

Fraunhofer Gesellschaft  
Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik,  
Abteilung Gentechnologie in Hannover

**Proteinmodifikation**  
**zur Verbesserung pharmakologischer Eigenschaften**  
**am Beispiel der PEGylierung der Interferone- $\alpha$  und - $\beta$**

Von dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung der Grades Doktor der Naturwissenschaften

**DOCTOR RERUM NATURALIUM**

**Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation

von Dipl.-Biochem. Florian Battermann  
geb. 08.06.1974 in Hannover

**2003**

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Florian Battermann, geboren am 08.06.1974 in Hannover, an Eides statt, dass ich die im Fachbereich Chemie an der Universität Hannover eingereichte Dissertation mit dem Titel:

**Proteinmodifikation  
zur Verbesserung pharmakologischer Eigenschaften  
am Beispiel der PEGylierung der Interferone- $\alpha$  und - $\beta$**

am Fraunhofer Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik (IGB) in der Abteilung Gentechnologie in Hannover und an der TiHo Hannover, Institut für angewandte Molekularbiologie (in Gründung) unter der Anleitung von Prof. Dr. B. Otto ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner anderen in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung der Promotion eingereicht, noch wurde diese oder andere Arbeiten als Dissertation vorgelegt.

Hannover, den 08.10.2003

Die vorliegende Arbeit in der Zeit von Juni 2000 bis Oktober 2003 in der Fraunhofer Gesellschaft am Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik in der Abteilung Gentechnologie sowie am Institut (in Gründung) für angewandte Molekularbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Otto angefertigt.

Teile dieser Arbeit sind zum Patent unter dem Titel PEGylierung von hu.Interferon Gamma (IFN-g) beim deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Referent: Prof. Dr. Bernd Otto

Koreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Promotion: 14.11.2003

Datum der Veröffentlichung: November 2003

Every so often, you have to unlearn what you thought you already knew,  
and replace it by something more subtle.

This process is what science is all about, and it never stops.

Terry Pratchett – *The Science of Discworld*

# Inhaltsverzeichnis

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....	I
INHALTSVERZEICHNIS .....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
ÜBERBLICK .....	X
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 THEORIE .....</b>	<b>2</b>
2.1 INTERFERONE .....	2
2.1.1 Historischer Überblick: .....	2
2.1.2 Interferon- $\alpha$ .....	3
2.1.3 Interferon- $\beta$ .....	4
2.1.3.1 Multiple Sklerose (MS) und der Einfluß von IFN- $\beta$ auf den Krankheitsverlauf .....	5
2.1.3.2 Varianten des IFN- $\beta$ .....	7
2.1.4 Interferon- $\gamma$ .....	9
2.1.4.1 Varianten des IFN- $\gamma$ .....	10
2.1.5 Interferon- $\delta$ .....	11
2.1.6 Interferon- $\epsilon$ .....	11
2.2 MODIFIKATION VON PROTEINEN .....	11
2.2.1 Glycosylierung .....	12
2.2.2 PEGylierung .....	13
2.2.2.1 PEG .....	14
2.2.2.2 Historie der PEGylierung .....	15
2.2.2.3 Amin-PEGylierung .....	17
2.2.2.4 Thiol-PEGylierung .....	18
2.2.2.5 Histidin-PEGylierung .....	19
2.2.2.6 PEGylierung an Glycanstrukturen .....	20
2.2.2.7 Reversible PEGylierung .....	20
2.2.2.8 Alternativen zum PEG .....	21
2.2.3 Crosslinking und Fusionsproteine .....	21
2.2.4 Verpackung von Proteinen .....	22
2.3 EXPRESSIONSYSTEME FÜR REKOMBINANTE PROTEINE .....	22
2.3.1 Bakterien .....	22
2.3.2 Zellkultur .....	23
2.3.3 Alternative Expressionssysteme .....	23
2.4 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT .....	24
<b>3 MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>

3.1	MATERIALIEN .....	25
3.1.1	EDV.....	25
3.1.2	Geräte .....	25
3.1.3	Chemikalien.....	26
3.1.4	Antikörper.....	27
3.1.5	IFN-Standards.....	27
3.1.6	Häufig verwendete Puffer .....	27
3.1.7	Chromatographie-Materialien .....	28
3.1.8	Nährmedien .....	28
3.1.8.1	Bakterienkulturmedium.....	28
3.1.8.2	Zellkulturmedium .....	29
3.1.9	Verwendete Organismen.....	29
3.1.9.1	Bakterienstämme .....	29
3.1.9.2	Zellkulturzelllinien .....	30
3.1.10	Varianten des IFN- $\gamma$ .....	30
3.1.11	Varianten des IFN- $\beta$ .....	30
3.2	METHODEN .....	31
3.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	31
3.2.1.1	Mini-Präparation nach Qiagen .....	31
3.2.1.2	Midi-Präparation nach Qiagen .....	32
3.2.1.3	PCR .....	32
3.2.1.3.1	Capture-PCR zur Umklonierung von IFN- $\gamma$ .....	32
3.2.1.3.2	Sequenzier-PCR.....	33
3.2.1.3.3	PCR zur Mutation von IFN- $\gamma$ .....	34
3.2.1.4	Restriktionsverdau.....	35
3.2.1.4.1	DpnI-Verdau .....	35
3.2.1.4.2	Analytischer Restriktionsverdau.....	36
3.2.1.4.3	Präparativer Restriktionsverdau .....	37
3.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	37
3.2.1.6	Gelextraktion nach Qiagen.....	38
3.2.1.7	Ligation .....	39
3.2.1.7.1	Ringschluss .....	39
3.2.1.7.2	Vektor-Insert-Ligation.....	39
3.2.1.8	Darstellung kompetenter Zellen.....	39
3.2.1.8.1	JM 105 und JM 109 .....	39
3.2.1.8.2	MM294.....	40
3.2.1.9	Transformation.....	40
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	41
3.2.2.1	Expression und Aufarbeitung von IFN- $\gamma$ aus Bakterienzellen.....	41
3.2.2.1.1	Expression von IFN- $\gamma$ in inclusion bodies .....	41
3.2.2.1.2	Aufarbeitung von IFN- $\gamma$ aus inclusion bodies.....	41
3.2.2.1.3	Chromatographische Aufreinigung von IFN- $\gamma$ aus inclusion bodies.....	42
3.2.2.2	Aufarbeitung von IFN- $\gamma$ aus CHO-Zellen.....	43
3.2.2.2.1	Chromatographische Aufarbeitung von IFN- $\gamma$ aus CHO-Zellkulturüberstand.....	43

3.2.2.3	Expression und Aufarbeitung verschiedener IFN- $\beta$ -Varianten.....	45
3.2.2.3.1	Expression von IFN- $\beta$ .....	45
3.2.2.3.2	IFN- $\beta$ -Aufarbeitung .....	45
3.2.2.4	PEGylierung von Proteinen.....	46
3.2.2.4.1	Thiol-PEGylierung .....	46
3.2.2.4.2	Amin-PEGylierung.....	47
3.2.2.5	SDS-PAGE.....	47
3.2.2.5.1	Trenngele anderer Dichten .....	49
3.2.2.6	Coomassie-Färbung .....	50
3.2.2.7	Silberfärbung.....	50
3.2.2.8	Western blot und Immunfärbung .....	51
3.2.2.9	Proteinbestimmung nach Bradford .....	52
3.2.2.10	Proteinbestimmung über UV-Extinktion.....	52
3.2.2.11	Spot-Blot.....	52
3.2.2.12	ELISA.....	53
3.2.3	<i>Methoden der Zellkultur</i> .....	54
3.2.3.1	Antiviraler Assay .....	54
3.2.3.2	Adaption der CHO-Zellklone 21A8(0,1)10 III und 17A1(10)16 an serumfreie Bedingungen.....	55
3.2.3.3	Umstellung der CHO-Zellen auf Natriumcholat als Lösungsvermittler für IFN- $\beta$ .....	55
3.2.3.4	Gewinnung der Zellkulturüberstände .....	56
3.2.3.5	Pflege von Caco-2-Zellen.....	56
3.2.3.6	Modell der Darmpassage von Proteinen durch Caco-2-Zellen.....	57
3.2.4	<i>Biophysikalische Methoden</i> .....	57
3.2.4.1	Stabilität von PEGylierten Proteinen .....	57
3.2.4.1.1	Thermostabilität von Proteinen .....	57
3.2.4.1.2	Stabilität in Anwesenheit von Proteasen .....	58
3.2.4.1.3	Stabilität in saurem und basischem Milieu .....	58
3.2.5	<i>Tierversuche</i> .....	59
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>60</b>
4.1	UMSTELLUNG DER CHO-ZELLINIEN AUF SUSPENSIONSKULTUREN .....	60
4.2	MEDIENUNTERSUCHUNGEN FÜR CHO-EXPRESSIONSKULTUREN.....	62
4.2.1	<i>Medienalternativen zum CHO-S-SFM II in der Expression von IFN-<math>\beta</math></i> .....	62
4.2.2	<i>Wachstumsfaktoren für die IFN-<math>\beta</math>-produzierenden CHO-Zellen</i> .....	64
4.2.3	<i>Ersatz von HSA</i> .....	65
4.3	ALTERNATIVE KULTURSYSTEME .....	67
4.4	EXPRESSION UND AUFARBEITUNG VON IFN- $\beta$ .....	70
4.4.1	<i>Expression in Bakterienzellen und Aufarbeitung von IFN-<math>\beta</math></i> .....	71
4.4.1.1	Alternative Lösungsvermittler für IFN- $\beta$ aus Bakterienzellen .....	71
4.4.2	<i>Expression in CHO-Zellen und Aufarbeitung von IFN-<math>\beta</math></i> .....	72
4.5	PEGYLIERUNG VON IFN- $\beta$ .....	72
4.5.1	<i>PEGylierung am IFN-<math>\beta</math> aus inclusion bodies</i> .....	72
4.5.2	<i>PEGylierung am IFN-<math>\beta</math> aus CHO-Zellen</i> .....	74
4.6	EXPRESSION UND AUFREINIGUNG DER IFN- $\beta$ -VARIANTEN.....	77

4.6.1	<i>Vergleich von Expression in JM 105 und MM 294</i> .....	77
4.6.2	<i>Aufreinigung der IFN-<math>\beta</math>Varianten</i> .....	78
4.7	PEGYLIERUNG VON IFN- $\beta$ .....	79
4.7.1	<i>Darstellung der Variante 7/69 S99C C-10 Q133L des IFN-<math>\beta</math></i> .....	83
4.8	STABILITÄT VON PEGYLIERTEM IFN- $\beta$ .....	85
4.9	TIERVERSUCH .....	86
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>93</b>
5.1	VERGLEICH EINER ADHÄRENTEN ZELLKULTUR MIT EINER SUSPENSIONSZELLKULTUR.....	93
5.2	ERSATZ VON HSA IM UMGANG MIT RHUIFN- $\beta$ .....	94
5.3	OPTIMIERUNG DER PEGYLIERUNGSREAKTIONEN .....	95
5.3.1	<i>Einfluss des pH-Wertes auf die PEGylierungsreaktion</i> .....	96
5.3.2	<i>Einfluss von Lösungsvermittlern auf die PEGylierungsreaktion</i> .....	98
5.4	VERGLEICH VON UNPEGYLIERTEM IFN- $\beta$ MIT PEGYLIERTEM IFN- $\beta$ .....	98
5.4.1	<i>Wahl der PEGylierungsposition</i> .....	98
5.4.2	<i>In vitro-Vergleich</i> .....	99
5.4.3	<i>Bioverfügbarkeit von PEGyliertem und unPEGyliertem IFN-<math>\beta</math></i> .....	100
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>103</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>105</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>107</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>114</b>
	<b>CIRCULUM VITAE.....</b>	<b>115</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<i>abs</i>	absolut
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AVA	Antiviraler Assay
AUC	<i>Area under the curve</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyolphosphat
bp	Basenpaar
<i>bw</i>	<i>backward</i>
$c_{\max}$	Maximalkonzentration
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EAE	<i>Experimental allergic encephalomyelitis</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMC	muriner Encephalomyocarditisvirus
FCS	fötales Kälberserum
<i>fw</i>	<i>forward</i>
HSA	humanes Serumalbumin
IFN	Interferon
kDa	Kilodalton
LMW	<i>low molecular weight</i>
MAL	Maleinimid
mPEG	Monomethoxypoly(ethylenglycol)

MS	Multiple Sklerose
NaAc	Natriumacetat
NBCS	New born calf serum
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NK	<i>natural killer</i>
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEG	Poly(ethylenglycol)
PVP	Polyvinylpyrolidon
rhu	<i>recombinant human</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
SPA	Succinimidylpropionat
TCA	<i>Trichloracetat</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
$t_{\max}$	Zeit zum Erreichen der Maximalkonzentration
ün	über Nacht
UV	Ultraviolett
<i>wt</i>	<i>wild type</i>
YT	<i>yeast tryptone</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Abstract

I started my work with interferon- $\beta$ -producing CHO-cells. These cells called 17A1(10)16 (IFN- $\beta$  wt) and 21A8(0,1)10 III (IFN- $\beta$  9x) were adapted to growth in suspension so the handling of the cells was easier and the expression ratio was higher due to the higher cell density of suspension cells.

The second step in the work with IFN- $\beta$  was the exchange of HSA by other solubilizers in the cell culture, preparation and formulation. Of all tested substances only sodium cholate did not interfere with the CHO-cells. While no positive effect on the expression of IFN- $\beta$  could be shown, in the preparation of IFN- $\beta$  on the other hand sodium cholate was able to stabilize IFN- $\beta$ .

Because of the work of Pepinski *et al.* PEGylation of IFN- $\beta$  derived from CHO and bacteria was tried. Different problems with the PEGylation reaction were found and partially eliminated.

Parallel to the work with interferon- $\beta$  different variants of IFN- $\beta$  were made, which were subsequently modified by PEGylation. Different PEG-length and different reaction mechanism were used. The modified variants and the unPEGylated IFN- $\beta$  were tested for heat stability and protease stability.

Animal trials with the modified IFN- $\beta$  were made to show the *in vivo* benefit of the PEGylation. PEGylated IFN- $\beta$  had a more than six times prolonged half-life in the blood of the test animals while the maximum activity in the blood was reduced to about one tenth of the unPEGylated IFN- $\beta$ . These data were depending on the kind of PEGylation mechanism used.

An IFN- $\beta$  modified at a cysteine residue (Cys 99) showed better pharmacologic data than an IFN- $\beta$  modified at one or more of twenty lysine residues.

**Keywords:** interferon- $\beta$ , interferon- $\beta$  PEGylation, animal trials

## Überblick

Zunächst wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit mit Interferon- $\beta$ -exprimierenden CHO-Zellen gearbeitet. Diese Zellen der Zelllinien 17A1(10)16 (IFN- $\beta$  wt) und 21A8(0,1)10 III (IFN- $\beta$  9x) wurden von adhärentem Wachstum in serumfreier Umgebung auf ein Wachstum in Suspension bei gleichen Wachstumsbedingungen umgestellt. Hieraus resultierte ein einfacherer Umgang mit den Zellen und eine höhere Expressionsleistung pro Medienvolumen, da Suspensionszellen in größerer Dichte kultiviert werden können als adhärente Zellen.

Ein weiterer wichtiger Schritt in der Arbeit mit IFN- $\beta$  war der Ersatz von humanem Serumalbumin in der Zellkultur, Aufarbeitung und Formulierung des IFN- $\beta$ . Aus einer Reihe von untersuchten Substanzen zeigte nur das Natriumcholat in der Zellkultur keinen negativen Einfluss auf die CHO-Zellen, jedoch konnte auch kein stabilisierender Effekt auf das IFN- $\beta$  an dieser Stelle festgestellt werden. Erst im Rahmen der Aufarbeitung von IFN- $\beta$  aus Zellkulturüberständen konnte gezeigt werden, dass Natriumcholat als Stabilisator von IFN- $\beta$  eingesetzt werden kann.

Angeregt durch die Arbeiten von Pepinski *et al.* wurden PEGylierungsversuche sowohl am IFN- $\beta$  aus CHO-Zellen als auch an unglycosyliertem bakteriellem Material vorgenommen. Hierbei wurden verschiedene Störfaktoren für PEGylierungsreaktionen erkannt und teilweise eliminiert.

Parallel zu den Arbeiten am IFN- $\beta$  wurden im Rahmen einer Studie Varianten des Interferon- $\beta$  erstellt, welche über verschiedene Mechanismen PEGylierbar sind. Von diesen Varianten wiederum wurden PEGylierte Modifikationen erstellt und zunächst auf ihre Thermostabilität und Proteasestabilität im Vergleich zum unPEGylierten IFN- $\beta$  untersucht.

Um eine mögliche verbesserte pharmakokinetische Stabilität *in vivo* zu überprüfen, wurden die einige der modifizierten Varianten im Tierversuch untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch die PEGylierung eine deutliche Erhöhung der pharmakologischen Stabilität des IFN- $\beta$  im Blut der Versuchstiere erzielt werden kann. Gleichzeitig jedoch betrug das Maximum des Serumspiegels an IFN- $\beta$  je nach Modifikationsform weniger als 1/10 des Maximums des unPEGylierten IFN- $\beta$ . Deutliche Vorteile zeigten hierbei die Thiol-PEGylierte Modifikationen gegenüber ihren Amin-PEGylierten Gegenstücken.

**Stichworte:** Interferon- $\beta$ , Interferon- $\beta$  PEGylierung, Tierversuch

## 1 Einleitung

In vielen Bereichen der Medizin spielen Proteine eine zentrale Rolle, ob als Ziel für eine Therapiemaßnahme oder gar als Therapeutikum selbst.

