



## РЕКОМБИНАНТНЫЙ ГРАНУЛОЦИТАРНЫЙ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИЙ ФАКТОР (ФИЛГРАСТИМ): ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КОНЬЮГИРОВАНИЯ С ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ

© 2012 г. И. А. Пучков\*<sup>#</sup>, Н. В. Кононова\*, А. И. Бобрускин\*, Д. И. Баирамашвили\*\*<sup>#</sup>, В. А. Мартьянов\*, А. М. Шустер\*

\*Российская фармацевтическая компания ЗАО "Мастерклон" 119019 Москва, ул. Ленинка, 3, стр. 11

\*\*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ИБХ РАН)

Поступила в редакцию 31.01.2012 г. Принята к печати 26.04.2012 г.

В целях создания активной фармацевтической субстанции препарата с пролонгированным действием проведена модификация рекомбинантного человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора GCSF (филграстима) полиэтиленгликолем (PEG,  $M 21.5$  кДа). Описан метод получения PEG-производного филграстима, предназначенный для разработки и масштабирования технологического процесса производства. Модификацию белка с помощью PEG осуществляли посредством селективного ковалентного присоединения молекулы  $\alpha$ -метил-PEG-пропиональдегида к  $\alpha$ -аминогруппе  $N$ -концевого аминокислотного остатка метионина рекомбинантного GCSF. Подобраны условия реакции, которые обеспечивают выход целевого продукта не менее 85% от общего белка, высокую концентрацию белка в реакционной смеси (более 9 мг/мл) и позволяют снизить расход PEG в пересчете на концевую  $\alpha$ -аминогруппу белка. Данные ОФ ВЭЖХ и MALDI-масс-спектрометрии свидетельствуют о том, что полученный препарат модифицирован PEG по  $N$ -концевому остатку и содержит не более 10% продуктов с более высокой степенью модификации.

*Ключевые слова:* полиэтиленгликоль (PEG), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (GCSF), филграстим, модификация, масс-спектрометрия ESI-TOF.

### ВВЕДЕНИЕ

Человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор — гемопозитический фактор роста (GCSF), влияющий на состояние системы кроветворения, образование функционально активных нейтрофилов и их выход в кровь из костного мозга. Лекарственные препараты на основе его рекомбинантного аналога GCSF (филграстима) [1] успешно применяются при лечении врожденной нейтропении и в онкологической практике после химиотерапии при миелосупрессиях разной степени [2].

Необходимость в ежедневном введении GCSF в течение длительного периода лечения привела к созданию за рубежом препарата нового поколения с пролонгированным действием, представляющего собой модифицированный GCSF активированным производным PEG с мол. массой 21.5 кДа [3]. Такой препарат характеризуется замедленной аб-

сорбцией, сниженным клиренсом и более продолжительным периодом полувыведения по сравнению с его немодифицированным предшественником. К тому же он отличается меньшей иммуногенностью и токсичностью [4].

Связывание PEG с белками может осуществляться по разным функциональным группам полипептидной цепи, имеющим в своем составе атомы с неспаренными электронами. Наиболее часто присоединение происходит за счет образования ковалентной связи между карбонильным углеродом моноальдегид-производного PEG и  $\alpha$ -аминогруппой  $N$ -концевого аминокислотного остатка, а также  $\epsilon$ -аминогруппой лизина и имидазольной группой гистидина. В результате такой реакции (часто называемой "пэгилированием" белка) образуется PEG-модифицированная молекула белка с принципиально новыми физико-химическими свойствами, обладающая высокой гидрофильностью и устойчивостью к протеолизу [5].

Отсутствие избирательности в присоединении представляет серьезную проблему при разработке методов получения PEG-производных белков, поскольку изменение структуры природной мо-

Сокращения: PEG — полиэтиленгликоль; GCSF — рекомбинантный человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; PEG-GCSF — пэгилированный GCSF.

<sup>#</sup> Автор для связи (тел./факс: +7 (495) 741-78-20; эл. почта: poutchkov@mail.ru).

лекулы может непредсказуемо влиять на ее биологические свойства и повлечь за собой возникновение новых побочных эффектов [6]. Фармакокинетические и фармакодинамические свойства PEG-модифицированных белков зависят не только от специфичности центров связывания, но и от массы и структуры модифицирующей молекулы. В основном, более длинные цепи PEG обуславливают большую продолжительность полужизни конъюгата “PEG-белок” в организме, а также его фармакологическую стабильность. Разветвленная молекула PEG замедляет метаболизм препарата, что влечет за собой увеличение времени его активной циркуляции. С разветвленной структурой цепочек связана также и значительно меньшая иммуногенность модифицированных препаратов при сохранении ими основных фармакологических свойств. Подобные эффекты также могут быть достигнуты конъюгацией белка, например, не с одной, а с несколькими линейными молекулами PEG [7–9].

Природный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор — это гликопротеин с молекулярной массой 19.6 кДа, состоящий из 174 а.о. Его рекомбинантный аналог — GCSF, полученный с помощью прокариотической системы, в отличие от природного белка, негликозилирован в положении Thr<sup>133</sup> и содержит в своей структуре на *N*-конце дополнительный аминокислотный остаток метионина [10–11].

Кроме присоединения PEG по  $\alpha$ -аминогруппе *N*-концевого остатка, в результате которого образуется модификация с заданным фармакологическим профилем, возможно также присоединение по Lys<sup>41</sup>, что отрицательно сказывается на активности конечного препарата [12]. При pH 5.0–6.0 с использованием монометил-ПЭГ-пропиональдегида в качестве акцептора происходит селективное присоединение к свободной  $\alpha$ -аминогруппе *N*-концевого аминокислотного остатка GCSF [13], при котором сохраняется до 70% от исходной биологической активности белка [9].

