

# Erweiterung des Konzeptes spezifischer Wirkstoff-Formulierungs additive auf nichtfluoreszierende Wirkstoffe: eine Studie zur Solubilisierung potenzieller Anti-Alzheimer-Wirkstoffe

Carmen Lawatscheck, Marcus Pickhardt, Sebastian Wieczorek, Andrea Grafmüller, Eckhard Mandelkow\* und Hans G. Börner\*

**Abstract:** Maßgeschneiderte Additive für die Wirkstoff-Formulierung ermöglichen die Testung potenzieller neuer Wirkstoffe mit ungünstigen pharmakologischen Eigenschaften. Zur Identifizierung wirkstoffaffiner Peptidsequenzen wird die Verteilung eines Wirkstoffs in großen Peptidbibliotheken mittels Raman-Mikroskopie verfolgt. Die Integration der Sequenzen in Peptid-Polymer-Konjugate ergibt spezifische Löslichkeitsvermittler, die prophylaktische und therapeutische Anti-Alzheimer-Wirkstoffe effektiv solubilisieren. Somit können maßgeschneiderte Additive nicht nur für fluoreszierende, sondern auch für nichtfluoreszierende Wirkstoffe gefunden werden.

Sowohl in akademischer als auch industrieller Forschung wird beträchtlicher Aufwand zur Entwicklung neuer Medikamente betrieben.<sup>[1]</sup> Statistisch gesehen werden in vorklinischen Studien von  $10^4$  potentiellen Wirkstoffen, die Krankheitsverläufe beeinflussen können, lediglich 5–10 genauer untersucht, und nur bei 1–2 der Wirkstoffe gelingt die Entwicklung eines industriellen Produkts.<sup>[2]</sup> Von großem Interesse sind vor allem stark lipophile und niedermolekulare Verbindungen, die aufgrund ihrer meist schlechten Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit oft schon in frühen Phasen der Wirkstoffentwicklung die Anforderungen nicht erfüllen.<sup>[3]</sup> Die Nachfrage nach effektiven Strategien, die eine direkte Untersuchung der Wirkstoffe ermöglichen, ist daher sehr groß. Die Vermeidung kosten- und ressourcenintensiver

Strukturvariationen zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit ist hierfür unerlässlich.<sup>[4]</sup>

Herkömmliche Strategien nutzen Formulierungs additive für die Wirkstoffsolubilisierung.<sup>[5]</sup> So wird in frühen Phasen der Wirkstoffbewertung oft Dimethylsulfoxid (DMSO) für erste Biotests zugesetzt.<sup>[6]</sup> Häufig werden auch Blockcopolymeren genutzt, die nicht nur die Löslichkeit und Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs erhöhen, sondern auch zur Stabilität des Wirkstoffs beitragen und die Integration komplexer Funktionen wie die Überwindung von physiologischen Barrieren oder kontrollierte Freisetzung und selektive Ablieferung in das Zielgewebe ermöglichen.<sup>[7]</sup>

Kürzlich wurde das Konzept der spezifischen Formulierungs additive<sup>[8]</sup> eingeführt, um die pharmazeutischen Eigenschaften von bioaktiven Stoffen gezielt zu verbessern. PEGylierte Peptid-Konjugate zeigten interessante Eigenschaften in biomedizinischen Anwendungen.<sup>[9]</sup> Durch nicht-kovalente Bindungen der Konjugate an organische Wirkstoffe mit geringer Wasserlöslichkeit konnten wasserlösliche Komplexe erzeugt werden.<sup>[10]</sup> Die präzise Aufnahme des Wirkstoffs erfolgt dabei über die Seitenfunktionalitäten des Peptids, während Löslichkeit und Abschirmung des Wirkstoffs durch die Polyethylenglykoleinheit (PEG) gewährleistet werden. So konnten z. B. unlösliche Wirkstoffe wie einige Kinase-lpsE-Inhibitoren und der Photosensibilisator *meta*-Tetra(hydroxyphenyl)chlorin (*m*-THPC)<sup>[8,10]</sup> durch Peptid-PEG-Konjugate in wasserlösliche Komplexe überführt werden. Durch die erhöhte Bioverfügbarkeit der Substanzen konnten Biotests durchgeführt werden, die ohne Additive nicht realisierbar waren.

Zuvor ermöglichte eine kombinatorische Strategie bereits die Selektion von Peptidsequenzen mit hoher Bindungsaffinität zu *m*-THPC aus umfangreichen Peptidbibliotheken mittels Fluoreszenzmikroskopie. Der Wirkstoff konnte durch entsprechende Peptid-PEG-Konjugate gut solubilisiert werden. Zudem waren die Auslösung der Freisetzung und eine Justierung der Freisetzungskinetik durch externe Stimuli möglich.<sup>[11]</sup> Die Erweiterung dieses Konzepts von fluoreszierenden auf nichtfluoreszierende Wirkstoffe ist von großem Interesse, da nur ein Bruchteil biologisch relevanter Substanzen fluoreszierende Eigenschaften aufweisen.

