

УДК 577.112.4

Д.В. КОРЖАВИН<sup>1,2,\*</sup>, Т.В. ЧЕРНОВСКАЯ<sup>1</sup>, Ю.Г. ЕФАНОВ<sup>1</sup>, Е.Г. РУДЕНКО<sup>1</sup>, Р.А. ИВАНОВ<sup>1</sup>,  
А.Б. ПШЕНИЧНИКОВА<sup>2</sup>, В.И. ШВЕЦ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Биофармацевтическая компания ЗАО «БИОКАД», Санкт-Петербург, 198515

<sup>2</sup>Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571

e-mail: korjavin@biocad.ru

## Получение моноПЭГилированного интерферона бета-1а человека: оптимизация условий N-концевого ПЭГилирования

В работе проведена модификация рекомбинантного интерферона (ИФН) бета-1а человека полиэтиленгликолем (ПЭГ). Реакцию проводили с использованием линейного активированного бутиральдегидного производного ПЭГ с молекулярной массой 30 кДа. В результате проведения многофакторного эксперимента выявлена зависимость выхода моноПЭГилированного белка от условий и определены оптимальные условия реакции. Разработана схема одностадийной хроматографической очистки, позволяющая получить конъюгат ПЭГ-ИФН бета-1а чистотой более 98%. Результаты масс-спектрометрических исследований показали, что очищенный конъюгат имеет молекулярную массу 54 130 Да и является ПЭГилированным ИФН бета-1а, в котором N-концевой метионин связан с одной молекулой ПЭГ. Полученный ПЭГ-ИФН бета-1а обладает противовирусной активностью и может рассматриваться как перспективный кандидат при создании препарата пролонгированного действия для лечения рассеянного склероза.

*Ключевые слова:* ИФН-бета человека, модификация, полиэтиленгликоль, пролонгированная лекарственная форма, рассеянный склероз.

Препараты рекомбинантного ИФН-бета человека, получаемые из клеток млекопитающих (ИФН бета-1а), широко применяются в мировой клинической практике для лечения рассеянного склероза [1, 2]. В настоящее время в России зарегистрировано два зарубежных препарата на основе ИФН бета-1а: Авонекс (BiogenIdes, США) и Ребиф (Merck-Serono, Швейцария). Эффективность

действия препаратов ИФН бета-1а ограничена быстрым всасыванием из подкожных тканей, большим объемом распределения, относительно низкой стабильностью, коротким периодом полувыведения, высокой иммуногенностью и токсичностью [3]. Для достижения эффективных терапевтических концентраций в плазме крови возникает необходимость частых введений препарата, что до-

Коржавин Дмитрий Валерьевич, Черновская Татьяна Вениаминовна, Ефанов Юрий Георгиевич, Руденко Елена Георгиевна, Иванов Роман Алексеевич, Пшеничникова Анна Борисовна, Швец Виталий Иванович.

*Список сокращений:* ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ИФН — интерферон; МЕ — международная единица активности; мПЭГ — метокси-ПЭГ; ОФ ВЭЖХ — обращенно-фазовая ВЭЖХ; ПААГ — полиакриламидный гель; ПЭГ — полиэтиленгликоль; ПЭГилирование — модификация полиэтиленгликолем; ТФУ — трифторуксусная кислота; УЗ — ультразвуковой; SDS — додецилсульфат натрия.

\* Автор для переписки.

полнительно приводит к возникновению дозозависимых побочных эффектов [4]. Терапевтическая эффективность ИФН бета-1а может быть повышена при использовании модифицированного белка, в котором нативная молекула ИФН-бета химически связана с полиэтиленгликолем (ПЭГ). Присоединение молекулы ПЭГ к белкам приводит к улучшению фармакокинетики, повышению стабильности, увеличению времени полувыведения из крови, снижению колебаний их концентрации в крови, увеличению активности *in vivo* (при снижении активности *in vitro*), а также к уменьшению иммуногенности и токсичности [5].

Для достижения желаемых фармакологических свойств процесс ПЭГилирования белков должен быть оптимизирован, включая такие параметры, как молекулярная масса ПЭГ, тип активированного ПЭГ и условия проведения реакции [6—9]. Кроме того, при разработке технологии получения ПЭГилированных белков важно определение сайта в молекуле белка, который не участвует во взаимодействии с клеточным рецептором, чтобы связывание с ПЭГ не приводило к значительному снижению активности модифицированного белка.

Применение метода сайт-специфичного мутагенеза позволило установить, что наименее критичным для проявления активности молекулы ИФН-бета является ее N-концевой участок [10, 11]. В экспериментах на животных показано, что ИФН-бета, модифицированный ПЭГ по N-концу, имел улучшенные фармакокинетические параметры [12]. Таким образом, несмотря на снижение специфической активности в тесте *in vitro* биологическая активность белка оказалась выше благодаря значительному увеличению времени полувыведения. Противовирусная активность полученных конъюгатов ПЭГ-ИФН-бета зависела от молекулярной массы (5—20 кДа) и структуры молекулы ПЭГ и составляла 15—50% от специфической активности немодифицированного белка [12, 13]. Данные результаты позволили сделать предположение, что использование для модификации ПЭГ с массой более 20 кДа может привести к получению препарата ПЭГ-ИФН-бета, обладающего высокой терапевтической эффективностью при лечении рассеянного склероза.

Целью данной работы было проведение модификации ИФН бета-1а линейной молекулой ПЭГ массой 30000 Да и определение оптимальных условий реакции ПЭГилирования. Разработана одностадийная схема хроматографической очистки моноПЭГилированного ИФН бета-1а, определены сайт-модификации и специфическая активность очищенного конъюгата ПЭГ-ИФН бета-1а.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Материалы и реактивы.** В работе использовали очищенный рекомбинантный ИФН бета-1а (ЗАО «БИОКАД», Россия). Реакцию ПЭГилирования ИФН бета-1а проводили с использованием линейного активированного бутиральдегидного производного мПЭГ с молекулярной массой 30 кДа (Laysan Bio, США) и цианборгидрида натрия (Sigma-Aldrich, США).

## Проведение реакции ПЭГилирования

К 360 мл буферного раствора (10 мМ натрий-ацетат, pH 5,0), содержащего рекомбинантный ИФН бета-1а в концентрации 0,36 мг/мл (131 мг), добавляли 7,2 мл 1 М раствора цианборгидрида натрия, перемешивали и вносили 1 г сухого бутиральдегидного производного ПЭГ. Смесь тщательно перемешивали и инкубировали в течение 22 ч при температуре  $20 \pm 2$  °. Контроль образования ПЭГилированного ИФН бета-1а проводили с использованием метода обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) и SDS-электрофореза в 12,5%-ном ПААГ.

Анализ влияния условий реакции ПЭГилирования на состав образующихся продуктов проводили с использованием программ DesignExpert 9 и Origin Pro V9.1.

**Очистку моноПЭГилированного ИФН бета-1а** осуществляли на предварительно заполненной колонке CM-Sepharose FF (GE HealthCare) с использованием хроматографа АКТА purifier (GE HealthCare). Реакционную смесь после окончания реакции ПЭГилирования наносили на колонку, уравновешенную 5 мМ натрий-ацетатным буфером, pH 5,0. Колонку с сорбентом промывали последовательно буфером А (5 мМ натрий-ацетатный буфер, pH 6,8) и буфером А1, содержащим градиент концентрации NaCl от 0 до 0,2 М в буфере А. Из каждой фракции отбирали аликвоты для анализа проб методом SDS-электрофореза в ПААГ. Фракции, содержащие моноПЭГилированный конъюгат ПЭГ-ИФН бета-1а, объединяли и концентрировали. Для этого использовали метод тангенциальной фильтрации на кассетах с мембранами, имеющими предел отсечения 10 кДа (Pellicon<sup>®</sup> XL 50 PLCGC) на установке LabScale<sup>®</sup> TFF System (Millipore).

