ETH zürich

ETH Library

Single-dose vaccines on engineering and quality assessment of PLA/PLGA microsphere based vaccines

Doctoral Thesis

Author(s):
Johansen, Pal

Publication date:
1998

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-002073845

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

ETH Dissertation No. 12764

SINGLE-DOSE VACCINES

on engineering and quality assessment of PLA/PLGA microsphere based vaccines

Dissertation ETH Zurich

submitted for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Pål Johansen

M.Sc. Pharm.
born March 28th, 1967
VEGA, Norway

Accepted on the recommendation of

Prof. Hans P. Merkle, ETH Zurich, referee
Dr. Bruno Gander, ETH Zurich, co-referee
Dr. Reinhard Glück, Swiss Serum & Vaccine Institute, Bern, co-referee
Prof. Steven P. Schwendeman, Ohio State University, Columbus, co-referee

Zurich, 31.7.1998

Summary

Single-Dose Diphtheria and Tetanus Vaccines

Tetanus (Ttxd) and diphtheria (Dtxd) toxoids encapsulated in polyester microspheres (MS) for single injection immunisation have so far given pulsatile *in vitro* release and strong immune response in animals, but no boosting effect. This has been ascribed to insufficient toxoid stability within the MS exposed to *in vivo* conditions over a prolonged time period. The effect of *co*-encapsulated putative stabilising additives on encapsulation, release and stability of two different Ttxd and one Dtxd preparations was therefore examined in microspheres based on poly(d,l-lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) and poly(d,l-lactic acid) (PLA). Further, we investigated the influence of polymer hydrophobicity of commercially available and novel more hydrophobic polymers on encapsulation and burst release of the toxoids from MS prepared by spray-drying and coacervation. For this purpose fluorimetry, ELISA and HPLC were used. Finally, candidate tetanus vaccines were tested in mice for immune response.

The *co*-encapsulated stabilisers influenced significantly the entrapment of Dtxd and Ttxd in PLA/PLGA MS. *Co*-encapsulation of albumin, trehalose and γ-hydroxypropyl-cyclodextrin all improved the Ttxd encapsulation efficiency in spray-dried PLGA MS. Albumin increased the encapsulation efficiency of antigenic Ttxd by one to two orders of magnitude. Furthermore, with albumin or a mixture of albumin and trehalose ELISA responsive Ttxd was released over 1-2 months following a pulsatile pattern. For Dtxd, albumin or trehalose decreased the amount of toxoid entrapped in spray-dried MS, whereas albumin increased the entrapment in coacervated MS. Moreover, the entrapment of Dtxd decreased as a function of polymer hydrophobicity in spray-dried MS. Without additives, approx. 64, 43 and 16% entrapment efficiency was obtained for PLGA 50:50, PLGA 75:25 and PLA (approx. 15 kDa), respectively. Modified PLAs, carrying stearyl end-groups were only processed by coacervation. Satisfactory entrapment of Dtxd of between 30 and 60% was obtained. Here, albumin was a prerequisite for toxoid encapsulation, as albumin-free formulations produced strong toxoid precipitation. Furthermore, protein burst release increased with the more hydrophobic polymers, with Dtxd, Ttxd and the *co*-encapsulated albumin following a similar release pattern and magnitude. These investigations also revealed that entrapment estimation methods (extraction or polymer hydrolysis) as well as analytical methods (HPLC or ELISA) strongly influenced the determined amount of encapsulated toxoid and albumin.

Antibody responses were analysed after immunisation of mice with Ttxd microencapsulated in the presence of additives. Immunisation gave rise to higher responses than those obtained in the absence of additive. Albumin, trehalose, γ-hydroxypropylcyclodextrin and calcium salts preserved the immunogenicity of the incorporated antigen with the highest efficacy. Sustained responses were obtained with mixtures of fast and slowly releasing MS containing albumin plus trehalose or calcium salts. The selected additives may stabilise the antigen in MS during storage and rehydration in body fluids. Regulated antigen release from MS-based vaccines permits a reduction of the antigen dose and optimisation of single-dose vaccine formulations.

Further, we investigated the influence of polymer type and *co*-encapsulated excipients on Dtxd immunogenicity in guinea pigs. Guinea pigs immunised with Dtxd encapsulated into hydrophilic polymers exhibited specific antibody responses over 40 weeks that were comparable to the responses to aluminium adsorbed toxoid. In contrast, none or very low antibody

responses were determined after immunisation with MS of hydrophobic polymers. All MS formulations designed to provide both priming plus boosting doses elicited protective antibody responses 40 weeks post immunisation.