Nachfolgend berichten wir über einen erweiterten, auf Raman-Mikroskopie basierenden Ansatz für die Identifizierung von Peptiden zur Solubilisierung nichtfluoreszierender Wirkstoffe aus einer Peptidbibliothek (Abbildung 1). Das Prinzip der spezifischen Wirkstoffformulierung wurde am Beispiel von B4A1 gezeigt, einem potentiellen Anti-Alzhei-

[\*] C. Lawatscheck, S. Wieczorek, Prof. Dr. H. G. Börner

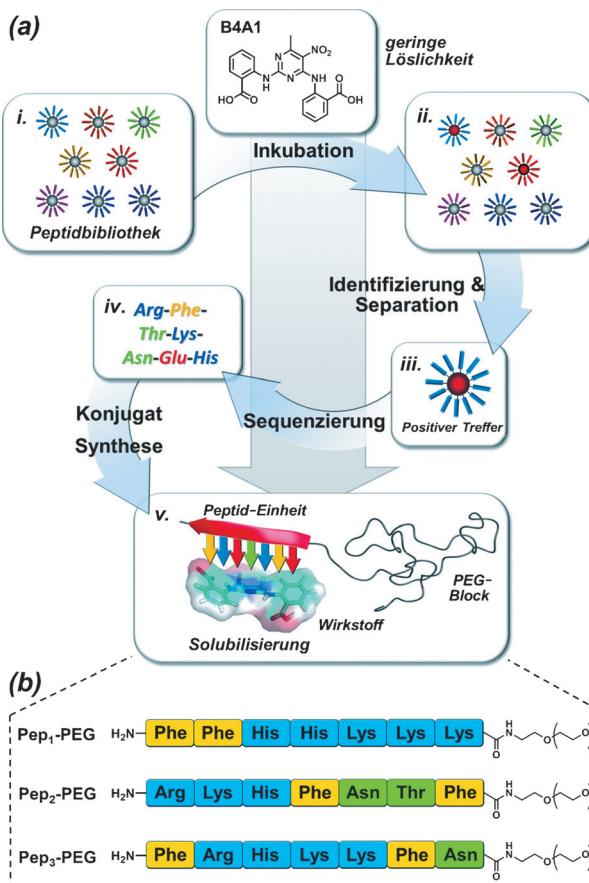
Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Chemie  
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)  
E-Mail: h.boerner@HU-Berlin.de

Dr. M. Pickhardt, Prof. Dr. E. Mandelkow  
Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE);  
Forschungszentrum CAESAR  
Ludwig-Erhard-Allee 2, 53175 Bonn (Deutschland)

Dr. A. Grafmüller  
Max-Planck-Institut für Kolloide und Grenzflächen  
Abteilung Theorie & Bio-Systeme  
Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam (Deutschland)

Prof. Dr. E. Mandelkow  
Max-Planck-Institut für Stoffwechselforschung  
Außenstation Hamburg, c/o DESY, Hamburg, (Deutschland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Materialien, Instrumente, experimentelle Vorschriften und analytische Daten) sind unter:  
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201601147> zu finden.



**Abbildung 1.** Design spezifischer Lösungsvermittler für den nichtfluoreszierenden potentiellen Anti-Alzheimer-Wirkstoff B4A1: (a) Inkubation einer Peptidbibliothek (i) mit B4A1. Anschließend können mittels Raman-Mikroskopie (ii) Träger mit starker Wirkstoffanreicherung identifiziert werden (iii), sodass durch die Sequenzierung des Peptidmaterials als einzelner Träger Sequenzen mit hoher Bindungskapazität zu B4A1 erhalten werden können (iv). Die Synthese der Sequenzen als Peptid-PEG-Konjugate (v) ergibt Pep<sub>1-3</sub>-PEG (b), die schließlich B4A1 solubilisieren sollen.

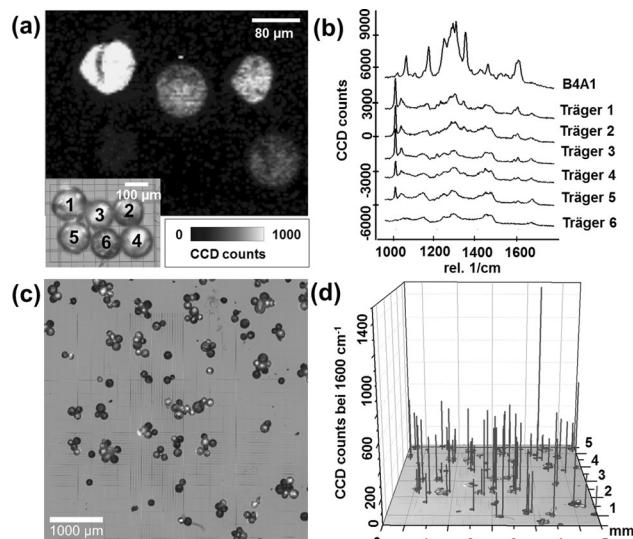
mer-Wirkstoff, der die Bildung von Tau-Protein-Aggregaten hemmen soll.<sup>[12]</sup> In DMSO-freien In-vitro-Studien konnte die Verbesserung der Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs durch Peptid-PEG-Konjugate bewiesen werden. Das Fundament zur Untersuchung problematischer Verbindungen ist durch diese Art der Wirkstoffformulierung gelegt.<sup>[13]</sup>

Aktuelle Behandlungen lindern in erster Linie die Symptome von Alzheimer-Patienten.<sup>[14]</sup> Fortschritte bei der Untersuchung der Alzheimer-Krankheit auf molekularer Ebene haben jedoch gezeigt, dass abgesehen von der pathologischen Plaquebildung durch das  $\beta$ -Amyloid-Peptid vor allem die abnormalen Veränderungen des Tau-Proteins, das zu neurotoxischen helikalen Fibrillen aggregiert, einen Großteil zum Fortschreiten von Alzheimer beiträgt.<sup>[15]</sup> Um Anti-Alzheimer-Wirkstoffe für prophylaktische oder therapeutische Behandlungen zu entwickeln, wurden vielversprechende Strategien mit Fokus auf Tau-Aggregationsinhibitoren entwickelt.<sup>[12]</sup> In einer In-vitro-Untersuchung wurde hierfür, neben Rhodanin- und Phenylthiazolylhydrazid-Derivaten,<sup>[16]</sup> die Verbindung B4A1 identifiziert, die sich in zellfreien Modellen

als wirksam gegen Tau-Aggregation erwies und sogar zur Deaggregation von bereits gebildeten Tau-Aggregaten führte. Allerdings wiesen die neuen potentiellen Wirkstoffe nur eine geringe Wasserlöslichkeit auf.<sup>[17]</sup>

