

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 547.915.5:542.06
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-2-197-203>

Поступила в редакцию 30.01.2018
Received 30.01.2018

Ю. В. Мартыненко-Макаев, А. С. Круглик, О. Л. Шарко, В. В. Шманай

Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

КОНТРОЛИРУЕМОЕ ПЕГИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ АЗИДНЫМИ РЕАГЕНТАМИ-РАЗВЕТВИТЕЛЯМИ С ПОМОЩЬЮ КЛИК-ХИМИИ

Аннотация. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) является нетоксичным, неиммуногенным, гидрофильным, незаряженным и бионеразлагаемым полимером, и его использование в составе терапевтических белковых препаратов вошло в медицинскую практику. Известно, что ПЭГ, соединенный с терапевтическим белком, способствует более длительному нахождению препарата в организме, снижает его иммуногенность и антигенность, повышает растворимость и стабильность в биологических средах, что позволяет оптимизировать фармакокинетические свойства препарата. Одной из целей оптимизации структуры конъюгатов терапевтических белков с ПЭГом является максимальное сохранение биологической активности белка, что может быть достигнуто с помощью контролируемого пегилирования по заданным сайтам белковой молекулы. В настоящей работе представлен метод двухстадийной модификации белков разветвленными полиэтиленгликолями с использованием реакции [3+2] диполярного циклоприсоединения азидов к алкинам. Описан синтез азидного реагента-разветвителя на основе *трис*(гидроксиметил)аминометана, содержащего три остатка полиэтиленгликоля. Разработана методика двухстадийной модификации модельного белка бычьего сывороточного альбумина, включающая введение на первой стадии алкиновых групп при помощи N-гидроксиsuccинимидного эфира алкиноукислоты, которые затем вступают в «клик»-реакцию с азидным пегилирующим реагентом-разветвителем. Полученные конъюгаты выделены с помощью гелепроникающей хроматографии. Число введенных модификаций определено при помощи МАЛДИ масс-спектрометрии.

Ключевые слова: полиэтиленгликоль, модификация белков, клик-химия, пегилирование, терапевтические белки пролонгированного действия

Для цитирования. Контролируемое пегилирование белков азидными реагентами-разветвителями с помощью клик-химии / Ю. В. Мартыненко-Макаев [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2018. – Т. 54, № 2. – С. 197–203. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-2-197-203>

Yu. V. Martynenko-Makaev, A. S. Kruhlik, O. L. Sharko, V. V. Shmanai

Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

CONTROLLED CuAAC PROTEIN PEGYLATION WITH AZIDE BRANCHING REAGENTS

Abstract. Polyethyleneglycol (PEG) is nontoxic, nonimmunogenic, hydrophilic, chargeless and nonbiodegradable polymer. Its usage as a part of therapeutics protein drugs is common in medicine practice. It is known that covalent attachment of PEG conduces to prolong blood circulation half-lives, improves drug solubility and stability and reduces immunogenicity. It allows optimizing pharmacodynamic and pharmacokinetic drug properties. The goal of structure optimization of therapeutic proteins conjugates with PEG is to reduce loss of biological activity. It can be reached through controlled site-specific pegylation. We introduce two-step modification of proteins with branched polyethyleneglycols via click-chemistry, synthesis of branched PEG azide reagent on the base of tris(hydroxymethyl)aminomethane with three linear PEG polymers. At first, we introduce alkyne groups with NHS-ester of alkyne acid in BSA protein. Then, branched PEG azide reagent reacts with alkyne function via CuAAC. Purification of the conjugates was done via gel-chromatography. Number of modifications was calculated from MALDI mass-spectra.

