

Pregled druge generacije bioloških zdravil s poudarkom na PEGilaciji

Review of second-generation biopharmaceuticals with emphasis on PEGylation

Tina Maver, Tatjana Milunović, Vladka Gaberc Porekar

Povzetek: V zadnjih nekaj letih se je povečalo število bioloških zdravil druge generacije, ki jih dobimo z različnimi načini spreminjanja proteinov: s spremembo aminokislinskega zaporedja, s sklopitvijo dveh proteinov ali s postprodukcijami modifikacijami, kot je kovalentna povezava proteinov s polimeri (PEGilacija, HESilacija, polysialilacija). Trenutno je glavni pristop za povečanje učinkovitosti in izboljšavo fizikalno-kemijskih lastnosti bioterapevtikov PEGilacija in v 20 letih se je na tržišču zvrstilo več PEGiliranih proteinov, ki potrjujejo varnost in učinkovitost tega pristopa. V članku smo se osredotočili na PEGilacijo in podali prednosti, zaradi katerih so PEGilirani bioterapevtiki tako zelo uspešna zdravila.

Ključne besede: druga generacija terapevtskih proteinov; PEGilacija; PEGilacijski reagenti; PEGilirani proteini; HESilacija

Abstract: In recent years an increasing number of modern biopharmaceuticals called second-generation biopharmaceuticals were engineered. Engineering can entail changes in the amino acid sequence, protein-protein fusion or post-production modifications such as conjugation with polymers (PEGylation, HESylation, polysialylation). PEGylation has become the most widely used post-production modification methodology for improving biomedical efficacy and physicochemical properties of therapeutic proteins. Several PEGylated products have been on the market for some time, confirming their efficacy and safety. In this review we focus on PEGylation and PEGylated biopharmaceuticals and try to explain why four of eight approved PEGylated biopharmaceuticals are blockbuster drugs.

Keywords: second-generation biopharmaceuticals; PEGylation; PEG reagents; PEGylated proteins; HESylation

1 Uvod

Odkar so leta 1982 odobrili uporabo rekombinantnega inzulina, so raziskovalci različnih strok dokazali učinkovitost in varnost številnih drugih produktov biotehnologije za zdravljenje mnogih bolezni.

Molekule biotehnološkega izvora lahko razdelimo na dve generaciji, in sicer glede na to, ali so jih kemijsko spremenili (druga generacija) ali ne (prva generacija). Tako v prvo generacijo sodijo preprosti proteini, ki posnemajo telesu lastne proteine, ter protitelesa (1). Za terapevtske proteine prve generacije (kot tudi za proteine na splošno) je značilno, da so relativno slabo stabilni in občutljivi na dejavnike v okolju (temperatura, pH, strižne sile, prisotnost proteaz), nimajo dolgih časov zadrževanja v krvnem obtoku, lahko izkazujejo večjo imunogenost in ne dajejo visokih izkoristkov pri rekombinantnem izražanju (Preglednica 1) (2).

Druga generacija terapevtskih proteinov ima veliko boljše in za terapijo primernejše lastnosti. Njihova struktura je običajno kemijsko nekoliko spremenjena, kar ima za posledico manj pogosto dajanje na manj stresen način, s tem pa so pacientu prijaznejši. Postopki, ki so v rabi pri

drugi generaciji terapevtskih proteinov, so predvsem spremembe nukleotidnega zaporedja v genu, ki kodira izhodni protein, katerih rezultat je lahko sprememba ene ali več aminokislin, kar lahko pripelje do popolnoma drugačnih farmakokinetičnih in farmakodinamičnih lastnosti terapevtskega proteina in tako do drugačnega delovanja. V drugo generacijo štejemo tudi sklopitve dveh proteinov, uvedbo dodatnih posttranslacijskih modifikacij in različne sintezne (postprodukcijske) modifikacije.

Nedavni napredek na področju izdelave naprednih dostavnih sistemov, med katere štejemo liposome, nanodelce in druge, je omogočil tudi pripravo sistemov z nadzorovanim sproščanjem terapevtskih proteinov.

