



## Doctoral Thesis

# **Towards receptor-specific targeting of antigen presenting cells with functionalized stealth microparticles**

**Author(s):**

Wattendorf, Uta

**Publication Date:**

2008

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005582085> →

**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. 17540

**TOWARDS RECEPTOR-SPECIFIC TARGETING  
OF ANTIGEN PRESENTING CELLS WITH  
FUNCTIONALIZED STEALTH MICROPARTICLES**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

UTA WATTENDORF

Diplom - Chemikerin, University of Heidelberg

born September 1<sup>st</sup>, 1977

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Hans P. Merkle, examiner  
Prof. Dr. Marcus Textor, co-examiner  
Prof. Dr. Janos Vörös, co-examiner

2008

## SUMMARY

Microparticles, such as microspheres or microcapsules, are of considerable interest in drug delivery, vaccination and as diagnostic agents. A special focus in the field of vaccination are targeted microparticles. Specifically, the targeting of C-type lectins (CLRs) on antigen presenting cells (APCs) was identified as a promising strategy for immunomodulation. Therefore, the objective of this dissertation was the development of a microparticulate platform that allowed the receptor specific targeting of CLRs on APCs. To achieve this aim, two requirements had to be met: (i) the microparticles had to be shielded from opsonization, phagocytic clearance, and engagement of cell surface receptors other than those to be targeted; and (ii) specific ligands had to be immobilized on the surface of the microparticles, leading to specific recognition by the targeted CLRs, and without compromising the particles' stealth character.

It has been hypothesized that the specific targeting of cell receptors could be accomplished by microparticulate carriers that bear suitable ligands coupled to the free ends of a poly(ethylene glycol) (PEG) corona. As an introduction to this PhD thesis, **Chapter I** reviews the unique properties of PEG, which make it the polymer of choice to render surfaces resistant to both adsorption of proteins and cellular recognition. Furthermore, different strategies for the preparation of PEGylated microparticles are presented. Both the incorporation of PEG during microparticle formation and the immobilization of PEG onto preformed microparticles are discussed. Finally, miscellaneous applications of PEGylated microparticles are reviewed, focusing on applications in the field of drug delivery. In particular, a section of this chapter is dedicated to the targeting of PEGylated stealth microparticles, such as through the surface immobilization of suitable ligands.

For the immobilization of a PEG corona on microparticles we chose PEG grafted poly(L-lysine) (PLL-g-PEG) copolymers. Due to the positive charge of the PLL backbone at physiological pH, it spontaneously adsorbs from aqueous solution onto negatively charged substrates through electrostatic interactions. The impact of PLL-g-PEG architecture on the recognition of coated microspheres by APC was explored in **Chapter II**. A small library of PLL-g-PEG copolymers was coated onto model microspheres (5  $\mu\text{m}$  carboxylated

polystyrene) to investigate resistance to phagocytosis depending on both grafting ratio ( $g = 2$  to 20) and molecular weight (1 to 5 kDa) of the PEG chains. Phagocytosis by human monocyte derived dendritic cells (DC) and macrophages ( $M\Phi$ ) was quantified by phase contrast microscopy and by analysis of the cells' side scattering in a flow cytometer. Supporting experiments included the determination of the particles'  $\zeta$ -potentials, their repellence to protein adsorption, and cell adhesion experiments on PLL-*g*-PEG coated glass slides. In addition, the efficient internalization of control microspheres, in contrast to adsorption to the outer cell membrane, was confirmed by confocal microscopy. Generally, increasing grafting ratios impaired the protein repellence of coated microspheres, leading to higher phagocytosis rates. For DC, long PEG chains of 5 kDa decreased the phagocytosis of coated microspheres even in the case of considerable IgG adsorption. In addition, preferential adsorption of dysopsonins is discussed as another potential factor for decreased phagocytosis rates. Remarkably, DC and  $M\Phi$  were found to adhere to relatively protein-repellent PLL-*g*-PEG adlayers, whereas phagocytosis of microspheres coated with the same copolymers was inefficient. Overall, the copolymer with 2 kDa PEG chains, a 20 kDa PLL backbone and a grafting ratio of 3.5, PLL(20)-[3.5]-PEG(2), was identified as the copolymer of optimal architecture to ensure resistance to both phagocytosis and cell adhesion. Therefore, this polymer was subsequently used throughout this PhD thesis. Finally, this chapter also shows the feasibility of preparing mixed coatings from different PLL-*g*-PEG type copolymers. This concept is exploited in the last chapter to control ligand densities by co-adsorption of ligand-modified and ligand-free PLL-*g*-PEG.

