



HAL
open science

Mise au point et développement de microparticules biodégradables contenant une protéine à l'état solide

Alexandra Giteau

► **To cite this version:**

Alexandra Giteau. Mise au point et développement de microparticules biodégradables contenant une protéine à l'état solide. Sciences pharmaceutiques. Université d'Angers, 2007. Français. NNT : . tel-00346463

HAL Id: tel-00346463

<https://theses.hal.science/tel-00346463>

Submitted on 11 Dec 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**MISE AU POINT ET DEVELOPPEMENT DE
MICROPARTICULES BIODEGRADABLES CONTENANT UNE
PROTEINE A L'ETAT SOLIDE**

THESE DE DOCTORAT

en pharmacologie expérimentale et clinique

ECOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

le 14 décembre 2007

à Angers

par **Alexandra GITEAU**

Devant le jury ci-dessous :

Professeur Jean COUDANE, Université de Montpellier

Rapporteur

Professeur Alf LAMPRECHT, Université de Franche-Comté

Rapporteur

Professeur Jean-Pierre BENOIT, Université d'Angers

Examineur

Docteur Sylvain HUILLE, Laboratoire LFB

Examineur

Docteur Marie-Claire VENIER-JULIENNE, Université d'Angers

Directeur de thèse

INSERM U646, Ingénierie de la vectorisation particulière

IBT, 10 Rue André Boquel, 49 100 Angers, France

Je remercie sincèrement les membres du Jury pour avoir accepté et pris le temps de juger ce travail.

Monsieur Jean-Pierre BENOIT, Professeur à l'Université d'Angers et Directeur de l'Unité INSERM U646

Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire où j'ai pu préparé ma thèse dans les meilleures conditions. Merci aussi de m'avoir fait confiance au cours de ce projet et de m'avoir permis d'orienter librement mes travaux. Vos grandes compétences et votre ferveur m'ont fortement encouragée.

*Monsieur Jean COUDANE, Professeur à l'Université de Montpellier
De me faire l'honneur de juger cette thèse*

*Monsieur Alf LAMPRECHT, Professeur de l'Université de Franche-Comté
De me faire l'honneur d'être rapporteur de ce travail*

*Monsieur le Docteur Sylvain HUILLE, Direction du Développement Biopharmaceutique au Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies
De me faire l'honneur de participer à ce Jury*

*Madame Marie-Claire VENIER-JULIENNE, Professeur à l'Université d'Angers
Je te remercie amicalement de m'avoir encadrée sans relâche. Pendant ces quatre années passées ensemble, j'ai vraiment apprécié ta rigueur, ton investissement et tes grandes valeurs humaines. Malgré mon hésitation à m'engager dans cette thèse au début, je peux aujourd'hui dire que ça en valait la peine ; tu m'as permis d'en tirer les meilleurs enseignements.*

Un grand merci aussi

Au Docteur Claudia MONTERO-MENEI avec qui j'ai pu approché le domaine de l'ingénierie tissulaire. Nos réunions « Genostem » (au labo ou en Crête) furent un réel plaisir. Merci de m'avoir souvent fait confiance et de m'avoir appuyé (pour mon futur).

Au Professeur Jean-Luc COURTHAUDON pour ses commentaires de biochimie, notamment pour la rédaction des articles.

Au Professeurs Patrick SAULNIER et Franck BOURY pour leurs conseils en physico-chimie et aussi pour leur sympathie.

Au Professeur VERDIER et au Docteur Stéphane MARCHAL de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes de Montpellier pour leur investissement dans la caractérisation structurale des protéines.

Au Docteur Xavier GARRIC de l'institut des Biomolécules Max Mousseron à Montpellier pour son aide précieuse dans la compréhension du comportement des polymères.

Au Professeur Igor CHOURPA de la faculté de pharmacie de Tours pour la caractérisation du lysozyme en spectrométrie Raman.

Au Professeur Christine JEROME du centre d'Etude et de Recherche sur les Macromolécules à Liège pour m'avoir permis de tester des types variés de polymères.

Au Professeur Michèle SERGENT du Laboratoire de la Méthodologie de la Recherche Expérimentale à Marseille pour ses conseils dans l'analyse des plans d'expériences et pour m'avoir permis de me former au criblage.

Au Docteurs Gérald LARCHER et Catherine GUET de l'Université d'Angers pour leurs conseils en biochimie.

A Monsieur Robert FILMON du service commun d'imagerie et de microscopie de l'Université d'Angers qui a réalisé les clichés de microscopie électronique à balayage et confocale.

Enfin, je remercie vivement les membres du laboratoire pour ces bons moments.

Je remercie Olivier Thomas pour nos longues discussions sur la cinétique de libération et les facteurs de croissance. Travailler avec toi fût très agréable et enrichissant. Je suis très heureuse que tu aies eu le poste d'ingénieur d'études.

Merci à Anne Aubert-Pouëssel pour m'avoir facilité mon début de thèse en me transmettant ses connaissances sur le difficile sujet de la microencapsulation de protéines.

Merci aux stagiaires qui m'ont aidé dans ce projet : Inge Grosse, Stéphanie David, Adeline Knapp, Virginie Malinge, Christine Koerner, Jean-Pierre Karam et Van Thanh Tran.

Merci à mes collègues de bureau passés et présents.

Anne S. Pour ta disponibilité et ta bonne humeur. Je n'ai pas assez pris de nouvelles pendant la dernière ligne droite, mais je vais me rattraper.

Arnaud, on a passé 3 ans et demi inoubliables et toujours avec humour; j'espère que tu n'auras pas perdu ton accent à ton retour.

Archi... j'ai rarement vu quelqu'un de plus généreux. Tu sais, ce n'est pas grave si tout le monde ne mange pas en même temps.

A notre lady D from Paris, merci pour son dynamisme. Et non, je peux le dire maintenant, tu n'es pas bavarde !

Ali, Arnaud V, Catherine, Delphine, Emilie R (« ROGER », ne change rien !), Emilien, Erika, Gaétan, Jérôme, Kamel, Matthieu, Marie, Mathilde (Salut MR), Mitou (bon courage pour la dernière année !), Nolwenn, Franck (dit Papa), Nico, Thomas, Valérie... Que de souvenirs de virées au RU, de blagounettes, de match de foot, de soirées... Bon vent

Bien sûr, je n'oublierai pas Jacqueline, Mimi, Edith, Anne C et Laurence qui perpétuent l'ambiance chaleureuse du labo.

Merci à mes amis et à ma famille qui ont accepté mon engagement pour ma thèse. Laurent, merci d'avoir compris mon objectif, de m'avoir soutenue, d'avoir été si patient mais aussi pour tous nos agréables moments qui m'ont permis de trouver le bon équilibre.

J'adresse aussi mes remerciements au Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche et au projet intégré LSHB-CT-2003-503161 Genostem pour leur soutien financier.

INTRODUCTION GENERALE		1
	1. Les microsphères de PLGA : un outil pour l'ingénierie tissulaire	1
	2. Instabilité des protéines lors des étapes d'encapsulation et de libération à partir de microsphères de PLGA	5
	3. Objectifs du travail	9
CHAPITRE 1	La libération incomplète et non continue d'une protéine à partir de microparticules biodégradables	15
	“How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles?”	
CHAPITRE 2	1. Mise au point d'une méthode de stabilisation d'une protéine lors de son encapsulation dans des microsphères de PLGA	45
	“Reversible protein precipitation to ensure its stability during encapsulation within PLGA microspheres”	
	2. Application à des facteurs de croissance	73
CHAPITRE 3	Optimisation du profil de libération <i>in vitro</i> du lysozyme à partir de microsphères biodégradables	85
	“Effect of various additives and polymers on in vitro release of lysozyme from PLA/GA microspheres prepared by a novel s/o/w emulsion technique”	
DISCUSSION GENERALE		113
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		130
ANNEXE	Etude du criblage des facteurs influents sur la formulation de microsphères de PLGA de 60µm	133

B

BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovine serum albumin

C

CD	circular dichroism
----	--------------------

D

DMSO	dimethyl sulfoxide
------	--------------------

E

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPO	erythropoietin

F

FDA	food and drug administration
FGF	fibroblast growth factor
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy

G

GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GuHCl	guanidine hydrochloride
GH	growth hormone

H

HP β CD	2-hydroxylpropyl- β -cyclodextrin
HSA	human serum albumin

I

IGF	insulin-like growth factor
-----	----------------------------

M

MEC	matrice extra-cellulaire
MIAMI	marrow isolated adult multipotent inducible

MPA microcarriers pharmacologiquement actifs

MSC mesenchymal stem cell

Mw molecular weight

N

NGF nerve growth factor

P

PBS phosphate buffer saline

PEG polyethylene glycol

PELA polylactide-co-poly(ethylene glycol)

pI point isoélectrique

PLGA poly(lactic-co-glycolic acid)

PVA poly(vinyl alcohol)

R

rh recombinant human

S

SAIB sucrose acetate isobutyrate

SDS-PAGE sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis

s/o/w solid-in-oil-in-water

s/o/o solid-in-oil-in-oil

T

TGF- β transforming growth factor- β

TRIS tris(hydroxymethyl)aminomethane

W

w/o/w water-in-oil-in-water

w/o/o water-in-oil-in-oil

INTRODUCTION GENERALE

1 Les microsphères de PLGA : un outil pour l'ingénierie tissulaire

Certains organes et/ou tissus peuvent être irrémédiablement endommagés après une blessure ou une maladie. C'est le cas de tissus tels que le cœur ou le tissu nerveux qui ont une capacité limitée d'autoréparation chez l'adulte. Les tissus contenant des cellules capables de se régénérer totalement après une blessure ou subissant des auto-renouvellements constants (peau, muqueuse intestinale, moelle osseuse), peuvent être, eux aussi, incapables de se reconstituer totalement en raison de nombreux facteurs tels que la taille de la blessure, sa cause et l'âge de la personne. La thérapie cellulaire pourrait être utilisée pour reconstituer ces organes détruits ou remplacer les cellules déficientes. Elle consiste en l'implantation de cellules vivantes dans les organes et/ou tissus lésés. Ces cellules vont ensuite s'intégrer dans le parenchyme et répondre aux signaux du microenvironnement. Certains domaines thérapeutiques font déjà appel aux thérapies cellulaires et tissulaires, tels que le traitement des brûlures (greffe de peau) et de certaines maladies du sang (leucémies, anémies avec la greffe de cellules souches hématopoïétiques).

Pour des organes plus complexes, les travaux sur les cellules souches humaines ouvrent de nouvelles perspectives. En effet, leurs capacités de différenciation et de prolifération offrent un champ d'approches thérapeutiques plus important. Plutôt que d'utiliser des cellules souches embryonnaires dont l'emploi est limité pour des raisons éthiques, des cellules souches prélevées chez l'adulte peuvent être utilisées. Ces cellules souches somatiques peuvent être directement prélevées chez le patient, différenciées *in vitro* en un type cellulaire désiré et réintroduites chez le patient pour reconstituer l'organe blessé ou malade (**Figure 1**).

En France, le traitement de l'insuffisance cardiaque par des cellules souches musculaires adultes a été expérimenté par l'équipe du Pr. Menasché (Hôpital G. Pompidou, Paris) [1]. Des myoblastes autologues ont été prélevés dans le muscle squelettique de la cuisse de patients souffrant d'une insuffisance cardiaque, cultivés et réimplantés dans la zone infarctée du cœur de ces patients. Une amélioration de la contractilité du myocarde chez ces

patients a été observée mais les résultats sont mitigés; ces cellules musculaires ont été incapables de donner naissance à de nouveaux cardiomyocytes. L'effet thérapeutique escompté n'a pas été observé principalement à cause de la faible survie des cellules greffées et de leur potentiel de différenciation limité.

Des cellules souches adultes médullaires peuvent aussi être utilisées et plus particulièrement les CSM (cellules souches mésenchymateuses) pour la régénération des tissus conjonctifs. Il a même été montré qu'une sous-population de CSM humaines plus primitives avec un potentiel de différenciation plus large, les cellules MIAMI (« Marrow Isolated Adult Multipotent Inducible »), avaient la capacité de se différencier en cellules de type neuronal dans certaines conditions [2, 3]. Cependant, le nombre de cellules différenciées est très faible. Là aussi, l'intégration des cellules implantées dans le tissu hôte et leur différenciation doivent donc être améliorées. C'est pourquoi le potentiel de régénération des cellules souches a été associé, ces dernières années, à des matériaux de soutien et à des molécules actives sur la différenciation et la régénération tissulaire, les facteurs de différenciation et de croissance (**Figure 1**) [4-7].

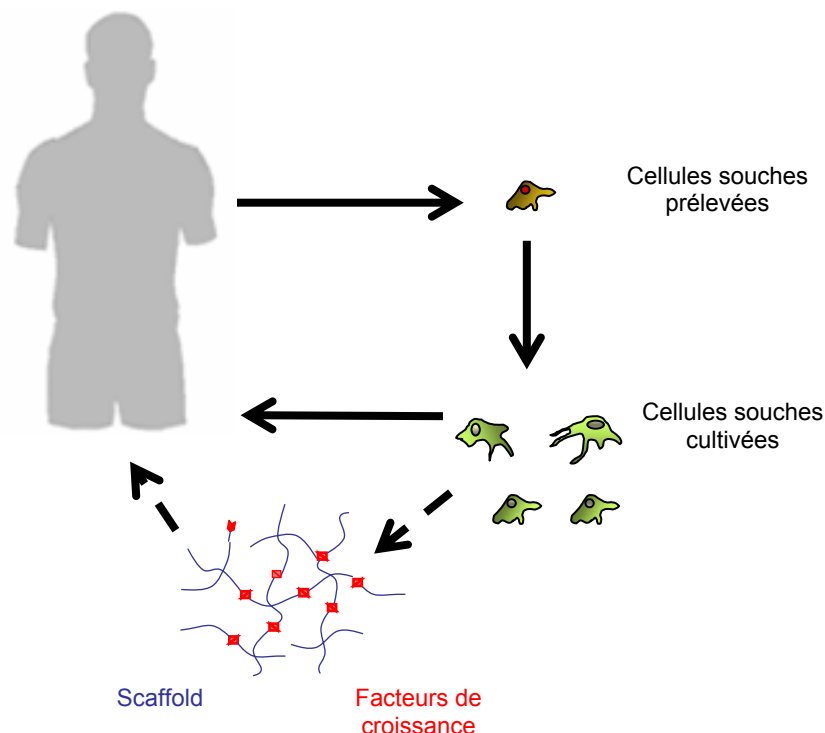


Figure 1. Principes généraux de la thérapie cellulaire et de l'ingénierie tissulaire. Les cellules souches sont isolées du patient puis cultivées et modifiées. Elles ont ensuite implantées dans la zone lésée éventuellement associées à un scaffold et à des facteurs de croissance.

L'adhérence de cellules à un support est un procédé de base pour stimuler la prolifération *in vitro*. C'est pourquoi, dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, l'adhérence des cellules à un biomatériau (scaffold) est communément réalisée. Des microcarriers de dextran (Cytodex[®]) ou de verre permettent ainsi d'augmenter la survie de cellules greffées [8]. De plus, comme l'attachement des cellules à une surface biomimétique peut induire une différenciation cellulaire [9], l'utilisation de molécules dérivées de la matrice extracellulaire (MEC) ou les mimant [10] est particulièrement intéressante. Dans ce contexte, de nombreux biomatériaux ont été testés [10-13]. Des hydrogels naturels (de collagène [14, 15], d'acide hyaluronique [16], de fibrine [17]...) ou synthétiques (à base de PEG [18-21], de polyfumarates [22, 23] ...), des matériaux solides lipophiles (dérivés de l'acide lactique et de l'acide glycolique [14, 24-26], Ethylène vinyle acétate (EVA) [27]...) ou leur combinaison ont ainsi été utilisés.

Un autre moyen d'améliorer l'intégration des cellules implantées consiste en l'apport, au site d'implantation, de facteurs de différenciation et de croissance. Ceux-ci permettent de réguler l'activité de cellules qui contrôlent la formation et la régénération des tissus. Toutefois, ces molécules ont des actions pléiotropiques, ce qui rend leur administration par voie systémique problématique. De plus, étant rapidement dégradées par l'organisme, elles doivent être administrées en quantités importantes ce qui entraîne des coûts élevés et des effets secondaires non maîtrisés. Il est donc essentiel de pouvoir contrôler l'effet de ces protéines par l'utilisation d'un système de libération qui potentialise leur activité de façon locale et durable.

La libération de protéines localement et de façon continue peut être assurée par la thérapie génique, en utilisant des plasmides ou des virus pour transfecter des cellules [28]. Cependant, le manque de contrôle de cette stratégie limite son intérêt et l'administration locale de protéines à partir de systèmes d'administration apparaît plus maîtrisable.

Ainsi, les facteurs de croissance d'intérêt pour la thérapie cellulaire ont été incorporés dans des microparticules polymères, des liposomes, des hydrogels, des mousses..., selon le type de matériau utilisé et l'organe ciblé.

Les matériaux utilisés pour assurer la libération contrôlée et localisée de protéines doivent être biologiquement compatibles et biodégradables; ils doivent garantir la stabilité des protéines et assurer leur libération pendant une durée suffisamment longue. Dans le cas particulier de l'ingénierie tissulaire, le matériau choisi peut avoir des propriétés mécaniques et élastiques propices à l'attachement des cellules et à leur différenciation. Des matériaux d'origine naturelle et synthétique ont été utilisés dans ce but [29-31].

Parmi les matériaux naturels, le collagène, la gélatine, l'acide hyaluronique, l'alginate, la fibrine, le dextran et le chitosan ont souvent été étudiés. L'avantage de ces matériaux réside dans leurs activités physiologiques, leurs propriétés mécaniques et leur biodégradabilité. Cependant, ils peuvent être immunogènes ou sources de contaminations virales. De plus, la rapide diffusion des protéines à partir de systèmes d'administration constitués de ces polymères nécessite de les adapter pour prolonger la durée de libération. Par exemple, la composition chimique du polymère peut être modifiée pour améliorer l'interaction avec la substance libérée. Des microsphères de gélatine acide ont ainsi pu retenir le TGF- β 1 (transforming growth factor) par complexation électrostatique [32].

De nombreux autres polymères biodégradables d'origine synthétique ont été utilisés pour l'administration de protéines en thérapie cellulaire comme l'acide polylactique (PLA), le copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique (PLGA), l'alcool polyvinylique (PVA), et le poly(éthylène glycol). En plus, d'être non immunogènes, ces matériaux ont l'avantage de pouvoir être produits à grande échelle ainsi que d'avoir une structure modifiable. Les polyesters de PLA et PLGA ont été les polymères préférentiellement utilisés. Disponibles dans diverses masses molaires et rapports des unités lactiques et glycoliques, leur vitesse de dégradation peut être facilement contrôlée. De plus, ils sont approuvés par la FDA pour une administration parentérale. Ils sont ainsi utilisés dans diverses applications pharmaceutiques, notamment pour l'administration de peptides à partir de microsphères ou d'implants (**Tableau 1**).

Plus particulièrement, un système à base de PLGA a été développé par notre équipe pour améliorer l'intégration des cellules souches dans le tissu hôte : les MPA (microcarriers pharmacologiquement actifs) (**Figure 2**) [33]. Cet outil permet à la fois d'administrer des facteurs de croissance et de constituer un support matriciel synthétique pour les cellules. Il est constitué de microparticules de PLGA d'une soixantaine de microns recouvertes d'une surface biomimétique et libérant de façon prolongée un facteur de croissance. Leur surface constitue un support pour des cellules.

L'une des principales causes de la déstabilisation des protéines dans les microsphères de PLGA est lié à leur préparation. Parmi les différentes techniques de préparation [34], la technique de double émulsion eau/huile/eau (E/H/E) ou « water-in-oil-in-water » (w/o/w) a été la plus utilisée pour encapsuler des protéines en raison de sa simplicité et de son efficacité [35-37]. La protéine en solution (« water », w) est émulsionnée dans la phase organique (« oil », o). Cette phase organique constituée du polymère dissous dans un solvant volatil est ensuite dispersée dans un milieu non miscible (« water », w) afin de former une seconde émulsion (« oil in water », o/w), d'où le terme de double émulsion. Sous agitation, l'évaporation du solvant entraîne la formation des microsphères.

Tableau 1. Exemples de formes à libération prolongée injectables de peptide et protéines actuellement commercialisées en France ou en développement.

Formulation	Nom	Type de molécule	Durée d'action	Statut	Société
PEGylation	Pegasys TM	Interféron pegylé	1 semaine	Commercialisé	Roche
Nanoparticules de poly aminoacides (Medusa [®])	Basuline [®]	Insuline	24 heures	Phase IIa	Flamel
	IFN alpha-2b XL [®]	Interféron	1 semaine	Phase I/II	
	IL-2 XL [®]	Cytokine	1 semaine	Phase I/II	
Microsphères de PEGT-PBT (Polyactive [®])	Locteron [®]	Interféron	2 semaines	Phase IIa	OctoPlus/ Biolex Therapeutics
Microsphères de peptide et de polymère hydrosoluble (Promaxx [®])	Leupromaxx [®]	Analogue LH-RH	1 et 3 mois	Phase II	Baxter/Teva
Microsphères de PLGA	Enantone [®] LP	Analogue LH-RH	1 mois et 3 mois	Commercialisé	Takeda Pharma Beaufour Ipsen Pharma Ferring Novartis
	Decapeptyl [®] LP	Analogues LH-RH	1 mois et 3 mois	Commercialisé	
	Gonapeptyl [®] LP	Analogues LH-RH	1 mois	Commercialisé	
	Sandostatine [®] LP	Analogue de la somatostatine	2 semaines	Commercialisé	
	Somatuline [®] LP	Analogue de la somatostatine	4 semaines	Commercialisé	Beaufour Ipsen Pharma
Implants de PLGA	Bigonist [®]	Analogue LH-RH	2 mois	Commercialisé	Sanofi-Aventis AstraZeneca
	Zoladex [®] LA	Analogue LH-RH	3 mois	Commercialisé	
Précipité <i>in situ</i> (PLGA + N-méthyl-2-pyrrolidone) (Atrigel [®])	Eligard [®]	Analogue LH-RH	1 à 6 mois	Commercialisé	Astellas Pharma

La formation d'une interface eau/solvant organique, le contact avec une surface hydrophobe (polymère), les forces mécaniques utilisées pour créer l'émulsion primaire et la déshydratation lors de la lyophilisation peuvent induire des modifications chimiques et

structurales des protéines lors de cette étape (**Figure 3**) [38, 39]. Pour pallier à ces inconvénients, différentes stratégies ont été développées comme l'utilisation de sucres [40-42], de PEG [43], de tensioactifs [44, 45], de protéines [46, 47] et de sels [36] mais rares sont les méthodes universelles qui ont été développées [39, 48-51]. La création de l'émulsion primaire eau dans huile est notamment l'un des facteurs majeurs contribuant à l'inactivation et à l'agrégation protéique lors de l'encapsulation par double émulsion. L'émulsification conduit à la création d'une large interface eau/solvant organique. Les protéines s'adsorbent à cette interface, se déplient et s'agrègent ou subissent d'autres modifications conduisant à leur inactivation biologique [46, 52]. Diverses stratégies ont été proposées pour éviter l'interface eau/solvant organique. Ainsi, des microsphères de structure hétérogène, constituées d'une matrice polymère de PLGA et de microparticules internes hydrophiles composées d'agarose (1-5 μm) [53], de PVA, de gélatine ou de poly(acryloyl-hydroxyéthyl amidon) (0,5-2 μm) [54] contenant une protéine ont été préparées. La dissolution de la protéine dans le solvant organique par association de paires d'ions (« Hydrophobic Ion Pairing ») permet également de s'affranchir de cette interface [55, 56]. Par cette méthode, la protéine est complexée à un tensioactif ionique avant encapsulation pour améliorer sa solubilité dans les solvants organiques. Les détergents anioniques sont préférés aux détergents cationiques pour une meilleure tolérance. Ainsi, l'utilisation de tels tensioactifs nécessite que la protéine soit chargée positivement. Pour les protéines de faible pH isoélectrique (chargées négativement à pH neutre), cette stratégie ne peut pas être utilisée. Dans ce cas, il est possible d'obtenir un précipité de protéine en reconstituant une protéine lyophilisée avec un tampon ajusté dans un second temps au pH isoélectrique de la protéine [41]. Une autre approche peut être la dissolution de la protéine dans un système co-solvant composé de diméthylsulfoxyde et de dichlorométhane suivie de son encapsulation par une technique de simple émulsion huile dans eau (o/w) [57]. A côté de ces techniques originales, des procédés d'encapsulation plus « universels » où la protéine est sous forme solide ont aussi été proposés. En effet, la protéine sous forme solide est très rigide, elle a une mobilité limitée dans le solvant organique, ce qui lui évite d'être dénaturée au contact du solvant [58].

Pendant la phase de libération, les protéines doivent également être protégées de leur environnement déstabilisant [57]. Des excipients ont été ajoutés pour stabiliser les protéines à 37°C, mais aussi pour minimiser les interactions avec le polymère et ses produits de dégradations acides [59-61]. Malgré cela, les résultats ont été mitigés en raison des causes complexes de cette déstabilisation. L'instabilité des protéines dans ces conditions est responsable de leur libération incomplète à partir des microsphères de PLGA. Le faible taux

de libération de la protéine et son instabilité pendant la formulation sont les principaux problèmes limitant le développement d'une formulation optimale de microsphères de PLGA encapsulant une protéine. Il est donc capital de conserver intacte la structure de la protéine à la fois pendant l'encapsulation et la libération.

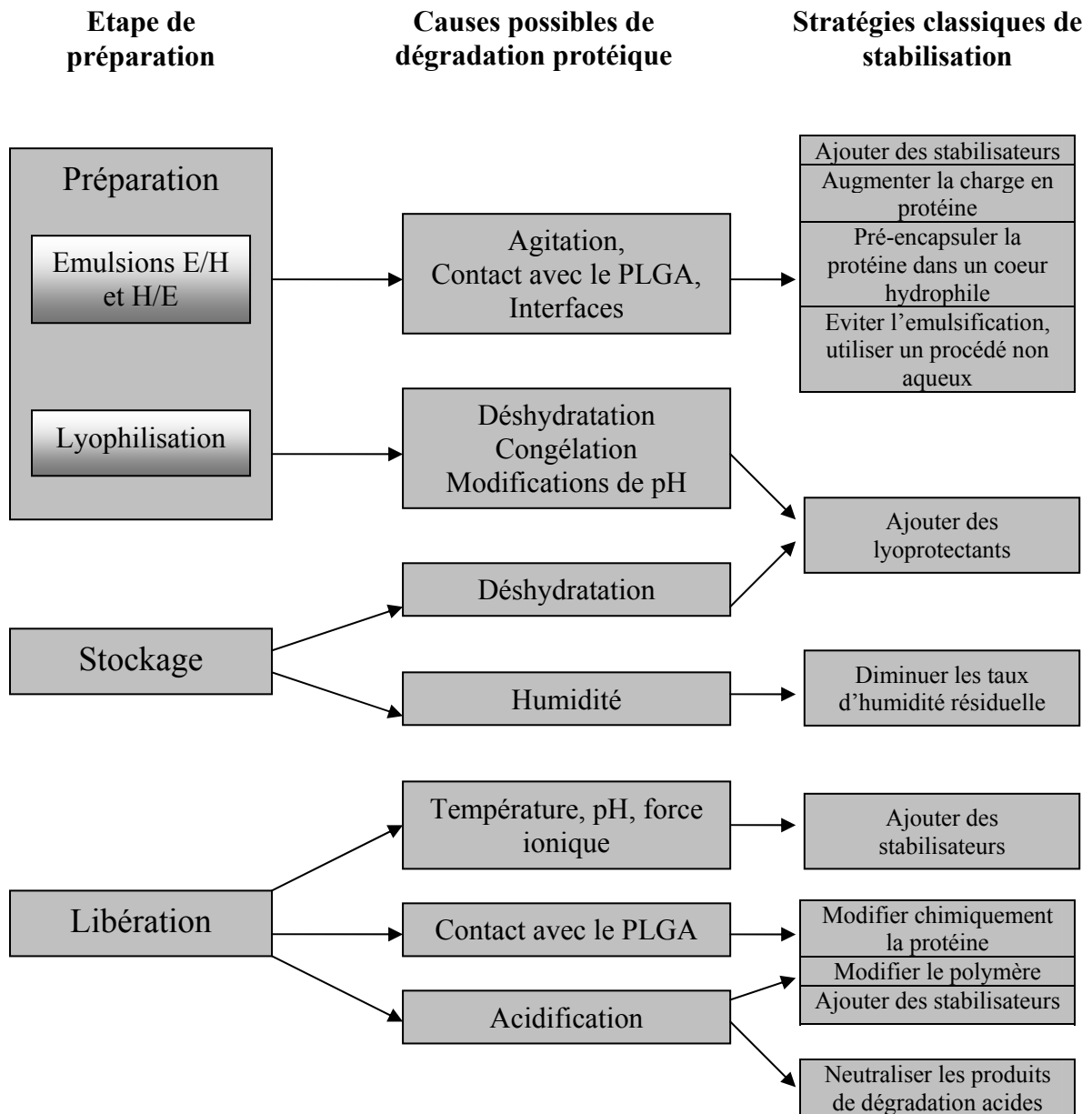


Figure 3. Etapes critiques de la préparation par double émulsion de microsphères de PLGA contenant une protéine, causes possibles de dégradation de la protéine à chaque étape et stratégies de stabilisation habituellement proposées (*adapté de [38]*).

3 Objectifs du travail

Les avancées de la thérapie cellulaire offrent des perspectives prometteuses pour la régénération de différents tissus. Cette stratégie thérapeutique repose sur l'association de cellules, de biomatériaux et de facteurs de croissance. Pour améliorer la survie et la différenciation des cellules greffées, des microparticules de PLGA recouvertes d'une surface biomimétique (MPA) ont été développées au sein de l'INSERM U646. Notre objectif a été d'optimiser ces vecteurs notamment pour l'apport de facteurs de croissance. Nous avons travaillé au sein d'un consortium « Genostem ». Celui-ci regroupe des scientifiques étudiant l'ingénierie des cellules souches mésenchymateuses pour la régénération de tissus conjonctifs [62].

Le développement de microsphères de PLGA contenant une protéine se heurtant à des problèmes d'instabilité protéique, nous avons cherché à préserver l'intégrité protéique pendant les étapes d'encapsulation et de libération à partir de ces systèmes.

A travers une revue bibliographique (chapitre 1), l'importance des conditions expérimentales sur le profil de libération *in vitro* de protéines à partir de microsphères de PLGA a été rapporté. En s'appuyant sur cette base, différentes stratégies visant à assurer la libération prolongée et complète de protéines ont pu être comparées. Suite à ce bilan, nous avons développé un outil répondant à nos exigences liées à une utilisation en thérapie cellulaire de ces vecteurs (MPA) (taille des microsphères de 60µm, adaptation possible à divers facteurs de croissance, nature du polymère, faible taux de charge des microsphères, utilisations de matériaux injectables...). Dans un premier temps, une méthode pour stabiliser une protéine quelconque pendant son encapsulation dans des microsphères de PLGA a été mise au point, en travaillant sur des protéines modèles (chapitre 2). Cette méthode a ensuite été éprouvée avec trois facteurs de croissance utiles pour la reconstitution cartilagineuse, osseuse (dans le cadre du projet Genostem) et neuronale (thématique de notre laboratoire) et ses limites ont pu être posées (2^{ème} partie du chapitre 2). L'interaction de la protéine avec le polymère étant responsable de sa faible libération, nous avons modélisé cette étape et des stratégies spécifiques ont pu être testées (chapitre 3).

Une discussion permettant de faire le point sur l'optimisation de la formulation des microsphères de PLGA chargées en protéine et de nous situer par rapport aux systèmes existants viendra clore ce travail et ouvrir de nouvelles perspectives.

Références

- [1] P. Menasche, Cellular therapy in cardiology, *La thérapie cellulaire en cardiologie Comptes Rendus - Biologies* 330 (6-7) (2007) 550-556.
- [2] G. D'Ippolito, S. Diabira, G. A. Howard, P. Menei, B. A. Roos, P. C. Schiller, Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential, *Journal of Cell Science* 117 (14) (2004) 2971-2981.
- [3] V. M. Tatard, G. D'Ippolito, S. Diabira, A. Valeyev, J. Hackman, M. McCarthy, T. Bouckenooghe, P. Menei, C. N. Montero-Menei, P. C. Schiller, Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons, *Bone* 40 (2) (2007) 360-373.
- [4] J. A. Hubbell, Tissue and cell engineering, *Current Opinion in Biotechnology* 14 (5) (2003) 517-519.
- [5] J. A. Hubbell, Tissue and cell engineering, *Current Opinion in Biotechnology* 15 (5) (2004) 381-382.
- [6] C. Jorgensen, J. Gordeladze, D. Noel, Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells, *Current Opinion in Biotechnology* 15 (5) (2004) 406-410.
- [7] V. M. Tatard, P. Menei, J. P. Benoit, C. N. Montero-Menei, Combining polymeric devices and stem cells for the treatment of neurological disorders: a promising therapeutic approach, *Curr Drug Targets* 6 (1) (2005) 81-96.
- [8] S. Saporta, C. Borlongan, J. Moore, E. Mejia-Millan, S. L. Jones, P. Bonness, T. S. Randall, R. C. Allen, T. B. Freeman, P. R. Sanberg, Microcarrier enhanced survival of human and rat fetal ventral mesencephalon cells implanted in the rat striatum, *Cell Transplant* 6 (6) (1997) 579-84.
- [9] P. C. Letourneau, M. L. Condic, D. M. Snow, Interactions of developing neurons with the extracellular matrix, *Journal of Neuroscience* 14 (3 I) (1994) 915-928.
- [10] J. A. Hubbell, Materials as morphogenetic guides in tissue engineering, *Curr Opin Biotechnol* 14 (5) (2003) 551-8.
- [11] J. L. Drury, D. J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications, *Biomaterials* 24 (24) (2003) 4337-51.
- [12] M. Martina, D. W. Hutmacher, Biodegradable polymers applied in tissue engineering research: A review, *Polymer International* 56 (2) (2007) 145-157.
- [13] M. Sokolsky-Papkov, K. Agashi, A. Olaye, K. Shakesheff, A. J. Domb, Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (4-5) (2007) 187-206.

- [14] Z. Ma, C. Gao, Y. Gong, J. Shen, Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor, *Biomaterials* 26 (11) (2005) 1253-9.
- [15] G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges, *J Biomed Mater Res* 51 (2) (2000) 273-9.
- [16] J. B. Leach, C. E. Schmidt, Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds, *Biomaterials* 26 (2) (2005) 125-35.
- [17] J. Kopp, M. G. Jeschke, A. D. Bach, U. Kneser, R. E. Horch, Applied tissue engineering in the closure of severe burns and chronic wounds using cultured human autologous keratinocytes in a natural fibrin matrix, *Cell and Tissue Banking* 5 (2) (2004) 89-96.
- [18] A. B. Pratt, F. E. Weber, H. G. Schmoekel, R. Muller, J. A. Hubbell, Synthetic extracellular matrices for in situ tissue engineering, *Biotechnol Bioeng* 86 (1) (2004) 27-36.
- [19] M. P. Lutolf, F. E. Weber, H. G. Schmoekel, J. C. Schense, T. Kohler, R. Muller, J. A. Hubbell, Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices, *Nat Biotechnol* 21 (5) (2003) 513-8.
- [20] M. P. Lutolf, J. L. Lauer-Fields, H. G. Schmoekel, A. T. Metters, F. E. Weber, G. B. Fields, J. A. Hubbell, Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (9) (2003) 5413-8.
- [21] D. L. Elbert, J. A. Hubbell, Conjugate addition reactions combined with free-radical cross-linking for the design of materials for tissue engineering, *Biomacromolecules* 2 (2) (2001) 430-41.
- [22] K.-W. Lee, S. Wang, B. C. Fox, E. L. Ritman, M. J. Yaszemski, L. Lu, Poly(propylene fumarate) bone tissue engineering scaffold fabrication using stereolithography: Effects of resin formulations and laser parameters, *Biomacromolecules* 8 (4) (2007) 1077-1084.
- [23] H. Park, J. S. Temenoff, Y. Tabata, A. I. Caplan, A. G. Mikos, Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering, *Biomaterials* 28 (21) (2007) 3217-3227.
- [24] N. R. Mercier, H. R. Costantino, M. A. Tracy, L. J. Bonassar, Poly(lactide-co-glycolide) microspheres as a moldable scaffold for cartilage tissue engineering, *Biomaterials* 26 (14) (2005) 1945-52.

- [25] H. Zhu, J. Ji, Q. Tan, M. A. Barbosa, J. Shen, Surface engineering of poly(DL-lactide) via electrostatic self-assembly of extracellular matrix-like molecules, *Biomacromolecules* 4 (2) (2003) 378-86.
- [26] G. Vozzi, C. Flaim, A. Ahluwalia, S. Bhatia, Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition, *Biomaterials* 24 (14) (2003) 2533-40.
- [27] N. Tornqvist, L. Bjorklund, P. Almqvist, L. Wahlberg, I. Stromberg, Implantation of bioactive growth factor-secreting rods enhances fetal dopaminergic graft survival, outgrowth density, and functional recovery in a rat model of Parkinson's disease, *Exp Neurol* 164 (1) (2000) 130-8.
- [28] Z. Lin, W. Qin, N. Zhang, X. L., J. Ling, Adenovirus-mediated recombinant human bone morphogenetic protein-7 expression promotes differentiation of human dental pulp cells., *J Endod.* 33 (8) (2007) 930-5.
- [29] S. Drotleff, U. Lungwitz, M. Breunig, A. Dennis, T. Blunk, J. Tessmar, A. Gopferich, Biomimetic polymers in pharmaceutical and biomedical sciences, *Eur J Pharm Biopharm* 58 (2) (2004) 385-407.
- [30] J. K. Tessmar, A. M. Gopferich, Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (4-5) (2007) 274-291.
- [31] K. Y. Lee, S. H. Yuk, Polymeric protein delivery systems, *Progress in Polymer Science (Oxford)* 32 (7) (2007) 669-697.
- [32] T. A. Holland, J. K. Tessmar, Y. Tabata, A. G. Mikos, Transforming growth factor-beta 1 release from oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels in conditions that model the cartilage wound healing environment, *J Control Release* 94 (1) (2004) 101-14.
- [33] V. M. Tatard, M. C. Venier-Julienne, P. Saulnier, E. Prechter, J. P. Benoit, P. Menei, C. N. Montero-Menei, Pharmacologically active microcarriers: a tool for cell therapy, *Biomaterials* 26 (17) (2005) 3727-3737.
- [34] J. P. Benoit, H. Marchais, H. Rolland, V. Vande-Velde, Biodegradable microspheres: advances in production technology, In S. Benita (ed), *Microencapsulation methods and industrial applications*, Decker, New York, 1996.
- [35] J. M. Pean, M. C. Venier-Julienne, F. Boury, P. Menei, B. Denizot, J. P. Benoit, NGF release from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. Effect of some formulation parameters on encapsulated NGF stability, *J Control Release* 56 (1-3) (1998) 175-87.
- [36] A. Aubert-Pouessel, D. C. Bibby, M. C. Venier-Julienne, F. Hindre, J. P. Benoit, A novel in vitro delivery system for assessing the biological integrity of protein upon release from PLGA microspheres, *Pharm Res* 19 (7) (2002) 1046-51.
- [37] A. Aubert-Pouessel, M. C. Venier-Julienne, A. Clavreul, M. Sergent, C. Jollivet, C. N. Montero-Menei, E. Garcion, D. C. Bibby, P. Menei, J. P. Benoit, In vitro study of

- GDNF release from biodegradable PLGA microspheres, *J Control Release* 95 (3) (2004) 463-75.
- [38] M. van de Weert, W. E. Hennink, W. Jiskoot, Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles, *Pharm Res* 17 (10) (2000) 1159-67.
- [39] P. Burke, Controlled release protein therapeutics: effects of process and formulation on stability, In D. L. Wise (ed), *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*, Marcel Dekker, New York, 2000, pp. 661-692.
- [40] K. Fu, K. Griebenow, L. Hsieh, A. M. Klibanov, Langer R, FTIR characterization of the secondary structure of proteins encapsulated within PLGA microspheres, *J Control Release* 58 (3) (1999) 357-66.
- [41] J. L. Cleland, A. J. Jones, Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon-gamma for microencapsulation in biodegradable microspheres, *Pharm Res* 13 (10) (1996) 1464-75.
- [42] C. Perez, N. Montano, K. Gonzalez, K. Griebenow, Stabilization of α -chymotrypsin at the CH₂Cl₂/water interface and upon water-in-oil-in-water encapsulation in PLGA microspheres, *J Control Release* 89 (2003) 71-85.
- [43] J. M. Pean, F. Boury, M. C. Venier-Julienne, P. Menei, J. E. Proust, J. P. Benoit, Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres?, *Pharm Res* 16 (8) (1999) 1294-9.
- [44] G. D. Rosa, R. Iommelli, M. I. La Rotonda, A. Miro, F. Quaglia, Influence of the co-encapsulation of different non-ionic surfactants on the properties of PLGA insulin-loaded microspheres, *Journal of Controlled Release* 69 (2) (2000) 283-295.
- [45] C. Stureson, J. Carlfors, Incorporation of protein in PLG-microspheres with retention of bioactivity, *Journal of Controlled Release* 67 (2-3) (2000) 171-178.
- [46] M. van de Weert, J. Hoehstetter, W. E. Hennink, D. J. Crommelin, The effect of a water/organic solvent interface on the structural stability of lysozyme, *J Control Release* 68 (3) (2000) 351-9.
- [47] M. Morlock, H. Koll, G. Winter, T. Kissel, Microencapsulation of rh-erythropoietin, using biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide): protein stability and the effects of stabilizing excipients, *Eur J Pharm Bioph* 43 (1997) 29-36.
- [48] S. P. Schwendeman, M. Cardamone, A. Klibanov, R. Langer, M. R. Brandon, Stability of proteins and their delivery from biodegradable polymer microspheres, In S. Cohen and H. Bernstein (eds), *Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines*, Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 1-49.
- [49] C. Perez, I. J. Castellanos, H. R. Costantino, W. Al-Azzam, K. Griebenow, Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers, *J Pharm Pharmacol* 54 (3) (2002) 301-13.