Kovalentne povezave proteinov s polimeri, še posebej PEGilacija (kovalentno pripetje polietilenglikolnih verig na protein), je trenutno glavni pristop za povečanje učinkovitosti bioterapevtikov. Zaradi PEGilacije se spremeni afiniteta oziroma vezava proteina na specifične receptorje, zato ima PEGilirani protein drugačno biološko aktivnost *in vitro* ter *in vivo*, spremenjeno hitrost in obseg absorpcije in biodistribucije ter spremenjen farmakokinetični in farmakodinamični profil.

Preglednica 1: Primerjava bioterapevtikov prve in druge generacije.

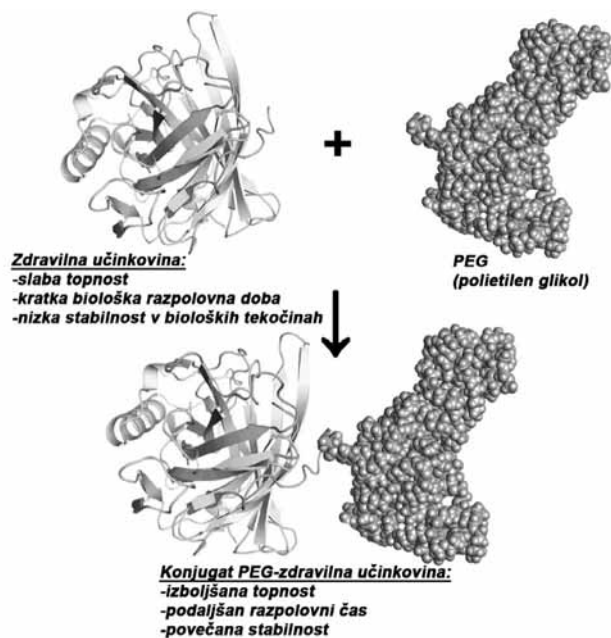
Table 1: Comparison of first- and second-generation biopharmaceuticals.

Prva generacija bioterapevtikov	Druga generacija bioterapevtikov
Relativno slaba stabilnost	Izboljšana stabilnost
Nizka topnost v vodi oziroma pufri	Izboljšana topnost
Kratek čas zadrževanja v krvnem obtoku	Podaljšan čas zadrževanja v krvnem obtoku
Občutljivi na proteolizo	Manj občutljivi oz. neobčutljivi na proteolizo
So lahko imunogeni	Izkazujejo lahko manjšo imunogenost
Slabi izkoristki pri rekombinantnem izražanju	Boljši izkoristki pri rekombinantnem izražanju

Zaradi kompleksne zgradbe proteinskih molekul je težje zagotoviti konstantnost zvitja proteina v pravilno strukturo in zato tudi število in mesta vezave molekul PEG velikokrat variira. Za uporabo v terapevtske namene so ustrezne le proteinske molekule, ki popolnoma ustrezajo načrtovanim (2).

2 PEGilacija

Začetki kovalentne modifikacije proteinskih molekul s polietilenglikolom (PEG), znane kot PEGilacija, segajo že v leto 1970, v zadnjih letih pa se je slednja uveljavila kot ena najbolj razširjenih in najuspešnejših metod za modifikacijo lastnosti bioloških zdravil. Shematski prikaz postopka PEGilacije je prikazan na sliki 1.

