



# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„In vitro evaluation of surface-modified PLGA  
microspheres“

Verfasserin

Romana Koller

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, im Juli 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

## **Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während meines Studiums unterstützt und mich immer wieder motiviert haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor und Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth für die ausgezeichnete Betreuung im Rahmen meiner Diplomarbeit.

Ein weiteres Danke gilt meiner Betreuerin Mag. Xue Yan Wang, die jederzeit bei Problemen und Fragen im experimentellen Bereich für mich da war und mir somit die Realisierung meiner Diplomarbeit ermöglichte.

Weiters möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für das gute Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft und für deren Freundschaft bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich auch bei meiner Familie, vor allem meiner Mutter, bedanken, dass sie mich immer unterstützt und immer für mich da ist.



## Inhaltsverzeichnis

1. Einführung .....	S.5
2. Grundlagen .....	S.7
2.1. Allgemeines über Mikropartikel .....	S.7
2.2. Drug Targeting .....	S.9
2.3. Poly(D,L-Milch-co-Glycolsäure) .....	S.12
2.4. Kopplungstechnik: Carbodiimid Methode .....	S.13
3. Materialien und Methoden .....	S.15
4. Ergebnisse und Diskussion .....	S.16
4.1. Charakterisierung der mit Fluorescein beladenen PLGA-Mikropartikel .....	S.17
4.2. Freisetzungsprofil von Fluorescein Natrium aus den PLGA-Mikropartikeln .....	S.17
4.3. Zellbindungsstudien .....	S.18
4.4. Charakterisierung der Mikropartikel-Zell-Interaktion anhand eines Pulse-Chase- Protokolls im Vergleich zur freien Fluorescein-Lösung .....	S.19
5. Literaturverzeichnis .....	S.22
6. Anhang A: Publikation .....	S.25
7. Zusammenfassung .....	S.49
8. Englische Zusammenfassung .....	S.51
9. Curriculum vitae .....	S.53



## 1. Einführung

Heutzutage stehen partikuläre Formulierungen als innovative Arzneiformen im Mittelpunkt des Forschungsinteresses. Sie bieten potentielle Vorteile wie den Einbau von sensitiven Wirkstoffen aus der Biotech-Pipeline und dadurch deren Schutz vor degradierenden Bedingungen im Körper und auch eine lang anhaltende Wirkstofffreisetzung. Das am häufigsten verwendete Polymer ist Poly(Milch-co-Glykolsäure) (PLGA), das bioabbaubar und biokompatibel ist und von der FDA (food and drug administration) als Hilfsstoff zugelassen wurde [1]. Um aktive Langzeit-Formulierungen zu entwickeln, die sensitive Arzneistoffe ohne nennenswerten Abbau zum Zielort transportieren können, wurde eine Vielzahl an APIs (aktive pharmazeutische Inhaltsstoffe) in PLGA Mikro- und Nanopartikel verkapselt [2]. Ausgewählte Beispiele für sensitive APIs in derartigen Formulierungen sind rekombinanter menschlicher Wachstumsfaktor, Schweineinsulin, oder HIV Peptide.

Die am häufigsten angewandte Methode zum Einbau hydrophiler Wirkstoffe ist die w/o/w Doppalemulsionstechnik basierend auf der Verdunstung des Lösungsmittels [3]. Da das Freisetzungsprofil des eingebauten Wirkstoffes von der Abbaubarkeit des Polymers und der Partikelgröße abhängt, bieten Mikropartikel den Vorteil einer hohen Einbaurrate und einer langanhaltenden Freisetzung. Um Arzneistoffe möglichst nahe und spezifisch zum Wirkort zu transportieren, können Mikropartikel an der Oberfläche mit biorekognitiven Liganden wie Lektinen modifiziert werden. Weizenlektin (Wheat germ agglutinin, WGA), ein Lektin aus *Triticum vulgare*, bindet spezifisch an Sialinsäure und N-Acetylglucosamine und daher an glycosylierte Strukturen des Darms [4-7].

Das Ziel dieser Arbeit war es, WGA-modifizierte PLGA Mikropartikel zu entwickeln, die mit Fluorescein-Natrium als Modell-Arzneistoff beladen sind. Fluorescein-Natrium wurde wegen

seiner ausgezeichneten Wasserlöslichkeit, seines niedrigen Molekulargewichtes und seiner Fluoreszenzeigenschaften, die die Detektion erleichtern, ausgewählt. WGA wurde mit Hilfe der Carbodiimid Methode an der Oberfläche der PLGA Mikropartikel kovalent gebunden. Bei der Herstellung von PLGA Partikeln durch Lösungsmittelverdunstung wird üblicherweise PVA (Polyvinylalkohol) als Stabilisator verwendet. In dieser Arbeit wurde aber an Stelle von PVA PEMA (Poly(ethylen-alt-maleinsäure)) als Stabilisator eingesetzt, da PVA trotz gründlichen Waschens an der Partikeloberfläche gebunden bleibt und dadurch zu einer verminderten Kopplungseffizienz führt [8]. Im Gegensatz dazu erhöht PEMA als Carboxylat-Multimer die Kopplungsrate [9]. Die hergestellten Mikropartikel wurden an Hand von Größe, Stabilität, Einbaurate und Freisetzungsprofil des verkapselten Fluorescein-Natriums charakterisiert. Um den Effekt der WGA-Beschichtung zu verdeutlichen, wurden Untersuchungen an Caco-2 Monolayern durchgeführt, die ein in der Pharmazeutischen Technologie etabliertes Modell des menschlichen Darmepithels darstellen und so die Situation im menschlichen Darm simulieren. Um die möglichen Vorteile einer bioadhäsiven partikulären Formulierung zu erkennen, wurden die Mikropartikel mit einer wässrigen Lösung von freiem Modellarzneistoff im in-vitro Modell verglichen.

## **2. Grundlagen**

### **2.1 Allgemeines über Mikropartikel**

Im pharmazeutischen Bereich werden Mikropartikel häufig als Arzneistoffträgersysteme für die orale, parenterale, pulmonale oder nasale Applikation eingesetzt. Mikropartikel weisen einen Durchmesser von 1 – 1000µm auf und man unterscheidet zwischen Mikrokapseln und Mikrosphären. Bei Mikrokapseln umhüllt eine äußere Polymerschicht einen flüssigen, gasförmigen oder festen Kern. Ein Beispiel für die Anwendung von Mikrokapseln ist die Überführung von Flüssigkeiten wie ätherischen Ölen, öligen Vitaminen oder Wirkstofflösungen in rieselfähige Pulver. Im Gegensatz dazu ist bei Mikrosphären der Wirkstoff gleichmäßig im Polymer verteilt. Mikrosphären aus bioabbaubaren Polymeren wie PLGA werden als Arzneistoffträgersysteme intensiv erforscht. Sie finden als parenterale Depotform eine immer breitere Anwendung, insbesondere für die steigende Anzahl von Protein- und Peptid-Wirkstoffen [10].

Es gibt verschiedene Herstellungsverfahren für Mikropartikel. Die meisten Methoden sind Abwandlungen folgender Techniken:

- Lösungsmittlextraktion / -verdunstung
- Phasenseparation (Koazervation)
- Sprühtrocknung.

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde die Technik der Lösungsmittelverdunstung zur Herstellung der Mikropartikel verwendet. Bei dieser Methode werden Emulsionströpfchen einer Lösung des Polymers in einem organischen Lösungsmittel, in die der Arzneistoff auf unterschiedliche Weise eingeschlossen sein kann, in eine Flüssigkeit eingebracht, in der das organische Lösungsmittel der dispersen Phase zum Teil löslich ist und dadurch aus den



Tröpfchen extrahiert wird. Abhängig von seinen Eigenschaften kann der Wirkstoff entweder gemeinsam mit dem Polymer in der dispersen Phase gelöst oder in fein pulverisierter Form in dieser dispergiert werden. Es können aber auch wässrige Wirkstofflösungen in der dispersen Phase emulgiert werden, wodurch sich mit der äußeren Phase eine Doppelemulsion bildet [10]. Die letztgenannte Möglichkeit wurde in der vorliegenden Arbeit zur Bildung der Mikrosphären aus einer w/o/w-Emulsion angewendet.

Inzwischen haben mikropartikuläre Darreichungsformen einen festen Platz in der Pharmakotherapie. Mit bioabbaubaren Depotformulierungen wurde eine Möglichkeit geschaffen, die sich für die Verabreichung von nieder- und hochmolekularen Substanzen eignet, hohe Wirkstoffbeladungen zulässt und mit der sich ein breites Spektrum unterschiedlicher Wirkstofffreigabeprofile mit Applikationsintervallen von 2 Wochen bis 4 Monaten realisieren lässt. Diese Darreichungsform bietet verschiedene Vorteile, wie eine zuverlässigere Therapie bei mangelnder Compliance sowie geringere Nebenwirkungsraten durch einen gleichmäßigeren Wirkstoffspiegel [10].

Ziel der Forschung ist es, mit Hilfe von Mikropartikeln den eingeschlossenen Wirkstoff während des Transportes vom Applikationsort bis zum Zielort (krankes Organ, kranke Zellen) zu schützen und von der Körperumgebung abzuschirmen. Am Zielort soll der Wirkstoff dann freigesetzt werden (drug targeting). Durch Oberflächenmodifikation können die Mikropartikel so verändert werden, dass sie spezifisch an die Zielzellen binden. Allerdings werden Mikropartikel im Gefäßsystem des Körpers von immun-kompetenten Zellen erkannt und teilweise deaktiviert bevor sie an den Wirkort gelangen. Daher wird in der pharmazeutischen Technologie in Richtung lokaler Therapie geforscht, da hier der Wirkstoff im Trägersystem näher an den Ort der Erkrankung gebracht wird [11].

## 2.2 Drug Targeting

Die Idee des Drug Targetings beruht darauf, dass viele Arzneimittel unselektiv hinsichtlich ihres Resorptionsortes oder ihrer Wirkung sind und daher unerwünschte oder sogar toxische Effekte ausüben können. Ziel des Targetings ist es, das Pharmakon so spezifisch wie möglich an seinen Wirkort zu transportieren [12].

