

# Kontrollierte systemische Freisetzung therapeutischer Peptide aus PEGylierten Prodrugs durch Serumproteasen\*\*

Friederike Inga Nollmann, Tina Goldbach, Nicole Berthold und Ralf Hoffmann\*

Bakterielle Infektionen verursachen weltweit noch immer die meisten Todesfälle, wobei Antibiotikaresistenzen eine der größten pharmazeutischen Herausforderungen darstellen. Die umfassende Berichterstattung der Medien über die Risiken Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA)- und multiresistenter *S. aureus* (MDR-SA)-Infektionen haben weltweit die Entwicklung neuer Antibiotika in den Fokus gerückt. So wurden in den letzten Jahrzehnten neue Medikamente gegen Gram-positive Keime zugelassen.<sup>[1]</sup> Weit weniger Anstrengungen wurden jedoch zur Entwicklung neuer, gegen Gram-negative Keime gerichtete Verbindungen unternommen, obwohl auch hier von der schnellen Verbreitung multi- oder panresistenter Stämme ein hohes Gesundheitsrisiko ausgeht.<sup>[2]</sup> Einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz bieten antimikrobielle Peptide (AMPs), welche ihre Effizienz als Teil des angeborenen Immunsystems über Jahrzehnte unter Beweis gestellt haben.<sup>[3]</sup> Unter pharmazeutischen Aspekten haben AMPs jedoch mehrere Nachteile. Die zwei wichtigsten Herausforderungen, die es zu bewältigen gilt, sind a) toxische Nebenwirkungen, die insbesondere für höhere Dosen von AMPs beobachtet wurden, welche Membranen lysieren, und b) die Verweildauer im Blut, da lineare Peptide schnell durch Proteasen abgebaut bzw. renal ausgeschieden werden.

Eine gängige Methode, diese Nachteile zu überwinden, basiert auf der kovalenten Kupplung von Polyethylenglycol (PEG), wodurch die renale Ausscheidung, der enzymatische Abbau, die Immunogenität und die Toxizität einer Verbindung reduziert werden kann. PEG verbessert zudem die Löslichkeit, wodurch das Injektionsvolumen herabgesetzt werden kann.<sup>[4]</sup> Entgegen früherer Befürchtungen konnte eine Toxizität von PEG nicht bestätigt werden, weshalb es heute vielfach in der Pharma- und Kosmetikindustrie eingesetzt wird.<sup>[5]</sup>

Neben diesen offensichtlichen Vorteilen kann die PEGylierung viele Wirkstoffe inaktivieren, insbesondere kleinere Moleküle. Deshalb wird PEG über hydrolysierbare

oder enzymatisch spaltbare Linker (z.B. Ester, Carbonate, Hydrazone oder aromatische Linker) an den Wirkstoff gekuppelt, um diesen dann gezielt aus dem Prodrug freizusetzen.<sup>[6]</sup> Wir präsentieren hier ein neues Konzept zur systemischen Freisetzung von Peptiden und kleinen Proteinen aus PEGylierten Prodrugs, wobei die im Blut vorhandenen Proteasen den maßgeschneiderten Linker spalten. Über den Linker kann die Freisetzungsgeschwindigkeit so gesteuert werden, dass die für den Wirkstoff gewünschten pharmakokinetischen Eigenschaften erreicht werden.

Dieses Konzept haben wir an Prolin-reichen AMPs (PrAMPs) erprobt, die ursprünglich aus Insekten isoliert wurden, und von uns zur Behandlung systemischer Infektionen mit Gram-negativen Bakterien optimiert wurden. Die gewählten Leitstrukturen Api88 und Onc72 sind *in vivo* sehr wirksam und weisen eine hohe therapeutische Breite auf (Tabelle 1).<sup>[7]</sup>

**Tabelle 1:** Sequenzen der Oncocin- und Apidaecin-Derivate.

Peptid	Sequenz <sup>[a]</sup>	PEG-Spacer (#)
Onc72	(#)-VDKPPYLPRPRPROIYNO-NH <sub>2</sub>	PEG-GAR
Onc110	(#)-VDKPPYLPRPRZRXNO-NH <sub>2</sub>	PEG-GAR
Api88	gu-ONNRPVYIPRPRPPHPRL-NH <sub>2</sub>	
Api137	gu-O(#)-NNRPVYIPRPRPPHPRL-OH	PEG-GARSG
Api300	gu-OO(#)-NRPVYIPRPRPPHPRL-OH	PEG-GARSG
Api301	gu-ONO(#)-RPVYIPRPRPPHPRL-OH	PEG-GARSG

