsäureethylester beendet, was ein Polymer mit endständiger Estergruppe („end-capped“) ergibt. Es gibt drei grundlegende Wege zur stabilen Oberflächenmodifikation von PLGA-Partikeln, die aus Carboxylat-Polymeren - dem sogenannten "H-Typ" – bestehen: Einerseits die kovalente Bindung bioaktiver Einheiten, vorzugsweise über die Carbodiimid-Methode, andererseits die Immobilisierung über ionische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Oberfläche, und schließlich die hydrophobe Bindung von lipophilen Liganden an das hydrophobe Polymergerüst. Die beiden letzten Methoden ergeben eine adsorptive Beschichtung, wobei die Gefahr der raschen Desorption der Schicht in biologischen Flüssigkeiten, aufgrund der Quellung und Erosion der Partikel, besteht [1].

2.2 Mikro- und Nanopartikel

Nanopartikel und Mikropartikel aus PLGA werden prinzipiell durch vergleichbare Technologien hergestellt, die sich nur im Energie-Eintrag unterscheiden. Ein hoher Energieeintrag bewirkt kleinere Emulsionströpfchen und damit einen kleineren Durchmesser, der dann bevorzugt im Nanobereich liegt. Speziell bei der Lösungsmittlextraktions-/Verdunstungs-Methode wird eine höhere Energiezufuhr in Form von Beschallung, Hochdruckhomogenisierung oder auch einer starken mechanischen Durchmischung eingesetzt. Um Nanopartikel im Bereich von 100 bis 300 nm mit enger Größenverteilung in einem einstufigen Prozess herzustellen, wird die Nano-Präzipitationstechnik, die Ausfällung von PLGA durch Zusatz eines Nicht-Lösungsmittels und darauf folgende Ablagerung von PLGA an den Grenzflächen, eingesetzt [1].

Generell sind mehrere Techniken verfügbar, um PLGA-Mikropartikel herzustellen wie Lösungsmittlextraktion/ Verdampfung, Phasentrennung und Sprühtrocknung [1]. In Bezug auf die Lösungsmittlextraktion/ Verdampfung gibt es verschiedene Modifikationen, die vom Typ der eingesetzten Emulsionsart abhängen. Die o/w Technik umfasst die

Emulsion, die PLGA, einen hydrophoben Wirkstoff in einem organischen Lösungsmittel und eine wässrige Stabilisator-Lösung enthält. Durch Verdampfen oder Extraktion des flüchtigen organischen Lösungsmittels härten die Tröpfchen. Das s/o/w-Verfahren basiert auf der Verwendung eines festen, feinst zerkleinerten Wirkstoffes anstatt einer Lösung, die nach der oben beschriebenen Vorgangsweise prozessiert wird. Ferner kann durch die w/o/w Technik ein hydrophiler Arzneistoff eingesetzt werden. Dabei wird zunächst ein kleines Volumen einer wässrigen Wirkstofflösung in einer PLGA-reichen organischen Phase emulgiert. Diese w/o-Emulsion wird in einer zweiten wässrigen Phase dispergiert, die einen Stabilisator enthält. Das organische Lösungsmittel diffundiert in die zweite wässrige Phase, sodass schlussendlich feste Partikel entstehen. Speziell für ölige Lösungen wird die o/o-Methode verwendet. Die erste ölige Lösung, üblicherweise Acetonitril, enthält PLGA und den hydrophoben Arzneistoff mit einer gewissen Restlöslichkeit in Wasser, die dann mit dem zweiten öligen Lösungsmittel, beispielsweise Baumwollsaamenöl, extrahiert wird, was zu einer Verfestigung der Tröpfchen führt.

Die zweite grundlegende Technik (Phasentrennung oder Koazervation) beruht auf einer Dispersion von einer suspendierten oder emulgierten Droge in einer Lösung von PLGA, der ein Nicht-Lösungsmittel zugesetzt wird, das an der Grenzfläche zur Koazervatanreicherung führt. Im Falle von PLGA, wird der PLGA-Emulsion eine wässrige Phase zugesetzt, die viskoses PVA/ Salz enthält [1].

Letztendlich wird für hydrophobe Arzneistoffe die Sprühtrocknung bevorzugt verwendet, während hydrophile Wirkstoffe wie Proteine dafür nicht geeignet sind [1].

2.3 Tenside

Emulgatoren wie PVA, Pluronic® oder PEMA werden zur Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln aus PLGA und verwandten Polymeren bevorzugt eingesetzt. Sie senken die Oberflächenspannung zwischen den zwei Phasen herab und ermöglichen die Bildung stabiler Dispersionen.

Pluronic®, ein sogenanntes Poloxamer, ist ein amphiphiles ABA-Triblock-Copolymer, das aus einem zentralen hydrophoben Polypropylenglycol (PPG) mit zwei endständigen hydrophilen Polyethylenketten besteht. Das Tensid ist im Europäischen Arzneibuch enthalten und ist von der FDA für orale, topische und parenterale Anwendungen zugelassen. Außerdem wird Poloxamer in der pharmazeutischen Industrie häufig verwendet, um die Löslichkeit von Wirkstoffen und damit auch die Resorption zu verbessern, aber auch um die Benetzbarkeit und das Haftvermögen von Arzneiformen auf Haut und Schleimhaut zu erhöhen.

PVA (Polyvinylalkohol) ist ein häufig verwendeter Emulgator, der durch partielle Hydrolyse von Polyvinylacetat hergestellt wird und somit aus hydrophoben Vinylacetat- und hydrophilen Vinylalkohol-Einheiten besteht. Bei der Partikelherstellung durch die Lösungsmittelverdampfungstechnik entsteht an der Partikeloberfläche ein Netzwerk aus PVA und PLGA, wobei PVA über seine hydrophoben Vinylacetateinheiten verankert wird [1].

Verglichen mit PEMA (Poly(ethylen-alt-maleinsäure)) haben beide Tenside eine ähnliche Struktur, die aus einfachen hydrophoben Kohlenwasserstoffketten backbones mit kurzen hydrophilen Seitenketten bestehen. Durch die Verankerung des hydrophoben Polymerbackbones in der Partikelmatrix liegt der Vorteil von PEMA in der großen Anzahl von derivatisierbaren Carbonsäuregruppen auf der Mikrosphärenoberfläche. Die sauren Seitenketten ermöglichen eine kovalente Bindung mit primären Aminogruppen des gewünschten Liganden in Form von stabilen Amid-Bindungen. Im Allgemeinen hat PEMA gute Qualitäten als Stabilisator und ermöglicht die Herstellung von biologisch abbaubaren Partikeln mit funktionalisierter Oberfläche [3, 4].

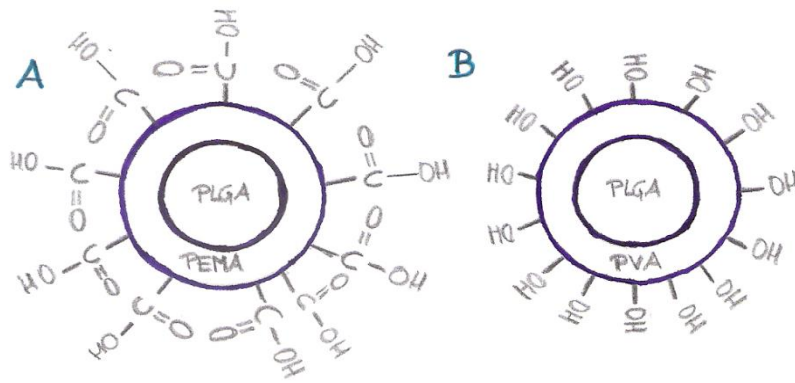


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Mikrosphären, die nach dem Emulsionsverfahren unter Verwendung zweier verschiedener Stabilisatoren hergestellt wurden:

- (A): Die Stabilisierung der Emulsion mit PEMA ergibt kugelförmige Molekülaggregate mit Carbonsäuregruppen auf der Oberfläche.
- (B): PVA als Stabilisator ergibt Mikrosphären mit Hydroxylgruppen an der Oberfläche

2.4 Arzneimittel-Targeting

Die Idee des gezielten Wirkstofftransportes basiert auf der Tatsache, dass viele Arzneimittel, in Bezug auf Resorptionsort und/oder Wirkung nicht selektiv sind und daher unerwünschte oder sogar toxische Wirkungen auslösen können. Man unterscheidet zwischen passivem, aktivem und physikalischem Targeting, um das Arzneimittel so genau wie möglich an das therapeutische Ziel zu transportieren [5-7]. Physiologische Eigenheiten des Zielgewebes spielen beim passiven Targeting eine wichtige Rolle. Das bekannteste Beispiel ist die erhöhte Permeabilität und Retention (EPR, enhanced Permeability and Retention) von Blutgefäßen im Tumorbereich oder entzündetem Gewebe [6, 7]. Das aktive Targeting beruht auf einer spezifischen Biorekognition zwischen Arzneimittel und erkranktem Gewebe. Beispielsweise interagiert Weizenlektin (WGA) spezifisch mit Sialyl- und N-Acetyl-D-Glucosaminyl-Strukturen der Zellmembran und kann dadurch die Bindung an die Zelle und bei Aktivierung von Tyrosinkinase die Aufnahme in die Zelle auslösen [6, 7]. Beim physikalischem Targeting erfolgt die Anreicherung bzw. Freisetzung des Wirkstoffes durch eine physikalische Maßnahme von außen wie Magnetfelder oder Hyperthermie durch eine Sonde [7].