In der Gruppe der therapeutischen Proteine wiederum sind die Interferone von großem Interesse. Sowohl verschiedene IFN- $\alpha$  als auch das IFN- $\beta$  sind bereits im Einsatz am Patienten. Auch für das IFN- $\gamma$  sind interessante klinische Ansätze gefunden worden.

Problematisch gestalten sich hierbei einige Eigenschaften der Interferone. So ist Interferon- $\alpha$  sehr hydrophob und nur mit stabilisierenden Substanzen wie dem humanen Serumalbumin in Lösung zu halten, welche aufgrund ihrer menschlichen Herkunft als potentielle Gefährdung des Patienten gelten müssen. Humanes Serumalbumin, das aus humanem Plasma gewonnen wird, kann mit Erregern der Creutzfeld-Jacob-Krankheit versetzt sein, ist aber momentan der einzige brauchbare Stabilisator für Interferon- $\alpha$ . Nachdem nun bereits eine hydrophilere Variante des IFN- $\alpha$  durch Mutation von 9 Aminosäuren zur Verfügung stand, war der nächste Schritt, die Suche nach einer Möglichkeit, das IFN- $\alpha$  ohne HSA in Lösung zu halten. Dies kann sowohl über eine Modifikation am Protein als auch über eine Veränderung der Pufferzusammensetzung erfolgen.

Interferon- $\alpha$  hingegen ist wesentlich hydrophiler, aber durch den Mangel an strukturstabilisierenden Elementen wie Disulfidbrücken auch sehr instabil. Aus diesem Grund wurde bereits eine Mutante des IFN- $\alpha$  entwickelt, die über eine Disulfidbrücke eine höhere thermodynamische Stabilität als das natürliche IFN- $\alpha$  aufweist. Jedoch war auch hier die Notwendigkeit nach einer weiteren Verbesserung der Eigenschaften des IFN- $\alpha$  vorhanden, wobei die Modifikation der verbesserten Variante im Vordergrund stehen sollte.

Als Modifikationsansatz sowohl für das IFN- $\alpha$  als auch das IFN- $\beta$  bot sich hierzu die bereits erfolgreich am IFN- $\alpha$  genutzte PEGylierung an verschiedenen Positionen mit verschiedenen Polyethylenglycolkettenlängen an.

## 2 Theorie

### 2.1 Interferone

#### 2.1.1 Historischer Überblick:

Bei Arbeiten mit Zellen des Hühneramnioms fanden Isaacs und Lindemann einen Faktor, der eine virale Infektion verhinderte. Diesen Faktor bezeichneten sie als Interferon (von lat. *interfere* = eingreifen, unterbinden, dazwischengehen). Diese Bezeichnung ist bis heute namensgebend für eine ganze Gruppe von Proteinen.

Schon bald darauf konnte gezeigt werden, dass Interferone Proteine sind und die Inhibition der viralen Replikation durch Interferone ein allgemeingültiger Mechanismus ist, der bei allen Vertebraten gilt.

Die Hemmung der viralen Replikation erfolgt nicht direkt. Vielmehr verhindert eine Umstellung des zellulären Metabolismus die virale Replikation und das *docking* von neuen Viren.

Interferone wirken bis auf wenige Ausnahmen streng speziesspezifisch. So wirken humane Interferone ausschließlich auf humane Zellen. Die einzige bisher gefundene Ausnahme ist humanes IFN- $\beta$ , welches nach neueren Untersuchungen auch auf bovinen und porcinen Zellen bei hinreichend hohen Dosen wirkt.

1965 isolierten Wheelock *et al.* ein Protein aus Lymphozyten, welches ebenfalls antiviral wirkte, jedoch anders als alle bis dato gefundenen Interferone bei pH 2 instabil war. Für dieses neue Interferon wurden die Namen Immuninterferon und Interferon- $\beta$  geprägt.

Youngner und Salvin grenzten 1973 das IFN- $\beta$  von den anderen Interferonen ab, indem sie es als Typ II-Interferon klassifizierten.

Zu den menschlichen Interferonen gehören dreißig teilweise glycolysierte Proteine, die von allen menschlichen Zellen gebildet werden können (Dinarello 1987 und Galvani 1988).

Die Interferone werden in zwei Klassen eingeteilt.

Zum Einen gibt es die Typ I-Interferone, zu diesen gehören die Interferone- $\alpha$ , das Interferon- $\beta$  und die weniger verbreiteten Interferone- $\omega$  und  $\epsilon$ . Die Typ I-Interferone sind strukturell stark verwandt. Sie sind sehr pH-stabil (pH 2,0). Sie binden alle an den Typ I-Rezeptor (Branca und Baglioni, 1982), vermitteln aber unterschiedliche Wirkungen.

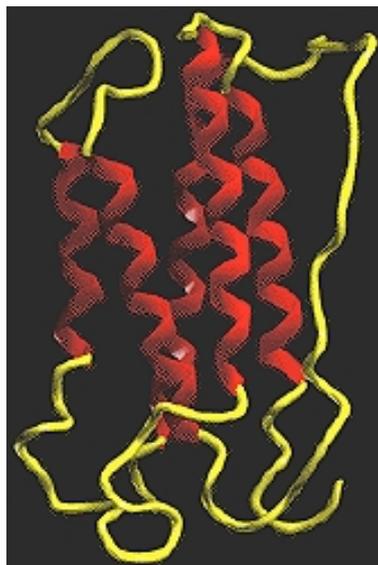
Zu den Typ II-Interferonen gehört ausschließlich das Interferon- $\gamma$ . Dieses unterscheidet sich strukturell sehr stark von den Typ I-Interferonen. Des Weiteren ist es das einzige Interferon, welches am Typ II-Rezeptor bindet.

Interferone sind sehr speziesspezifisch, d.h. humane Interferone sind in der Regel nur beim Menschen wirksam und nur sehr eingeschränkt bei Tieren. Die Speziesspezifität nimmt vom Interferon- $\alpha$  zu den Interferonen- $\beta$  ab.

### 2.1.2 Interferon- $\beta$

Die Familie der Interferone- $\beta$ , auch als Leukozyten-Interferon bekannt, besteht aus circa 25 Subtypen, die sich in der Kettenlänge (150-172 Aminosäuren) und in der Glycosylierung unterscheiden. Jedoch beträgt die Homologie innerhalb der Familie über 80 %.

Alle IFN- $\beta$  haben eine konservierte Region zwischen den Aminosäurepositionen 115 und 151. Die Hauptunterschiede treten am stark variablen Amino-Terminus und am bis zu 10 Aminosäuren verkürzten Carboxy-Terminus auf. Zwei Disulfidbrücken im IFN- $\beta$  (1/98 und 29/138) sind stabilitätsgebend, wobei die Erste entfallen kann, die Zweite jedoch für die biologische Aktivität essenziell ist. Als einzige IFN- $\beta$  tragen das IFN- $\beta$ 2b eine O-Glycosylation am Thr 106 und das IFN- $\beta$ 14c eine N-Glycosylierung am Asn-72.



**Abb. 1** Strukturmodell des rhuIFN- $\beta$

Die Gene für IFN- $\beta$  sind auf Chromosom 9p22 lokalisiert und enthalten keine Introns. Sie lassen sich in zwei Klassen einteilen, wobei die Klasse 1 die IFN- $\beta$  mit Kettenlängen zwischen 156 und 166 Aminosäuren kodiert, während die zweite Klasse die IFN- $\beta$  der Kettenlänge 176 Aminosäuren kodiert. Alle IFN- $\beta$ -Gene sind exprimierbar, jedoch werden unter normalen Bedingungen nur die Subtypen  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 4 expremiert.

IFN- $\beta$  wurde zunächst aus Leukozyten- bzw. B-Lymphozyten-Kulturen isoliert, was den Namen Leukozyteninterferon bedingte. Im Allgemeinen wirken IFN- $\beta$  antiviral und

antiproliferativ, sowie immunmodulatorisch, da sie die B-Zell-Proliferation hemmen und die Aktivierung der NK-Zellen fördern.

Interferon- $\alpha$ 2a und seine Modifikationen werden in der Hepatitis B-Therapie, nahezu allen Papillomavirus-erkrankungen, sowie bei einigen onkologischen Erkrankungen eingesetzt. Hier vor allem bei verschiedenen Leukämieformen.

Am IFN- $\alpha$  wurden teilweise Modifikationen (siehe auch 2.2.1.2 Historie der PEGylierung) durchgeführt, welche die Bioverfügbarkeit des Proteins deutlich steigern und somit das IFN- $\alpha$  zu einem wesentlich interessanteren Therapeutikum machen.

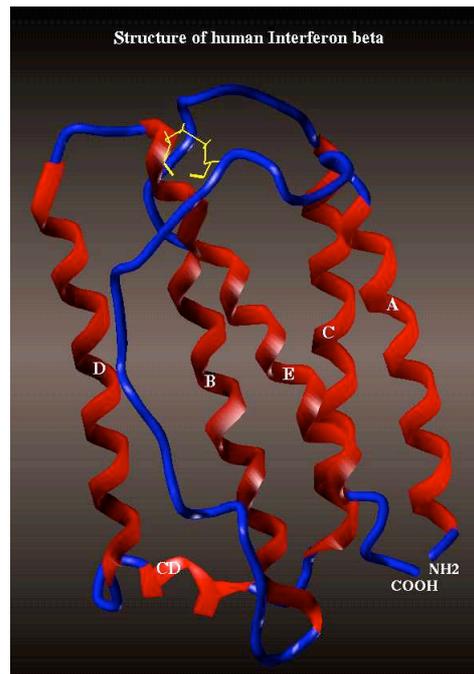
### 2.1.3 Interferon- $\alpha$

Das IFN- $\alpha$  gilt als das stammesgeschichtlich älteste Interferon. Es besteht aus 166 Aminosäuren und ist zu 30 % sequenzhomolog zur Familie der Interferone- $\beta$ . Es bindet an den gleichen Typ I-Rezeptor wie die Interferone- $\beta$  und ist ebenso pH-stabil. Auch IFN- $\alpha$  besitzt eine Glycosylierung am Asparagin 80, wobei eine Abspaltung des Glycosids zu einem Aktivitätsverlust um den Faktor 10 führt. Als strukturgebendes Element besitzt IFN- $\alpha$  drei Cysteine an den Positionen 17, 31 und 141. Die Cysteine in Position 31 und 141 bilden im natürlichen IFN- $\alpha$  eine Disulfidbrücke aus. Thermodynamisch begünstigt ist jedoch eine Disulfidbrücke zwischen Cys 17 und Cys 141. Diese bildet sich beim Renaturieren während der Aufarbeitung aus Bakterienzellen. Dieses falsch gefaltete IFN- $\alpha$  wirkt als Antigen und ist auch weniger aktiv. Aus diesem Grund wurde für das IFN- $\alpha$  aus Bakterienzellen das Cys17 gegen Serin ausgetauscht (Betaferon, Chiron, später Betaseron, Schering-Plough).

Ursprünglich wurde IFN- $\alpha$  aus humanen Fibroblasten isoliert, woher auch die alte Bezeichnung Fibroblasten-Interferon für das IFN- $\alpha$  stammt. Die Induktion der Expression von IFN- $\alpha$  *in vivo* erfolgt durch Viren oder doppelsträngige, nicht nukleär lokalisierte DNA.

IFN- $\alpha$  ist das Haupttherapeutikum in der Behandlung der Multiplen Sklerose. Des Weiteren sind unter anderem Indikationen bei Virusinfektionen wie Virusenzephalitis, verschiedene Herpeserkrankungen oder auch bei malignen Erkrankungen bekannt.

Als Quellen zur rekombinanten Herstellung stehen dabei sowohl bakterielle Systeme (E.coli  $\rightarrow$  Betaseron, Schering-Plough) als auch eukaryotische Expressionssysteme (CHO  $\rightarrow$  Avonex, Biogen; Rebif, Serono) zur Verfügung.



**Abb. 2** Modell des humanen IFN- $\beta$

### 2.1.3.1 Multiple Sklerose (MS) und der Einfluß von IFN- $\beta$ auf den Krankheitsverlauf

Multiple Sklerose ist eine bisher nicht heilbare Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die in drei verschiedenen Verläufen auftritt.

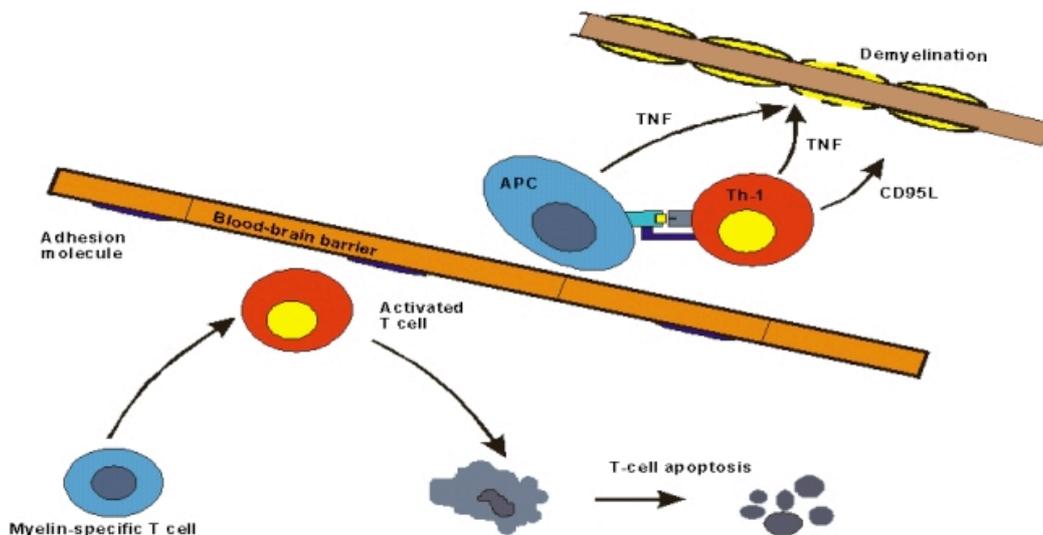
Zunächst gibt es eine so genannte schleichende Form, die eine konstante langsame Verschlechterung des Krankheitsbildes mit sich bringt.

Die zweite Form ist die schubförmige MS. Diese ist dadurch charakterisiert, dass Verschlechterungen des Krankheitsbildes in Schüben auftreten und nicht kontinuierlich. Die Auswirkungen dieser Schübe sind teilweise reversibel.

Die dritte Verlaufsform ist zunächst schubförmig, geht dann aber in die schleichende Form über.

In allen Fällen ist die Erkrankung durch eine Veränderung der Blut-Hirn-Schranke bedingt, was wiederum ein Eindringen von T-Zellen in das Nervensystem ermöglicht. Hierbei können auch T-Zellen in das zentrale Nervensystem eindringen, die Oberflächenmoleküle der Myelinscheiden der Axone erkennen. Myelinscheidenprotein erkennende T-Zellen gehen ohne Stimulus in der Blutbahn in Apoptose. Im ZNS wiederum greifen diese T-Zellen die Myelinscheide an und sorgen über die Aktivierung von Makrophagen für eine Demyelinierung der Axone. Diese demyelinisierten Axone wiederum können Reize schlechter oder bei einer akuten Entzündungssituation gar nicht weiterleiten. Ausfälle von sensorischen und motorischen Funktionen sind die Folge.

Bis heute sind die Ursachen der Multiplen Sklerose nicht bekannt. So werden sowohl genetische als auch virale Ursachen diskutiert. Denkbar ist eine Kombination aus beiden Ursachen. So muss eine genetische Veränderung vorliegen, damit T-Zellen, die körpereigene Myelinscheidenzellen erkennen, durch die Positiv-Negativselektion während der T-Zellreifung nicht aussortiert werden. Eine virale Komponente wiederum könnte die Veränderung der Blut-Hirn-Schranke hervorrufen, die erst den Durchtritt der fehlprogrammierten T-Zellen in das ZNS ermöglicht. Hier wird jedoch weitere intensive Forschung nötig sein, bis eine Aufklärung dieser Erkrankung erreicht ist.



**Abb. 3** Einfaches Modell einer entzündlichen Reaktion im ZNS  
(Quelle: <http://www.charite.de/>)

Momentan existieren zwei Substanzen, die den Verlauf der Multiplen Sklerose verlangsamen. Zum Einen ist dies IFN- $\beta$ , zum Anderen ein synthetisches Copolymer (Glatirameracetat), welches die Oberflächenproteine der Myelinscheide simuliert und somit diese fehlprogrammierten T-Zellen bereits außerhalb des Gehirns abfangen soll.

Die Wirkungsmechanismen von IFN- $\beta$  in der MS-Therapie sind sehr vielfältig und leiten sich alle von den grundlegenden Funktionen der Wirkung von IFN- $\beta$  im Immunsystem ab. Als grundlegende Motive sind dabei die Hemmung der T-Zellaktivierung sowie der Ausbildung von Adhäsionsmolekülen zu nennen.

Im Einzelnen hemmt IFN- $\beta$  bereits im Prästadium eines Schubes die autoimmune Aktivierung der T-Zellen. Im nächsten Schritt wird eine Adhäsion von aktivierten T-Zellen an die Gefäßwände im Bereich der Blut-Hirn-Schranke durch Verhinderung der Ausbildung von Adhäsionsmolekülen vermindert. In Folge dieser Maßnahme wird der Durchtritt durch die Blut-Hirn-Schranke unterbunden.

