

PEGİLASYON: PEG KONJUGATLARININ HAZIRLANMASI VE UYGULAMALARI

PEGYLATION: PREPARATION AND APPLICATION OF PEG CONJUGATES

Zerrin SEZGİN BAYINDIR, Nilüfer YÜKSEL

Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology
06100 Tandoğan, Ankara-TURKEY

ÖZET

Pegilasyon özellikle peptid-protein yapısında olan moleküllere bir veya daha fazla polietilen glikol (PEG) zincirinin bağlanması olarak tanımlanmaktadır. PEG toksik, immunojenik ve antijenik olmayan, suda yüksek çözünürlüğe sahip, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından onaylı bir polimerdir. PEG-etkin madde konjugatının vücutta kalış süresinin uzaması, metabolik enzimlerle parçalanmasının önlenmesi ve protein immünojenitesinin azalması veya eliminasyonu gibi avantajları bulunmaktadır. Günümüzde ilaç taşınmasında önemli bir yeri bulunan pegilasyon ile peptit ve proteinlerin terapötik kullanım potansiyelleri artmıştır. Bu derlemede pegilasyonun tanımı, faydaları, modifikasyon amacıyla kullanılan PEG türevleri, pegilasyonun farmasötik alandaki uygulamaları ve PEG kullanımını kısıtlayan faktörler hakkında bilgiler özetlenecektir.

Anahtar Kelimeler: Polietilen glikol, Pegilasyon, Peptid-protein, Pegilasyon kimyası.

ABSTRACT

Pegylation is defined as the modification of especially protein-peptide molecules by the linking of one or more polyethylene glycol (PEG) chains. PEG is a nontoxic, non-immunogenic, non-antigenic, highly water soluble and FDA approved polymer. The PEG-drug conjugates have several advantages: a prolonged residence in body, a decreased degradation by metabolic enzymes and a reduction or elimination of protein immunogenicity. Today the potential of peptides and proteins usage as therapeutic agents is enhanced via pegylation. In this publication definition and benefits of pegylation, PEG derivatives used for modification, applications of pegylation in pharmaceutical area and the limiting factors of PEG usage is reviewed.

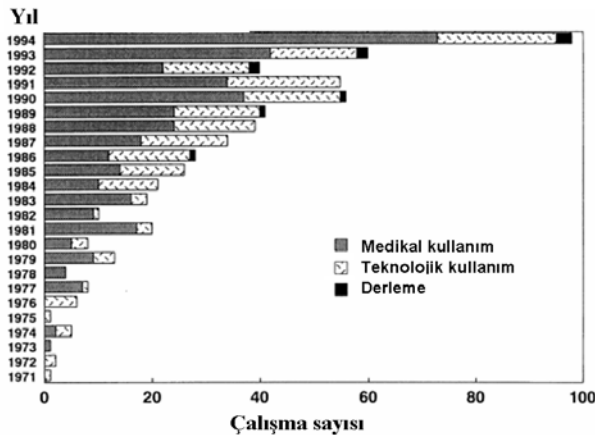
Keywords: Polyethylene glycol, Pegylation, Peptide-protein, Pegylation chemistry.

GİRİŞ

Peptid-protein yapısındaki büyük biyolojik moleküllerin ilaç etkin maddesi olarak kullanımı her geçen gün artmaktadır. Peptid-protein maddelerin çoğu oral yolla alındığında midede parçalanmakta veya enjekte edildiğinde plazma yarı ömürleri çok kısa olmaktadır [1]. Bu maddelerin vücuttaki taşınma ve farmakokinetik problemlerinin çözümlenebilmesi amacıyla araştırmacılar polimerler üzerinde yoğunlaşmışlardır. 1950'li yılların sonlarına doğru proteinlerin modifikasyonuna yönelik çalışmalar artmıştır. Protein moleküllerinin yapı-etki ilişkisinin analizini kolaylaştırmak amacıyla teknikler geliştirilmiştir. 1970'li yıllardan itibaren polietilen glikol (PEG) gibi sentetik makromoleküllerin proteinlere konjugasyonu ile ilgili çalışmalar yayınlanmaya başlamıştır. Protein modifikasyonlarında amaç immunoreaktivliğin veya immunojenliğin azaltılması ve medikal işlemlerde immunglobulin E (Ig-E) üretiminin baskılanması olmuştur. İlk kez 1977 yılında serum albumini ve katalaz enzimine PEG'nin kovalan olarak bağlanmasının antikorlara karşı immunoreaktivliği azalttığı gösterilmiştir.

İn vivo çalışmalarda polen alerjeninin sebep olduğu Ig-E sınıfı antikorların oluşumunun PEG-alerjen uygulaması ile baskılandığı bulunmuştur. Bir diğer uygulama ise peroksidaz, katalaz, lipaz ve kimotripsin gibi enzimlerin PEG ile modifiye edilmesidir. Bu modifiye enzimlerin hepsinin aktif oldukları ve organik çözücülerde çözüldükleri belirtilerek bu çözücülerdeki ters hidroliz reaksiyonunu katalizledikleri gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar biyomedikal ve biyoteknolojik işlemlerin geliştirilmesi için yeni yollar açmıştır. Konjugasyon işlemi sadece proteinlere değil, enzimler ve hemin, melanin, klorofil gibi biyoaktif maddelere de uygulanmıştır.

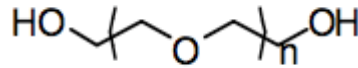
1971- 1994 yılları arasında protein ve biyoaktif maddelerin pegilasyonu ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı Şekil 1'de verilmiştir [2] Görüldüğü gibi her geçen sene pegilasyon ile ilgili çalışmalar artmaktadır.



Şekil 1: PEG veya türevleri ile protein modifikasyonunun yapıldığı çalışmaların sayısı [2].

Pegilasyon Kimyası

Şekil 2'de kimyasal yapısı verilen PEG 500–20,000 arası molekül ağırlığına sahip ve immunojenik olmayan bir maddedir. Sulu çözeltilerde ve pek çok organik çözeltide çözünebilmektedir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nden (Food and Drug Administration-FDA) onay almış bir polimer olan PEG toksik değildir, aktif proteinlere veya hücrelere hasar vermez [2]. PEG vücuttan bütün olarak böbrekler (< 30 kDa olan PEG'ler) veya feçes (> 20 kDa olan PEG'ler) yoluyla atılmaktadır [3].



Şekil 2: Polietilen glikol' ün (PEG) kimyasal yapısı.