[a] Abkürzungen: O = L-Ornithin (Orn), Z = *trans*-4-Hydroxy-L-prolin, X = *tert*-L-Leucin und gu = N,N,N'-Tetramethylguanidinogruppe.  
(#) Wasserstoffatom im freien Peptid (z. B. Onc72) oder PEG-Spacer in der PEGylierten Sequenz (z. B. PEG-GAR-Onc72).

Wir konnten beide Peptide bezüglich ihrer Proteasestabilität deutlich verbessern, wobei in verdünntem Mausserum Halbwertszeiten von mehr als 4 h erreicht wurden.<sup>[8]</sup> Nach PEGylierung beider Peptide zur Reduktion der renalen Ausscheidung verringerte selbst das kleine PEG<sup>750</sup>, ein Oligomer mit einer durchschnittlichen Masse von 750 Da, die antibakterielle Aktivität drastisch. Längere PEGs führten zu inaktiven Verbindungen. Dies war zu erwarten, da PrAMPs in die Bakterien gelangen müssen, um intrazelluläre Zielmoleküle (z.B. Chaperon DnaK) zu blockieren,<sup>[9]</sup> und das kovalent gekuppelte PEG wahrscheinlich die zelluläre Aufnahme verhindert. Daher verlängerten wir Onc72 (Onc110) N-terminal um drei Aminosäuren (Gly-Ala-Arg, GAR) und koppelten daran unterschiedlich lange PEGs, in der Annahme, dass das aktive Peptid (d.h. Onc72 bzw. Onc110) durch Trypsin-ähnliche Proteasen aus dem Prodrug freigesetzt werden würde. Während PEG<sup>750</sup> als Carbonsäure in guter Ausbeute an die ungeschützten N-Termini beider Peptide

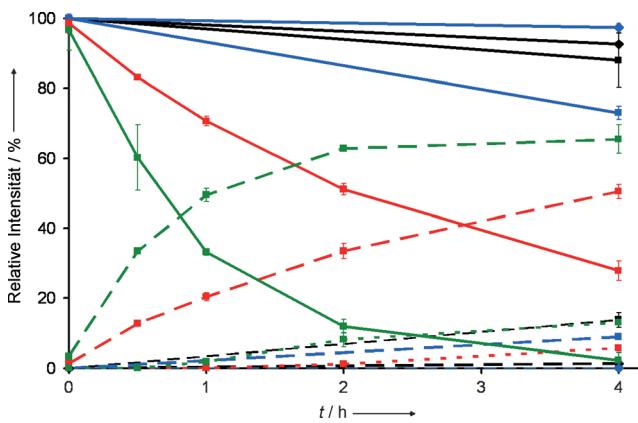
[\*] F. I. Nollmann,<sup>[+]</sup> T. Goldbach,<sup>[+]</sup> N. Berthold, Prof. R. Hoffmann  
Institut für Bioanalytische Chemie, Zentrum für Biotechnologie und  
Biomedizin, Universität Leipzig  
Deutscher Platz 5, 04103 Leipzig (Deutschland)  
E-Mail: hoffmann@chemie.uni-leipzig.de

[+] F.I.N and T.G. trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

[\*\*] Wir danken Prof. Dr. M. Blüher für die Serumproben, Dr. D. Knappe für hilfreiche Diskussionen, und Dr. A. Hagen für das Korrekturlesen. Die Forschung wurde unterstützt durch den European Fund for Regional Structure Development (EFRE, Europäische Union und Freistaat Sachsen). PEG = Polyethylenglycol.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201301533> zu finden.