PHYSICO-CHEMICAL AND ANTIGENIC STABILITY

Physico-chemical, antigenic and immunogenic properties may be altered during microencapsulation of antigens and their release from PLA/PLGA MS. Here, the physico-chemical, conformational and antigenic stability of Ttxd and Dtxd was studied in aqueous solutions stressed by elevated temperature and the presence of lactic and glycolic acids. Further, the stabilising effect of albumin was investigated. The analytical tools used were fluorimetry, CD-spectroscopy, turbidimetry, electrophoresis and ELISA. Elevated temperatures altered the physico-chemical and antigenic properties of the toxoids to a greater extent than did the acids (50 mM). Substantial unfolding and chemical changes of tryptophan were observed upon 1 - 4 weeks of incubation at 60°C. At 4°C, only minor conformational changes were observed, even in the presence of the acids. Furthermore, 40% of the Ttxd antigenicity was lost after 7 days at 37°C. This loss increased in the presence of the acids. At 60°C, the antigenicity had completely vanished. Very importantly, 0.5% albumin preserved the tetanus antigenicity over 6 weeks incubation at 37°C, regardless of the presence of glycolic acid.

ANTIGEN RELEASE SET-UP ASSESSMENT AND SURFACE ADSORPTION

The classical adjuvants alum and Freund's Incomplete Adjuvant (IFA) are frequently used as references for the design of new adjuvants and antigen delivery systems, e.g., microspheres. PLGA MS have been proposed for delivering antigen booster doses *in vivo* after a single injection. However, as antigen release kinetics from conventional adjuvants are generally unknown, it appears presumptuous to propose a desired antigen release pattern from PLGA MS. Therefore, we have studied the Ttxd *in vitro* release from alum, IFA formulations and MS in four different test systems. The results showed a stronger Ttxd association to alum than to IFA, and the release from both formulations lasted between 3 - 9 days. The total of ELISA-responsive antigen released was 60 - 85% of the actual dose. Both the total amount and the prolongation of release depended on the Ttxd dose. Furthermore, the incomplete *in vitro* release of Ttxd from the adjuvants and also from PLGA 50:50 MS was shown to be partly due to experimental conditions. Typically, Ttxd adsorbed on the glass vials used for the release test and also on the surface of the PLGA MS wherefrom it was released. In conclusion, the test system depending rate and quantity of release observed evidence the limitations of *in vitro* release data. Finally, for mimicking conventional vaccination schedules, i.e., 0, 4, and 8 weeks, PLGA MS should release antigen doses at the corresponding time points, and the release pulses should last for a few days.

THERMODYNAMIC MICROENCAPSULATION APPROACH

Microencapsulation was studied by a thermodynamic approach taking into account quantitatively the molecular interactions between polymer, solvent and the aqueous protein phase. Bovine serum albumin was microencapsulated into PLA by spray-drying using single solvents and binary solvent mixtures. The use of binary solvent mixtures allowed the design of systems with adjustable solubility parameters. MS characteristics like entrapment efficiency, burst release after 24 h and surface morphology were investigated and proved to be highly dependent on the polymer solvent system. Hildebrand or partial Hansen solubility parameters (δ, δ_d, δ_p, δ_h) proved to be insufficient for predicting MS properties, although low or moderate hydrogen-bonding solvents and solvent mixtures were found to be generally appropriate, whereas strongly H-bonding solvents gave poor quality MS. Similarly, water-miscible solvents were shown to give often unsatisfactory products. A more powerful tool for optimising a microencapsulation process is estimating polymer-solvent-drug interactions by using δ_d, δ_p, and the Drago parameters E (electrostatic) and C (covalent) of the components involved. Entrapment efficiency is increased and burst release reduced if polymer-drug interaction is dominant and if polymer-solvent or drug-solvent interactions are reduced. This thermodynamic approach provides a rational basis for optimising microencapsulation processes.

Zusammenfassung

Einfachimpfungen gegen Diphtherie und Tetanus

Der Einbau von Tetanustoxoid (Ttxd) und Diphtherietoxoid (Dtxd) in Polyester-Mikropartikel aus Poly(d,l-laktid-*co*-glykolid) (PLGA) und Poly(d,l-laktid) (PLA) ergibt ein Antigenfreigabesystem, das nach parenteraler Verabreichung am Tier starke Immunantworten bewirkt. Dieses Antigenfreigabesystem zeigt *in vitro* ein pulsatiles Freisetzungsverhalten, welches *in vivo* bisher keinen signifikanten *Boost-effect* bewirken konnte. Dies wird einer ungenügenden Stabilität der Toxoide gegenüber den *in vivo* herrschenden Bedingungen zugeschrieben. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Einfluss von ausgewählten Hilfsstoffen auf Verkapselungsgüte, *in vitro* Freigabe und Stabilität von zwei verschiedenen Tetanus- und einem Diphtherietoxoid in PLA/PLGA Partikeln untersucht. Zudem wurde der Einfluss der Hydrophobizität von kommerziell erhältlichen und neuen, hydrophoberen Polyestern auf die initiale *in vitro* Freigabe der Toxoide aus Mikrosphären (MS) untersucht. Die verwendeten Mikroverkapselungstechniken waren die Sprühtrocknung und die Koazervation. Analytisch wurden die Toxoide mittels Fluorimetrie, ELISA und HPLC erfasst. Ausgewählte Impfstofformulierungen wurden schliesslich an Mäuse und Meerschweinchen verabreicht und die spezifischen Antikörperreaktionen bestimmt.