- [50] U. Bilati, E. Allemann, E. Doelker, Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles, *Eur J Pharm Biopharm* 59 (3) (2005) 375-88.
- [51] H. Tamber, P. Johansen, H. P. Merkle, B. Gander, Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (3 SPEC. ISS.) (2005) 357-376.
- [52] H. Sah, Stabilization of proteins against methylene chloride/water interface-induced denaturation and aggregation, *J Control Release* 58 (2) (1999) 143-51.
- [53] N. Wang, A novel approach to stabilization of protein drugs in poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres using agarose hydrogel, *Int J Pharm* 166 (1998) 1-14.
- [54] G. Jiang, W. Qiu, P. P. DeLuca, Preparation and in vitro/in vivo evaluation of insulin-loaded poly(acryloyl-hydroxyethyl starch)-PLGA composite microspheres, *Pharm Res* 20 (3) (2003) 452-9.
- [55] K. Fu, R. Harrell, K. Zinski, C. Um, A. Jaklenec, J. Frazier, N. Lotan, P. Burke, A. M. Klibanov, R. Langer, A potential approach for decreasing the burst effect of protein from PLGA microspheres, *J Pharm Sci* 92 (8) (2003) 1582-91.
- [56] J. D. Meyer, M. C. Manning, Hydrophobic ion pairing: altering the solubility properties of biomolecules, *Pharm Res* 15 (2) (1998) 188-93.
- [57] T. G. Park, H. Yong Lee, Y. Sung Nam, A new preparation method for protein loaded poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres and protein release mechanism study, *J Control Release* 55 (2-3) (1998) 181-91.
- [58] K. G. Carrasquillo, H. R. Costantino, R. A. Cordero, C. C. Hsu, K. Griebenow, On the structural preservation of recombinant human growth hormone in a dried film of a synthetic biodegradable polymer, *J Pharm Sci* 88 (2) (1999) 166-73.
- [59] W. Wang, Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics, *Int J Pharm* 289 (1-2) (2005) 1-30.
- [60] A. Sanchez, B. Villamayor, Y. Guo, J. McIver, M. J. Alonso, Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *Int J Pharm* 185 (2) (1999) 255-66.
- [61] G. Zhu, S. R. Mallery, S. P. Schwendeman, Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide- co-glycolide), *Nat Biotechnol* 18 (1) (2000) 52-7.
- [62] C. Jorgensen, Tissue engineering through mesenchymal stem cells: role of the Genostem Consortium., *Regenerative medicine* 1 (4) (2006) 493-496.

La libération incomplète et non continue d'une protéine à partir de
microparticules biodégradables

How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles?

A.Giteau^a, M.C. Venier-Julienne^{a*}, A. Aubert-Pouëssel^b, J.P. Benoit^a

^aINSERM U646, Angers, F-49100 France; Université d'Angers, Angers, F-49100 France.

^bUMR CNRS, ENSCM, UM1 5618, Montpellier, F-34296 France.

Submitted in International Journal of Pharmaceutics

Abstract

One of the most challenging tasks in the delivery of therapeutic proteins from PLGA-based microparticles is the sustained and complete release of the protein in its native form. The mechanisms responsible for incomplete protein release from these devices are numerous and complex; the beneficial effect of different formulations has often been evaluated *in vitro*. Strategies employed for overcoming protein destabilization during the release step are reviewed in this paper. Proteins have been protected in the deleterious environment by adding stabilizers to the formulation, or by modifying the protein or the polymer. Alternatively, some strategies have aimed at avoiding the formation of the destabilizing environment. As experimental conditions may influence the results from *in vitro* release studies, we initially report precautions to avoid adverse effects.

Keywords

Sustained release; protein; microspheres; poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA); *in vitro* release; release mechanism.

Introduction

Developments in biotechnology have seen the growing use of proteins and peptides as therapeutic agents. However, expectations concerning the delivery of therapeutic proteins have been limited by their fragile structure and the frequent administrations required (Yang *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2003). To protect them from proteolysis, to allow for their sustained delivery and to enhance their therapeutic efficacy, their encapsulation in injectable, biodegradable microparticles has been explored (Pean *et al.*, 1999; Rosa *et al.*, 2000; Aubert-Pouessel *et al.*, 2004).

Polymers derived from D,L lactic and glycolic acids, poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), are biocompatible and biodegradable (Visscher *et al.*, 1985; Fournier *et al.*, 2003), they have been widely employed with this aim in mind. Drug release from these systems is due to drug diffusion through water-filled networks of pores and channels coupled with the bulk erosion of the microspheres by hydrolysis of the polymer's ester bond linkages. This classical model, which has been observed for small hydrophobic molecules, is not always relevant for proteins: a high initial burst followed by a very slow release or no release at all has been observed in many cases. The burst effect is generally attributed to the rapid diffusion of the drug located at the surface of the microparticles. Many studies (Pean *et al.*, 1999; Lam *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005) and reviews (Schwendeman *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999; Burke *et al.*, 2000; van de Weert *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2002; Bilati *et al.*, 2005; Tamber *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005) have addressed protein stability issues occurring during the formulation process. However, few results have shown a suitable protein release profile.

Releasing a protein according to a zero-order profile and without denaturation in the course of the polymer degradation process is very challenging. When protein is released over time, other protein instability problems may occur within PLGA microspheres. This results in varying degrees of incomplete release subsequent to the initial burst, even after the PLGA copolymer has been substantially degraded. This feature certainly remains one of the most important hurdles for successful protein delivery from biodegradable microspheres.

The methods proposed to prevent incomplete release are often unsuccessful for many proteins. The importance of the conditions in which the *in vitro* protein release profile is established is often underestimated and confusing release results are common. By considering the influence of these parameters, the development of protein stabilizing strategies becomes possible. This article describes trends towards a better protein release profile with examples of

successful and failed sustained release of model and therapeutic proteins. The paper focuses on studies performed with microparticles of biodegradable polymers from lactic and glycolic acids. Aspects concerning protein stability issues during the encapsulation step are not addressed; nevertheless, they should be solved before studying the release as they might drastically influence the final protein release pattern.

1 Influence of the experimental conditions on the release profile

1.1 Influence of the release medium

A variety of proteins have been encapsulated in polymeric carriers (see Bilati *et al.*, 2005 for a review). The various entrapped proteins differ in terms of their physico-chemical properties (*i.e.* molecular weight, solubility, distribution coefficient, number of free thiol groups and/or disulfide bonds) and their therapeutic functions (Sandor *et al.*, 2001). These differences imply different reactions to stress factors (Sah *et al.*, 1999), different interactions with PLGA degradation products (Blanco *et al.*, 1998) and especially different stability issues in the incubation medium (Wang *et al.*, 2005).

Most of the authors used Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4 at 37°C for the *in vitro* studies, because it is the buffer with the nearest physiological conditions. As only a few proteins such as tetanus toxoid (Jung *et al.*, 2002) are stable in these conditions, some authors performed protein stability studies to assess the *in vitro* release study in an optimal release medium (e.g., acetate, citrate or TRIS-HCl buffers) (**Table 1**). For instance, lysozyme, which was found to aggregate in phosphate buffer resulting in incomplete release, was stabilized in glycine buffer and exhibited a complete release (Jiang *et al.*, 2002).

The pH has a key effect on release by acting both on the polymer degradation rate and on protein stability. Firstly, acidic and alkaline media are known to accelerate polymer degradation (Makino *et al.*, 1986). Secondly, the pH of a protein solution has a great influence on protein conformation. Thus, acidic pH may either aggregate one protein or on the contrary may stabilize another one. Lu *et al.* (Lu *et al.*, 2001) studied Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-β1) release kinetics in pH 3, 5 or 7.4 buffers. They observed that the release rate decreased with the pH, although microparticle degradation increased. They attributed this slow release to protein aggregation in the polymer matrix. In contrast, a faster and complete release of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-1) (Lam *et al.*, 2000) and lysozyme (Jiang *et al.*,

2002) was observed at acidic pH levels (pH 5.4 and pH 2.5, respectively), where these proteins are not prone to aggregation.

Table 1. Protein release studies from PLGA microspheres performed in “stabilizing” release medium at 37°C.

Protein formulation	Release medium	References
α -chymotrypsin	10mM Phosphate buffer (pH 5.0)	(Castellanos et al., 2002)
GDNF	10 mM Citrate buffer (pH 5.0) + 0.1% BSA	(Aubert-Pouessel et al., 2004)
r-met-HuGDNF	10mM Citrate buffer (pH 5.0)	(Fu et al., 2003)
IFN- γ	5mM Succinate buffer (pH 5.0) + 0.01% polysorbate 20	(Yang et al., 1997)
IGF-1	50mM Acetate buffer (pH 5.4) + 0.02% polysorbate 20 + 100mM NaCl	(Lam et al., 2000)
Insulin	50mM TRIS-HCl buffer (pH 7.4) + 0.02% polysorbate 80	(Rosa et al., 2000)
	10mM Glycine buffer (pH 2.8)	(Jiang et al., 2003)
Lysozyme	100mM Acetate buffer (pH 4.0) 100mM Glycine-HCl buffer (pH 2.5)	(Jiang et al., 2002)
	84mM TRIS-HCl buffer (pH 7.4) + 0.09% NaCl + 0.1% BSA	(Aubert-Pouessel et al., 2002)
Tetanus toxoid	PBS (pH 7.2)	(Jung et al., 2002)

The increase in the ionic strength of the release medium often induces a decrease of the release rates. Authors have suggested that the increased ionic strength may reduce the swelling of the polymer matrix by reducing the diffusion of the protein from the microspheres (Hora *et al.*, 1990; Bodmer *et al.*, 1992). Moreover, the increase of ionic strength can affect protein stability leading to aggregation. Yang *et al.* (Yang *et al.*, 1997) observed that interferon- γ (IFN- γ) in solution in an iso-osmotic saline medium underwent aggregation, whereas in a buffer with low osmolarity (succinate buffer 5mM), the protein remained stable. On the contrary, greater lysozyme amounts were released from PLGA microspheres during the first 24-day incubation period by increasing the ionic strength of the medium (by the addition of NaCl). The ionic interactions between the lysozyme positive

charge and carboxylic acid end-groups in PLGA were supposed to be disrupted in this release period. It is worth noticing that in the latter stages other mechanisms occurred (*i.e.* non-covalent aggregation and surface adsorption) leading to incomplete release (Park *et al.*, 1998).

Therefore, in order to choose the most suitable release medium, different strategies have been carried out by different researchers. They prioritized the release of an active protein or they prioritized a simulation of the *in vivo* conditions via a physiological medium (PBS pH 7.4). In the first case, the use of a stabilizing buffer allowed researchers to better understand the causes of the denaturation of the released protein and hence to improve the formulation. Moreover, despite the use of a 'non' physiological buffer (such as acetate pH 5), the *in vitro* release allowed good *in vitro-in vivo* correlations (Jiang *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2003). In the second case, it was supposed that a physiological buffer could elicit better information on the *in vivo* release profile of the protein. Nevertheless, when no preliminary stability studies in physiological conditions were performed and when the protein was released in a denatured state in these conditions, it appeared difficult to explain the cause of protein destabilization during release.

1.2 Influence of the sampling method

The *in vitro* release study of stable drugs from conventional formulations is common and easy. But for fragile drugs like peptides and proteins encapsulated in particulate systems, many issues are encountered. They are listed in **Figure 1** as well as the various ways to avoid these artefacts during the *in vitro* release study from protein-loaded devices. As well as being reproducible, discriminating, and able to approach physiological conditions and to respect sink conditions, the technique must also prevent protein degradation prior to analysis and be able to follow the release of low amounts of protein over a sustained period with limited artefacts.

Various systems exist to characterize *in vitro* release kinetics of protein-loaded delivery systems (see D'Souza *et al.*, 2006 for a review). They can be classified as: separation techniques; membrane diffusion techniques; and continuous flow techniques. Before comparing different release profiles, it is necessary to consider the method used, as some artefacts may be created.

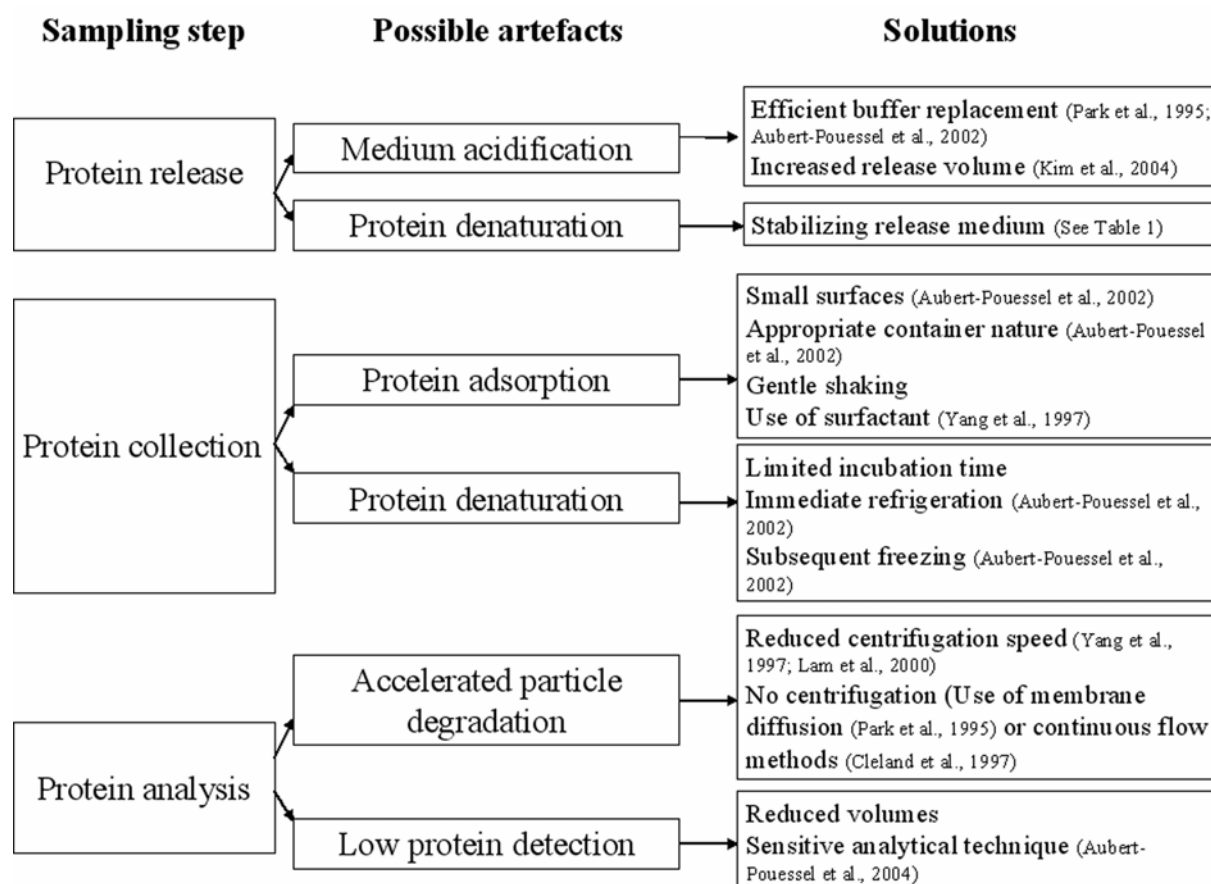


Figure 1. Critical steps in the sampling of the protein released from PLGA microspheres and possible solutions to avoid artefacts at each step.

The separation method is the most frequently used technique for protein particulate systems. It is very easy to perform as the microparticles are separated from the protein-containing release medium at different intervals by centrifugation. Nevertheless, this method may influence the release profile. First of all, the mechanical force applied at each sample centrifugation is suspected of influencing protein release. Indeed, by packing the particles at the bottom of the tube, it may affect their physical characteristics, especially their degradation. This accelerated degradation may favour both protein alteration (acidic environment) and protein release (polymer erosion). By reducing the centrifugation speed, some researchers have been able to limit this effect (Yang *et al.*, 1997). Moreover, low-speed centrifugation created a better correlation between *in vitro* and *in vivo* profiles (Lam *et al.*, 2000). The choice of the release medium volume is also of great importance. Hence, Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2001) showed that by increasing this volume (from 1 to 10ml for 20mg of

microparticles), the amount of released recombinant human Growth Hormone (rhGH) entrapped in PLGA microspheres by a s/o/w encapsulation procedure was increased. They hypothesized that the release rate was dependent on a thermodynamic equilibrium between reversibly-dissociable rhGH aggregates and rhGH monomers. In another work, the correlation of an increased release rate of rhGH with an increased release volume was explained by a better buffer capacity over the release of acidic polymer degradation products (Kim *et al.*, 2004). In conclusion, this separation method is attractive because it requires very basic materials, it is easy to develop, and results are reproducible. However, the speed of centrifugation and the buffer volume should be adjusted for a better *in vitro-in vivo* correlation.

The membrane diffusion technique consists of entrapping the protein-loaded microparticles in a dialysis bag. It presents the advantage of maintaining a constant pH level during the release study because the acidic degradation products can diffuse through the membrane (Park *et al.*, 1995). However, it is important to remember that, with this method, the volume of the acceptor compartment is high; it is therefore inappropriate for the study of protein release because of protein adsorption to the dialysis membrane and because of low protein detection due to protein dilution.

Finally, the continuous flow method has sometimes been used. It employs cells to entrap samples; they are fed continuously with a releasing medium from a pressurized reservoir. There is no effect related to the acidification of the medium because of the continuous replenishment of the buffer, nor is there an effect related to the use of centrifugation forces. This system mimics the *in vivo* conditions in which particles are exposed to a flowing biological fluid. However, it is not often used, maybe because of the complexity of the materials. A good *in vitro-in vivo* correlation was possible with this system as demonstrated for microspheres loaded with rhGH and suspended in HEPES (pH 7.4) (Cleland *et al.*, 1997). The authors observed *in vitro* release profiles similar to the *in vivo* conditions (a triphasic profile characterized by a small burst and then by a complete release). A modified continuous flow system was developed by Aubert-Pouëssel *et al.* (Aubert-Pouessel *et al.*, 2002). The methodology was intended to prevent protein degradation (by collecting the protein fractions at 4°C) and to avoid protein adsorption prior to analysis (by using an adsorption resistant material in PEEK®).

To conclude, when evaluating the release kinetics of a protein from PLGA microspheres, it is essential to keep in mind that low release levels of protein may be due not only to protein denaturation during the formulation process or polymer degradation, but also

due to the experimental conditions (by medium acidification, destabilizing release medium etc.). For a more appropriate interpretation of the results, the amount of 'total' released protein (determined by bicinchoninic acid assay (Al-Azzam *et al.*, 2002), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Jiang *et al.*, 2003), radioactivity count (Aubert-Pouessel *et al.*, 2002), Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA) (Aubert-Pouessel *et al.*, 2004)... and the amount of biologically-active released protein (Aubert-Pouessel *et al.*, 2002) may be simultaneously estimated. Hence, the 'active' and 'total' release profiles may be compared and the integrity of the released protein may be assessed. In the same way, the three-dimensional conformation may be analyzed by Size Exclusion Chromatography-HPLC (SEC-HPLC) (Wang *et al.*, 2004), Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (Woo *et al.*, 2001), Circular Dichroism (CD) (Kwon *et al.*, 2004) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) (Carrasquillo *et al.*, 2001).

2 Trends toward a sustained and complete release

Protein release from PLGA devices is governed by diffusion through aqueous pores in the initial phase, erosion of the polymeric matrix at later stages, and additional factors responsible for the incomplete release such as the affinity of the protein for the polymer and inherent protein instability problems occurring during polymer erosion. The mechanism of incomplete protein release is illustrated in **Figure 2**.

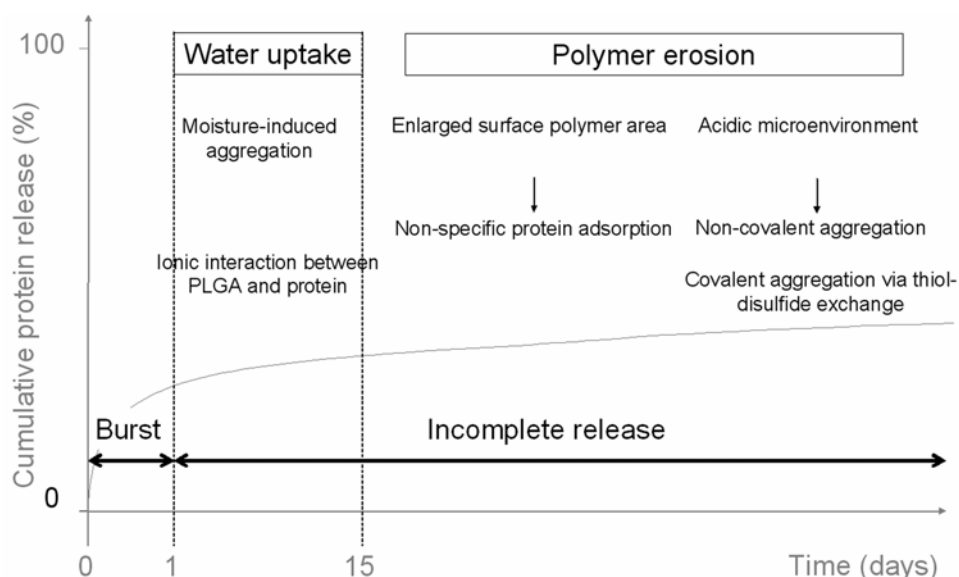


Figure 2. Schematic illustration of protein release profile and mechanism of incomplete release from PLGA microspheres. Time scale is approximate and relative to 50:50 uncapped PLGA.

During the initial phase of microsphere hydration, the protein is prone to moisture-induced aggregation (Costantino *et al.*, 1994). Later, ionic interaction may occur between proteins positively charged at neutral pH (e.g. lysozyme) and carboxylic acid end-groups in uncapped PLGA (Blanco *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1998). Hence, when NaCl was added into the incubation medium during the *in vitro* release study of lysozyme from PLGA microspheres, increased lysozyme release was observed (Park *et al.*, 1998). This effect was only significant in the early stage of incubation (first 15 days) (Park *et al.*, 1998).

Later, when the polymer starts to degrade, non-specific adsorption on the degrading PLGA surface, covalent/non-covalent aggregation, and denaturation may occur (Crotts *et al.*, 1998). This was supported by comparing the amount of released protein with or without 5M Guanidine hydrochloride (GuHCl) or 5mM sodium dodecyl sulphate (SDS) in the incubation medium (Park *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999). GuHCl dissociates non-covalently aggregated proteins and SDS minimizes non-specific adsorption in addition to the dissociation of non-covalent aggregates (Crotts *et al.*, 1998).

The presence of non-covalent aggregates was confirmed by performing an SDS-PAGE under non-reducing conditions on the encapsulated protein remaining within microspheres, at different release days. Covalent aggregation *via* thiol-disulphide exchange-reaction due to acidification inside the microspheres was also demonstrated using an SDS-PAGE under reducing conditions (Park *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2004). Additionally, chemical degradation reactions such as acylation (Lucke *et al.*, 2002) and deamidation (Ibrahim *et al.*, 2005), not detected by the SDS-PAGE results, may happen during the incubation period and they should also be considered.

The factors affecting protein release rates are numerous and complex. Moreover, these phenomena may coexist so that formulation strategies that are efficient in counteracting all these destabilizing mechanisms are not frequent. These approaches may be classified in two sections presented in **Table 2**. Firstly, some advances are aimed at stabilizing the protein during the release step. Other processes tend to avoid protein destabilization mechanisms by achieving protein release prior to damage due to polymer erosion.

Table 2. Strategies commonly used to improve protein release from PLGA microspheres

Strategy	Examples	References
<i>Protein stabilization</i>		
Protein chemical modification	Pegylation	(Diwan et al., 2001; Diwan et al., 2003; Castellanos et al., 2005)
	Carboxy-methylated BSA	(Crotts et al., 1997)
Neutralization of PLGA degradation products	Use of basic salts	(Shao et al., 1999; Zhu et al., 2000)
Help to protein refolding	Unfolding with urea	(Nam et al., 2000)
	Metal-induced precipitation	(Lam et al., 2001)
	Precipitation with ammonium sulphate	(Zale et al., 1997)
	Co-lyophilization with PEG	(Morita et al., 2000)
Formation of a viscous microenvironment	Starch, PVA, agarose inner microparticles	(Wang et al., 1998; Wang et al., 1999; Woo et al., 2001; Capan et al., 2003; Jiang et al., 2003)
	Poloxamer 407 SAIB, starch, hyaluronate, glycol chitosan	(Sturesson et al., 2000) (Lee et al., 2006; Lee et al., 2007)
Use of a more hydrophilic polymer	Uncapped polymer	(Lam et al., 2000; Blanco-Prieto et al., 2004)
	Modified polymers	(Cho et al., 2001; Frauke Pistel et al., 2001; Kissel et al., 2002; Zhou et al., 2003; Kwon et al., 2004)
<i>Prevention of protein destabilization mechanisms</i>		
Delay of polymer degradation	High polymer Mw	(Boury et al., 1997)
	Low percentage of GA units in the polymer	(Park et al., 1995)
	More crystalline polymer	(Kim et al., 2004)
Preparation of porous microspheres	PLGA/PLA blends with hydrophilic/ amphiphilic molecules	(Morlock et al., 1998; Lavelle et al., 1999; Yeh et al., 2000; Jiang et al., 2001; Mi et al., 2003)
	Pore-closing process	(Kim et al., 2006)
	Heparin immobilized microspheres	(Chung et al., 2006)
Minimization of protein-polymer surface area	Reservoir-type microcapsules	(Park et al., 2006)
	Reversible aggregation with organic solvent	(Kim et al., 2001)

2.1 Stabilizing proteins in the deleterious environment

The use of additives during the encapsulation process has been extensively studied and certainly represents the most widely-employed strategy to minimize protein degradation associated with the direct environment of degrading PLGA. However, adequate *in vitro* release profiles were rarely generated from these formulations, even when the stabilization of the encapsulated protein by preferential hydration was successful. In general, these additives predominantly influenced the initial drug release phase but the discontinuous *in vitro* release behaviour was not significantly modified; they could not eliminate the non-release of aggregated proteins, possibly because of their rapid diffusion from the microparticles. It was supposed that when water entered the microspheres, the protein and the hydrophilic additives were released in a burst manner. Thus, it was shown that the stabilizing effect of saccharides varied depending upon their molecular weight and structure, with a better stabilization for higher molecular-weight substances (dextran and heparin) which were released slowly from the microspheres (Sanchez *et al.*, 1999). As a result of this, more specific strategies were engineered to ensure protein stabilization during the release step (**Figure 3**).

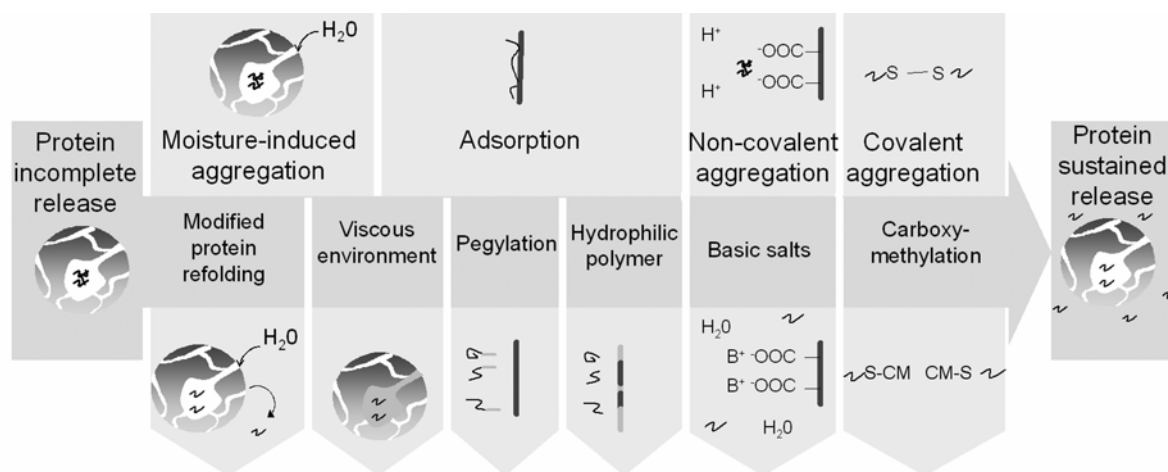


Figure 3. Schematic illustration of some strategies stabilizing the protein during the release period.

2.1.1 Protein chemical modification

The conjugation of proteins with polyethylene glycol (PEG) is known to enhance protein stability in solution as revealed in relevant clinical results (Harris *et al.*, 1998). Besides, pegylated proteins are good at reducing protein adsorption onto surfaces. Lysozyme adsorption onto the surface of blank PLGA microspheres was thereby reduced when it was conjugated with methoxyPEG (mPEG, MW 5000) (Diwan *et al.*, 2001). During PLGA microsphere degradation, as protein release is limited by protein adsorption onto the enlarged surface polymer area (Crotts *et al.*, 1997), protein chemical modification enhanced protein release rates as demonstrated for lysozyme (Diwan *et al.*, 2001), interferon- α (Diwan *et al.*, 2003) and α -chymotrypsin (Castellanos *et al.*, 2005). However, the preferential location of surface-active pegylated protein on the surface of microspheres also increased burst release; an initial burst superior to 50% within the first day of incubation was induced by the covalent modification of α -chymotrypsin with PEG (Castellanos *et al.*, 2005).

In their aqueous-solution state, proteins can become covalently aggregated *via* thiol-disulphide exchange reactions; this phenomenon may generate an incomplete release. By blocking the free thiol group of BSA by a carboxy-methyl group, with excellent aqueous stability, no aggregation in microspheres after 28 days of incubation occurred, and protein release over 56 days was recorded (Crotts *et al.*, 1997).

Such chemical modifications are interesting to increase the protein release rate from PLGA microspheres, but it is essential to control the formation of a new chemical entity by dealing with its probable modified physico-chemical properties and its changed activity relative to the native protein.

2.1.2 Neutralization of PLGA degradation products

A particular feature of PLGA degradation is the formation of acidic degradation products. The increasing number of carboxylic end-groups causes a concomitant drop of the pH level in the degrading PLGA matrix. The decrease of the pH value results in non-covalent aggregation, thereby in a non-releasable protein mass (Crotts *et al.*, 1998; van de Weert *et al.*, 2000). To circumvent acid-induced protein aggregation, basic salts were co-encapsulated within PLGA microspheres to neutralize acidic PLGA degradation products. The incorporation of $\text{Mg}(\text{OH})_2$ strongly stabilized BSA, recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF), and bone morphogenic protein-2, and facilitated continuous protein release from cylindrical PLGA implants (Zhu *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000). The choice of the

basic salt is of great importance: Its strength and its ability to diffuse in the network of pores strongly impacts on the release profile. Indeed the use of a strong base (e.g. $\text{Ca}(\text{OH})_2$) resulted in a short release duration, while a weak base (e.g. ZnCO_3) could not eliminate aggregation, suggesting the maintenance of a low pH level. Besides, although $\text{Mg}(\text{OH})_2$ strongly inhibited the formation of BSA aggregates in cylindrical implants, the co-encapsulation of $\text{Mg}(\text{OH})_2$ in microspheres has been moderately successful in inhibiting BSA aggregation (Zhu *et al.*, 2000) because its distribution was not homogeneous in the microspheres. To facilitate base diffusion through the network of aqueous pores, a more water-soluble salt should be employed such as MgCO_3 which has an alkalinity level equivalent to that of $\text{Mg}(\text{OH})_2$ but which is about 10-fold more water soluble. In fact, it stabilized BSA better than $\text{Mg}(\text{OH})_2$ in microspheres (Zhu *et al.*, 2000). Other less familiar basic salts have been incorporated in PLGA formulations; they have improved the *in vitro* release profile (sodium bicarbonate (Shao *et al.*, 1999)) or had negligible effects (calcium carbonate, calcium orthophosphate and sodium acetate (Johansen *et al.*, 1998)). In most cases, this buffering approach increased the stability of the released protein *in vitro*. Nevertheless, protein release profiles from PLGA microspheres were not fully controlled. Modulation of both stability and release kinetics by adding other excipients or by incorporating a salt in a different way seems necessary.

2.1.3 Help to protein refolding

Proteins entrapped in lyophilized microspheres are very stable because they are in the solid-state but when their water content increases, their flexibility is enhanced and they are more sensitive to deleterious conditions. Moreover, as proteins become slowly hydrated (*i.e.* slower than direct reconstitution), high internal protein concentration is generated which favours protein aggregation (Costantino *et al.*, 1994; Costantino *et al.*, 1994). Strategies intending to circumvent moisture-induced protein aggregation, either by enhancing protein diffusion or by stabilizing the protein by increased water activity, are emerging. Hence, urea, a protein unfolding agent was used to create an unfolded lysozyme form which diffuses more easily through porous channels within the microspheres than do aggregated or folded ones (Nam *et al.*, 2000). Interestingly, a correct conformation after refolding was maintained in the release medium. Besides, to stabilize the protein during the slow protein transition from solid to liquid state, proteins were coupled with additives. The interest in the engineering of protein-zinc complexes, insoluble and reversible, has been reported (Johnson *et al.*, 1997) and was efficient in reducing NGF aggregation during its release from PLGA microspheres (Lam *et*

al., 2001). Although metal-induced precipitation of protein therapeutics requires a protein with a zinc binding site and specific conditions to obtain a reversible complex (zinc:rhGH > 2:1; zinc:rhNGF > 18:1), this approach is very attractive. Ammonium sulphate was also used by Alkermes to minimize moisture-induced protein aggregation during slow microsphere hydration (Zale *et al.*, 1997). Using the ProLease[®] spray-freeze process, a microsphere formulation composed of a solid-state protein was developed. EPO was precipitated with ammonium sulphate within the microspheres and it was supposed that no high local protein concentration could appear thanks to the mechanism of salting-out. The sustained-release of non-aggregated EPO could be achieved with this strategy. Finally, protein particles surrounded by a amphiphilic polymer phase have been prepared by lyophilization (Morita *et al.*, 2000) and then encapsulated in PLGA microspheres (Morita *et al.*, 2000; Morita *et al.*, 2001; Morita *et al.*, 2001; Al-Azzam *et al.*, 2002; Lagarce *et al.*, 2006). The sustained and complete release of various proteins such as bovine superoxide dismutase (Morita *et al.*, 2000), BSA (Morita *et al.*, 2001; Al-Azzam *et al.*, 2002) and interleukin-18 (Lagarce *et al.*, 2006) was achieved. The continuous PEG phase may have protected them from aggregation within the hydrating microspheres. However, the remaining amount of PEG in the freeze-dried protein product led to an important initial burst, and so, an adaptation of the process was necessary (adjustment of the polymer composition).

2.1.4 Formation of a viscous microenvironment

During the incubation stage, moisture-induced aggregation and interaction with the polymer can limit protein release. Isolating the protein from its microenvironment appears to be most obvious method of protection to stabilize entrapped protein drugs and to improve release profiles. Viscosity around the protein has been successfully enhanced with this aim in mind. Initial studies were based on the design of heterogeneously structured microspheres. Firstly, hydrophilic inner microparticles were made of gelatin (Li *et al.*, 1997), agarose (Wang *et al.*, 1998), PVA (Wang *et al.*, 1999) and starch (Woo *et al.*, 2001; Capan *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2003) and they were then combined with the PLGA matrix. Although quite time-consuming, these composite microspheres loaded with BSA, horseradish peroxidase, and rhGH, showed more favourable and sometimes complete *in vitro* release than conventional PLGA microspheres (Woo *et al.*, 2001) (Wang *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). Interestingly, composite PLGA-starch microspheres loaded with insulin exhibited a sustained and complete

release without burst in 10mM glycine buffer pH 2.8 with a good *vitro-vivo* correlation (Jiang *et al.*, 2003). Later, similar but simpler effective approaches were reported. The viscous agent was added directly to the formulation either in the aqueous or organic phase. The thermogelling poloxamer 407 added in the inner aqueous phase protected urease during encapsulation by a w/o/w method and increased its *in vitro* release rate (Sturesson *et al.*, 2000). Other viscous products such as starch and hyaluronate have been used to solve issues relative to protein stability and delivery (Lee *et al.*, 2007). They were also added in the internal aqueous phase but microdroplets were formed because solid lyophilized proteins were incorporated. This so-called s/w/o/w method exhibited nearly zero-order kinetics for lysozyme, gonadorelin, leuprolide acetate and rhGH. Recently, sucrose acetate isobutyrate (SAIB) was added in the organic phase to form a highly-viscous hydrogel in water. The high viscosity of this sucrose derivative enabled prolonged and complete lysozyme release for up to 2 months (Lee *et al.*, 2006). Therefore, it minimized the burst release and continuously discharged the protein; it also reduced PLGA degradation protecting the protein from denaturing conditions. Similarly, glycol chitosan (GC), a chitosan derivative conjugated to ethylene glycol, was incorporated in PLGA microspheres to stabilize lysozyme (Lee *et al.*, 2007). GC viscous properties allowed a continuous lysozyme release up to 78% for one month. As chitosan degradation is mainly induced by lysozyme hydrolysis activity, presence of lysozyme may be necessary for this strategy.

2.1.5 Use of a more hydrophilic polymer

Low release levels from PLGA microspheres are partly due to the hydrophobic nature of the polymer. Indeed, when a hydrophobic blocked (capped) polymer is employed, a slower release rate of rhIGF-I (Lam *et al.*, 2000) and of a somatostatin analogue (Blanco-Prieto *et al.*, 2004) has been observed in comparison to the use of the uncapped form. For that reason, the use of promising new polymers that are more hydrophilic than PLGA have emerged, especially with the commercialization of some copolymers of PLGA and PEG. These polymers are more compatible with proteins; especially since they reduce protein adsorption and favour homogeneous distribution within the matrix. Besides, they increase water uptake within the microspheres.

Several types of modified polymers have been synthesized. Copolymers consisting of PLA and PEG, polylactide-co-poly(ethylene glycol) (PELA) have been designed with limited success (Zhou *et al.*, 2003). Although they presented lower burst release, higher release rates, and the earlier onset for the second burst release for human serum albumin and glucose oxidase (GOD) loaded in PELA-microspheres, no complete release was reported and a loss of specific activity was detected for the released GOD after 7 days (67% of activity) (Li *et al.*, 2000; Deng *et al.*, 2001). Microspheres based on monomethoxypoly(oxyethylene)-poly(lactic acid) diblock copolymers (MPOE-PLA) did not avoid incomplete release either. Indeed, a plateau was reached after approximately 10 days of BSA release from these microspheres (Bouillot *et al.*, 1999). Brush-like branched polyesters, obtained by grafting PLGA onto poly(vinyl alcohol) (PVA) backbones, were also investigated to allow modification of the release pattern over a broader range (Frauke Pistel *et al.*, 2001). PVA-graft-PLGA (PVA-g-PLGA), offers additional degrees of freedom to manipulate properties such as molecular weight, glass transition temperature and hydrophilicity for higher compatibility with proteins. Drug release rates from PVAL-g-PLGA microspheres were improved resulting in more continuous release profiles by contrast to PLGA microspheres. Nevertheless, no complete release was observed.

Block copolymers consisting of PLGA alternating with poly (ethylene oxide) (PEO) were also developed. These block copolymers showed striking differences in their physico-chemical properties compared to their homopolymers. For instance, the water uptake of microspheres consisting of ABA-triblock copolymers (PLGA A-blocks and PEO B-blocks) was markedly enhanced compared to PLGA microspheres (Kissel *et al.*, 2002). A combined mechanism of swelling and erosion led to a hydrogel-like structure within these devices. This structure allowed the continuous and molecular mass-dependant release of macromolecular drugs (different forms of dextran). This profile really differs from the one observed with PLGA devices which is biphasic and almost independent of the molecular mass of the drug (Kissel *et al.*, 1996). Besides, the *in vitro* release pattern of several model proteins was comparable to that of the model molecule dextran 40kDa in the initial release phase. Microspheres loaded with erythropoietin (EPO) and prepared by a water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion encapsulation procedure exhibited a continuous *in vitro* release for up to 2 weeks (Morlock *et al.*, 1998; Koll *et al.*, 2002). However, EPO release levelled off at later time points. The formation of EPO aggregates at the later stages of the release was probably induced by the presence of PEO itself which is known to precipitate proteins. For tetanus

toxoid, another protein prone to aggregation, similar stability issues were encountered (Jung *et al.*, 2002). Therefore, further optimization of the ABA polymer composition may be necessary to fully exploit the potential of these new materials. In the same way, microparticles forming a hydrogel-like structure upon contact with water were prepared with a blend of PLGA and oligo-ethylene glycol grafted poly(l-lactide) (PLLA-g-oligoEG) (Cho *et al.*, 2001). BSA was continuously and completely released via diffusion from this swollen matrix. Otherwise, a triblock copolymer PLGA-PEG-PLGA was prepared with a lower Mw (Mw 1,500-1,000-1,500) (Kwon *et al.*, 2004). Its unusual, sol-gel transition property was used to prepare microspheres without using organic solvents. *in vitro* studies of insulin release exhibited a low initial burst and a sustained and nearly complete release over 3 weeks (>85%).