**Электрофорез** в 12,5%-ном ПААГ проводили по стандартному протоколу Лэммли. Гели обрабатывали Coomassie R-250 для проявления белка и иодидом бария для окрашивания ПЭГ [14]. В качестве стандартов молекулярной массы использо-

вали набор LMW Calibration Kit (GE Healthcare). Результаты электрофореза оценивали денситометрически с помощью программы GelPro 32 (Media Cybernetics).

**ОФ ВЭЖХ** проводили на колонке Symmetry C18 (0,4 × 150 мм) с использованием хроматографа Waters (Breeze, США). На колонку наносили 100 мкл анализируемого образца с концентрацией ИФН бета-1а 0,1 мг/мл и хроматографию проводили при 35°. Элюцию осуществляли в градиенте ацетонитрила (Panreac, HPLC PAI-ACS) от 0 до 90% в 0,1%-ном водном растворе ТФУ (Panreac, PS 99%).

### Масс-спектрометрические исследования

Определение молекулярной массы и пептидный фингерпринт ПЭГ-ИФН и ИФН осуществляли на тандемном времяпролетном масс-спектрометре MALDI-TOF-TOF ABSciex 4800 (ABSciex, Канада). Первичную структуру отдельных триптических пептидов определяли методом MS-MS. Результаты анализировали при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com) в базе данных NCBI и BioTools v. 3 (Bruker, Германия).

Для определения молекулярной массы исследуемые образцы концентрировали (конечная концентрация 5 мг/мл) и диализовали против деионизованной воды с помощью пробирок Centricon (Amicon Ultra, Millipore, США). Для приготовления раствора матрицы к 2 мг 2,5-дигидроксibenзойной кислоты добавляли 100 мкл 50 %-ного ацетонитрила в 0,1 %-ной ТФУ. Полученный раствор помещали на УЗ-баню (Branson, model 1510 EDTH) на 5 мин с перемешиванием на вортексе. Раствор использовали свежеприготовленным.

Раствор матрицы объемом 0,5 мкл наносили последовательно 2 раза. Раствор образца нанесли в 2—3 лунки поверх матрицы 5—6-кратно (по 0,5 мкл на каждую лунку).

**Сайт ПЭГилирования в молекуле ПЭГ-ИФН бета-1а** определяли путем сравнения масс-спектров пептидов, полученных в результате гидролиза трипсином конъюгата ПЭГ-ИФН бета-1а и немодифицированного ИФН бета-1а, как описано в Фармакопее США [15]. Препараты ПЭГ-ИФН бета-1а и ИФН бета-1а разделяли путем электрофореза в 12,5 %-ном ПААГ. После окраски геля ку-масси из него вырезали участки, соответствующие анализируемым белкам. Фрагмент геля размером 1 мм<sup>3</sup> дважды промывали 100 мкл 40 %-ного раствора ацетонитрила в 0,1 М гидрокарбонате аммония (Sigma-Aldrich) в течение 30 мин при 37°. Фрагмент обесцвеченного геля высушивали на воздухе и добавляли 4 мкл раствора модифициро-

ванного трипсина (Sigma) в концентрации 15 мкг/мл в 0,05 М гидрокарбонате аммония. Гидролиз проводили в течение 18 ч при 37°, затем к раствору добавляли 8 мкл 0,5 %-ной ТФУ в 10 %-ном водном растворе ацетонитрила и тщательно перемешивали. Раствор над гелем использовали для получения MALDI-масс-спектров триптических пептидов на приборе MALDI-TOF-TOF ABSciex (Канада).

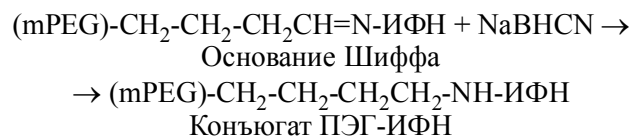
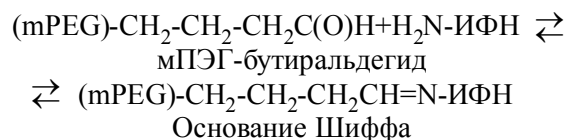
**Определение противовирусной активности ПЭГ-ИФН бета-1а** проводили с использованием культуры клеток карциномы легкого человека (A-549), зараженных вирусом везикулярного стоматита. Противовирусную активность определяли как степень подавления цитопатического действия вируса на клетки.

Активность ПЭГилированного ИФН везде выражали в % от активности немодифицированного белка.

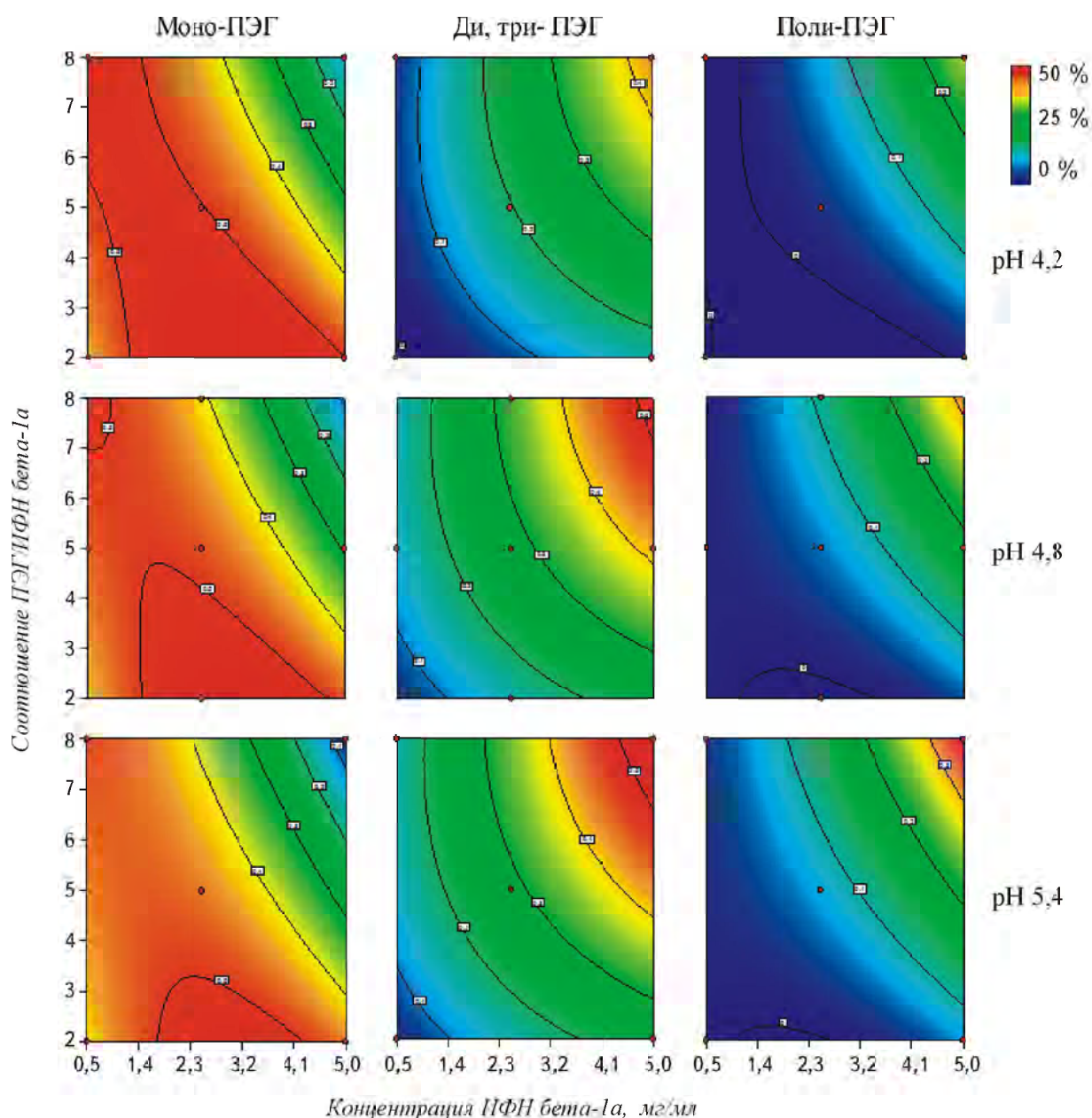
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Оптимизация реакции ПЭГилирования ИФН бета-1а

