

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za farmacijo



**MARTINA RAKEF**

**POSKUS IZBOLJŠANJA SELEKTIVNOSTI PEGILACIJE INTERFERONA  $\alpha 2b$**

**An attempt to improve selectivity of interferon  $\alpha 2b$  pegylation**

**Ljubljana, 2009**

Diplomsko nalogo sem opravljala na oddelku Nove generacije proteinov, Lek d.d. pod mentorstvom prof. dr. Štrukelj Boruta in somentorstvom dr. Jevševar Simone. Meritve biološke učinkovitosti *in vitro* so opravili v Laboratoriju za biosintezo in biotransformacijo biološko aktivnih snovi na Kemijskem inštitutu.

Zahvaljujem se komisiji in mentorju Borutu Štruklju, ki so mi omogočili pravočasen zagovor diplomske naloge.

Hvala Simoni Jevševar, ki mi je omogočila opravljanje diplome, za diskusije in za skrben pregled diplomske naloge. Posebno hvaležna sem Menči Kunstelj za vso pomoč pri izdelavi diplomske naloge in koristne nasvete. Zahvaljujem se tudi Katarini Fidler, Mateji Kržišnik, Karmen Cercic ter študentkama Matejki Juvančič in Špeli Kočar, ki so me uvedli v delo in mi pomagali v laboratoriju ter poskrbeli za dobro voljo.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof.dr.Štrukelj Boruta in somentorstvom dr. Jevševar Simone.

Rakef Martina

**VSEBINA**

<b>Seznam okrajšav .....</b>	<b>III</b>
<b>POVZETEK .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 BIOLOŠKA ZDRAVILA .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 INTERFERONI .....</b>	<b>1</b>
1.2.1 STRUKTURA IN FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI IFN- $\alpha$ 2b .....	2
1.2.2 FIZIOLOŠKA VLOGA .....	3
1.2.3 REKOMBINANTNI IFN- $\alpha$ 2 .....	4
<b>1.3 PEGILACIJA .....</b>	<b>4</b>
1.3.1 Pripetje PEG molekule .....	6
1.3.2 Reakcija pegilacije .....	7
<b>1.4 REVERZIBILNA ZAŠČITA LIZINOV PRED PEGILACIJO .....</b>	<b>10</b>
1.4.1 Reverzibilna zaščita inzulina .....	10
1.4.2 Reverzibilna zaščita TNF- $\alpha$ .....	10
<b>1.5 MODIFIKACIJA LIZINSKIH OSTANKOV Z ANHIDRIDOM .....</b>	<b>11</b>
<b>2- METILMALEINSKE KISLINE .....</b>	<b>11</b>
<b>1.6 PEGILIRANI INTERFERONI .....</b>	<b>11</b>
1.6.1 Pegintron <sup>®</sup> .....	11
1.6.2 Pegasys <sup>®</sup> .....	13
<b>1.7 UPORABA KROMATOGRFSKIH METOD ZA SEPARACIJO PROTEINOV .....</b>	<b>15</b>
1.7.1 Ionsko-izmenjevalna kromatografija .....	15
<b>1.8 ANALITIKA IN KARAKTERIZACIJA PROTEINOV .....</b>	<b>17</b>
1.8.1 Reverzno-fazna kromatografija .....	17
1.8.2 Gelska elektroforeza .....	17
1.8.3 UV metoda za določanje koncentracij .....	17
<b>2 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA .....</b>	<b>18</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 MATERIALI .....</b>	<b>19</b>
3.1.1 Kemikalije .....	19
3.1.2 PEG reagenti .....	19
3.1.3 Voda .....	20
3.1.4 Kromatografske kolone .....	20
3.1.5 Raztopine in pufri .....	20
3.1.6 Standard .....	21
3.1.7 Laboratorijska oprema .....	22
<b>3.2 METODE .....</b>	<b>23</b>
3.2.1 Pegilacija IFN- $\alpha$ 2b (PEG-pNF, PEG-NHS) .....	23
3.2.2 Pegilacija IFN- $\alpha$ 2b (CHO) .....	23
3.2.3 Reverzibilna zaščita lizinskih ostankov .....	23
3.2.4 Uporaba kolone ZEBA za odstranjevanje odvečnega anhidrida .....	24
3.2.5 Kationsko-izmenjevalna kromatografija .....	24
3.2.6 Anionsko izmenjevalna kromatografija .....	25
3.2.7 Tekočinska reverzno fazna kromatografija visoke ločljivosti .....	25
3.2.8 SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza .....	25
3.2.9 Barvanje gelov z barvilom Simply Blue Safe Stain .....	26
3.2.10 Kromatografska izolacija .....	26
3.2.11 Menjava pufra .....	26
3.2.12 Določanje biološke aktivnosti .....	27
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 PEGILACIJA .....</b>	<b>30</b>

4.1.1	Pegilacija IFN- $\alpha$ 2b s PEG-NHS reagentom .....	30
4.1.2	Pegilacija interferona s PEG-pNF .....	35
4.1.3	Pegilacija s PEG-CHO reagentom.....	38
4.1.3.1	<i>Pogoji pegilacije</i> .....	38
<b>4.2</b>	<b>REVERZIBILNA ZAŠČITA LIZINOV PRED PEGILACIJO .....</b>	<b>40</b>
4.2.1	Reakcijski pogoji zaščite lizinov .....	40
4.2.2	Reakcijski pogoji odščite lizinov.....	42
4.2.3	Biološka aktivnost <i>in viro</i> zaščitenega IFN- $\alpha$ 2b in IFN- $\alpha$ 2b po odščiti .....	44
<b>4.3</b>	<b>PREPARATIVNA IZOLACIJA PEGILIRANIH KONJUGATOV IFN-A2B, PRIPRAVLJENIH S PEG-NHS, PEG-pNF IN PEG-CHO REAGENTOM .....</b>	<b>45</b>
4.3.1	Preparativna izolacija IFN- $\alpha$ 2b pegiliranega s PEG-NHS .....	45
4.3.2	Preparativna izolacija IFN- $\alpha$ 2b pegiliranega s PEG-pNF reagentom .....	47
4.3.3	Preparativna izolacija IFN- $\alpha$ 2b pegiliranega s PEG-CHO reagentom .....	48
<b>4.4</b>	<b>PREPARATIVNA IZOLACIJA PEGILIRANIH KONJUGATOV IFN-A2B,.....</b>	<b>50</b>
	<b>PRIPRAVLJENIH Z <i>N</i>-HIDROKSISUKCINIMIDNIM, <i>P</i>-NITROFENILKARBONATNIM IN ALDEHIDNIM PEG REAGENTOM S PREDHODNO ZAŠČITO LIZINSKIH OSTANKOV .....</b>	<b>50</b>
4.4.1	Preparativna izolacija IFN pegiliranega s PEG-NHS s predhodno zaščito z anhidridom 2-metilmaleinske kisline .....	50
4.4.2	Preparativna izolacija IFN- $\alpha$ 2b pegiliranega s PEG-pNF reagentom s predhodno zaščito z anhidridom 2-metilmaleinske kisline .....	52
<b>4.5</b>	<b>ANALIZA PRIPRAVLJENIH KONJUGATOV .....</b>	<b>53</b>
4.5.1	SDS-PAGE analiza.....	53
4.5.2	Kationska analiza .....	54
4.5.3	Analiza končnih konjugatov z reverznofazno kromatografijo .....	56
4.5.4	Primerjava bioloških aktivnosti pripravljenih konjugatov .....	57
<b>5</b>	<b>SKLEP.....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>60</b>

## Seznam okrajšav

A <sub>280</sub>	absorbanca pri 280 nm
C-konec	karboksilni konec proteina
Da	Dalton, enota za molekulsko maso
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> ; tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IFN	interferon
kDa	kilo (1.000) Dalton, enota za molekulsko maso
M	molarnost (mol/L)
Mark12	standard molekulskih mas za SDS-PAGE
Na-fosfatni pufer	natrijev fosfatni pufer
N-konec	aminski konec proteina
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PEG	Polietilenglikol
PEO	Polietilenoksid
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije oksonijevih ionov
pI	<i>isoelectric point</i> ; izoelektrična točka
CEC-HPLC	<i>cation exchange high performance liquid chromatography</i> ; kationsko izmenjevalna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
AEC-HPLC	<i>anion exchange high performance liquid chromatography</i> ; anionsko izmenjevalna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i> ; reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
SDS	<i>sodium-dodecyl-sulphate</i> ; natrijev dodecilsulfat
SE-HPLC	<i>size exclusion high performance liquid chromatography</i> ; gelska izključitvena tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
TFA	trifluoroocetna kislina
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> ; dejavnik tumorske nekroze
UV	Ultravijolično
VIS	vidni spekter
IFN- $\alpha$ 2b	Interferon $\alpha$ 2b
Lys	Lizin
His	Histidin
Cys	Cistein
K	Lizin
Y	Tirozin
H	Histidin
NHS	<i>N</i> -hidroksi-sukcinimid
<i>p</i> NF	para-nitrofenol
CHO	Aldehyd
DTT	Ditiotreitol
SDS-PAGE	Poliakrilamidna gelska elektroforeza
HCV	Virus hepatitisa C

## POVZETEK

Proteini in peptidi se vse pogosteje uporabljajo pri zdravljenju. Kljub svoji učinkovitosti pa imajo tudi pomanjkljivosti, kot so kemijska in fizikalna nestabilnost, omejena topnost, kratek razpolovni čas, imunogenost in toksičnost. Preizkušene so bile različne tehnologije, ki naj bi izboljšale lastnosti proteinskih in peptidnih zdravilnih učinkovin, kot ena najbolj uspešnih pa se je izkazala konjugacija s polietilenglikolom. Slabost pegilacije je skoraj vedno zmanjšana biološka učinkovitost *in vitro*, ki pa je *in vivo* kompenzirana z izredno podaljšanim razpolovnim časom.

Na tržišču sta prisotni dve pegilirani obliki interferona alfa-2b. Obe sta monopegilirani mešanici molekul z različnim mestom pripetja verige polietilenglikola. Različno pegilirane molekule imajo lahko različne farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti, zato je cilj razvoja novih pegiliranih molekul priprava homogenih in dobro definiranih konjugatov.

Z namenom izboljšanja selektivnosti pegilacije interferona alfa2b smo pred pegilacijo reverzibilno zaščitili nekatere amino skupine z uporabo anhidrida 2-metilmaleinske kisline. Pri izbranih pogojih sicer nismo izboljšali selektivnosti pegilacije, smo pa dokazali, da je s takšnim pristopom mogoče vplivati na mesto pripetja verige polietilenglikola. Ugotovili smo tudi, da postopek zaščite in odščite amino skupin ne zniža biološke učinkovitosti proteina.

Na selektivnost pegilacije smo vplivali tudi s spreminjanjem pegilacijskih pogojev, kot so pH, čas pegilacije, prebitek PEG reagenta in z uporabo različnih pegilacijskih reagentov. Za analizo smo uporabljali kationsko in anionsko kromatografijo in SDS-PAGE. Ugotovili smo, da pH zelo vpliva na pojavljanje posameznih izomerov v pegilacijski mešanici. Pri nižjem pH je število položajnih izomer v pegilacijski mešanici pri *p*-nitrofenilnem pegilacijskem reagentu nižje, pri *N*-hidroksi sukcinimidnem reagentu pa višje. Po selektivnosti pegilacije si od bolj k manj selektivnemu sledijo aldehidni, *N*-hidroksi sukcinimidni in *p*-nitrofenilni pegilacijski reagent.

S tremi pegilacijskimi reagenti smo z ali brez reverzibilne zaščite amino skupin v stranskih verigah aminokislinskih ostankov izolirali pet konjugatov. Biološke učinkovitosti pripravljenih konjugatov se razlikujejo glede na vrsto uporabljenega reagenta. Najvišjo biološko učinkovitost *in vitro* izkazuje konjugat pripravljen s *p*-nitrofenilnim pegilacijskim reagentom, ki ima ohranjeno 10 % učinkovitost v primerjavi z nemodificiranim IFN- $\alpha$ 2b.

*In vitro* biološka učinkovitost konjugatov pripravljenih z *N*-hidroksi sukcinimidnim in aldehidnim reagentom je veliko nižja, le 1,7% nemodificiranega IFN- $\alpha$ 2b. Biološka učinkovitost konjugatov, pripravljenih z reverzibilno zaščito amino skupin v stranskih verigah lizinskih ostankov je malo nižja od biološke učinkovitosti konjugatov, pripravljenih brez postopka zaščite.

## ABSTRACT

Proteins and peptides are nowadays used very often for treatment of many diseases. Despite their efficiency protein drugs possess many properties which do not classify them as optimal drugs, such as physico-chemical instability, limited solubility, short elimination half-life, proteolytic instability, immunogenicity and toxicity.

Several technologies have been already proven to improve beforementioned properties of protein and peptide-based drugs. Conjugation of protein to polyethylenglycol, so called pegylation, is one of the best established technologies for this purpose.

Although pegylation of protein is usually accompanied by decrease of *in vitro* (biological) efficacy this drawback is successfully compensated *in vivo* by substantially extended elimination half life.

Two pegylated forms of interferon alpha2b are available on the market. Both are mixture of molecules with different attachment sites of polyethylenglycol. Differently pegylated molecules can exhibit different pharmacokinetic and pharmacodynamic properties; therefore target for development of new pegylated products is preparation of homogeneous, well defined conjugates.

In order to improve selectivity of interferon alpha2b pegylation we tried to protect some amino groups with cytraconic anhydride. Selectivity of pegylation has not been improved at selected conditions. However it has been proven that such approach can have an impact on the attachment site of polyethylenglycol. Additionally we found out that process of amino groups protecting and deprotecting does not reduce *in vitro* protein efficacy.

Selectivity of pegylation reaction has been influenced also by variation of pegylation conditions, such as pH, incubation time, excess of PEG reagent and by using various pegylation reagents. Cation and anion chromatography as well as SDS-PAGE have been used for analysis. We have observed that pH influences strongly on formation of particular isoforms in pegylation mixture. Selectivity of pegylation reaction is higher at lower pH for *p*-nitrophenyl pegylation reagent, while for *N*-hydroxisuccinimid pegylation reagent is lower at lower pH. The most selective pegylation reagent is aldehyde, followed by *N*-hydroxisuccinimid and *p*-nitrophenyl pegylation reagent.

Five purified conjugates have been prepared with or without reversible protection of lysine side chain amino groups using different pegylation reagents and *in vitro* biological activity was determined for all. Despite the fact that all PEG lengths were between 40 and 45 kDa,



efficacy of conjugates differ and seem to depend on type of PEG reagent attached. The highest efficacy (10 %) exhibit conjugate prepared by *p*-nitrophenyl pegylation reagent, followed by aldehyde and *N*-hydroxysuccinimid with similar efficacies of ~1,7 %. Efficacy of conjugates prepared with reversible protection of lysines was a bit lower compared to those prepared without protection.

# 1 UVOD

## 1.1 BIOLOŠKA ZDRAVILA

Biološka zdravila, med katera štejemo proteine in peptide, so zelo pomembna skupina zdravil. Farmakološko so zelo učinkovita, imajo pa tudi nekatere pomankljivosti, kot so kratek razpolovni čas, proteolitska nestabilnost, imunogenost, toksičnost, omejena topnost in parenteralni način aplikacije. Razvoj novih tehnologij je omogočil izboljšanje navedenih pomankljivosti in doseganje želenih farmakokinetičnih in farmakodinamičnih parametrov. V ta namen vgradijo protein v farmacevtsko obliko z upočasnjenim sproščanjem (oljne injekcije, implantanti, liposomi, nanodelci, črpalke), jih aplicirajo neparantralno (pulmonalno, nasalno, transdermalno), izvedejo fuzijo z imunoglobulini ali serumskimi proteini, spremenijo aminokislinsko zaporedje, da zmanjšajo imunogenost in encimsko degradacijo in konjugirajo z naravnimi ali sintetičnimi polimeri. [1]

## 1.2 INTERFERONI

Odkritje skupine proteinov, ki preprečujejo razširjanje virusov na neokužene celice, sega v leto 1957, ko sta Briton Lick Isaacs in Swiss Jean Lidemann pri svojem delu opazila, da so z virusom okužene celice odporne na okužbo z drugimi virusi. Skupino proteinov, ki so za to odgovorni, sta poimenovala interferoni.

Interferoni spadajo v skupino citokinov. Citokini so glikoproteini, z molekularno maso od 8 do 80 kDa. V telesu delujejo kot modulatorji imunskega sistema in kot signalne molekule, ki omogočajo komunikacijo med celicami in s tem uravnavanje večine bioloških procesov. Citokini se vežejo na receptor z visoko afiniteto, zato so učinkoviti že v majhnem odmerku. Delujejo predvsem lokalno, lahko pa tudi sistemsko. Učinek se pojavi zaradi spremenjenega izražanja genov v celici. Delovanje citokinov je pleiotropno (posamezen citokin z delovanjem na različne celice sproži različne biološke učinke) in nadomestljivo (različni citokini imajo lahko enake biološke učinke) [2;3].

### 1.2.1 STRUKTURA IN FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI IFN- $\alpha$ 2b

Interferoni se po strukturnih značilnostih in delovanju delijo v dve skupini. Med tip I spadajo družine  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ,  $\iota$ ,  $\omega$ , ki imajo zelo podobno prostorsko strukturo. Za ta tip interferonov je značilna monomerna struktura in stabilnost v kislem okolju. Interferon  $\gamma$  je dimerne oblike in v kislem nestabilen, spada med tipa II. Aminokislinsko zaporedje IFN- $\alpha$  in IFN- $\beta$  je v petdesetih odstotkih homologno. IFN- $\gamma$  se v aminokislinskem zaporedju precej razlikuje, ima pa podobno tridimenzionalno strukturo. Skupina IFN- $\alpha$  obsega dvajset strukturno sorodnih proteinov, med katere spada tudi IFN- $\alpha$ 2b. [1; 4; 5]

IFN- $\alpha$ 2b sestavlja 188 aminokislin, od česar začetnih 23 aminokislin predstavlja signalno zaporedje, ki omogoča ekstracelularno sekrecijo proteina. Aktivna oblika IFN- $\alpha$ 2b ima 165 aminokislin [6].

1	11	21	31	41	51	60
1	CDLPQTHSLG	ŠRRTLMLLAQ	MRRISLFSCL	KDRHDFGFPQ	EEFGNQFQKA	ETIPVLHEMI
61	QQIFNLFSTK	DSSAAWDETL	LDKFYTELYQ	QLNDLEACVI	QGVGVTTETPL	MKEDSILAVR
121	KYFQRITLYL	KEKKYSPCAW	EVVRAEIMRS	FSLSTNLQES	LRSKE	

Slika 1: Aminokislinsko zaporedje IFN- $\alpha$ 2b.

Vir: Swiss-prot, INTERFERON  $\alpha$ -2a (P01563); (v aminokislinskem zaporedju, ki ustreza IFN- $\alpha$ 2a je zamenjana aminokislina Lys46 v Arg46, kar ustreza aminokislinskemu zaporedju IFN- $\alpha$ 2b).

Strukturo IFN- $\alpha$ 2b lahko opišemo s petimi  $\alpha$  vijačnicami, od katerih štiri tvorijo vzporedni šop. Med aminokislinami so štirje cisteini, ki tvorijo disulfidne mostičke in sicer na mestih 1 – 99 in 29 – 139, od katerih je Cys29-Cys138 nujno potrebna za biološko aktivnost [5; 7; 1].



Slika 2: 3D- struktura IFN- $\alpha$ 2b; rumeno so označeni cisteini

Vir: Protein Data Bank, PDB ID: 1ITF (struktura 1ITF je spremenjena s programom Swiss-Pdbviewer; Lys46 je spremenjen v Arg46).

### 1.2.2 FIZIOLOŠKA VLOGA

Interferoni so biološko aktivni proteini, ki se sintetizirajo v somatskih celicah sesalcev in jih uvrščamo med citokine. Sodelujejo v nespecifičnem obrambnem odgovoru na tumorske celice ali ob vdoru tujih dejavnikov kot so virusi, bakterije in paraziti. [4; 5]

Interferoni dosežejo celični odziv z vezavo na specifične membranske receptorje na celični površini. Vezavi sledi zapleteno zaporedje biokemijskih reakcij, ki spodbudijo izražanje drugih citokinov in določenih encimov ter peptidnih hormonov, zmanjšajo deljenje celic, povečajo fagocitno sposobnost makrofagov in celično toksičnost limfocitov do tarčnih celic in preprečijo podvojevanje virusov v celicah, okuženih z virusom. Interferon lahko povzroči višjo aktivnost p53 v okuženih celicah in s tem povzročijo apoptozo celic, zaradi česar ima protitumorno delovanje. [8]

Interferoni delujejo protivirusno, protibakterijsko, protitumorno in imunoregulatorno zaradi česar se uporabljajo pri zdravljenju nekaterih vrst raka, hepatitisa C, multipli sklerozi, avtoimunskih napakah, pri virusnih prehladih in gripi [3; 5].