В связи с возрастающей потребностью в пролонгированном препарате целью настоящего исследования явилась разработка условий стадии конъюгации PEG с GCSF для создания промышленной технологии получения отечественного аналога активной фармацевтической субстанции нового поколения — пэгилированного GCSF.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

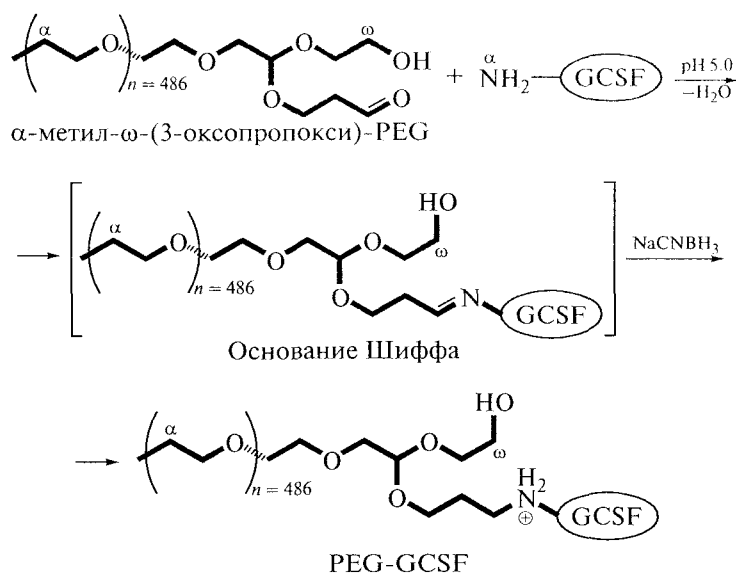
Получение пэгилированных лекарственных препаратов — достаточно сложная задача. Основную проблему представляет выбор таких условий конъюгирования, которые обеспечивали бы при

последующем масштабировании высокий выход целевого продукта, сохранение биологической активности исходного препарата и минимизацию побочных эффектов при использовании в медицинской практике. Несмотря на то, что в литературе уже описано множество различных способов присоединения PEG к белкам [3, 6, 14–16], для разработки промышленных технологий получения PEG-модифицированных белковых препаратов необходимо более детальное исследование этого процесса. Для *N*-концевого пэгилирования обычно используют производные PEG-пропиональдегидов — линейные, модифицированные молекулы PEG, содержащие нереакционноспособные  $\alpha$ -группировки и одну карбонильную группу, через которую и происходит присоединение к имеющему в своем составе аминогруппы белку [12, 17].

Реакцию пэгилирования GCSF проводили методом восстановительного алкилирования, в условиях, обеспечивающих селективную модификацию  $\alpha$ -аминогруппы *N*-концевого остатка метионина (схема) [13]. В качестве восстанавливающего агента использовали цианборгидрид натрия. Присоединение линейного PEG в ходе реакции алкилирования сопровождается сохранением неспаренных электронов на аминогруппе *N*-концевого остатка с возможностью ее ионизации при кислых значениях pH, в результате чего предотвращается образование агрегатов и инактивация белка [13, 18, 19].

В данной реакции PEG выступает как конъюгационный партнер, увеличивающий гидродинамический объем молекулы белка. Такие свойства модифицирующего агента обуславливаются тем, что высокое содержание атомов водорода в молекуле PEG позволяет ей связываться с молекулами воды, являющимися диполями. Подобный эффект влечет за собой организацию водного окружения конъюгата PEG–белок, за счет чего значительно увеличивается его гидродинамический радиус. Гидратирование модифицированной молекулы белка, с одной стороны, значительно повышает растворимость и биодоступность препарата, а с другой — защищает молекулу от действия других белков (нейтрализующие антитела, комплемент) [20].

Для проведения реакции использовали активную фармацевтическую субстанцию GCSF–филграстим, полученную по оригинальной методике [21], а в качестве модифицирующего агента применяли метил-PEG-пропиональдегид с мол. массой 21.5 кДа.



**Схема.** Реакция модификации полипептидной цепи GCSF по  $\alpha$ -аминогруппе *N*-концевого остатка метионина методом восстановительного алкилирования.

В первоначальных экспериментах для селективной модификации белка по  $\alpha$ -аминогруппе использовали условия работ [4, 13]: 18 ч, 4°C, 0.1 М фосфатный буферный раствор (рН 5.0), 80-кратный избыток цианборгидрида натрия и 5-кратный избыток PEG при концентрации белка 5 мг/мл в общем объеме реакционной смеси 10 мл. Для оценки эффективности методики было проведено 5-, 10- и 50-кратное масштабирование процесса, что соответствовало 50, 100 и 500 мл реакционной смеси. Количество образовавшегося конъюгата PEG-GCSF для каждой точки масштабирования определяли методом ОФ ВЭЖХ. Результаты этих экспериментов суммированы в табл. 1.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, масштабирование процесса в этих условиях привело к снижению выхода PEG-GCSF и к образованию в ходе реакции побочных продуктов. Поскольку уже на первой ступени масштабирования выход PEG-GCSF резко снижался (с 59.5 до

48.3%), то оптимизацию остальных параметров было решено проводить в объеме реакционной смеси равном 50 мл.

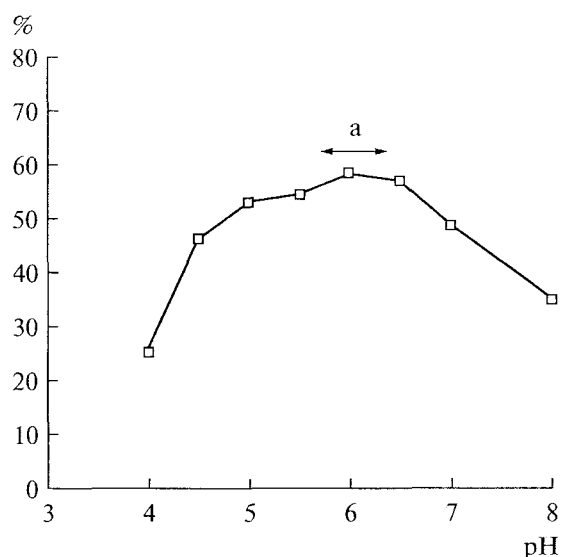
Был проведен ряд экспериментов по подбору факторов, влияющих на ход реакции пэггилирования GCSF: рН в области 4.0–8.0, состав буферной системы, исходные концентрации белка, PEG и цианборгидрида натрия. Для поддержания значений рН реакционной смеси от 4.0 до 5.5 использовали 50 мМ NaCH<sub>3</sub>COO, рН 6.0–5 мМ Na<sub>3</sub>-цитрат, рН 6.5–20 мМ Na<sub>2</sub>-фосфат, рН 7.0–20 мМ Трис, рН 8.0–20 мМ HEPES. За исключением величины значения рН, реакцию проводили в условиях, аналогичных первоначальному масштабированию процесса. На рис. 1 показано влияние рН среды на выход PEG-GCSF. Как следует из этих данных, наиболее полному протеканию реакции с выходом целевого белка около 58% соответствует диапазон значений рН 5.8–6.4, а не значение 5.0, как описано в литературе [13].