Pegilasyon basitçe protein, peptid veya bunların dışındaki moleküllerin bir veya daha fazla PEG zincirinin bağlanması ile modifikasyona uğratılmaları olarak tanımlanmaktadır. Pegilasyon işleminden sonra moleküllerin enzimatik aktivite veya reseptör tarafından algılanma gibi biyolojik özellikleri değişmemektedir.

Pegilasyon işlemi genellikle proteinlerin amino gruplarından açilasyon ve alkilasyon reaksiyonları ile oluşturulmaktadır. Bunun sebepleri amino gruplarının nükleofil olarak aktif oluşları ve proteinlerin yüzeyinde yer almalarıdır. Özel kimyasal ve enzimatik reaksiyonlar kullanılarak tiyol, hidroksil ve amid gruplarından da pegilasyon işlemi yapılabilmektedir [2].

Bir moleküle (polipeptid, polisakkarit, polinükleotid ve küçük organik moleküller) bağlanabilmesi için PEG'nin bir veya iki terminalinde de fonksiyonel grup içerecek şekilde aktive edilerek PEG türevinin hazırlanması gerekmektedir. Fonksiyonel grup, molekülde bulunan ve PEG ile birleşecek uygun reaktif grubun tipine göre seçilmektedir. Proteinler için reaktif aminoasitler lizin, sistein, histidin, arjinin, aspartik asit, glutamik asit, serin, treonin, tirozin, N-terminal amino grubu ve C-terminal karboksilik asittir. Glikoproteinlerde ise yakın hidroksil grupları periyodat ile okside olarak iki reaktif formil (-CHO) grubu oluştururlar [4].

Modifikasyon amacıyla kullanılan polietilen glikol türevleri

Polietilen glikoller beyaz sıvıdan mumsu katıya kadar değişen şekillerde bulunmaktadır. Bu bileşikler suda çözünür ve uçucu değildir. Lubrikant, vezikül, çözücü, bağlayıcı olarak ve gıda, ilaç, lastik, kozmetik, ziraat, tekstil, kağıt, petrol ve diğer birçok endüstri alanında kullanılmaktadır. PEG'lerin genel özellikleri şu şekilde verilebilir:

1. Amfipatik özelliktedir; su, toluen, 1,1,1-trikloroetan ve benzende çözünür, etil eter ve alifatik hidrokarbonlarda çözünmez.
2. Molekül ağırlığı (MA) 1000'den büyük olan PEG'ler toksik değildir. MA'ı 4000 olan PEG %10' luk çözeltisi intravenöz (i.v.) olarak 16 g/kg dozda sıçan, domuz, tavşan ve maymunlara uygulanabilir (Dahilen kullanım için FDA onayı alınmıştır.).
3. Zayıf immunojeniktir.
4. Yüksek konsantrasyonda hücre füzyonuna sebep olur.
5. Dekstran veya konsantre tuz çözeltisi gibi bazı makromoleküllerin sulu çözeltileri ile iki fazlı sistemler oluştururlar.
6. Protein ve nükleik asitleri çöktürmek amacıyla kullanılabilirler.

Pegilasyon işlemi için çeşitli PEG türevleri kullanılabilir. Bu türevler genellikle monometoksi-PEG (mPEG) kullanılarak sentezlenmektedir. Bazı PEG türevleri aşağıda verilmiştir.

-Süksinimidil PEG

Terminal karboksil grubu bulunan mPEG çok yönlü bir türevdir. Karboksil grubu polimerin aktif esterlerinin hazırlanması ve biyolojik önemi olan moleküllere doğrudan bağlanması amacıyla kullanılabilir. PEG'nin N-hidroksisüksinimidil (NHS) esteri, pH 7-9 arasında protein yapısındaki amino grupları ile doğrudan etkileşmektedir [2].

-PEG-aminoasit

PEG'nin aminoasit türevleri hazırlanmıştır. mPEG-asit norlösin'in α -amino grubuna veya lizinin ϵ -amino grubuna bağlanmıştır (Şekil 3) [2].

- PEG-süksinimidil karbonat

Araştırmacılar PEG aktivasyonu amacıyla mPEG'nin hidroksil grubunu fosgenle reaksiyona sokup NHS ile aktive etmişlerdir. Elde edilen yapı olan PEG-süksinimidil karbonat pH 7-10 arasında proteinlerin amino gruplarıyla reaksiyona girerek dayanıklı üretan bağı meydana getirmektedir [2].

- PEG-triazin

Diğer tipteki modifiye edicilerden olan 2-(O-metoksipolietilenglikol)-4,6-dikloro-s-triazine, PEG1 olarak (Şekil 3) ve 2,4-bis (O-metoksipolietilenglikol)-6-kloro-s-triazin ise PEG2 olarak kısaltılmıştır. mPEG yapısındaki primer alkol siyanürik klorür ile reaksiyona girerek sırasıyla bir veya iki triazin grubu ile yer değiştirmekte ve aktive edilmiş PEG1 veya PEG2'yi oluşturmaktadır.

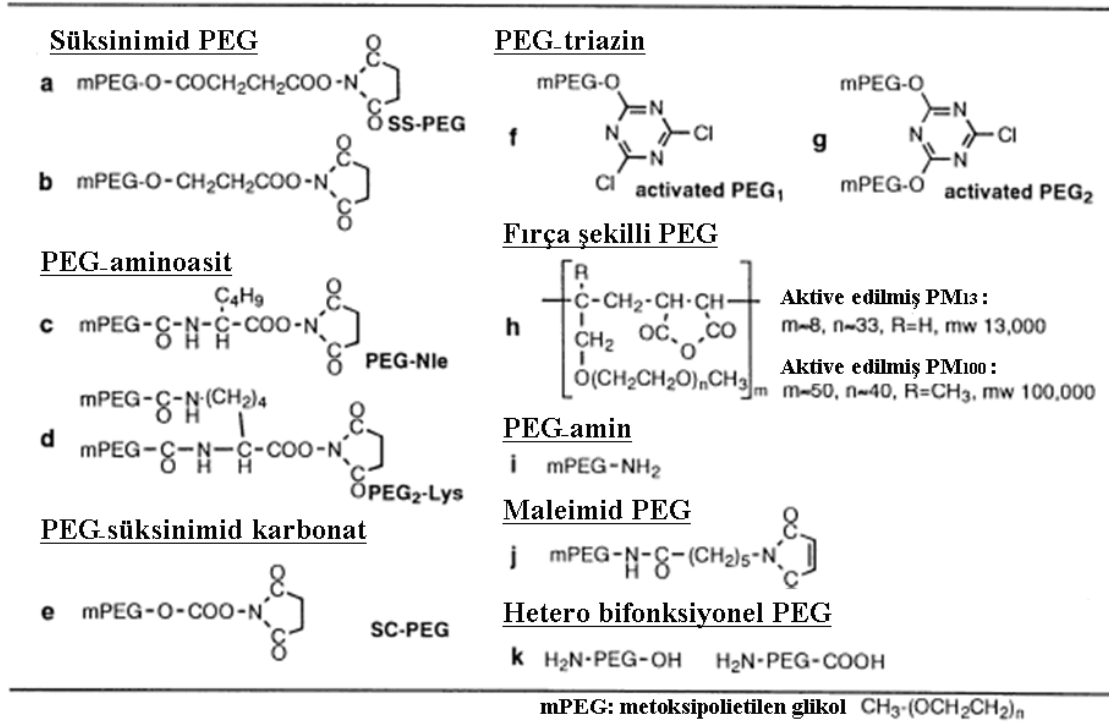
Aktive edilmiş PEG1 veya PEG2, proteinlerin amino grupları ile pH 8-9 ve 9,5-10 arasında reaksiyona girmektedir. İki PEG zinciri protein yapısındaki bir amino grubuna triazin zinciri ile bağlanmakta ve böylece PEG1 ile PEG2'den daha etkili bir protein modifikasyonu sağlanmaktadır. Bu tip modifiye edici türevler "zincir şekilli PEG'ler" olarak isimlendirilmektedir [2].

