

Diss. ETH Nr. 12007

**Biodegradable Polyester Microspheres for Sustained Protein  
Delivery: Development and Potential of the Coacervate  
Encapsulation Process**

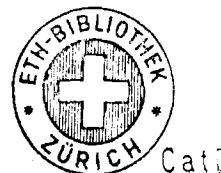
**A dissertation  
submitted to the**

**Swiss Federal Institute of Technology  
Zurich**

For the degree of  
Doctor of Natural Sciences

Presented by  
**Claudio Antona Thomasin**  
Pharmacist  
born May 24th, 1962  
from Tinizong GR

Accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. H.P. Merkle, examiner  
Dr. B. Gander, co-examiner  
Prof. Dr. E. Doelker, co-examiner  
Prof. Dr. R. Bodmeier, co-examiner



Zurich, 1997

## Abstract

Recent developments in biotechnology have made available highly potent protein and peptide drugs. These compounds exhibit particular properties (solubility, physical and chemical stability, biological half-time) requiring new strategies in application techniques and drug delivery. Presently, most of these compounds are administered parenterally. Due to their short biological half-life, however, the biological effect is often compromised. Therefore, parenteral drug delivery systems such as biodegradable microspheres or implants are intensively investigated. Such systems were designed to release the incorporated compound in a controlled way over a period varying between one week and several months.

This thesis focused on the microencapsulation of the model protein bovine serum albumin [BSA] and of immunologically relevant antigens into biodegradable polyesters. For the long term delivery of peptide and protein based vaccines, a pulsatile release profile may be most desirable. It was assumed, that pulsatile release kinetics could possibly mimic the booster shots necessary with the conventional vaccine schedules. Microencapsulation of antigens into biodegradable poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) should provide a pulsatile release profile over a period of several months. Thus, important physico-chemical and technological aspects of peptide and protein microencapsulation by the so called coacervation technology were investigated.

The first chapter summarizes the most relevant studies on the coacervation of biodegradable polyesters with respect to physico-chemical and manufacturing parameters. This review revealed that most approaches for optimizing microencapsulation were mainly empirical. Therefore, well-known thermodynamic models for polymer solutions were outlined to improve our understanding of the coacervation process. Using interaction parameters (Flory, Hildebrand, Drago, H $\delta$ ) and interfacial properties (Van Oss) we developed strategies to optimize the coacervation technique.

The experimental chapters (II-V) characterize the PLA/PLGA coacervation process and its impact on protein microencapsulation and on the properties of the final product. Chapter II compares experimentally determined polymer solubility characteristics with those theoretically expected. Moreover, coacervation induced by addition of silicon oil [PDMS] was followed microscopically, and the different stages and phases examined for their solvent/non-solvent content, their volume, viscosity and solubility parameters. Polymer type, molecular weight and related hydrophobicity had a marked effect on the coacervation process. In thermodynamic terms (chapter I), PDMS induced phase separation of PLA/PLGA could be described best by a polymer incompatibility mechanism. Finally, gas chromatographic analysis revealed that the solvent/coacervating agent ratio was crucial for the amount of residual solvent and hardening agent [octamethylcyclotetrasiloxane, OMCTS] in the microspheres.

Interfacial tension characteristics necessary for protein entrapment were investigated by tensiometric methods using both, solid and aqueous BSA. Minimizing the interfacial free energy was recognized as essential driving force for drug engulfment. Drug entrapment by the coacervate phase required a coacervate/protein affinity dominating over that of continuous phase/protein. Furthermore, the ratio of coacervate droplet over powder particle size, the nominal drug loading and the viscosity of the polymer solution were additional parameters considered. In terms of actual drug loading, microencapsulation of aqueous BSA was less effective than entrapment of micronized protein powders. However, burst release from microspheres loaded with aqueous BSA was easier to control. The microencapsulation process was also highly influenced by the solvent/coacervating agent ratio, the viscosity of the coacervating agent and the volume of protein solution. Further, more hydrophilic copolymers entrapped aqueous BSA to a higher extent and released a lower amount of drug during the first 24 h than the hydrophobic PLA. Finally, SEM-micrographs demonstrated the importance of moderate and controlled drying to minimize surface porosity.

Generally, coacervation was recognized as a complex manufacturing technique sensitive to a variety of parameters influencing the product properties.