2.5 Konjugation-Targeting

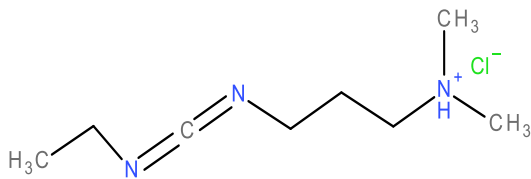


Abbildung 3: Strukturformel von 1-Ethyl-3 - (- 3'-dimethylaminopropyl) carbodiimid-hydrochlorid (EDAC)

1-Ethyl-3- (3'-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDAC) ist ein Kopplungsagens, das in Wasser gut löslich ist und somit auch für die Konjugation von hydrophilen, biologisch aktiven Liganden bei einem pH-Wert zwischen 4,7 und 7,5 geeignet ist (Abb. 4). Aber die Stammlösung von EDAC ist im Wasser instabil und sollte kurz vor Gebrauch hergestellt werden, um einen Aktivitätsverlust zu verhindern. Voraussetzung für die Konjugation ist, dass eines der Partner-Moleküle ein primäres Amin und das andere eine Carboxylgruppe enthält. Carbonsäuren reagieren mit N-substituierten Carbodiimiden unter Bildung eines instabilen O-Acylharnstoffes als aktives, aber instabiles Zwischenprodukt. Dieser kann mit einem Nukleophil wie einem primären Amin unter Ausbildung einer stabilen Amidbindung reagieren. Als Nebenprodukt entsteht wasserlöslicher Isoharnstoff, der durch Dialyse oder Gelfiltration entfernt werden kann [1].

Um die Stabilität des aktiven Zwischenprodukts zu erhöhen, wird N-Hydroxysuccinimid (NHS) oder N-Hydroxysulfosuccinimid (sulfo-NHS) der Carbodiimid-Reaktion zugegeben. Durch die Zugabe dieses schwachen Oxidationsmittels, das mit dem Aktivester zu einem NHS-Ester als stabileres Zwischenprodukt reagiert, ist es möglich, die Halbwertszeit auf mehrere Stunden zu erhöhen. Zur Oberflächenmodifikation von Partikeln werden zunächst deren Carboxylgruppen mit EDAC/ NHS aktiviert. Nach Entfernung der überschüssigen Reagenzien durch das Waschen kann der Aktivester mit den zugesetzten Aminen unter Ausbildung einer Peptidbindung reagieren. Im Allgemeinen verbessert NHS die

Effizienz der Reaktion und es ermöglicht auch eine Verbesserung der Kopplungsrate von Carboxylat- und Aminogruppen enthaltenden Proteinen durch Vermeidung der Vernetzung von Proteinmolekülen infolge einer Zweischnitt-Reaktion [1, 8].

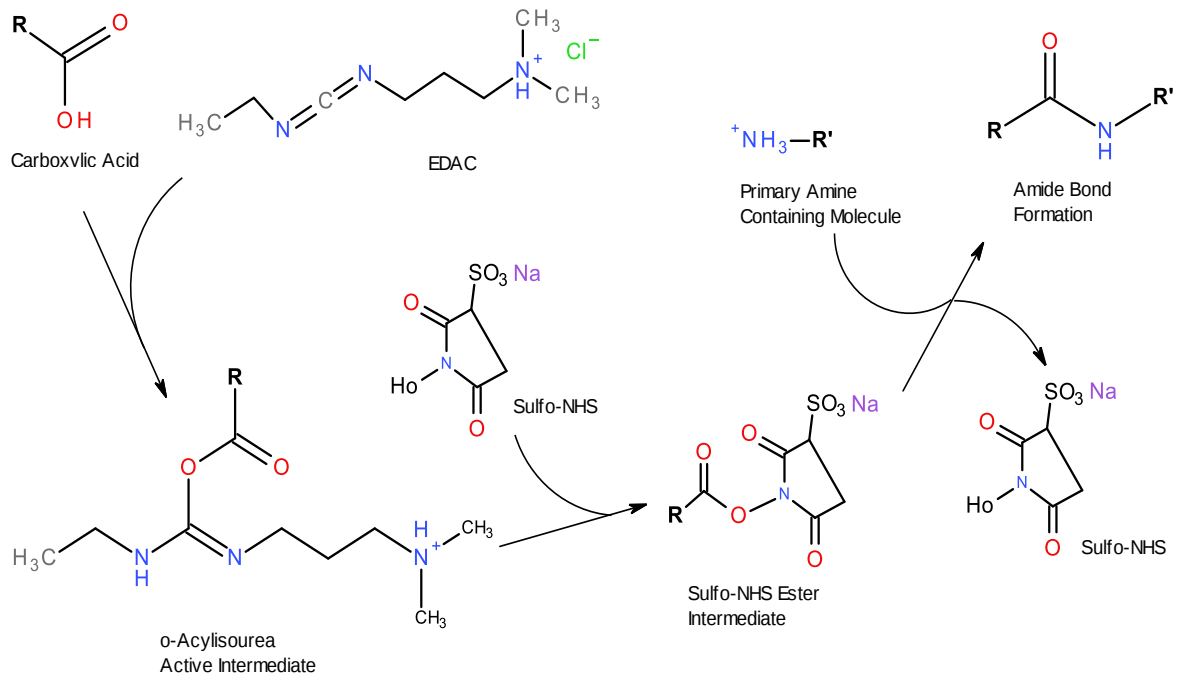


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Carbodiimid-vermittelten Kopplung von Aminen an Carbonsäuren. In diesem zweistufigen Verfahren können durch Zugabe von Sulfo-NHS eine höhere Konjugationsrate erzielt werden, da der intermediär gebildete Sulfo-NHS-Ester länger in wässriger Lösung stabil ist als der Aktiv-Ester, der bei der Reaktion mit EDAC und Carbonsäure gebildet wird.

References:

- [1] Gerda Ratzinger, Christian Fillafer, Vera Kerleta, Michael Wirth, Franz Gabor: The role of surface functionalization in the design of PLGA micro- and nanoparticles. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 27(1):1-83, 2010.
- [2] Jain RA, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials*. 21 (2000) 2475 – 2490.
- [3] Mark E. Keegan, John L Falcone, Thomas C. Leung, W. Mark Saltzman: Biodegradable microspheres with Enhanced Capacity for Covalently Bound Surface Ligands, *Macromolecules* 2004, 37, 9779 – 9784.
- [4] Mark E. Keegan, Sara M. Royce, Tarek Fahmy, W. Mark Saltzman: In vitro evaluation of biodegradable microspheres with surface bound ligands, *Journal of Controlled Release* 110 (2006) 574 – 580.

- [5] Couvreur P, Vauthier C, Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease, *Pharmaceutical Research*. 23 (2006), 1417 – 1450.
- [6] Sahoo SK, Labhasetwar V, Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drug Discovery Today*. 8 (2003) 1112 – 1120.
- [7] Langguth P, Fricker G, Wunderli-Allenspach H. *Biopharmazie*, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2004.
- [8] Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, San Diego, 1996.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit konnte maßgeblich zur Publikation “ Influence of stabilizers and preparation procedures on ligand density of PLGA-microparticles” beigetragen werden.

