

A Riccardo



UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli studi di Padova
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
in SCIENZE MOLECOLARI
Indirizzo in SCIENZE FARMACEUTICHE
XX CICLO

STUDIO DI SISTEMI SUPRAMOLECOLARI PER IL *DELIVERY* DI PROTEINE TERAPEUTICHE

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Supervisore : Ch.mo Prof. Paolo Caliceti

Correlatore : Dott. Stefano Salmaso

Dottoranda : Sara Bersani

31 gennaio 2008

INDICE

INDICE		I
RIASSUNTO		V
ABSTRACT		VII
INTRODUZIONE		1
1.1	FARMACI PROTEICI: LIMITI ED OPPORTUNITA’	1
1.2	SISTEMI DI <i>DELIVERY</i> PER FARMACI PROTEICI	5
1.2.1	Micro- e nanoparticelle solide	5
1.2.2	Sistemi supramolecolari solubili	7
1.2.3	Bioconiugazione	9
1.3	BIOCONIUGAZIONE “<i>Grafting to</i>” CON POLIMERI PREFORMATI	12
1.3.1	Polietilenglicole	14
1.3.2	PEGhilazione di proteine ad uso terapeutico	16
1.4	BIOCONIUGAZIONE “<i>Growing from</i>” MEDIANTE PROCESSO DI POLIMERIZZAZIONE RADICALICA DI DERIVATI ACRILICI	21
1.4.1.1	Concetti generali sulla polimerizzazione radicalica	21
1.4.1.2	<i>Atom Transfer Radical Polymerization</i>	24
1.4.1.3	<i>Atom Transfer Radical Polymerization</i> a partire dalla superficie di proteine	26

MATERIALI E METODI	29
2.1 MATERIALI	29
2.1.1 Reagenti	29
2.1.2 Strumentazione	30
2.2 METODI	31
2.2.1 Metodi analitici	31
2.2.1.1 Determinazione spettrofotometrica della concentrazione proteica	31
2.2.1.2 Determinazione dei gruppi tiolici liberi (A) e dei gruppi maleimidici (B)	31
2.2.1.3 Determinazione di gruppi amminici primari	31
2.2.1.4 Determinazione del polietilenglicole (PEG)	33
2.2.1.5 Determinazione dei residui aldeidici	33
2.2.1.6 Analisi cromatografiche mediante <i>high performance liquid chromatography</i>	34
2.2.1.6.1 Cromatografia per esclusione molecolare	34
2.2.1.6.2 Cromatografia a fase inversa	34
A. Caratterizzazione di molecole a basso peso molecolare	34
B. Caratterizzazione di proteine	35
2.2.1.7 Analisi di dicroismo circolare	35
2.2.2 Modifica di proteine mediante glicazione	36
2.2.2.1 Sintesi dei <i>linker</i> alchil-glicosilici attivati con gruppi maleimidici	36
2.2.2.1.1 Sintesi del lattonolattone e del maltotriolattone	36
2.2.2.1.2 Sintesi del galattosil-glucon-amide-dodecil-ammina e del maltosil-glucon-amide-dodecilammina	36
2.2.2.1.3 Sintesi del galattosil-glucon-amide-dodecil-amido-propanoilmaleimide e del maltosil-glucon-amide-dodecil-amido-propanoilmaleimide	36
2.2.2.2 Glicazione sito-specifica e PEGhilazione di HSA	37
2.2.2.2.1 Glicazione sito-specifica di Cys ³⁴ di HSA	37
2.2.2.2.2 Ossidazione di glicosil-HSA	37
2.2.2.2.3 PEGhilazione di glicosil-HSA ossidata	38
2.2.2.2.4 Cinetica di spiazzamento del PEG da PEG-glicosil-HSA con carboidrazide	39
2.2.2.2.5 Cinetiche di idrolisi di PEG-glicosil-HSA a differenti pH	39
2.2.2.3 Glicazione sito-specifica e PEGhilazione di rh-G-CSF	40
2.2.2.3.1 Glicazione sito-specifica di Cys ¹⁷ di rh-G-CSF	40
2.2.2.3.2 Ossidazione di maltosil-rh-G-CSF	40
2.2.2.3.3 PEGhilazione di rh-G-CSF	41
2.2.2.4 PEGhilazione di HSA e rh-G-CSF con PEG-maleimide	41
2.2.3 Modifica di proteine mediante <i>Atom Transfer Radical Polymerization</i>	43
2.2.3.1 Sintesi di derivati alchil-bromuro per la modifica sito-specifica di proteine	43
2.2.3.1.1 Sintesi di 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide	43
A. Sintesi di 2-(2-maleimidoetossi)etanolo	43
B. Sintesi di 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide	43
2.2.3.1.2 Sintesi del 2-bromo-isobutirril-cadaverina	43
2.2.3.2 Studi preliminari di ATRP	44
2.2.3.2.1 Sintesi di un probe cromoforico: 2-bromo-isobutirril-trinitrofenil-cadaverina	44
A. Reazione di ATRP con TNP-cadaverina-Br	44
B. Reazione di ATRP con TNP-cadaverina-Br in presenza di rh-GH	45
2.2.3.2.2 Sintesi del macroiniziatore proteico HSA-Br	45
2.2.3.2.3 Reazione di ATRP con HSA-Br	46
2.2.3.2.4 Sintesi del macroiniziatore proteico rh-G-CSF-Br	47
2.2.3.2.5 Reazione di ATRP con rh-G-CSF-Br	48
2.2.3.2.6 Sintesi del macroiniziatore proteico rh-GH-Br ₂	48
2.2.3.2.7 Reazione di ATRP con rh-GH-Br ₂	49

RISULTATI	51
3.1	GLICAZIONE SITO-SPECIFICA E PEGHILAZIONE DI PROTEINE
3.1.1	Sintesi dei <i>linker</i> alchil-glicosilici attivati con gruppi maleimidici
3.1.1.1	Sintesi di lattonolattone e del maltotriionolattone (A)
3.1.1.2	Sintesi del galattosil-glucon-amide-dodecil-ammina e del maltosil-glucon-amide-dodecilammina (B)
3.1.1.3	Sintesi del galattosil-glucon-amide-dodecil-amido-propanoilmaleimide e maltosil-glucon-amide-dodecil-amido-propanoilmaleimide (C)
3.1.2	PEGhilazione di HSA mediante glicazione sito-specifica
3.1.2.1	Glicazione sito-specifica della Cys ³⁴ di HSA
3.1.2.2	Ossidazione selettiva dei residui glicosilici di HSA-glicata con <i>m</i> -periodato
3.1.2.3	Cinetiche di PEGhilazione
3.1.2.4	Caratterizzazione dei bioconiugati ottenuti
3.1.2.5	Cinetica di spiazzamento del PEG da PEG-glicosil-HSA con carboidrazide
3.1.2.6	Cinetiche di idrolisi di PEG-glicosil-HSA in funzione del pH
3.1.3	PEGhilazione di rh-G-CSF mediante glicazione sito-specifica
3.1.3.1	Glicazione sito-specifica della Cys ¹⁷ di rh-G-CSF ed ossidazione selettiva dei residui glicosidici con <i>m</i> -periodato di sodio
3.1.3.2	PEGhilazione di maltosil-rh-G-CSF ossidato
3.2	POLIMERIZZAZIONE RADICALICA DI DERIVATI ACRILICI E METACRILICI A PARTIRE DA MACROINIZIATORI PROTEICI
3.2.1	Sintesi di 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide
3.2.2	Sintesi di 2-bromo-isobutirril-cadaverina
3.2.3	Studi preliminari di ATRP
3.2.3.1	Sintesi di <i>probe</i> cromoforico: 2-bromo-isobutirril-trinitrofenil-cadaverina
3.2.3.2	Reazione di ATRP con TNP-cadaverina-Br
3.2.3.3	Reazione di ATRP con TNP-cadaverina-Br in presenza di rh-GH
3.2.4	Sintesi di macroinizzatori proteici e polimerizzazione ATRP
3.2.4.1	Sintesi di HSA-Br
3.2.4.2	Reazione di ATRP di monomeri acrilici a partire da HSA-Br
3.2.4.3	Sintesi di rh-G-CSF-Br
3.2.4.4	Reazione di ATRP di monomeri acrilici a partire da rh-G-CSF-Br
3.2.4.5	Sintesi di rh-GH-Br ₂
3.2.4.6	Reazione di ATRP di PEGMA a partire da rh-GH-Br ₂
DISCUSSIONE	91
CONCLUSIONI	103
BIBLIOGRAFIA	105

RIASSUNTO

In questo lavoro di tesi si sono studiate nuove tecniche di modifica sito-specifica di proteine utilizzando *linker* a basso peso molecolare.

Nella prima parte della ricerca sono state sintetizzate piccole molecole glicosidiche derivatizzate con catene alchiliche e successivamente attivate con una funzione maleimidica per la modifica selettiva di cisteine (Cys) di proteine. I linker glicosilici ottenuti sono stati coniugati a Cys poco accessibili di albumina di siero umano (HSA) e di fattore stimolante la formazione di colonie granulocitarie (rh-G-CSF). Successivamente, polietilenglicole funzionalizzato con un gruppo idrazinico (PEG-Hz) è stato legato ai residui aldeidici ottenuti per ossidazione selettiva delle funzioni glicosidiche con *m*-periodato.

Questa strategia *multi-step* ha permesso di ottenere bioconiugati di tipo “*flag-type*”, caratterizzati da una iper-PEGhilazione sito-specifica. Questa tecnica, infatti, consente di inserire varie catene di PEG unicamente a livello della porzione glicosilica della *neo*-glicoproteina. Inoltre, il polimero si lega alla proteina attraverso un legame idrazonico reversibile che si idrolizza nel tempo con cinetiche pH-dipendenti e che, per questo motivo, garantisce un graduale e lento rilascio della proteina nella forma dePEGhilata più attiva.

Nella seconda parte del lavoro sono stati condotti alcuni studi preliminari di polimerizzazione radicalica su proteine terapeutiche utilizzando la tecnica di *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP). Sono stati sintetizzati due differenti derivati alchil-alogenuri: il 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide ed il 2-bromo-isobutirril-cadaverina. I due *linker* sono stati utilizzati per modificare selettivamente alcuni aminoacidi di proteine modello, quali HSA, rh-G-CSF ed ormone della crescita (rh-GH). I 2-isobutirril-derivati sintetizzati sono stati caratterizzati mediante differenti tecniche che confermano l'avvenuta modifica delle proteine native. Questi macro-iniziatori proteici sono in grado di generare, in opportune condizioni di reazione, radicali attivi che innescano le reazioni di polimerizzazione di monomeri acrilici. Si è quindi proceduto alla polimerizzazione di polietilenglicole metacrilato (PEGMA), anche se, tuttavia, gli studi preliminari di ATRP non hanno dato risultati molto soddisfacenti. Sarà quindi necessario sperimentare condizioni di reazione più favorevoli per l'ottenimento dei bioconiugati desiderati.

ABSTRACT

Novel strategies for site-specific protein modification have been investigated by using low molecular weight linkers.

In the first part of the study, glycoside-derivatives have been obtained by conjugation of alkyl chains and then activated with a maleimido function for selective derivatization of cysteines. The linkers were used to modify the free cysteins (Cys) of serum albumin (HSA) and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rh-G-CSF). Hydrazide polyethyleneglycole (PEG-Hz) was conjugated to the aldehydes groups generated by selective oxidation of the glycosides with periodate. This PEGylation strategy yielded "flag-type" bioconjugates as several PEG chains are attached to the glycosidic residues of the semi-synthetic *neo*-glycoprotein. The PEG-Hz conjugation to the oxidized glycosides yields pH-dependent cleavable hydrazone bonds which allow for PEG release. Therefore, un-PEGylated active protein can be released over time under physiological conditions.

In the second part of the work preliminary studies of polyethylene methacrylate (PEGMA) radical polymerization from protein surface were conducted in aqueous solution using the Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) technique.

Two different alkyl halide derivatives were synthesized: 2-bromo-isobutyryl-ethoxyethyl-maleimide and 2-bromo-isobutyryl-cadaverine. The linkers were used to modify selectively aminoacids of protein models: HSA, rh-G-CSF and recombinant human growth hormone (rh-GH) and to yield macro-initiators. The synthesized 2-bromo-isobutyryl-derivatives have been characterized by chromatographic and spectrometric techniques. However, preliminary studies of radical polymerization using ATRP from the protein surfaces did not give reasonable results. Therefore more detailed investigation will be worked up in order to set up a convenient polymerization protocol.

INTRODUZIONE

L'entrata di farmaci biotecnologici nello scenario farmaceutico rappresenta la più grande innovazione ed opportunità terapeutica dell'ultimo decennio. Molecole di natura peptidica e proteica sono infatti caratterizzate da una elevata selettività ed attività farmacologica, proprietà che le rendono agenti terapeutici spesso insostituibili nel trattamento di gravi patologie. Tuttavia, nonostante l'elevato potenziale farmacologico, l'impiego clinico di tali agenti terapeutici è spesso limitato dalle loro inadeguate caratteristiche chimico-fisiche e biofarmaceutiche.

L'elevata complessità strutturale rende le macromolecole proteiche fragili e facilmente inattivabili da processi di tipo sia fisico, chimico che enzimatico, che possono verificarsi durante le varie fasi di formulazione, conservazione o somministrazione. La rapida eliminazione dal circolo di questi farmaci attraverso vari meccanismi tra cui l'ultrafiltrazione glomerulare e l'*uptake* epatico riduce significativamente la loro biodisponibilità. Il carattere macromolecolare e l'elevata idrofilia prevengono l'assorbimento attraverso le membrane biologiche e rendono difficile la loro somministrazione. Infine, le intrinseche caratteristiche immunologiche di tali macromolecole, immunogenicità e antigenicità, spesso rappresentano un'importante limitazione per il loro impiego terapeutico.

I problemi biofarmaceutici che limitano l'uso di farmaci proteici possono essere in parte superati mediante la realizzazione di innovativi sistemi di formulazione che permettono di migliorarne la stabilità e, in alcuni casi, di controllarne la velocità di rilascio, di ridurre gli effetti collaterali e di ottimizzare il regime di dosaggio, con un conseguente miglioramento della *compliance* del paziente.

Attraverso approcci multidisciplinari la tecnologia farmaceutica moderna ha sviluppato nuove ed interessanti tecniche di *drug delivery* per farmaci proteici quali, ad esempio, microsfele e nanosfele polimeriche e lipidiche, liposomi, assemblati fisici solubili di vario tipo e bioconiugati polimerici.

Tra le tecniche di formulazione di farmaci proteici di maggiore successo vi è senza dubbio la modifica superficiale di proteine con polimeri biocompatibili e solubili, quali poliacrilati, polialchilglicoli, polisaccaridi, acido polisialico, ecc. In particolare, significativi

risultati sono stati ottenuti attraverso la PEGhizzazione di proteine, come testimoniano i molti prodotti già entrati in terapia che presto hanno guadagnato una posizione di rilievo nel mercato farmaceutico come *blockbuster*.

Con questo progetto di ricerca si sono studiate alcune nuove tecniche di bioconiugazione per la modifica sito-specifica di proteine con polimeri solubili.

Con la prima strategia di bioconiugazione si è voluto studiare la possibilità di PEGhizzare proteine a livello di aminoacidi poco accessibili che difficilmente sono modificabili per diretta coniugazione con polietilenglicole. Tra questi aminoacidi vi sono, ad esempio, le cisteine che costituiscono interessanti e rari siti di coniugazione, ma che usualmente sono nascoste e protette all'interno di tasche idrofobiche in modo da prevenire il processo di dimerizzazione attraverso la formazione di ponti disolfuro.

Con il secondo approccio, invece, si è voluto studiare una innovativa tecnica di polimerizzazione che consente di costruire polimeri fatti su misura sulla superficie delle proteine e che permette così di ottenere derivati con peculiari caratteristiche chimico-fisiche e biofarmaceutiche e nuove potenzialità terapeutiche.

1.1 FARMACI PROTEICI: LIMITI ED OPPORTUNITA'

I progressi degli ultimi decenni in ambito biotecnologico hanno portato alla conoscenza di molti meccanismi cellulari o molecolari alla base di varie patologie, permettendo così l'individuazione di nuovi *target* farmacologici e la scoperta di nuove molecole proteiche ed oligonucleotidiche con elevato potenziale terapeutico [1,2]. Lo sviluppo terapeutico di farmaci di natura peptidica è oggi possibile grazie alle nuove tecniche di fermentazione, ibridoma e di DNA ricombinante che consentono di ottenere su larga scala farmaci biotecnologici di terza generazione: "proteine ricombinanti altamente modificate (proteine mutate in più posizioni, proteine chimeriche, fusioni di proteine, ecc.), molecole nuove con differenti attività e nuovi impieghi clinici molto diverse dalle proteine naturali".

L'attenzione dell'industria farmaceutica verso i farmaci biotecnologici è in continua crescita e questo grazie ai numerosi vantaggi terapeutici che tali molecole presentano rispetto a farmaci tradizionali. Infatti, le proteine possiedono elevata attività biologica e specificità d'azione, caratteristiche che li rendono spesso agenti terapeutici unici nel trattamento di molte patologie [3]. Farmaci biotecnologici sono impiegati nella terapia antitumorale (anticorpi monoclonali, citochine, ecc.), nella cura di patologie cardiache (enzimi e fattori del sangue), nella cura del diabete (insulina) e nella terapia sostitutiva di malattie genetiche che causano la deficienza di alcune proteine (ormoni ed enzimi). In Tabella I è riassunto lo sviluppo del mercato farmaceutico delle principali classi di farmaci proteici con la previsione di mercato per i prossimi anni.

Product class	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	CAGR
Erythropoietins	7,763	8,136	8,473	9,268	9,777	10,893	11,779	6.1
Monoclonal antibodies	6,721	11,079	13,986	17,734	20,599	36,399	45,352	31.4
Insulin and insulin analogues	5,487	6,551	7,940	9,236	10,772	13,828	17,363	17.9
Interferons	3,935	3,692	3,825	4,050	4,392	4,983	5,828	5.8
Therapeutic hormones (including growth hormones)	3,317	3,895	4,186	4,280	4,456	4,990	5,799	8.3
Blood factors	2,354	2,598	2,595	2,679	2,998	3,215	3,432	5.5
Enzyme replacement therapies	1,057	1,203	1,374	1,533	1,713	2,111	2,738	14.6
Interleukins	219	224	229	237	250	260	273	3.2
Other therapeutic hormones	121	111	72	212	520	1,595	2,514	N/A
Total	30,974	37,489	42,680	49,229	55,477	78,274	95,078	17.4

Tabella I: Principali classi di farmaci proteici presenti nel mercato farmaceutico e previsioni di mercato per i prossimi anni.

La conservazione delle caratteristiche strutturali proteiche rappresenta un requisito fondamentale per il mantenimento della loro attività biologica e il principale problema per il loro sviluppo clinico. I principali problemi, che limitano l'impiego di questa classe di farmaci, sono infatti dovuti alla loro elevata complessità e fragilità strutturale che li rendono facilmente inattivabili per denaturazione e degradazione chimica, fisica o enzimatica durante le fasi di produzione, formulazione, conservazione o somministrazione.

Tra i principali meccanismi di degradazione chimica di molecole proteiche vi sono l'ossidazione di cisteine e metionine, la deamidazione di asparagina e glutammina, l'idrolisi di legami peptidici a livello di residui di acido aspartico, fenomeni di β -eliminazione, fenomeni di reticolazione a livello di lisine o cisteine, riduzione o scambio di ponti disolfuro di cistine, isomerizzazione e racemizzazione di aminoacidi.

Processi di denaturazione fisica determinano la perdita della struttura tridimensionale delle proteine a livello secondario, terziario e quaternario (Figura 1.1).

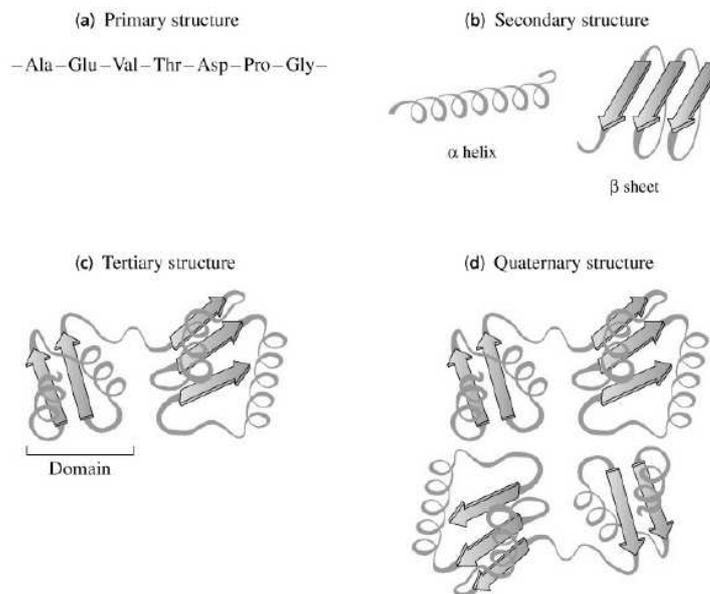


Figura 1.1.: Organizzazione strutturale delle proteine.

Questa complessa organizzazione strutturale dipende da interazioni idrofobiche, elettrostatiche, legami idrogeno, propensità intrinseche, forze di Van der Waals e ponti disolfuro. La rottura di questi legami e la perdita strutturale provoca l'esposizione di aminoacidi idrofobici (Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe Trp, Cys) che normalmente sono disposti

all'interno della struttura proteica causando conseguente diminuzione di solubilità, aggregazione, adsorbimento e denaturazione interfacciale.

Sebbene i processi di degradazione chimica e fisica siano eventi di diverso tipo, questi avvengono spesso in modo correlato e conseguente. Ad esempio la perdita strutturale di una proteina può dare luogo a fenomeni di degradazione chimica così come una degradazione chimica comporta un processo di denaturazione. Le principali cause di degradazione e denaturazione di proteine sono legate al processo formulativo (temperatura, pressione, forze di taglio, mescolamento e agitazione, radiazioni, atmosfera, solventi organici, contaminanti, pH, forza ionica, radicali liberi, ecc.), all'impiego di eccipienti (polimeri, lipidi, fosfolipidi, ecc.), co-eccipienti e additivi (tamponi, sali, agenti chelanti, gas inerti, surfattanti, stabilizzanti, zuccheri, polimeri, aminoacidi, conservanti ecc.), alla concentrazione.

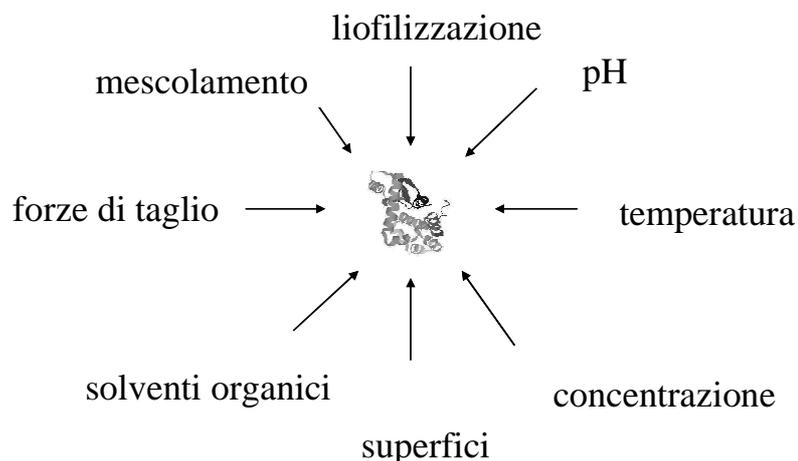


Figura 1.2.: Principali cause di degradazione delle proteine [Kissel T, Koneberg R. 1996].

Un altro importante fattore di instabilità è costituito dagli enzimi proteolitici. Endo- ed esopeptidasi catalizzano la reazione di idrolisi dei legami peptidici e provvedono alla frammentazione della catena polipeptidica. Tali enzimi sono ubiquitari e sono altamente rappresentati a livello della maggior parte dei tessuti biologici per cui la degradazione enzimatica rappresenta uno dei principali fattori che limitano la stabilità di questi farmaci durante la somministrazione. In particolare l'elevato contenuto di enzimi proteolitici nelle membrane intestinali e polmonari riduce fortemente la biodisponibilità di farmaci proteici in seguito a somministrazione orale e polmonare. Per questa ragione, questi farmaci vengono principalmente somministrati per via endovenosa e difficilmente vengono somministrati per

vie che prevedono una fase di assorbimento. Una volta somministrati, inoltre, subiscono rapida *clearance* dal circolo plasmatico. Peptidi e proteine con peso molecolare inferiore ai 65 kDa vengono usualmente eliminati per via renale, mentre proteine con peso molecolare maggiore possono essere eliminate per via renale dopo frammentazione, oppure vengono eliminate attraverso altre vie quali ad esempio la via epatica. Il cut-off di 65 kDa è stato calcolato sulla base del peso molecolare di albumina che in condizioni fisiologiche non subisce ultrafiltrazione renale e viene trattenuta nel circolo sanguigno.

L'intrinseco carattere immunogenico e antigenico delle proteine rappresenta un ulteriore importante limite all'impiego terapeutico di molecole proteiche. Proteine eterologhe, ottenute da piante, microrganismi, o di origine animale presentano un elevato carattere immunogenico a causa delle significative variazioni strutturali rispetto alle proteine umane. Tuttavia, anche nel caso di proteine omologhe, i processi di estrazione da organi e tessuti, di manipolazione e di conservazione possono indurre variazioni strutturali nella proteina e renderla di conseguenza immunogenica ed antigenica.

Sebbene i nuovi processi di tecnologia ricombinante abbiano in parte risolto il problema di approvvigionamento di proteine omologhe, il problema dell'immunogenicità di farmaci proteici rimane aperto. Proteine ricombinate umane, ottenute da microrganismi o da cellule di mammifero, possono presentare un carattere immunogenico in seguito a variazioni sequenziali strutturali, quali mancata o anomala glicosilazione. Inoltre, alterazioni strutturali possono verificarsi durante le fasi di produzione e purificazione [4,5,6].

E' pertanto chiaro che per favorire l'impiego in terapia dei farmaci proteici è necessario sviluppare nuove strategie formulative che consentano di superare almeno in parte i limiti chimico-fisici, farmacocinetici ed immunologici. In questo senso sono state seguite sostanzialmente due vie di sviluppo differenti ma strettamente correlate tra loro: l'ottenimento di nuovi derivati proteici con migliori proprietà biofarmaceutiche rispetto alla proteina nativa di riferimento e lo sviluppo di nuove formulazioni.

1.2 SISTEMI DI *DELIVERY* PER FARMACI PROTEICI

Negli ultimi anni, grazie ad un approccio multidisciplinare che coinvolge vari settori della ricerca, quali la chimica dei polimeri, la bioingegneria, la biochimica e la fisiologia, la moderna tecnologia farmaceutica ha sviluppato diversi sistemi di *drug delivery* per farmaci proteici. Tali sistemi sono progettati in modo da migliorare la *performance* terapeutica del farmaco proteico mediante rilascio lento e prolungato, aumentata permanenza in circolo, migliore solubilità e stabilità, facile assorbimento attraverso le membrane, ridotta immunogenicità e antigenicità, ecc. Tra le più studiate formulazioni per il *delivery* di proteine vi sono micro- e nano-particelle polimeriche, lipidiche o inorganiche, sistemi solubili supramolecolari fisici quali micelle, liposomi, assemblati di diverso tipo, bioconiugati [7].

1.2.1 Micro- e nanoparticelle solide

Sistemi micro- e nanoparticellari solidi sono stati ampiamente studiati per la somministrazione sottocutanea per il rilascio prolungato di proteine. Tuttavia solo un numero limitato di prodotti microparticellari, principalmente contenenti polipeptidi, sono stati effettivamente introdotti in terapia.

Microsfere per il *drug delivery* vengono per lo più preparate con polimeri biodegradabili e biocompatibili, quali ad esempio poliortoesteri, poliuretani, polianidridi, policarbonati, polifosfazeni e poliesteri. In Tabella II è riportato un elenco di prodotti impiegati per la preparazione di sistemi microparticellari studiati per la veicolazione di proteine.

Proteine Naturali	Polisaccaridi Naturali	Polimeri Sintetici
Albumina	Chitosan	Poliortoesteri
Collagene	Destrano	Polianidridi
Inulina	Amido	Poliammidi
Fibrinogeno	Acido Ialuronico	Polialchilcianoacrilati
Gelatina	Pullulano	Poliesteri
Caseina	Alginato	Policaprolattoni
	Cellulosa	Policaprolattoni aggraffati su PVA (o sulfobutil-PVA)
		Polifosfazeni
		Pseudo-poli-aminoacidi
		Polimetidilene Malonato

Tabella II. Elenco di prodotti utilizzati per la preparazione di sistemi microparticellari per la veicolazione di proteine.

Nel corso degli anni sono state messe a punto varie tecniche di preparazione che ne consentono la produzione industriale su larga scala, come ad esempio tecniche di *spray-drying*, *spray-congealing* e tecniche basate sull'impiego di fluidi supercritici.

Sebbene i sistemi microparticellari siano tra le formulazioni più interessanti per la veicolazione di proteine, il loro sviluppo rimane comunque difficile a causa della difficoltà di incorporamento del farmaco, della sua instabilità fisica e chimica e del difficile controllo delle cinetiche di rilascio.

Le condizioni di preparazione di sistemi microparticellari polimerici spesso provocano la denaturazione e degradazione della proteina. I polimeri utilizzati sono infatti usualmente materiali idrofobici la cui manipolazione richiede l'impiego di solventi organici e condizioni operative che provocano facilmente la denaturazione e inattivazione di proteine. Inoltre, la degradazione del polimero durante il rilascio del farmaco può alterare le condizioni microambientali in cui si trova la proteina degradandola o denaturandola. Un tipico esempio è dato dalla degradazione di poliesteri che porta alla formazione di acidi carbossilici con conseguente diminuzione di pH all'interno della matrice polimerica. Tale diminuzione di pH rappresenta spesso una delle principali cause di denaturazione e degradazione di proteine e in alcuni casi si sono osservate vere e proprie reazioni chimiche tra gruppi carbossilici liberati e funzioni proteiche. Per quanto riguarda il rilascio del farmaco dalle microparticelle uno dei principali problemi è l'effetto *burst*, rilascio immediato, che spesso compromette l'efficienza terapeutica della formulazione. L'effetto *burst* è dovuto alla elevata idrofilicità della proteina che viene facilmente rilasciata dalla matrice idrofila. Molti studi sono stati condotti negli ultimi anni per mettere a punto adeguati metodi di preparazione di microsferiche polimeriche in modo da ovviare ai problemi di instabilità e di rapido rilascio della proteina. Ad esempio, l'intrappolamento di proteina allo stato solido nella matrice polimerica così come l'impiego di co-eccipienti che mantengono le condizioni microambientali fisiologiche durante il rilascio hanno portato ad un miglioramento della stabilità. Migliori cinetiche di rilascio sono state invece ottenute aggiungendo modificatori del rilascio come ad esempio polimeri idrofilici.

Un problema ancora aperto è tuttavia la sterilizzazione di queste formulazioni. Tecniche di sterilizzazione chimiche o di filtrazione non possono essere impiegate a questi prodotti mentre l'impiego di radiazioni sterilizzanti possono infatti portare ad alterazioni e degradazioni della struttura polimerica e del farmaco incorporato [8].

Le nanoparticelle sono definite, in ambito tecnologico, come “sistemi colloidali formati da particelle solide di dimensioni comprese tra 1 e 1000 nm (1 μ m)”. Tali formulazioni sono state impiegate per la veicolazione di proteine che possono essere intrappolate all’interno della matrice oppure adsorbite o coniugate sulla superficie per essere veicolate e successivamente rilasciate nel sito d’azione. Le nanoparticelle possono essere prodotte utilizzando diversi materiali quali polimeri (*polymeric nanoparticles*, PNPs) e lipidi (*solid lipid nanoparticles*, SLNs).

Analogamente alle microsfele polimeriche, le nanoparticelle presentano problemi di efficienza di incorporamento e rapido rilascio di farmaco per cui sono stati utilizzati differenti co-ecipienti idrofilici, in grado di bilanciare le caratteristiche idrofiliche e lipofiliche della matrice e che permettono di ottenere sistemi con migliori caratteristiche biofarmaceutiche. In letteratura sono riportati molti studi che confermano la capacità di questi sistemi di attraversare la mucosa epiteliale in seguito a somministrazioni orale, nasale, polmonare, ecc., e di aumentare quindi la biodisponibilità delle proteine veicolate. Una volta in circolo, si accumulano in siti bersaglio attraverso meccanismi attivi o passivi, dove rilasciano il farmaco con meccanismi di diffusione passiva o in seguito a processi di erosione e degradazione della matrice. La somministrazione locale assicura invece un’azione localizzata ad opera di componenti cellulari e sub-cellulari, come nucleo ed organelli [9].

1.2.2 Sistemi supramolecolari solubili

Sistemi supramolecolari solubili sono formati per aggregazione spontanea di macromolecole idrofiliche o anfifiliche mediante interazioni deboli di Van der Waals, ioniche, legami ponte idrogeno, ecc. Tipici esempi di sistemi supramolecolari solubili sono: liposomi, micelle, aggregati, complessi macromolecolari, bioconiugati proteici, gel, vescicole, ecc. [10].

I liposomi sono vescicole colloidali formate da un doppio strato fosfolipidico simile alle membrane biologiche. Per la loro elevata biocompatibilità e capacità di intrappolare sia molecole idrofiliche, nel *core* acquoso, che lipofile, nel doppio strato fosfolipidico, sono ampiamente studiati per il delivery di farmaci a basso peso molecolare e proteici. I liposomi possono essere somministrati attraverso tutte le vie di somministrazione provvedendo sia ad un rilascio locale che sistemico del farmaco e favorendo l’assorbimento di farmaci attraverso

le mucose grazie ad una prolungata permanenza in circolo e alla capacità di fondersi con le membrane cellulari e rilasciare il farmaco selettivamente in cellule e tessuti bersaglio. La tecnologia moderna consente di ottenere liposomi con diversa composizione e struttura rendendo tali formulazioni particolarmente versatili. In particolare i liposomi possono essere derivatizzati sulla superficie con molecole in grado di modificarne il carattere idrofilico/lipofilo o con molecole direzionanti. L'uso di polimeri anfifilici, quali il polietilenglicole, ha permesso di ottenere liposomi di tipo “*stealth*” che prevengono l'adsorbimento sulla superficie di opsonine. In tal modo si previene l'*uptake* da parte di cellule fagocitiche e si ottengono *long-circulating liposomes* con prolungata permanenza nel circolo sanguigno. La derivatizzazione di liposomi con anticorpi, frammenti di anticorpi o altre molecole quali transferrina e acido folico ha permesso di ottenere vescicole con selettività per alcune cellule e tessuti e quindi utilizzabili nel *targeting* attivo [11].

I sistemi micellari sono strutture sovramolecolari con dimensioni variabili tra 10-100 nm ottenute per assemblamento spontaneo di molecole anfifiliche. Questi sistemi sono stati sviluppati per veicolare farmaci poco solubili la cui attività farmacologica è compromessa dalla bassa biodisponibilità. Nel caso della veicolazione di farmaci proteici la frazione lipofila dei polimeri può inserirsi in tasche idrofobiche delle proteine, mentre la frazione idrofila rimane all'esterno garantendone il mantenimento della solubilità. Alcuni materiali impiegati per questi scopi sono i derivati polimerici denominati Medusa® in cui una catena idrofobica di poli-leucina è legata ad una catena idrofila di PEG. Altri polimeri anfifilici impiegati per la preparazione di questi super-assemblati sono poli-idrossiaspartammidi o pullulani aggraffati con molecole alchiliche. Le proprietà di *self-assembly* di polimeri anfifilici lineari, o con struttura “*comb-like*”, permettono di ottenere aggregati supramolecolari o micellari-simili capaci di inglobare la proteina nel *core* idrofobico e di proteggerla dal riconoscimento del sistema immunitario e di enzimi proteolitici, di garantire un lento rilascio dopo somministrazione parenterale o sottocutanea con conseguente aumento della emivita plasmatica della proteina stessa [12,13,14].

1.2.3 Bioconiugazione

Con il termine “bioconiugazione” si intende la modifica covalente di sostanze ad attività biologica con molecole o macromolecole con particolari caratteristiche chimico-fisiche e biofarmaceutiche. Nel caso di proteine terapeutiche una delle più comuni applicazioni della bioconiugazione è il legame di polimeri solubili sulla superficie proteica che consente di ottenere bioconiugati supramolecolari con migliori caratteristiche terapeutiche rispetto alla proteina nativa.

La prospettiva strutturale e funzionale dei bioconiugati proteina-polimero è molto diversa da quella dei bioconiugati che si ottengono con farmaci a basso peso molecolare e polimeri. In quest’ultimo caso infatti il polimero svolge il ruolo di *carrier* macromolecolare in cui molecole di farmaco a basso peso vengono legate covalentemente e rilasciate attraverso processi di idrolisi chimica o enzimatica a livello di tessuti bersaglio dove svolgono la loro azione terapeutica. Questi sistemi si ottengono generalmente utilizzando polimeri multifunzionali che consentono il legame di varie molecole di farmaco al *backbone* polimerico. Al contrario, per la preparazione di bioconiugati proteina-polimero vengono impiegate una o più catene polimeriche monofunzionali che vengono legate alla superficie proteica. Il polimero, infatti, non svolge funzione di trasportatore, ma conferisce al farmaco proteico un elevato volume idrodinamico ed una maggiore solubilità, proteggendolo dal riconoscimento enzimatico e del sistema immunitario.