**Таблица 1.** Оценка масштабирования процесса модификации филграстима\*

$k^{\#}$	Объем реакц. смеси, мл	Количество филграстима, взятого для модификации, г	Выход конъюгата ПЭГ-филграстим, %	Непрореагировавший филграстим, %	Побочные продукты модификации, %
1×	10	0.050	59.5	38.1	2.4
5×	50	0.250	48.3	46.0	5.7
10×	100	0.500	38.8	51.8	9.4
50×	500	2.500	35.0	51.2	13.8

\* Условия реакции модификации филграстима: 18 ч при температуре 4°C в 0.1 М фосфатном буферном растворе (рН 5.0), 80-кратный избыток цианборгидрида натрия и 5-кратный избыток PEG при концентрации белка 5 мг/мл.

<sup>#</sup> Коэффициент масштабирования.



**Рис. 1.** Зависимость выхода PEG-GCSF от pH реакционной смеси; а — оптимальный диапазон pH для проведения реакции (5.8–6.4). Условия реакции модификации филграстима: 18 ч, 4°C, 80-кратный избыток цианборгидрида натрия и 5-кратный избыток PEG при концентрации белка 5 мг/мл.

Изучение влияния типа аниона буферной системы на выход PEG-GCSF выполняли в растворах, сохраняющих свою буферную емкость при pH 6.0. Реакцию проводили в течении 18 ч при температуре 4°C в присутствии 80-кратного избытка цианборгидрида натрия и 5-кратного избытка PEG при концентрации белка 5 мг/мл. Во всех экспериментах количество образовавшегося PEG-GCSF, немодифицированного GCSF и побочных продуктов при использовании в реакционной смеси каждого типа аниона определяли с помощью ОФ ВЭЖХ. Коэффициент эффективности протекания процесса ( $\alpha$ ) рассчитывали как отношение количества образовавшегося в ходе

**Таблица 2.** Влияние анионов на коэффициент эффективности ( $\alpha$ )\* реакции модификации филграстима полиэтиленгликолем

Буферная система	$\alpha$
50 мМ Na-ацетат	1.1
20 мМ Na <sub>2</sub> -фосфат	0.96
10 мМ Na <sub>2</sub> -малонат	1.06
20 мМ MES	1.21
5 мМ Na <sub>3</sub> -цитрат	1.45
20 мМ MOPS	0.7

Коэффициент эффективности протекания процесса модификации филграстима ( $\alpha$ ) — отношение количества образовавшегося в ходе реакции PEG-GCSF к общему количеству побочных продуктов и невступившего в реакцию филграстима.

реакции PEG-GCSF к общему количеству побочных продуктов и невступившего в реакцию GCSF (табл. 2). Как следует из представленных в табл. 2 данных, использование буферной системы, содержащей цитрат-ион, приводило к наибольшей эффективности процесса конъюгирования PEG с GCSF. Коэффициент эффективности реакции модификации GCSF ( $\alpha$ ) в этом случае составлял величину 1.45. Таким образом, было установлено, что эффективность протекания реакции пэгирования определяется не только свойствами белка, но и типом аниона буферной системы.

Подбор исходной оптимальной концентрации GCSF осуществляли в растворе 5 мМ цитрата натрия при значении pH 6.0. Исследовали диапазон значений концентрации GCSF от 1.0 до 20 мг/мл. Реакцию конъюгации проводили в объеме реакционной смеси 50 мл в течении 18 ч при температуре 4°C в присутствии 80-кратного избытка цианборгидрида натрия и 5-кратного избытка PEG. Полученные данные суммированы в табл. 3.

Из приведенных данных следовало, что увеличение исходной концентрации GCSF в растворе от 1 до 13 мг/мл обуславливало более высокий выход конечного продукта. При этом было выделено два диапазона исходных значений концентрации белка в растворе (табл. 3, строки I, II), в рамках каждого из которых выход PEG-GCSF оставался практически неизменным: от 5 до 8 мг/мл — диапазон I, и от 10 до 12 мг/мл — диапазон II. Реакция модификации с исходными концентрациями GCSF в диапазоне I имела коэффициент эффективности равный 1.41–1.45 и характеризовалась наименьшими потерями белка. Коэффициент эффективности реакции с использованием концентраций диапазона II был значительно выше (2.19–2.27) коэффициента эффективности диапазона I, однако при высоких исходных концентрациях взятого в реакцию GCSF из-за ограничения растворимости белка его потери увеличивались, а равновесие реакции начинало смещаться в сторону образования побочных продуктов.