Dabei wurden Biokonjugate, bestehend aus F-WGA und PLGA mit jeweils verschiedenen Tensiden wie Pluronic® F-68, PVA und PEMA, hergestellt. Die auf diese Weise hergestellten Partikel, mit oder ohne den jeweiligen eingebauten Stabilisator, wurden anschließend durch Ligandendichte, Zellbindungskapazität und Internalisationspotential an konfluenten Zell-monolayern charakterisiert. Für diese Bindungs-und Internalisationsstudien wurden Zellen der Caco-2 – Zelllinie eingesetzt.

Unterschrift: 

Influence of stabilizers and preparation procedures on ligand density of PLGA-microparticles

Xue-Yan Wang, Sandra Kubin, Michael Wirth, Franz Gabor

Faculty of Life Sciences, Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics,
University of Vienna, Vienna A-1090, Austria

To be submitted to Science of Advanced Materials

Corresponding author:

Franz Gabor

Faculty of Life Sciences, Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics,
University of Vienna, Vienna A-1090, Austria

Phone: +43-1-4277-55406

Fax: +43-1-4277-9554

Email: franz.gabor@univie.ac.at

Abstract

Targeted drug delivery requires administration of stable surface-functionalized particles but grafting might be counteracted by presence of stabilizers. To elucidate the influence of polyvinylalcohol (PVA), Pluronic® F-68 (PL), and poly(ethylene-alt-maleic acid) (PEMA) on ligand density after immobilization, the energy input during solvent evaporation was modified to yield particles in a comparable size range of about 3.5 μm in terms of the surface area mean. The cytoadhesive fluorescent-labeled wheat germ agglutinin was covalently coupled to the carboxylate groups of the PLGA matrix via carbodiimide. Calculation of the ligand density from the surface area mean and fluorescence intensity of immobilized lectin revealed that in case of solvent evaporation in presence of stabilizers the number of immobilized ligand molecules per microparticle followed the order PEMA (21%) > PVA 4 kDa (17%) > PL (13%) > PVA 40 kDa (8%) as compared with spray dried particles prepared without any stabilizer (100%). Cytoadhesion studies with Caco-2 monolayers confirmed retained biorecognition of the immobilized targeter and the cell binding rate followed the same ranking as above except for the two types of PVA which changed their places. All in all, PEMA emerged as an alternative stabilizer preferable over well-established PVA and PL because it offers additional reactive carboxylates for grafting as well as sufficient stabilization of the microparticles especially in case of hydrophilic drugs as a payload.

Keywords

Poly(_{D,L}-lactic-co-glycolic acid) (PLGA); Poly(ethylene-*alt*-maleic acid) (PEMA); Polyvinylalcohol (PVA); Solvent evaporation; Spray drying

Introduction

Currently great efforts are focused on the development of micro- and nanoscaled particulate drug delivery systems offering potential benefits such as protection of the API against harmful environment, prolonged release and enhanced solubility of poorly bioavailable drugs. Additionally, different preparation techniques ranging from the lab to the industrial scale enable entrapment of hydrophilic as well as hydrophobic drugs of different molecular weight. An intensively investigated future trend of this concept is the development of site-specific drug delivery systems by structural modification of the surface. Ideally the grafting with biorecognitive ligands would allow specific targeting of cells and tissues, which is supposed to ultimately result in increased efficacy at reduced dosage concurrent with minimized side effects for the patient [1, 2].

For preparation of surface-modified particles, two approaches are currently pursued, either a one-step procedure using fully functionalized polymers as a starting material or a two-step procedure by surface modification of previously prepared particles. In the latter case, surface functionalization might be counteracted by the presence of stabilizers. On the one hand, stabilizers are inevitably necessary to prevent aggregation; on the other hand they are adsorbed at the surface shielding functional groups required for covalent linkage of ligands.

In order to approach this problem, microparticles are prepared from the copolyester Poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA), which is most widely used for the preparation of particulate drug delivery systems for oral [3], parenteral [4], dermatological [5], pulmonary [6], nasal [7], and ocular [8] routes as well as diagnostics [9] due to biocompatibility and biodegradability [10]. Among the numerous methods developed for preparation of PLGA-particles, spray drying and solvent evaporation techniques are most frequently applied. In case of spray drying, the droplets of an atomized PLGA solution are dried in a stream of warm air [11, 12]. In case of the solvent evaporation technique, a lipophilic API is dissolved in the organic solution of PLGA (single emulsion technique) whereas a hydrophilic API is dissolved in an aqueous phase and emulsified in an organic PLGA phase (double emulsion technique). The organic solution or emulsion is then emulsified in an

outer aqueous phase, which results in the formation of an oil-in-water single emulsion or a water-in-oil-in-water double emulsion, respectively. Subsequently, the organic solvent is evaporated and the liquid droplets increase in density to yield finally solid particles. Both methods, however, require a stabilizer to prevent emulsion breaking and aggregation. Polyvinylalcohol (PVA) and poloxamers, especially poloxamer 188 (Pluronic® F-68), are most frequently applied and they are reported to be incorporated on the particle surface during preparation, which can affect size, zeta potential, mucoadhesion [13, 14] and particularly surface functionalization.

As potential binding sites are required for functionalisation, the H-type of PLGA is used, which contains free carboxylate groups, and the carbodiimide technique [15] is applied for covalent conjugation of bioadhesive wheat germ agglutinin. Use of the fluorescein-labeled bioadhesive analogue (F-WGA) as a ligand enables both, determination of the coupling efficiency by fluorimetry and estimation of retained biorecognition by cytoadhesion assays using Caco-2 monolayer representing a well-established model of the human intestinal epithelium.

In the present study, PLGA-microparticles are prepared by the double emulsion solvent evaporation technique. Three types of surfactants are used as stabilizers, namely polyvinylalcohol (PVA), poloxamer 188 (Pluronic® F-68) and poly(ethylene-*alt*-maleic acid) (PEMA). According to McCarron et al [16] PVA reduced the coupling rate of polyclonal antibodies to PLGA-nanoparticles by 50%. Additionally, it should be considered that the commonly applied PVA exhibits a molecular weight <100,000 Dalton and represents a heterogeneous mixture of polymer chains with different length [17-19] which influences the properties of formed particles. Therefore, PVA of 31,000 Dalton and 205,000 Dalton and nearly identical polymer components were used in this study. In order to increase the density of carboxylic acid groups on the surface of particles as well as to stabilize the particles, PEMA was also included [20, 21]. For comparison of the influence of stabilizers on the ligand density at the particle surface, spray-dried PLGA-microparticles were also functionalized without any stabilizer [3].

Materials and Methods

Materials

PLGA (poly(D,L-lactide-co-glycolide), Resomer[®] RG503H, 50:50 lactide/glycolide) was bought from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). Poly (ethylene-*alt*-maleic anhydride), Pluronic[®] F-86, Polyvinyl alcohol 40-88 (PVA 40-88, MW 205,000), and Polyvinyl alcohol 4-88 (PVA 4-88, MW 31,000) were obtained from Sigma Aldrich (Vienna, Austria). Fluorescein-labeled Wheat Germ Agglutinin (F-WGA, molar ratio fluorescein/protein=2.9) from *Triticum vulgare* was purchased from Vector laboratories (Burlington, USA). All other chemicals were of analytical purity.

Preparation of PLGA-microparticles

PLGA-microparticles were prepared by the water-in-oil-in-water solvent evaporation technique. Briefly, 400 μ L distilled water were emulsified with a solution containing 400 mg PLGA in 2.4 g ethyl acetate by sonication. After adding 8 mL 0.5% aqueous solution of different tensides, the emulsion was homogenized again by different procedures in order to prepare particles in a comparable size range: In case of Poly (ethylene-*alt*-maleic acid)(PEMA), which was prepared from Poly (ethylene-*alt*-maleic anhydride) by hydrolysis with 0.2M NaOH [22], the emulsion was sonified (Bandelin electronic UW70/HD70; tip: MS 72/D; Berlin, Germany) for 2 min at 40% intensity. In case of all other surfactants high speed homogenization (ULTRA - TURRAX[®] T8, IKA, Staufen, Germany) was applied for 6 min at about 25,000rpm (Pluronic F-86[®]; position #6) or 22,000 rpm (PVA 40-88 and PVA 4-88; position #5). After pouring the (w/o)/w emulsion into 100 mL 0.25% aqueous solution of the corresponding tenside, the particle suspension was stirred at 600 rpm over night at room temperature to evaporate residual ethyl acetate. Finally, the microparticles were washed three times with 120 mL 20mM HEPES/NaOH pH 7.0 and resuspended in 100 mL of the same buffer.