Реакция модификации белков активированным ПЭГ-альдегидом является рН-чувствительной и в условиях слабокислотных значений рН (≤6) преимущественно происходит реакция алкилирования по непротонированной α-аминогруппе N-концевой аминокислоты. В результате реакции образуется нестабильное основание Шиффа, которое при последующем восстановлении переходит во вторичный стабильный амин с прочной ковалентной связью [16].



Побочными продуктами реакции являются полиПЭГилированные конъюгаты белка, образующиеся в результате дополнительного присоединения ПЭГ к ε-аминогруппам лизина в монозамещенном белке. Поликонъюгаты обладают гораздо меньшей активностью по сравнению с моноконъюгатом, поскольку ПЭГилированию подвергаются ос-



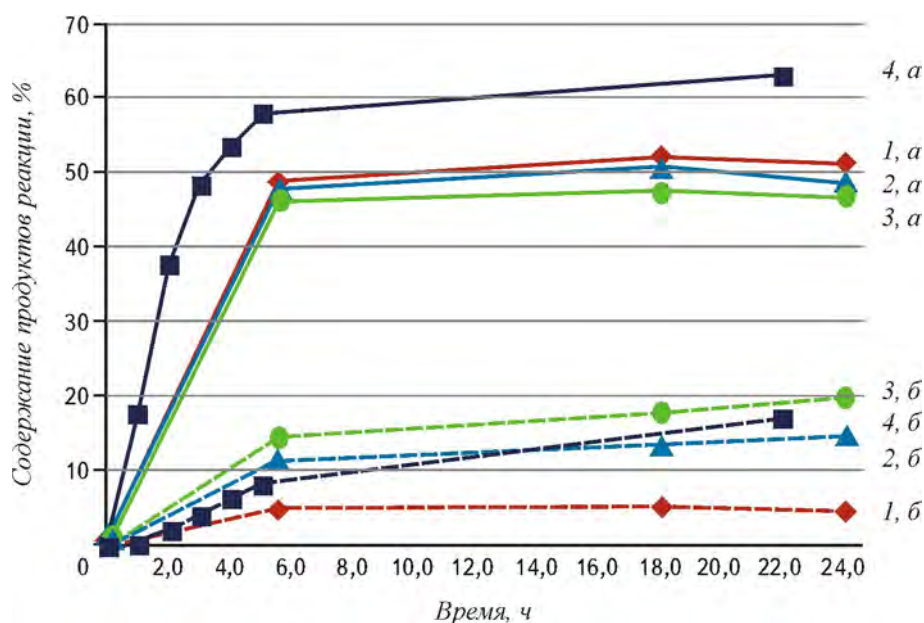
**Рис. 1.** Содержание продуктов реакции ПЭГилирования ИФН бета-1а в реакционной смеси, %, в зависимости от pH реакционной смеси, концентрации ИФН бета-1а и соотношения ПЭГ/ИФН бета-1а. Кривые определяют границы перехода 0-20-30-40-50

татки лизина в активных центрах белка. Кроме того, образование полиПЭГилированных форм приводит к снижению выхода целевого монозамещенного белка и усложняет схему его очистки [17].

Для определения оптимальных условий протекания реакции N-концевого ПЭГилирования с целью максимального выхода моноПЭГ-ИФН-бета был проведен многофакторный эксперимент по исследованию влияния наиболее важных параметров: соотношение ПЭГ/белок (2—8); концентрация белка (0,5—5,0 мг/мл); время (6—24 ч) и pH (4,2—5,4).

На рис. 1 представлены результаты анализа реакции и ПЭГилирования, проведенной при различных условиях, через 6 ч после ее начала при температуре  $(20 \pm 3)^\circ$ .

Согласно полученным результатам, при разных условиях выход моноПЭГилированного ИФН бета-1а варьировал от 4 до 55%, выход примесных полиПЭГилированных форм составлял 3—90%. Было обнаружено, что образование примесных олигоПЭГилированных продуктов реакции в большей степени зависит от соотношения



**Рис. 2.** Кинетика ПЭГилирования ИФН бета-1а при различных условиях реакции: 1 — рН 4,2, 22±2°; 2 — рН 4,8, 22±2°; 3 — рН 5,4, 22±2°; 4 — рН 5,0, температура 22±2° 0—4 ч и 16±2° 4—24 ч; а — содержание монозамещенного ИФН; б — содержание ди- и тризамещенного ИФН

ПЭГ/ИФН бета-1а, в меньшей — от рН и возрастает с увеличением концентрации модифицируемого белка (в большей степени при рН 4,8 и 5,4). При низком значении рН оптимальный выход моноПЭГилированного ИФН (55%), содержащего менее 15% примесных ди- и тризамещенных конъюгатов, находится в широком диапазоне концентраций белка. При увеличении рН, диапазон оптимальных условий сужается и разделяется на две области: первая — с высоким соотношением ПЭГ/ИФН бета-1а и низкой концентрацией модифицируемого белка (менее 1 мг/мл); вторая — с низким соотношением ПЭГ/ИФН бета-1а и высокой концентрацией ИФН бета-1а в диапазоне 1,5—4,0 мг/мл. Были выбраны условия из первой области\* с минимальным соотношением ПЭГ/белок (4—6), позволяющим получить максимальный выход монозамещенного продукта.