Определение концентрации общего белка по завершении реакции показало, что степень преципитации его из раствора при 5-кратном избытке PEG и 80-кратном избытке цианборгидрида натрия повышается при концентрации GCSF > 9.0 мг/мл, а максимальная концентрация PEG-GCSF в данных условиях составляла 10–12 мг/мл. Скорее всего, это определяется механизмом взаимодействия PEG с белком, который заключается в стерическом исключении молекулы PEG из белковой зоны за счет отнятия воды полимером. Кроме того, на растворимость GCSF в реакционной смеси отрицательно сказывается избыточная концентрация модифицирующего агента [22–25]. Исходя из того, что эффективность реакции достигала своего максимального значения в диапазоне II, опти-

Таблица 3. Влияние исходной концентрации филграстима на выход модифицированного филграстима\*

Концентрация филграстима, мг/мл	Определяемый параметр после проведения реакции модификации					
	PEG-филграстим, %	Филграстим, %	Побочные продукты реакции, %	Концентрация общего белка, мг/мл	Потери белка, %	$\alpha$
1	6.63	92	—	1	—	—
3	36.5	63	0.5	2.95	1.7	0.57
I	5	58.8	3.0	4.88	2.5	1.43
	7	58.5	3.5	6.8	3	1.41
	8	59.2	37.3	7.66	4.3	1.45
	9	63.0	32.2	4.8	8.65	4.5
II	10	69.0	8.0	9.4	6	2.23
	11	68.7	23.3	9.79	11	2.19
	12	69.4	22	8.6	10.2	15
13	67.2	22.3	10.5	10.0	23	2.06
14	64.9	23.2	11.9	9.75	25	1.85
15	61.5	25.7	12.8	10.4	30.6	1.60
20	56.8	30.2	13.0	9.8	51	1.31

\* Условия реакции: в течение 18 ч при температуре 4°C в растворе 5 мМ цитрата натрия при значении pH 6.0 в присутствии 80-кратного избытка цианборгидрида натрия и 5-кратного избытка PEG в объеме реакционной смеси 50 мл.

Строки I, II – два диапазона исходных значений концентрации белка в растворе, в рамках каждого из которых выход PEG-GCSF оставался практически неизменным: от 5 до 8 мг/мл – диапазон I, и от 10 до 12 мг/мл – диапазон II.

Цветом выделены диапазоны (I и II) значений концентраций PEG-GCSF в растворе, а также диапазон концентрации общего белка, в котором был достигнут максимум возможно допустимых значений в данных условиях.

мальной концентрацией GCSF в реакции было принято значение 10 мг/мл.

Далее был проведен ряд опытов, в ходе которых варьировали концентрации метил-PEG-пропиональдегида и цианборгидрида натрия при сохранении неизменными времени реакции (18 ч) и объема реакционной смеси (50 мл), а также концентрации GCSF – 10 мг/мл. Реакцию проводили при температуре 4°C в 5 мМ цитрате натрия при pH 6.0. Исследовали следующие значения избытков цианборгидрида натрия 1×, 5×, 10×, 20×, 30×, 40×, 80× и PEG – 1×, 2×, 3×, 4×, 5×. На рис. 2 представлены полученные данные в виде трехмерной зависимости степени пэгилрования GCSF от концентрации цианборгидрида натрия и метил-PEG-пропиональдегида. Проведенные эксперименты показали, что при концентрации белка 10 мг/мл существуют молярные соотношения этих реагентов (NaCNBH<sub>3</sub> : PEG), при которых степень конъюгации GCSF с PEG достигает 90%. Это соотношение составило 20 : 3 и было принято в качестве оптимального для проведения данного процесса.

Анализ с помощью ОФ ВЭЖХ состава реакционной смеси, полученной в выбранных условиях (рис. 3), подтвердил правильность хода исследований. Так, масса пика 3, соответствующего времени выхода непрореагировавшего GCSF, со-

ставляла 5% от массы общего белка, а пика 2, соответствующего побочным продуктам, – 5–7%.

Повторное масштабирование процесса конъюгации GCSF с PEG проводили в буферной систе-

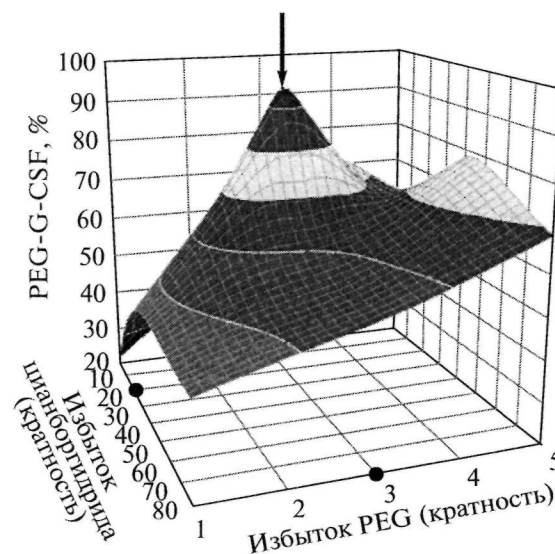


Рис. 2. Трехмерная диаграмма влияния концентрации компонентов реакции на степень модификации филграстима. Стрелкой указана область, в которой выход PEG-GCSF максимален.

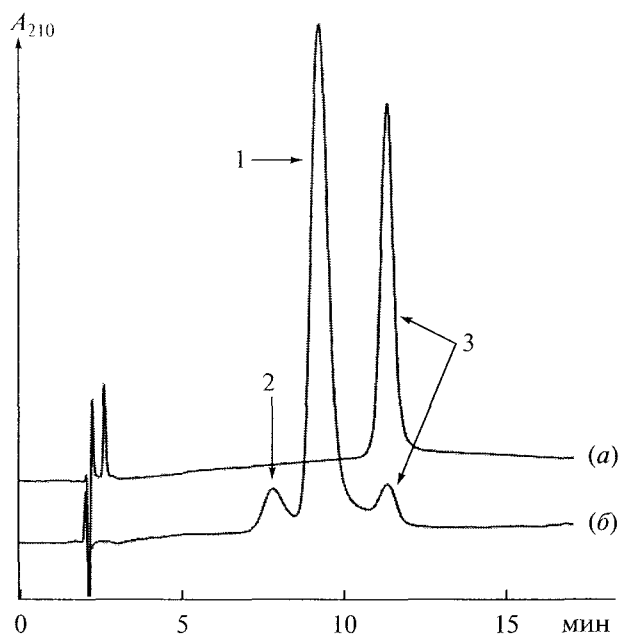


Рис. 3. ОФ ВЭЖХ-анализ ГСО “Филграстима” (а) и реакционной смеси, полученной после проведения реакции в оптимизированных условиях (б). Пик 2 — побочные продукты, получаемые в процессе реакции (5–7%); пик 3 — филграстим (5%, б); пик 1 — PEG-GCSF.

