

Modification of Proteins with Semi-Permeable Coatings Fabricated with the Comb-Shaped Polymer Poly(oligoethylene glycol) Methyl Ether Methacrylate

Doctoral Thesis

Author(s):

Liu, Mi

Publication date:

2014

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010213541>

Rights / license:

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

DISS.ETH No. 22089

**Modification of Proteins with Semi-Permeable Coatings
Fabricated with the Comb-Shaped Polymer Poly(oligoethylene
glycol) Methyl Ether Methacrylate**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZÜRICH

(Dr. sc. ETH Zürich)

Presented by

MI LIU

MSc, Peking University

Born on 16th November, 1983

Citizen of China

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Jean-Christophe Leroux (examiner)

Prof. Dr. Marc A. Gauthier (examiner)

Prof. Dr. Petra Dittrich (co-examiner)

Dr. Pål Johansen (co-examiner)

2014

Summary

Approximately 25% of all new drugs approved annually by the *American Food and Drug Administration* are peptides or proteins. As a class of molecules they are for example versatile catalysts and binding agents (etc.), and can have high bioactivity and specificity. This has led to their application in the treatment of e.g., cancer, diabetes, degenerative diseases, infectious diseases, and enzyme deficiency disorders. However, also as a class of molecules, peptides and proteins can display a number of common shortcomings such as short circulation half-life *in vivo* upon systemic administration, susceptibility to proteolysis, and generation of immune responses. Various strategies have been explored to overcome these issues and thus improve their performance as therapeutics. One important strategy, which is also the main focus of this thesis, is to conjugate polymers to their solvent-exposed functional groups. This can increase their hydrodynamic radius to prevent renal excretion, provide a steric shield to prevent proteolysis, and convey stealth-like characteristics to the protein by masking epitopes from opsonins and immune recognition. The polymer most often used for this purpose is α -methoxy poly(ethylene glycol) (mPEG), and the strategy itself is commonly simply referred to as “PEGylation”. The major caveat of PEGylation is that efficient protection of the protein, obtained by conjugation of numerous polymer chains, often comes at the expense of bioactivity. This thesis explores how this dogma can be circumvented using a comb-shaped analog of mPEG, poly(oligoethylene glycol) methyl ether methacrylate (pOEGMA).

Chapter 1 provides readers with a general introduction to protein drugs, including the major obstacles to their use. The major strategies applied to overcome these obstacles, including protein engineering, PEGylation, and PEGylation with pOEGMA, are discussed.

In **Chapter 2**, a general discussion of the thermo-sensitivity, dynamic self-assembly properties, and protein-repellant characteristics of pOEGMA is provided. More specifically, it encompasses a presentation of the relationship between pOEGMA’s behavior in these applications and its molecular characteristics as well as the conformation of its main-chain. Overall, the bulk of the studies reported all consistently indicate that main-chain length, side-chain length, concentration, salts, chemical alterations, etc. have similar effects on pOEGMA, independently of whether it is isolated in solution or present within a more complex system.

This section therefore highlights that lessons learned from one application may provide useful insight for present and future avenues of research.

In **Chapter 3**, pOEGMA is grafted to the enzyme α -chymotrypsin. By preparing and analyzing more than 100 distinct pOEGMA- α -chymotrypsin conjugates, a detailed picture of the behavior of pOEGMA on the surface of a protein was obtained. Simple ^1H NMR spectroscopy in combination with the catalytic properties of α -chymotrypsin were used to analyze the conformational/permeability properties of protein-bound monolayers of pOEGMA. Remarkably, control of polymer conformation and inter-penetration produced a thus far overlooked molecular sieving effect. The application of this effect for the “smart” PEGylation of proteins is portrayed, from which insight is provided for the design of other therapeutic bio-conjugates and functional coatings with selective permeability properties.

Chapter 4 extends the *in vitro* work from the previous chapter and exemplifies the application of the knowledge gained for the optimization of a therapeutic protein, L-asparaginase, *in vivo*. Nineteen pOEGMA-L-asparaginase conjugates were prepared and characterized. Selected conjugates were analyzed *in vivo*. Based on the guidelines established in Chapter 3, the pOEGMA coating could be tailored to impart exceptionally low immunogenicity, with a commensurably low loss of therapeutic activity.

The general discussion and outlook, **Chapter 5**, describes the major achievements of this doctoral study. This last chapter also addresses the limitations of the research and what needs to be investigated further. In addition, how this research can benefit the society is discussed.