Es gibt verschiedene Prinzipien des Targetings: passives, aktives und physikalisches Targeting. Passives Targeting nützt physiologische Besonderheiten des Zielgewebes aus. Es kann bei Entzündungen und in bestimmten Stadien der Tumorentwicklung auf dem EPR-Effekt (enhanced permeability and retention effect) beruhen. Dabei sind Blutgefäße von pathologisch verändertem Gewebe durchlässiger, sodass Wirkstoffe und kleinste Arzneiformen vermehrt permeieren können und sich im Interstitium anreichern [12].

Beim aktiven Targeting werden Liganden an den Wirkstoff oder Wirkstoffträger gekoppelt, die spezifische Merkmale der Zelloberfläche wie Rezeptoren, Membrantransportproteine oder Adhäsionsproteine erkennen und an diese binden [12].

Physikalisches Targeting basiert auf einer physikalischen Maßnahme von außen, die eine Wirkstofffreisetzung im Zielgewebe bewirkt. Beispielsweise können thermosensitive Nanopartikel durch Licht angeregt und erhitzt werden, sodass nur eine lokale Freisetzung bzw. Ablation von Zellen erfolgt [12].

### **Wheat Germ Agglutinin (WGA)**

WGA ist ein Lektin, das aus *Triticum vulgare* isoliert wird. Heute versteht man unter Lektinen Proteine oder Glykoproteine, die mindestens eine katalytische Domäne besitzen und reversibel an spezifische Mono- oder Oligosaccharide binden. WGA ist ein dimeres Protein,

das 4 Hevein-Domänen besitzt und spezifisch mit N-Acetylglucosaminen und Sialinsäuren der Zelloberfläche interagiert [13].

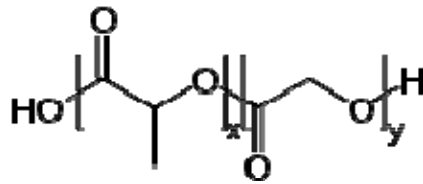
Die spezifische Wechselwirkung zwischen Lektin-hältigen Formulierungen und glycosylierten Strukturen des Darms kann ausgenutzt werden, um die Wirksamkeit von schlecht resorbierbaren Arzneistoffen zu verbessern. Jede Säugetierzelle besitzt eine Kohlenhydratschicht, die sogenannte Glykokalyx, die aus den Oligosaccharid-Anteilen von Proteoglykanen, Glykolipiden und Glykoproteinen der Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran aufgebaut wird. Darüber hinaus können Lektine im Darm auch an Kohlenhydrat-Anteile des Mukus oder an die Glykokalyx der darunterliegenden Zellen binden. Da WGA im sauren Bereich kaum an Kohlenhydrate bindet, interagiert das Lektin nicht mit Strukturen der Magenschleimhaut. Die glykosylierte extrazelluläre Domäne 3 des EGF-Rezeptors (epidermal growth factor-receptor) ist an der WGA-Bindung beteiligt. Da der EGF-Rezeptor in einigen Tumoren, wie z.B. im Lungen-, Brust-, Leber- und im Blasen-tumor, überexprimiert wird, wurde dieses biorekognitive Targeting für die Anwendung in der Tumorthherapie vorgeschlagen [13].

Die Aufnahme von WGA in die Zelle ist temperaturabhängig. Während bei 4°C WGA nur an die Zelloberfläche bindet, kann es bei 37°C zusätzlich in die Zellen aufgenommen werden. Um die Eigenschaften dieses Lektins für die gezielte Wirkstofffreisetzung zu nützen, stehen zwei Möglichkeiten zur Entwicklung Lektin-funktionalisierter Formulierungen zur Verfügung: 1) Lektin-Prodrugs, die aus einem Lektin, einem Zwischenstück und einem Arzneistoff bestehen, oder 2) Lektin-funktionalisierte Trägersysteme wie Mikropartikel, Liposomen und Nanopartikel [13].

Die Bioverfügbarkeit schlecht resorbierbarer Wirkstoffe kann dadurch erhöht werden, dass einerseits durch die direkte Bindung der WGA-hältigen Formulierung an den resorbierenden

Enterozyten der Konzentrationsgradient zwischen Lumen und Zellinnerem erhöht und der Diffusionsweg des freigesetzten Wirkstoffes verkürzt wird und so die Aufnahme des Wirkstoffes in die Zelle erhöht wird. Andererseits kann WGA als Targeter zusätzlich die Aufnahme von kleinsten Strukturen in die Zelle durch Auslösung einer rezeptorvermittelten Endocytose vermitteln, wobei die Dimension der Formulierung im Nanometerbereich liegen muss.

### 2.3 Poly(D,L-Milch-co-Glycolsäure)



**Abbildung 1:** Struktur von PLGA. x=Anzahl der Milchsäure-Einheiten; y=Anzahl der Glycolsäure-Einheiten

Poly(D,L-Milch-co-Glycolsäure) (PLGA) ist ein biokompatibles und bioabbaubares Copolymer aus Milchsäure und Glycolsäure-Einheiten. Es wurde von der FDA (food and drug administration) für die Verwendung in „drug delivery“ Systemen zugelassen [14].

Die physikochemischen Eigenschaften von PLGA wie Molekulargewicht, Monomerenverhältnis und Größe der Mikroblöcke der Monomeren beeinflussen die mechanische Festigkeit des Polymers, die Eigenschaften der Arzneistoffformulierung und schließlich auch die Freisetzung aus der Polymermatrix. Die mechanische Festigkeit, das Quellungsverhalten, die Hydrolyserate und damit die Bioabbaubarkeit werden direkt von der Kristallinität des PLGA-Polymers beeinflusst, welche vom Molverhältnis der beiden Monomeren, Milchsäure und Glycolsäure, in einer Polymerkette bestimmt wird. Das Polymer mit äquimolarem Anteil an Milch- und Glycolsäure wird viel schneller hydrolysiert, als jene mit einem niedrigeren oder höheren Verhältnis der beiden Polymere zueinander. Die Glasübergangstemperatur von PLGA liegt über der physiologischen Temperatur von 37°C und sinkt mit einem steigenden Glycolsäuregehalt und einem abnehmenden Molekulargewicht. Beim biologischen Abbau von PLGA entstehen Milch- und Glycolsäure-

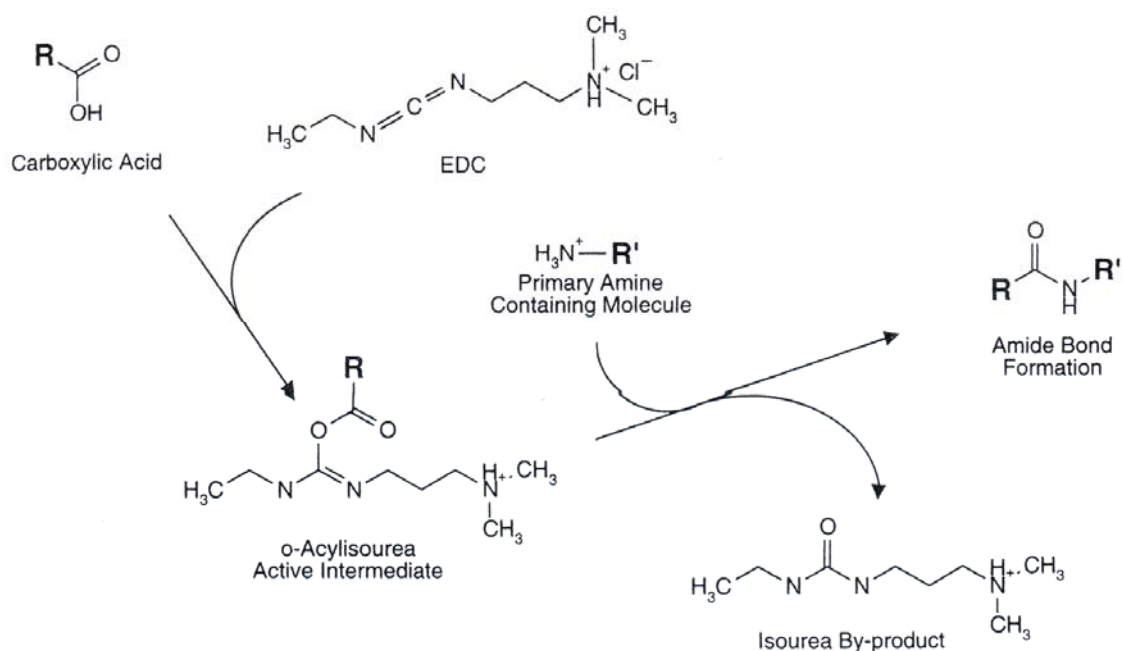
Einheiten. Der Abbau erfolgt in 3 Schritten: zunächst sinkt das Molekulargewicht des Polymers durch unspezifische Hydrolyse, es entstehen aber noch keine löslichen Abbauprodukte, sodass die Masse der Formulierung konstant bleibt. Mit fortschreitender Hydrolyse werden im nächsten Schritt wasserlösliche Oligomer- und Monomerprodukte gebildet, wodurch nun ein Massenverlust auftritt. Zum Schluss liegt das gesamte Polymer in gelöster Form in Monomeren vor [14].

## **2.4 Kopplungstechnik: Carbodiimid-Methode**

Carbodiimide vermitteln die Bildung eines Amids aus einer Carbonsäure und einem Amin, beziehungsweise die Phosphoramid-Bildung aus einem Phosphat und einem Amin. Carbodiimide werden als „zero-length“ Quervernetzer bezeichnet, da bei der Bildung dieser Bindungen keine zusätzliche chemische Struktur zwischen den konjugierten Molekülen eingeführt wird. Durch die Reaktion zwischen Carbonsäure-Gruppen und N-substituierten Carbodiimiden kommt es zur Bildung von aktiven O-Acylisoharnstoff-Zwischenprodukten, die mit Nucleophilen wie primären Aminen Amide ausbilden. Als Nebenprodukt entsteht Isoharnstoff (Abb. 2). Für diese Reaktion ist ein Medium mit einem pH-Wert zwischen 4,5 und 7,5 optimal [15].