ме 5 мМ Na<sub>3</sub>-цитрат (рН 6.0) в присутствии 20-кратного избытка NaCNBH<sub>3</sub> и 3-кратного избытка PEG с исходной концентрацией белка 10 мг/мл. Результаты ОФ ВЭЖХ-анализа полученных реакционных смесей приведены в табл. 4. Как следует из данных, высокий выход конечного продукта реакции — конъюгата PEG-GCSF — сохранялся вплоть до 10-кратного увеличения исходного объема реакционной смеси (50-кратное масштабирование).

Для подтверждения селективности связывания PEG с  $\alpha$ -аминогруппой GCSF был осуществлен трипсинолиз очищенного конъюгата PEG-GCSF при соотношении фермент-субстрат 1 : 50 при рН 7.5 в течение 4 ч. Разделение полученного гидролизата проводили с помощью микроколоночной ОФ ВЭЖХ в системе, оснащенной время-пролетным масс-анализатором в режиме on-line. Для сравнения использовали гидролизат немодифицированного GCSF. В результате хроматографии гидролизат PEG-GCSF удалось разделить на 12 фракций. Кривые разделения пептидов на колонке показаны на рис. 4, а распределение соединений по фракциям и результаты их анализа методом ESI-TOFLC/МС — в табл. 5.

Как видно из этой таблицы, пептиды из двух гидролизатов с одинаковой структурой были идентифицированы во фракциях 1–7, 9, 11–13 и 1а–7а, 9а, 11а–13а, соответственно. Пептиды, находящиеся в составе этих фракций, имели близкие времена удерживания на колонке и по значениям  $[M + H]^+$  соответствовали немодифицированным участкам полипептидной цепи молекулы GCSF (табл. 5).

Однако величины  $m/z$  для двух компонентов каждого из гидролизатов (фракции 5 и 5а, 6 и 6а) 1491.78 и 1619.84 Да, соответственно, не были сопоставимы ни с одним из рассчитанных значений ожидаемых масс триптических пептидов. Так как молекула GCSF содержит в своей структуре одну свободную сульфгидрильную группу цистеина в положении Cys<sup>18</sup> [10], а фрагмент Cys<sup>18</sup>–Arg<sup>23</sup> с мол. массой 746.38 Да не был обнаружен в гидролизатах ни GCSF, ни его конъюгата с PEG, было сделано предположение, что пептиды 5 и 5а, 6 и 6а образуются в результате окисления остатка Cys<sup>18</sup> в процессе трипсинолиза и являются дисульфидными производными фрагмента Cys<sup>18</sup>–Arg<sup>23</sup>. Для подтверждения этого предположения оба компо-

Таблица 4. Оценка масштабирования процесса модификации филграстима в оптимизированных условиях\*

Начальные условия реакции		Определяемые параметры после проведения реакции							
		ВЫХОД						Потери белка	
Объем реакц. смеси, мл	Белок, г	PEG-филграстим		Филграстим		Побочные продукты			
		%	г	%	г	%	г		
50	0.5	90	0.38	5	0.021	5	0.021	0.075	15
100	1.0		0.77		0.043		0.043	0.15	
500	5.0	87	3.7	8	0.34		0.21	0.75	

\* Условия реакции: в течение 18 ч при температуре 4°C в буферной системе 5 мМ Na<sub>3</sub>-цитрат (рН 6.0) в присутствии 20-кратного избытка NaCNBH<sub>3</sub> и 3-кратного избытка PEG с исходной концентрацией белка 10 мг/мл.

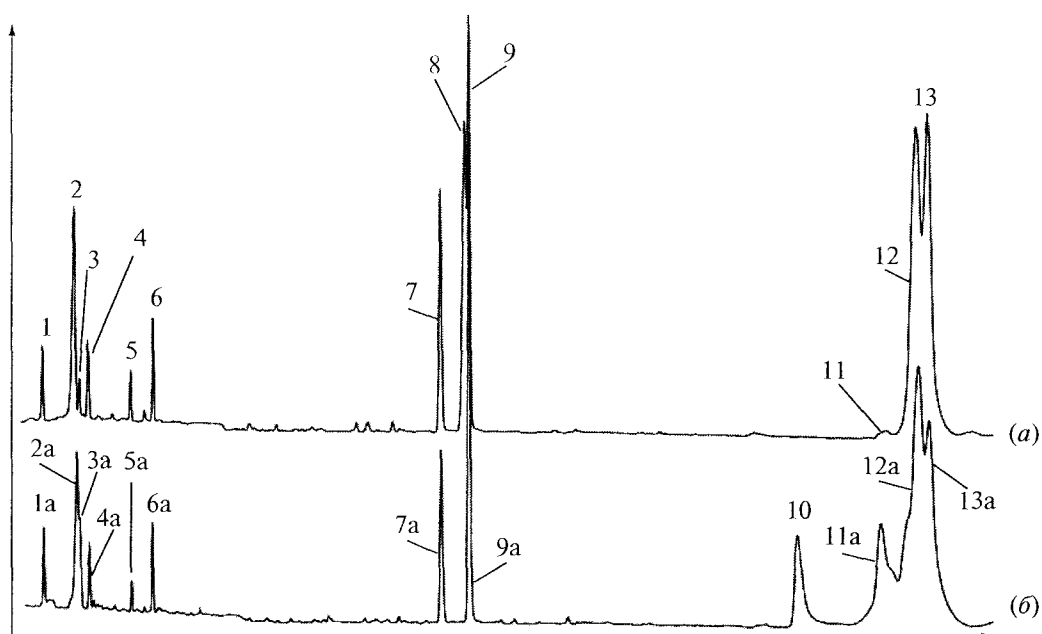


Рис. 4. ESI-TOF LC/MS-анализ триптических гидролизатов – GCSF (а) и PEG-GCSF (б).