As a further step towards possible applications as drug delivery systems, **Chapter III** shows that the model microspheres can be replaced by other particulates such as polyelectrolyte microcapsules. Layer-by-layer assembled hollow microcapsules that were composed of alternating layers of polystyrene sulfonate (PSS) and polyallylamine hydrochloride (PAH) were coated with adlayers of PLL-*g*-PEG. In addition, a PEG-grafted copolymer with an anionic backbone, poly(L-glutamic acid)-*graft*-PEG (PGA-*g*-PEG), was investigated. PGA-*g*-PEG coatings had no significant effect on phagocytosis, which may be explained by insufficient PEG density of the adlayer. Contrary, PLL-*g*-PEG

effectively blocked phagocytosis of coated microcapsules. Moreover, PAH/PSS microcapsules did not impair phagocyte viability. The results demonstrate that layer-by-layer assembled polyelectrolyte microcapsules coated with PLL-g-PEG represent a promising platform for a drug delivery system that escapes fast clearance by the MPS. In addition, this chapter also confirms the stability of PLL-g-PEG coatings upon storage for at least three weeks, even in the presence of human serum.

**Chapter IV** finally deals with receptor specific targeting of CLR on APCs. Different mannoside ligands (adsorbed mannan from *S. cerevisiae*; or chemically coupled mono- and tri-mannose) were immobilized at controlled concentrations onto stealth microspheres via adsorption of PLL-g-PEG. We hypothesized that the presentation of mannoside ligands linked to the surface of microspheres at high densities via flexible PEG chains could be a strategy to mimic high molecular weight mannose based pathogen associated molecular patterns (PAMPs) with synthetic small molecular ligands. Aspects that are covered in this chapter include both the formulation of such microspheres and their specific recognition by APC, as well as potential effects of mannoside substitutions on DC maturation. In addition, combinations of mannoside ligands with an integrin targeting RGD peptide ligand were investigated. Due to their PEG and mannan coronas, the coatings were repellent to unspecific protein adsorption, thus inhibiting opsonization and allowing specific ligand-receptor interactions. Mannose density was a major factor for the phagocytosis of mannosylated microspheres, though with limited efficiency. This strengthened the recent hypothesis by other authors that the mannose receptor (MR) can only act as a phagocytic receptor in collaboration with yet unidentified partner receptors. Finally, analysis of DC maturation revealed that surface assembled mannan on the microspheres could not stimulate DC maturation. Thus, phagocytosis upon recognition by CLR alone cannot trigger DC activation towards a T helper response.

Overall, the microparticulate platform established in this work represents a promising tool for a systematic investigation of specific ligand-receptor interactions on phagocytes, including the screening for potential ligands and ligand combinations, and the analysis of immunomodulatory effects thereof. We

hope that this platform will be useful to deepen our knowledge about the impact of the first encounter of APCs with micron-sized pathogens or microparticles on the downstream immune cascade, which may ultimately lead to improved vaccine formulations.

## ZUSAMMENFASSUNG

Mikropartikel, seien es solide Partikel oder Mikrokapseln, finden in der pharmazeutischen Forschung vielseitige Anwendungen. Ein besonderer Fokus ist das sogenannte *Targeting* von Mikropartikeln, worunter generell ein gezieltes Ansteuern bestimmter Zellen oder Gewebe verstanden wird, im engeren Sinne aber auch das Ansprechen spezieller Zell-Rezeptoren. Der letztgenannte Ansatz wird seit einiger Zeit auch zur Verbesserung der Immunantwort bei Impfungen verfolgt. Insbesondere das Targeting einer speziellen Art von Lektin-Rezeptoren auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC), den Lektin-Rezeptoren vom C-Typ (CLR), wurde als vielversprechende Strategie für die Modulation der Immunantwort erkannt. Ziel der vorliegenden Dissertation war das spezifische Targeting solcher CLR. Um dies zu erreichen, waren zwei Bedingungen zu erfüllen: (i) die Mikropartikel mussten gegen die Adsorption von Proteinen, die sog. Opsonisierung, passiviert werden, um Wechselwirkungen der adsorbierten Proteine mit anderen Zell-Rezeptoren auszuschliessen; und (ii) es mussten spezifische Liganden für die CLR auf der Oberfläche der Mikropartikel immobilisiert werden, ohne dabei deren Passivierung gegen Proteinadsorption zu beeinträchtigen.