Keywords: polyethyleneglycol, protein modification, CuAAC, pegylation, prolonged therapeutic proteins

For citation. Martynenko-Makaev Yu. V., Kruhlik A. S., Sharko O. L., Shmanai V. V. Controlled CuAAC protein pegylation with azide branching reagents. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk=Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2018, vol. 54, no. 2, pp. 197–203 (In Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-2-197-203>

Введение. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) является нетоксичным, неиммуногенным, гидрофильным, незаряженным и бионеразлагаемым полимером. Его использование в составе терапевтических белковых препаратов вошло в медицинскую практику и одобрено контролирующими органами в медицинской сфере, в частности FDA [1]. Известно, что ПЭГ, соединенный с терапевтическим белком, способствует более длительному нахождению препарата в организме, снижает его иммуногенность и антигенность, повышает растворимость и стабильность в биологических средах, что позволяет оптимизировать фармакокинетические свойства препарата [1–4].

При получении пегелированного белка следует учитывать, что масса ПЭГ должна превышать 400 Да, чтобы полимер оставался бионеразлагаемым, а масса конъюгата должна быть существенно больше 20 кДа, чтобы исключить быстрое выведение через почки. Конъюгаты большего веса метаболизируются и выводятся из организма иными путями: через печень, иммунную систему или протеолиз белковой части конъюгата [5–12]. Помимо молекулярной массы, на эффективность препарата влияет разветвленность ПЭГ: конъюгаты с разветвленными модификациями имеют более длительное время полувыведения. Кроме того, использование разветвленного ПЭГ, в отличие от линейного, требует меньшего количества сайтов для связывания с белком, что снижает иммуногенность препарата, но при этом лучше сохраняются его биологические свойства [13, 14].

Разветвленные ПЭГ являются значительно более объемными, чем соответствующие им по массе линейные аналоги [15], более эффективно защищают препарат от иммунной системы и протеаз, таким образом снижая вероятность деструкции [16].

Неспецифическое пегелирование приводит к образованию множества изомерных конъюгатов, в которых ПЭГ связан с различными сайтами белка, что нежелательно для терапевтических препаратов [4, 17]. Одной из целей оптимизации структуры конъюгатов терапевтических белков с ПЭГом является максимальное сохранение биологической активности белка, что может быть достигнуто пегелированием по заданным сайтам белковой молекулы [18]. Это особенно важно для пегелирования антител: необходимо, чтобы полимер был удален от активного центра [2].

Цели и задачи. Цель работы – разработка и подтверждение эффективности нового метода получения пегелированных белков через двухстадийную модификацию. Выбранная стратегия получения пегелированных высокомолекулярных конъюгатов предполагает введение в молекулу белка алкиновой функции, которое может быть осуществлено на первой стадии сайт-специфически с помощью гетеробифункциональных линкеров: малеимид для модификации цистеина или восстановленных дисульфидных мостиков (соединение а), N-гидроксисукцинимидный эфир (NHS) для модификации ε-аминогрупп лизина (соединение б), производные пиридинкарбальдегида для модификации N-концевой аминогруппы (соединение с), гидразид для модификации окисленного периодатом углеводного фрагмента гликопротеинов и т. д. На второй стадии модификация проводится азидным производным ПЭГ при помощи высокоэффективной биоортогональной реакции циклоприсоединения азидов к алкинам (клик-химия), что снижает расход реагентов в 5–10 раз (рис. 1).

В нашей работе представлен синтез азидсодержащих реагентов-разветвителей, позволяющих реализовать вышеописанную двухстадийную стратегию пегелирования белковых препаратов с помощью клик-реакций. В зависимости от природы алкиновой функции, введенной в белок, модификация может быть проведена как в условиях медного катализа, так и в некаталитических условиях. Количество введенных трис-ПЭГ модификаций может контролироваться соотношением реагентов в случае неспецифической модификации по остаткам лизина, что исследовалось