In der akuten Erkrankungsphase verhindert IFN- $\gamma$  die Ausbildung von antigenpräsentierenden MHC-II-Molekülen auf myelinprozessierenden Mikrogliazellen, somit wird die sekundäre T-Zellaktivierung und -proliferation gedämpft.

Bei aktivierten T-Zellen wird die Ausschüttung von Zytokinen im Besonderen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  gehemmt. Durch die Hemmung der Zytokine wird eine erweiterte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke unterdrückt. Der Entzündungsprozess kann also nicht durch Einwanderung weiterer T-Zellen und Makrophagen voranschreiten.

Durch die Induktion von immunmodulatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$  wird der Angriff weiter heruntergeregelt. Durch die bereits genannte *down*-Regulation von TNF- $\alpha$  werden wiederum Makrophagen von einem Angriff auf die Myelinscheiden abgehalten.

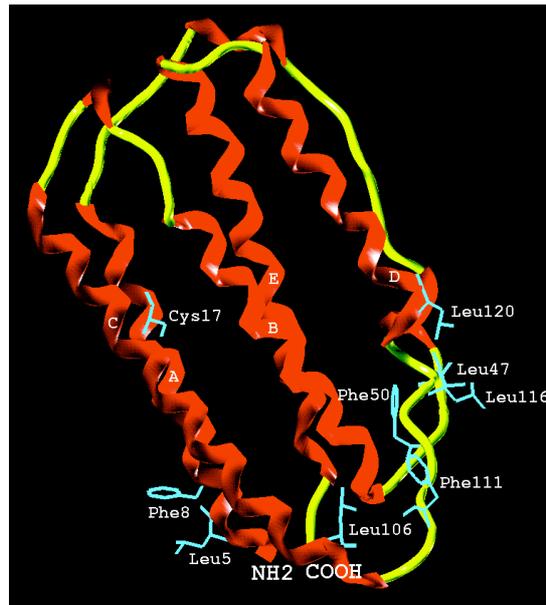
Über all diese Mechanismen hemmt also IFN- $\gamma$  die Entzündungsreaktion.

### 2.1.3.2 Varianten des IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$  ist ein extrem hydrophobes Protein. Aus diesem Grunde verursacht es in der Aufarbeitung und Formulierung große Probleme. Da jedoch IFN- $\gamma$  aufgrund des Einsatzes in der MS-Therapie einem regen Interesse unterliegt, war die Idee einer Verbesserung durch Mutation naheliegend.

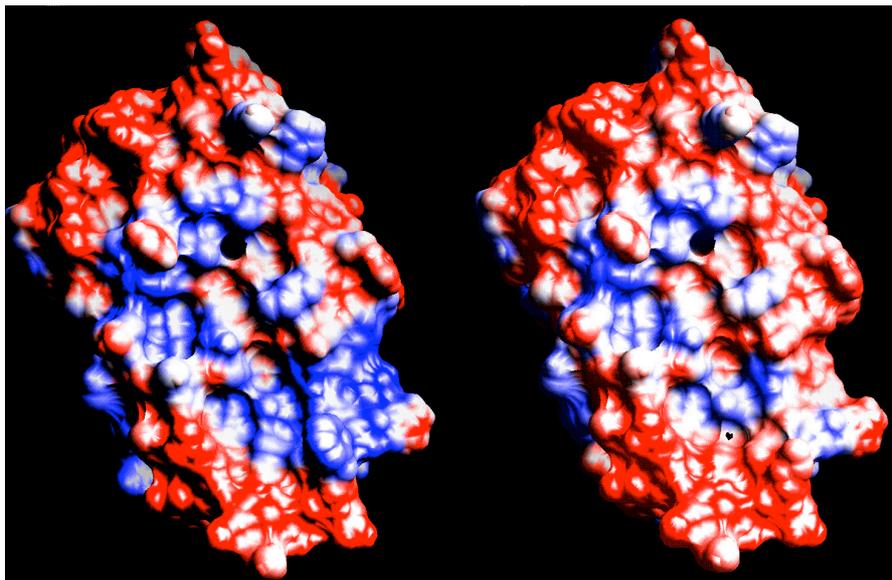
Weil zu Beginn der Arbeiten die Röntgenkristallstruktur des humanen IFN- $\gamma$  nicht bekannt war, wurden zunächst *modelling*-Arbeiten durchgeführt, bei denen anhand des Maus-IFN- $\gamma$ , dessen Struktur bekannt war, die Struktur des huIFN- $\gamma$  berechnet wurde (Doktorarbeit Christian Schneider-Fresenius). Anhand dieses Strukturmodells wurden anschließend 10 Phenylalanine und Leucine identifiziert, die laut Strukturmodell an der Oberfläche des IFN- $\gamma$  liegen sollten und dort für hydrophobe Cluster verantwortlich waren. Einzel- und Mehrfachmutanten (F->S oder L->S) dieser im *modelling* entstandenen IFN- $\gamma$ -Varianten wurden über gerichtete Mutagenese entwickelt und in *E.coli* expremiert, wobei als Referenz und Ausgangsgen bereits eine Mutante des IFN- $\gamma$  mit einem Austausch eines Cysteins in Position 17 gegen ein Serin eingesetzt wurde (Betaseron). Zwei der 10 gefundenen potentiellen mutierbaren Positionen führten zu einem massiven Aktivitätsverlust, so dass sie aus den weiteren Arbeiten ausgeschlossen wurden.

Als schließlich die Kristallstruktur des IFN- $\gamma$  geklärt war, konnte gezeigt werden, dass die theoretische, errechnete Struktur nahezu der realen Struktur entsprach. Nur in einer Position war ein Phenylalaninrest anders als berechnet nicht an der hydrophoben Oberfläche beteiligt, da dieser Rest in das Innere des Proteins gedreht ist.



**Abb. 4** Positionen der auszutauschenden Aminosäuren im IFN- $\gamma$

Für die Mutanten des IFN- $\gamma$  konnte gezeigt werden, dass die einzelnen mutierten Aminosäuren einen additiven Effekt auf die Löslichkeit des Proteins haben. Somit wurde für die weiteren Arbeiten das IFN- $\gamma$  9x mit neun Aminosäureaustauschen (8 Phenylalanin- und Leucinaustausche und der Cys17Ser) eingesetzt. Neben den *E.coli*-Ansätzen wurden für IFN- $\gamma$  *wt* und die 9x-Variante stabil transfizierte CHO-Zelllinien entwickelt (Doktorarbeit Thorsten Ulf Meyer). Diese haben anders als die in *E.coli* expremierten Varianten eine N-Glycosylierung am Asn 80, durch die eine gegenüber der unglycosylierten Form um den Faktor 10 höhere Aktivität vermittelt wird.

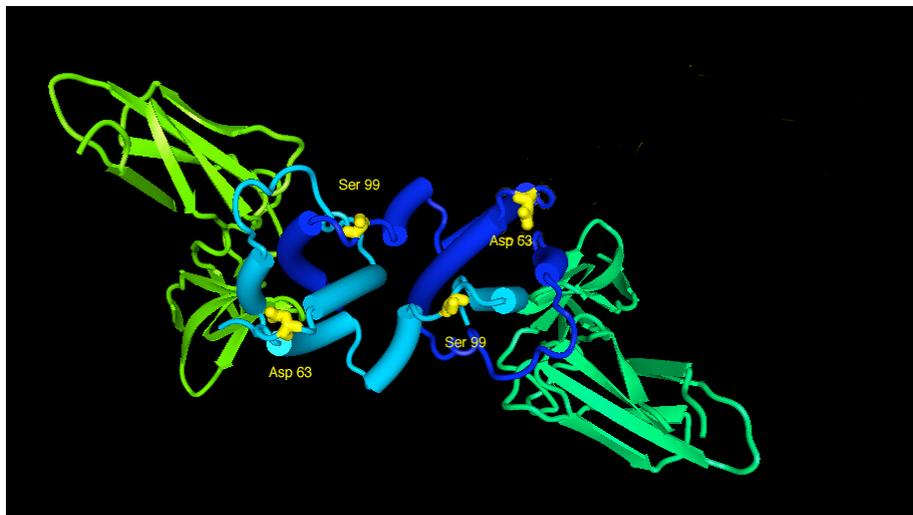


**Abb. 5** Vergleich der Oberfläche von humanem IFN- $\gamma$  *wt* (links) und der 9x-Varianten (rechts). In Blau sind hydrophobe Bereiche, in Rot hydrophile Bereiche dargestellt.

Sowohl für das Material aus *E.coli* als auch aus CHO-Zellen konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass die 9x-Variante eine um den Faktor 4 bessere Bioverfügbarkeit besitzt. Theroretische Epitop-Berechnungen mit der SYFPEITHI-Datenbank ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)) wiederum zeigten, dass durch die Mutationen keine erhöhte antigene Wirkung zu befürchten ist, da durch die Mutationen nur drei neue, eventuell antigene Epitope geschaffen wurden, welche sich im Datenbankvergleich aber als ähnlich antigen oder gar weniger antigen wie die vergleichbaren Epitope im IFN- $\beta$  wt herausstellten.

### 2.1.4 Interferon- $\beta$

Das Gen für IFN- $\beta$  ist auf dem Chromosom 12 lokalisiert. Das IFN- $\beta$  ist das einzige Typ II-Interferon. Es ist ein Homodimer, welches aus zwei Aminosäureketten von 146 Aminosäuren besteht, wobei der Carboxyterminus verkürzt sein kann. *In vivo* werden drei Aminosäuren abgespalten. Glyosylierungen erfolgen *in vivo* an bis zu zwei Stellen pro Monomer, welche jedoch für die biologische Wirkung keine Relevanz besitzen. Natürliches humanes IFN- $\beta$  besitzt keine Cysteine und somit auch keine strukturstabilisierenden Disulfidbrücken.



**Abb. 6** Modell des humanen IFN- $\beta$  (blau) mit zwei Rezeptorketten (grün). In Gelb sind die zur PEGylierung ausgetauschten Aminosäuren dargestellt (Struktur nach Ealick)

Diese mangelnde Stabilität spiegelt sich auch in den thermodynamischen Eigenschaften des IFN- $\beta$  wieder. So ist IFN- $\beta$  im stark sauren Milieu (pH 2,0) nicht stabil und denaturiert auch bei wesentlich niedrigeren Temperaturen als die anderen Interferone.

Anders als IFN- $\alpha$  und  $\gamma$  bindet IFN- $\beta$  an einen eigenen Rezeptor (Typ II-Rezeptor). IFN- $\beta$  wird hauptsächlich von Immunzellen (T-Zelle, B-Zelle und NK-Zelle) produziert.

Obwohl IFN- $\lambda$  definitionsgemäß auch antiviral wirkt, ist dies jedoch eher eine Nebenfunktion (Spezifische antivirale Aktivität ist um Faktor 10 geringer als bei Typ I-IFN). Stärker ausgeprägt sind die antiproliferativen und immunmodulatorischen Eigenschaften, wobei der Immunmodulation die größte Bedeutung zukommt.

Gerade die immunmodulierende Wirkung ist jedoch auch das größte Problem im Einsatz von IFN- $\lambda$ . Während die Wirksamkeit von IFN- $\lambda$  bei septischer Granulomatose bekannt ist und klinische Versuche der Firma InterMune eine Wirksamkeit bei der idiopathischen Lungenfibrose zeigen, stellt sich IFN- $\lambda$  beim zunächst positiven Ansatz der Polyarthritiden im Nachhinein als sogenannter „*bad player*“ heraus. Auch bei der schubförmigen MS ist die immunmodulatorische Wirkung des IFN- $\lambda$  negativ zu bewerten, da IFN- $\lambda$  hier den Schub forciert.

Somit lässt sich abschließend sagen, dass Arbeiten am IFN- $\lambda$  sowohl in die Richtung einer Verbesserung des Proteins als auch in Richtung von Abschaltmechanismen gehen sollten.

#### 2.1.4.1 Varianten des IFN- $\lambda$

Die oben beschriebene thermodynamische Labilität hat zu den Arbeiten von Waschütza *et al.* geführt, welche durch *modelling*-Arbeiten paarweise Aminosäurepositionen ermittelt haben, die zum Eintausch von Cysteinen und der daraus resultierenden Ausbildung intramolekularer bzw. intermolekularer Disulfidbrücken geeignet waren. In der weiteren Bearbeitung hat sich gezeigt, dass einzig die Variante 7/69, also Cysteineintausche in Position 7 und 69 mit daraus resultierender Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke, einen positiven Effekt auf die thermodynamische Stabilität hatte bei gleichzeitigem Aktivitätserhalt.

Slodowski *et al.* hatten bereits zuvor zeigen können, dass eine C-terminale Verkürzung um 10 Aminosäuren bei gleichzeitigem Austausch der letzten Aminosäure nach Verkürzung gegen Leucin zu einer Aktivitätssteigerung um den Faktor 10 führt.

Der Weg zu einer Doppelmutante 7/69 C-10 war daher naheliegend. So konnten Pechenov *et al.* zeigen, dass diese Doppelmutante sowohl den Vorzug der thermodynamischen Stabilität der 7/69-Variante als auch die gesteigerte Aktivität durch die Verkürzung aufweist.

Ein Austausch der letzten Aminosäure nach der Verkürzung nach Leucin wiederum bringt nur eine geringe weitere Verbesserung bei der Doppelmutante.

Alle Verbesserungen am IFN- $\lambda$  durch Mutation betrafen aber ausschließlich die *in vitro*-Eigenschaften des Proteins. Eine Untersuchung der *in vivo*-Eigenschaften wie Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik steht noch aus.

### 2.1.5 Interferon- $\beta$

Den Interferonen- $\beta$  und - $\delta$  kommt eine eher unbedeutende Rolle in der Wissenschaft zu, da sie entweder nur sehr kurzzeitig auftreten oder aber anderen Interferonen stark ähneln.

IFN- $\beta$  gehört zu den Typ I-IFN, wird jedoch anders als alle anderen Interferone nur sehr kurze Zeit gebildet. Während der Schwangerschaft wird IFN- $\beta$  zwischen dem 11. und dem 21. Tag durch den Embryo gebildet und dient zur Steuerung der Selbst-/Nichtselbsterkennung zwischen Embryo und Mutter. Hierbei greift IFN- $\beta$  immunmodulatorisch in die Typ I-IFN-Antwort ein und verhindert so eine Schädigung des Embryos.

Neuere Untersuchungen zum Einsatz von IFN- $\beta$  im EAE-Modell durch Soos *et al.* (2002), sprechen dem IFN- $\beta$  eine positive Wirkung in der MS-Therapie zu, die weitere Forschung auf diesem Bereich bleibt jedoch abzuwarten.

### 2.1.6 Interferon- $\omega$

Interferon- $\omega$  wurde 1985 von Hauptmann und Swetly gefunden. Es gehört aufgrund der recht großen strukturellen Homologie und den ähnlichen Eigenschaften zur Familie der Interferone- $\beta$  (Adolf 1990) und wird auch häufig als solches klassifiziert. Die hohe Divergenz in der Aminosäuresequenz gegenüber der Familie der IFN- $\beta$ , die auf eine stammesgeschichtlich sehr frühe Abtrennung von der IFN- $\beta$ -Familie schließen lässt, rechtfertigt die Einteilung in eine eigene Klasse.

IFN- $\omega$  wird in virusbefallenen Leukozyten expremiert und ist das IFN mit der bislang höchsten antiviralen Aktivität ( $4 \times 10^8$  IU/mg). Im Tierversuch konnte eine Antitumorwirkung bei verschiedenen Krebsarten nachgewiesen werden. Da IFN- $\omega$  wie alle IFN sehr speziesspezifisch ist, muss die weitere Forschung abgewartet werden, bevor Aussagen zum therapeutischen Nutzen von IFN- $\omega$  gemacht werden können.

## 2.2 Modifikation von Proteinen

Veränderungen an Proteinen können auf zwei Arten vorgenommen werden. Zum Einen kann die Aminosäuresequenz verändert werden, in diesem Fall spricht man von Mutation, zum Anderen können Veränderungen am fertigen Protein vorgenommen werden, ohne die Aminosäurekette zu verändern, diesen Vorgang nennt man Modifikation. Erfolgen diese Veränderungen während des Reifungsprozesses eines Proteins, spricht man von posttranslationalen Modifikationen.

Eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen von Proteinen und Peptiden sind beschrieben worden. Die häufigste natürliche Modifikationsform ist die Glycosylierung, welche ausschließlich von eukaryotischen Zellen durchgeführt wird (Näheres siehe Kapitel 2.2.1 Glycosylierung).

Modifikationen finden teilweise als Aktivierungs- oder Deaktivierungsmechanismus *in vivo* statt. Hierzu gehören die Phosphorylierung/Dephosphorylierung, Methylierung, Acetylierung, Hydroxylierung und Carboxylierung. Eine andere Modifikation, die Ubiquitylierung, leitet den Abbau eines Proteins ein. Wiederum andere Modifikationen dienen zur Verankerung von nicht Transmembranproteinen in der Zellmembran. Hierzu gehören das Anhängen von Myristylsäure und Glycophospholipiden.

Auch das Prozessieren gehört in den Bereich der natürlichen Proteinmodifikation. Prominentestes Beispiel hierfür ist das Insulin, welches erst durch Herausschneiden eines Fragmentes aus dem Präinsulin zum aktiven Insulin wird.

Eine Reihe von Modifikationen kann ausschließlich *in vitro* ausgeführt werden. Zu diesen Modifikationen gehören, Biotinylieren, Crosslinking, Fluoreszenzmarkierung, Iodierung und PEGylierung. Von diesen Modifikationen besitzen nur die PEGylierung und das Crosslinking einen Nutzen in der Stabilisierung von Proteinen. Die anderen Modifikationen werden ausschließlich zu analytischen Zwecken eingesetzt.