Einer Hypothese aus der Literatur zufolge kann spezifisches Targeting von Zell-Rezeptoren erreicht werden, indem Polyethylenglykol-(PEG)-Ketten an die Oberfläche von Mikropartikeln gebunden werden, an deren Ende Liganden für die Rezeptoren chemisch gebunden wurden. Eine Einführung in die Thematik der PEGylierung von Mikropartikeln ist Gegenstand von **Kapitel I**. Zunächst wird auf die einzigartigen Eigenschaften von PEG eingegangen, aufgrund derer es wie kaum ein anderes Polymer zur Passivierung von Oberflächen gegen Proteinadsorption und zelluläre Wechselwirkungen geeignet ist. Im Folgenden werden verschiedene Strategien zur Herstellung von Mikropartikel mit PEGylierten Oberflächen vorgestellt, wobei PEG entweder bereits während der Herstellung der Mikropartikel eingesetzt wird, oder erst in einem weiteren Schritt auf der Oberfläche bereits bestehender Partikel immobilisiert wird. Ein Schwerpunkt des Kapitels liegt schliesslich auch auf den verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten PEGylierter Mikropartikel im biomedizinischen Bereich, wobei insbesondere auf das Targeting PEGylierter

Mikropartikel mit Hilfe geeigneter, auf der Oberfläche immobilisierter Liganden eingegangen wird.

Zur Adsorption einer PEG-Schicht auf den Mikropartikeln wird in dieser Dissertation grundsätzlich ein Pfropfpolymer (*engl.: graft copolymer*) vom Typ Poly(L-Lysin)-*graft*-PEG (PLL-*g*-PEG) verwendet. Da das Rückgrat dieses Polymers (PLL) bei physiologischem pH positiv geladen ist, adsorbiert PLL-*g*-PEG aus wässrigen Lösungen spontan auf negativ geladene Substrate unter Ausbildung elektrostatischer Wechselwirkungen. **Kapitel II** untersucht den Einfluss der molekularen Struktur des Pfropfpolymeres auf die Phagozytose der Mikropartikel durch APC, wobei das Molekulargewicht der PEG-Ketten von 1 bis 5 kDa und das Pfropfverhältnis (*engl.: grafting ratio*) von 2 bis 20 variiert wurde. Letzteres ist definiert als die Anzahl PLL-Monomere geteilt durch die Anzahl gepfropfter PEG-Ketten. Das Pfropfverhältnis ist damit eine Kennzahl für die PEG-Dichte des jeweiligen Pfropfpolymeres. Die Phagozytose von derart überzogenen Mikropartikeln wurde mit Hilfe von dendritischen Zellen und Makrophagen untersucht, welche aus humanen Monozyten gewonnen wurden. Die Quantifizierung erfolgte mittels Phasenkontrastmikroskopie und Durchflusszytometrie, wobei als Modell Mikropartikel aus carboxyliertem Polystyrol mit einem Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$  Verwendung fanden. Unterstützende Experimente umfassten die Bestimmung der  $\zeta$ -Potentiale beschichteter Mikropartikel und des Ausmasses der Proteinadsorption, sowie Zelladhäsionsexperimente auf beschichtetem Glas. Zusätzlich wurde auch die Phagozytose der (Kontroll)-Mikropartikel, im Gegensatz zur Adhäsion an die äusseren Zellmembran, mittels konfokaler Mikroskopie nachgewiesen. Grundsätzlich führten grössere Pfropfverhältnisse, also geringere PEG-Dichten, zu einer verringerten Resistenz gegen die Adsorption des Modell-Proteins Immunglobulin G (IgG), was mit einer erhöhten Phagozytose einherging. Im Fall von dendritischen Zellen und langen PEG-Ketten (5 kDa) nahm die Phagozytose beschichteter Mikropartikel darüber hinaus selbst dann ab, wenn beträchtliche Mengen IgG adsorbiert wurden. In diesem Zusammenhang wird auch die möglicherweise bevorzugte Adsorption von Dysopsoninen diskutiert, welche ein weiterer wichtiger Faktor für die verminderte Phagozytose durch dendritische Zellen oder Makrophagen sein könnte. Interessanterweise konnten



beide Zellarten auch auf einigermaßen protein-resistenten PLL-g-PEG Schichten adhären, während keine effiziente Phagozytose von Mikropartikeln möglich war, wenn diese mit den gleichen Pfropfpolymeren modifiziert wurden. Insgesamt legt dieses Kapitel das Fundament für alle weiteren Arbeiten, indem das Pfropfpolymer mit einem Pfropfverhältnis von 3.5 bei einem PEG-Molekulargewicht von 2 kDa als optimal identifiziert wurde, um sowohl Passivierung gegen Proteinadsorption als auch verminderte Zelladhäsion und Phagozytose zu verleihen. Darüber hinaus wird gezeigt, dass auch Mischungen verschiedener PLL-g-PEG-Polymere auf Mikropartikel aufgebracht werden können. Dieser Aspekt wird im letzten Kapitel Anwendung finden, um durch Adsorption einer Mischung von Ligand-modifiziertem und unmodifiziertem PLL-g-PEG eine kontrollierte Variation der Ligandenkonzentration zu erreichen.