Im Zuge dieser Arbeit wurde das wasserlösliche 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) verwendet. Da in wässrigen Lösungen das aktive Zwischenprodukt (O-Acylharnstoff) innerhalb von Sekunden hydrolysiert bzw. zum nicht reaktiven N-Acylharnstoff umgelagert wird, wurde N-Hydroxysuccinimid (NHS) zu dessen Stabilitätserhöhung zugesetzt. Durch die Reaktion der Hydroxylgruppe von NHS mit dem O-

Acylharnstoff entsteht der NHS-Ester mit einer höheren Stabilität und einer verlängerten Halbwertszeit bis zu einigen Stunden. Dieser Aktivester reagiert auch im wässrigen Milieu bevorzugt mit Aminogruppen-hältigen Liganden unter Amidbildung, sodass das Endprodukt dieser 2-Stufen-Reaktion mit jenem einer einstufigen Reaktion identisch ist. In der Praxis werden im ersten Schritt die Carboxyl-Gruppen durch EDAC und NHS aktiviert und zusätzlich durch Waschen die überschüssigen Kopplungsreagenzien entfernt. Anschließend wird das Amin zugeführt, das mit dem Aktivester zu einer stabilen Amid-Bindung reagieren kann. Dieser 2-Sufen-Prozess ermöglicht es der aktivierten Carboxyl-Gruppe nur an die Aminogruppen des Proteins zu binden, wodurch eine Quervernetzung der Proteine verhindert und bessere Kontrolle über die Konjugation erlangt wird [15].



**Abbildung 2:** Reaktionsschema der Carbodiimid Methode [15].

### **3. Materialien und Methoden**

Siehe Anhang A Kapitel 2



#### **4. Ergebnisse und Diskussion**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zur Publikation

"Lectin-Coated PLGA Microparticles: Thermoresponsive Release and In-Vitro Evidence for Enhanced Cell Interaction"

Xue-Yan Wang, Romana Koller, Michael Wirth, Franz Gabor

Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna,  
Vienna, Austria

eingereicht beim "Journal of Controlled Release"

beigetragen werden.

## **4.1 Charakterisierung der mit Fluorescein beladenen PLGA-Mikropartikel**

Die mit Fluorescein-Natrium als Modell für einen hydrophilen Wirkstoff beladenen PLGA-Mikropartikel wurden nach der Doppelmulsions-Lösungsmittelveraporations-Technik hergestellt und besitzen einen Durchmesser von 4,7µm. Die eingebaute Fluorescein-Natrium Menge beträgt  $1,75 \pm 0,02 \mu\text{g}$  Fluorescein pro mg PLGA bei WGA-modifizierten Mikropartikeln, bei nicht modifizierten Mikropartikeln  $1,77 \pm 0,01 \mu\text{g}$ . Die mikroskopische Untersuchung der Partikel zeigte eine gleichmäßige Fluorescein-Freisetzung aus der Partikelmatrix. Laut Literatur wird durch die Verwendung von PEMA an Stelle von PVA als Stabilisator bei der Herstellung die Kopplungseffizienz von Liganden mit einer Aminogruppe erhöht [8,9]. Dementsprechend war der Gehalt an WGA auf der Partikeloberfläche siebenmal höher als bei Verwendung von PVA (Daten nicht angeführt). Trotz der Verwendung von PEMA blieben die Mikropartikel völlig redispergierbar und über mindestens ein Monat lagerstabil bei 4°C.

## **4.2 Freisetzungsprofil von Fluorescein-Natrium aus den PLGA-Mikropartikeln**

Üblicherweise ist das Freisetzungsprofil aus PLGA-Mikropartikeln am Beginn durch eine rasche Fluorescein-Freisetzung durch Lösung des an der Oberfläche gebundenen hydrophilen Farbstoffes gekennzeichnet, darauf folgt eine langsame Abgabe des Modell-Wirkstoffes aus der Polymermatrix. Dieser erste Freisetzungsschub konnte nicht beobachtet werden, vermutlich wegen der Partikelreinigung direkt nach der Herstellung. Interessanterweise konnte im Rahmen dieser Untersuchung gezeigt werden, dass die Fluorescein-Abgabe aus den Partikeln temperaturabhängig ist, da nach einer 47-stündigen

Inkubation bei 4°C und bei Raumtemperatur (RT) weniger als 1% Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wurde. Bei 37°C konnte jedoch bereits nach 23 Stunden eine konstante Freisetzung von mehr als 80% der eingebauten Menge beobachtet werden (Figur 1, Anhang A). Aus der Literatur ist bekannt, dass PLGA-Mikropartikel, die kleiner als 300µm sind, entweder homogen oder größtenteils auf einmal abgebaut werden, wobei die Abbaurate der Oberfläche jener des Kernes entspricht [16]. Die temperaturabhängigen Parameter, die die Freisetzung aus den 4,7µm großen PLGA-Partikeln beeinflussen, sind die Löslichkeit und Diffusion des Farbstoffes, sowie die Mobilität und Abbaurate der PLGA-Ketten. Da Fluorescein-Natrium unabhängig von der Temperatur sehr gut wasserlöslich ist und der Unterschied in der Freisetzungsrate zwischen RT und 37°C viel höher ist als zwischen 4°C und RT, dürften die physikochemischen Eigenschaften des Farbstoffes nur einen geringen Einfluss ausüben. Außerdem ist das Freisetzungsprofil des verkapselten Modellwirkstoffes unabhängig von der Oberflächenmodifizierung mit WGA. Daher dürfte die erhöhte Freisetzungsrate bei 37°C lediglich von der hydrophoben PLGA-Matrix abhängen. Durch die ausschließliche Freisetzung bei Körpertemperatur sind die Mikropartikel bei 4°C und RT lagerstabil, was nicht nur für die Formulierung von instabilen Wirkstoffen, sondern auch bei der Oberflächenmodifizierung der Mikropartikel einen Vorteil darstellt.

### **4.3 Zellbindungsstudien**

Um die Auswirkungen der WGA-Modifikation der Mikropartikel zu zeigen, wurden Caco-2 Monolayer 30 Minuten bei 4°C mit Partikeln inkubiert und nach Entfernung der ungebundenen Partikel qualitativ sowie quantitativ untersucht. Bereits bei mikroskopischer Betrachtung wurde sichtbar, dass mit WGA-modifizierte Partikel besser an den Zellen haften

als die Mikropartikel ohne Oberflächenmodifikation (Fig. 2, Anhang A). Die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten ergab, dass nach kovalenter Bindung des Lektins an die Mikropartikel mit dem Lektin 1,5mal so viele Partikel an die Zellmembran binden als ohne Lektin (Daten nicht angeführt). Die erhöhte Bioadhäsion der WGA-modifizierten Mikropartikel beruht auf der starken Interaktion zwischen WGA und Sialinsäure- oder N-Acetyl-D-glucosamin-Strukturen des künstlichen Darmepithels, sodass die Partikel trotz der Waschprozedur haften bleiben [17]. Bei 4°C findet keine Aufnahme der Partikel in die Zellen statt, da diese Temperatur energieabhängige Transportprozesse unterdrückt und da die Partikel für eine zelluläre Aufnahme Rezeptor-vermittelter Endozytose zu groß sind [13].

#### **4.4 Charakterisierung der Mikropartikel-Zell-Interaktion anhand eines Pulse-Chase-Protokolls im Vergleich zur freien Fluorescein-Lösung**

Um den Mechanismus der Interaktion zwischen Caco-2 Monolayern und WGA-modifizierten Mikropartikeln quantitativ zu untersuchen, wurden Pulse-Chase Experimente durchgeführt (Fig. 3, Anhang A). Zunächst wurden die Zellmonolayer nach Entfernung des Mediums 30 Minuten bei 4°C bzw. 37°C mit der Partikelsuspension beladen (Pulse-Inkubation). Da die ungebundenen Mikropartikel gewaschen wurden und bei 4°C keine Fluorescein-Freisetzung stattfindet, entspricht die relative Fluoreszenzintensität (RFI) bei 4°C dem zellgebundenen, in Mikropartikel eingebauten Fluoreszenzfarbstoff. Im Gegensatz dazu entspricht die RFI bei der Pulse-Inkubation bei 37°C der Summe aus dem an die Zellen gebundenen, verkapselten und aus dem an die Zellen gebundenen, freigesetzten Farbstoff. Zusätzlich wurde die Freisetzung von Fluorescein aus den Mikropartikeln mit einer Lösung von Fluorescein verglichen. Dazu wurde eine Fluorescein-Lösung mit demselben Gehalt wie

in den Partikeln (0,35µg/mL) auf den Monolayer aufgetragen. Nach der Pulse-Inkubation bei 4°C war der Gehalt des zellgebundenen Modell-Wirkstoffes der freien Lösung viermal so hoch wie bei den nicht modifizierten Partikeln und 2,7mal so hoch wie bei den WGA-modifizierten. Bei der Pulse-Inkubation bei 37°C war durch erhöhte Aufnahme von freiem Fluorescein durch Diffusion der Wirkstoffgehalt der Zellen 4,7mal beziehungsweise 3,2mal so hoch. Der Unterschied in der zellgebundenen Fluoreszenzintensität zwischen Lösung und Mikropartikeln beruht offenbar auf einem Quench-Effekt des Farbstoffes durch die Partikelmatrix. Die RFI der WGA-modifizierten Mikropartikel übersteigt die RFI der Partikel ohne Lektin um 40%, was wiederum auf die erhöhte Bioadhäsion durch Lektine hinweist.