### 1.2.3 REKOMBINANTNI IFN- $\alpha$ 2

Rekombinantni IFN- $\alpha$ 2b se pridobiva s pomočjo gojenja transformiranih bakterij *E. coli*, ki vsebujejo ekspresijski vektor z zapisom za IFN- $\alpha$ 2b. Ker se ga pridobiva iz *E. coli*, ni glikoliziran. Rekombinantni IFN- $\alpha$ 2b je vodotopen, od človeškega levkocitnega IFN- $\alpha$ 2b se razlikuje v eni aminokislini. [1]

Rekombinantni IFN- $\alpha$ 2 je bil prvič registriran 1985 v Združenih državah Amerike za zdravljenje levkemije, od takrat pa se je izkazal za učinkovito zdravilo pri zdravljenju različnih virusnih in rakavih obolenj. 80 % vseh registriranih oblik IFN- $\alpha$ 2 se porabi za zdravljenje kroničnega hepatitisa C (CHC), s katerim naj bi bilo na svetu okuženih 170 milijonov ljudi [9].

Omejitev zdravljenja z rekombinantnim IFN- $\alpha$ 2b je njegov kratek razpolovni čas, ki je krajši od dvanajstih ur. Za zdravljenje rakavih obolenj je zato potrebna vsakodnevna, za zdravljenje hepatitisov pa trikrat tedenska subkutana aplikacija zdravila. Kratek razpolovni čas pomeni večje nihanje koncentracije IFN v krvi in izpostavljenost bolnika razmeroma dolgemu času plazemskih koncentracij pod terapevtsko koncentracijo, s čimer se zmanjšuje učinkovitost antivirusne terapije. Virus hepatitisa C se namreč hitro razmnožuje in zato mora biti učinek interferona v terapiji hepatitisa C čim daljši. Interferon mora biti torej čim dlje časa prisoten v krvi v koncentraciji, ki preprečuje razmnoževanje virusa in s tem možnost mutacije in rezistence virusa na zdravljenje z IFN. [10]

Da bi izboljšali farmakokinetične lastnosti IFN- $\alpha$ 2, sta bili razviti in registrirani dve zdravili PEG-Intron® in Pegasys®, v katerih je IFN- $\alpha$ 2 kovalentno povezan z molekulo polietilenglikola (PEG) [4]

## 1.3 PEGILACIJA

Pegilacija označuje modifikacijo proteina, peptide ali nepeptidne molekule s kovalentnim pripetjem ene ali več molekul polietilenglikola (PEG). V zadnjem času je ena

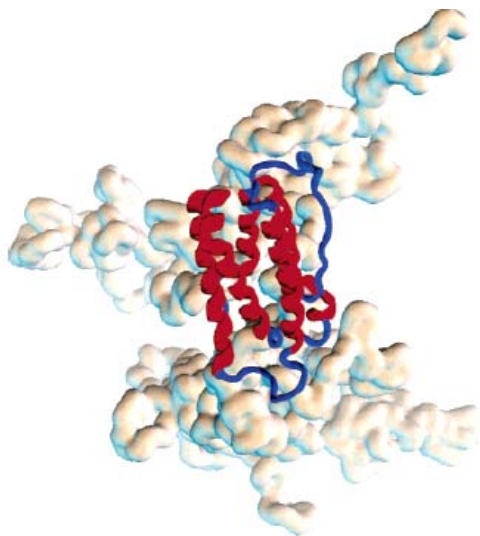
najpomembnejših in najuspešnejših metod za izboljšanje farmakokinetičnih in farmakodinamičnih lastnosti bioloških molekul, predvsem zaradi izboljšanja terapevtske učinkovitosti [11].

PEG je nevtralen, kemično inerten, netoksičen in neimunogen hidrofilni polietar, ki se že dolgo uporablja kot ekscipiens v farmacevtskih oblikah. PEG je polimerna molekula, sestavljena iz enot etilenoksida. Na enem koncu PEG verige je metoksi skupina, na drugem pa so pripete različne funkcionalne skupine, ki reagirajo z reaktivnimi skupinami stranskih verig aminokislin na površini proteina, (npr.  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{COOH}$ ). PEG, ki se uporablja, je lahko razvejan ali linearen in različnih molekularskih mas (od 10 – 60 kDa). [12]

- a)  $\text{HO} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{OH}$
- b)  $\text{MeO} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{Y} - \text{X}$

Slika 3: a) osnovna struktura polietilen glikola, b) osnovna struktura pegilacijskega reagenta (Y označuje povezovalno skupino, X pa reaktivno skupino). [12]

Pegilacija poveča hidrodinamski radij proteina, zaradi česar se zmanjša ledvična filtracija in se podaljša čas zadrževanja učinkovine v telesu. Pegilacija zmanjša imunogenost, saj PEG prekrije površino proteina in s tem zmanjša izpostavljenost imunogenih epitopov. Zaradi ščitenja površine proteina se zmanjša tudi proteolitska razgradnja. S pegilacijo se spremeni volumen distribucije, pri subkutani aplikaciji se zmanjša hitrost absorpcije. Pegilacija navadno izboljša topnost in stabilnost proteina. Pegilacija pa ima tudi manj željene učinke. Navadno pride do zmanjšanja volumna distribucije in do znižanja biološke učinkovitosti *in vitro*. Znižana učinkovitost *in vitro* je v telesu kompenzirana s podaljšanim zadrževanjem v telesu. [13]



Farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti pegiliranih proteinov so odvisne od števila, stukture in mesta pripetja PEG verig [14]. Konjugati z daljšo PEG verigo in konjugati z večjim številom pripetih PEG verig imajo daljše razpolovne čase, navadno pa tudi nižjo biološko učinkovitost *in vitro*. [11,13].

Slika 4: Trodimenzionalna struktura izomera pegiliranega IFN, na mestu K164 [14].

### 1.3.1 Pripetje PEG molekule

Za pripetje PEG molekule na protein, je potrebno PEG molekulo najprej aktivirati, torej modificirati terminalno hidroksilno skupino v funkcionalno skupino, ki lahko reagira s funkcionalnimi skupinami na površini proteina. Ker se nahajajo na proteinu različni aminokislinski ostanki, je možno PEG pripeti na različne načine. [12]

Pri izbiri pravega mehanizma pegilacije je nujno poznati namen modifikacije proteina in sam protein, glede stabilnosti, strukture proteina in aktivnih mest na proteinu, ki so pomembna za biološki učinek. [15]

Najpogosteje poteka modifikacija proteinov preko amino skupin proteinov (*N*-terminalna amino skupina, amino skupine stranskih verig lizinskih ostankov) z reakcijami alkiliranja in aciliranja [16].

Lizinski ostanki se nahajajo na površini protina in so lahko dostopni. To predstavlja tudi največjo omejitev omenjenega načina pegilacije, saj pri tem nastanejo zmesi položajnih izomerov, ki jih je težko izolirati in se zato v terapiji uporabljajo kot mešanice monopegiliranih položajnih izomerov. [12]

Zelo selektivno modifikacijo proteinov omogoča konjugacija preko prostih sulfhidrilnih skupin v cisteinskih ostankih. Omejitev tovrstne konjugacije je, da so proste sulfhidrilne

skupine cisteinskih ostankov na površini proteina zelo redko, če pa že so, so navadno del aktivnega mesta. V strukturo proteina je možno vgraditi cistein z metodami točkovne mutacije cDNA, ki se kasneje vgradi v vektor za izražanje. [12]

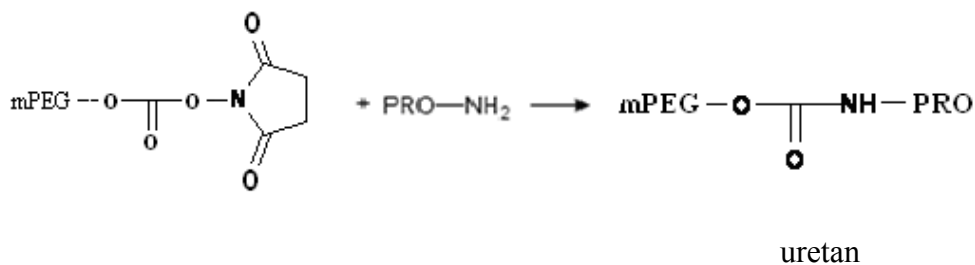
### 1.3.2 Reakcija pegilacije

Selektivnost reakcije pegilacije je v največji meri odvisna od izbire pegilacijskega reagenta in pH reakcije. Določen vpliv na selektivnost glede mesta pegilacije se da doseči s spremembo reakcijskih pogojev, kot so: pH, struktura PEG reagenta (razvejan, linearen), molarno razmerje med proteinom in PEG reagentom, koncentracija reaktantov, temperatura, čas. [15]

Najpogosteje se za pegilacijo uporabljajo **amino selektivni PEG reagenti**, med katere spadajo spodaj naštet:

#### **1. N-hidroksi-sukcinimidil karbonatni PEG reagent**

N-hidroksi-sukcinimidil karbonatna (SC) reaktivna skupina spada med naključne pegilacijske reagente, ki reagirajo z  $\epsilon$ - in  $\alpha$ -amino skupinami (lizini in N-terminalna amino skupina), z imidazolnim dušikom histidina in hidroksi skupino serina, treonina in tirozina.



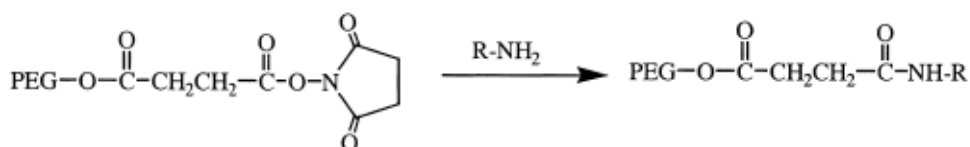
Slika 5.1: PEG-SC tvori uretansko vez z amino skupinami lizinskih ostankov proteina in N-terminalno AK[9].

12 kDa linearni PEG-SC je bil uporabljen za pripravo komercialnega produkta Pegintron®.



## 2. N-hidroksi-sukcinimidni sukcinatni PEG reagent (PEG-NHS)

N-hidroksi-sukcinimidna (NHS) reaktivna skupina spada med naključne pegilacijske reagente, ki reagirajo z amino skupinami proteinov. Primer reakcije predstavlja Slika 5.2. Značilnost NHS skupine je velika hidrolitska nestabilnost. Na reaktivnost in tudi na stabilnost zelo vpliva povezovalna skupina med PEG verigo in NHS skupino – daljša in manj elektrofilna je, daljši je razpolovni čas NHS skupine.

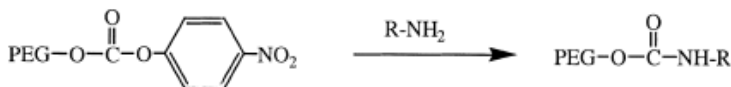


Slika 5.2: reakcija N-hidroksi-sukcinimidi sukcinat PEG reagenta

40 kDa razvejan PEG-NHS je bil uporabljen za pripravo komercialnega produkta Pegasys®.

## 3. Para-nitrofenilni karbonatni PEG reagent (PEG-p-NF)

Para-nitrofenilna reaktivna skupina spada med starejše pegilacijske reagente. Primer reakcije predstavlja slika 5.3. Je manj reaktivna kot PEG-SC, zaradi česar je tudi bolj selektivna. Selektivnost dosežemo z manjšo hitrostjo reakcije pegilacije.[12]

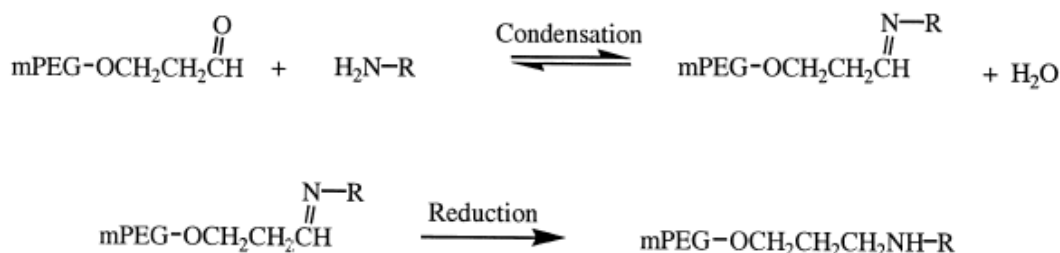


Slika 5.3: reakcija p-nitrofenil karbonat PEG reagenta z lizini proteina in N-terminalno AK, nastane uretanska vez [9].

Po strukturi je podoben PEG-SC, zato verjetno reagira z istimi skupinami.

#### 4. PEG-aldehidni reagent (PEG-CHO)

Aldehidna reaktivna skupina (CHO) omogoča mestno specifično pegilacijo *N*-terminalne amino skupine. Primer reakcije predstavlja Slika 5.4. Reakcija je dvostopenjska, v prvi stopnji gre za nukleofilno adicijo, ki je hitra in reverzibilna in bolje poteka v bazičnem okolju. Druga stopnja kondenzacije je dehidracija, ki bolje poteka v kislem. pH za optimalen potek reakcije je od 4-5. Druga reakcija je ireverzibilna, gre za redukcijo imina. Za redukcijo se največkrat uporablja NaCNBH<sub>3</sub>. [17]



Slika 5.4: reduktivno *N*-alkiliranje

Reakcija pri nizkem pH je bolj selektivna za *N*-terminalno amino skupino proteina, ker ima le-ta amino skupina nižji pKa glede na ostale nukleofile. Največja selektivnost reakcije naj bi bila dosežena, ko je pH med reakcijo blizu ali tik nad pKa amino skupine. *N*-terminalna skupina ima nižji pKa (8) v primerjavi z (ε) amino skupino lizinskih ostankov (10).

Primer takega produkta je Neulasta<sup>®</sup>. [18]

Reakcijski pogoji priprave Neulaste<sup>®</sup> so po literaturnih podatkih naslednji: 100 mM CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O, pH 5.0, 20 mM NaCNBH<sub>3</sub>, 5-kratni molarni prebitek PEG-CHO, ledena kopel [19].

#### Vpliv spremembe pH :

Na specifičnost pegilacije zelo vpliva pH med reakcijo. Pri rahlo kislem pH je pri intrerferonu glavno mesto modifikacije His34. Pri višjem pH se v večji meri pegilirajo lizinski ostanki. Pri pH 10 ni več prisotno *N*-terminalno pegiliranega konjugata [23]. Razlog različne selektivnosti je v različnih vrednostih pKa amino skupin oz. dušik-

vsebujočih skupin v stranskih verigah, ki je za histidine 6-7, za N-terminalno amino skupino Cys 7-8 in lizine 9-10 [20].

#### **Vpliv strukture PEG reagenta:**

Uporaba daljših in razvejanih PEG reagenti zmanjša število pozicijskih izomer. [15]

### **1.4 REVERZIBILNA ZAŠČITA LIZINOV PRED PEGILACIJO**

Večjo selektivnost pegilacije je možno doseči tudi s predhodno zaščito lizinskih preostankov z uporabo različnih anhidridov. Na primeru dejavnika tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) je reverzibilna zaščita lizinov pred pegilacijo z anhidridom 2-metilmaleinske kisline omogočila pripravo konjugatov z višjo biološko aktivnostjo. [21]

S predhodno zaščito insulina s tetrahidroftalanhidridom pa jim je uspelo pripraviti mestno specifično pegiliran konjugat. [22]

#### **1.4.1 Reverzibilna zaščita insulina**

Liofiliziranemu svinjskemu inzulinu, raztopljenemu v fosfatnem pufru s pH 8, so dodali 30x molarni prebitek anhidrida glede na inzulin. Po 30 min pri pH 8 in na T 25°C je delež triTHP- insulina, ki nastane, 90%. Pri višji temperaturi, do 30°C se delež triTHP še poveča. Regeneracija triTHP poteče po 6 urah, na 25°C, z 0,1 M očetno kislino ali pa po 4 h na 30°C. [22]

#### **1.4.2 Reverzibilna zaščita TNF- $\alpha$**

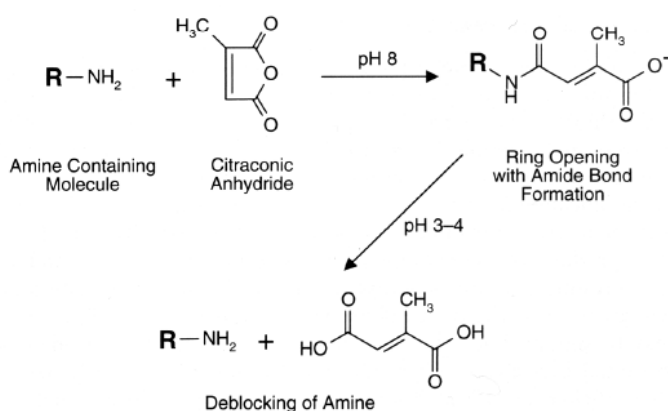
Za reverzibilno zaščito lizinov je bil potreben 10x molarni prebitek anhidrida glede na število lizinov. Reakcija je potekla v pol ure v fosfatnem pufru, s pH 8,5. pri teh pogojih so dosegli 35 % modifikacijo 18 lizinskih skupin. Popolna odstranitev acilnih skupin je potekla po 1 uri na pH 6, pri T 37°C. [21]

## 1.5 MODIFIKACIJA LIZINSKIH OSTANKOV Z ANHIDRIDOM

### 2- METILMALEINSKE KISLINE

Reakcija poteka pri pH 8 in 9, ki ga dosežemo z NaOH. Višji pH niso primerni zaradi nestabilnosti proteina.

Odstranitev 2-metilmaleinske amidne zaščitne skupine do prostih aminov poteče z dodajanjem  $\text{CH}_3\text{COOH}$  oz. HCl do pH 3,5 – 4. Druga možnost odstranitve pa je s hidroksilaminom, pri pH 10, tri ure.



Slika 6: zaščita in odščita z anhidridom [24]

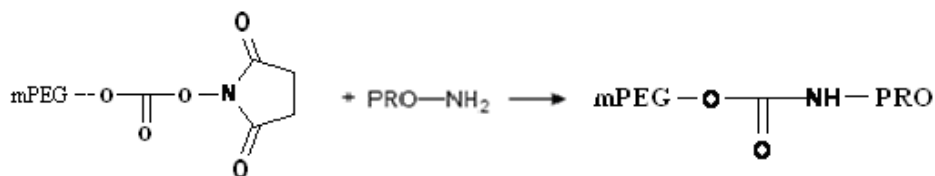
## 1.6 PEGILIRANI INTERFERONI

### 1.6.1 Pegintron<sup>®</sup>

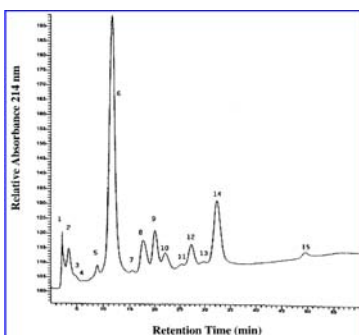
Pegintron<sup>®</sup> je IFN- $\alpha$ 2b kovalentno povezan z 12 kDa PEG verigo. Pripravljen je s PEG-SC reagentom, zaradi česar je Pegintron<sup>®</sup> dokaj heterogena mešanica, sestavljena iz številnih pozicijskih izomerov (Slika 7.1). Največji delež zavzemata izomera, pegilirana na mestih His 34 (50 %) in Cys 1 (13 %), ostala pegilacijska mesta pa so večinoma lizinski ostanki. Izomer s PEG verigo pripeto na Hys 34 ima najvišjo *in vitro* biološko učinkovitost, in sicer

37 % glede na nepegiliran IFN- $\alpha$ 2b. *In vitro* biološka učinkovitost zdravila Pegintron<sup>®</sup> je 28 %, glede na nepegiliran IFN- $\alpha$ 2b. [23]

Reakcija pegilacije poteka v 100 mM natrijevem fosfatnem pufru s pH 6,5 [1].



Slika 7.1: Reakcija sinteze PEG-Introna<sup>®</sup> [9].



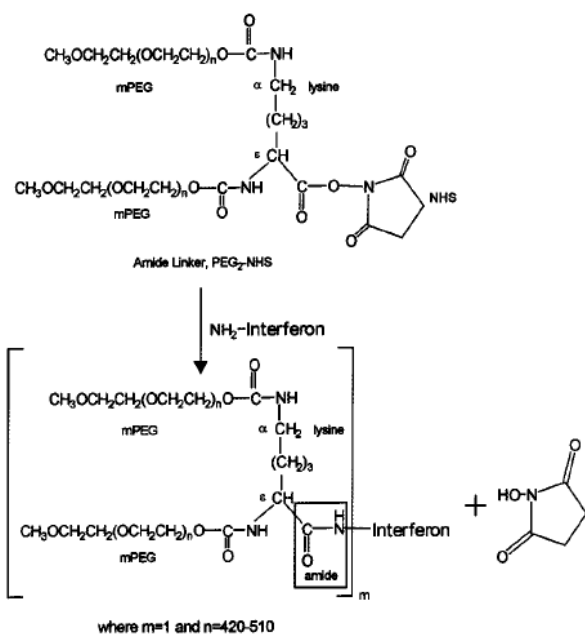
Slika 7.2: Kationska analiza PEG-Introna<sup>®</sup> [28].