- Fırça şekilli PEG'ler

PEG ve maleik anhidrit kopolimeridir ve aktive edilmiş PM olarak kısaltılmaktadır. Fırça şeklinde olup çok değerlikli reaktif kısımları bulunmaktadır. Proteinlerin amino grupları PM yapısındaki maleik anhidriti ile birleşerek amid bağı oluşturmaktadır. Fırça şekilli PEG'ler protein molekülünü örtmekte ve/veya protein yüzeyine anyonik gruplar (-COOH) yerleştirmektedir [2].

- Diğer PEG türevleri:

PEG türevleriyle amino grubu modifikasyonunun dışında protein modifikasyonu için değişik stratejiler geliştirilmiştir. PEG-amin, karbonil bileşiklerinin modifikasyonu için kullanılmıştır. Son zamanlarda heterofonksiyonel PEG türevleri yeni tip modifiye ediciler olarak sentezlenmiştir [2].



Şekil 3: Proteinleri ve biyoaktif maddeleri modifiye etmek amacıyla kullanılan PEG türevleri [2].

Birinci kuşak pegilasyon işlemi

Birinci kuşak pegilasyon metodlarında genellikle PEG, lizinlerin ϵ -amino gruplarına bağlanmıştır. Ancak bu durum birçok lizinin modifiye olmasına neden olmuş ve farklı molekül ağırlığında PEG izomeri karışımlarını vermiştir. Bu izomerlerin oluşması ilaç serilerinin tekrar üretilebilirliğini zora sokmuş, ilaç antijenliğini artırmış ve kötü klinik sonuç alınmasına neden olmuştur. Birinci kuşak pegilasyon metodlarında özellikle doğrusal ve 12 kDa büyüklüğündeki PEG'ler kullanılmıştır. Bazen ilaç ve etkin madde arasında zayıf bağlar olduğundan üretim ve enjeksiyon esnasında ilaç-PEG konjugatının parçalanması gibi problemler meydana gelmiştir. Bir başka problem ise önceleri kullanılan PEGdiol ile kontamine olan mPEG'den dolayı proteinlerin çapraz bağlanarak aktif olmayan agregatlar oluşturmasıdır. Diol kontaminasyonu polimerizasyon sırasında ortamdaki su kalıntıları nedeniyle olmaktadır. PEGdiol yapısı, polimerin iki ucundan da polimerizasyon gerçekleştiği için yüksek molekül ağırlığına sahiptir [4]. mPEG yapısındaki diol kontaminasyonu %10-15 arasında olabilmektedir. Bu dezavantajlar araştırmacıları ikinci kuşak pegilasyon işlemine yönlendirmiştir.

İkinci kuşak pegilasyon işlemi

Araştırmacılar PEG türevlerini ve etkin maddelerle olan bağlarını iyileştirmek ve proteinlerin spesifik bölgelerine PEG zincirinin konjuge edilmesini sağlamak amacıyla çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Örneğin transglutaminaz kullanarak PEG'nin alkilamin türevlerinin proteinlere, aktivite kaybı olmadan istenen bölgeden bağlanması sağlanmıştır. Bu durumun PEG-protein konjugatlarının klinikteki kullanımları için avantaj sağlayacağı belirtilmiştir [5]. Bu şekilde hassas bölgelere yakın reaktif grupların saklanması amacıyla enzimlerin aktif bölgelerini veya proteinlerin algılama bölgelerini bir inhibitör, substrat veya spesifik ligant varlığında koruyarak da pegilasyon yapılabilir.

PEG-asetaldehit yerine PEG-propiyonaldehit kullanımı PEG'de safsızlık oluşumunu engellemiştir. PEG'nin karboksilik asit ara ürünlerinin hazırlanması, PEG etkin maddeye bağlanmadan önce diol safsızlıklarının % 97 oranına kadar iyon-değişimi kromatografisi ile uzaklaştırılmasını sağlamıştır. İkinci kuşak metodlarda bir başka amaç ise daha büyük PEG polimerleri sentezleyerek farmakokinetik ve farmakodinamik etkinliği artırmak olmuştur. Tablo 1'de bazı polipeptitlerin pegilasyon sonrası değişen farmakokinetik ve farmakodinamik etkinlikleri verilmiştir.

Tablo 1: Pegilasyonun farmakokinetik ve farmakodinamik parametreler üzerine etkisi [3].

Farmakokinetik Etki	Farmakodinamik Etki
İnterferon-α2a	
Sürekli absorpsiyon	İn vivo antiviral aktivitede 12-135 kat artış
Artan yarı ömür (3-8 saatten 65 saate)	Antitümöral aktivitede 18 kat artış
Azalan dağılma hacmi (31-73 L' den 8-12 L' ye)	Kronik hepatit C'ye artan sürekli cevap
Azalan sistemik atılım (6,6-29,2 L/saat'den 0,06-0,10 L/saat'e)	
İnterlökin-6	
Artan yarı ömür (2,1dak'dan -206 dak.ya)	Trombopoetik etkide 500 kat artış
Tümör nekroz faktör	
Artan yarı ömür (3 dak.dan 45-136 dak.ya)	Antitümöral aktivitede 4 ila 100 kat artış

Bölgeye spesifik pegilasyon işlemi biyolojik aktivite kaybını ve immünojeniteyi azaltabilmektedir. Polipeptitlerde lizin gruplarından daha az sistein rezidüsü olduğu için sisteinin tiyol grupları modifikasyon için daha uygundur. Ayrıca sistein grupları polipeptid yapısına gen mühendisliği teknikleriyle eklenebilmektedir. Yüksek aktiviteli, uzun süre dolaşımda kalabilen ve stabil interferon konjugatının hazırlanışı bu şekilde yapılmıştır.