Spray-dried PLGA microparticles were prepared and fractionated according to their size as previously described [3, 23, 24]. Briefly, a 6.5% (w/v) PLGA solution in methylene chloride was spray-dried (Mini Spray Dryer B-191, Buechi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). For size fractionation 100 mg dry particles were dispersed in 10 mL distilled water

by sonication and centrifuged at 400 rpm for 2 min. The pellet containing too large particles was discarded and the supernatant was again centrifuged for 10 min at 3200 rpm for 10 min. The supernatant containing mainly nanoscaled particles was discarded and the pellet was re-suspended in 5 mL 20mM HEPES/NaOH 7.0.

The PLGA content of lyophilized aliquots was determined gravimetrically after exhaustive dialysis against distilled water. The particle size distribution was determined using a Malvern Mastersizer 2000 laser particle size analyzer (Malvern Instruments, Malvern, UK).

Surface modification with fluorescein-labeled wheat germ agglutinin

F-WGA was covalently linked to the carboxylate groups on the surface of PLGA-microparticles using a modified carbodiimide method [25]. In brief, a dispersion of 5 mL PLGA-microparticles in 20 mM HEPES/NaOH pH 7.0 was incubated end-over-end for 2 h at room temperature with 2.5 mL of a freshly prepared solution containing 1400 mg 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and 59 mg N-hydroxysuccinimide in the same buffer. The beads containing activated carboxylic groups were washed three times with 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4 to remove the excess reagents. After resuspending the microparticles in 5 mL of the same buffer, 500 μ L aqueous solution of F-WGA (5 mg/mL) were added followed by end-over-end incubation overnight at room temperature. Non-reacted binding sites were saturated by subsequent incubation with 1.8 mL glycine solution (200 mg/mL in buffer) for 5 h at room temperature. Finally, the microparticles were washed three times by centrifugation to remove excessive reagents, resuspended in 5 mL buffer and stored at -80 °C until use. The mass of modified PLGA-particles was determined gravimetrically as mentioned above.

Quantification of particle-immobilized F-WGA

The amount of surface-bound F-WGA was determined by quantification of the label after dissolving the microparticles. For that purpose, 500 μ L suspension containing F-WGA-modified particles were firstly spun down at 3200 rpm for 15 min. and the pellet was hydrolyzed with 500 μ L 0.1 M NaOH for 3 days. The relative fluorescence intensities (RFI) of hydrolyzed samples were determined at 485/525 nm using a Tecan Infinite® 200 fluo-

rescence reader (Grödig, Austria) and the amount of immobilized WGA was calculated from the calibration curve of F-WGA.

Calculation of the WGA-density at the particle surface

The surface area A [m^2] and volume V [m^3] of a spherical particle with radius r [m] is calculated according to equation 1.1 and 1.2, respectively:

$$A = 4r^2\pi \quad (1.1)$$

$$V = \frac{4r^3\pi}{3} \quad (1.2)$$

Consequently, the mass of a single particle m [kg] can be calculated from equation 1.3 with ρ [$kg\ m^{-3}$] as the density of the polymer.

$$m = \rho V \quad (1.3)$$

Therefore, the total number of particles N and total surface area A_{total} [m^2] each milligram particles is calculated from equation 1.4 and 1.5, respectively:

$$N = \frac{10^{-6}}{m} \quad (1.4)$$

$$A_{total} = NA \quad (1.5)$$

Finally, after substitution, the simplified expression is presented by 1.6:

$$A_{total} = \frac{3 \times 10^{-6}}{\rho r} \quad (1.6)$$

with ρ is $1280\ kg\ m^{-3}$ in the case of PLGA and r is the Sauter mean diameter $D[3,2]$. Since the molecular weight of WGA is 36kDa, the number of coupled WGA-molecules per m^2 N_{WGA}/m^2 can be calculated from equation 1.7.,

$$N_{WGA}/m^2 = \frac{Avagadro's\ number * p * 10^{-6}}{A_{total} * 36000} \quad (1.7)$$

where p is the ratio of conjugated WGA to PLGA-microparticles [$\mu g/mg$] and Avagadro's number is 6.022×10^{23} .

Furthermore, the number of coupled WGA-molecules each PLGA-microparticle ($N_{\text{WGA/MP}}$) as another parameter describing the coupling efficiency is calculated according to expression 1.8.:

$$N_{\text{WGA/MP}} = \frac{\text{Avagadro's number} \cdot p \cdot 10^{-6}}{N \cdot 36000} \quad (1.8)$$

Cell culture

Caco-2 cells were purchased from the German collection of microorganisms and cells (DSMZ, Braunschweig, Germany). Cells were cultivated in RPMI 1640 cell culture medium containing 10% fetal calf serum, 4 mM L-glutamine and 150 mg/mL gentamycine in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere at 37°C and were subcultured by treatment with TrypLE® select. Cells between passage 56 and 87 were used in the present study. For cytoadhesion studies, 1.7×10^4 Caco-2 single cells/well were seeded in 96-well microplates. Cells were cultivated under standard cell culture conditions for one week until a confluent monolayer has been formed.

Cytoadhesion Studies

In order to evaluate the particle-cell interactions, PLGA-microparticles were incubated with Caco-2 monolayers. After washing the confluent Caco-2 monolayer once with isotonic 20 mM HEPES/NaOH pH 7.4, the cells were incubated with 100 µL per well of the microparticle suspension (20 µg microparticles) for 30 min at 4 °C. Unbound microparticles were removed by washing twice with the same buffer, and the RFI of the monolayer was determined at 485/525 nm. The amount of the cell-associated particles was calculated from a calibration curve established with F-WGA microparticle suspensions.

Scanning electron microscopy (SEM)

The dry particles were placed on sample holders and coated with gold using Q150R ES rotary-pumped sputter coater (Queorum, UK) at 0.1 mbar and 60 mA for 60 sec. The samples were imaged in high vacuum using a Hitachi Tabletop Microscope TM-1000 (Krefeld, Germany).

Results and Discussion

Characterization of PLGA-microparticles

In order to elucidate the influence of stabilizers on the ligand density and subsequently the cytoadhesive properties, PLGA-microparticles were prepared by solvent evaporation in presence and spray drying in absence of a stabilizer. As the surface area is a key parameter the energy input had to be adjusted to obtain particles within a comparable size range. Although the concentration of the stabilizers was kept constant, the characteristics inherent to the stabilizer additionally determine the droplet size when the solvent evaporation technique is applied. Whereas PEMA required highest energy input by ultrasonication to yield particles in the micrometer range, for use of PVA or PL lower dispersing energy by ULTRA - TURRAX® was sufficient (Table 1). Interestingly, emulsification of PVA-containing batches at speed setting #4 yielded larger microparticles, but nanoparticles were obtained at setting #6. Consequently, setting #5 corresponding to about 22,000 rpm was chosen for preparation of both types of PVA-MPs. In case of PL as a stabilizer only a high dispersing energy corresponding to 25,000 rpm resulted in formation of microparticles in desired size range. Such different effects of poloxamer and polyvinylalcohol on particle size are also reported in the literature by different groups. Applying similar preparation techniques, particles using poloxamer 188 as stabilizer were bigger than those prepared with PVA even in the case of nanoparticles [19] and microparticles [18].

The different procedures yielded microparticles in the size range between 2.96 to 7.11 μm (Table 1). As described by Ratzinger et al [3, 27], spray-dried PLGA-particles are highly hydrophobic resulting in formation of aggregates upon dispersion and thus a broader size distribution. In an effort to limit the size distribution, the spray-dried particles were roughly fractionated by centrifugation yielding higher uniformity. In contrast, particles prepared by solvent evaporation were smaller with lower uniformity (Table 1) corresponding to a narrower size distribution. Among the microparticles prepared by solvent evaporation, PVA 4-88 as stabilizer (PVA 4-MPs) yielded the biggest particles that was followed by the order: poly(ethylene-alt-maleic acid) particles (PEMA-MPs) > Pluronic® F-68 particles (PL-MPs) > PVA 40-88 particles (PVA 40-MPs). Interestingly the size of PVA 4-

MPs exceeded that of PVA 40-MPs. This might be due to the high molecular weight and an approximately 2-fold higher viscosity of PVA 40-88 as compared to PVA 4-88, which provoked formation of tighter and smaller oily droplets during the second emulsification step and thus yielded smaller particles. SEM images (Figure 1) confirmed these results and displayed smooth particle surfaces.