Um maßgeschneiderte Peptidsequenzen mit hoher Affinität zu B4A1 identifizieren zu können, wurde eine Peptidbibliothek mit 7<sup>7</sup> verschiedenen Heptapeptiden unter Verwendung von ChemMatrix-Harz und der Split/Mix-Synthese hergestellt.<sup>[18]</sup> In Anbetracht der Wirkstoffstruktur wurden zur Synthese der Bibliothek die Aminosäuren L-Arg, L-Lys, L-His und L-Glu für die Bildung von ionischen Wechselwirkungen, L-Phe für Van-der-Waals- und  $\pi$ -Kontakte, sowie L-Thr und L-Asn für polare Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken ausgewählt. Um die anschließende Sequenzierung des Peptidmaterials zu ermöglichen, wurde das Segment Gly-Gly-Met zwischen die variable Peptideinheit und die feste Phase eingebaut, da Met leicht durch Bromcyan gespalten werden kann. Die vollständig entschützte Peptidbibliothek wurde über Nacht mit einer 2.7 mM Lösung von B4A1 in DMSO/Wasser (4:5 V/V) inkubiert, um eine schnelle Verteilung der kaum löslichen Substanz zu ermöglichen. Nach intensivem Waschen des inkubierten Trägermaterials wurden die Kugelchen auf einem Glasobjektträger fixiert, und anschließend wurde ein optisches Mikroskopbild der Träger aufgenommen, um deren Positionen zu bestimmen (Abbildung 2).

Mittels Raman-Mikroskopie konnte die Anreicherung von B4A1 an Festphasen mit passenden Peptidsequenzen unter Verwendung eines Lasers ( $\lambda = 785$  nm) analysiert werden. Das Raman-Spektrum von B4A1 wies eine intensive



**Abbildung 2.** Analyse der Anreicherung von B4A1 an peptidfunktionalisierten Harzträgern mittels Raman-Mikroskopie zur Identifizierung von Peptiden mit hohen Wirkstoffaffinitäten: Großflächiger Raman-Scan, der die Intensitäten einer für B4A1 charakteristischen Bande bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  zeigt (a, mit zugehörigem optischen Mikroskopbild) und die zugehörigen kompletten Raman-Spektren der Festphasen (b). Optisches Mikroskopbild eines Satzes inkubierter Bibliotheksträger (c) und visualisierte Analyse mittels Raman-Mikroskopie, die die Intensitäten der Bande bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  für jede einzelne Festphase zeigt. (d) Messungen mit „Auto-Focus-Single-Spectrum“  $2 \times 2$  s pro Spektrum.

Banden bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  auf, die der asymmetrischen C-C-Streckschwingung des aromatischen Ringsystems von B4A1 entspricht und im Folgenden als Referenzsignal genutzt wurde (Abbildung 2).<sup>[19]</sup> Ein hochauflösender Scan von sechs verschiedenen Trägern bewies, dass zwischen Trägern mit hoher und niedriger Wirkstoffanreicherung klar Unterschiede werden kann (Abbildung 2a,b). Ein größerer Satz von Festphasen wurde mit der „Auto-Focus“-Methode analysiert, wobei nur ein Spektrum in der Mitte jedes Trägers aufgenommen wurde. Auf diese Weise konnte die Messzeit enorm reduziert und die Vergleichbarkeit der Intensitäten der Raman-Banden aufgrund von optimiertem Fokus gewährleistet werden (siehe Abbildung 2c,d sowie Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). Infolgedessen wurde ein Intensitätswert von  $>1000$  CCD counts als Grenze für die Bewertung von Festphasen mit hoher Wirkstoffanreicherung festgelegt. 40 als positiv bewertete Träger wurden identifiziert und mittels Sequenzierung der Peptide über MALDI-ToF-MS/MS auf den einzelnen Träger 30 Sequenzen ermittelt (Tabelle S1). In Anbetracht der Wirkstoffstruktur erscheint es sinnvoll, dass die erhaltenen Peptide einen hohen Anteil an Phe und basischen Aminosäuren aufweisen. Offensichtlich sind  $\pi$ - $\pi$ - und Coulomb-Wechselwirkungen bei der Peptid-B4A1-Bindung vorherrschend. Interessanterweise treten die basischen Segmente der Peptide meist in 3er- 5er-Blöcken neben Phe auf. Asn und Thr ermöglichen Wasserstoffbrücken, z.B. mit der polaren Diamin-Pyrimidin-Kerneinheit von B4A1. Drei der identifizierten Sequenzen wurden als Peptid-PEG-Konjugate (Pep<sub>1-3</sub>-PEG) synthetisiert, um die Solubilisierung des Wirkstoffs durch die Konjugate und anschließende Biotests der Komplexe untersuchen zu können. Die ausgewählten Sequenzen weisen einen zusammenhängenden Block kationischer Reste auf, unterscheiden sich jedoch in der Stellung der Phe Einheiten. Während Pep<sub>1</sub>-PEG über eine Phe-Phe-Dyade verfügt, enthält Pep<sub>2</sub>-PEG einen polaren Asn-Thr-Abstandshalter im aromatischen Block, und bei Pep<sub>3</sub>-PEG flankieren die beiden Phe-Einheiten den kationischen Block. Unter Verwendung einer inversen Konjugationsstrategie der Festphasen-Peptidsynthese wurden die entsprechenden Peptid-Polymer-Konjugate mit PEG-Einheiten von  $M_n=3200$ <sup>[20]</sup> synthetisiert. Nach dem Abspalten der Konjugate Pep<sub>1-3</sub>-PEG von der Festphase erfolgte deren Isolation und Aufreinigung, sowie der Nachweis ihrer chemischen Strukturen mithilfe von Massenspektrometrie und NMR (siehe die Hintergrundinformationen).