Nach der vierstündigen Chase-Inkubation bei 37°C von beiden Ansätzen (4°C und 37°C Pulse-Inkubation) wurde die RFI bestimmt ohne vorher zu waschen (Chase total, Fig. 3, Anhang A). Daher entspricht hier die RFI dem freien Fluorescein, das von den Zellen aufgenommen wurde, dem freien Fluorescein im Überstand, sowie dem nach wie vor verkapselten Fluorescein. Bei den Mikropartikeln steigt die Fluoreszenz sehr stark an, was zeigt, dass der vorher verkapselte und gequenchete Farbstoff jetzt freigesetzt wird. Zusätzlich ist die RFI der modifizierten Mikropartikel höher als jene der unveränderten, da durch das Lektin mehr Partikel an den Zellen haften. Bei der Fluorescein-Lösung ändert sich die RFI nach der Chase-Inkubation nicht. Anschließend wurde der Monolayer gewaschen, um die Fluorescein-Menge, die nicht an den Zellen gebunden ist, zu entfernen. Die RFI entspricht nun der von den Zellen aufgenommenen und der verkapselten Farbstoff-Menge. Nach der Pulse-Inkubation bei 4°C und Chase-Inkubation bei 37°C war der an die Zellen gebundene Farbstoff-Gehalt bei den Mikropartikeln 2,9mal höher und stieg auf das 4,2fache bei WGA-modifizierten Partikeln im Vergleich zur Lösung. Nach beiden Inkubationen bei 37°C war der Gehalt des von den Zellen aufgenommenen Modell-Wirkstoffes bei den nicht modifizierten

Partikeln 4,4mal höher, beziehungsweise bei den WGA-modifizierten Partikeln 5,8mal höher als jener nach Zusatz der Farbstofflösung. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Überlegenheit der Partikel gegenüber der Lösung, welche durch Oberflächenmodifizierung mit WGA zusätzlich gesteigert wird.

Um die Farbstofffreisetzung und Aufnahme zu veranschaulichen wurden Caco-2 Monolayer mit WGA-modifizierten Mikropartikeln bei 37°C inkubiert und nach unterschiedlichen Zeiten Fluoreszenzphotos gemacht (Fig. 4, Anhang A). Nach einer Stunde konnte noch keine Freisetzung des Farbstoffes beobachtet werden. Nach weiteren zwei Stunden wurde jedoch bereits ein Teil des Farbstoffes aus den Mikropartikeln freigesetzt und von den Zellen aufgenommen, sodass eine diffuse Fluoreszenzkorona um die Mikropartikel in den darunterliegenden Zellen auftrat. Nach fünf Stunden Inkubation bei 37°C waren kaum noch Partikel sichtbar, da der Großteil des Farbstoffes bereits freigesetzt worden ist und dadurch die meisten Zellen durch den aufgenommenen Modell-Wirkstoff gefärbt worden sind. Diese mikroskopischen Beobachtungen beweisen, dass die vorgestellte Formulierung aufgrund ihres Lektin-Mantels cytoadhäsiv ist und den eingebauten Modell-Wirkstoff über einen längeren Zeitraum an die darunterliegenden Zellen abgibt.

## 5. Literaturverzeichnis

- [1]<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/ucm084292.htm>
- [2]R.C.Mundargi, V.R.Babu, V.Rangaswany, P.Patel, T.M.Aminabhavi, Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives, *J Control Release*, 125 (2008) 193-209.
- [3]M. Ye, S. Kim, K. Park, Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles, *J Control Release*, 146 (2010) 241-260.
- [4]G. Ratzinger, P. Agrawal, W. Körner, J. Lonkai, H.M.H.F. Sanders, E. Terreno, M. Wirth, G.J. Strijkers, K. Nicolay, F. Gabor, Surface modification of PLGA nanospheres with Gd-DTPA and Gd-DOTA for high-relaxivity MRI contrast agents, *Biomaterials*, 31 (33) (2010) 8716-8723.
- [5]G. Ratzinger, X. Wang, M. Wirth, F. Gabor, Targeted PLGA microparticles as a novel concept for treatment of lactose intolerance, *J Control Release*, 147 (2) (2010) 187-192.
- [6]F. Roth-Walter, I. Schöll, E. Untersmayr, A. Ellinger, G. Boltz-Nitulescu, O. Scheiner, F. Gabor, E. Jensen-Jarolim, Mucosal targeting of allergen-loaded microspheres by *Aleuria aurantia* lectin, *Vaccine*, 23 (21) (2005) 2703-2710.
- [7]A. Weissenböck, M. Wirth, F. Gabor, WGA-grafted PLGA-nanospheres: Preparation and association with Caco-2 single cells, 99 (3) (2004) 383-392.
- [8]M. E. Keegan, S. M. Royce, T. Fahmy, W. M. Saltzman, In vitro evaluation of biodegradable microspheres with surface-bound ligands, *J Control Release*, 110 (2006) 574-580.
- [9]M. E. Keegan, J. L. Falcone, T. C. Leung, W. M. Saltzman, Biodegradable Microspheres with Enhanced Capacity for Covalently Bound Surface Ligands, *Macromolecules*, 37 (2004) 9779-9784.
- [10]<http://pharmazie-lehrbuch.de/kapitel/1-6.pdf>

- [11]R. Voigt, Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf, 10. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2006.
- [12]P. Langguth, G. Fricker, H. Wunderli-Allenspach, Biopharmazie, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2004.
- [13]F. Gabor, M. Wirth, Lectin-mediated drug delivery: fundamentals and perspectives, STP. Pharma Sciences 13 (2003): 3-16.
- [14]R.A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, Biomaterials 21 (2000) 2475-2490.
- [15]G.T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996.
- [16]J.M. Anderson, M.S. Shive, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, Adv Drug Del Rev 28 (1997) 5-24.
- [17]H.-J. Gabius, The Sugar Code, first ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2009.





## 6. Anhang A

### **Lectin-Coated PLGA Microparticles: Thermoresponsive Release and In-Vitro Evidence for Enhanced Cell Interaction**

Xue-Yan Wang, Romana Koller, Michael Wirth, Franz Gabor\*

Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna,  
Vienna, Austria

To be submitted to the Journal of Controlled Release

\*Corresponding author: Franz Gabor

Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, University of Vienna,  
Althanstraße 14, 1090 Vienna, Austria

Tel: (+43)-1-4277-55406

Fax: (+43)-1-4277-9554

E-Mail: franz.gabor@univie.ac.at

## **ABSTRACT**

PLGA-microparticles of 4.7 $\mu$ m in diameter and loaded with 1.7 $\mu$ g fluorescein / mg PLGA mimicking a hydrophilic API were prepared by the double emulsion technique and coated with wheat germ agglutinin in an effort to further elucidate the release and bioadhesive characteristics of lectin-grafted formulations in-vitro. The microparticles exhibited thermo-responsive release since no free fluorescein was detected at 4°C or room temperature. At body temperature, however, more than 80% were liberated within 48h. The adhesion of lectin-grafted particles to Caco-2 monolayers applied as a model for the human intestinal epithelium exceeded that of plain ones 1.5-fold as also observed by fluorescence microscopy. Furthermore, the amount of model drug bound and taken up into the cells was 5.8-fold higher after incubation for 4h at 37°C as compared to fluorescein in solution. According to fluorescence imaging a considerable amount of the total fluorescein payload was accumulated intracellularly after incubation for 5h at 37°C. These findings not only confirm the utility of bioadhesives of the second generation for improved absorption of low molecular weight hydrophilic compounds but also indicate storage stability of such suspensions at 4°C and room temperature without any premature loss of API.

**KEYWORDS** (max. 6): bioadhesion, Caco-2, microparticle, PLGA, thermo-responsive, WGA.

## 1. INTRODUCTION

Nowadays, particulate formulations are intensively investigated as drug delivery systems. They offer lots of advantages such as feasibility of encapsulation of different drugs especially sensitive APIs, sustained drug delivery from the particle matrix, and protection of the payload against unfavorable conditions in the body. Among the polymers in use, Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is most popular because it is biodegradable and biocompatible and generally recognized as safe by the FDA [1]. In order to develop long-term active formulations, in which sensitive drugs could be delivered to their target without degradation, a variety of APIs has been encapsulated into PLGA micro- and nanoparticles [2], for example, recombinant human growth factor [3], swine insulin [4], recombinant glycosylated glial cell-line derived neurotrophic factor [5], and HIV peptides [6]. The method most commonly used to encapsulate hydrophilic drugs within particles is the water/oil/water double emulsion technique based on solvent evaporation [7]. Since the release profile of the payload depends on the degradation characteristics of the polymer and the particle size, microspheres offer the advantage of a high payload and sustained release kinetics. In order to transport drugs as close as possible to the site of action, microcarriers can be targeted with different ligands. In particular, the lectin-mediated targeting is well known as a variant of the bioadhesion concept, which is not only applicable for gastrointestinal targeting, but also for other biological barriers [8, 9]. Among these sugar-binding proteins, wheat germ agglutinin (WGA) from *Triticum vulgare*, which specifically binds to sialic acid and N-acetylglucosamine, possesses cytoadhesive and cytoinvasive characteristics. Furthermore, due to WGA-mediated biorecognition of the glycosylated

structures in the intestine, we have already published several drug delivery systems grafted with WGA for GI-targeting [10-13].

The aim of the present work was to develop a WGA-targeted PLGA microparticulate delivery system loaded with fluorescein sodium as a model drug. Fluorescein sodium was chosen because of its excellent water solubility, low molecular weight and fluorescent properties facilitating detection. Lectin was immobilized to the surface of PLGA microparticles using the carbodiimid method. As already reported by Keegan's group, PLGA particles are usually prepared by solvent evaporation using polyvinylalcohol (PVA) as stabilizer. Despite thoroughly washing, however, the PVA still resides on the surface of particles and leads to decreased ligand coupling efficiency [14]. Therefore, poly (ethylene-alt-maleic acid) (PEMA) was applied as a new stabilizer during the preparation process because its carboxylate groups can increase the coupling rate [15]. The resulting particulate drug delivery system was examined in terms of particle size, stability, payload, and release profile of encapsulated fluorescein sodium. In order to elucidate the impact of the bioadhesive coating, assays were performed using Caco-2 monolayers which represent a well-established model of the human intestinal epithelium. Besides imaging techniques quantitative protocols such as pulse-chase incubations were pursued to simulate the situation in the human intestine. Moreover, the characteristics of the microspheres were compared with an aqueous solution of free model drug to figure out the advantages of the bioadhesive particulate formulations.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Materials

PLGA (poly (D,L-lactide-co-glycolide), Resomer RG503H, 50:50 lactide/glycolide) was obtained from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). Poly (ethylene-*alt*-maleic anhydride) (PEMA) and Fluorescein sodium were bought from Sigma Aldrich (Vienna, Austria). Wheat germ agglutinin (WGA) from *Triticum vulgare* was purchased from Vector laboratories (Burlingame, USA). Hoechst 33342 trihydrochloride trihydrate was obtained from Invitrogen (Vienna, Austria). All other chemicals used were of analytical purity.