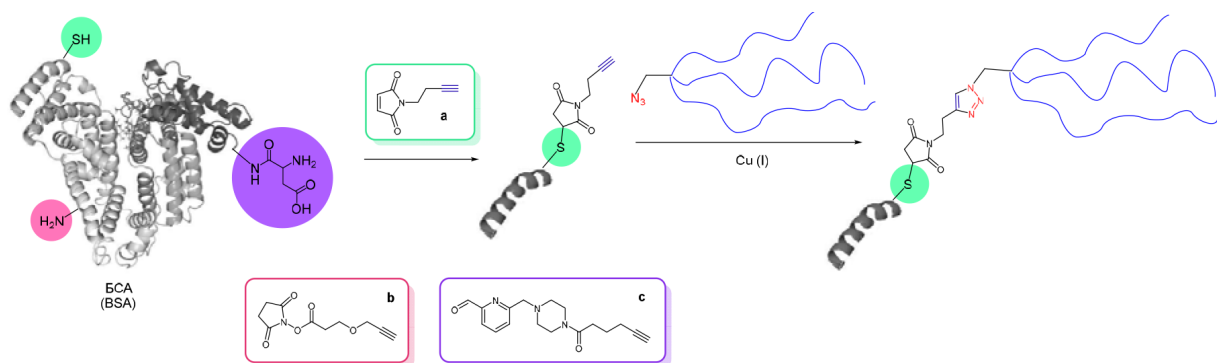


Рис. 1. Схема двухстадийной модификации белков при помощи реакции азид-алкинового циклоприсоединения

Fig. 1. Two-step CuAAC protein modification

в данной работе. С другой стороны, такие реагенты представляются удобными для стехиометрического пегилирования в случае, если алкиновые функции сайт-специфически встроены в белок или введены в рекомбинантный белок в составе неприродных аминокислот [19, 20].

Для пегилирования белков, как правило, используют монометокси-производные ПЭГ [13, 21] для снижения вероятности вступления в реакцию свободной гидроксильной группы *in vivo*, а также из-за незначительной метаболической токсичности и простоты активации этих производных [22].

Результаты и их обсуждение. Реагент-разветвитель на основе *трис*-гидроксиметиламинометана **4** был получен ацилированием амина **1** NHS-эфиром азидомаасляной кислоты (рис. 2). После снятия защитных групп три свободные карбоксильные группы использовались для связывания с аминопроизводными монометокси-ПЭГ. Использование (3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорида (EDC·HCl) в качестве конденсирующего агента и 1-гидроксибензотриазола (HOBT) в качестве нуклеофильной добавки позволило получить *трис*-ПЭГ азид с достаточно высоким выходом (80 %).

Для принципиальной проверки предлагаемого подхода мы провели ацилирование ε-аминогрупп лизина бычьего сывороточного альбумина (БСА) NHS-эфиром пропинилоксипропионой кислоты (рис. 3: соединение **b**). В реакции использовался 50-кратный избыток модифицирующего реагента для достижения высокого удельного содержания алкиновых групп на молекулу белка, что позволило в дальнейшем варьировать степень введения *трис*-ПЭГ-модификаций. Реакцию ацилирования вели в 0,2 М гидрокарбонатном буфере с pH 8,4 при +4 °С. Низкомолекулярные примеси отделяли при помощи гель-проникающей хроматографии с одновременной заменой буфера на ТЕАА, более подходящий для проведения клик-реакции. Количество полученных модификаций, определенное масс-спектрометрически, составило 37 алкиновых групп на молекулу белка. Модифицированный белок вводили в клик-реакцию с различными избытками (1,5, 5, 10 и 20 эквивалентов) *трис*-ПЭГ-азид (рис. 3: соединение **4**). Реакцию вели при комнатной температуре 24 ч. Полученный конъюгат выделяли гель-проникающей хроматографией; степень конъюгирования оценивали масс-спектрометрически (таблица).