Pegilacija zmanjša *in vitro* specifično učinkovitost IFN- $\alpha$ 2b, vendar ne vpliva na protivirusno delovanje PegIntrona<sup>®</sup>.

Klinične študije za Pegintron<sup>®</sup> so prikazale 40 urni plazemski razpolovni čas, kar pomeni 10x podaljšanje glede na nepegiliran IFN- $\alpha$ 2b. Ugotovili so tudi, da pegilacija le malo vpliva na hitrost absorpcije in volumen distribucije. Izkazalo se je tudi, da je enkrat tedensko doziranje Pegintrona bolj učinkovito kot trikrat tedensko injiciranje nepegiliranega IFN- $\alpha$ 2b, predvsem glede znižanja števila HCV v telesu. Glede stranskih učinkov pa sta terapiji z obema zdraviloma primerljivi. Zdravljenje v kombinaciji z ribavirinom se je izkazalo še za učinkovitejše, tudi v primerjavi s terapijo IFN- $\alpha$ 2b in ribavirina. [20]

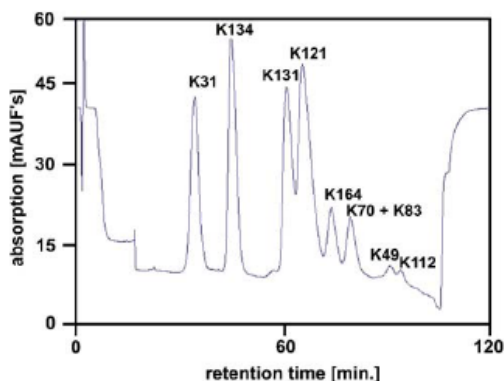
## 1.6.2 Pegasys<sup>®</sup>

Pegasys<sup>®</sup> je IFN- $\alpha$ 2a kovalentno povezan z razvejano in 40 kDa veliko PEG verigo. Pripravljen je z PEG-NHS reagentom, zaradi česar je v primerjavi z Pegintronom manj heterogen (Slika 7.3). Pegasys<sup>®</sup> je večinoma zmes šestih monopegiliranih položajnih izomerov z mestom pegilacije na Lys31, Lys 134, Lys 121, Lys 164 ali Lys 70. Največjo učinkovitost imata frakciji Lys 31 in Lys 134, najmanjšo pa Lys 121. [25]



Slika 7.3: Reakcija sinteze Pegasysa<sup>®</sup> [26].

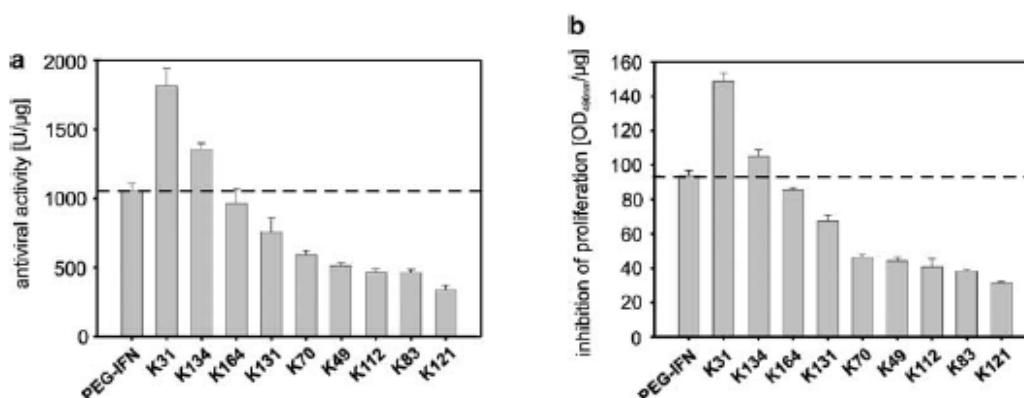
Pegilacija je potekala v boratnem pufru 50 mM, pri pH 9 in 4°C dve uri. Pri teh pogojih nastane 45-50 % monopegiliranega proteina, ki se ga izolira s kationsko izmenjevalno kromatografijo. 40-50 % je nezreagirane proteina, 5-10 % pa je večpegiliranih konjugatov. [17]



Slika 7.4: Kationska analiza Pegasysa<sup>®</sup> [25].

### Biolška aktivnost Pegasys<sup>®</sup>

Biolško aktivnost so merili na celicah humanega melanoma vrste ME15. Največji inhibitorni učinek sta imeli frakciji s pegiliranimi mestoma na Lys 31 in Lys 134. Najmanjšo aktivnost ima interferon, pegiliran na mestu Lys 121. Podatki torej kažejo na to, da specifične strukturne lastnosti interferona vplivajo na jakost njegovega delovanja. [25]



Slika 7.5: a.) Prikaz specifične antivirusne aktivnosti vsakega posameznega izomera. Antivirusno aktivnost so določali v MDBK celicah, okuženih z virusnem stomatitisom. b.) Prikaz specifične antiproliferativne aktivnosti izomerov in PEG-IFN. Določali so aktivnost na humanih celicah melanoma. Pokazano povprečje treh neodvisnih ponovitev, črtkana črta označuje specifično aktivnost PEG-IFN. [24]

## 1.7 UPORABA KROMATOGRFSKIH METOD ZA SEPARACIJO PROTEINOV

Kromatografske metode uporabljamo za ločitev, identifikacijo in določitev posameznih spojin ali kompleksnih mešanic. Molekule vzorca potujejo z mobilno fazo (plinska ali tekočinska) preko stacionarne faze, ločijo pa se na podlagi različnih interakcij med spojinami in funkcionalnimi skupinami na površini stacionarne faze. Molekula se bo dlje zadrževala v kromatografski koloni, torej večji bo njen retencijski čas, v primeru da bodo interakcije med molekulo in stacionarno fazo močnejše. [27]

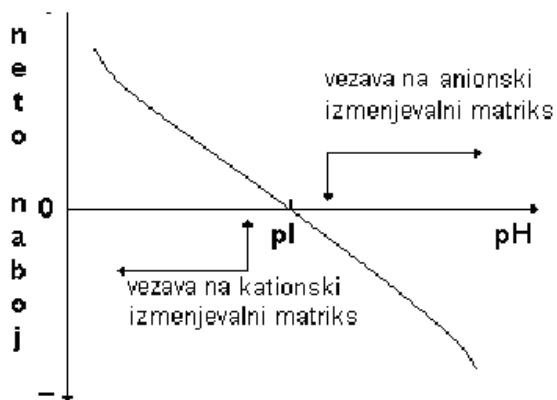
Gelska-izključitvena kromatografija omogoča ločevanje makromolekul glede na razlike v velikosti in obliki, ionsko-izmenjevalna na podlagi celokupnega naboja, pri reverzno-fazni kromatografiji pa pride do ločitve zaradi hidrofobnosti makromolekule.

### 1.7.1 Ionsko-izmenjevalna kromatografija

Temelji na elektrostatskih interakcijah med nasprotno nabitimi delci. Stacionarno fazo predstavljajo funkcionalne skupine, kovalentno vezane na hidroksilne skupine kroglic matriksa. Zaradi ionizacije nekaterih aminokislinskih preostankov pri različnih pH vrednostih, imajo proteini različen celokupni naboj. Na pozitivno nabite skupine ionsko-izmenjevalnega matriksa se vežejo bolje proteini z negativnim celokupnim nabojem in obratno, na negativno nabite skupine ionsko-izmenjevalnega matriksa se vežejo bolje proteini s pozitivnim celokupnim nabojem.

V kislem se protonira amino skupina, v bazičnem disociira karboksilna skupina. Pri pH, kjer je celokupni naboj nič, ima protein izoelektrično točko (pI). Pri pH pufra, višjih od pI ima protein negativni in pri pH nižjih od pI, ima pozitivni celokupni naboj, kot je prikazano na sliki 8.





Slika 8: Odvisnost celokupnega naboja proteina od pH [26].

Za učinkovito vezavo proteina na anionski-izmenjevalni matriks je pomembno, da je pH pufera za 1.5 do 2 enoti višji od pI proteina. Pri vezavi na kationski-izmenjevalni matriks pa je ustrezen pH pufera za 1.5 do 2 enoti nižji od pI proteina. [27]

### Stacionarna faza

Stacionarno fazo predstavljajo kroglice matriksa, ki imajo na hidroksilne skupine kovalentno vezane nabite skupine. Ionsko-izmenjevalni matriksi se delijo glede na naboj in ioniziranost funkcionalne skupine pri nizkem in visokem pH.

### Mobilna faza

Izbira mobilne faze in njen pH vplivata na selektivnost ionsko-izmenjevalne kromatografije. Kot mobilna faza se uporabljajo standardne puferne raztopine s koncentracijo od 5 mmol/l do 50 mmol/l. Začetni pufer (pufer A) navadno ne vsebuje soli, lahko pa je dodana do koncentracije, ki še dopušča vezavo proteina na kolono. Elucija proteinov poteka navadno z linearnim gradientom pufera za elucijo (pufer B), ki vsebuje 0,5 mol/l ali 1 mol/l soli. Najpogosteje se uporablja NaCl. [12]

## 1.8 ANALITIKA IN KARAKTERIZACIJA PROTEINOV

### 1.8.1 Reverzno-fazna kromatografija

RP-HPLC (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography) je med vsemi HPLC analitskimi metodami najhitrejša in najučinkovitejša. Stacionarna faza je silikagel, ki je derivatiziran s hidrofobnima oktano ali oktadecilno skupino. Mobilna faza je acetonitril, z dodatkom trifluoroocetne kisline (TFA). TFA zmanjša neželjeno interakcijo pozitivno nabitih aminokislinskih ostankov z nederivatiziranimi silanolnimi skupinami silikagela, ki so pri višjem pH-ju od 3 negativno nabite. Ker TFA tvori ionske pare s pozitivno nabitimi skupinami proteina, se zmanjša naboj molekule. S tem so hidrofobna področja proteina bolj izpostavljena. Ravno glede na razlike v hidrofobnosti pa se ločujejo tudi komponente vzorca. [28,29]

### 1.8.2 Gelska elektroforeza

Poliakriamidna gelska elektroforeza omogoča ločevanje proteinov le po velikosti. Vzorcju dodamo natrijev dodecil sulfat (SDS), ki se nespecifično veže na proteinsko molekulo in povzroči razdrtje sekundarne strukture. Dodatek reducenta ( $\beta$ -merkaptotanol, DTT) prekine disulfidne vezi, popolna denaturacija pa se doseže s segrevanjem vzorca na 95 °C. Polipeptidne verige imajo v kompleksu s SDS negativen naboj, zato v električnem polju potujejo proti anodi. [20]

Na gel vedno nanese standard molekulskih mas. Sestavljajo ga proteini znanih molekulskih mas in omogoča oceno molekulske mase proteinov v vzorcju.

### 1.8.3 UV metoda za določanje koncentracij

Aromatske aminokisliline v proteinih (triptofan, tirozin, fenilalanin) močno absorbirajo pri 280 nm. Absorpcijski vrh pri 200 nm, kjer absorbira peptidna vez, je sicer višji, vendar v tem območju absorbirajo tudi nekatere druge snovi, ki jih pri delu s proteini pogosto uporabljamo. Zato za rutinsko določevanje koncentracije proteinov uporabljamo valovno dolžino 280 nm. [20]

## 2 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA

Proteini in peptidi se vse pogosteje uporabljajo kot zdravilne učinkovine. Kljub svoji učinkovitosti pa imajo tudi pomanjkljivosti, med katerimi je najizrazitejši kratek razpolovni čas. Kot ena najbolj uspešnih rešitev tega problema se je izkazala konjugacija proteina s polietilenglikolom oz. pegilacija. Najpogostejši način pegilacije proteinov vključuje uporabo pegilacijskih reagentov, ki reagirajo z amino skupinami proteinov. Amino skupine so navadno zelo pogoste na površini proteinov, kar zagotavlja učinkovitost reakcije, po drugi strani pa ravno veliko število amino skupin omogoča nastanek kompleksnih mešanic z različnimi položajnimi izomeri in višjepegiliranimi konjugati. Vsak položajni izomer pa ima lahko potencialno različne farmakokinetične, predvsem pa farmakodinamične lastnosti. Zato gre trend pri novih pegiliranih zdravilih v smeri priprave homogenega in dobro definirane konjugata s čim boljšimi farmakokinetičnimi lastnostmi.

V diplomskem delu bomo kot modelni protein uporabili interferon- $\alpha$ 2b, ki ima na površini enajst lizinskih in eno N-terminalno amino skupino, zaradi česar je pričakovati veliko število različnih konjugatov.

Glavni namen diplomske naloge je uporabiti pristop, pri katerem bomo pred pegilacijo reverzibilno zaščitili amino skupine proteina. Pri tem želimo ugotoviti ali je možno pri interferonu- $\alpha$ 2b s takim pristopom vplivati na zmanjšanje števila položajnih izomerov oz. selektivnost pegilacije.

Za pegilacijo bomo uporabili tri aminoselektivne pegilacijske reagente, ki se razlikujejo v specifičnosti konjugacije. Za vsak reagent bomo najprej poiskali optimalne pogoje pegilacije (pH, prebitek pegilacijskega reagenta, čas pegilacije), ki omogočajo visoke izkoristke reakcije in visoko selektivnost.

Cilj diplomske naloge je tudi izolirati različne pegilirane konjugate interferona- $\alpha$ 2b v miligramskih količinah za merjenje biološke aktivnosti *in vitro*.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Kemikalije

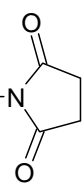
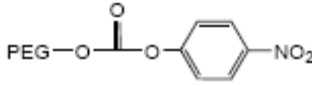
Vse kemikalije so analitske stopnje čistote, kupljene pri distribucijski družbi Sigma, razen če je to posebej drugače določeno in opisano.

Na primer anhidrid 2-metilmaleinske kisline je kupljen od dobavitelja Pierce.

##### 3.1.2 PEG reagenti

PEG reagente smo kupili pri NOF, razen PEG-pNF, ki smo ga kupili pri Chiotech.

##### Preglednica 2: PEG reagenti

	Proizvajalec	Kataloška oznaka	Molekulsk a masa	Struktura
<u>CHO</u>	NOF	Sunbright – ME – 040AL	45 kDa	$\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$
<u>NHS</u>	NOF	GL2-400GS2	40 kDa	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH} \\   \\ \text{CH}_2\text{OC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{COO-N} \end{array}$ 
<u>p-NF</u>	Chiotech	40kDa metoxy polyethylene glycol para- nitro phenyl carbonate	40 kDa	

### 3.1.3 Voda

Demineralizirano vodo pridobivamo z reverzno ozmozo z napravo Millipore, model RiOs16. Prečiščeno vodo pridobivamo z napravo Millipore, model Milli-Q R6 (v nadaljevanju voda Milli-Q). Za pripravo vseh pufrov in raztopin uporabimo vodo Milli-Q.

### 3.1.4 Kromatografske kolone

**DEAE** TSK-gel DEAE NPR, 7,5 mm x 7,5 cm column (Tosoh Bioscience)

**CEC** TSK-gel SP-5PW, 7,5 mm x 7,5 cm column (Tosoh Bioscience)

**Reverzna** YMC-ODS-AQ, C18, 4,6 mm x 15cm (YMC Japan)

### 3.1.5 Raztopine in pufri

Vse raztopine smo pripravili s prečiščeno vodo Mili-Q.

#### **Pufer za uravnavanje pH reakcije pegilacije**

Boratni pufer 0,01M s pH 9

0,01M s pH 10

#### **Pufer za spiranje kolone in elucijo pegiliranega IFN – CEA**

Mobilna faza A: 3,4 mM očetna kislina, 10% etanol, 1% dietilenglikol, pH 4,4

Mobilna faza B: 25mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10% etanol, 1% dietilenglikol, pH 6,6

#### **Pufer za spiranje kolone in elucijo pegiliranega IFN – DEAE**

Mobilna faza A: 3,4 mM Na fosfat, pH 8,5.

Mobilna faza B: 50mM Na fosfat, 500mM NaCl, pH 8,5

#### **Pufer za spiranje kolone in elucijo pegiliranega IFN – reverzna**

Mobilna faza A: 10% acetonitril s 0,1 % TFA

Mobilna faza B: 100% acetonitril s 0,1 % TFA

#### **Pufer za preparativno izolacijo pegiliranega IFN- $\alpha$ 2b**

Separacija:

Pufer A: 25mM CH<sub>3</sub>COOH/NaOH, pH 3,8

Pufer B: 75mM CH<sub>3</sub>COOH/NaOH, pH 8,0

### **Pufri za SDS-PAGE**

**Elektroforezni pufer:** NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x), NP0002, Invitrogen, pred uporabo redčimo z vodo Milli-Q v razmerju 1 : 20, da dobimo 1-kratni MES elektroforezni pufer.

**Vzorčni pufer:** NuPAGE LDS Sample Buffer (4x), NP0007, Invitrogen, dvakratni vzorčni pufer pripravimo z redčenjem z vodo Milli-Q.

**Reducent:** Nu-PAGE Sample Reducing Agent (10x), NP0004, Invitrogen.

### **Končni pufer za shranjevanje pegiliranega IFN- $\alpha$ 2b**

Zamenjalni pufer: NaCl/Na acetat, pH 6

### **Raztopine za barvanje gelov**

#### **Simply blue**

Symple Blue Safe Stain, LC6065, Invitrogen

vodo Milli-Q

### **3.1.6 Standard**

**Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard**, (LC5800, Invitrogen): standard molekulskih mas (*SDS-PAGE*): nanos: 5  $\mu$ L; 260 kDa, 160 kDa, 110 kDa, 80 kDa, 60 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 30 kDa, 20 kDa, 15 kDa, 10 kDa, 3,5 kDa

### 3.1.7 Laboratorijska oprema

**Kromatografske kolone:** proizvajalec Amersham Biosciences.

**Kromatografski sistem:** Akta purifier 10, zbiralec frakcij Frac-950, program za obdelavo podatkov: Unicorn, (GE Healthcare),.

**Analitski kromatografski sistem:**

Waters analytical HPLC system W2390/5, Waters 2475 Multi  $\lambda$  Fluorescence Detector;  
Agilent Technologies 1200 series analytical HPLC system

**UV-VIS spektrofotometer:** Varian 5000 UV-VIS-NIRspectrophotometer LO159

**Termični blok:** Techno Dri-Black 08-3 (*segrevanje na 95 °C*) in CH-100 (*segrevanje na 70 °C*).

**Pribor za nanašanje vzorca na elektroforezni gel:** 25  $\mu$ L brizga, Hamilton.

**Elektroforezni sistemi:** vertikalni elektroforezni sistem Lock™ System, Invitrogen

**Izvor napetosti za elektroforezo:** Power-Pac 300, Biorad.

**Namizni stresalnik:** Vibromix 314 EVT, Tehnica Železniki d.o.o.

**pH meter:** MA 5741, Iskra.

**pH indikatorski papir:** Universalindikator pH 1 – 10, Merck.

**Filtri za sterilno filtracijo:** Millex Syringe Driven filter Unit, Millipore Corporation.

**Pipete:** Pipetman 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L, Gilson.

**Analitska tehtnica:** Sartorius Analytic.

**Precizna tehtnica:** Exacta 300 EB, Tehnica Železniki d.o.o.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Pegilacija IFN- $\alpha$ 2b (PEG-pNF, PEG-NHS)

Raztopini IFN- $\alpha$ 2b s koncentracijo 2 mg/ml in pH 7,4 smo dodali boratni pufer; 0,01M s pH 9 oz. 0,01M s pH 10, v tolikšni količini, da smo uravnavali pH reakcijske mešanice na željeno vrednost. Za doseg pH 7 smo dodali 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Za izenačenje koncentracij v pegilacijskih mešanicah smo razlike v volumnih puffrov za uravnavo pH kompenzirali z dodatkom miliQ-H<sub>2</sub>O. PEG reagente smo dodali v obliki praška, v različnih pribitkih. Reakcijska zmes se je mešala na sobni T, različno dolgo, ob rahlem stresanju, v temi. V prvi in drugi uri smo še z 0,1M NaOH uravnavali pH reakcijske mešanice. Reakcijo smo zaustavili z dodatkom 40mM nepufrane CH<sub>3</sub>COOH, pH 3,8. Pri nižjem pH namreč pegilacija ne poteka.

Pri reakciji s PEG-pNF, pH med samo reakcijo ni bil uravnavan. Izkazalo se je, da PEG-pNF niti ne vpliva toliko na pH reakcije in se v času pegilacije pH ne znižuje tako kot pri uporabi PEG-NHS.

