



Doctoral Thesis

Biointeractive materials with integrated VEGF activity for controlled induction of blood vessel growth

Author(s):

Ehrbar, Martin

Publication Date:

2004

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004860941> →

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 Nr. 15584

**Biointeractive materials with integrated VEGF activity for
controlled induction of blood vessel growth**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
MARTIN EHRBAR
Dipl. Natw. ETH Zürich
born on November 14, 1966
citizen of Urnäsch AR

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. J.A. Hubbell, examiner
Dr. A.H. Zisch, co-examiner
Dr. V.G. Djonov, co-examiner
Prof. Dr. M. Fussenegger, co-examiner

Zürich 2004

Summary

Design of materials that induce new vessel growth (angiogenesis) *in vivo* is important for many areas of tissue regeneration and wound healing. Preclinical and clinical investigations have indicated that therapeutic administration of angiogenic growth factors, such as the prototypic vascular endothelial growth factor (VEGF) can improve regional blood supply. For new and lasting tissue vascularization, prolonged tissue exposure to these factors appears critical. Furthermore, as shown for VEGF, dosage must be tightly controlled, as excess amounts of VEGF can cause severe vascular leakage and hypotension.

The objective of my research was to develop biomaterial-based growth factor depots that allow continuous and controlled low level release of VEGF by local cellular proteolytic activity rather than through passive diffusion. Towards this aim, we have developed two classes of injectable wound healing matrices as delivery devices for VEGF: (1) the natural biopolymer fibrin, (2) completely synthetic material based on poly (ethylene glycol) (PEG) and bioactive peptides. A hallmark of our material schemes is the covalent coupling of mutant VEGF proteins to the matrix network. This provides retention of the growth factor within the matrix until its liberation by proteases that cleave either the matrix or the coupling domain in the sequence of the factor itself.

For application in the fibrin scheme, we have generated a mutant variant in *E.coli.*, $\alpha_2\text{PI}_{1-8}$ -VEGF₁₂₁ which couples to fibrin. We employed the chicken chorioallantoic assay (CAM) and the mouse Teflon chamber implant model to compare the angiogenic potencies of fibrin-coupled $\alpha_2\text{PI}_{1-8}$ -VEGF₁₂₁, and freely diffusible VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅ mixed to fibrin. VEGF-fibrin grafts, directly placed in contact with tissue, evoked extensive blood vessel formation. Consistent with its covalent attachment mode, blood vessel formation induced by $\alpha_2\text{PI}_{1-8}$ -VEGF₁₂₁ was strongly localized to the site of graft membrane contact. Morphological analysis of induced blood vessels showed the formation of normal, healthy structures in response to $\alpha_2\text{PI}_{1-8}$ -VEGF₁₂₁-fibrin. In contrast, delivery of freely diffusing VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅ resulted in abnormous tortuous vessel restoration. Thus, administration of covalently modified VEGF-fibrin may provide a therapeutically safe treatment to mediate VEGF function for neovascularization and tissue restoration.

Similar results could be obtained by employing VEGF in a new class of synthetic PEG-peptide hydrogel matrices that we engineered with key functionalities of collagen. By way of Michael-type reaction, VEGF was covalently coupled to the synthetic matrix. Our *in vitro* experiments demonstrated, that the biological activity of the VEGF liberated from matrix was fully preserved. VEGF was found critical for endothelial cell survival and migration within the matrix. When grafted atop developing CAM; strong new blood vessel growth was evoked precisely at the area of graft-CAM contact. In rat subcutaneous implantation experiments, VEGF-containing synthetics were completely remodeled into native tissue.