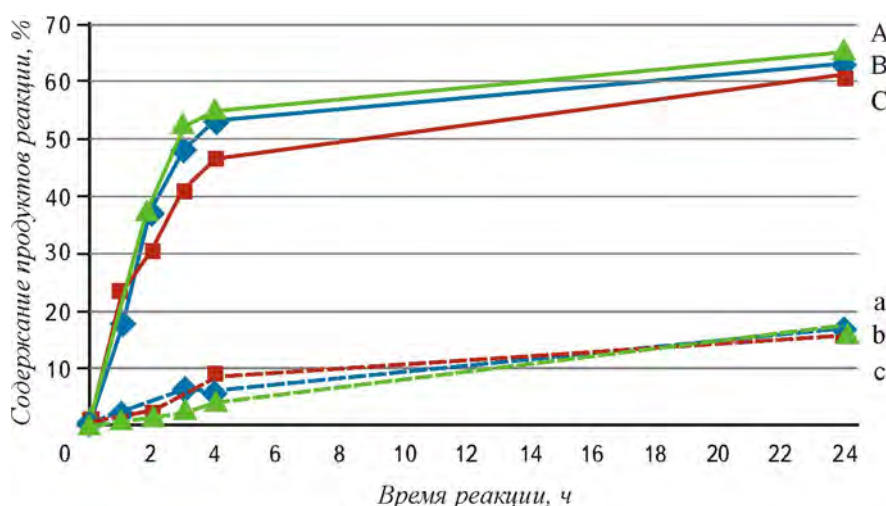
Увеличение времени реакции свыше 6 ч при температуре (22±2)° приводило к накоплению примесных полизамещенных продуктов, тогда как выход целевого продукта оставался неизменным (рис. 2). Снижение температуры реакции с (22±2)° до (2—8)° через 3—4 ч после начала реакции с последующей инкубацией в течение 24 ч

при более низкой температуре (16±2°) приводило к увеличению содержания моноПЭГ-ИФН свыше 60% при содержании примесных полиПЭГилированных форм, не превышающем 17%.

На рис. 2 представлены кинетические кривые реакций подбора условий процесса (рН 4,2, 4,8, 5,4) и реакции после оптимизации (рН 5,0, в условиях температурного шифта). Оптимальное значение рН 5,0 было выбрано с учетом условий проведения дальнейшей хроматографической очистки моноПЭГилированного ИФН-бета.

Масштабирование реакции ПЭГилирования в 15 раз подтвердило воспроизводимость полученного результата (рис. 3) в диапазоне содержания ИФН бета-1а 59—918 мг, взятого в реакцию. В результате реакции содержание моноПЭГ-ИФН бета-1а в реакционной смеси составляло 61—65%. На рис. 3 и 4 представлена типичная картина кинетики ПЭГилирования ИФН бета-1а в оптимальных условиях (рН 5,0, молярное соотношение ПЭГ/белок 5:1, концентрация ИФН бета-1а — 0,5 мг/мл, температурный шифт). К моменту остановки реакции (24 ч) реакционная смесь содержала 63% моноПЭГилированного ИФН-бета, 17% диПЭГилированного ИФН-бета и 20% непрореа-

\* Использование второй области потребовало бы дополнительной стадии пробоподготовки (концентрирования), что привело бы к нежелательным потерям целевого белка.



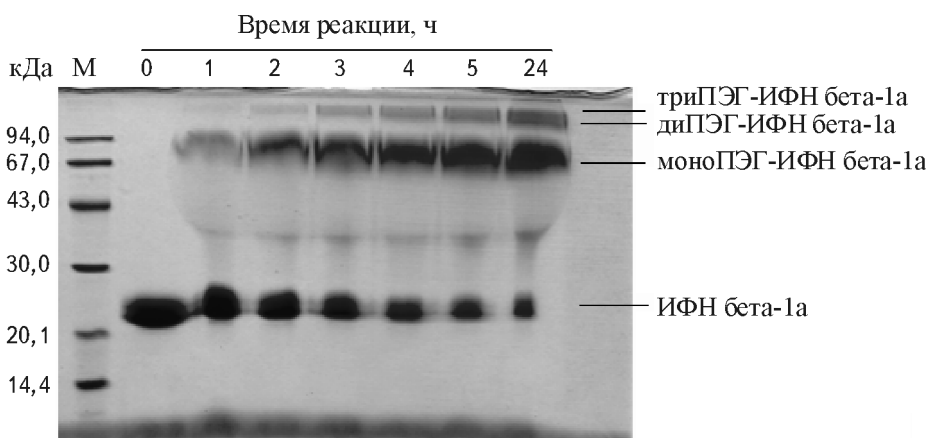
**Рис. 3.** Кинетические кривые реакции ПЭГилирования ИФН бета-1а при оптимальных значениях pH 5,0, температурном шифте (см. текст), концентрации ИФН бета-1а 0,5 мг/мл и соотношении ПЭГ/ИФН = 5:1 в условиях масштабирования; заглавными буквами указано содержание монозамещенного ИФН, прописными — ди- и тризамещенных ИФН. Количество ИФН в реакции: А — 918 мг; В — 59 мг; С — 518 мг

гировавшего ИФН-бета (последние данные не приведены). Для получения высокоочищенного моноПЭГилированного ИФН бета-1а и отделения нецелевых продуктов (ди- и три-ПЭГилированные ИФН, немодифицированный ИФН бета-1а, непрореагировавший ПЭГ) проводили хроматографическую очистку.

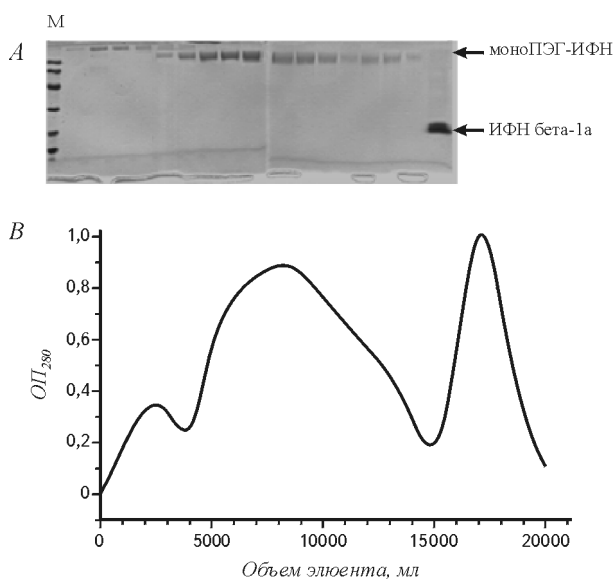
### Хроматографическая очистка моноПЭГилированного ИФН бета-1а

Для очистки моноПЭГилированных терапевтических белков в большинстве случаев используют двухстадийную хроматографию, включая гидрофобную или ионообменную процедуры

в сочетании с эксклюзионной хроматографией [18—20]. Ограничения в масштабировании, а также низкая скорость процесса гель-фильтрации, равно как необходимость дополнительной подготовки сырья для гидрофобной хроматографии, сделали очистку ПЭГ-конъюгатов на ионообменных сорбентах наиболее популярной. Молекула ПЭГ, сама по себе нейтральная, может закрывать заряженные группы поверхности белка, оказывая влияние на его общий заряд и величину изоэлектрической точки [17]. Кроме того, ПЭГилирование белков даже при использовании небольших по массе молекул ПЭГ многократно увеличивает гидродинамический объем молекулы, что приводит к значительному снижению емкости используемых



**Рис. 4.** Электрофорезграмма (12,5%-ный ПААГ, окрашивание кумасси продуктов ПЭГилирования ИФН бета-1а в различное время после начала реакции (условия см. в подписи к рис. 3); М — маркеры молекулярной массы



**Рис. 5.** Профиль хроматографического разделения смеси продуктов реакции ПЭГилирования ИФН бета-1а (B) и анализ соответствующих фракций методом электрофореза в 12,5 %-ном ПААГ (A); М — маркеры молекулярной массы

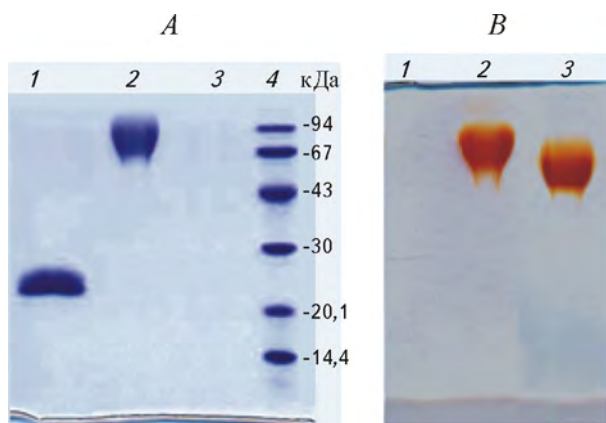
сорбентов и скорости диффузии ПЭГилированных белков и тем самым упрощает их отделение от немодифицированного белка. Основной проблемой при хроматографической очистке в этом случае является сложность разделения дизамещенных, монозамещенных и тем более позиционных изомеров конъюгата из-за малого различия в их свойствах. Эффективность связывания с ионообменным сорбентом зависит от степени модификации белка: у полиПЭГилированных форм связы-

вание с сорбентом слабее, чем у моноПЭГилированного белка.