2.2 Preventing the formation of the deleterious environment

Rather than stabilizing the protein during release, some work has focused on avoiding the occurrence of protein destabilization mechanisms. These experiments were based on the reasoning that protein release profiles can be optimized if the release is not controlled by polymer erosion. The matrix polymer degradation and microsphere characteristics were modified to allow total protein release prior to polymer degradation.

2.2.1 Delay of polymer degradation

Polymer hydrolytic degradation depends on many factors such as the molecular weight, the copolymer composition and the crystallinity of the polymer, all of which control water accessibility to the ester linkage (Anderson *et al.*, 1997; Batycky *et al.*, 1997; Freiberg *et al.*, 2004). A change of one of these parameters will induce a variation in the protein release profile as protein destabilization is related to a large extent to polymer degradation kinetics. Therefore, if polymer degradation is delayed, the protein will be released before it can interact with the degrading polymer.

The degradation of polymer microspheres shows a clear dependence on the polymer's molecular weight (inherent viscosity). Longer polymers require a longer time to degrade and hence induce a longer release time of low molecular weight drugs. For proteins, the release rate during the second phase of the release (erosion of the polymer) also depends to a large

extent on the polymer's molecular weight. Contrary to classical observations made with low molecular weight drugs, protein release may be slower when the molecular weight of the PLGA decreases. Indeed, protein release from PLGA microspheres is not only governed by the PLGA erosion rate and protein diffusion through the water-filled channels, it is also highly affected by the protein properties and their possible interaction with PLGA and its degradation products. Boury *et al.* (Boury *et al.*, 1997) investigated BSA release from 10 μ m microspheres prepared with 50:50 PLGA of two different molecular weights (15 and 87kD). A quasi-absence of burst effect was observed with the lowest Mw polymer but it was followed by an incomplete release after one month. With the higher Mw PLGA, a high initial release of BSA was recorded in the first hours and thereafter, the remainder of the encapsulated BSA was completely released over the following 15 days. The authors explained this by a higher affinity of BSA with the lower Mw polymer. During the degradation process, the appearance of ionized carboxylic groups was enhanced with the lowest molecular weight polymer. The interactions of these charged functional groups with the positively-charged groups of the protein probably led to its retention in the polymer matrix and consequently explained the slower release of the protein.

The copolymer composition also influences polymer degradation. It is clearly established that microspheres containing a higher percentage of glycolic acid (GA) units in the polymer backbone will degrade faster than those with lower percentage of GA units due to their high reactivity with water. The hydrolytic cleavage of ester bonds to alcohol and carboxylic acid autocatalyzes the degradation process and more L-lactic acid is generated in the medium. Therefore, the local acidity is increased in microspheres containing a higher GA mol ratio in the polymer and they might be more prone to incomplete release (Park *et al.*, 1995).

Water uptake into the polymer is influenced by the ratio of crystalline to amorphous regions: in general, amorphous regions are more easily affected by hydrolysis (Park *et al.*, 1995). In agreement with previous observations, Kim and Park (Kim *et al.*, 2004) demonstrated that the use of semi-crystalline, relatively low molecular weight (10kD), and slow degrading poly(L-lactic acid) (PLA), better control the rhGH release profile from microspheres than the use of amorphous and fast-degrading PLGA. Semi-crystalline PLA microspheres have a nano-porous structure on the pore wall due to the preferential crystallization of PLA during the in-water solvent evaporation process; sustained release was

observed (100% in 34 days). As polymer degradation/erosion processes occurred after completing the protein release, the acidic microenvironment problem affecting protein instability events were avoided.

2.2.2 Preparation of porous microspheres

Processing conditions employed during the preparation of microspheres determine the properties of the microspheres, such as the size, morphology, encapsulation efficiency, and drug distribution. All these properties influence the release of the drug from the delivery system. Among these variables, the morphology of microspheres, especially their porosity, plays a key role in modulating drug release (Freiberg *et al.*, 2004); a large number of pores may greatly increase the rate of drug expulsion (Yang *et al.*, 2000). Porosity is determined during microsphere hardening as the organic solvent evaporates during preparation and is influenced by the preparation temperature, solvent removal rate, and the volume of internal water phase when the common solvent evaporation technique is employed.

To enable a better water uptake and an easier diffusion of the protein and of the polymer degradation products out of the polymer, porous microspheres were prepared by a range of groups. Biodegradable PLA or PLGA have been codissolved with various biocompatible hydrophilic or amphiphilic compounds in the encapsulation procedure to prevent acidic microclimate-induced instability reactions of proteins in degrading polymers.

For instance, PLGA was blended with pore-forming PEG in order to enhance the release of EPO, FITC-IgG, ovalbumin and insulin (Cleek R. L. *et al.*, 1997; Morlock *et al.*, 1998; Lavelle *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 2000). But, a burst and a steady rate of protein release *in vitro* were observed over 1 month. Complete release was not reached due to the presence of protein aggregates. To reduce the pH drop, PLGA was replaced by the slowly degrading PLA. The use of PLA/PEG blend resulted in much reduced fragmentation and aggregation of the protein related to a stable microparticle morphology over 4 weeks (Lavelle *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2001). When the PEG content in the blend was less than 20%, BSA release was incomplete and insoluble non-covalent BSA aggregates were observed in the residual device (Jiang *et al.*, 2001). In contrast, when PEG content was between 20 and 30%, continuous release was improved and BSA remained structurally intact.

In order to improve protein release from PLGA microspheres, protein-loaded microspheres consisting of blends of PLGA and non-ionic poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide) copolymers (poloxamers) were also prepared. Poloxamers are available in a wide range of molecular weights and hydrophilicity and thus provide further opportunities for varying the characteristics of protein release from microparticles. Linear protein release profiles over 25 days were exhibited by incorporating hydrophilic poloxamer 407 in PLGA microparticles obtained by water-in-oil-in-oil (w/o/o) encapsulation procedure (Yeh *et al.*, 1996). In contrast to PEG blended with PLGA, poloxamer resists the washing and the encapsulation process because of physical entanglements and complex formation (due to hydrogen bonding) between PLGA and poloxamer chains (Park *et al.*, 1992). Poloxamer is embedded in the hydrophobic matrix and its extraction is retarded. With more hydrophobic copolymers (poloxamer 401), the release profile had a propensity to plateau after 10 days. This was attributed to the absence of developed porosity in the microparticles. Poloxamer 188 was also used to prepare poloxamer/PLGA microparticles by solid-in-oil-in-oil (s/o/o) method. The lag phase was reduced and a more continuous release than with PLGA microparticles was observed. It is important to notice that the microsphere diameter was increased by the presence of the poloxamer in the s/o/o procedure (Carrasquillo *et al.*, 2001).

Recently, an original approach based on a pore-closing process of preformed porous microspheres has been reported (Kim *et al.*, 2006). A sustained release of rhGH over one month was achieved. Highly porous PLGA microspheres were fabricated using Poloxamer 407 as an extractable porogen. Afterward, the microspheres were loaded with rhGH by dipping and the pores were closed by a water miscible solvent that partially dissolves PLGA. The result was a continuous release via a diffusion-controlled mechanism through the water-filled porous channels. A similar strategy indicated the use of porous PLGA microspheres (obtained with Poloxamer 407) for sustained release of bFGF (Chung *et al.*, 2006). The release was controlled by using the binding affinities of heparin to the growth factor. Hence, heparin was immobilized onto the surface of porous PLGA microspheres via covalent conjugation and the release was dictated by the dissociation rate of the bFGF-heparin complex.

2.2.3 Minimization of the protein-polymer surface area

From the above discussion, it becomes clear that a rational modification of PLGA microspheres is required to achieve a controlled release of a stabilized protein. With this purpose in mind, some techniques have been used to minimize the protein-polymer surface area.

An interesting approach is to coat the outer surface of protein sub-micron particles with PLGA to control the release by a dissolution controlled mechanism (Kim *et al.*, 2001). PLGA only plays the role of a diffusion barrier during incubation time and protein-polymer interactions are reduced. The so-called A(aggregate)/O/W method consists of the protein aggregating in a reversibly dissociable form and in its subsequent coating by PLGA. This technique presents the advantage over the conventional s/o/w formulation to be a one-step process as the protein aggregates are formed during the spontaneous mixing of a water miscible organic solvent (ethyl acetate) with an aqueous protein solution. By using this technique, the formation of irreversible aggregates during processing is circumvented and the sustained release of the native monomeric form is achieved.

The minimization of the protein-polymer surface area by the use of microcapsules instead of microspheres was supposed to alleviate interaction between proteins and polymers (Park *et al.*, 2006). Consequently, the preparation of reservoir-type microcapsules by a solvent exchange method has been detailed. This technique involves the collision between droplets of aqueous and organic solutions generated by a coaxial ultrasonic atomizer, the spreading of the organic solution on the aqueous core, and the mutual mass transfer of the solvents. Interestingly, the microcapsules released unaltered lysozyme in a sustained manner without a significant burst effect. The release rate was governed by diffusion through the polymer membrane layer.

To conclude this section 2.2., strategies that modify the PLGA microparticles seem to be relevant to avoid protein interactions with degrading polymers. While amorphous PLGA copolymers were the most widely used polymers in protein delivery because of the variety of PLGA copolymers commercially available, it soon became clear that it shows certain disadvantages for protein delivery, e.g. the triphasic protein release kinetics, the bulk erosion mechanism of degradation (an accumulation of acidic PLGA chains in the centre of the

formulation), and its hydrophobicity. Therefore, though using relatively fast-degrading PLGA copolymers such as 50:50 PLGA for synchronizing a polymer degradation rate with a protein release rate, many attempts have been made to delay hydrolysis of the PLGA ester bonds to avoid acid build-up. Whereas this strategy has not been sufficient to release the protein continuously, water soluble compounds have been associated in the matrix to enhance microsphere porosity, or even a pore-closing process has been used to create a porous matrix without inducing burst effect. Finally, methods where protein-polymer interactions are reduced *via* a diffusion-controlled release have exhibited beneficial effects for protein release.

Conclusion

The development of biodegradable microparticles for protein drug delivery has been hindered by various obstacles due to protein instability issues such as their incomplete release from PLGA devices. The understanding of this mechanism has required studying the *in vitro* protein release in appropriate conditions and limiting effects as well as evaluating the integrity of the protein remaining inside the microspheres. Knowing the influence of the release medium and of the method of sampling is critical to fairly compare different formulations and to identify the best stabilizing strategy to adopt.

Approaches ensuring better protein release profiles from PLGA microparticles have been reported. They were based on the modification of either the microparticle formulation (protein, polymer, possible additives) or the microencapsulation process (protein microenvironment, microparticle formation). These strategies may be classified in two types: those tending to shield the protein from degradation and adsorption during the release period, and those tending to avoid these deleterious phenomenon to break out.

An optimal strategy should protect the protein during the different stages of release. Moreover, it should be simple and transposable to any protein (even the more fragile and for low-loaded microspheres). Finally, it should not induce burst effect.

Taking into account these considerations, some of the reported strategies are highly relevant, such as the one concerning the refolding of the protein in the release medium, the one using more hydrophilic polymers, and the one creating a viscous microenvironment around the protein. Obviously, the association of different strategies is conceivable. It seems that the delivery of therapeutic proteins over a prolonged period is within reach.

References

- Al-Azzam, W.Pastrana, E. and Griebenow, K., 2002. Co-lyophilization of bovine serum albumin (BSA) with poly(ethylene glycol) improves efficiency of BSA encapsulation and stability in polyester microspheres by a solid-in-oil-in-oil technique, *Biotechnol Letters*, 24, 1367-1374.
- Anderson, J.M. and Shive, M.S., 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Adv Drug Deliv Rev*, 28, 1, 5-24.
- Aubert-Pouessel, A.Bibby, D.C.Venier-Julienne, M.C.Hindre, F. and Benoit, J.P., 2002. A novel in vitro delivery system for assessing the biological integrity of protein upon release from PLGA microspheres, *Pharm Res*, 19, 7, 1046-51.
- Aubert-Pouessel, A.Venier-Julienne, M.C.Clavreul, A.Sergent, M.Jollivet, C.Montero-Menei, C.N.Garcion, E.Bibby, D.C.Menei, P. and Benoit, J.P., 2004. In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres, *J Control Release*, 95, 3, 463-75.
- Batycky, R.P.Hanes, J.Langer, R. and Edwards, D.A., 1997. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres, *J Pharm Sci*, 86, 12, 1464-1477.
- Bilati, U.Allemann, E. and Doelker, E., 2005. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles, *Eur J Pharm Biopharm*, 59, 3, 375-88.
- Blanco, D. and Alonso, M.J., 1998. Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants, *Eur J Pharm Biopharm*, 45, 3, 285-94.
- Blanco-Prieto, M.J.Campanero, M.A.Besseghir, K.Heimgatner, F. and Gander, B., 2004. Importance of single or blended polymer types for controlled in vitro release and plasma levels of a somatostatin analogue entrapped in PLA/PLGA microspheres, *J Control Release*, 96, 3, 437-48.
- Bodmer, D.Kissel, T. and Traechslin, E., 1992. Factors influencing the release of peptides and proteins from biodegradable parenteral depot systems, *J Control Release*, 21, 1-3, 129-138.
- Bouillot, P.Ubrich, N.Sommer, F.Duc, T.M.Loeffler, J.P. and Dellacherie, E., 1999. Protein encapsulation in biodegradable amphiphilic microspheres, *Int J Pharm*, 181, 2, 159-72.
- Boury, F.Marchais, H.Proust, J.E. and Benoit, J.P., 1997. Bovine serum albumin release from poly([alpha]-hydroxy acid) microspheres: effects of polymer molecular weight and surface properties, *J Control Release*, 45, 1, 75-86.
- Burke, P., 2000. Controlled release protein therapeutics: effects of process and formulation on stability. In: Wise, D. L. (Ed.), *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*, Marcel Dekker, New York, pp. 661-692.

Capan, Y.Jiang, G.Giovagnoli, S.Na, K.H. and DeLuca, P.P., 2003. Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for controlled release of human growth hormone, *AAPS PharmSciTech*, 4, 2, E28.

Carrasquillo, K.G.Stanley, A.M.Aponte-Carro, J.C.De Jesus, P.Costantino, H.R.Bosques, C.J. and Griebenow, K., 2001. Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein, *J Control Release*, 76, 3, 199-208.

Castellanos, I.J.Al-Azzam, W. and Griebenow, K., 2005. Effect of the covalent modification with poly(ethylene glycol) on alpha-chymotrypsin stability upon encapsulation in poly(lactic-co-glycolic) microspheres, *J Pharm Sci*, 94, 2, 327-40.

Castellanos, I.J.Cruz, G.Crespo, R. and Griebenow, K., 2002. Encapsulation-induced aggregation and loss in activity of gamma-chymotrypsin and their prevention, *J Control Release*, 81, 3, 307-19.

Cho, K.Y.Choi, S.H.Kim, C.Nam, Y.S.Park, T.G. and Park, J., 2001. Protein release microparticles based on the blend of poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) and oligo-ethylene glycol grafted poly(l-lactide), *J Control Release*, 76, 275-284.

Chung, H.J.Kim, H.K.Yoon, J.J. and Park, T.G., 2006. Heparin immobilized porous PLGA microspheres for angiogenic growth factor delivery, *Pharm Res*, 23, 8, 1835-41.

Cleek R. L., T.K.C., Eskin S.G., Mikos A.G., 1997. Microparticles of poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) blends for controlled drug delivery, *J Control Release*, 48, 259-268.

Cleland, J.L.Duenas, E.Daugherty, A.Marian, M.Yang, J.Wilson, M.Celniker, A.C.Shahzamani, A.Quarmby, V.Chu, H.Mukku, V.Mac, A.Roussakis, M.Gillette, N.Boyd, B.Yeung, D.Brooks, D.Maa, Y.-F.Hsu, C. and Jones, A.J.S., 1997. Recombinant human growth hormone poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres provide a long lasting effect, *J Control Release*, 49, 2-3, 193-205.

Costantino, H.R.Langer, R. and Klibanov, A.M., 1994. Moisture-induced aggregation of lyophilized insulin, *Pharm Res*, 11, 1, 21-9.

Costantino, H.R.Langer, R. and Klibanov, A.M., 1994. Solid-phase aggregation of proteins under pharmaceutically relevant conditions, *J Pharm Sci*, 83, 12, 1662-9.

Crotts, G. and Park, T.G., 1998. Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues, *J Microencapsul*, 15, 6, 699-713.

Crotts, G. and Park, T.G., 1997. Stability and release of bovine serum albumin encapsulated within poly(-lactide-co-glycolide) microparticles, *J Control Release*, 44, 2-3, 123-134.

Crotts, G.Sah, H. and Park, T.G., 1997. Adsorption determines in-vitro protein release rate from biodegradable microspheres: Quantitative analysis of surface area during degradation, *J Control Release*, 47, 1, 101-111.

Deng, X.Zhou, S.Li, X.Zhao, J. and Yuan, M., 2001. In vitro degradation and release profiles for poly-dl-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres containing human serum albumin, *J Control Release*, 71, 2, 165-73.

Diwan, M. and Park, T.G., 2001. Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres, *J Control Release*, 73, 2-3, 233-44.

Diwan, M. and Park, T.G., 2003. Stabilization of recombinant interferon-alpha by pegylation for encapsulation in PLGA microspheres, *Int J Pharm*, 252, 1-2, 111-22.

D'Souza, S.S. and DeLuca, P.P., 2006. Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric particulate systems, *Pharm Res*, 23, 3, 460-74.

Fournier, E.Passirani, C.Montero-Menei, C.N. and Benoit, J.P., 2003. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility, *Biomaterials*, 24, 19, 3311-31.

Frauke Pistel, K.Breitenbach, A.Zange-Volland, R. and Kissel, T., 2001. Brush-like branched biodegradable polyesters, part III. Protein release from microspheres of poly(vinyl alcohol)-graft-poly(D,L-lactic-co-glycolic acid), *J Control Release*, 73, 1, 7-20.

Freiberg, S. and Zhu, X.X., 2004. Polymer microspheres for controlled drug release, *Int J Pharm*, 282, 1-2, 1-18.

Fu, K.Harrell, R.Zinski, K.Um, C.Jaklenec, A.Frazier, J.Lotan, N.Burke, P.Klibanov, A.M. and Langer, R., 2003. A potential approach for decreasing the burst effect of protein from PLGA microspheres, *J Pharm Sci*, 92, 8, 1582-91.

Harris, A.S. and Mitra, A.K., 1998. Peptide and protein pegylation II - clinical evaluation, *Adv Drug Deliv Rev*, 29, 1-2, 1.

Hora, M.S.Rana, R.K.Nunberg, J.H.Tice, T.R.Gilley, R.M. and Hudson, M.E., 1990. Release of human serum albumin from poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *Pharm Res*, 7, 11, 1190-1194.

Ibrahim, M.A.Ismail, A.Fetouh, M.I. and Gopferich, A., 2005. Stability of insulin during the erosion of poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres, *J Control Release*, 106, 3, 241-52.

Jiang, G.Qiu, W. and DeLuca, P.P., 2003. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of insulin-loaded poly(acryloyl-hydroxyethyl starch)-PLGA composite microspheres, *Pharm Res*, 20, 3, 452-9.

Jiang, G.Woo, B.H.Kang, F.Singh, J. and DeLuca, P.P., 2002. Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres, *J Control Release*, 79, 1-3, 137-45.

Jiang, W. and Schwendeman, S.P., 2001. Stabilization and controlled release of bovine serum albumin encapsulated in poly(D, L-lactide) and poly(ethylene glycol) microsphere blends, *Pharm Res*, 18, 6, 878-85.

Johansen, P.Men, Y.Audran, R.Corradin, G.Merkle, H.P. and Gander, B., 1998. Improving stability and release kinetics of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives, *Pharm Res*, 15, 7, 1103-10.

Johnson, O.L.Jaworowicz, W.Cleland, J.L.Bailey, L.Charnis, M.Duenas, E.Wu, C.Shepard, D.Magil, S.Last, T.Jones, A.J. and Putney, S.D., 1997. The stabilization and encapsulation of human growth hormone into biodegradable microspheres, *Pharm Res*, 14, 6, 730-5.

Jung, T.Koneberg, R.Hungerer, K.D. and Kissel, T., 2002. Tetanus toxoid microspheres consisting of biodegradable poly(lactide-co-glycolide)- and ABA-triblock-copolymers: immune response in mice, *Int J Pharm*, 234, 1-2, 75-90.

Kim, H.K.Chung, H.J. and Park, T.G., 2006. Biodegradable polymeric microspheres with "open/closed" pores for sustained release of human growth hormone, *J Control Release*, 112, 2, 167-174.

Kim, H.K. and Park, T.G., 2004. Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(L-lactic acid) and amorphous poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: morphological effect on protein release, *J Control Release*, 98, 1, 115-25.

Kim, H.K. and Park, T.G., 2001. Microencapsulation of dissociable human growth hormone aggregates within poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microparticles for sustained release, *Int J Pharm*, 229, 1-2, 107-16.

Kim, H.K. and Park, T.G., 1999. Microencapsulation of human growth hormone within biodegradable polyester microspheres: protein aggregation stability and incomplete release mechanism, *Biotechnol Bioeng*, 65, 6, 659-67.

Kim, J.H.Taluja, A.Knutson, K. and Han Bae, Y., 2005. Stability of bovine serum albumin complexed with PEG-poly(l-histidine) diblock copolymer in PLGA microspheres, *J Control Release*, 109, 1-3, 86-100.

Kissel, T.Li, Y. and Unger, F., 2002. ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins, *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 1, 99-134.

Kissel, T.Li, Y.X.Volland, C.Go?rich, S. and Koneberg, R., 1996. Parenteral protein delivery systems using biodegradable polyesters of ABA block structure, containing hydrophobic poly(lactide-co-glycolide) A blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B blocks, *J Control Release*, 39, 2-3, 315-326.

Koll, H.Winter, G.Kissel, T. and Morlock, M. Polypeptide-containing pharmaceutical forms of administration in the form of microparticles and method for the preparation thereof, 6,346,274, U.S., 2002.

Kwon, Y.M. and Kim, S.W., 2004. Biodegradable triblock copolymer microspheres based on thermosensitive sol-gel transition, *Pharm Res*, 21, 2, 339-43.

Lagarce, F.Garcion, E.Faisant, N.Thomas, O.Kanaujia, P.Menei, P. and Benoit, J.P., 2006. Development and characterization of interleukin-18-loaded biodegradable microspheres, *Int J Pharm*, 314, 2, 179-88.

Lam, X.M.Duenas, E.T. and Cleland, J.L., 2001. Encapsulation and stabilization of nerve growth factor into poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres, *J Pharm Sci*, 90, 9, 1356-65.

Lam, X.M.Duenas, E.T.Daugherty, A.L.Levin, N. and Cleland, J.L., 2000. Sustained release of recombinant human insulin-like growth factor-I for treatment of diabetes, *J Control Release*, 67, 2-3, 281-92.

Lavelle, E.C.Yeh, M.K.Coombes, A.G. and Davis, S.S., 1999. The stability and immunogenicity of a protein antigen encapsulated in biodegradable microparticles based on blends of lactide polymers and polyethylene glycol, *Vaccine*, 17, 6, 512-29.

Lee, E.S.Kwon, M.J.Lee, H. and Kim, J.J., 2007. Stabilization of protein encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) microspheres by novel viscous S/W/O/W method, *Int J Pharm*, 331, 1, 27-37.

Lee, E.S.Park, K.Park, I.S. and Na, K., 2007. Glycol chitosan as stabilizer for protein encapsulated into poly(lactide-co-glycolide) microparticles, *Int J Pharm*, 338, 310-316.

Lee, E.S.Kwon, M.J.Lee, H.Na, K. and Kim, J.J., 2006. In vitro study of lysozyme in poly(lactide-co-glycolide) microspheres with sucrose acetate isobutyrate, *Eur J Pharm Sci*, 29, 5, 435-441.

Li, J.K.Wang, N. and Wu, X.S., 1997. A novel biodegradable system based on gelatin nanoparticles and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery, *J Pharm Sci*, 86, 8, 891-5.

Li, X.Zhang, Y.Yan, R.Jia, W.Yuan, M.Deng, X. and Huang, Z., 2000. Influence of process parameters on the protein stability encapsulated in poly--lactide-poly(ethylene glycol) microspheres, *J Control Release*, 68, 1, 41-52.

Lu, L.Yaszemski, M.J. and Mikos, A.G., 2001. TGF-beta1 release from biodegradable polymer microparticles: its effects on marrow stromal osteoblast function., *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*, 83 A Suppl 1, Pt 2,

Lucke, A.Fustella, E.Tessmar, J.Gazzaniga, A. and Gopferich, A., 2002. The effect of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactic acid) diblock copolymers on peptide acylation, *J Control Release*, 80, 1-3, 157-68.

Makino, K.Ohshima, H. and Kondo, T., 1986. Mechanism of hydrolytic degradation of poly(L-lactide) microcapsules: effects of pH, ionic strength and buffer concentration, *J Microencapsul*, 3, 3, 203-12.

Mi, F.L.Shyu, S.S.Lin, Y.M.Wu, Y.B.Peng, C.K. and Tsai, Y.H., 2003. Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug delivery system: a new delivery system for protein, *Biomaterials*, 24, 27, 5023-36.

Morita, T.Horikiri, Y.Suzuki, T. and Yoshino, H., 2001. Applicability of various amphiphilic polymers to the modification of protein release kinetics from biodegradable reservoir-type microspheres, *Eur J Pharm Biopharm*, 51, 1, 45-53.

Morita, T.Horikiri, Y.Yamahara, H.Suzuki, T. and Yoshino, H., 2000. Formation and isolation of spherical fine protein microparticles through lyophilization of protein-poly(ethylene glycol) aqueous mixture, *Pharm Res*, 17, 11, 1367-73.

Morita, T.Sakamura, Y.Horikiri, Y.Suzuki, T. and Yoshino, H., 2001. Evaluation of in vivo release characteristics of protein-loaded biodegradable microspheres in rats and severe combined immunodeficiency disease mice, *J Control Release*, 73, 2-3, 213-21.

Morita, T.Sakamura, Y.Horikiri, Y.Suzuki, T. and Yoshino, H., 2000. Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant, *J Control Release*, 69, 3, 435-44.

Morlock, M.Kissel, T.Li, Y.X.Koll, H. and Winter, G., 1998. Erythropoietin loaded microspheres prepared from biodegradable LPLG-PEO-LPLG triblock copolymers: protein stabilization and in-vitro release properties, *J Control Release*, 56, 1-3, 105-15.

Nam, Y.S.Song, S.H.Choi, J.Y. and Park, T.G., 2000. Lysozyme microencapsulation within biodegradable PLGA microspheres: urea effect on protein release and stability, *Biotechnol Bioeng*, 70, 3, 270-7.

Park, J.H.Ye, M.Yeo, Y.Lee, W.K.Paul, C. and Park, K., 2006. Reservoir-type microcapsules prepared by the solvent exchange method: effect of formulation parameters on microencapsulation of lysozyme, *Mol Pharm*, 3, 2, 135-43.

Park, T.G., 1995. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition, *Biomaterials*, 16, 15, 1123-30.

Park, T.G.Cohen, S. and Langer, R., 1992. Poly(L-lactic acid)/pluronic blends: characterization of phase separation behaviour, degradation and morphology and use as protein-releasing matrices, *Macromolecules*, 25, 116-122.

Park, T.G.Lu, W. and Crotts, G., 1995. Importance of in vitro experimental conditions on protein release kinetics, stability and polymer degradation in protein encapsulated poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) microspheres, *J Control Release*, 33, 2, 211-222.

Park, T.G.Yong Lee, H. and Sung Nam, Y., 1998. A new preparation method for protein loaded poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres and protein release mechanism study, *J Control Release*, 55, 2-3, 181-91.

Pean, J.M.Boury, F.Venier-Julienne, M.C.Menei, P.Proust, J.E. and Benoit, J.P., 1999. Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres?, *Pharm Res*, 16, 8, 1294-9.

Perez, C.Castellanos, I.J.Costantino, H.R.Al-Azzam, W. and Griebenow, K., 2002. Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers, *J Pharm Pharmacol*, 54, 3, 301-13.

Perez, C.Montano, N.Gonzalez, K. and Griebenow, K., 2003. Stabilization of α -chymotrypsin at the CH_2Cl_2 /water interface and upon water-in-oil-in-water encapsulation in PLGA microspheres, *J Control Release*, 89, 71-85.

Rosa, G.D.Iommelli, R.La Rotonda, M.I.Miro, A. and Quaglia, F., 2000. Influence of the co-encapsulation of different non-ionic surfactants on the properties of PLGA insulin-loaded microspheres, *J Control Release*, 69, 2, 283-295.

Sah, H., 1999. Stabilization of proteins against methylene chloride/water interface-induced denaturation and aggregation, *J Control Release*, 58, 2, 143-51.

Sanchez, A.Villamayor, B.Guo, Y.McIver, J. and Alonso, M.J., 1999. Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *Int J Pharm*, 185, 2, 255-66.

Sandor, M.Enscore, D.Weston, P. and Mathiowitz, E., 2001. Effect of protein molecular weight on release from micron-sized PLGA microspheres, *J Control Release*, 76, 3, 297-311.

Schwendeman, S.P.Cardamone, M.Klibanov, A.Langer, R. and Brandon, M.R. Stability of proteins and their delivery from biodegradable polymer microspheres. In Cohen, S. and Bernstein, H. (eds), *Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines* (Cohen, S. and Bernstein, H., eds), Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 1-49.

Shao, P.G. and Bailey, L.C., 1999. Stabilization of pH-induced degradation of porcine insulin in biodegradable polyester microspheres, *Pharm Dev Technol*, 4, 4, 633-42.

Sinha, V.R. and Trehan, A., 2003. Biodegradable microspheres for protein delivery, *J Control Release*, 90, 3, 261-80.

Sturesson, C. and Carlfors, J., 2000. Incorporation of protein in PLG-microspheres with retention of bioactivity, *J Control Release*, 67, 2-3, 171-178.

Tamber, H.Johansen, P.Merkle, H.P. and Gander, B., 2005. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery, *Adv Drug Deli Rev*, 57, 3 SPEC. ISS., 357-376.

van de Weert, M.Hennink, W.E. and Jiskoot, W., 2000. Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles, *Pharm Res*, 17, 10, 1159-67.

Visscher, G.E.Robison, R.L.Maulding, H.V.Fong, J.W.Pearson, J.E. and Argentieri, G.J., 1985. Biodegradation of and tissue reaction to 50:50 poly(DL-lactide-co-glycolide) microcapsules, *J Biomed Mater Res*, 19, 3, 349-65.

Wang, J.Chua, K.M. and Wang, C.H., 2004. Stabilization and encapsulation of human immunoglobulin G into biodegradable microspheres, *J Colloid Interface Sci*, 271, 1, 92-101.

Wang, N., 1998. A novel approach to stabilization of protein drugs in poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres using agarose hydrogel, *Int J Pharm*, 166, 1-14.

Wang, N.Wu, X.S. and Li, J.K., 1999. A heterogeneously structured composite based on poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres and poly(vinyl alcohol) hydrogel nanoparticles for long-term protein drug delivery, *Pharm Res*, 16, 9, 1430-5.

Wang, W., 1999. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals, *Int J Pharm*, 185, 2, 129-88.

Wang, W., 2005. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceuticals, *Int J Pharm*, 289, 1-2, 1-30.

Woo, B.H.Jiang, G.Jo, Y.W. and DeLuca, P.P., 2001. Preparation and characterization of a composite PLGA and poly(acryloyl hydroxyethyl starch) microsphere system for protein delivery, *Pharm Res*, 18, 11, 1600-6.

Yang, J. and Cleland, J.L., 1997. Factors affecting the in vitro release of recombinant human interferon-gamma (rhIFN-gamma) from PLGA microspheres, *J Pharm Sci*, 86, 8, 908-14.

Yang, Y.-Y.Chung, T.-S.Bai, X.-L. and Chan, W.-K., 2000. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method, *Chemical Engineering Science*, 55, 12, 2223-2236.

Yeh, M.K., 2000. The stability of insulin in biodegradable microparticles based on blends of lactide polymers and polyethylene glycol, *J Microencapsul*, 17, 6, 743-56.

Yeh, M.K.Davis, S.S. and Coombes, A.G., 1996. Improving protein delivery from microparticles using blends of poly(DL lactide co-glycolide) and poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) copolymers, *Pharm Res*, 13, 11, 1693-8.

Zale, S.E.Burke, P.A.Bernstein, H. and Brickner, A. Composition for sustained release of non-aggregated erythropoietin, 5,716,644, US, 1997.

Zhou, S.Liao, X.Li, X.Deng, X. and Li, H., 2003. Poly-D,L-lactide-co-poly(ethylene glycol) microspheres as potential vaccine delivery systems, *J Control Release*, 86, 2-3, 195-205.

Zhu, G.Mallery, S.R. and Schwendeman, S.P., 2000. Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide- co-glycolide), *Nat Biotechnol*, 18, 1, 52-7.

Zhu, G. and Schwendeman, S.P., 2000. Stabilization of proteins encapsulated in cylindrical poly(lactide-co-glycolide) implants: mechanism of stabilization by basic additives, *Pharm Res*, 17, 3, 351-7.

CHAPITRE 2

2.1. Mise au point d'une méthode de stabilisation d'une protéine lors de son encapsulation dans des microsphères de PLGA

Le premier défi à relever lorsque l'on veut administrer des protéines via des microsphères de PLGA est celui de la stabilité pendant l'encapsulation. En effet, ces macromolécules sont très fragiles et elles peuvent s'agréger ou subir des dégradations chimiques [1]. Si la protéine est modifiée chimiquement lors de la préparation des microsphères, elle ne pourra pas être reconnue dans l'organisme, son activité biologique sera altérée, elle pourra même présenter des effets inattendus. L'agrégation des protéines peut être induite par altération chimique ou d'autres phénomènes tels qu'une température élevée, de fortes forces ioniques, une agitation importante, une adsorption aux interfaces... L'agrégation d'une protéine peut augmenter son immunogénicité voire altérer sa solubilité. Dans ce cas, sa libération à travers les pores créés dans les microsphères hydratées sera impossible.

Une autre difficulté majeure du développement de microsphères de PLGA chargées en protéine est liée à l'utilisation de solvants organiques toxiques. La méthode classique de double émulsion utilisée pour préparer des microsphères nécessite l'utilisation de solvants volatils toxiques (dichlorométhane, acétone) pour dissoudre le PLGA. La présence de résidus de ces solvants non injectables doit répondre aux limites définies par la Pharmacopée Européenne. D'autre part, à l'échelle industrielle, la manipulation de tels solvants implique de développer une infrastructure spécifique. Le développement d'une méthode de préparation de microsphères de PLGA n'impliquant que des excipients approuvés dans le domaine pharmaceutique est donc nécessaire. Notre équipe a précédemment développé une méthode basée sur un procédé d'émulsion-extraction faisant intervenir le glycofurol, solvant du PLGA déjà utilisé pour des injections parentérales [2]. La transposition industrielle de cette technique étant difficile à réaliser, nous avons envisagé le développement d'un procédé mécanique basé sur la technique du prilling. En plus d'être utilisable à l'échelle industrielle, ce procédé présente l'avantage de conduire à des microparticules monodisperses et de pouvoir être réalisé en conditions aseptiques, caractères essentiels pour l'utilisation des microparticules en thérapie cellulaire. Ce procédé est largement utilisé pour la préparation de billes d'alginate par gélification thermique [3] et pourrait être adapté à la préparation de microparticules de PLGA sans solvant toxique en utilisant le glycofurol. Le PLGA serait ainsi

dissous dans le glycofurol et un jet laminaire de cette solution pourrait ensuite être cisailé en gouttes par vibrations. Les gouttes résultantes pourraient être durcies dans un bain de non-solvant du PLGA, dans lequel le glycofurol serait miscible (**Figure 1**).

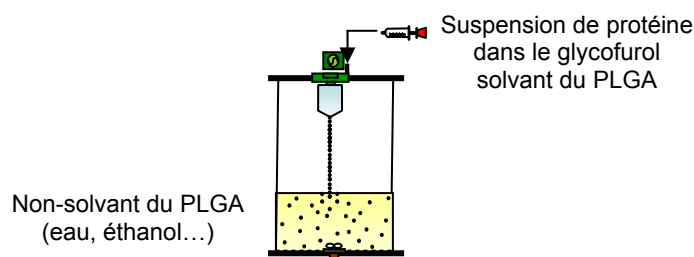


Figure 1. Concept de préparation des microsphères de PLGA par prilling.

Nous avons montré l'absence de toxicité du glycofurol sur des MSCs par un test MTS pour une quantité de glycofurol inférieure à 500 μ g pour 4500 cellules et nous avons prouvé la possibilité d'obtenir des particules de PLGA par ce concept. Des billes de 800 μ m ont ainsi été préparées à l'aide d'une buse de 400 μ m.

Avant d'optimiser ce procédé d'obtention des particules (taille et morphologie des particules, rendement d'encapsulation...), nous avons souhaité stabiliser la protéine pendant l'étape d'encapsulation, sans utiliser de carrier de type albumine. En effet, lors de son encapsulation, la protéine subit des conditions délétères susceptibles d'entraîner sa dénaturation ou son agrégation. Par émulsion-extraction/évaporation de solvant, la protéine peut s'agréger aux interfaces eau/solvant organique, s'adsorber au polymère ou encore être déstabilisée par les forces mécaniques exercées [4-6]. Dans cette étude, une méthode permettant la stabilisation de la protéine non seulement par émulsion-extraction/évaporation de solvant mais également par toute autre méthode de microencapsulation (spray-drying, spray-freeze-drying, extrusion, prilling...) a été développée. La stratégie de stabilisation devait être simple et non spécifique à une protéine pour pouvoir tester différents facteurs de croissance intéressants en thérapie cellulaire. Toujours dans l'objectif d'encapsuler des facteurs de croissance, la méthode de stabilisation développée ne devait pas entraîner de perte de protéine. Enfin, pour des raisons sanitaires et pour éviter l'apparition d'un « burst », l'utilisation d'additifs hydrophiles (albumine humaine, polymères hydrophiles...) devait être évitée.

Pour préserver l'intégrité de la protéine pendant la préparation de microsphères de PLGA, nous avons donc mis au point une technique pour obtenir une protéine à l'état solide, état où la protéine est la moins fragile. Nous avons répondu à notre cahier des charges en précipitant la protéine à l'aide du chlorure de sodium et du glycofurol, non solvant de la

protéine. L'importance de développer un procédé ne faisant pas intervenir de solvant organique toxique, notamment pour la thérapie cellulaire, a ainsi été considérée. Afin de considérer le seul problème de stabilité protéique, nous avons fait le choix d'utiliser la méthode classique d'émulsion-évaporation/extraction de solvant pour préparer les microsphères.

Le procédé de précipitation est basé sur la formation d'une suspension de protéine dans le glycofurol par ajout d'une solution saline de protéine à un excès de glycofurol. Ce procédé a été optimisé grâce à des plans d'expériences. Dans un premier temps, l'influence des facteurs technologiques sur le rendement de précipitation d'une protéine modèle, la β -galactosidase a été estimée à l'aide d'un plan factoriel complet (2^3) (**Tableau 1**). Le rendement de précipitation correspond à la quantité de précipité récupéré et actif après remise en solution. Les facteurs étudiés ont été :

- la température du milieu réactionnel (4°C-température ambiante),
- le temps de contact entre les différents composants (1 min-30 min),
- le temps de centrifugation nécessaire à la récupération de la protéine précipitée (5 min-30 min).

Tableau 1. Domaine expérimental.

Facteurs	Niveaux	
	-1	+1
Température (°C)	4	Température ambiante
Temps de centrifugation (min)	5	30
Temps de contact	1	30

Chaque expérience a été dupliquée ($S^2=41.5$; 8 ddl). L'analyse graphique des effets des facteurs étudiés montre que seuls les temps de centrifugation et de contact ont une influence significative sur le rendement de précipitation (de façon réversible) (**Figure 2**). A l'issue de cette première étape, des temps de contact et de centrifugation de 30 min ont été sélectionnés et la précipitation a été effectuée à température ambiante.

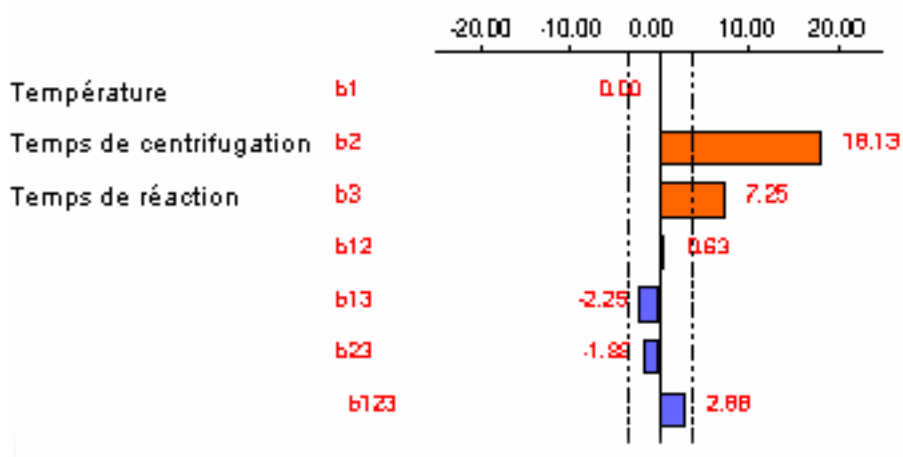


Figure 2. Etude graphique des effets des facteurs technologiques sur la précipitation de la β -galactosidase et de leurs interactions.