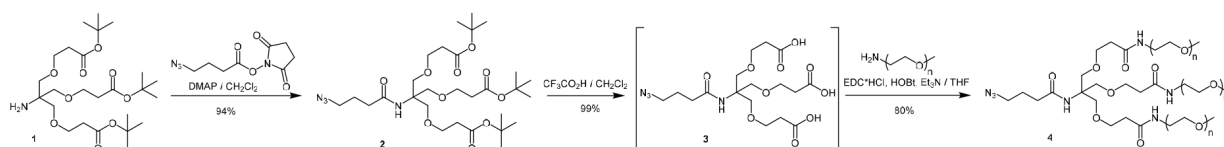


Рис. 2. Схема синтеза азидного пегилирующего реагента **4**

Fig. 2. Synthesis of PEG-azide **4**

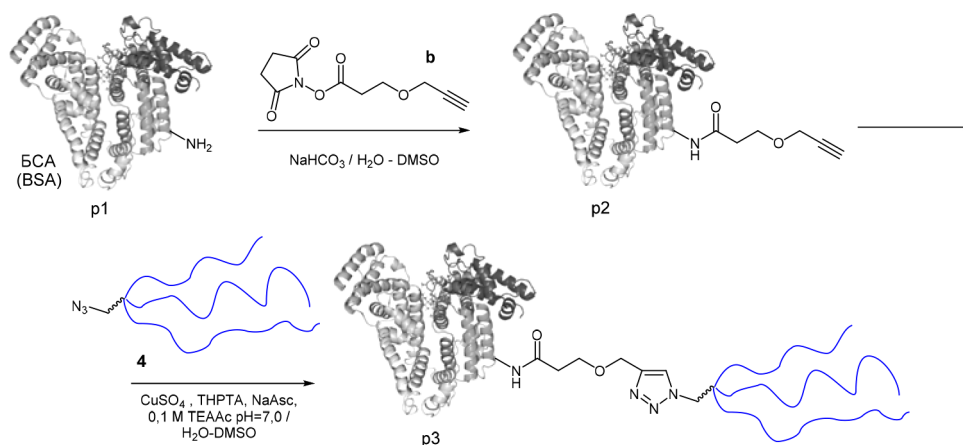


Рис. 3. Схема двухстадийной модификации БСА

Fig. 3. Two-step BSA protein modification

Последовательная модификация БСА алкиновыми группами и трис-ПЭГ азидом

Serial modification of BSA protein with alkyne groups and tris-PEG azide

Количество эквивалентов алкина	Количество эквивалентов трис-ПЭГ азиды	M+	ΔM+	Расчетное число модификаций (выход реакции)
0 (нативный белок)	–	66463	–	–
50	0	70882	4419	37
	1,5	72596	6133	1,26(84 %)
	5	77459	10996	4,65(93 %)
	10	82360	15897	8,12(81 %)
	20	82219	15756	8,06(40 %)

По результатам MALDI масс-спектрометрии установлено максимальное число трис-ПЭГ модификаций на одну молекулу белка, равное 8.

Заклучение. Разработан метод синтеза пегилирующих азидных реагентов разветвленной структуры на основе трис-гидрокси-метиламинометана. Данный подход может быть использован для получения пегилирующих реагентов заданной молекулярной массы с использованием более доступных низкомолекулярных аминокислотных производных ПЭГ. С использованием разветвляющих реагентов разработана методика двухстадийного пегилирования белков с введением в белок алкиновой функции с помощью низкомолекулярных реагентов и последующей клик-реакцией с азидным производным разветвленного ПЭГ, которая позволяет проводить селективную модификацию белков с высоким выходом и низким расходом пегилирующих реагентов.

Материалы и методы

Получение ди-трет-бутил 3,3'-((2-(4-азидобутанамидо)-2-((3-(трет-бутоксид)-3-оксопропони)метил)пропан-1,3-диил)бис(окси)дипропионата (2). К раствору амина **1** (1 г, 1,98 ммоль) в абсолютном ДХМ (10 мл) при перемешивании добавили ДМАП (300 мг, 2,46 ммоль) и NHS-эфир азидомасляной кислоты (556 мг, 2,46 ммоль). Реакционную смесь перемешивали ночь при комнатной температуре, затем разбавили вдвое ДХМ и промыли 10 %-ным раствором лимонной кислоты, насыщенным раствором соды (2×10 мл), насыщенным раствором NaCl (10 мл). Органическую вытяжку сушили над сульфатом натрия и после фильтрования и упаривания получили окрашенную смолу, которую хроматографировали на силикагеле (100 % ДХМ-(2 % Me₂CO)-20 % Me₂CO/ДХМ). Получили соединение **2** в виде бесцветной смолы (1,145 г, 94 %).