In parallel to the experiments using BSA, the feasibility and potential of microencapsulation of antigens such as tetanus toxoid [Ttxd] and a weakly immunogenic synthetic branched malaria peptide [P30B2] were studied (chapter IV). For this type of antigen delivery system, drug release over a time period of 4-6 months was envisaged. Polymers suitable for this purpose were defined by *in vitro* degradation studies using size exclusion chromatography. A mixture of microspheres made with high molecular weight PLA and low molecular weight PLGA 75:25 and PLGA 50:50 and having particle sizes of 1-5, 10-30, and 10-60  $\mu\text{m}$ , gave pulsatile *in vitro* release for both antigens. The release kinetics correlated well with the degradation pattern of the three polymers. More specifically, antigen release was biphasic showing an initial burst followed by a polymer specific lag time with limited drug release. An additional pulse was observed towards the end of polymer degradation. In immunization experiments in mice, long lasting high antibody titers were obtained after single subcutaneous administration of antigen containing microspheres, as compared to Ttxd adsorbed on alum or to P30B2 in Incomplete Freund's Adjuvant. Moreover, the immune responses induced by microspheres were clearly influenced by the antigen release kinetics, the polymer type and the microsphere size. The results demonstrated the immunopotentiating properties of biodegradable microspheres and their potential to elicit long-lasting immune responses after single administration when tailoring *in vitro* release characteristics and particle size.

Safety of the microsphere product was a final and very important aspect of this work. For microspheres prepared by coacervation, residual solvents are of major concern. A decrease of residual DCM, EtAc, OMCTS and hexane was achieved by applying controlled drying conditions. Drying at a temperature close to the polymer glass transition temperature,  $T_g$ , was a prerequisite for controlling the amount of residuals. Drying at 40 °C decreased the residual polymer solvents

DCM to < 100 ppm and EtAc to < 4 %. By contrast, the residual hardening agents (OMCTS, hexane) were only slightly affected by an increased drying temperature, which was due to the very restricted diffusion capability of non-solvents across the polymer matrix. Finally, <sup>1</sup>H-NMR and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to monitor residual PDMS in microspheres (< 5000 ppm).

These experimental studies showed the potential of the coacervation technology for peptide and protein microencapsulation provided the relevant process parameters can be controlled. Nonetheless, the interfacial properties must be known for predicting successful microencapsulation. Furthermore, the quality of microspheres prepared by coacervation may suffer from substantial amounts of residual solvents. For this reason, the conclusive remarks (chapter VI) focus on thermodynamic strategies to develop and optimize biocompatible coacervation systems. Although the final results from this ongoing study are not yet fully available, preliminary data revealed the potential of these toxicologically acceptable solvents for the design of a highly biocompatible coacervation system. The solvents used in this study showed either poor or strong hydrogen bonding capacity. The alternative coacervation systems tested produced microspheres with particle size, loading efficiency and burst release properties comparable to the conventional system (DCM, PDMS and OMCTS or hexane).

## Zusammenfassung

Biotechnologische Prozesse eröffnen seit kurzem vielversprechende Möglichkeiten, um hochwirksame Arzneistoffe auf Protein- und Peptid-Basis zu gewinnen. Diese Verbindungen bedürfen aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften (Löslichkeit, physikalische und chemische Stabilität, biologische Halbwertszeit) neuer Applikations- und Freigabesysteme. Zur Zeit werden die meisten Peptid/Protein-Arzneistoffe hauptsächlich parenteral verabreicht. Wegen ihrer im allgemeinen kurzen biologischen Halbwertszeit lässt sich in der Regel jedoch nur eine kurzanhaltende Wirkung erzielen. Recht intensiv werden deshalb parenteral verabreichbare Freigabesysteme wie bioabbaubare Mikrosphären oder Implantate entwickelt, die eine Wirkstofffreigabe über eine Woche bis drei oder mehr Monate ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns mit der Mikroverkapselung des Modellproteins Rinderserumalbumin [BSA] und immunologisch relevanter Antigene in bioabbaubare Polyester befasst. Für Peptid- und Proteinantigene, die parenteral als Impfstoffe eingesetzt werden sollen, wird zusätzlich zur Langzeitfreigabe ein pulsatile Freigabeprofil gewünscht. Es wird angenommen, dass eine derartige Antigenfreigabe die sogenannten 'Booster'-Dosen imitieren könnte, die nach konventionellen Impfschemen verabreicht werden müssen. Durch Mikroverkapselung von Antigenen in biodegradierbare Polyester vom Typ der Poly(milchsäure) [PLA] und der Poly(milch-co-glykolsäure) [PLGA] erhoffte man sich, ein pulsatile Freigabeprofil über einen Zeitraum von mehreren Monaten zu erzielen. Diese Arbeit beschäftigte sich deshalb eingehend mit technologischen und physikalisch-chemischen Aspekten der Peptid/Protein-Mikroverkapselung, die bei der Entwicklung gesteuerter Freigabesysteme von Bedeutung sind. Insbesondere wurde auf die Möglichkeiten und Grenzen der sogenannten Koazervationstechnologie eingegangen.