### 2.2 Preparation of fluorescein-loaded PLGA microparticles

Fluorescein loaded PLGA microparticles were prepared by a water-in-oil-in-water solvent-evaporation technique. 400 $\mu$ L aqueous fluorescein sodium salt solution (7.5mg/mL) were emulsified with a solution containing 400mg PLGA in 2.4g of ethyl acetate by sonication for 2min (sonifier, Bandelin electronic UW70/HD70; tip, MS 72/D; Berlin, Germany). After adding 8mL of a 0.5% aqueous solution of PEMA the emulsion was sonicated again for 2min yielding the (w/o)/w emulsion which was poured into 100mL of a 0.25% aqueous solution of PEMA. After mechanical stirring at 600rpm for 1h at room temperature, residual ethyl acetate was removed under reduced pressure. In order to remove non-encapsulated fluorescein sodium, the microparticles were washed three times with 120mL 20mM HEPES/NaOH pH 7.0. Finally the particles were resuspended in 100mL of the same buffer. The PLGA content of lyophilized aliquots was determined gravimetrically after dialysis

against distilled water. The particle size distribution was determined using a Malvern Mastersizer 2000 laser particle size analyzer (Malvern Instruments, Malvern, UK).

### **2.3 Preparation of Wheat Germ Agglutinin functionalized microparticles**

WGA was covalently coupled to carboxylate-groups at the surface of PLGA microparticles according to a carbodiimide method. Briefly, 5mL of the PLGA microparticles suspension in 20mM HEPES/NaOH pH 7.0 containing 0.1% Pluronic® F-68 were activated by adding 5mL of a freshly prepared solution containing 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC, 1400mg) and N-hydroxysuccinimide (NHS, 59mg) in the same buffer. After end-over-end incubation for 30min at room temperature the microparticles were washed by dilution with 15mL 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 containing 0.1% Pluronic® F-68 and centrifugation (3200rpm, 10min, 4°C) to remove the excess reagents. After resuspending the microparticles in 10mL of the same buffer 500µL of an aqueous solution of WGA (5mg/mL) were added followed by end-over-end incubation for 1h at room temperature. Unreacted binding sites were saturated by incubation with 2.4mL glycine solution (100mg/mL in buffer) for 30min at room temperature. Subsequently, the microparticles were washed twice by centrifugation (3200rpm, 10min, 4°C) with 15mL buffer each as above. Finally, the particles were resuspended in 10mL buffer and stored at -80°C until use. As a reference, plain PLGA microparticles were treated as above but adding solely buffer instead of the EDAC, NHS, WGA and glycine.

## **2.4 Determination of the fluorescein sodium content of the microparticles**

In triplicate, aliquots (300 $\mu$ L) of the microparticle suspensions were hydrolyzed by addition of 100 $\mu$ L 4M NaOH. The fluorescein content of 100 $\mu$ L aliquots was determined in 96-well plates at 485/525nm (exc./em). The amount of encapsulated label was calculated from a calibration curve established with fluorescein sodium in 1M NaOH.

## **2.5 Release of the fluorescein sodium from the microparticles**

To assess the release of encapsulated fluorescein sodium, 500 $\mu$ L suspension containing either plain or surface modified particles were incubated with 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 containing 0.1% Pluronic<sup>®</sup> F-68 at 4°C, 37°C, and room temperature. At certain time intervals, the respective supernatants were collected by centrifugation (14000rpm, 5min, 4°C) and the amount of liberated fluorescein sodium was determined in each sample fluorimetrically at 485/525nm. Finally, the percentage of the released fluorescein was calculated with reference to the encapsulated fluorescein content.

## **2.6 Cell culture**

Caco-2 cells were purchased from the German collection of microorganisms and cell culture (DSMZ, Braunschweig, Germany). Cells were cultivated in RPMI 1640 cell culture medium containing 10% fetal calf serum, 4mM L-glutamine and 150mg/mL gentamycine in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere at 37°C and were subcultured by TrypLE<sup>®</sup> select. Tissue culture reagents were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA) and Gibco Life



Technologies Ltd. (Invitrogen Corp., Carlsbad, USA). Cells between passage 63 and 73 were used for the present study. For cell experiments following a pulse-chase protocol and fluorescence microscopy,  $1.7 \times 10^4$  Caco-2 single cells were seeded per well using 96-well microplates or glass cover slips combined with the flexiPERM micro 12 system, respectively. Cells were cultivated under standard cell culture conditions until a confluent monolayer had been formed.

## **2.7 Pulse-chase studies of the particle-cell interaction and comparison with free fluorescein in aqueous solution**

In order to evaluate the particle-cell interactions, fluorescein loaded microparticles were incubated with Caco-2 monolayers under different conditions following a pulse-chase protocol. At this, the microparticle suspension was diluted with isotonic 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 to yield a concentration of 200 $\mu$ g particles/mL. For comparison, a solution of fluorescein in the same buffer containing equal amounts to that of the microparticles was applied (0.35 $\mu$ g/mL). After washing confluent Caco-2 monolayers with isotonic 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 (100 $\mu$ L/well), the cells were incubated with 100 $\mu$ L/well of the microparticle suspension or the aqueous fluorescein solution for 30min at 4°C and 37°C, respectively (pulse phase). After removal of unbound microparticles or free fluorescein by washing twice with 100 $\mu$ L 20mM HEPES/NaOH pH 7.4, the relative cell-associated fluorescence intensity was determined at 485/525nm. Subsequently, the cell layers were incubated up to 4h at 37°C (chase phase), followed by a further washing step as above. Again, the relative fluorescence intensities were determined before and after this final washing step at 485/525nm.

## 2.8 Fluorescence microscopy

Caco-2 monolayers grown on glass cover slips in the flexiPERM micro 12 system were used for fluorescence microscopy. After removing the cell culture medium, the nuclei of the living cells were stained by incubation with Hoechst 33342 (5 $\mu$ g/mL RPMI medium; 50 $\mu$ l/well) for 30min at 37°C. Excessive dye was removed by washing the monolayers twice with 100 $\mu$ L isotonic 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 each. After incubation with 100 $\mu$ L microparticle suspension (200 $\mu$ g/mL isotonic 20mM HEPES/NaOH pH 7.4) at 37°C for one, three and five hours, respectively, the Caco-2 layers were washed with 100 $\mu$ L isotonic 20mM HEPES/NaOH pH 7.4 to remove any unbound particles and fluorescein released into the supernatant. Without any further preparation images of the cell layers were acquired using a Zeiss Axio Observer.Z1 microscopy system equipped with LED illumination system "Colibri" (Göttingen, Germany).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Characterization of fluorescein-loaded PLGA-microparticles

With respect to the size of particulate drug delivery systems for intestinal delivery of hydrophilic APIs, among others, some issues remain to be considered: (i) Desai et al. [16] reported that particles in the lowest micrometer range rather remain in the intestinal lumen than to be taken up by the cells. (ii) Microparticles provide a higher payload of hydrophilic APIs than submicron particles [17]. (iii) Smallest microparticles provide a surface area large enough for modification with targeters. Thus, PLGA-microparticles with a mean diameter of 4.7 $\mu$ m loaded with fluorescein sodium as a model for hydrophilic APIs were prepared by the double emulsion solvent-evaporation technique. The amount of encapsulated fluorescein sodium was 1.75 $\pm$ 0.02 $\mu$ g and 1.77 $\pm$ 0.01 $\mu$ g fluorescein sodium per mg PLGA with and without WGA conjugation, respectively. Microscopic inspection of the particles revealed homogenous distribution of fluorescence throughout the particle matrix. According to Keegan et al. [14, 15], the use of PEMA instead of the traditional stabilizer poly(vinyl alcohol) enhances the conjugation efficiency with amine-containing ligands. Accordingly, the amount of WGA coupled to the surface of PLGA-microparticles using PEMA as tenside was about 7-fold higher in comparison to the PVA stabilized particles (data not shown). In spite of replacement of PVA by PEMA, the plain and surface decorated particles were fully redispersible and stable upon storage for at least one month at 4°C.

### 3.2 Release profile of fluorescein sodium from PLGA microparticles

Most probably due to purification of the microparticles immediately after preparation the first burst release associated with dissolution of surface-bound hydrophilic label was not observed (Figure 1). Interestingly, the drug model substance was released at a fairly constant rate even over 23h corresponding to the second and third slower continuous release phase [18]. This amount corresponds to the maximum release rate since no further liberation of model drug was observed upon prolonged incubation. In case of thermo-responsive release it was reported that temperatures higher than 37°C alter the first burst phase due to morphological changes of the microparticles but the post-burst release phases remain unaltered [19]. However, no information is available about the situation at temperatures below 37°C. To date it is generally accepted that PLGA microspheres smaller than 300µm undergo homogenous or bulk degradation where the degradation rate of the surface is equivalent to that of the core [20]. The temperature-dependent parameters governing the release of 4.7µm PLGA spheres comprise the solubility and diffusion of the label as well as the mobility and degradation rate of PLGA-chains. Since fluorescein sodium is highly soluble regardless of temperature and the difference in release rate between room temperature and 37°C is quite higher than that between 4°C and room temperature, the physicochemical properties of the model drug are supposed to be of minor influence. Additionally, the release profile of entrapped fluorescein was almost the same regardless of surface modification of the microparticles with lectin. Thus it might be concluded that the enhanced release at body temperature is solely due to the hydrophobic PLGA-matrix. Such thermo-responsive release characteristics go along with storage stability at 4°C and room temperature, but with release of the API from the formulation as soon as reaching body

temperature. This might be of high interest not only for formulation of unstable biotech drugs but also for surface modification of drug loaded particulate matter.