Towards prosthetic graft endothelialization, we studied the kinetics of proteolysis-mediated VEGF release from fibrin and their biological performance in mediating growth of new endothelium. We developed formulations in which the release of VEGF differed in its susceptibility to local cellular proteolytic activity. We studied three recombinant variants of VEGF₁₂₁ in fibrin, namely native VEGF₁₂₁, and two variants $\alpha_2\text{PI}_{1-8}$ -VEGF₁₂₁ and $\alpha_2\text{PI}_{1-8}$ -Pla-VEGF₁₂₁ which possess a fibrin-coupling domain. Our experimental data of *in vitro* VEGF release kinetics fitted the mathematical models of diffusive as well as cell-demanded release that we based on the diffusion coefficient of free VEGF₁₂₁, the degradation rate constants of plasmin acting on fibrin or the plasmin-sensitive site in $\alpha_2\text{PI}_{1-8}$ -Pla-VEGF₁₂₁. The importance

of covalent affixation to protect VEGF from washout from fibrin under flow was demonstrated in HUVEC growth assay. Further, we show that VEGF-fibrin substrates induce maturation of CD133-selected human endothelial progenitor cells.

Collectively, our morphological and permeability assays of newly formed vessels in chick and mice indicate that cellular proteolytic activity as temporospatial trigger is compatible with natural cellular control of VEGF/VEGF receptor signaling. From our analyses, it became apparent that the high overall dose of VEGF translated into a low local dose at any point in time when the variant $\alpha_2\text{PI}_{1-8}$ -VEGF₁₂₁ was coupled to fibrin and released on cellular demand. We think that administration of covalently affixed VEGF in biointeractive matrix delivery devices could provide a therapeutically efficient and safe practicality to mediate VEGF function for induction of local and controlled angiogenesis.

Zusammenfassung

Die Herstellung von Materialien, welche das Wachstum von neuen Gefäßen (Angiogenese) induzieren, ist für viele Gebiete der Geweberegeneration und Wundheilung wichtig. Präklinische und klinische Untersuchungen deuten darauf hin, dass der therapeutische Einsatz von angiogenen Wachstumsfaktoren, wie dem prototypischen „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), die regionale Blutversorgung verbessern. Für eine neue und stabile Gewebevaskularisierung dürfte eine anhaltende Versorgung des Gewebes mit diesen Faktoren entscheidend sein. Im Weiteren muss, wie für VEGF gezeigt wurde, die Dosierung streng kontrolliert werden, da überschüssige Mengen an VEGF zu schwerwiegender Gefäßdurchlässigkeit und tiefem Blutdruck führen können.

Das Ziel meiner Forschung war es, auf Biomaterialien basierende Wachstumsfaktor-Depots zu entwickeln, die anstelle von passiver Diffusion eine durch proteolytische Aktivität gesteuerte, kontinuierliche und kontrollierte Freisetzung von kleinen VEGF Mengen zulassen. Zu diesem Zweck haben wir zwei Klassen von injizierbaren Wundheilungsmaterialien als Freisetzungswerkzeuge für VEGF eingesetzt: (1) natürliches biopolymeres Fibrin, (2) vollständig synthetisches, auf Poly (ethylene glycol) (PEG) und bioaktiven Peptiden, basierendes Material. Ein Merkmal unserer Materialien ist der kovalente Einbau der mutanten VEGF Proteine ins Matrix-Netzwerk. Auf diese Weise wird der Wachstumsfaktor in der Matrix zurückgehalten, bis er durch Proteasen, die entweder die Matrix oder die Koppelungsdomäne in der Sequenz des Faktors schneiden, freigesetzt wird.

Für den Einsatz in Fibrin haben wir in *E.coli* die mutierte VEGF-Variante $\alpha_2\text{PI}_{1-8}\text{-VEGF}_{121}$ generiert, die an Fibrin bindet. Das angiogene Potential von Fibrin gebundenem $\alpha_2\text{PI}_{1-8}\text{-VEGF}_{121}$ und frei diffundierbarem, zu Fibrin gemischtem VEGF_{121} oder VEGF_{165} , haben wir auf der Hühner-Chorioallantois-Membran (CAM) und mit Maus Teflonkammer Implantaten untersucht. VEGF-Fibrin Transplantate, die in direktem Kontakt mit Gewebe standen, lösten eine deutliche Blutgefäßbildung aus. Konsistent mit dem kovalenten Bindungsmodus des Wachstumsfaktors blieb die durch $\alpha_2\text{PI}_{1-8}\text{-VEGF}_{121}$ induzierte Blutgefäßbildung streng auf die Kontaktstelle zwischen Transplantat und Membran beschränkt. Die morphologische Untersuchung der durch $\alpha_2\text{PI}_{1-8}\text{-VEGF}_{121}$ induzierten Blutgefäße zeigte normal gebildete, gesunde Strukturen. Im Gegensatz dazu resultierte die Verabreichung von VEGF_{121} oder VEGF_{165} in der Herstellung von abnormalen, gewundenen Gefäßen. Kovalent modifiziertes VEGF-fibrin könnte deshalb eine therapeutisch sichere Behandlungsmethode zur Bildung von neuen Gefäßen oder der Geweberegeneration mittels VEGF darstellen.