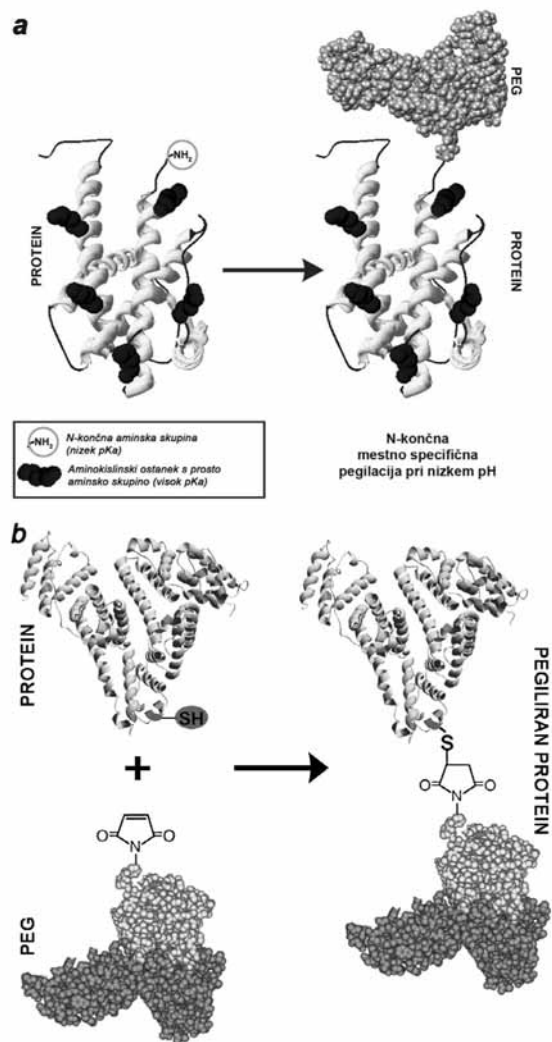


Slika 1: Shematski prikaz postopka PEGilacije.

Figure 1: Scheme of PEGylation.

Prednost tako modificiranega proteina so podaljšan razpolovni čas v serumu, zmanjšana imunogenost in občutljivost na proteolitično

razgradnjo ter povečani stabilnost in topnost. PEG lahko aktiviramo na različne načine, da dosežemo vezavo na specifične skupine na površini proteinskih molekul. V preteklosti so razvili številne reagente za naključno PEGilacijo, ki so ciljali predvsem na aminske skupine v stranski verigi lizina. Ker je lizin precej pogosta aminokislina, ki zajema okoli 10 % vseh aminokislin znotraj proteinov, je rezultat naključne PEGilacije pogosto heterogena mešanica različnih konjugatov. Različni aminokislinski ostanki v proteinih ne izkazujejo enake nukleofilnosti, zaradi česar lahko nekaj specifičnosti pri vezavi dosežemo z izvajanjem reakcije pri različnih vrednostih pH. Pri višjih vrednostih (pH 8 ali več) je PEGilacija najverjetnejša na aaminskih skupinah stranskih verig lizina. Pri nižjih vrednostih (pH 7.5 in manj) pa reakcija poteka tudi na N-končni aaminski skupini, z imidazolnimi dušiki histidinskih ostankov in celo s serinskimi, treoninskimi, tirozinskimi in cisteinskimi ostanki, kar je v skladu z njihovimi



Slika 2: Mestno specifična PEGilacija: a) mestno specifična PEGilacija na N-končnem delu, b) mestno specifična PEGilacija na tiolnih skupinah.

Figure 2: Site-specific PEGylation: a) N-terminal PEGylation, b) PEGylation of thiol groups.

nižjimi vrednostmi pK_a . Prav tako lahko s spreminjanjem posameznih parametrov med sintezo (temperatura, čas reakcije, količina dodanih reagentov,...) vplivamo na stopnjo PEGilacije (mono-, di-, tri- ali višje PEGilirani konjugati).

Jasno je, da je s stališča zahtev za terapevtsko uporabne spojine in regulatornih pravil zelo pomembno, da je rezultat PEGilacije samo en dobro definiran konjugat, kar omogočajo zgolj tako imenovane mestno specifične PEGilacije (Slika 2). Glavna prednost uporabe reakcij PEGilacije na specifičnem mestu je, da dobimo dobro definiran produkt, ki ga lažje ustrezno očistimo. Dobro znane so PEGilacije na N-končnih aminokislinah ter na tiolnih skupinah, če so te oddaljene od aktivnega mesta proteina (2).