Solitamente il legame polimero-proteina è un legame stabile in condizioni fisiologiche e quindi il bioconiugato proteico svolge la sua azione biologica come tale e non in seguito al distacco del polimero dalla proteina. E’ quindi chiaro che la strategia di modifica di proteine con polimeri ricopre un ruolo chiave nell’ottenimento di derivati con adeguate caratteristiche chimico-fisiche, immunologiche, farmacocinetiche e di conseguenza terapeutiche [15]. In Figura 1.3 sono riportati alcuni esempi di strategie di bioconiugazione che si possono seguire per la modifica di proteine.

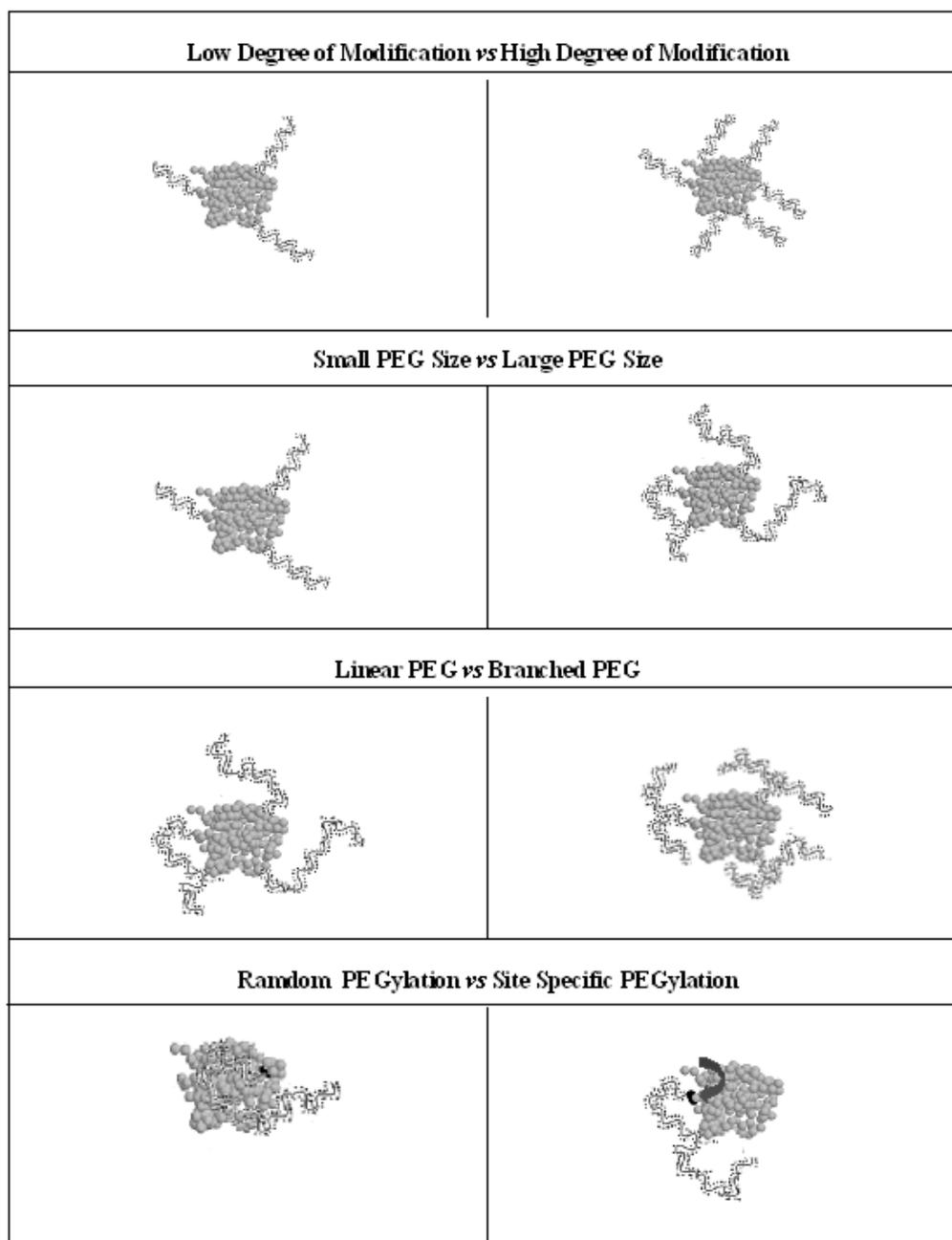


Figura 1.3.: Differenti modelli di coniugati proteici che si possono ottenere per bioconiugazione [Salmaso S, Bersani S, Semenzato A, Caliceti P. 2006].

Dal punto di vista chimico la bioconiugazione di proteine con polimeri preformati può essere schematicamente suddivisa in due principali categorie (Figura 1.4): metodi di bioconiugazione diretta (A) e di bioconiugazione indiretta (B) [16].

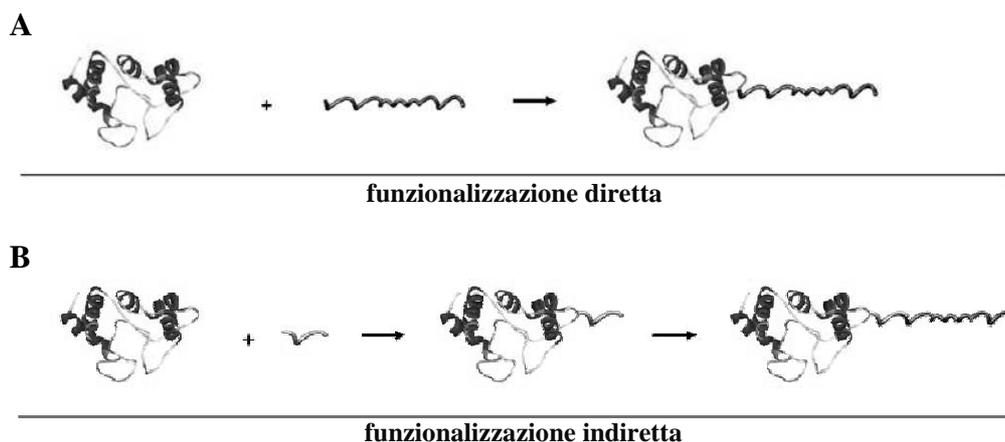


Figura 1.4.: Rappresentazione schematica di possibili strategie di bioconiugazione di proteine: metodo di funzionalizzazione diretta (A) e metodo di funzionalizzazione indiretta (B) [Thordarson, Le Droumaguet B, Velonia K. 2006].

Nel primo caso la proteina viene direttamente derivatizzata con polimeri a livello di alcuni siti di ancoraggio naturali, quali i residui aminoacidici o glicosilici esposti sulla superficie proteica. Nel secondo caso invece vengono utilizzati opportuni *linker* che vengono artificialmente introdotti nella struttura proteica e che diventano in un secondo momento il sito di legame per il polimero.

Il processo di bioconiugazione diretta è semplice ma non sempre selettivo in quanto molte proteine non presentano specifici punti di ancoraggio. Inoltre, la coniugazione di due macromolecole (polimero e proteina) stericamente ingombrate è un processo cineticamente sfavorito e di conseguenza non sempre efficiente. L'impiego di *linker*, invece, permette l'inserimento nella struttura proteica di specifici siti di legame per il polimero e, sebbene il processo sia sicuramente più complesso rispetto al precedente, esso consente di ottenere in modo più accurato derivati in cui il polimero è legato alla proteina in modo sito-specifico.

Negli ultimi anni, accanto alla metodica di bioconiugazione con polimeri preformati, definita come “*grafting to*”, sono state sviluppate alcune tecniche alternative che permettono di ottenere bioconiugati con caratteristiche strutturali definite e con elevato grado di purezza. Si tratta di metodiche *multi-step* di tipo “*growing from*” che prevedono una iniziale funzionalizzazione della proteina con *linker* iniziatori che, in opportune condizioni di reazione, sono in grado di iniziare un processo di polimerizzazione di monomeri di piccole dimensioni direttamente in soluzione a partire dalla superficie proteica. Contrariamente ai

bioconiugati ottenuti con metodiche “*grafting to*”, i prodotti ottenuti mediante tecniche di “*growing from*” possono essere facilmente purificati attraverso semplici processi di gel filtrazione, ultrafiltrazione e dialisi che consentono di isolare efficientemente il bioconiugato macromolecolare dai reattivi a basso peso molecolare (monomero, iniziatore, catalizzatore, ecc.) utilizzati.

1.3 BIOCONIUGAZIONE “*Grafting to*” CON POLIMERI PREFORMATI

La modifica di proteine terapeutiche con polimeri solubili è considerata oggi una delle tecniche più interessanti, semplici e consolidate per migliorare le caratteristiche chimico-fisiche, biofarmaceutiche ed infine terapeutiche di questa classe di farmaci.

I primi esempi di modifica di proteine con polimeri preformati risalgono agli anni '70 quando streptochinasi fu modificata con destrano [17] e superossido dismutasi fu coniugata ad albumina [18]. Sebbene questi derivati non siano stati sviluppati come prodotti farmaceutici, questi studi hanno aperto nuove e interessanti prospettive per l'impiego di proteine terapeutiche. Infatti, la natura multifunzionale dei polimeri usati (destrano o albumina) e delle proteine ha prodotto derivati eterogenei in cui il rapporto proteina/polimero non è ben definito.

Il primo coniugato polimero-proteina entrato effettivamente in terapia è lo SMANCS (Figura 1.5).

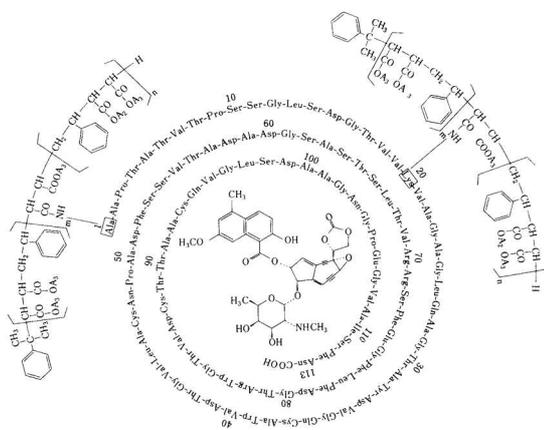


Figura 1.5.: SMANCS.

Questo derivato, ancor oggi in uso in Giappone nel trattamento di tumori epatici, è stato ottenuto in condizioni controllate legando 3 molecole: una molecola di neocarzinostatina, potente farmaco antitumorale, e due catene del copolimero stirene-anidride maleica. La coniugazione della piccola proteina al polimero ha permesso di prolungarne la permanenza *in vivo* migliorandone il profilo farmacocinetico e rendendo tale farmaco terapeuticamente efficace [19].

Il principale aspetto della bioconiugazione a polimeri solubili sulla superficie di proteine è quello di ottenere derivati macromolecolari con elevati volumi idrodinamici che non vengono rapidamente eliminati per ultrafiltrazione glomerulare e che, per questa ragione, permangono in circolo per tempi maggiori rispetto alle proteine native.

Un altro importante effetto della bioconiugazione ai polimeri è la protezione della proteina dalla degradazione enzimatica e dal riconoscimento da parte del sistema immunitario. E' importante osservare come la diminuzione del potenziale immunogenico ed antigenico ha favorito l'impiego terapeutico anche di proteine non omologhe come nel caso di L-Asparaginasi, enzima estratto da *Vibrio succinogenes*, che viene impiegato come chemioterapico nel trattamento della leucemia linfoblastica acuta. L'impiego terapeutico di questa proteina è stato reso possibile grazie alla modifica con PEG che ne ha ridotto drasticamente il carattere immunogenico e antigenico [20].

Il legame del polimero alla proteina può migliorare anche la stabilità chimica e fisica della proteina prevenendo fenomeni di aggregazione o adsorbimento su superfici idrofobiche. Inoltre, *in vivo* il polimero può ridurre fenomeni più o meno specifici di *uptake* cellulare o interazioni della proteina con strutture biologiche che da un lato possono migliorare il suo profilo farmacocinetico, ma dall'altro possono compromettere lo svolgimento dell'attività farmacologica [21].

I polimeri impiegati nella preparazione di bioconiugati devono possedere alcuni requisiti generali: biocompatibilità locale e sistemica, mancanza di immunogenicità ed antigenicità, solubilità e devono essere facilmente eliminati come tali o dopo degradazione.

Per la modifica di proteine sono stati studiati vari polimeri a diversa composizione chimica e struttura, quali: polisaccaridi, come destrani e acido polisialico; polimeri peptidici, come polilisina e poliglutamato; proteine, quali albumina e fibrinogeno; poliacrilati, come poliidrossipropilacrilamide, poliacrililormofolina; copolimeri derivati dell'anidride maleica, quali poli-(divinil-etere-co-anidride maleica, poli(stirene-co-anidride maleica); polivinili,

come polivinilpirrolidone e il polivinilalcol; e polialchilglicoli, come ad esempio polietilenglicole.

1.3.1 Polietilenglicole

Per le sue eccellenti caratteristiche chimico-fisiche e biologiche il polietilenglicole (PEG) è il polimero di I^a scelta per la modifica di proteine terapeutiche.

PEG è un polimero sintetico che si ottiene per polimerizzazione anionica dell'ossido di etilene. La reazione viene iniziata dall'attacco nucleofilo di uno anione (RO⁻) e procede secondo lo schema sintetico riportato in Figura 1.6 [22].

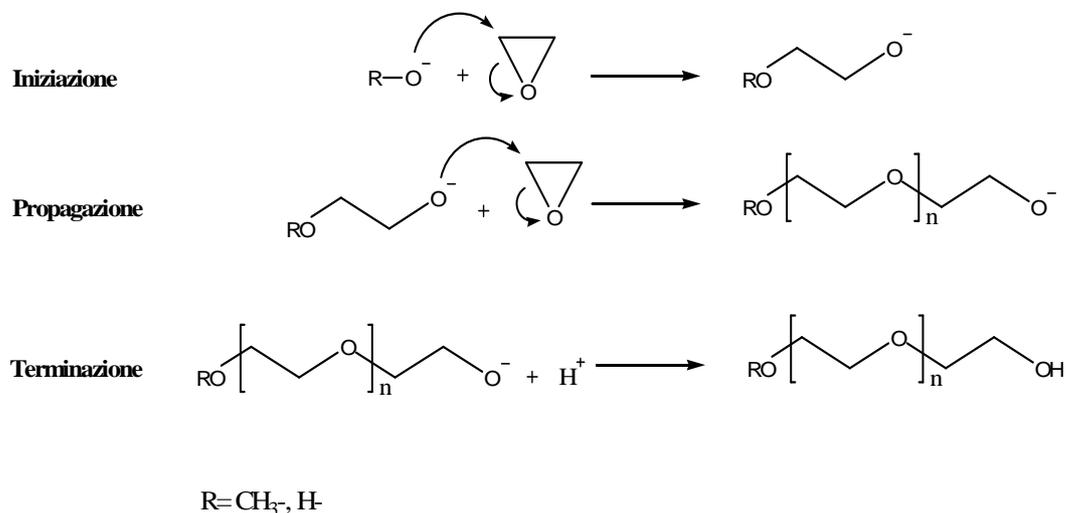


Figura 1.6.: Polimerizzazione anionica dell'ossido di etilene per la sintesi del PEG.

L'apertura dell'anello epossidico, la reazione di propagazione e la sua terminazione per aggiunta di acido cloridrico concentrato permettono di ottenere un polimero lineare come riportato in Figura 1.7.

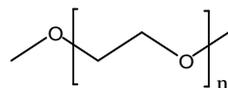


Figura 1.7.: Struttura chimica del polietilenglicole (PEG).

L'impiego dell'anione idrossilico (-OH) genera un PEG-diolo, HO-[CH₂-CH₂-O]_n-H, mentre il gruppo metossilico (CH₃O-) porta alla formazione di derivati mono-metossiPEG

(mPEG), $\text{CH}_3\text{O}-[\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}]_n-\text{H}$. Iniziatori multidentati e polivalenti vengono invece impiegati per ottenere strutture ramificate multivalenti.

In condizioni di reazione controllata è possibile ottenere polimeri con indici di polidispersività (PDI) di 1.01 per i PEG a basso peso molecolare (<5kDa) e di 1.1 per quelli ad elevato peso molecolare (>50kDa). Pertanto, rispetto ad altri polimeri, i PEG utilizzati nella modifica di proteine sono dimensionalmente omogenei e con struttura ben definita, come richiesto per lo sviluppo di prodotti farmaceutici.

La struttura poliossietilenica conferisce al PEG un elevato carattere idrofilico in quanto ogni monomero è in grado di coordinare 2-3 molecole di acqua. Per questo motivo il suo volume idrodinamico (peso molecolare apparente) risulta essere almeno tre volte superiore a quello calcolato per il polimero non idratato [23,24]. Comunque, la natura anfifilica del PEG lo rende solubile anche in molti solventi organici polari che ne facilitano i processi di manipolazione e di purificazione.

Dal punto di vista biologico, il PEG è un polimero neutro, biocompatibile, non biodegradabile, atossico, non immunogenico. Solo lo 0.2% della popolazione sviluppa anticorpi anti-PEG, che comunque non portano ad effetti collaterali tali da impedirne l'impiego farmaceutico [25].

Sebbene non sia biodegradabile, esso può essere rapidamente eliminato per via renale ed epatica senza subire modifiche strutturali. Le Figure 1.8 e 1.9 indicano come le eliminazioni renale ed epatica dipendano dal peso molecolare del polimero.

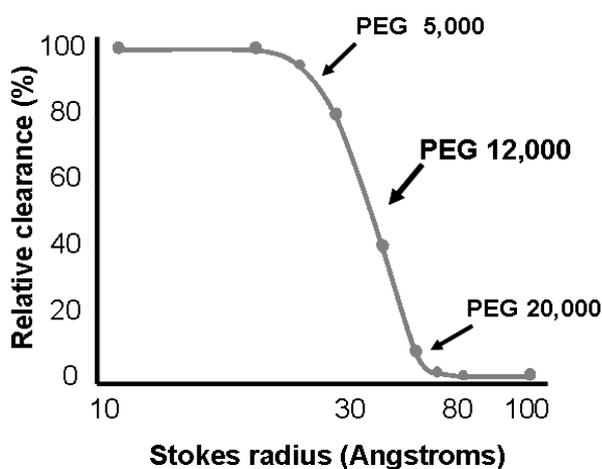


Figura 1.8.: Clearance renale del polietilenglicole in funzione del peso molecolare [Yamaoka T. Tabata Y, Ikada Y. 1994].

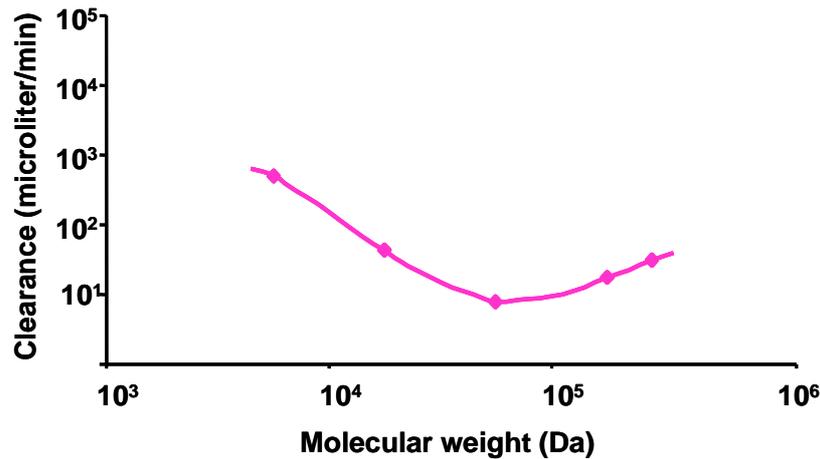


Figura 1.9.: Clearance epatica del polietilenglicole in funzione del peso molecolare [Yamaoka T. Tabata Y, Ikada Y. 1994].

I PEG al di sotto dei 20 kDa vengono liberamente filtrati a livello glomerulare, mentre i polimeri con pesi molecolari maggiori vengono rimossi dal circolo più lentamente [26].

Per queste caratteristiche e per la bassa tossicità il PEG è stato approvato dall'*European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA) e dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per la somministrazione parenterale di forme farmaceutiche tradizionali come liposomi *stealth*, nano- e microsfele, dendrimeri, idrogeli, bioconiugati di peptidi, proteine e farmaci a basso peso molecolare [27].

1.3.2 PEGhizzazione di proteine ad uso terapeutico

Il PEG è caratterizzato da un'elevata inerzia chimica e pertanto per essere coniugato a proteine deve essere attivato a livello dei gruppi idrossilici terminali. L'attivazione del polimero costituisce un aspetto chiave nel processo di bioconiugazione in quanto permette di modificare in maniera più o meno selettiva i gruppi funzionali della proteina.

I primi metodi di attivazione del PEG messi a punto negli anni '70-'80 erano mirati alla modifica di gruppi amminici presenti sulla superficie di proteine: gruppi amminici in posizione ϵ delle lisine (ϵNH_2) e il gruppo amminico dell'aminoacido N-terminale (αNH_2) [28]. I gruppi amminici sono infatti frequentemente rappresentati nella struttura proteica, ben esposti sulla superficie e altamente reattivi in condizioni fisiologiche. In Figura 1.10 sono

riportate alcune delle principali metodiche di attivazione del PEG per il legame ai gruppi -NH₂.

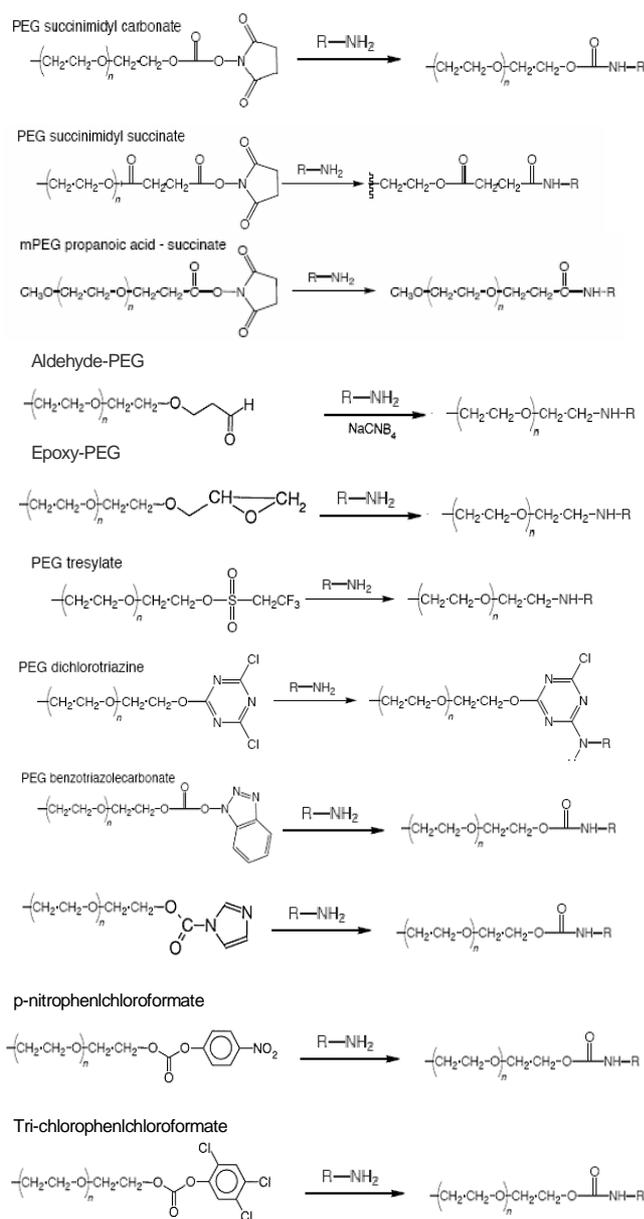


Figura 1.10.: Esempi di polietilenglicoli attivati per la coniugazione di gruppi amminici.

La presenza di numerosi gruppi amminici nelle proteine, da un lato favorisce un elevato grado di modifica, mentre dall'altro presenta un problema di poca selettività nella coniugazione in quanto produce miscele di isomeri posizionali in cui il PEG è legato in modo casuale ai gruppi amminici proteici. In questo caso il PEG può legarsi anche ad aminoacidi direttamente coinvolti nell'interazione con i recettori o in prossimità di siti di interazione impedendone il riconoscimento e quindi lo svolgimento dell'attività biologica.

Questo tipo di modifica può portare ad una sostanziale perdita della attività biologica e ad un comportamento spesso imprevedibile *in vivo*. In particolare, importanti proteine, quali interleuchine ed ormoni, hanno dimostrato una drammatica diminuzione della loro attività in seguito a bioconiugazione aspecifica [29,30].

Al fine di ottenere bioconiugati con una migliore *performance* terapeutica sono state messe a punto varie tecniche di coniugazione sito-selettive che si basano sulla scelta di specifiche condizioni di reazione, sull'impiego di polimeri attivati in modo da reagire selettivamente con gruppi proteici poco rappresentati nella struttura proteica o introdotti artificialmente nella sequenza aminoacidica, o sull'impiego di enzimi.

Esempi di modifica sito-specifica mediante l'impiego di definite condizioni di reazione sono la PEGhilazione del frammento 1-29 del fattore rilasciante l'ormone della crescita (GRF) che presenta tre gruppi amminici disponibili per la PEGhilazione (Tyr¹, Lys¹², or Lys²¹). Il GRF può essere modificato preferenzialmente a livello di lisina 12 o 21 a seconda del tipo di solvente di reazione [31]. Nel caso di insulina, invece, la modifica selettiva del gruppo amminico della fenilalanina terminale (Phe¹B1) della catena B è stata ottenuta previa protezione con *tert*-butil-carbonato dei gruppi amminici più reattivi di lisina in posizione 29 (Lys²⁹) della catena B e glicina in posizione 1 (Gly¹A1) della catena A. Questa complessa procedura è stata messa a punto in quanto lisina e glicina sono coinvolte nell'interazione della proteina con il recettore [32].

Una tecnica semplice ed efficiente per la modifica sito-selettiva di proteine prevede l'impiego di PEG attivato con un gruppo funzionale aldeidico che consente, in condizioni acide e riducenti, di modificare selettivamente il gruppo amminico N-terminale (α NH₂) della proteina. La differenza di pKa del gruppo α NH₂ dell'aminoacido N-terminale (7.6-8.0), del gruppo ϵ NH₂ delle lisine (9.3-10.2) e del gruppo -NH- dell'anello istidinico (5.5-7.5) sono state sfruttate per produrre mono-PEGhilati come il Pegfilgastrim o il Peginterferon [33,34]. L'ossidazione selettiva dei gruppi NH₂-terminali di serine (Ser) o treonine (Thr) genera un residuo aldeidico che può essere selettivamente PEGhilato con PEG-aldeide in presenza di un blando riducente [35]. I gruppi glicosilici di glicoproteine possono essere selettivamente ossidate a livello dei residui glicosilici e reagire in seguito con PEG-idrazide (PEG-Hz) o con PEG-ammino (PEG-NH₂), in presenza di un blando riducente [36].

Negli ultimi anni sono stati proposti vari nuovi derivati del PEG attivati in modo da consentire il legame a funzioni proteiche poco rappresentate. In Figura 1.11 sono riportate alcune strutture di polimeri verso vari gruppi funzionali diversi dai gruppi amminici.

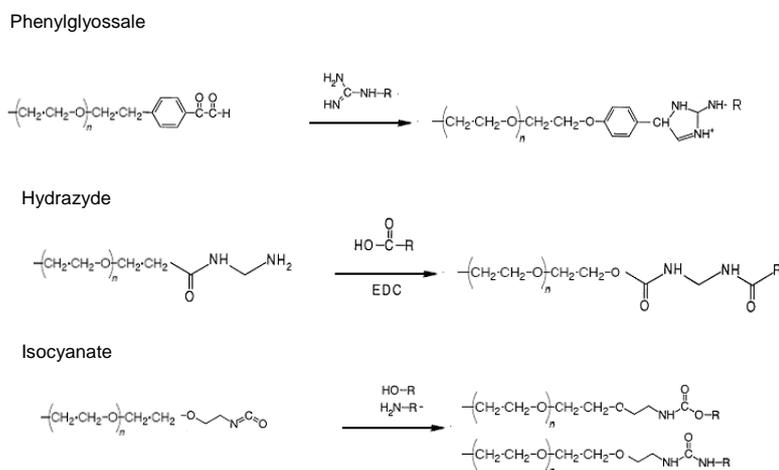


Figura 1.11.: Esempi di polietilenglicoli attivati per la coniugazione di gruppi funzionali non-amminici.

Tra siti di *binding* “rari” vi sono le cisteine (Cys). Questi aminoacidi sono poco presenti in forma ridotta nella proteina, in quanto usualmente sono impegnati nella formazione di ponti disolfuro. Se nella sequenza aminoacidica è presente una Cys, o se viene introdotta artificialmente tramite tecnologie di ingegneria ricombinante, la proteina può essere bioconiugata a livello di questo residuo aminoacidico in modo selettivo senza significativa perdita di attività biologica [37]. In Figura 1.12 sono riportate alcune strutture di polimeri attivati per la modifica selettiva dei Cys.

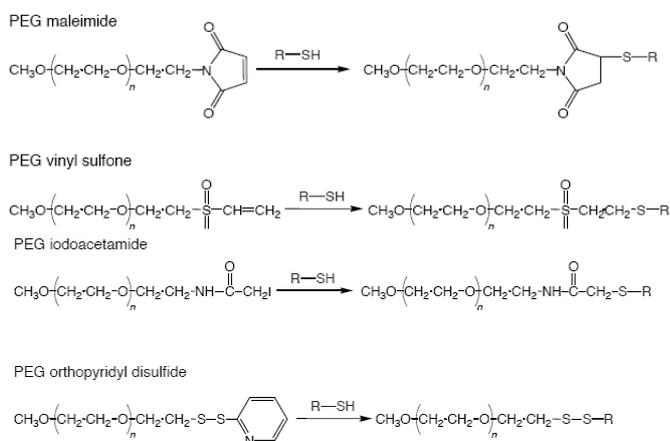


Figura 1.12.: Esempi di polietilenglicoli attivati per la coniugazione di gruppi tiolici.

Un esempio di modifica sito-selettiva di Cys che è stata utilizzata con successo per ottenere derivati mono-PEGhilati è quello che riguarda la cianovirina-N, dove la Glu⁶² è stata sostituita con Cys (CV-N(Q62C) senza sostanziale perdita di attività e successivamente PEGhilata con PEG-maleimide (PEG-mal) di 20 kDa. Il derivato ottenuto è risultato mantenere un'elevata attività anti-HIV, mentre il suo potenziale immunogenico è stato drasticamente ridotto [38].

Polimeri reattivi verso residui Cys sono stati con successo impiegati nella modifica selettiva dei gruppi -SH ottenuti per frammentazione e riduzione dei ponti disolfuro (Cys-Cys) di anticorpi. Numerosi studi hanno infatti dimostrato come la modifica casuale dei gruppi amminici di anticorpi porta alla drastica perdita di attività di riconoscimento antigenico, mentre la modifica sito-specifica di gruppi -SH di Fab o Fab₂ porta a derivati che mantengono quasi inalterata la loro capacità di riconoscimento anche utilizzando polimeri ad elevato peso molecolare [39]. Recentemente è stato sviluppato un nuovo ed interessante metodo di modifica sito-selettiva diretta ai ponti Cys-Cys, che vengono inizialmente ridotti e successivamente bis-alchilati in modo tale da ottenere un ponte a tre atomi di carbonio (*three-carbon bridge*) tra le due Cys al quale legare covalentemente il PEG per ottenere bioconiugati con una elevata attività biologica [40]. Purtroppo, le Cys ridotte si trovano spesso nascoste e protette all'interno di cavità idrofobiche e la loro scarsa accessibilità, assieme all'elevato volume idrodinamico del PEG, possono determinare scarse rese di reazione di PEGhilazione [41,42].

Sono state messe a punto anche metodiche di PEGhilazione di tipo enzimatico, utilizzando, ad esempio, transglutaminasi e carbossipeptidasi, enzimi capaci di modificare, rispettivamente, glutamine o funzioni carbossiliche terminali esposte sulla superficie delle proteine [43,44]. Recentemente, Neose Technologies, Inc. ha reso pubblica una innovativa metodica enzimatica, *GlycoPEGylation*, che prevede l'iniziale glicosilazione a livello di serine o di treonine (O-glicosilazione) ad opera di una N-acetilgalattosiltransferasi e la successiva PEGhilazione con una sialiltransferasi a livello del residuo glicosilico introdotto sulla superficie di citochine di origine ricombinante, quali G-CSF, IFN α -2b e GM-CSF [45].

1.4 BIOCONIUGAZIONE “*Growing from*” MEDIANTE PROCESSO DI POLIMERIZZAZIONE RADICALICA DI DERIVATI ACRILICI

1.4.1.1 Concetti generali sulla polimerizzazione radicalica

I bioconiugati prodotti mediante tecnica “*growing from*” vengono ottenuti per polimerizzazione radicalica di monomeri vinilici o acrilici a partire dalla superficie delle proteine.

Una reazione di polimerizzazione radicalica (*Free Radical Polymerization*) avviene attraverso una iniziale fase di attivazione durante la quale si formano le specie radicaliche, una fase di propagazione che corrisponde all’allungamento della catena polimerica ed infine una reazione di terminazione per accoppiamento di due specie radicaliche.

Nella fase di iniziazione i radicali primari si possono generare per via chimica o fisica. Il metodo più comune è la dissociazione termica o fotochimica (tramite radiazione UV) di legami relativamente deboli (Figura 1.13).

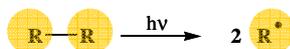


Figura 1.13.: Polimerizzazione radicalica dell’etilene: meccanismo di iniziazione.

Gli iniziatori utilizzati sono generalmente perossidi (organici o inorganici), idroperossidi, azo- e diazocomposti, disolfuri, ecc. e si distinguono in base alla loro solubilità. Per le reazioni condotte in solventi organici solitamente si utilizza il perossido di benzoile (BOP), l’azodiisobutirronitrile (AIBN) e gli idroperossidi, mentre per le reazioni in soluzione acquosa si utilizza il reattivo di Fenton, che sfrutta la reazione redox tra il persolfato ed il bisolfito (o metabisolfito) catalizzata da ioni Fe^{3+} . Altri tipi di iniziatori possono essere attivati per via termica o con radiazioni.

Durante il processo di propagazione, il radicale reagisce con il gruppo vinilico di un monomero, formando un nuovo radicale con un peso molecolare maggiore che a sua volta reagisce propagando la reazione di polimerizzazione con l’allungamento della catena polimerica (Figura 1.14).

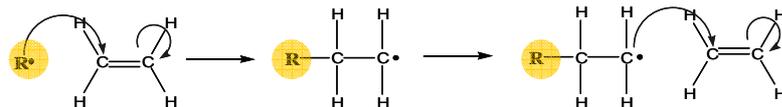


Figura 1.14.: Polimerizzazione radicalica dell'etilene: meccanismo di propagazione.

La reazione di polimerizzazione termina con l'estinguersi delle specie radicaliche presenti in soluzione (Figura 1.15).

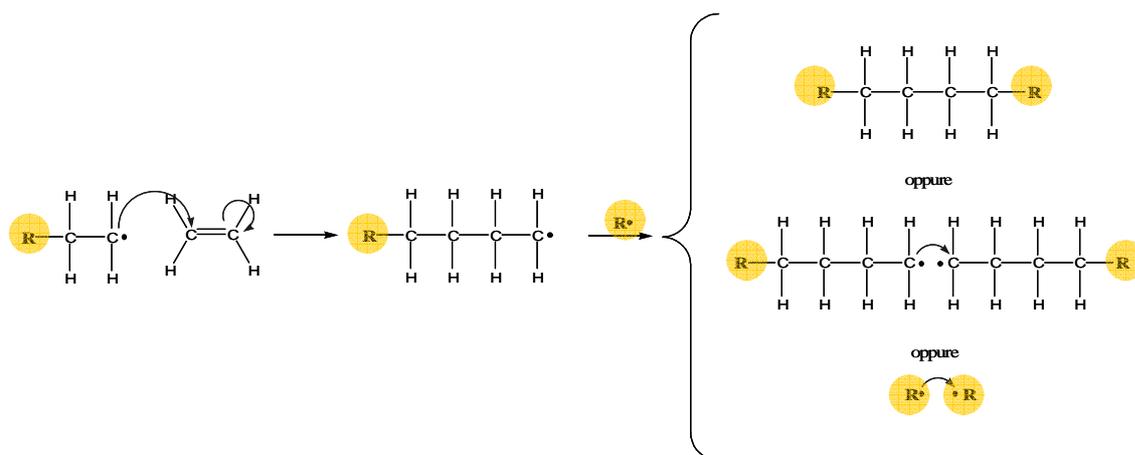


Figura 1.15.: Polimerizzazione radicalica dell'etilene: meccanismo di terminazione.

La dimensione del polimero dipende dalle condizioni di reazione e dai rapporti molari dei reattivi utilizzati mentre le proprietà fisiche dei polimeri dipendono dalla composizione chimica, la struttura e l'arrangiamento delle catene, il grado di polimerizzazione (DP), il peso molecolare ed il relativo indice di polidispersività (PDI, M_w/M_n). Solitamente i polimeri sintetizzati con questo metodo presentano un'ampia distribuzione di pesi molecolari e mostrano valori di PDI compresi tra 2 e 3.

In letteratura sono descritte numerose tecniche di polimerizzazione radicalica che permettono di ottenere polimeri con ben definite caratteristiche chimico-fisiche e strutturali in condizioni di reazione controllate. In questo senso, la polimerizzazione radicalica controllata (*Controlled Free Radical Polymerization*, CFRP) di tipo "living" ha suscitato un grande interesse. In questo tipo di processi nella fase iniziale di iniziazione si formano due differenti specie radicaliche: una direttamente implicata nel processo di propagazione, l'altra responsabile del processo di terminazione. La reazione procede come descritto nella Figura 1.16.

