



Doctoral Thesis

DNA-loaded microparticles - interaction with dendritic cells and immunomodulatory effects

Author(s):

Jilek, Samantha

Publication Date:

2004

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004725090> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 15467

**DNA-loaded microparticles – interaction with dendritic
cells and immunomodulatory effects**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich (ETH)

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Samantha Jilek

Biologist, Université de Genève

Born April 2nd, 1975

Citizen of Geneva, GE

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H. P. Merkle, examiner

PD Dr. E. Walter, co-examiner

PD Dr. B. Corthésy, co-examiner

2004

ABSTRACT

Biodegradable poly(lactide) and poly(lactide-*co*-glycolide) (PLA/PLGA) microparticles have been widely investigated as vaccine delivery systems for protein or peptide antigens. Furthermore, administration of naked DNA showed promising results for vaccination using various animals models from mice to non-human primates. In order to combine these two promising approaches, this thesis focuses on the delivery of DNA by the means of biodegradable PLA/PLGA microparticles. Due to their important role in immunomodulation, dendritic cells (DC) were chosen as targets, and transfection and stimulation by DNA-loaded microparticles was investigated. Moreover, immunomodulation upon administration of DNA-containing microparticles was examined in a bee venom allergy mouse model.

In Chapter I, the role of DC in microparticle-mediated immune response and the advantages of associating DNA to microparticles in order to increase the potency of DNA vaccination *in vivo* are discussed. To begin with, different methods for the preparation of DNA-loaded microparticle with PLA/PLGA polymers are presented. Further, the effects of DNA-loaded microparticles on DC *in vitro* are extensively examined including transfection and stimulation of DC, a key feature of the immune response. Finally, *in vivo* tracking of DNA-loaded microparticles and induction of immune responses upon DNA-loaded microparticle administration in different animal models and with various routes of administration are reviewed.

Chapter II deals with the encapsulation of DNA in PLGA microparticles and the transfection efficiency of DNA-loaded microparticles. DNA was encapsulated in PLGA microparticles by spray-drying, and various additives were tested and process parameters adjusted in order to prevent degradation of the DNA during encapsulation. The highest degree of supercoiled DNA was maintained by adding a strong buffering agent, such as PBS or NaHCO₃.

Transfection efficacy of the DNA-loaded microparticles in a mouse DC line was compared with commonly employed cationic transfectants and was visually assessed by green fluorescent protein expression. Transfection rate was very low in DC for all microparticle formulations and was comparable with commonly used cationic transfectants. Transfection of DC using PLGA microparticles is feasible, but efforts need to be undertaken to improve transfection efficiency *in vitro*, which may in addition lead to improved immune responses *in vivo*.

Activation of DC *in vivo* is important for a strong immune response. Therefore the capacity of different PLA and PLGA microparticle formulations to induce maturation of human blood monocyte-derived DC was investigated in Chapter III. Plain microparticles were compared with microparticles loaded with plasmid DNA or double stranded salmon DNA either by encapsulation or adsorption to the surface of cationic microparticles. Stimulation of DC was determined by the up-regulation of surface maturation markers CD83 and CD86, and the secretion of IL-12 and TNF- α . Slowly degrading PLA microparticles did not induce any detectable stimulation or activation of DC. In contrast, fast degrading PLGA microparticles were able to influence DC maturation and cytokine secretion dependent on their surface charge. Anionic PLGA microparticles induced an up-regulation of CD83 and high TNF- α secretion, which was further enhanced up to the level of the potent stimulator lipopolysaccharide when plasmid DNA was encapsulated. Moreover, the secretion of significant amounts of IL-12 was observed. Cationic PLGA microparticles induced an up-regulation of CD86 and moderate TNF- α secretion, but no IL-12 secretion, with no additional effects in the presence of plasmid DNA. We conclude that the composition and charge of biodegradable DNA-loaded microparticles profoundly influences maturation and cytokine secretion in DC.

ABSTRACT

Finally, in Chapter IV, in order to determine whether microparticles can potentiate DNA vaccination against allergy and evaluate the immunomodulatory properties of microparticles alone, mice were treated prophylactically with DNA-loaded or plain PLGA microparticles prior to sensitization with phospholipase A2 (PLA2), the major allergen of bee venom. Seric PLA2-specific IgG1 and IgG2a production was dependent on the surface charge of microparticles, but was not influenced by the presence of DNA. In contrast, block in IgE production and T cell hyporesponsiveness were observed with all microparticles formulations. Recall challenge with PLA2 triggered combined expression of both IL-4 and IFN- γ , together with sustained expression of IL-10 that can explain the protective effect against anaphylaxis. Our data suggest a dual mechanism that does initially rely on immune deviation and then on IL-10-mediated suppression. This is the first physiological demonstration that plain PLGA microparticles can induce tolerance in mice for up to 6 months post-sensitization.

RESUME

Le potentiel des microparticules biodégradables en copolymères d'acides lactique et glycolique (PLA et PLGA) comme véhicules pour des protéines ou des peptides a déjà été largement étudié. De plus, l'administration d'ADN nu dans différents modèles animaux de la souris aux primates montre des résultats prometteurs dans le domaine de la vaccination. Dans le but de combiner ces deux approches, cette thèse se focalise sur l'administration d'ADN par le biais de microparticules biodégradables en PLA ou PLGA. Tenant compte du rôle important des cellules dendritiques (DC) dans l'immunomodulation, nous avons choisi d'étudier leur transfection et leur activation par des microparticules contenant de l'ADN. De plus, le potentiel immunomodulateur de ces mêmes microparticules a été examiné dans un modèle murin d'allergie au venin d'abeille.