### **2.2.1 Glycosylierung**

Glycosylierung ist die häufigste natürlich vorkommende Modifikation von Proteinen in eukaryotischen Zellen. Sie erfüllt mehrere Aufgaben, so sind Glycanstrukturen hydrophiler Natur und können hydrophobe Proteine in Lösung halten. Aufgrund dieser Fähigkeit unterbindet eine Glycosylierung in gewissem Umfang die Aggregation von Proteinen. Eine Beteiligung an Rezeptorbindungen tritt in einigen Fällen auch auf.

Bei den Glycosylierungen unterscheidet man generell zwischen O-Glycosylierungen an Serin oder Threonin und N-Glycosylierungen an Asparagin. An einem Protein können mehrere Glycanstrukturen angehängt sein.

Diese Glycanstrukturen wiederum sind mono-, bi-, tri- oder in seltenen Fällen tetraantennär aufgebaut, wobei verschiedenen Hexosen und Pentosen zum Einsatz kommen.

Während N-Glycosylierungen über eine Grundstruktur des Oligosaccharides aus 2 N-Acetylglucosaminen, einer Fucose und 3 Mannosen aufgebaut sind, ist die Grundstruktur einer O-Glycosylierung über ein Trisaccharid aus N-Acetylgalactosamin, Galactose und

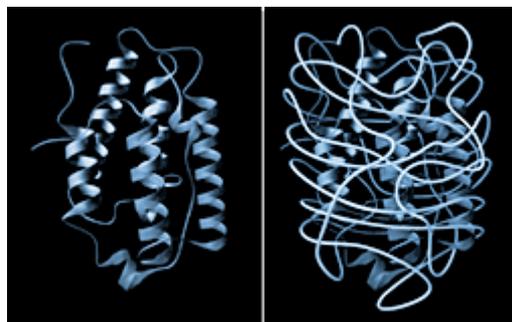
Sialinsäure aufgebaut. Eine zweite Zuckerantenne kann direkt am N-Acetylgalactosamin aufgebaut werden.

Allen Glycosylierungsmustern ist eine gewisse Spezifität gegeben. Diese führt dazu, dass falsche Glycosylierungsmuster *in vivo* zu antigenen Reaktionen führen können. Daher werden zur Expression therapeutischer Proteine wie IFN- $\gamma$  oder EPO bei vollem Aktivitätserhalt Säugerzellen eingesetzt. Eine Expression in Hefe oder Insektenzellen ist zwar möglich, jedoch nicht ratsam, da hier durch andere Glycosylierungsmuster potentiell antigene Strukturen erzeugt werden.

Ein Verlust der Glycosylierung kann zum teilweisen Verlust der Aktivität eines Proteins führen. So fällt die Aktivität von IFN- $\gamma$  ohne die Zuckerstruktur auf 1/10 der spezifischen Aktivität von glycosyliertem IFN- $\gamma$  ab. Hingegen macht sich die fehlende Glycosylierung des IFN- $\gamma$  *in vitro* nicht durch einen Aktivitätsverlust bemerkbar. *In vivo* jedoch beeinflusst die fehlende Glycosylierung die pharmakologische Stabilität des Proteins.

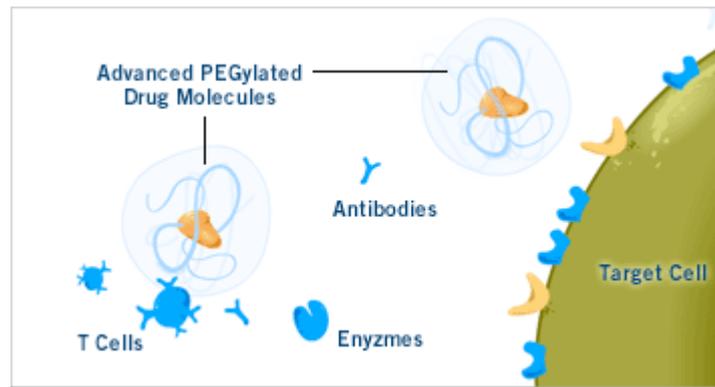
### 2.2.2 PEGylierung

Da eine *in vitro*-Glycosylierung von Proteinen bisher nicht möglich ist, wird versucht, den positiven Effekt der Glycosylierung durch eine andere Modifikation eines Proteins zu erzielen.



**Abb. 7** Modell eines unPEGylierten und eines PEGylierten Proteins (Quelle: [www.nektar.com](http://www.nektar.com))

Die PEGylierung ist eine gut verstandene Reaktion zur Modifikation von Makromolekülen und Oberflächen. Bei therapeutisch genutzten Proteinen und Peptiden wird die PEGylierung unter anderem zur Maskierung von antigenen Effekten, Erhöhung der Löslichkeit oder Verlängerung der Aufenthaltsdauer im Blut durch Verminderung des rezeptorbedingten Abbaus und der Nierenfiltration eingesetzt. Die PEGylierung emuliert damit Effekte, die *in vivo* durch eine Glycosylierung des entsprechenden Proteins erreicht werden.



**Abb. 8** Maskierungseffekte durch PEGylierung (Quelle [www.nektar.com](http://www.nektar.com))

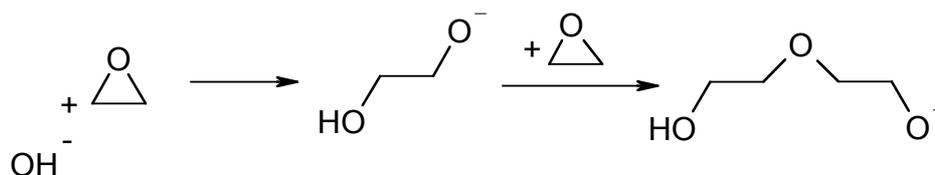
Für ein erfolgreiches Konjugat aus PEG und einem Protein sind verschiedene Faktoren ausschlaggebend.

Sowohl die Zahl als auch die Größe der angehängten PEG-Ketten kann positive und negative Einflüsse haben. Des Weiteren ist die Position der zu PEGylierenden Aminosäuren im Protein entscheidend, da eine PEGylierung im oder am aktiven Zentrum eines Proteins die Aktivität stark reduziert oder gar ganz einbrechen lässt. Als letzter sehr entscheidender Faktor spielt die Chemie der PEGylierung eine Rolle. Findet die PEGylierungsreaktion nur unter sehr extremen Bedingungen statt, so kann es passieren, dass das zu PEGylierende Protein denaturiert und nach dem PEGylieren nicht wieder renaturiert werden kann.

Durch die richtige Wahl der PEGylierungsreagenzien können folgende Aminosäuren ebenso wie N- und C-Terminus PEGyliert werden: Lysin, Cystein, Histidin, Arginin, Aspartat, Glutamat, Serin, Threonin und Tyrosin.

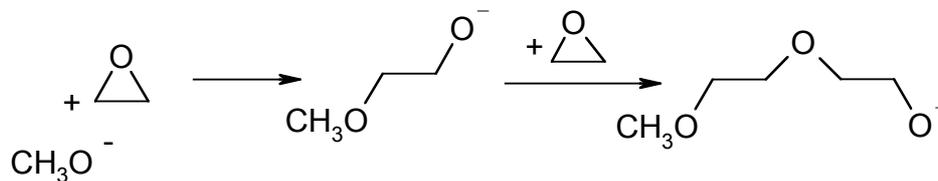
### 2.2.2.1 PEG

Poly(ethylenglycol) ist ein linearer oder verzweigter Polyether des Ethylenglycols, der an den Enden mit Hydroxylfunktionen versehen ist. PEG werden durch die alkalische Ringöffnung eines Epoxydrings gebildet, wobei ein Hydroxydion als Reaktionsstarter dient.



**Abb. 9** Polymerisation zu PEG

Wählt man an Stelle des Hydroxydions ein Methoxyion als Reaktionsstarter, so erhält man die für die PEGylierung genutzten MonomethoxyPEGs.



**Abb. 10** Polymerisation zu mPEG

Andere aus der organischen Chemie bekannte Schutzgruppen wie die *tert*-Butoxyfunktion oder Trimethylsilan können ebenfalls eingesetzt werden, bringen jedoch den Nachteil möglicher Nebenreaktionen durch Abspaltung der Schutzgruppe mit sich.

Obwohl bei der Synthese von mPEG auf eine wasserfreie Reaktionsumgebung geachtet wird, befindet sich immer eine geringe Menge Wasser im Reaktionsansatz, so dass neben der mPEG-Synthese auch immer ein geringer Teil der *diol*-PEGs gebildet wird. Im schlechtesten Falle liegt der *diol*-PEG-Anteil bei 15 %. Methoden zur Abtrennung der *diol*-PEGs sind eine Reaktion mit Benzyloxy-PEG und anschließender Methylierung. Es entstehen dabei die inerten Dimethoxy-PEGs. In einem anderen Verfahren werden die PEGs in Carboxyl-PEGs umgewandelt und an einer Kationentauschersäule abgereichert.

Durch die Wahl verschiedener Startersubstanzen bzw. Kettenabbruchsubstanzen werden PEGs der verschiedenen Funktionalitäten erzeugt.

Da die Synthese von PEGs als eine Kettenreaktion abläuft, lässt sich die gewünschte Kettenlänge der PEGs über die Reaktionsdauer definieren. Weil jedoch die Geschwindigkeit der Addition von neuen Epoxideinheiten an die wachsende PEG-Kette schwankt, findet man nach Abbruch der Reaktion PEG-Ketten unterschiedlicher Länge, die jedoch im Mittel der gewünschten Kettenlänge entsprechen. Je größer die gewünschte mittlere Kettenlänge ist, desto stärker variieren die einzelnen PEG-Ketten in ihrer Länge!

### 2.2.2.2 Historie der PEGylierung

Die ersten PEGylierungsreaktionen wurden mit succinimidylsuccinat-, succinimidylcarbonat- oder trisylataktivierten mPEGs durchgeführt. Diese PEG-Reagenzien sind auf niedermolekulare Kettenlängen (< 5.000 Da) beschränkt, da bei der Synthese neben den gewünschten monofunktionalen aktivierten mPEGs auch bifunktionale oder gar multifunktionale PEGs entstehen. Die Rate dieser bi- oder multifunktionalen PEGs wächst

mit steigender Kettenlänge. Der Nachteil bi- und multifunktionaler PEGs ist die Möglichkeit einer in der Regel unerwünschten kovalenten Verknüpfung von mehreren Proteinen, was zu einer vermehrten Aggregation führen würde.

PEGylierungsreagenzien erster Generation sind ausschließlich für Amin- oder Carboxy-PEGylierung ausgelegt.

Bereits die Reaktionen mit PEGs der ersten Generation hat für viele Proteine einen stabilisierenden Effekt *in vitro* und *in vivo* gezeigt.

Auf der anderen Seite ist das inhomogene Verhalten der PEGs erster Generation und die Beschränkung auf niedermolekulare Kettenlängen ein großer Nachteil für den Einsatz dieser PEGs.

Diese Nachteile haben dazu geführt, dass neue PEGylierungsreagenzien zweiter Generation entwickelt wurden. Eines der ersten Proteine, das mit einem mPEG zweiter Generation PEGyliert wurde, war das IFN- $\alpha$  von Hoffmann-La Roche. Nachdem zunächst eine PEGylierung mit einem Reagenz erster Ordnung durchgeführt wurde, zeigte sich in klinischen Versuchen, dass dieses PEG-IFN- $\alpha$  erster Generation nur geringfügig besser war als das nicht PEGylierte IFN- $\alpha$ . Auch war dieses PEG-IFN- $\alpha$  erster Generation nicht homogen PEGyliert, sondern trug an den frei zugänglichen Amin-funktionen auf der Oberfläche des Proteins statistisch verteilte PEG-Ketten. Somit entstanden mehrfach PEGylierte IFN- $\alpha$  Derivate, die sich zwar in der Masse des PEGylierten Proteins gleichen, wo aber keine Aussage über die Position der PEG-Ketten getroffen werden konnte.

In einer Kooperation zwischen Roche und Shearwater wurde daraufhin über *modelling*-Arbeiten ein elektrophiles mPEG 40.000 (2 x 20.000 Da mPEG wurden an die Aminfunktionen eines Lysins gekoppelt und diese Molekül über die Bindung von Succinimid an der Carbonylfunktion aktiviert) entwickelt und an das IFN- $\alpha$  gekoppelt. In Tierversuchen und in klinischen Tests zeigte sich schnell, dass dieses neue PEG-IFN- $\alpha$  die gewünschten Eigenschaften besaß. Die Aufenthaltsdauer des PEG-IFN- $\alpha$  war von 9 h auf 77 h erhöht. Dieses neue PEG-IFN- $\alpha$  ist unter dem Markennamen PEGASYS für die Hepatitis C-Therapie auf dem Markt. PEGASYS ist ausschließlich an Lysinresten PEGyliert, wobei jeweils immer nur einer der Lysinreste in den Positionen 31, 49, 70, 83, 112, 121, 131, 134 und 164 PEGyliert ist. PEGASYS wird als ein Gemisch dieser 9 verschiedenen Isomere des PEGylierten IFN- $\alpha$  vertrieben.

Nahezu im gleichen Zeitraum entwickelte auch eine Kooperation aus der PEGylierungsfirma Enzon und dem Pharmaunternehmen Schering-Plough eine PEGylierte Form des IFN- $\alpha$ -

Präparates Intron-A. Unter dem Markennamen PEG-Intron ist dieses 12.000 Da Histidin-PEGylierten IFN- $\alpha$  auf dem Markt.

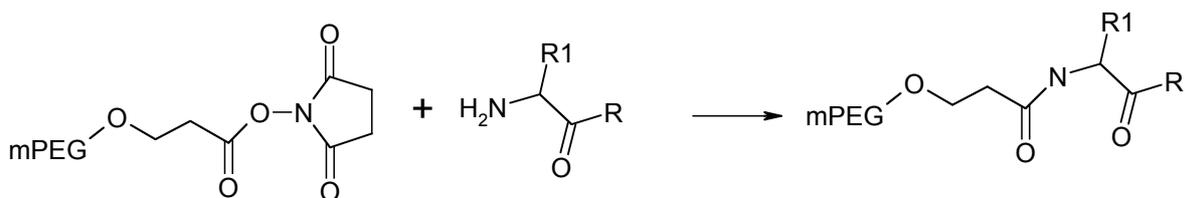
### 2.2.2.3 Amin-PEGylierung

Bereits in der ersten Generation von PEGylierungsreaktionen wurden Bindungen von mPEGs über aktivierende Gruppen an Amin-Funktionen im Protein durchgeführt. Amin-PEGylierungsreagenzien zweiter Generation unterscheiden sich hauptsächlich in der Kettenlänge von denen erster Generation. In der Chemie der Aktivierung von mPEGs zur Amin-PEGylierung sind zwar neue Gruppen hinzugekommen, am allgemeinen Prinzip der Amin-PEGylierung hat sich hierdurch jedoch nichts verändert. Neben der unten beschriebenen Aktivierungsgruppe stehen folgende weitere Aktivierungsgruppen zur Amin-PEGylierung zur Auswahl: Dichlorotriazin, Succinimidylcarbonat, Benzotriazolcarbonat, n-Nitrophenylcarbonat, Trisylat, Carbonylimidazol, Succinimidylsuccinat.

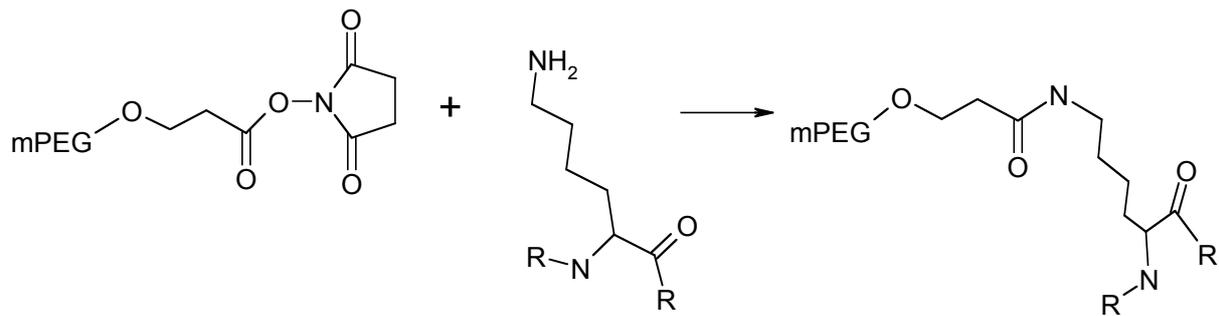
Die Amin-PEGylierung basiert auf einer nukleophilen Substitution freier  $\text{NH}_2$ -Gruppen eines Proteins an über Succinimidylpropionat (alternativ Succinimidylbutionat) aktivierten mPEGs. Hierbei erfolgt die Substitution an die Carbonylfunktion der Propionats unter Freisetzung von Succinimidyl als Fluchtgruppe. Amin-PEGylierungen werden am besten bei neutralem bis leicht basischem pH-Wert durchgeführt.

Wie am Beispiel des IFN- $\alpha$  beschrieben, führt eine Amin-PEGylierung nicht immer zu einer PEGylierung des Amino-Terminus. Ebenso einfach können Lysinreste an der Proteinoberfläche PEGyliert werden. Im Falle des IFN- $\alpha$  führte allein die Größe der PEG-Kette zu einer mono-PEGylierung des Proteins. Die Wahl kurzer PEG-Ketten birgt somit neben der Gefahr, unerwünschte Positionen zu PEGylieren, auch die Gefahr mehrfacher PEGylierungen.