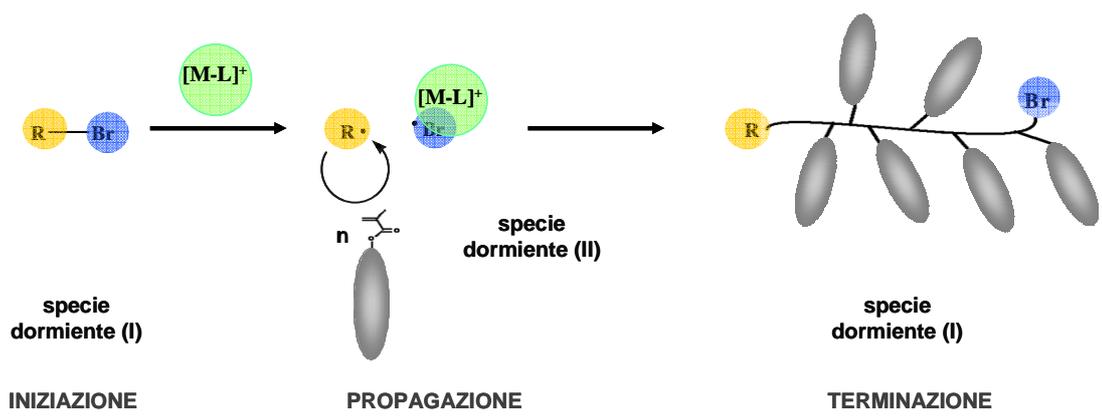


Figura 1.16.: Polimerizzazione radicalica controllata di tipo “living”.

Il processo di iniziazione e terminazione di queste reazioni radicaliche sono processi reversibili di tipo “*switch on-switch off*” e il radicale attivo può essere rigenerato in continuazione e le catene di polimero possono crescere in maniera indefinita finché c'è disponibilità di monomero in soluzione. Il carattere "vivente" della reazione permette, inoltre, di sintetizzare copolimeri a blocchi per semplice aggiunta di differenti monomeri in fasi successive del processo di polimerizzazione.

La diversa funzione delle due specie radicaliche che si formano e il rapido equilibrio del loro processo di attivazione-terminazione permettono di evitare reazioni di terminazione bimolecolari, consentendo di ottenere polimeri con ben definiti pesi molecolari e valori di polidispersività molto bassi.

Alcuni esempi di polimerizzazioni *living* attualmente praticate in ambito industriale sono la polimerizzazione per trasferimento di gruppo (*Group Transfer Polymerization*, GTP) [46], la polimerizzazione radicalica a trasferimento di atomo (*Atom Transfer Radical Polymerization*, ATRP) [47], la polimerizzazione controllata con il catione nitrosile (*Nitroxide-Mediated Polymerization*, NMP) [48] ed il processo di trasferimento di catena per addizione-frammentazione reversibile (*Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer*, RAFT) [49]. Tutte queste tecniche di polimerizzazione radicalica controllata, che si distinguono per il diverso mediatore che esercita il controllo sul processo di polimerizzazione, permettono di sintetizzare strutture polimeriche *ad hoc* con ben definite caratteristiche chimico-fisiche e strutturali in condizioni di reazione controllate.

1.4.1.2 *Atom Transfer Radical Polymerization*

Matyjaszewski e coll. [50] e Sawamoto e coll. [51] sono stati tra i primi ricercatori a studiare la tecnica di *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP), un processo di polimerizzazione controllata molto versatile che permette di sintetizzare omopolimeri e copolimeri di derivati dell'acido acrilico e metacrilico utilizzando iniziatori radicalici alchilalogenuri (R-Br o R-Cl). Questa tecnica viene condotta sia in soluzione acquosa che organica utilizzando blande condizioni di reazione. E' così possibile ottenere polimeri ad alto peso molecolare con caratteristiche chimico-fisiche e strutturali ben definite ed un basso indice di polidispersività che possono essere impiegati con fini farmacologici [52].

In commercio è disponibile un'ampia varietà di iniziatori radicalici per ATRP, tuttavia nuovi iniziatori si possono ottenere per esterificazione di un ossidrile o modifica di un gruppo amminico primario con acido 2-bromo-isobutirrico o acido 2-cloro-propionico attivati come alogenuri.

ATRP è stata impiegata con successo utilizzando come catalizzatori diversi metalli, quali Ti, Mo, Re, Fe, Ru, Rh, Ni, anche se i complessi di rame $[Cu(I)]^+$ si sono dimostrati essere i più efficienti nei processi di sintesi per l'ottenimento di polimeri idrosolubili con definiti pesi molecolari e basso indice di polidispersività (PDI). Inoltre, l'utilizzo di derivati amminici multi-dentati, quali biperidina (bpy), dietilentriamina (DETA), tris-(2-aminoetil)amina (TREN), tris-[2-(dimetilamino)etil]amina (Me_6TREN), ecc., come ligandi, in associazione con il Cu(I), permette di ottenere catalizzatori che possiedono una maggiore attività e specificità nel generare specie radicaliche attive [53]. Lo schema riportato in Figura 1.17 descrive il processo di iniziazione e propagazione di una reazione di polimerizzazione di ATRP in presenza di un sistema catalizzatore metallico/ligando formato da Cu(I) e 2,2'-biperidina (bpy).

Agenti antiossidanti possono agire da riattivatori del sistema generante il trasferimento di atomo (*Activators ReGenerated by Electron transfer* - ARGET) e, se aggiunti alla miscela di reazione, sono in grado di contrastare l'azione ossidante dell'ossigeno nei confronti del catalizzatore metallico permettendo di mantenere il rame nella forma ridotta Cu(I) durante il processo di polimerizzazione [54].

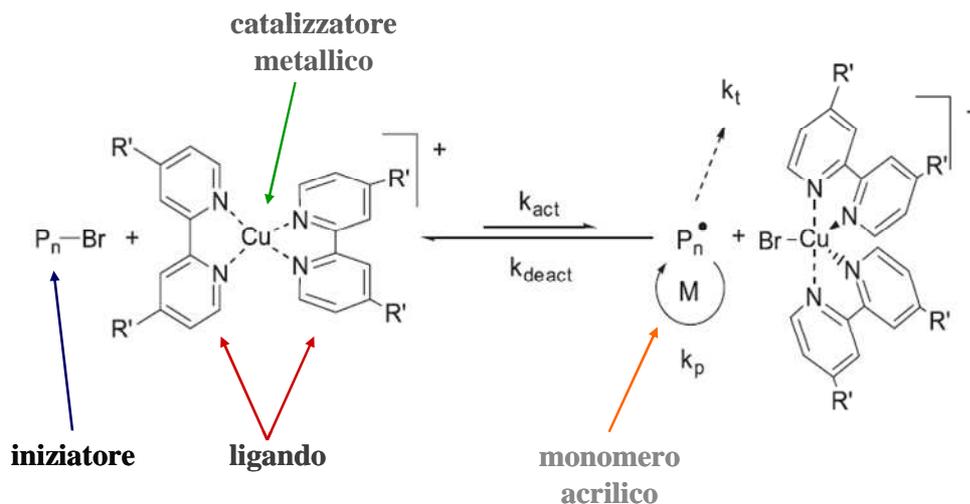


Figura 1.17.: Rappresentazione schematica di un processo di polimerizzazione a trasferimento di atomo (ATRP) in presenza del sistema catalizzatore/ligando costituito da Cu(I)/bis 2,2'-bipiridina [Brauneker WA, Matyjaszewski K. 2007].

Haddleton e coll. sono stati tra i primi a sintetizzare una serie di polimeri derivati del polietilenglicole con struttura “*comb-like*” differentemente funzionalizzati. I polimeri ottenuti, polyPEG, sono stati funzionalizzati come N-idrossi succinimidilesteri (polyPEG-NHS) ed utilizzati per la modifica di gruppi amminici del lisozima [55], poly-PEG maleimide impiegato per modificare selettivamente la Cys³⁴ dell’albumina di siero umano (BSA) [56] e poly-PEG aldeide impiegato per modificare in condizioni riducenti i gruppi amminici del lisozima [57]. Dai risultati ottenuti in questi studi preliminari su proteine modello emerge la possibilità di un impiego efficace di questi polimeri in campo farmaceutico per la realizzazione di bioconiugati proteici.

L’impiego di opportuni iniziatori radicalici derivatizzati con gruppi reattivi verso i residui aminoacidici delle proteine ha favorito lo sviluppo di nuove metodiche di sintesi per polimeri idrofilici e biocompatibili da usare per ottenere bioconiugati proteici [58]. Alcuni esempi di strutture chimiche di tali iniziatori è riportata in Figura 1.18.

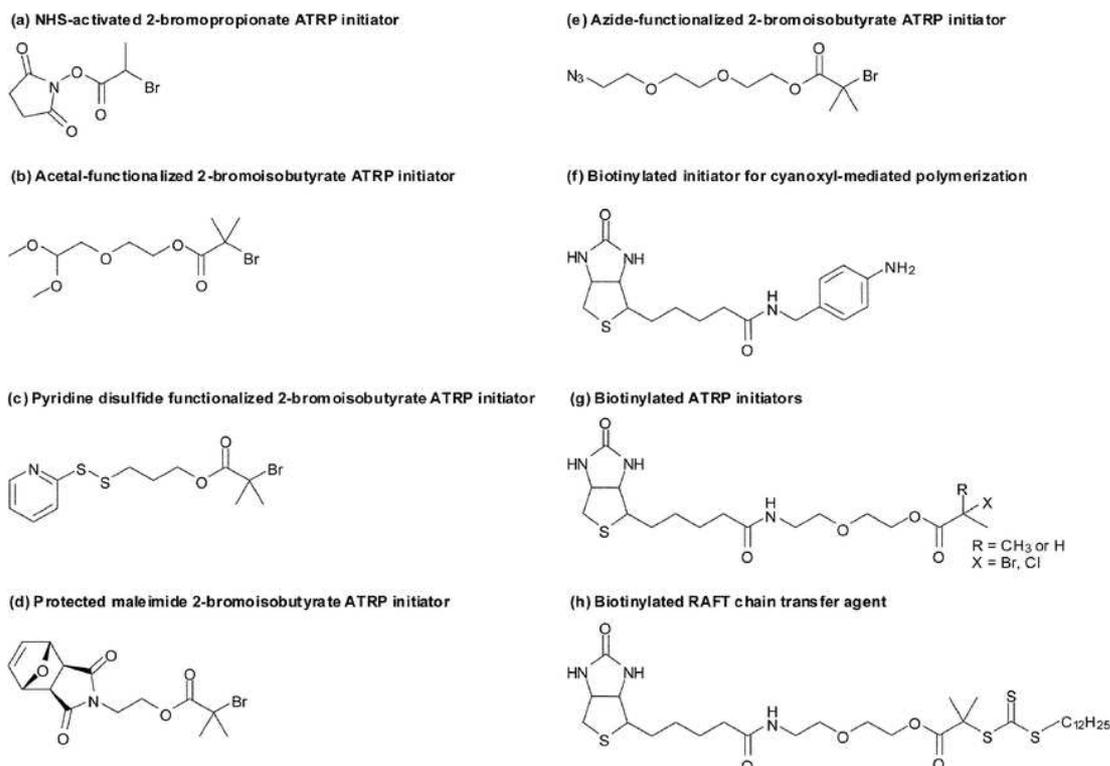


Figura 1.18.: Esempi di alcuni iniziatori radicalici utilizzati per sintetizzare polimeri reattivi nei confronti di residui aminoacidici delle proteine mediante ATRP [Heredia KL, Maynard HD. 2007].

1.4.1.3 Atom Transfer Radical Polymerization a partire dalla superficie di proteine

La polimerizzazione di ATRP apre nuove prospettive di sintesi di bioconiugati proteici ad uso terapeutico in quanto permette la coniugazione sito-selettiva di polimeri “fatti su misura” sulla superficie di proteine.

In letteratura sono stati riportate alcune interessanti metodiche di modifica per ottenere macroiniziatori proteici utilizzando *linker* alchil-alogenuro a basso molecolare che sono stati successivamente utilizzati per sintetizzare bioconiugati proteici.

Matyjaszewski e coll. hanno modificato i gruppi amminici della chimotripsina con 2-bromoisobutirri-bromuro, per ottenere tre differenti macroiniziatori proteici con 1,4 o 8 residui di 2-bromo-isobutirril-amidici. Successivamente la chimotripsina funzionalizzata con un unico sito iniziatore (CT^{1*}) è stata utilizzata per la reazione di ATRP di PEGMA che ha permesso di ottenere un bioconiugato con un elevato peso molecolare ed un indice di

polidispersività molto basso ($PDI=1.05$) [59]. Parallelamente, Maynard e coll. hanno svolto un interessante lavoro di modifica di BSA e di lisozima con 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide con derivati termosensibili del N-isopropilacrilammide (NIPAM). In questo caso l'impiego di una resina come iniziatore sacrificale ha permesso di aumentare la resa di reazione dal 44% al 65%. I bioconiugati ottenuti, inoltre, hanno dimostrato mantenere la loro attività biologica. [60]. Haddleton e coll. hanno sintetizzato un nuovo monomero acrilato derivato della Rhodamina B che è stato impiegato per sintetizzare un bioconiugato di poly-PEG fluorescente a partire da BSA e da lisozima [61].

Per il momento sono stati condotti solo studi preliminari di tecniche “*growing from*” che stanno cercando di combinare le ben consolidate conoscenze sulla bioconiugazione sito-specifica di proteine con la lunga tradizione di sintesi organica di polimeri biocompatibili con struttura e composizione chimica ben definite e grado di polidispersività prossimi all'unità ($PDI\approx 1$).

MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALI

2.1.1 Reagenti

Lattosio, maltotriosio, 1,12-dodecildiammina, trietilammina (Et_3N), acido N-succinimidil-3-maleimidopropionato, iodio (I_2), cloruro di bario (BaCl_2), *m*-periodato di sodio (NaIO_4), idrossido di potassio (KOH), solfato di sodio (Na_2SO_4) anidro, acido trifluoroacetico (TFA), acido etilendiamminotetracetico (EDTA), acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico all'1% in DMF (TNBS), acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), 2,4-dinitrofenilidrazina (2,4-DNPH), carboidrazide, cisteina (Cys) e glicil-glicina (Gly-Gly), bromuro di rame (I) [Cu(I)Br], acido ascorbico, 2-(2-aminoetossi)etanolo sono stati acquistati da Fluka Analytical (Buchs SG, Switzerland). N-metossicarbonil-maleimide, N-Boc-cadaverina, 2-bromo-isobutirril-bromuro, polietilenglicole metil etere metacrilato (PEGMA) $\approx 360 M_n$ e $\approx 300 M_n$, 2,2'-bipiridina (bpy), N-isopropilacrilammide (NIPAAm), N-vinil- ϵ -caprolattame (VCL) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Albumina di siero umano (HSA) è stata acquistata da Fluka BioChemika (Buchs SG, Switzerland), mentre il fattore stimolante la formazione di colonie granulocitarie (rh-G-CSF) e l'ormone della crescita (rh-GH) sono stati forniti da BioKer (Pula, CA, Italy). Transglutaminasi microbica (M-TGase) ACTIVA WM (99% maltrodestrine e 1% M-TGase) è stata fornita da Ajinomoto Co. (Tokyo, Japan). Monometossi-PEG idrazide (PEG-Hz) 10 kDa e monometossi-PEG maleimide (PEG-mal) 10 kDa sono stati acquistati da Nektar Therapeutics (Huntsville, AL, USA). La resina Sephadex G-25 superfine è stata fornita da Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden).

Tutte le soluzioni acquose sono state preparate utilizzando acqua deionizzata (milliQ-grade, 18.2 M Ω) ottenuta mediante sistema Millipore MilliQ (MA, USA). I sali impiegati per la preparazione dei tamponi sono stati acquistati da Riedel-de-Haen (Seelze, Germany), Fluka Analytical (Buchs SG, Switzerland) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tutti i solventi ed i rimanenti reattivi utilizzati sono stati scelti tra quelli specifici per HPLC o con maggiore grado di purezza tra quelli disponibili in catalogo da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) o da Carlo Erba (Milan, MI, Italy).

2.1.2 Strumentazione

Le determinazioni spettrofotometriche sono state effettuate con spettrofotometro UV-Vis Lambda 25 della Perkin-Elmer (Northwolk, CT, USA). Le analisi cromatografiche sono state condotte con sistema *High Performance Liquid Chromatography* Jasco (Tokyo, Japan), costituito di due pompe PU-1580, rilevatore UV-1575 ed integratore Hercule 200 JMBS. Per la desalificazione delle proteine sono state utilizzate colonne di varie dimensioni caricate con resina Sephadex G-25 *superfine*, mentre per la purificazione dei bioconiugati ottenuti è stato usato un sistema *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC), equipaggiato con una colonna preparativa *Superdex 200 26/60* con collettore di frazioni LKB Superrac 2211 Pharmacia Biotech (Upssala, Sweden). Gli eluenti e le soluzioni tamponi sono stati filtrati con sistemi Millipore (Benford, MA, USA) muniti di filtri da 0,22 µm e sono stati sonicati con sistema ad ultrasuoni Ultrasonic Cleaner mod. 5210 Branson (Dambury, USA) per almeno 30 minuti prima del loro impiego nelle analisi cromatografiche. Gli spettri infrarossi (FT-IR) sono stati acquisiti con uno spettrofotometro Perkin-Elmer FT-IR serie 1600 (Norwolk, CT, USA). Gli spettri di risonanza magnetica del protone (¹H-NMR) e del carbonio (¹³C-NMR) sono stati registrati con Spectrospin AMX 300 MHz Bruker (Fallanden, Switzerland) utilizzando solventi deuterati contenenti tetrametilsilano (TMS) come riferimento interno. Le analisi di massa ESI-TOF sono state eseguite in modalità positiva con Applied Biosystem Mariner ESI-TOF (Monza, MI, Italy). Le analisi di dicroismo circolare sono state registrate su uno spettropolarimetro Jasco J-810 (Tokyo, Japan). Le analisi elettroforetiche sono state effettuate su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) utilizzando Jule Snap-A-Gel per la preparazione del gel e la cella elettroforetica Mighty Small Pharmacia (Upssala, Sweden).

Le soluzioni organiche sono state concentrate con Rotavapor mod. R114 BÜCHI Labortechnik AG (Postfash, Switzerland), mentre le soluzioni acquose impiegando sistemi Centricon e Centriprep (Denver, CO, USA) muniti di membrana per ultrafiltrazione con differenti cut-off. Le liofilizzazioni sono state effettuate con Vacuum Centrifuge HETO Lab. Equipment e liofilizzatore Hetosicc HETO Lab. Equipment (Birkerod, Danimarca). Le misure di pH sono state eseguite con pHmetro Seven Easy S20-K Mettler Toledo con elettrodo Mettler Toledo Inlab 413 (Schwerenbach, Switzerland).

2.2 METODI

2.2.1 Metodi analitici

2.2.1.1 Determinazione spettrofotometrica della concentrazione proteica

La concentrazione di proteina in soluzione è stata determinata per via spettrofotometrica a 280 nm utilizzando i seguenti valori di assorbanza ($ABS_{0.1\% \text{ p/v}}$): 0.545 per HSA, 0.828 per rh-G-CSF e 0.739 per rh-GH. I valori di $ABS_{0.1\% \text{ p/v}}$ sono stati calcolati con il metodo descritto da Gill e coll. [62]. La concentrazione proteica è stata inoltre confermata sperimentalmente mediante analisi colorimetrica utilizzando il kit BCA Protein Assay (Pierce, IL, USA) e una soluzione di sieralbumina bovina a titolo noto come riferimento [63].

2.2.1.2 Determinazione dei gruppi tiolici liberi (A) e dei gruppi maleimidici (B)

A. La concentrazione dei gruppi -SH in soluzione è stata determinata mediante il saggio di Ellman, in cui l'acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) reagisce selettivamente a pH neutro con i residui tiolici (-SH) formando il cromoforo 2-nitro,5-tiobenzato [64].

200 μ l di campione sono stati incubati con 30 μ l di DNTB (4 mg/ml in fosfato 50 mM, pH 7.0) ed analizzati dopo 30 minuti a 405 nm. La concentrazione di gruppi -SH è stata calcolata sulla base di una retta di taratura ottenuta con quantità note di cisteina.

Nel caso di modifica di gruppi -SH di proteine, la percentuale di modifica è stata calcolata sulla base del valore di assorbanza ottenuto con un campione di riferimento contenente una quantità equimolare di proteina nativa non modificata, come segue:

$$\% \text{ modifica} = \left(1 - \frac{ABS \text{ proteina modificata}}{ABS \text{ proteina nativa}} \right) \times 100$$

B. Il test di Ellman è stato usato anche in modo indiretto per determinare la presenza di gruppi maleimidici nei *linker* sintetizzati.

I campioni da analizzare sono stati preparati sciogliendo i composti maleimidici in tampone fosfato 50 mM, pH 6.5, contenente una quantità equimolare (2 mM) di cisteina.

Come riferimento sono state preparate soluzioni contenenti sola cisteina alla stessa concentrazione dei composti da analizzare. Campioni e riferimento sono stati analizzati mediante saggio di Ellman come riportato sopra e la percentuale di gruppi maleimidici nel composto è stata determinata sulla base della seguente formula:

$$\% \text{ di funzioni maleimidiche} = \left(1 - \frac{\text{ABS campione}}{\text{ABS cisteina}} \right) \times 100$$

2.2.1.3 Determinazione di gruppi amminici primari

La determinazione quantitativa dei gruppi amminici dei *linker* e dei loro intermedi di reazione sintetizzati in questo lavoro di tesi è stata calcolata mediante il saggio colorimetrico di Snyder con acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (TNBS). Il TNBS viene fatto reagire in condizioni basiche con i gruppi amminici dei campioni da analizzare ed il cromoforo che si forma viene determinato per via spettrofotometrica a 420 nm [65].

I campioni da analizzare sono stati preparati sciogliendo i composti in 970 μl di tampone borato 0.1 M, pH 9.3. A ciascun campione sono stati aggiunti, successivamente, 30 μl di TNBS (1% p/v in DMF). L'assorbimento a 420 nm del campione è direttamente proporzionale alla concentrazione di gruppi amminici la cui concentrazione è stata calcolata sulla base di una retta di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di glicil-glicina (Gly-Gly) o di monometossi-PEG-amino (m-PEG-NH₂) (Figura 2.1).

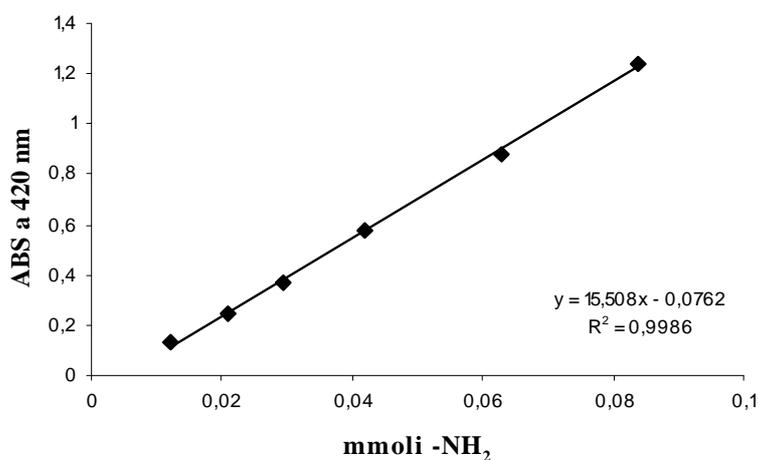


Figura 2.1.: Retta di taratura di gruppi amminici primari ottenuta mediante saggio di Snyder.

2.2.1.4 Determinazione del polietilenglicole (PEG)

La concentrazione di polietilenglicole (PEG) in soluzione è stata ottenuta con il saggio allo iodio, seguendo la metodica descritta da Sims e Snape [66]. Ad 1 ml di soluzione acquosa contenente PEG si aggiungono 250 μ l di una soluzione di cloruro di bario (5% p/v in HCl 1 N) e 250 μ l di una soluzione di iodio (1.27% p/v in KI al 2% in acqua). Dopo 15 minuti si determina spettrofotometricamente l'assorbanza dei campioni a 535 nm da cui si ricava la concentrazione di PEG nel campione sulla base di una retta di taratura ottenuta con campioni a concentrazione nota di PEG (Figura 2.2).

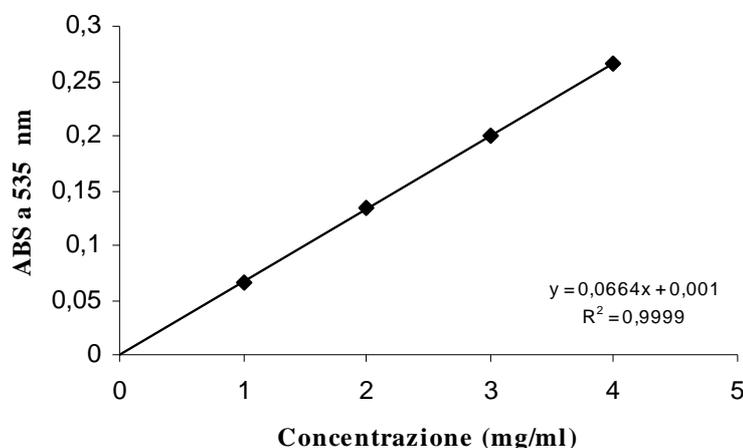


Figura 2.2.: Retta di taratura di polietilenglicole ottenuta mediante saggio allo iodio.

2.2.1.5 Determinazione dei residui aldeidici

Le funzioni aldeidiche ottenute in seguito all'ossidazione delle glicosil-proteine sono state determinate mediante derivatizzazione in ambiente acido con 2,4-dinitrofenilidrazina (2,4-DNPH) ed analizzate spettrofotometricamente a 490 nm [67].

20 μ l di soluzione contenente il campione da analizzare sono stati incubati a 37°C con 30 μ l di 2,4-DNPH (0.4% p/v in HCl 2 N). Dopo 10 minuti 200 μ l di NaOH 0.5 N sono stati aggiunti alla miscela e il campione è stato analizzato spettrofotometricamente a 490 nm. I valori determinati sono stati riferiti ad una retta di taratura ottenuta utilizzando soluzioni a concentrazione nota di 4-(dimetilamino)-benzaldehyde (Figura 2.3).

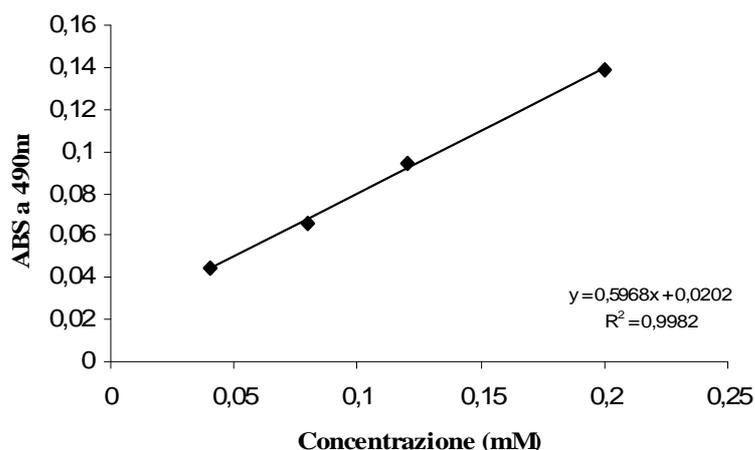


Figura 2.3.: Retta di taratura di gruppi aldeidici ottenuta con 4-(dimetilammino)-benzaldeide.

Dalla concentrazione di aldeidi presenti nei campioni a concentrazione proteica nota è possibile determinare il numero di gruppi aldeidici (-CHO) per proteina glicosilata utilizzando la seguente equazione:

$$\text{numero di gruppi aldeidici per proteina} = \frac{[-\text{CHO}]}{[\text{proteina glicata}]}$$

2.2.1.6 Analisi cromatografiche mediante *high performance liquid chromatography*

2.2.1.6.1 Cromatografia per esclusione molecolare

Le soluzioni proteiche sono state analizzate mediante un sistema HPLC con colonna Bio-Gel SEC 40 XL (300x7.8 mm - BioRad, MI, Italy) eluita con tampone fosfato 63 mM, 3% di isopropanolo, pH 7.2, ad un flusso di 0.6 ml/min. Il profilo di eluizione è stato ottenuto mediante determinazione spettrofotometrica a 280 nm.

2.2.1.6.2 Cromatografia a fase inversa

A. Caratterizzazione di molecole a basso peso molecolare

Soluzioni contenenti i composti da caratterizzare sono state analizzate mediante un sistema HPLC con colonna Luna C18 (250x4.6 mm - Phenomenex, Torrance, USA.)

termostatata a 55°C ed eluita con acqua (eluente A) e acetonitrile (eluente B) contenenti 0.05% di TFA con il seguente gradiente lineare di concentrazione: 0-3 min al 5% di eluente B; 3-23 min dal 5% al 85% di eluente B; 23-24 min al 95% di eluente B. Il flusso è stato fissato a 1 ml/min e il detector UV a 320 nm.

B. Caratterizzazione di proteine

Soluzioni di proteine sono state analizzate mediante sistema HPLC con colonna Vydac C4 (250x4.6 mm - Grace-Vydac, Hesperia, CA, USA) termostatata a 55°C ed eluiti con acqua (eluente A) e acetonitrile (eluente B) contenenti 0.05% di TFA con il seguente gradiente lineare di concentrazione: 0-3 min al 35% di eluente B; 3-23 min dal 35% al 75% di eluente B; 23-24 min al 95% di eluente B. Il flusso è stato fissato a 1 ml/min e il detector UV a 280 nm.

2.2.1.7 Analisi di dicroismo circolare

Soluzioni di 0.1 mg/ml di proteina sono state analizzate mediante dicroismo circolare nel far-UV (195-250 nm) utilizzando cuvette di quarzo con cammino ottico di 0.1 cm ed eseguendo scansioni a 10 nm/min.

2.2.2 Modifica di proteine mediante glicazione

2.2.2.1 Sintesi dei linker alchil-glicosilici attivati con gruppi maleimidici

2.2.2.1.1 Sintesi del lattonolattone e del maltotrionolattone

Lattosio (1.00 g, 2.92 mmoli), o maltotriosio (1.47 g, 2.92 mmoli), sono stati sciolti in 2.0 ml di metanolo al 70%. La soluzione è stata riscaldata e termostata a 40°C e successivamente aggiunta di 20 ml di una soluzione di iodio (1.48 g, 5.84 mmoli) in metanolo. Nella miscela di reazione sono stati versati goccia a goccia 8 ml di una soluzione al 4% p/v di ioduro di potassio in metanolo. Il precipitato bianco di lattonato di potassio è stato recuperato per filtrazione, lavato con metanolo e successivamente con etere di etilico. Il precipitato è stato sciolto in acqua e la soluzione è stata eluita con acqua milliQ attraverso una resina a scambio cationico di Amberlite IR-120B (H⁺). L'eluato raccolto è stato liofilizzato ed il prodotto finale, risolto in metanolo, ricristallizzato in etere dietilico freddo. Il prodotto finale è stato essiccato e caratterizzato mediante spettroscopia all'infrarosso (FT-IR).

2.2.2.1.2 Sintesi del galattosil-glucon-amide-dodecil-ammina e del maltosil-glucon-amide-dodecilammina

18 ml di metanolo contenenti 1,12-dodecildiammina (9.0 g, 45.84 mmoli) e trietilammina (Et₃N) (638 µl, 4.584 mmoli) sono stati aggiunti 520 mg di lattonolattone (1.53 mmoli), o 770 mg di maltotrionolattone (1.53 mmoli) sciolti in 7 ml metanolo. La miscela di reazione è stata mantenuta a 65°C per 2 ore e, dopo raffreddamento a 25°C è stata filtrata per rimuovere il trietilammonio cloruro che si forma durante la reazione. La soluzione è stata concentrata a bassa pressione ed il prodotto è stato recuperato come polvere bianca per precipitazione in etere dietilico raffreddato contenente 0.1% (v/v) trietilammina (Et₃N). Il precipitato è stato ripetutamente sciolto in metanolo e riprecipitato in etere etilico.

Il galattosil-glucon-amide-dodecil-ammina [galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂] e maltosil-glucon-amide-dodecil-ammina [maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂] sono stati essiccati sotto vuoto e caratterizzati spettroscopicamente mediante FT-IR, ¹H-NMR in D₂O e analisi di massa ESI-TOF. Il grado di alchilazione del glicoside è stato determinato con saggio di Snyder (NH₂ determinati/NH₂ teorici, %).

2.2.2.1.3 Sintesi del galattosil-glucon-amide-dodecil-amido-propanoilmaleimide e del maltosil-glucon-amide-dodecil-amido-propanoilmaleimide

Galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂ (21.8 mg, 40.2 μmoli), o maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂ (28.2 mg, 40.2 μmoli), e Et₃N (5.6 μl, 40.2 μmoli) sono stati sciolti in 1.0 ml dimetilsolfossido (DMSO) anidro e aggiunti a N-succinimidil 3-maleimido-propionato [NHS-CO-(CH₂)₂-maleimide] (15 mg, 56.3 μmoli). Dopo 15 minuti la miscela di reazione è stata versata in etere dietilico freddo e il precipitato recuperato per centrifugazione a 4000 rpm. Il prodotto recuperato è stato risolto in metanolo e riprecipitato in etere per due volte.

I prodotti finali, galattosil-glucon-amide-dodecil-amido-propanoilmaleimide [galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide] e maltosil-glucon-amide-dodecil-amido-propanoilmaleimide [maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide], sono stati essiccati sotto vuoto e caratterizzati mediante spettroscopia ¹H-NMR in D₂O ed analisi di massa ESI-TOF. Il grado di modifica dei gruppi amminici degli alchil-glicosidi è stato determinato con saggio di Snyder (NH₂ determinati/NH₂ teorici, %), mentre la valutazione quantitativa del grado di modifica con maleimide è stato determinato con saggio di Ellman.

2.2.2.2 Glicazione sito-specifica e PEGhilazione di HSA

2.2.2.2.1 Glicazione sito-specifica di Cys³⁴ di HSA

Galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide (1.0 mg, 1.44 μmoli), o maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide (1.23 mg, 1.44 μmoli), sono stati aggiunti ad 1 ml di una soluzione 10 mg/ml di HSA in tampone fosfato 50 mM, EDTA 10 mM, pH 6.5, in modo da ottenere un rapporto finale proteina/linker di 1:10. Dopo 2 ore la miscela di reazione è stata analizzata mediante saggio di Ellman per valutare il grado di coniugazione del linker alla Cys³⁴ di HSA.

Le proteine glicate, galattosil-HSA e maltosil-HSA, sono state purificate mediante cromatografia FPLC utilizzando una colonna preparativa Hiload Superdex 200 26/60 (Pharmacia, Upssala, Sweden) eluita con tampone fosfato 10 mM, pH 7.4. Sono state raccolte frazioni di 1 ml che sono state analizzate spettrofotometricamente a 280 nm. Le

frazioni contenenti la proteina sono state riunite e concentrate mediante ultrafiltrazione con membrana da dialisi avente cut-off di 10 kDa.

2.2.2.2 Ossidazione di glicosil-HSA

5 mg di glicosil-HSA in 1 ml di tampone fosfato 10 mM, pH 7.4, sono stati aggiunti di 50 µl di una soluzione 200 mM di *m*-periodato di sodio ad 1 ml di soluzione di proteina di 5 mg/ml. La miscela di reazione è stata mantenuta al buio e in bagno di ghiaccio per 90 minuti e quindi aggiunta di 15 µl di una soluzione 500 mM di mannitolo. La proteina ossidata è stata estesamente lavata con un sistema ultrafiltrante Centricon avente cut-off di 10 kDa. Sulla soluzione finale sono state determinate la concentrazione di proteina nel campione mediante analisi UV a 280 nm e il grado di ossidazione dei residui glicosilici con 2,4-dinitrofenilidrazina (2,4-DNPH).

2.2.2.3 PEGhilazione di glicosil-HSA ossidata

PEG-Hz 10 kDa (10 mg/ml, 0.144 mM) è stato aggiunto ad 1.0 ml di una soluzione 1 mg/ml di glicosil-HSA ossidata in tampone fosfato 50 mM e EDTA 10 mM, pH 6.5, in modo da ottenere un rapporto finale PEG/gruppi aldeidici di 10:1. A tempi prestabiliti la miscela di reazione è stata analizzata mediante SEC-HPLC come riportato al paragrafo 2.2.1.6.1. Dai valori delle aree corrispondenti ai picchi corrispondenti a glicosil-HSA ossidata e al bioconiugato PEG-glicosil-HSA si è quindi determinato il grado di PEGhilazione di HSA sulla base della seguente formula:

$$\% \text{ PEGhilazione} = \left(1 - \frac{\text{glicosil - HSA ossidata}}{\text{HSA totale}} \right)$$

Le costanti cinetiche di bioconiugazione sono state calcolate secondo una cinetica di primo ordine mediante l'equazione 1:

$$\text{velocità di PEGhilazione} = k [\text{aldeidi}] \quad (\text{eq.1})$$

dove le costanti cinetiche (k') sono state estrapolate come pendenza della retta che si ottiene graficando il logaritmo naturale della concentrazione della proteina nativa in funzione del tempo (eq.2):

$$\ln c = \ln c_0 - k't \quad (\text{eq.2})$$

in cui c_0 è la concentrazione di proteina non modificata iniziale (%) e c è la sua concentrazione al tempo t .

Dopo 120 ore di reazione la proteina PEGhilata è stata purificata mediante cromatografia FPLC utilizzando una colonna preparativa Hiload Superdex 200 26/60 eluita con tampone fosfato 10 mM, pH 7.4, con flusso di 0.3 ml/min. Le frazioni raccolte sono state analizzate spettrofotometricamente a 280 nm e mediante il saggio allo iodio per determinare, rispettivamente, la presenza di proteina e di PEG. Le frazioni risultate positive ad entrambi i test sono state riunite e concentrate per ultrafiltrazione usando un sistema Amicon con membrane da dialisi con cut-off di 10 kDa. La concentrazione di proteina delle soluzioni contenenti i prodotti purificati è stata determinata spettrofotometricamente a 280 nm e il saggio allo iodio ha permesso di determinare il grado di modifica della proteina (numero di catene di polimero/proteina). Il peso molecolare apparente dei bioconiugati è stato determinato per gel filtrazione utilizzando una retta di taratura ottenuta con proteine globulari a diverso peso molecolare.