Usually, the particle size determined by laser diffraction is presented as volume moment mean or De Broukerer mean diameter $D[4,3]$ relying on the volume as a basis for calculation the particle size [28]. However, for evaluation of the variation of ligand density at the surface due to different stabilizers, the surface area mean or Sauter mean diameter $D[3,2]$ is relevant, since it represents the particle distribution calculated from the surface area [28]. Interestingly, the spray-dried particles exhibited a difference of about $3.2\text{ }\mu\text{m}$ between $D[4,3]$ and $D[3,2]$. This indicates a broad size distribution with several big particles or aggregates larger than $4\text{ }\mu\text{m}$, which contribute essentially to $D[4,3]$. However, most of the batches contained particles around $4\text{ }\mu\text{m}$ contributing strongly to $D[3,2]$. This result was also confirmed by the uniformity values and SEM images (Figure 1A). Thus, the surface area of particles was meaningful for our purpose and $D[3,2]$ was used as diameter of different PLGA-microparticles for further discussion. Accordingly, the PLGA-microparticles either prepared by solvent evaporation or spray drying yielded a diameter around $3.5\text{ }\mu\text{m}$ in terms of the surface area mean (Table 1).

Quantification of immobilized wheat germ agglutinin on the surface of PLGA-microparticles

The amount of fluorescein-labeled wheat germ agglutinin (F-WGA) immobilized at the surface of PLGA-MPs was quantified fluorimetrically. In order to consider any loss of PLGA-particles during the process, the weight of the modified particles was also determined. The ratios between functionalized WGA and PLGA-particles on a weight basis (p [$\mu\text{g}/\text{mg}$]) are presented in Table 2. The spray-dried microparticles prepared without surfactant yielded the highest amount of WGA per particle, which was more than 2-fold higher than that of particles fabricated by solvent evaporation in presence of stabilizer. Among the particles prepared by the double emulsion technique, the weight ratios be-

tween WGA and PLGA-MPs followed the order: PVA 40-MPs > PEMA-MPs > PL-MPs > PVA 4-MPs. Such a weight-related ranking, however, is not reliable for comparison of the stabilizer induced variation of ligand density since the particles possess different size and consequently surface area.

Considering the surface area for calculation of the number of immobilized WGA molecules according to the equations given above revealed that again spray-dried particles contained the highest number of coupled lectin molecules (Table 2). Since the spray-dried particles are characterized by a high ratio p as well as a rather smaller total surface area, which both exert a positive effect on calculation of N_{WGA}/m^2 , undoubtedly an excellent coupling efficiency is obtained. However, since PEMA-MPs exceeded PVA 40-MPs, the order of stabilized particles varied now as follows: PEMA-MPs > PVA 40-MPs > PL-MPs > PVA 4-MPs. This alteration in coupling efficiency might be due to the difference in particle size corresponding to the total surface area. At a certain total weight of particles, a larger total surface area is associated with a smaller mean diameter of the particles. According to expression 1.7, the number of coupled lectin-molecules/ m^2 is proportional to p however inversely proportional to A_{total} . Therefore, although PVA 40-MPs exhibit a higher coupling ratio p , a lower number of WGA-molecules is immobilized at the surface due to a larger total surface area as compared with PEMA-MPs. Additionally, the difference between MPs prepared in presence and in absence of stabilizer increased concurrently. For instance, the ratio p of PEMA-MPs was 62% lower than that of sprayed-dried particles compared to 70% difference of the value N_{WGA}/m^2 . In case of PVA 40-MPs, the difference to surfactant-free particles was 65% for the ratio p and 74% for the value N_{WGA}/m^2 . This pronounced decrease in coupling efficiency of particles prepared by the solvent evaporation technique according to the calculation mode might again be due to the same reason as mentioned above.

For further refinement and reliability in describing the ligand density, the number of particles is taken into account. According to expression 1.8, the number of coupled WGA molecules each particle is strongly dependent on the number of MPs (N) of certain weight. Moreover, since all particles were made from PLGA, N is inversely proportional to the diameter r of the particles according to the expressions 1.2 - 1.4. Thus, it is con-

cluded that, the bigger the particles, the smaller is the N which vice versa means that a larger particle can bind more ligands than a smaller one. As expected, among all types of PLGA-MPs, spray-dried particles with the biggest mean diameter yielded the highest amount of WGA functionalized on their surface, whereas PVA 40-MPs possessing the smallest particle size exhibited the lowest lectin-density. Interestingly, although the size of PEMA-MPs was at the upper end of particles prepared by solvent evaporation, the lectin density per particle N_{WGA}/MP was the highest and about 20% higher than that of PVA 4-MPs with the largest mean diameter.

Among all types of particles, the spray-dried particles possessed the highest lectin density since surface exposed carboxylate groups of PLGA were not shielded by stabilizers and were freely accessible for activation and coupling. In case of solvent evaporation, however, stabilizers are necessary to prevent coalescence of the emulsion droplets. Adhesion at the particle surface or even incorporation nearby the surface might shield the carboxylic end groups of PLGA-chains and decrease the coupling efficiency. As reported by Scholes et al, PVA could not be completely removed even by repeated washings and they suggested physical incorporation of PVA into the nanoparticle surface due to hydrophobic interactions or hydrogen bonding [13]. Pluronic F-68[®] is triblock copolymer consisting of a hydrophobic poly (propylene glycol) (PPO) backbone grafted with two hydrophilic poly (ethylene glycol) (PEO) chains. The PEO chains protrude towards the aqueous medium, whereas the PPO moiety adsorbs at the hydrophobic surface of the particles [27, 29]. Depending on the amount of adsorbed Pluronic F-68[®], a 'mushroom-like' or 'brush-like' layer is formed [29] with 6 nm in thickness according to Backer et al [30] or >20 nm as reported by Santander-Ortega et al [31]. Thus, such a surfactant-layer limits access of carboxylic groups of PLGA and counteracts coupling efficiency. In contrast, PEMA offers additional reactive carboxylate groups instead of non-reactive hydroxyls in the case of PVA and Pluronic F-68[®]. Consequently, PEMA-MPs exhibited the highest ligand density of all particles prepared by solvent evaporation. Moreover, as reported by Keegan et al, the immobilized ligand still remains on the particle surface even after the release of encapsulated proteins. This supports the assumption that during bulk erosion of PLGA-MPs the particle surface is not destroyed immediately and the stabilizer conjugated ligands remain bioreactive at least for a certain period [20]. In accordance with Keegan et al. the

results reveal that the use of PEMA is a better choice for preparation of biodegradable particles with functionalized surface and high ligand density than the well-established stabilizers PVA and Pluronic®. Nevertheless, it should be considered that the number of coupled ligands on the surface of PEMA-MPs was about a fifth of surfactant-free particles, most likely due to the fact that only part of the carboxylic acid chains of PEMA is accessible for conjugation so that PEMA still exhibits a considerable blocking effect as compared to spray-dried particles. Contrariwise, particles prepared by spray-drying suffer from a broad size distribution, which requires size fractionation associated with low recovery. Additionally, different stabilizers can influence other particle characteristics such as size and biological properties. Particles prepared with PVA for stabilization are usually small and rather uniform in size [32]. Pluronic®-contained particulate carriers possess enhanced mucoadhesive properties [33] and can activate the complement system [34]. Thus, the preparation technique as well as the choice of stabilizer for a certain microparticulate drug delivery system strongly depends on the aim of application.