R_f 0,75 (гексан-этилацетат 1:1 об./об.); ¹H ЯМР (500 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 6,16 (s, 1H), 3,64–3,57 (m, 12H), 3,30 (t, J = 6,8 Гц, 2H), 2,39 (t, J = 6,1 Гц, 6H), 2,21–2,16 (m, 2H), 1,83–1,73 (m, 2H), 1,43 (s, 27H).

¹³C ЯМР (126 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 172,67, 171,82, 80,92, 69,76, 67,95, 60,67, 51,47, 36,87, 34,18, 28,30, 25,63.

Получение соединения (4). Соединение **2** растворили в 15 мл 20 %-ного раствора трифторуксусной кислоты в ДХМ и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем растворители упарили при пониженном давлении. Полученную смолу соупаривали с толуолом (3×20 мл). Соединение **3** далее использовали без дополнительной очистки.

К раствору трикислоты **3** в ТГФ (10 мл) при перемешивании добавили EDC-HCl (141 мг, 0,73 ммоль), НОВт (99 мг, 0,73 ммоль) и Et₃N (103 мкл, 0,73 ммоль). Затем в реакционную смесь внесли раствор ПЭГ-амина (250 мг, 0,73 ммоль) в ТГФ (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение суток. После упаривания растворителей получили окрашенную смолу, которую хроматографировали на силикагеле (100 % ДХМ-(1 % MeOH)-10 % MeOH/ДХМ). Получили соединение **4** в виде бесцветной смолы (236 мг, 75 %).

R_f 0,7 (метанол-дихлорметан 1:9 об./об.); ¹H NMR (500 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 6,89–6,81 (m, 3H), 6,52 (s, 1H), 3,65–3,60 (m, 12H), 3,58–3,51 (m, 70H), 3,50–3,44 (m, 14H), 3,33–3,30 (m, 8H), 3,29 (s, 9H), 2,34 (t, J = 5,9 Гц, 6H), 2,21 (t, J = 7,3 Гц, 2H), 1,82–1,74 (m, 2H).

¹³C ЯМР (126 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 172,99, 171,98, 72,54, 71,09 (9C), 71,04, 70,92, 70,91, 70,31, 69,81, 68,31, 60,72, 58,84, 51,53, 46,87, 39,86, 37,07, 34,10, 25,68.

Получение конъюгата р2. К раствору 30 мг (0,45 мкмоль) белка р1 в 900 мкл 0,2 М гидрокарбонатного буфера с рН 8,4 при +4 °С при перемешивании добавили NHS-эфир пропилилокси-пропионовой кислоты в (5,1 мг, 22,6 мкмоль) в 100 мкл DMSO. Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч, после чего хроматографировали на Сефадексе G-25, элюируя 50 мМ ТЕАА буфером с рН 7,2. Концентрацию белка р2 в растворе определяли спектрофотометрически (28,5 мг, 95 %).

Получение конъюгата р3. К серии растворов белка р2 в 50 мкл (1 мг, 15 нмоль) добавляли различное количество *трис*-ПЭГ-азида 4 (32/106/212/423 мкг, 22,5/75/150/ 300 нмоль) в 50 мкл ДМСО, смесь из 10 мкл 10 мМ CuSO₄, 11 мкл 10 мМ ТНРТА и 20 мкл 10 мМ аскорбата натрия, 50 мкл, удаляли из реакционной смеси кислород током аргона и перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре, после чего хроматографировали на Сефадексе G-25, элюируя 50 мМ ТЕАА буфером с рН 7,2. Получили серию соединения р3 в виде растворов.