2.2.2.2.4 Cinetica di spiazzamento del PEG da PEG-glicosil-HSA con carboidrazide

500 μ l di soluzioni contenenti i bioconiugati, PEG-galattosil-HSA-PEG e PEG-maltosil-HSA-PEG alla concentrazione di 5 mg/ml sono state aggiunte di 75 μ l di una soluzione 500 mM di carboidrazide in PBS, pH 7.4, in modo da ottenere un rapporto molare carboidrazide/proteina 100:1. Ad intervalli stabiliti, le soluzioni sono state analizzate mediante SEC-HPLC come riportato nel paragrafo 2.2.1.6.1 e dalla variazione dell'area del picco corrispondente alla glicosil-HSA è stata valutata la cinetica di spiazzamento del PEG da parte di carboidrazide come segue:

$$\% \text{ glicosil-HSA rilasciata} = \left(1 - \frac{\text{glicosil - HSA}}{\text{HSA totale}} \right) \times 100$$

2.2.2.2.5 Cinetiche di idrolisi di PEG-glicosil-HSA a differenti pH

Tre differenti soluzioni 5 mg/ml di HSA-PEG sono state diluite fino ad ottenere una concentrazione proteica di 1 mg/ml con tamponi: citrato 100mM, pH 4.5 (A), fosfato 100

mM, pH 7.4 (B) e borato 100 mM, pH 8.4 (C). A tempi stabiliti le soluzioni sono state analizzate mediante SEC-HPLC come riportato nel paragrafo 2.2.1.6.1 ed è stata determinata la percentuale di glicosil-HSA a partire dall'area dei picchi corrispondenti sulla base della seguente formula:

$$\% \text{ glicosil-HSA rilasciata} = \left(1 - \frac{\text{glicosil - HSA}}{\text{HSA totale}} \right) \times 100$$

Le costanti cinetiche di idrolisi sono state calcolate sulla base di una equazione di cinetica di primo ordine come coefficiente angolare delle rette che si ottengono graficando il logaritmo naturale della concentrazione della glicosil-HSA in funzione del tempo.

2.2.2.3 Glicazione sito-specifica e PEGhilazione di rh-G-CSF

2.2.2.3.1 Glicazione sito-specifica di Cys¹⁷ di rh-G-CSF

Maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide (0.915 mg, 1.07 μmoli) è stato aggiunto ad 1 ml di una soluzione 2 mg/ml di rh-G-CSF (0.107 μmoli) in tampone fosfato 50 mM, EDTA 10 mM, pH 6.5, in modo da ottenere un rapporto finale proteina/linker di 1:10. La miscela di reazione è stata mantenuta per 2 ore a temperatura ambiente. La proteina glicosilata è stata purificata mediante sistema FPLC con colonna preparativa Superose 12 (Pharmacia, Upssala, Sweden) eluita con tampone fosfato 50 mM e EDTA 10 mM, pH 5.5 a flusso 0.5 ml/min. Le frazioni raccolte sono state analizzate spettrofotometricamente e quelle contenenti la proteina sono state riunite e concentrate mediante ultrafiltrazione con sistema Amicon utilizzando membrana da dialisi con cut-off di 10 kDa.

2.2.2.3.2 Ossidazione di maltosil-rh-G-CSF

50 μl di una soluzione 200 mM di *m*-periodato di sodio sono stati aggiunti ad 1 ml di una soluzione 2 mg/ml di maltosil-rh-G-CSF in tampone fosfato 50 mM, EDTA 10 mM, pH 6.5. La reazione è stata mantenuta per 30 minuti a 25°C al buio e, successivamente, bloccata per aggiunta di 30 μl di una soluzione di mannitolo (500 mM). La miscela di reazione è stata

purificata per gel filtrazione mediante sistema FPLC utilizzando una colonna Superose 12 eluita con tampone citrato 50 mM, pH 4.5. Le frazioni contenenti maltosil-rh-G-CSF ossidato sono state riunite e concentrate mediante ultrafiltrazione utilizzando una membrana con cut-off di 10 kDa. Sulla soluzione finale è stato determinato il grado di ossidazione dei residui glicosilici con 2,4-dinitrofenilidrazina (2,4-DNPH) e calcolato il rapporto molare tra gruppi aldeidici.

2.2.2.3.3 PEGhilazione di rh-G-CSF

PEG-Hz 10 kDa è stato aggiunto ad 1 ml di una soluzione di 1 mg/ml di rh-G-CSF ossidato in tampone fosfato 50 mM, EDTA 10 mM, pH 6.5, in modo da ottenere un rapporto finale PEG/gruppi aldeidici di 10:1. Ad intervalli prestabiliti la miscela di reazione è stata analizzata mediante SEC-HPLC secondo la metodica riportata nel paragrafo 2.2.1.6.1 Sulla base delle aree dei picchi corrispondenti al maltosil-rh-G-CSF per calcolare il grado di PEGhilazione come segue:

$$\% \text{ PEGhilazione} = \left(1 - \frac{\text{maltosil - rh - G - CSF}}{\text{rh - G - CSF}} \right) \times 100$$

Dopo 130 ore di reazione il prodotto finale è stato purificato mediante gel filtrazione in FPLC come descritto nel paragrafo precedente.

Il peso molecolare apparente del PEG-maltosil-rh-G-CSF è stato determinato per gel filtrazione utilizzando una retta di taratura ottenuta con proteine globulari a diverso peso molecolare.

Soluzioni di rh-G-CSF nativo (0.1 mg/ml) e PEG-maltosil-rh-G-CSF (0.1 mg/ml) in tampone fosfato 50 mM, EDTA 10 mM, sono state analizzate mediante dicroismo circolare come riportato nel paragrafo 2.2.1.7.

2.2.2.4 PEGhilazione di HSA e rh-G-CSF con PEG-maleimide

PEG-maleimide 10 kDa commerciale è stato aggiunto ad un 1.0 ml di una soluzione 10 mg/ml HSA o 2 mg/ml di rh-G-CSF in tampone fosfato 50 mM e EDTA 10 mM, pH 6.5, in modo da ottenere un rapporto molare proteina/polimero di 1:10. A tempi prestabiliti le miscele di reazione sono state analizzate mediante SEC-HPLC come descritto al paragrafo

2.2.1.6.1. per valutare la percentuale di PEGhilazione di HSA e rh-G-CSF. Dopo 120 ore di reazione, le proteine PEGhilate sono state purificate per gel filtrazione in FPLC, concentrate ed analizzate spettrofotometricamente a 280 nm per la determinazione della concentrazione proteica e analizzate con saggio allo iodio per determinare il numero di catene di PEG legate alla proteina.

2.2.3 Modifica di proteine mediante *Atom Transfer Radical Polymerization*

2.2.3.1 Sintesi di derivati alchil-bromuro per la modifica sito-specifica di proteine

2.2.3.1.1 Sintesi di 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide

A. Sintesi di 2-(2-maleimidoetossi)etanolo

N-metossicarbonil-maleimide (500 mg, 3.22 mmoli) è stata sciolta in 3 ml di una soluzione acquosa satura di bicarbonato di sodio (NaHCO_3) e posta in bagno di ghiaccio. Successivamente, 335.3 μl di 2-(2-aminoetossi)etanolo (3.54 mmoli) sono stati aggiunti alla miscela di reazione. Dopo 30 minuti il prodotto è stato estratto dalla miscela di reazione con 4 ml di cloroformio. La soluzione organica, anidrificata con solfato di sodio anidro (Na_2SO_4), è stata evaporata a bassa pressione. L'intermedio chimico ottenuto, che si presenta come un olio, è stato caratterizzato spettroscopicamente con $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 , analisi di massa ESI-TOF e saggio di Snyder e di Ellman.

B. Sintesi di 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide

250 mg di 2-(2-maleimidoetossi)etanolo (1.35 mmoli) sono stati sciolti in 2 ml di cloroformio anidro ed esterificati per aggiunta di 166.9 μl di 2-bromo-isobutirril bromuro (1.35 mmoli) in presenza di 187.9 μl di Et_3N (1.35 mmoli). La miscela di reazione è stata mantenuta per 8 ore a 23°C sotto agitazione e in pressione positiva di azoto. Il solvente è stato rimosso a bassa pressione ed il prodotto, risciolto in diclorometano, è stato purificato mediante cromatografia utilizzando una colonna caricata con gel di silice ed eluendo il composto con una miscela 50:50 di etile acetato/etere di petrolio. Le frazioni raccolte sono state analizzate mediante TLC eluendo con la stessa miscela di solventi. Le soluzioni contenenti il 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide ($R_f = 0.67$) sono state riunite ed essiccate sotto vuoto. Il prodotto ottenuto è stato caratterizzato mediante spettrometria $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 , analisi di massa ESI-TOF e saggio di Snyder e di Ellman.

2.2.3.1.2 Sintesi del 2-bromo-isobutirril-cadaverina

120 μl di N-Boc-cadaverina (0.577 mmoli) sono stati dispersi in 15 ml di diclorometano anidro a cui sono stati aggiunti 71.3 μl di 2-bromo-isobutirril bromuro (0.577 mmoli) e 80.3 μl di Et_3N (0.577 mmoli). Dopo 3 ore di reazione a temperatura ambiente la miscela di

reazione è stata filtrata e concentrata mediante rotavapor. Il composto ottenuto è stato purificato tramite cromatografia su colonna di gel di silice eluita con una miscela 50:50 di etile acetato/n-esano. Le frazioni ottenute sono state analizzate mediante TLC eluita con la stessa miscela e quelle contenenti il prodotto desiderato ($R_f = 0.48$) sono state riunite e tirate a secco a bassa pressione. Il composto oleoso che si ottiene è stato successivamente disciolto in TFA al 95% e dopo 30 minuti l'acido è stato rimosso a pressione ridotta. Il *linker* ottenuto è stato caratterizzato mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 , analisi di massa ESI-TOF e saggio di Snyder.

2.2.3.2 Studi preliminari di ATRP

2.2.3.2.1 Sintesi di un probe cromoforico: 2-bromo-isobutirril-trinitrofenil-cadaverina

10 mg di 2-bromo isobutirril-cadaverina (0.040 mmoli) sono stati sciolti in tampone borato 50 mM, pH 8.5 e aggiunti di 1.3 ml di acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico al 1% p/v in DMF (0.046 mmoli). Dopo 4 ore il prodotto finale è stato estratto dalla miscela di reazione con cloroformio ed essiccato a pressione ridotta con rotavapor. Il 2-bromo-isobutirril-trinitrofenil-cadaverina (TNP-cadaverina-Br) si ottiene come polvere cristallina di colore giallo ed è stato caratterizzato mediante analisi di massa ESI-TOF, spettrometria UV-Vis e cromatografia a fase inversa (vedi. paragrafo 2.2.1.6.2.A).

A. Reazione di ATRP con TNP-cadaverina-Br

La reazione di ATRP a partire da TNP-cadaverina-Br è stata condotta utilizzando i reattivi nei rapporti molari reattivo/iniziatore radicalico riportati in Tabella III:

	rapporto molare reattivo/iniziatore
TNP-cadaverina-Br	1
PEGMA ($M_n \approx 300$ Da)	100
Cu(I)Br	40
2,2'-bipiridina	80
Acido ascorbico	0.3

Tabella III.: Rapporti molari (reattivi/iniziatore) utilizzati per la reazione di ATRP di PEGMA utilizzando come iniziatore TNP-cadaverina-Br.

Tutti i solventi utilizzati sono stati reflussati per almeno 30 minuti in corrente di azoto prima di essere impiegati per rimuovere eventuali tracce di ossigeno presenti in soluzione, mentre i contenitori usati per le reazioni sono state preventivamente riempiti di azoto ed ermeticamente chiusi fino al loro utilizzo.

Ad una soluzione di 4.12 μg di TNP-cadaverina-Br (8.85 nmoli) in 100 μl di tampone fosfato 50 mM, pH 6.0, sono stati aggiunti 5 μl di una soluzione al 5% di polietilenglicole metil etere metacrilato (PEGMA, ≈ 300 Da) in acqua milliQ (265.65 μg , 885.0 nmoli). e 15 μl della soluzione concentrata contenente il complesso catalizzatore metallico/ligando (6.77 mg di Cu(I)Br, 14.75 mg di 2,2'-bipiridina e 0.06 mg di acido ascorbico in 2 ml di acqua milliQ). La miscela di reazione viene analizzata tramite cromatografia a fase inversa utilizzando una colonna Luna C18 eluita con il gradiente descritto nel paragrafo 2.2.1.6.2.A e mediante cromatografia su strato sottile di silice (TLC) eluendo sia i reagenti che la miscela di reazione con una miscela 50:50 di n-esano/etile acetato. Come riferimento è stato utilizzato un poly-PEG di 33 kDa (PDI=1.10) ottenuto per polimerizzazione ATRP di polietilenglicole metil etere metacrilato (PEGMA, 1100 M_n) (Warwick Effect Polymers Ltd, Coventry, UK).

B. Reazione di ATRP con TNP-cadaverina-Br in presenza di rh-GH

La stessa reazione di polimerizzazione, descritta nel paragrafo precedente (2.2.3.1.3.A), è stata condotta aggiungendo rh-GH alla soluzione di reazione in modo da ottenere una concentrazione di proteina di 1 mg/ml. Il prodotto finale è stato analizzato come riportato nel punto (2.2.1.6.2.A).

2.2.3.2.2 Sintesi del macroiniziatore proteico HSA-Br

A 3 ml di una soluzione 20 mg/ml di HSA (0.866 μmoli) in tampone fosfato 50 mM, pH 6.5 vengono aggiunti 2.89 mg di 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide (8.66 μmoli) in modo da ottenere un rapporto molare proteina/linker di 1:10. Ad intervalli stabiliti viene eseguito il saggio di Ellman per determinare il grado di modifica dei gruppi tiolici liberi di HSA. L'albumina derivatizzata (HSA-Br) è stata purificata per ultrafiltrazione a 2200 rpm impiegando membrane da dialisi Vivaspin 6 con cut-off di 10 kDa e sulla soluzione finale è stata determinata la concentrazione proteica mediante analisi spettrofotometrica a 280 nm. Il macroiniziatore proteico HSA-Br è stato quindi analizzato mediante cromatografia a fase

inversa utilizzando il protocollo descritto nel paragrafo 2.2.1.6.2.B.

HSA-Br è stata analizzata anche mediante gel elettroforesi di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE, *stacking gel*: 4%; *running gel*: 10%) in condizioni riducenti secondo il protocollo di Laemmli [68].

2.2.3.2.3 Reazione di ATRP con HSA-Br

La reazione di polimerizzazione a partire da HSA-Br è stata condotta in tampone fosfato 50 mM, pH 6.5, in presenza di un sistema catalizzatore-ligando formato da Cu(I)Br e 2,2'-bipiridina (bpy). Sono stati utilizzati differenti monomeri acrilati: polietilenglicole metacrilato (PEGMA, ≈ 360 Da), N-isopropilacrilammide (NIPAAm, 113.16 Da) e N-vinil- ϵ -caprolattame (VCL, 139.19 Da), che presentano differenti proprietà e diverse caratteristiche chimico-fisiche.

Nella Tabella IV sono stati riportati i rapporti molari dei reattivi utilizzati rispetto all'iniziatore radicalico per allestire le reazioni di polimerizzazione allo scopo di ottenere polimeri con un peso finale di 30 kDa:

	rapporto molare reattivo/proteina
HSA-Br	1
PEGMA ($M_n \approx 360$ Da)	100
HSA-Br	1
NIPAAm	254
HSA-Br	1
VCL	200
Cu(I)Br	10
2,2'-bipiridina	20
Acido Ascorbico	0.75

Tabella IV.: Rapporti molari (reattivi/iniziatore) utilizzati per le reazioni di ATRP di PEGMA, NIPAAm e di VCL utilizzando come iniziatore macromolecolare HSA-Br.

In tutti i solventi usati per le reazioni è stato gorgogliato azoto per almeno 30 minuti prima del loro impiego. I contenitori sono stati preventivamente riempiti con azoto e tenuti chiusi fino al momento del loro utilizzo.

A tre campioni di 1 ml di una soluzione 10 mg/ml di HSA-Br sono stati aggiunti rispettivamente, 4.7 μ l PEGMA (5.2 mg, 14.4 μ mol), 4.1 mg di NIPAM (36.2 μ mol) e 3,88 μ l di VCL (4.0 mg, 28.7 μ mol). Alle miscele sono stati aggiunti 10 μ l di una soluzione contenente il complesso catalizzatore metallico/ligando costituita da 20.7 mg di Cu(I)Br, 45.0 mg di 2,2'-bipiridina, 1.9 mg di acido ascorbico in 1 ml di acqua milliQ. Dopo 24 ore i campioni sono stati purificati con ultrafiltrazione a 2200 rpm impiegando membrane da dialisi Vivaspin 6 con cut-off di 10 kDa e analizzati mediante cromatografia a fase inversa utilizzando una colonna Vydac C4 eluita come riportato nella sezione 2.2.1.6.2.B.

5 μ g di ciascun campione sono stati caricati ed analizzati mediante gel elettroforesi di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE - *stacking gel*: 4%; *running gel*: 10%) in condizioni riducenti. Le bande ottenute dopo colorazione con Blue di Comassie sono state confrontate con proteine standard di diverso peso molecolare.

2.2.3.2.4 Sintesi del macroiniziatore proteico rh-G-CSF-Br

A 2.0 ml di una soluzione 2 mg/ml di rh-G-CSF (4 mg, 0.214 μ mol) in tampone fosfato 50 mM, pH 6.5 sono stati aggiunti 0.715 mg di 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide (2.14 μ mol) per ottenere un rapporto molare proteina/*linker* di 1:10. La soluzione è stata mantenuta a temperatura ambiente per 30 minuti e quindi analizzata mediante saggio di Ellman per determinare il grado di coniugazione ai gruppi tiolici. La miscela di reazione è stata quindi purificata mediante gel filtrazione usando una colonna di G25 *superfine* e le frazioni contenenti la proteina sono state riunite. La concentrazione proteica nella soluzione finale è stata determinata per via spettrofotometrica a 280 nm. Il prodotto purificato, rh-G-CSF-Br, è stato analizzato con cromatografia a fase inversa mediante sistema HPLC equipaggiato con una colonna Vydac C4 eluita con il gradiente descritto nel paragrafo 2.2.1.6.2.B.

Una soluzione 0.1 mg/ml di rh-G-CSF-Br in tampone fosfato 50 mM, pH 6.5, è stata analizzata mediante dicroismo circolare. Per confronto è stata eseguita l'analisi su una soluzione 0.1 mg/ml di rh-G-CSF come descritto nel paragrafo 2.2.1.7.

2.2.3.2.5 Reazione di ATRP con rh-G-CSF-Br

Tutti i solventi, i contenitori e le eppendorf usati per le reazioni sono stati reflussati con azoto per almeno 30 minuti prima del loro impiego.

Per allestire le reazioni sono stati utilizzati i reagenti con rapporti molari ben definiti allo scopo di ottenere un polimero con un peso molecolare finale di 30 kDa. Nella Tabella V sono state riportate le quantità ed i rapporti molari dei reattivi utilizzati.

	rapporto molare reattivo/iniziatore
rh-G-CSF-Br	1
PEGMA (Mn≈300 Da)	100
Cu(I)Br	40
2,2'-bipiridina (o Me ₆ TREN)	80
Acido ascorbico	0.3

Tabella V.: Rapporti molari (reattivi/iniziatore) utilizzati per la reazione di ATRP di PEGMA utilizzando come iniziatore macromolecolare rh-G-CSF-Br.

A 100 µl di una soluzione 1 mg/ml di rh-G-CSF-Br (5.35 nmoli) sono stati aggiunti 5 µl di una soluzione al 5% di PEGMA in acqua milliQ (535.0 nmoli) e 5 µl della soluzione di complesso catalizzatore metallico/ligando ottenuta sciogliendo 6.15 mg di Cu(I)Br, 13.40 mg di bpy (oppure 9.90 mg di Me₆TREN) e 0.06 mg di acido ascorbico in 1 ml di acqua milliQ. A tempi stabiliti la miscela di reazione è stata analizzata mediante cromatografia a fase inversa utilizzando una colonna Vydac C4 eluita con il gradiente descritto nel paragrafo 2.2.1.6.2.B.

2.2.3.2.6 Sintesi del macroiniziatore proteico rh-GH-Br₂

Ad 1 ml di una soluzione 2 mg/ml di rh-GH (0.09 µmoli) in tampone TRIS 0.2 M, pH 7.5 sono aggiunti 2.28 mg di 2-bromo-isobutirril-cadaverina (0.9 µmoli), in modo da ottenere un rapporto proteina/linker di 1:100. La reazione di funzionalizzazione è stata catalizzata da 0.1 U.I./ml di transglutaminasi microbiologica (M-TGase). Dopo 12 ore di reazione a temperatura ambiente e senza agitazione l'eccesso di linker è stato eliminato per gel filtrazione con una colonna caricata con resina G25 *superfine* eluita con tampone fosfato

50 mM, pH 6.0. Le frazioni analizzate spettrofotometricamente a 280 nm contenenti proteina sono state riunite e la concentrazione finale è stata determinata mediante analisi UV-Vis a 280 nm. Il prodotto purificato rh-GH-Br₂ è stato analizzato mediante cromatografia RP-HPLC con una colonna Vydac C4 come riportato nel paragrafo 2.2.1.6.2. B.

100 µg di rh-GH-Br₂ sono stati purificati tramite RP-HPLC, liofilizzati ed infine caratterizzati tramite analisi di massa ESI-TOF in modalità positiva; per confronto sono stati analizzati anche 100 µg di rh-GH nativo.

Soluzioni di rh-GH nativo (0.1 mg/ml) e rh-GH-Br₂ (0.1 mg/ml) in tampone fosfato 50 mM, pH 6.0, sono state analizzate mediante dicroismo circolare come riportato nel paragrafo 2.2.1.7.

2.2.3.2.7 Reazione di ATRP con rh-GH-Br₂

Nella Tabella VI sono state riportate le quantità ed i rapporti molari dei reattivi utilizzati per la reazione di polimerizzazione allo scopo di un polimero con un peso molecolare calcolato di 30 kDa.

	rapporti molari reattivi/iniziatore
rh-GH-Br ₂	0.5
PEGMA (Mn≈300 Da)	100
Cu(I)Br	40
2,2'-bipiridina	80
Acido ascorbico	0.3

Tabella VI: Rapporti molari (reattivi/iniziatore) utilizzati per la reazione di ATRP di PEGMA utilizzando come iniziatore macromolecolare rh-GH-Br₂.

A 100 µl di una soluzione 1 mg/ml di rh-GH (5.35 nmoli) sono stati aggiunti 5 µl di una soluzione al 5% di PEGMA in acqua milliQ (160.68 µg, 535.0 nmoli e 5 µl di una soluzione di complesso catalizzatore metallico/ligando, ottenuta sciogliendo 6.15 mg di Cu(I)Br, 13.40 mg di bpy e 0.06 mg di acido ascorbico in 1.0 ml di acqua milliQ. A tempi definiti la miscela di reazione è stata analizzata tramite cromatografia RP-HPLC utilizzando una colonna Vydac C4 eluita come riportato nel paragrafo 2.2.1.6.2. B. Il prodotto ottenuto è stato purificato per gel filtrazione utilizzando una colonna di G25 *superfine* eluita con tampone

fosfato 50 mM, pH 6.0. Le frazioni contenenti proteina sono state raccolte e riunite e la concentrazione di rh-GH è stata determinata mediante spettrofotometria a 280 nm. Il prodotto finale è stato analizzato mediante gel elettroforesi di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE - *stacking gel*: 4%; *running gel*: 12%) in condizioni riducenti. Le bande ottenute dopo colorazione con Blue di Comassie sono state confrontate con proteine standard di diverso peso molecolare.

RISULTATI

3.1 GLICAZIONE SITO-SPECIFICA E PEGHILAZIONE DI PROTEINE

3.1.1 Sintesi dei *linker* alchil-glicosilici attivati con gruppi maleimidici

In Figura 3.1 è riportato lo schema generale di sintesi adottato per la preparazione dei due derivati alchil-glicosilici: galattosil-glucon-amide-dodecil-amido-propanoilmaleimide e maltosil-glucon-amide-dodecil-amido-propanoilmaleimide.

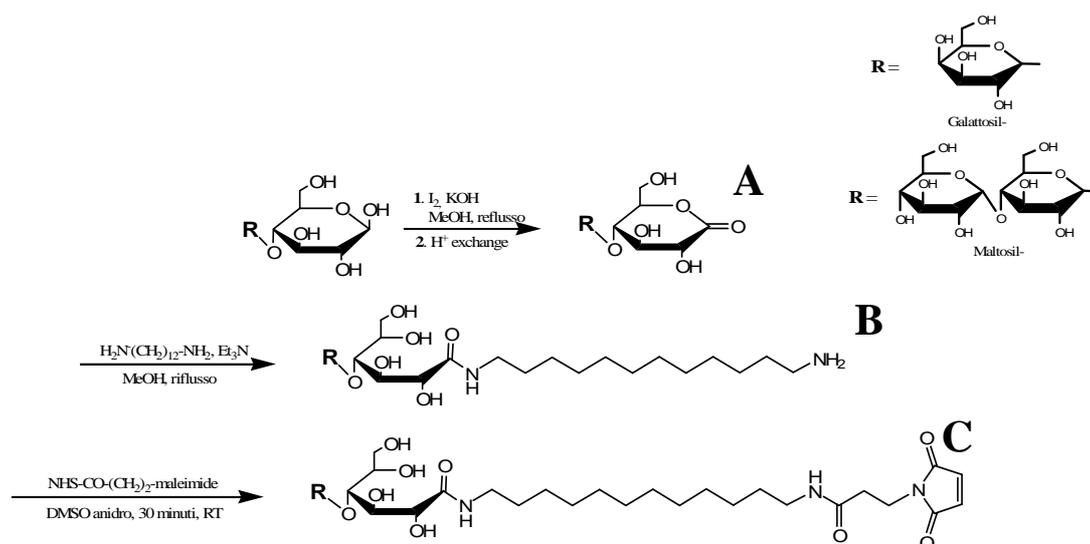


Figura 3.1.: Schema di sintesi dei *linker* alchil-saccaridici: lattonolattone e maltotriionolattone (A); galattosil-glucon-amide-dodecil-ammina e maltosil-glucon-amide-dodecil-ammina (B); galattosil-glucon-amide-dodecil-amido-propanoilmaleimide e maltosil-glucon-amide-dodecil-amido-propanoilmaleimide (C). [dove R corrisponde al residuo galattosilico per il derivato del lattosio e al residuo maltosilico per il derivato del maltotriosio.]

3.1.1.1 Sintesi di lattonolattone e del maltotrionolattone (A)

Il lattonolattone ed il maltotrionolattone sono stati preparati a partire dal lattosio e maltotriosio secondo la procedura riportata in letteratura [69].

I derivati lattonici sono stati ottenuti per ossidazione selettiva del carbonio anomero (C1) con iodio. In presenza di idrossido di potassio si ottiene un precipitato bianco corrispondente a lattonolattone di potassio nel caso del lattosio e a maltotrionolattone di potassio nel caso di maltotriosio. La successiva eluizione con acqua deionizzata da una resina cationica (Amberlite IR-120B) permette di ottenere i corrispondenti acidi glicosilici. Dopo ricristallizzazione in etere dietilico freddo si sono ottenuti prodotti cristallini bianchi con resa del 60-70% p/p. Gli spettri IR (KBr) dei prodotti finali riportati nella Figura 3.2 (A) e 3.2 (B) mostrano la presenza di bande caratteristiche tra 1750 e 1735 cm^{-1} e tra 1300 e 1000 cm^{-1} che corrispondono ai segnali degli esteri ciclici caratteristici dello *stretching* del C=O e dello *stretching* del C-O.

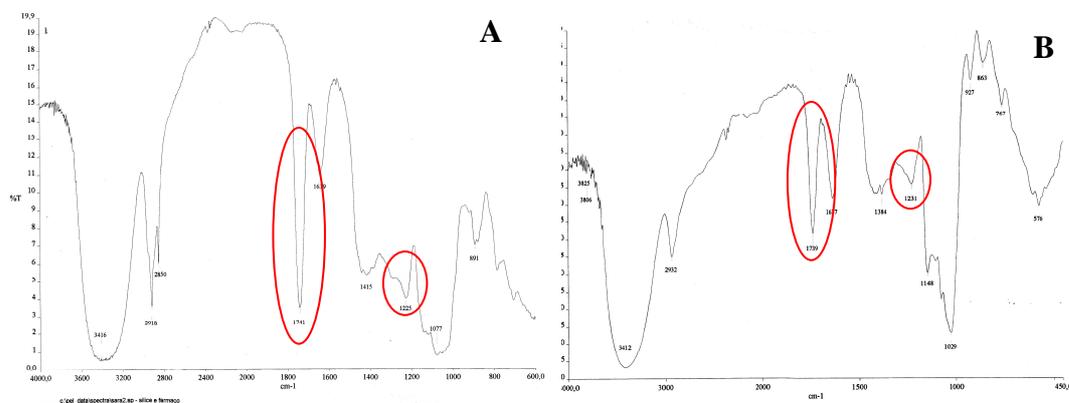


Figura 3.2.: Spettro IR di lattonolattone (A) e maltotrionolattone (B). Negli spettri sono evidenziate le bande di assorbimento caratteristiche dell'estere ciclico: 1741 e 1225 cm^{-1} per il lattonolattone e 1739 e 1231 cm^{-1} per il maltotrionolattone.

Per confronto la Figura 3.3 mostra gli spettri degli zuccheri di partenza, lattosio (A) e maltotriosio (B) in cui sono assenti le bande dei gruppi lattonici.

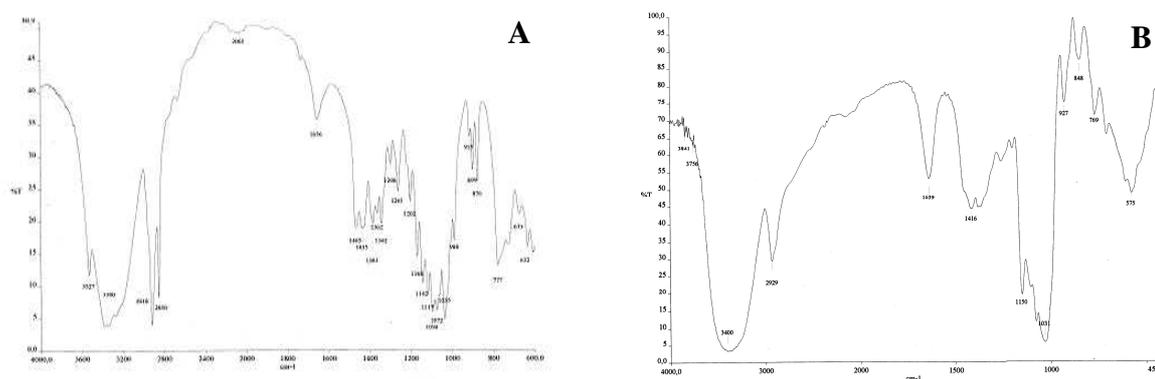


Figura 3.3.: Spettro IR di lattosio (A) e di maltotriosio (B).

3.1.1.2 Sintesi del galattosil-glucon-amide-dodecil-ammina e del maltosil-glucon-amide-dodecilammina (B)

I derivati lattonici, lattonolattone e maltotrionolattone, sono stati derivatizzati con 1,12-dodecildiammina impiegando un largo eccesso di alchil-diammina rispetto al derivato lattonico. In tal modo è stato possibile ottenere derivati in cui la funzione glicosilica è legata ad una sola estremità della catena alchilica ed evitare la formazione dei derivati in cui due funzioni glicosiliche sono legate ad entrambi i gruppi amminici. Dopo 2 ore la reazione è risultata completa ed il galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂ e il maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂ sono stati recuperati per precipitazione in etere dietilico (0.1% Et₃N) freddo. La presenza della trietilammina rende più solubile la 1,12-dodecildiammina, mentre il derivato glicosil-alchilico è praticamente insolubile e precipita. Tale processo di purificazione consente pertanto di eliminare l'eccesso di dialchil-ammina impiegato nella reazione. La resa di prodotto è risultata essere 87% p/p nel caso di galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂ e 65% p/p maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂.

Lo spettro IR del prodotto ottenuto ha evidenziato la scomparsa delle bande caratteristiche dei derivati lattonici corrispondenti agli esteri ciclici a ν 1741 cm⁻¹ (*stretching* C=O) e 1225 cm⁻¹ (*stretching* C-O), già riportati in Figura 3.2.

Gli spettri ¹H-NMR (D₂O), riportati in Figura 3.4 (A), mostrano i seguenti segnali caratteristici: δ 1.324 s [20H, -(CH₂)₁₀-], δ 1.588 bm [4H, -NH-CH₂- e -CH₂-NH₂], δ 3.5–4.2 bm [19H, -H, -OH e -CH₂-OH del lattosio], δ 4.397 d [1H, H1']. Dal rapporto tra l'integrale

del segnale relativo al protone anomero in posizione H1' e quello dei protoni corrispondenti ai metileni della catena alchilica è stato calcolato un rapporto molare glicosile/alchile è di 1:1 che conferma la monofunzionalizzazione della catena alchilica con una funzione glicosilica.

Lo spettro di massa ESI-TOF riportato in Figura 3.4 (B) mostra la presenza dei segnali m/e a 541.31 (M+H)¹⁺ e 271.16 (M+2H)²⁺ che corrispondono al peso molecolare calcolato per C₂₄H₄₈N₂O₁₁ (540.33 Da).

Dai risultati ottenuti con il saggio di Snyder condotto su una soluzione a concentrazione nota di prodotto è stato calcolato un rapporto molare NH₂/galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂ di 0.92.

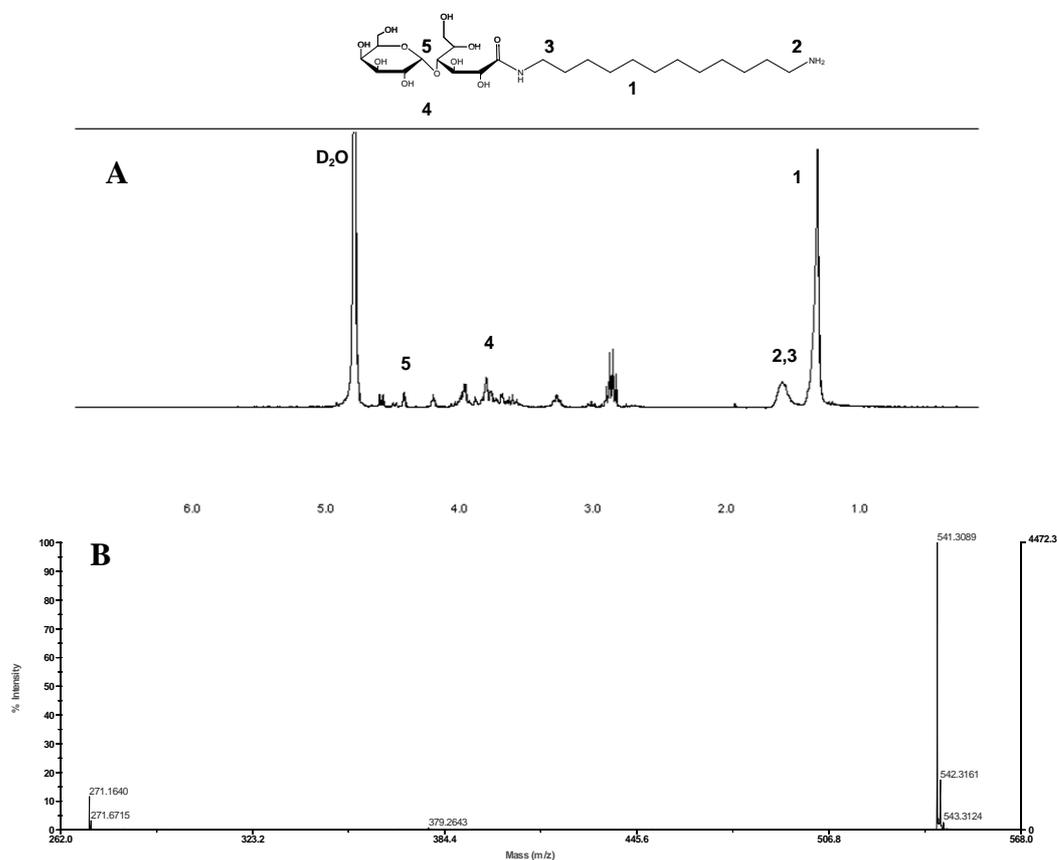


Figura 3.4.: Galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂: spettro ¹H-NMR in D₂O (A) e spettro di massa ESI-TOF (B).

Come per il galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂, lo spettro IR ottenuto con maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂ mostra la scomparsa delle bande dell'estere ciclico a ν 1739 cm⁻¹ e a 1231 cm⁻¹.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (D_2O) riportato in Figura 3.5 (A) mostra i seguenti segnali caratteristici: δ 1.326 s [20H, $-(\text{CH}_2)_{10}$], δ 1.590 bm [4H, $-\text{NH-CH}_2-$ e $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$], δ 3.5-4.8 bm [28H, $-\text{H}$, $-\text{OH}$ e $-\text{CH}_2-\text{OH}$ del maltotriosio], δ 5.198 d [1H, $\text{H1}'$], δ 5.435 d [1H, $\text{H1}''$]. Anche in questo caso dal rapporto degli integrali relativi al segnale caratteristico del protone $\text{H1}'$ e protoni dei metileni della catena alchilica si ottiene che il rapporto molare glicosile/alchile è di 1:1 indicando che ad ogni catena alchilica è legata una funzione glicosilica.

