

## ПЭГИЛИРОВАНИЕ КАК МЕТОД СОЗДАНИЯ ПРОЛОНГИРОВАННЫХ ФОРМ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ (НА ПРИМЕРЕ ПЭГИЛИРОВАННОГО ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА)

И.А. Пучков<sup>1, 2, \*</sup>, аспирант, Д.И. Баирамашвили<sup>3</sup>, начальник производства,

В.И. Швец<sup>1</sup>, заведующий кафедрой, академик РАН

<sup>1</sup> кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова,  
Москва, 119571 Россия

<sup>2</sup> Российская фармацевтическая компания ЗАО «Мастерклон»,  
Москва, 119019 Россия

<sup>3</sup> Опытное биотехнологическое производство генно-инженерных препаратов  
ИБХ РАН, Москва, 117997 Россия.

\*Автор для переписки e-mail: poutchkov@mail.ru

**В** настоящее время пэгилирование биологически активных молекул, в том числе белков, с помощью инертного гидрофильного полимера полиэтиленгликоля (ПЭГ) представляет собой важное направление в создании нового поколения фармацевтических препаратов пролонгированного действия. Конъюгированные молекулы, как правило, имеют улучшенный фармакокинетический профиль, в том числе пониженный почечный клиренс, дополнительную защиту от действия протеолитических ферментов и низкую иммуногенность, что позволяет сохранить активность *in vivo* нативного препарата в человеческом организме в течение более продолжительного времени. Данный обзор дает возможность ознакомиться с современными методиками пэгилирования биофармацевтических молекул, препаратами на основе конъюгатов с ПЭГ и рассматривает, как пример, пэгилирование рекомбинантного человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (рЧГ-КСФ). Также в обзоре представлены различные виды модифицированных ПЭГ-реагентов для направленного присоединения к биологическим молекулам и обсуждаются их преимущества и недостатки.

**Ключевые слова:** полиэтиленгликоль (ПЭГ), биофармацевтические препараты, рекомбинантный человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (рЧГ-КСФ), модификация, цитокины, фармакокинетический профиль.

### 1. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

Колониестимулирующие факторы (КСФ) – это семейство молекул, стимулирующих производство зрелых клеток крови в организме человека. КСФ впервые были выделены и охарактеризованы в начале 70-х годов XX века, когда было обнаружено, что колонии, содержащие зрелые нейтрофилы и макрофаги, подвергались быстрому росту после иммобилизации кроветворных клеток на гелевой матрице и обработке различными средами. КСФ участвуют в различных стадиях созревания, деления и пролиферации гемопоэтических клеток из плюрипотентных стволовых в различные зрелые клетки, гранулоцитарные макрофаги, эритроциты и тромбоциты [1]. Многие факторы роста проявляют универсальные свойства, стимулируют клеточное деление различных типов клеток, в то время как другие являются довольно узко специфичными.

КСФ относятся к цитокинам, которые представляют собой класс сигнальных белков, участвующих в клеточном взаимодействии, иммунной функции и эмбриогенезе. Цитокины экспрессируются с помощью различных кроветворных и некроветворных типов клеток и могут оказывать аутокринный, паракринный и эндокринный эффекты [2].

#### 1.1. Функции, биологическое значение и механизм секреции гранулоцитарного колониестимулирующего фактора

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) – один из представителей цитокинов – гликопротеин с молекулярной массой 19.6 кДа, состоящий из 174 аминокислотных остатков, – влияет на состояние системы кроветворения, образование функционально активных нейтрофилов и их выделение из костного мозга в кровеносную систему [3], а также обладает сигнальной функцией для поддержания стационарного уровня нейтрофилов *in vivo* [4].

Основное действие Г-КСФ на нормальные гемопоэтические клетки ограничивается клетками линии нейтрофилов. *In vitro* Г-КСФ избирательно стимулирует пролиферацию и дифференцировку нейтрофилов колониобразующих клеток и изменяет некоторые функции зрелых нейтрофилов. Г-КСФ также действует на относительно зрелые клетки-предшественники, которые ответственны за дифференциацию нейтрофилов. Г-КСФ часто проявляет синергетическую кроветворную активность в присутствии других цитокинов *in vitro*, таких как интерлейкин-3, интерлейкин-6 и гранулоцитарный макрофагальный КСФ (ГМ-КСФ). Синергетическую активность Г-КСФ также проявляет в

комбинации с клонированными лигандами (факторами стволовых клеток) на *c*-протоонкоген, который воздействует на раннюю клеточную популяцию [5].

При введении *in vivo* рекомбинантный Г-КСФ увеличивает количество зрелых нейтрофилов в крови крыс, мышей, хомяков, собак, приматов и человека. Лечение животных с помощью Г-КСФ в ходе доклинических исследований выявило ряд его важнейших биологических особенностей, в том числе повышение уровня нейтрофилов, ускоренное их восстановление, перераспределение гематопоза и мобилизацию стволовых клеток периферической крови [5].

С точки зрения специфичности клеток-мишеней, Г-КСФ является привлекательным вектором для доставки биологических веществ к нормальным или аномальным гранулоцитам и их прекурсорам [6].

Как правило, Г-КСФ можно обнаружить в плазме крови при концентрациях более 10 пкг/мл. В различных случаях, как, например, при апластической анемии, нейтропении, всевозможных инфекциях, а также при сложных случаях беременности концентрация Г-КСФ может быть значительно выше – до 100 пкг/мл [7].

На клеточном уровне было показано, что отсутствие Г-КСФ (вследствие удаления его рецептора) увеличивает восприимчивость нейтрофильных предшественников к апоптозу, или запрограммированной смерти клетки [7].

Основной целью Г-КСФ являются промиелоцитные/миелобластные колонии клеток, а ускоренное производство нейтрофилов под влиянием введенного Г-КСФ происходит за счет ускоренной миграции нейтрофилов из костного мозга в кровь [7].

Помимо всего прочего, Г-КСФ пролонгирует время жизни зрелых нейтрофилов и увеличивает их способность к хемотаксису, к генерированию супероксид-аниона в ответ на бактериальные пептиды, к синтезу нейтрофилами щелочной фосфатазы и миелопероксидазы и к высвобождению арахидоновой кислоты. Также Г-КСФ стимулирует усиление продукции интерферона- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), увеличивает фагоцитарную активность нейтрофилов и их способность к антитело-зависимому уничтожению опухолевых клеток [4].

Г-КСФ продуцируется моноцитами-макрофагами, фибробластами и клетками эндотелия. Поскольку эти типы клеток широко распространены в человеческом организме, возможно, что Г-КСФ участвует в пролиферации, активации и усилении функциональных свойств нейтрофилов, которые возникают в ответ на местные инфекции или по другим причинам. Бактериальные эндотоксины, такие как липо-

полисахариды (ЛПС), могут стимулировать продукцию Г-КСФ моноцитами-макрофагами. Кроме того, интерлейкин-1 и фактор некроза опухоли (ФНО), секретлируемые активированными моноцитами-макрофагами, могут стимулировать фибробласты и клетки эндотелия для продукции Г-КСФ [4].

Активированные Т-лимфоциты секретруют большое количество цитокинов, таких как интерлейкин-3, -4, ГМ-КСФ, IFN- $\alpha$ , которые в свою очередь стимулируют моноциты-макрофаги для продукции Г-КСФ. По-видимому, эта сложная система продукции Г-КСФ определяет уровни локального и циркулирующего Г-КСФ. Однако пока невозможно установить, какие клетки и стимуляторы являются активаторами, а какие – только вспомогательными в процессе синтеза Г-КСФ *in vivo* [4].

Известно, что некоторые линии опухолевых клеток рака человека, такие как сквамозная клеточная карцинома (СНУ-2) и карцинома мочевого пузыря (5637 и Т24), известны как конститутивные производители Г-КСФ. Экспрессия Г-КСФ в этих опухолях возможна благодаря внутренней активации факторов транскрипции, связанных с продукцией цитокинов, которые воздействуют на регион промотора гена Г-КСФ [4].

Что касается механизма действия Г-КСФ, то взаимодействие Г-КСФ с рецептором, как было установлено, следует сразу после активации системы гуанозинтрифосфатсвязывающего белка и аденилатциклазы. Существует взаимозависимое повышение внутриклеточных концентраций аденилатмонофосфата и ионов  $Ca^{2+}$  параллельно с активацией протеинкиназы С [4].

Молекула Г-КСФ специфически связывается с рецепторами клетки при константе диссоциации около 100 пкМ. Эта константа гораздо выше, чем концентрация, требующаяся для проявления половины от максимального биологического ответа на молекулу Г-КСФ. Это служит доказательством того, что биологический ответ, вызванный Г-КСФ, может возникать и при низком уровне загрузки рецептора [4].

### 1.1. Структура Г-КСФ

Человеческий Г-КСФ доступен для клинического использования в двух формах: негликозилированной и гликозилированной. Негликозилированная форма белка, или рекомбинантный Г-КСФ (рч-Г-КСФ), полученный экспрессией из клеток *E. coli*, известен как **филграстим** и состоит из 175 аминокислотных остатков (АКО). Эта форма белка имеет дополнительный *N*-концевой остаток метионина, стабилизирующий третичную структуру белка в бактериальной экспрессирующей системе. Благодаря своему бактериальному происхождению, рчГ-

КСФ не имеет *O*-связанного углеводного остатка на треонине-133 нативного белка, но сохраняет все пять остатков цистеина, типичных для протеина человека [8].

Нативный Г-КСФ – это гликопротеин, содержащий 204 АКО, включая сигнальную последовательность из 30 АКО, которая удаляется из секретируемой формы. Природная форма не содержит сайтов *N*-гликозилирования и имеет один сайт *O*-гликозилирования по Thr<sup>133</sup>, который защищает белки от агрегирования, но не влияет решающим образом на биологическую активность [7]. Молекулярный механизм стабилизирующего эффекта гликозилирования, по-видимому, состоит в том, что углеводный остаток уменьшает подвижность молекулы Г-КСФ в районе сайта гликозилирования [9].

Молекула Г-КСФ содержит свободную сульфгидрильную группу в положении Cys<sup>17</sup> и две внутримолекулярные дисульфидные связи в положениях Cys<sup>36</sup>–Cys<sup>42</sup> и Cys<sup>64</sup>–Cys<sup>74</sup> [7]. С помощью сайт-специфического мутагенеза было установлено, что в молекуле Г-КСФ свободный Cys не отвечает за активность белка, в то время как модификация цистеинов, формирующих дисульфидные связи, приводит к снижению биологической активности и нарушению вторичной и третичной структур молекулы [5].

Расчет вторичной структуры Г-КСФ показал, что молекула белка содержит 66%  $\alpha$ -спиралей и 17%  $\beta$ -складок [10].

Третичная структура Г-КСФ, как и других членов семейства цитокинов, была установлена с высоким разрешением рентгеновской кристаллографией и ЯМР-спектроскопией. Молекула Г-КСФ представляет собой узел из четырех антипараллельных  $\alpha$ -спиралей с общим размером 45×26×26 Å и имеет короткую спираль между первой и второй из этих структур. Четыре спирали называют соответственно А-, В-, С- и D-спиралями, а их соединительные петли – АВ-, ВС- и CD-петлями. АВ- и CD-петли – длинные вертикальные структуры, и только ВС-петля является наиболее типичной короткой U-образной петлей [11].

Структура узла рГ-КСФ неизменна за счет углов пересечения спирали, размер которых варьируется между -167° и -159°. Средний угол пересечения -162.5° очень близок к теоретически прогнозируемому (-161°) для идеального левозакрученного антипараллельного четырехспирального узла. Спираль А, В и С прямые, тогда как спираль D сгибается по направлению к самой короткой спирали В. Изменение в аксиальном направлении между концами спирали D составляет 35° с наибольшими изгибами в районе Gly<sup>149</sup> и Ser<sup>159</sup>. Прямой участок спирали D (АКО 159–173) позволяет наиболее полно взаимодействовать со спиралями А, В и

С, а также часто используется для определения углов пересечения внутри молекулы [11]. Короткая спиральная секция Е находится внутри петли АВ (рис. 1).

Белковая цепь делает крутой поворот от спирали А, и 5 АКО переходят в 4 остатка спирали 3<sub>10</sub>. В Leu<sup>47</sup> есть сдвиг в направлении полипептидной цепи, и спираль 3<sub>10</sub> ведет непосредственно к 6-му остатку  $\alpha$ -спирали. Угол 45° между этими короткими спиральями оборачивает их вокруг *N*-конца цепи спирали D. Они экспонированы наружу и выступают из основного каркаса белковой структуры. Остатки этого региона перекрываются с эпитопами, распознаваемыми нейтрализующими моноклональными антителами [11].

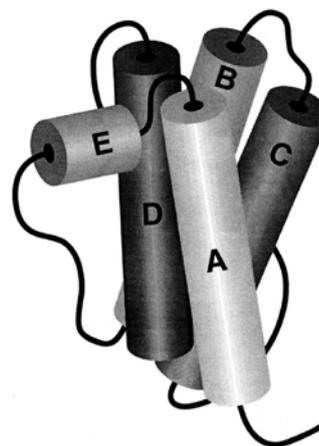


Рис. 1. Трехмерная структура Г-КСФ ( $\alpha$ -спирали изображены в виде цилиндров).

Как уже упоминалось, присутствие двух дисульфидных связей в рГ-КСФ, Cys<sup>36</sup>–Cys<sup>42</sup> и Cys<sup>64</sup>–Cys<sup>74</sup>, необходимо для биологической активности белка. Они расположены на противоположных концах длинной петли АВ, где образуют короткие петли у *C*-конца спирали А и *N*-конца спирали В. Измерение кругового дихроизма молекулы Г-КСФ позволило установить, что в отсутствие Cys<sup>64</sup>–Cys<sup>74</sup> формируется лишь около половины нативной структуры  $\alpha$ -спирали [11].

Существует два типа структур молекулы Г-КСФ (А и В), имеющих приблизительно одинаковые молекулярные веса порядка 20 кДа и которые состоят соответственно из 177 (А-тип) и 174 АКО (В-тип). Эти два вида структур идентичны, за исключением последовательности из трех АКО (Val-Ser-Glu), имеющейся в районе 35-й аминокислоты от *N*-конца в молекуле А-типа. Молекулы Г-КСФ обоих типов в обилии содержат гидрофобные аминокислотные остатки и имеют две дисульфидные связи [4].

Углеводный остаток на Thr<sup>133</sup> составляет около 4% от общего молекулярного веса гликопротеина и представляет собой (2,6)галактозо- $\beta$ (1,3)-*N*-ацетилгалактозамин сиаловой кислоты [4].

### 1.3. Применение филграстима в медицине

Очистка и молекулярное клонирование рч-Г-КСФ (филграстима) были осуществлены в период между 1984 и 1986 гг., а разработка технологии получения филграстима для клинических нужд началась в 1986 году. Его клиническое применение у онкологических больных, прошедших курс химиотерапии, было разрешено в Соединенных Штатах в феврале 1991 года. Спустя 5 лет с момента лицензирования филграстима как лекарственного средства, 1,2 миллиона пациентов прошли курс лечения с его помощью [12].

Первоначально филграстим использовался в качестве вспомогательного средства в клинических испытаниях после курса химиотерапии для предотвращения нейтропении или ее осложнений (лихорадка, инфекции, язвы ротовой полости) [13]. Исследования выявили, что рч-Г-КСФ ускоряет восстановление нейтрофилов и уменьшает продолжительность нейтропении после химиотерапии цитостатическими препаратами и радиационной терапии опухолей [14]. Его использование привело к снижению частоты возникновения инфекций и к сокращению продолжительности госпитализации онкологических больных [13]. Помимо нейтропении, вызванной химиотерапией, филграстим был одобрен более чем в 70 странах для лечения миелосупрессии после трансплантации костного мозга, тяжелой хронической нейтропении, пневмонии, острого лейкоза, апластической анемии, миелодиспластического синдрома и для мобилизации в периферическую кровь клеток-предшественников при трансплантации. В последнее время описаны случаи использования филграстима при тяжелых повреждениях спинного мозга и при реваскуляризации сосудов при ишемической болезни сердца [12].

Клиническое применение Г-КСФ было преимущественно оправдано при лечении различных форм нейтропении: врожденной, циклической или идиопатической [13]. Например, при тяжелой врожденной нейтропении – заболевании, характеризующемся задержкой созревания миелоидных клеток в костном мозге и приводящем к резкому снижению уровня периферических нейтрофилов и восприимчивости к оппортунистическим бактериальным инфекциям, которые могут быть фатальными. Еще одним важным и первоначально неожиданным преимуществом Г-КСФ явилась его способность индуцировать выход гематопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников из костного мозга в периферическую кровь. Это дало возможность использовать рчГ-КСФ для активации и изоляции периферических гемопоэтических стволовых клеток для их трансплантации и лейкофереза [12, 13]. Механизм,

посредством которого Г-КСФ мобилизует эти клетки в периферию, до конца не изучен, но, как полагают, не является прямым, поскольку непосредственно Г-КСФ не воздействует на стволовые клетки и клетки-предшественники. Этот механизм опосредован его рецепторами, в том числе с помощью секреции матриксных металлопротеиназ, активации рецепторов хемокинов и модуляции различных адгезивных молекул [13, 15].

## 2. Полиэтиленгликоли

### 2.1. Преимущества, направления и перспективы использования пэгиллирования в области создания новых классов биофармацевтических препаратов

В настоящее время полиэтиленгликоль (ПЭГ) является одним из наиболее популярных биосовместимых полимеров, поскольку обладает множеством полезных свойств. Среди них – широкий диапазон растворимости в органических и водных средах, отсутствие токсичности и иммуногенности и относительная устойчивость *in vivo* [16] в сочетании с высокой полидисперсностью и коммерческой доступностью ПЭГ на рынке [17]. ПЭГ имеет самый низкий уровень белковой и клеточной адсорбции на своей поверхности по сравнению с другими известными полимерами. Это свойство объясняется минимальной энергией на поверхности раздела фаз его молекул в водном растворе [18].