### 3.2.2 Pegilacija IFN- $\alpha$ 2b (CHO)

Raztopini IFN- $\alpha$ 2b s koncentracijo 2 mg/ml in pH 7,4 smo dodali 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v tolikšni količini, da je bil pH reakcijske mešanice 5,0. PEG reagente smo dodali v obliki praška, v različnih pribitkih. V pegilacijsko mešanico je bil dodan tudi reducent (NaCNBH<sub>3</sub>) s končno koncentracijo 20 mM. Mešanje reakcijske zmesi je potekalo pri 4°C različno dolgo, ob rahlem stresanju v temi. Reakcijo smo zaustavili z odstranitvijo reducenta na koloni Zeba.

### 3.2.3 Reverzibilna zaščita lizinskih ostankov

Za zaščito lizinskih ostankov IFN- $\alpha$ 2b smo uporabili 2-metilmaleinanhidrid. Raztopini IFN- $\alpha$ 2b s koncentracijo 2 mg/ml in pH 7,4 smo dodali redčeno raztopino anhidrida. Anhidrid je potrebno redčiti, ker je sicer v reakciji prevelika molarna koncentracija. Pri redčenju so se pojavljale težave zaradi viskoznosti. Ni se homogeno mešal z vodo, zato je



prišlo do nelinearnih zaščit lizinov. V končnih postopkih smo zato uporabili kar neredčen anhidrid, ki sem ga dodala večji količini raztopine proteina.

Takoj po dodatku različnih prebitkov anhidrida smo z 0,02 M NaOH oziroma z 0,1 M Na boratom dvignili pH na 8-9. Mešanico smo po rahlem mešanju na sobni T, po 1h, 2h, 3h analizirali z anionsko kromatografijo.

### **3.2.4 Uporaba kolone ZEBA za odstranjevanje odvečnega anhidrida**

Kolone Zeba uporabljamo za odstranjevanje soli oz. majhnih molekul iz raztopine. Ločevanje molekul na koloni Zeba poteka po principu gelske filtracije. Vzorec odpipetiramo na kolono (30-130  $\mu$ l), položimo v 1,5 ml epruvetko eppendorf in centrifugiramo pri 1500 obratih, 1min. V tekočini v epici je ves protein, anhidrid pa je ostal ujet na koloni.

## **ANALIZNE METODE ZA IDENTIFIKACIJO**

### **3.2.5 Kationsko-izmenjevalna kromatografija**

Za kationsko kromatografijo smo uporabili kolono TSK-gel SP-5PW, 7,5 mm x 7,5 cm (Tosoh Bioscience). Mobilna faza A je bila: 3,4 mM očetna kislina, 10% etanol, 1% dietilenglikol, pH 4,4. Elucijo smo izvedli z linearnim gradientom (v 115 min) s pufrom B s pH 6,6; 25mM  $K_2HPO_4$ , 10% etanol, 1% dietilenglikol. Pretok je bil 1 ml/min. Detekcijo smo izvajali pri 215 nm in fluorescenci: vzbujanje 280 nm / emisija 345 nm. Količina injiciranega vzorca je bila 20 -100  $\mu$ g.

### **3.2.6 Anionsko izmenjevalna kromatografija**

Za anionsko kromatografijo smo uporabili kolono TSK-gel DEAE NPR, 7,5 mm x 7,5 cm (Tosoh Bioscience). Pred začetkom kromatografije smo aktivirali metodo brez nanosa vzorca, nato pa smo kolono ekvilibrirali z vsaj dvema volumnoma kolone začetnega pufra. Mobilna faza A je bila: 3,4 mM Na fosfat s pH 8,5. Elucijo smo izvedli z linearnim gradientom do 65% pufra B v 18 min s pH 8,5. Mobilno fazo B sestavlja 50 mM Na fosfat in 500mM NaCl. Pretok je bil 1 ml/min. Detekcijo smo izvajali pri 215 nm in fluorescenci: vzbujanje 280 nm / emisija 345 nm. Količina injiciranega vzorca je bila 20 -100 µg.

### **3.2.7 Tekočinska reverzno fazna kromatografija visoke ločljivosti**

Za separacijo pegiliranih konjugatov, smo uporabili tudi Agilent Technologies 1200 series, analitski sistem s kolono YMC-ODS-AQ, C18, 4,6 mm x 15cm (YMC Japan). Elucija je uravnavana s pretokom 1ml/min z linearnim gradientom iz 10% do 100% acetonitrila s 0,1 % TFA v 30 min, pri 70C. Detektiramo pri 215nm.

### **3.2.8 SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza**

Za SDS-PAGE smo uporabili že pripravljene gele (Nu-PAGE 4-12 % Bis-Tris Gel, Invitrogen). Ustrezno redčenim proteinskim vzorcem smo dodali reducent 4xSB, v razmerju 3 : 1. Sledila je denaturiracija z 10-minutnim segrevanjem pri 70 °C. Za kalibracijo smo uporabljali standard molekulskih mas Novex Sharp MV Standard. Elektroforeza je potekala 40 minut pri napetosti 200 V.

### 3.2.9 Barvanje gelov z barvilom Simply Blue Safe Stain

Proteine po elektroforezi detektiramo z barvanjem. Barvanje je nespecifično, saj se barvilo veže na pozitivno nabite skupine lizina, tudi arginina in histidina. Razlika je v jakosti obarvanja proteinov. Močno bazični proteini se obarvajo močneje kot močno kisli proteini.

Postopek barvanja:

1. po koncu elektroforeze gel namakamo v vodi Milli-Q 3-krat po 5 min, pri sobni T
2. dolijemo barvilo Simply Blue Safe Stain, predhodno segreto na 50°C, in pustimo gel v barvilu med rahlim stresanjem 30 min
3. na koncu gel še 30 min pustimo v vodi Milli-Q, pri sobni T, da se razbarva

### 3.2.10 Kromatografska izolacija

Za preparativno izolacijo smo uporabili kationsko kolono (Tricorn 10/100, volumna 6,4ml, nosilec TSK gel (SP-5PW, 30µm delci); proizvajalec Tosoh Bioscience) nanesimo vzorec,. Kot vezavni pufer smo uporabili pufer A. Po nanosu vzorca smo spirali kolono z volumnom kolone, nato pa dosegli separacijo z linearnim gradientom pufera B, s katerim nato eluiramo izomere IFN- $\alpha$ 2b. Pretok je uravnavan na 2ml/min z gradientom 0-100% pufera B v 35-kratnem volumnu kolone oz. v 112min.

Ločimo lahko monopegiliran, dipegiliran in večpegiliran protein.

Začetne - nevezane frakcije zbiramo v posebno epruveto, potem ko se začne gradient, pa nastavimo na avtomatsko zbiranje v epruvete po 2 ml. Frakcije smo analizirali na SDS-PAGE in na podlagi teh analiz so bile izbrane frakcije, ki smo jih združili, zamenjali pufer in nadaljnje analizirali.

### 3.2.11 Menjava pufera

Najprej speremo centrifugirko s 15 ml MQ H<sub>2</sub>O, nato še s 15 ml zamenjalnega pufera; 15 min, na 3500 obr/min. Vzorec koncentriramo na 2ml, pri 3500 obr/min in nato 3x

speremo z zamenjalnim pufrom, do 1 ml. Na koncu dodamo toliko pufra, da je končni volumen 1,5 ml.

Centrifugirka Amicon: 15 ml, 10000 kDa

Zamenjalni pufer: NaCl, Na acetat, pH 6

V tem pufru je protein zagotovo dalj časa stabilen, da po odmrzitvi vzorcem lahko izmerimo biološko aktivnost.

### **3.2.12 Določanje biološke aktivnosti**

Meritve so opravili v Laboratoriju za biosintezo in biotransformacijo biološko aktivnih snovi na Kemijskem inštitutu (dr. Simon Caserman in Maja Marušič).

*In vitro* učinkovitost je bila opazovana na gensko spremenjeni človeški celični liniji HEK293P. Ob prisotnosti IFN- $\alpha$ 2b, celice izločajo SEAP v testni medij, ki substrat pNPP pretvori v obarvan produkt.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Amino selektivni pegilacijski reagenti omogočajo enostavno konjugacijo. Njihova slaba stran pa je, da pri konjugaciji nastanejo heterogene mešanice. Visoka nespecifičnost reakcije pomeni manjši delež iskanega konjugata in posledično manjši izkoristek pegilacije. Visoka heterogenost pegilacijske mešanice pa vedno predstavlja tudi večji iziv pri kromatografskem čiščenju oz. izolaciji tarčnega konjugata.

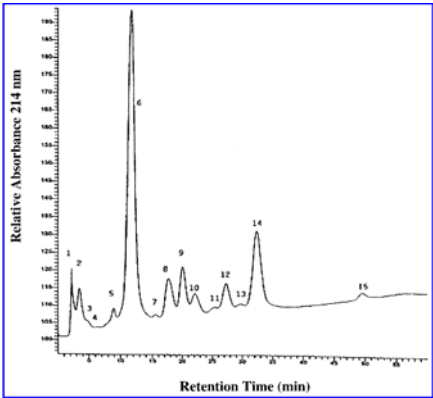
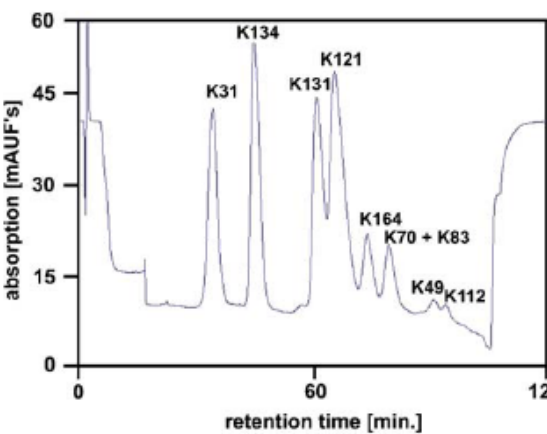
IFN- $\alpha$ 2b, ki je bil naš modelni protein, ima 12 primarnih amino skupin (N-terminalna in 11 lizinskih ostankov; Lys 23, Lys 31, Lys 49, Lys 70, Lys 83, Lys 121, Lys 131, Lys 133, Lys 134, Lys 164) in prav vse predstavljajo potencialna mesta za konjugacijo z aminoselektivnim pegilacijskim reagentom, saj se vse nahajajo bolj ali manj na površini proteina. Potencialna pegilirana mesta, so tudi His7 in Tyr129. [30]



Slika 9: Struktura IFN- $\alpha$ 2b (rdeče obarvane pozicije označujejo ostanke, ki predstavljajo možna pegilacijska mesta) [30].

Tržna produkta Pegintron<sup>®</sup> in Pegasys<sup>®</sup> sta pripravljena z različnima aminoselektivnima pegilacijskima reagentoma in sta mešanici različno monopegiliranih položajnih izomerov. Pegintron<sup>®</sup> sestavlja 13, Pegasys<sup>®</sup> pa 6 izomerov. [14]

## Preglednica 3

	
<p>Slika 10: Pegintron<sup>®</sup> analiziran s kationsko izmenjevalno kromatografijo. Prevladujoči položajni izomer je His34.</p>	<p>Slika 11: Pegasys<sup>®</sup> analiziran s kationsko izmenjevalno kromatografijo. Prevladujoči položajni izomeri so Lys 31, Lys 134, Lys 131, Lys 121.</p>

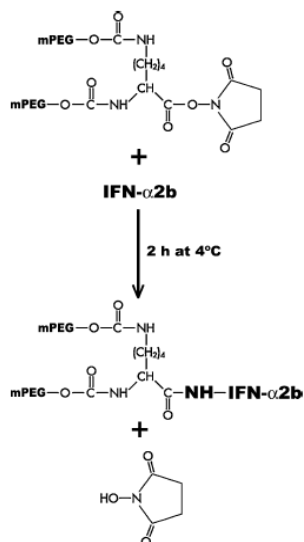
Manjša heterogenost Pegasysa<sup>®</sup> je posledica uporabe drugačne reaktivne skupine na PEG verigi. Pegasys<sup>®</sup> je pripravljen s PEG-NHS reagentom, ki je bolj selektiven kot PEG-SC, ki se uporablja pri pripravi Pegintrona<sup>®</sup>. Manjše število položajnih izomerov je pri Pegasysu<sup>®</sup> tudi posledica uporabe razvejanega in 40kDa velikega PEG reagenta, ki v primerjavi z 12 kDa velikim PEG reagentom, ki se uporablja pri pripravi Pegintrona<sup>®</sup>, predstavlja večjo sterično oviro pri vezavi naslednje PEG verige.

Na potek reakcije pegilacije lahko vplivamo tudi s pH, molarnim razmerjem reaktantov, temperaturo in izbiro pegilacijskega reagenta.

V tem diplomskem delu smo preiskovali tri pegilacijske reagente in za vse smo najprej poiskali pogoje, pri katerih nastane največ monopegiliranih konjugatov.

## 4.1 PEGILACIJA

### 4.1.1 Pegilacija IFN- $\alpha$ 2b s PEG-NHS reagentom



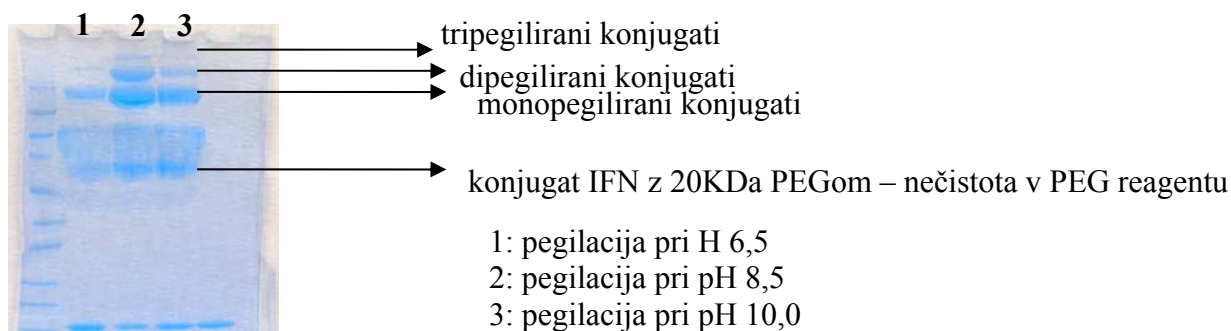
Slika.12.1: Prikaz reakcije [10]

Da bi poiskali optimalne pogoje pegilacije IFN- $\alpha$ 2b z razvejanim 40 kDa PEG-NHS reagentom, smo nastavili set poskusov, pri katerih smo spreminjali pH in čas poteka reakcije. Testni pogoji so predstavljeni v spodnji tabeli.

#### Preglednica 4: Različni pH in časi pegilacije

Prebitek PEG reagenta	pH	čas		
5-kratni	6,5	2,5h	4,5h	6,5h
5-kratni	8,5	2,5h	4,5h	6,5h
5-kratni	10,0	2,5h	4,5h	6,5h

Potek reakcije v posameznih mešanicah smo spremljali z analitsko kationsko izmenjevalno kromatografijo in SDS-PAGE analizo. SDS-PAGE loči molekule po velikosti, zaradi česar je možno spremljati reakcijo pegilacije. Na sliki 12.2 je prikazan gel, kjer se vidi sestava pegilacijske mešanice. Najnižje na gelu je nemodificiran IFN- $\alpha$ 2b, višje sta monopegiliran in dipegiliran, najvišje na gelu je tripegiliran konjugat IFN- $\alpha$ 2b.

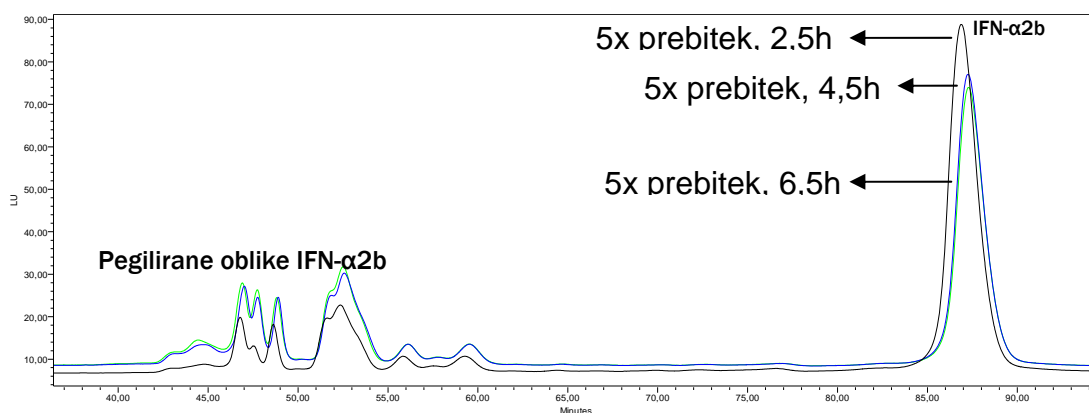


Slika 12.2: SDS-PAGE

Pri pH 6,5 poteka pegilacija počasneje kot pri pH 8,5 in 10. Na gelu se vidi, da pri pH 6,5 ostane največ nezreagirane IFN- $\alpha$ 2b, zelo malo pa je tudi dipegiliranega konjugata. Hitrost reakcije med amino skupino proteina in aktivirano kislino PEG reagenta naj bi se povečevala z višanjem pH, kar pomeni, da bi morala biti najvišja pretvorba pri pH 10. Eksperimentalni podatki kažejo, da pegilacija potekla slabše pri pH 10 kot pri pH 8,5. Razlog je najverjetneje, da pri pH 10 NHS skupina hidrolizira, pri čemer nastaja neaktivna oblika reagenta.

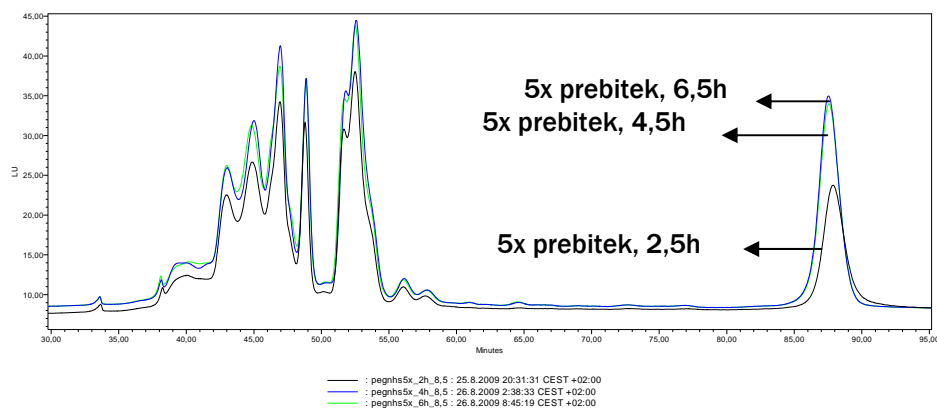
Pegilacijske mešanice so bile analizirane z analitsko kationsko izmenjevalno kromatografijo. Le-ta omogoča detekcijo različnih položajnih izomer.

Primerjava asignacije vrhov Pegasysa<sup>®</sup> na kationskem kromatogramu (Slika 11) z našimi pegilacijskimi mešanicami kaže na to, da pegilacija z PEG-NHS reagentom poteče na Lys31, Lys134, Lys131, Lys121, Lys164, nastane pa je tudi nekaj dipegiliranih in višjepegiliranih konjugatov.

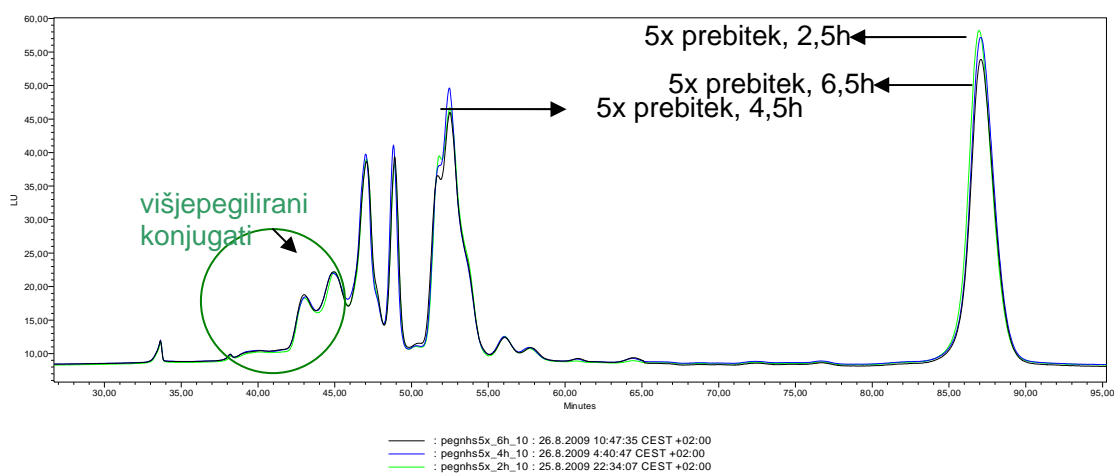


Slika 12.3: Pegilacijska mešanica pripravljena s 5-kratnim prebitkom PEG-NHS pri pH 6,5, po različnih časih, analizirana s kationsko-izmenjevalno kromatografijo.





