

DISS. ETH NO. 22065

# **Bio-reduction of Disulfide-Containing Drug Carriers**

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

presented by

**LORINE BRÜLISAUER**

Master of Science ETH in Chemistry, ETH Zurich  
born on July 4<sup>th</sup>, 1984  
citizen of Appenzell, AI, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Jean-Christophe Leroux, examiner  
Prof. Dr. Marc A. Gauthier, co-examiner  
Prof. Dr. Helma Wennemers, co-examiner

2014

## Summary

Advanced drug carriers can be designed with stimuli-sensitive moieties to promote drug release upon exposure to specific conditions at the targeted site. One stimuli-responsive moiety, whose use has grown in popularity over the last ten years, is the disulfide bond. Disulfides are found in proteins, where they modulate structure and function. They can respond to the naturally occurring redox-gradient between extra- and intra-cellular spaces by undergoing reduction or disulfide exchange. While proteins localized in the extra-cellular space contain mostly intact disulfide bonds, the proteins in the cytoplasm are reduced to a greater extent due to the highly negative redox-potential found in this compartment. Most drug carriers incorporating disulfides rely on a similar concept. In other words, redox-responsive linkers are generally used under the assumption that they stay intact in the extra-cellular space and are only “cleaved” upon cell internalization. However, it has become increasingly clear that this assumption is too simplistic. One important challenge to effectively exploit redox-sensitive linkages is that their rate of responsiveness to redox-stimuli is modified by their micro-environment. Furthermore, the cellular location of cleavage might not be as selective for the intra-cellular space as often is assumed. As a consequence, a more detailed evaluation of the cellular location of bio-reduction and the specific behavior of disulfides within individual carrier systems is essential to improve their efficiency and future optimization. To this end, this Ph.D. thesis explores bio-reduction for two important delivery systems, namely, gene delivery polycations and protein–drug conjugates.

In Chapter 1, an introduction to endogenous stimuli typically used in drug delivery is provided. Redox-responsive drug delivery is introduced as well as the major objectives of this thesis.

Chapter 2 provides an overview of biological redox-environments (*i.e.*, blood, interstitial space, endocytic compartments, cytoplasm) relevant to drug delivery and provides explanations on how disulfides may be cleaved in these milieu. Furthermore, it reviews the current state of knowledge regarding the performance of disulfide-containing drug carriers in these compartments. The chapter's main conclusion is that disulfide cleavage is not limited to the intra-cellular space. Indeed, a necessity to stabilize disulfides within drug delivery systems to prevent premature cleavage in the extra-cellular space is evident.

The investigation of redox-sensitive polycationic gene delivery systems is described in Chapter 3. Disulfide bonds are increasingly used in nucleic acid carriers to reduce the cytotoxicity of polycations and to enhance transfection efficiency. To analyze bio-reduction of such redox-sensitive systems, a model dendrimer, 3<sup>rd</sup> generation poly(amido amine) (PAMAM; widely used polymer for gene delivery), was modified with two boron-dipyrromethene (BODIPY) fluorophores. These dyes were coupled to the primary amines on the surface of the PAMAM dendrimer *via* disulfide bonds. In the intact probe, the BODIPY fluorescence was self-quenched. Upon disulfide cleavage, a ~10-fold increase in fluorescence intensity was observed. This property of the probe enabled real-time and quantitative measurement of disulfide reduction. Kinetic analyses of disulfide exchange were performed in the presence of reducing agents and at different pHs. The polyionic nature of the PAMAM dendrimer was shown to accelerate disulfide reduction due to electrostatic accumulation of negatively charged reducing agents (*e.g.*, glutathione (GSH), the most abundant biological low-molecular-weight redox agent in cells). This led to rapid de-quenching of the probe in model redox buffer. The extent and the cellular location of bio-reduction was then analyzed in four different cancer cell lines (HeLa, A549, PC3, and Caco-2). It was found that the disulfides were largely cleaved (if not entirely) in the extra-cellular space. In addition to this, the obtained data indicate a strong involvement of cell surface oxido-reductases in this cleavage process. Complexing the probe with plasmid DNA at least partially stabilized the disulfide bonds in the extra-cellular space. The knowledge gained by these findings helps to better understand and to optimize the performance of bio-reducible gene carriers.

