



Doctoral Thesis

## Releasable and Traceless PEGylation of Arginine Residues

**Author(s):**

Gong, Yuhui

**Publication Date:**

2016

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010608796> →

**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. 23194

# **Releasable and Traceless PEGylation of Arginine Residues**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zürich)

Presented by

**Yuhui Gong**

MSc in Polymer Chemistry, Wuhan University

Born on 13<sup>th</sup> January, 1988

Citizen of China

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Jean-Christophe Leroux (examiner)

Prof. Dr. Bruno Gander (co-examiner)

Prof. Dr. Marc A. Gauthier (co-examiner)

Prof. Dr. Nico Bruns (co-examiner)

2016

## Summary

Grafting methoxy poly(ethylene glycol) (mPEG) to proteins, a process referred to as PEGylation, has been widely exploited to slow down their renal clearance and reduce their recognition by the immune system. Currently, several PEGylated protein therapeutics are used in the clinic. From a developmental context, several synthetic strategies are available for preparing well-defined conjugates of peptides/proteins and polymers. Owing to its simplicity, one attractive grafting approach is to employ residue-specific reactions, which permit the selective modification of up to all solvent exposed amino acid residues of a given sort. However, in many cases, polymer-modification can lead to significant (or total) loss of peptide/protein activity. Although some solutions to this issue have been investigated, such as site-specific polymer conjugation, these solutions are not universally applicable. For instance, site-specific PEGylation may inefficiently mask all epitopes on immunogenic proteins. Site-specific PEGylation may also inactivate smaller therapeutic peptides.

One approach that is gaining momentum to address these challenges is to release the fully active and unmodified native peptide/protein from mPEG with time in the body. This process is termed releasable PEGylation (rPEGylation). rPEGylation incorporates an element of controlled release and is particularly useful for slowly regenerating the activity of proteins adversely affected by polymer-modification. In this Ph.D. thesis, a series of mPEG-phenylglyoxal (PGO) derivatives were synthesized and evaluated as agents for the rPEGylation at arginine residues in peptide or proteins. Arginine is an amino acid for which rPEGylation chemistry does not currently exist. The objective was to develop arginine-reactive mPEG bearing PGO derivatives, use these agents to modify peptides and proteins, and exploit the releasable nature of the coupling chemistry to release the unmodified and fully active agent over time. We also examined whether the rate of release can be tunable by changing the structure of the PGO group and the possibility to disrupt the protein-protein interactions in a high concentration protein solution

**Chapter 1** provides a general introduction to protein therapeutics, the challenges associated with their use, and the strategies to overcome these limitations.

**Chapter 2** provides an overview of the state-of-the-art of rPEGylation, with emphasis on the chemistry behind the release of the peptide/protein and the means for altering the rate of release in biological fluids.

**Chapter 3** presents the first proof of concept of rPEGylation at the arginine residues, of arginine-rich antimicrobial peptides (AMPs). While arginine-rich AMPs are emerging therapeutics of interest, their applicability is limited by their short circulation half-life, caused in part by their small size and digestion by blood proteases (targeting arginine). To overcome these problems, a strategy to temporarily mask arginine residues within AMPs with mPEG bearing PGO was developed and evaluated. Based on the reagent used, release of AMPs can occur in a couple hours to days in a completely traceless fashion. Owing to its simplicity, this method should be applicable for the modification of the entire family of arginine-rich AMPs, which have great potential to be employed as the novel therapeutics.

In **Chapter 4**, mPEG-PGO-additives with different mPEG lengths were synthesized and used to disrupt protein–protein interactions within high-concentration immunoglobulin (IgG) solutions. The concentrated protein aqueous solutions are increasingly used for subcutaneous injections, however, high concentration are typically associated with formulation challenges such as protein aggregation and high viscosity. The addition of very small amounts of the rPEGylation agents based on PGO imparted a significant reduction of viscosity caused by the disruption of IgG self-assembly. In addition, the additives prevented IgG aggregation, caused by prolonged storage.

**Chapter 5** provides a general conclusion and describes the major achievements of this Ph.D. thesis. A discussion of the limitations of our strategy is also given as well as the expected impact of our findings.

# Zusammenfassung

Die Bindung von Methoxypoly(ethylene glycol) (mPEG) an Proteine (sog. PEGylierung) wird angewendet, um die renale Ausscheidung von Proteinen zu verlangsamen und deren Erkennung durch das Immunsystem zu vermindern. Verschiedene PEGylierte Proteine werden zurzeit therapeutisch verwendet. Es existieren unterschiedliche Synthesestrategien, um gut definierte Polymer-Protein- und Polymer-Peptid-Konjugate herzustellen. Eine häufig beschriebene und einfache Methode verwendet Reaktionen, die für bestimmte Aminosäuren spezifisch sind und diese, sofern frei zugänglich, selektiv modifizieren. Häufig führen PEGylierungen jedoch zu einem partiellen oder totalen Verlust der biologischen Aktivität. Gewisse Ansätze zur Behebung dieses Problems sind zwar in der Literatur beschrieben (z. B. die PEGylierung von spezifischen Aminosäureseitenketten), jedoch sind diese Strategien nicht universell einsetzbar und können auch (bei kleineren therapeutischen Peptiden zu Inaktivierung führen).