Pek çok proteinde bölgesel pegilasyon olamasa da antikör parçaları gibi bazı yapılarda PEG'nin bağlanma bölgesinden uzak bir yere bağlanması önemlidir.

Pegilasyon işleminde bir diğer gelişme ise hedef bölgelerde etkin maddenin salınabilmesini sağlayan parçalanabilir bağların oluşturulması ve heterobifonksiyonel PEG'lerin sentezlenerek kullanılması olmuştur. Etkin maddenin salımı için kullanılan metodlardan birisi benzil üreanın para- veya orto- disülfidinin kullanılmasıdır. Hücre endozomlarının içi gibi ortamlara maruz kaldığında etkin madde serbest hale geçer. Heterobifonksiyonel PEG'ler benzer olmayan terminal gruplar içerirler. Bu durum immuno-assay, biyosensör ve probalar kullanılarak makromoleküllerin yüzeylere bağlanması, etkin maddelerin, lipozom veya virüslerin hedef dokulara ulaşması açısından avantaj sağlamaktadır.

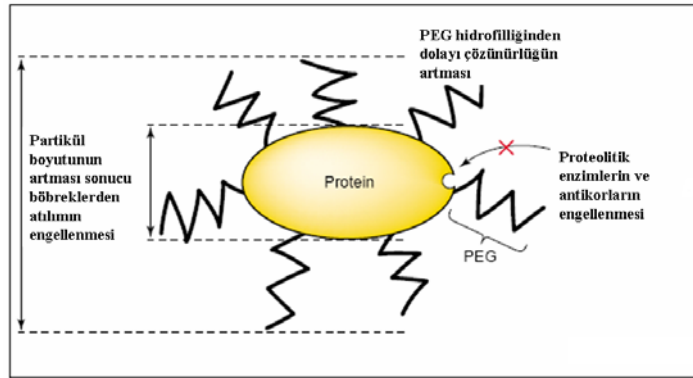
İkinci kuşak PEG polimerlerindeki bir başka gelişme ise birinci kuşakta kullanılan lineer PEG'lerin aksine dallanmış yapıların kullanılması olmuştur. Birinci kuşakta kullanılan 12 kDa olan yapıların yerini dallanmış 60 kDa PEG molekülleri almıştır. Bu PEG molekülleri bağlı polipeptidi immün sistem ve proteolitik enzimlerden daha kolay koruyup antijeniteyi ve parçalanma olasılığını azaltmışlardır.

Pegilasyon işlemlerinde PEG bağlanma bölgesinin kontrolünün sağlanmasının yanında, PEG-etkin madde konjugatının PEG türevlerinden ayrılması da önemlidir. Saflaştırma iki fazlı partiyon veya SEC (Size Exclusion Chromatography), HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) ve IEX (Ion Exchange Chromatography) gibi kromatografik metodlar ile yapılabilmektedir [6].

PEG-etkin madde konjugatlarının avantajları

Pegilasyon işlemi sonucu elde edilen konjugatlar aşağıda belirtilen özellikleri göstermektedir(Şekil 4) [2,7,8-15].

1. PEG, protein yüzeyini sterik engellemeyle maskelemekte ve degrade edici ajanlara karşı korumaktadır.
2. Polipeptidin moleküler büyüklüğünü artırmakta ve bunun sonucunda renal ultrafiltrasyonu azalmaktadır.
3. Antikor veya antijen işleyici hücrelerin teması da PEG zincirlerince engellenmektedir .
4. Protein immünojenitesi azalmakta veya elimine edilmektedir.
5. PEG fizikokimyasal özelliklerini bağlandığı peptit veya nonpeptit moleküle taşımakta ve böylece o maddenin biyodağılım ve çözünürlük özellikleri değişmektedir.
6. Enzim ve biyoaktif maddeler organik çözücü veya sulu çözeltilerde çözünmektedir.
7. İn vivo olarak PEG-protein konjugatının atılımını ve kandaki sirkülasyon süresini uzatmaktadır.
8. Protein ve biyoaktif maddelerin fizyolojik özelliklerini stabilize etmektedir.
9. Çeşitli etkin maddelerin farmakokinetik özellikleri iyileştirilmektedir.
10. Biyolojik moleküller, membranlar, hücre partikülleri ve hücreler ayrılmaktadır.
11. Tümörlü dokulardaki birikimi artırmaktadır.



Şekil 4: Pegilasyona uğramış proteinin avantajlarının şematik gösterimi [7].

Pegilasyonun Farmasötik Alandaki Uygulamaları

PEG konjugatlarıyla, kanser [16-19], enflamasyon [20,21], enzim eksikliği [22], kan süstitüsüyonu [23,24] gibi pek çok hastalığın tedavisi amacıyla çalışılmaktadır. Pegilasyon ile ilgili çalışmalar 1971 senesinden başlayarak artan bir şekilde ilerlemiştir. Tablo 2’ de 70’li yıllardan başlayarak pegilasyon açısından önemli uygulamalara yer verilmiştir.

Tablo 2: 1970 yılından itibaren gerçekleştirilen önemli pegilasyon uygulamaları.

Yıl	
1977	PEG'nin serum albuminine ve katalaz enzimine kovalan olarak bağlanması sonucunda antikorlara karşı immün etkinin azaldığının gösterilmesi
1977	Alerjenlerin pegilasyonu
1986	Hidrofilik-hidrofobik enzimlerin pegilasyonu
1990	Kalıtısal adenzin deaminaz eksikliğine bağlı immün zayıflığın tedavisinde kullanılan yetim ilaç (orphan drug) olan Adagen®'in (PEG-adenozin deaminaz) FDA'dan onay alması.
1994	Lenfoblastik lösemi ve diğer lenfoid malignitelerin tedavisinde kullanılan Oncaspar®'in (PEG-L-asparginaz) onay alması [25].
1995	Kaposi sarkoma, metastazik over kanseri tedavisinde kullanılan Doxil®'in (doksorubisinin pegile edilmiş lipozomal formülasyonunun) onay alması.
2000	Hepatit C tedavisinde kullanılan PEG-Intron®'un (Peginterferon alfa-2b) onay alması [26,27].
2002	Hepatit C tedavisinde kullanılan Pegasys®'in (Peginterferon alfa-2a) onay alması [28,29].
2002	Kemoterapi sırasında meydana gelen granülosit azalmasının tedavisinde kullanılan, Pegfilgrastim®'in (PEG-granülosit stimule edici faktör) onay alması.
2002	Akromegali tedavisinde kullanılan Pegvisomant®'in (PEG-büyüme hormonu reseptör antagonisti) onay alması.
2004	Yaşa bağlı makular dejenerasyon tedavisinde kullanılan Pegaptanib®'in (PEG-anti-vasküler epitelyal büyüme faktörü aptameri) onay alması.