La longueur de chaque barre est proportionnelle à la valeur absolue de l'effet « b » de chaque facteur. Une barre à droite de l'axe central indique un effet positif du facteur sur le rendement de précipitation et inversement. Les pointillés représentent les limites de signification de l'effet des facteurs. Au-delà de cette limite, l'effet est considéré comme influent sur le rendement de précipitation. (NEMROD[®]W, 2000, LPRAI, Marseille)

Dans une seconde étape, la composition du mélange a été modifiée afin d'obtenir une précipitation de la β -galactosidase proche de 100%. Trois facteurs ont été étudiés à l'aide d'une matrice de Doehlert. Les propriétés de séquentialité de la matrice de Doehlert ont été exploitées pour centrer le domaine expérimental sur une zone d'intérêt. Cette démarche a permis de retenir le domaine expérimental suivant (pour 1 ml de suspension):

- force ionique de la phase aqueuse (0,01 M-0,59 M) (U_1),
- volume de phase aqueuse (25 μ l-155 μ l) (U_2),
- quantité de protéine (0,1-0,9 mg) (U_3).

La réponse expérimentale est le pourcentage de précipité récupéré et actif après réhydratation ($n=2$; $S^2=71.9$; 17 ddl). L'estimation des coefficients du modèle (polynomial de degré 2) a été effectuée à l'aide de la méthode des moindres carrés (NEMROD[®]W, 2000, LPRAI, Marseille). L'analyse de la variance montre une validité du modèle acceptable (27%). Mais, le peu de variation de la réponse entraîne une régression non significative, l'ensemble de la matrice étant centré sur l'optimum. Quelque soit la quantité de protéine utilisée, il est possible d'obtenir un taux de précipitation de la protéine > 90%. La représentation graphique de la variation de la réponse pour une quantité de protéine de 0.5 mg est représentée sur la figure 3.

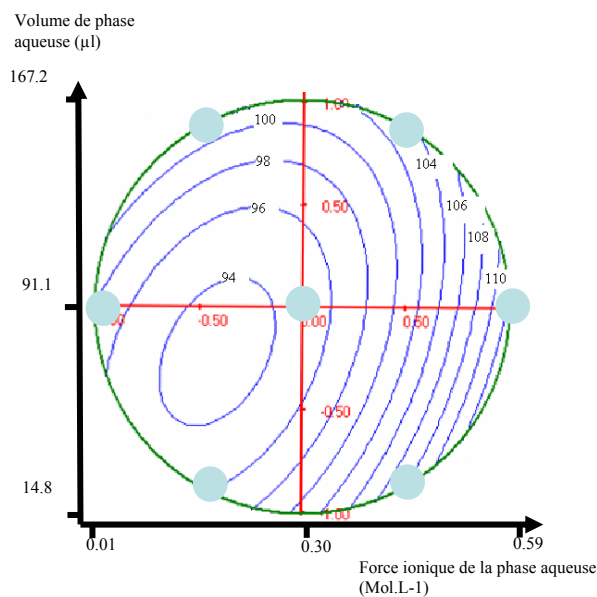


Figure 3. Représentation graphique du pourcentage de protéine précipitée et active après remise en solution pour 0.5 mg de β -galactosidase.

Afin de tester la robustesse de ce procédé de précipitation, nous avons appliqué la même matrice à trois autres protéines modèles (le lysozyme, l' α -chymotrypsine et la peroxydase). Ces protéines sont des enzymes et la mesure de leur activité biologique est donc simple à estimer. Les résultats de cette étude sont présentés dans ce chapitre.

Références

- [1] W. Wang, Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics, *Int J Pharm* 289 (1-2) (2005) 1-30.
- [2] A. Aubert-Pouessel, M. C. Venier-Julienne, P. Saulnier, M. Sergent, J. P. Benoit, Preparation of PLGA microparticles by an emulsion-extraction process using glycofurol as polymer solvent, *Pharm Res* 21 (12) (2004) 2384-91.
- [3] S. Koch, C. Schwinger, J. Kressler, C. Heinzen, N. G. Rainov, Alginate encapsulation of genetically engineered mammalian cells: comparison of production devices, methods and microcapsule characteristics, *J Microencapsul* 20 (3) (2003) 303-16.
- [4] H. Sah, Stabilization of proteins against methylene chloride/water interface-induced denaturation and aggregation, *J Control Release* 58 (2) (1999) 143-51.
- [5] M. van de Weert, W. E. Hennink, W. Jiskoot, Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles, *Pharm Res* 17 (10) (2000) 1159-67.
- [6] M. van de Weert, J. Hoehstetter, W. E. Hennink, D. J. Crommelin, The effect of a water/organic solvent interface on the structural stability of lysozyme, *J Control Release* 68 (3) (2000) 351-9.

Reversible protein precipitation to ensure its stability during encapsulation within PLGA microspheres

Alexandra Giteau¹, Marie-Claire Venier-Julienne^{1,4}, Stéphane Marchal², Jean-Luc Courthaudon¹, Michèle Sergent³, Claudia Montero-Menei¹, Jean-Michel Verdier², Jean-Pierre Benoit¹

¹Inserm, U646, Angers, F-49100 France; Université d'Angers, Angers, F-49100 France.

²Inserm, U710, Montpellier, F-34095 France; Université de Montpellier 2, Montpellier, F-34095 France; EPHE, Montpellier, F-34095 France.

³Laboratoire de Méthodologie de la Recherche Expérimentale, Université Paul Cézanne, Marseille, F-13397 France.

Submitted in European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

Abstract

Proteins were precipitated to ensure their stability upon subsequent encapsulation within PLGA microspheres. Spherical, nanosized protein particles were formed by the addition of a salt (sodium chloride) and a water-miscible organic solvent (glycofurol) to protein solutions. Various process parameters were modified to optimize the precipitation efficiency of four model proteins: lysozyme, α -chymotrypsin, peroxidase and β -galactosidase. As monitored by enzymatic activity measurement of the rehydrated particles, conditions to obtain more than 95% of reversible precipitates were defined for each protein. The study of the structure of the rehydrated particles by absorbance spectroscopy, fluorescence spectroscopy and circular dichroism showed an absence of structural perturbation after precipitation. Protein particles were then microencapsulated within PLGA microspheres using a s/o/w technique. The average encapsulation yield was around 80% and no loss of protein activity occurred after the encapsulation step. Additionally, a lysozyme *in vitro* release study showed that all of the released lysozyme was biologically active. This method of protein precipitation is appropriate for the encapsulation in PLGA microspheres of various proteins without inactivation.

KEY WORDS: protein precipitation; protein stability; microspheres; poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA); solid-in-oil-in-water (s/o/w) encapsulation procedure.

INTRODUCTION

Although the production of various proteins has become possible with the recent advances in biotechnology, their use for therapeutic purposes has been limited due to their physical and chemical instability. Due to their relatively high enzymatic susceptibility and short half-life, much attention has been paid to their delivery from systems controlling their local release [1]. Numerous studies have reported their delivery from injectable, biodegradable microspheres made of poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) [2-5]. Among the techniques used for the preparation of PLGA microspheres loaded with protein, the water-in-oil-in-water (w/o/w) encapsulation procedure has been the most often employed. However, during the formulation process, critical stability problems can be encountered. Indeed, the protein dissolved in the aqueous phase can unfold at the interface with the organic phase containing the polymer. Many studies have suggested formulation optimization in order to improve protein stability during classical w/o/w procedure [2, 3, 6-10]; even so, the complete stabilization of any protein following this type of processing remains a formidable challenge. Therefore, a different approach based on the encapsulation of a solid-state protein was explored [11, 12]. Indeed, in the absence of water, protein conformational mobility is reduced, so that the stability of proteins in contact with the organic solvent is enhanced. Consequently, the encapsulation methods involving no protein/water contact may be relevant: *i.e.* the solid-in-oil-in-water (s/o/w) emulsion-evaporation method [12-15], phase-separation [16, 17] or spray-drying [18].

As traditional drying processes such as freezing or spray-drying potentially cause harmful stress to proteins [13, 19-22], we aimed to develop a non-denaturing method to prepare protein particles. For their subsequent encapsulation in PLGA microspheres, a mean diameter of the solid particles much lower than the desired mean microsphere size is required; a particle/microsphere size ratio of 1/10 or less is appropriate [12]. Since the microspheres are typically 15 to 100 μ m in diameter, the protein particle size has to be in the order of a few micrometers or less for good dispersion. The method developed should also be suitable for any protein and easy to adapt. To meet all these requirements, protein precipitates were formed from aqueous solution by the addition of a water-miscible organic solvent. Glycofurol was chosen because it is particularly advantageous for protein encapsulation in PLGA microspheres. Indeed, glycofurol is a non-toxic solvent of PLGA and could be used for microsphere formulation [23, 24]. In this study, glycofurol was only used to precipitate

proteins and more current solvents were employed for the formulation of the PLGA microspheres to firstly assess the behaviour of a solid-state protein. As the production of recombinant proteins by genetic engineering is costly, a process without protein loss is needed. To increase the efficiency of the protein precipitation, sodium chloride was used in conjunction with glycofurol. Four model proteins differing by their physical and chemical properties were precipitated: lysozyme, α -chymotrypsin, peroxidase and β -galactosidase. Enzymes were chosen in order to easily evaluate their biological activity during the process. The optimum conditions to obtain reversible particles of these proteins were determined. The protein particles obtained were subsequently encapsulated in PLGA microspheres using an s/o/w technique to control their stability upon encapsulation. The *in vitro* release profile was studied for lysozyme, whose physical and chemical properties are similar to those of growth factors such as NGF (nerve growth factor) or GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor). These growth factors have great potential in tissue-engineering for cell survival and differentiation and their encapsulation in PLGA microspheres is attractive [3, 6].

MATERIALS AND METHODS

Materials

Proteins: lysozyme (chicken egg-white), α -chymotrypsin (bovine pancreas), peroxidase (horseradish) and β -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) and their respective substrates, i.e.: *Micrococcus lysodeikticus*, N-Benzoyl-L-Tyrosine Ethyl Ester (BTEE), Pyrogallol and o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG), were all purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Glycofurol (tetraglycol or α -[(tetrahydro-2-furanyl) methyl]- ω -hydroxy-poly (oxy-1, 2-ethanediyl) and buffer compounds were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Capped 75/25 PLGA, provided by Phusis (Saint-Ismier, France), had a mean molecular weight of 27,000 Da (Polydispersity index, $I=1.9$) as determined by size-exclusion chromatography (standard: polystyrene). Polyvinyl alcohol (Mowiol[®] 4-88) was from Kuraray Specialities Europe (Frankfurt, Germany) and micro-BCA protein assay reagent from Pierce (Bezons, France).

Protein precipitation

Precipitation and isolation of the protein

Protein, glycofurol and sodium chloride were used without further purification. Experiments were carried out at room temperature. The overall mixture was prepared directly inside a centrifugation tube as follows. The protein powder was first dissolved in a non-buffered aqueous solution of sodium chloride and this solution was introduced into glycofurol. Thirty minutes later, the protein particles were recovered by centrifugation (10,000g, 30 min). Mixing and centrifugation times of 30 minutes were selected in order to optimize the quantity of precipitated protein.

Experimental design

To define the optimum conditions of precipitation, an experimental design was used. Three parameters influencing protein precipitation were modified: the ionic strength, the ratio between the volumes of aqueous phase and of glycofurol, and the mass of protein.

To study these three variables, a Doehlert matrix was chosen. Fifteen experiments were carried out. Each experiment was repeated two or three times according to the protein. The experimental domain for each factor is described as follows:

- ionic strength of the aqueous phase (U_1): 0.01 to 0.59M (5 levels),
- volume of the aqueous phase (U_2): 25 to 155 μ l (7 levels),
- protein quantity (U_3): 0.1 to 0.9mg (3 levels).

The volume of glycofurol was the complement for 1ml of suspension.

The experimental design and illustration of the 15 experiments are shown in **Fig. 1**.

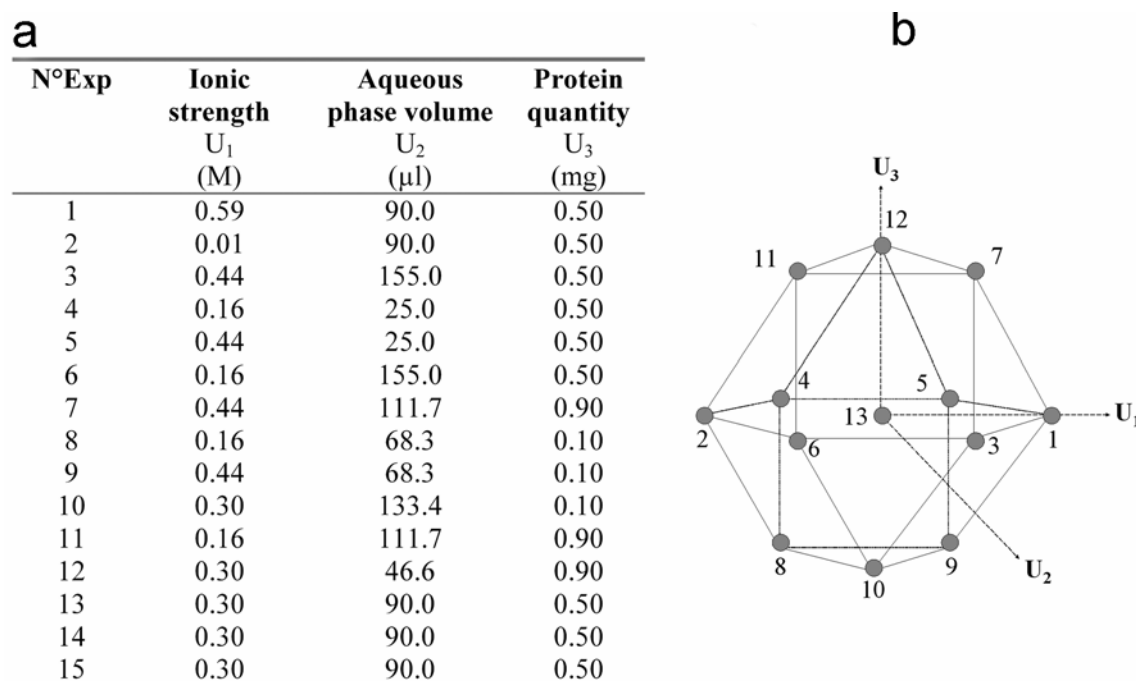


Figure 1. Optimization of the protein precipitation: **(a)** experimental design and **(b)** its spatial representation.

Table (a) represents the values of each studied factor (U_1 , U_2 , U_3) for the fifteen experiments. These values vary in a defined experimental domain which is illustrated in (b). In the 3D view of the experimental domain, the directions of variation of the factor values are represented by arrows and the experiments of the table by dots.

The measured responses were the precipitation efficiencies of four proteins (**Table 1**):

- lysozyme (Y_1),
- α -chymotrypsin (Y_2),
- peroxidase (Y_3),
- β -galactosidase (Y_4).

The same experiments were performed for each protein; this allowed a direct comparison of responses.

NEMROD[®] W software (2000, LPRAI, Marseille) was used for the generation and exploitation of the statistical experimental design.

The precipitation efficiency (Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4) was considered as the percentage of active protein recovered after precipitation and rehydration. The reference was the initial activity, *i.e.* the activity measured for the initial protein mass whose activity was 100%. The protein suspensions in glycofurol were centrifuged, the supernatant eliminated and the pellet of protein particles rehydrated. Lysozyme was rehydrated in TRIS-HCl 0.01M buffer, pH 7.4, α -chymotrypsin in TRIS-HCl 0.08M buffer, pH 7.8, peroxidase in potassium phosphate buffer, pH 6.0 and β -galactosidase in water. The biological activity of lysozyme was determined by measuring the turbidity change in a *Micrococcus lysodeikticus* bacterial cell suspension as reported by Aubert-Pouëssel *et al.* [25]. The enzymatic activity of α -chymotrypsin was evaluated with N-Benzoyl-L-Tyrosine Ethyl Ester as substrate [26]. The enzymatic activity of peroxidase was determined with pyrogallol as substrate [27]. The ability of β -galactosidase to hydrolyse o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside was also determined [28].

Table 1. Molecular weight and isoelectric point of the studied proteins.

	Molecular weight (Da)	Isoelectric point
Lysozyme	14,300	11.0
α-Chymotrypsin	25,000	9.1
Peroxidase	40,000	7.2
β-Galactosidase	105,000	4.7

Characterization of the protein particles

Morphology and size

The particle size of each protein suspended in glycofurol was determined by light diffraction (Mastersizer[®] 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Their morphology was investigated using Scanning Electron Microscopy (SEM) (JSM 6310F, JEOL, Paris, France). Particles were mounted on glass slides fixed on metal stubs and coated with Au film (1-5nm) using a MED 020 (Bal-Tec, Balzers, Lichtenstein).

Structure

Three different spectroscopic techniques were used to detect possible changes in the structure of the proteins after precipitation:

UV spectroscopy in the fourth derivative mode. Baseline-corrected absorbance spectra in the range of 250-305nm were recorded at 37°C with a Cary 3E spectrophotometer (Varian Inc.) characterized by a high spectral reproducibility (S.D. \pm 0.02nm). Data acquisition was in steps of 0.1nm with an acquisition time of 1s per data point. The fourth derivatives of the UV spectra were calculated with the optimized spectral shift method as described previously [29] with an automated transformation program designed in the laboratory. Briefly, this technique improves the low resolution of zero-order spectra and provides information about structural changes of proteins in the local environment of tyrosine and tryptophan residues [29].

Fluorescence spectroscopy. Spectra were recorded on a spectrofluorimeter (Fluoromax 23 Jobin-Yvon-Spex) at 25°C. Each spectrum was an average of 3 measurements (from 310 to 400nm) with a resolution of 1nm. The chosen wavelength for excitation was 297nm. Slits of 4nm were used for excitation and emission.

Circular dichroism spectroscopy. Spectra were recorded on JASCO 810 at 25°C. Triplicate scans were obtained for each formulation (from 260 to 310nm) with a resolution of 2nm and correction for background dichroism was made by subtracting the CD-spectra recorded for the respective vehicle solutions.

Encapsulation of the solid-state protein

Microsphere preparation

Protein-loaded PLGA microspheres were prepared using a s/o/w emulsion solvent extraction-evaporation process adapted from Pean *et al.* [2]. Briefly, 0.9mg of protein particles (0.6% w/w with respect to the amount of PLGA) were prepared in the optimum conditions of precipitation and collected as described above. They were then carefully dispersed in an organic solution (2ml; 3:1 methylene chloride:acetone) containing 150mg of PLGA. The resulting organic suspension was then emulsified in a poly(vinyl alcohol) aqueous solution (30ml, 6% w/v) maintained at 1°C and mechanically stirred at 550rpm for 1 min (Heidolph RZR 2041, Merck Eurolab, Paris, France). After the addition of 100ml of deionized water and stirring for 10 min, the resulting s/o/w emulsion was added to deionized water (500ml) and stirred for a further 20 min to extract the organic solvent. Finally, the formed microparticles were filtered on a 0.45µm filter (HVLP type, Millipore SA, Guyancourt, France), washed five times with 100ml of deionized water and freeze-dried. The average volume diameter and the size distribution of the resulting microspheres were evaluated using a Multisizer™ 3 Coulter Counter® (Beckman Coulter, Roissy CDG, France).

Protein encapsulation efficiency

Total protein. The total protein content (active + inactive) in the microspheres was measured by micro-BCA protein assay [30]. Briefly, protein-loaded microspheres (10mg) were dissolved in 1ml of acetone (3 batches, 2 experiments per batch). After 1h, they were centrifuged (10,000g, 15 min) and the organic phase was removed. The precipitates were then dispersed with freshly added acetone to eliminate the excess PLGA. Rinsing was carried out three times. After evaporation for 2hrs, the collected protein fraction was dissolved in water for protein content measurement using mBCA reagent.

For lysozyme, the percentage of entrapped lysozyme was evaluated by encapsulating ¹²⁵I-labelled lysozyme and by counting the radioactivity within the microspheres (3 batches). Lysozyme was labelled by a chemical method using a fixed oxidant: Iodogen® (1, 3, 4, 6-tetrachloro-3α-6α-diphenylglycouril). This method was described by Aubert-Pouëssel *et al.* [25].

Active protein. Protein encapsulation yield was also determined considering the biologically-active entrapped protein. For peroxidase and β -galactosidase, the microparticles (10mg, 2 batches) were dissolved in acetone (see above) and the collected protein was dissolved in an appropriate buffer to determine its enzymatic activity in the presence of its substrate.

For lysozyme, another technique to extract the protein was used as the previous one may inactivate lysozyme. Lysozyme PLGA microspheres (10mg, 3 batches) were dissolved in 0.9ml DMSO in silanized glass tubes. After 1 hour, 3ml of 0.01M HCl was added. The solution was left to stand for one more hour, and then incubated with *Micrococcus lysodeikticus* suspension for lysozyme activity determination.

For α -chymotrypsin, neither of these methods to quantify the entrapped active protein could be used because it was inactivated by acetone and DMSO.

***In vitro* release profile of lysozyme from microspheres**

The *in vitro* release profile of lysozyme from PLGA microspheres was determined using a continuous-flow system previously developed in our laboratory [25]. Microspheres (10mg, n=2) were placed in an HPLC tube fitted with 0.5 μ m frits and connected with 1.6mm o.d. HPLC tubing at each end. Eluent (TRIS-HCl 0.01M buffer, pH 7.4, containing 0.1% w/v BSA and 0.09% w/v NaCl) was supplied to the column inlet at 5 μ l.min⁻¹ by syringe pump. Heating of the chamber at 37°C was achieved by the immersion of the column assembly in a water bath. Tubing from the column outlet led into a refrigerated chamber (4°C), allowing the collection of samples without protein degradation. The percentage of released ¹²⁵I-lysozyme was determined by measuring radioactivity and the percentage of released biologically-active lysozyme was measured by enzymatic assay.

RESULTS

Protein precipitation

Formation of fine protein particles and their characterization

An excess of water-miscible organic solvent, glycofurol, and sodium chloride were conjunctively added to protein solutions to induce the formation of fine protein particles. By centrifugation of the homogeneous protein suspension, collection of the protein particles was possible. This easy process presented the advantage of being reversible as the precipitates could be dissolved. Four model proteins (lysozyme, α -chymotrypsin, peroxidase, β -galactosidase) were precipitated as described. As no effect of temperature (between 4°C and room temperature) on β -galactosidase precipitation efficiency was observed, the experiments were carried out at room temperature. **Fig. 2** shows the morphology and the size distribution of the four types of protein particles. For all proteins studied, nano-scale spheroids (around 150nm) were obtained. Some of these particles were agglomerated in clusters (around 1 μ m).

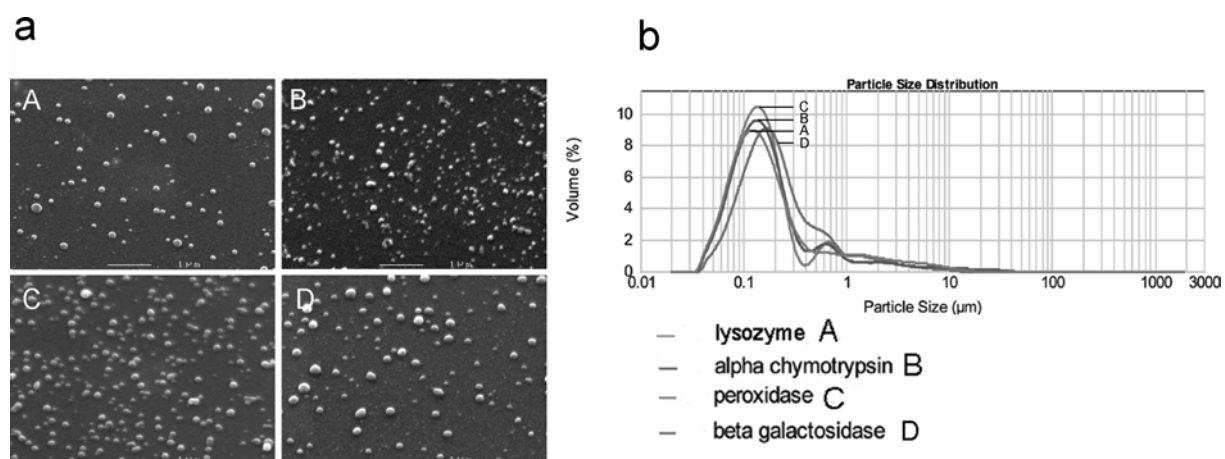


Figure 2. Characterization of the four protein particles: morphology analyzed by SEM (a) and size distribution determined by light diffraction (b).

Optimization of protein precipitation efficiency

As the efficiency and reversibility of precipitation vary with the process conditions, the composition of the medium was varied in a defined experimental domain represented by a Doehlert matrix, at room temperature. Precipitation optima for four model proteins were investigated. They corresponded to the recovery of more than 95% of the initial protein mass in its biologically-active state. The experimental results are reported in **Table 2**.

Table 2. Experimental design results: percentage of protein refolded into a biologically active form (Y), for each experiment and each protein.

N°Exp	Solid active lysozyme Y ₁ (%)	Solid active α-chymotrypsin Y ₂ (%)	Solid active peroxidase Y ₃ (%)	Solid active β-galactosidase Y ₄ (%)
1	39	46	29	110
2	0	10	102	100
3	38	13	32	110
4	104	75	63	90
5	99	71	44	111
6	66	6	52	99
7	94	19	32	109
8	23	99	51	109
9	25	46	51	109
10	7	47	29	101
11	94	22	79	104
12	102	57	48	108
13	80	41	38	91
14	87	44	35	95
15	88	59	36	100
	<i>n</i> =2 <i>S</i> ² =88.2 <i>17df</i>	<i>n</i> =3 <i>S</i> ² =169.5 <i>30df</i>	<i>n</i> =2 <i>S</i> ² =25.3 <i>17df</i>	<i>n</i> =2 <i>S</i> ² =71.9 <i>17df</i>

The Doehlert matrix allows the use of a mathematical model to predict the response within a studied experimental domain. In this case, the coefficients of the model are estimated from the experimental results by the least square regression method. In the present study, one or more precipitation optima were determined for the four proteins but the response within the studied experimental domain could not be predicted. For β-galactosidase, the precipitation efficiency was above 90% for all the experiments. This high activity value all over the experimental domain caused the low variation of the experimental results; the regression was not significant and the validation of a proper model was not possible. For the other proteins, the investigated zone was too large to propose a validated model and predict the responses in the whole experimental domain. Therefore, the exploitation of the data was limited to the

experimental results which exhibited, nevertheless, a good response in the domain investigated for the each of the four proteins as the four tested proteins were successfully precipitated with the technique developed and recovered in a biologically-active form (**Fig. 3**). For instance, reversible precipitates of peroxidase were obtained for experiment number 2. The conditions of this experiment correspond to the addition of 90 μ l of an aqueous solution containing 500 μ g peroxidase and 10mM sodium chloride to 910 μ l of glycofurol.

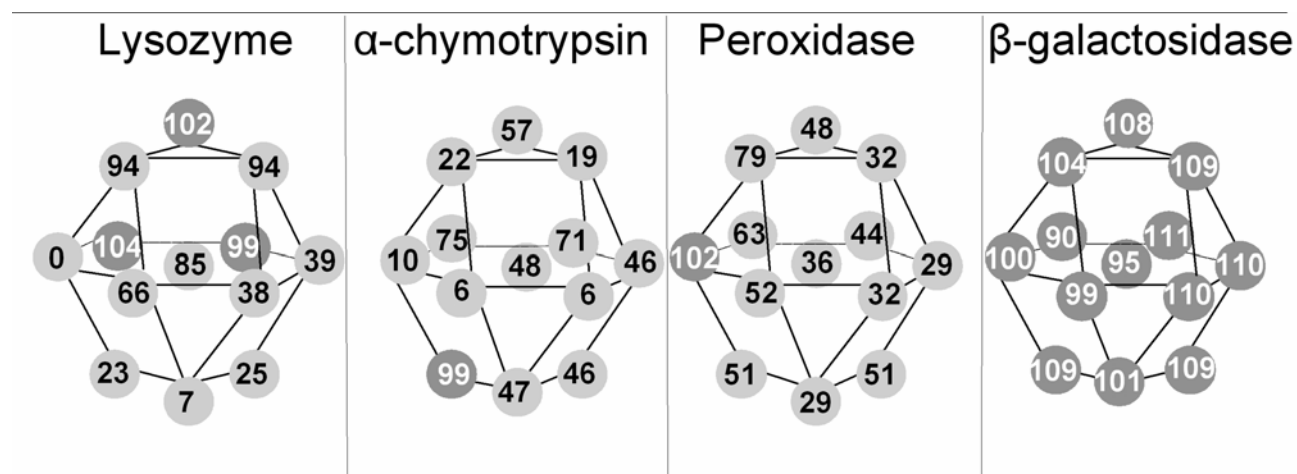


Figure 3. Optimization of the protein precipitation: spatial representation of the experimental design results.

Numbers in the circles refer to the percentage of protein recovered under a biologically active form, after precipitation and dissolution, for each experiment.

It was thus demonstrated that different proteins could be precipitated without inactivation; even so they behave differently. Indeed, their optima were located in different zones of the experimental domain. The easier precipitation of β -galactosidase could be attributed to its higher molecular weight which could justify its preferential hydration and high sensitivity to the modification of the dielectric constant and ionic strength. Nevertheless, many other structural factors influence protein solubility and the combined effect of structural flexibility, amphipatic structure, hydrophobicity, charge density and secondary structure of proteins has also to be considered.

It is well known that the salt electrostatic screening favors protein precipitation in the presence of organic solvent. Thus, for a fixed amount of lysozyme and aqueous phase volume, precipitation efficiency of lysozyme and α -chymotrypsin increased with sodium chloride concentration (from 10mM to 590mM) (experiments number 1 and 2 of the experimental

design). On the contrary, the precipitation efficiency of peroxidase under the same conditions decreased with increasing sodium chloride concentration. Despite the use of a low chaotropic salt, peroxidase unfolding with the increase of the ionic strength is hypothesized.

The amount of protein and the volume of aqueous phase (for a fixed total volume in the system) also greatly influence protein precipitation and should be taken into consideration as well. Combined analysis of these two parameters, *i.e.* protein concentration, underlines that lysozyme precipitation optima correspond to higher protein concentrations (>5.55mg/ml) (experiments number 4, 5, 7, 11 and 12) but this observation is not transposable to the other studied proteins, even though a higher protein concentration will favour phase separation. Concerning the glycofurol concentration in the water-glycofurol-salt mixtures, the experimental results confirm that glycofurol in excess is preferential (above 80%w/w). This correlates with a reduction of the dielectric constant when increasing the organic solvent concentration.

Integrity of the protein particles after dissolution

To know whether the protein precipitates did refold in their native conformation, several assays were performed. The structure of the proteins after precipitation (and dissolution of the pellet in an appropriate solvent) was compared to that of the native protein using spectroscopic methods (**Fig. 4**). After protein precipitation, the fourth derivative UV-visible spectra did not show any shift of maxima in the area corresponding to tyrosine and tryptophan residues (284 and 290nm, respectively) (**Fig. 4A**). With fluorescence spectroscopy, spectra did not differ either before or after precipitation (and rehydration) for lysozyme, α -chymotrypsin and β -galactosidase (**Fig. 4B a, b, d**). These results were confirmed using near-UV CD spectroscopy, indicating that the micro-environment of tyrosine and tryptophan residues of these proteins were maintained (spectra not shown). For peroxidase (**Fig. 4B c**), a reduced level of fluorescence intensity was observed, but no change in peak maximum. This suggests that the precipitation caused a quenching of the fluorescence, rather than changes in the secondary or tertiary structures.

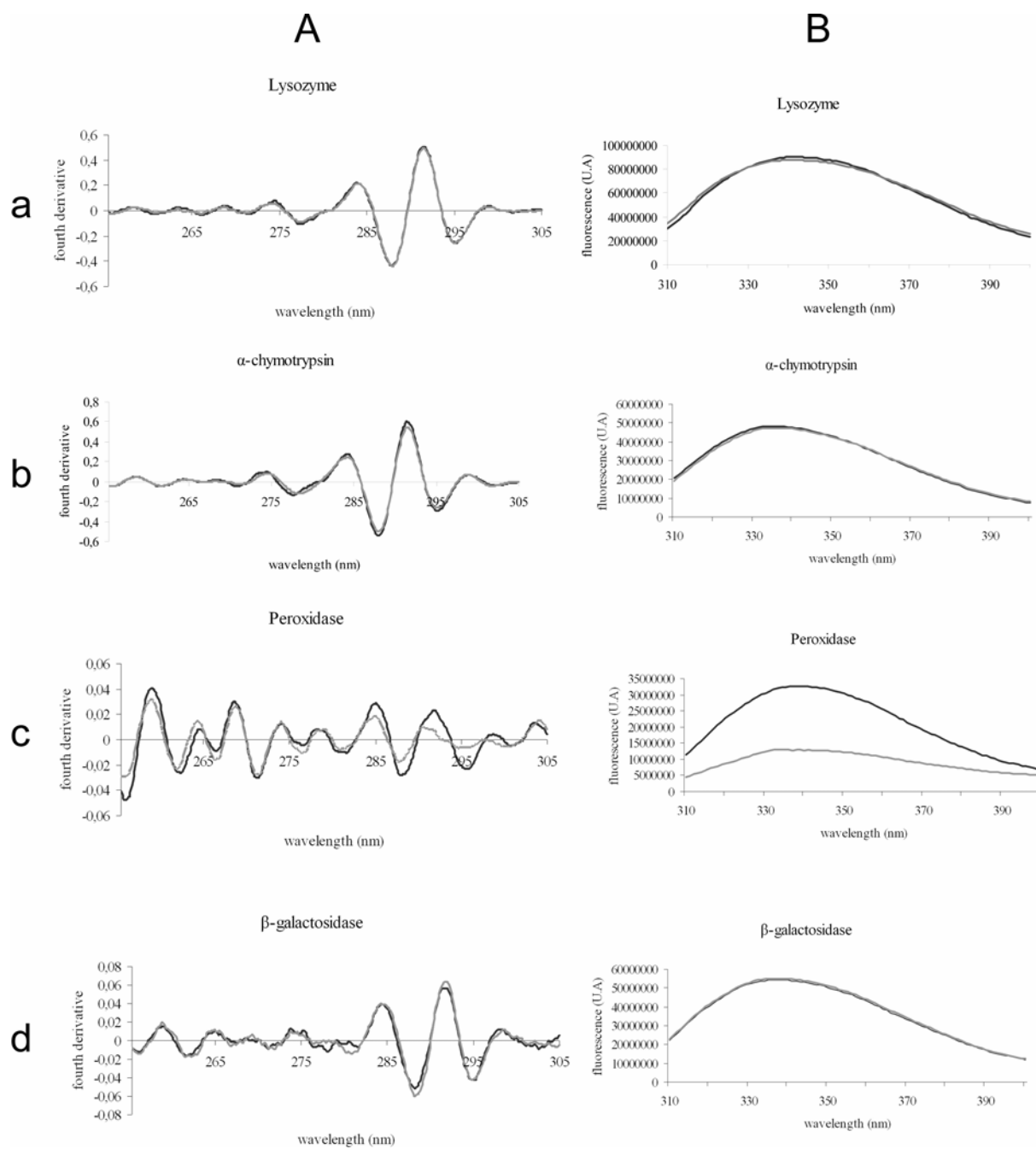


Figure 4. Results of spectroscopic studies before (black curve) and after protein precipitation (grey curve).

Fourth derivative UV (A) and fluorescence (B) spectra are represented for lysozyme (a), α -chymotrypsin (b), peroxidase (c) and β -galactosidase (d).

Encapsulation of the solid-state protein

The four tested proteins were successfully encapsulated in PLGA microspheres. Whatever the encapsulated protein, the microspheres were smooth and spherical, the mean particle size was $27 \pm 11 \mu\text{m}$ (volume weighted), and the mean encapsulation efficiency was around 80% for the four proteins as determined by micro BCA protein assay (**Table 3**). This result was confirmed by entrapped ^{125}I -lysozyme count, which does not require a previous extraction step of the protein from the microspheres. Furthermore, to detect any loss in biological activity during the encapsulation process, the amount of active protein extracted from microspheres was determined. The relative ratio (in percent) between active entrapped protein and total entrapped protein was determined: *ca.* 95% of the effectively encapsulated proteins was active without any stabilizer. It seems that protein precipitation using glycofurol and sodium chloride efficiently preserves protein activity during the microsphere preparation process without requiring the use of any additives.

Table 3. Protein encapsulation efficiencies.

	Total*	Active	Active /total
Lysozyme	$72 \pm 5\%$ ^(a) $72 \pm 7\%$ ^(b)	$71 \pm 4\%$	99%
α -chymotrypsin	$94 \pm 3\%$ ^(a)	Interferences	-
Peroxidase	$89 \pm 7\%$ ^(a)	$82 \pm 5\%$	92%
β -galactosidase	$84 \pm 6\%$ ^(a)	$78 \pm 1\%$	93%

*As determined by mBCA (a) or radioactivity count (b)

In vitro release study of lysozyme from microspheres

An *in vitro* release study was carried out to determine the protein release profile and to assess the state of released lysozyme. The encapsulation of radio-labelled lysozyme combined with a biological activity assay allowed us to confirm that all the released protein was biologically-active (**Fig. 5**). The release profile was characterized by an initial protein release of 10% followed by low, continuous release.

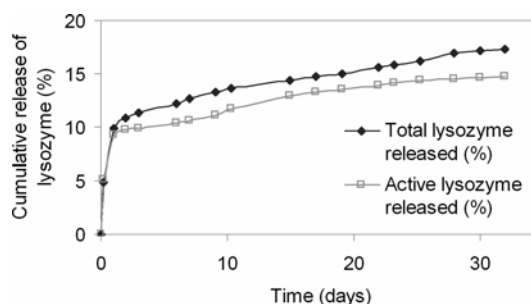


Figure 5. *In vitro* release profile of lysozyme from PLGA microspheres.

DISCUSSION

Since a solid-state protein exhibits restricted conformational flexibility, non-aqueous encapsulation approaches have emerged to ensure protein stability upon encapsulation within biodegradable polyester microspheres [7]. Various methods like spray-drying or spray-freeze drying have been reported for the preparation of small protein particles. Although these methods can generate protein particles, they present some drawbacks for microencapsulation: they are technically complex; they lead to low protein recovery; and they may denature proteins [20, 21]. Freeze-drying has often been used to obtain protein particles without protein loss but it induces the formation of large particles. To obtain fine particles and preserve protein integrity, proteins have been freeze-dried with poly(ethylene glycol) (PEG) which induces a two-phase separation [31, 32]. This interesting approach can be applied to various proteins and has been used for protein microencapsulation by *s/o/w* [14, 33] and *s/o/o* techniques [34]. However, the remaining amount of PEG in the freeze-dried protein product leads to an important initial burst (20% in 1 hour) upon release from PLGA microspheres, and so an adaptation of the process was necessary [14, 35].

In order to obtain protein particles without these disadvantages, we chose to employ chemical rather than a mechanical processing. From an aqueous solution, protein precipitation can be induced via isoelectric precipitation, the reduction of the dielectric constant by the addition of water-miscible organic solvents, the reduction of the protein charge by changing the pH, and the addition of polymers or salts. The formulation of the protein at its isoelectric point for its encapsulation in PLGA microspheres has been previously studied with limited success on protein stability during encapsulation [11]. Moreover, since this approach favors protein dissolution in organic solvents by a charge neutralization effect, protein molecules may be more sensitive to the deleterious environment. The addition of polymers such as PEG was not retained either because the residual amount can enhance the burst effect. Salt-induced precipitation is an extensively used method in biotechnology for separating target proteins from multi-component protein solutions as the first purification step [36-38]. However, the increase of ionic-strength required to induce salting-out is often limited by salt solubility or protein stability issues [39, 40]. Thus, when the protein has become unfolded by salt-induced precipitation, it may either remain incorrectly folded or form insoluble aggregates upon redissolution. In this study, an organic solvent was employed by preference to induce the formation of fine protein particles. Rather than using ethanol, whose detrimental effect on protein integrity is well known [41], nanosized protein particles were formed by the addition

of excessive glycofurol and sodium chloride to aqueous solutions of globular proteins. Glycofurol was chosen as the precipitant as it possesses interesting properties. Firstly, it is a non-toxic PLGA solvent which could be used to prepare PLGA microspheres [24]; moreover, it is a protic solvent containing hydrogen attached to oxygen so that it is able to form hydrogen bonds or to donate a proton such as the stabilizing PEG. The presence of glycofurol induces a liquid-liquid phase separation resulting in a protein-rich phase and a protein-poor phase. The addition of salt was indispensable to collect the maximum amount of protein precipitates. Sodium chloride reduced the electrostatic repulsive interactions between the charged proteins, promoting attractive hydrophobic interactions. The selection of sodium chloride was related both to its possible use in parenteral pharmaceutical formulations and to its intermediate location in the lyotropic series [42]. Sodium chloride decreases protein solubility very little with minimal denaturant effects.