Lo spettro di massa ESI-TOF riportato in Figura 3.5 (B) mostra i segnali m/e a 703.41 ($\text{M}+\text{H}$) $^{1+}$ e 352.21 ($\text{M}+2\text{H}$) $^{2+}$ che sono in accordo con il valore di massa calcolato per $\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_{16}$ (702.79 Da).

L'analisi colorimetrica dei gruppi amminici mediante saggio di Snyder condotta su una soluzione a concentrazione nota di prodotto mostra che il rapporto molare $\text{NH}_2/\text{galattosil-glucono-CO-NH-(CH}_2)_{12}\text{-NH}_2$ è di 0.95.

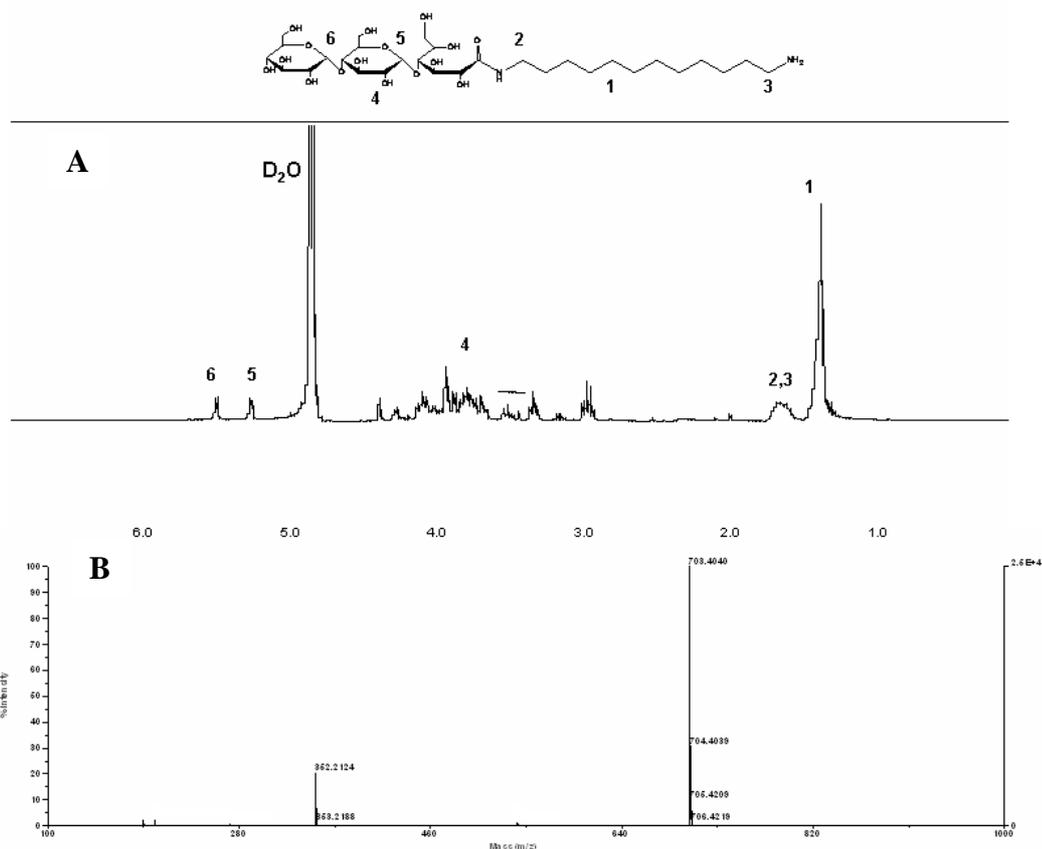


Figura 3.5.: Maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂: spettro $^1\text{H-NMR}$ in D_2O (A) e spettro di massa ESI-TOF (B).

3.1.1.3 Sintesi del galattosil-glucon-amide-dodecil-amido-propanoilmaleimide e maltosil-glucon-amide-dodecil-amido-propanoilmaleimide (C)

I derivati galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂ e maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂ sono stati fatti reagire con N-succinimidil 3-maleimido-propionato allo scopo di inserire un gruppo maleimidico nella parte ammino-terminale della funzione alchilica. La reazione è stata condotta in DMSO anidro in cui tutti i reattivi sono risultati solubili e quindi i coniugati finali sono stati isolati per precipitazione con etere dietilico. La resa di prodotto dopo purificazione è risultata essere di 50% p/p nel caso di galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide e 84% p/p nel caso di maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide.

Lo spettro ¹H-NMR (D₂O) riportato in Figura 3.6 (A) mostra i segnali caratteristici del galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide ottenuto: δ 1.342 bs [20H, -(CH₂)₁₀-], δ 1.588 bm [4H, -NH-CH₂- e -CH₂-NH₂], δ 2.506 t [2H, -CH₂- in β rispetto al gruppo maleimidico], δ 3.108 t [2H, -CH₂- in α rispetto al gruppo maleimidico], δ 3.5-4.2 bm [19H, -H, -OH e -CH₂-OH del lattosio], δ 4.397 d [1H, H1'], δ 6.920 s [2H, -CH=CH- della maleimide].

Dal rapporto dell'integrale a δ 1.34, relativo ai 20 protoni della catena alchilica di dodecildiammina, e di quello a δ 6.92, corrispondente ai 2 protoni vinilici del gruppo maleimidico, è stato possibile calcolare una percentuale di modifica dei *linker* quasi totale.

Lo spettro di massa ESI-TOF riportato in Figura 3.6 (B) mostra i segnali m/e caratteristici a 692.37 (M+H)¹⁺ e 346.70 (M+2H)²⁺ che corrispondono alla massa di 691.76 calcolata per C₃₁H₅₃N₃O₁₄.

Il saggio di Snyder eseguito su una soluzione a concentrazione nota di derivato ha evidenziato la presenza del 4% di gruppi amminici non derivatizzati (moli NH₂/moli di *linker* glicosilico, %) indicando la quasi totale funzionalizzazione dei gruppi amminici inizialmente presenti nel derivato glicosil-alchilamminico.

Il saggio con DTNB ha mostrato un grado di modifica del *linker* maleimidico del 95% (moli di maleimide/moli di *linker* glicosilico, %).

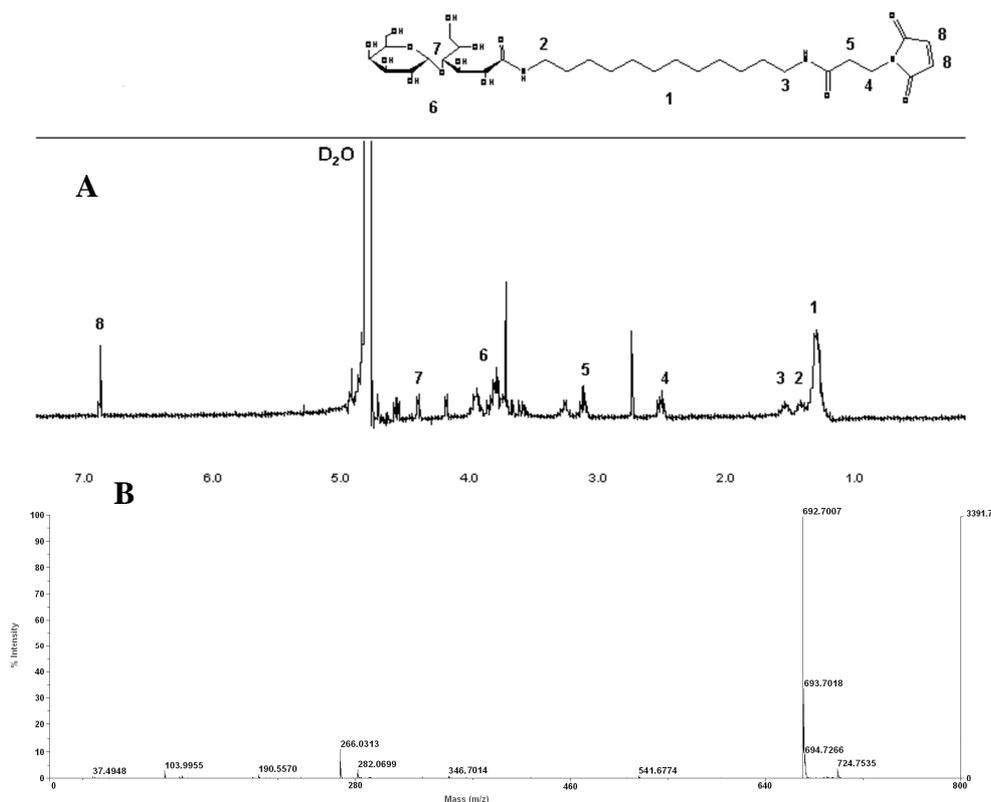


Figura 3.6.: Galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide: spettro ¹H-NMR in D₂O (A) e spettro di massa ESI-TOF (B).

Lo spettro ¹H-NMR (D₂O) riportato in Figura 3.7 (A) mostra i segnali caratteristici del maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide: δ 1.340 bs [20H, -(CH₂)₁₀-], δ 1.586 bm [4H, -NH-CH₂- e -CH₂-NH₂], δ 2.523 t [2H, -CH₂- in β rispetto al gruppo maleimidico], δ 3.127 t [2H, -CH₂- in α rispetto al gruppo maleimidico], δ 3.5-4.8 bm [28H, -H, -OH e -CH₂-OH del maltotriosio], δ 5.198 d [1H, H1'], δ 5.435 d [1H, H1''], δ 6.921 s [2H, -CH=CH- della maleimide]. Dal rapporto dell'integrale a δ 1.34, relativo ai 20 protoni della catena alchilica di dodecildiammina, e di quello a δ 6.92, corrispondente ai 2 protoni vinilici del gruppo maleimidico, è stato possibile calcolare una percentuale di modifica dei *linker* quasi totale. Infatti il saggio di Ellman con DTNB ha mostrato un grado di attivazione del *linker* del 92% (moli di maleimide/moli di *linker* glicosilico, %).

Lo spettro di massa ESI-TOF riportato in Figura 3.7 (B) mostra i segnali m/e caratteristici a 854.41 ($M+H$)¹⁺ e 427.71 ($M+2H$)²⁺ che corrispondono alla massa calcolata per C₃₇H₆₃N₃O₁₉ (853.41 Da).

I gruppi amminici residui sono stati determinati mediante saggio di Snyder e sono risultati essere 1% rispetto a quelli iniziali (moli NH₂/moli di *linker* glicosilico, %).

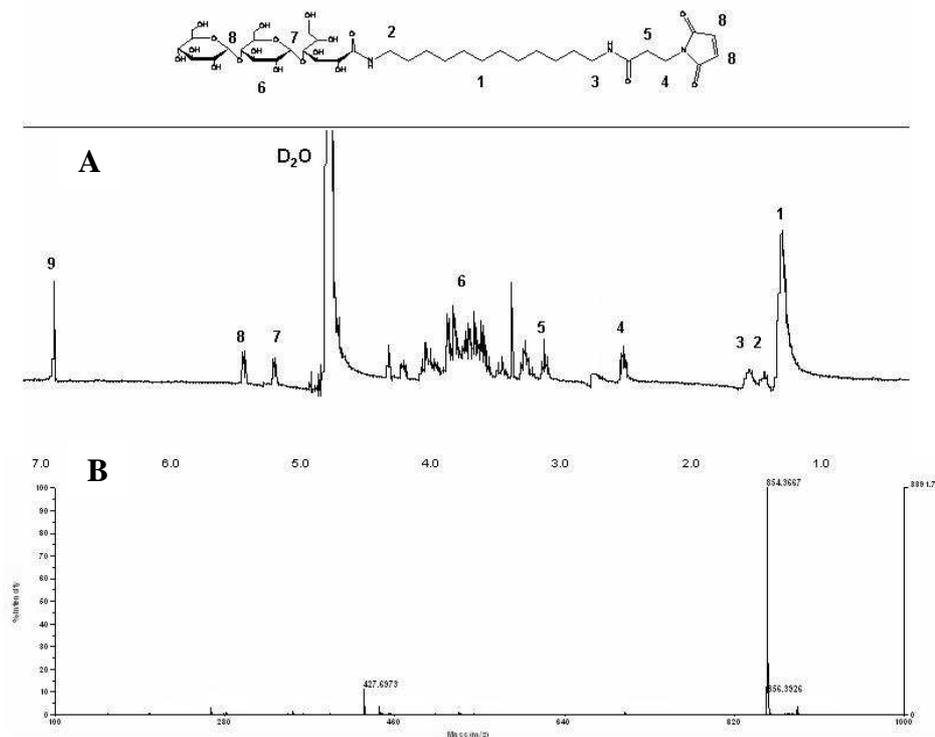


Figura 3.7.: Maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide: spettro ¹H-NMR in D₂O (A) e spettro di massa ESI-TOF (B).

3.1.2 PEGhilazione di HSA mediante glicazione sito-specifica

3.1.2.1 Glicazione sito-specifica della Cys³⁴ di HSA

La reazione di glicazione di HSA con i derivati maleimidici sintetizzati, galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide e maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide, è stata condotta a pH 6.5 secondo lo schema riportato in Figura 3.8. A questo valore di pH la funzione maleimidica è selettivamente reattiva verso i gruppi tiolici della proteina con cui forma un legame tioetereo stabile.

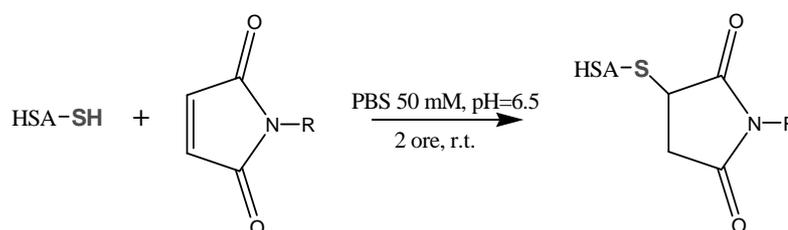


Figura 3.8.: Meccanismo di reazione tra gruppo maleimidico di galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide e maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide e la cisteina in posizione 34 della HSA. [R corrisponde alla porzione alchil-glicosilica del *linker*].

L'analisi dei residui tiolici liberi durante la reazione ha dimostrato che l'alchilazione dei gruppi -SH della proteina è completa in due ore con una resa di reazione del 95-99%.

La purificazione della proteina glicosilata, galattosil-HSA o maltosil-HSA, mediante cromatografia di gel filtrazione ha permesso di rimuovere completamente il *linker* in eccesso.

3.1.2.2 Ossidazione selettiva dei residui glicosilici di HSA-glicata con *m*-periodato

I residui glicosilici della glicosil-HSA sono stati ossidati con *m*-periodato secondo il protocollo riportato in letteratura [70]. Questa strategia di ossidazione chimica, riportata in Figura 3.9, è selettiva per i gruppi ossidrilici vicinali e permette di ottenere gruppi aldeidici che si formano per rottura del legame C-C [71].

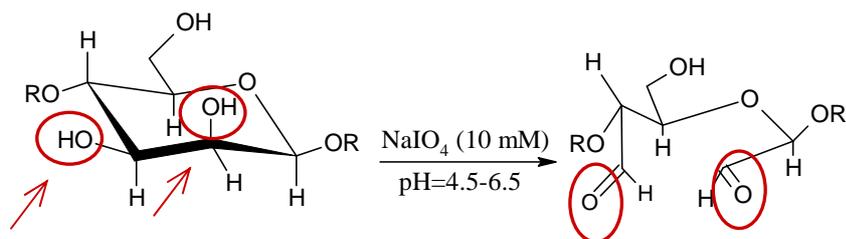


Figura 3.9.: Meccanismo di ossidazione selettiva di dioli ad opera di periodato di sodio.

La reazione di ossidazione è stata bloccata per aggiunta di mannitolo; i reattivi e i prodotti secondari di reazione a basso peso molecolare sono stati eliminati per ultrafiltrazione. L'ottimizzazione delle condizioni di glicazione e di ossidazione utilizzate ha permesso di ottenere con il galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide e con maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide un rapporto molare gruppi aldeidici/proteina, rispettivamente, di 2.2:1 e 3.2:1.

3.1.2.3 Cinetiche di PEGhilazione

La reazione tra i gruppi aldeidici della proteina e le funzioni idraziniche del PEG è riportata in Figura 3.10.

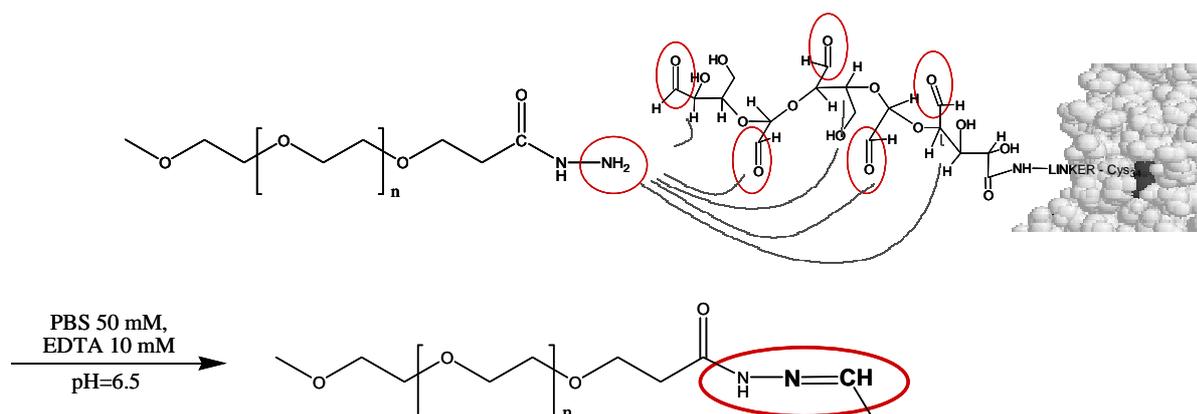


Figura 3.10.: Reazione di coniugazione di glicosil-HSA ossidata con PEG-idrazide: formazione di un legame idrazonico.

I profili di PEGhilazione riportati in Figura 3.11 (A) mostrano che la coniugazione di PEG-Hz alla proteina glicosilata ossidata è completa dopo circa 40 ore di reazione sia nel caso di HSA glicata con galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide e che HSA modificata con maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide. Al contrario, la PEGhilazione condotta con il prodotto commerciale PEG-maleimide è risultata essere molto più lenta ed incompleta in quanto solo il 30% di proteina viene PEGhilata in circa 70 ore di reazione.

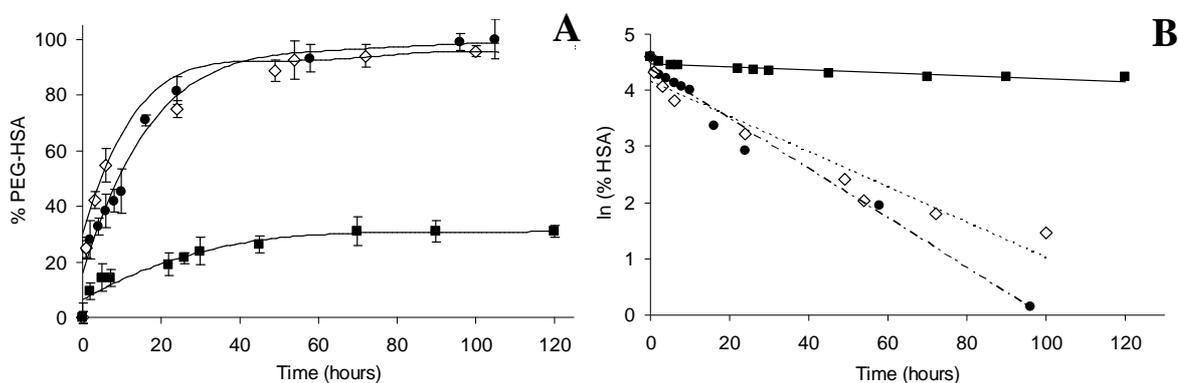


Figura 3.11.: A: Profili di PEGhilazione di HSA nativa con PEG-maleimide (10 kDa) (■) e di galattosil-HSA (●) e maltosil-HSA (◇) con PEG-Hz (10 kDa) in tampone fosfato 50 mM e EDTA 10 mM, pH=6.5. I valori medi e la loro deviazione standard (\pm SD) sono stati calcolati su quattro esperimenti. B: Cinetica di scomparsa di galattosil-HSA ossidata (●), maltosil-HSA ossidata (◇), e di HSA nativa (■) durante il processo di PEGhilazione riportato nel pannello A.

I profili cinetici riportati in Figura 3.11 (B) mostrano che il processo di PEGhilazione segue una cinetica di ordine 1° in cui le costanti cinetiche sono risultate essere 63.9×10^{-3} per la galattosil-HSA, $86.0 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ per la maltosil-HSA e $7.4 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ per la modifica diretta.

3.1.2.4 Caratterizzazione dei bioconiugati ottenuti

Dopo 120 ore di incubazione i bioconiugati finali, PEG-galattosil-HSA e PEG-maltosil-HSA, sono stati purificati e caratterizzati mediante gel filtrazione.

In Figura 3.12 sono riportati i profili di eluizione ottenuti mediante analisi di gel filtrazione con HPLC per HSA nativa, maltosil-HSA e il corrispondente prodotto PEGhilato che si ottiene dopo 120 ore di reazione.

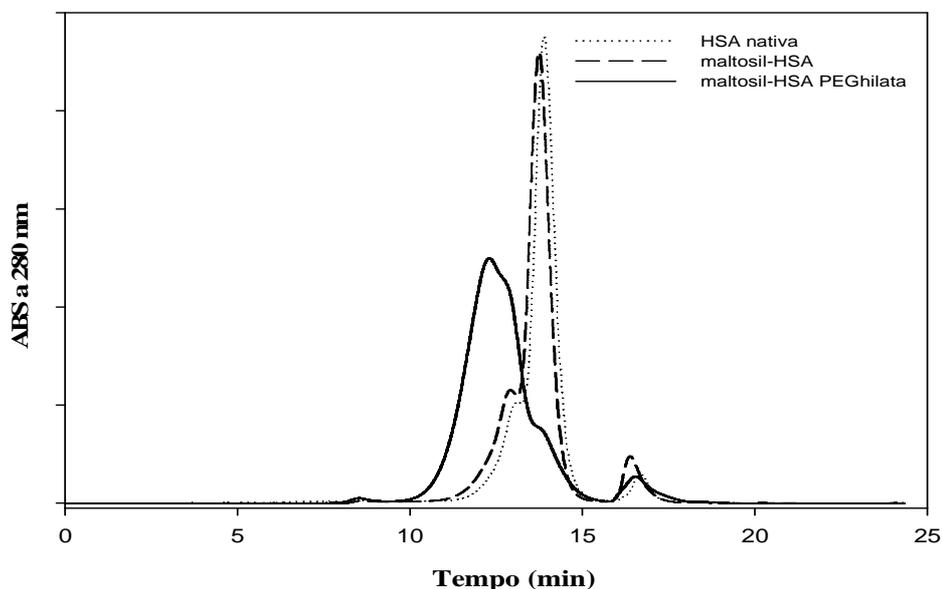


Figura 3.12.: Overlay di profili di eluizione di HSA nativa (.....), maltosil-HSA (---) e PEG-maltosil-HSA dopo 120 ore di reazione (—) ottenuti con SEC-HPLC monitorando a 280 nm.

Il peso molecolare apparente dei bioconiugati, determinato mediante cromatografia di gel filtrazione con HPLC utilizzando una retta di taratura ottenuta con proteine globulari standard, è risultato essere di 140 kDa per PEG-galattosil-HSA e di 170 kDa per PEG-maltosil-HSA. Tali risultati sono in accordo con il peso molecolare apparente dei coniugati calcolato sommando il peso di HSA nativa (69.3 kDa) con quello di due e tre catene di PEG (10 kDa) il quale è riportato avere un peso molecolare apparente di circa 30 kDa [72].

3.1.2.5 Cinetica di spiazzamento del PEG da PEG-glicosil-HSA con carboidrazide

I bioconiugati sono stati incubati con carboidrazide in modo da valutare la reversibilità del legame idrazonico tra il PEG ed il residuo glicosilico ossidato e si è valutato il profilo di comparsa della proteina glicata non PEGhilata mediante analisi cromatografica di gel filtrazione HPLC.

I profili di rilascio di PEG-galattosil-HSA (Figura 3.12) e di PEG-maltosil-HSA (Figura 3.13) mostrano in entrambi i casi che in presenza di carboidrazide il coniugato rilascia PEG molto più rapidamente che in assenza dell'agente competitivo ed evidenziano la reversibilità del legame idrazonico.

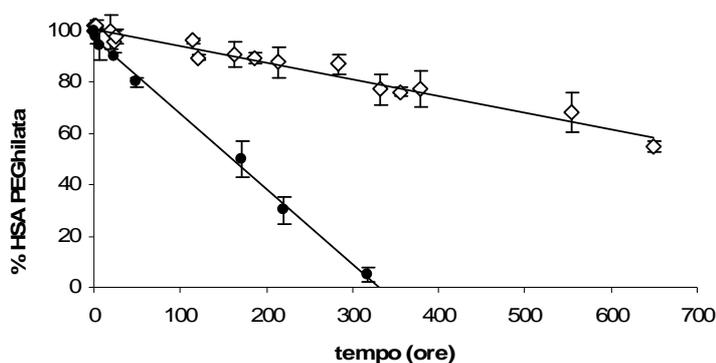


Figura 3.13.: Cinetica di spiazzamento del PEG dal bioconiugato PEG-galattosil-HSA in presenza di carboidrazide (●) e senza (◇). I valori medi riportati e la loro deviazione standard (\pm SD) sono stati calcolati sui risultati di tre esperimenti.

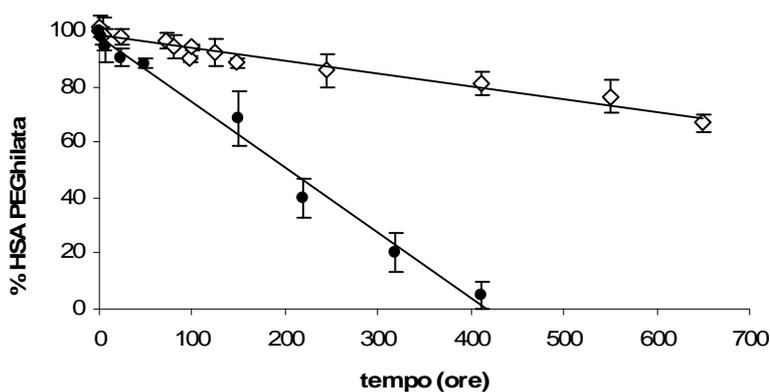


Figura 3.14.: Cinetica di spiazzamento del PEG dal bioconiugato ottenuto con PEG-maltosil-HSA in presenza di carboidrazide (●) e senza (◇). I valori medi riportati e la loro deviazione standard (\pm SD) sono stati calcolati sui risultati di tre esperimenti.

3.1.2.6 Cinetiche di idrolisi di PEG-glicosil-HSA in funzione del pH

Lo studio di idrolisi del legame idrazonico nei differenti bioconjugati di PEG-glicosil-HSA è stato determinato tramite analisi SEC-HPLC a diverso pH: 4.5, 7.4 e 8.4. Nelle diverse condizioni di pH si osserva la diminuzione dell'area del picco di proteina PEGhilata conseguente al rilascio di glicosil-HSA e PEG e aumento dell'area del picco relativo ad glicosil-HSA. I profili di rilascio ottenuti sono stati riportati in Figura 3.15.

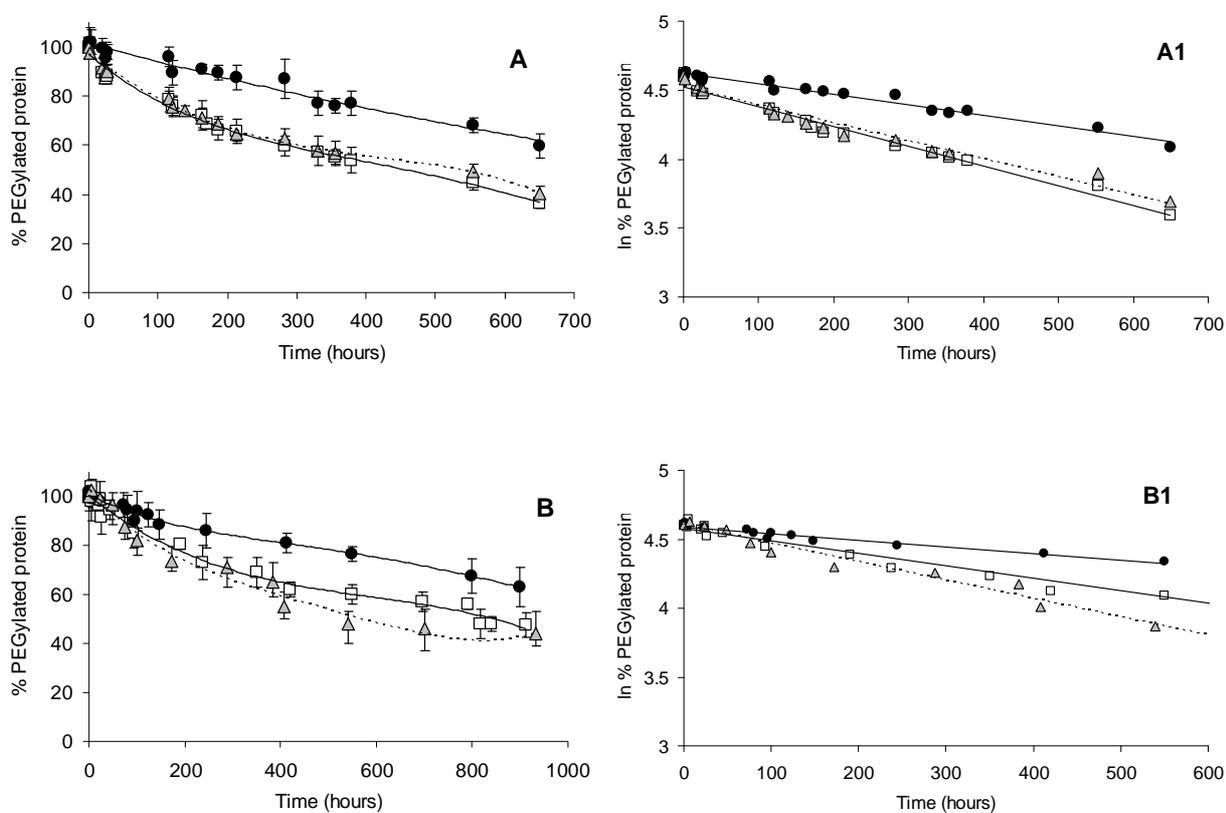


Figura 3.15.: Profili di idrolisi ottenuti in differenti condizioni di pH per PEG-galattosil-HSA (A, A1) e PEG-maltosil-HSA (B, B1). Il grafico riporta le cinetiche ottenute a pH=4.5 (\square), pH=7.4 (\bullet) e pH=8.4 (\blacktriangle). I valori medi e la loro deviazione standard (\pm SD) sono stati calcolati sulla base di quattro esperimenti.

I valori delle costanti cinetiche riportate in Tabella VII mostrano che entrambi i bioconiugati sono più stabili a pH fisiologico, mentre la velocità di idrolisi aumenta a pH più acidi o più basici.

	pH = 4.5 (hr ⁻¹)	pH = 7.4 (hr ⁻¹)	pH = 8.4 (hr ⁻¹)
PEG-galattosil-HSA	1.4 x 10 ⁻³ (R ² =0.975)	0.8 x 10 ⁻³ (R ² =0.968)	1.3 x 10 ⁻³ (R ² =0.963)
PEG-maltosil-HSA	0.9 x 10 ⁻³ (R ² =0.947)	0.5 x 10 ⁻³ (R ² =0.940)	1.3 x 10 ⁻³ (R ² =0.962)

Tabella VII.: Costanti cinetiche di rilascio di proteina libera da PEG-galattosil-HSA e PEG-maltosil-HSA calcolate nelle differenti condizioni di pH (4.5, 7.4, 8.4).

Il bioconiugato PEG-maltosil-HSA mostra un rilascio di proteina libera più lento rispetto al PEG-galattosil-HSA, dovuto ad un maggior numero di catene di PEG legate al glicosile.

3.1.3 PEGhilazione di rh-G-CSF mediante glicazione sito-specifica

3.1.3.1 Glicazione sito-specifica della Cys¹⁷ di rh-G-CSF ed ossidazione selettiva dei residui glicosidici con *m*-periodato di sodio

Il saggio di Ellman ha dimostrato che la glicazione della Cys¹⁷ di rh-G-CSF con il linker maltosilico è completa dopo 2 ore di reazione. Il maltosil-rh-G-CSF è stato purificato mediante gel filtrazione. Rispetto ad altre tecniche più denaturanti, quali l'ultrafiltrazione, questa metodica permette di rimuovere completamente i prodotti secondari di reazione e di mantenere la stabilità della citochina.

La proteina glicata è stata successivamente ossidata con *m*-periodato di sodio e, dopo aggiunta di mannitolo, la miscela di reazione è stata frazionata mediante gel filtrazione. In Figura 3.16 è stato riportato il profilo di eluizione che si ottiene analizzando le singole frazioni raccolte a 280 nm.

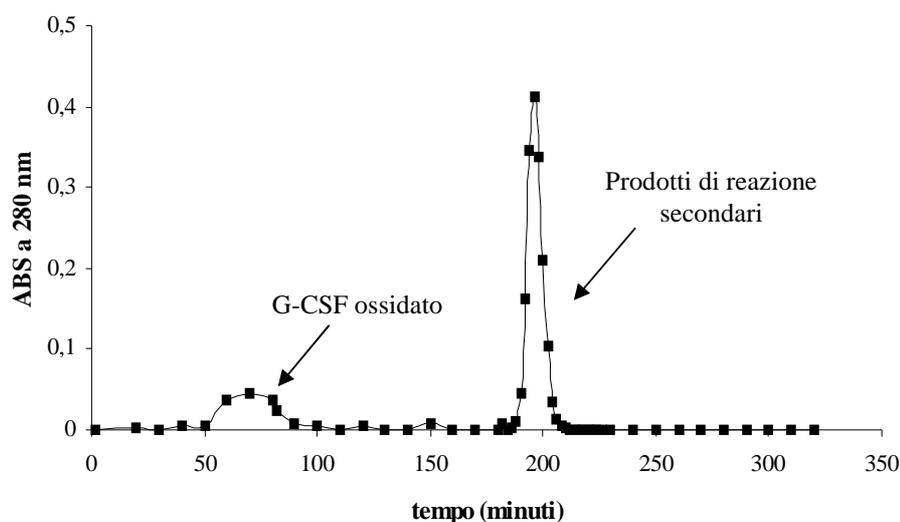


Figura 3.16.: Profilo cromatografico della miscela di reazione che si ottiene in seguito ad ossidazione del maltosil-rh-G-CSF con periodato di sodio.

Il test colorimetrico con 2,4-DNPH per valutare il grado di ossidazione del residuo glicosilico ha confermato per il maltosil-rh-G-CSF ossidato un rapporto molare di gruppi aldeidici/proteina di 2.3:1.

3.1.3.2 PEGilazione di maltosil-rh-G-CSF ossidato

I cromatogrammi riportati in Figura 3.17 mostrano il profilo di eluizione della miscela di reazione ottenuto dopo 60 ore di incubazione tra PEG-Hz e maltosil-rh-G-CSF ossidato (A). A confronto è stato riportato il cromatogramma del maltosil-rh-G-CSF (B).

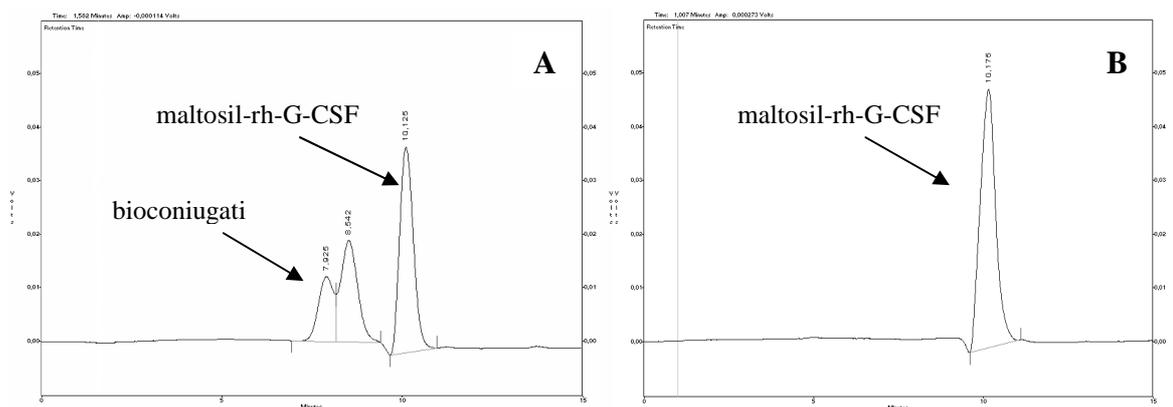


Figura 3.17.: Profili di eluizione SEC-HPLC di maltosil-rh-G-CSF (dx) e della miscela di reazione tra maltosil-rh-G-CSF e PEG-idrazide dopo 60 ore (sx).

Il maltosil-rh-G-CSF ossidato viene eluito a 10.126 min con un tempo di ritenzione simile a quello del rh-G-CSF nativo (10.175 min). Dopo aggiunta di PEG-Hz alla soluzione di maltosil-rh-G-CSF si osserva la formazione di due specie proteiche a maggior peso molecolare rispetto alla proteina nativa che indicano la formazione di due bioconiugati PEG-rh-G-CSF, uno con maggior peso molecolare (volume di eluizione 7.925 min) e uno con minor peso molecolare (volume di eluizione 8.542 min). Il profilo di eluizione della miscela di reazione evolve nel tempo. L'area del picco corrispondente a maltosil-rh-G-CSF diminuisce progressivamente nel tempo, mentre aumenta di conseguenza l'area dei picchi relativi ai prodotti coniugati.