Другой важной причиной возросшей популярности ПЭГ является его относительная структурная простота. Молекула полимера имеет химически инертную основу (каркас) и только две (или в случае моно-ПЭГ – одну) модифицированные концевые группировки [16].

Многие нежелательные эффекты, вызванные различными биологическими механизмами узнавания *in vivo*, могут быть сведены к минимуму путем ковалентной модификации биологически активных молекул с ПЭГ. Так, например, иммуногенность и антигенность белков может быть значительно снижена. Время циркуляции в крови липосом, наночастиц и белков может быть увеличено, а их усвоение ретикулоэндотелиальной системой (РЭС), печенью и селезенкой понижено. Также может быть уменьшена тромбогенность, адгезия клеток и белков на поверхности молекул [16]. Благодаря ковалентному присоединению ПЭГ к белкам вокруг молекулы конъюгата образуется водное облако, которое способно затормозить или предотвратить действие протеолитических ферментов, антител и фагоцитов, а также увеличить гидродинамический объем молекулы, что позволяет снизить почечный клиренс [17]. Таким образом, может быть уменьшена частота

введения препарата и соответственно количество лекарственного средства, что улучшает качество жизни пациента и уменьшает клинические расходы [19].

Выведение ПЭГ-конъюгатов и пэгилированных носителей почками снижается при использовании препаратов с более высокой молекулярной массой, что обусловлено эффектом повышенной проницаемости и удержания молекул в организме (пассивный таргетинг). Это явление в основном наблюдается в раковых или воспаленных тканях, которые отличаются гиперваскуляризацией и обладают особо проницаемой сосудистой сетью и представляют собой спонтанно расположенные, слабо связанные эндотелиальные клетки, позволяющие наноскопическим частицам проникать в опухолевые ткани и оставаться внутри в результате отсутствия или ослабления лимфодренажа [19].

Однако следует иметь в виду, что выведение полимера не напрямую зависит от его молекулярной массы, но, скорее, от его гидродинамического объема, на который влияет архитектура полимера. Например, звездообразные полимеры и дендримеры имеют меньшие объемы по сравнению с линейными полимерами с аналогичными молекулярными массами [19].

Также пэгилирование придает препаратам большую физическую и термическую стабильность и предотвращает или снижает агрегацию их молекул в организме или во время хранения, что является результатом стерической изоляции и/или маскирования зарядов, обеспеченного образованием «конформационного облака» [19].

Эти полезные свойства, передающиеся биомолекулам с помощью присоединения ПЭГ, имеют огромное значение для любой системы, требующей контакта с кровью [16].

В связи с уникальным сочетанием физических, химических и биологических свойств ПЭГ и его производные стали одними из наиболее востребованных модификаторов биологически значимых молекул. Производные ПЭГ также широко используются в качестве растворимых матриц для жидкофазного пептидного синтеза, как лиганды для водорастворимых комплексов переходных металлов и как водорастворимые агенты для слияния клеток [18]. В настоящее время диапазон применения ПЭГ-конъюгатов продолжает расширяться. Некоторые из ПЭГ-модифицированных молекул, например, белки и липосомы, уже являются коммерчески успешными зарегистрированными фармацевтическими препаратами [16].

Обширный опыт работы с ПЭГ-модифицированными белками показывает, что такие системы требуют особенно тщательной степени разработки. Спектр сложных ПЭГ-реагентов, предназначенных для сайт-селективной модификации биологических макромолекул, безус-

ловно, будет расширяться для создания пролонгированных форм препаратов направленного действия. Опыт работы с модифицированными ПЭГ в последние десятилетия показал, что введение соответствующих реакционноспособных групп в молекулу полимера может быть успешно описано довольно простыми схемами присоединения [16].

За последние 30 лет было создано несколько различных классов ПЭГ, которые позволяют сконструировать конъюгат с заранее заданными терапевтическими свойствами. Кроме того, за это время были разработаны и оптимизированы различные методики для очистки и анализа конъюгатов, которые необходимы при разработке подобных фармацевтических препаратов. Вследствие растущего интереса к пэгилированным формам на фармацевтическом рынке стали доступны многие активированные полимеры, таким образом делая возможным проведение пэгилирования в тех лабораториях, которые не снабжены химическими и технологическими средствами, необходимыми для активации ПЭГ [20].

С момента утверждения на фармацевтическом рынке первого пэгилированного препарата Управлением по контролю продуктов и лекарств (FDA) в США в 1990 году, а именно пэгилированной формы аденозиндезаминазы «Адаген» для лечения тяжелого комбинированного иммунодефицита, пэгилирование стало широко использоваться в качестве метода модификации на стадии пост-производства для улучшения биомедицинской эффективности и физико-химических свойств терапевтических белков [21]. С тех пор девять различных пэгилированных препаратов получили одобрение FDA: восемь пэгилированных белков и один аптамер пэгилированного фактора роста сосудистого эндотелия (ФРСЭ) «Пэгаптаниб» для лечения глазных сосудистых заболеваний. Стоит отметить, что четыре из этих восьми утвержденных пэгилированных биопрепаратов являются фармацевтическими «блокбастерами» – теми препаратами, которые генерируют доход более \$ 1 млрд. в год: «Пэгинтрон» (пэгилированная форма интерферона- $\alpha 2b$ ); «Пегасис» (пэгилированная форма интерферона- $\alpha 2a$ ), «Ньюласта» (пэгилированная форма рч-Г-КСФ) и «Мирцера» (пэгилированный эпоэтин- $\beta$ ), утвержденный FDA в 2007 году для лечения анемии, связанной с хронической почечной недостаточностью у взрослых [22].

В качестве альтернативы моноклональным антителам уже зарегистрирован пэгилированный фрагмент антитела, который относится к семейству ингибиторов фактора некроза опухоли (ФНО). Препарат «Кимзия» (пэгилированный анти-ФНО- $\alpha$ -Fab') был утвержден в апреле 2008 года для лечения заболевания Крона и в

мае 2009 года – для лечения ревматоидного артрита. Другой пэгилированный фрагмент антитела был создан из ди-Fab'-анти-агрегантного производного фактора роста (CDP860) для применения на последних этапах клинических испытаний [22].

В дополнение к этим уже утвержденным пэгилированным биофармацевтическим препаратам в ближайшем будущем к выпуску готовятся многие другие новые пролонгированные формы, находящиеся сейчас на разных стадиях клинических испытаний. Некоторые фармацевтические компании активно разрабатывают пэгилированные формы IFN- $\beta$ : пэгилированный по N-концу человеческий IFN- $\beta$ , разработанный компанией «Biogen Idec» (BIB017), в настоящее время находится на III фазе клинических испытаний, и ПЭГ-IFN- $\beta$ , разработанный «Toray» (TRK-560), – на первой фазе клинических испытаний [23]. Кроме того, новая версия пэгилированного Г-КСФ с улучшенным фармакокинетическим профилем «Маху-G34», разработанная компанией «Маху-gen Inc.», успешно прошла вторую стадию клинических испытаний [24].

Есть также несколько докладов о применении пэгилированных белков, которые находятся на различных этапах разработки. Фармацевтической компанией «Novo Nordisk» проведены испытания производных гликопэгилированных факторов свертываемости крови, из которых аналог VII фактора N7-GP уже прошел II фазу клинических испытаний [25], как и аналог фактора VIII N8-GP, прошедший испытания на пациентах из 7 стран, страдающих тяжелой формой гемофилии типа A [26]. Также ведется разработка фармакокинетической модели для базовых и хирургических испытаний III фазы гликопэгилированной формы рекомбинантного фактора IX нонакога бета N9-GP по данным однократного введения препарата пациентам, страдающим гемофилией типа B, и прошедшим I фазу клинических исследований [27]. Компанией «BioMarin Pharmaceutical Inc.» проводится II фаза клинических испытаний пэгилированной формы фенилаланинаммонийлиазы в качестве потенциального препарата для инъекций больным фенилкетонурией [28]. Также компанией «Halozyme Therapeutics» успешно проводятся испытания препарата пэгилированной человеческой рекомбинантной гиалуронидазы PEGPH20, расщепляющей гиалуроновую кислоту, входящую в состав внеклеточного матрикса, и способной провоцировать несколько клеточных линий человеческой панкреатической карциномы. PEGPH20 способствует опухолеспецифическому увеличению макромолекулярной проницаемости и индуцирует

порозность и межэндотелиальные и соединительные пробелы в эндотелии опухоли. Комбинированная терапия PEGPH20 и гемцитабином ингибирует рост опухоли и продлевает выживание популяции трансгенных мышей [29].

Каркасные белки представляют собой новое поколение универсальных связывающих рецепторов для конструирования биофармацевтических лекарственных препаратов. Сконструированные каркасные белки образованы небольшими растворимыми мономерными белками, такими как липокалины («Антикалин»), фибронектин III («Аднектин»), белок А («Аффибоди»), тиоредоксин и BPTI/LACID1/ITI-D2 (домен Куница) [22], и представляют собой домены антител, в частности, их наименьшие функциональные единицы, способные к специфическому связыванию. Липокалины – функционально разнообразные белки, содержащие 160–180 АКО, с довольно слабой гомологией аминокислотной последовательности. Эти протеины со сконструированными лиганд-связывающими сайтами представляют собой привлекательную альтернативу рекомбинантным фрагментам антител. Они сочетают в себе преимущества молекул значительно меньших размеров с одной полипептидной цепью и обладают терапевтическим потенциалом внутриклеточных мишеней с высокой структурной пластичностью вследствие изменения аминокислотной последовательности [30, 31]. Чтобы продлить время циркуляции в организме, их также часто подвергают пэгилированию. Несколько препаратов на основе каркасных белков в данный момент проходят стадию доклинических и клинических испытаний, в том числе: пэгилированный Аднектин<sup>TM</sup> СТ-322, связывающий рецептор-2 сосудистого эндотелиального фактора роста, применяющийся в терапии саркомы Юинга (компания «Adnexus, A Bristol-Myers Squibb R&D Company») [32], и пэгилированный домен антитела, связывающий фактор некроза опухоли- $\alpha$ , разработанный совместно компаниями «PolyTherics Ltd.» и «Fujifilm Diosynth Biotechnologies» [33].

Один из новейших подходов для создания небольших антигенсвязывающих фрагментов с высокой избирательностью сфокусирован на использовании однодоменных V<sub>H</sub>H-фрагментов антител, названных нанотелами и обнаруженных только у семейства верблюдовых. Свойства рекомбинантных однодоменных нанотел позволяют беспрепятственно проводить синтез, выработку и молекулярно-биологические манипуляции, такие как модификация аминокислотной последовательности, создание «фьюжн»-молекул с другими белками и даже перенос антигенной специфичности от одного нанотела к

другому [34]. Нанотела обладают высокой стабильностью при комнатной или повышенной температурах и имеют слабую способность к агрегированию по сравнению с любыми одноцепочечными переменными фрагментами (scFv), полученными из обычных антител, могут быть легко получены в бактериях, в дрожжах и мицелиальных грибах и имеют низкую иммуногенность (данные для мышей) [35]. Кроме того, из-за их небольших размеров (15 кДа) нанотела могут атаковать гликозилированные и скрытые антигены, недоступные для крупных молекул антител, а характерные вытянутые формы участка их антигенсвязывающего сайта позволяют взаимодействовать с эпитопами, которые не являются узнаваемыми для обычных антител. На настоящий момент уже описано применение нанотел *in vivo* для терапевтических целей, в том числе для воздействия на паразитов и на раковые клетки [34]. Поэтому стало очевидным, что пэгилирование нанотел сможет подавить клиренс макрофагов и увеличить время циркуляции введенных векторов, что жизненно важно для экстравазации нанополимеров в опухоли для обеспечения эффективной системной доставки трансгенов. Не так давно был синтезирован конъюгат анти-DF3/Муцин1-нанотела со сложным ПЭГ-полиэтилениминовым комплексом (полиплекс) для доставки летальных трансгенов к сверхпродуктивным раковым клеткам Муцин1 [36] и конъюгаты трех различных факторов некроза опухоли- $\alpha$  с ПЭГ 40 кДа для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит [37].

Конъюгация ПЭГ с белками приводит к

образованию новых макромолекул с измененными физико-химическими характеристиками. Эти модификации, как правило, отражаются на способности связывания рецептора, на *in vivo* и *in vitro* биологической активности, скорости сорбции и биодоступности, биораспределении, фармакокинетическом и фармакодинамическом профилях, а также на снижении иммуногенности и токсичности.

Пэгилирование защищает пептиды и белки от протеолитического расщепления, однако высокомолекулярные и разветвленные виды ПЭГ способны оказывать негативное воздействие на биологическую активность конъюгатов из-за стерических помех [38–40]. В условиях *in vivo* этот эффект компенсируется значительно увеличенным клиренсом, который обычно составляет основное преимущество пэгилированных белков перед нативными [41–43]. Как правило, чем длиннее цепь ПЭГ [44–46] и выше его молекулярный вес [47–49], тем больше время полувыведения ПЭГ-конъюгата (рис. 2) [22]. В дополнение к длине ПЭГ, на фармакокинетические и фармакодинамические показатели, скорость сорбции, объем распределения препарата в организме и на период полувыведения сильно влияет его геометрия [50–52]. Было установлено, что конъюгаты белков с разветвленными видами ПЭГ имеют более длительную циркуляцию *in vivo*, чем их линейные аналоги, при одинаковой молекулярной массе за счет более эффективного экранирования поверхности белка, но также обладают и большим гидродинамическим объемом [53–56], хотя в последнее время появились результаты, оспаривающие эту гипотезу [57].

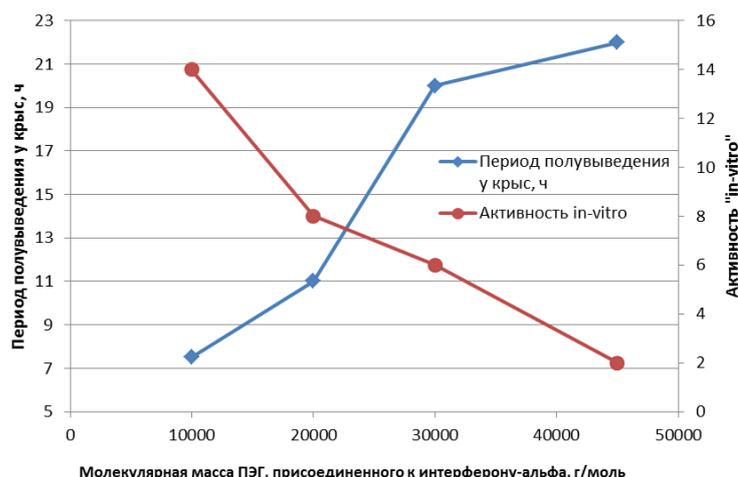


Рис. 2. Влияние молекулярной массы пэгилированных по N-концевой аминокислоте конструкторов интерферона- $\alpha$ -2b с линейными (10, 20 и 30 кДа) и разветвленным (45 кДа) ПЭГ на их активность *in vitro*, определенную с помощью RGA (ангиогенный анализ гена-репортера), и на период полувыведения у крыс после введения данных препаратов.

Проблемы, которые встают при разработке пэгилированных белков, также как и других

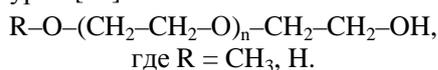
пэгилированных молекул, часто связаны с контролем сайта конъюгации ПЭГ и количест-

вом продуктов с различной степенью пэгирования. Терапевтические препараты должны быть полностью гомогенны, с четко установленной активностью и минимизированными побочными эффектами. Изменение соотношения продуктов реакции пэгирования, как и их конформации, приводит к изменению биологической активности и фармакокинетического профиля [58–60]. Активность, стабильность, фармакокинетика, а также биораспределение и иммуногенность биоконъюгатов могут зависеть от нескольких параметров, таких как размер и форма полимера, положение сайта конъюгации, число присоединенных молекул ПЭГ, природа химической связи и количество задействованных аминокислот [61–65].

Доступные в настоящее время ПЭГ-реагенты позволяют проводить селективное присоединение к наиболее распространенным функциональным группам, присутствующим в белках, а именно: к первичным аминам, карбоксильным группам, тиоловым или углеводным остаткам [66, 67]. Тем не менее, проведение селективных модификаций по определенным аминокислотным остаткам в белковой последовательности (например, для сохранения первоначальной биологической активности) является довольно сложной процедурой, и на данный момент невозможно вывести какую-то единственную унифицированную стратегию для присоединения ПЭГ ко всем белкам или пептидам [22].

## 2.2. Свойства ПЭГ как модифицирующего агента

Уникальные химические и медико-биологические особенности полиэтиленгликоля в течение длительного времени успешно используются для различных практических целей, в том числе для присоединения к биологическим молекулам без изменения их биомедицинских свойств. ПЭГ может быть легко модифицирован и присоединен к другим молекулам с незначительным воздействием на их химические свойства, но с заметным изменением их растворимости, размера и стабильности. Этот полимер, на первый взгляд, является очень простой молекулой, а, по сути, представляет собой линейный нейтральный полиэфир с общей структурой [68]:



Одной из наиболее ярких особенностей ПЭГ является растворимость: до 50% в большинстве растворителей, применяемых в органической химии, а также в воде. ПЭГ имеет низкую собственную токсичность. К тому же не каждый неионный гидрофильный полимер может обеспечить безопасное, не вызывающее побочных

реакций воздействие. ПЭГи с молекулярной массой от 20 до 50 кДа в основном используются для конъюгации с низкомолекулярными препаратами, такими как олигонуклеотиды и малые интерферирующие РНК. В результате образуются конъюгаты, имеющие повышенный почечный клиренс из-за увеличенной молекулярной массы полученной молекулы, не способной преодолеть порог почечного выведения. ПЭГи с более низкими молекулярными массами 1–5 кДа часто используются для конъюгации с высокомолекулярными препаратами, такими как антитела или наночастицы [19].

С теоретической точки зрения, этот биоразлагаемый полимер является наиболее удобным в применении, поскольку проблема его полного выведения преодолима. В то же время должны быть приняты во внимание и другие аспекты, такие как токсичность продуктов разложения и ограниченный период хранения препарата.