For therapeutic purposes, the precipitation conditions need to be very efficient and non-denaturing. Therefore, an optimization of the precipitation efficiency was designed by varying the ionic strength of the aqueous protein solution, its volume and the amount of protein present. As the protein is only efficient if it is active, the amount of the active fraction recovered after precipitation and dissolution was quantified and the percentage of reversible precipitates was calculated. Four physically and chemically different enzymes were submitted to various precipitation conditions. For each one, optimum conditions (efficiency of 95% or more) were successfully determined (**Fig. 3**). The structural integrity of the rehydrated protein particles was studied and showed that, under selected optimal conditions (when enzymatic active site is preserved), the protein structure remains unchanged for the four proteins.

These results suggest that this technique is of interest to prepare protein particles for microencapsulation by the *s/o/w* encapsulation procedure. As described above, the encapsulation of a solid-state protein proved to enhance its stability during encapsulation in PLGA microspheres [11]. However, complete success of this approach has been limited by formulation issues (protein loss, the use of additives, a complex manufacturing process). In this study, complete and reversible protein precipitation was associated with the preservation of protein stability during the encapsulation step without the addition of stabilizers in the formulation.

It is also important to maintain protein stability during release. Generally, if a protein becomes denatured during the encapsulation step, it will remain in that same state during the release step. But, it is not obvious that when activity is preserved within microspheres, that it is also preserved upon *in vitro* release. For example, protein co-lyophilisation with methyl- β -

cyclodextrin preserved the stability of an entrapped protein but, upon *in vitro* release, a loss of activity was observed [22]. The inactivation was supposed to be due to inactivation during prolonged incubation at 37°C. Therefore, the choice of an appropriate release medium which approached physiological conditions and prevented protein denaturation prior to analysis in the release medium was taken into account as previously proposed [25] and lysozyme *in vitro* release was studied. Lysozyme is a good model to predict the behaviour of growth factors such as NGF and GDNF whose therapeutic potential is well known because of their similar physical and chemical properties [3, 25]. Moreover, its enzymatic assay is sensitive (in the ng/ml order); so, among the four studied proteins, lysozyme was the only one for which the total and active released fractions could be compared. Lastly, although lysozyme is known as a relatively stable protein, it may be inactivated upon release. A previous study made in similar conditions (polymer type, encapsulation yield, *in vitro* release conditions) showed that lysozyme inactivation occurred upon release (69% of activity loss) if no Mg(OH)₂ was added, despite protein stabilization during encapsulation by a w/o/w technique and the choice of an appropriate release medium [25]. In this study, protein stabilization during the encapsulation process by precipitation with glycofurol/sodium chloride allowed the release of an active mass. As no hydrophilic polymer nor carrier was added, the burst effect was minimized. The size of the particles was also prominent, as several experimental results indicated a reduction in burst if the protein particle size was reduced [44]. Despite these concerns on the release profile, classical protein low release from the PLGA microspheres could not be avoided. Indeed, many destabilizing mechanisms occur during the incubation period such as moisture-induced aggregation, adsorption onto the polymer surface (especially for proteins positively charged at neutral pH such as lysozyme) and acid-induced aggregation due to polymer degradation [45]. The formulation should now be adjusted to overcome incomplete protein release [7].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank “Service Commun d’Imagerie et de Microscopie d’Angers”, Anne Aubert-Pouëssel, Gérald Larcher, François Hindré and Myriam Moreau for their assistance. They are also grateful to the French “Ministère de l’Education Nationale et de la Recherche” for its financial support and to the Integrated Project LSHB-CT-2003-503161 ‘Genostem’.

REFERENCES

- [1] V. Luginbuehl, L. Meinel, H. P. Merkle, B. Gander, Localized delivery of growth factors for bone repair, *Eur J Pharm Biopharm* 58 (2) (2004) 197-208.
- [2] J. M. Pean, M. C. Venier-Julienne, F. Boury, P. Menei, B. Denizot, J. P. Benoit, NGF release from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. Effect of some formulation parameters on encapsulated NGF stability, *J Control Release* 56 (1-3) (1998) 175-87.
- [3] A. Aubert-Pouessel, M. C. Venier-Julienne, A. Clavreul, M. Sergent, C. Jollivet, C. N. Montero-Menei, E. Garcion, D. C. Bibby, P. Menei, J. P. Benoit, In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres, *J Control Release* 95 (3) (2004) 463-75.
- [4] S. P. Schwendeman, M. Cardamone, A. Klibanov, R. Langer, M. R. Brandon, Stability of proteins and their delivery from biodegradable polymer microspheres, In S. Cohen and H. Bernstein (eds), *Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines*, Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 1-49.
- [5] V. R. Sinha, A. Trehan, Biodegradable microspheres for protein delivery, *J Control Release* 90 (3) (2003) 261-80.
- [6] J. M. Pean, F. Boury, M. C. Venier-Julienne, P. Menei, J. E. Proust, J. P. Benoit, Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres?, *Pharm Res* 16 (8) (1999) 1294-9.
- [7] U. Bilati, E. Allemann, E. Doelker, Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles, *Eur J Pharm Biopharm* 59 (3) (2005) 375-88.
- [8] H. Tamber, P. Johansen, H. P. Merkle, B. Gander, Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (3 SPEC. ISS.) (2005) 357-376.
- [9] D. Blanco, M. J. Alonso, Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants, *Eur J Pharm Biopharm* 45 (3) (1998) 285-94.
- [10] M. Morlock, H. Koll, G. Winter, T. Kissel, Microencapsulation of rh-erythropoietin, using biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide): protein stability and the effects of stabilizing excipients, *Eur J Pharm Biopharm* 43 (1997) 29-36.
- [11] J. L. Cleland, A. J. Jones, Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon-gamma for microencapsulation in biodegradable microspheres, *Pharm Res* 13 (10) (1996) 1464-75.

- [12] C. Perez, I. J. Castellanos, H. R. Costantino, W. Al-Azzam, K. Griebenow, Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers, *J Pharm Pharmacol* 54 (3) (2002) 301-13.
- [13] I. J. Castellanos, W. O. Cuadrado, K. Griebenow, Prevention of structural perturbations and aggregation upon encapsulation of bovine serum albumin into poly(lactide-co-glycolide) microspheres using the solid-in-oil-in water technique, *J Pharm Pharmacol* 53 (8) (2001) 1099-107.
- [14] T. Morita, Y. Sakamura, Y. Horikiri, T. Suzuki, H. Yoshino, Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant, *J Control Release* 69 (3) (2000) 435-44.
- [15] T. W. King, C. W. Patrick, Jr., Development and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique, *J Biomed Mater Res* 51 (3) (2000) 383-90.
- [16] F. L. Mi, Y. M. Lin, Y. B. Wu, S. S. Shyu, Y. H. Tsai, Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug-delivery system: phase-separation, degradation and release behavior, *Biomaterials* 23 (15) (2002) 3257-67.
- [17] N. Wang, X. S. Wu, J. K. Li, A heterogeneously structured composite based on poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres and poly(vinyl alcohol) hydrogel nanoparticles for long-term protein drug delivery, *Pharm Res* 16 (9) (1999) 1430-5.
- [18] X. M. Lam, E. T. Duenas, J. L. Cleland, Encapsulation and stabilization of nerve growth factor into poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres, *J Pharm Sci* 90 (9) (2001) 1356-65.
- [19] A. Sanchez, B. Villamayor, Y. Guo, J. McIver, M. J. Alonso, Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *Int J Pharm* 185 (2) (1999) 255-66.
- [20] X. M. Lam, E. T. Duenas, A. L. Daugherty, N. Levin, J. L. Cleland, Sustained release of recombinant human insulin-like growth factor-I for treatment of diabetes, *J Control Release* 67 (2-3) (2000) 281-92.
- [21] J. Wang, K. M. Chua, C. H. Wang, Stabilization and encapsulation of human immunoglobulin G into biodegradable microspheres, *J Colloid Interface Sci* 271 (1) (2004) 92-101.
- [22] I. J. Castellanos, G. Flores, K. Griebenow, Effect of cyclodextrins on alpha-chymotrypsin stability and loading in PLGA microspheres upon S/O/W encapsulation, *J Pharm Sci* 95 (4) (2006) 849-58.
- [23] Glycofulrol monograph, In A. Wade and P. J. Weller (eds), *Handbook of pharmaceutical excipients*, The pharmaceutical press, London, 1994, pp. 213-214.

- [24] A. Aubert-Pouessel, M. C. Venier-Julienne, P. Saulnier, M. Sergent, J. P. Benoit, Preparation of PLGA microparticles by an emulsion-extraction process using glycofurol as polymer solvent, *Pharm Res* 21 (12) (2004) 2384-91.
- [25] A. Aubert-Pouessel, D. C. Bibby, M. C. Venier-Julienne, F. Hindre, J. P. Benoit, A novel in vitro delivery system for assessing the biological integrity of protein upon release from PLGA microspheres, *Pharm Res* 19 (7) (2002) 1046-51.
- [26] R. Wirnt, *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1974, pp. 1009-1012.
- [27] B. Chance, A. C. Maehly, *Methods in Enzymology*, Vol. 2, 1955, pp. 773-775.
- [28] O. P. Bahl, K. M. L. Agrawal, *Journal of Biological Chemistry* 244 (1969) 2970-2978.
- [29] R. Lange, J. Frank, J.-L. Saldana, C. Balny, Fourth derivative UV-spectroscopy of proteins under high pressure. I. Factors affecting the fourth derivative spectrum of the aromatic residues, *Eur. Biophys. J.* 24 (1996) 277-283.
- [30] P. K. Smith, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical biochemistry* 150 (1985) 76-85.
- [31] R. A. Jain, C. T. Rhodes, A. M. Railkar, A. W. Malick, N. H. Shah, Controlled release of drugs from injectable in situ formed biodegradable PLGA microspheres: effect of various formulation variables, *Eur J Pharm Biopharm* 50 (2) (2000) 257-62.
- [32] T. Morita, Y. Horikiri, H. Yamahara, T. Suzuki, H. Yoshino, Formation and isolation of spherical fine protein microparticles through lyophilization of protein-poly(ethylene glycol) aqueous mixture, *Pharm Res* 17 (11) (2000) 1367-73.
- [33] F. Lagarce, E. Garcion, N. Faisant, O. Thomas, P. Kanaujia, P. Menei, J. P. Benoit, Development and characterization of interleukin-18-loaded biodegradable microspheres, *Int J Pharm* 314 (2) (2006) 179-88.
- [34] W. Al-Azzam, E. Pastrana, K. Griebenow, Co-lyophilization of bovine serum albumin (BSA) with poly(ethylene glycol) improves efficiency of BSA encapsulation and stability in polyester microspheres by a solid-in-oil-in-oil technique, *Biotechnol Letters* 24 (2002) 1367-1374.
- [35] T. Morita, Y. Horikiri, T. Suzuki, H. Yoshino, Applicability of various amphiphilic polymers to the modification of protein release kinetics from biodegradable reservoir-type microspheres, *Eur J Pharm Biopharm* 51 (1) (2001) 45-53.
- [36] P. R. Foster, P. Dunnill, M. D. Lilly, Salting-out of enzymes with ammonium sulphate, *Biotechnol Bioeng* 13 (5) (1971) 713-8.
- [37] F. Rothstein, Differential precipitation of proteins. *Science and technology, Bioprocess Technol* 18 (1994) 115-208.

-
- [38] T. Arakawa, Y. Kita, J. F. Carpenter, Protein-solvent interactions in pharmaceutical Formulations, *Pharm Res* 8 (3) (1991) 285-291.
- [39] S. A. Tobler, N. E. Sherman, E. J. Fernandez, Tracking lysozyme unfolding during salt-induced precipitation with hydrogen exchange and mass spectrometry, *Biotechnol Bioeng* 71 (3) (2000) 194-207.
- [40] P. H. Vonhippel, K. Y. Wong, Neutral Salts: The Generality of Their Effects on the Stability of Macromolecular Conformations, *Science* 145 (1964) 577-80.
- [41] S. Tanaka, Y. Oda, M. Ataka, K. Onuma, S. Fujiwara, Y. Yonezawa, Denaturation and aggregation of hen egg lysozyme in aqueous ethanol solution studied by dynamic light scattering, *Biopolymers* 59 (5) (2001) 370-9.
- [42] T. Arakawa, S. N. Timasheff, Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions, *Biochemistry* 21 (25) (1982) 6545-52.
- [43] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, A. Bairoch. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. J. M. Walker (ed), *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press: 571-607 (2005).
- [44] H. R. Costantino, L. Firouzabadian, K. Hogeland, C. Wu, C. Beganski, K. G. Carrasquillo, M. Cordova, K. Griebenow, S. E. Zale, M. A. Tracy, Protein spray-freeze drying. Effect of atomization conditions on particle size and stability, *Pharm Res* 17 (11) (2000) 1374-83.
- [45] T. G. Park, H. Yong Lee, Y. Sung Nam, A new preparation method for protein loaded poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres and protein release mechanism study, *J Control Release* 55 (2-3) (1998) 181-91.

2.2. Application à des facteurs de croissance

1 Introduction

Les avancées dans le domaine de la thérapie cellulaire sont très prometteuses mais la survie et la fonctionnalité des cellules après implantation ont encore besoin d'être améliorées. Cette optimisation fait appel à la maîtrise de trois technologies : l'isolement et la caractérisation de cellules souches, le développement d'une matrice et l'administration de facteurs de croissance. La nature de facteurs de croissance variant en fonction de l'indication thérapeutique, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'optimisation de l'apport de ces protéines dans trois indications: la réparation osseuse, cartilagineuse et neuronale.

Pour la réparation osseuse, le potentiel de nombreux facteurs de croissance tels que la super-famille des TGF- β (Transforming growth factor- β), et plus particulièrement les BMPs (bone morphogenetic proteins), mais aussi les IGF (insulin-like growth factors), les FGF (fibroblast growth factors), le PDGF (platelet-derived growth factor) et le VEGF (vascular endothelial growth factor) a souvent été rapporté [1]. La nature de ces facteurs est très variée en raison de la diversité des cellules ciblées et des modèles étudiés. Une équipe du projet Genostem a démontré que l'IGF-2 jouait un rôle majeur dans la différenciation ostéoblastique des MSCs étudiées [2].

Pour induire la différenciation de MSCs en chondroblastes, les TGF- β peuvent être utilisés [3]. En particulier pour les conditions sélectionnées dans le cadre du projet Genostem, le TGF- β 3 peut induire une différenciation des MSCs en phénotype cartilagineux [4].

Pour le traitement de maladies neurodégénératives, des facteurs neurotrophiques peuvent être apportés. Le NGF (Nerve Growth Factor) a été l'un des premiers à être décrit. Ensuite, de nombreux autres facteurs de croissance ont été identifiés tels que le BDNF (brain derived neurotrophic factor), le NT-3 (neurotrophin 3), le GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor) et les IGF [5]. Leur efficacité sur la protection de différentes populations neuronales a été montré [6]. Par exemple, le NGF peut protéger les neurones cholinergiques qui dégénèrent dans la maladie d'Alzheimer [7]. Il pourrait donc être un bon candidat pour la thérapie cellulaire.

Cependant, la faible demi-vie, l'instabilité, le manque de sélectivité tissulaire et la toxicité potentielle de ces facteurs de croissance requièrent de contrôler leur administration.

Leur encapsulation dans des microsphères de PLGA pourrait assurer cette fonction. Ces microsphères ont un intérêt double puisqu'une fois recouvertes d'une surface biomimétique, elles favorisent également l'intégration des cellules greffées. Cependant, une méthode d'encapsulation non dénaturante devrait être utilisée afin de préserver l'intégrité de la protéine après encapsulation. La technique de précipitation proposée au chapitre précédent est particulièrement adaptée à cet objectif. De plus, cette méthode peut être appliquée à différents types de protéines avec de bons rendements. Ceci est intéressant dans le domaine de la régénération cellulaire et tissulaire où de nombreux facteurs de croissance doivent être testés en raison de la diversité des indications thérapeutiques et des cellules ciblées.

Dans cette étude, la précipitation de l'IGF-2, du TGF- β 3 et du NGF a été étudiée afin de développer des MPA aux indications diverses (réparation osseuse, cartilagineuse et neuronale, respectivement) et d'étudier l'effet de ces MPA sur la survie et la fonctionnalité de cellules implantées *in vivo* (MSCs issues de la moelle osseuse et MIAMI).

Le but étant d'encapsuler ces protéines dans des microsphères de PLGA, les conditions pour précipiter 50 μ g de protéine ont été recherchées. Cette quantité est requise pour un taux d'encapsulation théorique de 0,1% dans un lot de 50mg de microsphères. Selon les propriétés physico-chimiques des facteurs de croissance étudiés, des conditions de précipitation ont été sélectionnées et les rendements de précipitation déterminés. Un rapide screening pour définir les conditions optimales de précipitation nécessitant peu de protéine a également été mis au point.

2 Matériels et Méthodes

2.1 Matériels

Le NGF, le TGF- β 3 et l'IGF-2 ont été utilisés sans carrier de type BSA. Le NGF et le TGF- β 3 provenaient de chez AbCys (Paris, France); l'IGF-2 de chez Gropep (Adelaide, Australie). Le NGF recombinant humain (2.5S) (réf. ANC011) et l'IGF-2 recombinant humain (réf. OU100) étaient conditionnés sous forme de lyophilisat. Le TGF- β 3 recombinant humain (réf. PCYT-368) était formulé à l'état liquide dans une solution à 250 μ g/ml contenant 20% éthanol et 0,12% d'acide acétique.

Les kits ELISA du NGF, du TGF- β 3 et de l'IGF-2 provenaient de chez AbCys (Paris, France), R&D systems (Lille, France) et DSL (Cery-Pontoise, France), respectivement.

Le glycofurol (ou tétraglycol) et les éléments du tampon ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2.2 Méthodes

2.2.1 Précipitation et isolement de la protéine

Dans un premier temps, la protéine est dissoute dans une solution saline non tamponnée (pH proche de la neutralité) et cette solution est ensuite ajoutée à du glycofurol, à température ambiante. Ce mélange est brièvement vortexé et 30 minutes plus tard, les particules de protéines sont récupérées par centrifugation (10 000 tpm, 30 min) et le surnageant est éliminé.

2.2.2 Détermination du rendement de précipitation

Le rendement de précipitation d'une protéine correspond à la quantité de protéine récupérée après précipitation et redissolution des particules de protéines. Le pourcentage est exprimé par rapport à la quantité initiale de protéine avant précipitation. Pour déterminer ce rendement, le culot de particules de protéines a été dissout dans un tampon approprié et la quantité de protéine en solution a été déterminé par dosage ELISA.

2.2.3 Screening rapide de l'effet du NaCl sur la formation d'agrégats de protéines

La formation d'agrégats de protéines en présence de glycofurol et de NaCl a été recherchée à l'aide d'un lecteur de plaques. Pour cela, la concentration en NaCl de la solution de protéine a été modifiée, alors que les autres paramètres jouant sur la précipitation de protéines (concentration en protéine, volumes de glycofurol et d'eau) étaient maintenus fixes. Ainsi, une solution aqueuse (50µl) contenant la protéine (125ng ou 5µg) a été déposée dans les puits d'une plaque 96 puits. Ensuite, 50µl de solutions aqueuses contenant des concentrations croissantes en NaCl (de 0 à 3M) ont été ajoutées dans chaque puits et enfin, le glycofurol (300 µl). La formation d'agrégats de protéines a été révélé par la mesure de la densité optique à 340nm (la protéine n'absorbe pas à cette longueur d'onde).

3 Résultats

3.1 Précipitation du NGF

Le NGF se présente sous la forme d'un complexe de 3 sous-unités, α , β and γ . La sous-unité β (NGF-2,5S) est responsable de l'activité biologique du NGF ; c'est un homodimère de 2 chaînes polypeptidiques de 120 acides aminés chacune liées par des liaisons non-disulfure. Chaque polypeptide a une masse molaire de 13KDa, un point isoélectrique de 9 et comporte 26 résidus d'acides aminés chargés à pH neutre [8].

Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques des 4 protéines modèles et des facteurs de croissance étudiés.

	MM (KDa)	pHi	Nombre de résidus d'acides aminés chargés à pH 7
Lysozyme	14	11	26
α -chymotrypsine	25	9,1	31
Peroxydase	40	7,2	59
β -galactosidase	105	4,7	186
NGF (1 chaîne)	13	9	26
TGF- β 3	25	8,7	40
IGF-2	7	6,2	18

D'après le **tableau 1**, les propriétés physico-chimiques de chaque chaîne de NGF sont très proches de celles du lysozyme. Pour le lysozyme, on peut précipiter 50 μ g de protéine en mélangeant 10 μ l d'une solution à 5mg/ml dans le NaCl 0,3M à 990 μ l de glycofurol (**Tableau 2**). Ces conditions ont donc été appliquées au NGF et le rendement de précipitation du NGF a été déterminé par ELISA. Pour le NGF, le site reconnu par ELISA correspond au site actif de la protéine, ce dosage a donc également permis de vérifier la conservation de l'activité de la protéine. 80 \pm 20% de NGF ont ainsi pu être précipités simplement en appliquant les conditions de précipitation du lysozyme (**Tableau 2**).

Tableau 2. Rendements de précipitation de 50µg de protéines dans différentes conditions.

TGF-β3^a et TGF-β3^b correspondent à différentes conditions testées pour le TGF-β3.

Protéine	Volume phase aqueuse (µl)	Volume glycofurol (µl)	Concentration en protéine (mg/ml)	Concentration en NaCl (M)	Rendement de précipitation (%)
Lysozyme	10	990	5	0,3	83
α-chymotrypsine	10	990	5	0,3	49
NGF	10	990	5	0,3	80
TGF-β3 ^a	10	990	5	0,3	14
TGF-β3 ^b	1000	9000	0,05	2	82

3.2 Précipitation du TGF-β3

3.2.1 Application des conditions de référence

Le TGF-β3 est également un homodimère (ponts disulfure); il contient 112 acides aminés et a une masse molaire de 25 KDa. Une recherche sur le site Expasy [8] a permis de déterminer son point isoélectrique (8,7) et le nombre de résidus d'acides aminés chargés à pH neutre (40). Ces paramètres sont très proches de ceux de l'α-chymotrypsine et proche de ceux du lysozyme (qui a été la protéine modèle choisie pour les études de libération). La recherche d'un optimum de précipitation commun à ces 2 protéines a montré que lorsqu'on mélangeait 10µl d'une solution de protéine à 5mg/ml dans le NaCl 0,3M à 990µl de glycofurol, on précipitait 83% de lysozyme et 49% d'α-chymotrypsine (**Tableau 2**). On a donc utilisé ces conditions pour précipiter le TGF-β3. Cette protéine était fournie en solution éthanolique acide peu concentrée en protéine. Or, le TGF-β3 est très soluble à pH acide [9] et les conditions de précipitation choisies nécessitent une concentration en protéine de 5mg/ml. Cette solution contenant 50µg de protéine a donc été concentrée sur microcon[®] 3 000 MWCO, reprise dans 200µl de NaCl 0.3M et concentrée à nouveau pour obtenir 10µl de solution à 5mg/ml. Après ajout au glycofurol et détermination du rendement de précipitation, seulement 14% de protéine ont été récupérés (**Tableau 2, TGF-β3^a**).

3.2.2 Screening rapide de l'effet du NaCl sur la formation d'agrégats de protéines

Etant donné le rendement de précipitation très faible obtenu et le coût élevé de cette protéine, un rapide screening de l'effet du NaCl sur la formation d'agrégats de TGF- β 3 a été réalisé sur une solution de TGF- β 3 contenant peu de TGF- β 3 (125ng). Cette solution a été préalablement tamponnée grâce à un tampon phosphate 10mM pH 7,4 pour éliminer l'effet du pH sur la précipitation. Dans ces conditions où seule la concentration en NaCl variait, la formation d'agrégats de protéine a été observée à partir d'une concentration en NaCl de 2M (**Figure 1**). Il semble donc que l'ajout de 100 μ l d'une solution tamponnée de TGF- β 3 (125ng) dans un minimum de 2M de NaCl à 300 μ l de glycofurol permet de former des agrégats de protéine. Les rendements de précipitation selon ces conditions et selon des conditions où la formation d'agrégats n'était pas observée (NaCl 1M) ont donc été quantifiés. 53% de TGF- β 3 ont été récupérés après précipitation dans le NaCl 2M contre 7% pour le NaCl 1M.

3.2.3 Application des conditions issues du screening

En vue d'une encapsulation, l'objectif était de précipiter 50 μ g de TGF- β 3. Etant donné la formulation en solution acide, la solution initiale (50 μ g de TGF- β 3 dans 200 μ l) a été concentrée sur microcon[®] 3 000 MWCO et reprise dans 1ml de solution tamponnée (phosphate 10mM, pH7,4) contenant du NaCl 2M, d'après les résultats du screening. Un excès de glycofurol a été ajouté pour induire la précipitation du TGF- β 3. Un rendement de précipitation de 82% a été atteint selon ces conditions (**Tableau 2, TGF- β 3^b**).

3.3 Précipitation de l'IGF-2

L'IGF-2 est une protéine globulaire de 67 acides aminés contenant 3 ponts disulfure. Sa masse molaire est de 7KDa, son point isoélectrique de 6,2 et elle contient 18 résidus d'acides aminés chargés à pH neutre. Etant donné que ces propriétés se rapprochent d'aucune de celles des protéines modèles étudiées, le screening décrit précédemment a été utilisé pour étudier l'effet du NaCl sur la formation d'agrégats d'IGF-2 en présence de glycofurol. D'après cette étude, le mélange de 100 μ l d'une solution saline d'IGF-2 (5 μ g) avec 300 μ l de glycofurol induirait la formation d'agrégats quand une concentration minimale de 1M de NaCl serait utilisée (**Figure 1**). Pour obtenir 50 μ g de particules d'IGF-2, une suspension d'IGF-2 dans le glycofurol a été préparée d'après ces conditions avec un excès de glycofurol (9000 μ l de glycofurol pour 1000 μ l de solution NaCl 1M contenant 50 μ g de protéine). Puis, cette suspension a été centrifugée pour récupérer le culot de particules de protéine. Mais, aucun culot n'a été recueilli dans ces conditions. Afin d'optimiser les conditions de précipitation, la concentration en protéine a été multipliée par 10 et la vitesse de centrifugation a été augmentée à 80 000tpm, sans succès (absence de culot).

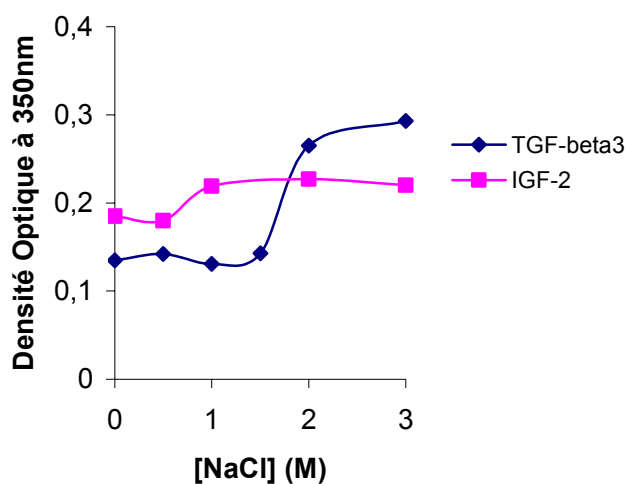


Figure 1. Effet de la concentration en NaCl sur la formation d'agrégats de TGF- β 3 et d'IGF-2 étudié par spectroscopie à 350nm. Toutes les mesures ont été faites en présence de 100 μ l d'une solution aqueuse contenant la protéine (125ng pour le TGF- β 3 et 5 μ g pour l'IGF-2) mélangés à 300 μ l de glycofurol.

4 Discussion

Cette étude a permis, d'une part, d'avoir plus de recul sur le procédé de précipitation décrit précédemment et, d'autre part, d'obtenir des agrégats réversibles de 2 facteurs de croissance avec de bons rendements. Ainsi, les conditions optimales de précipitation du NGF ont été identifiées simplement en transposant les conditions optimales de précipitation du lysozyme. Ce résultat confirme l'hypothèse de départ qui veut que les conditions de précipitation d'une protéine thérapeutique peuvent être recherchées à l'aide d'une protéine modèle aux caractéristiques physico-chimiques proches.

Deux limites au procédé de précipitation ont également été posées. Tout d'abord, la formulation de la protéine native a une grande importance sur le choix des conditions de précipitation. Ainsi, une formulation en solution acide du TGF- β 3 n'a pas permis une simple transposition des conditions de précipitation. L'utilisation d'un screening de l'effet du NaCl a cependant permis de trouver un optimum de précipitation pour cette protéine présentant un intérêt majeur pour la reconstitution cartilagineuse. Nous avons montré une bonne corrélation entre les résultats du screening et la mesure du rendement de précipitation par Elisa dans les mêmes conditions. L'intérêt de ce screening est d'avoir une idée rapide du comportement de la protéine en présence de glycofurol et de concentrations croissantes de chlorure de sodium en consommant peu de protéine dont le coût est prohibitif. Mais, il ne reste qu'indicatif puisque les quantités de protéine mises en jeu sont très inférieures aux quantités que l'on souhaite précipiter. Le screening ayant montré qu'une concentration élevée de NaCl était nécessaire à la formation d'agrégats à partir d'une solution initiale de TGF- β 3 à 1,25 μ g/ml, cette même concentration en NaCl a été utilisée pour précipiter 50 μ g de protéine dans un excès de glycofurol (90%). Le rendement de précipitation de 50 μ g de TGF- β 3 a ainsi été augmenté à des valeurs acceptables en consommant peu de protéine. Nous avons choisi dans ce protocole final de travailler aussi à une faible concentration en protéine (50 μ g/ml) bien que de plus fortes concentrations en protéine sont plus favorables à sa précipitation (**1^{ère} partie du chapitre et tableau 2**). Deux raisons expliquent ce choix. Tout d'abord, des concentrations élevées en protéine sont propices à un salting-out et une dénaturation irréversible de la protéine est à craindre dans des solutions fortement concentrées en sel. Or, l'utilisation d'une concentration en NaCl de 2M pour la précipitation du TGF- β 3 à partir d'une solution à 1.25 μ g/ml n'a pas entravé sa redissolution, d'après les résultats du dosage par Elisa. Donc, il paraissait intéressant de se situer dans une gamme de concentration en protéine proche de celle utilisée pour cette étape préliminaire. D'autre part, en diluant la solution de TGF- β 3

fournie dans un tampon phosphate pH 7,4, l'effet de la formulation acide pouvait être minimisé et la précipitation favorisée, le TGF- β 3 étant très soluble à pH acide [9]. Les difficultés rencontrées au cours de cette étude nous ont amenées à proposer une démarche à suivre lorsque l'on veut précipiter une protéine en présence de glycofurol et de chlorure de sodium, elle est résumée dans la **figure 2**.

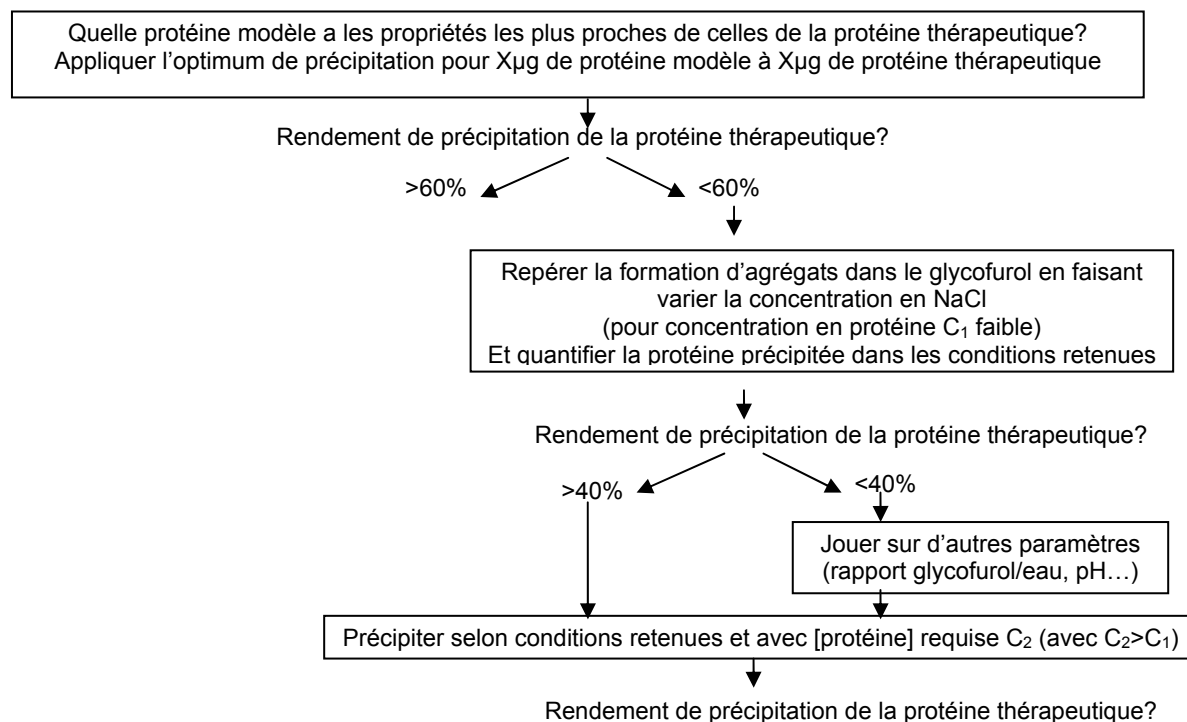


Figure 2. Plan d'action pour définir les conditions optimales de précipitation d'une protéine thérapeutique

Un autre facteur peut limiter la précipitation d'une protéine selon le procédé proposé puisque l'IGF-2 (7KDa) n'a pas pu être précipité. La détection de la formation d'agrégats d'IGF-2 est moins nette que celle de TGF- β 3 (**Figure 1**). On suppose donc que l'IGF-2 ne donne pas d'agrégats sur toute la gamme de concentration en NaCl étudiée. 3M correspond à la limite de solubilité du NaCl, on conclut donc que l'IGF-2 ne peut être précipité par l'association du NaCl et du glycofurol. L'IGF-2, à la différence des protéines étudiées précédemment, est un polypeptide de masse molaire très faible ; ce paramètre est un facteur limitant de la technique de précipitation décrite. Peu d'études relatent, d'ailleurs, la précipitation de polypeptides de masse molaire si faible [10]. Pour obtenir des particules

d'insuline, molécule de structure proche de celle de l'IGF-2, la nébulisation ou la complexation avec le zinc sont d'ailleurs le plus souvent utilisées [11]. Pour atteindre notre objectif de formation de précipités submicroniques et réversibles d'IGF-2, différentes voies peuvent être testées. Tout d'abord, la nature du sel pourrait être modifiée. Nous avons choisi le chlorure de sodium qui est faiblement kosmotropique, pour limiter la dénaturation de macromolécules fragiles. L'IGF-2, plus petit, devrait être moins instable et le remplacement du chlorure de sodium par des sels tels que le sulfate d'ammonium pourrait être une alternative. Le pH de la solution de protéine pourrait également être modifié pour se placer au point isoélectrique de l'IGF-2 (6,2). Une autre possibilité serait d'ajouter un carrier de type albumine, lequel pourrait favoriser la formation d'une phase riche en protéines et d'une phase pauvre en protéine.

Malgré ces limites, deux facteurs de croissance ont été précipités. Il sera maintenant intéressant d'étudier leur encapsulation dans des MPA pour tester ensuite leur intérêt pour la régénération neuronale (pour le NGF) et cartilagineuse (pour le TGF- β 3).

L'étude de l'administration, pour la thérapie cellulaire, de TGF, bien connus pour leurs fonctions régulatrices de la survie et la différenciation cellulaire, est de plus en plus reportée [12-18]. Plus particulièrement, des microsphères de gélatine chargées en TGF- β 1 et des MSC de lapin ont été récemment encapsulées dans un hydrogel injectable et biodégradable de oligo(poly(éthylène glycol) fumarate) (OPF) [13]. Cette étude a confirmé l'importance de la présence du facteur de croissance puisqu'il a permis d'augmenter significativement la différenciation chondrogénique par comparaison à l'hydrogel sans microsphères ou avec des microsphères non chargées. Plutôt que d'utiliser de la gélatine, dont la dégradation est trop rapide (3 semaines) pour induire la régénération tissulaire, le PLGA a été utilisé pour la microencapsulation des TGF β 1 et β 3 par la technique de double émulsion/extraction de solvant [15, 17, 18]. La structure de ces protéines après encapsulation n'a pas été reportée, seule les profils de libération ont été étudiés. Une libération initiale massive suivie d'un plateau a été généralement observée. Pour potentialiser l'effet de ces facteurs, il serait maintenant intéressant d'étudier leur encapsulation, après précipitation, par la technique de la simple émulsion. Concernant le NGF, notre équipe a déjà étudié son encapsulation par double émulsion [19-22]. Sa stabilité pendant l'encapsulation a été assurée par ajout de BSA et de PEG 400 dans la phase aqueuse interne [20]. Pour s'affranchir de l'utilisation d'albumine pour des raisons de sécurité sanitaire et de polymères hydrophiles, responsables de l'effet burst, tout en évitant sa dénaturation, l'encapsulation des précipités de NGF, obtenus dans cette étude, par simple émulsion sera étudiée.

Références

- [1] V. Luginbuehl, L. Meinel, H. P. Merkle, B. Gander, Localized delivery of growth factors for bone repair, *Eur J Pharm Biopharm* 58 (2) (2004) 197-208.
- [2] P. J. Marie, O. Fromigue, Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells, *Regenerative medicine* 1 (4) (2006) 539-548.
- [3] C. Jorgensen, J. Gordeladze, D. Noel, Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells, *Current Opinion in Biotechnology* 15 (5) (2004) 406-410.
- [4] F. Djouad, D. Mrugala, D. Noel, C. Jorgensen, Engineered mesenchymal stem cells for cartilage repair., *Regenerative medicine* 1 (4) (2006) 529-537.
- [5] E. J. Mufson, J. S. Kroin, T. J. Sendera, T. Sobreviela, Distribution and retrograde transport of trophic factors in the central nervous system: Functional implications for the treatment of neurodegenerative diseases, *Progress in Neurobiology* 57 (4) (1999) 451-484.
- [6] F. Hefti, Neurotrophic factor therapy for nervous system degenerative diseases, *Journal of Neurobiology* 25 (11) (1994) 1418-1435.
- [7] V. E. Koliatsos, R. E. Clatterbuck, H. J. W. Nauta, B. Knusel, L. E. Burton, F. F. Hefti, W. C. Mobley, D. L. Price, Human nerve growth factor prevents degeneration of basal forebrain cholinergic neurons in primates, *Annals of Neurology* 30 (6) (1991) 831-840.
- [8] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, A. Bairoch. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. J. M. Walker (ed), *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press: 571-607 (2005).
- [9] J. Pellaud, U. Schote, T. Arvinte, J. Seelig, Conformation and self-association of human recombinant transforming growth factor-beta3 in aqueous solutions, *Journal of Biological Chemistry* 274 (12) (1999) 7699-7704.
- [10] C. L. Stevenson, S. J. Prestrelski, Non-aqueous polar aprotic peptide formulations, US Patent 5,932,547, 1999.
- [11] N. Sadrzadeh, M. J. Glembourtt, C. L. Stevenson, Peptide drug delivery strategies for the treatment of diabetes, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96 (8) (2007) 1925-1954.
- [12] T. A. Holland, Y. Tabata, A. G. Mikos, Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering, *J Control Release* 101 (2005) 111-125.
- [13] H. Park, J. S. Temenoff, Y. Tabata, A. I. Caplan, A. G. Mikos, Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and

- growth factor delivery for cartilage tissue engineering, *Biomaterials* 28 (21) (2007) 3217-3227.
- [14] M. Yamamoto, Y. Tabata, L. Hong, S. Miyamoto, N. Hashimoto, Y. Ikada, Bone regeneration by transforming growth factor beta1 released from a biodegradable hydrogel, *J Control Release* 64 (1-3) (2000) 133-42.
- [15] E. K. Moiola, L. Hong, J. Guardado, P. A. Clark, J. J. Mao, Sustained release of TGFbeta3 from PLGA microspheres and its effect on early osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Tissue Eng* 12 (3) (2006) 537-46.
- [16] A. Jen, K. Madorin, K. Vosbeck, T. Arvinte, H. P. Merkle, Transforming growth factor-beta3 crystals as reservoirs for slow release of active TGF-beta3, *Journal of Controlled Release* 78 (1-3) (2002) 25-34.
- [17] L. Lu, M. J. Yaszemski, A. G. Mikos, TGF-beta1 release from biodegradable polymer microparticles: its effects on marrow stromal osteoblast function., *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* 83 A Suppl 1 (Pt 2) (2001)
- [18] A. J. DeFail, C. R. Chu, N. Izzo, K. G. Marra, Controlled release of bioactive TGF-beta1 from microspheres embedded within biodegradable hydrogels, *Biomaterials* 27 (8) (2006) 1579-1585.
- [19] J. M. Pean, M. C. Venier-Julienne, F. Boury, P. Menei, B. Denizot, J. P. Benoit, NGF release from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. Effect of some formulation parameters on encapsulated NGF stability, *J Control Release* 56 (1-3) (1998) 175-87.
- [20] J. M. Pean, F. Boury, M. C. Venier-Julienne, P. Menei, J. E. Proust, J. P. Benoit, Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres?, *Pharm Res* 16 (8) (1999) 1294-9.
- [21] P. Menei, J. M. Pean, V. Nerriere-Daguin, C. Jollivet, P. Brachet, J. P. Benoit, Intracerebral implantation of NGF-releasing biodegradable microspheres protects striatum against excitotoxic damage, *Exp Neurol* 161 (1) (2000) 259-72.
- [22] V. M. Tatard, M. C. Venier-Julienne, J. P. Benoit, P. Menei, C. N. Montero-Menei, In vivo evaluation of pharmacologically active microcarriers releasing nerve growth factor and conveying PC12 cells, *Cell Transplant* 13 (5) (2004) 573-83.