нента из фракций 5 и 6 гидролизата GCSF были выделены в препаративном количестве и модифицированы 4-винилпиридином. Полученные таким образом алкилированные производные фрагментов 5 и 6 дополнительно очищали и ана-

лизировали методом тандемной масс-спектрометрии. Величина  $m/z$  алкилированного продукта фракции 5 составляла значение 852.5 Да и точно соответствовала мол. массе винилпиридилированного фрагмента Cys<sup>18</sup>–Arg<sup>23</sup>, а 6 – 980.65 Да и

Таблица 5. Сравнительный анализ триптических пептидов GCSF и PEG-GCSF

Номера пиков на кривых разделения пептидов (шифр пептидов), рис. 5а, б	Структура и местоположение пептидов в аминокислотной последовательности цепи белка*	$m/z$ , Да [ $M + H^+$ ]	$M_{расч}$ , Да
1, 1а	Val <sup>168</sup> –Arg <sup>170</sup>	387.3	386.27
2, 2а	His <sup>171</sup> –Pro <sup>175</sup>	565.31	564.31
3, 3а	Ile <sup>25</sup> –Lys <sup>35</sup>	1129.59	1128.59
4, 4а	Lys <sup>24</sup> –Lys <sup>35</sup>	1256.68	1256.68
5, 5а	$\begin{array}{c} \text{S} - \text{S} \\   \quad   \\ \text{Agr}^{23} - \text{Cys}^{18} - \text{Cys}^{18} - \text{Lys}^{24} \end{array}$	1619.84	1618.87
6, 6а	$\begin{array}{c} \text{S} - \text{S} \\   \quad   \\ \text{Agr}^{23} - \text{Cys}^{18} - \text{Cys}^{18} - \text{Agr}^{23} \end{array}$	1491.78	1490.76
7, 7а	Arg <sup>148</sup> –Arg <sup>167</sup>	2190.2	2189.19
8	Met <sup>1</sup> –Lys <sup>17</sup>	1786.89	1785.9
9, 9а	Ala <sup>149</sup> –Arg <sup>167</sup>	2033.00	2032.08
10	PEG–Met <sup>1</sup> –Lys <sup>17</sup>	23311.5	23311.0
11, 11а	Met <sup>1</sup> –Pro <sup>175</sup>	18786.3	18785
12, 12а	Leu <sup>42</sup> –Arg <sup>147</sup>	11288.8	11288.8
13, 13а	Leu <sup>36</sup> –Arg <sup>147</sup>	11967.0	11967.0

\* Данные работы [27].

соответствовала мол. массе Cys<sup>18</sup>–Lys<sup>24</sup>. Таким образом, полученные данные позволили подтвердить предположение, что при образовании конъюгата PEG-GCSF остаток Cys<sup>18</sup> не затрагивается.

Уникальными для состава гидролизатов GCSF и PEG-GCSF оказались фракции 8 и 10. Поскольку различие мол. масс фрагментов 8 (гидролизат GCSF, пептид Met<sup>1</sup>–Lys<sup>17</sup>) и 10 (гидролизат PEG-GCSF) составляло 21524.6 Да и соответствовало мол. массе метил-PEG-пропиональдегида, был сделан вывод, что присоединение PEG к GCSF происходит по *N*-концевому фрагменту цепи GCSF. Поскольку других фрагментов GCSF, содержащих PEG, в составе продуктов, образующихся при трипсинолизе конъюгата PEG-GCSF, не обнаружено, и ранее было показано, что в буферной смеси при pH 5.0 модификации подвергается только  $\alpha$ -аминогруппа [13], то можно было сделать вывод, что в использованных условиях синтеза *моно-метил*-PEG-пропиональдегид присоединяется только по *N*-концевому остатку Met полипептидной цепи GCSF.

В результате проведенной работы были подобраны условия селективной модификации GCSF с помощью PEG по *N*-концевому остатку метионина полипептидной цепи белка с выходом целевого продукта не менее 85% от общего белка, взятого в реакцию. Установлено, что селективность реакции пэгилирования белков определяется не только свойствами белка, но и типом аниона буферной системы и соотношением взятых в реакцию восстановителя и PEG. Показано, что проведение реакции при концентрации GCSF более 5 мг/мл и менее чем 5-кратном избытке PEG позволит сделать процедуру получения нового препарата PEG-GCSF с пролонгированным действием технологически и экономически выгодной.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали рекомбинантный филграстим ГСО (субстанция “Филграстим”, ФК ЗАО “Мастерклон”, 0.3 мг/мл). Для концентрирования и разделения белка и пептидов использовали колонки SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Швеция), Tricorn 5/50 (GE Healthcare, Швеция); аналитические колонки: YMC-Pack C<sub>8</sub> 300 Å, 4.6 × 250 мм (YMC Co., Ltd., Япония), Symmetry C<sub>4</sub> 300 Å, 4.6 × 250 мм (Waters, США), Jupiter C<sub>4</sub> 300 Å, 10 × 250 мм; Luna C<sub>18</sub>(2) 100 Å, 4.6 × 250 мм (Phenomenex, США), Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 90 Å, 4.6 × 150 мм (Agilent, США), колонки NAP-5 Sephadex G-25 (GE Healthcare, Швеция). При проведении реакции модификации использовали  $\alpha$ -метил- $\omega$ -(3-оксипропокси)полиоксиэтилен (метил-PEG-пропиональдегид) (Shearwater Polymers Hantsville, AB), гидроксид натрия, ледяную уксусную кислоту, соляную кислоту, хлорид натрия,

цитрат натрия, Трис-HCl (RPS Panreas, Испания), цианборгидрид натрия, ацетат натрия, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, малонат натрия, HEPES, MOPS (Sigma-Aldrich, США), MES (Roth, Германия). Все растворы готовили на воде, полученной на установке Milli-Q (Millipore, США).

Очистку и разделение проводили на полупрепаративном хроматографе ÄKTA Purifier (GE Healthcare, Швеция), а ОФ ВЭЖХ-анализ – на аналитическом хроматографе Alliance, управляемом программным обеспечением Empower 2 версии 6.10.01.00 (Waters, США). Также использовали микроколоночную ОФ ВЭЖХ-систему Agilent 1200, оснащенную времяпролетным (ESI-TOF)-масс-анализатором серии Agilent 6224, MALDI-TOF-масс-спектрометр Bruker Autoflex II (Bruker Daltonics Inc., Германия), программу для обработки данных масс-спектрометрического анализа GPMW (General Protein/Mass Analysis for Windows) версии 10.0 (Protein Research Group at the University of Southern Denmark, Дания).