Es zeigte sich, dass die verkapselten Hilfstoffe den Einbau von Dtxd und Ttxd in PLA/PLGA MS signifikant beeinflussten. Sowohl Albumin als auch Trehalose und γ-Hydroxypropyl-Cyclodextrin steigerten die Verkapselungseffizienz von Ttxd in sprühgetrockneten PLGA MS. Albumin verbesserte die Verkapselungseffizienz von ELISA-reaktivem Ttxd um ein bis zwei Grössenordnungen. Mit Albumin und Mischungen von Albumin und Trehalose folgte die Freigabe des ELISA-reaktiven Ttxd während 1-2 Monaten einer pulsatilen Kinetik. Während Albumin und Trehalose die Verkapselung von Dtxd in sprühgetrocknete MS verschlechterte, verbesserte Albumin den Einbau dieses Toxoids in koazervierte MS. Auch sank die Verkapselungseffizienz von Dtxd in sprühgetrockneten MS mit der Hydrophobizität des Polymers. Ohne Hilfsstoffe betrug die Verkapselungseffizienz in PLGA 50:50, PLGA 75:25 und PLA (ca. 15 kDa) rund 64%, 43% und 16%. Die hydrophoberen, Stearyl-Endgruppen tragenden PLAs wurden ausschliesslich mittels Koazervation verarbeitet. Mit diesen Polymeren erreichte die Verkapselungseffizienz 30% bis 60%. Die Anwesenheit von Albumin war eine Voraussetzung für die Koazervation dieser Polymere, da ohne Zusatz von Albumin eine starke Toxoidausfällung auftrat. Die initiale *in vitro* Freigabe nahm mit zunehmender Hydrophobizität der Polymere zu, wobei Dtxd, Ttxd und mitverkapseltes Albumin in vergleichbaren Ausmassen und nach einer ähnlichen Kinetik freigegeben wurden. Überdies stellte sich in diesen Untersuchungen heraus, dass sowohl die Methode der Proteinextraktion aus den MS wie auch die Methode der Proteinbestimmung (HPLC, Fluorimetrie oder ELISA) einen grossen Einfluss auf die gefundene Menge der verkapselten Proteine hatten.

Die Immunogenität von mikroverkapseltem Ttxd wurde anhand der Antikörperreaktion nach subkutaner Injektion in Mäusen bestimmt. Die MS, die auch Albumin, Trehalose, γ-Hydroxypropyl-Cyclodextrin und Calziumsalze enthielten, ergaben höhere Antikörpertiter als die MS ohne Hilfsstoffe. Eine anhaltende Immunantwort konnte mit einer Mischung von MS

erreicht werden, die unterschiedlich schnell freisetzende MS und mitverkapseltes Albumin, Trehalose und Calziumsalz enthielt. Dieser Effekt lässt sich möglicherweise auf eine durch die Hilfsstoffe stabilisierte Antigenität und die kontrollierte Antigenfreigabe zurückführen. Diese MS mit kontrollierter Antigenfreigabe könnten die Grundlage bilden zur Herstellung von niedriger dosierbaren und von nur einmal zu verabreichenden Impfstoffen.

Physikalisch-chemische und antigene Stabilität

Der Prozess der Mikroverkapselung, aber auch die Freisetzung von Antigenen aus MS kann die physikalisch-chemischen und antigenen Eigenschaften von Antigenen beeinflussen. In dieser Studie wurden deshalb die physikalisch-chemische und antigene Stabilität Ttxd und Dtxd in wässrigen Lösungen untersucht, die erhöhten Temperaturen und dem Einfluss von Milch- und Glykolsäure ausgesetzt wurden. Zusätzlich wurde die stabilisierende Wirkung von Albumin untersucht. Für den Nachweis allfälliger Veränderungen wurden Fluorimetrie, CD-Spektroskopie, Turbidimetrie, Gel-Elektrophorese und ELISA angewandt. Es zeigte sich, dass die Toxoide vor allem durch die erhöhte Temperatur und weniger durch die Anwesenheit der Säuren verändert wurden. Substanzielle Proteinentfaltung und chemische Änderungen am Tryptophan konnten nach einer bis vier Wochen Lagerung bei 60°C beobachtet werden. Lagerung bei 4°C hingegen führte, selbst bei zusätzlicher Anwesenheit der Säuren, nur zu minimalen Konformationsänderungen. Weiter zeigte sich, dass bereits nach 7 Tagen bei 37°C rund 40% der Ttxd-Antigenität zerstört war, wobei dieser Effekt durch die Anwesenheit der Säuren noch verstärkt wurde. Bei 60°C war im gleichen Zeitraum sogar gar keine Antigenität mehr messbar. Als sehr vorteilhaft erwies sich der Zusatz von 0.5% Albumin, welches die Tetanusantigenität in bei 37°C gelagerten Lösungen über 6 Wochen stabilisierte, und zwar unabhängig vom Glykolsäurezusatz.