CHAPITRE 3

Optimisation du profil de libération *in vitro* du lysozyme à partir de microsphères biodégradables

Une nouvelle méthode pour encapsuler des protéines dans des microsphères de PLGA a été développée. En précipitant la protéine à l'aide de glycofurol et de NaCl, sa déstabilisation pendant la préparation des microsphères a été évitée (Chapitre 2). La méthode décrite précédemment présente aussi l'avantage d'être applicable à différentes protéines (modèles ou thérapeutiques) avec de bons rendements.

Bien que cette stratégie permette de résoudre un des problèmes majeurs de l'encapsulation de protéines, elle ne suffit pas pour assurer une libération prolongée et complète de la protéine. Nous avons montré que le lysozyme libéré à partir de microsphères de PLGA préparées par la technique *s/o/w* restait biologiquement actif. Cependant, après le premier jour de libération, un faible taux de libération a été observé.

La rétention de la protéine dans les microsphères élimine tout le bénéfice de l'utilisation d'un système à libération prolongée; le profil de libération doit donc être optimisé. La revue bibliographique présente les différentes stratégies qui ont été testées pour atteindre cet objectif. Elle rappelle également que de nombreux paramètres influencent la cinétique de libération. La protéine étudiée, son taux de charge, le milieu de libération, la taille des microsphères sont des facteurs l'affectant.

Nous avons donc cherché à augmenter le taux de libération à partir de notre formulation. Pour cela, le comportement du lysozyme, protéine modèle aux caractéristiques physico-chimiques proches de celles de facteurs de croissance a été étudié. Cette protéine constitue un bon modèle pour l'optimisation du profil de libération car elle est susceptible d'interagir avec le polymère de façon électrostatique (pHi 11). Elle a été encapsulée dans les microsphères à un faible taux d'encapsulation (TE=0,6%), les facteurs de croissance étant actifs à très faible concentration. Pour pouvoir comparer différentes formulations, un milieu dans lequel la protéine est stable a été sélectionné. Des microsphères de diamètre moyen de 60 μm ont été préparées dans le but de les utiliser comme support de cellules souches, une fois recouvertes de molécules biomimétiques (MPA). Dans le chapitre 2, le diamètre moyen des microsphères était de 20 μm , diamètre plus communément utilisé pour l'implantation de microsphères vecteurs de protéines.

L'obtention de microsphères de PLGA de 60 μ m par émulsion-évaporation/extraction de solvant a nécessité une mise au point des paramètres de formulation. Afin de transposer la méthode utilisée pour préparer des microsphères de 20 μ m à l'obtention de microsphères de 60 μ m, le diamètre des microsphères obtenues doit être contrôlé mais également la distribution de tailles et la présence de déchets de polymère. La concentration en tensioactif dans la phase aqueuse externe et la vitesse d'agitation sont connues pour influencer sur la taille des microparticules mais d'autres facteurs peuvent jouer un rôle important pour l'obtention d'une formulation acceptable. Pour identifier ces facteurs, nous avons réalisé une étape de criblage en étudiant l'effet de 19 facteurs à 2 niveaux à l'aide d'une matrice d'Hadamard (Tableau 1, Annexe).

Il est effectivement ressorti de cette étude que la diminution de la concentration en PVA permettait d'augmenter le diamètre des particules obtenues mais qu'elle entraînait parallèlement une augmentation des déchets de polymère formés (Annexe). Pour augmenter le diamètre des microsphères, nous avons notamment diminué la vitesse d'agitation, conservé la même concentration en PVA et augmenté la concentration en polymère dans la phase organique. Des microsphères sphériques de 60 μ m avec une répartition gaussienne et sans déchets ont ainsi pu être obtenues (**Figure 1**).

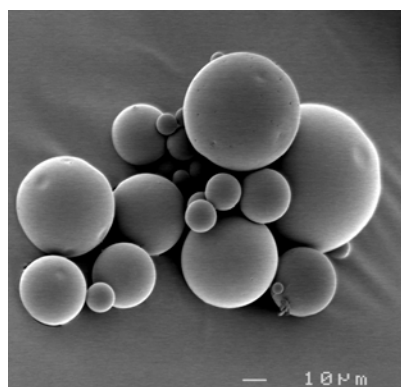


Figure 1. Microsphères de PLGA préparées par émulsion-évaporation/extraction de solvant.

Le procédé a ensuite été optimisé pour permettre l'encapsulation d'une protéine avec de bons rendements d'encapsulation (temps d'émulsion, température, volumes de phase aqueuse).

Ces conditions fixées, nous avons pu chercher à optimiser le relargage du lysozyme à partir des microsphères de PLGA. L'article qui suit reprend les résultats obtenus. L'adsorption de la protéine sur le polymère est souvent citée comme responsable. Après avoir mis en évidence ces phénomènes dans les conditions étudiées, nous avons réalisé un criblage de différents additifs et polymères pouvant les limiter. Ensuite, le profil de libération a été optimisé sur un temps plus long.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une demande de brevet européenne (n°EP 07291188.6) disponible sous accord de confidentialité.

Effect of various additives and polymers on in vitro release of lysozyme from PLA/GA microspheres prepared by a s/o/w emulsion technique

A. Giteau¹, M.C. Venier-Julienne^{1*}, O. Thomas¹, X. Garric², J. Coudane², S. Marchal³, J.M. Verdier³, C.N. Montero-Menei¹, J.P. Benoît¹

¹INSERM, U646, Angers, F-49100 France; Université d'Angers, Angers, F-49100 France.

²Institut des biomolécules Max Mousseron, CNRS UMR 5247, Montpellier, F-34093 France

³INSERM, U710, Montpellier, F-34095 France; Université de Montpellier 2, Montpellier, F-34095 France; EPHE, Montpellier, F-34095 France.

Abstract

Protein incomplete release from PLGA-based microspheres due to protein interactions with the polymer is one of the main issues in the development of PLGA microspheres loaded with proteins. In this study, a two-dimensional adsorption model was designed to rapidly assess the anti-adsorption effect of formulation components (additives, additives blended with the polymer or modified polymer). Lysozyme was chosen as a model protein because of its high affinity with PLGA. This study showed that PEGs, Poloxamer 188 and BSA totally inhibited protein adsorption onto the PLGA37.5/25 layer. Similarly, it was emphasized that more hydrophilic polymers were less prone to protein adsorption. The correlation between this model and the in vitro release profile was made by microencapsulating lysozyme with a low loading in the presence of these excipients by a non-denaturing s/o/w encapsulation technique. Precipitation of lysozyme with the amphiphilic poloxamer 188 prior to encapsulation exhibited a continuous release of active lysozyme over three weeks without burst effect. To promote lysozyme release in the latter stage release, a PLGA-PEG-PLGA tribloc copolymer was used: lysozyme was continuously released over 45 days under a biologically-active form.

Keywords: Sustained release; protein; microspheres; poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA); poloxamer; lysozyme

1 Introduction

Protein delivery from microparticles made of poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) biodegradable polymers is very interesting to avoid proteolysis and ensure protein sustained release. Nevertheless, protein successful delivery from PLGA microparticles is not still achieved. The most important hurdles are related to protein stability issues during the formulation process in one hand and during the release period in the other hand [1-5]. While protein stabilization during the formulation process is being reached thanks to the use of additives [6, 7] or to the encapsulation of a solid-state protein [8], protein release according to a zero-order profile and without denaturation was scarcely reported [9-11].

The release of small hydrophobic molecules from PLGA microspheres is governed by drug diffusion through the matrix in the initial phase and by polymer degradation at later stages. For proteins, an initial massive release (burst effect) followed by an incomplete release was frequently observed due to instability problems [12]. Moisture-induced aggregation and ionic interactions were supposed to occur in the initial phase of the microsphere hydration. Later, during polymer erosion, non-specific protein adsorption onto the degrading surface area and covalent/noncovalent aggregation due to the formation of acidic PLGA degradation products were reported as factors responsible for this incomplete release [13].

The aim of this study was to give insights to the improvement of protein release from PLGA microspheres. As protein interactions with the polymer is one of the main causes of protein incomplete release, a two dimensional model was developed to quantify protein adsorption onto PLGA surface. These interactions are particularly acute for protein positively-charged at neutral pH level [14, 15]. Therefore, lysozyme, which isoelectric point is superior to 7, was an appropriate model protein to study protein interactions with PLGA carboxylic acid end groups. In this model, the anti-adsorption effect of formulation components (additives in solution, additives blended with the polymer or modified polymer) could be studied. The efficient additives were then selected to prepare PLGA microspheres whose release profile was studied over three weeks. Microspheres were prepared by a non-denaturing solid-in-oil-in-water (s/o/w) emulsion-evaporation/extraction technique based on a preliminary step of protein precipitation. Nanosized protein particles were thus formed by addition of a salt (sodium chloride) and a water-miscible organic solvent (glycofurol) to a protein solution. They were then recovered by centrifugation for their subsequent encapsulation in PLGA microspheres without activity loss. A low protein loading was chosen to approach the conditions for microencapsulation of therapeutic proteins, effective at low

concentrations. For the later release period, complementary strategies were tested as additional stability issues occur when the polymer starts to degrade.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Physical characteristics of the studied polymers are listed in **Table 1**. Capped PLGA37.5/25 (Mn 14,000Da) and PLA50 (Mn 22,700Da) were provided by Phusis (Saint-Ismer, France). Uncapped PLGA25/50 (RG502H), PLGA25/50-PEG (RGP d 50105), PLGA25/50-PEG-PLGA25/50 (RGP t 50106) were purchased from Boehringer-Ingelheim (Ingelheim, Germany). Other non-commercialized tribloc copolymers: PLA96-PEG-PLA96 (24% PEG 20,000, MnTotal 85,000), PLA50-PEG-PLA50 (23% PEG 20,000, MnTotal 88,000), PLA50-PEG-PLA50 (8% PEG 20,000, MnTotal 254,000) were obtained from IBMM-CRBA [16].

Lysozyme (chicken egg white) and its substrate *Micrococcus lysodeikticus*, Glycofurol (tetraglycol or α -[(tetrahydro-2-furanyl) methyl]- ω -hydroxy-poly (oxy-1, 2-ethanediyl)), additives and buffer compounds were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPbetaCD) was gently given by Roquette Frères (Lestrem, France). Polyvinyl alcohol (Mowiol[®] 4-88) was from Kuraray Specialities Europe (Frankfurt, Germany). Poloxamer 188 and poly(ethylene imine) were kindly supplied by BASF (Levallois-Perret, France).

Table 1. Physical characteristics of the studied polymers

Code name	Polymer	Copolymer ratio (L-LA/GA%)	% PEG in mass	MnPEG	Mn polyester	Mn Total	Supplier
PLGA37.5/25	PLAGA	37.5/25			14,000 ⁽¹⁾	14,000 ⁽¹⁾	Phusis
PLA	PLA50				22,700 ⁽¹⁾	22,700 ⁽¹⁾	Phusis
PLGA25/50	PLAGA	25/50			7,900 ⁽²⁾	7,900 ⁽²⁾	Boehringer
PLGA-PEG	PLAGA-PEG	25/50	10	5,000	44,000	49,000 ⁽³⁾	Boehringer
PLGA-PEG-PLGA	PLAGA-PEG-PLAGA	25/50	9	6,000	58,000	64,000 ⁽³⁾	Boehringer
PELA96	PLA96-PEG-PLA96		24	20,000	32,500	85,000 ⁽³⁾	IBMM-CRBA
PELA50 LMW	PLA50-PEG-PLA50		23	20,000	34,000	88,000 ⁽³⁾	IBMM-CRBA
PELA50 HMW	PLA50-PEG-PLA50		8	20,000	117,000	254,000 ⁽³⁾	IBMM-CRBA

⁽¹⁾ Given by SEC in THF

⁽²⁾ Given by the supplier for the studied batch

⁽³⁾ Determined by using the integration ratio of resonances due to PEO blocks at 3.6 ppm, PGA locks at 4.76 ppm and to PLA blocks at 5.19 ppm in the ¹H NMR spectra.

2.2 Methods

2.2.1 Lysozyme quantification

The amount of active lysozyme was determined by measurement of the turbidity change in a *Micrococcus lysodeikticus* bacterial cell suspension as previously reported [17]. 100µl of a lysozyme solution were added to 2.9ml of a 0.015% w/v *Micrococcus lysodeikticus* suspension in TRIS-HCl (0.01M, pH 7.4) buffer solution. After incubation (37°C, 4h), the absorbance was measured at 450nm. The amount of active protein was calculated thanks to a range curve.

2.2.2 Lysozyme/polymer interaction study

Lysozyme/polymer interactions were indirectly investigated in a two-dimensional model by quantifying the amount of protein not adsorbed onto a polymer layer. To obtain the polymer layer, a PLGA 37.25/25 solution in chloroform (10% w/v) was settled in the wells of a polystyrene 24-wells plate (Nunc™ Delta) (700µl per well) and, in each well, 600µl of the polymer solution were immediately drawn up. After overnight evaporation under hood, the plate was placed under vacuum in a freeze-dryer for 12h. 300µl of lysozyme solution (0.5µg/ml) in TRIS-HCl (0.01M, pH 7.4) buffer were then added in each polymer-coated well. After 2h of incubation at room temperature, the “free” lysozyme (not adsorbed to the polymer) was quantified and the amount of adsorbed lysozyme was deduced by mass balance.

The effect of additives in solution or blended with PLGA 37.5/25 and of the polymer type on lysozyme/polymer interactions were studied. To this aim, additives were codissolved with lysozyme in the TRIS-HCl buffer prior to incubation with the polymer or they were codissolved with polymer itself in chloroform. The additive:polymer ratio was chosen according to the literature. The effect of modifying the polymer type was also studied. Simultaneously, a control without protein was realized to assess the ability of the additives to induce a lytic activity on a *Micrococcus lysodeikticus* suspension. The experiments were at least duplicated for each additive.

2.2.3 Microspheres

Microsphere preparation

PLGA microspheres

Microspheres were prepared using a s/o/w emulsion solvent extraction-evaporation process adapted from Péan *et al.* [6]. An organic solution (2ml; 3:1 methylene chloride:acetone) containing 150mg polymer was emulsified in a poly(vinyl alcohol) aqueous solution (90ml, 4% w/v) maintained at 1°C and mechanically stirred for 1min (Heidolph RZR 2041, Merck Eurolab, Paris, France). After addition of 100ml of deionized water and stirring for 10min, the resulting o/w emulsion was added to deionized water (500ml) and stirred at 550rpm further for 20min to extract the organic solvent. Finally, the formed microparticles were filtered on a 5µm filter (HVLP type, Millipore SA, Guyancourt, France), washed with 500ml of deionized water and freeze-dried. The average volume diameter and the size

distribution of the resulting microspheres were evaluated using a Multisizer™ 3 Coulter Counter® (Beckman Coulter, Roissy CDG, France).

Microspheres loaded with lysozyme

The protein loading was 0.6% w/w with respect to the amount of polymer. Firstly, NaCl and glycofurol, a water-miscible non-solvent of proteins, were used to precipitate lysozyme. At room temperature, 45µl of a NaCl 0.3M solution containing 900µg of protein was added to glycofurol to form a 1ml suspension. 30min later, the protein particles were recovered by centrifugation (10,000g, 30min). They were then carefully dispersed in the organic solution and the microspheres were prepared as described above.

Microspheres loaded with lysozyme/additive

When the effect of co-encapsulated excipients was tested, they were added to the protein solution before mixing with glycofurol in an additive to protein ratio of 50:1 for PEG 8,000 and 10:1 for Poloxamer 188 and BSA.

Microspheres made of a different matrix

In some preparations, additives (PEG 8,000 and poloxamer 188) were dissolved with the polymer in the organic solution (1:2 additive:polymer) to assess the influence of additive/polymer blends on the release profile. In the same way, the PLGA 37.5/35 reference was replaced by other polymer types (PLGA 25/50, PLGA-PEG-PLGA, PLGA-PEG, PELA96, PELA50 LMW and PELA50 HMW). To elicit a better comparison of the results from in vitro release studies, the formulation parameters were unchanged except the stirring speed which was adjusted (from 550 to 850rpm) for a similar microsphere diameter.

Protein encapsulation efficiency

Protein encapsulation yield was determined considering the biologically-active entrapped protein. Lysozyme PLGA microspheres (10mg, 3 batches) were dissolved in 0.9ml DMSO in silanized glass tube. After 1 hour, 3ml of 0.01M HCl was added. The solution was left to stand for one more hour, and then incubated with *Micrococcus lysodeikticus* suspension for lysozyme activity determination.

In vitro release study

The in vitro release profile of lysozyme from PLGA microspheres was determined by adding 500 μ L of TRIS-HCl 0.01M buffer, pH 7.4, containing 0.1% w/v BSA and 0.09% w/v NaCl to 10mg of microspheres into centrifugation tubes. The tubes were closed, incubated in a shaking water bath (37°C, 125 rpm). At determined time intervals, the tubes were centrifuged for 5min at 3000rpm. The 500 μ l of the supernatant were collected for analysis and replaced by fresh buffer. The percentage of biologically-active released lysozyme was measured by enzymatic assay.

2.2.4 Protein-poloxamer 188 characterization

Zeta potential

To monitor the interactions between lysozyme and poloxamer 188 in solution, lysozyme solutions in acetic acid 0.1M containing increasing amount of poloxamer 188 were prepared. The protein concentration was maintained at 10mg/ml. The corresponding zeta potential was measured as a function of protein to poloxamer ratio, using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

Size of the lysozyme-poloxamer 188 particles

The size of the lysozyme-poloxamer 188 particles dispersed in glycofurol was determined by light diffraction (Mastersizer[®] 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

BSA-FITC distribution within microspheres

Microspheres were loaded with BSA-FITC or with BSA-FITC/poloxamer 188 as described above. A laser scanning confocal imaging system (Olympus light microscope Fluoview FU300, Paris, France) was employed to observe BSA-FITC distribution within microspheres. Dry microspheres were dispersed on a glass slide; fluorescence images of cross-sections were taken by an optical sectioning. All the images were obtained using a single resolution.

FTIR

The secondary structure of lysozyme with or without poloxamer 188 inside the microspheres was determined by FTIR spectroscopy. Microspheres loaded with 5% w/w of protein (with respect to the amount of PLGA) were studied in order to detect the protein. FTIR studies were conducted with a Bucker IFS 28 equipped with a DTGS detector. 500 scans ($4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$) at 2cm^{-1} resolution were averaged to obtain each spectrum. Lyophilized microspheres were measured as KBr pellets (4-5 mg of microspheres per 200 mg of KBr). All spectra were analyzed in the amide I region ($1700\text{-}1600\text{cm}^{-1}$) using the program OPUS version 2.0. In all cases, a linear baseline between $2000\text{-}1800\text{cm}^{-1}$ was subtracted. Infrared band position and the number of bands in the amide I region were calculated by Levenberg-Marquardt algorithm using the program OPUS. The secondary structure contents were calculated from the area of the individual assigned bands and their fraction of the total area in the amide I region.

2.2.5 Contact angle measurements

The dynamic contact angles of polymer surfaces were measured with a Krüss Processor Tensiometer K100 by immersing polymer-coated glass in deionized water. The contact angle data for each sample were averages of three individual measurements. The measurement was performed at 26°C .

3 Results

3.1 Lysozyme/polymer interaction study

To achieve a more sustained protein release from PLGA microspheres, formulation components were often modified [18-23]. The choice of appropriate excipients was generally the result of an experimental observation of their effect on the in vitro release profile, after their microencapsulation. In the present study, a two-dimensional model was designed to better predict additive effect on the release profile; *i.e.* lysozyme adsorption onto a PLGA surface was quantified and its inhibition by numerous additives was rapidly evaluated. The PLGA surface was obtained by coating 24-wells plates with a polymer solution. A large volume of concentrated polymer solution was initially deposited and most was immediately removed to avoid the plate spoiling. Firstly adding a large volume allowed the sides of the

wells to be coated. Afterwards, drying (to begin under hood, then under vacuum) was achieved for complete solvent removal.

As protein concentration, temperature, pH and ionic strength influence protein interactions with hydrophobic surfaces, they were controlled during these experiments [24, 25]. The values of these parameters were fixed at levels where protein adsorption to PLGA 37.5/25 surface is the most important and the most rapid. Accordingly, with a low protein concentration of 0.5 µg/ml, a temperature of 37°C and a buffer where lysozyme is stable, 72% of the initial protein amount adsorbed onto the PLGA 37.5/25 layer within only 2 hours (**Figure 1-1A**).

Thanks to the model developed, effect of formulation components to limit lysozyme adsorption was determined: the efficiency of additives in solution, additives blended with PLGA37.5/25 or the polymer type was monitored (**Figure 1-1**). In a first part of the study, additives were codissolved with the protein prior to contact with the PLGA 37.5/25 surface; the most commonly employed in PLGA microspheres were tested: polyalcohols (trehalose, sucrose, mannitol, dextrans) [20, 21, 26, 27], hydrophilic polymers (PEGs [7]), a surfactant (poloxamer 188 [14, 28]), a protein (Bovine Serum Albumin (BSA) [29]) and amino acids (poly-L-arginine, histidine, glutathione). As shown in **Figure 1-1B**, polyalcohols and amino acids were unable to avoid lysozyme adsorption on the PLGA surface. It noteworthy that they had no effect even when their concentration was enhanced or when they were firstly incubated with the PLGA layer. On the contrary, PEGs, poloxamer 188 and BSA considerably reduced lysozyme adsorption as the percentage of adsorbed lysozyme dropped from 72% to 0-8%.

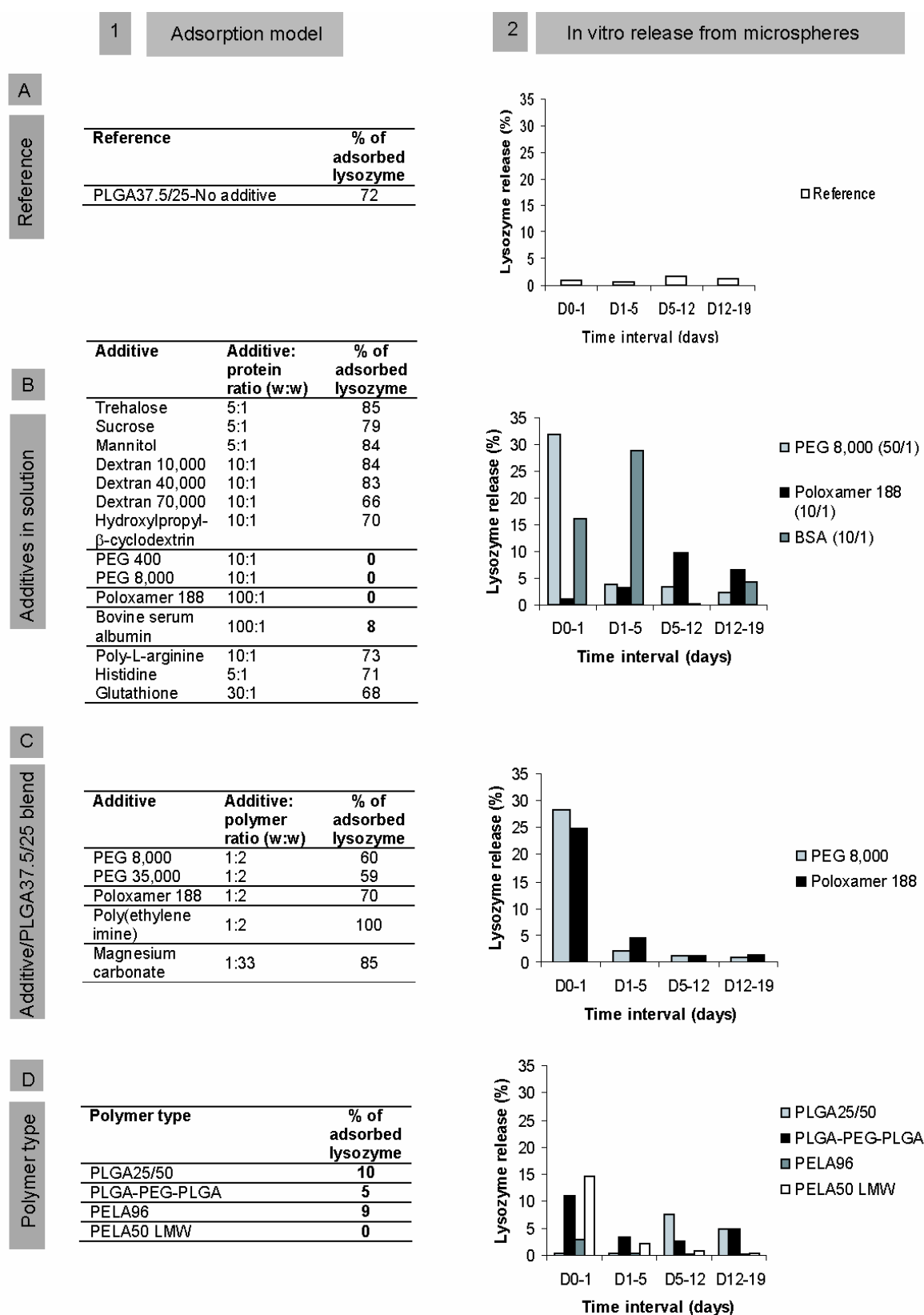


Figure 1. Effect of formulation components on lysozyme adsorption onto a polymer surface (1) and on in vitro lysozyme release profile from microspheres over 19 days (2).

Release is expressed in percentage of released lysozyme during each time period. The reference (A) corresponds to a formulation of lysozyme without additive and to PLGA37.5/25. Three modifications were designed. Additives were codissolved with lysozyme (B) or blended with the polymer within the layer (C). The ratio of additive to protein or polymer is given. The polymer type was also modified (D).

Otherwise, PEGs and poloxamer were blended with PLGA 37.5/25 within the layer. Results showed that, in this form, they did not shield lysozyme from adsorption (**Figure 1-1C**). Even when a higher molecular weight PEG (35,000) was used, lysozyme still adsorbed to the PLGA surface. Malzert *et al.* namely showed that PEG segments could desorb from the interface allowing lysozyme molecules to adsorb to the hydrophobic polymer [30]. Assuming that positive charges on PLGA surface could keep away positively-charged lysozyme, a cationic polymer, poly(ethylene imine), was blended with PLGA. However, the expected effect did not occur and lysozyme was still adsorbed onto the surface (100% adsorption). As basic salt were often employed to improve protein release from PLGA devices when polymer starts to degrade (by counteracting the local pH drop) [31], magnesium carbonate was added to PLGA onto the layer to detect any additional effect on protein-polymer interactions of the initial release period. No beneficial effect on protein adsorption was noticed.

In a further part, the polymer type was modified. The reference polymer (PLGA 37.5/25) was replaced by a PLGA 25/50 and tribloc copolymers (PLGA-PEG-PLGA and PLA-PEG-PLA) (**Table 1**). With these polymers, lysozyme adsorption did not occur (10% of adsorbed lysozyme or less) (**Figure 1-1D**). Contact angle measurements showed that these polymers are more hydrophilic than PLGA 37.5/25 (**Figure 2**). This feature could explain the lower protein adsorption on the surface of these polymers.

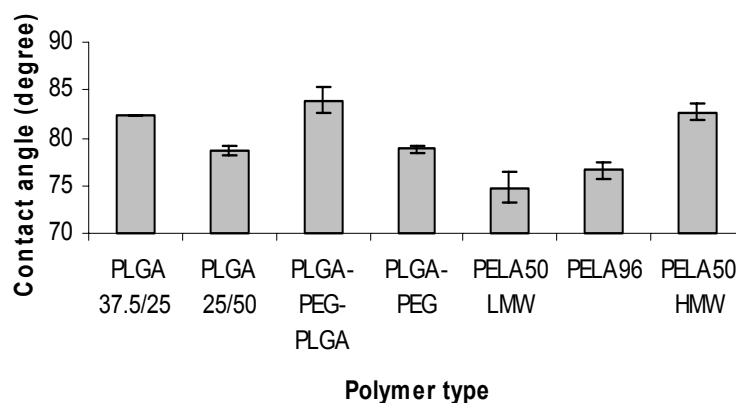


Figure 2. Contact angles of the studied polymers.

3.2 Effect of various formulation components on *in vitro* release of lysozyme over 3 weeks

In vitro release from microspheres

PLGA 37.5/25 microspheres loaded with lysozyme were prepared by a *s/o/w* technique. As shown in **Figure 1-2A**, lysozyme release over 19 days from these microspheres was very low. The above data suggest that protein in solution tends to adsorb to PLGA and that additives inhibiting protein adsorption could improve the protein release profile at least in the early-stage release (when adsorption is more significant) [15]. Hence, lysozyme-loaded microspheres were also prepared with selected additives and with various polymer types. The mean particle size of the microspheres was $60\pm 23\mu\text{m}$ (volume weighted) and the mean encapsulation efficiency was $73\pm 5\%$ as determined by lysozyme activity measurement. Regarding lysozyme release profile, marked differences were observed (**Figure 1-2**). Therefore, when BSA, PEG 8,000 and poloxamer 188 were codissolved with lysozyme prior to its precipitation and subsequent encapsulation, its release was markedly increased (**Figure 1-2B**). Nevertheless, this effect was different according to the hydrophilic nature of the excipients. Hence, BSA and PEG 8,000 which are hydrophilic induced a higher lysozyme release during the first day release (16% and 32%, respectively) but a low subsequent release. They diffused rapidly out of the microspheres and did not assure further lysozyme protection [21]. On the contrary, poloxamer 188 which is amphiphilic and resisted the initial hydration exhibited a lysozyme sustained release over almost 20 days. As expected from above results, when PEG or poloxamer 188 were only blended with PLGA, sustained release was not achieved despite their frequent use [32-35] (**Figure 1-2C**). They favoured initial protein release by forming pores in the PLGA matrix but they did not inhibit lysozyme interactions with the matrix. Finally, the polymer constituting the microspheres was modified for more hydrophilic polymers (**Figure 1-2D**). When PLGA 25/50 was employed, an increased release rate actually occurred between Day 5 and Day 12 (Day 5-12) and between Day 12 and Day 19 (Day 12-19). However, a lag time was observed before the fifth day as almost no lysozyme was released. The use PLA-PEG-PLA (PELA96 and PELA50 LMW) was neither beneficial to favour lysozyme sustained release; indeed, protein retention within the microspheres was still observed after the first day. The triblock copolymer PLGA-PEG-PLGA displayed appealing results.

Protein-poloxamer 188 characterization

To characterize the interaction of lysozyme with poloxamer 188 in aqueous solution, lysozyme zeta potential in solution with increasing amount of poloxamer 188 was measured (**Figure 3**). The soft particle analysis theory was applied to this macromolecular system [36]. When the non-ionic poloxamer 188 was added, lysozyme zeta potential shifts from 15 to 5mV. This decrease of the net surface charge on lysozyme surface revealed lysozyme interaction with poloxamer 188.

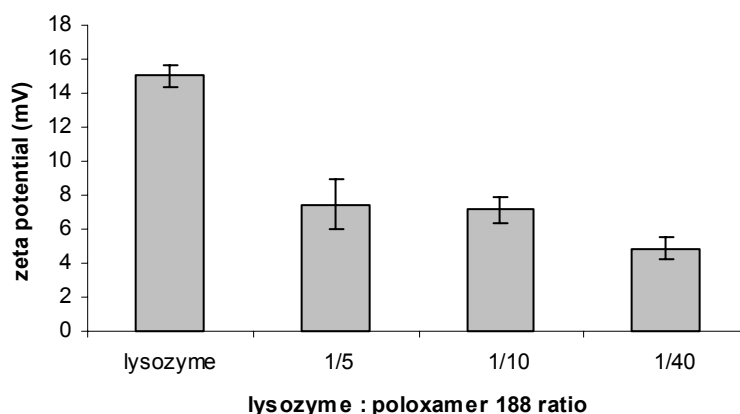


Figure 3. Evolution of lysozyme zeta potential when adding poloxamer 188 in solution.

In a previous study of our team [37], it was shown that the size of the lysozyme particles formed prior to encapsulation were submicronic. However, a study of a fluorescent protein distribution within the microspheres by confocal microscopy revealed that these protein particles were packed within the matrix in the absence of additive. When poloxamer 188 was added in the formulation, the size of the protein particles was unchanged but a homogeneous protein distribution was observed suggesting that poloxamer 188 not only inhibited protein interaction with the polymer but also improved its dispersion (**Figure 4**).

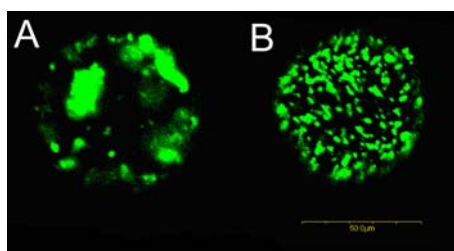


Figure 4. BSA-FITC distribution within PLGA37.5/25 microspheres without (A) or with poloxamer 188 (B). The bright zones represent the BSA-FITC.

To characterize the encapsulated protein-poloxamer 188 particles, the secondary structure of encapsulated lysozyme was characterized by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy (**Table 2**). The protein amide I IR infrared spectra were analyzed for the secondary structure composition. FTIR spectroscopy demonstrated that few protein structural perturbations were induced by the encapsulation and by the presence of poloxamer. Only minor spectral changes occurred in the amide I band (1700–1600 cm⁻¹), which is sensitive to protein structure. Analysis of the spectra by Gaussian curve-fitting revealed few change in the α -helical and in β -sheet content; the secondary structure was within the error the same as for the powder prior to encapsulation.

Table 2. Secondary structure of lysozyme under various conditions (as determined by FTIR spectroscopy).

Conditions	% α-helix	% β-sheet
Native lysozyme (powder)	24.5	37.9
Lysozyme in PLGA microspheres	24.9	34.9
Lysozyme + poloxamer188 (1/10) in PLGA microspheres	23.9	20.2

3.3 Effect of the matrix composition on in vitro release of lysozyme-poloxamer 188 after 3 weeks

Whereas protein encapsulation with poloxamer 188 was interesting to limit protein adsorption in the early stage release, it was insufficient to achieve a complete protein release and the protein release levelled off after the first 20 days incubation (2.76% of release between day 21 and day 35) (**Figure 5A**). Among the potential causes of this phenomenon, acidic-induced protein aggregation was reported to be significant. Indeed, during PLGA degradation, PLGA acidic degradation products are formed which causes a pH drop within the matrix. To counteract the formation of this acidic-induced aggregation, blend of the polymer with additives within the matrix and less denaturing polymers were tested.

Firstly, to favour the release of the protein and of the acidic degradation products, PEG was blended with PLGA 37.5/25 in lysozyme-poloxamer 188 microspheres. Like during the first three weeks, no positive effect on lysozyme release was induced between day 21 and 35 (**Figure 5B**). Microspheres made of a slow degrading PLA were also prepared to assess the effect of delaying the hydrolytic cleavage of ester bonds. To counterbalance this slow degradation and to perform sufficient release of the protein, poloxamer 188 or PEG 8,000

were blended with PLA. The release profile was neither improved at later stage release (**Figure 5B**). Beneficial effect of coencapsulated poloxamer 188 was maintained during the first 3 weeks but later, protein retention was observed. When the PEG polymer was covalently conjugated to the PLA, a plateau was also reached after 3 weeks release (**Figure 5C**). These profiles may be related to the destabilizing environment of the hydrophobic polymer. Thus in order to much more delay the polyester degradation and the outbreak of acidic compounds, a high molecular weight copolymer (PELA50 HMW) was tested. This strategy was unsuccessful. Interestingly, the use of a tribloc PLGA-PEG-PLGA copolymer and of a diblock PLGA-PEG copolymer allowed active lysozyme continuous release over at least 35 days (**Figure 5C**). **Figure 6** represents the cumulative lysozyme release from PLGA-PEG-PLGA microspheres. Lysozyme release continued over 45 days and almost 50% of active lysozyme was continuously released after a limited burst of about 10%. The release then levelled off after day 45.

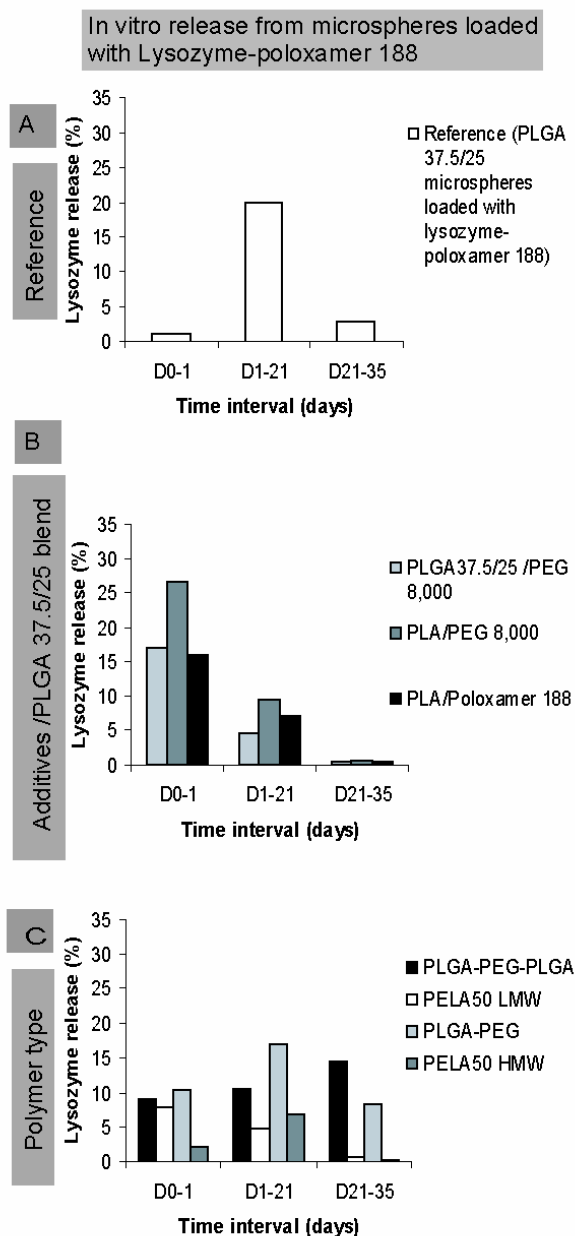


Figure 5. Optimisation of lysozyme in vitro release from microspheres after day 21.

The reference corresponds to microspheres of PLGA 37.5/25 encapsulating lysozyme-poloxamer 188. Release is expressed in cumulative percentage of released lysozyme during each time period.

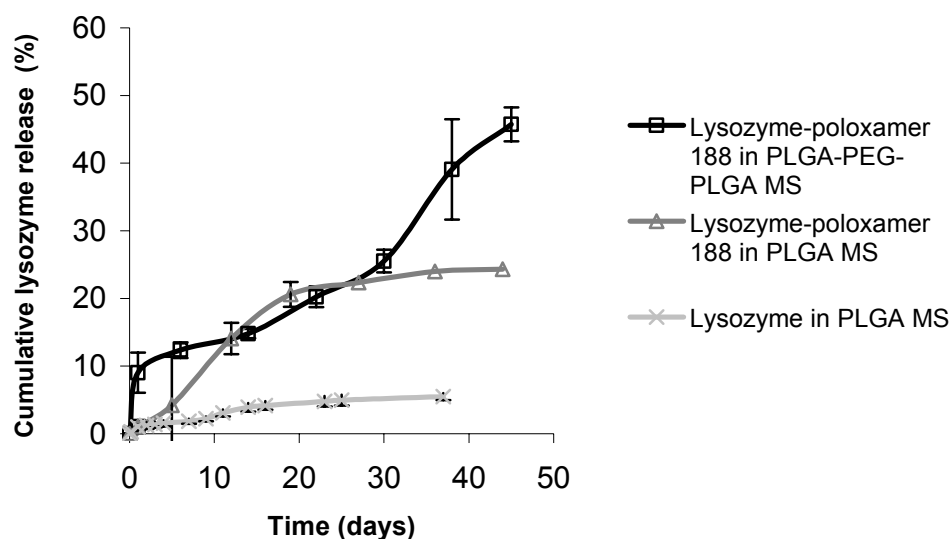


Figure 6. In vitro release profile of lysozyme (mean \pm SD) from PLGA microspheres without poloxamer 188 (n=2 batches, twice) and with poloxamer 188 (n=3 batches) and from PLGA-PEG-PLGA microspheres containing poloxamer 188 (n=7 batches).