2.1 PEG reagenti in njihove lastnosti

PEGilacija je trenutno najuporabnejša metoda biokonjugacije. Znano je, da mora biti idealen polimer, ki se uporablja v terapevtske namene, biorazgradljiv ali kako drugače odstranljiv iz telesa, saj se tako izognemo dolgoročni akumulaciji *in vivo*. Za polimere, ki so v rabi v reakcijah biokonjugacije, je tudi zaželeno, da imajo nizko stopnjo polidisperznosti (povezana je s širino porazdelitve molekulske mase) in da reagirajo samo s specifično funkcionalno skupino na proteinu.

Po številnih podatkih iz literature imajo PEG reagenti mnoge prednosti pred drugimi reagenti za modifikacijo, kot so polisaharidi (dekstrani, modificirani škrobi, sialična kislina idr.) ali maščobne kisline in njihovi derivati. Glavne med njimi so netoksičnost, neimunogenost, hidrofilnost ter nenabitost, veljajo pa tudi za nerazgradljive polimere in jih je že pred časom odobrila FDA ter jih splošno priznavajo za varne (3).

PEG sintetizirajo s polimerizacijsko reakcijo iz etilenoksida. Proizvajalci ponujajo na različne načine aktivirane PEG, ki omogočajo vezavo s specifičnimi funkcionalnimi skupinami na proteinih (2). Vezava PEG na terapevtski protein ponavadi spremeni njegove terapevtske lastnosti tako,

da se povečajo njegov čas zadrževanja *in vivo*, odpornost pred encimsko razgradnjo, topnost in stabilnost, zmanjša pa se imunogenost. Večino teh pridobitev lahko povežemo z zelo povečanim hidrodinamskim volumnom konjugata, kar je rezultat fleksibilnosti verige PEG in njene lastnosti, da lahko veže veliko količino vode (4). Verige PEG lahko zaradi svoje fleksibilne strukture na površini proteina valujejo (sterična stabilizacija), s čemer protein zasenčijo, zmanjšajo vpliv okolice na površino ter spremenijo njegove interakcijske lastnosti, odgovorne za biološko aktivnost.

2.2 Biodistribucija in farmakokineti ne lastnosti PEG-protein konjugatov

PEGilacija poveča čas zadrževanja proteina v telesu in v splošnem lahko rečemo, da čas eliminacije konjugata iz telesa narašča z dolžino verige PEG in z njeno razvejanostjo. Dolgi in še posebej razvejani PEG imajo lastnost, da ovirajo potovanje konjugata po telesu in prehajanje skozi biološke membrane.

Za proteine z molekulske maso, manjšo od 40 kDa, je ledvična filtracija glavna pot izločanja iz organizma, zaradi česar se ti proteini zelo kratek čas zadržujejo v krvnem obtoku. S konjugacijo s polietilenglikolom se ta čas bistveno podaljša, saj protein pridobi na velikosti in se v krvi zadrži tudi do desetkrat dlje. PEGiliran protein je zaščiten, zaradi česar se zmanjšajo encimska razgradnja, odstranjevanje s celicami retikuloendotelijskega sistema in prepoznavnost s strani imunskega sistema (2). Proteini z molekulskimi masami, večjimi od 70 kDa, in večina konjugatov PEG-protein se izločajo iz telesa preko drugih poti, kot so privzem v jetra, proteolitična razgradnja ali odstranjevanje s pomočjo imunskega sistema. Oblika in velikost konjugatov PEG-protein tudi določata, kako se bodo porazdeljevali in morebiti akumulirali v določenih delih telesa. Najpogosteje se konjugati PEG-protein nahajajo v organih, bogatih z retikuloendotelijskimi celicami, kot so jetra, vranica, limfni vozli, pljuča in tudi ledvice. Očistek iz teh organov je nižji za konjugate kot za telesu lastne in glikozilirane proteine.

Preglednica 2: PEGilirani biofarmaceutiki, ki se danes uporabljajo za zdravljenje (10).

Table 2: Marked pegylated biopharmaceuticals (10).