Список использованных источников

1. Nucci, M. L. The therapeutic value of poly(ethylene glycol)-modified proteins / M. L. Nucci, R. Shorr, A. Abuchowski // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 1991. – Vol. 6, № 2. – P. 133–151. DOI:10.1016/0169-409X(91)90037-D
2. Harris, J. M. Effect of pegylation on pharmaceuticals / J. M. Harris, R. B. Chess // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2003. – Vol. 2, № 3. – P. 214–221. DOI: 10.1038/nrd1033
3. Swierczewska, M. What is the future of PEGylated therapies? / M. Swierczewska, K. C. Lee, S. Lee // *Expert Opin. Emerg. Drugs.* – 2015. – Vol. 20, № 4. – P. 531–536. DOI: 10.1517/14728214.2015.1113254
4. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. / P. L. Turecek [et al.] // *J. Pharm. Sci.* – 2016. – Vol. 105, № 2. – P. 460–75. DOI:10.1016/j.xphs.2015.11.015
5. Jevševar, S. PEGylation of therapeutic proteins / S. Jevševar, M. Kunstelj, V. G. Porekar // *Biotechnol. J.* – 2010. – Vol. 5, № 1. – P. 113–128. DOI:10.1002/biot.200900218
6. A branched monomethoxypoly(ethylene glycol) for protein modification. / C. Monfardini [et al.] // *Bioconjug. Chem.* – Vol. 6, № 1. – P. 62–9. DOI: 10.1021/bc00031a006
7. Therapeutic proteins: a comparison of chemical and biological properties of uricase conjugated to linear or branched poly(ethylene glycol) and poly(N-acryloylmorpholine) / O. Schiavon [et al.] // *Il Farmaco.* – 2000. – Vol. 55, № 4. – P. 264–269. DOI: 10.1016/S0014-827X(00)00031-8
8. PEG-Ara-C conjugates for controlled release. / O. Schiavon [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 39, № 2. – P. 123–33. DOI:10.1016/j.ejmech.2003.10.005
9. PEG-metronidazole conjugates: synthesis, in vitro and in vivo properties / C. Bersani [et al.] // *Il Farm.* – 2005. – Vol. 60, № 9. – P. 783–788. DOI:10.1016/j.farmac.2005.04.015
10. Comparison of bioactivities of monopegylated rhG-CSF with branched and linear mPEG / X.-Q. Li [et al.] // *Process Biochem.* – 2007. – Vol. 42, № 12. – P. 1625–1631. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.09.005
11. Lactoferrin Conjugated with 40-kDa Branched Poly(ethylene Glycol) Has an Improved Circulating Half-Life / Y. Nojima [et al.] // *Pharm. Res.* – 2009. – Vol. 26, № 9. – P. 2125–2132. DOI: 10.1007/s11095-009-9925-z
12. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs / P. L. Turecek [et al.] // *J. Pharm. Sci.* – 2016. – Vol. 105, № 2. – P. 460–475. DOI: 10.1016/j.xphs.2015.11.015
13. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. / A. Abuchowski [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1977. – Vol. 252, № 11. – P. 3582–3586.
14. Reduction of immunoreactivity of bovine serum albumin conjugated with polyethylene glycol(PEG) in relation to its esterase activity / A. Matsushima [et al.] // *Biochem. Int.* – 1992. – Vol. 26, № 3. – P. 485–490.
15. Yamasaki, N. Novel polyethylene glycol derivatives for modification of proteins / N. Yamasaki, A. Matsuo, H. Isobe // *Agric. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 52, № 8. – P. 2125–2127. DOI: 10.1271/bbb1961.52.2125
16. Veronese, F.M. Branched and Linear Poly(Ethylene Glycol): Influence of the Polymer Structure on Enzymological, Pharmacokinetic, and Immunological Properties of Protein Conjugates / F. M. Veronese, P. Caliceti, O. Schiavon // *J. Bioact. Compat. Polym.* – 1997. – Vol. 12, № 3. – P. 196–207. DOI: 10.1177/088391159701200303
17. Veronese, F.M. PEGylation, successful approach to drug delivery / F. M. Veronese, G. Pasut // *Drug Discov. Today.* – 2005. – Vol. 10, № 21. – P. 1451–1458. DOI:10.1016/S1359-6446(05)03575-0
18. Site-specific PEGylation of therapeutic proteins via optimization of both accessible reactive amino acid residues and PEG derivatives. / C. Zhang [et al.] // *BioDrugs.* – 2012. – Vol. 26, № 4. – P. 209–215. DOI: 10.2165/11633350-000000000-00000
19. Neumann, H. Rewiring translation – Genetic code expansion and its applications / H. Neumann // *FEBS Lett.* – 2012. – Vol. 586, № 15. – P. 2057–2064. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.02.002
20. Hendrickson, T. L. Incorporation of Nonnatural Amino Acids Into Proteins / T. L. Hendrickson, V. de Crécy-Lagard, P. Schimmel // *Annu. Rev. Biochem.* – 2004. – Vol. 73, № 1. – P. 147–176. DOI:10.1146/annurev.biochem.73.012803.092429
21. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol / A. Abuchowski [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1977. – Vol. 252, № 11. – P. 3578–3581.
22. Roberts, M. J. Chemistry for peptide and protein PEGylation. / M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2002. – Vol. 54, № 4. – P. 459–476. DOI: 10.1016/S0169-409X(02)00022-4