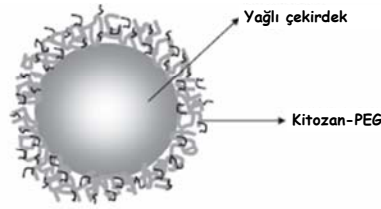
PEG-Lipozomlar

Yaklaşık 0,02-3,5 µm çapında kolloidal taşıyıcı sistemler olan lipozomlar küresel veziküllerdir [30]. Lipozomlara PEG konjugasyonu yapma stratejisi lipozomların tümör gibi hasarlı dokularda absorbe olabilme özelliğine dayanılarak geliştirilmiştir. Lipozomlara PEG bağlanması retiküloendotelial sistem (RES) tarafından lipozom alımını önlemektedir; bu nedenle PEG kaplı lipozomlar “stealth lipozom” olarak adlandırılmaktadır. PEG-lipozomların tümör içindeki dağılımları yüksektir [31]. Lipozomların pegilasyon işlemi, lipozom süspansiyonunun uygun PEG ile inkübasyonu veya sonikasyonu ile yapılabilmektedir [32,33]. Kanser tedavisinde uygulanan

fotodinamik terapi ajanı olan fotofirin'in lipozomal formülasyonlarının PEG ile konjuge edilmesi sonucu sitotoksik etkinin arttığı görülmüştür [32]. Managit ve ark. [34] galaktozil bağlanmış lipozomlar üzerine PEG kaplayarak bu lipozomların kayıp olmadan karaciğer parankimatik dokularına hedeflenmesini sağlamışlardır. Lipozom yüzeyindeki galaktoz gruplarının reseptörle etkileşiminin PEG zincirlerince kontrol edilebileceği belirtilmiştir.

PEG-Nanokapsülleri

Araştırmacılar özellikle küçük boyutlarından dolayı avantajlı olan nanotaşıyıcıları pegilasyon ile modifiye ederek özelliklerini iyileştirmeye çalışmışlardır [35-40]. Nanotaşıyıcıların absorplayıcı epitelyum ile yüzey etkileşimi fazladır. Biyoadhezif materyallerin kullanılması ile bu özellik artmaktadır ve koruyucu özellik de desteklenmektedir. Nanotaşıyıcıların etkinliğini kullanılan polimer bileşimi çok etkilemektedir. Özellikler kitozan bu açıdan sıklıkla tercih edilmektedir. Araştırmacılar kitozan nanokapsüllerinin PEG ile modifikasyonunu yapmışlardır (Şekil 5). PEG kaplamasının biyolojik sıvılardaki stabiliteyi artırarak barsak epitelyumundan geçişi artırdığı bulunmuştur [35].



Şekil 5: Kitozan-PEG nanokapsülünün teorik illüstrasyonu [35].

Pegile proteinlerin mikropartikül gibi taşıyıcı sistemlere yüklenmesi de söz konusudur [41]. Bu sayede araştırmacılar bazal insülinin haftada tek doz verilecek şekilde sürekli salımını gerçekleştirmişlerdir.

Pegilasyonun oral yolla biyoyararlanımı artırmaya yönelik kullanımı

Bilindiği gibi peptit ve protein yapısındaki maddeler oral olarak uygulandığında, enzimatik degradasyona uğramaları ve barsak epitelindeki düşük geçirgenlik nedeniyle absorbe olamamaktadır [42]. Pek çok araştırmacı bu tarzdaki etkin maddelerin oral biyoyararlanımını artırmaya yönelik formülasyonları geliştirmeye çalışmıştır. Bu amaçla pegilasyon işlemleri de yapılmıştır. Calceti ve ark. [43] PEG-insülin konjugatının elastaz ve pepsin degradasyonuna karşı insülini koruduğunu göstermişlerdir. PEG-insülinin poliakrilik asit-sistein ile hazırlanan matris

tabletlerinin oral olarak verilmesi sonucunda serbest insüline göre kan şekerinde belirgin derecede düşüş sağlanmıştır.

Pegilasyonun doku mühendisliği alanındaki uygulaması

Zhang ve ark. [44] miyokard enfeksiyonunun tedavisi amacıyla izole edilmiş mezenşimal kök hücrelerini (MSC) pegile edilmiş fibrin bazlı yama (patch) yardımı ile taşımaya çalışmışlardır. Sonuç olarak hazırlanan sistemin kök hücreleri canlı tutma yeteneğinin oldukça yüksek olduğu bulunmuştur.

Pegilasyonun diyagnostik taşıyıcı olarak kullanımı

İn vivo olarak invazif olmayan tanı magnetik rezonansla veya radyoaktivite ile bulunabilen izleyiciler (tracers) ile yapılmaktadır. İzleyicilere şelatlama vasıtasıyla spesifik dağılım ve hedeflenme özellikleri katılabilmektedir. Bu amaçla polimerler, antikolar gibi şelatlayıcılar kullanılmaktadır. Araştırmacılar pegilasyonun paramanyetik şelatların vucutta kalış sürelerini artırdığını ve böylece manyetik rezonansla daha detaylı görüntülerin elde edilmesini sağladığını göstermişlerdir. Bunun yanısıra pegilasyonun protein hedefli tanı, spesifik olmayan protein-protein etkileşmelerine bağlı olan arka plan kirliliğini engelleyerek daha iyi görüntüler almayı sağladığı belirtmektedir [7].

Antijen ve antikoların pegilasyonu

Farmasötik endüstride monoklonal antikoların araştırılması ve geliştirilmesi amacıyla yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Antikoların immunojenitelerini düşürerek dolaşımdaki yarı ömürlerini uzatmak amacıyla PEG konjugatları hazırlanmıştır. Pegile antikoların tümöre hedefleme, kronik hastalıkların immünoterapileri gibi özel klinik uygulamalarda avantaj getireceği belirtilmiştir. PEG'in antikolara spesifik olarak bağlanabilmesi antijen bağlanmasında görülen kayıpları engelleyerek bağlanma affinitesini ve homojenitesini, büyük üretimin daha homojen olmasını sağlayabilmektedir [45].