Dans le chapitre I, le rôle des DC dans la réponse immune suivant l'administration de microparticules et l'avantage d'associer de l'ADN aux microparticules pour augmenter la potentialité de l'ADN *in vivo* sont discutés. Pour commencer, différentes méthodes de préparation des microparticules de PLA ou PLGA contenant de l'ADN sont présentées. Ensuite, les effets de ces microparticules sur les DC, comme la transfection et l'activation de ces cellules, une phase clé de l'induction de la réponse immune, sont discutés de manière approfondie. Finalement, l'analyse *in vivo* du destin de l'ADN après son relargage des microparticules, ainsi que l'induction de réponses immunes après administration de microparticules contenant de l'ADN, dans différents modèles animaux et avec différentes routes d'administration, sont passées en revue.

Le chapitre II traite de l'encapsulation de l'ADN dans des microparticules de PLGA et de leur efficacité à transférer des DC. L'ADN fut encapsulé dans des microparticules de PLGA par nébulisation. Différents stabilisateurs furent testés et les paramètres de préparation ajustés pour prévenir la dégradation de l'ADN

pendant l'encapsulation. L'intégrité de l'ADN super-enroulé a été maintenue par l'addition d'un agent tampon comme le PBS ou le NaHCO₃. Utilisant une lignée cellulaire de DC de souris, nous avons comparé la transfection obtenue avec des microparticules contenant de l'ADN avec celle observée avec des agents de transfection cationiques communément utilisés. La transfection a été mise en évidence par la présence de la protéine fluorescente verte dans les DC visualisée à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les taux de transfection étaient très bas dans les DC pour tous les types de microparticules et comparables à ceux obtenus avec les agents de transfection cationiques. La transfection des DC par les microparticules de PLGA est possible, mais des efforts doivent encore être fournis pour augmenter la transfection *in vitro*, car cela pourrait mener à une meilleure réponse immunitaire *in vivo*.

L'activation des DC *in vivo* est une étape importante pour l'induction de la réponse immune. C'est pourquoi, dans le chapitre III, nous avons analysé la capacité des différentes préparations de microparticules de PLA ou PLGA à activer des DC dérivées de monocytes sanguins humains. Des microparticules vides ont été comparées à des microparticules contenant un plasmide ADN ou un ADN double brin provenant du saumon. L'ADN a été associé aux microparticules de deux manières: soit par encapsulation dans les microparticules anioniques soit par adsorption sur la surface de microparticules cationiques. La maturation des DC a été analysée à l'aide des marqueurs de surface CD83 et CD86, ainsi que par la production d'IL-12 et de TNF- α . Les microparticules de PLA, qui se dégradent lentement, n'induisent pas la maturation des DC. Au contraire, les microparticules de PLGA, qui se dégradent rapidement, sont capables d'influencer la maturation des DC et la production de cytokines selon leur charge de surface. Les microparticules de PLGA anioniques induisent l'augmentation de CD83 ainsi qu'une forte production de TNF- α . Les microparticules contenant le plasmide ADN

induisent une réponse proche de celle obtenue avec des lipopolysaccharides. De plus, pour toutes les microparticules anioniques, la production d'une quantité significative d'IL-12 a été observée. Les microparticules de PLGA cationiques induisent l'augmentation de CD86 et une sécrétion modérée de TNF- α , mais pas celle d'IL-12. Dans ce cas, la présence du plasmide ADN n'a aucune influence sur l'augmentation des marqueurs de surface et la production de cytokines. En conclusion, la composition ainsi que la charge de surface des microparticules contenant de l'ADN influence de manière importante la maturation des DC et la production de cytokine.

Enfin, dans le chapitre IV, pour déterminer si les microparticules peuvent augmenter l'effet de la vaccination ADN dans l'allergie et pour évaluer l'effet immunomodulateur des microparticules vides, des microparticules de PLGA contenant de l'ADN ou des microparticules vides ont été administrées à des souris. Ensuite, les souris ont été sensibilisées avec la phospholipase A2 (PLA2), l'allergène majeur du venin d'abeille. La production d'anticorps sériques de type IgG1 et IgG2a spécifiques à la PLA2 était dépendante de la charge de surface des microparticules, mais n'était pas influencée par la présence du plasmide ADN. En revanche, toutes les préparations de microparticules induisent une réduction dans la production d'IgE ainsi qu'une réponse des cellules T réduite. Un challenge avec la PLA2 induit une expression combinée de IL-4 et de IFN- γ avec une expression constante d'IL-10 pouvant ainsi expliquer l'effet protecteur contre l'anaphylaxie. Ces résultats suggèrent un double mécanisme qui repose d'abord sur un premier renversement de la réponse immune Th2 vers Th1 et ensuite sur une suppression de la réponse T par l'IL-10. Ceci est la première démonstration physiologique que des microparticules de PLGA exemptes d'ADN peuvent induire une tolérance chez la souris allant jusqu'à six mois après la sensibilisation.