References

1. Nucci M. L., Shorr R., Abuchowski A. The therapeutic value of poly(ethylene glycol)-modified proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1991, vol. 6, no. 2, pp. 133–151. DOI: 10.1016/0169-409X(91)90037-D
2. Harris J. M., Chess R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, vol. 2, no. 3, pp. 214–221. DOI: 10.1038/nrd1033
3. Swierczewska M., Lee K.C., Lee S. What is the future of PEGylated therapies? *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 2015, vol. 20, no. 4, pp. 531–536. DOI: 10.1517/14728214.2015.1113254
4. Turecek P.L., Bossard M.J., Schoetens F., Ivens I.A. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, vol. 105, no. 2, pp. 460–475. DOI: 10.1016/j.xphs.2015.11.015
5. Jevševar S., Kunstelj M., Porekar V. G. PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnology Journal*, 2010, vol. 5, no. 1, pp. 113–128. DOI: 10.1002/biot.200900218
6. Monfardini C., Schiavon O., Caliceti P., Morpurgo M., Harris J. M., Veronese, F. M. A branched monomethoxy-poly(ethylene glycol) for protein modification. *Bioconjugate Chemistry*, 1995, vol. 6, no. 1, pp. 62–69. DOI: 10.1021/bc00031a006
7. Schiavon O., Caliceti P., Ferruti P., Veronese F. M. Therapeutic proteins: a comparison of chemical and biological properties of uricase conjugated to linear or branched poly(ethylene glycol) and poly(N-acryloylmorpholine). *Il Farmaco*, 2000, vol. 55, no. 4, pp. 264–269. DOI: 10.1016/s0014-827x(00)00031-8
8. Schiavon O., Pasut G., Moro S., Orsolini P., Guiotto A., Veronese F. M. PEG-Ara-C conjugates for controlled release. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, vol. 39, no. 1, pp. 123–133. DOI: 10.1016/j.ejmech.2003.10.005
9. Bersani C., Berna M., Pasut G., Veronese F. M. PEG-metronidazole conjugates: synthesis, in vitro and in vivo properties. *Il Farmaco*, 2005, vol. 60, no. 9, pp. 783–788. DOI: 10.1016/j.farmac.2005.04.015
10. Li X.-Q., Lei J.-D., Su Z.-G., Ma G.-H. Comparison of bioactivities of monopegylated rhG-CSF with branched and linear mPEG. *Process Biochemistry*, 2007, vol. 42, no. 12, pp. 1625–1631. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.09.005
11. Nojima Y., Suzuki Y., Yoshida K., Abe F., Shiga T., Takeuchi T., Sugiyama A., Shimizu H., Sato A. Lactoferrin Conjugated with 40-kDa Branched Poly(ethylene Glycol) Has an Improved Circulating Half-Life. *Pharmaceutical Research*, 2009, vol. 26, no. 9, pp. 2125–2132. DOI: 10.1007/s11095-009-9925-z
12. Turecek P. L., Bossard M. J., Schoetens F., Ivens I. A. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, vol. 105, no. 2, pp. 460–475. DOI: 10.1016/j.xphs.2015.11.015
13. Abuchowski A., McCoy J. R., Palczuk N. C., van Es T., Davis F. F. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 1977, vol. 252, no. 11, pp. 3582–3586.
14. Matsushima A., Sasaki H., Kodera Y., Inada Y. Reduction of immunoreactivity of bovine serum albumin conjugated with polyethylene glycol(PEG) in relation to its esterase activity. *Biochemistry International*, 1992, vol. 26, no. 3, pp. 485–490.