Alle Konjugate waren sehr gut wasserlöslich und wirksame Formulierungsadditive, die die Wasserlöslichkeit von B4A1 im Vergleich zu Solubilisierungsexperimenten mit PEG oder Wasser beträchtlich erhöhten (Abbildung S9). UV/Vis-Spektroskopie bei 384 nm ermöglichte die Bestimmung der maximalen Beladungskapazitäten der Konjugate.<sup>[10]</sup> Es konnte eine deutliche Abhängigkeit der Kapazität von der Peptidsequenz beobachtet werden. Während Pep<sub>1</sub>-PEG und Pep<sub>2</sub>-PEG die höchsten Beladungen von 0.83 mmol und 0.94 mmol Wirkstoff pro mmol Transporter zeigten, wurde bei Pep<sub>3</sub>-PEG nur eine Beladung von 0.65 mmol Wirkstoff pro mmol Transporter erreicht. Die gemessenen Beladungen waren 5- bis 7-fach höher als bei Verwendung von Cremophor ELP als Referenz.<sup>[21]</sup> Das bereits klinisch eingesetzte For-

mulierungsadditiv konnte nur 0.13 mmol B4A1 pro mmol Cremophor solubilisieren, was die Effektivität der neu identifizierten Transporter unterstreicht.

Eine genauere Betrachtung der Aminosäuresequenzen könnte darauf hindeuten, dass ein blockartiges Auftreten von kationischen und aromatischen Einheiten im Peptid vorteilhaft ist und dass ein flexibler, polarer Abstandshalter zwischen den beiden aromatischen Resten zu optimalen Bindungskontakten beiträgt. Bemerkenswerterweise wurde mit Pep<sub>2</sub>-PEG ein nahezu stöchiometrisches molares B4A1-Transporter-Verhältnis von  $1:1.1 \pm 0.1$  erreicht. Damit verbessert der Transporter die Verfügbarkeit von B4A1 um das 20-fache im Vergleich zur normalen Löslichkeit des potentiellen Wirkstoffes in Wasser. Die anderen Transporter zeigten ebenfalls zufriedenstellende molare Verhältnisse von  $1:1.2 \pm 0.1$  für Pep<sub>1</sub>-PEG und  $1:1.5 \pm 0.4$  für Pep<sub>3</sub>-PEG. Um diese Sequenzabhängigkeit der Transportkapazität verstehen zu können, wurden idealisierte 1:1-Komplexe von B4A1 und den Peptid-Bindungsdomänen (Pep<sub>1-3</sub>) simuliert (Abbildung 3, Abbildung S10 und S11).

Die Simulationen zeigen, dass jede der drei Peptidsequenzen deutlich an B4A1 bindet. Die dabei entstehenden Komplexe sind mit Wechselwirkungsenergien von rund  $-200\text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $-150\text{ kJ mol}^{-1}$  und  $-180\text{ kJ mol}^{-1}$  für Pep<sub>1</sub>/B4A1, Pep<sub>2</sub>/B4A1 bzw. Pep<sub>3</sub>/B4A1 eher dynamischer Natur. Die Analyse der beiden effektivsten Transporter ergab, dass im Allgemeinen Pep<sub>2</sub>/B4A1-Komplexe eine größere Zahl an Konformationen gleicher Energie als Pep<sub>1</sub>/B4A1 aufweisen. Aufgrund des Abstandhalters zwischen Phe<sub>1</sub> und Phe<sub>4</sub> wurde ein höherer Freiheitsgrad an Konformationen für Pep<sub>2</sub> erwartet. Repräsentative Momentaufnahmen der Simulationen (Abbildung 3) zeigen mehrere intra- und intermolekulare Wechselwirkungen zwischen dem Wirkstoff und den Peptiden. Statistisch gesehen sind  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen bei Pep<sub>1</sub>/B4A1 und Pep<sub>2</sub>/B4A1 mit durchschnittlichen 1.3 bzw. 1.4  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen vorherrschend. Pep<sub>1</sub> und B4A1 bilden