Die Mechanismen für eine PEGylierung am Amino-Terminus und an der  $\epsilon$ -Aminofunktion eines Lysins sind im Folgenden dargestellt:



**Abb. 11** Mechanismus der N-terminalen Amin-PEGylierung



**Abb. 12** Alternative Amin-PEGylierung an der  $\epsilon$ -Aminofunktion von Lysin

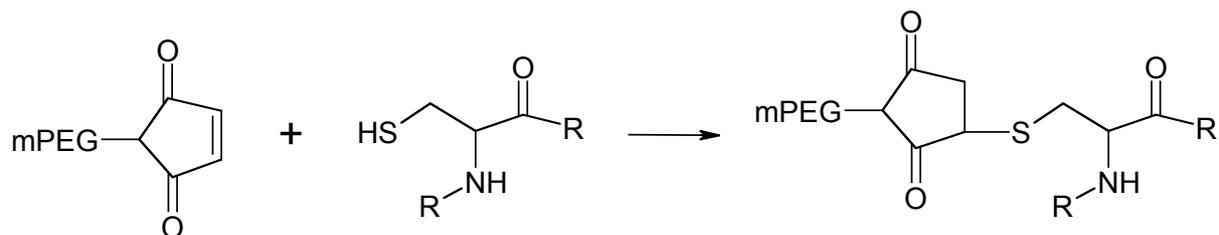
Der Grad der PEGylierung mit einer Amin-PEGylierung ist von zwei Faktoren abhängig. Die Zahl der Bindungsstellen (Anzahl der Lysine im Protein + N-Terminus) gibt Aufschluss über die maximale Zahl an PEGylierungen. Die Größe des PEGylierungsreagenz wiederum wirkt dem entgegen. Wie am IFN- $\alpha$  gezeigt werden konnte gilt, je größer ein gebundenes mPEG ist, desto stärker hindert es weitere mPEGs an der Bindung. Dies gilt im Besonderen für verzweigte mPEGs, wie im Falle des PEGASYS eingesetzt.

#### 2.2.2.4 Thiol-PEGylierung

Eine weitere Methode der PEGylierung mit PEG-Reagenzien zweiter Generation ist die Thiol-PEGylierung. Die Thiol-PEGylierung basiert auf einer nukleophilen Additionsreaktion freier SH-Gruppen von Cysteinen im Protein an vinyloge Doppelbindungen nach dem Mechanismus der Michael-Addition.

Als Aktivierungsgruppen können hierbei Maleinimid oder Vinylsulfon eingesetzt werden. Auch für die Thiol-PEGylierung gilt, der Grad der PEGylierung ist von der Zahl der freien Cysteinfunktionen an der Oberfläche eines Proteins abhängig. Auch hier wirkt die Größe des mPEGs mehrfachen PEGylierungen entgegen.

Die für die Thiol-PEGylierung angewandte Methode der Michael-Addition an Maleinimid wird häufig auch zur kovalenten Bindung von Proteinen und Peptiden an Oberflächen eingesetzt (Reimer et al. 2002).



**Abb. 13** Mechanismus der Thiol-PEGylierung

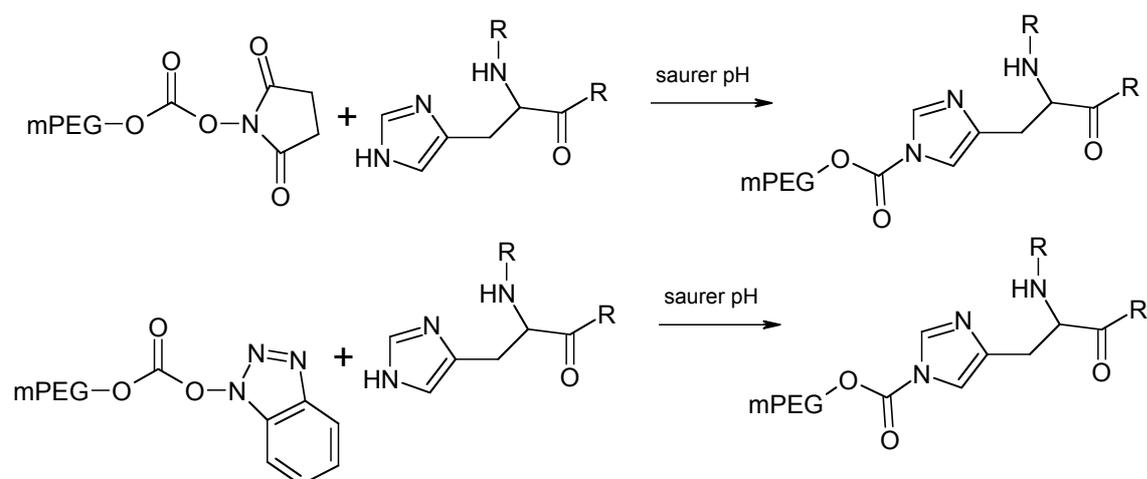
Zwei weitere Mechanismen für die Thiol-PEGylierung werden diskutiert. Zum Einen gibt es die Möglichkeit, über eine Substitutionsreaktion an ein iodoacetamidaktiviertes mPEG unter Abspaltung von Iodsäure zu PEGylieren. Zum Anderen kann Orthopyridyldisulfid als aktivierende Gruppe eingesetzt werden. Bei diesem Mechanismus wird eine Disulfidbrücke umgeknüpft.

### 2.2.2.5 Histidin-PEGylierung

Die Histidin-PEGylierung ist eine Sonderform der Amin-PEGylierung. Bei der Histidin-PEGylierung können einige der Amin-PEGylierungsreagenzien eingesetzt werden. Bevorzugt sind hierbei Reagenzien, bei denen eine Bindung der aktivierenden Gruppe an das mPEG über einen Carbonatester erfolgt. Im Einzelnen sind dies succinylcarbonat- und benzotriazolcarbonat-aktivierte mPEGs.

Anders als die bisher besprochenen PEGylierungsreaktionen läuft die Histidin-PEGylierung ausschließlich bei einem sauren pH-Wert ab. Im sauren pH-Bereich liegt Histidin an einer Stickstofffunktion im Imidazolring protoniert vor. Kommt es nun zur Bindung zwischen dem protonierten Histidin und dem aktivierten mPEG am Carbonatester, führt eine  $\pi$ -Umlagerung im Imidazolring zu einer Abspaltung eines Protons und der damit verbundenen Stabilisierung des Übergangszustandes. Erst im zweiten Reaktionsschritt wird Benzotriazol oder Succinimid als Fluchtgruppe freigesetzt.

Prominentestes Beispiel einer Histidin-PEGylierung ist das von Enzon und Schering-Plough entwickelte PEG-Intron.

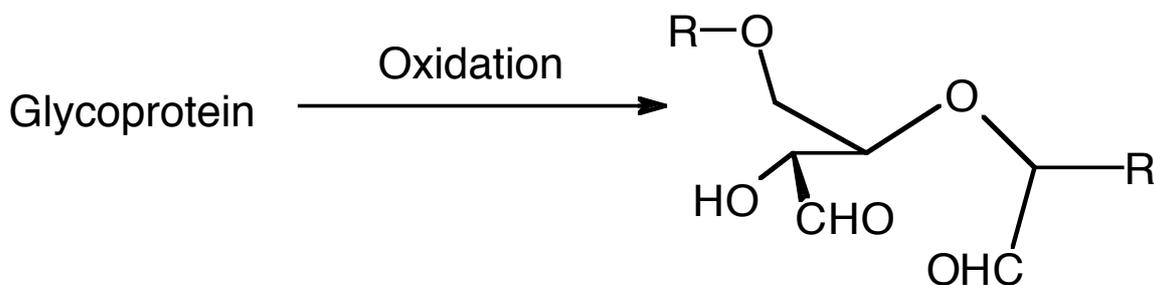


**Abb. 14** Mechanismus der Histidin-PEGylierung

### 2.2.2.6 PEGylierung an Glycanstrukturen

Eher exotisch ist die PEGylierung an der Zuckerstruktur eines Glycoproteins einzustufen.

Hierzu wird zunächst der Zucker im Glycosylbaum durch Oxidation aktiviert und anschließend ein mPEG-Amin oder ein mPEG-Hydrazin an eine der so entstandenen Aldehydgruppen gebunden.



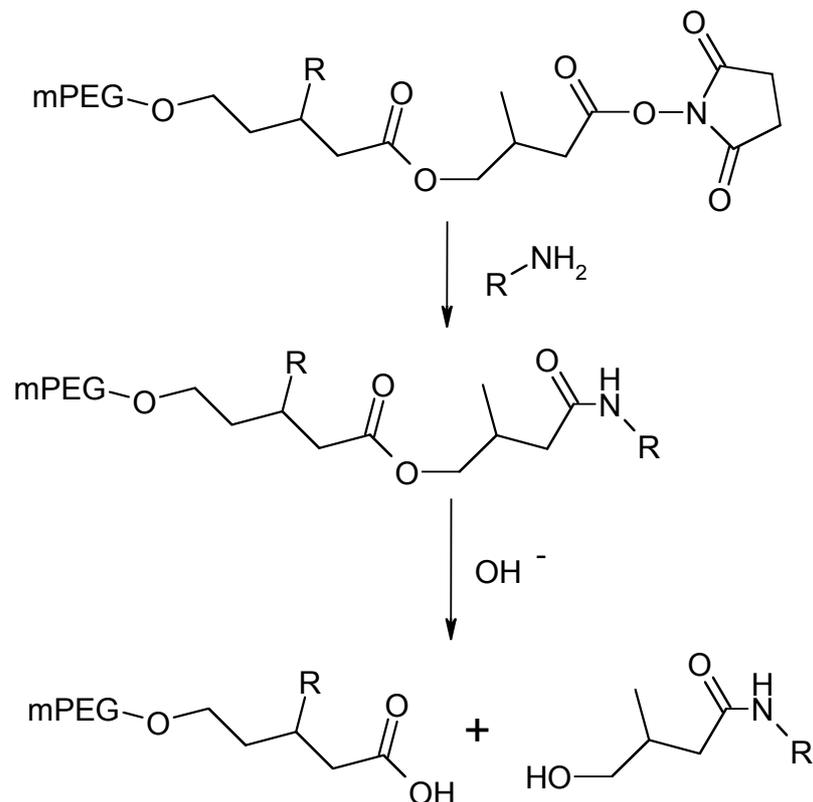
**Abb. 15** Oxidative Aktivierung eines Zuckers der Glycanstruktur eines Glycoproteins

Problematisch bei der Glyco-PEGylierung ist die Oxidation eines Zuckers in der Glycanstruktur. Hier besteht keine Garantie, dass nur ein Zucker oxidiert wird, so dass es zu mehrfacher Pegylierung kommen kann. Des Weiteren können durch oxidative Reagenzien auch Aminosäuren wie Cystein zu Cysteinsulfonsäure oxidiert werden. Im besten Fall ändert sich hierdurch nichts an der Struktur des Proteins, im schlechtesten Fall kann es zu einem partiellen Verlust der Tertiärstruktur kommen, was wiederum die Funktion des Proteins einschränkt.

### 2.2.2.7 Reversible PEGylierung

Ein weiterer sehr interessanter Ansatz ist die Arbeit mit PEG-Reagenzien, die eine Art Sollbruchstelle im Linker zwischen mPEG und Protein besitzen. Diese mPEG-Reagenzien besitzen im Linker zum PEGylierten Protein einen Ester, der nicht aktiviert ist und somit nicht durch das zu PEGylierende Protein angegriffen wird. Dieser Ester wiederum ist kontrolliert hydrolysierbar unter Bedingungen, bei denen das Amid nicht hydrolysiert. Nach der Hydrolyse steht ein voll funktionsfähiges Protein zur Verfügung.

Nachteilig wirkt sich hingegen der Verbleib eines Teils des Linkers am Protein aus, da hierdurch eine möglicherweise antigene *site* geschaffen wird!



**Abb. 16** Mechanismus der reversiblen PEGylierung

### 2.2.2.8 Alternativen zum PEG

Alternativen zum mPEG werden in Form von Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Polyacryloylmorpholin (PAM) diskutiert. Diese werden über die gleichen Mechanismen wie mPEG zu mPVP oder mPAM aufgebaut und ebenfalls über die gleichen Mechanismen mit entsprechend aktivierten Endgruppen versehen. Die Chemie dieser Substanzen stimmt somit mit der PEGylierungschemie überein. Durch die andere Struktur von Polyvinylpyrrolidon und Polyacryloylmorpholin ergeben sich ganz neue pharmakodynamische und –kinetische Eigenschaften.

Problematisch ist hierbei, dass sowohl PVP als auch PAM mindertoxische Substanzen sind. In einer Langzeittherapie könnten sich diese Substanzen im Patienten anreichern und so zu Folgeschädigungen führen.

### 2.2.3 Crosslinking und Fusionsproteine

Beim *Crosslinking* werden Proteine an andere Proteine, meist Albumin, über einen kovalent verknüpften *linker* gekoppelt. Ähnlich wie durch PEGylierung kann durch das *Crosslinking* die Pharmacodynamik und –kinetik eines Proteins ebenso wie die Thermodynamik verändert

werden. Nachteilig wirkt sich hierbei die Herkunft des gelinkten Proteins aus. Albumin wird günstig aus Blut gewonnen, daher ist das Kontaminationsrisiko mit humanpathogenen Viren eher gegeben als bei synthetisch hergestellten PEGs. Auch die Gefahr der Antigenität solcher Konjugate aus zwei Proteinen ist gegeben.

Einen anderen Weg beschritten die Forscher von Human Genome Sciences. Diese schufen Konstrukte, bei denen IFN- $\alpha$  oder - $\beta$  mit Albumin fusioniert sind (Sung *et al.* 2003). Diese Konstrukte wurden in Maus-Myelomazellen expremiert. Durch den Albuminfusionsanteil konnten negative pharmakologische und pharmakokinetische Eigenschaften der Typ-I-Interferone, besonders des IFN- $\alpha$ , gemildert werden.

#### **2.2.4 Verpackung von Proteinen**

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung von Proteintherapeutika geht über die Verpackung der Proteine in Mikrosphären. Als Mikrosphärenbildner kommen dabei Substanzen wie Polylactid-co-Glycolsäure (PLGA), Chitosan oder Ähnliche zum Einsatz. Probleme bereitet hier noch die schwer dosierbare Freisetzung der Proteine. Mit der Verpackung von Proteinen sollen zwei Vorteile erreicht werden. Zum Einen soll die Verpackung zu einem *slow release* des Proteins führen. Der Weg kann dabei sowohl über ein Herauslösen der aktiven Substanz aus dem Verpackungsmaterial als auch über eine Auflösung des Verpackungsmaterial führen. In beiden Fällen ist das Resultat, eine langsame Freisetzung des Proteins, das gleiche.

Zum Anderen sollen über eine Verpackung neue Applikationformen anstelle der Injektion für ein Protein geschaffen werden. Untersucht werden in diesem Zusammenhang transdermale, orale und pulmonale Ansätze.

Eine Kombination aus Verpackungstechnik und Modifikation des verpackten Proteins ist auch möglich. So können PEGylierte Proteine in PLGA verpackt und im Patienten langsam freigesetzt werden. Erste Arbeiten in diesem Bereich werden bereits vom Nektarverbund durchgeführt, zu dem die Firmen Shearwater, Inhale Therapeutics und Bradford Particle Design gehören.

### **2.3 Expressionsysteme für rekombinante Proteine**

#### **2.3.1 Bakterien**

Bakterien sind das häufigste Expressionsystem in der Biotechnologie. Da sie eine sehr hohe Proliferationsrate besitzen, kann in kürzester Zeit eine große Zellmasse produziert werden. An ihre Wachstumsbedingungen stellen Bakterien sehr niedrige Ansprüche.

Die Transformation mit dem gewünschten Zielgen kann über Plasmide sehr leicht erfolgen. Abhängig vom gewählten Promotor ist eine hohe Expressionsleistung erreichbar. Nachteilig wirkt sich eine hohe Expression dahingehend aus, dass durch Überexpression entstandene Proteine in *inclusion bodies* eingelagert werden.

Durch geeignete Expressionbedingungen kann jedoch die Expression in einen löslichen Ansatz getrieben werden.

Unter den Bakterien ist *E.coli* das häufigste in der Biotechnologie genutzte Expressionssystem. Die einzelnen Expressionsstämme stammen alle vom *E.coli* K12 ab und unterscheiden sich in ihren Sicherheitsfaktoren.

### **2.3.2 Zellkultur**

Die Zellkultur kommt immer dann zum Tragen, wenn Proteine für ihre Funktion glycosyliert sein müssen oder aber nur von bestimmten Zellen expremiert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Gewinnung monoklonaler Antikörper aus immortalisierten B-Lymphozyten.

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wird in der Biotechnologie meistens die CHO-Zelle verwandt. Diese stammt aus der Eizelle des chinesischen Hamsters (Chinese hamster ovary). Der Vorteil, den CHO-Zellen beispielsweise gegenüber Insektenzellen besitzen, zeigt sich bei der Expression von humanen Glycoproteinen. Deren Glycanstruktur wird von CHO-Zellen annähernd der humanen Glycanstruktur analog aufgebaut. Insektenzellen hingegen bauen ein anderes Glycanmuster auf, was wiederum zu einer potentiell antigenen Struktur führt.