Для хроматографической очистки компонентов реакции ПЭГилирования ИФН бета-1а был использован слабый катионообменный сорбент. Хроматограмма процесса с электрофореграммой соответствующих фракций представлена на рис. 5. В выбранных условиях непрореагировавший ПЭГ не связывался с сорбентом, а различие заряда поверхности остальных компонентов реакционной смеси позволило провести фракционирование в градиенте NaCl таким образом, что полизамещенные продукты (ди-, три- и полиПЭГ-ИФН) десорбировались при низкой концентрации соли, целевой моноПЭГ-ИФН бета-1а — в середине градиента, а немодифицированный ИФН бета-1а — при большей концентрации соли.

Фракции, содержащие моноПЭГилированный ИФН бета-1а, объединяли и определяли чистоту и гомогенность полученного модифицированного белка с использованием SDS-электрофореза и обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографии (ОФ ВЭЖХ).

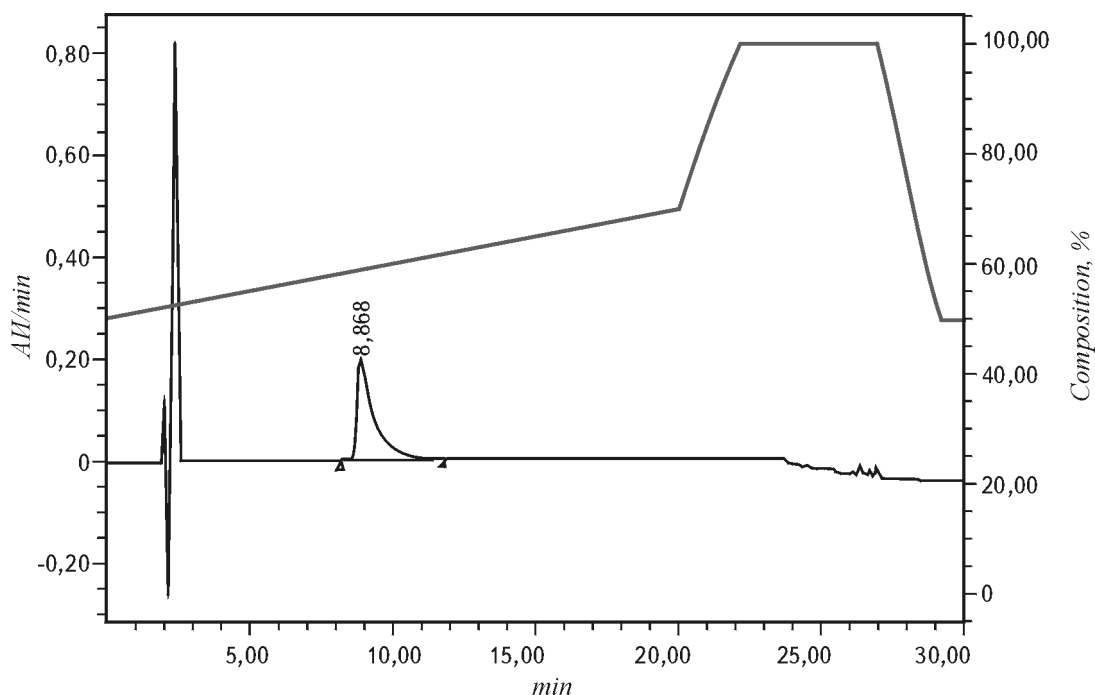
Электрофоретический анализ очищенного ПЭГ-ИФН бета-1а подтвердил чистоту полученного конъюгата (рис.6, A, B). Окрашивание геля проводили кумасси (см. рис. 6, A) или раствором иодида бария (см. рис. 6, B). Гомогенность полученного продукта оценивали по специфичности окрашивания нанесенных образцов: краситель кумасси окрашивает немодифицированный ИФН бета-1а и конъюгат ПЭГ-ИФН бета-1а (см. рис. 6, A, дорожки 1 и 2, соответственно) и не окрашивает активированный ПЭГ-бутиральдегид (рис. 6, A, дорожка 3). Иодид бария окрашивает конъюгат ПЭГ-ИФН бета-1а и активированный ПЭГ-бутиральдегид (см. рис. 6, B, дорожки 2 и 3, соответственно) и не окрашивает немодифицированный ИФН бета-1а (см. рис. 6, B, дорожка 1). Результаты ОФ ВЭЖХ подтвердили высокую чистоту полученного моноПЭГ-ИФН бета-1а (рис. 7).



**Рис. 6.** Электрофореграммы (12,5%-ный ПААГ) конъюгата ПЭГ-ИФН бета-1а после ионообменной очистки в сравнении с немодифицированным ИФН бета-1а: A — окраска кумасси; B — окраска раствором иода в присутствии солей бария; дорожка 1 — немодифицированный ИФН бета-1а; дорожка 2 — конъюгат ПЭГ-ИФН бета-1а; дорожка 3 — активированный ПЭГ-бутиральдегид, 30 кДа; дорожка 4 — маркеры молекулярной массы

### Определение молекулярной массы полученного конъюгата ПЭГ-ИФН бета-1а

Следует отметить, что с помощью электрофореза точное значение молекулярной массы для ПЭГилированных белков определить невозможно, так как присоединение гидрофильной молекулы ПЭГ к белку значительно увеличивает радиус Стокса образовавшегося конъюгата. В результате при электрофорезе подвижность комплекса ПЭГ-белок в геле заметно падает и значение его молеку-



	RT (min)	Area (mV/sec)	% Area	Height (UV)	% Height
1	8,868	7857370	100,00	189761	100,00

Рис. 7. Хромограмма препарата ПЭГ-ИФН бета-1а, полученная путем ОФ ВЭЖХ после ионообменной очистки

лярной массы оказывается значительно выше, чем сумма молекулярных масс белка и ПЭГ. Поэтому определение молекулярной массы ПЭГилированного интерферона бета-1а проводили с помощью масс-спектрометрии (MALDI-TOF-TOF).