### **3.3 Cytoadhesion studies**

In order to elucidate the effects of grafting the microparticles with WGA, Caco-2 monolayers were incubated with particles for 30min at 4°C and examined qualitatively as well as quantitatively after removal of unbound microparticles. Even microscopic inspection revealed a considerably higher number of cell-bound microparticles in case of lectin-modification as compared to plain particles, which confirms successful coupling of the lectin (Figure 2). In accordance with the release studies at 4°C, staining of cells by released dye was not observed. Performing the same experiment in 96-well plates and fluorescence reading revealed that about 1.5-fold more microparticles had bound to the cell-membrane upon surface modification with the biorecognitive lectin (Data not shown). The enhanced bioadhesion of the WGA-grafted particles derives from the strong interaction of the lectin with sialic- or N-acetyl-D-glucosamine moieties of the artificial intestinal epithelium, which resists even the washing procedure [21]. As depicted by the images, intracellular uptake of the lectinized particles does not occur since the incubation temperature of 4°C suppresses energy-dependent transport processes and the size of the particles exceeds by far that of vesicles generated during receptor-mediated endocytosis which represents the mechanism of WGA-mediated cytoinvasion [22].

### **3.4 Elucidation of the microparticle-cell interaction following a pulse-chase protocol in comparison to free fluorescein**

To investigate the mechanism of the interaction between Caco-2 monolayers and WGA-grafted fluorescein-loaded microparticles in a quantitative way, pulse-chase experiments were performed (Figure 3). Firstly, after removing the medium, the Caco-2 cell monolayers were pulse-incubated with the particle suspension for 30min at 4°C or 37°C. Since fluorescein is not released at 4°C and unbound particles were removed by washing, the RFI (relative fluorescence intensity) at 4°C represents the amount of cell-bound microparticles or cell-bound encapsulated model drug. In contrast, because of release of encapsulated fluorescein at 37°C, the cell-associated RFI of 37°C pulse incubation represents the sum of cell-bound microparticle-entrapped and cell-associated released dye. When the same amount of free fluorescein was added as the payload of the microparticles (0.35µg/mL), the amount of cell-associated model drug was fourfold higher as compared to non-grafted microparticles but only 2.7-fold higher as compared to bioadhesive microparticles after pulse incubation at 4°C. Due to higher diffusional uptake of free fluorescein, this difference slightly increases to 4.7-fold or 3.2-fold, respectively, in case of 37°C pulse incubation. Obviously, the difference in cell-associated RFI between the solution of the model drug and the microparticles mainly derives from quench of the label by the microparticles' matrix. At both temperature levels of the pulse incubation, however, the cell-associated RFI of WGA-grafted microparticles exceeded that of plain particles by about 40% on average. In accordance with the cytoadhesion studies (section 3.3), this again confirms successful covalent modification of the microparticles and their enhanced bioadhesivity as compared to lectin-free microparticles.

Secondly, after 4h of chase incubation at 37°C following pulse incubation at both temperature levels, the total fluorescence intensities were determined omitting a washing step (Figure 3, chase total). Thus, they represent the sum of the fluorescence intensities referring to both, released fluorescein in the supernatant and taken up into the cell as well as cell-bound microencapsulated model drug. In case of the microparticles, the high RFI values point to extraordinarily high thermoresponsive release of model drug which was entrapped and quenched by the PLGA matrix before. Again, the total release of lectinised-microparticles exceeded by far that of non-coated ones due to the fact that a considerably higher number of WGA-coated particles containing quenched model drug adhered to the cells as already observed (see Figure 2). In case of the fluorescence solution, no change in RFI was observed after chase incubation. Altogether, the microparticle approach is favorable since less than 10% of the model drug were finally detected when applied as a solution.

Thirdly, after removal of non-cell-associated fluorescein, the determined relative fluorescence intensity represents cell-associated fluorescein deriving from intracellularly accumulated fluorescein and microparticle-entrapped cell-bound dye (Figure 3). After pulse incubation at 4°C and chase incubation at 37°C the amount of cell-associated model drug was 2.9-fold higher when applied as microparticles and further increased to 4.2-fold in case of WGA-coated microparticles as compared to the solution. Upon incubation at body temperature the percentage of model drug delivered to the cells exceeded that of the solution 4.4-fold (non-coated microparticles) or 5.8-fold (WGA-coated microparticles). These results again confirm the superiority of the microparticle approach, which is further improved by surface modification of the particles with cytoadhesive WGA.

To visualize the course of release of the model drug from lectin-coated microparticles, preloaded Caco-2 monolayers were incubated for different time intervals at 37°C (Figure 4).

After 1h the fluorescent particles were still bound to the cells and cellular enrichment of released dye was hardly detectable. After further two hours of incubation, however, the released model drug was already taken up locally by the cells as indicated by appearance of a diffuse fluorescent corona around the microparticles in the underlying cells. Finally, after 5h of incubation at body temperature, most of the microparticles lost their label and were sparsely visible, but the majority of cells was stained by the released dye. Consequently, this set of fluorescence photos demonstrates that the presented micro-formulation is cytoadhesive due to the lectin coat and delivers the entrapped model API directly into the underlying cells in a sustained manner.

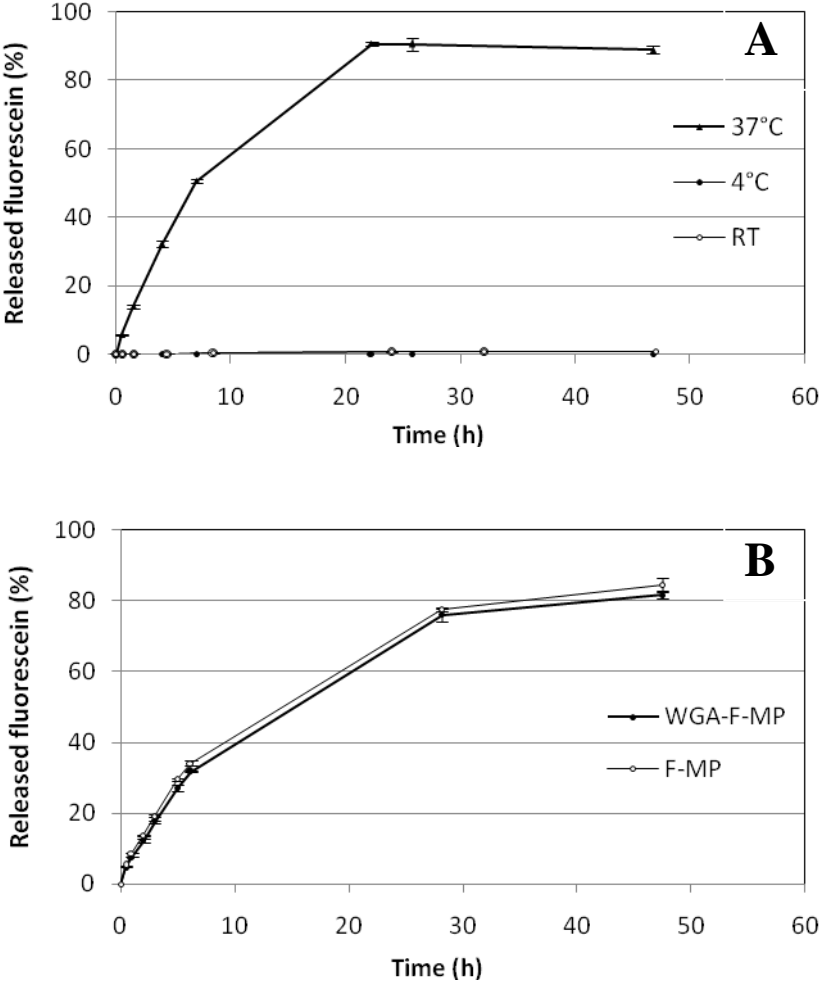


## 4. CONCLUSION

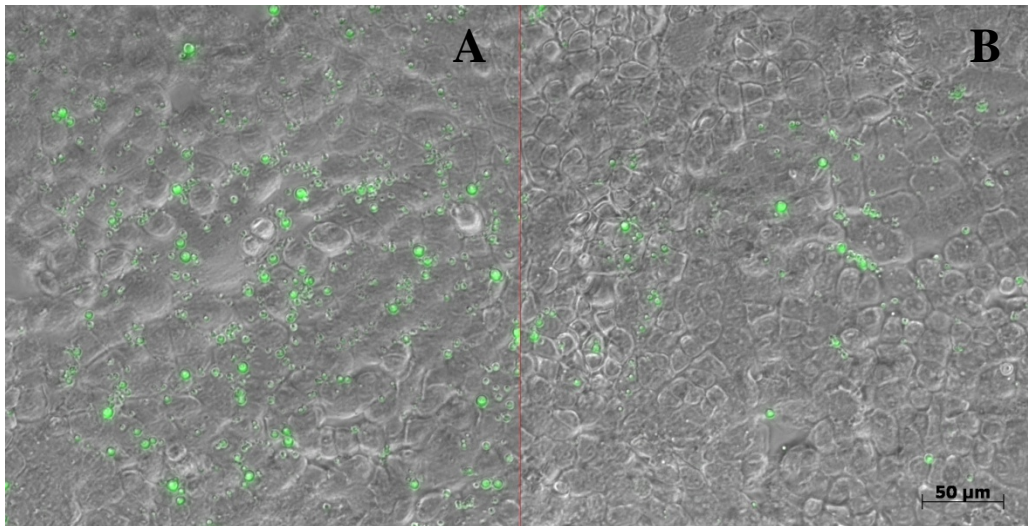
Biodegradable PLGA microparticles of 4.7 $\mu$ m in diameter were prepared by a w/o/w solvent evaporation technique using PEMA instead of a traditional stabilizer, which 7-fold increases the number of modifiable carboxylate groups at the particle surface. The particles were rendered cytoadhesive by covalent coupling of WGA and loaded with fluorescein sodium as a model API yielding a payload of 1.7 $\mu$ g/mg polymer independent from surface modification. The comparison with free model API and non-coated microparticles using Caco-2 monolayer assays revealed two notable characteristics of WGA-grafted microparticles: Firstly, the model API was only released from the microparticles at body temperature. Although the genuine mechanism remains to be elucidated, this property implies storage stability of the drug-loaded microparticle suspension at both, 4° and room temperature, which is suggested to be beneficial for drug candidates with poor storage stability. Secondly, as confirmed by fluorescence microscopy, the WGA-coat made the particles bioadhesive resulting in 1.5-fold enhanced cell-binding as compared to non-modified ones. The close vicinity of the particles to the absorptive enterocytes shortened the diffusional pathway of the drug into the cell and concurrently increased the gradient between the lumen and the cytoplasm so that enhanced intracellular uptake of the hydrophilic model drug was observed. According to quantitative pulse-chase experiments, lectin-mediated cytoadhesion increased the cellular accumulation 5.8-fold as compared to the API-solution. This confirms utility of the lectin-approach for enhanced and sustained intestinal cellular uptake of hydrophilic drugs from microparticles. Since WGA also binds to sialic acid moieties of the mucus [9], these lectin-coated particles representing bioadhesives of the second generation are expected to be firmly fixed to the absorptive epithelium in-vivo due to double anchoring. As this concept would not only be