Der Nachteil von eukaryotischen Expressionssystemen gegenüber bakteriellen Systemen ist die niedrige Proliferationsrate der Zellen. Während eine Bakterienzelle sich in der Regel alle 20 min teilt, liegt die Teilungsrate für eukaryotische Zellen bei einem Zeitraum größer 24 h. Für gleiche Expressionsraten müssen also in der Zellkultur wesentlich größere Systeme über einen längeren Zeitraum betrieben werden.

### **2.3.3 Alternative Expressionssysteme**

Zu den alternativen Expressionssystemen gehören Hefen, pflanzliche Expressionssysteme und transgene Tiere. Während die ersten beiden für die Expression von humanen Glycoproteinen ungeeignet sind, da sich die Glycosylierungsmuster von Pflanzen oder Hefen zu stark von den humanen Glycosylierungsmustern unterscheiden, ist die Technologie der Proteinexpression in transgenen Tieren noch in den Kinderschuhen. So wurden zwar bereits Versuche zur

Expression des Gerinnungsfaktors VIII in Milchdrüsen von Schafen unternommen, jedoch ist bisher keine Substanz aus transgenen Tieren am Markt.

#### **2.4 Zielsetzung dieser Arbeit**

Zielsetzung dieser Arbeit war die Verbesserung der Pharmakokinetik und –dynamik von Interferonen durch *in vitro*-Modifikation.

Als Modellsystem sollte hierzu IFN- $\beta$  über verschiedene PEGylierungen modifiziert werden. Diese modifizierten IFN- $\beta$ -Varianten sollten dann *in vitro* auf ihre Stabilität gegenüber Temperatureinfluss und Protease untersucht werden. *In vivo* wiederum sollten Untersuchungen auf Bioverfügbarkeit erfolgen.

Im Anschluss an diese Untersuchungen sollten die gewonnenen Erkenntnisse auf das wesentlich schwieriger handhabbare IFN- $\alpha$  übertragen werden. Hierbei sollten sowohl die aus Bakterienzellen gewonnenen Varianten IFN- $\alpha$  1x, IFN- $\alpha$  8x und IFN- $\alpha$  9x als auch die in CHO-Zellen expremierten Varianten IFN- $\alpha$  wt und IFN- $\alpha$  9x eingesetzt werden.

In der Expression von IFN- $\alpha$  aus CHO-Zellen sollten in diesem Zusammenhang alternative Kultursysteme untersucht werden mit dem Ziel, die Handhabung der Zellen zu vereinfachen und/oder die IFN- $\alpha$ -Ausbeute zu steigern. Ebenfalls im Rahmen der Arbeiten an der PEGylierung sollten alternative Stabilisatoren für IFN- $\alpha$  gesucht werden, die alternativ zum humanen Serumalbumin in der Zellkultur oder während der Aufarbeitung eingesetzt werden können.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 EDV

Die graphische Darstellung von Ergebnissen erfolgte mit Programmen aus dem Microsoft-Officepaket (Microsoft, USA).

SDS-PAGE- und Agarosegele sowie *western blots* und AVAs wurden mit einem digitalen Dokumentationssystem (BioDoc II, Biometra, Göttingen) oder mit einem Flachbettscanner (Power Look, UMAX, Taiwan; HP Scanjet 7450 C, HP, USA) aufgezeichnet. Die Scanner wurden mit der zugehörigen Software (MagicScan 4.0, UMAX, Taiwan; HP Precision Scan, HP, USA) betrieben. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.).

Die Auswertung von Gelen wurde mit dem Programm NIH Image 1.63 (National Institute of Health, US) vorgenommen.

Die DNA-Sequenzen wurden mit MacVector 7.1 (Oxford Molecular Ltd., Oxford, GB) und VectorNTI 8.0 (InforMax, USA) ausgewertet.

#### 3.1.2 Geräte

Autoklav	Modell GLA 40, Gössner
Blot-Apparatur	Fast-Blot B32, Biometra
Brutschrank	Modell B5060, Heraeus-Christ
Chromatographie-Anlage	BioCAD – Perfusion Chromatography Workstation 60, PerSeptive Biosystems BIO-RAD Econo, BIO-RAD
Elektrophoresekammern	Minigel-Twin (SDS-PAAGE), Biometra (Wide) Mini Sub Cell (Agarose-Gel), BioRAD
Fraktionssammler	Modell FC 205, Gilson
Geldokumentationsanlage	BioDoc II, Biometra
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf
Magnetrührer	RET basic, IKA Labortechnik IKAMAG RCT, IKA Labortechnik
Mikroskop	ID 03, Zeiss

pH-Elektrode	N 6280, Schott N 6000 A, Schott
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick
Pipetierhilfe	Pipetboy plus, Tecnomara
Rotoren	JA 14, Beckman JS 13.1, Beckman
Schüttelinkubator	Modell G25 New Brunswick Scientific
Schwenktisch	Modell 3016, Gesellschaft für Labortechnik (GFL)
Sequenzierautomat	ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer Applied Biosystems
Spannungsquellen	Modell ECPS 3000/150, Pharmacia Biotech Modell EPS 500/400, Pharmacia Biotech Modell 100, Bethesda Research Laboratories
Spektralphotometer	Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech
Sterilbank	HF 60, ICN Gelaire BSB 6A, ICN Gelaire
Thermocycler	Peltier Thermocycler PTC-200, MJ Research
Ultraschallprozessor	UP 200 H, Dr. Hilscher
Vortex	Minishaker MS 1, IKA Labortechnik
Waage	Modell 1474, Satorius Modell BP 61, Satorius
Wasseraufbereitung	MilliQ Plus, Millipore
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5417 R, Eppendorf Minifuge RF, Heraeus-Christ Avanti J-25, Beckman Hettich Universal, Hettich

### 3.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Aldrich-Chemie (Steinheim), AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München), Difco Laboratories (Detroit, MI / USA), Fluka (Neu-Ulm), Gibco BRL (Eggenstein), Invitrogen (Breda, NL), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München), Shearwater (Huntsville, AL / USA).

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer stammen von der Fa. TIB MolBiol (Berlin).

### 3.1.4 Antikörper

Für die Immunfärbung wurden folgende Antikörperpaare verwendet:

rabbit-anti-human-IFN- $\gamma$ -IgG: RDI (Flanders, NJ, USA) 10.000x konzentriert

anti-rabbit-IgG AP-gekoppelt: Promega (Madison, WI, USA) 10.000x konzentriert

mouse-anti-human-IFN- $\gamma$ G3e: Eigene Produktion 10.000x konzentriert

anti-mouse-IgG AP-gekoppelt: Promega (Madison, WI, USA) 10.000x konzentriert

Das ELISA-Kit zur Bestimmung von humanem IFN- $\gamma$  stammen von der Fa. eBioscience (San Diego, Ca, USA), bezogen über Fa. THP (Wien, Österreich).

### 3.1.5 IFN-Standards

IFN- $\gamma$ -Standard: Rebif (Serono, Unterschleißheim)

IFN- $\gamma$ -Standard: D3b (Eigene Produktion, abgeglichen am WHO-Standard)

### 3.1.6 Häufig verwendete Puffer

TBS (10 x)

100 mM Tris

1,5 M NaCl

Auf einen Liter 1x TBS werden 0,5 ml Tween 20 gegeben (TBST)

Samplebuffer SDS (5 x)

250 mM Tris/HCl (pH 6,8)

10 % Mercaptoethanol

10 % (w/v) SDS

20 % Glycerin

0,1 % Bromphenolblau

TBE

127,5 mM Tris

43 mM Borsäure

2,42 mM EDTA

Anodenpuffer (10 x)

30 g/l Tris

Kathodenpuffer (10 x)

30 g/l Tris

144 g/l Glycin

Auf einen Liter 1x Kathodenpuffer werden 10 ml 10% SDS-Lösung gegeben.

PBS

20 mM NaPP (Verhältnis NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> nach pH-Wert)

150 mM NaCl

Transferpuffer		Probenpuffer DNA	
25 mM	Tris	0,25 %	Bromphenolblau
192 mM	Glycin	0,25 %	Xylenecyanol FT
20 %	Methanol	30 %	Glycerin
		69,5 %	<i>aqua bidest.</i>
TAE (10 x)		AP-Puffer	
48 g/l	Tris	100 mM	Tris
11,4 ml/l	Eisessig	100 mM	NaCl
10 mM	EDTA	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
Entfärber Coomassie		pH-Wert auf über 9,5 einstellen	
50 %	<i>aqua bidest.</i>		
40 %	Methanol		
10 %	Eisessig		

### 3.1.7 Chromatographie-Materialien

- Blue Sepharose FF, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
- Chelating Sepharose FF, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
- SP-Sepharose FF, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
- Superdex 75, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
- Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
- BioSIL SEC 125, Bio-RAD (München)

### 3.1.8 Nährmedien

#### 3.1.8.1 Bakterienkulturmedium

Für die Proteinexpression wurde 2xYT-Medium verwandt (Sambrook et al. 1989). Für die Anzucht von transformierten Bakterien wurde eine 2xYT-Agar-Platte eingesetzt. Alle Medien wurden autoklaviert. Das agarhaltige Medium wurde zum Gießen der Platten in der Mikrowelle gekocht.

Da die eingesetzten Clone eine Ampicillin-Resistenz besitzen, wurde dem Medium sterilfiltriertes Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 mg/l zugesetzt.

2xYT-Medium (1 l):	16 g	Trypton	2xYT-Agar:	1 l	2xYT-Medium
	10 g	Hefeextrakt		16 g	Agar
	10 g	NaCl			
		pH 7,3 – 7,5			

### 3.1.8.2 Zellkulturmedium

Für die Zellkultur wurden Medien in Pulver- und Flüssigform entsprechend den Wachstumsbedingungen der einzelnen Zelllinien angesetzt.

Die Rohmedien sowie die Zusätze wurden, sofern nicht anders angegeben, in der Regel von der Firma Invitrogen (NL) bezogen.

Im Einzelnen sind dies:

- CHO-S-SFM II (flüssig)
- FCS US-origin (flüssig)
- Fungizone (flüssig)
- MEM-□ mit Ribonukleosiden und Desoxiribonukleosiden (flüssig)
- MEM-□ ohne Ribosukleoside und Desoxiribonukleoside (Pulver)
- MEM-*Vitamins* (100 x) (flüssig)
- Penicillin/Streptomycin (flüssig)
- RPMI-1640 (Pulver)
- DMEM high glucose (Pulver)
- Trypsin/EDTA (flüssig)

HSA und Natriumcholat wurden als Pulver von der Firma Sigma bezogen.

## 3.1.9 Verwendete Organismen

### 3.1.9.1 Bakterienstämme

SoloPack Gold (Superkompetente Zellen):

Tetr D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1  
gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]

*E.coli* K12 JM105:

thi rpsL endA sbcB15 hspR4 □(lac-proAB) (F' traD36 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup>  
ZDeltaM15)

*E.coli* K12 MM294:

F<sup>-</sup> endA1 thi-1 hsdR17 supE44 lambda-

*E.coli* K12 BL21 DE3:

F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub>) *gal* ␣(DE3)

### 3.1.9.2 Zellkulturzelllinien

A549: Humane epitheliale Lungenkarzinomzellen (Erstdepot 1972), DSMZ, Nr. DSM ACC 107

CHO dhfr<sup>-</sup>: epitheliale Zellen aus den Eierstöcken des chinesischen Hamsters, die Dehydrofolatreduktase negativ sind, DSMZ, Nr. DSM ACC 126

Caco-2: Humane colorectale Adenocarcinoma Zellen, DSMZ, Nr DSM ACC 169

### 3.1.10 Varianten des IFN-␣

Bezeichnung	Erklärung
IFN-␣ <i>wt</i>	rekombinantes humanes IFN-␣ 1a
IFN-␣ 1x	rekombinantes humanes IFN-␣ mit einem Cys17Ser-Austausch und einer Deletion des initialen Methionins
IFN-␣ 8x	rekombinantes humanes IFN-␣ mit folgenden acht Aminosäureaustauschen: Leu5Ser, Phe8Ser, Leu47Ser, Phe50Ser, Leu106Ser, Phe11Ser, Leu116Ser und Leu120Ser
IFN-␣ 9x	rekombinantes humanes IFN-␣ mit folgenden neun Aminosäureaustauschen: Leu5Ser, Phe8Ser, Cys17Ser, Leu47Ser, Phe50Ser, Leu106Ser, Phe11Ser, Leu116Ser und Leu120Ser

### 3.1.11 Varianten des IFN-␣

Bezeichnung	Erklärung
IFN-␣ <i>wt</i>	rekombinantes humanes IFN-␣
IFN-␣ <i>wt</i> D63C	rekombinantes humanes IFN-␣ mit einem Asn63Cys-Austausch
IFN-␣ <i>wt</i> S99C	rekombinantes humanes IFN-␣ mit einem Ser99Cys-Austausch

IFN- $\gamma$ /69	rekombinantes humanes IFN- $\gamma$ mit einer Disulfidbrücke nach folgenden zwei Austauschen: Glu7Cys und Ser69Cys
IFN- $\gamma$ /69 D63C	rekombinantes humanes IFN- $\gamma$ mit einer Disulfidbrücke nach folgenden zwei Austauschen: Glu7Cys und Ser69Cys ein zusätzlicher Austausch von Asp63Cys
IFN- $\gamma$ /69 S99C	rekombinantes humanes IFN- $\gamma$ mit einer Disulfidbrücke nach folgenden zwei Austauschen: Glu7Cys und Ser69Cys ein zusätzlicher Austausch Ser99Cys
IFN- $\gamma$ /69 C-10	rekombinantes humanes IFN- $\gamma$ mit einer Disulfidbrücke nach folgenden zwei Austauschen: Glu7Cys und Ser69Cys C-terminale Verkürzung um 10 Aminosäuren
IFN- $\gamma$ /69 S99C C-10	rekombinantes humanes IFN- $\gamma$ mit einer Disulfidbrücke nach folgenden zwei Austauschen: Glu7Cys und Ser69Cys C-terminale Verkürzung um 10 Aminosäuren ein zusätzlicher Austausch Ser99Cys
IFN- $\gamma$ /69 D63C S99C	rekombinantes humanes IFN- $\gamma$ mit einer Disulfidbrücke nach folgenden zwei Austauschen: Glu7Cys und Ser69Cys zwei zusätzliche Austausche Asn63Cys und Ser99Cys

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Mini-Präparation nach Qiagen

Die Mini-Präparation erfolgte nach einem adaptierten Protokoll der Herstellerfirma.

Zunächst wurden die plasmidhaltigen Bakterien in einer 4 ml „Über Nacht“-Kultur in YT-Medium mit Ampicillin angezogen. Aus dieser Kultur wurden 1 – 1,5 ml abgenommen und die Bakterien abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 250  $\mu$ l Puffer P1 resuspendiert und mit 250  $\mu$ l Lysispuffer P2 versetzt. Nach mehrfachem Umschwenken wurde für fünf Minuten bei RT inkubiert, bevor die Lyse mit 350  $\mu$ l Neutralisationspuffer N3 gestoppt wurde.

Nach erneutem mehrfachem Umschwenken wurde die Probe auf Eis für fünf Minuten inkubiert, bevor die Bakterientrümmel abzentrifugiert wurden (10 min, 14.000 rpm, 4° C).

Der geklärte Überstand wurde auf eine QiaSpin-Säule übertragen und durch das Säulenmaterial zentrifugiert (1 min, 14.000 rpm, 4° C). Die Säule wurde nun zunächst mit

500 µl Waschpuffer PB und anschließend mit Waschpuffer PE gewaschen. Nach jedem Auftrag wurde die Säule für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert.

Nach dem zweiten Waschschrift wurde die Säule trocken zentrifugiert, bevor 50 µl *aqua bidest.* zur Elution der DNA aufgetragen wurde. Das *aqua bidest.* inkubierte für eine Minute bei RT auf der Säule, bevor die Säule erneut abzentrifugiert wurde.

Im Durchfluss befand sich die Plasmid-DNA.

### 3.2.1.2 Midi-Präparation nach Qiagen

Die Midi-Präparation erfolgte nach Vorschrift des Herstellers.

Zunächst wurden die plasmidhaltigen Bakterien in einer 200 ml „Über Nacht“-Kultur in YT-Medium mit Ampicillin angezogen. Diese Kultur wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 4 ml Puffer P1 resuspendiert und mit 4 ml Lysispuffer P2 versetzt. Nach mehrfachem Umschwenken wurde für fünf Minuten bei RT inkubiert, bevor die Lyse mit 4 ml eiskaltem Neutralisationspuffer P3 gestoppt wurde.

Nach erneutem mehrfachem Umschwenken wurde die Probe auf Eis für fünf Minuten inkubiert, bevor die Bakterientrümmel abzentrifugiert wurden (JS 13.1, 30 min, 10.000 rpm, 4° C).

Der geklärte Überstand wurde auf eine zuvor mit 4 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Midi-Säule übertragen. Mittels Gravitation lief die Probe durch das Säulenmaterial.

Nach dem Auftrag wurde das Säulenmaterial mit 2 x 10 ml Puffer QC gewaschen, bevor zur Elution 5 ml Puffer QF aufgetragen wurden.

Das Eluat wurde anschließend mit 3,5 ml Isopropanol zur Fällung der DNA versetzt. Nach Umschwenken wurde die gefällte DNA abzentrifugiert (JS 13.1, 30 min, 10.000 rpm, 4° C).

Zur Waschung nahm man die abzentrifugierte DNA in 2 ml 70 % Ethanol auf und zentrifugierte erneut (JS 13.1, 20 min, 10.000 rpm, 4° C).

Die gefällte DNA wurde nun im Vakuum getrocknet und anschließend in 100 µl *aqua bidest.* aufgenommen.