Результаты анализа конъюгата ПЭГ-ИФН бета-1а в диапазоне  $m/z$  от 16 000 до 65 000 приведены на рис. 8. В масс-спектре наблюдается размытый основной пик, соответствующий однозарядному иону с  $m/z$   $54130 \pm 2000$ . Размытость пика

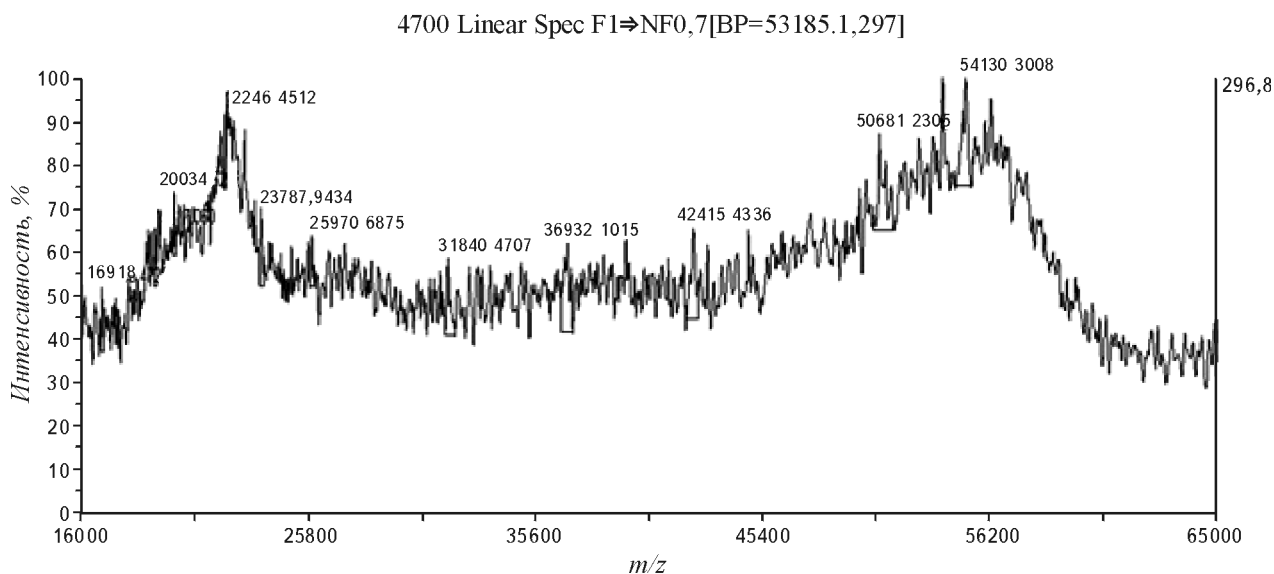


Рис. 8. Масс-спектр моноПэг-модифицированного ИФН бета-1а после ионообменной хроматографической очистки



обусловлена гетерогенностью ПЭГ-фрагмента молекулы. Измеренное значение  $m/z$  в пределах погрешности метода совпадает с расчетными данными по сумме молекулярной массы ИФН бета-1а (около 22,5 кДа) и ПЭГ (30 кДа), что в свою очередь означает, что в полученном конъюгате ПЭГ-ИФН бета-1а одна молекула ИФН бета-1а связана с одной молекулой ПЭГ.

### Исследование локализации сайта ПЭГилирования в конъюгате ПЭГ-ИФН бета-1а

Локализацию участка присоединения ПЭГ в молекуле ПЭГ-ИФН бета-1а определяли путем сравнения масс-спектров пептидов, полученных в результате триптического гидролиза конъюгата ПЭГ-ИФН бета-1а и немодифицированного ИФН бета-1а. В триптическом гидролизате конъюгата ПЭГ-ИФН бета-1а должен отсутствовать пептид, соответствующий участку белка, в котором произошла модификация.

На рис. 9 представлены масс-спектры триптических пептидов немодифицированного ИФН бета-1а в сравнении с конъюгатом моноПЭГ-ИФН бета-1а. В таблице представлены результаты идентификации экспериментальных пептидов ПЭГ-ИФН бета-1а и немодифицированного ИФН бета-1а с теоретическими данными для природного немодифицированного ИФН-бета.

Анализ результатов, представленных в таблице, показал, что масс-спектры триптических пептидов ПЭГ ИФН бета-1а и немодифицированного ИФН бета-1а практически полностью совпадают за исключением пептидов с  $m/z$  1341,6983 и 1357,6933, отсутствующих в триптическом гидролизате ПЭГ-ИФН бета-1а (см. рис. 9, таблица). Согласно анализу теоретических масс триптического гидролизата ИФН бета-1а человека (см. таблицу), пики с соотношением масса/заряд 1341,6983 и 1357,6933 соответствуют N-концевому пептиду (нативный пептид 1—11 и пептид 1—11, содержащий окисленный метионин, соответственно). Отсутствие этих пептидов в триптическом гидролизате ПЭГ-ИФН бета-1а свидетельствует о модификации N-концевого пептида, который, став тяжелее на массу ПЭГ (30 кДа), должен находиться за пределами исследуемой области спектра.

Для подтверждения первичной структуры положительного однозарядного иона с  $m/z$  1341,730 (соответствующего N-концевому пептиду ИФН бета-1а) использовали метод тандемной масс-спектрометрии (MS/MS). Родительский ион ( $m/z$  1341,730) изолировали в ионной ловушке и фрагментировали методом столкновительной диссоциации (данные не приведены). Массу полученных фрагментов использовали для совокупного

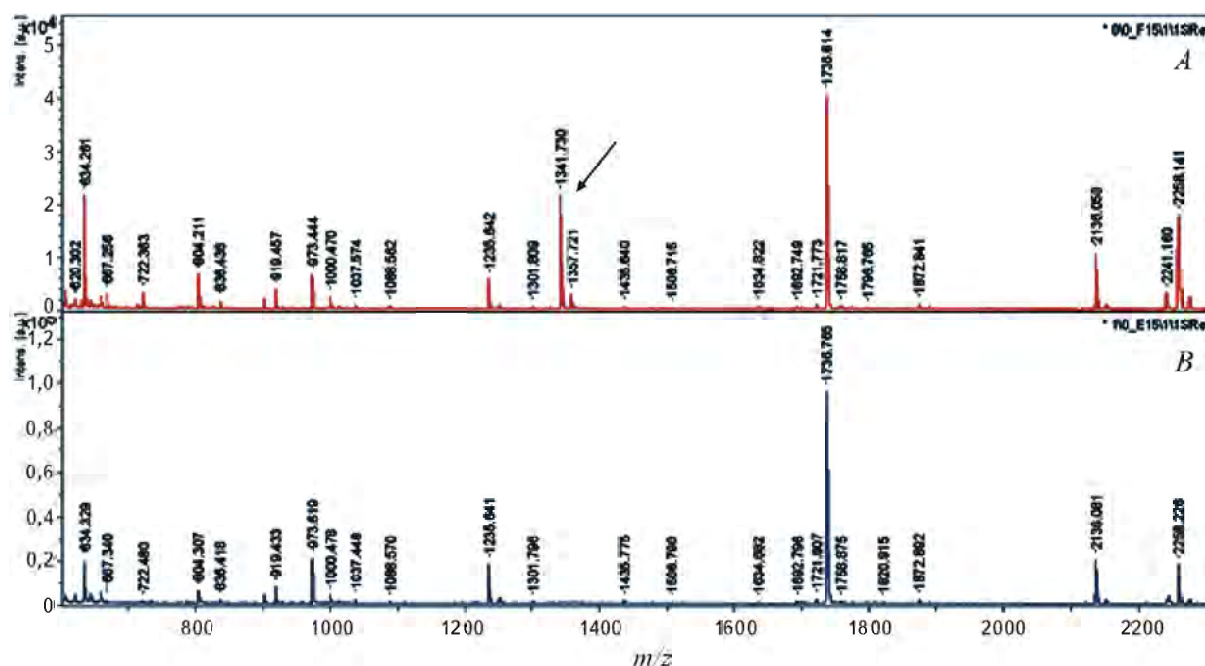


Рис. 9. Массы-спектры триптических пептидов немодифицированного ИФН бета-1а (А) и ПЭГ ИФН бета-1а (В) в области  $m/z$  600—2300. Стрелкой указано положение пептидов ИФН бета-1а с  $m/z$  1341,730 и 1357,721, отсутствующих на спектре ПЭГ-ИФН бета-1а