**Концентрирование филграстима** из субстанции “Филграстим” выполняли при комнатной температуре методом ионообменной хроматографии на колонке Tricorn 5/50, заполненной SP-Sepharose FF, объемом 1 мл. Раствор препарата в концентрации 0.3 мг/мл наносили на колонку (95% от динамической емкости сорбента), уравновешенную 20 мМ буферным раствором. После нанесения и промывки элюирование белка проводили буферным раствором, содержащим 0.3 М NaCl. Концентрация белка в элюате, определенная с помощью ОФ ВЭЖХ, составляла 35–40 мг/мл. Необходимая концентрация белка в экспериментах по масштабированию достигалась последовательным разведением полученного раствора.

**Концентрацию белка** определяли с помощью метода ОФ ВЭЖХ на обращенно-фазовой колонке Symmetry 300 C<sub>4</sub> (4.6 × 250 мм) (Waters, США) в буферной системе, которая состояла из элюента А, содержащего 0.1% TFA в H<sub>2</sub>O, и элюента В, содержащего 20% ацетонитрила в 1-пропанол с 0.1% TFA. Линейный градиент задавали от 40 до 50% элюента В, скорость потока составляла 1 мл/мин, температура 35°C, длина волны 210 нм. В качестве стандарта GCSF использовали препарат ГСО с известной концентрацией.

**Модификация филграстима.** В охлажденный до 4°C раствор белка добавляли необходимые объемы свежеприготовленных растворов метил-PEG-пропиональдегида и цианборгидрида натрия с исходной концентрацией 100 и 20 мМ, соответственно. Реакцию выполняли при постоянном перемешивании в течении 18 ч при 4°C, после чего в реакционную смесь добавляли TFA до конечной концентрации 0.1%. Выход модифицированного GCSF контролировали методом ОФ ВЭЖХ.



**Конъюгат PEG-GCSF** выделяли на обращенно-фазовой колонке Jupiter C<sub>4</sub> 300 Å, 10 × 250 мм (Phenomenex, США). Использовали систему буферных растворов, состоящих из элюента А, содержащего 0.1% TFA в H<sub>2</sub>O, и элюента В, содержащего 20% ацетонитрила в 1-пропанол с 0.1% TFA. Очистку белка проводили в градиентном режиме от 35 до 55% элюента В, скорость потока составляла 2 мл/мин, температура 35°C, длина волны 220 нм. Сбор основной фракции осуществляли в максимуме хроматографического пика, соответствующего выходу PEG-GCSF.

**Пептидное картирование.** Концентрированный GCSF и очищенный PEG-GCSF обессоливали на одноразовых колонках NAP-5 с использованием в качестве элюента 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. К 1 мл раствора белка с концентрацией 1 мг/мл прибавляли 50 мкл 0.1% раствора трипсина. Гидролиз проводили при температуре 37°C в течение 4 ч и оставляли добавлением 50 мкл 1% раствора TFA.

**ESI-TOF LC/MS-анализ триптических гидролизатов** осуществляли в режиме on-line на микроколоночной ОФ ВЭЖХ-системе Agilent 1200, оснащенной времяпролетным (ESI-TOF) масс-анализатором серии Agilent 6224. Анализ выполняли на микроколоночке YMC C<sub>8</sub> 300 Å, 4.6 × 250 мм. Подвижная фаза: А – 0.1% TFA; Б – 70% ацетонитрил в 0.1% TFA; градиент: 10–100% В за 17 мин; скорость потока: 0.25 мл/мин, температура 40°C; длина волны 220 нм.

**Наработку и алкилирование пептидов 5 и 6** производили на обращенно-фазовой колонке Luna C<sub>18</sub>(2) 100 Å, 4.6 × 250 мм. Подвижная фаза: А – 0.1% TFA; Б – 90% ацетонитрил в 0.1% TFA; градиент: 10–25% В за 15 мин, 25–50% В за 40 мин, 50–80% В за 10 мин; скорость потока 1 мл/мин, температура 30°C; длина волны 214 нм. Собирали фракцию пептида 5 с 12.6–12.8 мин и фракцию пептида 6 с 13.8–14.1 мин.

Алкилирование осуществляли в соответствии с методикой [26], для чего 30–50 мг пептида растворяли под азотом в 2–3 мл Трис-НСI-буферного раствора (рН 7.5), содержащего 8 М мочевины, добавляли 4-винилпиридин (20-кратный избыток) и инкубировали при перемешивании в течение 2–3 ч. Затем реакционную смесь подкисляли ледяной уксусной кислотой до рН 3.0, диализовали против 0.01 М уксусной кислоты и лиофилизовали.

**Выделение и очистку винилпиридилированных пептидов для масс-спектрометрического анализа** осуществляли с помощью ОФ ВЭЖХ на обращенно-фазовой колонке Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 90 Å, 4.6 × 150 мм (Agilent, США): раствор лиофилизованных пептидов в 0.1% TFA (подвижная фаза А) наносили на колонку и хроматографировали в линейном градиенте фазы В (ацетонитрил, содержащий 0.09% TFA, в фазе А (0 → 40%, 40 мин) при

скорости потока 1 мл/мин, контроль при длине волны 214 нм. Для масс-спектрометрического анализа собирали пептид в максимуме оптического поглощения.