Ime biofarmaceutika	Originalni protein	Proizvajalec zdravila	Terapevtska indikacija	Leto odobritve v ZDA
Adagen	adenozin deaminaza	Enzon	Motnje imunskega sistema	1990
Oncaspar (Pegaspargase)	asparaginaza	Enzon	Akutna limfoblastna levkemija	1994
PEG-Intron (PEGIFN- α 2b)	IFN- α 2b	Schering-Plough/Enzon	Hepatitis C	2001
Pegasys (PEGIFN- α 2b)	IFN- α 2b	Hoffmann-La Roche	Hepatitis C	2002
Neulasta (pegfilgrastim)	G-CSF	Amgen/Nektar	Nevtropenija	2002
Somavert (Pegvisomant)	mutein hGH	Pfizer/Nektar	Akromegalija	2003
Certolizumab pegol (Cimzia)	anti-TNF Fab	UCB	Revmatoidni artritis in Crohnova bolezen	2008
Mircera PEGylated epoetin- β	eritropoetin- β	Roche	Anemija, povezana s kronično odpovedjo ledvic	2008
Macugen or Macuverse (pegaptanib)	anti-VEGF aptamer (RNA- oligonukleotid)	Pfizer	Starostna degeneracija rumene pege	2004

Kljub temu, da trenutno ne obstajajo raziskave, ki bi kazale na slabosti konjugatov PEG-protein, še zmeraj ne vemo, kaj se v resnici zgodi z njimi po dolgotrajnih terapijah, še posebej pri modernih konjugatih z razvejanimi verigami PEG velikih molekulskih mas, ki zelo povečajo hidrodinamski radij in volumen. Čeprav obstajajo poročila, v katerih raziskovalci svarijo, da kopičenje PEG-protein konjugatov v jetrih lahko pripelje do toksičnih učinkov (5, 6, 7), o resni toksičnosti za jetra poročajo le redki (8).

2.3 PEGilirani proteini v terapiji

PEGilacija je dobro raziskana, široko uporabljena in hitro rastoča tehnologija, ki zadošča strogim zahtevam za varnost in učinkovitost zdravil. Prvi poskusi PEGilacije proteinov segajo že v leto 1970, vendar je FDA šele leta 1990 odobrila prvi PEGilirani protein: PEGilirano obliko adenozin deaminaze. Danes se za zdravljenje uporablja že osem različnih PEGiliranih proteinov druge generacije in en PEGiliran aptamer (RNA-oligonukleotid) (Preglednica 2).

V bližnji prihodnosti lahko pričakujemo številne nove PEGilirane proteine, ki so trenutno v različnih fazah kliničnih preizkušanj. Kot primere lahko navedemo PEGilirani IFN- β 1 za zdravljenje multiple skleroze, ki je na začetku faze III (9), mestno specifično PEGilirani analog G-CSFa, ki je uspešno zaključil fazo IIa (10), in PEGilirano rekombinantno urikazo (encim, ki zniža koncentracijo plazemske sečne kisline), ki je uspešno zaključila fazo III kliničnih preizkušanj (11).

3 Drugi načini modifikacije proteinov

Razen PEGilacije, ki je trenutno glavni pristop za povečanje učinkovitosti bioterapevtikov, se za doseg enakovrednih ciljev uporabljata še HESilacija in sialilacija.

3.1 HESilacija

Podjetje Fresenius Kabi je razvilo novo tehnologijo priprave dostavnih sistemov, ki temelji na derivatizaciji izhodne učinkovine s hidroksietil škrobom, ki jo imenujemo HESilacija ali HESiliranje. HESilacija podobno kot PEGilacija vpliva na lastnosti terapevtske učinkovine. Ta derivatizacija omogoči podaljšano zadrževanje v krvnem obtoku zaradi povečanja in stabilizacije molekule, kot tudi zmanjševanje očistka preko ledvic. Nadalje lahko HESilacija spremeni imunogenost in alergičnost. V nasprotju s PEGom je HES (hydroxyethyl starch) naravni polimer, ki ima za večjo obstojnost premreženo strukturo. Pridobivajo ga iz voskastega koruznega škroba in ga človeški encimi lahko razgradijo, razgradni produkti pa se izločajo iz telesa preko ledvic. HES se že nekaj časa uporablja v klinični praksi, in sicer kot sredstvo za povečevanje volumna krvne plazme.