Что касается химической модификации ПЭГ, то на концах его молекула имеет первичную, легко модифицируемую гидроксильную группу, в то время как полиэфирная основа химически инертна.

В случае, когда требуется присоединить только одну молекулу вещества к молекуле ПЭГ или прикрепить сложные цепи ПЭГ к субстрату, во избежание возможного кросс-линкинга белка часто используется монометиловый эфир ПЭГ (мПЭГ). Ковалентная связь между ПЭГ и молекулой белка образуется с участием ОН-групп полимера. Кроме того, новые функциональные молекулы ПЭГ могут быть получены или путем прямого преобразования гидроксильных фрагментов в требуемую функциональную группу, либо взаимодействием полимера с бифункциональной молекулой, где одна функциональная группа используется для присоединения к полимеру, а другая остается доступной для конъюгации с интересующей молекулой [68].

Считается, что конъюгация молекул ПЭГ, присоединенных в непосредственной близости от активного центра, может привести к стерическим затруднениям или незначительным конформационным изменениям в функциональной части белка. С помощью иммобилизации маскирующих (экранирующих) агентов на твердые носители, пространство вокруг активного центра становится защищенным от химического воздействия во время проведения пэгирования. После снятия защиты субстрат беспрепятственно достигает активного центра пэгированного белка [69].

При использовании ПЭГ в качестве модифицирующего агента для присоединения к пептиду или белку он должен быть активирован с

помощью функциональных групп, которые являются реакционноспособными по отношению к некоторым группировкам белка [68].

Несмотря на успех клинических испытаний многих ПЭГ-конъюгатов, присоединение ПЭГ-реагента к биомолекуле, также как и придание конъюгату требуемой структуры и его дальнейшая очистка, остаются довольно проблематичными [70]. В частности, в результате реакции конъюгации может образовываться примесь побочных продуктов, если в молекуле белка имеется еще одна функциональная группа, которая является активной по отношению к ПЭГ-реагенту. Например, при взаимодействии с обычными белками даже монофункциональных ПЭГ реакция конъюгации часто приводит к образованию смеси моно-, ди- и полипэгиллированных форм. В связи с вышеизложенными соображениями, ограниченный выбор ПЭГ-реагентов, способных обеспечить сайт-направленное пэгиллирование, является основной преградой для разработки биофармацевтических молекул-конъюгатов. Довольно часто приходится встраивать конкретный специфичный сайт в биомолекулу для дальнейшего сайт-направленного присоединения [71]. Таким образом, выбор специфичного реагента становится важной задачей при создании методики направленного пэгиллирования [68].

Поскольку фолдинг белковых цепей регулируется термодинамическими факторами, доступность и реакционная способность боковых цепей может быть изменена путем варьирования условий протекания реакции. Например, лизин является более реакционноспособным в непротонированной форме, т.е. при  $\text{pH} > \text{pK}_a$ . Следовательно, при более высоких значениях  $\text{pH}$  реакция протекает быстрее [72], но ОН-группы становятся более конкурентоспособными, а при низких значениях  $\text{pH}$  реакция протекает медленнее с более высокой селективностью. Кроме того, «спрятанные» аминокислоты могут быть выведены на поверхность благодаря частичной денатурации белка. Таким образом, поскольку биологические функции белков определяются их структурой и формой, то следует учитывать все структурные особенности этих молекул для предотвращения неблагоприятных изменений конформации в результате проведения модификации [69].

Процесс присоединения ПЭГ к белкам обычно происходит с вовлечением остатка лизина, поскольку его  $\epsilon$ -аминогруппы, всегда присутствующие в белках, довольно реакционноспособны и гидрофильны [73–75]. Также существует множество работ, посвященных сайт-направленному пэгиллированию других аминокислотных остатков в белках [42, 66, 76]. Тиоловые модификации с помощью таких реагентов как малеимид [77, 78], пиридил-

дисульфид [79, 80], винилсульфон [81] представляют особый интерес, но поскольку цистеин редко присутствует в белках, то их применение ограничено [82, 83]. В качестве активных сайтов конъюгации также могут выступать гуанидиновые группы аргинина, карбоксильные и карбоксамидные группы глутаминовой кислоты и глутамина [84–86], а также углеводные остатки – в случае гликопротеинов [87]. Иногда случайное присоединение также может происходить по тирозину [88] или гистидину [72, 89]. Любой нежелательный продукт присоединения по тирозину может быть расщеплен обработкой гидроксил-амином [90]. Присоединение по карбоксильным группам белка описано только для нескольких конкретных случаев, как в случае косвенного присоединения ПЭГ-гидразида при низких значениях  $\text{pH}$  [91, 92], поскольку при реакции с аминокислотными ПЭГ одновременно происходит кросс-линкинг белка по этим же аминокислотным группам [93–95].

Необходимым требованием для всех этих методов является создание условий для сохранения активности биомолекулы: определенное значение  $\text{pH}$ , температуры и концентрации белка и соли [68, 96] с целью предотвращения неспецифичного присоединения ПЭГ.

Известно, что образование прочной связи между биологической молекулой и молекулой ПЭГ является причиной существенной потери биологической активности белка или полипептида [54, 58]. Однако даже если в результате реакции остается около 5% от первоначальной биологической активности, то этого, как правило, вполне достаточно для функционирования *in vivo* пэгиллированной формы со стабильной связью [68].

## 2.3. Виды ПЭГ-реагентов

### 2.3.1. Обзор современных ПЭГ-реагентов

Коммерчески доступные ПЭГ-реагенты имеют различные длину, геометрию молекул и химические свойства, что позволяет им взаимодействовать с особыми функциональными группами белков для создания ковалентной связи. Существует несколько коммерческих поставщиков, например, «NOF Corporation» (Япония), «SunBio» (Южная Корея), «Chirotech Technology Ltd.» (Великобритания), «JenKem» (Китай), «Creative PEG Works» (США) [22].

Полимерные ПЭГ, как правило, не подвержены биодegradации, но, по некоторым данным, подтвержден процесс их окислительного расщепления с помощью различных ферментов, таких как алкоголь- и альдегиддегидрогеназа [97] или цитохром-P450-зависимая оксидаза. Цепи ПЭГ с молекулярной массой менее 400 Да деградируют *in vivo* под воздействием алкогольдегидрогеназы до довольно токсич-

ных метаболитов [98]. Более длинные цепи, которые используются для пэгирования белков, не подвергаются метаболизму, и механизм выведения их конъюгатов зависит от молекулярной массы [22, 99].

Молекулы ПЭГ и конъюгатов белков с ПЭГ, имеющими молекулярную массу ниже 20 кДа, выводятся через почки, в то время как белковые конъюгаты с большими молекулярными весами удаляются из организма другими способами: через печень, с помощью иммунной системы и протеолитическим расщеплением белковой части конъюгата [100]. Эти пути представляют собой природные механизмы выведения крупных белковых молекул с молекулярной массой более 70 кДа [22].

Различные виды ПЭГ, как модифицированные, так и нет, имеющие широкий спектр полидисперсности, использовались в недавнем прошлом, в то время как в настоящее время общепринятым стандартом для ПЭГ-реагентов с молекулярной массой до 30 кДа является степень полидисперсности около 1.05. Для высокомолекулярных форм приемлемо значение полидисперсности, равное 1.1, однако общая тенденция направлена на разработку ПЭГ с узким диапазоном распределения. Большой разброс молекулярных масс в составе полимера является одним из факторов, усложняющих анализ конъюгатов ПЭГ с белками. В сегодняшней практике часто используются линейные и разветвленные виды ПЭГ с молекулярной массой до 40 кДа, применение которых приводит к ожидаемому улучшению фармакокинетических свойств белков [54, 56, 100]. Тем не менее, новые формы ПЭГ, например, раздвоенные, «многорукие» [101] и гребнеобразные [102], имеют перспективу дальнейшего использования при создании новых пролонгированных форм препаратов. Гребнеобразные ПЭГ содержат многочисленные короткие цепи ПЭГ, прикрепленные к остову полимера с помощью металл-опосредованной свободно-радикальной полимеризации [103], что добавляет дополнительные преимущества к плотно-упакованной структуре полимера [22].

Перспективным подходом к направленному пэгированию является присоединение ПЭГ с дальнейшим удалением группы, связывающей его с белком [63, 104, 105]. Этот метод позволяет преодолевать инактивацию белка во время реакции пэгирования и создавать препарат со сравнительно высокой биологической активностью, повышенной растворимостью и биодоступностью, а с помощью селекции сшивающего агента делает возможным контроль фармакокинетики [22].

Высвобождаемые ПЭГ-линкеры (или сшивающие агенты), как правило, предназначены

для контролируемого высвобождения препаратов, содержащих аминокислоты [106]. Этот способ наиболее подходит для пептидов [107], небольших молекул и олигонуклеотидов. Для большей эффективности неактивная форма препарата («пропрепарат»), полученная с помощью «высвобождаемого» пэгирования, должна быть химически или ферментативно преобразована в свою активную форму после введения в организм пациента. С этой целью Залипски и др. [108], а также Гринвальд и др. [109, 110] создали *in vivo* высвобождаемые виды ПЭГ, различающиеся механизмом отщепления. Молекулы ПЭГ, разработанные группой Залипски, использовавшей *para*- или *ortho*-дисульфиды бензилуретана, подвергались расщеплению в эндосомальном пространстве клетки в довольно мягких условиях. В ПЭГах, синтезированных группой Гринвальда, использовалась система, состоящая из спейсера, содержащего инициатор или спецификатор, и ферментативно высвобождаемого линкера, присоединенного к молекуле препарата. Скорость, с которой препарат отщеплялся от линкера, зависела от стерических препятствий, заданных химической структурой самого линкера [59].

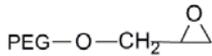
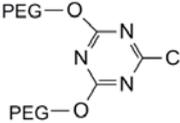
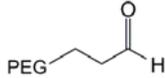
Улучшенные физико-химические характеристики ПЭГ-конъюгатов объясняются увеличением гидродинамического объема их молекул, что обеспечивается способностью ПЭГ координировать вокруг себя молекулы воды, а также вследствие гибкости его цепи. Цепи полимера могут разворачиваться вокруг белка для ограждения его от окружающей среды (или наоборот), но они также оказывают влияние на взаимодействие белка с другими молекулами, что важно для проявления его биологических функций. Это свойство считается качественной основой разницы в активностях пэгированных белков *in vitro* и *in vivo*. Как правило, активность *in vitro* после пэгирования снижается, иногда очень существенно; тем не менее, фармакологические свойства *in vivo* обычно улучшаются [22, 58, 59, 63].

Поскольку большинство реакций пэгирования проводится с участием довольно нестабильных молекул, то для проведения реакции конъюгации требуются мягкие условия, подходящие для проведения в водных растворах. В случае полипептидов наиболее распространенными для присоединения реактивными группами являются *N*-конец полипептидной цепи или  $\epsilon$ -аминогруппы лизина [74]. Первые синтезированные аналоги ПЭГ, как правило, содержали большое количество примесей, имели низкие молекулярные массы, нестабильные связи, а также не обладали ярко выраженной селективностью. Примерами первого поколения производных ПЭГ являются: ПЭГ-дихлор-

триазин [111, 112], ПЭГ-трезилат [113], ПЭГ-сукцинимидилкарбонат (СК-ПЭГ) [114, 115], ПЭГ-бензотриазолилкарбонат [116], ПЭГ-*n*-нитрофенилкарбонат [112, 117], ПЭГ-

трихлорфенилкарбонат [112], ПЭГ-карбонилимидазол [112] ПЭГ-сукцинимидил-сукцинат (СС-ПЭГ) [112, 115, 118], которые представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Алкилирующие производные ПЭГ, взаимодействующие с аминогруппами с образованием вторичных аминов с сохранением заряда белка

Формула	Название	Примечания	Ссылки
	ПЭГ-эпоксид	Нереакционноспособен, используется редко	[122, 123]
	ПЭГ-хлортриазин	Не используется в клинической практике из-за токсичности	[111, 112, 119, 120]
$\text{PEG-O-SO}_2\text{-CH}_2\text{CF}_3$	ПЭГ-трезилат (-тозилат)	Не используется: образуется смесь изомеров	[92, 113, 124]
	ПЭГ-альдегид	Реакция проходит в две стадии с восстановителем NaCNBH <sub>3</sub> . Если присоединение проводится при низких pH (4.5-5.0), реакция идет только по α-аминогруппе	[125, 126]

Производные ПЭГ-хлортриазина могут реагировать с несколькими нуклеофильными группами, такими как функциональные группы остатков лизина, серина, тирозина, цистеина или гистидина, в результате образуется конъюгат в виде вторичного амина с сохраненным зарядом [119, 120]. К сожалению, реакционная способность ПЭГ-хлортриазинов довольно высока, что вызывает кросс-линкинг молекул белка, содержащих дополнительные нуклеофильные остатки. Другими алкилирующими агентами, используемыми для неспецифической модификации многочисленных аминокрупп и образующими связи по вторичным аминокруппам с белками, вирусными частицами и липосомами, являются ПЭГ-трезилат (или ПЭГ-тозилат) [68, 121]. ПЭГ-трезилат наиболее специфичен по отношению к аминокруппам, чем ПЭГ-дихлортриазин.

Для второго поколения алкилирующих ПЭГ-реагентов были устранены следующие проблемы: загрязнение диольными производными, ограничение на использование низкомолекулярных мПЭГ, возникновение неста-

бильных связей, протекание побочных реакций и отсутствие избирательности к заменам. Одним из представителей второго поколения ПЭГ-производных является мПЭГ-пропиональдегид [16, 68]. Он легко синтезируется и удобен в использовании [126] по сравнению с ПЭГ-ацетальдегидом, так как последний очень чувствителен к димеризации через альдольную конденсацию [132, 125].

Взаимодействие альдегидов с первичными аминами происходит через образование оснований Шиффа, которые восстанавливаются до стабильных вторичных аминов, как показано на рис. 3. Это удобный способ конъюгации, поскольку положительный заряд аминокислоты имеет решающее значение для сохранения биологической активности белка [68].

В качестве альтернативных алкилирующих агентов также могут быть использованы эпокси-ПЭГ [133], но это нереакционноспособные и, кроме того, неспецифичные агенты, поскольку в случае их применения присоединение может идти и по гидроксильным группам [68].

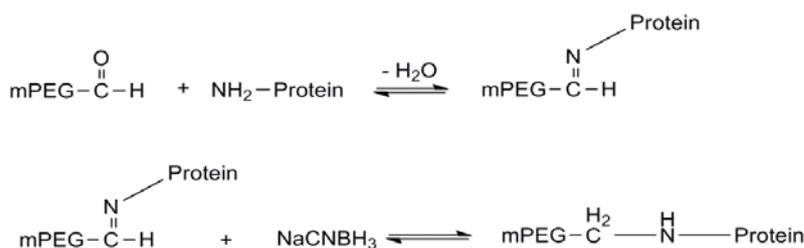
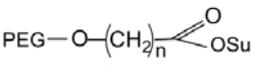
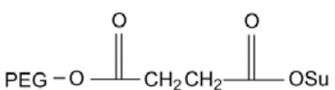
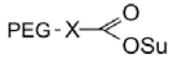
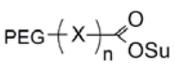
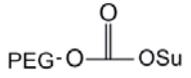
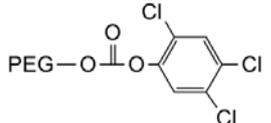
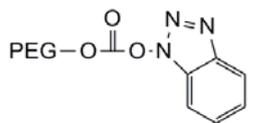
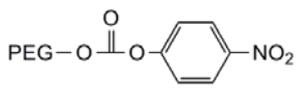


Рис. 3. Схема образования стабильной C-N-связи между мПЭГ и белком.

Таблица 2. Ацилирующие производные ПЭГ, взаимодействующие с аминокруппами с образованием амидов или уретановых связей со снижением заряда белка пропорционально количеству присоединенных цепей ПЭГ

Формула	Название	Примечания	Ссылки
<i>ПЭГ-карбоксилаты (N-гидроксисукцинимидные (NHS-) эфиры)</i>			
	ПЭГ-сукцинимидил-производные карбоновых кислот с одной или более группой -CH <sub>2</sub> -	Степень конъюгации зависит от числа CH <sub>2</sub> -групп и разветвленности цепи	[127]
	ПЭГ-сукцинимидил-сукцинат	Легко протекающий гидролиз эфира между янтарной кислотой и ПЭГ	[112, 115, 118, 128]
	ПЭГ-сукцинимидный эфир аминокислоты	Быстрый анализ числа присоединенных цепей ПЭГ введением Nle или β-Ala	[129, 130]
	ПЭГ-сукцинимидный эфир пептида	Met-Nle или Met-β-Ala позволяют легко локализовать сайт пэгилирования удалением ПЭГ с помощью CNBr	[129, 130, 131]
<i>ПЭГ-карбонаты</i>			
	ПЭГ-сукцинимидил-карбонат	Нереакционно-способен	[72, 114, 115]
	ПЭГ-2,3,5-трихлор-фенилкарбонат	Нереакционно-способен	[112]
	ПЭГ-бензотриазолилкарбонат	Нереакционно-способен	[116]
	ПЭГ- <i>n</i> -нитрофенилкарбонат	Нереакционно-способен	[112, 117]

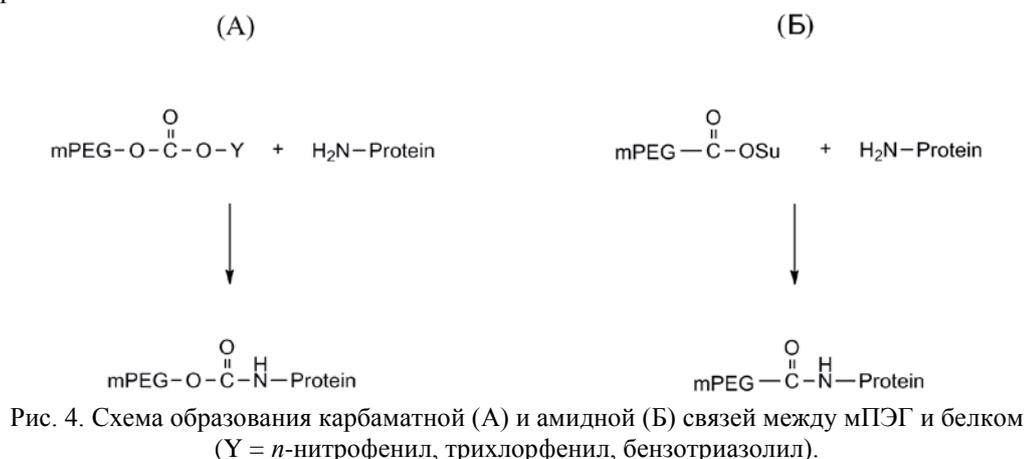
Большинство ПЭГ первого поколения являются ацилирующими агентами (см. табл. 2). Два из них широко используются – сукцинимидилкарбонат (СК-ПЭГ) [114, 115] и бензотриазолилкарбонат (БТЗ-ПЭГ) [116]. СК-ПЭГ и БТЗ-ПЭГ реагируют преимущественно с остатками лизина с образованием амидной связи, но также вступают в реакцию с гистидином и тирозином; СК-ПЭГ несколько более устойчив к гидролизу, чем БТЗ-ПЭГ. Другие ацилирующие ПЭГ-реагенты образуют карбаматные связи с белками – *n*-нитрофенилкарбонат (*n*НФК-ПЭГ) [112, 117], трихлорфенилкарбонат (ТХФ-ПЭГ) [112] и карбонилимидазол (КБИ-ПЭГ) [112]. Эти реагенты получают путем взаимодействия

хлорформатов или карбонилимидазола с концевой гидроксильной группой мПЭГ, и их реакционная способность гораздо ниже, чем СК-ПЭГ или БТЗ-ПЭГ. Образование карбаматной связи показано на рис. 4 [68].