**MS- и MS/MS-спектры** алкилированных пептидов регистрировали на MALDI-TOF-масс-спектрометре Bruker Autoflex II (Bruker Daltonics Inc., Германия). Обработку результатов проводили с помощью программы для обработки данных масс-спектрометрического анализа GPMW (General Protein/Mass Analysis for Windows) версии 10.0 (Protein Research Group at the University of Southern Denmark).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают особую благодарность сотрудникам ИБХ РАН Р.С. Есипову и Р.Х. Зиганшину за техническую помощь в проведении экспериментальных работ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wingfield P., Benedict R., Turcatti G., Allet B., Mermod J., DeLamarter J., Simona M.G., Rose K. // *The Biochemical J.* 1988. V. 256. P. 213–218.
2. Welte K., Gabrilove J., Bronchud M.H., Platzer E., Morstyn G. // *Blood.* 1996. V. 88. P. 1907–1929.
3. Kinstler O., Molineux G., Treuheit M., Ladd D., Gegg C. // *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2002. V. 54. P. 477–485.
4. Molineux G. // *Current Pharmaceutical Design.* 2004. V. 10. P. 1235–1244.
5. Maullu C., Raimondo D., Caboi F., Giorgetti A., Sergi M., Valentini M., Tonon G., Tramontano A. // *FEBS J.* 2009. V. 276. P. 6741–6750.
6. Jevsevar S., Kunstelj M., Gaberc-Porekar V. // *Biotechnology J.* 2010. V. 5. P. 113–128.
7. Gaberc-Porekar V., Zore I., Podobnik B., Menart V. // *Current Opinion in Drug Discovery & Development.* 2008. V. 11. P. 242–250.
8. Bailon P., Won C.Y. // *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2009. V. 6. P. 1–16.
9. Kang J.S., Deluca P.P., Lee K.C. // *Expert Opinion on Emerging Drugs.* 2009. V. 14. P. 363–380.
10. Kubota N., Orita T., Hattori K. // *J. Biochem.* 1990. V. 107. P. 486–492.
11. Lu H.S., Boone T.C., Souza L.M., Lai P.H. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1989. V. 268. P. 81–92.
12. Piedmonte D.M., Treuheit M. // *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2008. V. 60. P. 50–58.
13. Kinstler O.B., Brems D.N., Lauren S.L., Paige A.G., Hamburger J.B., Treuheit M.J. // *Pharmaceutical Research.* 1996. V. 13. P. 996–1002.
14. Morpurgo M., Veronese F.M. // *Bioconjugation Protocols. Strategies and Methods / Humana Press Inc.,* 2004. P. 45–71.
15. Fee C.J., Van Alstine J.M. // *Chemical Engineering Science.* 2006. V. 61. P. 924–939.

16. Baker D.P., Lin E.Y., Lin K., Pellegrini M. et al. // Bioconjugate Chemistry. 2006. V. 17. P. 179–188.
17. Salmaso S., Bersani S., Scomparin A., Mastrotto F., Scherpf R., Tonon G., Caliceti P. // Bioconjugate Chemistry. 2009. V. 20. P. 1179–1185.
18. Roberts M.J., Bentley M.D., Harris J.M. // Advanced Drug Delivery Reviews. 2002. V. 54. P. 459–476.
19. Gaertner H.F., Offord R.E. // Bioconjugate Chemistry. 1996. V. 7. P. 38–44.
20. Pasut G., Guiotto A., Veronese F.M. // Expert Opinion on Therapeutic Patents. 2004. V. 14. P. 859–894.
21. Кононова Н.В., Бобрускин А.И., Костромина Т.И., Мелихова Т.Д., Вайнсон А.А., Свешикова Е.В., Зинченко А.А., Демин А.В., Мартыанов В.А., Шустер А.М., Баирамашвили Д.И. // Биотехнология. 2009. № 5. С. 24–32.
22. Annunziata O., Asherie N., Lomakin A., Pande J., Ogun O., Benedek G.B. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002. V. 99. P. 14165–14170.
23. Bhat R., Timasheff S.N. // Protein Science. V. 1. P. 1133–1143.
24. Atha D.H., Ingham K.C. // The J. of Biological Chemistry. 1981. V. 256. P. 12108–12117.
25. Johansen A.S., Steensgaard J., Jacobsen C. // Immunology. 1980. V. 41. P. 695–704.
26. Дарбре А. Практическая химия белка: Пер. с англ. М.: Мир, 1989 (Darbre A. Practical Protein Chemistry. A Handbook. Chichester; New York; Brisbane; Toronto; Singapore: Department of Biochemistry King's College London. A Wiley–Interscience Publication. John Wiley & Sons).
27. Kubota N., Orita T., Hattori K., Oh-eda M., Ochi N., Yamazaki T. // J. Biochem. 1990. V. 107. P. 486–492.

## Recombinant Granulocyte-Colony Stimulating Factor (Filgrastim): Optimization of Conjugation with Polyethylene Glycol

I. A. Puchkov\*, #, N. V. Kononova\*, A. I. Bobruskin\*, D. I. Bairamashvili\*\*,  
V. A. Martyanov\*, and A. M. Shuster\*

# Phone/fax: +7 (495) 741-78-20; e-mail: poutchkov@mail.ru

\* Russian Pharmaceutical Company "Masterclone", Lenivka str. 3/11, Moscow, 119019 Russia

\*\* Institute of Bioorganic Chemistry of acad. Shemyakin and Ovchinnikov of the Russian Academy of Sciences, Mikluho-Maklaya str. 16/10, Moscow, 117997 Russia

In order to create an active pharmaceutical substance of the drug with prolonged action the modification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor GCSF (filgrastim) with polyethylene glycol (PEG, M 21.5 kDa) was conducted. A method for preparation of PEG–filgrastim designed for the development and scaling-up of the technological process of production was described. Modification of proteins with PEG was performed by selective covalent attachment of the molecule  $\alpha$ -methyl-PEG-propionaldehyde to the  $\alpha$ -amino group of the N-terminal methionine amino acid residue of the recombinant GCSF. The conditions of the reaction, which provide the desired product yield at least 85% of the total protein, also high protein concentration in the reaction mixture (more than 9 mg/mL) and reduce consumption of PEG in terms of terminal  $\alpha$ -amino group of the protein was chosen. The data of RP HPLC and MALDI-mass spectrometry showed that the produced drug modified by the N-terminal residue and contains no more than 10% of products with a high degree of modification.

*Keywords:* polyethylene glycol (PEG), granulocyte colony-stimulating factor (GCSF), filgrastim, modification, ESI-TOF mass-spectrometry.