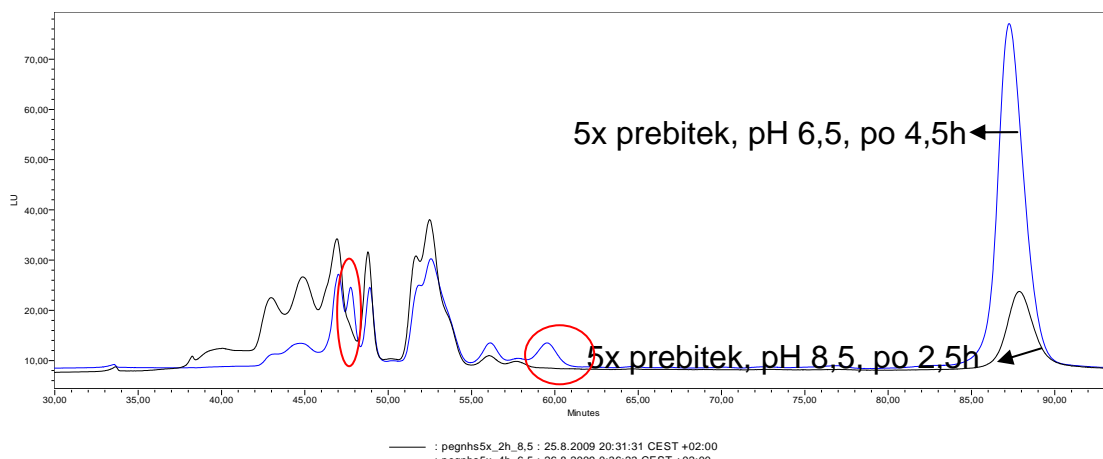
Slika 12.4: Pegilacijska mešanica pripravljena s 5-kratnim prebitkom PEG-NHS pri pH 8,5, po različnih časih, analizirana s kationsko-izmenjevalno kromatografijo.



Slika 12.5: Pegilacijska mešanica pripravljena s 5-kratnim prebitkom PEG-NHS pri pH 10 po različnih časih, analizirana s kationsko-izmenjevalno kromatografijo.

Z analizo pegilacijskih mešanic pri različnih časih pegilacije smo ugotovili, da se pri pH 6,5 pegilacija konča oz. se sestava pegilacijske mešanice ne spreminja več po 4,5 urah, medtem ko je pri pH 10 reakcija pegilacije konča že po 2,5 urah.

pH ima vpliv na potek pegilacije. Pri pH 6,5 sta na kationskem kromatogramu vidna dva dodatna vrha (Slika 12.6), ki nakazujeta prisotnost dveh dodatnih položajnih izomerov.



Slika 12.6: Primerjava pegilacijskih mešanic, pripravljenih s 5-kratnim prebitkom PEG reagenta pri pH 6,5 in 8,5.

Za pegilacijo s PEG-NHS reagentom smo izbrali pH 8,5, saj pri teh pogojih nastane največ monopegiliranih konjugatov, obenem pa je število položajnih izomer najmanjše.

V naslednjem poskusu smo želeli določiti prebitek PEG reagenta. Testni pogoji so predstavljeni v spodnji tabeli.

**Preglednica 5: Testni pogoji pri različnih prebitkih PEG-a.**

Prebitek PEG reagenta	pH	čas		
		1h	2h	3h
3-kratni	8,5	1h	2h	3h
5-kratni	8,5	1h	2h	3h

Pegilacijo smo nastavili tako, kot je napisano v poglavju 3.2.1. Pegilacijske mešanice smo analizirali z analitsko kationsko kromatografijo.



Kot optimalne pogoje pegilacije smo izbrali pH 8,5, 5-kratni moralni prebitek PEG reagenta in čas pegilacije 3 h. Pri teh pogojih pegilacijsko mešanico sestavlja 10 % višjepegiliranih oblik (Slika 13.2, stolpič označen z 1), 55 % monopegiliranih položajnih izomerov (Slika 13.2, stolpiči 2,3,4,5) in 35 % IFN- $\alpha$ 2b (Slika 13.2, stolpič IFN).

#### 4.1.2 Pegilacija interferona s PEG-pNF

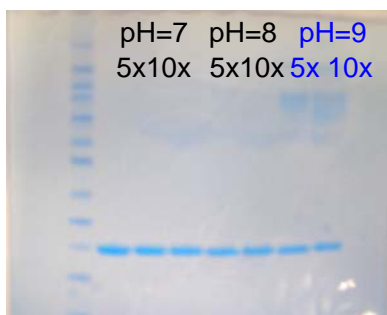
PEG s pNF reaktivno skupino lahko poleg z lizini, reagira tudi s histidini, serini in threonini.

Za določitev optimalnih pogojev pegilacije IFN- $\alpha$ 2b s 40 kDa linearnim PEG-pNF reagentom smo nastavili set poskusov, pri katerih smo spreminjali prebitek PEG reagenta, pH in čas poteka reakcije. Testni pogoji so predstavljeni v spodnji tabeli.

**Preglednica 6: Testni pogoji pri pegilaciji s PEG-pNF.**

Prebitek PEG reagenta	pH	čas		
5-kratni	7	2h	4h	1 dan
10-kratni	7	2h	4h	1 dan
5-kratni	8	2h	4h	1 dan
10-kratni	8	2h	4h	1 dan
5-kratni	9	2h	4h	1 dan
10-kratni	9	2h	4h	1 dan

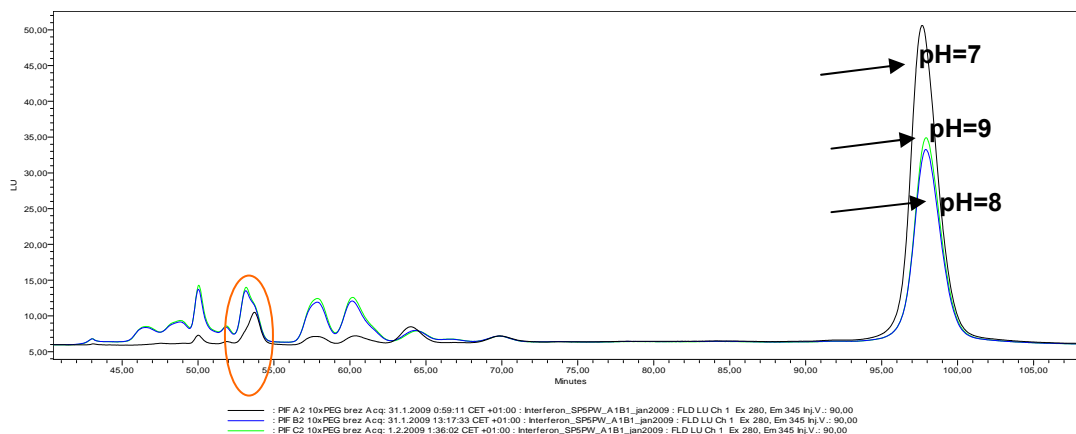
Potek reakcije v posameznih mešanicah smo spremljali z analitsko kationsko kromatografijo in SDS-PAGE analizo.



Slika 14.1 : SDS-PAGE vzorcev po 1 dnevu

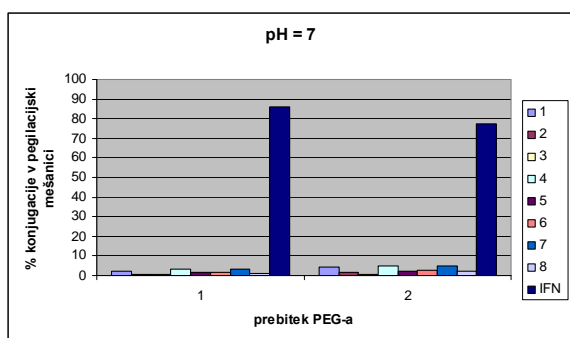
Pri testiranih pogojih je nastalo le malo pegiliranega produkta, še največ pri pH 9,0. Poskusili smo pegilacijo s 50x in 100x prebitkom PEG-pNF, vendar se je pri višjem prebitku PEG reagenta začel obarjati protein.

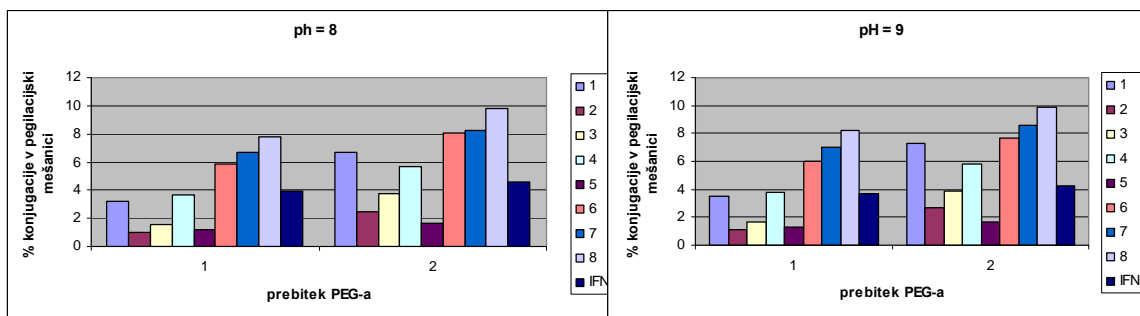
S SDS-PAGE gela je razvidno, da pegilacija pri pH 7.0 skoraj ne poteka. To potrjuje tudi analitska kationska kromatografija (Slika 14.2).



Slika 14.2: Slika 13.1: Pegilacijska mešanica pripravljena s 5 in 3-kratnim prebitkom PEG-NHS pri pH 8,5, po različnih časih, analizirana s kationsko-izmenjevalno kromatografijo (5, 4, 3, 2 označujejo monopegilirane položajne izomere, 1 so višjepegilirani konjugati IFN- $\alpha$ 2b).

pH vpliva na hitrost in selektivnost reakcije (Slika 14.2 črna linija v primerjavi z modro in zeleno). Pri pH 7.0 je reakcija zelo počasna, prevladuje pa en vrh (slika 14.2, označen z rdečim), ki pri višjem pH ni tako izrazit. Čeprav je pri nižjem pH reakcija bolj selektivna, teh pogojev nismo izbrali za pegilacijo, zaradi zelo nizkih izkoristkov.



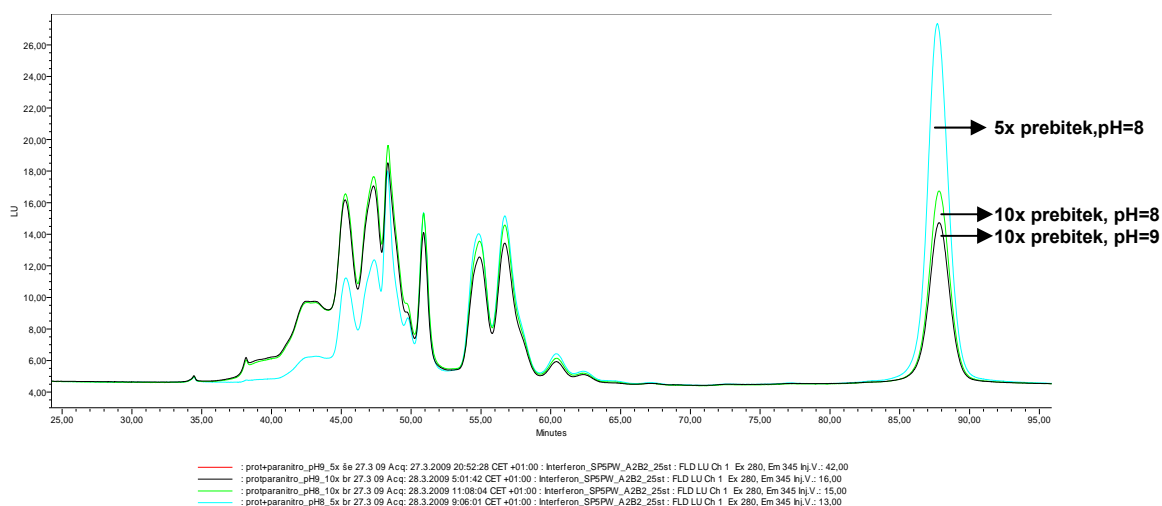


Slika 14.3: Sestava pegilacijskih mešanic, pripravljenih s 5x (1) in 10x (2)-im prebitkom PEG-pNF pri različnih pH (8,7,6,5, 4, označujejo monopegilirane položajne izomere, 1, 2 in 3 so višjepegilirani konjugati IFN- $\alpha$ 2b, IFN pa označuje nepegiliran IFN- $\alpha$ 2b).

V naslednjem poskusu smo želeli določiti prebitek PEG reagenta in okvirni čas pegilacije. Testni pogoji so predstavljeni v spodnji tabeli.

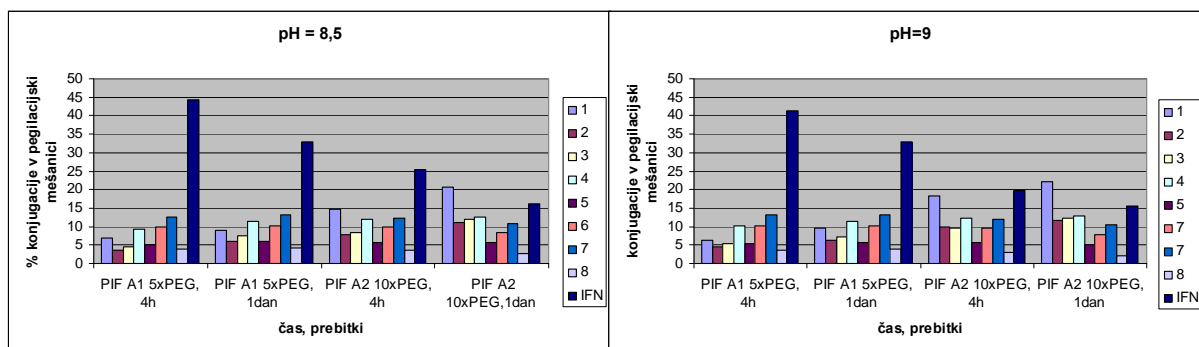
Preglednica 7: testni pogoji pri 3x in 5x-im prebitkom PEG-a

Prebitek PEG reagenta	pH	čas		
		4h	1 dan	3 dnevi
5-kratni	8,5	4h	1 dan	3 dnevi
10-kratni	9	4h	1 dan	3 dnevi
5-kratni	8,5	4h	1 dan	3 dnevi
10-kratni	9	4h	1 dan	3 dnevi



Slika 15.1: Pegilacijska mešanica, pripravljena s 5-kratnim in 10-kratnim prebitkom PEG-pNF, pri pH 8.5 in pH 9, analizirana s kationsko-izmenjevalno kromatografijo.

Kot že prej ugotovljeno, se s prebitkom PEG reagenta poveča stopnja pegilacije. Razlika med pH 8.5 in pH 9, po enem dnevu in treh dneh ni bistvena. Po štirih urah pegilacija še ni končana.



Slika 15.2: Sestava pegilacijskih mešanic, pripravljenih s 5x (1) in 10x (2)-im prebitkom PEG-pNF pri pH 8,5 in 9,0 po različnih časih (8,7,6,5, 4, označujejo monopegilirane položajne izomere, 1, 2 in tri so višjepegilirani konjugati IFN- $\alpha$ 2b, IFN pa označuje nepegilirani IFN- $\alpha$ 2b).

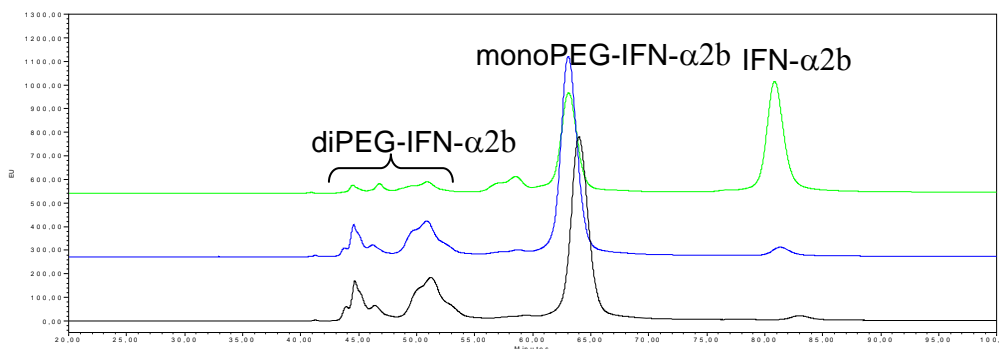
Iz diagrama smo določili najprimernejši prebitek in pH za nadaljnje poskuse. Odločili smo se za 5-kratni prebitek. Med pH-jema ni bistvene razlike, zato smo izbrali pH med 8,5 in 9. Pegilacijski čas pa mora biti vsaj en dan.

#### 4.1.3 Pegilacija s PEG-CHO reagentom

S tem reagentom so v farmacevtski družbi Lek že izvajali poskuse, tako da smo okvirne pogoje pegilacije (prebitek PEG reagenta, pH) že poznali. Za pegilacijo smo izbrali 10-kratni molarni prebitek PEG-reagenta, pri pH 5 in temperaturi 4°C. [22]

##### 4.1.3.1 Pogoji pegilacije

Pegilacijsko mešanico smo analizirali po 4, 10 in 12 urah. Optimalni čas pegilacije pri teh pogojih je 10 ur [22].



Slika 16: Pegilacijska mešanica, pripravljena z 10-kratnim prebitkom PEG-CHO, pri pH 5.0 in različnih časih (zelena–4h, modra–10h in črna–12h), analizirana s kationsko-izmenjevalno kromatografijo.

Potrdili smo, da je optimalni čas pegilacije pri izbranih pogojih 10 ur. Pri desetih urah je delež nepegiliranega IFN- $\alpha$ 2b minimalen, prevladuje pa monopegiliran konjugat. Z nadaljnjim podaljševanjem časa pegilacije se povečuje delež dipegiliranih konjugatov na račun monopegiliranih konjugatov.

PEG-CHO reagent je zelo selektiven saj pretežno reagira z N-terminalno amino skupino. V našem primeru je ves monopegiliran pik N-terminalno pegiliran IFN- $\alpha$ 2b.



## 4.2 REVERZIBILNA ZAŠČITA LIZINOV pred pegilacijo

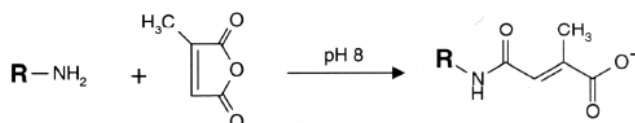
V literaturi smo našli postopek, ki je vključeval reverzibilno zaščito amino skupin pred pegilacijo. Z uporabo tega principa jim je uspelo doseči večjo specifičnost pegilacije, saj so se pegilirale le tiste aminoskupine, ki niso bile zaščitene.

Pri pegilaciji IFN- $\alpha$ 2b smo preizkusili tak postopek. Za reverzibilno zaščito amino skupin pa smo uporabili anhidridom 2-metilmaleinskim.

### 4.2.1 Reakcijski pogoji zaščite lizinov

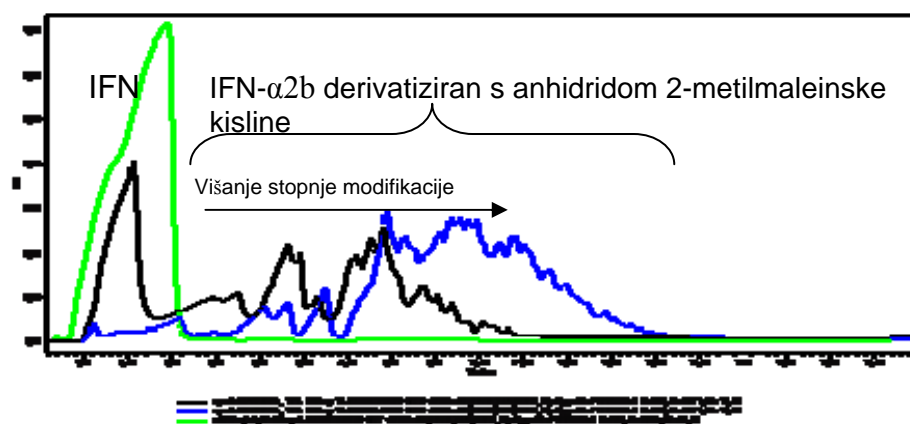
Po literaturnih podatkih je optimalni pH za reakcijo med anhidridom 2-metilmaleinskim in amino skupinami proteina med 8 in 9.

Za določitev ustreznih pogojev zaščite smo pri pH 8,5 testirali različne molarne prebitke anhidrida in različne reakcijske čase. Uporabljeni molarni prebitki anhidrida so bili 30, 60, 70, 110, 200 in 400-kratni.