4 Discussion

Protein adsorption to PLGA is a critical factor affecting protein release kinetics from PLGA microspheres [15, 38, 39] and no universal strategy yet exists to avoid this phenomenon. That is the reason why we chose to design a two-dimensional model to select formulation components able to circumvent this event. Previous studies on protein-PLGA interactions for the development of protein-loaded PLGA microspheres considered the influence of the release media [38] and of pegylating the protein [39] but, to our knowledge, none compared the effect of formulation components. In this study, by decreasing the adsorption duration from days to 2 hours, the anti-adsorption effect of numerous excipients was rapidly screened. This could be achieved by working with a low protein concentration (0.5 μ g/ml) and a sensitive protein quantification method. Indeed, at low concentration, protein is more likely to adsorb to hydrophobic surface and changes in protein concentrations in the supernatant are more easily detectable [39]. To maximize lysozyme adsorption in this model, the temperature was set to 37°C during the experiment as adsorption increases with the temperature [25, 38]. Jiang *et al.* reported that lysozyme was more prone to adsorption at pH 7.4 [38]. So, to set conditions where maximum lysozyme amount adsorbs to PLGA and to approach physiological conditions, a media pH level of 7.4 was used. In these conditions, lysozyme adsorption on the PLGA surface was rapidly observed. Interestingly, these

conditions (low amount of protein, 37°C, TRIS-HCl 0.01M, pH 7.4 buffer) are similar to that of the in vitro release study and is presumed to fit lysozyme behaviour during release from PLGA microspheres. By using PLGA-coated microplates, rapid screening of numerous excipients, in various forms, could be achieved and certain reported results could be explained. In particular, it was previously described that trehalose, dextrans, HPbetaCD and L-arginine incorporated in PLGA microspheres were inefficient to sustain protein release [20, 26]; our results actually showed that they could not inhibit protein adsorption to PLGA. It was namely described earlier that sugars were ineffective in blocking protein adsorption (at a w/o interface) [40]. Therefore, the model is useful to eliminate some candidates for enhancement of protein release. Nevertheless, only adsorption phenomenon was considered and excipients rejected from this study should not be eliminated for complementary indications. Only BSA, PEGs and poloxamer 188 were able to block lysozyme adsorption; this is consistent with their properties at interfaces. Indeed, the surface-active properties of albumins are widely documented. As well, poloxamers are frequently used to minimize protein adsorption onto hydrophobic surfaces because of their surface active properties and their biocompatibility [41-43]. They are triblock copolymers of the type PEO-PPO-PEO, where PEO and PPO are poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide). Hydrophobic PPO centre blocks attach to the surface and longer PEO tails build a steric barrier between surface and protein molecules. PEG can also sterically displace the protein from its interface with the polymer surface [7]. Nevertheless, among the excipients identified as inhibiting protein adsorption, poloxamer 188 was the only one which allowed a sustained release of lysozyme from the PLGA microspheres presumably because its stronger interactions with hydrophobic surfaces (with the PPO segment) [44]. Moreover, poloxamer is known to facilitate recovery of unfolded lysozyme [45].

Previous studies reported the coencapsulation of protein with poloxamer 188. By a w/o/w process, the co-encapsulation of a surfactant led, in most cases, to a faster release of the encapsulated protein during the first day but the release rate no further increased because of the rapid loss of the surfactant. To avoid the fast release of protein and poloxamer 188, Morita *et al.* [28] prepared reservoir-type microparticles by a 'polymer-alloys technique'. Poloxamer, previously colyophilized with the protein, partitioned in the organic phase and was preferentially localized in the shell of the microparticles; it facilitated the formation of aqueous pores (like other amphiphilic polymers) and increased diffusional BSA release in the early phase (over 14 days) [14, 46]. Otherwise, Sanchez *et al.* [46] showed that only the initial release was enhanced when poloxamer 188 was blended with PLGA; this was confirmed in

the present study. A study reported on a reduction of the burst effect and a prolonged release in these conditions but this effect was rather attributed to an increase of the microsphere diameter [35]. In the present study, poloxamer effect on protein release from PLGA microspheres was quite different. The hypothesis of diffusion barrier where poloxamer located around the protein particles would slow down release of the surface-located protein can be excluded. Indeed, in the formulation without additive, no burst effect was observed. Therefore, on the contrary, it seems obvious that poloxamer enhanced protein release. Nevertheless, the presence of poloxamer did not result in a high initial release as observed in the case poloxamer/PLGA blending; so, we can assume that poloxamer little partitioned in the organic phase during the s/o suspension step. Therefore, the existence of interaction between poloxamer 188 and protein particles is considered. Hydrophobic interactions between proteins and non-ionic surfactants have been widely investigated [47-49]. According to the zeta potential measurement results, poloxamer binds to protein, in aqueous solution. Therefore, when adding glycofurol to this aqueous solution, protein-poloxamer particles are formed. The effect of poloxamer may thus be multiple. In one hand, poloxamer prevent self association of the protein particles (even at low concentration) [45] and allow a more homogeneous protein distribution within the microspheres. On the other hand, poloxamer reduces protein adsorption to the PLGA surface during microsphere hydration. The gelling properties of poloxamer may also play a key role during the release period. Although poloxamer 188 concentration in aqueous solution before particle formation is below the CMC at room temperature [50, 51], a liquid-crystalline phase transition of poloxamer may occur by desolvating with glycofurol, suggesting the formation of a gel-like structure within the microspheres.

The presence of poloxamer 188 in the formulation exhibited a continuous release of lysozyme over 3 weeks. Afterwards, a plateau was reached because of additional destabilizing mechanisms concomitant with polymer degradation. Therefore, we chose to modify the degradation behaviour of the biodegradable matrix. By using a PLGA-PEG-PLGA triblock copolymer, a continuous release and near zero order release pattern was obtained. The reason for such effect can not be restricted to a more hydrophilic feature. Indeed, as shown in **figure 2**, PLGA-PEG-PLGA presented quite similar contact angle as PLGA37.5/25; besides, polymers which were more hydrophilic (PLGA25/50 and PELAs) were unable to prolong the release. The favoured release profile with PLGA-PEG-PLGA was rather a consequence of a microphase separation and the formation of a physically cross-linked biodegradable hydrogel upon contact with water [52, 53]. Because of enhanced water uptake, the onset of erosion

period was shorter and the lag phase observed for examples with PLGA 25/50 was avoided [54]. Moreover, the PLGA-PEG-PLGA degradation was faster than that of PLGA and PLA-PEG-PLA copolymers [55]. Therefore, as pore diffusion and polymer erosion were superimposed, acidic degradation products did not accumulate in the core and protein aggregation was prevented [56]. Kissel and coworkers reported EPO release from similar systems for 2 weeks [57]. By coprecipitating lysozyme with poloxamer and performing its encapsulation within PLGA-PEG-PLGA microspheres, a continuous release over 45 days with limited initial burst (9%) was observed. Interestingly, diblock copolymers exhibited similar effect. Protein incomplete release will yet have to be clarified. We can assume that after 45 days, all the PEG segments are exhausted and the release mechanism via diffusion-degradation is substituted by a polyester degradation which may destabilize the protein. Besides, high variations of lysozyme release were observed during the fifth week (from 30% to 78% of cumulative release from triblock copolymer); a study of microsphere degradation could help to know whether these variations were due to non-reproducible polymer degradation.

Acknowledgements

The authors thank ‘Service commun d’Imagerie et de Microscopie d’Angers’ for confocal microscopy experiments. We would like to thank Christine Jérôme for supplying additional polymers, Dr Abdelslam El Ghzaoui for its technical assistance in the contact angle measurements and also Gérald Larcher, Catherine Guet, Patrick Saulnier and Franck Boury for their scientific advices. They are also grateful to the French ‘Ministère de l’Education Nationale et de la Recherche’ for its financial support and to the Integrated Project LSHB-CT-2003-503161 ‘Genostem’.

References

- [1] S. P. Schwendeman, M. Cardamone, A. Klibanov, R. Langer, M. R. Brandon, Stability of proteins and their delivery from biodegradable polymer microspheres, In S. Cohen and H. Bernstein (eds), *Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines*, Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 1-49.
- [2] W. Wang, Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics, *Int J Pharm* 289 (1-2) (2005) 1-30.
- [3] M. van de Weert, W. E. Hennink, W. Jiskoot, Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles, *Pharm Res* 17 (10) (2000) 1159-67.
- [4] U. Bilati, E. Allemann, E. Doelker, Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles, *Eur J Pharm Biopharm* 59 (3) (2005) 375-88.
- [5] H. Tamber, P. Johansen, H. P. Merkle, B. Gander, Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (3 SPEC. ISS.) (2005) 357-376.
- [6] J. M. Pean, M. C. Venier-Julienne, F. Boury, P. Menei, B. Denizot, J. P. Benoit, NGF release from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. Effect of some formulation parameters on encapsulated NGF stability, *J Control Release* 56 (1-3) (1998) 175-87.
- [7] J. M. Pean, F. Boury, M. C. Venier-Julienne, P. Menei, J. E. Proust, J. P. Benoit, Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres?, *Pharm Res* 16 (8) (1999) 1294-9.
- [8] C. Perez, I. J. Castellanos, H. R. Costantino, W. Al-Azzam, K. Griebenow, Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers, *J Pharm Pharmacol* 54 (3) (2002) 301-13.
- [9] E. S. Lee, M. J. Kwon, H. Lee, J. J. Kim, Stabilization of protein encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) microspheres by novel viscous S/W/O/W method, *Int J Pharm* 331 (1) (2007) 27-37.
- [10] H. K. Kim, H. J. Chung, T. G. Park, Biodegradable polymeric microspheres with "open/closed" pores for sustained release of human growth hormone, *Journal of Controlled Release* 112 (2) (2006) 167-174.
- [11] J. H. Park, M. Ye, Y. Yeo, W. K. Lee, C. Paul, K. Park, Reservoir-type microcapsules prepared by the solvent exchange method: effect of formulation parameters on microencapsulation of lysozyme, *Mol Pharm* 3 (2) (2006) 135-43.
- [12] G. Crotts, T. G. Park, Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues, *J Microencapsul* 15 (6) (1998) 699-713.

- [13] H. K. Kim, T. G. Park, Microencapsulation of human growth hormone within biodegradable polyester microspheres: protein aggregation stability and incomplete release mechanism, *Biotechnol Bioeng* 65 (6) (1999) 659-67.
- [14] D. Blanco, M. J. Alonso, Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants, *Eur J Pharm Biopharm* 45 (3) (1998) 285-94.
- [15] T. G. Park, H. Yong Lee, Y. Sung Nam, A new preparation method for protein loaded poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres and protein release mechanism study, *J Control Release* 55 (2-3) (1998) 181-91.
- [16] I. Rashkov, N. Manolova, S. M. Li, J. L. Espartero, M. Vert, Synthesis, characterization, and hydrolytic degradation of PLA/PEO/PLA triblock copolymers with short poly(L-lactic acid) chains, *Macromolecules* 29 (1) (1996) 50-56.
- [17] A. Aubert-Pouessel, D. C. Bibby, M. C. Venier-Julienne, F. Hindre, J. P. Benoit, A novel in vitro delivery system for assessing the biological integrity of protein upon release from PLGA microspheres, *Pharm Res* 19 (7) (2002) 1046-51.
- [18] C. Stureson, J. Carlfors, Incorporation of protein in PLG-microspheres with retention of bioactivity, *Journal of Controlled Release* 67 (2-3) (2000) 171-178.
- [19] G. Jiang, W. Qiu, P. P. DeLuca, Preparation and in vitro/in vivo evaluation of insulin-loaded poly(acryloyl-hydroxyethyl starch)-PLGA composite microspheres, *Pharm Res* 20 (3) (2003) 452-9.
- [20] M. Morlock, H. Koll, G. Winter, T. Kissel, Microencapsulation of rh-erythropoietin, using biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide): protein stability and the effects of stabilizing excipients, *Eur J Pharm Bioph* 43 (1997) 29-36.
- [21] A. Sanchez, B. Villamayor, Y. Guo, J. McIver, M. J. Alonso, Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *Int J Pharm* 185 (2) (1999) 255-66.
- [22] Y. S. Nam, S. H. Song, J. Y. Choi, T. G. Park, Lysozyme microencapsulation within biodegradable PLGA microspheres: urea effect on protein release and stability, *Biotechnol Bioeng* 70 (3) (2000) 270-7.
- [23] S. E. Zale, P. A. Burke, H. Bernstein, A. Brickner, Composition for sustained release of non-aggregated erythropoietin, U.S. Patent 5,716,644, 1997.
- [24] W. Wang, Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals, *Int J Pharm* 185 (2) (1999) 129-88.
- [25] T. Tsai, Adsorption of peptides to poly(D,L-lactide-co-glycolide): 2. Effect of solution properties on the adsorption, *Int J Pharm* 127 (1996) 43-52.

- [26] P. Johansen, Y. Men, R. Audran, G. Corradin, H. P. Merkle, B. Gander, Improving stability and release kinetics of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives, *Pharm Res* 15 (7) (1998) 1103-10.
- [27] W. Jiang, S. P. Schwendeman, Stabilization of a model formalinized protein antigen encapsulated in poly(lactide-co-glycolide)-based microspheres, *J Pharm Sci* 90 (10) (2001) 1558-69.
- [28] T. Morita, Y. Horikiri, T. Suzuki, H. Yoshino, Applicability of various amphiphilic polymers to the modification of protein release kinetics from biodegradable reservoir-type microspheres, *Eur J Pharm Biopharm* 51 (1) (2001) 45-53.
- [29] T. W. King, C. W. Patrick, Jr., Development and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique, *J Biomed Mater Res* 51 (3) (2000) 383-90.
- [30] A. Malzert-Fréon, O. Abillon, J. E. Proust, R. Gref, J. P. Benoit, F. Boury, Interactions between hen egg-white lysozyme, PEG2,000, and PLA50 at the air-water interface, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 42 (2) (2005) 97-106.
- [31] G. Zhu, S. R. Mallery, S. P. Schwendeman, Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide- co-glycolide), *Nat Biotechnol* 18 (1) (2000) 52-7.
- [32] T. K. C. Cleek R. L., Eskin S.G., Mikos A.G., Microparticles of poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) blends for controlled drug delivery, *J Control Release* 48 (1997) 259-268.
- [33] E. C. Lavelle, M. K. Yeh, A. G. Coombes, S. S. Davis, The stability and immunogenicity of a protein antigen encapsulated in biodegradable microparticles based on blends of lactide polymers and polyethylene glycol, *Vaccine* 17 (6) (1999) 512-29.
- [34] M. K. Yeh, The stability of insulin in biodegradable microparticles based on blends of lactide polymers and polyethylene glycol, *J Microencapsul* 17 (6) (2000) 743-56.
- [35] K. G. Carrasquillo, A. M. Stanley, J. C. Aponte-Carro, P. De Jesus, H. R. Costantino, C. J. Bosques, K. Griebenow, Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein, *J Control Release* 76 (3) (2001) 199-208.
- [36] V. Ducel, P. Saulnier, J. Richard, F. Boury, Plant protein-polysaccharide interactions in solutions: application of soft particle analysis and light scattering measurements, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41 (2-3) (2005) 95-102.
- [37] A. Giteau, M. C. Venier-Julienne, S. Marchal, M. Verdier, C. N. Montero-Menei, J. P. Benoit, The development of a nanosized, solid-state protein and its in vitro release from PLGA microspheres, 33rd Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, 2006.

- [38] G. Jiang, B. H. Woo, F. Kang, J. Singh, P. P. DeLuca, Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres, *J Control Release* 79 (1-3) (2002) 137-45.
- [39] M. Diwan, T. G. Park, Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres, *J Control Release* 73 (2-3) (2001) 233-44.
- [40] H. Sah, Stabilization of proteins against methylene chloride/water interface-induced denaturation and aggregation, *J Control Release* 58 (2) (1999) 143-51.
- [41] J. S. Tan, D. E. Butterfield, C. L. Voycheck, K. D. Caldwell, J. T. Li, Surface modification of nanoparticles by PEO/PPO block copolymers to minimize interactions with blood components and prolong blood circulation in rats, *Biomaterials* 14 (11) (1993) 823-33.
- [42] T. M. Goppert, R. H. Muller, Protein adsorption patterns on poloxamer- and poloxamine-stabilized solid lipid nanoparticles (SLN), *Eur J Pharm Biopharm* 60 (3) (2005) 361-72.
- [43] M. Duncan, M. Joanne, M. Warchol, Influence of surfactants upon protein/peptide adsorption to glass and propylene, *Int J Pharm* 120 (1995) 179-188.
- [44] M. Amiji, K. Park, Prevention of protein adsorption and platelet adhesion on surfaces by PEO/PPO/PEO triblock copolymers, *Biomaterials* 13 (10) (1992) 682-92.
- [45] R. C. Lee, F. Despa, L. Guo, P. Betala, A. Kuo, P. Thiyagarajan, Surfactant copolymers prevent aggregation of heat denatured lysozyme, *Ann Biomed Eng* 34 (7) (2006) 1190-200.
- [46] A. Sanchez, M. Tobio, L. Gonzalez, A. Fabra, M. J. Alonso, Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha, *Eur J Pharm Sci* 18 (3-4) (2003) 221-9.
- [47] R. Sedev, Z. Nemeth, R. Ivanova, D. Exerowa, Surface force measurement in foam films from mixtures of protein and polymeric surfactats, *Colloids and Surfaces A* 149 (1999) 141-144.
- [48] H. Sjogren, C. A. Ericsson, J. Evenas, S. Ulvenlun, Interactions between charged polypeptides and nonionic surfactants, *Biophysical journal* 89 (2005) 4219-4233.
- [49] M. Vasilescu, D. Angelescu, Interactions of globular proteins with surfactants studied with fluorescence probe methods, *Langmuir* 15 (1999) 2635-2643.
- [50] P. Alexandridis, J. Holzwarth, T. Hatton, Micellization of poly(ethylen oxide)-poly(propylen oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association, *Macromolecules* 27 (1994) 2414-2425.
- [51] Y. L. Wu, Effect of salt on the phase behaviour of F68 triblock PEO/PPO/PEO, *J. Phys.: Condens. Matter* 18 (2006) 4461-4470.

-
- [52] Y. X. Li, T. Kissel, Synthesis and properties of biodegradable ABA triblock copolymers consisting of poly(L-lactic acid) or poly(L-lactic-co-glycolic acid) A-blocks attached to central poly(oxyethylene) B-blocks, *Journal of Controlled Release* 27 (3) (1993) 247-257.
- [53] T. Kissel, Y. Li, F. Unger, ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (1) (2002) 99-134.
- [54] K. Mader, B. Bittner, Y. Li, W. Wohlauf, T. Kissel, Monitoring Microviscosity and Microacidity of the Albumin Microenvironment Inside Degrading Microparticles from Poly(lactide-co-glycolide) (PLG) or ABA-triblock Polymers Containing Hydrophobic Poly(lactide-co-glycolide) A Blocks and Hydrophilic Poly(ethyleneoxide) B Blocks, *Pharmaceutical Research* V15 (5) (1998) 787-793.
- [55] B. Bittner, C. Witt, K. Mader, T. Kissel, Degradation and protein release properties of microspheres prepared from biodegradable poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: influence of buffer media on polymer erosion and bovine serum albumin release, *J Control Release* 60 (1999) 297-309.
- [56] T. Kissel, Y. X. Li, C. Volland, S. Go?rich, R. Koneberg, Parenteral protein delivery systems using biodegradable polyesters of ABA block structure, containing hydrophobic poly(lactide-co-glycolide) A blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B blocks, *Journal of Controlled Release* 39 (2-3) (1996) 315-326.
- [57] M. Morlock, T. Kissel, Y. X. Li, H. Koll, G. Winter, Erythropoietin loaded microspheres prepared from biodegradable LPLG-PEO-LPLG triblock copolymers: protein stabilization and in-vitro release properties, *J Control Release* 56 (1-3) (1998) 105-15.

DISCUSSION GENERALE

L'administration de protéines à partir de microsphères de PLGA présente un intérêt pour de nombreuses applications, en particulier pour le développement de nouveaux outils de thérapie cellulaire plus efficaces et plus sûrs. En effet, l'instabilité, le manque de sélectivité tissulaire, la toxicité et le risque cancérigène des facteurs de croissance appellent le développement de tels systèmes d'administration permettant l'apport localisé et prolongé de protéines. Cependant, leur développement a été limité du fait des conditions déstabilisantes appliquées à la protéine pendant le procédé de préparation des microsphères et la dégradation du polymère (Chapitre 1). Ce travail a donc eu pour but de réduire voire de prévenir la dégradation physico-chimique de protéines dans ces systèmes.

1 Etape préliminaire de précipitation de protéines

La mise au point d'une technique de précipitation de protéines en présence de glycofurol a émergé de deux exigences : la nécessité de stabiliser la protéine pendant son encapsulation dans des microsphères de PLGA et celle de développer un procédé de microencapsulation sans solvant organique toxique. Des particules submicroniques de protéines (modèles et thérapeutiques) ont été préparées par séparation de phase sans dénaturation et avec de bons rendements (Chapitre 2).

Les méthodes classiques d'obtention de particules de protéines telles que la nébulisation, le broyage ou la lyophilisation ont été utilisées pour la microencapsulation de protéines par la technique s/o/w malgré leurs conditions délétères ou leurs faibles rendements [1-6]. Une méthode non dénaturante et n'entraînant pas de perte de protéine a été développée par Morita *et al.* pour obtenir de fines particules de protéines en vue de leur encapsulation [7]. Cette méthode repose sur la colyophilisation de la protéine avec du PEG. Dans notre travail, les conditions non dénaturantes permettent de s'affranchir de l'utilisation d'additifs. De plus, à la différence de ces méthodes, la précipitation dans le glycofurol et le chlorure de sodium ne nécessite pas d'équipements lourds. Ces avantages sont communs à ceux de la technique de précipitation développée par les laboratoires Baxter, elle aussi basée sur une séparation de phase. Celle-ci est induite par du PEG dissous dans une phase aqueuse contenant la protéine. Dans ce cas, le changement de phase est obtenu par une augmentation de température et des particules de l'ordre du micromètre sont obtenues [8].

Un plan d'expérimentation a permis de trouver les conditions optimales de précipitation de quatre protéines modèles aux propriétés physico-chimiques différentes. Les paramètres étudiés dans le plan d'expériences ont été choisis selon les contraintes qui nous sont imposées pour la mise en œuvre du procédé de microencapsulation. Pour une meilleure compréhension des mécanismes physico-chimiques mis en jeu lors de la précipitation, d'autres paramètres auraient dû être inclus. Il est connu que le pH, au même titre que la force ionique, agit sur la précipitation des protéines. L'influence de ce paramètre sur la précipitation des différentes protéines aurait pu être étudié. Il est évident que deux protéines de points isoélectriques très différents se comporteront différemment à un même pH. Nous recherchions l'existence de conditions optimales de précipitation identiques pour ces quatre protéines et donc, nous n'avons pas choisi de modifier ce paramètre qui n'aurait pas pu conduire à notre objectif. En effet, en tamponnant le milieu, on aurait diversifié la nature des sels présents dans la phase aqueuse et il aurait été difficile de contrôler la force ionique. D'autre part, la température n'a pas été maîtrisée au cours de cette étude qui a été réalisée à température ambiante. Bien que nous ayons montré, dans un travail préliminaire, que de travailler à 4°C ou température ambiante ne jouait pas sur le rendement de précipitation de la β -galactosidase, il aurait été préférable de travailler à température fixe. Enfin, une augmentation de la concentration en protéine est connue pour favoriser sa précipitation. Plutôt que d'étudier la concentration, la quantité de protéine a été modifiée, toujours en vue de l'application plutôt que de l'explication des principes physico-chimiques. Le principe de désolvatation de la protéine impliqué semble cependant classique et dû à une diminution de la constante diélectrique du milieu en présence de glycofurol et de chlorure de sodium, il s'apparente à une désolvatation en présence de PEG et de sel [9, 10]. Une étude physico-chimique pourrait approfondir ces résultats voire les optimiser (par mesure des constantes de diffusion des solvants, de la cinétique de formation des particules, de la teneur en eau résiduelle, par caractérisation structurale du précipité...). En effet, bien que des optimums de précipitation aient pu être obtenus dans les conditions décrites, ces conditions doivent encore être optimisées notamment pour diminuer les volumes qui restent importants (de l'ordre du millilitre pour précipiter 1mg de protéine). Nous avons vu que de définir les conditions optimales de précipitation d'une protéine était assez complexe en raison du coût prohibitif des protéines thérapeutiques et de leurs caractéristiques propres ; cette technique comportait quelques limites (masse molaire, formulation de la protéine) (2^{ème} partie du chapitre 2). Une caractérisation plus avancée du rôle combiné du glycofurol et du chlorure de sodium pourrait

aider à trouver plus facilement les conditions optimales de précipitation d'une protéine quelconque.

Ces particules de protéines ont initialement été développées pour stabiliser une protéine lors de son encapsulation dans des microsphères de PLGA. Leur intérêt pour stabiliser quatre protéines modèles sans utiliser de carrier de type albumine a été montré puisque l'activité enzymatique de ces protéines a été préservée après l'étape d'encapsulation. Ces particules, isolées ou en suspension, offrent d'autres possibilités d'application.

Tout d'abord, les protéines à l'état solide sont plus stables qu'en solution, cette propriété pourrait être utilisée pour stabiliser les protéines pendant leur stockage. Les particules sèches de protéines pourraient aussi être administrées par voie pulmonaire, après lavage (dans l'éthanol par exemple) et élimination des résidus de glycofurol.

Leur administration en suspension dans le glycofurol ou tout autre non solvant des protéines injectable et miscible à l'eau (N-méthyl-2-pyrrolidone, diméthylacétamide, diméthylsulfoxyde, PEGs, propylène glycol) est aussi envisageable. Cette forme pourrait permettre d'augmenter la concentration de protéine administrée (par diminution de la viscosité) voire de prolonger la demi-vie après injection.

Dans le cas où le solvant utilisé serait un solvant du PLGA, ce polymère pourrait être dissous dans la phase dispersante pour former un précipité *in situ* par diffusion du solvant dans les tissus environnants après administration. Ces systèmes à libération prolongée ont l'avantage d'avoir des procédés de fabrications simples et peu coûteux et de pouvoir être retirés dans le cas d'effets indésirables. De nombreuses publications rapportent l'étude de ces implants formés *in situ* [11, 12]. Le glycofurol a été utilisé comme solvant dans ces applications mais aussi : la N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP), le diméthylsulfoxyde (DMSO), le propylène glycol, la triacétine et le benzoate de benzyle. La NMP et le DMSO ont été les solvants préférentiellement choisis pour dissoudre des polymères de PLA et PLGA, en raison de leur utilisation de longue date en pharmacie. Une formulation conduisant à la formation de précipités *in situ* de PLGA contenant un analogue de la LH-RH, la leuproréline, est commercialisée avec de la NMP comme solvant (Eligard[®], technologie Atrigel[®]). Comparé au Lupron[®] Depot (US) (microsphères de PLGA contenant aussi de la leuproréline, comme l'Enantone[®] LP en France), l'Eligard[®] a la même efficacité pharmacologique et les avantages supplémentaires décrits précédemment [13].

Dans le cas de l'Eligard[®], une poudre de leuproréline lyophilisée est dispersée dans la solution de polymère extemporanément. Ce type de dispersion peut être inhomogène et responsable d'une perte du peptide. Des écart-types importants des niveaux plasmatiques ont

d'ailleurs été observés après administration de ces systèmes chez le chien [13]. La stabilité du peptide est également une limite à cette formulation. Ainsi, une fois mélangée, elle doit être administrée dans les 30min, sinon le peptide est dénaturé au contact du solvant organique. Pour une application à la libération prolongée de protéines, ces difficultés d'instabilité et d'inhomogénéité doivent être surmontées. Après avoir vérifié la stabilité dans le temps d'une protéine en suspension dans le glycofurol, il pourrait être intéressant de tester son intérêt pour l'administration de protéines à partir de précipités de PLGA formés *in situ*.

Cependant, ces implants présentent d'autres inconvénients majeurs [11]. Le principal problème est la possibilité d'un « burst » dans les heures suivant l'injection puisqu'il y a un temps de latence entre l'injection et la formation de l'implant. Ce type de système ne peut donc être envisagé que pour des molécules avec un index thérapeutique élevé. Un autre problème est lié à l'utilisation de solvants organiques. La NMP, le DMSO et le propylène glycol sont généralement considérés comme relativement non toxiques aux concentrations utilisées pour des applications pharmaceutiques [11, 14]. Mais, ils peuvent être irritants ou hémolytiques à forte concentration. Le benzoate de benzyle serait moins irritant. La triacétine, quant à elle, est principalement utilisée par voie orale [14]. Le glycofurol est utilisé pour des administrations parentérales mais peu de données toxicologiques sont disponibles [15]. Un autre inconvénient de ces précipités formés *in situ* est dû à la faible stabilité du polymère en solution (il se dégrade en 26 semaines dans la NMP, à 25°C) [16].

En raison de la répartition faiblement uniforme du principe actif dans les implants, des microsphères peuvent aussi être préparées *in situ* (ISM) [17]. Des « prémicrosphères » (microglobules de solution de PLGA) dispersées dans une phase huileuse sont ainsi injectées [17, 18]. Ces systèmes présentent peu d'avantage par rapport aux microsphères de PLGA durcies avant injection et surtout ont l'inconvénient de la présence d'un solvant indésirable.

Dans le cas du procédé de prilling envisagé ici, un procédé simple mettant en jeu des volumes acceptables de glycofurol résiduel pourrait être mis en œuvre. Dans ce cas, la protéine pourrait être directement mise en suspension dans la phase organique de façon homogène et sans déstabilisation. Notre laboratoire développe actuellement des microsphères de PLGA en CO₂ supercritique en utilisant le glycofurol comme solvant du PLGA. La précipitation de la protéine dans le glycofurol avant encapsulation devrait également permettre de stabiliser la protéine (**Figure 1**). Mais, le problème de fuite de la protéine prévisible lors de la préparation des microsphères par ces deux méthodes devra ensuite être surmonté.

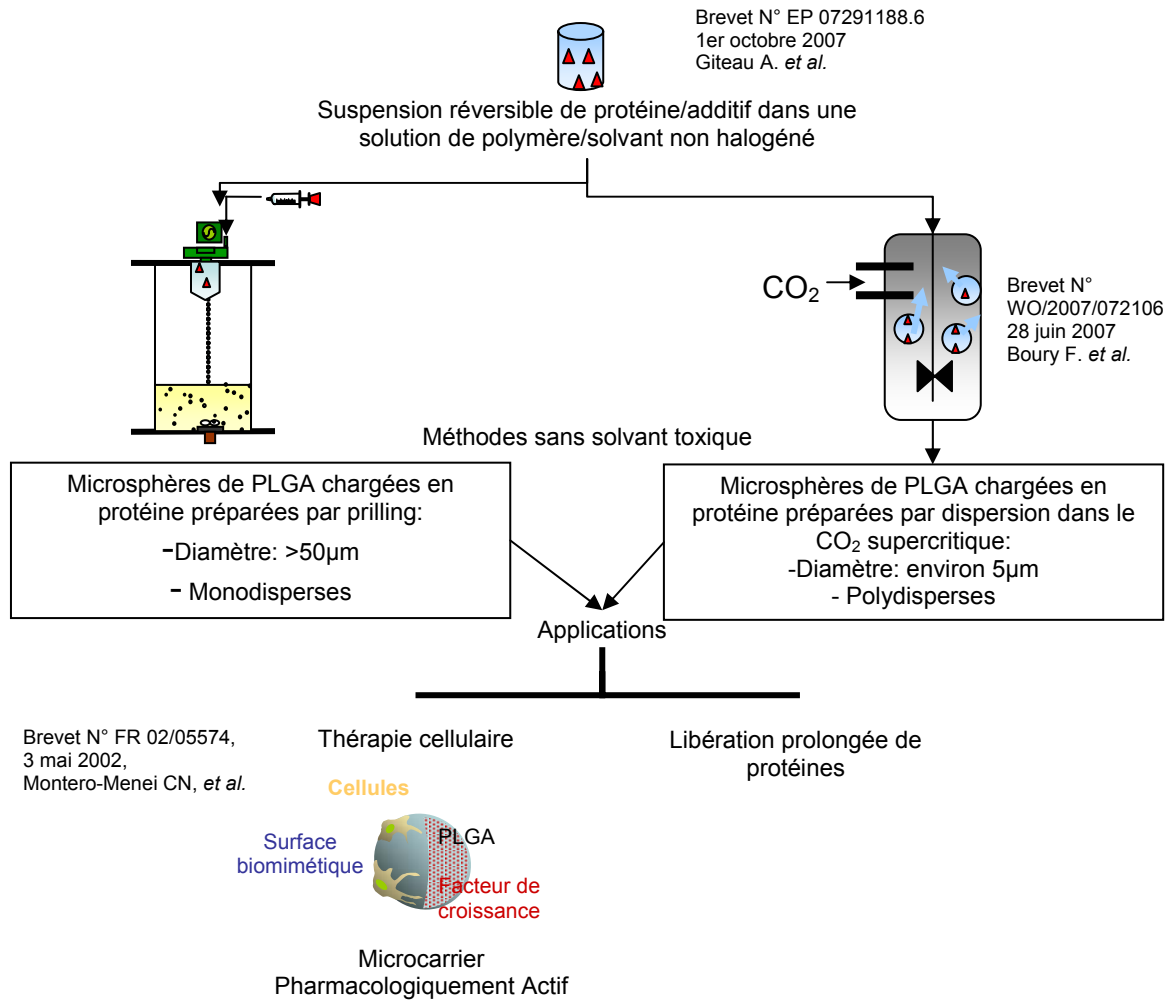


Figure 1. Intérêt des particules de protéines pour les projets du laboratoire.

2 Encapsulation d'une protéine à l'état solide dans des microsphères de PLGA

Depuis quelques années, les techniques d'encapsulation de protéines à l'état solide se substituent à la technique classiquement utilisée dite de double émulsion (w/o/w) pour encapsuler des protéines dans des microsphères de PLGA [2]. Bien que cette technique de double émulsion soit simple et conduise à de bons rendements d'encapsulation, les stress imposés aux protéines ont appelé le développement de techniques moins dénaturantes. Des méthodes telles que la technique s/o/w ou s/o/o sont basées sur la suspension d'une poudre de protéine dans un solvant organique. En l'absence de phase aqueuse interne, la protéine est moins susceptible d'être dénaturée : l'interface w/o n'existe plus et les ultrasons ne sont plus nécessaires pour former l'émulsion primaire. De plus, la structure de la protéine dans cette phase organique est thermodynamiquement figée et les changements de conformation ne peuvent se produire.

Pour obtenir une poudre de protéine micronisée en vue d'une microencapsulation, l'atomisation a souvent été utilisée mais cette méthode reste relativement délétère et peu rentable [4, 5, 19-21]. La lyophilisation en présence d'additifs a également été entreprise malgré la lourdeur des équipements nécessaires [6, 22, 23]. En utilisant la technique de précipitation présentée précédemment, un procédé avantageux et non dénaturant a permis l'obtention de particules submicroniques et leur encapsulation dans des microsphères de PLGA par une technique dite de simple émulsion (s/o/w). Ce procédé est simplifié par rapport aux procédés décrits précédemment malgré l'étape de centrifugation nécessaire pour éliminer le glycofurol. Dans un procédé de microencapsulation utilisant le glycofurol comme solvant du PLGA, cette étape n'existera plus.

L'effet des conditions d'encapsulation sur l'activité de quatre protéines modèles a été étudié (Chapitre 2). Ces protéines ont été choisies selon deux critères : leurs propriétés physico-chimiques et leur activité biologique. D'une part, ces quatre protéines couvrent une large gamme de masses molaires et de pH isoélectriques ; d'autre part, ce sont des enzymes, leur activité biologique est donc facile à déterminer. Nous avons ainsi pu évaluer à la fois, la quantité « totale » de protéine microencapsulée (après extraction : par mBCA et sans extraction : par radioactivité) et la quantité « active » de protéine microencapsulée (par mesure de l'activité spécifique des enzymes) pour ces quatre protéines. Ceci nous a permis de calculer la perte d'activité lors de l'étape d'encapsulation. En précipitant avant leur

encapsulation ces protéines, leur dénaturation a pu être évitée pendant la préparation des microsphères sans utiliser de carrier de type albumine (toute la protéine encapsulée est restée active après extraction hors des microsphères et redissolution). Des rendements d'encapsulation d'environ 80% ont été obtenus en adaptant le procédé, particulièrement en améliorant la dispersion des agrégats de protéines dans la phase organique (ajout de la phase organique par fractions).

La précipitation au préalable de la protéine a permis d'éviter sa dénaturation pendant l'encapsulation. D'autres limites à la formulation de ces systèmes à libération prolongée vont maintenant devoir être surmontées. Il reste notamment à développer un procédé de microencapsulation plus facilement industrialisable et ne faisant pas intervenir de solvant organique toxique. Nous pensons que la technique de prilling pourrait atteindre ces objectifs. Par ailleurs, nous avons cherché également à stabiliser la protéine au cours de sa libération, autre défi majeur de la formulation de microsphères de PLGA chargées en protéines.

3 Optimisation du profil de libération *in vitro*

La libération de protéines à partir de microsphères de PLGA est généralement caractérisée *in vitro* par une libération initiale massive (effet « burst ») suivie d'un plateau. Ce n'est qu'au cours de ces dernières années que ce problème de libération incomplète est devenu un axe de recherche prioritaire ; avant, seul le problème de stabilité pendant l'encapsulation était étudié. Un profil d'ordre zéro et sans dénaturation de la protéine n'a d'ailleurs été que rarement obtenu (Chapitre 1). L'absence d'uniformité des conditions d'études (taux d'encapsulation, protéine étudiée, milieu de libération, méthode d'échantillonnage) rend, en effet, la confrontation des résultats difficile et limite le développement d'une stratégie universelle.

Après avoir stabilisé la protéine pendant l'étape d'encapsulation, notre objectif a été d'assurer sa libération continue et prolongée à partir des microsphères (Chapitre 3). Nous avons travaillé avec le lysozyme pour cette étude. En effet, selon l'expérience du laboratoire, c'est un bon modèle pour prédire le comportement de facteurs de croissance tels que le NGF et le GDNF en raison des leurs propriétés physico-chimiques proches (faible masse molaire, $pHi > 7$) [24, 25]. Nous avons d'ailleurs montré que les conditions optimales de précipitation définies pour le lysozyme appliquées au NGF permettaient de précipiter 80% de NGF (Chapitre 2). D'autre part, malgré sa stabilité reconnue, le lysozyme conduit souvent à une libération non continue et incomplète [24, 26-33]. Enfin, la mesure de son activité

enzymatique est assez sensible pour déterminer facilement la quantité de protéine libérée sous forme active (ordre du ng/ml) à partir de microsphères faiblement chargées en protéine (taux d'encapsulation de 0,6%). Ce taux d'encapsulation a été choisi en vue de la future encapsulation de facteurs de croissance, actifs à faible dose.

En comparant la protéine libérée totale (marquée à l'Iode 125) et sous forme active, nous avons montré que la protéine restait active au cours de sa libération dans un tampon de stabilité, le tampon TRIS-HCl (0.01M, pH 7.4) (1^{ère} partie du chapitre 2, figure 5) [24]. Nous avons alors fait le choix de quantifier uniquement la protéine libérée sous forme active afin d'éviter l'étape supplémentaire de radiomarquage. D'autre part, notre équipe a précédemment mis en place un système de flux continu pour étudier la libération *in vitro* de protéines à partir de microsphères [24]. Plutôt que d'utiliser ce système minimisant les risques d'adsorption et de dénaturation protéique, nous avons étudié la libération par la technique dite de « séparation » basée sur l'introduction des microsphères dans un tube à centrifuger et un prélèvement régulier du surnageant. Ceci a permis un criblage simple de différentes formulations, après avoir démontré la bonne corrélation des résultats obtenus par les deux méthodes.

Les stratégies que nous avons développées dans ce travail pour améliorer *in vitro* le profil de libération du lysozyme à partir de microsphères de PLGA sont résumées dans la **figure 2** et détaillées par la suite.

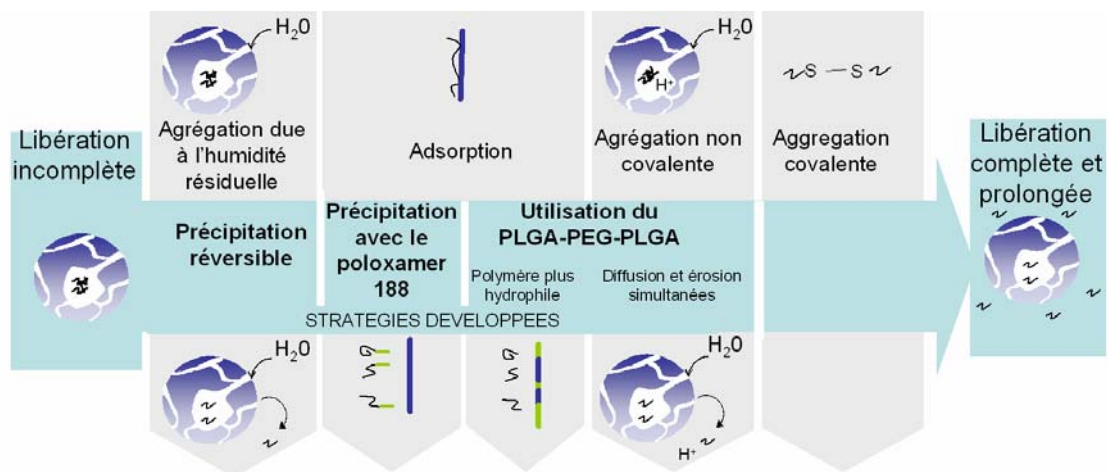


Figure 2. Représentation schématique des stratégies développées pour assurer la libération prolongée de protéines à partir de microparticules biodégradables et de leurs effets supposés.