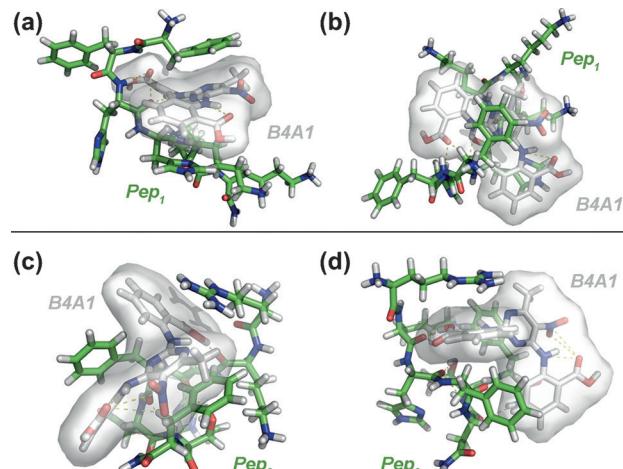


Abbildung 3. Repräsentative Momentaufnahmen der MD-Simulationen der Bindung von B4A1 (Darstellung als Van-der-Waals-Oberfläche) an maßgeschneiderte Peptidsequenzen (Darstellung als Stabmodell) in idealisierten 1:1-Komplexen: Pep<sub>1</sub>/B4A1 (oben), Pep<sub>2</sub>/B4A1 (unten). Seitenansicht (a,c) und Draufsicht (b,d); Simulationen wurden mit PyMOL visualisiert.

meist  $\pi$ -Kontakte zwischen einem Phe-Rest und dem zentralen Pyrimidinring von B4A1 aus (80% parallele und 20% senkrechte Wechselwirkungen). Weitere  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen wurden zwischen einem der His-Reste und einer Aminobenzoësäuregruppe von B4A1 festgestellt. Wasserstoffbrücken traten zwischen dem Rückgrat des Peptids und beiden sekundären Aminen bzw. den Carboxylgruppen von B4A1 auf. Interessanterweise deuten Phe<sub>2</sub> und die drei Lysin-Reste häufig vom Wirkstoff weg und ragen in die Lösungsmittelumgebung. Die Bindungsarten zwischen Pep<sub>2</sub> und B4A1 weisen auf  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen der Pyrimidineinheit von B4A1 und einem Phe-Rest hin (65–75% parallele und 25–35% senkrechte Wechselwirkungen). In der abgebildeten Konformation ist z.B. eine Aminobenzoësäureeinheit von Phe<sub>4</sub> und Arg<sub>1</sub> umgeben, und T-förmige  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen und Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen sind deutlich erkennbar. Wasserstoffbrücken werden zwischen der Carbonsäurefunktion von B4A1 und dem Rückgrat des Peptids gebildet. Der Komplex wird durch Wasserstoffbrücken innerhalb des Peptides zwischen der Seitenkette von Thr<sub>6</sub> und den Amiden des Peptidrückgrats zusätzlich stabilisiert.

Die Trennung der beiden Phe-Reste bei Pep<sub>2</sub> durch zwei polare Aminosäuren ermöglicht zusätzliche Freiheitsgrade. Dasselbe gilt für Arg<sub>1</sub> und Phe<sub>4</sub>, die durch Lys<sub>2</sub>-His<sub>3</sub> voneinander getrennt sind. Verglichen mit dem Komplex Pep<sub>1</sub>/B4A1 lassen diese Abstandshalter eine dynamischere Komplexierung von B4A1 durch Pep<sub>2</sub> zu. Offensichtlich ist eine blockartige Anordnung der aromatischen und kationischen Reste wie bei Pep<sub>1</sub> weniger vorteilhaft für die Bindung des Wirkstoffs. Obwohl die Bindungswechselwirkungen nur modellartigen Charakter besitzen, stimmen die Beobachtungen mit den Solubilisierungsexperimenten überein, bei denen Pep<sub>1</sub>-PEG eine geringere Kapazität als Pep<sub>2</sub>-PEG zeigt. Entsprechend ist es umso wahrscheinlicher, dass die modulierten Wechselwirkungen auch in den tatsächlich vorliegenden B4A1/Transporter-Komplexen auftreten. Zum Vergleich wurden auch für den Pep<sub>3</sub>/B4A1-Komplex, der bei den Solubilisierungsexperimenten die geringste Kapazität aufweist, Simulationen durchgeführt. Auch wenn sich die verhältnismäßig geringe Kapazität von Pep<sub>3</sub> nicht in der Wechselwirkungsenergie, die zwischen denen von Pep<sub>1</sub>/B4A1 und Pep<sub>2</sub>/B4A1 liegt, widerspiegelt, kann sie anhand der Modellierungen erklärt werden. Es konnten Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Arg<sub>2</sub> und B4A1 beobachtet werden, aber anscheinend ist Phe<sub>1</sub>, das sich am N-Terminus neben Arg<sub>2</sub> befindet, nicht an der Bindung beteiligt, da es ohne Kontakt zu B4A1 in die Lösungsmittelumgebung ragt (Abbildung S13). Somit wechselwirkt nur eines der beiden Phe mit B4A1, sodass sich im Durchschnitt lediglich 1.0  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen ergeben. Auch die His-Lys-Lys-Einheit deutet von B4A1 weg. Die Hauptwechselwirkung zwischen Pep<sub>3</sub> und B4A1 bildet sich also zwischen Arg<sub>2</sub> und Phe<sub>6</sub>, wobei allerdings die parallele  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung oft leicht verschoben ist und somit weniger stark als bei Pep<sub>1</sub>/B4A1 und Pep<sub>2</sub>/B4A1 ausfällt.