**Сравнение масс-спектров триптических пептидов немодифицированного ИФН бета-1а и конъюгата ПЭГ-ИФН бета-1а с теоретическими данными для природного немодифицированного ИФН-бета**

Экспериментальные значения, m/z		Теоретические значения для ИФН-бета, m/z	Соответствуют пептиду	Аминокислотная последовательность
ПЭГ-ИФН бета-1а	ИФН бета-1а			
–	1341,730	1341,6983	1—11	-.MSYNLLGFLQR.S
–	1357,721	1357,6933	1—11	-.MSYNLLGFLQR.S + Oxidation (M)
941,439	941,388	941,4155	12—19	R.SSNFQCQK.L
1012,465	1012,378	1012,4517	12—19	R.SSNFQCQK.L + Propionamide (C)
1000,478	1000,470	999,5734	20—27	K.LLWQLNGR.L
1820,915	1820,870	1819,9887	20—33	K.LLWQLNGRLEYCLK.D + + Propionamide (C)
1506,790	1506,715	1506,7257	34—45	K.DRMNFDIPEEIK.Q
1235,641	1235,642	1235,5976	36—45	R.MNFDIPEEIK.Q
1251,596	1251,537	1251,5925	36—45	R.MNFDIPEEIK.Q + Oxidation (M)
2136,081	2136,058	2136,0794	36—52	R.MNFDIPEEIKQLQQFQK.E
2152,044	2152,014	2152,0743	36—52	R.MNFDIPEEIKQLQQFQK.E + + Oxidation (M)
919,433	919,457	919,4996	46—52	K.QLQQFQK.E
2258,226	2258,141	2258,1525	53—71	K.EDAALTIYEMLQNIFAIFR.Q
2274,230	2274,170	2274,1474	53—71	K.EDAALTIYEMLQNIFAIFR.Q + + Oxidation (M)
718,430	718,346	718,3981	100—105	K.TVLEEK.L
1088,570	1088,562	1088,6197	100—108	K.TVLEEKLEK.E
1037,448	1037,574	1037,5262	106—113	K.LEKEDFTR.G
667,340	667,256	667,3046	109—113	K.EDFTR.G
928,608	928,519	116—123	116—123	K.LMSSLHLK.R
714,391	714,359	714,3682	124—128	K.RYYGR.I
558,286	558,295	558,2671	125—128	R.YYGR.I
786,464	786,495	786,4872	129—134	R.ILHYLK.A
1634,682	1634,822	1634,8107	135—147	K.AKEYSHCAWTIVR.V + + Propionamide (C)
1435,775	1435,640	1435,6787	137—147	K.EYSHCAWTIVR.V + + Propionamide (C)
629,395	629,415	629,3981	148—152	R.VEILR.N
973,619	973,444	973,4890	153—159	R.NFYFINR.L
722,480	722,363	721,4195	160—165	R.LTGYLR.N
836,418	836,436	836,4625	160—166	R.LTGYLRN.-

Примечание: (+) — пептид с обнаруженной модификацией; (–) — пептид отсутствует; (-) — N-концевой пептид.

поиска в базе данных по MS+MS/MS с использованием программы BioTools v. 3 (Bruker, Германия), который показал, что пик положительного однозарядного иона с  $m/z$  1341,730 принадлежит протонированному пептиду ИФН бета-человека с первичной структурой MSYNLLGFLQR, соответствующему N-концевому триптическому пептиду 1—11 ИФН-бета человека (см. рис. 9). Данный пептид содержит единственную свободную аминогруппу, по которой могло произойти ПЭГилирование — альфа-аминогруппу N-концевого метионина. Таким образом, результаты анализа первичной структуры пептидов подтвердили, что в полученном конъюгате ПЭГ-ИФН бета-1а связывание ПЭГ с молекулой белка произошло через альфа-аминогруппу N-концевого метионина ИФН бета-1а.

### Определение специфической активности моноПЭГ-ИФН бета-1а

Модификация белков ПЭГ в большинстве случаев приводит к снижению специфической активности *in vitro* из-за экранирования активных сайтов белка. Степень снижения активности при этом зависит от молекулярной массы и структуры ассоциированного ПЭГ. Например, при ПЭГилировании ИФН альфа-2b линейным ПЭГ-сукцинимидилкарбонатом с молекулярной массой 12 кДа были получены 14 различных позиционных изомера, каждый из которых содержал одну молекулу ПЭГ, присоединенную в различных участках молекулы белка к лизину, тирозину, гистидину, серину и цистеину. Средняя активность ПЭГилированного белка составила 28% от активности немодифицированного белка и варьировала от 6 до 37% для отдельных изомеров [21]. ПЭГилирование ИФН альфа-2a разветвленным гидроксисукцинимидным производным ПЭГ с молекулярной массой 40 кДа привело к получению 6 позиционных изомеров, суммарная противовирусная активность которых составила 1—7% [22]. При модификации ИФН бета-1b по N-концу молекулами ПЭГ массой 20, 30 и 40 кДа были получены конъюгаты, обладающие активностью в 66%, 58% и 22%, соответственно [13]. Специфическая активность конъюгата ИФН бета-1а, модифицированного по N-концу ПЭГ с массой 20 кДа, составляла 50% [19]. Такие же результаты ранее были опубликованы и для ИФН бета-1b [12].

Исследования специфической противовирусной активности полученного нами конъюгата ИФН бета-1а с ПЭГ массой в 30 кДа показали, что удельная противовирусная активность модифицированно-

го белка *in vitro* составила  $(5,04 \pm 0,3) \cdot 10^7$  МЕ/мг, что составляет 25% от активности немодифицированного интерферона бета-1а —  $(2 \pm 0,4) \cdot 10^8$  МЕ/мг.

Таким образом, в результате проведенной работы был получен высокоочищенный конъюгат ПЭГ-ИФН бета-1а, в котором молекула ПЭГ с массой 30 кДа связана с альфа-аминогруппой N-концевого метионина. Полученный конъюгат обладает противовирусной активностью и может рассматриваться как перспективный кандидат при создании отечественного препарата пролонгированного действия для лечения рассеянного склероза.

Коллектив акторов благодарит лабораторию аналитических методов за выполнение масс-спектрометрических исследований.

