

DISS. ETH NO. 23258

Improving enzymatic oral therapies via site-specific polymer conjugation

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

JESSICA DAGMAR SCHULZ

M. Sc. in Chemistry, ETH Zurich

born on 16.08.1987

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Jean-Christophe Leroux

Prof. Dr. Laura Nyström

2016

Abstract

CELIAC disease is an autoimmune disorder which is triggered by gluten, a main proteinic constituent of various grains. The disease-specific inflammation of the small intestine is developed upon gluten ingestion by individuals who carry a genetic predisposition (~1% worldwide). Thereby, immunogenic gluten peptides are taken up by the small intestine where they induce a cascade of inflammatory processes that leads to *e.g.*, villus atrophy and intraepithelial lymphocytosis, which in turn increases the risk of developing certain cancers. Classical symptoms consist of abdominal pain, bloating and diarrhea, but patients also often suffer from fatigue, depression and anemia. Unfortunately, pharmaceutical treatments are not available and currently only a gluten-free diet can relieve patients from symptoms and helps avoiding the intestinal damage. Various pharmacological approaches have reached clinical trials among which one promising strategy to tackle celiac disease stands out: the oral application of enzymes that can cleave the gluten peptides in the gastro-intestinal tract. However, the harsh conditions of the oral route can deactivate the enzymes. In order to develop an efficient oral therapy the biomolecules need to be stabilized *in vivo*. To this end, in this work site-specific polymer conjugation was tested on prolyl endopeptidases (PEPs) known to effectively break-down gluten peptides. Conjugated polymers can stabilize proteins in the gastro-intestinal tract by protecting them from enzymatic degradation and physical denaturation. In addition, when performed in a site-specific manner polymer attachment can enable the enzymes to retain high activity upon modification.

Two PEPs derived from *Myxococcus xanthus* (MX) and *Spingomonas capsulate* (SC) were engineered to contain cysteine residues that provided the free thiol groups on their surface to which the polymers were conjugated. A library of single, double and triple cysteine-mutated PEPs was successfully produced with the aim of covering most of the enzymes' surfaces upon polymer attachment. While mutagenesis caused activity loss in the SC mutants, all MX mutants preserved full MX wild-type (MX WT) activity and led to the successful generation of two threefold mutated variants (MX3.1 and MX3.2).

Covalent site-specific polymer conjugation was subsequently investigated. First, two different sizes of the linear polymer poly(ethylene glycol) (PEG, 5 and 40 kDa) were

conjugated to mutant MXs. The threefold attachment of PEG to MX3.1 and MX3.2 caused different impairments on activity (30% *vs.* 65% respectively) indicating that the attachment sites are of high importance for activity preservation. Interestingly, no difference in activity was observed when comparing the MX conjugated to three PEG5 or PEG40 chains. Additionally, the polycationic dendrimer poly(amido amine) (PAMAM, 6.9 kDa) was attached to the cysteine-mutated MXs. The triple attachment of PAMAM to MX3.1 led to full MX WT activity indicating that the polymer chains do not interfere with the enzyme's dynamics at these positions, probably due to the dendrimer's compact and precise structure. The most active bioconjugates of MX3.1 with highest *in vitro* stability under simulated intestinal conditions were then tested *in vivo*. A gluten-specific sequence carrying a quenched dye that turns fluorescent upon peptide cleavage was orally administered to rats. Subsequently, MX or MX-polymer conjugate were applied and the cleavage of the substrate was detected through the rats' abdomens over time. The MX WT and mutant MX were directly deactivated in the gastro-intestinal tract as no signal was observed. In the case of the conjugate with the three short PEG5 chains some fluorescence was detected but it was statistically not distinguishable from that of the native enzyme. In contrast, the longer PEG40 chain as well as PAMAM triply conjugated to MX3.1 led to significant signals upon oral administration. Importantly, the stabilization effect of the polymers was also maintained when the conjugates were administered to the digestive tract of rats 1 or 2 h before the substrate was applied.

The findings presented in this thesis have helped gaining a better understanding of the protection of enzymes by polymers in the gastro-intestinal tract. By attaching the polymers site-specifically, structure-activity relationships could be established. Two of the triply mutated MX3.1 conjugates produced in this project successfully retained their activity in the digestive tract of rats and therefore position themselves as promising candidates for the supportive treatment of celiac disease. Finally, the knowledge stemming from this research is a valuable contribution to the general field of oral therapeutic proteins tract.