Chapter 4 deals with the investigation of bio-reduction during the major histocompatibility complex class I-related Fc receptor (FcRn)-mediated

trafficking of immunoglobulin G (IgG)-, Fc- (constant region of IgG), or albumin-based drug conjugates. In these systems disulfide-containing linkers are often used to conjugate drug molecules to the protein carrier. To analyze the bio-reduction potential of FcRn biology, two redox-sensitive model systems based on albumin were synthesized. One of them contained a sensitive cysteine–cysteine (Cys–Cys) disulfide bond, while the other probe possessed a more hindered penicillamine–cysteine (Pen–Cys) disulfide. Additionally, a BODIPY fluorophore and a Black Hole Quencher (BHQ1) were attached to the systems so that resonance energy transfer between these molecules quenched fluorescence. Upon disulfide bond cleavage, resonance was lost, leading to a quantifiable 7-fold increase in fluorescence intensity. Detailed characterization of the probes in redox buffer revealed that the Pen–Cys disulfide had a 17-fold slower cleavage rate compared to the more susceptible Cys–Cys bond. Bio-reduction was then evaluated in two FcRn-expressing cell lines (*i.e.*, HUVEC and Caco-2). The albumin probe with the Cys–Cys was shown to be relatively prone to cleavage in the extra-cellular space, while the Pen–Cys remained intact in this compartment for a substantially longer time. An implication of cell surface and secreted thiols to bio-reduction processes were correlated to these findings. The probe containing the Pen–Cys disulfide was then used to analyze intra-cellular bio-reduction during FcRn-mediated trafficking. The data obtained indicate that the FcRn-mediated recycling pathway itself is not (or only poorly) bio-reducing. On the contrary, cytoplasm and late endosomes/lysosomes showed an implication in disulfide cleavage. The performed study provides new considerations for the design of redox-sensitive protein-drug conjugates, which are exposed to FcRn-mediated trafficking while circulating in the blood.

Chapter 5 summarizes and discusses in more detail the main findings of this work. It also suggests possible future experiments, which would help to further improve the performance of the redox-sensitive drug carriers studied in this thesis.

# Zusammenfassung

Wirkstoffträger können mit molekularen Strukturen gebaut werden, welche am therapeutischen Zielort unter den dort vorliegenden spezifischen Bedingungen die Wirkstofffreisetzung fördern. Eine auf umgebungsabhängige Stimuli reagierende Struktur, deren Verwendung in den letzten zehn Jahren stark an Popularität gewonnen hat, ist die Disulfidbindung. Disulfide kommen in vielen Proteinen vor, wo sie die Struktur und Funktion modulieren, indem sie auf den natürlich vorkommenden Redoxgradienten zwischen Extra- und Intrazellulärraum mit Reduktion oder Thiol-Disulfid-Austausch reagieren. Proteine, welche im Extrazellulärraum lokalisiert sind, besitzen vorwiegend intakte Disulfidbindungen. Im Gegensatz dazu sind die Disulfidbindungen der Proteine im Cytoplasma aufgrund des dort vorliegenden stark negativen Redoxpotentials zu einem grossen Teil reduziert. Die Grundüberlegung bei der Entwicklung von Wirkstoffträgern mit eingebauten Disulfidbindungen stützt sich auf ein ähnliches Konzept, d.h. die redox-empfindliche Disulfidbindung wird in der Regel unter der Annahme verwendet, dass sie im Extrazellulärraum intakt bleibt und erst nach Zellinternalisierung gespalten (reduziert) wird. Über die letzten Jahre hat sich jedoch immer mehr herausgestellt, dass diese Annahme zu einfach ist. Eine Schwierigkeit der effektiven Nutzung von redox-empfindlichen Verbindungen besteht darin, dass deren Redox-Reaktionsfähigkeit durch weitere Faktoren der Mikroumgebung modifiziert wird. Zudem ist die Spaltung der Disulfidbindungen möglicherweise nicht nur auf den Intrazellulärraum begrenzt. Um die Effizienz und zukünftige Optimierung redox-sensitiver Systeme zu verbessern, sind detaillierte Untersuchungen der zellulären Lokalisation der Bio-Reduktion sowie des spezifischen Verhaltens von Disulfiden in einzelnen Wirkstoffträgersystemen essenziell. Zu diesem Zweck erforscht diese Doktorarbeit die Bio-Reduktion von zwei wichtigen Trägersystemen, nämlich von Polykationen für den Transport von Nukleinsäuren und von Protein-Wirkstoff-Konjugaten.