gekuppelt werden konnte, gestaltete sich die Reinigung mittels RP-HPLC aufgrund der Peakverbreiterung als Folge des polydispersen PEG schwierig. Daher änderten wir die Synthesestrategie und kuppelten im letzten Schritt der Peptidsynthese Iodessigsäure an den ungeschützten N-Terminus, spalteten das Peptid ab und kuppelten nach dessen Reinigung das PEG<sup>750</sup> oder PEG<sup>5000</sup> als Thiol. Bei dieser Herangehensweise konnten die Prodrugs relativ einfach mittels RP-HPLC von den Edukten abgetrennt werden. In Serum wurden sowohl Onc72 (schwarz) als auch Onc110 (blau) langsam aus den mit PEG<sup>750</sup> (Quadrat) oder PEG<sup>5000</sup> (Rauten) aufgebauten Prodrugs mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten freigesetzt (Abbildung 1).

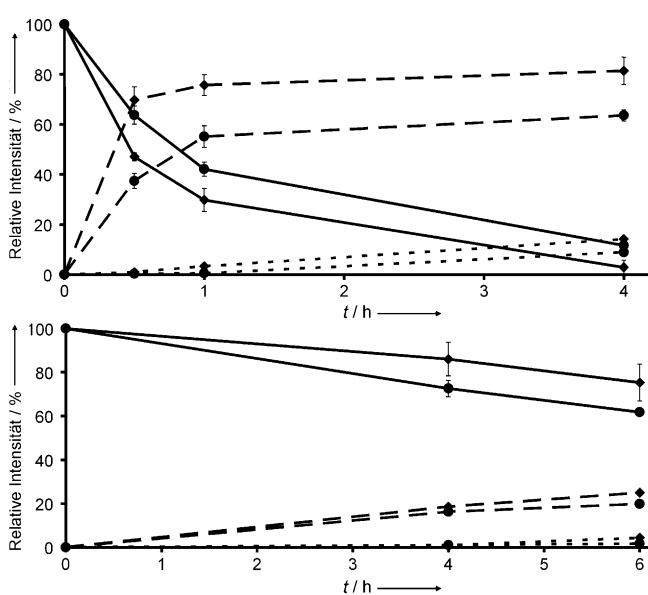


**Abbildung 1.** Abbau von PEG-GAR-Onc72 (schwarz), PEG-GAR-Onc110 (blau) und Api137 mit PEG-GRSG (rot) oder PEG-GARSG (grün) an der δ-Aminogruppe des Orn-1 in Mausserum (37°C). Die Peptidmengen wurden aus den Peakflächen berechnet (RP-HPLC, Absorption bei 214 nm) relativ zu den Peakflächen des ursprünglich eingesetzten und in Mausserum (100%) gelösten Peptids. Untersucht wurden PEG<sup>750</sup> (■) und PEG<sup>5000</sup> (◆). Durchgezogene Linien zeigen die PEGylierten Prodrugs, gestrichelte Linien die freigesetzten Peptide Onc72, Onc110 und Api137(SG) und gepunktete Linien das Abbauprodukt <sup>1-16</sup>Api137(SG).

Interessanterweise wurden beide Peptide mit der gleichen Geschwindigkeit aus den PEG<sup>750</sup>ylierten Prodrugs und den nicht-PEGylierten GAR-Onc72/Onc110 Sequenzen freigesetzt (Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Dies deutet darauf hin, dass zumindest für kurze PEGs die Freisetzung vornehmlich von der Erkennungssequenz abhängt und durch das Polymer nicht wesentlich beeinflusst wird. Bevor wir dies im Detail weiter verfolgten, testeten wir das Konzept ebenfalls an N-terminal modifizierten Peptiden. Für Api137,<sup>[9]</sup> welches einen guanidierten N-Terminus besitzt (Tabelle 1), reduzierte die Kupplung von PEG<sup>750</sup> an die δ-Aminogruppe des Ornithins in Position 1 der Peptidkette (Orn-1) die antibakterielle Aktivität mehr als 200fach. Da Proteasen einen über ein C-terminales Arginin an die Seitenkette von Orn-1 gekuppelten Peptidlinker nicht abspalten, haben wir das Tetrapeptid Gly-Arg-Ser-Gly (GRSG) als Linker eingebaut, sodass die Spaltstelle zwei Reste vom verzweigten Orn-1 entfernt ist. Dabei wurde PEG<sup>750</sup>-GR mit einer Halbwertszeit von 2 h abgespalten (Abbildung 1, rot, durchgezogene Linie).