Evaluation of particle-cell interactions

In order to assess the relationship between WGA-density at the particle surface and bioadhesion, cytoadhesion studies using Caco-2 monolayers as an ex-vivo model were performed. For that purpose, the amount of cell-associated particles referring to the cell-bound RFI is given as percentage of the amount of added particles. After repeated washings the highest binding of microcarriers to the monolayer was observed in case of stabilizer free spray-dried microparticles amounting to $44 \pm 8.3 \%$ (Figure 2). In case of PEMA-MPs it roughly halved decreasing to $23 \pm 1.5 \%$. PVA 4-MPs revealed the lowest binding rate to the cell layer, whereas PL-MPs and PVA 40-MPs interacted with the cells to a similar extent. However it should be considered that cytoadhesion depends on both, number of conjugated lectin and the particle size. Generally, big particles possess a large surface area allowing immobilization of a higher number of cytoadhesive ligands and offer a larger contact area to the glycocalyx of the cells than smaller ones. Contrariwise, big particles need a higher coupling density to survive the strong shear stress during repeated washings. Consequently, comparing the WGA-density at the surface and the percentage of bound particles, PEMA-MPs bind strong enough to the cell surface to with-

stand detachment by washing. In case of spray dried MPs, a quite higher ligand density is required to remain attached. Although the lectin density of PVA 4-MPs is higher than that of PVA 40-MPs, lower cell-adhesion was observed. Probably the lectin-mediated interaction was too weak so that they were easily washed away. Interestingly, in case of PVA 40-MPs the amount of cell-bound microcarriers is higher than expected as indicated by the lectin-density. Probably, strong non-specific interactions contribute to binding rendering these particles problematic for targeting purposes. All in all, the cytoadhesion studies additionally confirm that PEMA is a stabilizer preferable for site specific micro-particles.

Conclusion

Targeted particulate drug delivery requires high ligand density at the surface to enable strong biorecognitive interactions with the intended site of action. Usually first the drug-loaded particles are prepared and their surface is decorated in a second step. Upon covalent immobilization of ligands using reactive groups of the matrix, spray drying is the method of first choice since no stabilizer is required and the particles offer the advantage of non-restricted access for modification provided that the particles do not agglomerate in aqueous dispersion. In case of high hydrophilicity or thermosensitivity of the payload such as drugs from the biotech pipeline, however, the double emulsion technique is an alternative preparation method. Basically, this technique requires stabilizers to yield particles but conversely functional groups are shielded resulting in reduced ligand density. In this study, the carboxylate-rich polymer PEMA was found to fulfill both tasks, sufficient stabilization and thus narrow size distribution of the particles as well as sufficient reactive moieties for functionalization with biorecognitive ligands. The ligand density significantly exceeded that of microparticles prepared with well-established PVA or Pluronic®. Although the minimum ligand density required to accomplish biorecognitive interactions is still unknown, PEMA is proposed as a useful stabilizer even for active targeting of particles.

Acknowledgement

The authors thank Stephan Harm (center for biomedical technology, faculty of health and medicine, Danube University Krems, Krems Austria) for performing SEM imaging and Dr. Frank von der Kammer (Department of Environmental Geosciences, Faculty of Earth Sciences, Geography and Astronomy, University of Vienna, Vienna, Austria) for help with particle size analysis by Mastersizer 2000.

References

- [1] O. M. Koo, I. Rubinstein, and H. Onyuksel, *Nanomedicine*, 1, 193, **(2005)**
- [2] I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, *Adv. Drug Delivery Rev.* 54, 631, **(2002)**
- [3] G. Ratzinger, X. WANG, M. Wirth, and F. Gabor, *J. Control. Release*, 147, 187 **(2010)**
- [4] G.S. Das, G.H.R. Rao, R.F. Wilson, and T. Chandy, *Drug Delivery* 7, 129, **(2000)**
- [5] E.G. De Galon, M.J. Blanco-Prieto, P. Ygartua, and S. Santoyo, *J. Control. Release* 75, 191, **(2001)**
- [6] R.M. Seguin, and N. Ferrari, *Expert Opin. Investig. Drugs* 18, 1505, **(2009)**
- [7] N. Csaba, A. Sanchez, and M.J. Alonso, *J. Control. Release* 113, 164, **(2006)**
- [8] T. Moritera, Y. Ogura, N. Yoshimura, Y. Honda, R. Wada, S. Hyon, and Y. Ikada, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33, 3125, **(1992)**
- [9] G. Ratzinger, P. Agrawal, W. Körner, J. Lonkai, H.M.H.F. Sanders, E. Terreno, M. Wirth, G.J. Strijkers, K. Nicolay, and F. Gabor, *Biomaterials* 31, 8716, **(2010)**
- [10] J.M. Anderson, and M.S. Shive, M.S., *Adv. Drug Delivery Rev.* 28, 5, **(1997)**
- [11] R.C. Mundargi, V.R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel, and T.M. Aminabhavi TM, *J. Control. Release* 125, 193, **(2008)**
- [12] R.A. Jain, *Biomaterials* 21, 2475, **(2000)**
- [13] P.D. Scholes, A.G.A. Coombes, L. Illum, S.S. Davis, J.F. Watts, C. Ustariz, M. Vert, and M.C. Davis, *Int. J. Pharm.* 59, 261, **(1999)**
- [14] S. Feng, and G. Huang, *J. Control. Release* 71, 53, **(2001)**
- [15] G.T. Hermanson, Editor, *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, San Diego, **(1996)**
- [16] P.A. McCarron, W.M. Marouf, R.F. Donnelly, and C.J. Scott, *Biomed. Mater. Res.* 87, 873, **(2008)**
- [17] J. Vanderwoort, and A. Ludwig, *Int. J. Pharm.* 238, 77, **(2002)**
- [18] T. Feczko, J. Toth, and J. Gyenis, *Colloid. Surface. A* 319, 188, **(2008)**
- [19] K.C. Song, H.S. Lee, I.Y. Choung, K.I. Cho, Y. Ahn, and E.J. Choi, *Colloid. Surface. A* 276, 162, **(2006)**
- [20] M.E. Keegan, J.L. Falcone, T.C. Leung, and W.M. Saltzman, *Macromolecules*, 37, 9779, **(2004)**
- [21] M.E. Keegan, S.M. Royce, T. Fahmy, and W.M. Saltzman, *J. Control. Release* 110, 572, **(2006)**
- [22] B.L. Rivas, S.A. Pooley, E. Pereira, E. Montoya, and R. Cid, *J. Appl. Polym. Sci.* 101, 2057, **(2006)**
- [23] C. Fillafer, G. Ratzinger, J. Neumann, Z. Guttenberg, S. Dissauer, I.K. Lichtscheidl, M. Wirth, F.

Gabor, and M.F. Schneider, Lab Chip 9, 2782, **(2009)**

[24] B. Ertl, F. Heigl, M. Wirth, and F. Gabor, J. Drug. Target. 8, 173, **(2000)**

[25] X.-Y. Wang, R. Kollar, M. Wirth, and F. Gabor, Int. J. Pharm. 436, 738, **(2012)**

[26] M.P. Desai, V. Labhasetwar, E. Walter, R.J. Levy, and G.L. Amidon, Pharm Res. 14, 1568, **(1997)**

[27] G. Ratzinger, U. Länger, L. Neutsch, F. Pittner, M. Wirth and F. Gabor, Langmuir 26, 1855 **(2010)**

[28] A. Rawle, *Basic principles of particle size analysis*, Malvern Instruments Limited, Worcestershire, UK. from www.malvern.co.uk

[29] J.-T. Li, K. Caldwell, and N. Rapoport, Langmuir 10, 4475, **(1994)**

[30] J. A. Baker, and J. C. Berg, Langmuir 4, 1055, **(1988)**

[31] M.J. Santander-Ortega, A.B. Jodar-Reyes, N. Csaba, D. Bastos-Gonzalez, and J.L. Ortega-Vinuesa, Colloid Interface Sci. 302, 522, **(2006)**

[32] J. Panyam, and V. Labhasetwar, Adv. Drug Deliver. Rev. 55, 329, **(2003)**

[33] A. Zimmer, P. Chetoni, M. Saettone, H. Zerbe, and J. Kreuter, J. Control. Release, 33, 31, **(1995)**

[34] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, C. M. Dadswell, S. Savay, C. R. Alving, and J. Szebeni, Biochimica et Biophysica, 1689, 103, **(2004)**

PLGA-microparticles	Type of surfactants as stabilizers	Molecular weight of surfactant	Preparation technique	D [4,3] Volume moment mean (μm)	D [3, 2] Surface area mean (μm)	Uniformity
PEMA-MPs	poly(ethylene-alt-maleic acid) (PEMA)	100000 - 500000	(w/o)w double emulsion Sonifier with intensity 40%	4.7 ± 0.01	3.2 ± 0.01	0.46
PL-MPs	Pluronic® F-68 (poloxamer 188)	8350	(w/o)w double emulsion ULTRA-TURAXX® #6	3.8 ± 0.08	2.9 ± 0.08	0.40
PVA 40-MPs	polyvinylalcohol (PVA) 40-88	205000	(w/o)w double emulsion ULTRA-TURAXX® #5	2.9 ± 0.01	2.2 ± 0.01	0.47
PVA 4-MPs	polyvinylalcohol (PVA) 4-88	31000	(w/o)w double emulsion ULTRA-TURAXX® #5	5.6 ± 0.01	3.4 ± 0.01	0.51
spray-dried MPs	-	-	Spray drying	7.1 ± 0.02	3.9 ± 0.01	0.73

Table 1. Characteristics of the PLGA-microparticles prepared by different methods.