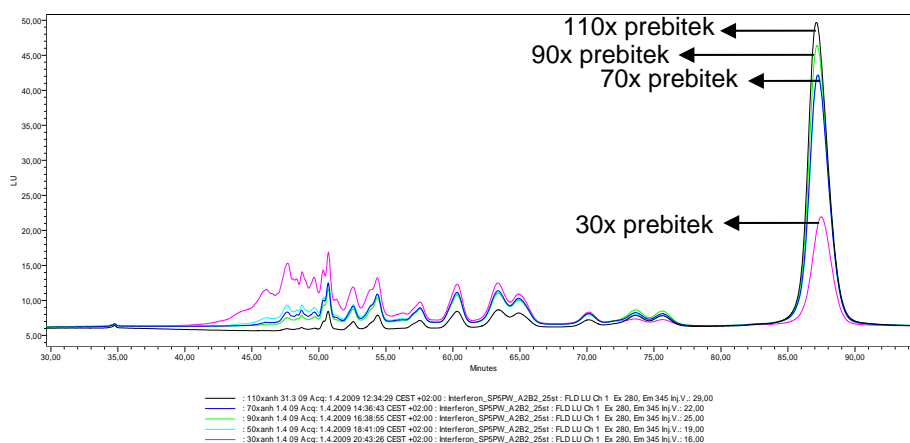


Slika 17: reakcija zaščite  $\epsilon$ -amino skupin lizinskih ostankov.

Stopnjo modifikacije proteina smo spremljali s kationsko ali pa z anionsko-izmenjevalno kromatografijo. Pri vezavi anhidrida na amino skupine pride do spremembe celokupnega naboja proteina. Pozitivni naboj lizina nadomesti negativni naboj karboksilne kisline (slika 17). Zaradi spremembe naboja se spremeni retencijski čas na kationsko- in anionsko-izmenjevalni koloni. Modificiran IFN- $\alpha$ 2b se na anionsko-izmenjevalni koloni eluira za nemodificiranim IFN- $\alpha$ 2b (Slika 17.1), na kationsko-izmenjevalni pa ravno obratno (Slika 17.2). Modificiran IFN- $\alpha$ 2b se eluira pred nemodificiranim.



Slika 17.1: Anionsko-izmenjevalna kromatografija IFN- $\alpha$ 2b po inkubaciji s 30-kratnim prebitkom po 2h (črna) in 60-kratnim prebitkom anhidrida po 1h (modra). Standard IFN- $\alpha$ 2b (zeleni) ima širok vrh zaradi prevelikega nanosa vzorca na kolono.



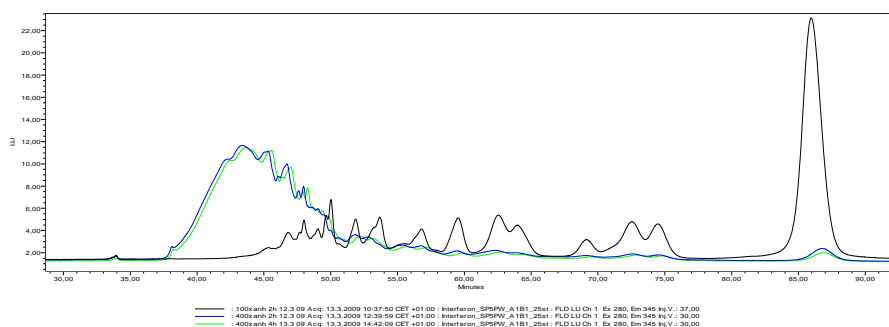
Slika 17.2: Kationsko-izmenjevalna kromatografija IFN- $\alpha$ 2b po inkubaciji z različni prebitki anhidrida.

Veliko število vrhov, ki so vidni na kationsko- in anionsko-izmenjevalni koloni, nakazuje, da pri reakciji nastane kompleksna mešanica, katero sestavljajo molekule z različno stopnjo modifikacije in z različno kombinacijo modificiranih lizinov.

S preizkušanjem različnih prebitkov anhidrida smo ugotovili, da je ta reakcija zelo neponovljiva. Glavni razlog je po vsej verjetnosti priprava redčene raztopine anhidrida. Anhidrid je potrebno pred dodatkom k proteinu do 1000 x redčiti. Porazdeljevanje anhidrida v vodi in tudi v pufru pa ni bilo najboljše.

Pri časovnem spremljanju reakcije smo ugotovili, da neodvisno od prebitka po dveh urah reakcija med proteinom in anhidridom ne poteka več.

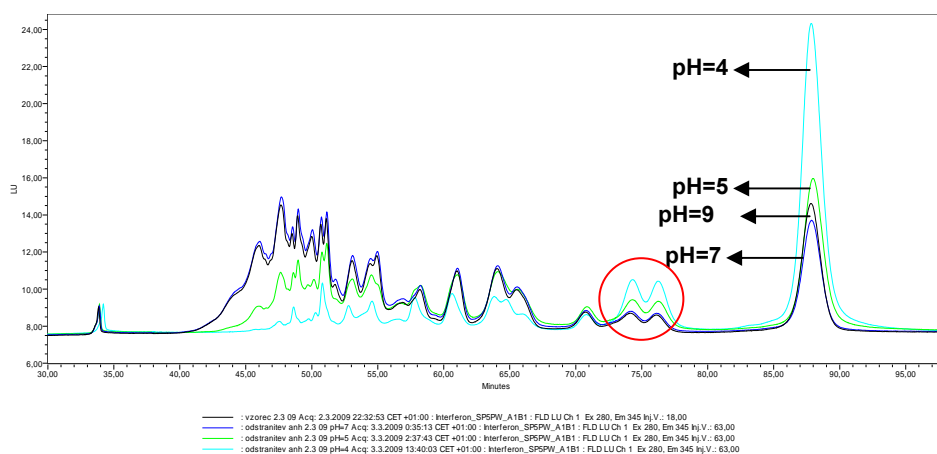
Končni postopek zaščite amino skupin je bil: 30-kratni prebitek anhidrida pri pH 8.5 in sobni temperaturi. Po dveh urah smo vzorec analizirali z ionsko-izmenjevalno kromatografijo. Če niso bile vse molekule IFN- $\alpha$ 2b modificirane, smo dodali nov alikvot anhidrida in po dveh urah ponovno analizirali vzorec.



Slika 17.3: Kationska-izmenjevalna kromatografija IFN- $\alpha$ 2b po inkubaciji s 120-kratnim prebitkom anhidrida (črna krivulja - ves IFN- $\alpha$ 2b se ne modificira), po inkubaciji s 400-kratni prebitek anhidrida po 2h in 4h (modra in zelena krivulja - ob tej količini anhidrida se modifira ves IFN in sicer poteče reakcija do konca že po dveh urah).

#### 4.2.2 Reakcijski pogoji odščite lizinov

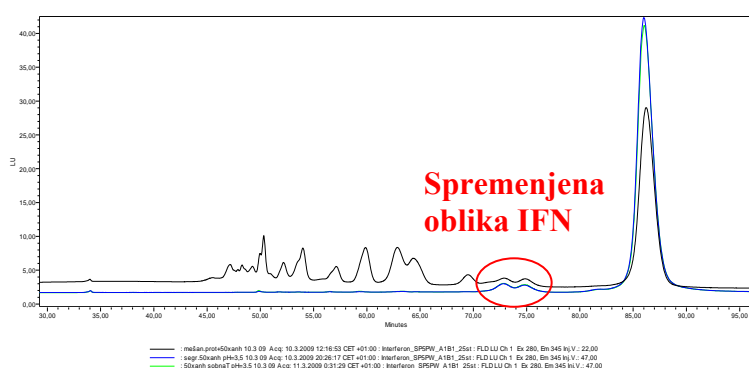
Odstranjevanje zaščite naj bi potekalo pri nizkem pH ali pa ob dodatku hidroksilamina. Po postopku, opisanem v poglavju 1.5, smo spremljali odstranjevanje zaščite pri različnih pH. Testirani pogoji so bili pH 7.0, 5.0 in 4.0, pri sobni temperaturi (Slika 18.1) ter pH 3.5 in 3.0 pri 35°C (Sliki 18.1).



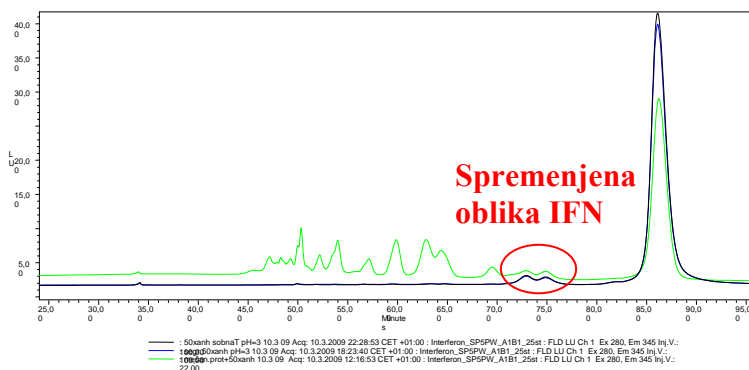
Slika 18.1: Odstranitev anhidrida pri pH 4, pH 5 in pH 7, analiza s kationsko-izmenjevalno kromatografijo po 24 urah.

Vzorec za spremljanje odščite smo pripravili s 30-kratnim prebitkom anhidrida 2h na sobni temperaturi. Črna krivulja na kromatogramu (Slika 18.1) prikazuje IFN- $\alpha$ 2b, zaščiten z anhidridom. Pri pH 7 poteče reakcija malenkost dlje. Največ anhidrida se odstrani pri pH 4, vendar ne pride do popolne odščite. Pri tem postopku nastanejo tudi molekule IFN- $\alpha$ 2b, ki se malo razlikujejo od nativnega IFN- $\alpha$ 2b (na Sliki 18.1 obkroženo z rdečim).

Ker pri izbranih pogojih nismo dosegli odščite, smo poskusili s še nižjim pH in povišano temperaturo.



Slika 18.2: Odstranitev anhidrida pri pH 3,5, analiza s kationsko-izmenjevalno kromatografijo po 24 urah.



Slika 18.3: Odstranitev anhidrida pri pH 3, analiza s kationsko-izmenjevalno kromatografijo po 24 urah.

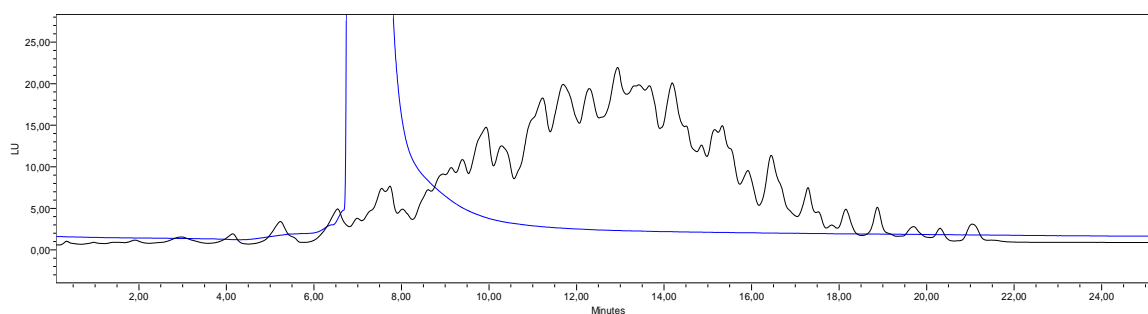
Črna krivulja na Sliki 18.2 in zelena krivulja na Sliki 18.3 prikazujeta zaščito IFN- $\alpha$ 2b s 57-kratnim prebitkom anhidrida. Po treh urah smo znižali pH na 3,5 in 3,0. En del vzorca smo segrevali 3 h na 35 °C, drugi del je stal 13 ur na sobni T. V vseh primerih se je odstranil ves anhidrid. To je opazno tudi iz kromatograma, saj se vrh IFN- $\alpha$ 2b spet poveča.

Z dodatkom anhidrida se v manjši meri spremeni struktura proteina, ki ostane prisotna tudi po odstranitvi anhidrida (obkroženo). Te molekule imajo manjši pozitivni celokupni naboj.

Pri tem poskusu smo ugotovili, da s segrevanjem med odstranjevanjem anhidrida nastaja več modificirane oblike IFN- $\alpha$ 2b, medtem ko s potekom reakcije pri sobni T te modificirane oblike ni.

#### 4.2.3 Biološka aktivnost *in vitro* zaščitenega IFN- $\alpha$ 2b in IFN- $\alpha$ 2b po odščiti

Ker smo opazili, da pri odščiti amino skupin nastanejo tudi spremenjene oblike IFN- $\alpha$ 2b, smo preverili vpliv postopka na *in vitro* biološko učinkovitost IFN- $\alpha$ 2b. Biološko učinkovitost smo izmerili IFN- $\alpha$ 2b modificiranim z anhidridom in IFN- $\alpha$ 2b po odstranitvi anhidrida. Anionske analize vzorcev, katerim je bila izmerjena biološka aktivnost, prikazuje slika 19.



Slika 19: Anionska-izmenjevalna kromatografija IFN- $\alpha$ 2b, derivatiziranega z anhidridom (črna) in IFN- $\alpha$ 2b po odščiti (modra).

Preglednica 8: rezultati biološke aktivnosti (100 % aktivnost ima IFN- $\alpha$ 2b)

vzorec	IFN- $\alpha$ 2b po odščiti	derivatiziran IFN- $\alpha$ 2b
Biološka aktivnost (%) *	<b>96,75</b>	<b>17,25</b>
SD	30,41	2,48

\* izražena kot delež učinkovitosti nemodificiranega IFN- $\alpha$ 2b

Učinkovitost *in-vitro* derivatiziranega IFN- $\alpha$ 2b pade na 17% nemodificiranega IFN- $\alpha$ 2b po odščiti pa se ponovno dvigne.

Standardna deviacija meritve jakosti po odščiti je zelo velika, zaradi česar ni možno trditi, da se jakost *in-vitro* po odščiti vrne na 100%.

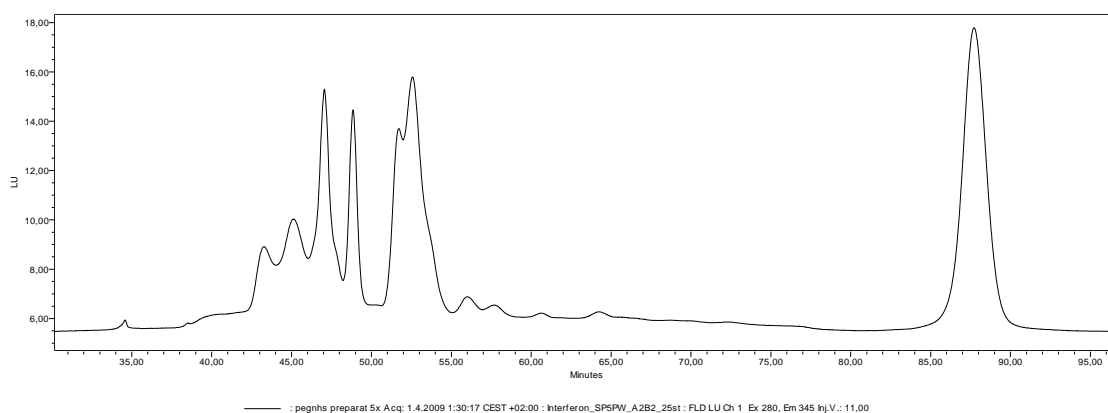
### 4.3 PREPARATIVNA IZOLACIJA PEGILIRANIH KONJUGATOV IFN- $\alpha$ 2b, pripravljenih s PEG-NHS, PEG-pNF in PEG-CHO reagentom

Izolacija monopegiliranega konjugata iz pegilacijske mešanice predstavlja dokaj velik izziv, saj je potrebno odstraniti nezreagirani PEG reagent, višjepegilirane konjugate, nemodificiran protein in vse reagente, ki so dodani v pegilacijsko mešanico. Gelska filtracija in hidrofobna kromatografija sta možni, vendar se najpogosteje uporablja kationsko-izmenjevalna kromatografija.

Izdelali smo tri pegilacijske reagente in izvedli pegilacijo z in brez zaščite amino skupin lizinskih ostankov, čemur je sledila izolacija 5 konjugatov. Konjugat s PEG-CHO reagentom in z lizinsko zaščito ni bil pripravljen, ker se pri pH 5,0, kjer poteka pegilacija, že pričinja odščita lizinov.

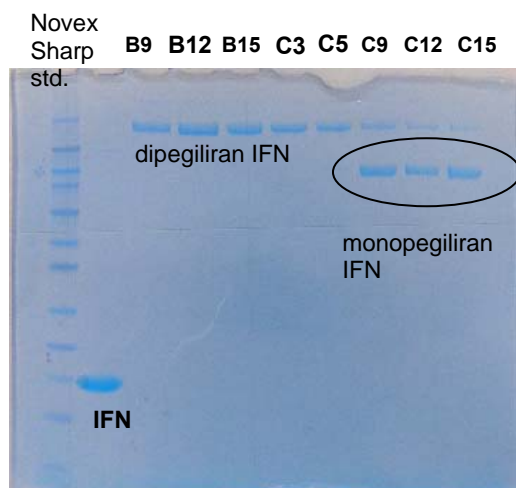
#### 4.3.1 Preparativna izolacija IFN- $\alpha$ 2b pegiliranega s PEG-NHS

Pri pogojih, ki smo jih predhodno optimirali, smo nastavili pegilacijo IFN- $\alpha$ 2b v malo večjem merilu z namenom preparativne izolacije monopegiliranega konjugata. Uporabili smo 5-kratni prebitek PEG-NHS reagenta. 4 mg IFN- $\alpha$ 2b, ki se shranjuje v Na-fosfatnem pufru s pH 7.4, smo uravnali pH z boratnim pufrom na 8.5. Pegilacijo smo pustili potekati 3 h, nato smo končali reakcijo z dodatkom 40 mM očetne kisline, saj pegilacija v kislem ne poteka več. Znižanje pH pegilacijske mešanice je potrebno tudi za vezavo IFN- $\alpha$ 2b na kationsko-izmenjevalno kolono. Slika 20.1 prikazuje analitsko kationsko analizo pegilacijske mešanice.



Slika 20.1: Kationsko-izmenjevalna kromatografija pegilacijske mešanice IFN- $\alpha$ 2b, pegiliranega s PEG-NHS reagentom .





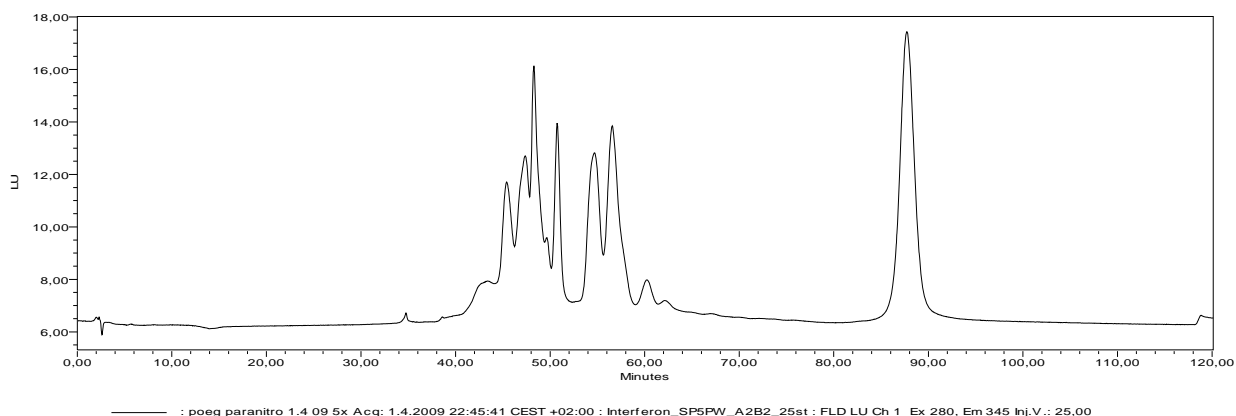
Slika 20.3: SDS-PAGE analiza posameznih frakcij po preparativni kationski kromatografiji.

Izoliran monopegiliran IFN- $\alpha$ 2b z NHS reagentom smo analizirali z analitsko kationsko kolono (Slika 20.3), SDS-PAGE in RP-HPLC.

#### 4.3.2 Preparativna izolacija IFN- $\alpha$ 2b pegiliranega s PEG-pNF reagentom

Pri pogojih, ki smo jih predhodno optimirali, smo nastavili pegilacijo IFN- $\alpha$ 2b v malo večjem merilu z namenom preparativne izolacije monopegiliranega konjugata.