Kapitel 1 beinhaltet eine Einleitung über endogene Stimuli, welche häufig für das sogenannte “Drug Delivery“ verwendet werden. Zudem werden redox-empfindliche Drug Delivery Systeme und die Hauptziele dieser Arbeit besprochen.

Kapitel 2 bietet einen Überblick über biologische Redox-Umgebungen (d.h. Blut, Interstitium, Endosomen, Zytoplasma), welche für das Drug Delivery wichtig sind, und erklärt wie Disulfide in diesen Milieus gespalten werden können. Zudem wird der aktuelle Wissensstand bezüglich des Verhaltens von Transportsystemen mit Disulfiden in diesen Redox-Kompartimenten diskutiert. Die wichtigste Schlussfolgerung des Kapitels ist, dass die Spaltung von Disulfiden nicht auf den Intrazellulärraum beschränkt ist. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, Disulfidbindungen in Transportsystemen zu stabilisieren, um eine vorzeitige Spaltung im Extrazellulärraum zu verhindern.

Kapitel 3 beschreibt Untersuchungen redox-empfindlicher, polykationischer Transportsysteme für Nukleinsäuren. Für polykationen-basierte Nukleinsäure Delivery Systeme (Gene Delivery Systeme; Polyplexe) werden zunehmend Disulfidbindungen verwendet, um die Zytotoxizität der Polykationen zu reduzieren und die Effizienz der Transfektion zu verbessern. Um die Bio-Reduktion eines solchen Systems in dieser Arbeit zu untersuchen, wurde ein Poly(amido amin) (PAMAM) Dendrimer (für das Gene Delivery häufig verwendetes Polymer) der Generation 3 mit zwei Boron-dipyrrromethen (BODIPY) Fluorophoren modifiziert. Diese Farbstoffe wurden über Disulfidbindungen an die primären Amine der PAMAM Dendrimere gebunden. Im intakten Modellsystem war die BODIPY-Fluoreszenz ausgelöscht. Nach Spaltung der Disulfidbindungen erhöhte sich die Fluoreszenzintensität um den Faktor von ca. 10. Diese Fluoreszenzintensitätserhöhung ermöglichte es, die Reduktion der Disulfidbindungen zu quantifizieren. Die Kinetik der Disulfidspaltung wurde dann in Gegenwart von Reduktionsmitteln und bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Diese Experimente zeigten, dass die polykationische Natur des PAMAM Dendrimers die Reduktion der Disulfidbindungen aufgrund der elektrostatischen Anziehung von negativ geladenen Reduktionsmitteln (z. B. Glutathion (GSH)) beschleunigt; GSH ist das in Zellen am häufigsten vorkommende niedermolekulare Reduktionsmittel. Dies führte zu einer raschen Spaltung der