Wurde der Linker um einen Alaninrest verlängert (d.h. GARSG), so reduzierte sich die Halbwertszeit in Serum auf nur 40 min (Abbildung 1, grün, durchgezogene Linie). Die Mengen des freigesetzten Api137(SG) stiegen mit dem Abbau der beiden Prodrugs an (Abbildung 1, gestrichelte Linie). Die späte Detektion des Abbauprodukts <sup>1-16</sup>Api137(SG) legt nahe, dass Api137 nicht abgebaut wird, solange es an PEG gekuppelt ist. Dies konnte auch massenspektrometrisch bestätigt werden. Das Signalmuster der Prodrugs war über den gesamten Zeitraum stabil und verschob sich nicht zu kleineren Massen.

Der Einfluss der Verzweigungsstelle wurde durch Substitution der Reste Asn-2 und Asn-3 in Api137 genauer untersucht, da diese gegen Orn mit einem der beiden Peptidlinker an der δ-Aminogruppe ohne nennenswerten Aktivitätsverlust ersetzt werden können.<sup>[6]</sup> Dadurch konnte die positive Ladung am N-Terminus von Api137, die für die antibakterielle Wirkung insbesondere gegen *Pseudomonas aeruginosa* wichtig ist, wiederhergestellt werden. Da die Freisetzung des Wirkstoffs für die Orn-2- und Orn-3-Derivate für beide Linkersequenzen und beide PEGs innerhalb der Fehlergrenzen identisch war, beschreiben wir hier nur die Ergebnisse des Orn-3-Peptids (Api301), während die Daten der Orn-2-Derivate in den Hintergrundinformationen gezeigt werden (Abbildung S2). Das aktive Peptid wurde relativ schnell aus Api301(PEG<sup>750</sup>-GRSG) freigesetzt ( $t_{1/2} \approx 30$  min), wobei die Menge innerhalb von 1 h auf etwa 70% des Prodrugs und danach nur noch geringfügig über die nächsten 3 h anstieg (Abbildung 2, oben). Stabiler war das entsprechende PEG<sup>5000</sup>-Derivat, aus dem innerhalb von 4 h nur ca. 20% Api301(SG) der ursprünglich eingesetzten Menge des Prodrugs freigesetzt wurden (Abbildung 2, unten). Die längeren



**Abbildung 2.** Abbau des mit PEG<sup>750</sup> (oben) und PEG<sup>5000</sup> (unten) über die N-terminalen Linker GRSG (◆) oder GARSG (●) PEGylierten Api301 in Mausserum (100%, 37°C). Durchgezogene Linien zeigen die PEGylierten Prodrugs, gestrichelte Linien das freigesetzte therapeutische Peptid Api301(SG) und gepunktete Linien das Abbauprodukt <sup>1-16</sup>Api301(SG).

Peptidlinker zeigten geringfügig langsamere Freisetzung von Api301(SG) und demzufolge auch nur sehr viel geringere Mengen an  $^{1-16}$ Api301(SG) am Ende der Inkubation (Abbildung 2). Der Einfluss des Prodrugs auf die antibakterielle Aktivität des Wirkstoffs wurde in TSB-Medium (tryptische Soja-Nährösung) und einer Mischung aus TSB-Medium und Mausserum getestet (Tabelle 2). In der Mischung war Api137

**Tabelle 2:** Antimikrobielle Aktivität der freien und PEGylierten Api- und Onc-Derivate sowie die Halbwertszeiten der Prodrugs in Serum.

Peptid	MHK [ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ] <sup>[a]</sup>		$t_{1/2}$ [min]
	TSB	Serum + TSB	
Api88	0.4	1.8	
Api137	0.5	0.2	
Api301 (SG)	0.8	0.2	
Api300 (PEG <sup>750</sup> -GRSG)	2.9	0.4	50
Api300 (PEG <sup>750</sup> -GARSG)	2.8	0.7	35
Api301 (PEG <sup>750</sup> -GRSG)	2.8	0.4	45
Api301 (PEG <sup>5000</sup> -GARSG)	9.3	0.6	> 360
Onc72	1.7	1.7	
Onc110	7.0	0.9	
PEG <sup>750</sup> -GAR Onc72	12	6	> 360
PEG <sup>750</sup> -GAR Onc110	24	12	> 360