Il cromatogramma riportato in Figura 3.18 mostra che il rapporto tra le aree corrispondenti ai picchi del bioconiugato con minor e con maggior tempo di ritenzione diminuisce progressivamente indicando che la reazione di PEGilazione procede nel tempo con la formazione del derivato con volume idrodinamico maggiore e quindi con maggior numero di catene di PEG legate.

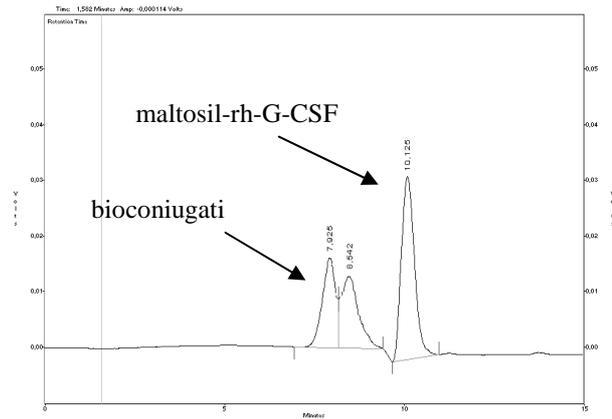


Figura 3.18.: Profili di eluizione SEC-HPLC della miscela di reazione tra maltosil-rh-G-CSF e PEG-idrazide dopo 80 ore (sx).

La cinetica di PEGhilazione descritta in Figura 3.19 è stata calcolata sulla base dell'aumento della somma dell'area dei picchi corrispondenti ai coniugati con PEG e sulla diminuzione dell'area del picco corrispondente al maltosil-rh-G-CSF ossidato.

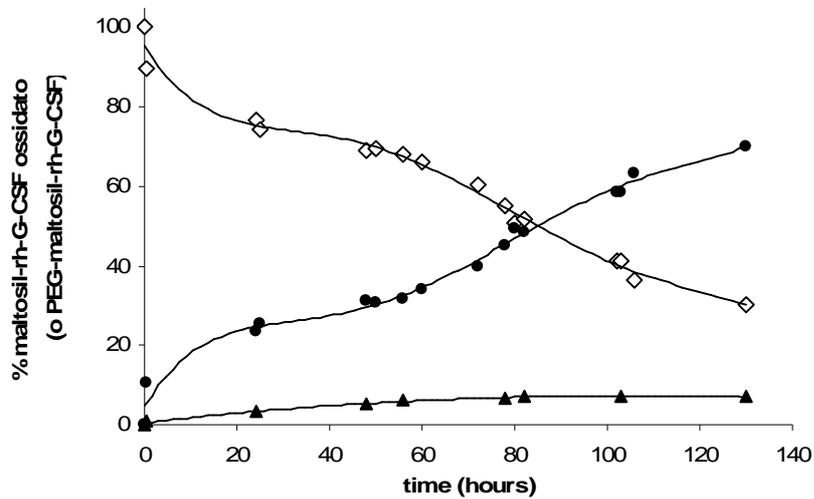


Figura 3.19.: Cinetica di PEGhilazione di maltosil-rh-G-CSF ossidato in presenza di un eccesso di PEG-idrazide: maltosil-G-CSF ossidato (◇) maltosil-G-CSF PEGhilato (●). Profilo di PEGhilazione di rh-G-CSF nativo con PEG-maleimide (▲).

I profili di PEGhizzazione riportati mostrano che la coniugazione del polimero procede lentamente con una conversione della proteina in bioconiugato di circa il 70% in 130 ore di reazione. Per confronto si osserva che nello stesso tempo di reazione la coniugazione diretta di PEG-maleimide alla Cys¹⁷ porta alla formazione di solo il 7% di bioconiugato.

Dopo 130 ore di reazione il bioconiugato ottenuto è stato purificato mediante cromatografia di gel filtrazione per eliminare l'eccesso di PEG-Hz e successivamente è stato caratterizzato. Dall'analisi quantitativa del PEG nel bioconiugato, condotta mediante saggio allo iodio, è risultato che il derivato è costituito da 2 catene di PEG legate ad 1 molecola di proteina. Inoltre, tramite analisi cromatografica mediante gel filtrazione con HPLC, riportata in Figura 3.20, è stato possibile determinare che il PEG-maltosil-rh-G-CSF ha un peso molecolare apparente di circa 80 kDa che corrisponde alla somma del peso molecolare apparente dei singoli componenti del bioconiugato: 19 kDa per il rh-G-CSF e 30 kDa per ciascuna catena di PEG 10 kDa. Inoltre, il cromatogramma mostra la presenza di un'unica specie nel prodotto indicando che la strategia di PEGhizzazione ed il processo di purificazione consentono di ottenere una sola specie PEGhilata.

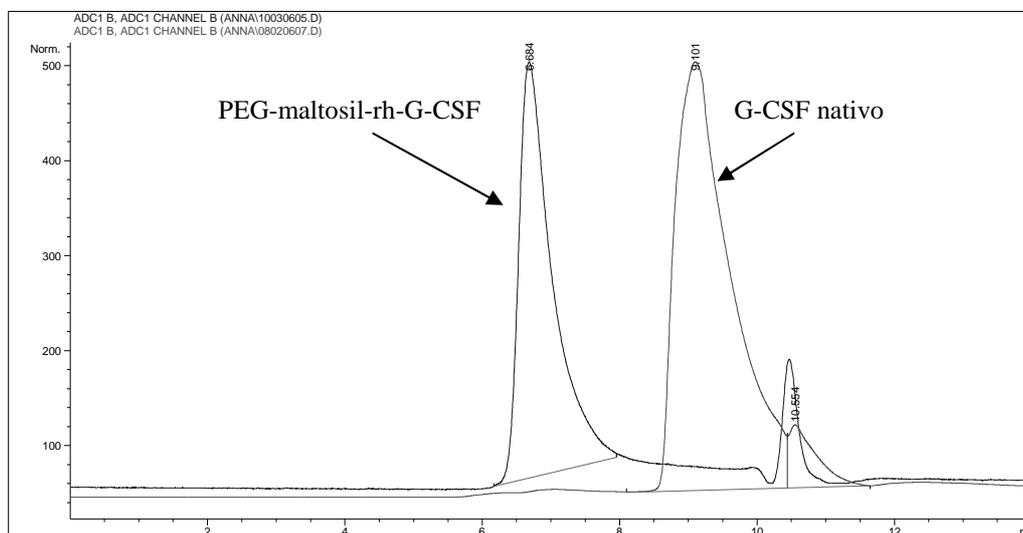


Figura 3.20.: Overlay di profili di eluizione di di rh-G-CSF nativo e PEG-maltosil-rh-G-CSF ottenuti con SEC HPLC.

Gli spettri di dicroismo circolare registrati nel *far*-UV e riportati in Figura 3.21 mostrano un identico profilo spettroscopico per rh-G-CSF nativo e PEG-maltosil-rh-G-CSF indicando che la struttura secondaria della citochina viene mantenuta anche dopo PEGhilazione.

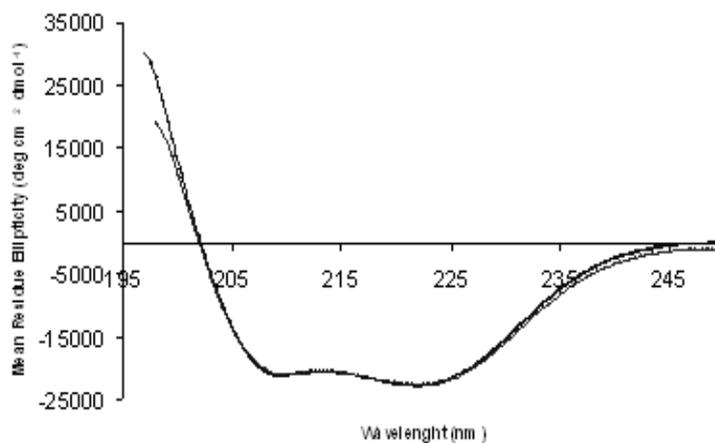


Figura 3.21.: Spettro di dicroismo circolare nel *far*-UV di rh-G-CSF nativo (—) e PEGhilato (---).

3.2 POLIMERIZZAZIONE RADICALICA DI DERIVATI ACRILICI E METACRILICI A PARTIRE DA MACROINIZIATORI PROTEICI

3.2.1 Sintesi di 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide

La Figura 3.22 riporta lo schema di sintesi in due *step* adottato per ottenere il linker 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide.

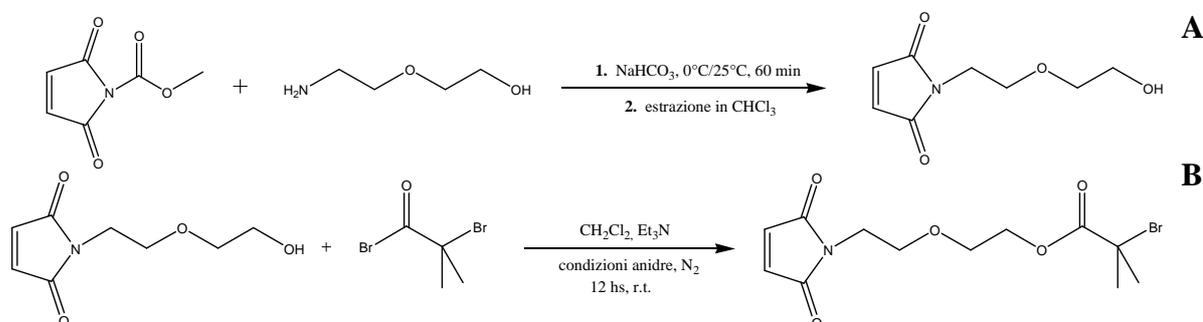


Figura 3.22.: Procedura di sintesi del 2-(2-maleimidoetossi)etanolo (A) e il 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide (B).

Nel primo *step* sintetico il 2-(2-maleimidoetossi)etanolo è stato sintetizzato seguendo la metodica descritta in letteratura da Weber e coll. [73]. Il 2-(2-aminoetossi)etanolo è stato funzionalizzato con un gruppo maleimidico utilizzando N-metossicarbonil-maleimide. Il prodotto è stato purificato mediante cromatografia di silice ed è stato recuperato con una resa del 93-96% p/p.

La scomparsa dei gruppi amminici in seguito a reazione di coniugazione è stata determinata mediante saggio colorimetrico di Snyder che ha evidenziato la presenza di solo 1% di gruppi amminici non derivatizzati (moli NH₂/moli di 2-(2-maleimidoetossi)etanolo, %). La determinazione dei gruppi maleimidici nel prodotto purificato è stata eseguita con saggio indiretto di Ellman che ha evidenziato una presenza di gruppi maleimidici di 92-94% di mmoli residui maleimidici/mmoli *linker*.

In Figura 3.23 (A) è stato riportato lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) in cui si osservano i segnali caratteristici del (2-(2-maleimidoetossi)etanolo: δ 2.320 [bs, 1H, $-\text{CH}_2\text{OH}$], δ 3.602 [t, 2H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$], δ 3.704 [tt, 4H, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$], δ 3.768 [t, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$], δ 6.726 [s, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}-$], mentre in Figura 3.23 (B) è stato riportato lo spettro $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) che evidenzia i segnali tipici del *linker*: δ 37.77 ($-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), δ 61.94 [$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$], δ 68.49 [$-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$], δ 72.26 [$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$], δ 134.46 [$-\text{CH}=\text{CH}-$], δ 171.47 [$-\text{C}=\text{O}$].

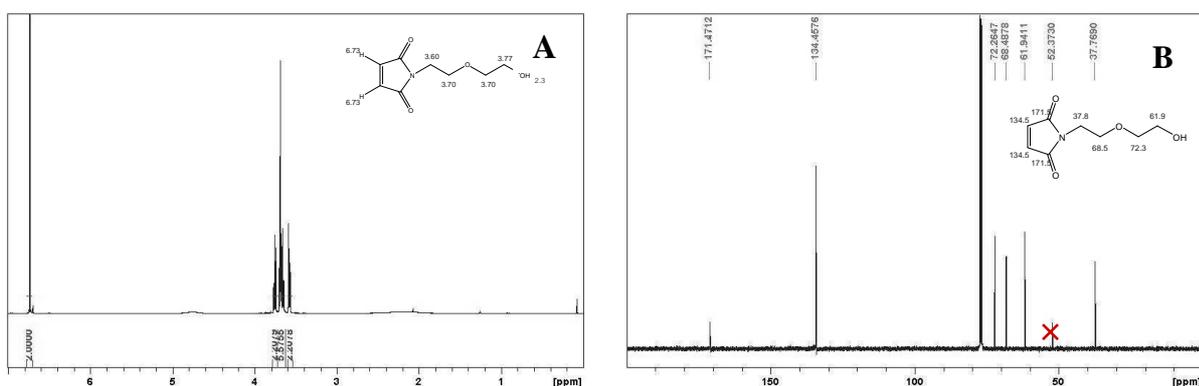


Figura 3.23: 2-(2-maleimidoetossi)etanolo: spettro $^1\text{H-NMR}$ (A) e spettro $^{13}\text{C-NMR}$ (B) in CDCl_3 .

Nello spettro $^1\text{H-NMR}$ il rapporto tra l'integrale del segnale a δ 3.60 relativo ai 2 protoni della catena ossietilenica del (2-(2-maleimidoetossi)etanolo e quello a δ 6.73 corrispondente ai 2 protoni vinilici del gruppo maleimidico indica il grado di derivatizzazione del *linker* con maleimide che è risultato di 91% (moli di maleimide/moli di *linker*, %).

Lo spettro di massa ESI-TOF ha mostrato i segnali m/e caratteristici a 186.13 ($\text{M}+\text{H}$) $^{1+}$, 208.03 ($\text{M}+\text{Na}$) $^{1+}$ e 115.60 ($\text{M}+2\text{Na}$) $^{2+}$ che corrispondono alla massa di 185.18 Da calcolata per $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_4$.

Nel secondo passaggio sintetico il 2-(2-maleimidoetossi)etanolo sintetizzato è stato esterificato con 2-bromo-isobutirril bromuro per ottenere il 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide. La resa di prodotto è stata del 74-76% p/p.

Dall'analisi dei gruppi maleimidici mediante determinazione indiretta con saggio di Ellman è risultata una percentuale di gruppi maleimide/linker del 95%.

In Figura 3.24 (A) è stato riportato lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) del 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide. I segnali ottenuti sono stati assegnati nel seguente modo: δ 1.941 [s, 6H, $-\text{OCO}(\text{CH}_3)_2\text{-Br}$], δ 3.705 [m, 4H, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$], δ 3.720 [t, 2H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$], δ 4.295 [t, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCO}-$], δ 6.728 [s, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}-$]. Lo spettro $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) riportato in Figura 3.24 (B) evidenzia i segnali tipici del 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide: δ 30.93 [$-\text{OCOC}(\text{CH}_3)_2\text{-Br}$], δ 37.30 [$-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$], δ 55.70 [$-\text{OCOC}(\text{CH}_3)_2\text{-Br}$], δ 65.20 [$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$], δ 67.90 [$-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$], δ 68.23 [$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$], δ 134.03 [$-\text{CH}=\text{CH}-$], δ 170.72 [$-\text{C}=\text{O}$], δ 171.94 [$-\text{OCOC}(\text{CH}_3)_2\text{-Br}$].

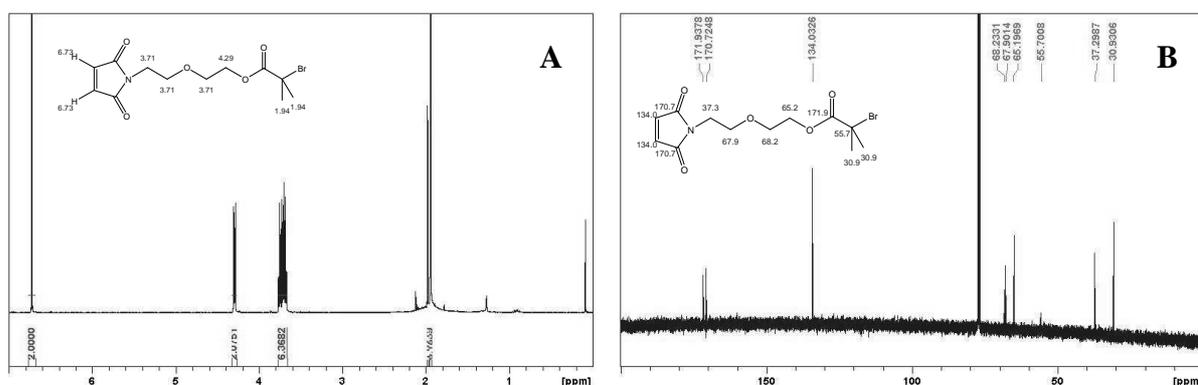


Figura 3.24: 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide: spettro $^1\text{H-NMR}$ (A) e spettro $^{13}\text{C-NMR}$ (B) in CDCl_3 .

Dallo spettro $^1\text{H-NMR}$ si è calcolato il rapporto tra il segnale a δ 3.60 relativo ai 2 protoni dello 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide e quello a δ 6.73 corrispondente ai 2 protoni vinilici del gruppo maleimidico che rivela un grado di derivatizzazione del *linker* con la maleimide di 96 %.

Lo spettro di massa ESI-MS del 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide ha mostrato i segnali m/e caratteristici a 334.03 (M), 335.04 ($\text{M}+\text{H}$) $^{1+}$, 336.03 ($\text{M}+2\text{H}$) $^{2+}$, 337.04 ($\text{M}+3\text{H}$) $^{3+}$, 337.07 ($\text{M}+4\text{H}$) $^{4+}$ e 351.06 ($\text{M}+\text{Na}$) $^{1+}$, 352.06 ($\text{M}+\text{Na}$) $^{2+}$, 353.06 ($\text{M}+\text{Na}$) $^{3+}$ e 354.06 ($\text{M}+\text{Na}$) $^{4+}$ che corrispondono alla massa di 334.16 Da calcolata per $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{BrNO}_5$. (Figura 3.25).

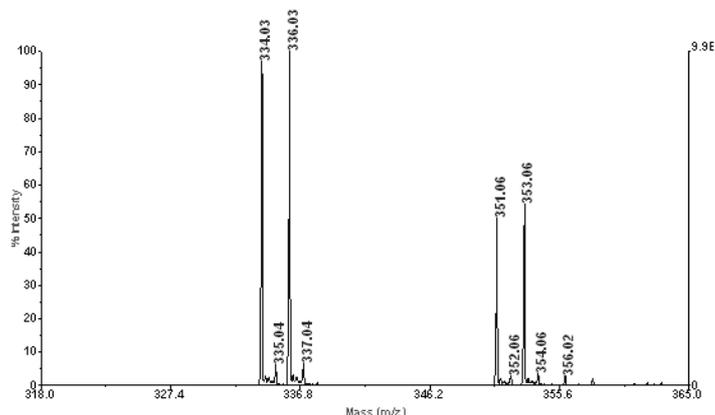


Figura 3.25: 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide: spettro di massa ESI-TOF.

Dopo 24 ore di incubazione del linker in acqua o in metanolo gli spettri di massa dei derivati sono rimasti invariati.

3.2.2 Sintesi di 2-bromo-isobutirril-cadaverina

In Figura 3.26 è riportato lo schema di sintesi seguito per la preparazione del *linker* 2-bromo-isobutirril-cadaverina.

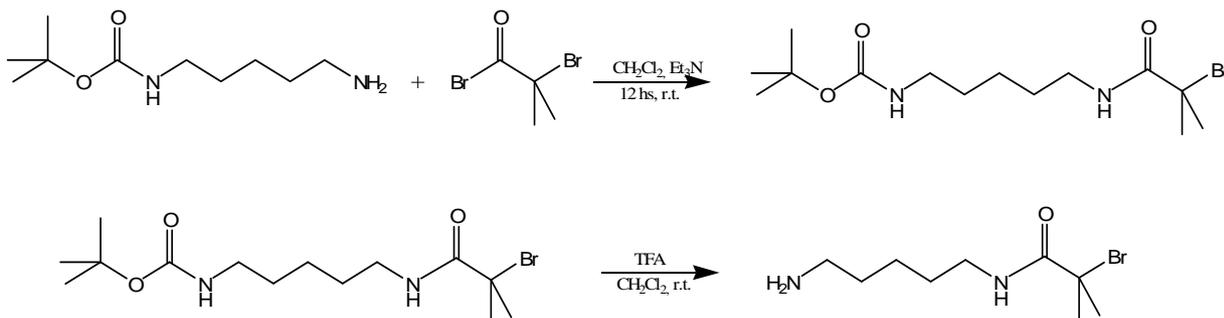


Figura 3.26.: Schema di sintesi per il 2-bromo-isobutirril-cadaverina.

N-Boc-cadaverina è stata derivatizzata con 2-bromo-isobutirril bromuro ed il composto ottenuto è stato purificato mediante cromatografia di gel di silice. Il composto isolato è stato

successivamente trattato con TFA al 95% in modo da rimuovere il gruppo protettore Boc dal gruppo amminico ed ottenere il 2-bromo-isobutirril-cadaverina con una resa del 63% p/p.

Il saggio di Snyder eseguito sul prodotto ottenuto dopo trattamento con TFA ha evidenziato una presenza dei gruppi amminici che è risultata essere quantitativa (99%, NH_2 determinati/ NH_2 teorici).

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) riportati in Figura 3.27 (A) mostrano i caratteristici segnali dei protoni del 2-bromo-isobutirril-cadaverina: δ 1.438 [t, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$], δ 1.606 [t, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$], δ 1.795 [m, 2H, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2-$], δ 1.940 [s, 6H, $-\text{OCO}(\text{CH}_3)_2\text{-Br}$], δ 3.079 [m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$] e δ 3.301 [t, 2H, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2-$].

L'identità del prodotto finale è stata inoltre confermata dall'analisi di massa eseguita mediante analisi di massa ESI-TOF. Nello spettro riportato in Figura 3.27 (B) si notano i caratteristici segnali a 251.09 (M), 252.09 ($\text{M}+\text{H}$) $^{1+}$, 253.09 ($\text{M}+2\text{H}$) $^{2+}$, 254.09 ($\text{M}+3\text{H}$) $^{3+}$ e 254.07 ($\text{M}+4\text{H}$) $^{4+}$ che corrispondono alla massa 251.16 Da calcolata per $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}$.

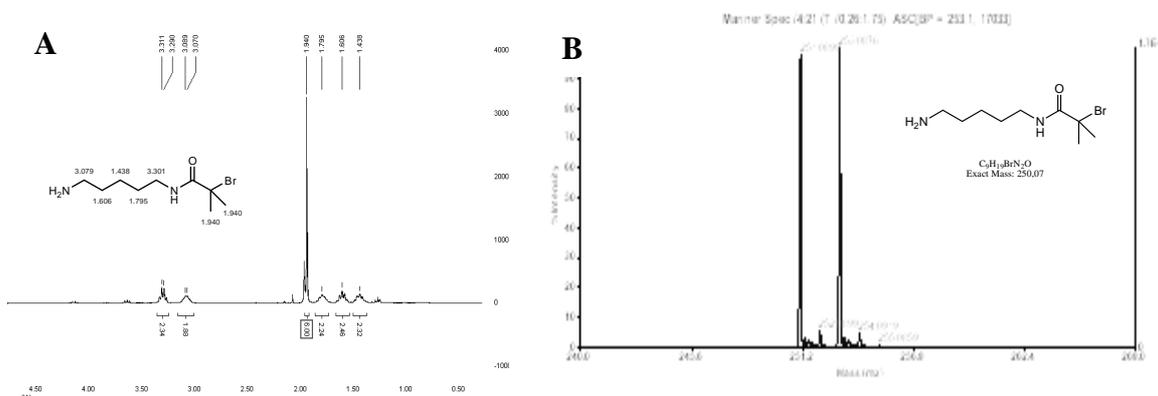


Figura 3.27: Spettro $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 (A) e spettro di massa (B) di 2-bromo isobutirril-cadaverina.

Sia lo spettro di massa ESI-TOF che quello $^1\text{H-NMR}$ hanno confermato la buona riuscita della reazione chimica e il buon grado di purezza del *linker* sintetizzato. Inoltre, la percentuale di gruppi amminici determinata mediante il saggio di Snyder attesta il completo sblocco del gruppo amminico dal gruppo protettore.

3.2.3 Studi preliminari di ATRP

Inizialmente è stato condotto uno studio preliminare per verificare l'efficienza della reazione di ATRP nelle condizioni di reazione stabilite per ottenere i bioconiugati finali.

3.2.3.1 Sintesi di *probe* cromoforico: 2-bromo-isobutirril-trinitrofenil-cadaverina

Il *probe* cromoforico, 2-bromo isobutirril-trinitrofenil-cadaverina (TNP-cadaverina-Br), è stato ottenuto per modifica chimica del gruppo amminico primario di 2-bromo isobutirril-cadaverina con acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (TNBS), seguendo la procedura sintetica riportata in Figura 3.28.

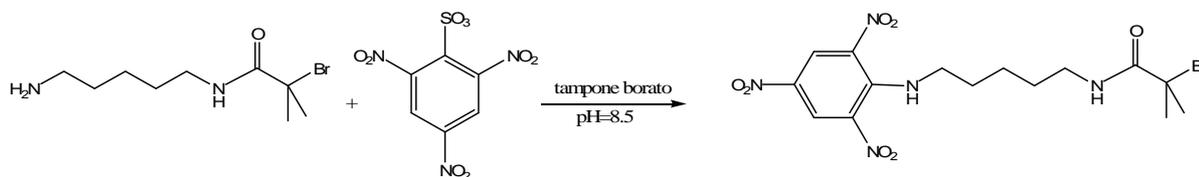


Figura 3.28.: Schema di sintesi del 2-bromo-isobutirril-trinitrofenil-cadaverina.

La polvere gialla e cristallina che si ottiene per estrazione dalla miscela di reazione con cloroformio e successiva rimozione del solvente organico è stata recuperata con una resa di 55% p/p ed è stata analizzata mediante analisi di massa ESI-TOF, spettroscopia UV-Vis e cromatografia a fase inversa con detector impostato a 350 nm.

Lo spettro di massa ESI-TOF riportato in Figura 3.29 mostra segnali m/e a 462.10 (M), 463.13 (M+H)¹⁺, 464.11 (M+2H)²⁺, 465.10 (M+3H)³⁺ e 254.07 (M+4H)⁴⁺ che corrispondono al valore di massa 462.25 Da calcolato per C₁₅H₂₃BrN₅O₇. Purtroppo il prodotto non possiede gruppi facilmente protonabili e quindi l'intensità di questi segnali è risultata molto bassa rispetto alla quantità analizzata.

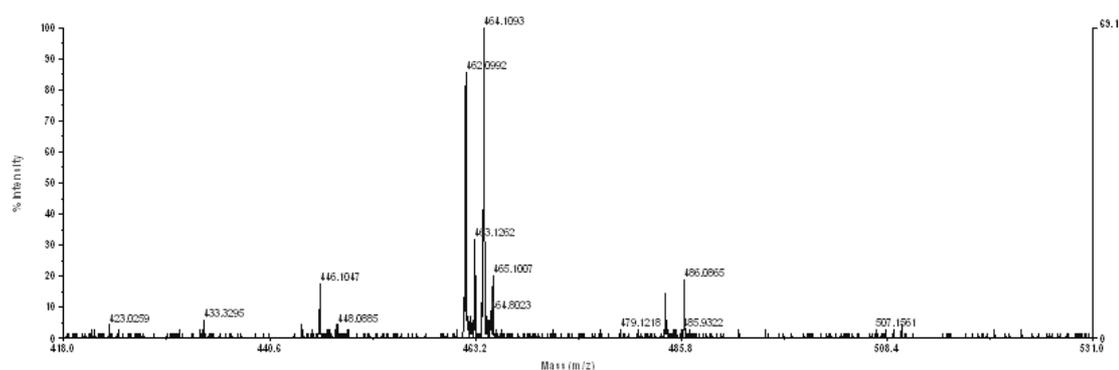


Figura 3.29: 2-bromo isobutirril-trinitrofenil-cadaverina: spettro di massa ESI-TOF.

Lo spettro UV-Vis relativo al coniugato riportato in Figura 3.30 (B) mostra il profilo spettroscopico tipico dei trinitrofenil-derivati con $\epsilon_M=1.32 \times 10^4$ a 350 nm e $\epsilon_M= 2.50 \times 10^4$ a 420 nm. Per confronto viene riportato in Figura 3.30 (A) lo spettro UV-Vis del TNBS.

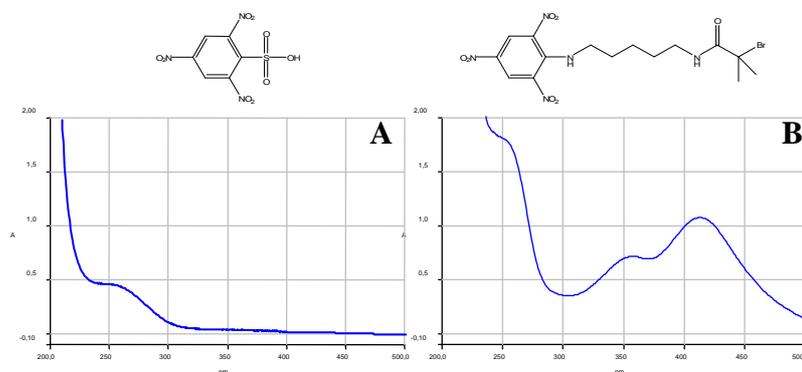


Figura 3.30: Spettro di assorbimento UV-Vis (200-500 nm) del 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (A) e del 2-bromo isobutirril-trinitrofenil-cadaverina (B).

I profili cromatografici ottenuti mediante analisi RP-HPLC, riportati in Figura 3.31, mostrano il picco corrispondente al *linker* TNP-cadaverina-Br che viene eluito con un tempo di ritenzione di 24.167 min. Per confronto viene riportato il cromatogramma relativo all'analogo TNP-propanolammina che viene eluito a 19.884 min, mentre il TNBS non coniugato non presenta un picco caratteristico in quanto come tale non assorbe a 350 nm.

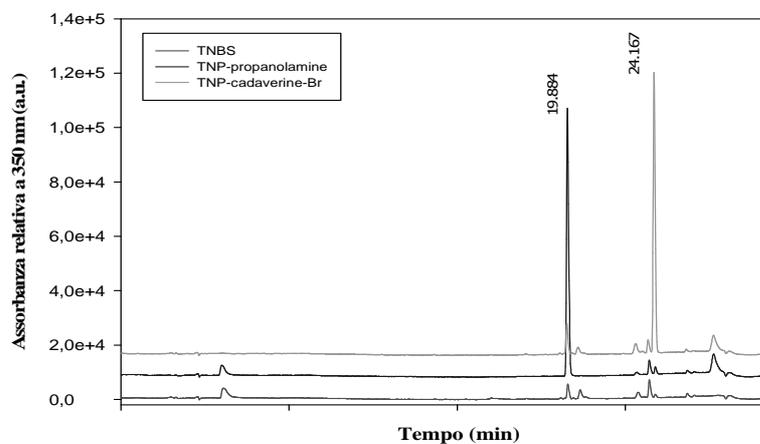


Figura 3.31: Overlay dei cromatogrammi RP-HPLC registrati a 350 nm di acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (---), trinitrofenil-propranolamina (—) e 2-bromo isobutirril-trinitrofenil-cadaverina (· · ·).

3.2.3.2 Reazione di ATRP con TNP-cadaverina-Br

La Figura 3.32 riassume il processo di polimerizzazione di derivati metacrilati del polietilenglicole a basso peso molecolare (PEGMA, ≈ 300 Da) a partire da TNP-cadaverina-Br.

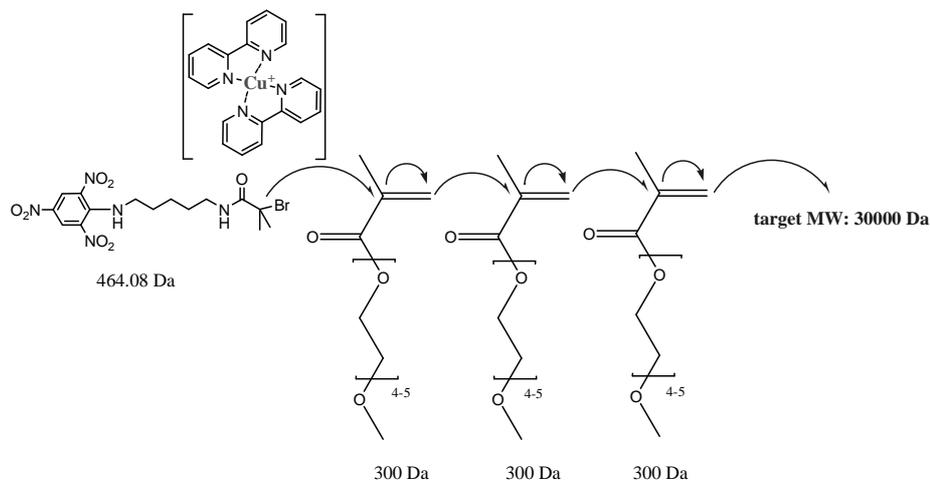


Figura 3.32: Schema di polimerizzazione radicalica di PEGMA a partire da TNP-cadaverina-Br.

In Figura 3.33 è riportato il profilo cromatografico della miscela di polimerizzazione dopo 60 minuti di reazione. Per confronto sono stati riportati anche i profili di eluizione caratteristici dei reattivi utilizzati (TNP-cadaverina-Br, Cu(I)/bpy e PEGMA).

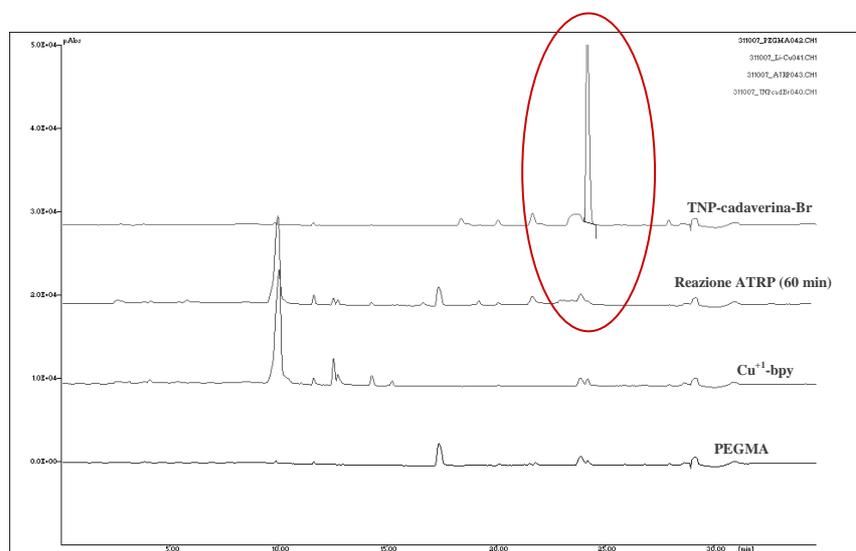


Figura 3.33: Confronto dei profili cromatografici RP-HPLC ottenuti utilizzando TNP-cadaverina-Br/Cu(I)/bpy/PEGMA.

Nel cromatogramma si nota la completa scomparsa del segnale relativo all'iniziatore radicalico dopo 60 minuti di reazione. In Figura 3.34 è riportata l'immagine relativa alla cromatografia su strato sottile di silice (TLC) della miscela di reazione, dei reattivi e come riferimento di poly-PEG.

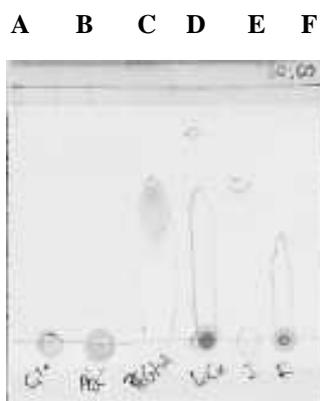


Figura 3.34.: TLC di CuCl_2 (A), poly-PEG (B), PEGMA (C), Cu(I)/bpy (D) e TNP-cadaverina-Br (E) eluiti con miscela di reazione ATRP (F) eluita con miscela di etile acetato/n-esano 50:50.

L'analisi TLC ha confermato la completa scomparsa dell'iniziatore e del PEGMA in seguito alla reazione di ATRP. Il prodotto finale rimane nel punto di caricamento con un comportamento simile a quello di poly-PEG di 33 kDa prodotto da Warwick Effect Polymers Ltd.

3.2.3.3 Reazione di ATRP con TNP-cadaverina-Br in presenza di rh-GH

La reazione di polimerizzazione ATRP è stata condotta nelle stesse condizioni riportate nella sezione precedente aggiungendo rh-GH alla miscela di reazione.

I cromatogrammi riportati in Figura 3.35 mostrano come dopo 30 minuti di reazione il picco relativo all'iniziatore radicalico scompare completamente come già osservato in assenza di proteina il cui cromatogramma viene riportato per confronto.