Другой ПЭГ-реагент первого поколения – сукцинимидилсукцинат (СС-ПЭГ) [112, 118, 128]. СС-ПЭГ образуется в ходе реакции мПЭГ с янтарным ангидридом с последующей активацией сукцинимидного эфира карбоновой кислоты. Цепи полимера содержат вторую эфирную связь, которая образуется после конъюгации с белком и очень чувствительна к гидролизу [134]. Но не только гидролиз приводит к потере фармакокинетических свойств конъюгата, но и

сукцинатный «хвост», который остается на белке после гидролиза – он может выступать в качестве гаптена, что в конечном счете приводит к повышению иммуногенных свойств белка [115, 135]. В целом, активированные эфиры ПЭГ-карбоновых кислот – наиболее часто

используемые ацилирующие агенты для модификации белков. Они взаимодействуют с первичными аминами в условиях, близких к физиологическим, с образованием стабильных амидов, как показано на рис. 4 [68, 136].



Первыми производными ПЭГ-карбоновых кислот, содержащими устойчивую связь с остовом цепи ПЭГ, как в СС-ПЭГ, были карбоксиметилированные виды ПЭГ (КМ-ПЭГ). Их сукцинимидильные эфирные производные (СКМ-ПЭГ) проявили чрезвычайную реакционную способность, что затруднило их использование при конструировании конъюгатов [68, 112, 137].

Для создания активированного эфира, который бы имел наиболее предпочтительный кинетический профиль для модификации белков, были использованы ПЭГ-производные сукцинимидилпропионовой (ПЭГ-О-[CH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-COOSu) и сукцинимидилмасляной (ПЭГ-О-[CH<sub>2</sub>]<sub>3</sub>-COOSu) кислот [132]. Изменение расстояния между активированным эфиром и остовом ПЭГ с добавлением метиленовой единицы оказало сильное влияние на реакционную способность ПЭГ-реагентов по отношению к аминам. Так, ПЭГ-О-[CH<sub>2</sub>]<sub>3</sub>-COOSu имеет большее время гидролитического полураспада, чем ПЭГ-О-[CH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-COOSu. Кроме того, присутствие аминокислотного или пептидного участка между ПЭГ и макромолекулой дает ряд преимуществ благодаря разнообразию свойств, которые могут быть привнесены с помощью подходящей аминокислоты или пептида [138]. Среди наиболее часто используемых аминокислот особый интерес представляют норлейцин для удобства анализа пэгиллированных белков [139] и метионин – для идентификации сайта пэгиллирования [68, 140].

### 2.3.2. Линейные пэгиллирующие реагенты

Для образования конъюгатов с линейными ПЭГ одну или несколько цепей ПЭГ с молекулярной массой от 1 до 40 кДа химически

пришивают к поверхности белка (рис. 5А) [17, 141]. Пэгиллирующие агенты, как правило, получают химической модификацией конечного гидроксильного остатка цепи полимера [18, 115]. За некоторыми исключениями [142, 143], в первые годы разработки методик пэгиллирования в арсенале биохимиков не имелось обширного потенциала путей синтеза для получения чистых монофункциональных ПЭГ-производных с высокими молекулярными массами. Поскольку диольная составляющая у высокомолекулярных ПЭГ может достигать 15%, первые этапы разработки модифицированных реагентов, как правило, были неэффективными из-за неизбежного кросс-линкинга [95]. Еще одним недостатком первых пэгиллирующих агентов являлось отсутствие сайт-специфичности при сопряжении, что приводило к гетерогенным смесям региоизомеров. Несмотря на это, несколько модифицированных ПЭГ-препаратов были официально одобрены и утверждены как лекарственные средства в связи с их исключительной и воспроизводимой эффективностью по сравнению с исходными молекулами [21, 23, 144].

В настоящее время пэгиллирование свободных остатков цистеина, вероятно, остается наиболее эффективной стратегией для сайт-специфичной конъюгации – в основном, с использованием малеимид- или 2-пиридил-дисульфид-модифицированных полимеров (рис. 6) [79, 80, 82, 83], а также при проведении присоединения в нестационарных денатурирующих условиях [145]. Свободные остатки цистеина довольно редко встречаются у нативных полипептидов, поэтому они могут быть введены в аминокислотную последовательность с помощью методов белковой инженерии [144–146].

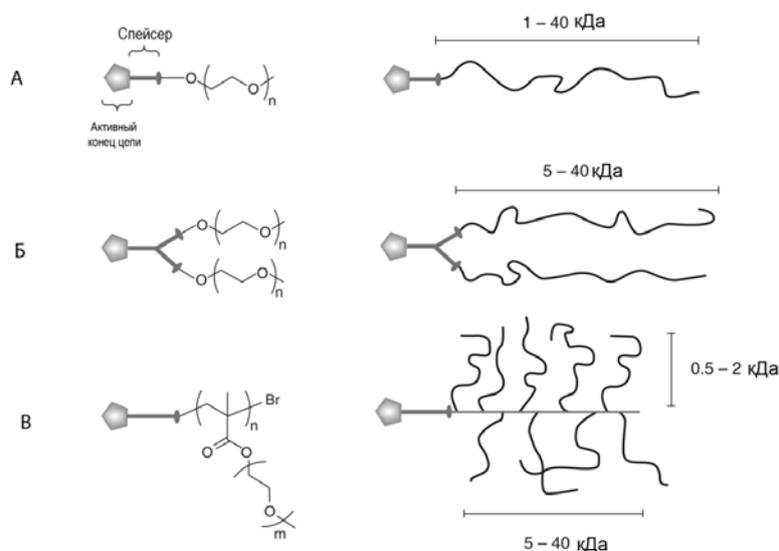


Рис. 5. Виды молекул ПЭГ-полимеров для создания препаратов на основе ПЭГ-белковых конъюгатов: А – линейные; Б – разветвленные; В – сильноразветвленные.

Направленная атака *N*-концевого остатка пептидной цепи достигается путем восстановительного аминирования с использованием пэгиллирующих агентов с активной альдегидной группой, которые способны вступать в реакцию с первичными аминами белков для формирования оснований Шиффа, которые затем подвергаются восстановлению в реакционной смеси с образованием стабильных вторичных аминов [57, 126, 142]. Было установлено, что при относительно низких значениях pH (обычно ниже 6), большинство  $\epsilon$ -аминогрупп остатков лизина находятся в протонированном состоянии, в то время как *N*-концевой атом азота остается непротонированным и способен взаимодействовать с альдегидной группой ПЭГ [136, 148]. Не так давно была предложена схема реакции, в которой дисульфидные мостики сначала восстанавливаются, а затем реагируют с метокси-ПЭГ, образуя бифункциональную группу на конце цепи [83, 149]. Бис-алкилирование образующихся свободных тиолов дает впоследствии трехуглеродный мостик, к которому ковалентно присоединяется ПЭГ (см. рис. 6) [82, 144].

### 2.3.3. Разветвленные пэгиллирующие агенты

Функциональные Y-образные (вилкообразные) виды ПЭГ (рис. 5Б) в последнее время привлекают большое внимание в связи с научными отчетами об улучшенной биологической активности конъюгатов на их основе по сравнению с используемыми линейными образцами [55, 105, 150]. Было доказано, что макромолекулярная (в данном случае разветвленная) структура полимера имеет решающее значение для улучшения свойств соответствующих биоконъюгатов. По сравнению с линейными ПЭГ разветвленные модификации увеличивают

устойчивость конъюгата к протеолизу и снижают его иммуногенность благодаря своей зонтикообразной форме [95, 144, 151].

### 2.3.4. Сильноразветвленные пэгиллирующие агенты

Гребнеобразные полимеры с одним сайтом присоединения представляют собой новый тип пэгиллирующих агентов. Одним из таких полимеров является зарегистрированный реагент «Поли-ПЭГ», в котором «зубцы» ПЭГ шиты с метакрилатным каркасом через сложноэфирные связи (рис. 5В). Молекула «Поли-ПЭГ» имеет большую степень подвижности, чем линейные ПЭГ, благодаря тщательному конструированию ее структуры [144].

Наиболее часто используемые пэгиллирующие агенты получают с помощью полимеризации раскрытого кольца этиленоксида, обычно взаимодействующего с алкоксид-производными соответствующих спиртов. В зависимости от выбранного метода синтеза последующие химические трансформации приводят к образованию целевого ПЭГ, используемого для конъюгации. Эта полимеризация открытого кольца осложняется неизбежным присутствием следов протонсодержащих группировок, которые предоставляют конкурирующие пути для взаимодействия с образованием гидроксильных групп на обоих концах цепи полимера. Кроме того, часто требуется множество дополнительных химических трансформаций для получения требуемой функциональной единицы полимера. Поскольку в любом случае невозможно получить 100%-ную гомогенную модификацию ПЭГ, как и разделить полимеры, отличающиеся только функциональными концевыми группами, то синтезированный ПЭГ всегда представляет собой смесь из целевого конъюгационного агента и его модификаций.

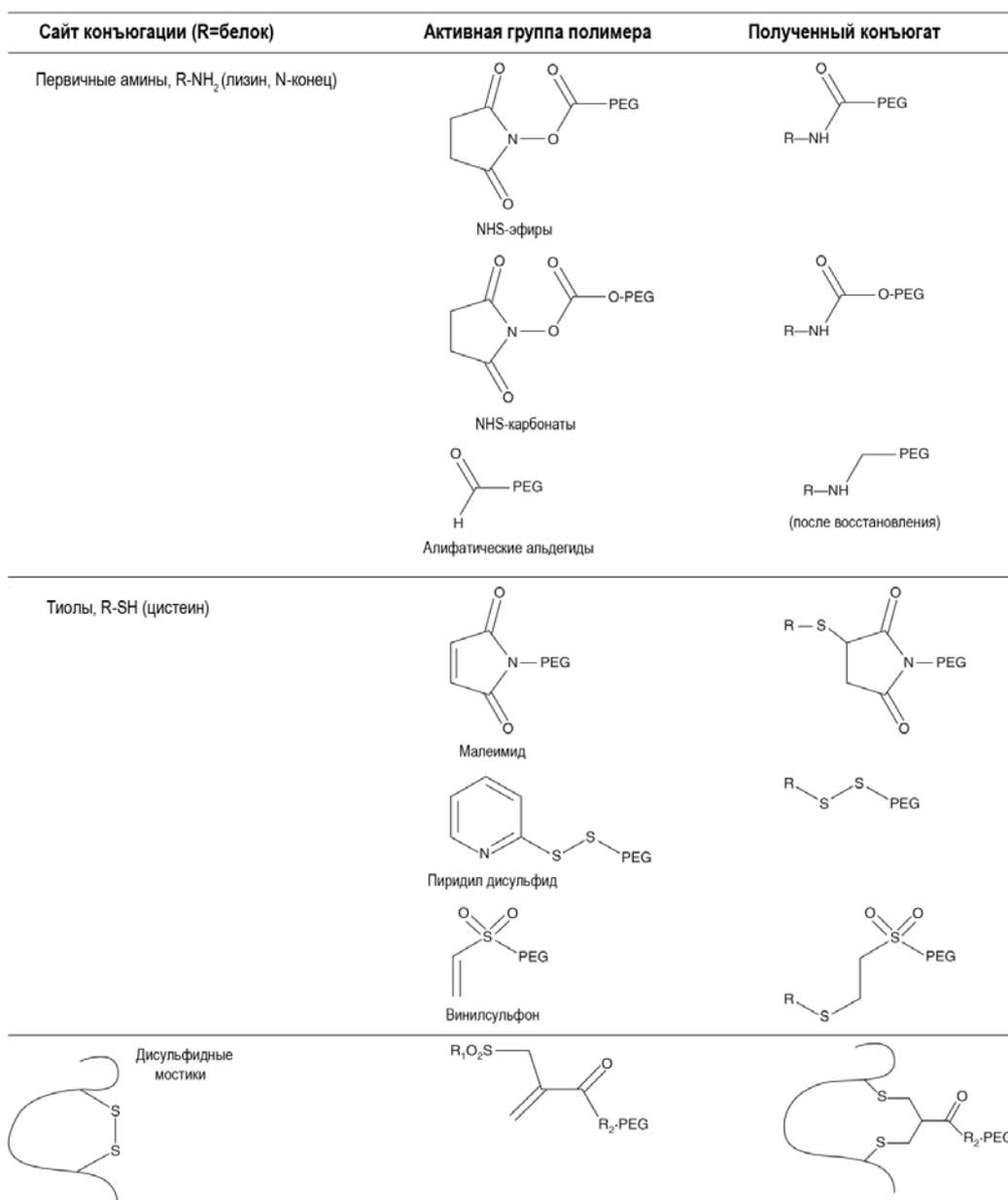


Рис. 6. Примеры сайт-направленной конъюгации ПЭГ с белками.

Эти проблемы усугубляются в том случае, если молекулярная масса полимера увеличивается – из-за трудностей, связанных с полимеризацией открытого кольца эпоксидов, что приводит к присоединению по различным группам. Новые поколения полимеров получают с помощью транзитивной металл-опосредованной радикальной полимеризации (ТММ LRP, часто – ATRP) [103, 152] – метода, который позволяет строго контролировать молекулярную массу полимера и его высокомолекулярную структуру [144, 153].

ПЭГ-реагенты существуют также в форме имеющих в продаже метакриловых мономеров различных молекулярных масс [154, 155]. Эти полимеры имеют метакрильный остов с «зубцами» ПЭГ и одну функциональную группу. Количество цепей ПЭГ можно варьировать, изменяя длину «зубцов» ПЭГ с использованием всевозможных ПЭГ-метакрилат-мономеров раз-

личных молекулярных масс (обычно 0,5–2 кДа). Подобным образом, с изменением позиционного отношения мономера к инициатору, длина метакрилатного каркаса также может варьироваться. Не содержащий «зубцов» сегмент спейсера также может быть вставлен для сохранения «гребенки» как можно дальше от белка. Таким образом, полимеры могут быть приспособлены для объединения активированных концевых групп с последующей ориентацией на конкретные аминокислоты. Например, сконструированная молекула «Поли-ПЭГ» позволяет проводить пэгилрование с задействованием ряда активных концевых групп, таких как альдегидная, сукцинимидил-эфирная и малеимидная, которые реагируют с N-концевым амином, боковыми радикалами лизина и цистеина соответственно [144, 156].

Линейные виды ПЭГ обычно имеют одну гидроксильную концевую группу, которая мо-

жет быть химически преобразована в любую другую функциональную группу, способную присоединяться к белковой цепи. Для некоторых ПЭГ также возможен вариант двух функциональных групп на обоих концах цепи, что может привести к нежелательному присоединению с образованием гибридного продукта [17]. В отличие от синтеза линейных ПЭГ, метод радикальной полимеризации, использующийся для синтеза гребневидных полимеров, гарантирует, что каждая полимерная молекула содержит только одну концевую функциональную группу [157]. В настоящее время изучается, насколько конъюгаты на основе этих гибридных гребневидных полимеров улучшают фармакокинетический профиль, снижают иммуногенность и токсичность и увеличивают период естественного полувыведения по сравнению с нативной молекулой белка и другими пэгилированными формами [158, 159]. Тем не менее, до сих пор открыт вопрос о биодegradации гребневидных полимеров и высвобождении пептида [160]. «Поли-ПЭГ» содержит эфирные связи, служащие коннектором между «зубцами» ПЭГ и остовом метакрилата, который должен деградировать, когда эти связи атакуются протеазами [161, 162]. Также не так давно было проведено присоединение легко удаляющегося сшивающего агента (линкера) между пептидом и ПЭГ-полимером, и эта технология может быть применена к гребневидным полимерам типа «Поли-ПЭГ» [104, 144, 163].