3.1 Libération entre J0 et J1

Pendant le stockage et la phase initiale de la libération, les microsphères s'hydratent lentement et la protéine peut s'agréger, ce qui peut diminuer la quantité de protéine libérée [34]. Dans notre travail, la conformation dépliée de la protéine lors de la précipitation étant réversible, la protéine pourra se replier correctement lors de l'hydratation des microsphères ; elle est alors libérée sans perte d'activité (Chapitre 2). Cette stratégie s'apparente aux travaux visant à améliorer le repliement de la protéine décrits dans le Chapitre 1 (dépliage réversible de la protéine à l'aide d'urée [31], complexation avec le zinc [35], précipitation en présence de sulfate d'ammonium [36]). L'avantage de notre procédé réside dans l'utilisation de composés injectables et de l'application possible à différents types de protéines.

Un travail antérieur de notre équipe avait montré que le lysozyme encapsulé par une technique de double émulsion perdait son activité pendant le premier jour de libération si aucun additif n'était ajouté [24]. De même, les travaux sur l'encapsulation d'une protéine à l'état solide rapportent l'ajout d'additifs dans la formulation pour la stabiliser soit pendant la micronisation, soit pendant l'encapsulation. La présence de certains additifs notamment de l'albumine est gênante pour des raisons de sécurité sanitaire ; d'autres, en particulier les additifs hydrophiles de type PEG, modifient le profil de libération de la protéine notamment par l'induction d'un effet « burst ». Morita *et al.*, par exemple, ont montré qu'un « burst » de 20% était observé en 1 heure lorsque la protéine était colyophilisée avec du PEG avant encapsulation [6]. La précipitation de la protéine avec du glycofurol a permis de s'affranchir de l'utilisation de tels excipients et donc de ce « burst », tout en évitant la dénaturation de la protéine. Cependant, lorsque des microsphères de 20 μ m ont été préparées (Chapitre 2), un « burst » de 10% pendant le premier jour a été observé. Il est connu que l'augmentation de la taille des microsphères ralentit la libération de la protéine. La libération à partir de microsphères de 60 μ m (étudiées en vue d'une application en ingénierie tissulaire) a donc été réduite à 1% pendant le premier jour d'incubation (Chapitre 3).

3.2 Libération entre J1 et J21

Au-delà du premier jour, une libération très faible de la protéine a été observée pour ces deux types de microsphères. L'interaction non spécifique de la protéine avec le polymère est l'une des causes de cette rétention [27-29]. Pour assurer une libération continue après le premier jour de libération, les stratégies existantes ont souvent été basées sur des essais de

nombreuses formulations. Pour tenter de développer une stratégie plus rationnelle, nous avons mis au point un modèle permettant de comparer l'effet de différents additifs sur l'adsorption du lysozyme sur une couche de PLGA (Chapitre 3). Parmi les additifs évitant cette adsorption, le poloxamer 188 a montré un effet intéressant sur le profil de libération. Le pourcentage cumulé de lysozyme libéré sur 20 jours est ainsi passé de 4 à 20% sans induction d'effet « burst » (Chapitre 3). Seul le poloxamer 188 a permis de prolonger la libération. La valeur ajoutée du poloxamer lors de la libération *in vitro* par rapport aux autres additifs évitant une adsorption dans le modèle est liée à son arrangement dans la matrice polymère. Nous supposons que, grâce à ses groupements polypropylène, il interagit plus fortement que la BSA ou le PEG avec le polymère et diffuse moins rapidement hors des microsphères. Pour confirmer cette hypothèse et caractériser l'interaction du poloxamer avec le lysozyme et/ou le PLGA, (mécanisme, proportions requises, cinétiques, type de poloxamer...), des études complémentaires sont nécessaires. Nous avons déjà amorcé quelques pistes (mesure du potentiel zéta, microscopie confocale) mais la présence de glycofurol résiduel dans les coprécipités lysozyme-poloxamer 188 a rendu difficile une caractérisation plus approfondie, notamment par DSC et spectrométrie Raman.

Il est également connu que le poloxamer 188 favorise le repliement du lysozyme [37] ; ceci peut, tout comme la précipitation réversible, améliorer sa diffusion dans une conformation correcte lors de l'hydratation des microsphères.

Enfin, lors de la précipitation par le glycofurol, le poloxamer est désolvaté ; il peut alors former un gel protecteur autour de la protéine lui évitant de s'accumuler (et donc de s'agréger) et d'interagir avec le polymère. Les stratégies instaurant un environnement visqueux autour de la protéine font d'ailleurs parties des rares techniques qui ont permis d'obtenir des profils de libération adéquates (Chapitre 1). Elles reposent sur l'ajout de poloxamer 407 capable de former un gel à 37°C [38], de isobutyrate acétate de saccharose [32], d'amidon et de hyaluronate [39].

3.3 Libération entre J21et J45

Lorsque le polymère commence à se dégrader, des produits de dégradation acides s'accumulent dans le cœur des microsphères et induisent l'agrégation de la protéine. Pour neutraliser ces composés acides, des sels basiques ont auparavant été ajoutés [25, 40]. Bien qu'efficaces pour la formulation d'implants de PLGA, leur effet s'est révélé limité après le premier jour de libération pour des microsphères chargées en lysozyme [24]. La cinétique de

dégradation de la matrice polymère a souvent été modifiée pour retarder l'hydrolyse de la chaîne polyester tout en favorisant la diffusion de la protéine (Chapitre 1). En utilisant cette stratégie et plus particulièrement en utilisant un nouveau copolymère tribloc de PLGA-PEG-PLGA, une libération continue du lysozyme a pu être obtenue. L'intérêt de ce type de copolymère a été étudié par l'équipe de Kissel [41-43] résultant en une libération continue de protéines (BSA, toxine tétanique, EPO) pendant 15 jours. En couplant cette stratégie à une coprécipitation du lysozyme avec du poloxamer 188, le lysozyme a été libéré continuellement pendant 45 jours à partir de ces microsphères (Chapitre 3).

L'intérêt de ce type de polymère est lié à sa structure comparable à celle d'un hydrogel après hydratation. De la même façon, des microparticules gélifiées ont été préparées à l'aide d'un mélange de PLGA et d'oligo-éthylène glycol greffé sur un acide poly(l-lactique) (PLLA-g-oligoEG) [44]. Ceci a permis une libération continue et complète de BSA par diffusion. Ainsi, les quelques cas récents qui ont permis d'obtenir ce type de profil de libération d'ordre zéro étaient généralement basés sur la modification de la matrice polymère de façon à prévenir l'apparition de conditions délétères pour la protéine. Par exemple, en utilisant un PLA semi-cristallin de faible masse molaire (10KDa) se dégradant très lentement, des microsphères nano-poreuses ont été préparées et ont ainsi permis la libération prolongée et complète d'hormone de croissance pendant 34 jours [45]. De même, la préparation de microcapsules constituées d'une coque de PLA et d'un cœur de PLGA a protégé la BSA pendant sa libération; la présence d'additifs amphiphiles dans la coque a permis de favoriser sa diffusion pendant 14 jours [6, 46]. Le relargage de la protéine par diffusion plutôt que par l'érosion du polymère a ainsi souvent permis de s'affranchir de l'apparition d'un microenvironnement acide. Néanmoins, ces stratégies ont un effet limité dans le temps puisque toute la protéine doit avoir diffusé avant que la dégradation du polymère ne se produise et les profils d'ordre zéro n'ont, à notre connaissance, été observé que pour des durées inférieures ou égales à 1 mois. Avec l'association d'une précipitation en présence de poloxamer et du PLGA-PEG-PLGA, nous avons observé un plateau après 45 jours de libération, certainement dû à l'acidification des microsphères. Des études complémentaires de dégradation des microsphères sont maintenant nécessaires pour comprendre les causes de l'apparition de ce plateau mais également des variations importantes observées lors de la cinquième semaine de libération.

Références

- [1] K. G. Carrasquillo, A. M. Stanley, J. C. Aponte-Carro, P. De Jesus, H. R. Costantino, C. J. Bosques, K. Griebenow, Non-aqueous encapsulation of excipient-stabilized spray-freeze dried BSA into poly(lactide-co-glycolide) microspheres results in release of native protein, *J Control Release* 76 (3) (2001) 199-208.
- [2] C. Perez, I. J. Castellanos, H. R. Costantino, W. Al-Azzam, K. Griebenow, Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers, *J Pharm Pharmacol* 54 (3) (2002) 301-13.
- [3] T. W. King, C. W. Patrick, Jr., Development and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique, *J Biomed Mater Res* 51 (3) (2000) 383-90.
- [4] J. Wang, K. M. Chua, C. H. Wang, Stabilization and encapsulation of human immunoglobulin G into biodegradable microspheres, *J Colloid Interface Sci* 271 (1) (2004) 92-101.
- [5] I. J. Castellanos, G. Flores, K. Griebenow, Effect of cyclodextrins on alpha-chymotrypsin stability and loading in PLGA microspheres upon S/O/W encapsulation, *J Pharm Sci* 95 (4) (2006) 849-58.
- [6] T. Morita, Y. Sakamura, Y. Horikiri, T. Suzuki, H. Yoshino, Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant, *J Control Release* 69 (3) (2000) 435-44.
- [7] T. Morita, Y. Horikiri, H. Yamahara, T. Suzuki, H. Yoshino, Formation and isolation of spherical fine protein microparticles through lyophilization of protein-poly(ethylene glycol) aqueous mixture, *Pharm Res* 17 (11) (2000) 1367-73.

- [8] L. Brown, Methods for fabrication, uses and compositions of small spherical particles of insulin prepared by controlled phase separation, US Patent 20050233945, 2005.
- [9] F. Capuano, A. Vergara, L. Paduano, O. Annunziata, R. Sartorio, Electrostatic and excluded volume effects on the transport of electrolytes in Poly(ethylene glycol)-water "mixed solvents", *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 12363-12369.
- [10] A. Vergara, O. Annunziata, L. Paduano, D. G. Miller, J. G. Albright, R. Sartorio, Multicomponent diffusion in crowded solutions. 2. Mutual diffusion in the ternary system tetra(ethylene glycol)-NaCl-water, *J Phys Chem B* 108 (2003) 2764-2772.
- [11] A. Hatefi, B. Amsden, Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems, *Journal of Controlled Release* 80 (1-3) (2002) 9-28.
- [12] C. B. Packhaeuser, J. Schnieders, C. G. Oster, T. Kissel, In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview, *Eur J Pharm Biopharm* 58 (2) (2004) 445-55.
- [13] H. B. Ravivarapu, K. L. Moyer, R. L. Dunn, Sustained activity and release of leuprolide acetate from an in situ forming polymeric implant, *AAPS PharmSciTech* 1 (1) (2000)
- [14] A. Wade, P. J. Weller, Handbook of pharmaceutical excipients, The pharmaceutical press, London, 1994.
- [15] A. Wade, P. J. Weller, Glycofurol monograph, Handbook of pharmaceutical excipients, The pharmaceutical press, London, 1994, pp. 213-214.
- [16] L. Wang, L. Kleiner, S. Venkatraman, Structure formation in injectable poly(lactide-co-glycolide) depots, *Journal of Controlled Release* 90 (3) (2003) 345-354.

- [17] H. Kranz, R. Bodmeier, A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics* 332 (1-2) (2007) 107-114.
- [18] R. A. Jain, C. T. Rhodes, A. M. Railkar, A. W. Malick, N. H. Shah, Controlled delivery of drugs from a novel injectable in situ formed biodegradable PLGA microsphere system, *J Microencapsul* 17 (3) (2000) 343-62.
- [19] I. J. Castellanos, W. O. Cuadrado, K. Griebenow, Prevention of structural perturbations and aggregation upon encapsulation of bovine serum albumin into poly(lactide-co-glycolide) microspheres using the solid-in-oil-in water technique, *J Pharm Pharmacol* 53 (8) (2001) 1099-107.
- [20] A. Sanchez, B. Villamayor, Y. Guo, J. McIver, M. J. Alonso, Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *Int J Pharm* 185 (2) (1999) 255-66.
- [21] X. M. Lam, E. T. Duenas, A. L. Daugherty, N. Levin, J. L. Cleland, Sustained release of recombinant human insulin-like growth factor-I for treatment of diabetes, *J Control Release* 67 (2-3) (2000) 281-92.
- [22] F. Lagarce, E. Garcion, N. Faisant, O. Thomas, P. Kanaujia, P. Menei, J. P. Benoit, Development and characterization of interleukin-18-loaded biodegradable microspheres, *Int J Pharm* 314 (2) (2006) 179-88.
- [23] W. Al-Azzam, E. Pastrana, K. Griebenow, Co-lyophilization of bovine serum albumin (BSA) with poly(ethylene glycol) improves efficiency of BSA encapsulation and stability in polyester microspheres by a solid-in-oil-in-oil technique, *Biotechnol Letters* 24 (2002) 1367-1374.
- [24] A. Aubert-Pouessel, D. C. Bibby, M. C. Venier-Julienne, F. Hindre, J. P. Benoit, A novel in vitro delivery system for assessing the biological integrity of protein upon release from PLGA microspheres, *Pharm Res* 19 (7) (2002) 1046-51.

- [25] A. Aubert-Pouessel, M. C. Venier-Julienne, A. Clavreul, M. Sergent, C. Jollivet, C. N. Montero-Menei, E. Garcion, D. C. Bibby, P. Menei, J. P. Benoit, In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres, *J Control Release* 95 (3) (2004) 463-75.
- [26] D. Blanco, M. J. Alonso, Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants, *Eur J Pharm Biopharm* 45 (3) (1998) 285-94.
- [27] G. Crotts, T. G. Park, Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues, *J Microencapsul* 15 (6) (1998) 699-713.
- [28] G. Jiang, B. H. Woo, F. Kang, J. Singh, P. P. DeLuca, Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres, *J Control Release* 79 (1-3) (2002) 137-45.
- [29] T. G. Park, H. Yong Lee, Y. Sung Nam, A new preparation method for protein loaded poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres and protein release mechanism study, *J Control Release* 55 (2-3) (1998) 181-91.
- [30] C. Perez, P. De Jesus, K. Griebenow, Preservation of lysozyme structure and function upon encapsulation and release from poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres prepared by the water-in-oil-in-water method, *Int J Pharm* 248 (1-2) (2002) 193-206.
- [31] Y. S. Nam, S. H. Song, J. Y. Choi, T. G. Park, Lysozyme microencapsulation within biodegradable PLGA microspheres: urea effect on protein release and stability, *Biotechnol Bioeng* 70 (3) (2000) 270-7.
- [32] E. S. Lee, M. J. Kwon, H. Lee, K. Na, J. J. Kim, In vitro study of lysozyme in poly(lactide-co-glycolide) microspheres with sucrose acetate isobutyrate, *Eur J Pharm Sci* 29 (5) (2006) 435-441.

- [33] E. S. Lee, K. H. Park, D. Kang, I. S. Park, H. Y. Min, D. H. Lee, S. Kim, J. H. Kim, K. Na, Protein complexed with chondroitin sulfate in poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *Biomaterials* 28 (17) (2007) 2754-62.
- [34] H. R. Costantino, R. Langer, A. M. Klibanov, Moisture-induced aggregation of lyophilized insulin, *Pharm Res* 11 (1) (1994) 21-9.
- [35] X. M. Lam, E. T. Duenas, J. L. Cleland, Encapsulation and stabilization of nerve growth factor into poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres, *J Pharm Sci* 90 (9) (2001) 1356-65.
- [36] S. E. Zale, P. A. Burke, H. Bernstein, A. Brickner, Composition for sustained release of non-aggregated erythropoietin, U.S. Patent 5,716,644, 1997.
- [37] R. C. Lee, F. Despa, L. Guo, P. Betala, A. Kuo, P. Thiyagarajan, Surfactant copolymers prevent aggregation of heat denatured lysozyme, *Ann Biomed Eng* 34 (7) (2006) 1190-200.
- [38] C. Stureson, J. Carlfors, Incorporation of protein in PLG-microspheres with retention of bioactivity, *Journal of Controlled Release* 67 (2-3) (2000) 171-178.
- [39] E. S. Lee, M. J. Kwon, H. Lee, J. J. Kim, Stabilization of protein encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) microspheres by novel viscous S/W/O/W method, *Int J Pharm* 331 (1) (2007) 27-37.
- [40] G. Zhu, S. R. Mallery, S. P. Schwendeman, Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide- co-glycolide), *Nat Biotechnol* 18 (1) (2000) 52-7.
- [41] T. Kissel, Y. X. Li, C. Volland, S. Go?rich, R. Koneberg, Parenteral protein delivery systems using biodegradable polyesters of ABA block structure, containing hydrophobic poly(lactide-co-glycolide) A blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B blocks, *Journal of Controlled Release* 39 (2-3) (1996) 315-326.

- [42] M. Morlock, T. Kissel, Y. X. Li, H. Koll, G. Winter, Erythropoietin loaded microspheres prepared from biodegradable LPLG-PEO-LPLG triblock copolymers: protein stabilization and in-vitro release properties, *J Control Release* 56 (1-3) (1998) 105-15.
- [43] T. Kissel, Y. Li, F. Unger, ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (1) (2002) 99-134.
- [44] K. Y. Cho, S. H. Choi, C. Kim, Y. S. Nam, T. G. Park, J. Park, Protein release microparticles based on the blend of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) and oligo-ethylene glycol grafted poly(L-lactide), *J Control Release* 76 (2001) 275-284.
- [45] H. K. Kim, T. G. Park, Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(L-lactic acid) and amorphous poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: morphological effect on protein release, *J Control Release* 98 (1) (2004) 115-25.
- [46] T. Morita, Y. Horikiri, T. Suzuki, H. Yoshino, Applicability of various amphiphilic polymers to the modification of protein release kinetics from biodegradable reservoir-type microspheres, *Eur J Pharm Biopharm* 51 (1) (2001) 45-53.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les enjeux de l'administration prolongée de protéines à partir de microparticules biodégradables sont très importants, d'une part, pour améliorer le confort de patients recevant des traitements à base de protéines recombinantes et d'autre part, pour traiter des maladies pour lesquelles aucun médicament n'existe à ce jour.

Notre projet s'est intéressé à la stabilisation de protéines à la fois lors des étapes d'encapsulation et de libération à partir de ces systèmes. Dans une étude préliminaire, des protéines modèles et thérapeutiques ont été précipitées de façon réversible afin d'éviter leur dénaturation lors de l'étape d'encapsulation. Des particules submicroniques ont ainsi été formées par ajout d'un non solvant des protéines et d'un sel à une solution aqueuse de protéine. Après optimisation des rendements de précipitation, ces particules de protéines ont été microencapsulées par un procédé de simple émulsion (s/o/w). Aucune perte d'activité n'a été observée et ce, sans stabilisant. Ensuite, pour pallier au problème de ralentissement de la libération après le premier jour d'incubation des microsphères, l'interaction protéine-polymère a été modélisée et des composés capables de limiter l'adsorption du lysozyme sur le PLGA ont été sélectionnés, notamment le poloxamer 188. La précipitation du lysozyme avec du poloxamer 188 avant encapsulation a ainsi conduit à une libération continue de protéine active pendant trois semaines sans effet « burst » à partir de microsphères de PLGA et pendant plus de six semaines avec un copolymère tribloc de PLGA-PEG-PLGA.

Les perspectives de ce travail sont, tout d'abord, de caractériser l'interaction du poloxamer 188 avec le lysozyme pendant les étapes de précipitation, d'encapsulation et de libération. Dans le but d'optimiser le procédé et l'effet du poloxamer 188 sur le profil de libération, les quantités de poloxamer 188, le temps de contact, le type de poloxamer et la nature des protéines pourront être modifiés. La résonance plasmonique de surface (technologie Biacore) est une technique classiquement utilisée pour étudier les interactions de macromolécules notamment leur spécificité, les constantes d'affinité et les cinétiques d'association et de dissociation, elle pourrait être mise en œuvre dans le cadre de cette étude [1]. En complément, la spectrométrie Raman pourrait permettre d'identifier les modifications structurales de la protéine observées après précipitation avec le poloxamer 188, dans la limite où il n'y aura pas d'interférence avec le poloxamer 188 (en excès) et le glycofurol résiduel [2]. La diffusion dynamique de la lumière (DLS) pourrait être utilisée pour caractériser la protéine en solution en présence de poloxamer et en suspension dans le glycofurol [3, 4].

Dans un second temps, les causes de l'apparition d'un plateau après 45 jours de libération et de la dispersion des résultats avec le copolymère PLGA-PEG-PLGA devront être identifiées. Pour confirmer l'hypothèse d'une agrégation protéique due à la formation d'un microenvironnement acide, la formation d'agrégats covalents et/ou non covalents dans les microsphères au cours de la libération pourra être recherchée par un SDS-PAGE en conditions réductrices et non réductrices, respectivement, après extraction de la protéine résiduelle dans les microsphères [5]. Une étude de la dégradation des microsphères sera également intéressante pour mieux comprendre l'intérêt de ce copolymère tribloc par rapport au PLGA (observation des microsphères en microscopie électronique à balayage après différents temps d'incubation, mesure de la perte en poids, détermination du changement de masse molaire par chromatographie d'exclusion stérique, quantification de la perte de PEG par RMN...[6]). De même, il peut être envisagé d'évaluer la diminution de pH dans les microsphères au cours de la libération, elle a notamment été mise en évidence par microscopie confocale [7] et par résonance paramagnétique électronique (EPR) avec une sonde pH-sensible couplée à de l'albumine [8]. Ces informations permettront de rechercher un polymère plus adapté pour une libération complète. Néanmoins, pour une application à l'ingénierie tissulaire, certaines contraintes devront être respectées notamment la possibilité d'adsorber des molécules biomimétiques à la surface des microsphères et le maintien de la forme microsphère pendant une période suffisamment longue pour permettre la survie des cellules greffées. L'encapsulation et la libération de protéines d'intérêt pour l'ingénierie tissulaire, les facteurs de croissance, pourront alors être envisagées, notamment le NGF et le TGF- β 3.

Parallèlement, le développement d'un procédé de préparation de microparticules biodégradables par prilling, amorcé dans ce travail, permettra de s'affranchir de l'utilisation de solvant halogéné toxique.

Enfin, l'effet de ces systèmes devra rapidement être étudié *in vivo* puisque nous savons que, dans le domaine de la microencapsulation de protéines, la corrélation *vitro/vivo* n'est pas toujours évidente. L'implantation, chez la souris, de microsphères de PLGA contenant du TGF- β 3 et supportant des cellules souches mésenchymateuses est d'ailleurs envisagée pour étudier leur effet sur la régénération cartilagineuse dans le cadre d'un partenariat établi lors du programme européen Genostem.

Références

- [1] D. G. Myszka, Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors, *Current Opinion in Biotechnology* 8 (1) (1997) 50-57.
- [2] I. Chourpa, V. Ducel, J. Richard, P. Dubois, F. Boury, Conformational modifications of gliadin and globulin proteins upon complex coacervates formation with gum arabic as studied by Raman microspectroscopy, *Biomacromolecules* 7 (9) (2006) 2616-2623.
- [3] V. Ducel, P. Saulnier, J. Richard, F. Boury, Plant protein-polysaccharide interactions in solutions: Application of soft particle analysis and light scattering measurements, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41 (2-3) (2005) 95-102.
- [4] www.malverninstruments.fr.
- [5] B. H. Woo, G. Jiang, Y. W. Jo, P. P. DeLuca, Preparation and characterization of a composite PLGA and poly(acryloyl hydroxyethyl starch) microsphere system for protein delivery, *Pharm Res* 18 (11) (2001) 1600-6.
- [6] B. Bittner, C. Witt, K. Mader, T. Kissel, Degradation and protein release properties of microspheres prepared from biodegradable poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: influence of buffer media on polymer erosion and bovine serum albumin release, *J Control Release* 60 (1999) 297-309.
- [7] K. Fu, D. W. Pack, A. M. Klibanov, R. Langer, Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres, *Pharm Res* 17 (1) (2000) 100-6.
- [8] K. Mader, B. Bittner, Y. Li, W. Wohlauf, T. Kissel, Monitoring Microviscosity and Microacidity of the Albumin Microenvironment Inside Degrading Microparticles from Poly(lactide-co-glycolide) (PLG) or ABA-triblock Polymers Containing Hydrophobic Poly(lactide-co-glycolide) A Blocks and Hydrophilic Poly(ethyleneoxide) B Blocks, *Pharmaceutical Research* V15 (5) (1998) 787-793.

ANNEXE



Etude de criblage des facteurs influents sur la formulation de microsphères de PLGA de 60µm

1 Domaine expérimental

La matrice retenue pour l'étude de criblage est une matrice d'Hadamard (N=20), elle permet d'étudier l'effet de 19 facteurs à deux niveaux en 20 expériences. Le domaine expérimental défini par les facteurs et leurs niveaux respectifs est représenté dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Domaine expérimental.

Facteurs		Niveaux	
		-1	+1
1	Numéro de lot de PLGA	99007	04010
2	Quantité de PLGA (mg)	75	150
3	Acétone comme co-solvant du polymère	Non	Oui
4	Volume phase aqueuse (ml)	30	90
5	Concentration en PVA (% p/v)	0,4	4
6	Présence de dichlorométhane dans la phase aqueuse	Non	Oui
7	Présence de NaCl dans la phase aqueuse	Non	Oui
8	Température dans le réacteur (°C)	1	10
9	Vitesse agitation (tpm)	500	1000
10	Mode d'ajout de la phase organique dans la phase aqueuse	Lent	Rapide
11	Position de l'aiguille lors de l'ajout de la phase organique dans la phase aqueuse	Au dessus du PVA	Plongée dans le PVA
12	Temps d'émulsion (min)	1	5
13	Volume d'extraction (ml)	200	600
14	Temps extraction (min)	30	60
15	Mode d'agitation pendant l'extraction	Magnétique	Pale
16	Fractionnement de l'extraction	1 fois	2 fois
17	Mode de transfert de l'émulsion vers la phase d'extraction	Tuyau en surface	Tuyau plongé
18	Agitation de l'émulsion pendant le transfert	Non	Oui
19	Gradient de température pendant l'extraction	Non	Oui

2 Matrice d'expériences et réponses expérimentales

Les réponses expérimentales mesurées sont le diamètre moyen des particules (Y_1 , μm), le coefficient de variation (Y_2 , %), la proportion de déchets de polymère (Y_3 , %) dans la préparation. La présence de déchets a été quantifiée en pesant la masse de déchets récupérée sur la pale et en surface de la suspension aqueuse de microsphères avant filtration.

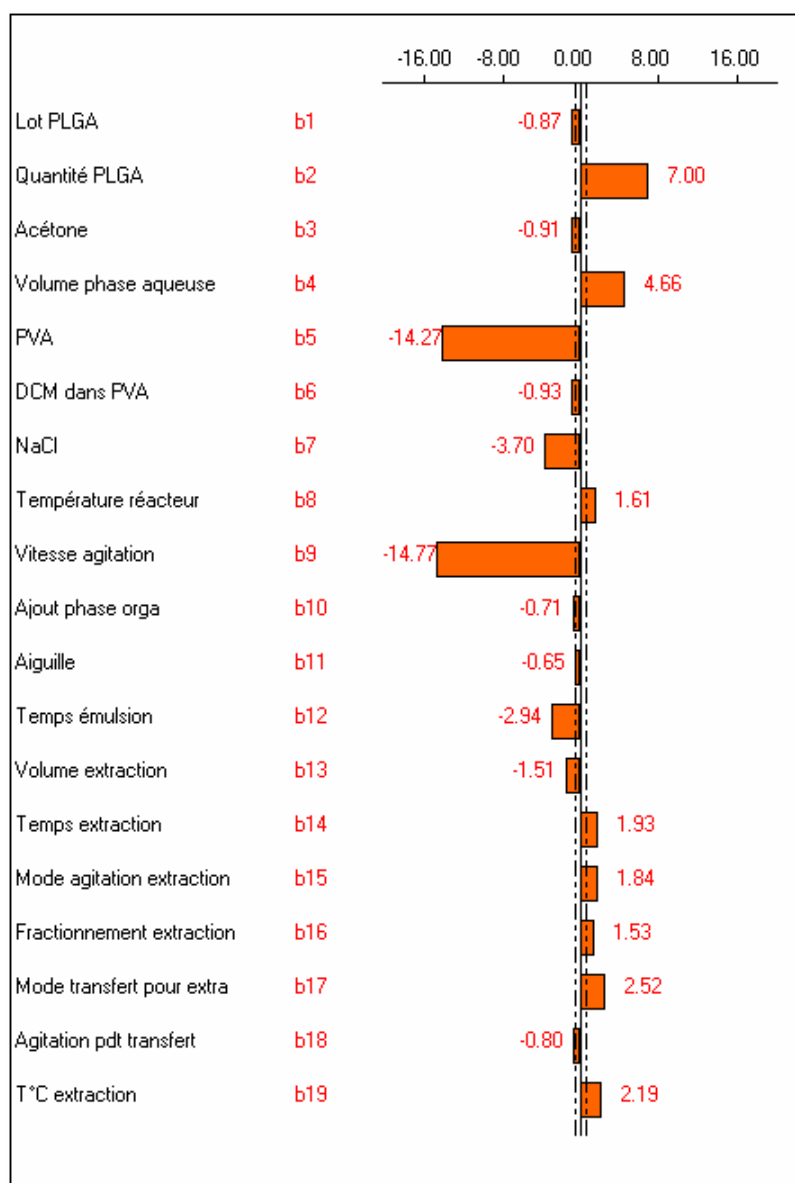
Tableau 2. Matrice d'expériences et réponses expérimentales mesurées.

N° Exp	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇	X ₁₈	X ₁₉	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1		34.14	6.80	0.20
2	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1		35.39	44.10	2.13
3	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1		33.28	43.80	0.00
4	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1		24.99	31.10	0.00
5	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1		12.36	41.70	0.00
																				10.28	61.50	0.00
																				10.03	40.60	0.00
6	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	55.67	29.60	0.26
7	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	32.03	35.40	0.00
8	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	11.66	42.50	0.00
9	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	24.24	30.20	0.40
																				24.44	39.00	0.67
10	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	88.11	27.80	0.13
																				86.79	24.60	0.33
11	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	33.63	57.50	0.53
																				33.27	43.70	0.93
12	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	54.69	30.50	0.20
13	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	34.15	37.70	0.27
14	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	83.20	39.70	0.53
15	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	37.02	41.90	0.00
16	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	90.36	29.80	0.00
17	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	27.31	42.50	0.00
18	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	1	48.75	36.20	0.00
19	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	11.73	88.20	0.00
20	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	60.31	36.80	3.47

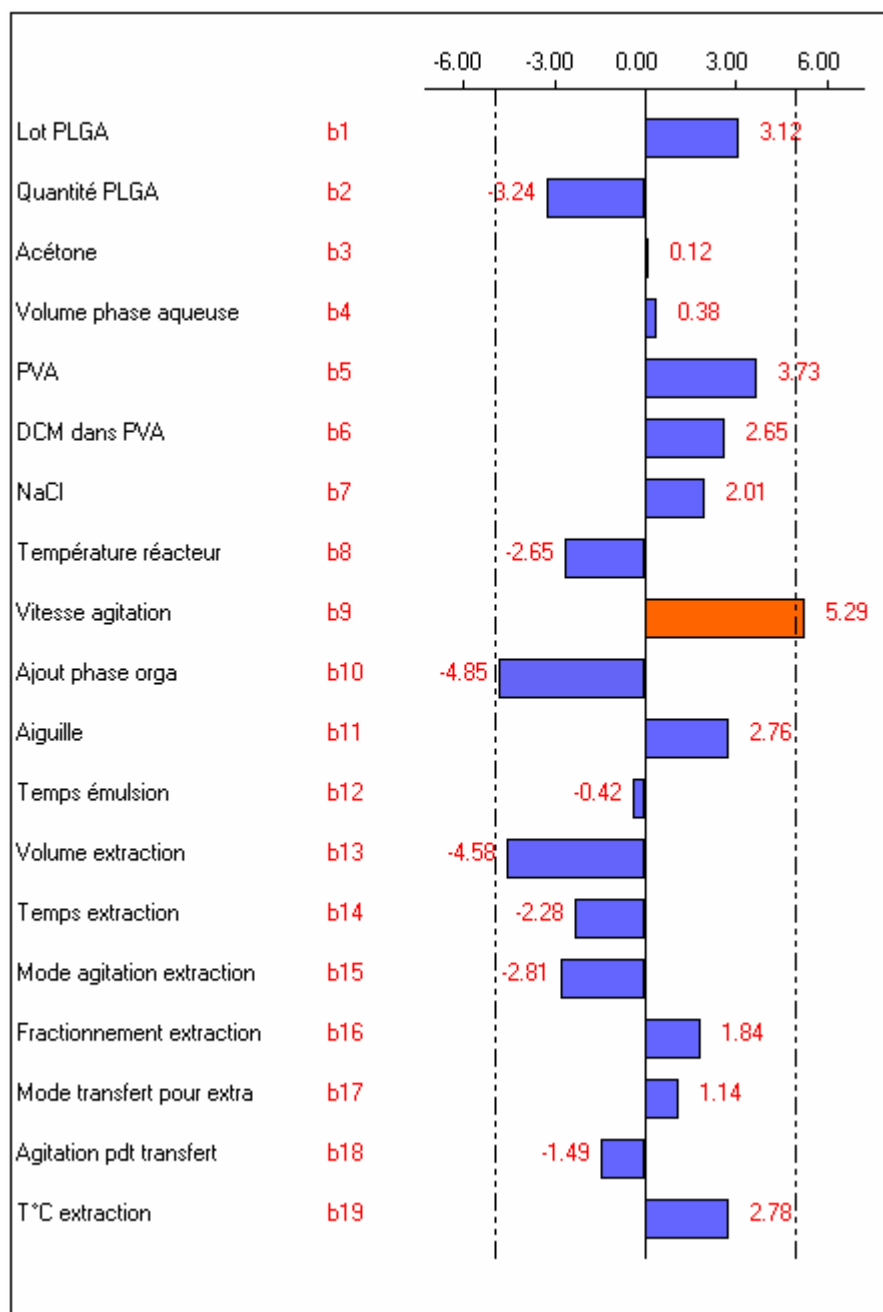
3 Etude graphique des effets des facteurs

Les effets des facteurs étudiés peuvent être représentés graphiquement. La longueur de chaque barre est proportionnelle à la valeur absolue de l'effet « b » de chaque facteur. Une barre à droite de l'axe central indique un effet positif du facteur sur la réponse et inversement. Les pointillés représentent les limites de signification de l'effet des facteurs, au-delà de cette limite l'effet est considéré comme influent sur la réponse considérée. (NEMROD[®]W, 2000, LPRAI, Marseille)

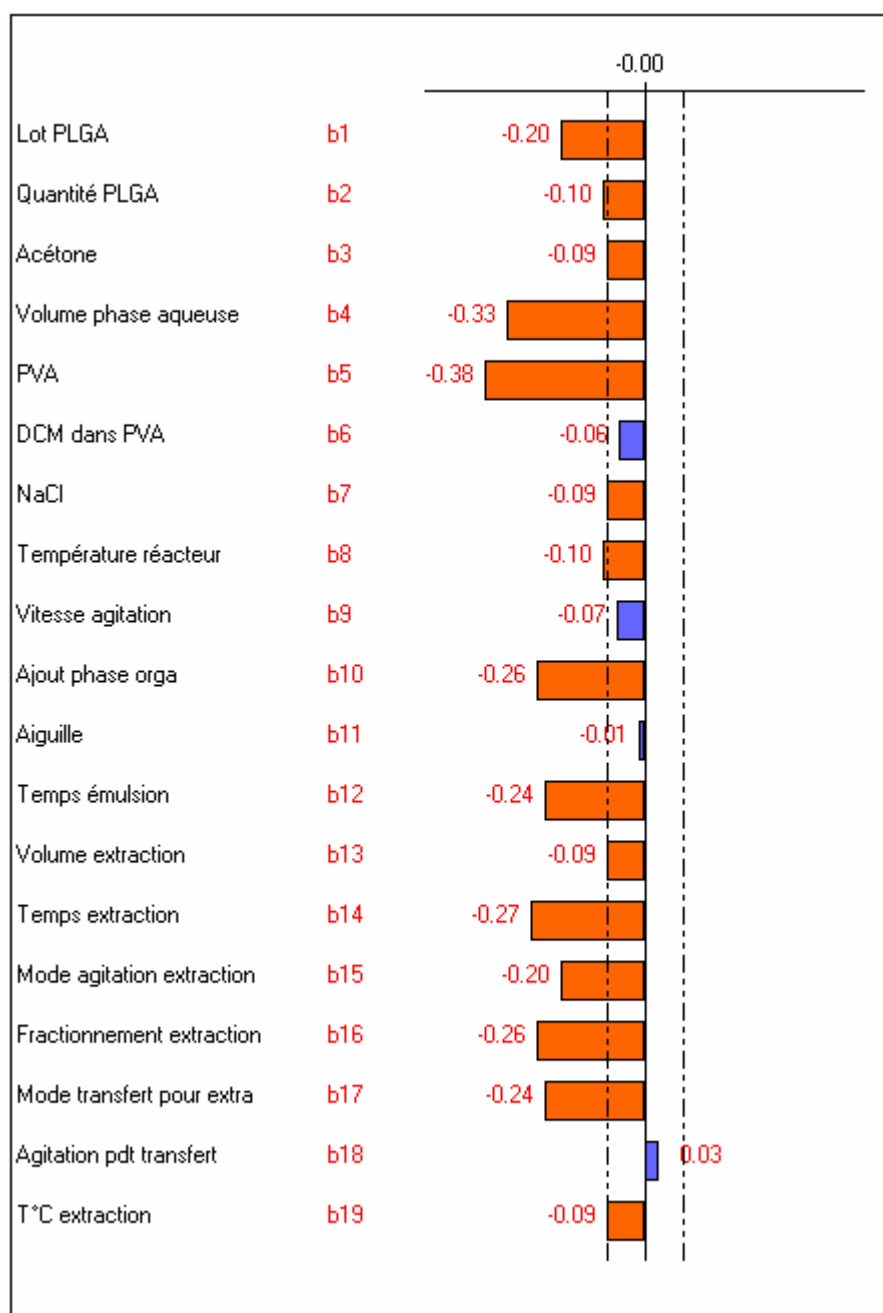
3.1 Etude graphique des effets sur le diamètre moyen des microsphères



3.2 Etude graphique des effets sur la distribution de taille (Coefficient de Variation)



3.3 Etude graphique des effets sur la présence de déchets



Résumé

L'administration de protéines de façon locale et prolongée à partir de microsphères biodégradables de PLGA présente un réel intérêt thérapeutique (diminution du nombre d'injections, potentialisation de l'activité, diminution des effets secondaires), plus particulièrement, dans le domaine de l'ingénierie tissulaire pour l'apport de facteurs de croissance. Cependant, la faible stabilité des protéines dans ces systèmes limite leur développement. Dans ce travail, des stratégies ont été mises en place pour préserver l'intégrité de protéines à la fois lors des étapes d'encapsulation et de libération. Dans une étude préliminaire, des protéines modèles et thérapeutiques ont été précipitées afin d'éviter leur dénaturation pendant leur future encapsulation. Des particules submicroniques ont ainsi été formées par ajout d'un non solvant et d'un sel à une solution aqueuse de protéine. Après optimisation des rendements de précipitation, ces particules de protéines ont été microencapsulées par un procédé de simple émulsion (s/o/w). Aucune perte d'activité n'a été observée et ce, sans stabilisant. Ensuite, pour pallier au ralentissement de la libération après le premier jour d'incubation des microsphères, l'interaction protéine-polymère a été modélisée et des composés capables de limiter l'adsorption du lysozyme sur le PLGA ont été sélectionnés, notamment le poloxamer 188. La précipitation du lysozyme avec du poloxamer 188 avant encapsulation a ainsi conduit à une libération continue de protéine active pendant trois semaines sans effet burst à partir de microsphères de PLGA et pendant plus de six semaines avec un copolymère tribloc de PLGA-PEG-PLGA.

Abstract

Local and sustained protein delivery from biodegradable PLGA microspheres present a real interest for therapeutic purposes (decrease of the number of injections, potentialization of the activity, reduction of the side effects), especially in the field of tissue engineering to convey growth factors. However, the poor stability of proteins in these devices limits their development. In this work, strategies were designed to preserve protein integrity both during encapsulation and release steps. In a preliminary study, model and therapeutic proteins were reversibly precipitated to avoid their denaturation during their subsequent encapsulation. Nanosized particles were formed by adding a protein non-solvent and a salt to an aqueous solution of protein. After an optimization of the precipitation yields, these protein particles were microencapsulated by a solid-in-oil-in-water encapsulation process (s/o/w). No activity loss was observed even without adding stabilizer. Then, to circumvent the protein slow release after the first day of microsphere incubation, protein-polymer interaction was studied in a two-dimensional model and compound able to totally block lysozyme adsorption onto a PLGA surface were selected, among them poloxamer 188. Lysozyme precipitation with poloxamer 188 prior to encapsulation thus led to a continuous protein release over three weeks without burst effect and for up to five weeks with a tribloc PLGA-PEG-PLGA copolymer.

Mots-Clés

Précipitation de protéine; stabilité protéique ; microsphères; poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA); libération prolongée