Glede na to, da s HESiliranjem lahko kontroliramo čas delovanja, kinetiko izločanja ter način povezovanja z učinkovino, verjamejo, da so tako dobljeni produkti primerni za terapevtsko uporabo. Družba Fresenius Kabi je tako že razvila nekaj tehnologij vezave HES na učinkovine (12).

3.2 Sialilacija

Pri tem postopku gre za pripenjanje polisialične kisline na aminokislinske ostanke proteina, s čimer se podaljša razpolovni čas in zmanjša imunogenost terapevtskega proteina. Čeprav so se pokazali dobri rezultati, je sialilacija ostala v senci PEGilacije (13).

4 Sklep

Biološka zdravila prve generacije so bila korak v pravo smer, a so imela še veliko pomanjkljivosti, ki so jih v veliki meri uspeli izboljšati pri drugi generaciji bioloških zdravil. Od slednjih so se izkazali za najučinkovitejše PEGilirani proteini, saj so s PEGilacijo dosegli podaljšan razpolovni čas, zmanjšano imunogenost, povečano proteazno rezistenco ter povečano točnost in stabilnost biološke učinkovine. Glede na številna nova odkritja na tem področju se lahko v bližnji prihodnosti nadejamo številnih novih in izboljšanih PEGiliranih zdravil.

5 Literatura

1. Szymkowski DE. Creating the next generation of protein therapeutics through rational drug design. *Curr Opin Drug Discovery Dev* 2005; 8(5): 590-600.
2. Gaberc-Porekar V, Zore I, Podobnik B, Menart V. Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins. *Curr Opin Drug Discovery Dev* 2008; 11(2): 242-250.
3. Pasut G, Veronese FM. Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies. *Prog Polym Sci* 2007; 32(8-9): 933-961.
4. Basu A, Yang K, Wang M, Liu S, Chintala R, Palm T, Zhao H, Peng P, Wu D, Zhang Z, Hua J et al. Structure-function engineering of interferon- β 1b for improving stability, solubility, potency, immunogenicity, and pharmacokinetic properties by site-selective mono-PEGylation. *Bioconjug Chem* 2006; 17(3): 618-630.
5. Caliceti P, Veronese FM. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55(10): 1261-1277.
6. Bukowski R, Ernstoff MS, Gore ME, Nemunaitis JJ, Amato R, Gupta SK, Tendler CL. Pegylated interferon- α 2b treatment for patients with solid tumors: A phase I/II study. *J Clin Oncol* 2002; 20(18): 3841-3849.
7. Gregoriadis G, Jain S, Papaioannou I, Laing P. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: A role for polysialic acids. *Int J Pharm* 2005; 300(1-2): 125-130.
8. Motzer RJ, Rakhit A, Ginsberg M, Rittweger K, Vuky J, Yu R, Fettner S, Hoofman L. Phase I trial of 40-kD branched pegylated interferon- α 2a for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2001; 19(5): 1312-1319.
9. Baker DP, Lin EY, Lin K, Pellegrini M. N-terminally PEGylated human interferon- β 1a with improved pharmacokinetic properties and in vivo efficacy in a melanoma angiogenesis model. *Bioconjug Chem* 2006; 17: 179-188.
10. Jevševar S, Kunstelj M, Gaberc-Porekar V. PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnol J* 2010; 5: 113-128.
11. Sherman MR, Saifer MG, Perez-Ruiz F. PEG-uricase in the management of treatment-resistant gout and hyperuricemia. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 59-68.
12. Fresenius Kabi, Hesylation: www.fresenius-kabi.com/internet/kabi/corp/fkintpbn.nsf/Content/HESYLATION. Dostop: 27-09-2010.
13. Fernandes AI, Gregoriadis G. The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: implication in its pharmacokinetics. *Int J Pharm* 2001; 217 (1-2): 215-224.