### 3.2.1.3 PCR

#### 3.2.1.3.1 Capture-PCR zur Umklonierung von IFN- $\gamma$

Das IFN- $\gamma$ -Gen (*wt*-Gen für Bakterien = Cys17Ser) befindet sich ebenso wie das Gen für die 8x und 9x-Variante in dem Vektor pET19b. Dieser ist IPTG induzierbar, besitzt jedoch einen

Regulationsmechanismus, welcher die Induktion mit geringen IPTG-Konzentrationen verhindert.

Eine niedrige IPTG-Konzentration ist jedoch notwendig, um Proteine nach dem löslichen Verfahren zu produzieren. Aus diesem Grund sollten die Gene für IFN- $\gamma$  wt, 8x und 9x in den Vektor pKK233-2 kloniert werden. Da die Multiple cloning sites von pET19b und pKK233-2 nicht schnittstellengleich sind, werden die Gene über eine PCR aus dem pET19b gefischt, während der PCR mit den entsprechenden Schnittstellen versehen nach einem Restriktionsverdau mit dem entsprechend geschnittenen pKK233-2 ligiert.

Als Schnittstellen wurden BspH I vor dem Gen und Hind III nach dem Gen gewählt.

Für die *capture*-PCR wurde zunächst folgender Ansatz gewählt.

5 $\mu$ l	pET19b $\gamma$ wt, $\gamma$ 8x oder $\gamma$ 9x (aus Midi)
2 $\mu$ l	Bspbetafw-Primer (100 pM)
2 $\mu$ l	Hindbetabw-Primer (100 pM)
2,5 $\mu$ l	PWO-Puffer
2 / 4 / 6 $\mu$ l	MgSO <sub>4</sub>
10,5 / 8,5 / 6,5 $\mu$ l	<i>aqua bidest.</i>
1 $\mu$ l	PWO-Polymerase (1 U/ $\mu$ l)

Als *cycling*-Protokoll wird BETAFIX gewählt.

PCR-Zyklus 30 x	94° C	2:00	Denaturieren
	55° C	0:45	<i>annealing</i>
	72° C	1:30	Elongation
	4° C	for ever	Kühlung

Variationen der PCR wurden über die Wahl verschiedener *failsafe*-Puffer (unterschiedliche Salzzusammensetzungen und -konzentrationen) und die *annealing*-Temperatur eingebracht.

### 3.2.1.3.2 Sequenzier-PCR

Als Ansatz für die Sequenzier-PCR wurde folgender Ansatz gewählt:

2 $\mu$ l	DNA
5 $\mu$ l	Primer (5 pmol final)
1 $\mu$ l	Wasser
2 $\mu$ l	<i>Big Dye Ready Reaktion Mix</i>

Als Programm für den Thermocycler kam das Protokoll CycleIPF zum Einsatz, welches wie folgt aussieht:

20 PCR-Zyklen	95° C	10 sec	Denaturieren
	50° C	5 sec	<i>annealing</i>
	60° C	240 sec	Elongation
	4° C	for ever	Kühlung

Nach der PCR wurde der Ansatz in 80 µl *aqua bidest.* aufgenommen und mit 10 µl 3M NaAc versetzt. Zur Fällung wurden 250 µl Ethanol *abs.* zugesetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Die gefällte DNA wurde in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (14.000 rpm, 4° C, 30 min) und mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen.

Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt (14.000 rpm, 4° C, 30 min) wurde die DNA im Vakuum getrocknet und anschließend in 10 µl *Template Suppression Reagent* aufgenommen. Nach einem Aufkochen (90° C, 2 min) wurden die Proben in die Sequenziergefäße überführt und in den Sequenzierautomaten gegeben.

### 3.2.1.3.3 PCR zur Mutation von IFN- $\gamma$

Eine Mutations-PCR wurde zur Erzeugung der verschiedenen Varianten des IFN- $\gamma$  eingesetzt, die sich an eine PCR-Protokoll von Stratgen orientiert. Hierzu wurden Primerpärchen gewählt, die ein *mismatch* von bis zu drei Basen, je nach gewünschter Mutation am Primerbeginn haben. Während der Elongationsphase der PCR wurde das gesamte Plasmid mitrepliziert. Nach dem zweiten Zyklus waren dann bereits die ersten mutierten, linearisierten Plasmide vorhanden.

Über diese Methode wurden die Varianten IFN- $\gamma$ wt D63C, IFN- $\gamma$ 7/69 D63C und IFN- $\gamma$ 7/69 S99C von Tobias Thomas im Rahmen einer Diplomarbeit generiert.

Als eine weitere Variante sollte eine Doppelmutante für die Thiol-PEGylierung vorbereitet werden. Diese besitzt außer den beiden Cysteineintauschen 7 und 69 noch einen um 10 Aminosäuren verkürzten C-Terminus. Zusätzlich sollte in diese Variante noch ein drittes Cystein an Position 99 mutiert werden. Hierzu diente der folgende Ansatz.

- 2 µl DNA aus Midi (pKK-233-2 + IFN- $\gamma$ 7/69 C-10)
- 2 µl Primer reverse (100 pmol/µl)
- 2 µl Primer forward (100 pmol/µl)
- 18 µl *aqua bidest.*
- 25 µl Failsafe D (2x)-Puffer

Die PCR erfolgte *alshot start*, d.h. die Polymerase PWO (1  $\mu$ l PWO-Polymerase [1 U/ $\mu$ l]) wurde erst nach einem ersten vierminütigen Denaturieren der DNA bei 90° C zugesetzt.

Als *cycling*-Protokoll wurde das STRATA-50-Protokoll eingesetzt, nach welchem die PCR der Varianten von Tobias Thomas durchgeführt wurden:

<i>hot start</i>	4:00 min	95° C	Denaturieren
PCR-Zyklus (12 x)	0:45 min	95° C	Denaturieren
	1:00 min	50° C	<i>Annealing</i>
	10:00 min	68° C	<i>Elongation</i>
Kühlung	<i>for ever</i>	4° C	

Nach Ablauf des Programms wurde zur Abtrennung der PWO und der für die PCR nötigen Salze die DNA gefällt. Hierzu wurde der PCR-Ansatz mit *aqua bidest.* auf ein Volumen von 90  $\mu$ l gebracht. 10  $\mu$ l 3M Natriumacetat (pH5,2) wurden zugesetzt und anschließend gab man 250  $\mu$ l Ethanol *abs.* zur Fällung hinzu.

Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde abzentrifugiert (14.000 rpm, 30 min, 4° C). Das Pellet wurde anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (14.000 rpm, 20 min 4° C). Anschließend wurde das Pellet im Vakuum getrocknet, bevor es in 17  $\mu$ l *aqua bidest.* aufgenommen wurde.

Zur Entfernung des *templates* wurde obiger Ansatz mit DpnI verdaut.

### 3.2.1.4 Restriktionsverdau

Restriktionsverdaue wurden sowohl analytisch als auch präparativ eingesetzt. Beim analytischen Restriktionsverdau wird DNA aus neuen Klonen auf ihre Richtigkeit geprüft, indem sie mit einem und oder mehreren Endonukleasen geschnitten wird. Erhält man die gewünschten Schnittmuster, ist die DNA vorerst als richtig einzustufen. Erst eine Sequenzierung gibt Aufschluss darüber, ob eventuell Punktmutationen aufgetreten sind.

Bei dem präparativen Restriktionsverdau werden PCR-Produkte (Inserts) und Vektoren mit den jeweils gleichen Endonukleasen geschnitten. Dadurch entstehen überhangsgleiche Enden an Vektor und Insert, welches eine Ligation dieser beiden ermöglicht.

#### 3.2.1.4.1 DpnI-Verdau

*DpnI* ist ein Restriktionsenzym, welches ausschließlich methylierte DNA schneidet. Der Prozess der Methylierung von DNA ist ein aktiver Prozess, welcher in Organismen erfolgt

und dort zum Schutz der DNA vor Schädigung durch Umwelteinflüsse dient. In einer PCR kann also nur das *template*, welches über eine DNA-Präparation aus Organismen gewonnen wird, methyliert sein.

Für den *DpnI*-Verdau gab man 2 µl NEB-Puffer 4 und 1 µl *DpnI* (20.000 U/ml) zum obigen Ansatz. Anschließend wurde der Ansatz bei 37° C für zwei Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz sofort in einer präparativen Agarosegelelektrophorese eingesetzt und die gewünschte Bande ausgeschnitten.

#### **3.2.1.4.2 Analytischer Restriktionsverdau**

Für den analytischen Restriktionsverdau wählte man Endonukleasen, die entweder ein markantes Stück aus einem Plasmid schneiden oder eine Schnittstelle im Zielgen öffnen.

Je nach Zahl der eingesetzten Endonukleasen sind dazu unterschiedliche Ansätze zu wählen.

Bei nur einer eingesetzten Endonuklease:

- 2 µl DNA aus Mini
- 1 µl NEB-Puffer (Siehe empfohlenen Puffer des Herstellers für entsprechende Endonuklease)
- 1 µl NEB-Endonuklease
- 6 µl *aqua bidest.*

Bei zwei eingesetzten Endonukleasen:

- 4 µl DNA aus Mini
- 2 µl NEB-Puffer
- 1 µl NEB-Endonuklease 1
- 1 µl NEB-Endonuklease 2
- 14 µl *aqua bidest.*

Diese Ansätze wurden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur (in der Regel 37° C) für 1 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Proben auf ein Agarosegel gegeben und analysiert.

### 3.2.1.4.3 Präparativer Restriktionsverdau

Beim präparativen Restriktionsverdau wurden PCR-Produkte, Plasmide mit gewünschten Genen und Vektoren eingesetzt. Je nach DNA-Quelle wurden unterschiedliche Ansätze gewählt.

Für DNA aus PCR:

- 10  $\mu$ l PCR-Ansatz nach Fällung
- 2  $\mu$ l NEB-Puffer
- 1  $\mu$ l NEB-Endonuklease 1
- 1  $\mu$ l NEB-Endonuklease 2
- 6  $\mu$ l *aqua bidest.*

Für Plasmid-DNA und Vektoren

- 5  $\mu$ l DNA aus Midi
- 2  $\mu$ l NEB-Puffer
- 1  $\mu$ l NEB-Endonuklease 1
- 1  $\mu$ l NEB-Endonuklease 2
- 11  $\mu$ l *aqua bidest.*

Beide Ansätze wurden mit der vom Hersteller empfohlenen Temperatur für 1 h inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Ansätze auf ein Agarosegel gegeben und die gewünschten Banden geextrahiert.

### 3.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde sowohl analytisch als auch präparativ eingesetzt.

Je nach Probenzahl wurde ein kleines Gel (8 Probenaschen) oder ein großes Gel (15, 20 oder 30 Probenaschen) vorbereitet. Hierzu wurde Agarose in einer Konzentration von 1 % in TBE unter Kochen aufgelöst. Die gelöste Agarose wurde anschließend auf circa 50 – 60° C unter Rühren abgekühlt, bevor sie in die Gussform gegeben wurde. In die Agarose wurde ein Probenkamm für oben beschriebene Probenaufkommen eingesetzt.

Nach dem Erstarren wurde das Gel aus der Gussform genommen und so in die Elektrophoresegelkammer eingesetzt, dass die Probenaschen der Kathode der Gelkammer am nächsten waren. Nachdem das Gel mit TBE überschichtet war, wurde der Probenkamm gezogen.

Bevor nun die DNA aufgetragen wurde, musste diese mit einem glycerinhaltigen Probenpuffer versetzt werden. Anschließend wurden bis zu 15 µl DNA pro Probenflasche auf das Gel aufgetragen.

Als Marker wurden  $\lambda$ -Marker (BstE II-Verdau der DNA des  $\lambda$ -Phagen) und/oder  $\lambda$ X-Marker (Hae III-Verdau der DNA des Phagen  $\lambda$ X174) je nach Größe des Plasmides, des PCR-Produktes oder der Schnittbande eingesetzt.

Nach dem Auftrag der Proben wurde eine Spannung von 100 V angelegt und die Elektrophorese somit gestartet.

Die Elektrophorese dauerte zwischen 40 min und 1,5 h. Anschließend wurde das Gel in eine Wanne mit TBE und dem DNA-Farbstoff Ethidiumbromid gegeben. Nach weiteren 15 min konnten die DNA-Banden unter UV-Licht analysiert und gegebenenfalls ausgeschnitten werden.

### 3.2.1.6 Gelextraktion nach Qiagen

Die Gelextraktion erfolgte nach Vorschrift des Herstellers.

Zunächst wurden die gewünschten Banden aus dem Ethidiumbromid befärbten Agarosegel möglichst exakt ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt.

In diesem wurde dem Agarosegelblöckchen ein 3,5faches Volumen (w/v) des Puffers QG zugesetzt.

Durch Erhitzen auf 50° C für 10 min wurde die Agarose im Puffer aufgelöst. Diese Lösung wurde nun auf eine Geextraktionssäule gegeben und bei 14.000 rpm durchzentrifugiert (4° C, 1min).

Die Säule wurde anschließend gewaschen, indem zunächst 500 µl Puffer QG und anschließend 750 µl Puffer PE ( Nach Auftrag von Puffer PE 5 min bei RT inkubieren) durch die Säule zentrifugiert wurden (14.000 rpm, 4° C, 1 min).

Nach einem Trockenzentrifugieren (14.000 rpm, 4° C, 1 min) inkubierte die Säule für 5 min bei RT.

Nach dem Auftrag von 20 µl *aqua bidest.* inkubierte die Säule erneut für 5 min bei RT, bevor die DNA durch Zentrifugation (14.000 rpm, 4° C, 1min) eluiert wurde.

### 3.2.1.7 Ligation

#### 3.2.1.7.1 Ringschluss

Nach einer Mutations-PCR musste das PCR-Produkt zu einem Plasmidring geschlossen werden. Hierzu werden 10 µl der aus der Gelextraktion gewonnene DNA mit 7 µl *aqua bidest.*, 2 µl T4 Ligase-Puffer und 1 µl T4 Ligase (400.000 U/ml) zusammengegeben und für 15 -30 min bei RT inkubiert.

Zur Inaktivierung der Ligase wurde der Ansatz anschließend für 10 min bei 65° C inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis konnte die DNA direkt in die Transformation eingesetzt werden.

#### 3.2.1.7.2 Vektor-Insert-Ligation

Zur Ligation wurden geschnittener Vektor und geschnittenes Insert im Verhältnis 1:3 zusammengegeben. Mit *aqua bidest.* wurde das Volumen auf 17 µl aufgefüllt, bevor man 2 µl T4 Ligase-Puffer und 1 µl T4 Ligase (400.000 U/ml) zusetzte. Anschließend wurde der Ansatz bei RT für 15 – 20 min inkubiert. Zur Inaktivierung der Ligase wurde bei 65° C für 10 min inkubiert und anschließend auf Eis heruntergekühlt.

Der Ansatz wurde nach der Inaktivierung direkt in die Transformation eingesetzt.

### 3.2.1.8 Darstellung kompetenter Zellen

#### 3.2.1.8.1 JM 105 und JM 109

Für die Transformation der JM 105 und JM 109 Bakterienzellen wurden diese nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode kompetent gemacht.

Hierzu wurden die Bakterien aus einer üN-Kultur in eine 10 ml Kultur (2xYT ohne Amp) überimpft und bei 37°C und 300 rpm bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von etwa 0,7 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (3.000 rpm, 15 min, 4°C, Heraeus Minifuge RF) und der Überstand verworfen.

Das Pellet wurde in 5 ml eisgekühlter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und das Pellet in 500 µl eiskalter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen. Eine weitere Inkubation für 30 min auf Eis schloss sich an.

Die so behandelten Zellen waren transformationskompetent, wurden bei 4°C gelagert und konnten innerhalb von 24 h für die Transformation verwendet werden.

### 3.2.1.8.2 MM294

Aus einer Cryokultur wurde eine 4 ml üN-Kultur der MM 294 in YT-Medium angesetzt und über Nacht bei 30° C inkubiert.

Aus der üN-Kultur wurde eine 100 ml Kultur (YT-Medium) 1:100 überimpft und bei 30 °C (~250 rpm) inkubiert. Bei einer optischen Dichte von  $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$  wurde die Kultur auf Eis für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in zwei 50 ml Blue Caps abzentrifugiert (4.500 rpm, 5 min 4° C, Heraeus Minifuge RF).

Die Pellets wurden in je 3 ml frisch angesetztem eiskaltem Resuspensionspuffer aufgenommen und mit diesem Puffer auf ein Volumen von 25 ml aufgefüllt. Nach einer weiteren Inkubation für 45 min auf Eis wurden die Bakterien wieder abzentrifugiert (3.000 rpm, 4° C, 5 min, Heraeus Minifuge RF).

Nun wurden die Bakterienpellets vorsichtig in 2,5 ml eiskaltem Resuspensionspuffer, dem 15 % (v/v) Glycerin zugesetzt wurde, aufgenommen und in 50 µl *aliquots* aufgeteilt.

Die Aliquots wurden bei -80° C bis zur Transformation gelagert. Die tiefgefrorenen Zellen waren bis zu zwei Monaten transformationskompetent.

### 3.2.1.9 Transformation

Zur Transformation wurden kompetente Zellen (50 µl *aliquot*) auf Eis aufgetaut. Zu den aufgetauten Zellen gab man 2,5 µl DNA aus der Ligation oder Midi.

Dieser Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 90 sec währender *heat shock* (Superkompetente Zellen 52° C, MM294, JM 105 und JM 109 42° C), bevor die Zellen erneut auf Eis abgekühlt wurden.