PLGA-microparticles	Particle surface area (m ² /mg) (A _{total})	µg WGA/ mg PLGA-MPs (p)(%) ^a	number of WGA- molecule/m ² (N _{WGA/m²})(%) ^a	number of WGA- molecule each PLGA-MP (N _{WGA/MP})(%) ^a
PEMA-MPs	1.4x10 ⁻³	0.6±0.02 (38%)	6.4x10 ¹⁵ (30%)	2.2x10 ⁵ (21%)
PL-MPs	1.6x10 ⁻³	0.5±0.01 (35%)	5.5x10 ¹⁵ (26%)	1.4x10 ⁵ (13%)
PVA 40-MPs	2.1x10 ⁻³	0.7±0.01 (47%)	5.6x10 ¹⁵ (27%)	0.8x10 ⁵ (8%)
PVA 4-MPs	1.4x10 ⁻³	0.4±0.01 (30%)	5.3x10 ¹⁵ (25%)	1.8x10 ⁵ (17%)
spray-dried MPs	1.2x10 ⁻³	1.5±0.01 (100%)	20.9x10 ¹⁵ (100%)	10.4x10 ⁵ (100%)

Table 2. Characteristics of the fluorescence-labeled wheat germ agglutinin (WGA) functionalized PLGA-microparticles.

^a presented in % related to covalent coupling in the absence of stabilizer by spray drying

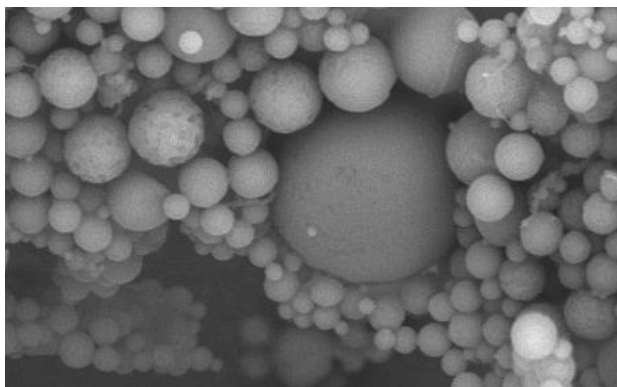


Image A (5 μ m)

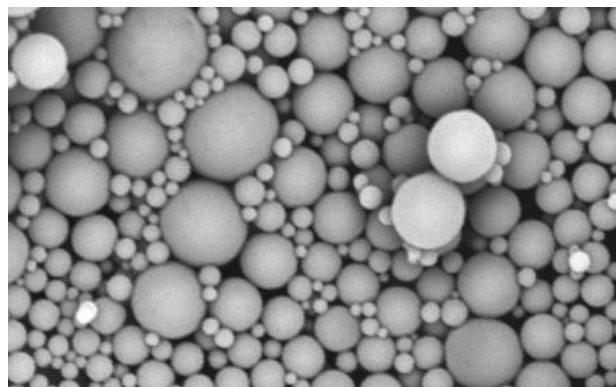


Image B (5 μ m)

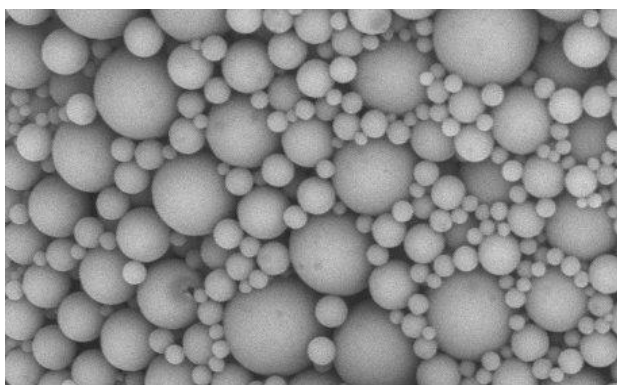


Image C (5 μ m)

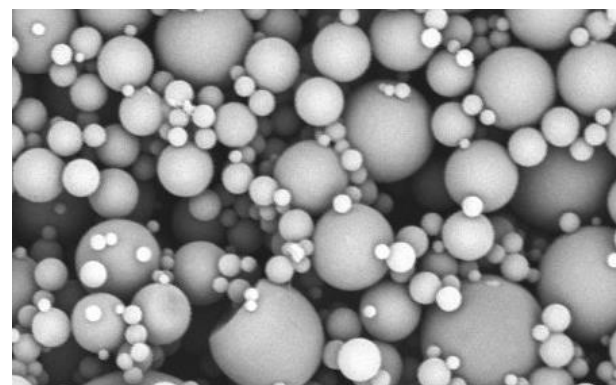


Image D (5 μ m)

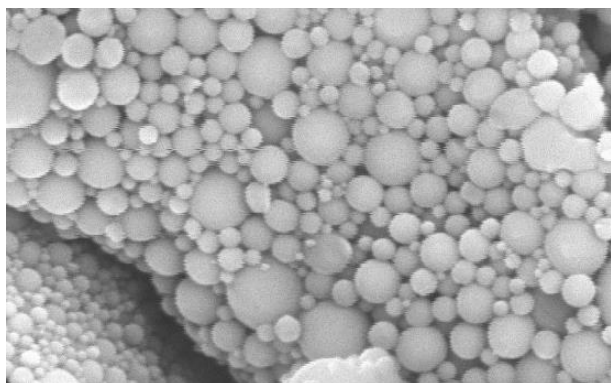


Image E (2 μ m)

Figure 1. Scanning electron microscopic images of PLGA-microparticles prepared using spray drying technique after size-fractionation (A), double-emulsion solvent evaporation technique using PEMA (B), Pluronic® F-68 (C), PVA 40-88 (D) and PVA 4-88 (E) as stabilizer.