Küçük moleküllü etkin maddelerin pegilasyonu

Küçük molekül ağırlıklı etkin maddelerde en çok görülen sıkıntı düşük çözünürlükleri, hızlı atılıma uğramaları ve hedefsiz bir şekilde dağılıma uğramalarıdır. Araştırmacılar pegilasyon ile bu problemleri elimine etmeye çalışmışlardır. PEG'nin özellikleri konjuge olduğu etkin maddeye geçebilmektedir. Konjugatın vücut içindeki davranışları polimerinkine benzer olmaktadır. Taksol, kamptotesin, doksorubusin gibi ilaçlarda pegilasyondan sonra çözünürlük artarken farmakokinetik ve hedeflenme özelliklerinin değiştiği belirlenmiştir [7].

Peptit yapısında olmayan etkin maddelerin konjugasyonunda daha az problemler yaşanmaktadır. Küçük moleküllerde daha az fonksiyonel grup bulunmaktadır, konformasyonel özellikler zorlayıcı değildir, daha kolay saflaştırılma ve karakterizasyon aşamalarına sahiptirler. Pek çok araştırmacı küçük molekülü etkin maddelerin pegilasyonunu, artmış permeabilite ve retansiyon etkisi (EPR) ile katı tümörlere pasif hedefleme amacıyla kullanmıştır. Etkin maddenin etki gösterebilmesi için salınması gerekmektedir. Bu nedenle konjugatlar makromoleküler prodruglar olarak sınıflandırılmaktadır. Son yıllarda etkin maddeyi kontrollü bir şekilde istenilen bölgede konjugattan salılabilecek metotlar geliştirilmiştir. Küçük molekülü etkin maddelerin pegilasyonunda karşılaşılan en genel problem polimerin az oranda yüklenmesidir. Aktive edilebilen bir veya iki hidroksil terminal grubu bulunmaktadır. Bu engeli aşmak amacıyla dendrimerik yapıdaki PEG dendronları oluşturmuşlardır. Bugün piyasada pegile edilmiş küçük molekülü etkin madde bulunmamaktadır [7].

Diğer pegilasyon çalışmaları

Kanser tedavisinde kullanılan ve suda çözünmeyen bir ajan olan kamptotesin'in pegilasyon ile suda çözünen ön-ilacı (prodrug) hazırlanmıştır. Böylece dolaşımda kalış süresi uzatılarak biyoyararlanımı artırılmıştır. Serbest kamptotesin'e göre daha fazla tümörde birikme gözlenmiş ve antitümör aktivite artmıştır [46].

Integrin, $\alpha4\beta1$ 'in lökositleri enflamasyonlu dokuya taşınmasını düzenleyerek enflamasyonda önemli rol almaktadır. Pepinsky ve ark. [47] küçük bir molekül olan BIO5192 molekülünün $\alpha4\beta1$ 'i inhibe ettiğini bulmuşlardır. Ancak antiinflamatuvar etki için bu maddenin yüksek dozlarının günlük olarak uygulanması gerekmiştir. Bu durum etkin maddenin kısa yarı ömrüne bağlanmıştır. Araştırmacılar etkin maddenin yarılanma ömrünü pegilasyonla uzatarak hem dozu 30 kat azaltmayı hem de dozlama rejimini haftada bir düşürmeyi başarmışlardır.

Yüzey proteinlerinin pegilasyonunun, yüzey proteini-platelet etkileşmelerini bloke ederek hasarlı damarlarda veya biyomateryallerin yüzeyindeki trombozisi önlediği belirlenmiştir. PEG ile modifiye edilmiş fibrinojenle yüzeylere platelet adhezyonunun azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak protein reaktif PEG'lerin akut trombotik depozisyonun önlenmesi amacıyla kullanılabileceği bildirilmiştir [48].

PEG-Protein konjugatlarının biyodağılımı ve farmakokinetik özellikleri

Doğal proteinlerin farmakokinetik özelliklerinin doğru olarak belirlenebilmesi, yapıları tam olarak bilinse dahi zor olmaktadır. PEG konjugatlarında ise bu durum daha da zorlaşmaktadır. Bunun nedeni değişen molekül ağırlığı, polimer şekli, modifikasyonun büyüklüğü ve PEG

bağlanma bölgesi gibi çeşitli değişkenlerin de sisteme eklenmiş olmasıdır. Bu parametrelerin tamamı belirli bir ölçüde konjugatın vücut içindeki glomerüler filtrasyonu, immunojenitesi, stabilitesi, doku lokalizasyonu, hücresel alımı, karaciğerden atılımı gibi biyolojik olayları etkilemektedir. Günümüzde bu konu çok fazla açıklığa kavuşturulamamıştır ve maalesef PEG konjugatlarının davranışlarının her bir durum için ayrı ayrı deneysel olarak gösterilmesi gerekmektedir [49,50].

Özellikle pegilasyon sonucunda partikül boyutunun artması, böbreklerdeki ultrafiltrasyonu yavaşlatmakta ve geçirgen dokularda birikimi artırmaktadır. Yüklenme ve glikolizasyon neticesinde maskeleme özelliği ortaya çıkmakta ve bunun neticesinde RES ve karaciğer hücrelerince fagositoz azalmaktadır. Proteinin korunması eliminasyonda önemli yollar olan proteolizi ve immün sistem tarafından algılanmayı azaltmaktadır. Pegilasyonun proteinin fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerine etkisi, proteinin ve polimerin özellikleri ile uygulanan pegilasyon stratejisine bağlıdır.

Hinds ve Kim [51] insülin ile düşük molekül ağırlıktaki mPEG'yi konjuge etmişlerdir. Elde edilen yapıda insülinin sekonder ve tersiyer yapısının ve etkinliğinin in vivo olarak değişmediği belirlenmiştir. Pegilasyon ile agregasyon azalırken in vivo olarak konjugatın immunojenite, allerjenite ve antijenitesi de ortadan kalkmıştır. Subkutan uygulamada modifiye edilmemiş insüline göre daha uzun süre dolaşımında kalmıştır.

PEG kullanımını kısıtlayan faktörler

PEG kimyasal sentez yoluyla elde edilmekte ve tüm sentetik polimerler gibi polidispers, yani farklı sayıda monomerleri olan moleküllerden oluşmaktadır. Bu durum bazı ilaç konjugatlarının vucutta kalma süresi ve immunojenitesi açısından farklı biyolojik özellikler göstermesine neden olabilmektedir. Günümüzde bir takım saflaştırma işlemleriyle polidispersite özelliği azaltılmıştır. Ancak bu durumun, özellikle peptitlerle veya peptit yapısında olmayan düşük molekül ağırlıklı etkin maddelerle çalışılıyorsa, hesaba katılması gerekmektedir.