Freisetzungsanforderung und Oberflächenadsorption des Antigens

Bei der Entwicklung neuer Adjuvantien und Antigen-Verabreichungssysteme, wie zum Beispiel Mikrosphären, werden häufig die klassischen Adjuvantien Alum oder Freund's Inkomplettes Adjuvans (IFA) als Referenzformulierungen mituntersucht. Es wird angenommen, dass PLGA MS nach einfacher Injektion Wiederholungsimpfungen hinfällig machen könnten. Bis heute sind jedoch die Freisetzungskinetiken mit herkömmlichen Adjuvantien weitgehend unbekannt. Es erschien uns deshalb naheliegend, ein erwünschtes Antigen-Freigabe-Muster zu definieren. Dazu wurde das Freigabeverhalten von Ttxd aus Alum, IFA Formulierungen und MS in vier verschiedenen Testsystemen *in vitro* untersucht. Die Resultate zeigten, dass das Antigen stärker mit Alum als mit IFA assoziiert war und, dass die Freisetzung aus beiden Formulierungen innerhalb von drei bis neun Tagen beendet war. Insgesamt wurde 60% - 85% der eingesetzten Dosis an ELISA-reaktivem Antigen freigesetzt. Sowohl die wiedergefundene Menge wie auch die Dauer der Freisetzung hing stark von der Ttxd-Dosis ab. Zudem konnte die unvollständige Freisetzung von Ttxd aus den Adjuvansformulierungen und auch aus den PLGA 50:50 MS zum Teil auf die experimentellen Bedingungen zurückgeführt werden. Es zeigte sich nämlich, dass Ttxd an den Glassfläschchen, welche für die Freisetzungsuntersuchungen verwendet wurden, und an den MS selber adsorbiert wurde. Dies lässt den Schluss zu, dass *in vitro* erhaltene Daten nur beschränkte Aussagekraft besitzen, da sie stark vom verwendeten Testsystem abhängig sind. Ausserdem sollten PLGA MS zu denselben Zeitpunkten, wie dies herkömmliche Impfpläne vorsehen, also nach zum Beispiel 0, 4 und 8 Wochen, Antigene freisetzen, wobei die Freisetzung einige Tage dauern sollte.

Thermodynamischer Ansatz der Mikroverkapselung

Durch den Einbezug molekularer Interaktionen zwischen Polymer, Lösungsmittel und wässeriger Proteinphase wurde versucht, den Verkapselungsprozess nach thermodynamischen Parametern zu beschreiben. Dazu wurde Rinderserumalbumin (BSA) mittels Sprühtrocknung in PLA mikroverkapselt, wobei einzelne Lösungsmittel und binäre Lösungsmittelgemische eingesetzt wurden. Der Einsatz von Lösungsmittelgemischen ermöglichte die Untersuchung von Systemen mit einstellbaren Löslichkeitsparametern. Der Einfluss der Kohäsionsenergien wurde anhand von

verschiedenen MS-Eigenschaften wie Beladung, Initialfreigabe von BSA innerhalb 24 Stunden und Oberflächeneigenschaften untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Messparameter sehr stark von den Eigenschaften des Lösungsmittelsystems abhängig waren. Die Löslichkeitsparameter nach Hildebrand oder Hansen (δ, δ_d, δ_p, δ_h) konnten jedoch keine befriedigende Voraussagen über die entstehenden MS-Eigenschaften liefern. Immerhin, ergaben Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische mit eher geringer Wasserstoffbrückenbildungskapazität qualitativ bessere MS als solche mit hoher Kapazität. Ebenso führten mit Wasser mischbare Lösungsmittel zu unbefriedigenden Resultaten. Der Prozess der Mikroverkapselung liess sich schliesslich besser optimieren, wenn die Polymer-Lösungsmittel-Protein-Interaktionen mit Hilfe von δ_h, δ_p und den Drago Parametern E (elektrostatisch) und C (kovalent) berechnet wurden. Durch Minimierung der Polymer-Lösungsmittel-Interaktion konnte die Verkapselungseffizienz gesteigert und die Initialfreigabe gesenkt werden, was auf die Dominanz der Polymer-Protein-Interaktion zurückgeführt wurde.