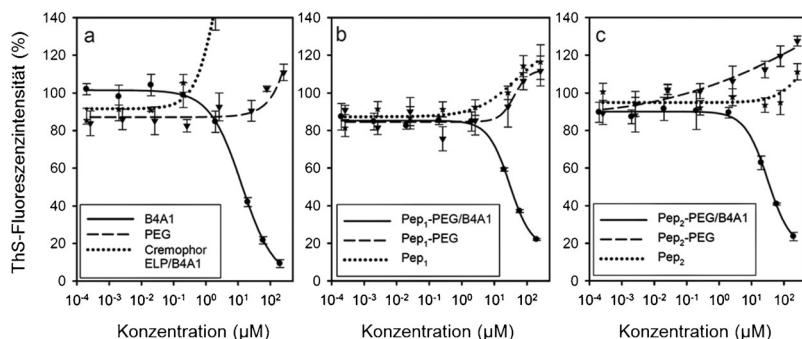
Dynamische Lichtstreuungsexperimente (DLS) zeigten, dass alle Peptid-PEG-Konjugate bei der Wirkstoffbeladung kolloide Aggregate bilden. Während alle Konjugate vor der

Beladung molekular gelöst sind, wurden für die Komplexe Pep<sub>1</sub>-PEG/B4A1, Pep<sub>2</sub>-PEG/B4A1 und Pep<sub>3</sub>-PEG/B4A1 hydrodynamische Radien ( $R_h$ ) von 105 nm, 175 nm bzw. 110 nm bestimmt. Aufgrund der chemischen Struktur von B4A1, die Wechselwirkungen mit den Transporterpeptiden an mehreren Stellen ermöglicht, wurde diese wirkstoffinduzierte Aggregation erwartet. Sie ist von Vorteil, da der Abbau des Transporters von einem Biosystem nach der Wirkstoffabgabe erleichtert werden könnte. Solch ein Mechanismus war für Cremophor nicht ersichtlich. Aufgrund seiner stark amphiphilen Natur weist dieses Additiv vor und nach der Beladung mit B4A1 in Wasser Aggregate mit  $R_h = 12–13$  nm auf. Eine Quantifizierung der Wirkstoff-Transporter-Bindungen mit Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) wäre an dieser Stelle wichtig. Aufgrund der Komplexität des Systems sind diese jedoch schwer zu bestimmen.

Wirksame Formulierungsadditive müssen nicht nur die Löslichkeit erhöhen, sondern auch geringe Toxizitäten aufweisen und die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs gewährleisten, um Einfluss auf den ausgewählten Bioprozess zu haben. Vor der Untersuchung des Einflusses der Transporter auf die B4A1 Aktivität wurden die Effekte der Substanz-Transporter-Komplexe auf die Zellapoptose bei Neuroblastom-2a-(N2a)-Zelllinien mittels Annexin-V-Test (siehe S17 in den Hintergrundinformationen) bestimmt. Diese Zellen exprimieren Tau<sup>4RD</sup> $\Delta$ K280-Proteine und stellen ein etabliertes Referenzsystem für Alzheimer-Therapieansätze dar. Die N2a-Zellen wurden mit B4A1 oder Transporter/B4A1-Komplexen inkubiert, und apoptotische Zellen wurden mit Annexin V angefärbt. Im Vergleich mit der Referenz, die 16% Zellapoptose aufweist, zeigten alle Transporter und Pep<sub>1,3</sub>-PEG/B4A-Komplexe eine deutlich geringere Apoptose von 8–12% (Abbildung S10). Interessanterweise weist der Cremophor/B4A1-Komplex mit 55% die bei weitem höchste Apoptoserate auf, was daran liegen könnte, dass aufgrund des geringen Beladungsgrades eine große Menge an Solubilisator verwendet werden musste. Offensichtlich haben Peptid-PEG-Konjugate und die zugehörigen Wirkstoffkomplexe eine deutlich geringere Toxizität als die Cremophor-ELP-Komplexe.

Die beiden vielversprechendsten Komplexe Pep<sub>1</sub>-PEG/B4A1 und Pep<sub>2</sub>-PEG/B4A1 wurden in Hinblick auf ihre Aktivität bezüglich der Deaggregation von Tau-Protein-Agglomeraten näher untersucht. In In-vivo-Studien müssen die Wirkstoff-Transporter-Komplexe das Eindringen von B4A1 in neuronale Gehirnzellen erleichtern, wobei sowohl die Blut-Hirn-Schranke als auch die Zellmembran passiert werden müssen. Ein kürzlich entwickelte, leistungsfähige In-vitro-Untersuchung ermöglichte eine schnelle Bewertung der Wirkstoffaktivität. Hierbei wird der Grad der Deaggregation zuvor gebildeter K19-Tau-Aggregate (Tau<sup>3RD</sup>; „Wiederholungseinheit“ von Tau, die für die Aggregation verantwortlich ist)<sup>[22]</sup> durch konzentrationsabhängige Thioflavin-S(ThS)-Fluoreszenzanalyse detektiert.

Zellfreie Modelle, die auf aggregierten Tau<sup>3RD</sup>-Plaques basieren, zeigen mit steigender Konzentration von solubilisiertem B4A1 eine effektive Abnahme der ThS-Fluoreszenz. Es konnten vielversprechende mittlere Wirkstoff Konzentrationswerte für die Deaggregation von Tau-Aggregaten



**Abbildung 4.** Bestimmung der B4A1-Aktivität auf die Deaggregation von Tau<sup>3RD</sup>-Aggregaten mit und ohne maßgeschneiderte Formulierungsadditive mittels In-vitro-ThS-Untersuchungen. Die verbleibende ThS-Fluoreszenz nach der Inkubation in Anwesenheit von B4A1 und PEG (a), der Peptide Pep<sub>1</sub> und Pep<sub>2</sub> (b,c), der Konjugate Pep<sub>1</sub>-PEG und Pep<sub>2</sub>-PEG (b,c) oder der Komplexe Pep<sub>1</sub>-PEG/B4A1 und Pep<sub>2</sub>-PEG/B4A1 (b,c) wurde prozentual zur unbehandelten Kontrollmessung aufgetragen.