İkinci bir problem ise polimerin vucuttan atılımıyla ilgilidir. Diğer polimerler gibi PEG'ler de idrar veya feçesle atılmaktadır. Ancak yüksek molekül ağırlığına sahip ise karaciğerde birikerek makromoleküler sendroma sebep olabilmektedir [7].

SONUÇ

Pegilasyonun etkin bir şekilde farmasötik alanda ortaya çıkışı yaklaşık olarak 20 yıl almıştır. Bu süre zarfında pegilasyon kimyasında ve PEG-etkin madde konjugatlarının yapısının anlaşılmasında önemli aşamalar katedilmiştir. Artık günümüzde pegilasyon özellikle protein tarzındaki etkin maddelerin farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini iyileştirmek amacıyla kullanılmaktadır. PEG ile modifiye edilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı büyük önem arz etmektedir. Araştırmalarda PEG ile küçük moleküllerin modifikasyonu gibi yeni çalışma alanları ortaya çıkmaktadır. Pegilasyonun farmasötik bilim ve teknolojiye rolünün giderek artacağı kuşkusuzdur.

KAYNAKLAR:

1. **Whelan, J.** “Beyond pegylation” *Drug. Dis. Tod.*, **10**, 301 (2005).
2. **Kodera, Y., Matsushima, A., Hiroto, M., Nishimura, H., Ishii, A., Ueno, T., Inada, Y.** “Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications” *Prog. Polym. Sci.*, **23**, 1233–1271 (1998).
3. **Haris, J.M., Chess, R.B.** “Effect of pegylation on pharmaceuticals” *Nature Reviews*, **2**, 214-221 (2003).
4. **Roberts, M.J., Bentley, M.D., Haris, J.M.** “Chemistry for peptide and protein PEGylation” *Adv. Drug Del. Rev.*, **54**, 459–476 (2002).
5. **Sato, H.** “Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins” *Adv. Drug Del. Rev.*, **54**, 487–504 (2002).
6. **Fee, C.J., Van Alstine, J.M.** “PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues” *Chem. Engin. Sci.*, **61**, 924 – 939 (2006).
7. **Veronese, F.M., Pasut, G.** “PEGylation, successful approach to drug delivery” *Drug Discovery Today*, **10(21)**, 1451-1458 (2005)
8. **Veronese, F.M.** “Peptide and protein PEGylation: A review of problems and solutions” *Biomaterials*, **22**, 405–417 (2001).
9. **Werle, M., Schnürch, A.B.** “Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs” *Amino Acids*, **30**, 351–367 (2006).

10. **Youn, Y.S., Jung, J.Y., Oh, S.H., Yoo, S.D., Lee, K.C.** “Improved intestinal delivery of salmon calcitonin by Lys18-amine specific PEGylation: Stability, permeability, pharmacokinetic behavior and in vivo hypocalcemic efficacy” *J. Cont. Rel.*, **114**, 334–342 (2006).
11. **Lee, G.K., Maheshri, N., Kaspar, B., Schaffer, D.V.** “PEG conjugation moderately protects adeno-associated viral vectors against antibody neutralization“ *Biotech. and Bioeng.*, **92:1**,24-34, (2005)
12. **Hinds, K.D. Kim, S.W.** “Effects of PEG conjugation on insulin properties” *Adv. Drug Del. Rev.*, **54**, 505–530 (2002)
13. **Ramon, J., Saez, V., Baez, R., Aldana, R., Hardy, E.** “PEGylated interferon- α 2b: A branched 40K polyethylene glycol derivative” *Pharm. Res.*, **22:8**, 1374-1386 (2005)
14. **Esposito, P., Barbero, L., Caccia, P., Caliceti, P., D’Antonio, M., Piquet, G., Veronese, F.M.** “PEGylation of growth hormone-releasing hormone (GRF) analogues” *Adv. Drug Del. Rev.*, **55**, 1279–1291 (2003).
15. **Salmasoa, S., Semenzatoa, A., Bersaniaa, S., Chinolb, M., Paganellib, G., Calicetia, P.** “Preparation and characterization of active site protected poly(ethylene glycol)–avidin bioconjugates” *Biochimica et Biophysica Acta*, **1726**, 57 – 66 (2005).
16. **Chan, P., Kurisawa, M., Chung, J.E., Yang, YY.** “Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery” *Biomaterials*, **28**, 540-9 (2007).
17. **Okuda, T., Kawakami, S., Akimoto, N., Niidome, T., Yamashita, F., Hashida, M.** “PEGylated lysine dendrimers for tumor-selective targeting after intravenous injection in tumor-bearing mice” *J. Cont. Rel.*, **116**, 330-6 (2006).
18. **Rossi, J., Giasson, S., Khalid, M.N., Delmas, P., Allen, C., Leroux, J.C.** “Long-circulating poly(ethylene glycol)-coated emulsions to target solid tumors” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, basımda (2007).
19. **Reddy, P.R., Venkateswarlu, V.** “Pharmacokinetics and tissue distribution of etoposide delivered in long circulating parenteral emulsion” *J. Drug Target.*, **13**, 543-53 (2005).
20. **Edwards, C.K. III.** “PEGylated recombinant human soluble tumour necrosis factor receptor type I(r-Hu-sTNF-RI): novel high affinity TNF receptor designed for chronic inflammatory diseases” *Ann Rheum Dis.*, **58:1**, 173-81 (1999).