Другие гребневидные полимеры с акрильным каркасом также находятся в процессе изучения, такие как рН-чувствительный поли[2-(диэтиламино)этилметакрилат], модифицированный поли(L-лизин) (ПЛ), который может применяться в качестве носителя молекул ДНК. Хотя он и не является пэгилирующим агентом, этот полимер имеет уникальные свойства, поскольку его активность сильно зависит от рН раствора [164]. Продолжением этой работы является синтез гребневидных сополимеров, состоящих из основной цепи ПЛ, ДНК-связывающего сайта, боковых цепей гиалуроновой кислоты (ГК) и клеточно-специфичных лигандов [157]. С помощью ПЛ-сшитых ГК-гребневидных сополимеров можно управлять свойствами ДНК, а именно размером, растворимостью и степенью упаковки. Оба этих типа гребневидных сополимеров могут быть использованы для улучшения направленности доставки короткой интерферирующей РНК в цитозоль. В другом исследовании Шривидия и соавт. [165] синтезировали амфифильные гребневидные полимеры с ПЭГ, пришитым к поли(диметилсилоксанам) (ПДС-ПЭГ) посредством гидросилилирования реактивных эпокси групп, для присоединения к белку. Подготовленные тонкие

мембраны, насыщенные бычьим сывороточным альбумином (БСА), пришивались к ПДС-ПЭГ, благодаря чему период циркуляции высвобожденного белка был довольно продолжительным и составлял более 72 ч. Термочувствительный поли(N-изопропилакриламид) (поли[NIPAM]) также был конъюгирован со стрептавидином, делая возможным термозависимое высвобождение при температуре тела в условиях *in vivo* [166, 167]. Конъюгаты также используются для проведения самосборки в гигантские амфифилы и для объединения различных свойств функциональных групп каркаса полимера при конъюгации с БСА [144, 168].

## 2.4. Пэгилированные биофармацевтические препараты

### 2.4.1. Препараты, полученные с помощью неспецифического пэгилирования

Первые пэгилированные фармацевтические препараты «Адаген» (ПЭГ-адемаза) и «Онк-аспар» (ПЭГ-аспарагиназа, ПЭГ-аспаргаза) на самом деле представляли собой сложные смеси различных пэгилированных изомеров [22, 54]. Было доказано, что воздействие препарата ПЭГ-адемазы на организм гораздо более эффективно, по сравнению с применявшимися ранее переливаниями крови, которые использовались в качестве стандартной терапии [169]. ПЭГ-аспаргаза служит для лечения различных видов лейкемии, а также для разрешения проблемы применения нейтрализующих антител, связанных с использованием нативной аспарагиназы [22, 170].

Однако впоследствии были зарегистрированы фармацевтические препараты «Пегинтрон» и «Пегасис», полученные ненаправленным пэгилированием. Оба препарата представляют собой смеси монопэгилированных позиционных изомеров, содержащих либо линейную цепь (12 кДа) ПЭГ, связанную с различными сайтами интерферона- $\alpha$ -2b, – в случае «Пегинтрона» [171], либо разветвленную цепь (40 кДа) ПЭГ, связанную главным образом с четырьмя лизиновыми остатками интерферона- $\alpha$ -2a, – в случае «Пегасиса» [22, 172].

Еще одним интересным пэгилированным биофармацевтическим препаратом, произведенным методом неспецифического пэгилирования, является ПЭГ-висомант («Сомаверт»), который был зарегистрирован в 2003 году для лечения акромегалии. ПЭГ-висомант был разработан для функционирования в качестве антагониста рецептора гормона роста человека (Р-ГРЧ) путем замены некоторых аминокислот в основной цепи ГРЧ. Модификации включают в себя несколько мутаций белка и конъюгацию с 4-6 цепями молекулы ПЭГ (5 кДа) на одну молекулу белка [22, 173].

Препарат «Мирцера», который был утвержден FDA в 2007 году, представляет собой смесь монопэгиллированных конъюгатов эритропоэтина с 30 кДа ПЭГ, присоединенным к остаткам лизина (в основном, Lys<sup>52</sup> и Lys<sup>45</sup>) или к N-концевой аминокислоте белка [22, 174].

#### 2.4.2. Препараты, полученные с помощью сайт-направленного (сайт-специфичного) пэгиллирования

Одной из перспективных групп белков для цистеин-направленного пэгиллирования являются Fab'-фрагменты. Пэгиллирование стало идеальным методом для снижения их антигенности и продления периода циркуляции в организме [175, 176]. Тем не менее, главным преимуществом использования пэгиллированных Fab'-фрагментов вместо целых антител является устранение нежелательных побочных эффектов, вызванных Fc-регионом [177]. Остатки цистеинов в шарнирной области Fab'-фрагментов, находящиеся на большом расстоянии от антигенсвязывающей области, предоставляют возможность специфического присоединения, приводящего к образованию продукта с четко заданными свойствами. Наиболее ярким примером этого подхода стал препарат «Кимзия» – Fab'-фрагмент человеческого анти-ФНО- $\alpha$ -моноклонального антитела, направленно присоединенного к 40 кДа разветвленному ПЭГ через сульфгидрильную группу цистеина [178]. Недавно было описано, что эффективность пэгиллирования Fab'-фрагментов может быть существенно усилена введением дисульфидной связи с последующим химическим восстановлением; таким образом, финальный Fab'-ПЭГ-конъюгат не содержит дисульфидной связи. Такие молекулы, хотя и без ковалентных связей между обеими цепями антитела, сохраняют очень высокий уровень химической и термической стабильности, привычные фармакокинетические показатели и характерную биологическую активность [22, 179].

Новым подходом к пэгиллированию белков по дисульфидным связям стали методы, использующие специальные ПЭГ-моносulфоновые реагенты [83, 176]. С помощью сайт-направленного бис-алкилирования двух атомов серы в нативной дисульфидной связи ПЭГ-сшивающий агент формирует трехуглеродный пэгиллированный мостик [82, 149].

Недавно были опубликованы результаты по пэгиллированию белков с использованием аффинного маркера гистидина в качестве мишени для присоединения ПЭГ [33, 180]. Учитывая, что такие маркеры являются одними из наиболее часто используемых инструментов для создания простой и быстрой методики очистки рекомбинантных белков, данный

подход несет в себе определенный потенциал для последующего применения [22, 181].

Пэгиллирование с участием ненативных аминокислот требует генетических манипуляций с последовательностью белка и предусматривает возможность их включения в аминокислотную последовательность продуцента (так называемая технология «Amber»), а также направленное присоединение к соответствующим ПЭГ-реагентам [22, 182, 183].

В этой связи большой интерес представляют азидо- и этинилпроизводные серина, за счет их способности взаимодействовать с соответствующими этинил-ПЭГ или азидо-ПЭГ-реагентами [22, 184].

Благодаря применению технологии «Amber», была получена монопэгиллированная молекула ГРЧ с улучшенными фармакологическими характеристиками [185]. Фазы I и II клинических исследований показали, что пролонгированные формы ГРЧ стабилизируют уровень инсулиноподобного фактора роста I (ИФР-I), обеспечивая при этом безопасность и переносимость у взрослых с дефицитом гормона роста [22, 186].

Вместо осуществления традиционной процедуры реакции конъюгации химическим способом, для достижения направленного пэгиллирования также могут быть использованы ферменты. Например, трансглутаминаза способна катализировать присоединение ПЭГ-алкиламина к глутаминовой кислоте белков, которая может быть как нативной, так и генетически введенной [187]. Реакция имеет высокую степень специфичности, поскольку модифицируются только те остатки глутаминовой кислоты, которые окружены гибкими или развернутыми регионами [188]. Более перспективным также представляется двухшаговое ферментное гликопэгиллирование, которое позволяет проводить присоединение цепи ПЭГ по нативным сайтам O-гликозилирования [189]. Исходными молекулами являются негликозилированные рекомбинантные полипептиды, полученные из *Escherichia coli*. Белки должны содержать один сайт O-гликозилирования, в котором серин или треонин функционируют как акцепторы для селективного присоединения N-ацетилгалактозамина (NAcGal) к рекомбинантному ферменту – O-NAcGal-трансферазе [190]. На следующем этапе гликозилированный белок пэгиллируется по O-NAcGal с помощью ПЭГ-цитидинмонофосфат-производных силановой кислоты с использованием другого рекомбинантного фермента, сиалилтрансферазы [191]. На сегодняшний день эта методика была протестирована на различных фармацевтических белках, в том числе, на рГ-КСФ [22].

### 3. Пэгилированный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

#### 3.1. Краткое описание препарата

Ковалентное присоединение цепи полиэтиленгликоля (ПЭГ) к *N*-концевому метионину филграстима посредством восстановительного *N*-алкилирования приводит к образованию ПЭГ-филграстима. ПЭГ-филграстим является пролонгированной формой филграстима, требующей только одной инъекции препарата за весь курс лечения, направленного на устранение последствий химиотерапии, в том числе нейтропении. Пэгилирование увеличивает размер молекулы филграстима настолько, что она становится слишком большой для почечного выведения (клиренса). Следовательно, нейтрофил-опосредованный клиренс является преимущественным путем выведения препарата. Таким образом, средний период естественного полувыведения препарата ПЭГ-филграстима увеличивается до 42 ч, по сравнению с 3.5–3.8 ч для филграстима, хотя на самом деле этот параметр непостоянен и зависит от абсолютного числа нейтрофилов и, в свою очередь, отражает способность препарата поддерживать производство этих же клеток [12].

ПЭГ-филграстим сохраняет первоначальную биологическую активность рГ-КСФ и связывается с тем же рецептором, стимулируя пролиферацию, дифференциацию и активацию нейтрофилов. Одноразовое за весь цикл химиотерапии введение ПЭГ-филграстима в организм уменьшает продолжительность тяжелой формы

нейтропении, при этом сохраняя результаты ежедневного применения неконъюгированного препарата. В ходе клинических испытаний у пациентов, получающих ПЭГ-филграстим, частота возникновения фебрильной нейтропении снижалась, по сравнению с пациентами, получающими филграстим [12].

#### 3.2. Пэгилирование Г-КСФ

Конъюгаты ПЭГ-Г-КСФ получают методом восстановительного алкилирования белков с линейными монофункциональными метокси-ПЭГ-альдегидами нескольких молекулярных масс. Некоторые из них отбирают по результатам тестов *in vivo* и *in vitro*.

На сегодняшний день описано множество методик пэгилирования рГ-КСФ для получения *N*-концевых пэгилированных производных цитокинов. Согласно наиболее часто применяемой из них [136], к охлажденному раствору рГ-КСФ (5 мг/мл) в буферной системе, содержащей 100 мМ ацетат натрия (рН 5.0) и 20 мМ цианоборгидрид натрия добавляют раствор, содержащий пятимольный избыток мПЭГ-альдегида. Реакционную смесь подвергают постоянному перемешиванию при тех же условиях. Пример схемы данной реакции пэгилирования рГ-КСФ приведен на рис. 7. Также недавно была описана масштабированная, более технологичная методика пэгилирования рГ-КСФ по  $\alpha$ -концевой аминогруппе с сокращенным количеством взятого в реакцию ПЭГ-альдегида [192].

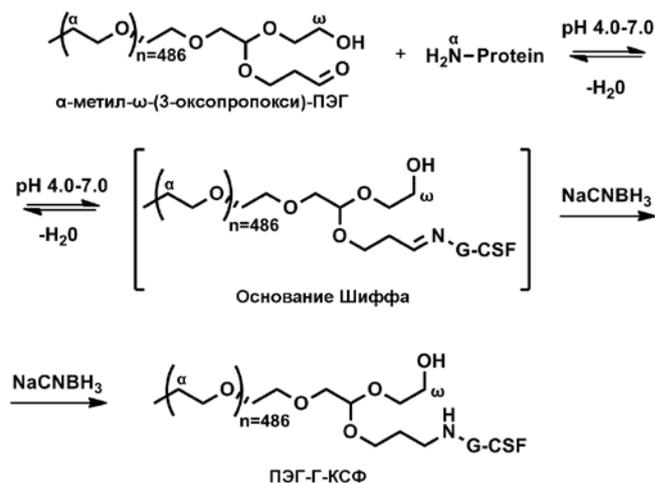


Рис. 7. Схема реакции пэгилирования рГ-КСФ по  $\alpha$ -аминогруппе *N*-концевого метионина.

Степень модификации белка контролируется методом ВЭЖХ на колонке Bio-Sil SEC 250-5 «Bio-Rad» с подвижной фазой, содержащей 100 мМ фосфат натрия, 150 мМ хлорид натрия, 10 мМ азид натрия (рН 6.8) при скорости потока 1 мл/мин [136]. После 10 ч инкубации, согласно ВЭЖХ-анализу, примерно 92% белка специфично присоединяется к монометокси-ПЭГ. Мономер ПЭГ-Г-КСФ был выде-

лен с помощью ионообменной хроматографии на сорбенте SP Sepharose, уравновешенном в буферной системе 20 мМ ацетат натрия (рН 4.0), с последующим линейным градиентом 0–1 М NaCl [136]. Различные мономеры ПЭГ-Г-КСФ были получены аналогичным образом с использованием селективного отбора мПЭГ-альдегидов различных молекулярных масс (между 12 и 30 кДа).

Расположение присоединенной ПЭГ-субъединицы в пространственной структуре полученной молекулы было определено методом эндопротеиназного пептидного картирования. Дополнительные исследования с использованием различных методов характеристики физико-химических свойств белка (ультрацентрифугирование, MALDI-TOF-MS, ВЭЖХ

на гель-фильтрационных колонках с on-line контролем под несколькими ракурсами рассеяния лазерного света) подтвердили прогнозируемый состав и структуру этих конъюгатов, а именно, что одна линейная макромолекула ПЭГ присоединяется к *N*-концевому остатку аминокислотной последовательности белка (рис. 8) [136].

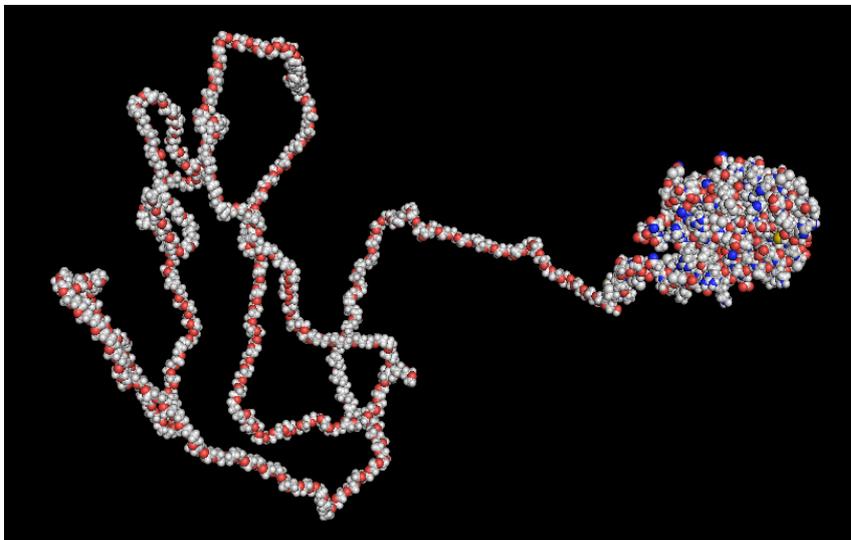


Рис. 8. Трехмерная модель молекулы ПЭГ-Г-КСФ.

Поскольку в результате реакции пэгиллирования белков, как правило, образуются очень специфические молекулы конъюгатов, то на практике нельзя выработать общий подход как для процессов конъюгации, так и их очистки [70, 193].

Наиболее часто применяемый для очистки пэгиллированных белков метод катионообменной хроматографии используется благодаря сродству к аминогруппам ПЭГ-конъюгата [194]. Ультрафильтрация и диализ используются редко и в основном для установления требуемой концентрации или перевода в другую буферную систему, а не для разделения нативной и пэгиллированной форм белка [69, 195]. Гидрофобная хроматография ПЭГ-модифицированных белков еще до конца не изучена, принимая во внимание тот факт, что модификация воздействует на гидрофобность белка, уменьшая или увеличивая ее в зависимости от его структуры [58, 70]. Обращенно-фазовая хроматография применяется в основном в промышленном производстве для анализа реакционной смеси на примеси. Аффинная хроматография задействует довольно дорогостоящие материалы и не может быть использована в промышленных масштабах [70]. Гель-фильтрация также может быть использована для разделения пэгиллированных изоформ, но имеет очень низкую производительность в промышленных масштабах [196], и ее эффективность сильно зависит от молекулярных масс разделяемых белков [60].

В настоящий момент в литературе описана только одна полная схема очистки ПЭГ-Г-КСФ, разработанная на основе схемы очистки рГ-КСФ и состоящая из четырех основных стадий [197]: ионообменной хроматографии на SP Sepharose FF при значении pH 6.0, позволяющей очистить рГ-КСФ от клеточных примесей и сконцентрировать выше 10 мг/мл для проведения реакции конъюгации с  $\alpha$ -метил-ПЭГ-пропиональдегидом [192], гидрофобной хроматографии на Butyl Sepharose 4 FF для удаления из препарата белков *E. coli*, родственных примесей и непрореагировавшего рГ-КСФ, и хроматографии на SP Sepharose FF в ацетатном буфере при значении pH 4.5 для очистки препарата от эндотоксинов и позволяющей сконцентрировать белок до значения 13 мг/мл перед стадией гель-фильтрации на сорбенте Sephadex G-25 Fine при pH 4.0 [197].

### 3.3. Доклинические и клинические испытания ПЭГ-филграстима

Привычная лечебная практика для онкологических больных, проходящих курс химиотерапии, начинается с ежедневной дозировки филграстима на следующий день после начала химиотерапии и продолжается до достижения безопасного уровня нейтрофилов в сыворотке крови – около 10000 нейтрофилов/мл [198]. В доклинических испытаниях на животных было показано, что разовая доза филграстима, независимо от ее количества, не может заменить повторного ежедневного введения из-за корот-

кого периода полувыведения циркулирующего белка [199]. Пэгилированные производные филграстима в испытаниях *in vivo* на мышцах почти без исключений проявили пролонгированную активность молекулы, увеличивая абсолютное число нейтрофилов (АЧН) гораздо интенсивнее, чем немодифицированная молекула. Окончательный выбор кандидата, представляющего собой молекулу ПЭГ с массой 20 кДа, ковалентно присоединенную к N-концевой аминокислоте филграстима, основывался на пролонгированной активности *in vivo* по сравнению с низкой активностью *in vitro* и такими факторами, как доступность субстрата, выход и устойчивость процесса [70]. ПЭГ-филграстим имеет сходное фармакодинамическое и биологическое воздействие на нейтрофилы, как и филграстим, стимулируя выработку и созревание прекурсоров нейтрофилов, а также повышение активности зрелых нейтрофилов с помощью тех же механизмов, что и филграстим [200]. Доклинические исследования показали, что ожидаемые свойства новой формы достигнуты моделированием параметров, описанных выше, – сравнимого профиля безопасности и фармакологических свойств материнской молекулы, и ее пролонгированной формы, с возможностью фармакокинетического контроля уровня нейтрофилов [12].