useful for delivery of hydrophilic low MW, but also other poorly absorbable low and high MW drugs from the biotech pipeline, the feasibility of this approach will be tested with other active compounds in future.

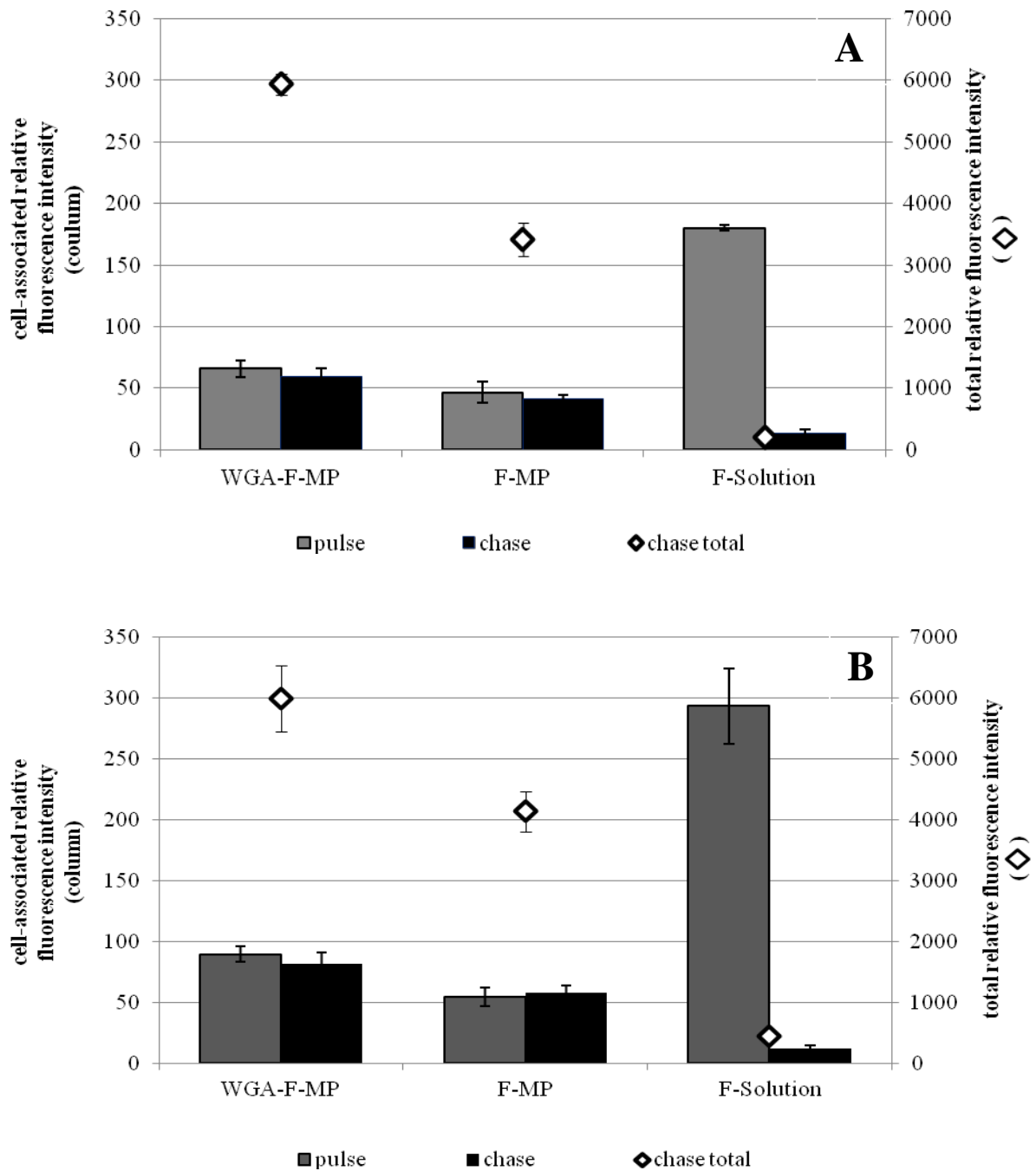
**FIGURES**



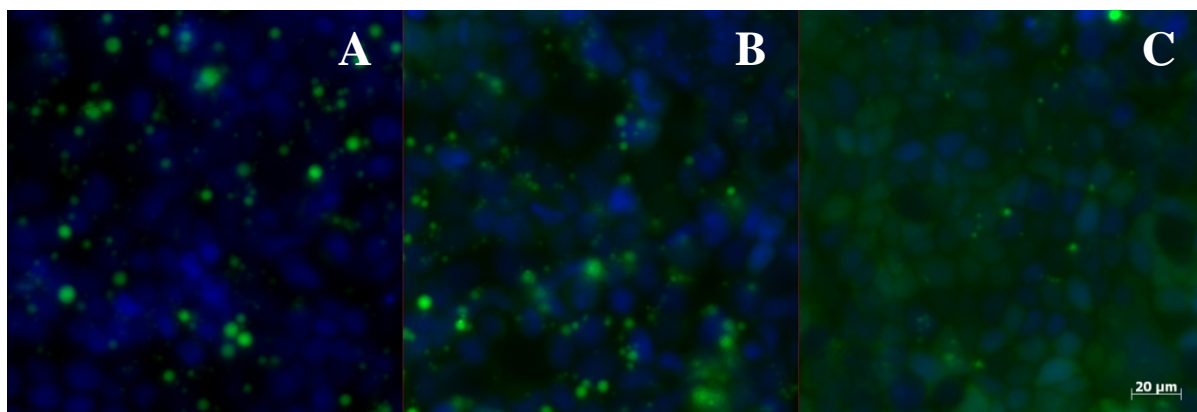
**Figure 1.** Release of fluorescein sodium from PLGA microparticles. Figure A depicts the release profile from microparticles before WGA conjugation at three different temperature levels (4°C, 37°C, and room temperature (RT)). Figure B shows the liberation at 37°C before (Fluorescein sodium-microparticles, F-MP) and after WGA conjugation (WGA-fluorescein sodium-microparticles, WGA-F-MP) (SD  $\leq$  2.16, n=3).



**Figure 2.** Overlay of differential interference contrast and fluorescence images of Caco-2 monolayers incubated with WGA-grafted fluorescein-loaded PLGA microparticles (A) and the same particles without WGA grafting (B) for 30 min at 4°C followed by two washing steps.



**Figure 3.** Comparison between WGA-grafted fluorescein-loaded microparticles (WGA-F-MP), fluorescein-loaded microparticles (F-MP; 200 $\mu$ g/ml) and fluorescein in aqueous solution (F-Solution; 0.35  $\mu$ g/mL) after pulse incubation at 4°C for 30min and chase incubation at 37°C for 4h (A) or pulse incubation at 37°C for 30 min and chase incubation at 37°C for 4 h (B). The grey columns (pulse incubation) and black columns (chase incubation) refer to the y-axis on the left, which represents the cell-associated relative fluorescence intensity after pulse or chase incubation after removal of free fluorescein. The diamonds (chase total) refer to the y-axis on the right, which represents the total relative fluorescence intensity after chase incubation without washing.



**Figure 4.** Fluorescence microscopic images of the Caco-2-binding of WGA-grafted fluorescein-loaded microparticles followed by release and cellular-uptake of encapsulated fluorescein sodium (green) at 37°C after 1 h (A), 3 h (B) and 5 h (C). The nuclei of the cells were stained in blue by Hoechst 33342.