[a] Die minimalen Hemm-Konzentrationen (MHK) wurden in 33% TSB-Medium oder 25% TSB-Medium unter Zusatz von 25% Mausserum bestimmt. Die Halbwertszeiten der PEGylierten Prodrugs wurden in Mausserum (37°C) über die Peakflächen der RP-Chromatogramme bestimmt.

etwas aktiver als in TSB-Medium. Im Vergleich dazu verschlechterte sich die Aktivität des weniger stabilen Api88 in Gegenwart von Serum vierfach. Im Unterschied zu den ohne Linker PEGylierten Verbindungen waren die PEG<sup>750</sup>- und PEG<sup>5000</sup>-G(A)RSG-Verbindungen in TSB-Medium leicht aktiv. In Anwesenheit von Mausserum stiegen deren antibakterielle Aktivitäten jedoch stark an und erreichten die gleichen MHK-Werte wie Api137. Diese hohe Aktivität war überraschend, da das aktive Peptid nur langsam freigesetzt wird, was eine entsprechend lange Vermehrung der Bakterien ermöglicht. Wahrscheinlich wird der anfängliche Wachstumsvorteil durch die kontinuierliche Freisetzung des Api301(SG) ausgeglichen, da über den gesamten Zeitraum ausreichende Mengen des aktiven Peptids vorliegen.

Zuletzt testeten wir den Abbau von Api300(PEG<sup>750</sup>-GRSG) in Blutproben von zehn gesunden Männern und Frauen (Alter:  $56 \pm 6$  Jahre), um die individuellen Abbauraten zu bestimmen. Insgesamt wurde das Prodrug langsamer als in Mausserum abgebaut, sodass nach 1 h noch  $60 \pm 16\%$  der ursprünglichen Menge detektiert wurden (Abbildung S3). Darüber hinaus unterschieden sich die Abbauraten in den einzelnen Proben nur geringfügig. Es ist anzumerken, dass die meisten Peptide, Api- und Onc-Peptide eingeschlossen, in Blut hauptsächlich durch Trypsin-ähnliche Proteasen abgebaut werden, die auch für die Spaltung des Prodrugs verantwortlich sind. Personen mit einer hohen Proteaseaktivität im Blut sollten den Wirkstoff daher schnell freisetzen, aber auch schnell abbauen, während Personen mit niedriger Proteaseaktivität den Wirkstoff langsam freisetzen und langsam abbauen. Folglich sollte die Konzentration des Wirkstoffs im

Blut aller Personen sehr ähnlich sein und weniger variieren, als die Kinetik der Freisetzung vermuten lässt.

Wir konnten hier ein neues Konzept zum temporären Schutz von Peptiden durch einen spaltbaren PEG-Peptid-Linker etablieren, bei dem die aktive Komponente systemisch durch Serumproteasen freigesetzt wird. Aufbauend auf den strukturellen Anforderungen eines Peptidwirkstoffs kann das PEG entweder N-terminal oder an eine Seitenkette gekuppelt werden, ohne die Funktion des Wirkstoffs zu beeinträchtigen. Dieses Konzept kann auch auf Peptidwirkstoffe mit einem C-terminalen Arg- oder Lys-Rest ausgeweitet werden. Die hier vorgestellte Strategie macht die Vorteile der PEGylierung (z. B. reduzierte Toxizität und Immunogenität, verlängerte Verweildauer im Blut) für kleine Peptide nutzbar, ohne deren Aktivität durch eine dauerhafte PEGylierung zu verringern – beispielsweise für Wirkstoffe wie Apidaecin und Oncocin, die intrazelluläre Zielproteine blockieren. Wichtig ist dabei, dass die Linkersequenz innerhalb eines bestimmten Bereichs so gewählt werden kann, dass der Wirkstoff wunschgemäß freigesetzt wird.