Zusammenfassung

Bei etwa 25% aller Arzneistoffe, die durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) jährlich neu zugelassen werden, handelt es sich um Peptide oder Proteine. Peptid- und Proteinanzneistoffe besitzen u.a. enzymatische oder regulierende Effekte und zeichnen sich durch hohe Wirksamkeit und Spezifität aus. Aufgrund dieser Eigenschaften werden sie besonders zur Behandlung schwerwiegender Erkrankungen wie Krebs, Diabetes, degenerativen und infektiösen Erkrankungen sowie Enzymmangelkrankungen eingesetzt. Peptid- und Proteinanzneistoffe besitzen jedoch auch diverse Nachteile, wie beispielsweise eine kurze Verweildauer *in vivo* nach systemischer Verabreichung, Anfälligkeit auf Proteolyse und das Auslösen einer Immunantwort gegen die verabreichten Proteine. Es werden verschiedenste Strategien verfolgt, um Wirksamkeit und Sicherheit von Proteinanzneistoffen zu verbessern. Eine dieser Strategien, die auch das Hauptthema dieser Dissertation darstellt, besteht in der Konjugation von therapeutischen Proteinen mit Polymeren. Dies führt u.a. zur Vergrößerung des hydrodynamischen Radius, wodurch eine renale Ausscheidung verlangsamt oder vermieden wird. Ebenso kann durch die sterische Abschirmung die Proteolyse vermindert oder vermieden werden. Schliesslich können Opsonine bindende Oberflächenstrukturen (Epitope), maskiert werden (sogenannter "stealth" Effekt), was die Erkennung des verabreichten Proteins durch Immunzellen erschwert. Ein häufig verwendetes Polymer zur Konjugation an Proteinanzneistoffe ist das α -Methoxy-polyethylenglykol (mPEG); diese Strategie wird vereinfachend als "Pegylierung" bezeichnet. Ein Nachteil der Pegylierung ist die häufig beobachtete Verminderung der Wirksamkeit von Proteinanzneistoffen. Diese Dissertation erforscht Möglichkeiten, dieses Dogma zu überwinden, indem anstelle von linearen PEG kammförmige Analogons des mPEG, nämlich Poly(oligoethylenglykol)methylether-methacrylat (pOEGMA), zur Biokonjugation verwendet werden.

Kapitel 1 bietet eine generelle Einführung in Proteinanzneistoffe, wobei insbesondere grundlegende Probleme bei ihrem therapeutischen Einsatz besprochen werden. Es werden zudem wichtige Strategien zur Überwindung der bekannten Nachteile dieser Arzneistoffklasse diskutiert, namentlich Proteinmodifikationen wie Pegylierung und Pegylierung mit pOEGMA.

Kapitel 2 befasst sich mit der Thermosensitivität, der dynamischen Selbstorganisation und der proteinabweisenden Eigenschaften von pOEGMA. Speziell

werden die Zusammenhänge zwischen Struktur- und Verhaltenseigenschaften von pOEGMA im Kontext von Proteinkonjugation besprochen. Die publizierten Studien zeigen einhellig, dass die Längen der Haupt- und Seitenketten, die Konzentration von pOEGMA, die Anwesenheit und Konzentration von Salzen, sowie chemische Modifikationen die Eigenschaften von pOEGMA in vergleichbarer Weise verändern, unabhängig davon ob pOEGMA isoliert in Lösung vorliegt oder gebunden in einem komplexeren System. Daraus lässt sich ableiten, dass Erkenntnisse mit einem definierten Protein-pOEGMA-Konjugat auch nützliche Einblicke für andere Forschungsgegenstände geben können.

Kapitel 3 beschreibt die Untersuchungen zur Bindung von pOEGMA an das Enzym α -Chymotrypsin. Durch Synthese und Analyse von mehr als 100 verschiedenen pOEGMA- α -Chymotrypsin-Konjugaten konnte ein detailliertes Bild des Verhaltens von pOEGMA an der Oberfläche eines Proteins erhalten werden. Mittels einfacher ^1H NMR Spektroskopie und Messung der katalytischen Eigenschaften des α -Chymotrypsins wurden Konformation und Permeabilität von pOEGMA- α -Chymotrypsin Monolayern bestimmt. Es zeigte sich, dass durch die Kontrolle der Polymerkonformation und der Polymerketten-Interpenetration ein bisher weitgehend unbeachteter molekularer Siebeffekt erzielt werden kann. Die Nutzung dieses Effekts zur „intelligenten“ PEGylierung von Proteinen wird diskutiert, um in Zukunft andere therapeutische Biokonjugate und funktionelle Protein-Umhüllungen mit selektiv permeablen Eigenschaften herzustellen.

In **Kapitel 4** werden die *in vitro* Untersuchungen des vorangegangenen Kapitels weitergeführt und die erhaltenen Kenntnisse zur Optimierung eines therapeutischen Proteins, L-Asparaginase, in *in vivo* Experimenten validiert. Dazu wurden 19 pOEGMA-L-Asparaginase-Konjugate hergestellt und charakterisiert. Ausgewählte Konjugate wurden daraufhin *in vivo* analysiert. Basierend auf den Leitlinien, welche in Kapitel 3 etabliert wurden, konnte eine massgeschneiderte Umhüllung von L-Asparaginase mit pOEGMA erzielt werden, die einen vergleichsweise geringen Verlust der therapeutischen Aktivität bei aussergewöhnlich niedriger Immunogenität des Proteinkonjugats ergab .

Die allgemeine Zusammenfassung und der Ausblick in **Kapitel 5** beschreiben die Haupterfolge dieser Dissertation. Dieses letzte Kapitel behandelt auch die Grenzen dieser Forschungsarbeit sowie zukünftige Forschungsthemen. Zusätzlich wird diskutiert, wie die Gesellschaft von den erzielten Erkenntnissen profitieren kann.