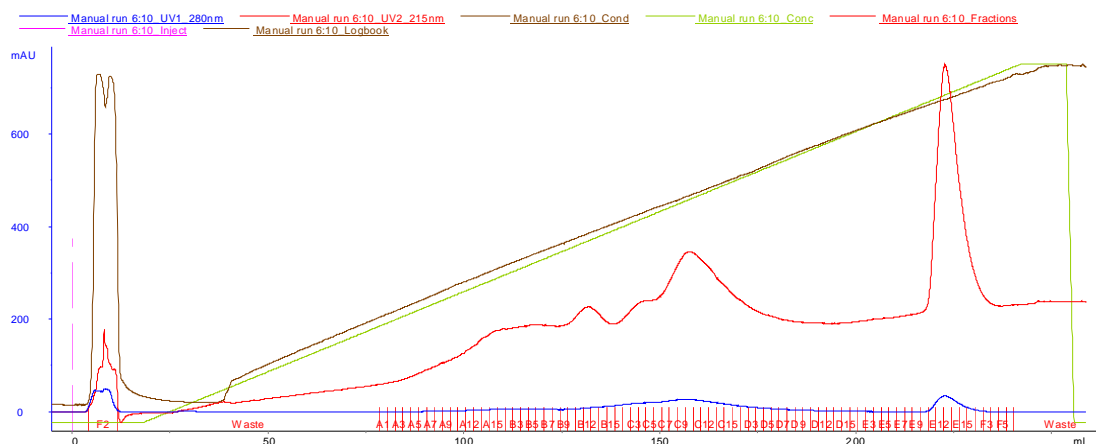
V primeru, ko smo uporabili 5-kratni prebitek PEG-a reagenta je pH bil uravnan na 9 z boratnim pufrom. Pegilacijo smo pustili potekati 18 h, nato smo reakcijo zaustavili z dodatkom 40 mM nepufrane oetne kisline. Slika 21.1 prikazuje pegilacijsko mešanico analizirano s analitsko kationsko-izmenjevalno kolono.





Slika 21.1: Kationsko-izmenjevalna kromatografija pegilacijske mešanice IFN- $\alpha$ 2b, pegiliranega s PEG-pNF reagentom .

Izkoristek pegilacije: Pri omenjenih pegilacijskih pogojih je ostalo nezreagirane 24,5 % IFN- $\alpha$ 2b, ostalo pa je v mono ali dipegilirani obliki.



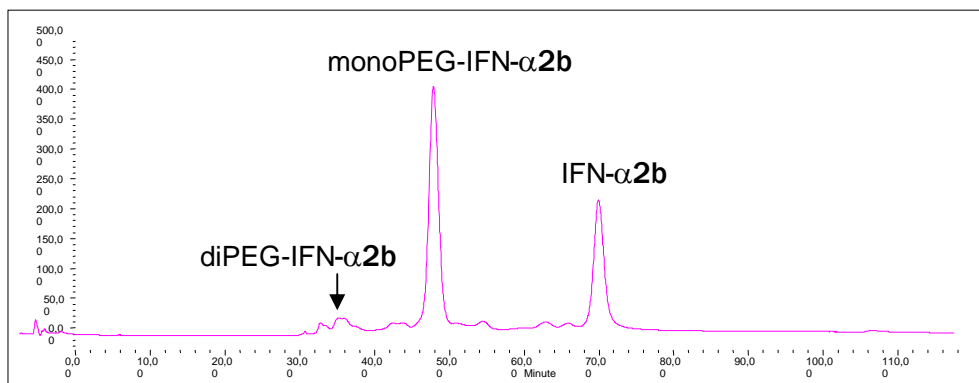
Slika 21.2: Preparativni kromatogram čiščenja pegilacijske mešanice IFN- $\alpha$ 2b, pripravljene s PEG-pNF na kationsko-izmenjevalni koloni.

Pred nanosom pegilacijske mešanice na kolono smo znižali pH. Separacija je potekala pod enakimi pogoji kot pri PEG-NHS reagentu. Kromatogram je zelo podoben kromatogramu separacije pegilacijske mešanice, pripravljene s PEG-NHS reagentom. Enako kot v prejšnjem primeru, so bile posamezne frakcije analizirane s SDS-PAGE. Monopegilirane frakcije so bile združene, skoncentrirane in zamenjan je bil puffer.

Izoliran monopegiliran IFN- $\alpha$ 2b pripravljen s PEG-pNF reagentom smo analizirali z analitsko kationsko-izmenjevalno kolono (Slika 20.3), SDS-PAGE in RP-HPLC, in mu izmerili tudi biološko učinkovitost *in vitro*.

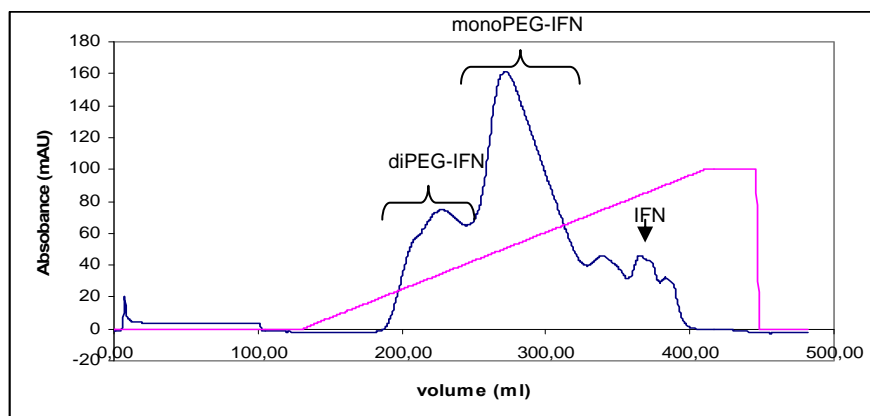
#### 4.3.3 Preparativna izolacija IFN- $\alpha$ 2b pegiliranega s PEG-CHO reagentom

Pri optimalnih pogojih (pH 5.0, 10 kratni prebitek PEG reagenta, 10 h) smo nastavili pegilacijo IFN- $\alpha$ 2b v malo večjem merilu z namenom preparativne izolacije monopegiliranega konjugata.



Slika 22.1: Kationsko-izmenjevalna kromatografija pegilacijske mešanice IFN- $\alpha$ 2b, pegiliranega s PEG-CHO reagentom.

Izolacijo monopegiliranega konjugata smo izvedli pri enakih pogojih, kot pri prejšnjih konjugatih. Preparativni kromatogram se razlikuje od prejšnjih dveh primerov. Razlika je predvsem v deležu monopegiliranih konjugatov.



Slika 22.2: Preparativni kromatogram čiščenja pegilacijske mešanice IFN- $\alpha$ 2b, pripravljene s PEG-CHO na kationsko-izmenjevalni koloni.

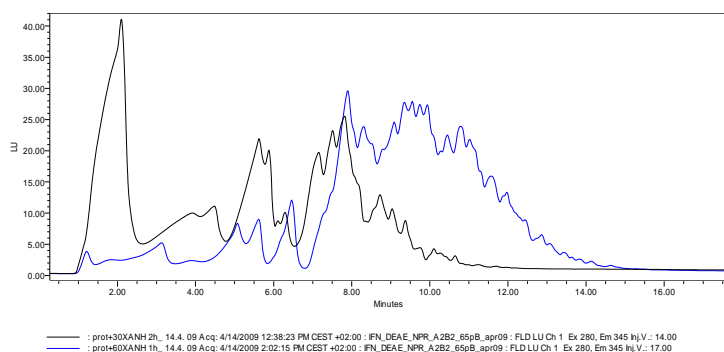
Fracije po preparativni kationski separaciji smo analizirali s SDS-PAGE. Na podlagi analize smo združili monopegilirane frakcije, jih skoncentrirali in jim zamenjali pufer, ter izmerili biološko učinkovitost *in vitro*.

#### 4.4 PREPARATIVNA IZOLACIJA PEGILIRANIH KONJUGATOV IFN- $\alpha$ 2b, pripravljenih z *N*-hidroksisukcinimidnim, *p*-nitrofenilkarbonatnim in aldehidnim PEG reagentom s predhodno zaščito lizinskih ostankov

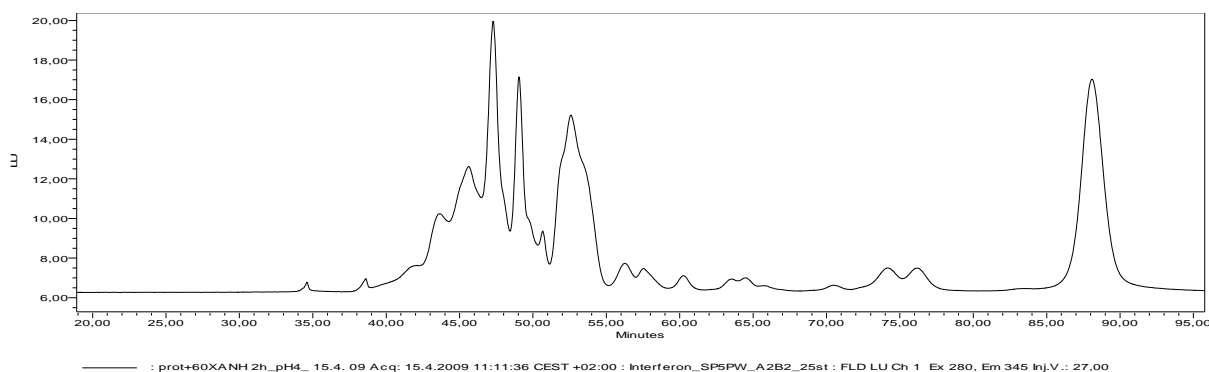
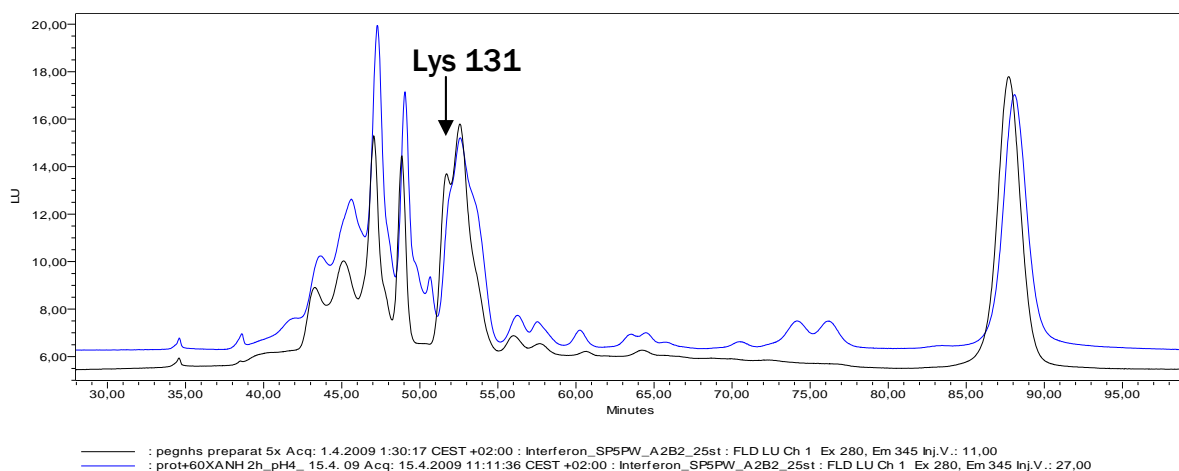
##### 4.4.1 Preparativna izolacija IFN pegiliranega s PEG-NHS s predhodno zaščito z anhidridom 2-metilmaleinske kisline

Raztopini proteina ( $m=2$  mg), ki smo ji pH uravnali z Na-boratom na 9, smo dodali 30-kratni prebitek anhidrida ( $V=0,27$   $\mu$ l,  $gost.=1,245$  mg/ml), ki je bil predhodno 50x redčen. Po 2,5 h smo vzorec analizirali z anionsko-izmenjevalno kromatografijo. Ker modifikacija IFN- $\alpha$ 2b ni bila zadostna, smo dodali še 10  $\mu$ l redčenega anhidrida in po nadaljnjih 2 h ponovno analizirali vzorec. Končni prebitek anhidrida je bil 60-kratni. Razlika v modifikaciji IFN- $\alpha$ 2b je vidna na spodnji sliki 23.1. pH med reakcijo smo uravnavali na pH med 8,5 in 9 z 0,02 M NaOH.

Tej mešanici smo dodali 5-kratni prebitek PEG-NHS (slika 23.2). Po enem dnevu pegilacije na sobni T, smo znižali pH z 0,2 M  $CH_3COOH$  na pH 4. Za popolno odščito anhidrida smo vzorec segrevali 4 h na 31°C.



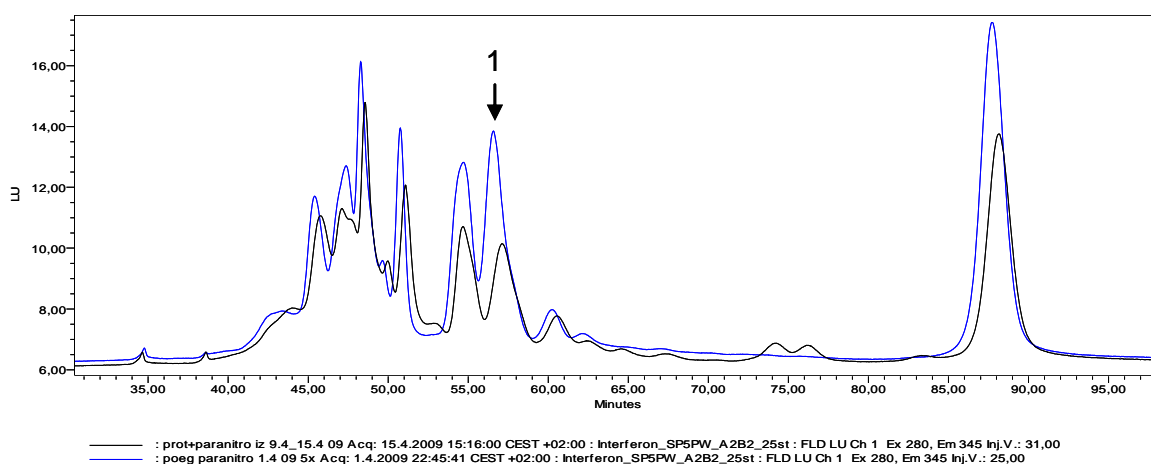
Slika 23.1: Anionsko-izmenjevalna kromatografija IFN- $\alpha$ 2b po modifikaciji z anhidridom; s 30-kratnim prebitkom po 1h (modra) in 60-kratnim prebitkom po 2h (črna).

Slika 23.2: Kationsko-izmenjevalna kromatografija pegilacijske mešanice IFN- $\alpha$ 2b.Slika 23.3: Primerjava pegilacijskih mešanic IFN- $\alpha$ 2b s PEG-NHS reagentom z (modra) in brez (črna) reverzibilne zaščite z anhidridom s kationsko analizo.

Pri primerjavi pegilacijskih mešanic, pripravljenih z in pa brez uporabe reverzibilne zaščite amino skupin, so vidne razlike v pegilacijskem profilu, čeprav so le-te zelo majhne. Delež pegilacije na Lys 131 je manjši v primeru, ko je bila uporabljena zaščita lizinov pred pegilacijo.

Izolacija monopegiliranega IFN- $\alpha$ 2b je potekala pod enakimi pogoji kot pri predhodnih konjugatih. Frakcije so bile združene na podlagi SDS-PAGE in RP-HPLC. Izmerjena je bila tudi biološka učinkovitost *in vitro*.





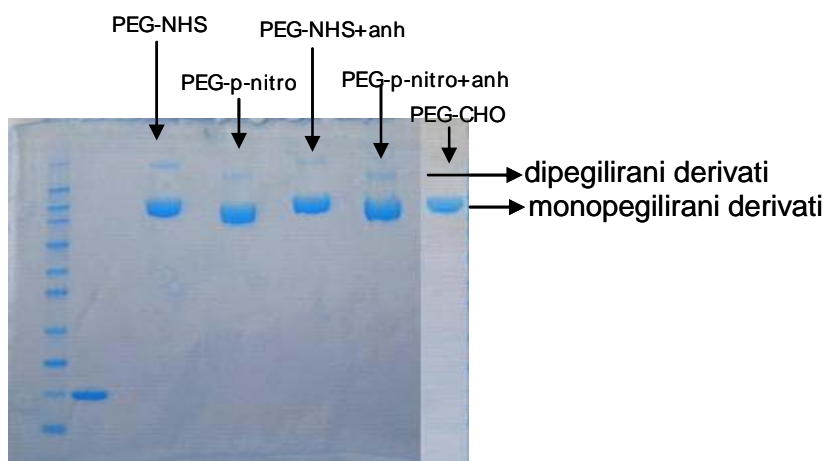
Slika 24.3: Primerjava pegilacijskih mešanic IFN- $\alpha$ 2b s PEG-pNF reagentom z zaščito z anhidridom (črna) in brez (modra) reverzibilne zaščite z anhidridom s kationsko analizo.

Prav tako kot pri pegilaciji IFN- $\alpha$ 2b z NHS reagentom so tudi tu vidne razlike v pegilacijskem profilu med postopkom z in brez uporabe zaščite. V primeru pegilacije s PEG-pNF reagentom je izrazito manj položajnega izomera, ki je na kromatogramu označen z 1.

Izolacija monopegiliranega IFN- $\alpha$ 2b je potekala pod enakimi pogoji kot pri predhodnih konjugatih. Frakcije so bile združene na podlagi SDS-PAGE in RP-HPLC. Izmerjena je bila tudi biološka učinkovitost *in vitro*.

## 4.5 Analiza pripravljenih konjugatov

### 4.5.1 SDS-PAGE analiza



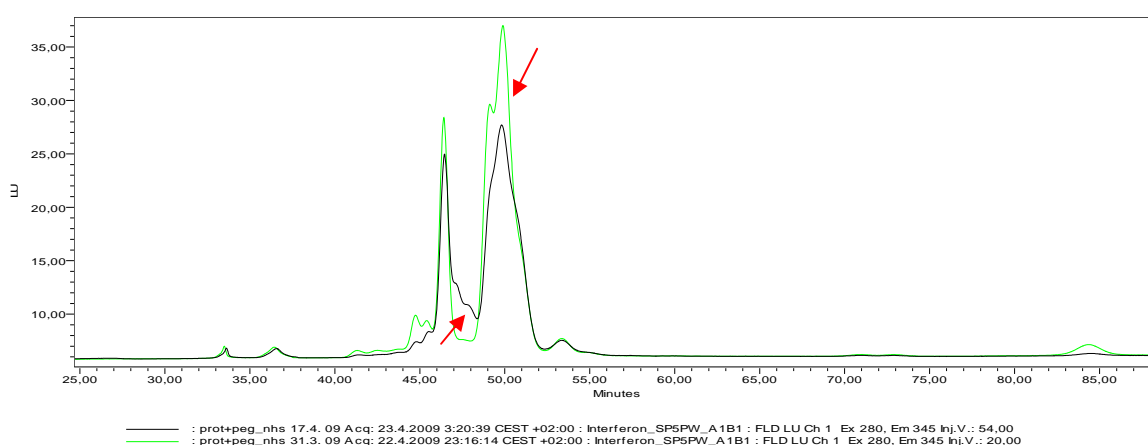
Slika 25.1: Analiza končnih konjugatov s SDS-PAGE:

Na gelu je vidno, da ima konjugat pripravljen s PEG-pNF manjšo molekulo maso. To je najverjetneje posledica manjše molekulske mase PEG reagenta.

#### 4.5.2 Kationska analiza

Vseh pet pripravljenih konjugatov smo analizirali z analitsko kationsko-izmenjevalno kromatografijo.

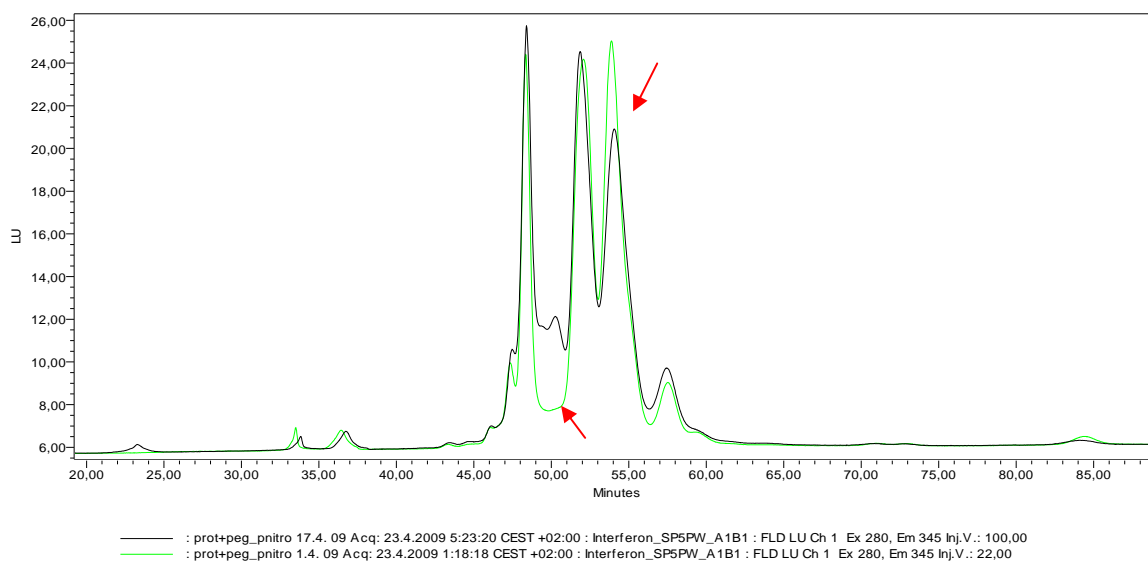
SDS-PAGE analiza razkriva, da smo izolirali monopegilirane konjugate IFN- $\alpha$ 2b. S kationsko analizo pa vidimo, da so izolirani monopegilirani konjugati mešanica položajnih izomerov, ki imajo PEG pripet na različnih amino skupinah. V primeru PEG-NHS reagenta na treh prevladujočih mestih Lys 134, Lys131 in Lys 121. Vidno je tudi, da z reverzibilno zaščito amino skupin lahko vplivamo na delež posamezne izoforme. Ta vpliv je primeru PEG-NHS reagenta majhen (Slika 25.2, zgornja puščica). Pri konjugatu, ki je bil pripravljen z reverzibilno zaščito, so se pojavili tudi dodatni vrhovi (Slika 25.2, spodnja puščica), ki lahko predstavljajo dodatna pegilacijska mesta ali pa tudi nepopolnoma odstranjeno zaščito.