(DC<sub>50</sub>) für Pep<sub>1</sub>-PEG/B4A1 und Pep<sub>2</sub>-PEG/B4A1 von  $31.1 \pm 1.1 \mu\text{M}$  und  $37.5 \pm 3.0 \mu\text{M}$  bestimmt werden (Abbildung 4). Dagegen induzierte Cremophor/B4A1 aufgrund der stark amphiphilen Natur des Additivs zusätzliche Aggregation des Tau-Proteins, sodass kein DC<sub>50</sub>-Wert bestimmt werden konnte. Darüber hinaus zeigt die Substanz B4A1 allein in analogen DMSO-freien Untersuchungen keine messbare Aktivität, da sie eine schlechte Wasserlöslichkeit und Verfügbarkeit aufweist. Kontrollexperimente bewiesen, dass weder PEG noch die Peptide oder Peptid-PEG-Konjugate erhebliche Effekte auf die Deaggregation des Tau-Proteins haben (Abbildung 4). Offensichtlich erfolgt die Freigabe des potentiellen Wirkstoffs von den maßgeschneiderten Additiven problemlos, sodass die Auflösung der Tau-Aggregate ungehindert erfolgen kann. Untersuchungen unter gleichen Bedingungen, jedoch unter Verwendung von DMSO, das B4A1 anstelle der Biokonjugate solubilisierte, zeigten das große Potenzial von B4A1. Der gemessene DC<sub>50</sub>-Wert von  $13.5 \pm 1.9 \mu\text{M}$  ist geringfügig kleiner als Werte für den Peptid-PEG-unterstützten Wirkstoff. Dennoch befinden sich alle DC<sub>50</sub>-Werte in einem vergleichbaren, unteren mikromolaren Bereich. Hierfür muss berücksichtigt werden, dass die Solubilisierung von B4A1 mit DMSO zu einer direkten Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und Tau-Protein-Aggregaten führt, während für die Pep-PEG/B4A1-Komplexe ein konkurrierendes Gleichgewicht zwischen B4A1, der Peptidbindungsdomäne und dem Tau-Protein zu erwarten ist. Das könnte zu den erhöhten DC<sub>50</sub>-Konzentrationen bei den B4A1-beladenen Komplexen führen. Zieht man jedoch aktuelle Untersuchungen, die potentielle Effekte DMSO-haltiger Substanz-Ausgangslösungen auf wichtige Proteinfunktionen in Wirkstofftests diskutieren, in Betracht, so ist klar ersichtlich, dass alternative Solubilisierungssysteme und DMSO-freie Tests für die frühe Wirkstoffbewertung zwingend erforderlich sind.<sup>[6]</sup>

Um die Vielseitigkeit des allgemeinen Konzepts zu belegen, wurden für BB14, einem schwer löslichen und strukturell deutlich abweichendem potentiellen Anti-Alzheimer-Wirkstoff, ebenfalls Peptid-PEG-Transporter entwickelt (siehe die Hintergrundinformationen).<sup>[16a]</sup> Die optimierte Prozedur ergab eine Auswahl an wirkstoffbindenden Peptiden (Tabelle S5).

Von diesen wurden drei Transporter mit strukturellen Ähnlichkeiten als Peptid-PEG-Konjugate synthetisiert (Pep<sub>4-6</sub>-PEG). Die höchste Beladung wurde mit Pep<sub>6</sub>-PEG mit einer Solubilisierung von 0.09 mmol BB14 pro mmol Konjugat erreicht.

Zusammenfassend wurde eine kombinatorische Screening-Prozedur durch konfokale Raman-Mikroskopie erweitert, um Peptide für maßgeschneiderte Löslichkeitsvermittler basierend auf Polyethylenglykol-block-Peptid-Konjugaten (PEG-Peptid) zu identifizieren, mit denen die nichtfluoreszierenden potentiellen Anti-Alzheimer-Wirkstoffe B4A1 und BB14 in wasserlösliche Komplexe überführt werden. Die Peptid-PEG-Transporter zeigten exzellente Beladungskapazitäten und solubilisierten die Substanzen in kolloiden Aggregaten, die vernachlässigbare Apoptosewerte ergaben. Diese waren in der Lage, Tau-Protein-Aggregate in einem DMSO-freien In-vitro-Test mit vielversprechenden DC<sub>50</sub>-Werten wieder aufzulösen. Diese Studie, die die Möglichkeit aufzeigt, nichtfluoreszierende niedermolekulare organische Substanzen in wasserlösliche Komplexe zu überführen, könnte auf zahlreiche potentielle Wirkstoffe mit unerwünschten pharmakologischen Eigenschaften erweitert werden.

## Danksagung

Wir danken E. Krause und H. Stephanowitz (FMP Berlin, Deutschland) für die MS-Sequenzierung und K. Linkert (HU Berlin) und B. Bulic für die Synthese von Konjugaten und B4A1. Die Finanzierung wurde vom Europäischen Forschungsrat unter dem 7. Forschungsrahmenprogramm (FP07-13)/ERC Starting grant „Specifically Interacting Polymers-SIP“ (ERC 305064) der Europäischen Union an H.G.B. und vom BMBF (Kompetenznetz für neurodegenerative Demenzen) und Wellcome Trust/MRC an E.M. gewährleistet.