### Experimentelles

Die Peptide wurden an fester Phase im 25  $\mu\text{mol}$ -Maßstab an einem multipleten Synthesizer (SYRO2000, MultiSynTech GmbH, Witten, Deutschland) unter Verwendung der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl/tert-Butyl (Fmoc/tBu)-Chemie und In-situ-Aktivierung mit Diisopropylcarbodiimid und 1-Hydroxybenzotriazol synthetisiert. Die Seitenkette des zu verzweigenden Ornithins wurde mit der 4-Methyltrityl(Mtt)-Gruppe geschützt. Die N-Termini der Apidaecin-Derivate wurden guanidiert und danach die Mtt-Gruppe mit 2% Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten.<sup>[7a,8a]</sup> Die synthetisierten Peptide wurden mit TFA abgespalten, mit Diethylether gefällt, mittels RP-HPLC gereinigt und die Massen durch MALDI-TOF-MS bestätigt. Die MHK-Werte wurden für *E. coli* BL 21 AI in einem Titerverfahren (Triplikate) in 33% TSB-Medium oder 25% TSB-Medium unter Zusatz von 25% Mausserum bei 37°C über Nacht bestimmt. Der Abbau der Peptide und die Freisetzung der Peptide aus PEGylierten Prodrugs wurde durch die Inkubation der entsprechenden Verbindungen in Maus- oder Humanserum (37°C) bestimmt, wobei zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquote entnommen und mittels RP-HPLC analysiert wurden. Die Mengen der untersuchten Komponenten wurden aus den Peakflächen relativ zu der Peakfläche zu Versuchsbeginn ( $t = 0$  min) berechnet.

Eingegangen am 21. Februar 2013,  
veränderte Fassung am 15. April 2013  
Online veröffentlicht am 13. Juni 2013

**Stichwörter:** Antimikrobielle Peptide · Apidaecin · Oncocin · PEGylierung · Prodrugs

- [1] H. G. Boman, *J. Intern. Med.* **2003**, *254*, 197–215.
- [2] K. K. Kumarasamy, M. A. Toleman, T. R. Walsh, J. Bagaria, F. Butt, R. Balakrishnan, U. Chaudhary, M. Doumith, C. G. Giske, S. Irfan, P. Krishnan, A. V. Kumar, S. Maharjan, S. Mushtaq, T. Noorie, D. L. Paterson, A. Pearson, C. Perry, R. Pike, B. Rao, U. Ray, J. B. Sarma, M. Sharma, E. Sheridan, M. A. Thirunarayan, J. Turton, S. Upadhyay, M. Warner, W. Welfare, D. M. Livermore, N. Woodford, *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 597–602.
- [3] K. A. Brogden, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238–250.

- [4] M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 459–476.
- [5] a) R. Webster, E. Didier, P. Harris, N. Siegel, J. Stadler, L. Tilbury, D. Smith, *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 9–16; b) J. S. Kang, P. P. Deluca, K. C. Lee, *Expert Opin. Emerging Drugs* **2009**, *14*, 363–380.
- [6] a) R. B. Greenwald, Y. H. Choe, J. McGuire, C. D. Conover, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 217–250; b) D. Filpula, H. Zhao, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 29–49.
- [7] a) P. Czihal, D. Knappe, S. Fritsche, M. Zahn, N. Berthold, S. Piantavigna, U. Müller, S. Van Dorpe, N. Herth, A. Binas, G. Koehler, B. De Spiegeleer, L. L. Martin, O. Nolte, N. Sträter, G. Alber, R. Hoffmann, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1281–91; b) D. Knappe, S. Fritsche, G. Alber, G. Köhler, R. Hoffmann, U. Müller, *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2445–2451.
- [8] a) N. Berthold, P. Czihal, S. Fritsche, U. Sauer, G. Schiffer, D. Knappe, G. Alber, R. Hoffmann, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 402–409; b) D. Knappe, M. Zahn, U. Sauer, G. Schiffer, N. Sträter, R. Hoffmann, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 874–876.
- [9] a) L. Otvos, Jr., I. O, M. E. Rogers, P. J. Consolvo, B. A. Condie, S. Lovas, P. Bulet, M. Blaszczyk-Thurin, *Biochemistry* **2000**, *39*, 14150–14159; b) G. Kragol, S. Lovas, G. Varadi, B. A. Condie, R. Hoffmann, L. Otvos, Jr., *Biochemistry* **2001**, *40*, 3016–26.