15. Yamasaki N., Matsuo A., Isobe H. Novel polyethylene glycol derivatives for modification of proteins. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1988, vol. 52, no. 8, pp. 2125–2127. DOI: 10.1271/bbb1961.52.2125
16. Veronese F. M., Caliceti P., Schiavon O. Branched and Linear Poly(Ethylene Glycol): Influence of the Polymer Structure on Enzymological, Pharmacokinetic, and Immunological Properties of Protein Conjugates. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 1997, vol. 12, no. 3, pp. 196–207. DOI: 10.1177/088391159701200303
17. Veronese F. M., Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today*, 2005, vol. 10, no. 21, pp. 1451–1458. DOI: 10.1016/S1359-6446(05)03575-0
18. Zhang C., Yang X., Yuan Y., Pu J., Liao F. Site-specific PEGylation of therapeutic proteins via optimization of both accessible reactive amino acid residues and PEG derivatives. *BioDrugs*, 2012, vol. 26, no. 4, pp. 209–215. DOI: 10.2165/11633350-000000000-00000
19. Neumann H. Rewiring translation - Genetic code expansion and its applications. *FEBS Letters*, 2012, vol. 586, no. 15, pp. 2057–2064. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.02.002
20. Hendrickson T.L., Crécy-Lagard V. de Schimmel P. Incorporation of Nonnatural Amino Acids Into Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 2004, vol. 73, no. 1, pp. 147–176. DOI: 10.1146/annurev.biochem.73.012803.092429
21. Abuchowski A., van Es T., Palczuk N. C., Davis F. F. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *Journal of Biological Chemistry*, 1977, vol. 252, no. 11, pp. 3578–3581.
22. Roberts M. J., Bentley M. D., Harris J. M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, vol. 54, pp. 459–476. DOI: 10.1016/s0169-409x(02)00022-4

Информация об авторах

Мартыненко-Макаев Юрий Владимирович – науч. сотрудник, Институт физико-органической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ygmart@gmail.com

Круглик Александр Сергеевич – мл. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.kruhlik@gmail.com

Шарко Ольга Леонидовна – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: olsharko@gmail.com

Шманай Вадим Владимирович – канд. хим. наук, зав. лаб., Институт физико-органической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by

Information about the authors

Yury V. Martynenko-Makaev – Researcher, Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (13, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yrmart@gmail.com

Aliaksandr S. Kruhlik – Junior researcher, Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (13, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.kruhlik@gmail.com

Olga L. Sharko – Ph. D. (Chemistry), Senior researcher, Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (13, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olsharko@gmail.com

Vadim V. Shmanai – Ph. D. (Chemistry), Head of the Laboratory, Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (13, Sarganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by