Slika 25.2: Kationska analiza monopegiliranega IFN- $\alpha$ 2b, pripravljena s PEG-NHS reagentom brez zaščite (zelena) in s predhodno zaščito lizinov (črna).

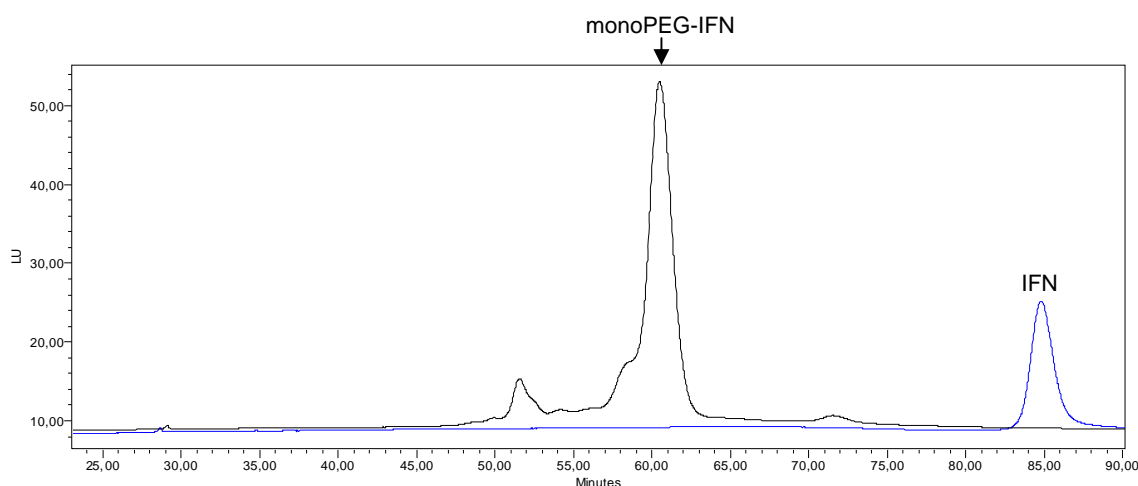
Pri konjugatih, pripravljenih s PEG-pNF reagentom, je razlika v pegilacijskem profilu pri ali brez uporabe zaščite amino skupin večja. Delež enega pozicijskega izomera je manjši (Slika 25.3, zgornja puščica). Prav tako kot v prejšnjem primeru, nastane dodatni vrh (Slika 25.3, spodnja puščica), ki prav tako lahko predstavlja dodatno pegilacijsko mesto ali pa ne popolnoma odstranjeno zaščito.

Ali ta dodatni vrh predstavlja nepopolnoma odstranjen anhidrid, bi lahko preverili z znižanjem pH na 3 in segrevanjem ter ponovno kationsko analizo.



Slika 25.3: Kationska analiza monopegiliranega IFN- $\alpha$ 2b, pripravljenega s PEG-PNF reagentom, brez zaščite (zelena) in s predhodno zaščito lizinov (črna).

Kationska analiza monopegiliranega konjugata IFN- $\alpha$ 2b, pripravljenega s PEG-CHO reagentom je potrdila pretežno prisotnost ene izoforme. Kot lahko vidimo iz slike 25.4 je več kot 90 % PEG molekul pripetih na *N*-terminalno aminokislino.

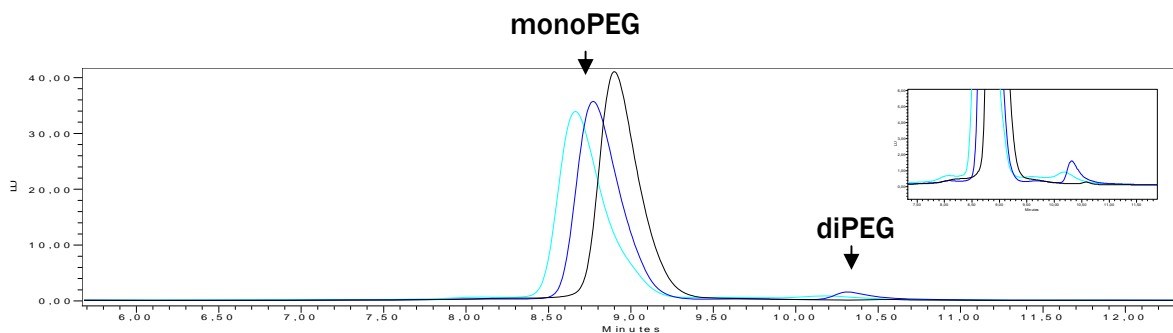


Slika 25.4: Kationska analiza monopegiliranega IFN- $\alpha$ 2b, pripravljenega s PEG-CHO reagentom, brez predhodne zaščite lizinov.

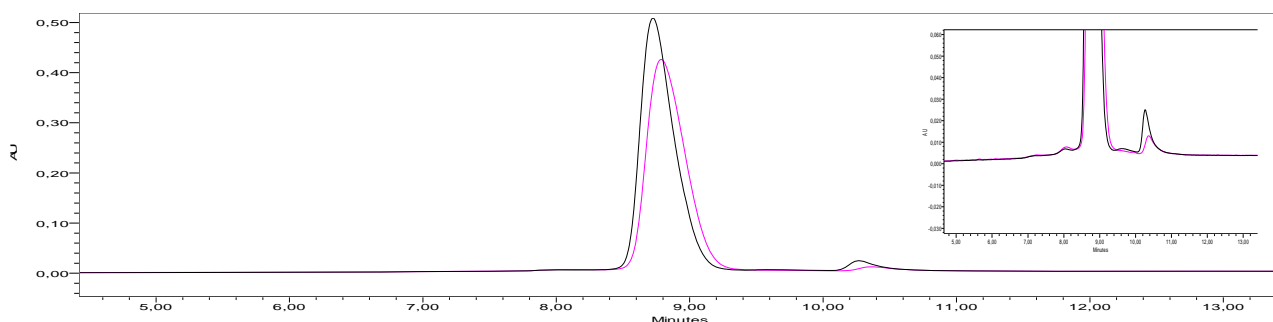


### 4.5.3 Analiza končnih konjugatov z reverznofazno kromatografijo

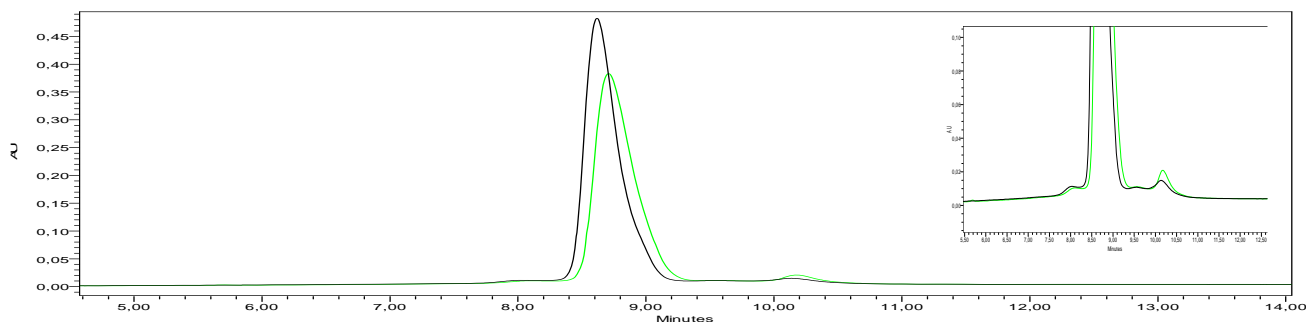
Z analizo na reverznofazni kromatografiji smo potrdili, da so izolirani konjugati monopegilirani. Vidna je razlika v dolžini PEG verig (Slika 26.1). PEG-pNF ima krajšo PEG verigo v primerjavi s PEG-NHS reagentom in PEG-CHO reagentom.



Slika 26.1: Analiza pripravljenih IFN- $\alpha$ 2b konjugatov s PEG-NHS (temno modra), PEG-pNF (svetlo modra) in PEG-CHO (črna) reagentom na reverzni fazi.



Slika 26.2: Analiza IFN- $\alpha$ 2b konjugatov, pripravljenih s PEG-NHS reagentom s predhodno zaščito z anhidridom (roza) brez zaščite (črna) na reverzni fazi.



Slika 26.3: Analiza IFN- $\alpha$ 2b konjugatov, pripravljenih s PEG-pNF reagentom s predhodno zaščito z anhidridom (zelena) brez zaščite (črna) na reverzni fazi.

#### 4.5.4 Primerjava bioloških aktivnosti pripravljenih konjugatov

Od mesta pripetja PEG verige je zelo odvisna biološka učinkovitost konjugata *in vitro*. Bližje kot je mesto pripetja PEG verige aktivnemu mestu, bolj verjetno je, da bo biološka aktivnost *in-vitro* konjugata nizka.

V diplomskem delu smo kot modelni protein uporabili IFN- $\alpha$ 2b, pri katerem se štirje najbolj izpostavljeni lizini nahajajo v domenah, ki so pomembne za interakcijo z receptorjem. Tržni produkt Pegasys<sup>®</sup>, ki vsebuje konjugate pegilirane na teh lizinih, ima *in-vitro* učinkovitost pod dvema procentoma nepegiliranega IFN- $\alpha$ 2b.

Preglednica 9: Biološka učinkovitost izoliranih konjugatov IFN- $\alpha$ 2b

Konjugat IFN- $\alpha$ 2b	Opis konjugata	Relativna učinkovitost *
IFN- $\alpha$ 2b	nemodificiran IFN- $\alpha$ 2b	100 %
Pegasys <sup>®</sup>	pegiliran IFN- $\alpha$ 2a	1.76 %
pN-IFN- $\alpha$ 2b	monopegiliran konjugat, pripravljen s PEG-pNF reagentom	10,0 %
NHS- IFN- $\alpha$ 2b	monopegiliran konjugat, pripravljen s PEG-NHS reagentom	1,70 %
CHO-IFN- $\alpha$ 2b	monopegiliran konjugat, pripravljen s PEG-CHO reagentom	1.8 %
p-NF(anh)-IFN- $\alpha$ 2b	monopegiliran konjugat, pripravljen s PEG- pNF reagentom, predhodno zaščiten z anhidridom	8,37 %
NHS(anh)- IFN- $\alpha$ 2b	monopegiliran konjugat, pripravljen s PEG-NHS reagentom, predhodno zaščiten z anhidridom	1,48 %

\*delež jakosti glede na nemodificiran IFN- $\alpha$ 2b

Biološka učinkovitost konjugatov pripravljenih s PEG-CHO in PEG-NHS reagentom je primerljiva biološki učinkovitosti Pegasysa. Za PEG-NHS reagent je to pričakovan rezultat, saj je PEG reagent, ki je bil uporabljen za pripravo našega konjugata enak PEG reagentu, ki se uporablja za pripravo Pegasysa.

Biološka učinkovitost konjugata pripravljenega s PEG-CHO reagentom je nizka iz česar lahko sklepamo, da je N-terminalna aminokislina v bližini receptorskega mesta in ni najbolj primerno mesto za pegilacijo.

Biološka učinkovitost konjugata pripravljenega s PEG-pNF je v primerjavi z ostalimi konjugati zelo visoka. Ta konjugat je v primerjavi z ostalimi po sestavi najbolj heterogen. Glede na visoko biološko učinkovitost mora ta konjugat vsebovati eno ali več pegilacijskih mest, ki niso v bližini receptorskega mesta.

Biološka učinkovitost konjugatov pripravljenih s postopkom zaščite lizinov je nižja v primerjavi s konjugati pripravljenimi brez zaščite lizinov. Možnih je več razlag.

Dodatni piki, ki so vidni na kationski analizi pri konjugatih pripravljenih z zaščito so lahko posledica nepopolnoma odstranjenega anhidrida, ki lahko zniža *in vitro* biološko učinkovitost.

Na reverznofazni analizi je vidno, da so odzivi pri vzorcih pripravljenih z zaščito nižji od tistih pripravljenih brez zaščite, kljub temu, da naj bi bili masni nanosi proteina na kolono enaki. To bi lahko pomenilo, da je koncentracija IFN- $\alpha$ 2b v vzorcih pripravljenih z zaščito nižja od izmerjene.

## 5 SKLEP

Uspeli smo pripraviti konjugate, pri katerih smo pred pegilacijo zaščitili vsaj eno amino skupino. Postopek zaščite amino skupin in nato odščite ne zmanjša znatno *in vitro* učinkovitosti proteina. Kationska analiza kaže, da se manjši del molekul IFN- $\alpha$ 2b po odščiti ne vrne v nativno stanje, kar je lahko razlog za malenkost nižje *in vitro* jakosti konjugatov pripravljenih z zaščito.

Pri izbranih pogojih zaščite amino skupin nismo signifikantno izboljšali selektivnosti pegilacije, smo pa dokazali, da je možno s tem načinom vplivati na mesto pripetja PEG verige oz. na spreminjanje pegilacijskega profila. Mogoče bi boljše rezultate lahko dosegli z zaščito večjega števila amino skupin.

Skladno z literaturnimi podatki smo potrdili, da je PEG-NHS reagent bolj selektiven kot PEG-pNF. Oba pa sta veliko manj selektivna kot PEG-CHO reagent, kar je tudi v skladu za navedbami v literaturi

Pri PEG-NHS in PEG-pNF reagentu pH vpliva na selektivnost pegilacije. Pri nižjem pH je reakcija s PEG-pNF reagentom veliko bolj selektivna, kot pri višjem pH, je pa tudi veliko počasnejša, pri PEG-NHS reagentu pa se pri nižjem pH pojavi dodatno pegilacijsko mesto. Selektivnost pegilacije je zato manjša, zmanjšan pa je tudi delež pretvorbe.

Izolirali smo pet konjugatov. Pri PEG-NHS in PEG-pNF reagentu s postopkom z zaščito in pa brez zaščite amino skupin, pri PEG-CHO reagentu pa samo konjugat brez zaščite amino skupin.

Oba konjugata pripravljena z reverzibilno zaščito sta imela nekoliko nižjo *in vitro* učinkovitost v primerjavi z istovrstnima konjugatoma, pripravljenima brez postopka zaščite.

Nepričakovano je imel najvišjo relativno učinkovitost (okoli 10 %) konjugat, pripravljen s PEG-pNF reagentom. V primerjavi s tržnimi konjugati IFN- $\alpha$ 2b je to zelo visoka vrednost. V prihodnje bi bilo smiselno izolirati posamazne položajne izomere in določiti, kateri je odgovoren za tako visoko učinkovitost. S PEG-pNF reagentom bi bilo smiselno izolirati monopegiliran konjugat, pegiliran pri pH 6.5.

## 6 LITERATURA

- [1] Štrukelj, B. and Kos, J. Biološka zdravila: od gena do učinkovine, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007.
- [2] Vozelj, M. Temelji imunologije, DZS, d.d., Ljubljana, 2000
- [3] <http://sl.wikipedia.org/wiki/Citokin>
- [4] P.Marinko and A.Krbavčič, Imunogenost inerferona: predklinično in klinično vrednotenje interferona  $\alpha$ , Farmaceutski Vestnik 52 (2001) 163-171.
- [5] P.Marinko and A.Krbavčič, Interferoni - klasifikacija, pridobivanje in delovanje, Farmaceutski Vestnik 51 (2000) 103-113.
- [6] Radhakrishnan R, Walter L. J. Zinc mediated dimer of human interferon- $\alpha$ 2b revealed by X-ray crystallography. *Structure*. 1996; 4:1453-1463
- [7] Marinko P, Krbavčič A: Molekulska in biološka karakterizacija rekombinantnega interferona  $\alpha$ , Farmaceutski Vestnik (2000); 51: 115-120
- [8] Pegasys Roche\_Monograph: Monotherapy and Combination Therapy with Ribavirin, June 2002
- [9] S.Youngster, Y.S.Wang, M.Grace, J.Bausch, R.Bordens, and D.F.Wyss, Structure, biology, and therapeutic implications of pegylated interferon alpha-2b. 4, *Curr.Pharm.Des* 8 (2002) 2139-2157.
- [10] J.Ramon, V. Saez, R. Baez, R Aldana, E. Hardy PEGylated interferon- $\alpha$ 2b: A Branched 40k Polyethylene Glycol Derivative. *Pharmaceutical Research*, 2005 22; 1374-1386
- [11] Caliceti P, Veronese FM, Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv Drug Deliv.Rev.*2003; 55: 1261-1277

- [12] M.J Roberts, M.D. Bentley, J.M. Harris; Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002; 54: 459-476
- [13] Foster GR, Review article: Pegylated interferons: chemical and clinical differences, *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 825-830
- [14] Cristophe Dhalluin, Alfred Ross; Structural and Biophysical Characterization of the 40 kDa PEG-Interferon and its Individual Positional Isomers, *Biconjugate Chem.* 2005, 16, 504-517
- [15] Mateja Kusterle, Simona Jevsevar, Vladka Gaberc Porekar; Size of Pegylated Protein Conjugates Studied by Various Methods. *Acta Chim.Slov.* 2008, 55; 594-601
- [16] Francesco M. Veronese and Gianfranco Pasut, Pegylation, successful approach to drug delivery, *J. Pharma. Scie.* 21 (2005) 1452-1458
- [17] G.E.Means and R.E.Feeney, Reductive Alkylation of Proteins, *Analy. Biochem.* 224 (1995) 1-16.
- [18] Rosendhal MS, Doherty DH, A Long-Acting, High Potent Interferon  $\alpha$ -2 Conjugate Created Using Site-Specific PEGylation. *Biconjugate Chem.* 2005; 16: 200-207
- [19] Kinstler, G.Molineux, M.Treuheit, D.Ladd, and C.Gegg, Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)-protein conjugates, *Adv.Drug Deliv.Rev.* 54 (2002) 477-485.
- [20] Wylie D.C.; Carboxylated Histidine is a pH- dependet product of pegylation with SC-PEG. *Pharm. Res.* 2001: 18(9); 1354-1360
- [21] Tsunoda S.; Enhanced Antitumor Potency of Polyethylene Glycolylated Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : A novel polymer-comjugation technique with a reversible amino protective reagent. *The J. of Pharm. And Exp. Therapeutics*; 1999; 290:368-372

- [22] Kimura Y., Zaitso K., Motomura Y., Ohkura Y.; A practical reagent for reversible Amino-Protection of Insulin, 3,4,5,6-tetrahydrophatic anhydride. Biol.Pharm. Bull. 1994; 17(7): 881-885
- [23] Yu-Sen Wang, Stephen Youngster, Michael Grace, James Bausch, Ronald Bordens, Daniel F.Wyss, Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon  $\alpha$ -2b and its therapeutic implications; Advanced Drug. Delivery Reviews 2002; 54: 547-570
- [24] Vir: Pierce, instructions Citraconic Anhydride, 20907
- [25] S Foser, K Weyer, W Huber, U Certa; Improved biological and transcriptional activity of monopegylated interferon-alfa-2a isomers. The Pharmacogenomics Journal 2003; 3: 312-319
- [26] P.Bailon, A.Palleroni, C.A.Schaffer, C.L.Spence, W.J.Fung, J.E.Porter, G.K.Ehrlich, W.Pan, Z.X.Xu, M.W.Modi, A.Farid, W.Berthold, and M.Graves, Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. Bioconjug.Chem. 2001; 21: 195-202.
- [27] Kuhelj R., Biokemija v praksi: načela in tehnike; 2. izdaja, UL – FKKT, 1998
- [28] C.T.Mant, Y.Chen, Z.Yan, T.V.Popa, J.M.Kovacs, J.B.Mills, B.P.Tripet, R.S.Hodges, HPLC Analysis and Purification of Peptides, Peptide Characterization and Application Protocols, 2007, pp. 3-55.
- [29] Rosenberg, I. M. Protein analysis and purification: Benchtop techniques, Springer, 2004
- [30] M.Grace, S.Youngster, G.Gitlin, W.Sydor, L.Xie, L.Westreich, S.Jacobs, D.Brassard, J.Bausch, R.Bordens, Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon  $\alpha$ -2b. J. of interferon and cytokine reas. 2001; 21: 1103-1115