21. **Edwards, C.K., Martin, S.W., Seely, J., Kinstler, O., Buckel, S., Bendele A.M., Cosenza, M.E., Feige, U., Kohno, T.** “Design of PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I (PEG sTNF-RI) for chronic inflammatory diseases” *Adv. Drug Del. Rev.*, **55**, 1315–1336 (2003).
22. **Wang,L., Gamez, A., Sarkissian, C.N., Straub, M., Patch, M.G., Han, G.W. Striepeke, S., Fitzpatrick, P., Scriver, C.R., Stevens, R.C.** “Structure-based chemical modification strategy for enzyme replacement treatment of phenylketonuria” *Mol. Gen. Met.* **86**, 134–140 (2005)
23. **Scott, M.D., Chen, A.M.** “Beyond the red cell: pegylation of other blood cells and tissues” *Trans. Cliniq. et Biol.*, **11**, 40–46 (2004).
24. **Wettstein, R., Tsai, A.G., Erni, D., Lukyanov, A.N., Torchilin, V.P., Intaglietta, M.** “Improving microcirculation is more effective than substitution of red blood cells to correct metabolic disorder in experimental hemorrhagic shock” *Shock*, **21**, 235-40 (2004).
25. **Graham, M.L.** “Pegaspargase: a review of clinical studies” *Adv. Drug Del. Rev.*, **55**, 1293–1302 (2003).
26. **Kozlowski, A., Haris, J.M.** “Improvements in protein PEGylation: Pegylated interferons for treatment of hepatitis” *J. Cont. Rel.*, **72**, 217–224 (2001).
27. **Wang, Y.-S., Youngster, S., Grace, M., Bausch, J., Bordens, R., Wyss, D.F.** “Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications” *Adv. Drug Del. Rev.*, **54**, 547–570 (2002).
28. **Matthews, J., Mccoy, C.** “Peginterferon Alfa-2a: A review of approved and investigational uses” *Clinical Therapeutics*, **26:7**, 991-1025 (2004).
29. **Reddy, K.R., Modi, M.W., Peder, S.** “Use of peginterferon alfa-2a (40 KD) (Pegasys®) for the treatment of hepatitis C” *Adv. Drug Del. Rev.*, **54**, 571–586 (2002).
30. **Gursoy A.Z.** “Lipozomlar” in *Kontrollü salım sistemleri*, Gursoy A.Z (Ed.), Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj Sanayii, İstanbul, 103 (2002).
31. **Luciani, A., Olivier, J-C., Clement, O., Siauve, N., Brillet, P.Y., Bessoud, B., Gazeau, F., Uchegbu, I.F., Kahn, E., Frija, G., Cuenod, C.A.** “Glucose-receptor MR imaging of tumors: Study in mice with pegylated paramagnetic niosomes” *Radiology* , **231**, 135-142 (2004).
32. **Sadzuka, Y., Tokutomi, K., Iwasaki, F., Sugiyama I., Hirano, T., Konno, H., Oku, N., Sonobe, T.** “The phototoxicity of photofrin was enhanced by PEGylated liposome in vitro” *Cancer Letters* ,**241**, 42–48 (2006).

33. **Lee, C.-M., Choi, Y., Huh, E.J., Lee, K.Y., Song, H.-C., Sun, M.J., Jeong, H.-J., Cho, C.-S., Bom, H.-S.** "Polyethylene glycol (PEG) modified ^{99m}Tc-HMPAO liposome for improving blood circulation and biodistribution: The effect of the extent of PEGylation" *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, **20:6**, 620–628 (2005).
34. **Managit, C., Kawakami, S., Nishikawa, M., Yamashita, F., Hashida, M.** "Targeted and sustained drug delivery using PEGylated galactosylated liposomes" *Int. J. Pharm.*, **266**, 77–84 (2003).
35. **Prego, C., Torres, D., Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Quiñoá, E., Alonso, M.J.** "Chitosan–PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: Effect of chitosan pegylation degree" *J. Cont. Rel.*, **111(3)**, 299-308 (2006).
36. **Owens, D.E., Peppas, N.A.** "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles" *Int. J. Pharm.*, **307**, 93–102 (2006).
37. **Acar, H.Y.C., Garaas, R.S., Syud, F., Bonitatebus, P., Kulkarni, A.M.** "Superparamagnetic nanoparticles stabilized by poly merized PEGylated coatings" *J. Magn. Magn. Mat.*, **293**, 1-7 (2005).
38. **Yoncheva, K., Lizarraga, E., Irache, J. M.** "Pegylated nanoparticles based on poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride): Preparation and evaluation of their bioadhesive properties" *Eur. J. Pharm. Sci.*, **24**, 411–419 (2005).
39. **Bhadra, D., Bhadra, S. Jain, S., Jain, N.K.** "A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil" *Int. J. Pharm.*, **257**, 111–124 (2003).
40. **Peracchia, M.T., Fattal, E., Desmaële, D., Besnard, M., Noel, J.P., Gomis, J.M., Appela, M., d'Angelo, J., Couvreur, P.** "Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting" *J. Cont. Rel.*, **60**, 121–128 (1999).
41. **Hinds, K.D., Campbella, K.M., Holland, K.M., Lewis, D.H., Piche, C.A., Schmidt, P.G.** "PEGylated insulin in PLGA microparticles. In vivo and in vitro analysis" *J. Cont. Rel.*, **104**, 447–460 (2005).
42. **Prego, C., Fabre, M., Torres, D., Alonso, M. J.** "Efficacy and mechanism of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery" *Pharm. Res.*, **23:3**, 549-556 (2006).
43. **Calceti, P., Salmaso, S., Walker, G., Bernkop-Schnürch, A.** "Development and in vivo evaluation of an oral insulin–PEG delivery system" *Eur. J. Pharm. Sci.*, **22**, 315–323 (2004).

44. **Zhang, G., Wang, X., Wang, Z., Zhang, J., Suggs, L.** “A PEGylated fibrin patch for mesenchymal stem cell delivery” *Tissue Engineering*, **12:1**, 9-19 (2006).
45. **Chapman, A.P.** “PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: A review” *Adv. Drug Del. Rev.*, **54**, 531–545 (2002).
46. **Conover, C.D., Greenwald, R.B., Pendri, A., Gilbert, C.W., Shum, K.L.**, “Camptothecin delivery systems: enhanced efficacy and tumor accumulation of camptothecin following its conjugation to polyethylene glycol via a glycine linker” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **42**, 407-414 (1998).
47. **Pepinsky, R. B. , Lee, W.-C., Cornebise, M., Gill, A., Wortham, K., Chen, L. L., Leone, D.R., Giza, K., Dolinski, B.M., Perper, S., Nickerson-Nutter, C., Lepage, D., Chakraborty, A., Whalley, E. T., Petter, R. C., Adams, S. P., Lobb, R. R., Scott, D. M.** “Design, synthesis, and analysis of a polyethelene glycol- modified (PEGylated) small molecule inhibitor of Integrin $\alpha 4\beta 1$ with improved pharmaceutical properties” *J. Pharm. Exper. Ther.*, **312:2**, 742-750 (2005).
48. **Xu, H., Kaar, J.L., Russell, A. J., Wagner, W. R.** “Characterizing the modification of surface proteins with poly(ethylene glycol) to interrupt platelet adhesion” *Biomaterials*, **27**, 3125–3135 (2006).
49. **Caliceti, P., Veronese, F.M.** “Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)–protein conjugates” *Adv. Drug Del. Rev.*, **55**, 1261–1277 (2003).
50. **Na, D.H., Lee, K.C., DeLuca, P.P.** “PEGylation of octreotide: II. Effect of N-terminal mono-PEGylation on biological activity and pharmacokinetics” *Pharm. Res.*, **22: 5**, 743-749 (2005)
51. **Hinds, K.D., Kim, S.W.** “Effects of PEG conjugation on insulin properties” *Adv. Drug Del. Rev.*, **54**, 505–530 (2002).

Received: 18.09.2007

Accepted: 03.01.2008