Disulfidbindungen des Modellsystems in Redox-Puffer. Das Ausmass und die zelluläre Lokalisation der Bio-Reduktion wurden dann in vier verschiedenen Krebszelllinien (HeLa, A549, PC3 und Caco-2) untersucht. Es zeigte sich, dass die Disulfide weitgehend oder sogar vollständig im Extrazellulärraum gespalten werden und Oxidoreduktasen auf der Zelloberfläche bei der Disulfidspaltung eine wichtige Rolle spielen. Komplexierung des Modellsystems mit Plasmid-DNA stabilisierte die Disulfidbindungen im Extrazellulärraum zumindest teilweise. Die erhaltenen neuen Erkenntnisse tragen zu einem besseren Verständnis von bio-reduzierbaren Gene Delivery Systemen bei und eröffnen damit fundierte Optimierungsstrategien.

Kapitel 4 beschäftigt sich mit der Untersuchung von Bio-Reduktion von Wirkstoff-Konjugaten, die entweder auf Immunglobulin G (IgG), dem Fragment c von IgG (Fc) oder Albumin basieren und deren Transport durch Fc Rezeptoren (FcRn) vermittelt werden, die zur Superfamilie des Haupthistokompatibilitäts-Komplex der Klasse I (major histocompatibility complex class I; MHC I) gehören. In solchen Systemen werden häufig Disulfid-Bindung aufweisende Verbindungsmoleküle verwendet, um Arzneimittelmoleküle an die Proteinträger zu konjugieren. Um das Bio-Reduktionspotenzial im Zusammenhang des FcRn-vermittelten Transports zu untersuchen, wurden zwei redox-empfindliche Modellsysteme auf der Basis von Albumin synthetisiert. Das eine System besass eine leicht spaltbare Cystein-Cystein (Cys-Cys) und das andere eine weniger leicht spaltbare Penicillamin-Cys (Pen-Cys) Disulfidbindung. Zudem wurden ein BODIPY Fluorophor und ein Black Hole Quencher (BHQ1) in die Systeme eingebaut, um durch Resonanzenergietransfer zwischen diesen Molekülen die BODIPY-Fluoreszenz auszulöschen. Nach Spaltung der Disulfidbindung ging diese Resonanz verloren, was zu einer quantifizierbaren 7-fachen Erhöhung der Fluoreszenzintensität führte. In Redox-Puffer war die Spaltungsgeschwindigkeit von Pen-Cys 17-fach niedriger als jene von Cys-Cys. Die Bio-Reduktion wurde in zwei FcRn-exprimierenden Zelllinien (HUVEC und Caco-2) analysiert. In der extrazellulären Umgebung war die Cys-Cys Bindung des Albumin-Konjugates relativ leicht spaltbar, während Pen-Cys wesentlich länger intakt blieb. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Zelloberfläche also auch Thiole, die von den Zellen ausgeschieden wurden, am Bio-Reduktionsprozess beteiligt waren. Das Albumin-Konjugat mit der Pen-Cys Bindung wurde dann verwendet, um die intrazelluläre Bio-Reduktion während

des FcRn-vermittelten Transportes zu untersuchen. Die Daten zeigten, dass der intrazelluläre FcRn-vermittelte Rezyklierungsweg nicht oder höchstens nur wenig bio-reduzierend ist. Hingegen waren sowohl Zytoplasma wie auch späte Endosomen/Lysosomen an der Disulfidspaltung beteiligt. Die Erkenntnisse der vorliegenden Untersuchungen liefern neue Hinweise für die Entwicklung von redox-empfindlichen Protein-Wirkstoff-Konjugaten, welche während ihrer Zirkulation im Blut einem FcRn-vermittelten Transport zugänglich sind.

Kapitel 5 diskutiert abschliessend die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit. Zudem werden mögliche zukünftige Experimente beschrieben, welche die Leistung der in dieser Arbeit beschriebenen redox-empfindlichen Transportsysteme weiter verbessern könnten.