**Stichwörter:** Alzheimer-Wirkstoffe · Biokonjugate · Kombinatorisches Screening · Präzisionspolymere · Tau-Protein

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8752–8756  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 8894–8899

- [1] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3.
- [2] S. Dunne, B. Shannon, C. Dunne, W. Cullen, *BMC Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *14*, 1.
- [3] a) J.-H. Zhang, T. D. Y. Chung, K. R. Oldenburg, *J. Biomol. Screening* **1999**, *4*, 67; b) T. Kennedy, *Drug Discovery Today* **1997**, *2*, 436.
- [4] S. M. Paul, D. S. Mytelka, C. T. Dunwiddie, C. C. Persinger, B. H. Munos, S. R. Lindborg, A. L. Schacht, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 203.

- [5] a) A. Beig, J. M. Miller, A. Dahan, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *81*, 386; b) M. E. Herbig, D.-H. Evers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 158.
- [6] A. Tjernberg, N. Markova, W. J. Griffiths, D. Hallén, *J. Biomol. Screening* **2006**, *11*, 131.
- [7] a) R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 347; b) Y. Bae, S. Fukushima, A. Harada, K. Kataoka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4640; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4788; c) M. R. Radowski, A. Shukla, H. von Berlepsch, C. Bottcher, G. Pickaert, H. Rehage, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1265; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1287; d) W. B. Liechty, D. R. Kryscio, B. V. Slaughter, N. A. Peppas, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2010**, *1*, 149; e) D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751; f) D. Huesmann, A. Sevenich, B. Weber, M. Barz, *Polymer* **2015**, *67*, 240; g) A. V. Kabanov, V. Y. Alakhov, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2002**, *19*, 1; h) R. Luxenhofer, Y. Han, A. Schulz, J. Tong, Z. He, A. V. Kabanov, R. Jordan, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 1613; i) K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6430; j) T. Steinbach, F. R. Wurm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6098; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 6196.
- [8] A. K. H. Hirsch, F. Diederich, M. Antonietti, H. G. Börner, *Soft Matter* **2010**, *6*, 88.
- [9] a) M. Danial, M. J. Root, H.-A. Klok, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1438; b) L. Hartmann, H. G. Börner, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 3425; c) D. Schaffert, C. Troiber, E. E. Salcher, T. Fröhlich, I. Martin, N. Badgujar, C. Dohmen, D. Edinger, R. Kläger, G. Maiwald, K. Farkasova, S. Seeber, K. Jahn-Hofmann, P. Hadwiger, E. Wagner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8986; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9149; d) J. V. Georgieva, R. P. Brinkhuis, K. Stojanov, C. Weijers, H. Zuilenhof, F. Rutjes, D. Hoekstra, J. C. M. van Hest, I. S. Zuhorn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8339; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8464; e) K. Hildebrandt, T. Pauloehr, J. P. Blinco, K. Linkert, H. G. Börner, C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2838; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 2880; f) T. Schwemmer, J. Baumgartner, D. Faivre, H. G. Börner, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2385.
- [10] S. Wieczorek, E. Krause, S. Hackbarth, B. Röder, A. K. H. Hirsch, H. G. Börner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1711.
- [11] S. Wieczorek, S. Vigne, T. Masini, D. Ponader, L. Hartmann, A. K. H. Hirsch, H. G. Börner, *Macromol. Biosci.* **2015**, *15*, 82.
- [12] I. Khlistunova, J. Biernat, Y. P. Wang, M. Pickhardt, M. von Bergen, Z. Gazova, E. Mandelkow, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1205.
- [13] a) A. Sydow, A. Van der Jeugd, F. Zheng, T. Ahmed, D. Baluschun, O. Petrova, D. Drexler, L. Zhou, G. Rune, E. Mandelkow, R. D'Hooge, C. Alzheimer, E.-M. Mandelkow, *J. Mol. Neurosci.* **2011**, *45*, 432; b) C. Fatouros, G. J. Pir, J. Biernat, S. P. Koushika, E. Mandelkow, E.-M. Mandelkow, E. Schmidt, R. Baumeister, *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 3587.
- [14] S. Salomone, F. Caraci, G. M. Leggio, J. Fedotova, F. Drago, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *73*, 504.
- [15] a) Y. Hong-Qi, S. Zhi-Kun, C. Sheng-Di, *Transl. Neurodegener.* **2012**, *1*, 21; b) B. Bulic, M. Pickhardt, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Neuropharmacology* **2010**, *59*, 276.
- [16] a) B. Bulic, M. Pickhardt, I. Khlistunova, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9215; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9375; b) M. Pickhardt, G. Larbig, I. Khlistunova, A. Coksezen, B. Meyer, E.-M. Mandelkow, B. Schmidt, E. Mandelkow, *Biochemistry* **2007**, *46*, 10016.
- [17] A. Pickhardt, J. Biemat, I. Khlistunova, Y.-P. Wang, Z. Gazova, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Curr. Alz. Res.* **2007**, *4*, 397.
- [18] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82.
- [19] M. M. Kubota, B. L. Sacco, D. C. Bento, H. de Santana, *Spectrochim. Acta Part A* **2015**, *151*, 80.
- [20] J.-F. Lutz, H. G. Börner, *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 1.
- [21] C. L. Burnett, B. Heldreth, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, D. C. Liebler, J. G. Marks, R. C. J. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, F. A. Andersen, *Int. J. Toxicol.* **2014**, *33*, 13S.
- [22] M. Pickhardt, M. von Bergen, Z. Gazova, A. Hascher, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Curr. Alzheimer Res.* **2005**, *2*, 219.

Eingegangen am 1. Februar 2016

Online veröffentlicht am 10. Juni 2016