Als weiterer Schritt in Richtung möglicher Anwendungen wird in **Kapitel III** gezeigt, dass die als Modelle verwendeten Mikropartikel auch durch andere Partikel, wie z.B. durch Polyelektrolyt-Mikrokapseln, ersetzt werden können. Diese Mikrokapseln wurden durch schichtweise abwechselnde Adsorption der Polymere Polystyrolsulfonat (PSS) und Polyallylamin Hydrochlorid (PAH) auf mikropartikuläre Template und nachfolgende Auflösung der Template hergestellt, und in einem zweiten Schritt mit PLL-g-PEG beschichtet. Alternativ wurde ein ähnliches Pfropfpolymer mit negativ geladenem Rückgrat, Poly(L-Glutaminsäure)-*graft*-PEG (PGA-g-PEG), aufgebracht. PGA-g-PEG hatte keinen Einfluss auf die Phagozytose, was wahrscheinlich auf eine zu geringe PEG-Dichte zurückzuführen war. Auf der anderen Seite konnte die Phagozytose der Mikrokapseln durch das Aufbringen einer PLL-g-PEG-Schicht erfolgreich gehemmt werden, ohne die Viabilität der Phagozyten zu beeinträchtigen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Beschichtungen mit PLL-g-PEG über einen Zeitraum von mindestens drei Wochen stabil waren, selbst in Gegenwart von humanem Serum.

**Kapitel IV** beschäftigt sich schliesslich mit dem Rezeptor-spezifischen Targeting von CLR auf APC. Dafür wurden verschiedene Mannosid-Liganden (Mannan von *S. cerevisiae*, sowie mono- und tri-Mannose) in kontrollierten Konzentrationen mit Hilfe von PLL-g-PEG auf Mikropartikeln immobilisiert.

Die Erkennung hochmolekularer Mannose-Strukturen, sogenannter Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (*engl.: pathogen associated molecular patterns, PAMPs*), spielt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr von Pathogenen. Unserer Hypothese zufolge sollte die Präsentation der Mannoside am äusseren Ende flexibler PEG-Ketten die Nachahmung dieser hochmolekularen PAMPs durch kleine synthetische Liganden ermöglichen. Die in diesem Kapitel behandelten Aspekte umfassen sowohl die Formulierung derartiger Mikropartikel als auch ihre spezifische Erkennung durch APC, sowie mögliche Effekte der Mannosid-Substitution auf die Maturierung dendritischer Zellen. Darüber hinaus wurden Kombinationen der Mannosid-Liganden mit einem Integrin-bindenden Liganden, einer RGD-Peptidsequenz, aufgebracht. Dank der Beschichtung mit PEG und/oder Mannan waren die modifizierten Mikropartikel gegen Proteinadsorption passiviert, so dass spezifische Wechselwirkungen zwischen Liganden und Rezeptoren untersucht werden konnten. Die Phagozytose-Raten der modifizierten Mikropartikel wurden in erster Linie von der Mannosid-Dichte bestimmt, allerdings wurde insgesamt nur eine geringe Effizienz beobachtet. Dies unterstützt eine vor kurzem veröffentlichte Hypothese, derzufolge der Mannose-Rezeptor (MR) nur in Gemeinschaft mit noch nicht identifizierten Co-Rezeptoren als phagozytischer Rezeptor wirkt. Ein weiteres Ergebnis der Studie war, dass die Aufnahme mit Mannan beschichteter Mikropartikel keine Maturierung dendritischer Zellen auslöste. Dies bedeutet, dass die Aktivierung von CLRs allein nicht in der Lage ist, dendritische Zellen in Richtung einer T-Zell-Aktivierung zu stimulieren, sondern dass dafür offensichtlich eine Stimulierung weiterer Rezeptoren und/oder die gleichzeitige Verarbeitung eines Antigens erforderlich sind.

Der in dieser Dissertation etablierten mikropartikulären Plattform kommt eine vielversprechende Rolle im Hinblick auf die Erforschung spezifischer Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen auf phagozytischen Zellen zu, einschliesslich der Identifizierung potentieller Liganden und Ligandenkombinationen, sowie der Untersuchung der durch diese Wechselwirkungen ausgelösten immunmodulierenden Effekte. Dies wird das Wissen um die ersten Schritte der Kontakte zwischen APC und Mikropartikeln oder Pathogenen und die daraus resultierende Immunkaskade um wertvolle

---

Details vertiefen, von denen wir annehmen, dass sie zu verbesserten Delivery-Systemen für Impfstoffe führen können.