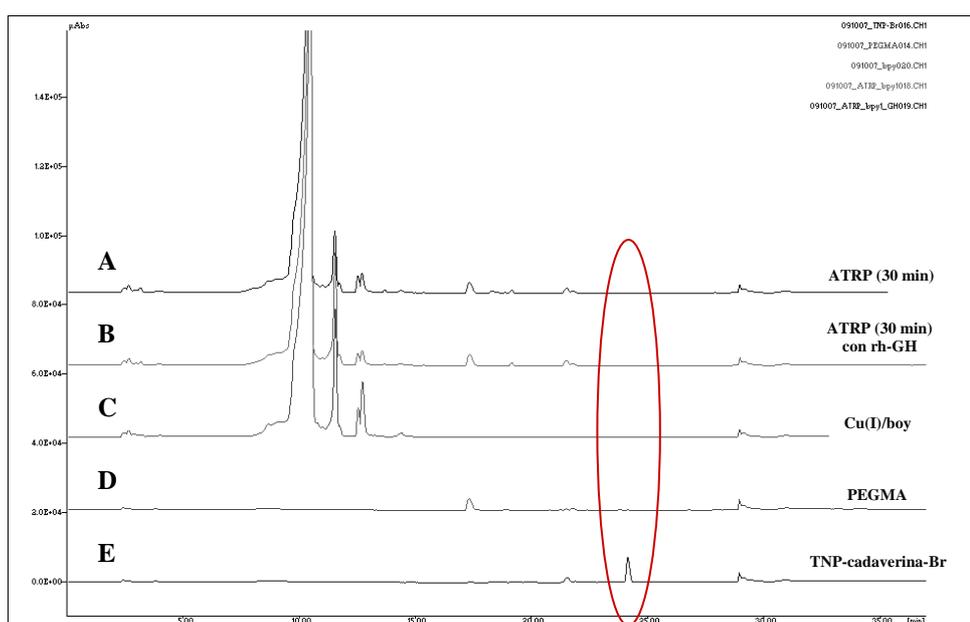


Figura 3.35.: Confronto delle analisi RP-HPLC ottenute per la reazione di ATRP di PEGMA a partire da TNP-cadaverina-Br in tampone fosfato (A) e in presenza di rh-GH (B). Per confronto sono stati riportati i profili di eluizione dei reattivi utilizzati: Cu(I)Br/bpy/Acido ascorbico (C), PEGMA (D) e TNP-cadaverina-Br (E).

3.2.4 Sintesi di macroiniziatori proteici e polimerizzazione ATRP

Il linker 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide è stato utilizzato per la modifica selettiva dei residui di cisteina liberi di HSA (Cys³⁴) e di rh-G-CSF (Cys¹⁷), mentre il 2-bromo-isobutirril-cadaverina è stato utilizzato per la modifica dei residui di glutammina presenti sulla superficie esterna di rh-GH per via enzimatica impiegando transglutaminasi di origine microbica (M-TGase).

3.2.4.1 Sintesi di HSA-Br

La reazione di bioconiugazione tra il 2-bromo-isobutirril-etossietil maleimide e il residuo Cys³⁴ della HSA è descritta nello schema di reazione riportato in Figura 3.36.

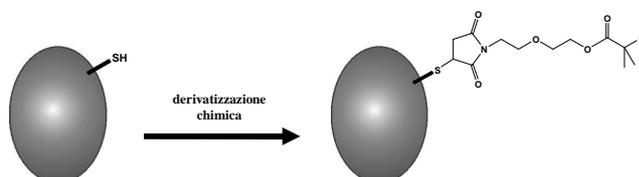


Figura 3.36.: Schema generale di derivattizzazione di una proteina a livello dei residui di cisteina liberi utilizzando 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide.

Dopo 2 ore di reazione il test di Ellman ha rilevato un grado di modifica delle funzioni tioliche del 99-100%. I cromatogrammi ottenuti per analisi RP-HPLC riportati in Figura 3.37, mostrano che il tempo di eluizione della proteina modificata con il linker è simile a quello della proteina nativa.

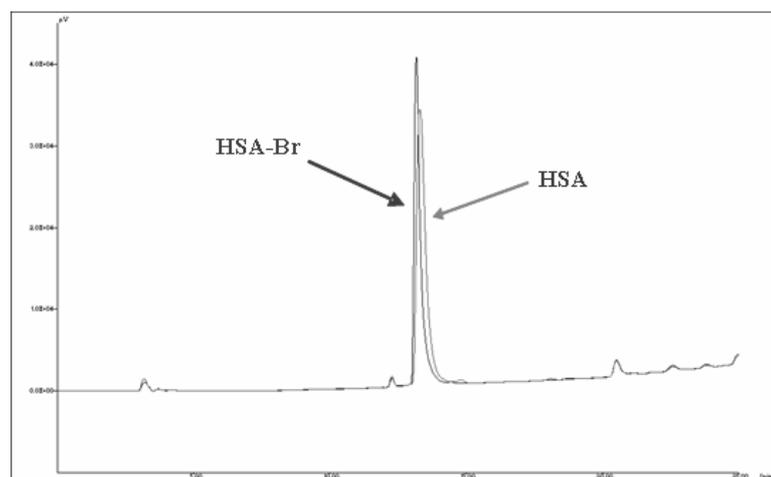


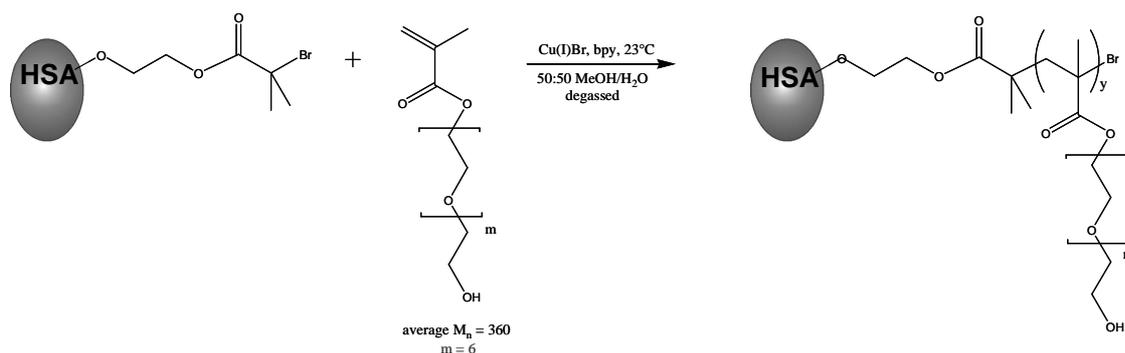
Figura 3.37: Overlay dei profili cromatografici RP-HPLC di HSA nativa e HSA-Br.

3.2.4.2 Reazione di ATRP di monomeri acrilici a partire da HSA-Br

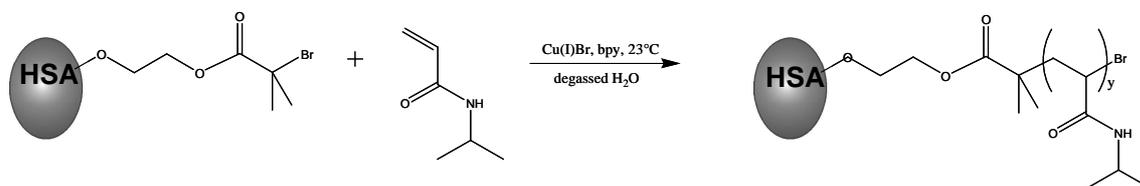
La reazione di polimerizzazione ATRP a partire da HSA-Br è stata condotta utilizzando tre differenti monomeri acrilici: polietilenglicole metacrilato (PEGMA, ≈ 360 Da), N-isopropilacrilammide (NIPAAm, 113.16 Da) e N-vinil- ϵ -caprolattame (VCL, 139.19 Da).

Gli schemi di polimerizzazione sono riportati in Figura 3.38.

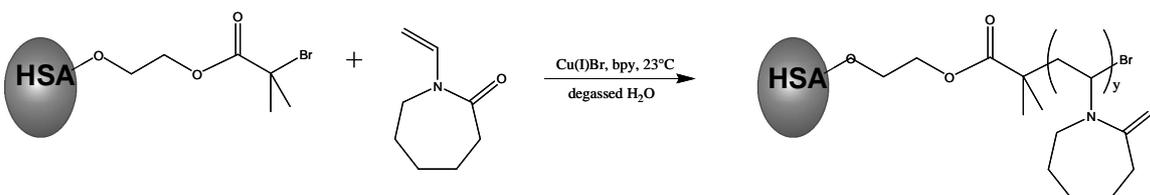
A: PEGMA:



B: NIPAAm:



C: VCL:



D: Acido Ascorbico:

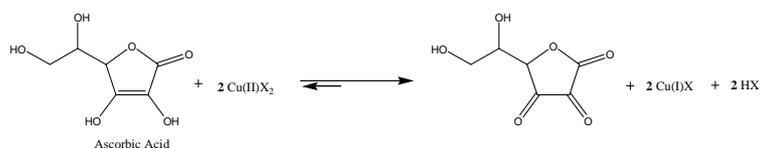


Figura 3.38.: Schema sintetico di polimerizzazione radicalica di PEGMA (A), NIPAAm (B) e VCL (C) a partire da HSA-Br e meccanismo di riduzione di Cu^{2+} da parte dell'acido ascorbico durante il processo di ATRP (D).

Dopo 24 ore di reazione i campioni purificati per ultrafiltrazione e successivamente analizzati mediante SDS-PAGE in condizioni riducenti. Dal confronto delle bande evidenziate dopo colorazione con Blue di Comassie riportate in Figura 3.39 non è possibile vedere alcuna differenza tra proteina nativa e proteina su cui è stata condotta la reazione ATRP.

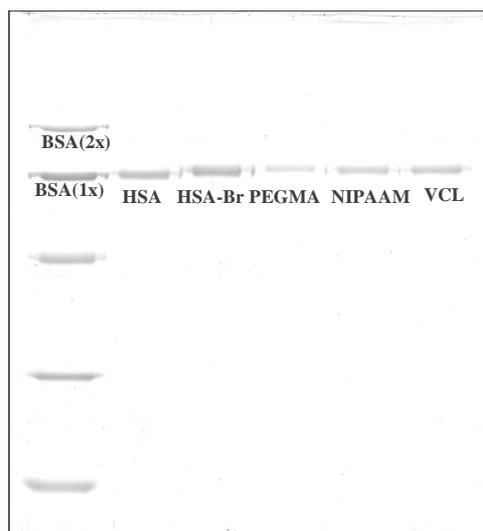


Figura 3.39.: SDS-PAGE: 1) standard MW, 2) HSA nativa, 3) HSA-Br, 4) polyPEG-HSA, 5) NiPAAm-HSA e 6)VCL-HSA.

3.2.4.3 Sintesi di rh-G-CSF-Br

rh-G-CSF è stato modificato con 2-bromo-isobutirril-etossietil- maleimide per reazione selettiva nei confronti della Cys¹⁷. Il saggio di Ellman per determinare la % di tioli derivatizzati ha consentito di determinare una percentuale di modifica del 95-98%. I cromatogrammi ottenuti per analisi RP-HPLC di rh-G-CSF nativo e rh-G-CSF-Br riportati in Figura 3.40 mostrano che le due forme di rh-G-CSF vengono eluite con analoghi tempi di ritenzione.

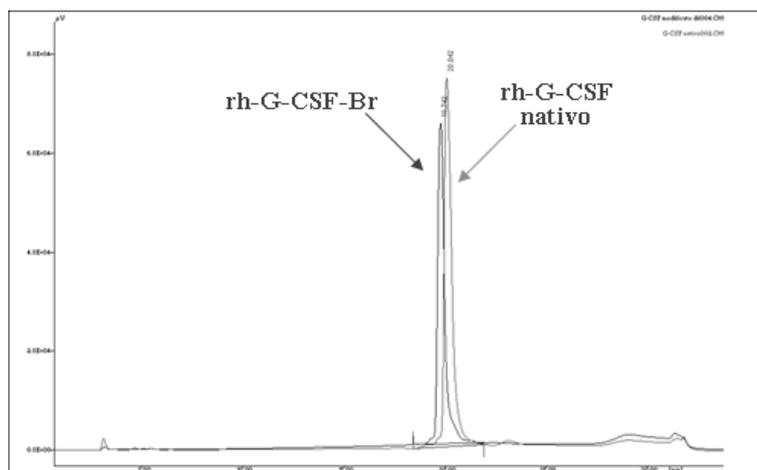


Figura 3.40: Cromatogrammi RP-HPLC di rh-G-CSF nativo e rh-G-CSF-Br.

Gli spettri di dicroismo circolare di rh-G-CSF nativo e rh-G-CSF-Br registrati nel far-UV riportati in Figura 3.41 mostrano che la struttura secondaria della proteina non viene alterata in seguito a derivatizzazione con il *linker*.

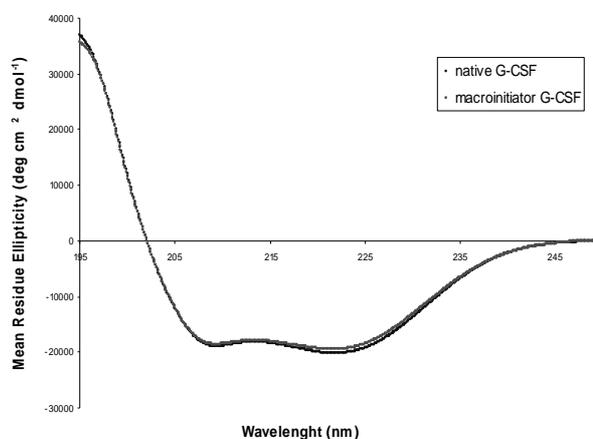


Figura 3.41: Spettro di dicroismo circolare nel FAR-UV di rh-G-CSF nativo (—) e rh-G-CSF (---).

3.2.4.4 Reazione di ATRP di monomeri acrilici a partire da rh-G-CSF-Br

La reazione di polimerizzazione di PEGMA (≈ 300 Da) a partire da rh-G-CSF-Br descritta in Figura 3.42 è stata condotta in presenza di Cu(I)Br utilizzando come ligandi sia il 2,2'-byp che il tris-[2-(dimetilamino)etil]amina (Me_6TREN).

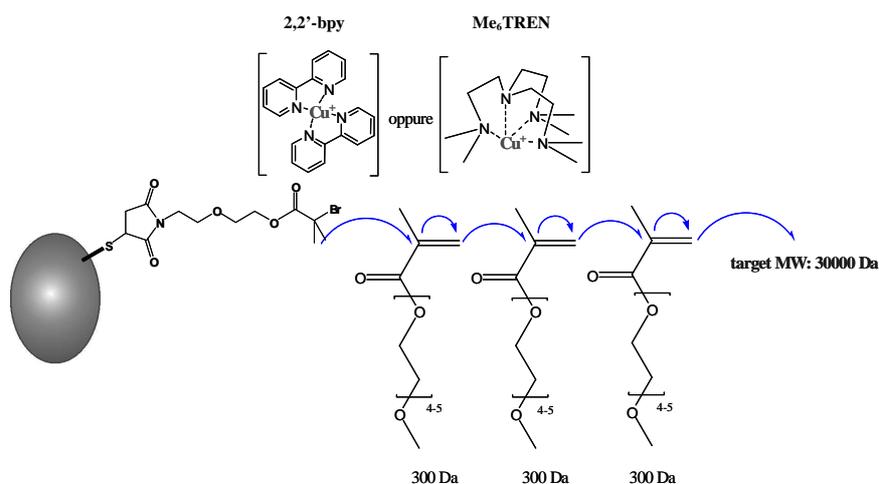


Figura 3.42.: Schema di polimerizzazione radicalica di PEGMA a partire da rh-G-CSF-Br.

I cromatogrammi ottenuti per analisi RP-HPLC della miscela di reazione riportati in Figura 3.43 non mostrano sostanziali variazioni nel profilo di eluzione del picco corrispondente al rh-G-CSF-Br indicando che il processo di polimerizzazione radicalica nelle condizioni in esame non è avvenuto.

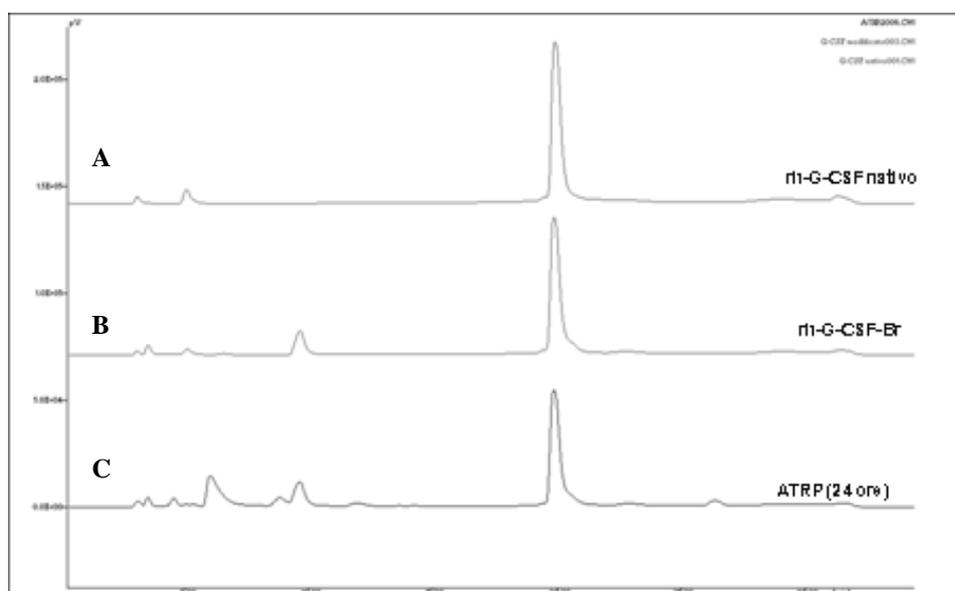


Figura 3.43.: Cromatogrammi RP-HPLC ottenuti per la reazione di ATRP di PEGMA con Cu(I)/bpy a partire da rh-G-CSF-Br (C). Per confronto sono stati riportati i profili di eluzione corrispondenti a rh-G-CSF nativo (A) e rh-G-CSF-Br (B).

3.2.4.5 Sintesi di rh-GH-Br₂

rh-GH è stato derivatizzato con 2-bromo-isobutirril-cadaverina utilizzando come catalizzatore enzimatico transglutaminasi capace di catalizzare reazioni di acil-trasferimento tra il gruppo γ -carbammidico di una glutammina (acil-accettore) ed un gruppo amminico (acil-donatore) per formare un legame (γ -glutamil)-peptidico come riportato in Figura 3.44.

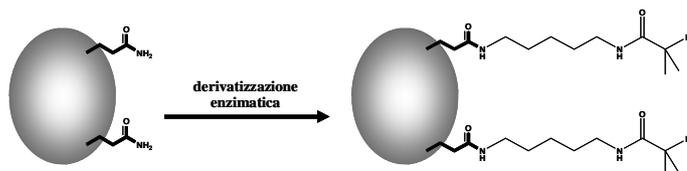


Figura 3.44.: Schema generale di derivatizzazione con 2-bromo-isobutirril-cadaverina ad opera di una transglutaminasi microbica a livello di specifici residui di glutammina esposti sulla superficie di alcune proteine.

I cromatogrammi RP-HPLC ottenuti con rh-GH nativa e rh-GH modificata con il *linker* alchil-bromuro riportati in Figura 3.45 mostrano una piccola differenza nel volume di eluizione tra le due specie proteiche.

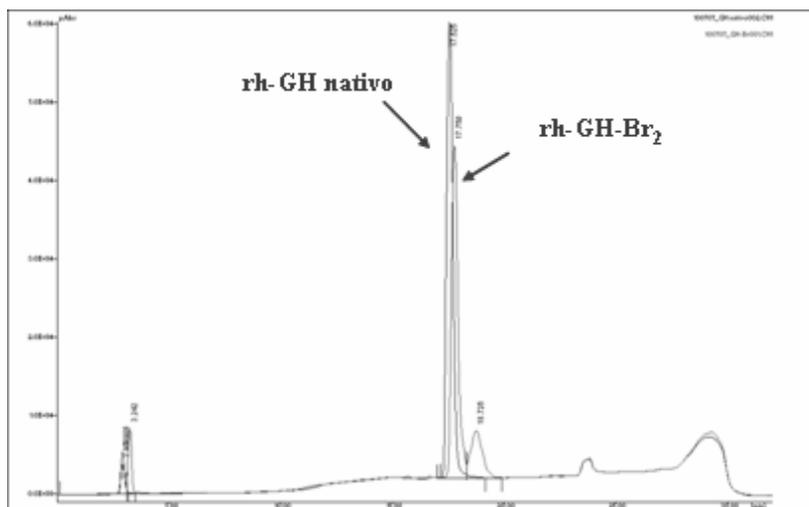


Figura 3.45: Overlay dei cromatogrammi RP-HPLC di rh-GH nativo e rh-GH modificato.

Gli spettri di massa ESI-TOF ottenuti con la proteina nativa e la proteina modificata riportati in Figura 3.46 mostrano che il coniugato ha un peso molecolare corrispondente a 22593 Da mentre la proteina nativa ha un peso molecolare di 22125 Da. Pertanto la proteina è stata modificata con due molecole di *linker* alchil-bromuro che hanno peso molecolare di 234 Da.

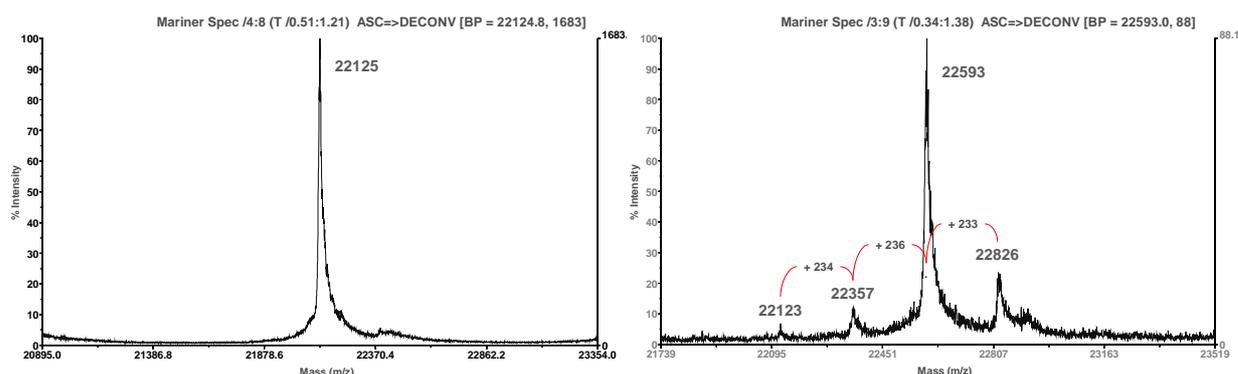


Figura 3.46: Spettro di massa ESI-TOF di rh-GH nativo (sx) e rh-GH modificato con 2-bromo-isobutirrilcadaverina in seguito a reazione con M-TGase (dx).

Gli spettri di dicroismo circolare registrati nel *far-UV* riportati in Figura 3.47 con la proteina nativa e derivatizzata con il linker sono sovrapponibili e questo risultato conferma che la struttura secondaria della proteina non viene alterata dal processo di coniugazione con il *linker*.

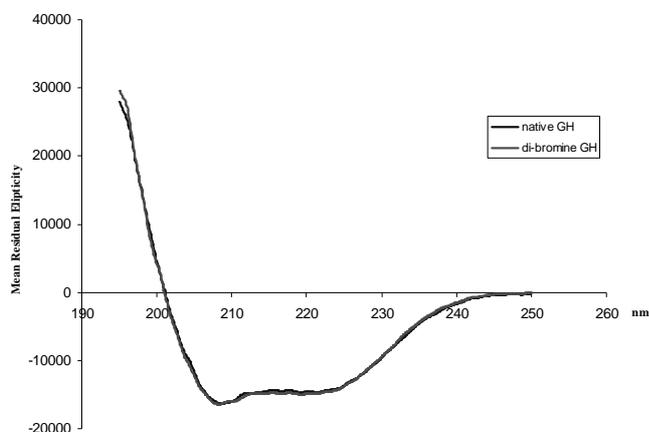


Figura 3.47: Spettro di dicroismo circolare di rh-GH nativo (—) e PEGhilato (---).

3.2.4.6 Reazione di ATRP di PEGMA a partire da rh-GH-Br₂

La reazione di polimerizzazione di PEGMA (≈ 300 Da) a partire dal macroiniziatore proteico ottenuto (rh-GH-Br₂ - 22593 Da) è stata condotta in presenza di Cu(I)Br e 2,2'-byp come riportato nello schema di Figura 3.48.

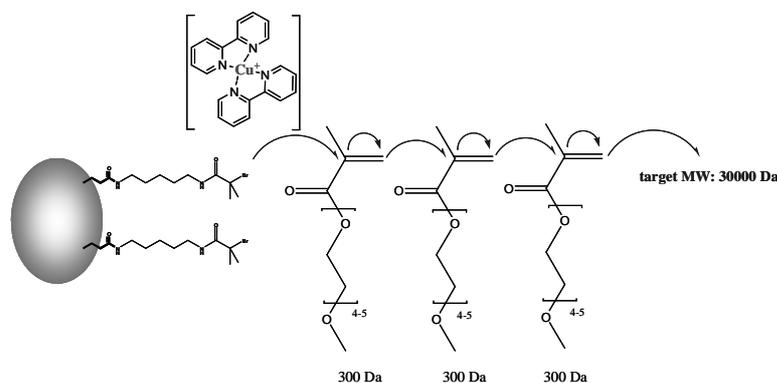


Figura 3.48.: Schema di polimerizzazione radicalica di PEGMA a partire da rh-GH-Br₂.

Dopo circa 60 minuti di polimerizzazione la miscela di reazione assume una colorazione azzurra che indica la completa disattivazione del catalizzatore utilizzato. I cromatogrammi acquisiti per analisi RP-HPLC della miscela di reazione non mostrano sostanziali variazioni del tempo di eluizione della proteina rispetto al picco del rh-GH-Br₂ (Figura 3.49). Tuttavia il picco della proteina sottoposta a reazione ATRP è più allargato.

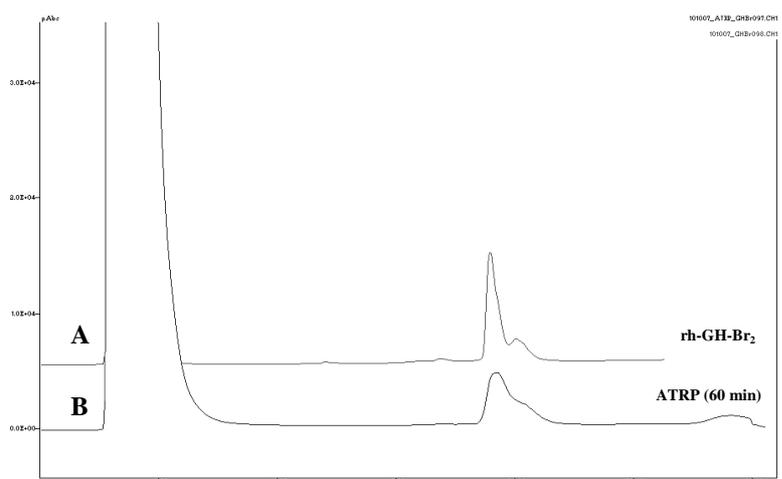


Figura 3.49.: Profili cromatografici RP-HPLC ottenuti per la reazione di ATRP di PEGMA con Cu(I)/bpy a partire da rh-GH-Br₂(B). Per confronto è stato riportato il cromatogramma corrispondente a rh-GH-Br₂ (A).

La proteina purificata per gel filtrazione è stata analizzata mediante SDS-PAGE. Dal confronto delle bande ottenute dopo colorazione con Blue di Comassie riportate nell'immagine di Figura 3.50 risulta che la proteina sottoposta a processo di polimerizzazione ATRP ha un peso molecolare maggiore della proteina nativa. Infatti il peso molecolare del GH nativo è di 22 kDa, mentre quello del bioconiugato finale è circa di 24 kDa.

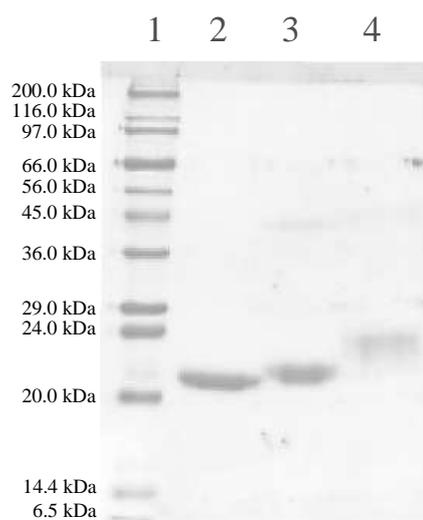


Figura 3.50.: Analisi SDS-PAGE: standard MW (1); rh-GH nativo (2); rh-GH-Br₂ (3); (polyPEG)₂-rh-GH (4).

DISCUSSIONE

Nel corso degli ultimi decenni sono stati condotti numerosi studi che hanno permesso di sviluppare interessanti ed innovative tecniche di PEGhilazione di proteine terapeutiche. Oggi tale tecnologia offre nuove possibilità di applicazione consentendo di ottenere derivati con adeguate proprietà chimico-fisiche, farmacocinetiche, immunologiche e biologiche per l'impiego clinico. Tuttavia, sebbene la PEGhilazione di proteine sia considerata una tecnica "matura" per lo sviluppo di nuovi prodotti farmaceutici, lo studio di nuove strategie di modifica di proteine con polimeri solubili rimane uno degli aspetti della ricerca farmaceutica più attivi. Infatti, molti sono i farmaci proteici PEGhilati recentemente entrati in terapia e ancor di più sono quelli in avanzata fase clinica. D'altra parte gli enti regolatori che presiedono alla valutazione e autorizzazione all'immissione in commercio di farmaci [quali *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA)* e *Food and Drug Administration (FDA)*] stabiliscono requisiti sempre più restrittivi per l'approvazione di nuovi farmaci. Nel caso dei bioconiugati proteina-polimero, in particolare lo sviluppo di prodotti con strutture altamente definite è reso difficile dall'intrinseca natura multifunzionale delle proteine e della polidispersività caratteristica dei polimeri. Per superare questi problemi si sono sviluppate negli ultimi anni nuove metodiche di bioconiugazione sito-specifica che permettono di legare il PEG in modo controllato a selezionate funzioni chimiche sulla superficie delle proteine che non sono coinvolte nello svolgimento dell'attività biologica della proteina stessa. Queste metodiche consentono così di ottenere derivati farmacologicamente attivi, con struttura definita e con migliori proprietà biofarmacologiche rispetto alla proteina nativa.

Una delle strategie più interessanti impiegata per ottenere bioconiugati sito-specifici si basa sulla coniugazione di polimeri ai gruppi -SH delle cisteine (Cys). Le Cys sono infatti aminoacidi poco rappresentati in forma ridotta nella struttura proteica e possono essere facilmente introdotte nella sequenza aminoacidica mediante ingegneria genetica. Comunque, a causa della capacità delle Cys di formare ponti disolfuro intermolecolari, questi aminoacidi sono spesso localizzati all'interno di cavità idrofobiche e quindi sono usualmente poco

accessibili per la modifica con polimeri idrofilici con elevato volume idrodinamico, come il PEG.

Tra le strategie impiegate per modificare Cys poco accessibili con polimeri alcune prevedono la parziale denaturazione delle proteine con cloruro di guanidinio o l'impiego di linker a basso peso molecolare che poi fungono da siti di ancoraggio del polimero.

In questo lavoro di tesi sono state messe a punto due differenti metodiche di bioconiugazione allo scopo di modificare selettivamente proteine a livello di residui che non sono facilmente accessibili per coniugazione diretta del polimero. Si tratta di procedimenti *multi-step*, che prevedono una iniziale derivatizzazione della proteina con *linker* a basso peso molecolare che diventano in un secondo passaggio il sito selettivo della bioconiugazione.

A partire da questi derivati proteici sono stati successivamente studiati due metodi per l'ottenimento di bioconiugati:

1. bioconiugazione di tipo "*grafting to*", che permette di ottenere macromole proteiche utilizzando polimeri preformati;
2. metodo di bioconiugazione "*growing to*", con il quale il polimero viene sintetizzato sulla superficie proteica per polimerizzazione radicalica.

Nella prima parte dello studio, linker glicosilici di piccole dimensioni sono stati sintetizzati per modificare selettivamente Cys localizzate in posizioni mascherate e poco accessibili della struttura proteica. Tali funzioni glicosiliche possono essere attivate per ossidazione selettiva con *m*-periodato che in condizioni blande agisce su gruppi ossidrilici vicinali ossidandoli ad aldeidi. I gruppi aldeidici possono quindi fungere da sito di legame di PEG funzionalizzati con gruppi amminici o idrazinici. La reazione di PEG-NH₂ con i gruppi aldeidici delle funzioni glicosiliche porta alla formazione di basi di Schiff che possono essere stabilizzate in presenza di un riducente, come il sodio cianoboroidruro. Invece, la reazione delle aldeidi con PEG-NHNH₂ porta alla formazione di legami idrazonici relativamente stabili e possono essere idrolizzati con cinetiche pH-dipendenti. Pertanto il metodo di glicosilazione studiato consente, da un lato di ottenere una glicosilazione della proteina sito-specifica e dall'altro di legare varie catene di PEG alla stessa funzione glicosilica inserita nella proteina. Il derivato iper-PEGhilato che si ottiene può rigenerare la proteina di partenza per idrolisi del legame idrazonico consentendo di ottenere un lento rilascio della proteina attiva e superare così i limiti di attività biologica del bioconiugato ad alto peso molecolare.

I *linker* glicosilici sono stati disegnati in modo da essere dotati contemporaneamente di una funzione specifica in grado di legarsi al gruppo -SH della Cys, una catena alchilica lineare e sufficientemente rigida capace di inserirsi nella cavità dove si trova il gruppo -SH senza modificare la struttura tridimensionale della proteina stessa ed, infine, un gruppo glicosilico terminale che, in seguito ad un'ossidazione condotta in blande condizioni di reazione, fornisce diversi punti di ancoraggio per il PEG.

Per la sintesi dei *linker* si sono utilizzati lattosio e maltotriosio, costituiti, rispettivamente, da due e tre residui glicosilici in modo da ottenere derivati in grado di generare un diverso numero di funzioni aldeidiche e quindi capaci di legare un diverso numero di catene di PEG.

La sintesi dei *linker* è stata condotta in tre *step*: 1. ossidazione selettiva del carbonio anomero (C1) dello zucchero e sintesi del corrispondente estere lattonico; 2. derivatizzazione dello zucchero con dodecildiammina; 3. funzionalizzazione del *linker* con un gruppo maleimidico per la bioconiugazione alle funzioni tioliche della Cys.

Nel primo passaggio gli zuccheri sono stati ossidati con iodio seguendo la metodica descritta in letteratura da Kobayashi. Questa reazione permette di ottenere i corrispettivi esteri ciclici del lattosio e del maltotriosio con un elevato grado di purezza. Infatti, il lattonolattone ed il maltotriolattone sono stati caratterizzati tramite spettroscopia FT-IR ed entrambi gli spettri mostrano le caratteristiche bande relative allo *stretching* del C=O e del C-O caratteristici degli esteri ciclici.

Nella fase successiva i glicosili attivati sono stati funzionalizzati con 1,12-dodecildiammina. Tale reattivo è stato scelto perché presenta due gruppi amminici all'estremità della catena alchilica che possono essere sfruttati per legare il glicosile da un lato e successivamente un gruppo maleimidico all'estremità opposta. Dodecildiammina presenta, inoltre, una struttura lineare idrofobica e poco flessibile che dovrebbe consentire la penetrazione del *linker* in tasche idrofobiche delle proteine senza provocare significative perturbazioni strutturali. La sua lunghezza di 25 Å dovrebbe infine essere sufficiente per favorire l'esposizione delle funzioni glicosiliche sulla superficie proteica per le successive fasi di ossidazione e di PEGhilazione.

La procedura di sintesi dei derivati alchil-glicosilici è risultata efficiente e con elevate rese di reazione e di prodotto. Gli esteri lattonici in condizioni basiche reagiscono facilmente con i gruppi amminici primari senza ulteriore aggiunta di agenti attivanti, quali dicicloesilcarbodiimmide (DCCI) ed N-idrossi succinimide (NHS), e formano un legame

ammidico stabile. La reazione è stata condotta in metanolo dove sono solubili sia il lattone glicosilico che la dodecildiammina. Per aumentare il grado di derivatizzazione dei glicosidi ed evitare che la dodecildiammina sia funzionalizzata contemporaneamente alle due estremità con i glicosili si è impiegato un eccesso di reattivo alchilico 30 volte superiore rispetto a lattonolattone e maltotrionolattone utilizzati. Il processo di purificazione adottato per precipitazione in etere dietilico/trietilammina, miscela in cui la dodecildiammina è molto solubile, ha consentito di eliminare completamente la dodecildiammina in eccesso e di ottenere il galattosil-glucon-amide-dodecil-ammina [galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂] e il maltosil-glucon-amide-dodecil-ammina [maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH₂] con un elevato grado di purezza. Le analisi spettroscopiche di FT-IR, ¹H-NMR in D₂O hanno confermato l'identità chimica di entrambi gli intermedi di reazione. Le analisi di massa registrate in modalità positiva hanno dimostrato la completa scomparsa della dodecildiammina utilizzata in quanto non è presente il suo caratteristico segnale (M+H)⁺ a 201 m/e. Questi risultati sono stati confermati dalla presenza del 92-95% di gruppi amminici primari determinata con il saggio di Snyder. La completa eliminazione della dodecildiammina è importante in quanto tale reattivo può interferire nelle fasi di sintesi successive portando a prodotti alchil-bis-maleimidici che possono competere con il linker glicosilico per la derivatizzazione di Cys.

Per permettere il legame delle funzioni glicosiliche alla Cys di proteine il derivato alchil-glicosilico è stato attivato con una funzione maleimidica. La maleimide, infatti, in opportune condizioni di reazione, può formare selettivamente legami stabili con funzioni tioliche. La funzionalizzazione degli intermedi di reazione con un gruppo maleimidico è stata ottenuta utilizzando N-succinimidil 3-maleimido-propionato. La reazione è stata condotta in condizioni anidre per prevenire la disattivazione dei gruppi carbossilici attivati con l'NHS [74]. Inoltre, in tali condizioni, l'estere attivo è altamente reattivo verso i gruppi amminici primari [75] mentre il gruppo maleimidico non presenta alcuna reattività verso tali funzioni chimiche [76]. Le analisi effettuate sui prodotti finali hanno confermato l'identità chimica dei composti desiderati e l'efficacia del metodo sintetico adottato.