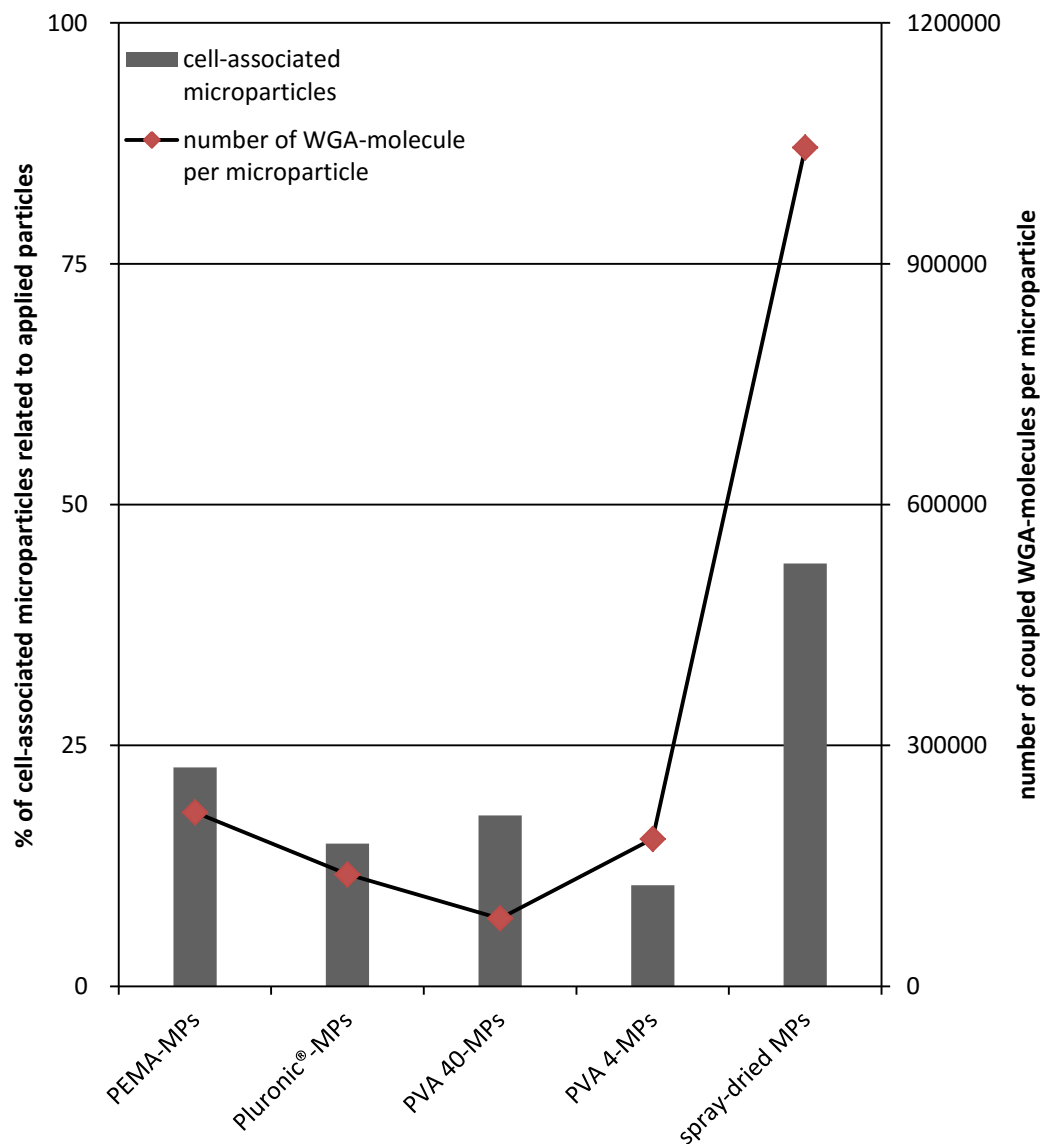


Figure 2. Cytoadhesion studies of fluorescein-labeled wheat germ agglutinin functionalized PLGA-microparticles with Caco-2 monolayers. After 30 min incubation at 4°C and removal of unbound particles, the amount of cell-associated microparticles was determined fluorimetrically. The grey columns refer to the y-axis at the left representing the percentage of the amount of cell-associated particles related to the amount of applied microparticles. The diamonds refer to the y-axis at the right representing the number of coupled WGA-molecules per microparticle. The significant difference of the percentage of cell-associated microparticles related to applied particles between PEMA-MPs ($p < 0.05$) and other particles is marked with an asterisk; as well as marked with double asterisks in the case of PVA 4-MPs ($p < 0.01$). ($n=4$, mean $\pm$ SD).

4 Zusammenfassung

Ein Problem vieler verabreichter Medikamente liegt darin, dass sie nicht direkt an ihrem Resorptionsort gelangen und somit keine gezielte Wirkung hervorrufen können, manchmal sogar unerwünschte oder toxische Wirkungen. Durch Oberflächenmodifikation von Mikropartikeln mit biorekognitiven Liganden wie Weizenlektin ist es möglich, Arzneimittel möglichst nahe und spezifisch zum Resorptionsort zu transportieren. Dies würde letztlich eine erhöhte Wirksamkeit bei reduzierter Dosis mit folglich weniger Nebenwirkungen für den Patienten bewirken [1, 2]. Bei der Herstellung von Mikropartikeln ist der Zusatz von Stabilisatoren notwendig, um einerseits eine Aggregation zu verhindern. Andererseits sind diese Stabilisatoren an der Partikeloberfläche angelagert und könnten so die Ligandendichte und damit die Biorekognition einschränken. Um den Einfluss der Stabilisatoren wie PEMA (Poly(ethylen-alt-maleinsäure)), Pluronic® F-68 (Poloxamer 188) und PVA (Polyvinylalkohol) auf die Ligandendichte zu untersuchen, wurde die Energiezufuhr während der Herstellung so modifiziert, dass man letztendlich Partikel mit einer vergleichbaren Oberfläche von etwa $38 \mu\text{m}^2$ erhielt. Das cytoadhesive, fluoreszenzmarkierte Weizenkeimagglutinin (F-WGA) wurde mit Hilfe der Carbodiimid-Methode kovalent an die Carboxylatgruppen der PLGA Mikropartikel gekoppelt. Die an Hand der Fluoreszenzintensität bestimmte Anzahl der immobilisierten Ligandenmoleküle pro Mikropartikel entsprach der Reihenfolge PEMA (21%) > PVA 4 kDa (17%) > PL (13%) > PVA 40 kDa (8%) im Vergleich zu den sprühgetrockneten PLGA Partikeln ohne Tensid-Zusatz (100%). Cytoadhesions-Studien mit Caco-2-Monolayern, bestätigten den Erhalt der Biorekognition trotz chemischer Umsetzung. Dabei entsprach die Zellbindungsrate der oben angeführten Reihenfolge mit Ausnahme der beiden PVA Typen, die ihre Plätze tauschten. Generell ist PEMA ein geeigneter Stabilisator und den häufig eingesetzten Tensiden PVA und Pluronic® vorzuziehen. PEMA bietet neben ausreichender ionischer und sterischer Stabilisierung der Partikel, zusätzliche Carboxylatgruppen, die sowohl eine höhere Ligandendichte erlauben als auch eine damit verbundene verbesserte Verankerung der Arzneiform im Zielgewebe.

4.1 Abstract – deutsche und englische Version

Das Ziel der Arbeit war, mittels optimierter Herstellungsverfahren Poly-(D, L-Milchsäure-co-Glykolsäure)-Mikropartikel in einem vergleichbaren Größenbereich unter Einsatz verschiedener Tenside (Pluronic® F-68, PVA 4kDA, 40kDA und PEMA), als Stabilisatoren, herzustellen und deren Einfluss auf die Ligandendichte an der Partikeloberfläche an Hand von fluoreszierendem WGA (Weizenkeimagglutinin) zu untersuchen. Methoden: Sowohl sprühgetrocknete PLGA-Partikel ohne Tensid-Zusatz als auch Partikel, die in Gegenwart der Tenside nach der Lösungsmittelverdampfungs-Technik hergestellt wurden, wurden mit F-WGA mittels Carbodiimid funktionalisiert. Die Ligandendichte wurde aus der durchschnittlichen Oberfläche [D 3.2] und der Fluoreszenzintensität von immobilisiertem F-WGA ermittelt. Die Zellbindungsrate und die Erhaltung der biologischen Aktivität des Lektins wurden in Caco-2-Bindungsstudien untersucht. Ergebnisse: Die Anzahl der immobilisierten Ligandenmoleküle pro Mikropartikel war bei PEMA (21%) als Stabilisator am höchsten, gefolgt von PVA 4kDA (17%), PL (13%) und PVA 40kDA (8%) im Vergleich zu sprühgetrockneten PLGA-Partikeln ohne Tensid (100%). Die Cytoadhäsions-Studien ergaben ein ähnliches Resultat mit dem Unterschied, dass beide PVA-Typen ihre Plätze tauschten.

The aim of this work was to prepare (poly (D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA)-microparticles within a similar size range of 3, 5 μm by optimization of the manufacturing parameters in presence of surfactants such as Pluronic® F-68, PVA 4kDa, 40kDa and PEMA as stabilizers. Using fluorescein-labeled wheat germ agglutinin (F-WGA) as a ligand for surface decoration of the microparticles, the influence of the stabilizers on ligand density and biorecognition was elucidated. Methods: Both, spray-dried PLGA particles without any surfactant and particles prepared in presence of stabilizers by the solvent evaporation were functionalized with F-WGA using the carbodiimide-method. The ligand density was calculated from the surface area mean [D 3.2] and the fluorescence intensity of F-WGA. Cell-binding and biological activity were assessed by Caco-2 binding studies.

Results: The number of immobilized ligand molecules per microparticle in the presence of stabilizers was highest in case of PEMA (21%) followed by PVA 4kDa (17%) and PL (13%) and finally PVA 40kDa (8%), as compared with the spray-dried PLGA particles in absence of surfactants (100%). Cytoadhesion studies with Caco-2 monolayers yielded similar results except that both types of PVA exchanged their ranking.

References:

- [1] O. M. Koo, I. Rubinstein, and H. Onyuksel, *Nanomedicine*, 1, 193, **(2005)**
- [2] I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, *Adv. Drug Delivery Rev.* 54, 631, **(2002)**