Das erste Kapitel fasst die wichtigsten Arbeiten der Mikroverkapselung von Peptiden/Proteinen in biodegradierbare Polyester mittels Koazervation

zusammen. Physico-chemische und technologische Aspekte, die diesen Untersuchungen zugrunde liegen, wurden beleuchtet. Im Gegensatz zu den heute noch vorwiegend empirischen Methoden, wurden in diesem Kapitel vor allem thermodynamische Gesichtspunkte angesprochen, mit deren Hilfe die Vorgänge während der Koazervation besser verstanden und gesteuert werden sollten. Mit Hilfe von Interaktionsparametern (Flory, Hildebrand, Drago, Hô) und Grenzflächeneigenschaften (Van Oss) wurden Strategien dargelegt, die zur Optimierung der Koazervationstechnologie beitragen können. Löslichkeitsparameter und Oberflächenspannungswerte der beteiligten Komponenten (Polymer, Lösungsmittel, Koazervationsmittel) erwiesen sich als hilfreiche Instrumente, um die Funktionalität eines Koazervationssystems abzuschätzen.

Die experimentellen Kapitel (II-V) dieser Doktorarbeit beschreiben Koazervationseigenschaften bioabbaubarer Polyester und deren Auswirkungen auf die Mikroverkapselung von Proteinen und die Qualität der Mikropartikel. Im Kapitel II wurde das Löslichkeitsverhalten der Polymere mittels theoretischer Berechnungen und experimenteller Versuche dargelegt. Der Koazervationsverlauf von PLA und PLGA nach Zugabe von Silikonöl [PDMS] wurde mikroskopisch charakterisiert, und die auftretenden Phasen wurden bezüglich Gehalt an Dichlormethan [DCM], PLA und PDMS, Volumen, Viskosität und Löslichkeitsparameter untersucht. Es zeigte sich, dass Molekulargewicht und Polymertyp und, damit verbunden, das Ausmass der Hydrophobie starken Einfluss auf den Verlauf der Phasentrennung nehmen. Gestützt auf thermodynamische Grundlagen (Kapitel I) wurde gezeigt, dass die durch PDMS induzierte Koazervation von PLA/PLGA thermodynamisch aufgrund einer Inkompatibilität zwischen den beiden Polymeren zustandekommt. Gaschromatographische Untersuchungen zeigten zudem auf, dass das Verhältnis von Lösungsmittel und Koazervationsmittel entscheidenden Einfluss auf den Restgehalt an Lösungs- und Härtungsmittel [Octamethylcyclotetrasiloxan, OMCTS] in den Mikrosphären nimmt.

Die grenzflächenspezifischen Bedingungen für die Mikroverkapselung von Protein-Feststoffen und wässrigen Proteinlösungen wurden tensiometrisch am Beispiel von Rinderserumalbumin [BSA] erarbeitet (Kapitel III). Die treibende Kraft zur Proteinhüllung ist dabei die Minimierung der freien Grenzflächenenergie, wobei die für eine erfolgreiche Verkapselung erforderliche Affinität zwischen Koazervatphase und Kernmaterial (Proteinfeststoff oder Proteinlösung) jene zwischen der Gleichgewichtsphase und dem Kernmaterial übertreffen muss. Die Grenzflächenspannung dient dabei als geeignetes Mass für diese Affinitätscharakterisierung. Für den Einbau von Feststoffen wurden als weitere bestimmende Grössen das Verhältnis der Koazervattropfen- zur Proteinkorngrösse, der Beladungsgrad und die Viskosität der Polymerlösung beschrieben. Bei der Mikroverkapselung wässriger Proteinlösungen zeigte sich, dass die erzielte Beladungseffizienz zwar tiefer, der nach 24 h freigewordene Anteil (burst release) hingegen besser kontrollierbar war als bei der Feststoffverkapselung. Wichtige Einflussparameter der Flüssigverkapselung waren wiederum das Verhältnis zwischen Lösungs- und Koazervationsmittel, die Viskosität des Koazervationsmittels und das eingesetzte Volumen an Proteinlösung. Weiterhin erlaubten die hydrophileren Copolymere eine höhere Beladung und wiesen eine geringere 'burst'-Freigabe auf als die Homopolymere. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten zudem die Wichtigkeit eines milden und gut definierten Trocknungsvorganges, um die Oberflächenporosität der beladenen Partikel zu minimieren. Generell erwies sich die Koazervationstechnologie als ein schwierig zu kontrollierender Prozess, da eine Vielzahl von Parametern die Produktqualität mitbeeinflussen.