La procedura di PEGhizzazione sito-specifica attraverso glicazione è stata verificata inizialmente impiegando HSA come proteina modello in quanto questa proteina possiede una cisteina libera in posizione 34. La Cys³⁴ di HSA si trova inserita all'interno di una tasca idrofobica profonda circa 9.5 Å [77]. Prima di ogni esperimento è stato verificato il contenuto di gruppi sulfidrilici liberi presenti nella HSA nativa liofilizzata mediante il saggio

di Ellman aggiungendo alla soluzione tampone guanidinio cloridrato 3M (condizioni denaturanti) in modo da poter determinare il massimo grado di modifica della proteina che si può ottenere durante la reazione. Infatti è noto che le proteine liofilizzate vanno incontro ad un processo di “invecchiamento” che si traduce in una ossidazione ed una minore reattività dei residui di cisteine libere [78].

Le reazioni di glicazione di HSA con galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide e maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide sono state condotte a pH 6.5, ambiente in cui la maleimide reagisce 1000 volte più selettivamente con i residui tiolici delle cisteine rispetto ai residui εNH₂ di lisine, al gruppo αNH₂ terminale e ai gruppi imidazolici di istidine [79]. A pH 6.5, infatti, i gruppi amminici sono principalmente protonati e pertanto poco reattivi, in quanto i gruppi εNH₂ possiedono un valore di pKa di 9.3-9.5, mentre il gruppo αNH₂ terminale ha una pKa di 7.6-8.0.

Dopo 2 ore di reazione dei *linker* glicosilici con HSA si è osservata la scomparsa quasi totale dei gruppi -SH e, di conseguenza, una completa modifica della Cys libera della proteina. Il legame tioetereo che si forma per addizione di Michael al doppio legame è un legame stabile, che non idrolizza nelle condizioni di reazione utilizzate per la successiva bioconiugazione. I glicoconiugati ottenuti sono stati purificati per ultrafiltrazione in modo da eliminare completamente l'eccesso di reattivo usato che può interferire con le successive fasi di ossidazione e PEGhilazione.

Le condizioni di ossidazione dei derivati galattosil-HSA e maltosil-HSA con *m*-periodato hanno permesso di ottimizzare la formazione di gruppi aldeidici senza provocare la denaturazione delle proteine. In base alle condizioni di reazione il residuo galattosilico, derivato dal lattosio, può generare un numero di -CHO compreso tra uno e tre, mentre quella del maltosile, derivato dal maltotriosio, tra uno e cinque. Dalle analisi condotte sui prodotti ossidati ottenuti è risultato che i rapporti molarli gruppi aldeidici/proteina calcolati sono, rispettivamente, di 2.2:1 per galattosil-HSA e 3.2:1 per maltosil-HSA. Questi risultati sono in accordo con il fatto che i gruppi idrossilici in C6 degli zuccheri reagiscono con i gruppi aldeidici in C4, come raffigurato in Figura 4.1, formando emiacetali intramolecolari che riducono il numero di aldeidi titolabili e reattive [80].

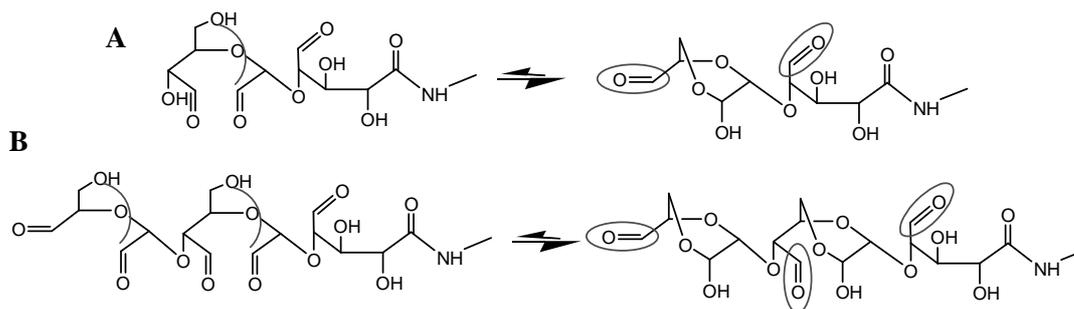


Figura 4.1.: Possibile formazione di emiacetali intramolecolari nel galattosil- (A) e maltosil- (B) derivato in seguito ad ossidazione con periodato.

Pertanto per la successiva bioconiugazione con il PEG-idrazide sono disponibili due gruppi aldeidici per il galattosil-derivato e tre per il maltosil-derivato, anche se, tuttavia, i gruppi aldeidici teorici che si formano per ossidazione sono tre per il galattosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide e cinque per il maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide.

Per ovviare a problemi di reticolazione dovuti a reazioni tra gruppi amminici della proteina e gruppi aldeidici del *linker* glicosilico la coniugazione a PEG-idrazide è stata eseguita a pH blandamente acido che protona i gruppi amminici. I gruppi aldeidici possono infatti reagire facilmente con gruppi idrazinici a pH compreso tra 5.0 e 7.0 formando legami idrazonici più stabili rispetto alle basi di Schiff che si formano dalla reazione tra un'aldeide ed un'ammina primaria. Dall'analisi cromatografica mediante gel filtrazione si osserva la formazione di bioconiugati di diverso peso molecolare dovuto alla formazione di mono-, di- e tri-PEGhilati. Comunque nel tempo si ha la completa coniugazione delle specie con il massimo grado di modifica che corrisponde al di-PEGhilato nel caso del galattosil-HSA e tri-PEGhilato nel caso di maltosil-HSA. Le specie a più basso peso molecolare nel prodotto finale sono trascurabili, indicando che il metodo sviluppato consente di ottenere un bioconiugato strutturalmente omogeneo. Dopo 50 ore di reazione il grado di modifica di entrambe le glicosil-HSA ossidate è stato del 93%. Al contrario, la modifica diretta della Cys con il PEG-maleimide commerciale senza l'impiego di *linker* raggiunge nello stesso tempo solo il 27%. Questa minore PEGhilazione è in accordo con la bassa accessibilità della Cys³⁴ a molecole altamente ingombranti ed idratate, quali il PEG. Le costanti cinetiche di PEGhilazione ottenute con galattosil-HSA e maltosil-HSA sono risultate, infatti, 10 volte superiori a quella relativa alla PEGhilazione diretta. Il numero di catene di polimero legato

alla proteina nel prodotto finale corrisponde ai gruppi aldeidici calcolati dopo ossidazione con *m*-periodato e con il peso molecolare apparente di 140 kDa per la galattosil-HSA e di 170 kDa per la maltosil-HSA determinato mediante analisi di cromatografia ad esclusione molecolare. La maggiore velocità di PEGhilazione ottenuta con il maltosil-derivato rispetto al galattosil-derivato è dovuta al maggior numero di gruppi aldeidici reattivi del bioconiugato. Inoltre vista la maggiore lunghezza del maltosile, questo *linker* glicosilico è maggiormente esposto sulla superficie della proteina rispetto al galattosil-derivato, facilitando la reazione di PEGhilazione.

In molti derivati il PEG viene legato covalentemente alle proteine in modo stabile e irreversibile. Tuttavia, questo può provocare una significativa e definitiva perdita di attività biologica. Inoltre il polimero può essere eliminato solo dopo degradazione proteica, un processo lungo che può causare problemi di accumulo del polimero e tossicità. L'utilizzo di legami reversibili tra polimero e proteina può essere una strategia interessante nel caso in cui si voglia programmare un rilascio lento e prolungato nel tempo della proteina libera o quando si desideri direzionare il rilascio della proteina in alcuni distretti dell'organismo in cui le condizioni fisiologiche favoriscano il distacco delle catene di polimero.

Gli studi di idrolisi competitiva condotti incubando i bioconiugati PEG-glicosil-HSA con un eccesso di carboidrazide hanno confermato la reversibilità del legame idrazonico tra le catene di PEG e glicosil-HSA. Carboidrazide può infatti competere con il PEG-idrazide portando al completo rilascio del PEG dalla proteina glicosilata. L'idrolisi del legame idrazonico è comunque reversibile anche in assenza di un competitore e si idrolizza con cinetiche pH-dipendenti. A pH fisiologico il coniugato è risultato essere più stabile in quanto il ripristino del 50% della proteina non PEGhilata avviene dopo circa 800 ore di incubazione, mentre a pH inferiori e maggiori il distacco del PEG avviene più rapidamente. La velocità di rilascio della proteina nella forma libera dipende anche dal numero di catene di polimero legate e infatti il derivato maltosilico rilascia la proteina glicosilata molto più lentamente rispetto al derivato galattosilico.

Visti i risultati positivi ottenuti con HSA il metodo di PEGhilazione attraverso glicazione sito-specifica è stato applicato a rh-G-CSF che presenta una cisteina libera in posizione 17 (Cys¹⁷) che si trova all'interno di una profonda tasca idrofobica e che risulta per questo motivo poco accessibile per una PEGhilazione diretta [81]. Infatti, la PEGhilazione di rh-G-CSF con PEG-maleimide 10 kDa in condizioni non denaturanti è risultata essere del 7% anche dopo 130 ore di reazione.

Modifiche con polimeri preformati dirette alla Cys¹⁷ possono essere condotte con rese di reazione maggiori tramite un processo di denaturazione reversibile anche se tuttavia la proteina subisce modifiche non trascurabili a livello della sua struttura secondaria [82].

Le condizioni di reazione utilizzate in questo studio per HSA si sono rivelate adatte anche per la derivatizzazione di rh-G-CSF, anche se le rese di reazione sono fortemente influenzate dalla scarsa stabilità e spiccata tendenza a formare aggregati insolubili della citochina [83,84,85].

rh-G-CSF è stato glicato impiegando maltosil-glucono-CO-NH-(CH₂)₁₂-NH-CO-(CH₂)₂-maleimide che nello studio precedente si era dimostrato il più interessante tra i due *linker* sintetizzati poiché garantisce una bioconiugazione di PEG superiore. Anche in questo caso la modifica di Cys con il *linker* è risultata completa, sebbene nel caso di rh-G-CSF questo aminoacido sia davvero poco accessibile. La modifica della Cys ha comunque portato ad un aumento dell'instabilità della proteina che tende ad aggregarsi in maniera irreversibile. Pertanto la proteina è stata purificata mediante cromatografia di gel filtrazione evitando di sottoporre la citochina a processi stressanti, come ad esempio l'ultrafiltrazione. Anche nel caso dell'ossidazione e della purificazione del prodotto ossidato si sono scelte condizioni operative meno drastiche rispetto a quelle usate con HSA. Questo comunque ha portato anche ad una diminuzione di gruppi aldeidici formati che sono risultati essere in rapporto finale gruppi aldeidici/rh-G-CSF di 2.3:1 rispetto al rapporto 3.2:1 ottenuto con il derivato maltosil-HSA.

Dopo circa 130 ore di PEGhilazione è stato ottenuto un grado di modifica del 70% della proteina. La più lenta velocità di PEGhilazione e minor grado di modifica ottenuta con G-CSF rispetto ad HSA può essere dovuto alla minore accessibilità del *linker* maltosilico e al minor numero di gruppi aldeidici presenti dopo ossidazione.

Dal confronto degli spettri dicroici ottenuti per il rh-G-CSF nativo e per la proteina PEGhilata risulta che il processo di bioconiugazione adottato non modifica significativamente la struttura secondaria della proteina, requisito fondamentale per il mantenimento dell'attività biologica.

Nella seconda parte del lavoro di tesi sono state studiate strategie di modifica di proteine per ottenere derivati alchil-bromuro, capaci di comportarsi da macroiniziatori proteici per le reazioni di polimerizzazione di monomeri acrilici mediante tecnica di *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP).

Sono stati sintetizzati due differenti alchil-alogenuri: 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide e 2-bromo-isobutirril-cadaverina, che sono stati impiegati per preparare macroiniziatori proteici.

Il primo composto è stato impiegato per la modifica selettiva dei residui Cys di proteine, mentre il secondo è stato utilizzato per la reazione di trans-acilazione a livello dei residui glutamminici ad opera di una transglutaminasi microbica (M-TGase).

Il 2-bromo-isobutirril-etossietil-maleimide è stato ottenuto esterificando il 2-(2-maleimidoetossi)etanolo con 2-bromo isobutirril-bromuro. Il metodo di purificazione mediante cromatografia su colonna di silice ha permesso di ottenere un prodotto finale puro come dimostrato dalle analisi spettrometriche di $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, analisi di massa ESI-TOF e saggi colorimetrici per la determinazione del gruppo maleimidico.

Utilizzando proteine modello, quali HSA e rh-G-CSF, si è dimostrato che questo reattivo modifica completamente le Cys libere in due ore ottenendo la formazione di macroiniziatori proteici. Le analisi di dicroismo circolare e le analisi cromatografiche hanno mostrato che la modifica delle Cys di HSA e rh-G-CSF non comportano sostanziali alterazioni della struttura secondaria della proteina.

La reazione di polimerizzazione radicalica di ATRP condotta a partire da questi due macroiniziatori radicalici, HSA-Br e rh-G-CSF-Br, non ha comunque dato risultati confortanti, in quanto da una valutazione complessiva dei risultati ottenuti con cromatografia a fase inversa e con elettroforesi SDS-PAGE, non è stato possibile confermare un effettivo aumento del volume idrodinamico della proteina in seguito a reazione sia con derivati metacrilici del polietilenglicole (PEGMA) sia di altri monomeri con differenti caratteristiche chimico-fisiche, quali il *N*-isopropilacrilamide (NIPAM) e *N*-vinil- ϵ -caprolattame (VLC).

Possibili spiegazioni della mancata formazione di polimero sulla superficie delle proteine studiate sono l'instabilità del *linker* che presenta una funzione esterea idrolizzabile e la capacità delle proteine di coordinare ioni metallici [86] tra cui anche $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$.

Al fine di valutare l'influenza della stabilità del *linker* si è deciso di utilizzare un *linker* più stabile in cui la funzione esterea è stata sostituita con una funzione amidica. Inoltre, per verificare il possibile effetto complessante da parte delle proteine nei confronti del catalizzatore metallico Cu^+ si è pensato di utilizzare un modello non proteico. Il nuovo *linker* 2-bromo-isobutirril-cadaverina è stato quindi coniugato ad un probe cromoforico a partire da acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (TNBS). Il TNBS reagisce infatti con i gruppi amminici

primari per formare un derivato che presenta due massimi di assorbimento nel *range* UV-Vis a 350 e 420 nm. La formazione del nuovo iniziatore cromoforico è stata confermata mediante tecniche spettrofotometriche e cromatografiche. L'analisi RP-HPLC ha confermato la formazione di TNP-cadaverina-Br che viene eluita con tempo di ritenzione maggiore rispetto al riferimento più idrofilico di TNP-propanolamina, ottenuta per modifica del gruppo amminico primario con TNBS.

Dopo reazione di ATRP condotta con PEGMA si è osservata la scomparsa del segnale relativo al TNP-cadaverina-Br che apparentemente indica l'avvenuta reazione di ATRP. Dai cromatogrammi registrati è stato possibile constatare che il TNP-cadaverina-Br si comporta da buon iniziatore radicalico in quanto dopo 30 minuti di reazione si osserva nel cromatogramma la completa scomparsa del picco che lo identifica. Tuttavia, non è stato possibile ottenere maggiori informazioni da queste analisi perché, in seguito alla scomparsa del segnale di TNP-cadaverina-Br, non si è registrata la comparsa di nessun picco corrispondente ad un'eventuale nuovo prodotto. D'altro canto le analisi su TLC della miscela di reazione non mostrano né lo *spot* caratteristico di TNP-cadaverina-Br né quello del PEGMA usati come reagenti nella polimerizzazione, mentre compare un nuovo *spot* che possiede un R_f simile a quello di un poly-PEG di 33 kDa (PDI=1.10) di riferimento e che assume una colorazione bruna tipica dei derivati ossietilenici esposti ai vapori di iodio. Pertanto si è assunto che la reazione di ATRP sia avvenuta come previsto.

Si è quindi proceduto a verificare se la presenza di proteina nativa in soluzione potesse in qualche modo inibire il processo di polimerizzazione a partire da TNP-cadaverina-Br. Per questo si è eseguita una nuova reazione di ATRP con il probe cromoforico, TNP-cadaverina-Br, in presenza di proteina. Anche in questo caso l'analisi HPLC ha mostrato la scomparsa del probe e l'analisi TLC ha individuato la formazione di un polimero avente proprietà cromatografiche simili al poli-PEG. Questo dimostra che la proteina non ha un'azione complessante nei confronti di Cu^+/Cu^{2+} tale da impedire la polimerizzazione.

2-bromo-isobutirril-cadaverina è stato quindi coniugato a rh-GH attraverso l'impiego di M-TGase che catalizza la reazione di acil-trasferimento tra il gruppo γ -carboammidico di una glutammina (Gln) ed il gruppo amminico di un composto amminoalchilico per formare un legame ϵ -(γ -glutamil)alchilico. Tale metodo di coniugazione enzimatica è stato impiegato per ottenere un macroiniziatore proteico a struttura definita. Dörwald e coll. riportano che la modifica di rh-GH con derivati alchil amminici avviene preferenzialmente a livello delle

glutammine in posizione 40 e 141 [87]. La M-TGase si è rivelata infatti molto selettiva nella modifica di rh-GH ed ha permesso di ottenere in questo caso un macroiniziatore bi-dentato come dimostrato dall'analisi di massa. Nonostante la presenza di due molecole di natura idrofobica sulla superficie della proteina i tempi di ritenzione ottenuti con cromatografia a fase inversa sono molto simili: rh-GH ha un tempo di ritenzione caratteristico di 17.72 minuti, mentre rh-GHBr₂ di 17.75 minuti. Le analisi di dicroismo circolare di rh-GH e di rh-GH-Br₂ forniscono spettri dicroici con profili simili ad indicare che la struttura secondaria della proteina non viene modificata in seguito ad alchilazione enzimatica.

La reazione di polimerizzazione di PEGMA (≈ 300 Da) a partire rh-GH-Br₂ è stata quindi condotta in presenza di Cu(I)Br e 2,2'-bpy. I cromatogrammi della miscela di reazione acquisiti dopo 60 minuti di incubazione mediante analisi HPLC a fase inversa non mostrano significative variazioni nel tempo di eluizione della proteina rispetto a rh-GH-Br₂, anche se il picco di eluizione presenta un forma allargata. Le analisi gel elettroforetiche condotte in condizioni riducenti di rh-GH nativo, rh-GH-Br₂ e poly-PEG-rh-GH mostrano però un effettivo incremento del peso molecolare della proteina rispetto a quella nativa, anche se la percentuale di conversione del monomero utilizzato per la reazione risulta essere comunque molto bassa. Infatti, dal confronto, delle bande corrispondenti al bioconiugato con quelle di opportuni standard proteici, è stato possibile determinare l'incremento del peso molecolare di 2 kDa, anziché di 60 kDa come previsto.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi mostrano come attraverso nuove metodiche di bioconiugazione di proteine con polimeri solubili sia possibile ottenere derivati con peculiari caratteristiche chimico-fisiche e strutturali.

Spacer alchil-glicosilici possono essere opportunamente sviluppati per la modifica sito selettiva di proteine e inserire così sulla superficie proteica in modo controllato siti di ancoraggio per il PEG. L'uso di *linker* a basso peso molecolare consente di modificare aminoacidi poco accessibili quali le cisteine che sono normalmente poco rappresentate nella sequenza proteica e nascoste in siti idrofobici per evitare la formazione di ponti disolfuro. *Linker* possono anche essere funzionalizzati in modo da modificare selettivamente aminoacidi diversi da cisteine. Ad esempio, l'impiego di glicosidi terminanti con funzioni amminiche possono essere legate a glutammine presenti sulla superficie della proteina mentre glicosidi terminanti con gruppi aldeidici possono essere legati ai gruppi amminici terminali (α -NH₂).

Gli studi preliminari di glicazione e PEGhilazione selettiva condotti con HSA e rh-G-CSF hanno dimostrato che è possibile ottenere derivati iper-PEGhilati di tipo *flag-type*. Scegliendo il *linker* e le condizioni di reazione è possibile controllare il numero di catene di PEG legate alla proteina e di conseguenza è possibile controllare il rilascio della proteina dal polimero. Pertanto questa metodica è potenzialmente utile per ottenere derivati con diversa performance in vivo.

Negli studi futuri sarà necessario verificare la tecnica di glicazione e PEGhilazione anche con proteine diverse da quelle impiegate e verificarne l'impatto sulla attività biologica. Sarà ad esempio interessante valutare l'impiego dei *linker* glicosilici per ottenere sistemi multifunzionali composti da proteine e farmaci a diversa attività.

Lo studio di *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP) non ha portato a risultati particolarmente positivi ma ha permesso di definire alcuni punti rilevanti come ad esempio l'effetto *scavenger* delle proteine che può limitare il processo di polimerizzazione. I risultati ottenuti dimostrano comunque che al di là delle suggestive prospettive di applicazione di tale tecnica in campo biofarmaceutico e dei risultati pubblicati in letteratura, la modifica di proteine con polimeri fatti su misura è una metodica complessa. In particolare risulta difficile

operare in condizioni non denaturanti così come è difficile la caratterizzazione dei prodotti finali. Pertanto dovranno essere condotti ancora diversi studi preliminari in cui sarà necessario mettere a punto appropriate tecniche analitiche per verificare l'efficienza di tale metodica.

BIBLIOGRAFIA

1. Borgia JA, Fields GB. Chemical synthesis of proteins. *Trends Biotechnol.* 2000; **18**, 243-251.
2. Molowa DT, Mazanet R. The state of biopharmaceutical manufacturing. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2003; **9**: 285-302.
3. Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature.* 1998; **392**: 5-10.
4. Cleland JL, Daugherty A, Mersny R. Emerging protein delivery methods. *Curr Opin Biotechnol.* 2001; **12**, 212-219.
5. Orive G, Hernández RM, Gascón RA, Domínguez-Gil A, Pedraz LJ. Drug delivery in biotechnology: present and future. *Curr. Opin Biotechnol.* 2003; **14**, 659-664.
6. McNall EJ. Protein Formulation and Delivery. *Marcel Dekker, McNall EJ Eds., New York*, 2000.
7. Salmaso S, Bersani S, Semenzato A, Caliceti P. Nanotechnologies in protein delivery. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006; **6**: 2736-2753.
8. Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release.* 2003; **90**: 261-280.
9. Almeida AJ, Souto E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Del Rev.* 2007; **6**: 478-490.
10. Yang L, Alexandridis P. Physicochemical aspects of drug delivery and release from polymer-based colloids. *Curr Opin Coll Interf Sci.* 2000; **5**, 132-143.
11. Spangler RS. Insulin administration via liposomes. *Diabetes Care.* 1990; **13**: 911-922.
12. Soula O, Meyrueix R, Chan YP, Grangeon C, Kravtsoff R, Soula G. Sustained release of IL-2 from MEDUSA[®] comb-like hydrophobically modified polyglutamate. *Contr Rel Soc. 30th Annual Meeting*, 2003; 688.
13. Meyrueix R, Lacomte JP, Soula O, Pouliquen G, Chan YP, Nicolas F, Kravtsoff P, Soula G. Sustained release of interferon alpha 2b from MEDUSA[®] nanoparticles of comb-like

- hydrophobically modified polyglutammate. *Contr Rel Soc. 30th Annual Meeting*, 2003; 690.
14. Salmaso S, Schrepfer R, Cavallaro G, Bersani S, Caboi F, Giammona G, Tonon G, Caliceti P. Supramolecular association of recombinant human growth hormone with hydrophobized polyhydroxyethylaspartamides. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007; *in press*.
 15. Duncan R, Spreafico F. Polymer conjugates: pharmacokinetic considerations for design and development. *Clin. Pharmacokinet.* 1994; **27**: 290-306.
 16. Thordarson P, Le Droumaguet B, Velonia K. Well-defined protein–polymer conjugates–synthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; **73**: 243-254.
 17. Ginger LG. Streptokinase chemically bonded to carbohydrate matrix. *US. Patent 3639213*, 1972.
 18. Poznansky MJ, Mao GD. Superoxide dismutase-catalase conjugates. *Biomater Art Cells & Art Org.* 1989; **17**: 229-244.
 19. Maeda H. SMANCS and polymer conjugated macromolecular drugs: advantages in cancer chemotherapy, *Adv Drug Delivery Rev.* 2001; **46**: 169-185.
 20. Abuchowski A, Kazo GM, Verhoest CR, Van Es T, Kafkewitz D, Nucci ML, Viau AT, Davis FF. Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates. *Cancer Biochem Biophys.* 1984; **7**: 175–186.
 21. Caliceti P, Veronese FM. Pharmacokinetics and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003; **55**: 1261-1277.
 22. Bailey Jr FE, Koleske JV. Poly(ethylene-oxide). *Academic Press, New York.* 1976.
 23. Powell GM. Polyethylene glycol. *Handbook of water soluble gums and resins. Davidson RL. Eds., McGraw-Hill, New York.* 1980; **18**: 1-31.
 24. Mutter M, Bayer E. *The peptides. Academic Press, New York.* 1979; 285-332.
 25. Dreborg S, Akerblom EB. Immunotherapy with monomethoxypolyethylene glycol modified allergens. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1990; **6**: 315-365.
 26. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci.* 1994; **83**: 601-606.

27. Bhadra D, Bhadra S, Jain P. PEG: a review of PEGylated systems. *Pharmazie*. 2002; **57**: 5-29.
28. Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002; **54**: 459-476.
29. Fee CJ, Van Alstine JM. PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. *Chem Eng Sci*. 2006; **61**: 924-939.
30. Pasut G, Veronese FM. Polymer–drug conjugation, recent achievements and general strategies. *Progr Polym Sci*. 2007; **32**: 933-961.
31. Youn YS, Lee KC. Site-Specific PEGylation for High-Yield Preparation of Lys21-Amine PEGylated Growth Hormone-Releasing Factor (GRF) (1-29) using a GRF(1-29) Derivative Fmoc-Protected at Tyr1 and Lys12. *Bioconjugate Chem*. 2007, **18**: 500–506.
32. Hinds K, Koh JJ, Joss L, Liu F, Baudys M, Kim SW. Synthesis and Characterization of Poly(ethylene glycol)-Insulin Conjugates. *Bioconjugate Chem*. 2000; **11**: 195-201.
33. Kinstler O, Molineux G, Treuheit M, Ladd D, Gegg C. Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)–protein conjugates. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002; **54**: 477-485.
34. Wang YS, Youngster S, Grace M, Bausch J, Bordens R, Wyss DF. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002; **54**: 547-570.
35. Geoghegan KF, Stroh JG. Site-directed conjugation of nanopptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application modification at N-terminal serine. *Bioconjugate Chem*. 1992; **3**: 138-146.
36. Youn YS, Na DH, Yoo SD, Song SC, Lee KC. Carbohydrate-specific polyethylene glycol-modified ricin A-chain with improved therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; **37**: 1525-1533.
37. Kochendoerfer GG. Site-specific polymer modification of therapeutic proteins. *Curr Opin Chem Biol*. 2005; **9**: 555-560.
38. Zappe H, Snell ME, Bossard MJ. PEGylation of cyanovirin–N (CV-N), an entry inhibitor of HIV. *Adv Drug Del Rev*. 2008; **60**: 79-87.

39. Leong SR, DeForge L, Presta L, Gonzalez T, Fan A, Reichert M, Chuntharapai A, Kim KJ, Tumas DB, Lee WP, Gribling P, Snedecor B, Chen H, Hsei V, Schoenhoff M, Hale V, Deveney J, Koumenis I, Shahrokh Z, McKay P, Galan W, Wagner B, Narindray D, Hebert C, Zapata G. Adapting pharmacokinetic properties of a humanized anti-interleukin-8 antibody for therapeutic applications using site-specific pegylation. *Cytokine*. 2001; **16**: 106-119.
40. Balan S, Choi J, Godwin A, Teo I, Laborde CM, Heidelberger S, Zloh M, Shaunak S, Brocchini S. Site-Specific PEGylation of Protein Disulfide Bonds Using a Three-Carbon Bridge. *Bioconjugate Chem*. 2007; **18**: 61-76.
41. Hinds KD, Kim SW. Effects of PEG conjugation on insulin properties. *Adv Drug Del Rev*. 2002; **54**: 505-530.
42. Esposito P, Barbero L, Caccia P, Caliceti P, D'Antonio M, Piquet G, Veronese FM. PEGylation of growth hormone-releasing hormone (GRF) analogues. *Adv Drug Del Rev*. 2003; **55**: 1279-1291.
43. Sato H. Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2002; **54**: 487-504.
44. Peschke B, Zundel M, Bak S, Clausen TR, Blume N, Pedersen A, Zaragoza F, Madsen K. C-Terminally PEGylated hGH-derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007; **15**: 4382-4395.
45. DeFrees S, Wang ZG, Xing R, Scott AE, Wang J, Zopf D, Gouty DL, Sjoberg ER, Panneerselvam K, Brinkman-Van der Linden EC, Bayer RJ, Tarp MA, Clausen H. GlycoPEGylation of recombinant therapeutic proteins produced in *Escherichia coli*. *Glycobiology*. 2006; **16**: 833-843.
46. Webster OW, Hertler WR, Sogah DY, Farnham, WB, RajanBabu TV. Group-transfer polymerization. 1. A new concept for addition polymerization with organosilicon initiators. *J Am Chem Soc*. 1983; **105**, 5706-5708.
47. Matyjaszewski K, Xia J. Atom transfer radical polymerization. *Chem Rev*. 2001; **101**, 291-299.
48. Hawker CJ, Bosman AW, Harth E. New polymer synthesis by nitroxide mediated living radical polymerizations. *Chem Rev*. 2001; **101**: 3661-3688.

49. Chiefari J, Chong YK, Ercole F, Krstina J, Jeffery J, Le TPT, Mayadunne RTA, Meijs GF, Rizzardo E, Tang SH. Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process. *Macromolecules*. 1998; **31**: 5559-5562.
50. Wang JS, Matyjaszewski K. Controlled/"living" radical polymerization. atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes. *J Am Chem Soc*. 1995; **117**: 5614-5615.
51. Kato M, Kamigaito M, Sawamoto M, Higashimura T. Polymerization of Methyl Methacrylate with the Carbon Tetrachloride/Dichlorotris-(triphenylphosphine)ruthenium(II)/Methylaluminum Bis(2,6-di-tert-butylphenoxide) Initiating System: Possibility of Living Radical Polymerization. *Macromolecules*. 1995; **28**: 1721-1723.
52. Nicolas J, Mantovani G, Haddleton DM. Living Radical Polymerization as a Tool for the Synthesis of Polymer-Protein/Peptide Bioconjugates. *Macromol Rapid Commun*. 2007; **28**: 1083-1111.
53. Braunecker WA, Matyjaszewski K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. *Progr Polym Sci*. 2007; **32**:93-146.
54. Jakubowski W, Min K, Matyjaszewski K. Activators Regenerated by Electron Transfer for Atom Transfer Radical Polymerization of Styrene. *Macromolecules*. 2006; **39**:39-45.
55. Lecolley F, Tao L, Mantovani G, Durkin I, Lautru S, Haddleton DM. A new approach to bioconjugates for proteins and peptides ("pegylation") utilising living radical polymerisation. *Chem Commun (Camb)*. 2004; **21**: 2026-2027.
56. Mantovani G, Lecolley F, Tao L, Haddleton DM, Clerx J, Cornelissen JJ, Velonia K. Design and synthesis of N-maleimido-functionalized hydrophilic polymers via copper-mediated living radical polymerization: a suitable alternative to PEGylation chemistry. *J Am Chem Soc*. 2005; **127**: 2966-2973.
57. Tao L, Mantovani G, Lecolley F, Haddleton DM. Alpha-aldehyde terminally functional methacrylic polymers from living radical polymerization: application in protein conjugation "pegylation". *J Am Chem Soc*. 2004; **126**: 13220-13221.

58. Heredia KL, Maynard HD. Synthesis of Protein-Polymer Conjugates. *Org Biomol Chem.* 2007; **5**: 45-53.
59. Lele BS, Murata H, Matyiaszewski K, Russel AJ. Synthesis of Uniform Protein-Polymer Conjugates, *Biomacromolecules.* 2005; **6**: 3380-3387.
60. Heredia KL, Bontempo D, Ly T, Byers JT, Halstenberg S, Maynard HD. In Situ Preparation of Protein-“Smart” Polymer Conjugates with Retention of Bioactivity, *J. Am. Chem. Soc.* 2005; **127**: 16955-16960.
61. Nicolas J, San Miguel V, Mantovani G, Haddleton DM. Fluorescently Tagged Polymer Bioconjugates from Protein derived Macroinitiators, *Chem. Comm.* 2006; **45**: 4697-4699.
62. Gill, S.G., von Hippel, P.H., Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 1989; **182**, 319-326.
63. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985; **150**:76-85.
64. Habeeb AFSA. Reaction of protein sulfhydryl group with Ellman’s reagent. *Methods in Enzymology.* 1972; **25**: 457-464.
65. Snyder SL, Sobocinsky PZ. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid method for the determination of amines. *Anal. Biochem.* 1975; **64**: 284-288.
66. Sims GE, Snape TJ. A method for the estimation of polyethylene glycol in plasma protein fractions. *Anal Biochem.* 1980; **107**: 60-63.
67. Jain S, Hreczuk-Hirst DH, McCormack B, Mital M, Epenetos A, Laing P, Gregoriadis G. Polysialylated insulin: synthesis, characterization and biological activity *in vivo.* *Biochim. Biophys. Acta.* 2003; **1622**: 42-49.
68. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; **227**:680-685.
69. Kobayashi, K., Sumitomo, H., Ina, Y., Synthesis and Function of Polystyrene Derivates Having Pedant Oligosaccharides. *Polymer J.* 1985; **17**: 567-575.

70. Hansen CB, Kao GY, Moase EH, Zalipsky S, Allen TM. Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. *Biochim Biophys Acta*. 1995; **1239**: 133-144.
71. Price CC., Kroll H. The Kinetics of the Periodate Oxidation of 1,2-Glycols. II. Ethylene Glycol, Pinacol and cis- and trans-Cyclohexene Glycols. *J Am Chem Soc*. 1938; **60**: 2726-2729.
72. Sherman MR, Williams LD, Saifer MGP, French JA, Kwak LW, Oppenheim JJ. Conjugation of high molecular weight poly(ethylene glycol) to cytokines: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factors as model substrates. *Chemistry and Biological Applications of Poly(ethylene glycol)*. ACS Symposium Series 680, Am Chem Soc, Washington, DC. 1997; 155-169.
73. Weber RW, Boutin RH, Nedelman MA, Lister-James J, Dean RT. Enhanced Kidney Clearance with an Ester-Linked ^{99m}Tc-Radiolabeled Antibody Fab'-Chelator Conjugate. *Bioconjugate Chem*. 1990; **1**:431-437.
74. Lomant AJ, Fairbanks G. Chemical probes of extended biological structures: Synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate). *J Mol Biol*. 1976; **104**: 243-261.
75. Staros J, Wright R, Swingle D. Enhancement by N-Hydroxysulfo-Succinimide of Water-Soluble Carbodiimide Mediated Coupling Reagents. *Anal Chem*. 1986; **156**: 220-222.
76. Tsubery H, Mironchik M, Fridkin M, Shechter Y. Prolonging the action of protein and peptide drugs by a novel approach of reversible polyethylene glycol modification. *J Biol Chem*. 2004; **279**: 38118-38124.
77. Stewart AJ, Blindauer CA, Berezenko S, Sleep D, Tooth D, Sadler PJ. Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin. *FEBS J*. 2005; **272**: 353-362.
78. Pedersen AO, Jacobsen J. Reactivity of the thiol group in human and bovine albumin at pH 3-9, as measured by exchange with 2,2'-dithiodipyridine. *Eur J Biochem*. 1980; **106**, 291-295.
79. Buechler KF, Banaszczyk MG, Noar JB. N-aryl-carbamic acid ester-derived and valeric acid ester-derived cross-linkers and conjugates, and methods for their synthesis and use. *US. Patent 6967107*, 2005.

80. Bruneel D, Schatch E. Chemical modification of pullulan: 1. Periodate oxidation. *Polymer*. 1993; **34**:2628-2632.
81. Arakawa T, Prestrelski SJ, Narhi LO, Boone TC, Kenney WC. Cysteine 17 of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor is partially solvent-exposed. *J Prot Chem*. 1993; **12**: 525-531.
82. Veronese FM, Mero A, Caboi F, Sergi M, Marongiu C, Pasut G. Site-Specific Pegylation of G-CSF by Reversible Denaturation. *Bioconjug Chem*. 2007; **18**: 1824-1830.
83. Rajan RS, Li T, Aras M, Sloey C, Sutherland W, Arai H, Briddell R, Kinstler O, Lueras AM, Zhang Y, Yeghnazar H, Treuheit M, Brems DN. Modulation of protein aggregation by polyethylene glycol conjugation: G-CSF as a case study. *Protein Sci*. 2006; **15**: 1063-1075.
84. Narhi LO, Kenney WC, Arakawa T. Conformational changes of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor induced by pH and guanidine hydrochloride. *J Protein Chem*. 1991; **10**: 359-367.
85. Raso SW, Abel J, Barnes JM, Maloney KM, Pipes G, Treuheit MJ, King J, Brems DN. Aggregation of granulocyte-colony stimulating factor in vitro involves a conformationally altered monomeric state. *Protein Sci*. 2005; **14**: 2246-2257.
86. Yim Z, Zupon M, Chaudry I. Insoluble copper-alpha interferon complex. *U.S. Patent 4871538*, 1989.
87. Dörwald F, Johansen N, Iversen L. Transglutaminase-mediated conjugation of growth hormone. *Patent WO/134148*, 2006.