Zusammenfassung

ZÖLIAKIE ist eine Autoimmunerkrankung, die durch Gluten, Hauptbestandteil vieler Getreidesorten, ausgelöst werden kann. Die krankheitspezifische Entzündung des Dünndarms kann nach dem Konsum von Glutenprodukten in genetisch prädispositionierten Personen hervorgerufen werden (1% der weltweiten Bevölkerung). Immunogene Peptidfragmente, die durch den teilweisen Verdau von Gluten entstehen, können im Dünndarm von Zöliakieerkrankten aufgenommen werden. Dort induzieren diese eine Reihe von Entzündungsmechanismen, die z.B. zu Zottenatrophie und intraepithelialer Lymphozytose führen. Klassische Symptome bestehen aus Bauchschmerzen, Blähungen und Diarrhö, wobei Patienten oftmals auch unter anderen Auswirkungen wie z.B. chronischer Müdigkeit, Depressionen und Anämie leiden. Zudem kann die chronische Entzündung zu einem höheren Darmkrebsrisiko führen. Bis heute ist keine medizinische Behandlung möglich und nur eine strikte gluten-freie Ernährung beugt Symptomen und der Entzündung im Dünndarm vor. Einige pharmakologische Ansätze, die der Behandlung von Zöliakie dienen könnten, wurden bereits in klinischen Studien getestet. Eine Möglichkeit der gluten-induzierte Entzündung vorzubeugen, ist die orale Verabreichung von Enzymen, welche die immunogenen Glutenpeptide im Magendarmtrakt verdauen und somit entgiften können. Jedoch werden auch Enzyme im Verdauungstrakt angegriffen, was oftmals zu deren Deaktivierung führt. Um nun eine effektive orale Therapie für Zöliakie entwickeln zu können, werden Methoden benötigt, welche Enzyme im Magendarmtrakt stabilisieren. Aufgrund dessen wurde die Strategie der ortsspezifischen Polymerkupplung auf Prolylendopetidase (PEP) angewendet, da diese die immunogenen Glutenpeptide effektiv abbauen können. Die Polymere sollen hierbei die Enzyme von deaktivierenden Einflüssen abschirmen (z.B. Gallensäure, pH, Verdauungsenzyme), wobei die Aktivität der Enzyme durch die ortsspezifische Kupplung der Polymere erhalten bleiben soll.

Hierfür wurden gezielt Aminosäuren zweier PEPs, isoliert von *Myxococcus xanthus* (MX) and *Spingomonas capsulate* (SC), zu Cysteinen mutiert um freie Thiolgruppen für die Polymerkonjugation an die Oberfläche der Enzyme zu platzieren. Eine Reihe von mutierten Enzymen wurde hergestellt und evaluiert, die ein, zwei oder drei Cysteine enthalten, mit dem Ziel letztendlich die gesamte Oberfläche der PEPs abzudecken, sobald

die Polymere gekuppelt sind. Während die Mutagenese erheblichen Aktivitätsverlust der SC Mutanten zur Folge hatte, wiesen alle MX Mutanten volle MX Wildtyp (MX WT) Aktivität auf, was zur erfolgreichen Produktion zweier dreifach cysteinmutierten Varianten führte (MX3.1 und MX3.2).

Aufgrund dessen wurde die kovalente ortsspezifische Polymerkonjugation ausschließlich mit den MX Mutanten durchgeführt. Zunächst wurde das lineare poly(ethylene glycol) (PEG, 5 und 40 kDa) in zwei verschiedenen Größen an die MX Mutanten konjugiert. Die dreifache Kupplung von PEG an MX3.1 und MX3.2 zeigte unterschiedliche Auswirkungen auf deren Aktivität (30% bzw. 65% Aktivitätsverlust), womit die große Bedeutung der Kupplungsorte verdeutlicht wurde. Interessanterweise gab es keinen Aktivitätsunterschied zwischen der dreifachen Kupplung von PEG5 oder PEG40 an MX. Anschließend wurde das polykationische Dendrimer poly(amido amine) (PAMAM, 6.9 kDa) über die Cysteine konjugiert. Dabei behielt MX3.1 auch nach dreifacher Kupplung von PAMAM eine der MX WT entsprechenden Aktivität. Hieraus schließen wir, dass das Dendrimer aufgrund seiner kompakten und präzisen Struktur nicht mit der Dynamik von MX interferiert, wenn es an diesen spezifischen Orten gekuppelt ist. Die besten Konjugate, hinsichtlich *in vitro* Aktivität und Stabilität in simulierten Darmbedingungen, wurden anschließend in einem *in vivo* Modell getestet. Hierbei wurde eine gluten-spezifische Peptidsequenz, die zudem einen gequenchten Farbstoff trägt, Ratten oral verabreicht. Anschließend wurde MX oder MX-polymer oral appliziert und sobald das Substrat gespalten wurde, konnte das entstehende fluoreszente Signal zeitabhängig durch die Bauchdecke der Tiere gemessen werden. MX WT und MX3.1 wurden umgehend im Magendarmtrakt deaktiviert, da kein Signal gemessen werden konnte. Obwohl das MX-Konjugat, welches drei kurze PEG5 Polymere trägt, ein Signal verursachte, war dies nicht signifikant im Vergleich zu MX WT. Dreifach konjugierte PEG40- und PAMAM-Konjugate zeigten ein intensives Signal. Der Grad der Stabilisierung wurde zudem untersucht, indem das PEG40 und PAMAM Konjugat 1 oder 2 h vor dem Substrat Ratten oral appliziert wurden. Die Experimente zeigten, dass beide MX-Polymere auch noch nach einiger Inkubationszeit im Magendarmtrakt hohe katalytische Aktivität aufwiesen.

Die Erkenntnisse, die aus den präsentierten Resultaten gezogen werden können, trugen zu einem besseren Verständnis der Stabilisierung von Enzymen durch gekuppelte

Polymere im Magendarmtrakt bei. Durch die ortsspezifische Kupplung konnten Zusammenhänge zwischen Polymerstruktur und der Aktivität der korrespondierenden Enzymkonjugate aufgestellt und deren Effekt *in vivo* bestimmt werden. Zwei der dreifach konjugierten MX3.1, welche in diesem Projekt erfolgreich hergestellt wurden, zeigten hohe Aktivität im Verdauungstrakt von Ratten und verkörpern demnach vielversprechende Kandidaten für eine Enzymtherapie gegen Zöliakie. Zudem hat dieses Projekt generell erhebliche Erkenntnisse zu dem Bereich der oralen Enzymtherapien beigetragen.