Ein immer häufiger benutzter Ansatz, um diesen Herausforderungen zu begegnen, ist die so genannte freisetzbare PEGylierung (rPEGylierung). Die rPEGylierung ermöglicht die kontrollierte Freisetzung *in vivo* von Peptiden und Proteinen aus PEG-Konjugaten und eignet sich besonders für die zeitabhängige Regeneration der Proteinaktivität im Falle einer Aktivitätsminderung aufgrund der PEGylierung. In dieser Doktorarbeit wurde eine Reihe von mPEG-phenylglyoxal (PGO) Derivaten synthetisiert und als Konjugationspartner für die rPEGylierung von Argininseitenketten in Peptiden und Proteinen verwendet. Für Arginin waren bis anhin keine chemischen Reaktionen zur rPEGylierung beschrieben. Ziel dieser Arbeit war die Synthese von argininreaktiven mPEG-modifizierten PGO-Derivaten, deren Anwendung in der PEGylierung von Peptiden und Proteinen und die Verwendung dieser Konjugate zur zeitabhängigen Freisetzung von vollständig aktiven Peptiden oder Proteinen. Es wurde zudem untersucht, ob die Freisetzungsgeschwindigkeit von Peptiden oder Proteinen aus dem PEG-Konjugat durch Strukturveränderung der PGO-Gruppe gesteuert und kontrolliert werden kann und ob Protein-Protein Interaktionen in hochkonzentrierten Proteinlösungen verhindert werden.

**Kapitel 1** enthält eine Einführung in Proteintherapeutika mit einer Auflistung der Anwendungsproblemen und möglicher Lösungsstrategien.

**Kapitel 2** bietet einen Überblick über die rPEGylierung. Schwerpunkt sind die chemischen Reaktionen, die der Freisetzung von Peptiden/Proteinen aus PEG-Konjugaten

zugrunde liegen, und die Möglichkeiten, die Freisetzungsgeschwindigkeit in biologischen Flüssigkeiten zu beeinflussen.

**Kapitel 3** präsentiert den ersten Machbarkeitsnachweis der rPEGylierung von Argininseitenketten argininreicher antimikrobieller Peptide. Argininreiche antimikrobielle Peptide sind interessante potenzielle Therapeutika, die aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit jedoch nur beschränkt therapeutisch anwendbar sind; die kurze Halbwertszeit rührt, teilweise von der kleinen Grösse und Anfälligkeit auf Zersetzung dieser Peptide durch argininerkennende Proteasen im Blut her. Um diese Probleme zu überwinden, wurde eine Strategie entwickelt, welche die Argininseitenketten vorübergehend mit mPEG-modifiziertem PGO maskiert. Abhängig vom benützten PEGylierungs-Molekül konnte eine *in vitro* Freisetzung der antimikrobiellen Peptide über Stunden bis Tagen erreicht werden, ohne dass Spuren der PEGylierung auf den Peptiden zurückblieben. Aufgrund der Einfachheit und Spezifität sollte die Methode prinzipiell auf alle argininreichen antimikrobiellen Peptide anwendbar sein.

In **Kapitel 4** wurden mPEG-PGO-Derivate mit unterschiedlicher mPEG-Länge synthetisiert, um Protein-Protein-Wechselwirkungen in hochkonzentrierten Immunoglobulinlösungen zu vermindern. Hochkonzentrierte Immunoglobulinlösungen, z. B. therapeutische monoklonale Antikörper, werden zunehmend therapeutisch eingesetzt, jedoch erweist sich die subkutane Injektion aufgrund von häufig auftretender Proteinaggregation und hoher Viskosität als problematisch. Die Zugabe sehr kleiner Mengen von PGO-basierten rPEGylierungsagenzien führte zu einer signifikanten Reduktion der Viskosität infolge verminderter Immunoglobulinwechselwirkungen und verhinderte die Bildung mikroskopisch beobachtbarer Immunoglobulinaggregate, welche bei längerer Lagerung auftreten.

**Kapitel 5** beinhaltet eine Schlussfolgerung und beschreibt die wichtigsten Erkenntnisse dieser Doktorarbeit. Insbesondere werden die Bedeutung und Grenzen des beschriebenen Ansatzes und der gewonnenen Erkenntnisse diskutiert.