## REFERENCES

- [1]<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/ucm084292.htm>
- [2]R.C.Mundargi, V.R.Babu, V.Rangaswamy, P.Patel, T.M.Aminabhavi, Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives, *J Control Release*, 125 (2008) 193-209.
- [3]M. Rafi, S.M. Singh, V. Kanchan, C.K. Anish, A.K. Panda, Controlled release of bioactive recombinant human growth hormone from PLGA microparticles, *J Microencapsul*, 27 (6) (2010) 552-560.
- [4]W. Bao, J. Zhou, J. Luo, D. Wu, PLGA microspheres with high drug loading and high encapsulation efficiency prepared by a novel solvent evaporation technique, *J Microencapsul*, 23 (5) (2006) 471-479.
- [5]E. Garbayo, E. Ansorena, J.L. Lanciego, M.S. Aymerich, M.J. Blanco-Prieto, Sustained release of bioactive glycosylated glial cell-line derived neurotrophic factor from biodegradable polymeric microspheres, *Eur J Pharm Biopharm*, 69 (3) (2008) 844-851.
- [6]M. Manocha, P.C. Pal, K.T. Chitralkha, B.E. Thomas, V. Tripathi, S.D. Gupta, R. Paranjape, S. Kulkarni, D.N. Rao, Enhanced mucosal and systemic immune response with intranasal immunization of mice with HIV peptides entrapped in PLG microparticles in combination with *Ulex Europaeus*-I lectin as M cell target, *Vaccine*, 23 (2005) 5599-617.
- [7]M. Ye, S. Kim, K. Park, Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles, *J Control Release*, 146 (2010) 241-260.
- [8]C. Bies, C.-M. Lehr, J. F. Woodley, Lectin-mediated drug targeting: history and applications, *Adv Drug Del Rev*, 56(2004) 425-435.
- [9]M. Wirth, K. Gerhardt, C. Wurm, F. Gabor, Lectin-mediated drug delivery: influence of mucin on cytoadhesion of plant lectins in vitro, *J Control Release*, 79 (2002) 183-191.

- [10]G. Ratzinger, P. Agrawal, W. Körner, J. Lonkai, H.M.H.F. Sanders, E. Terreno, M. Wirth, G.J. Strijkers, K. Nicolay, F. Gabor, Surface modification of PLGA nanospheres with Gd-DTPA and Gd-DOTA for high-relaxivity MRI contrast agents, *Biomaterials*, 31 (33) (2010) 8716-8723.
- [11]G. Ratzinger, X. Wang, M. Wirth, F. Gabor, Targeted PLGA microparticles as a novel concept for treatment of lactose intolerance, *J Control Release*, 147 (2) (2010) 187-192.
- [12]F. Roth-Walter, I. Schöll, E. Untersmayr, A. Ellinger, G. Boltz-Nitulescu, O. Scheiner, F. Gabor, E. Jensen-Jarolim, Mucosal targeting of allergen-loaded microspheres by Aleuria aurantia lectin, *Vaccine*, 23 (21) (2005) 2703-2710.
- [13]A. Weissenböck, M. Wirth, F. Gabor, WGA-grafted PLGA-nanospheres: Preparation and association with Caco-2 single cells, *J Control Release*, 99 (3) (2004) 383-392.
- [14]M. E. Keegan, S. M. Royce, T. Fahmy, W. M. Saltzman, In vitro evaluation of biodegradable microspheres with surface-bound ligands, *J Control Release*, 110 (2006) 574-580.
- [15]M. E. Keegan, J. L. Falcone, T. C. Leung, W. M. Saltzman, Biodegradable Microspheres with Enhanced Capacity for Covalently Bound Surface Ligands, *Macromolecules*, 37 (2004) 9779-9784.
- [16]M.P. Desai, V. Labhsetwar, E. Walter, R. J. Levy, G. L. Amidon, The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent, *Pharm Res*, 14 (1997) 1568-1573.
- [17]A. T. Florence, Nanoparticle uptake by the oral route: Fulfilling its potential?, *Drug Discov Today*, 2 (1) (2005) 75-81.



- [18]N. Faisant, J. Akiki, F. Siepmann, J.P. Benoit, J. Siepmann, Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: Experiment and theory, *Int J Pharm*, 314 (2006) 189-197.
- [19]B.S. Zolnik, P.E. Leary, D.J. Burgess, Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres, *J Control Release*, 112 (2006) 293-200.
- [20]J.M. Anderson, M.S. Shive, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Adv Drug Del Rev* 28 (1997) 5-24.
- [21]H.-J. Gabius, *The Sugar Code*, first ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- [22]F. Gabor, M. Wirth, Lectin-mediated drug delivery: fundamentals and perspectives, *STP Pharma Sci* 13 (2003) 3-16.

## **7. Zusammenfassung**

Bioabbaubare PLGA-Mikropartikel mit einem Durchmesser von 4,7µm und einer Fluorescein-Einbaurrate von 1,7µg/mg PLGA wurden nach der Doppelemulsionstechnik hergestellt. Dabei wurde PEMA an Stelle des üblicherweise verwendeten Stabilisators PVA eingesetzt. Dadurch wurde die Anzahl der zur Oberflächenmodifikation verfügbaren Carboxylgruppen der Partikel um das 7-fache erhöht. Die Oberfläche der Mikropartikel wurde mit WGA modifiziert, um die Freisetzungseigenschaft und die bioadhäsiven Eigenschaften von Lektin-hältigen Formulierungen in-vitro zu untersuchen. Die Mikropartikel zeigten eine temperaturabhängige Freisetzung, da weder bei 4°C noch bei Raumtemperatur freies Fluorescein detektiert wurde. Bei 37°C, der Körpertemperatur, wurden jedoch mehr als 80% der eingebauten Fluoresceinmenge innerhalb von 48h freigesetzt. Die Bindungsrate der Lektin-modifizierten Partikel an Caco-2 Monolayer als Modell für das menschliche Darmepithel war 1,5mal höher als jene von nicht-modifizierten Partikeln. Durch die räumliche Nähe der Partikel zu den absorbierenden Enterozyten wurde der Diffusionsweg des Wirkstoffes in die Zellen stark verkürzt und gleichzeitig der Gradient zwischen Lumen und Zytoplasma erhöht, wodurch eine erhöhte intrazelluläre Aufnahme des hydrophilen Modellarzneistoffes beobachtet wurde. Außerdem war der Gehalt an Fluorescein, das an die Zellen gebunden und von diesen aufgenommen wurde, nach vierstündiger Inkubation bei 37°C 5,8mal höher verglichen mit Fluorescein als Lösung. Fluoreszenzmikroskopische Bilder zeigten, dass nach fünfstündiger Inkubation bei 37°C ein beträchtlicher Anteil der gesamten, ursprünglich in den Partikeln eingebauten, Fluoresceinmenge intrazellulär angereichert ist. Diese Ergebnisse bestätigen nicht nur den Nutzen von bioadhäsiven Formulierungen der zweiten Generation für eine verbesserte und lang anhaltende intestinale Aufnahme von

hydrophilen Verbindungen mit einem niedrigen Molekulargewicht und anderen schlecht resorbierbaren Wirkstoffen, sondern auch die Lagerstabilität derartiger Partikelsuspensionen bei 4°C und bei Raumtemperatur ohne einen vorzeitigen Wirkstoffverlust, was für Arzneistoffe mit geringer Lagerstabilität vorteilhaft ist.

## 8. Englische Zusammenfassung

Biodegradable PLGA-microparticles of an average diameter of 4.7 $\mu$ m and loaded with 1.7 $\mu$ g fluorescein / mg PLGA were prepared by the double emulsion technique, but instead of PVA, a traditional stabilizer, PEMA was used, which increased the number of modifiable carboxylate groups at the particle surface 7-fold. The microparticles were coated with WGA to present the release and bioadhesive characteristics of lectin-coupled formulations in vitro. The microparticles showed a thermoresponsive release since no free fluorescein was detected at 4°C or at room temperature. But at 37°C, the body temperature, more than 80% of the entrapped fluorescein was liberated within 48h. The adhesion of lectin-coupled particles to Caco-2 monolayers used as a model for the human intestinal epithelium was 1.5-fold as high as the adhesion of the non-modified microparticles. Based on the closeness of the particles to the absorptive enterocytes, the diffusional pathway of the drug into the cells was shortened and simultaneously the gradient between the lumen and the cytoplasm was increased so that enhanced intracellular uptake of the hydrophilic model drug was observed. Furthermore, the amount of fluorescein bound and taken up into the cells was 5.8-fold higher after incubation at 37°C for 4h as compared to fluorescein in solution. According to the images made with the help of the fluorescence-microscope a considerable amount of the fluorescein payload was accumulated intracellularly after incubation at 37°C for 5h. These results not only confirm the utility of bioadhesive formulations of the second generation for improved and sustained intestinal cellular uptake of hydrophilic drugs with low molecular weight and other poorly absorbable drugs, but also storage stability of such particle-suspensions at 4°C and at room temperature without any premature loss of active agent, which is an advantage for drugs of a poor storage stability.



## 9. Curriculum vitae

### Persönliche Daten:

Name: Koller Romana  
Adresse: Rabnitzstraße 18  
7373 Piringsdorf  
Bgld / Österreich  
Telefonnr. 0680/2199035  
E-Mail: romi-koller@gmx.at  
Geburtsdatum: 17.Dez.1986  
Geburtsort: Oberpullendorf  
Familienstand: ledig  
Staatsbürgerschaft: Österreich

Meine Mutter: Koller Christine  
AHS-Lehrerin in Oberpullendorf (Englisch, Russisch)

Mein Vater: Koller Franz  
Berufsschullehrer in Eisenstadt (Maler und Anstreicher)

Meine Geschwister: Andreas (26) ist Volksschullehrer in Wien, 16. Bezirk  
Martin (25) ist Labortechniker bei AC<sup>2</sup>T-Research in Wiener Neustadt

### Bildungsweg:

#### Schulausbildung:

1993-1997 Volksschule in Piringsdorf  
1997-2005 Gymnasium in Oberpullendorf  
2005 Matura am Gymnasium Oberpullendorf

**Berufsausbildung:**

WS 2005 - SS 2011	Pharmaziestudium an der Universität Wien
WS 2005 - SS 2007	1. Studienabschnitt
SS 2007 - WS 2010	2. Studienabschnitt
SS 2011	3. Studienabschnitt
Okt. 2010 - März 2011	Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische Technologie

**Praktika:**

2008	Ferialpraxis in der Apotheke „zum Schwarzen Adler“ in Weppersdorf (Juli, August)
2009	Ferialpraxis in der „Salvator-Apotheke“ in Mattersburg (Juli, August)
2010	Ferialpraxis in der „Salvator-Apotheke“ in Mattersburg (Juli)
WS 2010/11	Tutorium an der Universität Wien: Grundpraktikum aus Pharmazeutischer Technologie
SS 2011	Tutorium an der Universität Wien: Industrielle Arzneimittelherstellung