Первая фаза клинических испытаний прошла без осложнений на здоровых добровольцах и была отмечена появлением нейтрофилии и экстремальной мобилизацией клеток-предшественников в периферическую кровь [201]. Во второй фазе исследований на больных раком легких сравнивали действие одноразовой дозы ПЭГ-филграстима за весь цикл химиотерапии с ежедневным введением филграстима; применение обеих схем вызвало быстрый рост АЧН, хотя, как и было спрогнозировано, исходя из доклинических исследований и первой фазы клинических испытаний, продолжительность иммунного ответа была больше у пациентов, получающих ПЭГ-филграстим [202]. Кроме того, период циркуляции ПЭГ-филграстима был больше, чем у филграстима даже в отсутствие нейтрофилов [12].

После второй фазы клинических испытаний, течение которых было полностью спрогнозировано, были проведены два рандомных этапа третьей фазы с одноразовым введением ПЭГ-филграстима у больных раком молочной железы, получающих доксорубицин ( $60 \text{ мг/м}^2$ ) и доцетаксел ( $75 \text{ мг/м}^2$ ) в ходе курса химиотерапии. Основным ограничением этих исследований была продолжительность тяжелой нейтропении (в дни с АЧН ниже  $0.5 \times 10^9/\text{л}$ ). В испытаниях было использовано несколько различных методов расчета дозировки. В одном

из исследований ПЭГ-филграстим вводили, исходя из массы тела больного ( $100 \text{ мкг/кг}$  на один цикл), в то время как во втором пациенты получали фиксированную дозу –  $6 \text{ мг}$  ПЭГ-филграстима. В обоих исследованиях в качестве контроля использовали стандартные инъекции филграстима  $5 \text{ мкг/кг}$  в день, который дозировался стандартным образом – начиная с 24 ч после начала химиотерапии до АЧН больше чем  $10 \times 10^9/\text{л}$  или на срок до 14 дней [12, 203, 204].

В испытаниях на основании веса больных средняя продолжительность тяжелой нейтропении в первом цикле была одинаковой как для группы, получающей ПЭГ-филграстим, так и для получающей филграстим ( $1.7$  дня против  $1.8 \pm 0.5$ ), и сопоставима в последующих циклах для обеих групп, хотя, как правило, короче в группе ПЭГ-филграстима. Исследования на основе метода фиксированных доз также показали одинаковую эффективность у пациентов, получавших как ПЭГ-филграстим, так и филграстим [204]. Среди 77 пациентов в группе ПЭГ-филграстима и 75 пациентов в группе филграстима средняя продолжительность тяжелой нейтропении в течение первого цикла составляла  $1.8$  и  $1.6$  дней соответственно. ПЭГ-филграстим имел сопоставимую эффективность с ежедневными дозами филграстима независимо от массы тела пациентов при введении  $6 \text{ мг}$  фиксированной дозы. Метод фиксированных дозировок имел, как правило, прогнозируемый профиль и был более эффективен за счет снижения возможности ошибок при расчете доз, что значительно упрощало лечение. Восстановление АЧН у пациентов в группе ПЭГ-филграстима было сравнимо с тем же показателем у пациентов, которые получали филграстим, но без отклонений, связанных с ежедневными инъекциями филграстима. Это отразил опыт доклинических исследований, в которых частый забор крови позволил подробнее продемонстрировать суточное колебание АЧН и влияние ежедневного дозирования филграстима на протекание цикла химиотерапии [201]. Можно предположить, что отсутствие ПЭГ-филграстима в сыворотке крови и конкретное значение АЧН после терапии с использованием пролонгированной формы могут иметь профилактическое преимущество. Остается определить, является ли соответствующий показатель АЧН полезным параметром; например, где аккумулируются нейтрофилы, когда они не циркулируют – просто мигрируют в отдаленные области клеток или безвозвратно теряются [12].

Фебрильная нейтропения (тяжелая форма нейтропении, сопровождающаяся температурой более  $38.2^\circ\text{C}$ ), как правило, связана с серьезными инфекциями и зачастую требует госпитализации и введения антибактериальных

средств [205]. В дополнение к угрозе для жизни пациента и потенциальной задержке дозированной химиотерапии, лечение фебрильной нейтропении само по себе может оказывать негативное влияние на качество жизни пациентов в связи с необходимостью госпитализации и внутривенной антиинфекционной терапией. Фебрильная нейтропения была определена как предельно допустимый параметр на обоих этапах третьей фазы клинических испытаний. На этих этапах (метод дозировки в зависимости от веса пациентов и на основе фиксированных доз) появление фебрильной нейтропении при применении ПЭГ-филграс- тима было ниже на каждом цикле по сравнению с филграс- тимом (18 против 9% и 13 против 20% соответственно) [203, 204]. При комбинировании данных из двух типов испытаний было установлено, что частота возникновения фебрильной нейтро- пении была значительно уменьшена у пациен- тов, получающих ПЭГ-филграс- тим, по сравне- нию с теми, кто получал филграс- тим (11 против 19%). Кроме того, продолжительность периодов фебрильной нейтропении была значительно короче в случае применения ПЭГ-филграс- тима, в результате чего значительно снижалась тен- денция риска госпитализации и использования внутривенных антибактериальных средств [12]. Переносимость ПЭГ-филграс- тима и фил- грас- тима была одинаковой на обоих этапах

третьей фазы клинических испытаний. Слабая или умеренно сильная боль в костях была описана как единственный побочный эффект, связанный с лечением (25 против 26%) [203, 204]. Также было показано, что ПЭГ-филграс- тим во второй фазе испытаний на основании веса пациентов не имел негативного воздейст- вия по сравнению с филграс- тимом у пациентов с лимфомой типа Нон-Ходжкинс, а также с лимфомой типа Ходжкинс, получающих ESHAP-химиотерапию (этопозид, метилпред- низолон, цисплатин и цитарабин) [12, 206].

Пэгилирование филграс- тима замедляет вы- ведение молекулы белка, не влияя на его биоло- гическую активность. Одиночные инъекции ПЭГ-филграс- тима за весь цикл химиотерапии оказались не менее эффективны, чем еже- дневное введение филграс- тима в целях сниже- ния продолжительности и частоты возникно- вения тяжелой нейтропении. Улучшенный график введения ПЭГ-филграс- тима может иметь преимущества перед введением филграс- тима с точки зрения простоты, соблюдения режима и улучшения качества жизни пациентов [207]. В результате тщательного изучения конструктивных параметров пролонгирован- ной формы, ее характеристики были признаны более выигрышными, несмотря на то, что ПЭГ- филграс- тим и филграс- тим имеют схожие профили побочных эффектов [12, 202].

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES:

1. Freyer G., Ligneau B., Trillet-Lenoir V. Colony-stimulating factors in the prevention of solid tumors induced by chemotherapy in patients with febrile neutropenia // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 1998. V. 10. P. 3–9.
2. Morstyn G., Burgess A.W. Hemopoietic growth factors: A review // *Cancer Res*. 1988. V. 48. P. 5624–5637.
3. Molineux G. Granulocyte colony-stimulating factors // *Cancer Treatment & Res*. 2011. V. 157. P. 33–53.
4. Asano S. Human granulocyte colony-stimulating factor: Its basic aspects and clinical applications // *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol*. 1991. V. 13. P. 400–413.
5. Herman A.C., Boone T.C., Lu H.S. Characterization, formulation, and stability of Neupogen (Filgrastim), a recombinant human granulocyte-colony stimulating factor // *Pharm. Biotechnol*. 1996. V. 9. P. 303–328.
6. Khalilzadeh R., Mohammadian-Mosaabadi J., Bahrami A., Nazak-Tabbar A., Nasiri-Khalili M.A., Amouheidari A. Process development for production of human granulocyte-colony stimulating factor by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 2008. V. 35. P. 1643–1650.
7. Molineux G. Granulocyte colony-stimulating factor / In: *Hematopoietic Growth Factors in Oncology: Basic Science and Clinical Therapeutics* / Ed. G. Morstyn, M. Foote, G. J. Lieschke. N.Y., Totowa: Humana Press Inc., 2004. P. 83–97.
8. Vanz A.L., Renard G., Palma M.S., Chies J.M., Dalmora S.L., Basso L.A., Santos D.S. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): Cloning, overexpression, purification and characterization // *Microb. Cell Fact*. 2008. V. 7. P. 1–12.
9. Gervais V., Zerial A., Oschkinat H. NMR investigations of the role of the sugar moiety in glycosylated recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor // *Eur. J. Biochem*. 1997. V. 247. P. 386–395.
10. Wingfield P., Benedict R., Turcatti G., Allet B., Mermod J.-J., DeLamararter J., Simona M.G., Rose K. Characterization of recombinant-derived granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) // *Biochem. J*. 1988. V. 256. P. 213–218.
11. Hill C.P., Osslund T.D., Eisenberg D. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 5167–5171.
12. Molineux G. The design and development of pegfilgrastim (PEG-rmetHuG-CSF, Neulasta) // *Curr. Pharm. Des*. 2004. V. 10. P. 1235–1244.
13. Wadhwa M., Thorpe R. Haematopoietic growth factors and their therapeutic use // *Thromb.*

Haemost. 2008. V. 99. P. 863–873.

14. Heuser M., Ganser A. Colony-stimulating factors in the management of neutropenia and its complications // *Ann. Hematol.* 2005. V. 84. P. 697–708.

15. van de Geijn G.J.M., Aarts L.H.J., Erkeland S.J., Prasher J.M., Touw I.P. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal hematopoietic cell development and myeloid disease // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2003. V. 149. P. 53–71.

16. Zalipsky S. Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates // *Bioconjug. Chem.* 1995. V. 6. P. 150–165.

17. Veronese F.M., Caliceti P., Schiavon O. Branched and linear poly(ethylene glycol): Influence of the polymer structure on enzymological, pharmacokinetic, and immunological properties of protein conjugates // *J. Bioact. Compat. Polym.* 1997. V. 12. P. 196–207.

18. Herman S., Hooftman G., Schacht E. Poly(ethylene glycol) with reactive endgroups: I. Modification of proteins // *J. Bioact. Compat. Polym.* 1995. V. 10. P. 145–186.

19. Knop K., Hoogenboom R., Fischer D., Schubert U.S. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2010. V. 49. P. 6288–6308.

20. Morpurgo M., Veronese F.M. Conjugates of peptides and proteins to polyethylene glycols / In: *Methods in Molecular Biology: Bioconjugation Protocols: Strategies and Methods* / Ed. C.M. Niemeyer. N.Y, Totowa: Humana Press Inc., 2004. V. 283. P. 45–70.

21. Kang J.S., Deluca P.P., Lee K.C. Emerging PEGylated drugs // *Expert Opin. Emerg. Drugs.* 2009. V. 14. P. 363–380.

22. Jevsevar S., Kunstelj M., Porekar V.G. PEGylation of therapeutic proteins // *Biotechnol. J.* 2010. V. 5. P. 113–128.

23. Milla P., Dosio F., Cattel L. PEGylation of proteins and liposomes: A powerful and flexible strategy to improve the drug delivery // *Curr. Drug Metab.* 2012. V. 13. P. 105–119.

24. Scholz M., Engel C., Apt D., Sankar S.L., Goldstein E., Loeffler M. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling of the novel human granulocyte colony-stimulating factor derivative Maxy-G34 and pegfilgrastim in rats // *Cell Prolif.* 2009. V. 42. P. 823–837.

25. Ljung R., Karim F.A., Saxena K., Suzuki T. [et al.]. 40K glycoPEGylated, recombinant FVIIa: 3-month, double-blind, randomized trial of safety, pharmacokinetics, and preliminary efficacy in hemophilia patients with inhibitors // *J. Thromb. Haemost.* 2013. V. 11. P. 1260–1268.

26. Tiede A., Brand B., Fischer R., Kavakli K. [et al.]. Enhancing the pharmacokinetic properties of recombinant factor VIII: first-in-human trial of glycoPEGylated recombinant factor VIII in patients with hemophilia A // *J. Thromb. Haemost.* 2013. V. 11. P. 670–678.

27. Collins P.W., Møss J., Knobe K., Groth A., Colberg T., Watson E. Population pharmacokinetic modeling for dose setting of nonacog beta pegol (N9-GP), a glycoPEGylated recombinant factor IX // *J. Thromb. Haemost.* 2012. V. 10. P. 2305–2312.

28. Sarkissian C.N., Kang T.S., Gámez A., Scriver C.R., Stevens R.C. Evaluation of orally administered PEGylated phenylalanine ammonia lyase in mice for the treatment of phenylketonuria // *Mol. Genet. Metab.* 2011. V. 104. P. 249–254.

29. Jacobetz M.A., Chan D.S., Neesse A., Bapiro T.E., Cook N., Frese K.K., Feig C., Nakagawa T. [et al.]. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer // *Gut.* 2013. V. 62. P. 112–120.

30. Skerra A. Engineered protein scaffolds for molecular recognition // *J. Mol. Recognit.* 2000. V. 13. P. 167–187.

31. Gebauer M., Skerra A. Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009. V. 13. P. 245–255.

32. Ackermann M., Morse B.A., Delventhal V., Carvajal I.M., Konerding M.A. Anti-VEGFR2 and anti-IGF-1R-Adnectins inhibit Ewing's sarcoma A673-xenograft growth and normalize tumor vascular architecture // *Angiogenesis.* 2012. V. 15. P. 685–695.

33. Cong Y., Pawlisz E., Bryant P., Balan S., Laurine E., Tommasi R. [et al.]. Site-specific PEGylation at histidine tags // *Bioconjug. Chem.* 2012. V. 23. P. 248–263.

34. Schoonoghe S., Laoui D., Van Ginderachter J.A., Devoogdt N., Lahoutte T., De Baetselier P., Raes G. Novel applications of nanobodies for *in vivo* bio-imaging of inflamed tissues in inflammatory diseases and cancer // *Immunobiology.* 2012. V. 217. P. 1266–1272.

35. Huang L., Muyldermans S., Saerens D. Nanobodies<sup>®</sup>: Proficient tools in diagnostics // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2010. V. 10. P. 777–785.

36. Sadeqzadeh E., Rahbarizadeh F., Ahmadvand D., Rasaei M.J. [et al.]. Combined MUC1-specific nanobody-tagged PEG-polyethylenimine polyplex targeting and transcriptional targeting of tBid transgene for directed killing of MUC1 over-expressing tumour cells // *J. Control. Release.* 2011. V. 156. P. 85–91.

37. Vugmeyster Y., Entrican C.A., Joyce A.P., Lawrence-Henderson R.F. [et al.]. Pharmacokinetic, biodistribution, and biophysical profiles of TNF nanobodies conjugated to linear or branched poly(ethylene glycol) // *Bioconjug. Chem.* 2012. V. 23. P. 1452–1462.