Получено 25.12.14

### ЛИТЕРАТУРА

1. Завалишин И.А. Рассеянный склероз: современная концепция патогенеза и патогенетического лечения / И.А. Завалишин, А.В. Переседова // *Анналы клинич. и эксперимент. неврологии*. — 2007. — № 1. — С. 32—40.
2. Kappos, L. Interferon beta-1b in secondary progressive MS: a combined analysis of the two trials / L. Kappos, B. Weinstenker, C. Pozzilli, A. J. Thompson, F. Dahlke, K. Beckmann, C. Polman, H. McFarland // *Neurology*. — 2004. — V. 63(10). — P.1779—1787.
3. Alam, J. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of two recombinant human interferon beta-1a (IFN beta-1a) products administered intramuscularly in healthy male and female volunteers / J. Alam, S. Goelz, P. Rioux, J. Scaramucci, W. Jones, A. McAllister, M. Champion, M. Rogge // *Pharmac. Research*. — 1997. — V.14. — P.546—549.
4. Bertolotto, A. Immunogenicity of interferon beta: differences among products / A. Bertolotto, F. Deisenhammer, P. Gallo, P. Solberg Sorensen // *J. Neurology*. — 2004. — V.251(2). — P. 115—124.
5. Pasut, G. PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: an overview / G. Pasut, F.M. Veronese // *Adv. Drug Delivery Rev.* — 2009. — V.61(13). — P. 1177—1188.
6. Wong, S.S. Chemistry of protein conjugation and cross-linking // CRC Press. — 1991.
7. Zalipsky, S. Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules // *Adv. Drug Delivery Rev.* — 1995. — V.16(2—3). — P.157—182.
8. Kinstler, O. Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)-protein conjugates / O. Kinstler, G. Molineux, M. Treuheit, D. Ladd, C. Gegg // *Adv. Drug Delivery Rev.* — 2002. — V.54(4). — P.477—485.
9. Roberts, M.J. Chemistry for peptide and protein PEGylation / M.D. Bentley, J.M. Harris // *Adv. Drug Delivery Rev.* — 2002. — V.54(4). — P.459—476.

10. *Runkel, L.* Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta) / L. Runkel, W. Meier, R.B. Pepinsky, M. Karpusas, A. Whitty, K. Kimball, M. Brickelmaier, C. Muldowney, W. Jones, S.E. Goelz // *Pharm. Res.* — 1998. — V.15(4). — P.641—649.
11. *Baker, D.P.* PEGylated Interferon Beta-1a: Meeting an Unmet Medical Need in the Treatment of Relapsing Multiple Sclerosis / D.P. Baker, R.B. Pepinsky, M. Brickelmaier, R. S. Gronke, X. Hu, K. Olivier, M. Lerner, L. Miller, M. Crossman, I. Nesterov, M. Subramanyam, S. Hitchman, G. Glick, S. Richman, S. Liu, Y. Zhu, M. A. Panzara, G. Davar // *J. Interferon Cytokine Res.* — 2010. — V.30(10). — P.777—785.
12. *Pepinsky, R.B.* Improved pharmacokinetic properties of a polyethylene glycol-modified form of interferon-beta-1a with preserved in vitro bioactivity / R.B. Pepinsky, D.J. LePage, A. Gill, A. Chakraborty, S. Vaidyanathan, M. Green, D. P. Baker, E. Whalley, P. S. Hochman, P. Martin // *J. Pharmacol. Exper. Therapeutics.* — 2001. — V.297(3). — P.1059—1066.
13. *Basu, A.* Structure-Function Engineering of Interferon beta-1b for Improving Stability, Solubility, Potency, Immunogenicity, and Pharmacokinetic Properties by Site-Selective Mono-PEGylation / A. Basu, K. Yang, M. Wang, S. Liu, R. Chintala, T. Palm, H. Zhao, P. Peng, D. Wu, Z. Zhang, H. Hua, M. C. Hsieh, J. Zhou, G. Petti, X. Li, A. Lanjua, M. Mendez, J. Liu, C. Longley, M. Mehlig, V. Borowski, M. Vismanathan, D. Filpula // *Bioconjug. Chem.* — 2006. — V.17. — P.618—630.
14. *Kurfurst, M.M.* Detection and Molecular Weight Determination of Polyethylene Glycol-Modified Hirudin by Staining after Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis // *Analyt. Biochem.* — 1992. — V.200. — P.244—248.
15. PEGfilgrastim: <https://mc.usp.org/monographs/pegfilgrastim-1-0>
16. *Kinstler, O.B.* Characterization and stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF / O.B. Kinstler, D.N. Brems, S. L. Lauren, A. G. Paige, J. B. Hamburger, M. J. Trenheit // *Pharm. Res.* — 1996. — V.13. — P.996—1002.
17. *Fee, C. J.* PEG-Proteins: Reaction Engineering and Separation Issues / C.J. Fee, J.M. Van Alstine // *Chem. Engin. Sci.* — 2006. — V.61(3). — P.924—939.
18. *Clark, R.* Long-acting growth hormones produced by conjugation with poly(ethylene glycol) / R. Clark, K. Olson, G. Fuh, M. Marian, D. Mortensen, G. Teshima, S. Chang, H. Chu, V. Mukku, E. Canova-Davis, T. Somers, M. Cronin, M. Winkler, J. A. Wells // *J. Biol. Chem.* — 1996. — V.271(21). — P. 969—977.
19. *Baker, D.P.* N-terminally PEGylated human interferon-beta-1a with improved pharmacokinetic properties and in vivo efficacy in a melanoma angiogenesis model / D.P. Baker, E.Y. Lin, K. Lin, M. Pellegrini, R.C. Petter, L. L. Chen, R. M. Arduini, M. Brickelmaier, D. Wen, D. M. Hess, L. Chen, D. Grant, A. Whitty, A. Gill, D. J. Lindner, R. B. Pepinsky // *Bioconjugation Chem.* — 2006. — V.17(1). — P.179—188.
20. *Caserman, S.* Correlations between in vitro potency of polyethyleneglycol—protein conjugates and their chromatographic behavior / S. Caserman, M. Kusterle, M. Kunstelj, T. Milunovic, M. Shiefermeier, S. Jevsevar, V. G. Porekar // *Analyt. Biochem.* — 2009. — V.389. — P.27—31.
21. *Wang, Y.S.* Structural and biological characterization of PEGylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications / Y. S. Wang, S. Youngster, M. Grace, J. Bausch, R. Bordens, D. F. Wuss // *Adv. Drug Delivery Rev.* — 2002. — V.54(4). — P.547—570.
22. *Foser, S.* Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon-2a (PEGASYS) / S. Foser, A. Schacher, K.A. Weyer, D. Brugger, E. Dietel, S. Marti, T. Schreitmuller // *Protein Expression. Purification.* — 2003. — V.30. — P.78—87.

D.V. KORZHAVIN<sup>1,2,\*</sup>, T.V. CHERNOVSKAYA<sup>1</sup>,  
Yu.G. EFANOV<sup>1</sup>, E.G. RUDENKO<sup>1</sup>, R.A. IVANOV<sup>1</sup>,  
A.B. PSHENICHNIKOVA<sup>2</sup>, and V.I. SHVETS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The BIOCAD Biopharmaceutical Co., 198515, St-Petersburg Russia

<sup>2</sup>The Lomonosov Moscow State University for Fine Chemical Technology, 119571, Moscow Russia

e-mail: korjavin@biocad.ru

### MonoPEGylated Human Interferon beta-1a Preparation: Optimization of Conditions for N-Terminal Pegylation

A modification of recombinant human IFN beta-1a by polyethylene glycol at  $\alpha$ -amino group of N-terminal methionine has been performed. The PEGylation was conducted using activated butyraldehyde PEG derivative with molecular mass of 30000 Da. As a result of the multifactorial experiment, the dependence of monoPEGylated protein yield on the reaction conditions was demonstrated, and optimal PEGylation conditions were established. We developed a one-step chromatographic purification scheme allowing to obtain the monoPEG-IFN beta-1a conjugate with the above 98% purity. Mass-spectrometric studies showed that the molecular mass of the conjugate is 54130 Da, wherein the N-terminal methionine is associated with one PEG molecule. The obtained PEG-IFN beta-1a has specific antiviral activity, and it can be considered as a perspective candidate to the design of long-acting medicine for the prolonged treatment of multiple sclerosis.

*Key words:* human IFN-beta, modification, multiple sclerosis, polyethylene glycol, prolonged release form.

\* Author for correspondence.