Parallel zu den Mikroverkapselungsuntersuchungen mit dem Modellprotein BSA wurde das Potential von biodegradierbaren Mikropartikeln als Impfstoffträger am Beispiel von Tetanus Toxoid [Ttxd] und eines synthetischen multiplen Malariaantigens [P30B2] betrachtet (Kapitel IV). Durch Untersuchungen der Abbaukinetik mittels Gelpermeationschromatographie wurden geeignete Polymere für ein 4-6 monatiges Freigabesystem ermittelt. Eine



Kombination von hochmolekularem PLA und niedrigmolekularen PLGA 75:25 und PLGA 50:50, sowie die Verwendung definierter Korngrössen im Bereich von 1-5  $\mu\text{m}$ , 10-30  $\mu\text{m}$  und 10-60  $\mu\text{m}$  ergaben *in vitro* eine pulsatile Freisetzung beider Antigene. Die Freigabedaten zeigten eine gute Korrelation mit den Abbaudaten der verwendeten Polymere. Generell erfolgte die Antigenfreisetzung zweiphasig, wobei auf eine initiale Freigabe innerhalb der ersten 24 h eine polymerspezifische Lag-Phase mit sehr geringer Wirkstofffreisetzung folgte. Ein deutlicher Anstieg der Freigabegeschwindigkeit wurde wiederum gegen Ende des Polymerabbaus festgestellt. Versuche an Mäusen unterstrichen die Effizienz der Formulierungen *in vivo*, indem im Vergleich zu Aluminiumadsorbaten (für Ttxd) bzw. zu Inkomplettem Freund's Adjuvans (für P30B2) höhere und länger anhaltende Antikörpertiter erreicht wurden.

Ein wichtige Zielsetzung dieser Arbeit bestand schliesslich darin, das bisher verwendete Koazervationssystem hinsichtlich seiner toxikologischen Eigenschaften zu untersuchen und Verbesserungsvorschläge zu erarbeiten. Der Schwerpunkt wurde in einem ersten Schritt auf die Minimierung der Restlösungsmittel DCM, OMCTS und Hexan gelegt, wobei insbesondere der Einfluss definierter Trocknungsbedingungen auf den Restlösungsmittelgehalt analysiert wurde (Kapitel V). Dabei erwies sich die Glasübergangstemperatur des Polymers als bestimmende Grösse für den Restgehalt an Polymerlösungsmittel. Eine signifikante Verminderung des Restgehaltes an DCM (< 100 ppm) und Ethylacetat (< 4 %) konnte nur bei einer Temperatur von 40 °C, d.h. in der Nähe des Glasüberganges von PLA erzielt werden. Erwartungsgemäss liess sich der Restgehalt an Härtungsmittel (0.5-5 %) durch die Trocknungstemperatur nicht wesentlich beeinflussen, was auf das sehr geringe Diffusionsvermögen der Nicht-Lösungsmittel in der Polymermatrix zurückzuführen ist. NMR-Untersuchungen und Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie [FTIR] ergaben zudem, dass auch Silikonöl, allerdings nur in relativ geringem Anteil (< 5000 ppm), in den Mikropartikeln verbleibt.

Die experimentellen Arbeiten zeigten, dass die Koazervationstechnologie für die Mikroverkapselung von Peptiden und Proteinen grundsätzlich gut geeignet ist, sofern die prozessrelevanten Parameter bekannt und kontrollierbar sind. Als Nachteil ergab sich, dass Voraussagen über eine erfolgreiche Verkapselung nur in Kenntnis des Grenzflächenverhaltens möglich sind. Das Verfahren ist zudem wegen der Belastung der Mikropartikel mit Restlösungsmittel limitiert.

Als Konsequenz dieser Ergebnisse enthalten die abschliessenden Schlussfolgerungen thermodynamische Überlegungen, die einen Weg zu neuen biokompatiblen Koazervationssystemen aufzeigen könnten (Kapitel VI). Die unvollständigen und deshalb noch unveröffentlichten Untersuchungen ergaben erste Hinweise, dass PLA/PLGA mit alternativen, toxikologisch besser verträglicheren Flüssigkeiten koazerviert und gehärtet werden können. Die dafür eingesetzten, neuen Koazervations- und Härtungsmittel zeigten einerseits hohe, andererseits schwache Kapazität für Wasserstoffbrückenbindungen. Die Qualität der mit Hilfe alternativer Lösungsmittel-Komponenten hergestellten Mikrosphären war bezüglich Partikelgrösse, Verkapselungseffizienz und 'burst'-Freigabe vergleichbar mit jener, die mittels konventionellem Verfahren (DCM, PDMS und OMCTS oder Hexan) erreicht werden konnte.