38. Sabar M.F., Kausar S., Zafar A.U. PEG-interferon conjugates: Effects of length and structure of linker // *Pak. J. Pharm. Sci.* 2013. V. 26. P. 425–430.
39. Onoue S., Matsui T., Kato M., Mizumoto T., Liu B., Liu L. [et al.]. Chemical synthesis and formulation design of a PEGylated vasoactive intestinal peptide derivative with improved metabolic stability // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013. V. 49. P. 382–389.
40. Mezo A.R., Low S.C., Hoehn T., Palmieri H. PEGylation enhances the therapeutic potential of peptide antagonists of the neonatal Fc receptor, FcRn // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011. V. 21. P. 6332–6335.
41. Kunstelj M., Fidler K., Skrajnar S., Kenig M. [et al.]. Cysteine-specific PEGylation of rhG-CSF via selenylsulfide bond // *Bioconjug. Chem.* 2013. V. 24. P. 889–896.
42. da Silva Freitas D., Mero A., Pasut G. Chemical and enzymatic site specific PEGylation of hGH // *Bioconjug. Chem.* 2013. V. 24. P. 456–463.
43. Mattos A., de Jager-Krikken A., de Haan M., Beljaars L., Poelstra K. PEGylation of interleukin-10 improves the pharmacokinetic profile and enhances the antifibrotic effectivity in CCl<sub>4</sub>-induced fibrogenesis in mice // *J. Control. Release.* 2012. V. 162. P. 84–91.
44. Tsiourvas D., Sideratou Z., Sterioti N., Papadopoulos A., Nounesis G., Paleos C.M. Insulin complexes with PEGylated basic oligopeptides // *J. Colloid. Interface Sci.* 2012. V. 384. P. 61–72.
45. Lee L.S., Conover C., Shi C., Whitlow M., Filpula D. Prolonged circulating lives of single-chain Fv proteins conjugated with polyethylene glycol: A comparison of conjugation chemistries and compounds // *Bioconjug. Chem.* 1999. V. 10. P. 973–981.
46. Mohs A.M., Zong Y., Guo J., Parker D.L., Lu Z.R. PEG-g-poly(GdDTPA-co-L-cystine): Effect of PEG chain length on *in vivo* contrast enhancement in MRI // *Biomacromolecules.* 2005. V. 6. P. 2305–2311.
47. Kaminskis L.M., Boyd B.J., Karellas P., Krippner G.Y., Lessene R., Kelly B., Porter C.J. The impact of molecular weight and PEG chain length on the systemic pharmacokinetics of PEGylated poly L-lysine dendrimers // *Mol. Pharm.* 2008. V. 5. P. 449–463.
48. Pasut G., Veronese F.M. PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: An overview // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009. V. 61. P. 1177–1188.
49. Caliceti P., Veronese F.M. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003. V. 55. P. 1261–1277.
50. Nouredin M., Ghany M.G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of peginterferon and ribavirin: Implications for clinical efficacy in the treatment of chronic hepatitis C // *Gastroenterol. Clin. North Am.* 2010. V. 39. P. 649–658.
51. Harris J.M., Martin N.E., Modi M. Pegylation: A novel process for modifying pharmacokinetics // *Clin. Pharmacokinet.* 2001. V. 40. P. 539–551.
52. González-Valdez J., Rito-Palomares M., Benavides J. Advances and trends in the design, analysis, and characterization of polymer-protein conjugates for "PEGylated" bioprocesses // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 403. P. 2225–2235.
53. Nojima Y., Suzuki Y., Yoshida K., Abe F., Shiga T., Takeuchi T. [et al.]. Lactoferrin conjugated with 40-kDa branched poly(ethylene glycol) has an improved circulating half-life // *Pharm. Res.* 2009. V. 26. P. 2125–2132.
54. Veronese F.M., Mero A. The impact of PEGylation on biological therapies // *BioDrugs.* 2008. V. 22. P. 315–329.
55. Fee C.J. Size comparison between proteins PEGylated with branched and linear poly(ethylene glycol) molecules // *Biotechnol. Bioeng.* 2007. V. 98. P. 725–731.
56. Hamidi M., Azadi A., Rafiei P. Pharmacokinetic consequences of pegylation // *Drug Deliv.* 2006. V. 13. P. 399–409.
57. Gokarn Y.R., McLean M., Laue T.M. Effect of PEGylation on protein hydrodynamics // *Mol. Pharm.* 2012. V. 9. P. 762–773.
58. Gaberc-Porekar V., Zore I., Podobnik B., Menart V. Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins // *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2008. V. 11. P. 242–250.
59. Bailon P., Won C.Y. PEG-modified biopharmaceuticals // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2009. V. 6. P. 1–16.
60. Fee C.J., Van Alstine J.M. PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues // *Chem. Eng. Sci.* 2006. V. 61. P. 924–939.
61. Roberts M.J., Harris J.M. Attachment of degradable poly(ethylene glycol) to proteins has the potential to increase therapeutic efficacy // *J. Pharm. Sci.* 1998. V. 87. P. 1440–1445.
62. Fishburn C.S. The pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to generate novel therapeutics // *J. Pharm. Sci.* 2008. V. 97. P. 4167–4183.
63. Pasut G., Veronese F.M. PEGylation for improving the effectiveness of therapeutic biomolecules // *Drugs Today (Barc.)*. 2009. V. 45. P. 687–695.
64. Harris J.M., Chess R.B. Effect of pegylation on pharmaceuticals // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003. V. 2. P. 214–221.
65. Bailon P., Berthold W. Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins // *Pharm. Sci.*

Technol. Today. 1998. V. 1. P. 352–356.

66. Zhang C., Yang X.L., Yuan Y.H., Pu J., Liao F. Site-specific PEGylation of therapeutic proteins via optimization of both accessible reactive amino acid residues and PEG derivatives // *BioDrugs*. 2012. V. 26. P. 209–215.

67. Larson R.S., Menard V., Jacobs H., Kim S.W. Physicochemical characterization of poly(ethylene glycol)-modified anti-GAD antibodies // *Bioconjug. Chem.* 2001. V. 12. P. 861–869.

68. Bonora G.M., Drioli S. Reactive PEGs for protein conjugation // In: *PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications* / Ed. F.M. Veronese. Switzerland: Birkhäuser Verlag, 2009. P. 33–45.

69. Hooftman G., Herman S., Schacht E. Poly(ethylene glycol)s with reactive endgroups. II. Practical consideration for the preparation of protein-PEG conjugates // *J. Bioact. Compat. Polym.* 1996. V. 11. P. 135–159.

70. Fee C.J., Van Alstine J.M. Purification of pegylated proteins // *Methods Biochem. Anal.* 2011. V. 54. P. 339–362.

71. Hershfield M.S., Chaffee S., Koro-Johnson L., Mary A., Smith A.A., Short S.A. Use of site-directed mutagenesis to enhance the epitope-shielding effect of covalent modification of proteins with polyethylene glycol // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 7185–7189.

72. Wylie D.C., Voloch M., Lee S., Liu Y.H., Cannon-Carlson S., Cutler C. [et al.]. Carboxy-alkylated histidine is a pH-dependent product of pegylation with SC-PEG // *Pharm. Res.* 2001. V. 18. P. 1354–1360.

73. Lee J.I., Eisenberg S.P., Rosendahl M.S., Chlipala E.A., Brown J.D. [et al.]. Site-specific PEGylation enhances the pharmacokinetic properties and antitumor activity of interferon Beta-1b // *J. Interferon Cytokine Res.* 2013. V. 33. P. 769–777.

74. Pasut G., Veronese F.M. State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research // *J. Control. Release*. 2012. V. 161. P. 461–472.

75. Bell S.J., Fam C.M., Chlipala E.A., Carlson S.J., Lee J.I. [et al.]. Enhanced circulating half-life and antitumor activity of a site-specific pegylated interferon-alpha protein therapeutic // *Bioconjug. Chem.* 2008. V. 19. P. 299–305.

76. Gaertner H.F., Offord R.E. Site-specific attachment of functionalized poly(ethylene glycol) to the amino terminus of proteins // *Bioconjug. Chem.* 1996. V. 7. P. 38–44.

77. Wu H., Li J., Zhang Q., Yan X., Guo L. [et al.]. A novel small Odorranalectin-bearing cubosomes: Preparation, brain delivery and pharmacodynamic study on amyloid- $\beta_{25-35}$ -treated rats following intranasal administration // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012. V. 80. P. 368–378.

78. Goodson R.J., Katre N.V. Site-directed pegylation of recombinant interleukin-2 at its glycosylation site // *Biotechnology*. 1990. V. 8. P. 343–346.

79. Woghiren C., Sharma B., Stein S. Protected thiol-polyethylene glycol: A new activated polymer for reversible protein modification // *Bioconjug. Chem.* 1993. V. 4. P. 314–318.

80. Pepinsky R.B., Shapiro R.I., Wang S., Chakraborty A. Long-acting forms of Sonic hedgehog with improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties are efficacious in a nerve injury model // *J. Pharm. Sci.* 2002. V. 91. P. 371–387.

81. Morpurgo M., Veronese F.M., Kachensky D., Harris J.M. Preparation and characterization of poly(ethylene glycol) vinyl sulfone // *Bioconjug. Chem.* 1996. V. 7. P. 363–368.

82. Balan S., Choi J.W., Godwin A., Teo I. [et al.]. Site-specific PEGylation of protein disulfide bonds using a three-carbon bridge // *Bioconjug. Chem.* 2007. V. 18. P. 61–76.

83. Brocchini S., Godwin A., Balan S. [et al.]. Disulfide bridge based PEGylation of proteins // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008. V. 60. P. 3–12.

84. Scaramuzza S., Tonon G., Olianias A., Messina I., Schrepfer R. [et al.]. A new site-specific monoPEGylated filgrastim derivative prepared by enzymatic conjugation: Production and physicochemical characterization // *J. Control. Release*. 2012. V. 164. P. 355–363.

85. Zhao X., Shaw A.C., Wang J., Chang C.C., Deng J., Su J. A novel high-throughput screening method for microbial transglutaminases with high specificity toward Gln141 of human growth hormone // *J. Biomol. Screen.* 2010. V. 15. P. 206–212.

86. Sato H., Yamamoto K., Hayashi E., Takahara Y. Transglutaminase-mediated dual and site-specific incorporation of poly(ethylene glycol) derivatives into a chimeric interleukin-2 // *Bioconjug. Chem.* 2000. V. 11. P. 502–509.

87. Wang Y.J., Liu Y.D., Chen J., Hao S.J., Hu T. et al. Efficient preparation and PEGylation of recombinant human non-glycosylated erythropoietin expressed as inclusion body in *E. coli* // *Int. J. Pharm.* 2010. V. 386. P. 156–164.

88. Orsatti L., Veronese F.M. An unusual coupling of poly(ethylene glycol) to tyrosine residues in epidermal growth factor // *Journal Bioact. Compat. Polym.* 1999. V. 14. P. 429–436.

89. Wang Y.S., Youngster S., Bausch J., Zhang R., McNemar C., Wyss D.F. Identification of the major positional isomer of pegylated interferon alpha-2b // *Biochemistry*. 2000. V. 39. P. 10634–10640.

90. Riordan J.F., Vallee B.L. *O*-Acetyl tyrosine // *Methods of Enzymology*. 1972. P. 500–506.

91. Zalipsky S., Menon-Rudolph S. Hydrazide derivatives of polyethylene glycols and their bioconjugates / In: Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications / Ed. J.M. Harris, S. Zalipsky. Washington: ACS, 1997. V. 680. P. 318–341.
92. Francis G.E., Fisher D., Delgado C., Malik F., Gardiner A., Neale D. PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: The importance of biological optimisation of coupling techniques // *Int. J. Hematol.* 1998. V. 68. P. 1–18.
93. Sakane T., Partridge W.M. Carboxyl-directed pegylation of brain-derived neurotrophic factor markedly reduces systemic clearance with minimal loss of biologic activity // *Pharm. Res.* 1997. V. 14. P. 1085–1091.
94. Wysocka M., Lesner A., Popow J., Legowska M., Rolka K. Pegylated fluorescent peptides as substrates of proteolytic enzymes // *Protein Pept. Lett.* 2012. V. 19. P. 1237–1244.
95. Veronese F.M. Peptide and protein PEGylation: A review of problems and solutions // *Biomaterials.* 2001. V. 22. P. 405–417.
96. Youn Y.S., Lee K.C. Site-specific PEGylation for high-yield preparation of Lys(21)-amine PEGylated growth hormone-releasing factor (GRF) (1-29) using a GRF(1-29) derivative Fmoc-protected at Tyr(1) and Lys(12) // *Bioconjug. Chem.* 2007. V. 18. P. 500–506.
97. Herold D.A., Keil K., Bruns D.E. Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase // *Biochem. Pharmacol.* 1989. V. 38. P. 73–76.
98. Kawai F. Microbial degradation of polyethers // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 58. P. 30–38.
99. Eliason J.F. Pegylated cytokines: Potential application in immunotherapy of cancer // *BioDrugs.* 2001. V. 15. P. 705–711.
100. Veronese F.M., Morpurgo M. Bioconjugation in pharmaceutical chemistry // *Il Farmaco.* 1999. V. 54. P. 497–516.
101. Giorgi M.E., Ratier L., Agusti R., Frasch A.C., de Lederkremer R.M. Improved bioavailability of inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: PEGylation of lactose analogs with multiarm polyethyleneglycol // *Glycobiology.* 2012. V. 22. P. 1363–1373.
102. Miyaji Y., Kasuya Y., Furuta Y., Kurihara A., Takahashi M. [et al.]. Novel comb-shaped PEG modification enhances the osteoclastic inhibitory effect and bone delivery of osteoprotegerin after intravenous administration in ovariectomized rats // *Pharm. Res.* 2012. V. 29. P. 3143–3155.
103. Ouchi M., Terashima T., Sawamoto M. Transition metal-catalyzed living radical polymerization: toward perfection in catalysis and precision polymer synthesis // *Chem. Rev.* 2009. V. 109. P. 4963–5050.
104. Filpula D., Zhao H. Releasable PEGylation of proteins with customized linkers // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008. V. 60. P. 29–49.
105. Zhao H., Yang K., Martinez A. [et al.]. Linear and branched bicin linkers for releasable PEGylation of macromolecules: Controlled release *in vivo* and *in vitro* from mono- and multi-PEGylated proteins // *Bioconjug. Chem.* 2006. V. 17. P. 341–351.
106. Lee S., Greenwald R.B., McGuire J., Yang K., Shi C. Drug delivery systems employing 1,6-elimination: Releasable poly(ethylene glycol) conjugates of proteins // *Bioconjug. Chem.* 2001. V. 12. P. 163–169.
107. Filpula D., Yang K., Basu A., Hassan R., Xiang L. [et al.]. Releasable PEGylation of mesothelin targeted immunotoxin SS1P achieves single dosage complete regression of a human carcinoma in mice // *Bioconjug. Chem.* 2007. V. 18. P. 773–784.
108. Zalipsky S., Qazen M., Walker J.A. 2nd, Mullah N. [et al.]. New detachable poly(ethylene glycol) conjugates: Cysteine-cleavable lipopolymers regenerating natural phospholipid, diacyl phosphatidylethanolamine // *Bioconjug. Chem.* 1999. V. 10. P. 703–707.
109. Greenwald R.B., Yang K., Zhao H., Conover C.D., Lee S., Filpula D. Controlled release of proteins from their poly(ethylene glycol) conjugates: Drug delivery systems employing 1,6-elimination // *Bioconjug. Chem.* 2003. V. 14. P. 395–403.
110. Greenwald R.B., Zhao H., Yang K., Reddy P., Martinez A. A new aliphatic amino prodrug system for the delivery of small molecules and proteins utilizing novel PEG derivatives // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47. P. 726–734.
111. Falchi A., Taddei M. PEG-dichlorotriazine (PEG-DCT): A new soluble polymer-supported scavenger for alcohols, thiols, phosphines, and phosphine oxides // *Org. Lett.* 2000. V. 2. P. 3429–3431.
112. Srichana T., Suwandecha T. Polyethylene glycol in clinical application and PEGylated drugs / In: *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development* / Ed. A.J. Domb, N. Kumar, A. Ezra. John Wiley & Sons, Inc., 2011. P. 451–493.
113. Ross E.A., Branham M.L., Tebbett I.R. High mass clearance of autoantibodies from a murine model of lupus nephritis by immunoadsorption using star-configured polyethylene glycols // *J. Biomed. Mater. Res.* 2001. V. 55. P. 114–120.
114. Hsu C.W., Olabisi R.M., Olmsted-Davis E.A., Davis A.R., West J.L. Cathepsin K-sensitive poly(ethylene glycol) hydrogels for degradation in response to bone resorption // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2011. V. 98. P. 53–62.
115. Zalipsky S., Seltzer R., Menon-Rudolph S. Evaluation of a new reagent for covalent attachment

- of polyethylene glycol to proteins // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1992. V. 15. P. 100–114.
116. Zhang G., Wang X., Wang Z., Zhang J., Suggs L. A PEGylated fibrin patch for mesenchymal stem cell delivery // *Tissue Eng.* 2006. V. 12. P. 9–19.
117. Woodward C.A., Kaufman E.N. Enzymatic catalysis in organic solvents: Polyethylene glycol modified hydrogenase retains sulfhydrogenase activity in toluene // *Biotechnol. Bioeng.* 1996. V. 52. P. 423–428.
118. Vasudev S.S., Ahmad S., Parveen R., Ahmad F.J. [et al]. Formulation of PEG-ylated *L*-asparaginase loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of pegylation on enzyme loading, activity and *in vitro* release // *Pharmazie.* 2011. V. 66. P. 956–960.
119. Abuchowski A., Vanes T., Palczuk N.C., Davis F.F. Alteration of immunological properties of bovine serum-albumin by covalent attachment of polyethylene-glycol // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. P. 3578–3581.
120. Abuchowski A., McCoy J.R., Palczuk N.C., van Es T., Davis F.F. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252. P. 3582–3586.
121. Roberts M.J., Bentley M.D., Harris J.M. Chemistry for peptide and protein PEGylation // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002. V. 54. P. 459–476.
122. Kaul G., Amiji M. Long-circulating poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery // *Pharm. Res.* 2002. V. 19. P. 1061–1067.
123. Bergström K., Holmberg K., Safranji A., Hoffman A.S. [et al.]. Reduction of fibrinogen adsorption on PEG-coated polystyrene surfaces // *J. Biomed. Mater. Res.* 1992. V. 26. P. 779–790.
124. Chen A., Kozak D., Battersby B.J., Forrest R.M. [et al.]. Antifouling surface layers for improved signal-to-noise of particle-based immunoassays // *Langmuir.* 2009. V. 25. P. 13510–13515.
125. Chamow S.M., Kogan T.P., Venuti M., Gadek T. Modification of CD4 immunoadhesin with monomethoxypoly(ethylene glycol) aldehyde via reductive alkylation // *Bioconjug. Chem.* 1994. V. 5. P. 133–140.
126. Kinstler O.B., Brems D.N., Lauren S.L., Paige A.G., Hamburger J.B., Treuheit M.J. Characterization and stability of *N*-terminally PEGylated rhG-CSF // *Pharm. Res.* 1996. V. 13. P. 996–1002.
127. Abello N., Kerstjens H.A., Postma D.S., Bischoff R. Selective acylation of primary amines in peptides and proteins // *J. Proteome Res.* 2007. V. 6. P. 4770–4776.
128. Abuchowski A., Kazo G.M., Verhoest C.R.Jr., Van Es T. [et al.]. Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates // *Cancer Biochem. Biophys.* 1984. V. 7. P. 175–186.
129. Santos L.F., Iglesias A.H., Gozzo F.C. Fragmentation features of intermolecular cross-linked peptides using *N*-hydroxy- succinimide esters by MALDI- and ESI-MS/MS for use in structural proteomics // *J. Mass Spectrom.* 2011. V. 46. P. 742–750.
130. Zimmermann J.L., Nicolaus T., Neuert G., Blank K. Thiol-based, site-specific and covalent immobilization of biomolecules for single-molecule experiments // *Nat. Protoc.* 2010. V. 5. P. 975–985.
131. Schlapak R., Pammer P., Armitage D., Zhu R. [et al.]. Glass surfaces grafted with high-density poly(ethylene glycol) as substrates for DNA oligonucleotide microarrays // *Langmuir.* 2006. V. 22. P. 277–285.
132. Nathan A., Zalipsky S., Ertel S.I., Agathos S.N. [et al.]. Copolymers of lysine and polyethylene glycol: a new family of functionalized drug carriers // *Bioconjug. Chem.* 1993. V. 4. P. 54–62.
133. Zavareh S., Samandari G. Polyethylene glycol as an epoxy modifier with extremely high toughening effect: Formation of nanoblend morphology // *Polymer Engineering & Science.* 2013. (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pen.23733/abstract>).
134. Geoghegan K.F. Modification of amino groups / In: *Current Protocols in Protein Science.* 2001. Chapter 15. Unit 15.2. (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps1502s04/abstract>).
135. Ikegawa S., Kinoshita J., Shimizu M., Tohma M. Radioimmunological characterization of anti lithocholic acid antisera elicited by [C-6] carboxylic acid *N*-succinimidyl esters as haptenic derivatives // *Yakugaku Zasshi: J. Pharmaceut. Soc. Japan.* 1989. V. 109. P. 306–311.
136. Kinstler O., Molineux G., Treuheit M., Ladd D. [et al]. Mono-*N*-terminal poly(ethylene glycol)-protein conjugates // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002. V. 54. P. 477–485.
137. Xu H., Kaar J.L., Russell A.J., Wagner W.R. Characterizing the modification of surface proteins with poly(ethylene glycol) to interrupt platelet adhesion // *Biomaterials.* 2006. V. 27. P. 3125–3135.
138. Harris J.M., Kozlowski A. Polyethylene glycol and related polymers monosubstituted with propionic or butanoic acids and functional derivatives thereof for biotechnical applications : US Patent. 1997. 5672662 A (<http://www.google.es/patents/US5672662>).
139. Sartore L., Caliceti P., Schiavon O., Veronese F.M. Enzyme modification by MPEG with an amino acid or peptide as spacer arms // *Appl. Biochem. & Biotechnol.* 1991. V. 27. P. 45–54.
140. Veronese F.M., Sacca B., De Laureto P.P., Sergi M., Caliceti P., Schiavon O. [et al.]. New PEGs for peptide and protein modification, suitable for identification of the PEGylation site // *Bioconjug. Chem.* 2001. V. 12. P. 62–70.
141. Veronese F.M., Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery // *Drug Discov. Today.* 2005. V. 10. P. 1451–1458.