Ähnliche Resultate konnten auch durch den Einsatz von VEGF in einer neuen Klasse von synthetischen PEG-Peptid Hydrogel Matrizen, die mit zentralen Funktionen von Collagen ausgestaltet sind, erzielt werden. Mittels einer Michael-type Reaktion wurde VEGF kovalent an die synthetische Matrix gekoppelt. Unsere *in vitro* Experimente zeigten, dass die biologische Aktivität von aus der Matrix freigesetztem VEGF vollumfänglich erhalten blieb. Im Weiteren war VEGF kritisch für das Überleben und die Migration von Endothelzellen in der Matrix. Auf der sich entwickelnden CAM löste das Transplantat ein starkes Wachstum neuer Gefäße präzise an der behandelten Stelle aus. VEGF enthaltende Synthetische Matrizen, als subcutane Implantate in der Ratte eingesetzt, wurden vollständig in natives Gewebe umgewandelt.

Zur Endothelialisierung von prothetischen Transplantaten haben wir den zeitlichen Verlauf der proteolysevermittelten VEGF-Freisetzung aus Fibrin bestimmt und dessen biologische Relevanz in der Vermittlung von Endothelwachstum untersucht. Wir haben Formulierungen

entwickelt, welche auf lokale proteolytische Aktivität verschieden empfindlich reagieren und dabei VEGF freisetzen. Wir haben drei rekombinate VEGF₁₂₁ Varianten in Fibrin studiert: natives VEGF₁₂₁, sowie zwei Varianten, α_2 PI₁₋₈-VEGF₁₂₁ and α_2 PI₁₋₈-Pla-VEGF₁₂₁, welche eine Fibrinkoppelungsdomäne aufweisen. Die *in vitro* bestimmten Freisetzungskinetiken von VEGF stimmten gut mit unseren mathematischen Modellrechnungen überein. Das verwendete Modell basierte auf der Diffusionskonstanten von freiem VEGF₁₂₁ wie auch auf der Konstanten für den plasminvermittelten Abbau von Fibrin oder der plasmin-sensitiven Stelle in α_2 PI₁₋₈-VEGF₁₂₁. Die Bedeutung der kovalenten Bindung von VEGF zum Schutz vor diffusionsbedingter Auswaschung aus Fibrin wurde in HUVEC Kulturen gezeigt. Im Weiteren zeigten wir, dass VEGF-Fibrin Substrate die Reifung von CD133 selektionierten Endothelialen Vorläuferzellen induzieren.

Gesamthaft deuten unsere an neu gebildeten Gefäßen von Hühnchen und Maus durchgeführten Morphologie- und Permeabilitätsstudien darauf hin, dass die zeitlich und örtlich regulierte zelluläre proteolytische Aktivität mit der natürlichen zellulären Kontrolle der VEGF/VEGF Rezeptor Signalübertragung kompatibel ist. Aus unseren Analysen wurde ersichtlich, dass unter Verwendung von fibrin gebundenem α_2 PI₁₋₈-VEGF₁₂₁, das der zellulären Aktivität entsprechend freigesetzt wird, eine hohe VEGF Gesamtkonzentration während der ganzen Zeit in eine geringe, lokale Konzentration umgewandelt wurde. Wir denken, dass die Verabreichung von in biointeraktiven Freisetzungsmatrizen kovalent gebundenem VEGF eine therapeutisch effiziente und sichere Art ist, VEGF zur Induktion von lokaler und kontrollierter Angiogenese einzusetzen.