142. Bentley M.D., Roberts M.J., Harris J.M. Reductive amination using poly(ethylene glycol) acetaldehyde hydrate generated *in situ*: Applications to chitosan and lysozyme // *J. Pharm. Sci.* 1998. V. 87. P. 1446–1449.
143. Bentley M.D., Harris J.M., Kozlowski A. Heterobifunctional poly(ethylene glycol) derivatives and methods for their preparation :1999. US Patent. US 6448369 B1. PCT US99/23536. (<http://www.google.com/patents/US6448369>).
144. Ryan S.M., Mantovani G., Wang X., Haddleton D.M. [et al.]. Advances in PEGylation of important biotech molecules: Delivery aspects // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2008. V. 5. P. 371–383.
145. Veronese F.M., Mero A., Caboi F., Sergi M. [et al.]. Site-specific pegylation of G-CSF by reversible denaturation // *Bioconjug. Chem.* 2007. V. 18. P. 1824–1830.
146. Doherty D.H., Rosendahl M.S., Smith D.J., Hughes J.M. [et al.]. Site-specific PEGylation of engineered cysteine analogues of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *Bioconjug. Chem.* 2005. V. 16. P. 1291–1298.
147. Rosendahl M.S., Doherty D.H., Smith D.J., Carlson S.J. [et al.]. A long-acting, highly potent interferon alpha-2 conjugate created using site-specific PEGylation // *Bioconjug. Chem.* 2005. V. 16. P. 200–207.
148. Pasut G., Guiotto A., Veronese F.M. Protein, peptide and non-peptide drug PEGylation for therapeutic application // *Expert Opin. Ther. Pat.* 2004. V. 14. P. 859–894.
149. Shaunak S., Godwin A., Choi J.W., Balan S. [et al.]. Site-specific PEGylation of native disulfide bonds in therapeutic proteins // *Nat. Chem. Biol.* 2006. V. 2. P. 312–313.
150. Li X.Q., Lei J.D., Su Z.G. [et al.]. Comparison of bioactivities of monopegylated rhG-CSF with branched and linear mPEG // *Proc. Biochem.* 2007. V. 42. P. 1625–1631.
151. Monfardini C., Schiavon O., Caliceti P., Morpurgo M., Harris J.M., Veronese F.M. A branched monomethoxypoly(ethylene glycol) for protein modification // *Bioconjug. Chem.* 1995. V. 6. P. 62–69.
152. Kamigaito M., Ando T., Sawamoto M. Metal-catalyzed living radical polymerization // *Chem. Rev.* 2001. V. 101. P. 3689–3746.
153. Lecolley F., Tao L., Mantovani G., Durkin I. A new approach to bioconjugates for proteins and peptides («pegylation») utilising living radical polymerization // *Chem. Commun. (Camb.)*. 2004. V. 18. P. 2026–2027.
154. Jones M.W., Strickland R.A., Schumacher F.F., Caddick S. [et al.]. Polymeric dibromomaleimides as extremely efficient disulfide bridging bioconjugation and pegylation agents // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. P. 1847–1852.
155. Fan X., Lin L., Messersmith P.B. Cell fouling resistance of polymer brushes grafted from ti substrates by surface-initiated polymerization: Effect of ethylene glycol side chain length // *Biomacromolecules*. 2006. V. 7. P. 2443–2448.
156. Mantovani G., Lecolley F., Tao L. [et al.]. Design and synthesis of *N*-maleimido-functionalized hydrophilic polymers via copper-mediated living radical polymerization: A suitable alternative to PEGylation chemistry // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 2966–2973.
157. Asayama S., Nogawa M., Takei Y., Akaike T., Maruyama A. Synthesis of novel polyampholyte comb-type copolymers consisting of a poly(L-lysine) backbone and hyaluronic acid side chains for a DNA carrier // *Bioconjug. Chem.* 1998. V. 9. P. 476–481.
158. Miyaji Y., Kasuya Y., Furuta Y., Kurihara A. Novel comb-shaped PEG modification enhances the osteoclastic inhibitory effect and bone delivery of osteoprotegerin after intravenous administration in ovariectomized rats // *Pharm. Res.* 2012. V. 29. P. 3143–3155.
159. Ryan S.M., Wang X., Mantovani G., Sayers C.T. Conjugation of salmon calcitonin to a combed-shaped end functionalized poly(poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate) yields a bioactive stable conjugate // *J. Control. Release.* 2009. V. 135. P. 51–59.
160. Da Pieve C., Blackshaw E., Missailidis S., Perkins A.C. PEGylation and biodistribution of an anti-MUC1 aptamer in MCF-7 tumor-bearing mice // *Bioconjug. Chem.* 2012. V. 23. P. 1377–1381.
161. Boomer R.M., Lewis S.D., Healy J.M., Kurz M. Conjugation to polyethylene glycol polymer promotes aptamer biodistribution to healthy and inflamed tissues // *Oligonucleotides*. 2005. V. 15. P. 183–195.
162. Setijadi E., Tao L., Liu J., Jia Z. Biodegradable star polymers functionalized with beta-cyclodextrin inclusion complexes // *Biomacromolecules*. 2009. V. 10. P. 2699–2707.
163. Santi D.V., Schneider E.L., Reid R., Robinson L., Ashley G.W. Predictable and tunable half-life extension of therapeutic agents by controlled chemical release from macromolecular conjugates // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. P. 6211–6216.
164. Asayama S., Maruyama A., Cho C.S., Akaike T. Design of comb-type polyamine copolymers for a novel pH-sensitive DNA carrier // *Bioconjug. Chem.* 1997. V. 8. P. 833–838.
165. Srividhya M., Preethi S., Gnanamani A., Reddy B.S. Sustained release of protein from poly(ethylene glycol) incorporated amphiphilic comb like polymers // *Int. J. Pharm.* 2006. V. 326. P. 119–127.
166. Heredia K.L., Bontempo D., Ly T., Byers J.T. [et al.]. *In situ* preparation of protein-«smart» polymer conjugates with retention of bioactivity // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 16955–16960.
167. Bontempo D., Maynard H.D. Streptavidin as a macroinitiator for polymerization: *In situ* protein-

polymer conjugate formation // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 6508–6509.

168. Le Droumaguet B., Mantovani G., Haddleton D.M., Velonia K. Formation of giant amphiphiles by post-functionalization of hydrophilic protein–polymer conjugates // *J. Mater. Chem.* 2007. V. 17. P. 1916–1922.

169. Booth C., Gaspar H.B. Pegademase bovine (PEG-ADA) for the treatment of infants and children with severe combined immunodeficiency (SCID) // *Biologics.* 2009. V. 3. P. 349–358.

170. Dinndorf P.A., Gootenberg J., Cohen M.H., Keegan P., Pazdur R. FDA drug approval summary: Pegaspargase (oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) // *Oncologist.* 2007. V. 12. P. 991–998.

171. Foster G.R. Pegylated interferons: Chemical and clinical differences (Review article) // *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2004. V. 20. P. 825–830.

172. Foser S., Schacher A., Weyer K.A., Brugger D. Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon alpha-2a (PEGASYS) // *Protein Expr. Purif.* 2003. V. 30. P. 78–87.

173. Thankamony G.N., Dunger D.B., Acerini C.L. Pegvisomant: Current and potential novel therapeutic applications // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2009. V. 9. P. 1553–1563.

174. McGahan L. Continuous erythropoietin receptor activator (Mircera) for renal anemia // *Issues Emerg. Health Technol.* 2008. V. 113. P. 1–6.

175. Jevševar S., Kusterle M., Kenig M. PEGylation of antibody fragments for half-life extension // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 901. P. 233–246.

176. Khalili H., Godwin A., Choi J.W., Lever R., Brocchini S. Comparative binding of disulfide-bridged PEG-Fabs // *Bioconj. Chem.* 2012. V. 23. P. 2262–2277.

177. Rader C. Overview on concepts and applications of Fab antibody fragments // *Current Protocols in Protein Science.* 2009. Chapter 6. Unit 6.9. (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps0609s55/abstract>).

178. Deeks E.D. Certolizumab pegol: A review of its use in the management of rheumatoid arthritis // *Drugs.* 2013. V. 73. P. 75–97.

179. Humphreys D.P., Heywood S.P., Henry A., Ait-Lhadj L. [et al.]. Alternative antibody Fab' fragment PEGylation strategies: Combination of strong reducing agents, disruption of the interchain disulphide bond and disulphide engineering // *Protein Eng. Des. Sel.* 2007. V. 20. P. 227–234.

180. Top A., Roberts C.J., Kiick K.L. Conformational and aggregation properties of a PEGylated alanine-rich polypeptide // *Biomacromolecules.* 2011. V. 12. P. 2184–2192.

181. Terpe K. Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. V. 60. P. 523–533.

182. Deiters A., Cropp T.A., Summerer D., Mukherji M., Schultz P.G. Site-specific PEGylation of proteins containing unnatural amino acids // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004. V. 14. P. 5743–5745.

183. Nestor J.J. Jr. The medicinal chemistry of peptides // *Curr. Med. Chem.* 2009. V. 16. P. 4399–4418.

184. Deiters A., Schultz P.G. *In vivo* incorporation of an alkyne into proteins in *Escherichia coli* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005. V. 15. P. 1521–1524.

185. Cho H., Daniel T., Buechler Y.J., Litzinger D.C., Maio Z. Optimized clinical performance of growth hormone with an expanded genetic code // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 9060–9065.

186. Fares F., Guy R., Bar-Ilan A., Felikman Y., Fima E. Designing a long-acting human growth hormone (hGH) by fusing the carboxyl-terminal peptide of human chorionic gonadotropin beta-subunit to the coding sequence of hGH // *Endocrinology.* 2010. V. 151. P. 4410–4417.

187. Sato H. Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002. V. 54. P. 487–504.

188. Fontana A., Spolaore B., Mero A., Veronese F.M. Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008. V. 60. P. 13–28.

189. DeFrees S., Wang Z.G., Xing R., Scott A.E., Wang J. GlycoPEGylation of recombinant therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* // *Glycobiology.* 2006. V. 16. P. 833–843.

190. Schjoldager K.T., Clausen H. Site-specific protein O-glycosylation modulates proprotein processing – deciphering specific functions of the large polypeptide GalNAc-transferase gene family // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1820. P. 2079–2094.

191. Yu C.C., Kuo Y.Y., Liang C.F., Chien W.T., Wu H.T. Site-specific immobilization of enzymes on magnetic nanoparticles and their use in organic synthesis // *Bioconj. Chem.* 2012. V. 23. P. 714–724.

192. Пучков И.А., Кононова Н.В., Бобрускин А.И., Баирамашвили Д.И., Мартьянов В.А., Шустер А.М. Рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Филграстим): Оптимизация условий конъюгирования с полиэтиленгликолем // *Биоорган. химия.* 2012. № 5. С. 545–554.

193. Yoshimoto N., Yamamoto S. PEGylated protein separations: Challenges and opportunities // *Biotechnol. J.* 2012. V. 7. P. 592–593.

194. Payne R.W., Murphy B.M., Manning M.C. Product development issues for PEGylated proteins // *Pharm. Dev. Technol.* 2011. V. 16. P. 423–440.

195. Busby T.F., Ingham K.C. Separation of macromolecules by ultrafiltration: Removal of

- poly(ethylene glycol) from human albumin // J. Biochem. Biophys. Methods. 1980. V. 2. P. 191–206.
196. Seely J.E., Richey C.W. Use of ion-exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography in the preparation and recovery of polyethylene glycol-linked proteins // J. Chromatogr. A. 2001. V. 908. P. 235–241.
197. Пучков И.А., Баирамашвили Д.И., Мягких И.В., Швец В.И. Пэгилированный рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор пролонгированного действия: новая схема получения активной фармацевтической субстанции // Биотехнология. 2014. № 2. С. 31–62.
198. Morstyn G., Dexter T.M., Foote M. Filgrastim (r-metHuGCSF) In Clinical Practice. Second Edition. N.Y., Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, 1998. 696 p.
199. Tanaka H., Satake-Ishikawa R., Ishikawa M., Matsuki S., Asano K. Pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor conjugated to polyethylene glycol in rats // Cancer Res. 1991. V. 51. P. 3710–3714.
200. Allen R.C. *Ex vivo* half-life of neutrophils from healthy human subjects pre and post treatment with daily filgrastim or single-dose pegfilgrastim // Blood. 2002. V. 100. P. 243.
201. Molineux G., Kinstler O., Briddell B., Hartley C. [et al.]. A new form of Filgrastim with sustained duration *in vivo* and enhanced ability to mobilize PBPC in both mice and humans // Exp. Hematol. 1999. V. 27. P. 1724–1734.
202. Johnston E., Crawford J., Blackwell S., Bjurstrom T., Lockbaum P., Roskos L. [et al.]. Randomized, dose-escalation study of SD/01 compared with daily filgrastim in patients receiving chemotherapy // J. Clin. Oncol. 2000. V. 18. P. 2522–2528.
203. Holmes F.A., O'Shaughnessy J.A., Vukelja S., Jones S.E. [et al.]. Blinded, randomized, multicenter study to evaluate single administration pegfilgrastim *once per cycle* versus daily filgrastim as an adjunct to chemotherapy in patients with high-risk stage II or stage III/IV breast cancer // J. Clin. Oncol. 2002. V. 20. P. 727–731.
204. Green M., Koelbl H., Baselga J., Galid A. [et al.]. A randomized, double blind, phase 3 study evaluating fixeddose, *once-per-cycle* pegylated filgrastim (SD/01) vs. daily filgrastim to support chemotherapy for breast cancer // Ann. Oncol. 2003. V. 14. P. 29–35.
205. Lyman G.H., Kuderer N., Greene J., Balducci L. The economics of febrile neutropenia: Implications for the use of colony-stimulating factors // Eur. J. Cancer. 1998. V. 34. P. 1857–1864.
206. Vose J.M., Crump M., Lazarus H., Emmanouilides C., Schenkein D., Moore J. [et al.]. Single dose pegfilgrastim (SD/01) is as effective as daily filgrastim following ESHAP chemotherapy for subjects with non-Hodgkin's lymphoma of Hodgkin's disease: Results of a randomized, open-label study // Blood. 2001. V. 98. P. 799.
207. Morstyn G., Foote M., Walker T., Molineux G. Filgrastim (rmetHuG-CSF) in the 21st century: SD/01 // Acta Haematol. 2001. V. 105. P. 151–155.

## PEGYLATION, AS METHOD OF PRODUCTION PROLONGED FORMS OF BIOPHARMACEUTICAL DRUGS (PEGYLATED GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR AS CASE OF STUDY)

I.A. Puchkov<sup>1,2,\*</sup>, D.I. Bairamashvili<sup>3</sup>, V.I. Shvets<sup>1</sup>

<sup>1</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, 119571 Russia

<sup>2</sup> Russian Pharmaceutical Company «Masterclone», Moscow, 119019 Russia

<sup>3</sup> Test Biotechnological Production of the Genetically Engineered Preparations of M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, 117997 Russia

\* Corresponding author e-mail: poutchkov@mail.ru

By now the pegylation of biologically active molecules including proteins with an inert hydrophilic polymer polyethylene glycol (PEG) is an important area in the new generation of prolonged-action pharmaceutical preparations. The conjugated molecules usually have an improved pharmacokinetic profile, including reduced renal clearance, additional protection from the proteolytic enzymes and reduced immunogenicity, thus preserving the *in vivo* activity of the native preparation in the human body for a longer time. This review is focused on the example of the pegylation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and gives the opportunity to have a look at different ways of pegylation and the mechanism of this reaction. Besides, the review describes the different types of reactive PEG for the specific conjugation to biological molecules and benefits and disadvantages of these reagents.

**Keywords:** polyethylene glycol (PEG), biopharmaceutical drugs, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), modification, cytokines, pharmacokinetic profile.