Nach dem Abkühlen gab man 250 µl YT-Medium auf die Bakterien und inkubierte für 1 h bei 37° C. Anschließend wurden die Ansätze auf YT+Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C inkubiert.

Die transformierten Klone wurden am nächsten Tage gepickt und in einer Minikultur ausgesät.

### 3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.2.1 Expression und Aufarbeitung von IFN- $\gamma$ aus Bakterienzellen

IFN- $\gamma$  ist ein sehr hydrophobes Protein, daher ist es nur möglich, dieses mit Hilfe von Seifen oder anderen Lösungsvermittlern in Lösung zu halten. Ohne oder bei zu geringen Lösungsvermittlerkonzentrationen besteht die Gefahr von Aggregation des IFN- $\gamma$ .

##### 3.2.2.1.1 Expression von IFN- $\gamma$ in inclusion bodies

Zunächst wurde IFN- $\gamma$  in *e.coli* expremiert. Hierzu wurde eine *e. coli*-Bakterienlinie (BL21 DE3) mit dem Plasmid für IFN- $\gamma$  1x (pET19b $\gamma$ 1x), IFN- $\gamma$  8x (pET19b $\gamma$ 8x) oder IFN- $\gamma$  9x (pET19b $\gamma$ 9x) transformiert.

Diese Klone wurden in 50 ml  $\mu$ N-Kulturen (37° C, 300 rpm) angezogen. Aus diesen Kulturen wurden jeweils 2 l Expressionskulturen in vier 2 l-Kolben 1:50 überimpft (2xYT + Amp).

Die Expressionkultur wurde bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600\text{ nm}} = 0,6$  bei 37° C und 300 rpm inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Expressionskultur mit 1 mM IPTG (final) induziert.

Eine weitere Inkubation bei 37° C und 300 rpm folgte. Diese wurde bei einer  $OD_{600\text{ nm}} = 1,8 - 2,0$  abgebrochen und die Bakterienzellen abzentrifugiert (Avanti J-25, JA 14, 6.000 rpm, 15 min, 4° C). Das so gewonnene Bakterienpellet wird mit 40 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert (Avanti J-25, JA 14, 6.000 rpm, 15 min, 4° C) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° C eingefroren.

##### 3.2.2.1.2 Aufarbeitung von IFN- $\gamma$ aus inclusion bodies

Das gefrorene Bakterienpellet wurde mit 80 ml PBS überschichtet.

Durch Ultraschall (*cycle 1, amplitude 80, 6 x 30 sec mit 30 sec Pause auf Eis*) wurden die Bakterienzellen aufgebrochen.

Das Bakterienlysat wurde abzentrifugiert (Avanti J-25, JS 13.1, 10.000 rpm, 15 min, 4° C) und das Pellet erneut in 80 ml PBS aufgenommen.

Wieder wurde die Suspension mit Ultraschall behandelt (2 x 30 sec) und abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt.

Nach dem zweiten Waschen wurde das Pellet in einem Puffer aus 4 M Harnstoff, 25 mM DTT und 100 mM Tris (pH 8,5) aufgenommen und durch Ultraschall suspendiert.

Die Suspension wurde für 45 min unter Schwenken bei RT inkubiert, bevor erneut zentrifugiert wurde (Avanti J-25, JS 13.1, 10.000 rpm, 30 min, 4° C).

Das gewonnene Pellet wurde nun mit Ultraschall in 60 ml einer 1% Sulfobetain SB 14-Lösung suspendiert und für 30 min bei RT geschwenkt.

Nachdem die Suspension erneut abzentrifugiert wurde (Avanti J-25, JS 13.1, 10.000 rpm, 30 min, 4° C), wurde das Pellet in 60 ml *aqua bidest.* aufgenommen und auf 100 mM Mercaptoethanol eingestellt. Nach 30 min Inkubation unter Schwenken bei RT wurde diese Suspension mit konzentrierter Natronlauge auf einen pH-Wert von ca. 12 gebracht. Die Suspension wurde dann für 1 min bei RT gerührt, bevor ein gleiches Volumen einer 5 % Sulfobetain SB 14-Lösung zugesetzt wurde. Nach weiteren 2 min Rühren wurde der pH-Wert langsam mit konzentrierter Salzsäure auf 8,5 gesenkt. Dabei präzipitierende, verunreinigende Proteine wurden durch Zentrifugation (Avanti J-25, JS 13.1, 10.000 rpm, 30 min, 4° C) abgetrennt. Der IFN- $\alpha$ -haltige Überstand wurde bis zum Auftrag auf die Chelating Sepharose bei 4° C gelagert.

### **3.2.2.1.3 Chromatographische Aufreinigung von IFN- $\alpha$ aus inclusion bodies**

Eine Bindung von Proteinen an eine Metallchelate-Säulenmatrix erfolgt über die Aminfunktionen basischer Aminosäuren oder Histidines. Unterschiedliche Metallionen an der Matrix bedingen unterschiedliche Bindungseigenschaften gegenüber Proteinen. Für IFN- $\alpha$  sind Zinkionen am besten geeignet.

Bevor der IFN- $\alpha$ -haltige Überstand auf die Chelating Sepharose aufgetragen werden konnte, musste diese entsprechend vorbereitet werden. Hierzu wurde zunächst bei einer Flussrate von 2,5 ml/min das Chelating Sepharose-Material mit 2  $V_0$  Stripping-Puffer (20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,2), 20 mM EDTA, 0,5 M NaCl) gespült. Nach einer anschließenden Spülung mit 5  $V_0$  *aqua bidest.* wurde in einem zweiten Waschschrift mit 2  $V_0$  0,1 M Natronlauge gespült.

Bis zur vollständigen Entfernung von Natronlangeresten wurde nun mit *aqua bidest.* gespült (> 10  $V_0$ ). Nun wurde der pH-Wert auf pH 5,0 eingestellt (Puffer: 0,1 M NaAc, 0,5 M NaCl). Nach der pH-Einstellung wurde das Material mit Zinkionen über 4  $V_0$  zinkhaltigem Puffer (0,1 M NaAc (pH 5,0), 0,5 M NaCl, 0,1 M  $\text{ZnCl}_2$ ) beladen. Im Anschluss an die Beladung wurde das Säulenmaterial durch Spülung mit *aqua bidest.* von überschüssigem Zink befreit (> 10  $V_0$ ) und auf den Auftragspuffer eingestellt (25 mM Tris (pH 8,5), 50 mM NaCl, 0,05 % Sulfobetain SB 14).

Für den Auftrag des IFN- $\alpha$ -haltigen Überstandes musste dieser zunächst auf die Auftragspufferbedingungen eingestellt werden (von 2,5 % Sulfobetain auf 0,05 % Sulfobetain

verdünnt in Auftragspuffer ohne Sulfobetain). Anschließend wurde diese Verdünnung auf das Chelating Sepharose-Material gegeben.

Die Elution erfolgte anschließend über einen pH-Sprung (pH 8,5 → pH 5,0) bei einer Flussrate von 1 ml/min, wobei ein Puffer aus 0,1 M NaAc (pH 5,0), 0,5 M NaCl und 0,05 % Sulfobetain SB 14 zum Einsatz kam. Die Elution wurde bei 280 nm im Durchflussphotometer überwacht. Fraktionen von 1 ml wurden im Bereich des Elutionspeaks aufgefangen.

### **3.2.2.2 Aufarbeitung von IFN- $\alpha$ aus CHO-Zellen**

Wie im Kapitel „Methoden der Zellkultur“ beschrieben, wurden aus den CHO-Kulturflaschen alle 2-3 Tage 2/3 des Mediums ausgetauscht. Das von den Zellen befreite Medium wurde über mehrere Wochen gesammelt, bis ein Volumen von 8,5 l zusammengekommen war.

Diese 8,5 l Zellkulturüberstand wurden mit 1,5 l Ethylenglycol und 1 M NaCl versetzt und auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Anschließend wurde der so vorbereitete Zellkulturüberstand auf eine „Blue Sepharose“-Säule aufgetragen.

#### **3.2.2.2.1 Chromatographische Aufarbeitung von IFN- $\alpha$ aus CHO-Zellkulturüberstand**

Bevor der vorbereitete Zellkulturüberstand auf das „Blue Sepharose“-Material aufgetragen werden konnte, musste das Material entsprechen vorbereitet werden. Hierzu wurde die Säule zunächst bei einer Flussrate von bis zu 4 ml/min mit 4  $V_0$  0,1 M NaOH, 2  $V_0$  *aqua bidest.* und 4  $V_0$  KSCN (2M) gespült. Zur Equilibration des Materials an die Auftragsbedingungen wurde anschließend mit 5  $V_0$  Auftragspuffer (15 % Ethylenglycol, 1 M NaCl und 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2) gespült. Nun konnte der vorbereitete Zellkulturüberstand mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen werden.

Nach dem Auftrag wurde das Säulenmaterial mit 5  $V_0$  Auftragspuffer und im Falle des IFN- $\alpha$  *wt* zusätzlich mit 3  $V_0$  Waschpuffer (30 % Ethylenglycol, 1 M NaCl und 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2) gespült.

Zur Elution wurde ein Elutionspuffer mit 60 % Ethylenglycol, 1 M NaCl und 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  bei pH 7,2 verwandt. Die Elution wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm in einem Spektralphotometer kontrolliert. Proteinhaltige Fraktionen wurden gesammelt und nach einer Kontrolle im Spot-blot zur weiteren Aufarbeitung vereinigt.

Der zweite chromatographische Reinigungsschritt verlief für IFN- $\alpha$  *wt* und IFN- $\alpha$  9x nach unterschiedlichen Vorschriften ab. In beiden Fällen wurde jedoch eine Chelating Sepharose

FF genutzt, die mit Zinkionen beladen war. Diese wurde nach folgendem Verfahren vorbereitet. Zunächst wurde das Säulenmaterial mit 1  $V_0$  *stripping*-Puffer (0,05 M EDTA, 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2) von zweiwertigen Metallionen befreit. Anschließend folgten Spülungen mit 2  $V_0$  *aqua bidest.*, 2  $V_0$  NaOH (1 M) und mindestens 10  $V_0$  *aqua bidest.* Zur pH-Einstellung für den Zinkauftrag wurde das Material mit 2  $V_0$  pH-Adaptionspuffer (0,1 M NaAc, 0,5 M NaCl, pH 5,0) und anschließend mit 2  $V_0$  Zink-Beladepuffer (0,1 M  $\text{ZnCl}_2$ , 0,1 M NaAc, 0,5 M NaCl, pH 5,0) gespült.

Zur Befreiung von ungebundenen Zinkionen wurde das Säulenmaterial hinreichend mit *aqua bidest.* gespült. Die Auswaschung wurde über einen Zinkcarbonatausfall getestet. Hierzu wurden wenige Tropfen Säulendurchfluss in eine gesättigte Natriumcarbonatlösung gegeben. Waren noch Zinkionen im Durchfluss enthalten, entstand ein weißer Zinkcarbonatniederschlag.

Nachdem das Säulenmaterial von freien Zinkionen befreit war, wurde es auf die Auftragsbedingungen eingestellt. Hierzu wurde das Säulenmaterial mit 3  $V_0$  Auftragspuffer (30 % Ethylenglycol, 0,5 M NaCl und 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0) gespült.

Zum Auftrag des IFN- $\alpha$ -haltigen „Blue Sepharose“-Eluats auf die Chelating Sepharose wurde dieses auf die Auftragspufferbedingungen eingestellt (Verdünnung von 1 + 1 mit 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6,8) und mit einer Flussrate von 1 ml/min auf das Material gegeben. Nach dem Auftrag wurde das Säulenmaterial mit 3  $V_0$  Auftragspuffer und 5  $V_0$  Waschpuffer (für IFN- $\alpha$  wt 0,5 M NaCl, 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0, bzw. für IFN- $\alpha$  9x 10 % Ethylenglycol, 0,5 M NaCl, 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0) gespült.

IFN- $\alpha$  wt wurde von der Chelating Sepharose über eine pH-Stufe eluiert (0,1 M NaAc, 0,5 M NaCl (pH 4,2). IFN- $\alpha$  9x wurde über eine Imidazolstufe eluiert (0,1 M Imidazol, 10 % Ethylenglycol, 0,5 M NaCl, 0,02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0). Die Elution wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm im Durchflussphotometer überwacht und proteinhaltige Fraktionen aufgefangen.

In die Sammelgefäße wurde HSA in einer finalen Konzentration von 0,2 mg/ml oder Natriumcholat in einer finalen Konzentration 100 nm/ml vorgelegt.

Bereits diese Fraktionen konnten zur PEGylierung herangezogen werden.

Optional wurde eine Endreinigung über eine Gelfiltration durchgeführt. Hierzu wurde eine mit Superdex 75-Material gefüllte 60 cm lange Säule eingesetzt. Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde als Gelfiltrationspuffer PBS mit einem pH-Wert von 6,8 und zusätzlich 10 % Ethylenglycol im Puffer für IFN- $\alpha$  9x bzw. 0,15 M NaCl, 0,1 M NaAc, pH 4,2 für IFN-b wt eingesetzt. Die bei der Gelfiltration aufgefangenen IFN- $\alpha$ -haltigen Fraktionen wurden

vereinigt und über eine Vivaspin-Konzentrator-kammer mit einer PES-Membran (cut-off 10.000 Da) aufkonzentriert.

### **3.2.2.3 Expression und Aufarbeitung verschiedener IFN- $\gamma$ -Varianten**

Die Expression und Aufarbeitung von IFN- $\gamma$  erfolgt nach dem patentierten löslichen Verfahren von Waschütza *et al.* und ist für alle IFN- $\gamma$ -Varianten identisch.

#### **3.2.2.3.1 Expression von IFN- $\gamma$**

Der Expressionsverlauf von IFN- $\gamma$  ist von der gewählten Bakterienzelllinie abhängig.

Zunächst wurden alle Expressionsansätze mit *e. coli* JM105 durchgeführt, später wurden die Varianten 7/69 S99C und 7/69 C-10 in *e. coli* MM294 expremiert.

Die Expression erfolgte in YT-Medium mit Ampicillin (50  $\mu$ g/ml) und begann immer mit einer 50 ml „Über Nacht“-Kultur (37° C, 300 rpm). Aus dieser wurden die Expressionskulturen (4 x 500 ml) 1:50 überimpft. Eine Inkubation bei 37° C und 300 rpm wurde bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600nm} = 0,5$  angeschlossen. Dieser Zeitpunkt war für MM294 bereits nach 2 h Inkubation erreicht, für JM105 erst nach 3 – 3,5 h.

Nun wurde mit 50  $\mu$ M IPTG induziert und bei 25° C und 300 rpm inkubiert.

Bei einer  $OD_{600nm} > 1,8$  wurde die Expression gestoppt. Hierzu wurden die Bakterien abzentrifugiert (JA 14, 6.000 rpm, 15 min, 4° C). Bei MM294 war dieser Zeitpunkt nach weiteren 3 h Inkubation erreicht, bei JM105 nach weiteren 4-4,5 h.

Die abzentrifugierten Bakterienzellen wurden in PBS (pH 7,0) gewaschen und bis zur Aufarbeitung bei -20° C weggefroren.

#### **3.2.2.3.2 IFN- $\gamma$ -Aufarbeitung**

Zunächst wurde das Bakterienpellet in einem 3,5fachen des Nassgewichtes der Bakterienpellets an PBS (pH 7,0) aufgenommen und die Zellen mit Ultraschall aufgebrochen (cycles 1, amplitude 100, 5 x 30 sec mit 30 sec Pausen auf Eis). Dieses Totallysate wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (JS 13.1, 10.000 rpm, 30 min, 4° C). Durch die Zentrifugation wurden Zelltrümmer und unlösliche Proteine von der löslichen Fraktion getrennt. Nach Überführen der Überstände in frische Zentrifugationsröhrchen wurde erneut zentrifugiert, bis sich die Lösung geklärt hatte.

Der geklärte Überstand wurde auf mit PBS (pH 7,0) äquibrierte SP-Sepharose Fast Flow im *batch* gegeben. Dieser Ansatz wurde nun für eine Stunde auf Eis geschüttelt, bevor die SP-Sepharose abzentrifugiert wurde (3.500 rpm, 10 min, 4° C).

Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde die SP-Sepharose FF mit 20 ml PBS (pH 7,0) gewaschen (30 min Schütteln auf Eis) und erneut abzentrifugiert.

Anschließend erfolgte die Elution mit 3 x 10 ml PBS (pH 7,0) mit 1 M NaCl (Schütteln für 30 min auf Eis und Abzentrifugieren der SP-Sepharose).

Die Äquilibration der SP-Sepharose FF erfolgte zunächst durch ein Waschen mit PBS mit 2 M NaCl (pH 7,0) und anschließendes ausgiebiges Spülen mit PBS (pH 7,0).

Das erste Eluat wurde mit 70 % Ammoniumsulfat über Nacht bei 4° C gefällt. Die gefällten Proteine wurden abzentrifugiert (JS 13.1, 10.000 rpm, 30 min, 4° C) und in gerade so viel *aqua bidest.* aufgenommen, dass sich die gefallenen Proteine lösen.

Diese Proteinlösung wurde anschließend mit einer Gelfiltration endgereinigt. Als Säule wurde eine K9/60-Säule von Amersham Pharmacia gewählt, die mit Superdex 75-Material befüllt war. Als Laufpuffer wurde steriles PBS (pH 7,0) eingesetzt.

### 3.2.2.4 PEGylierung von Proteinen

#### 3.2.2.4.1 Thiol-PEGylierung

Für die Thiol-PEGylierung wurden die Mutanten D63C und S99C der verschiedenen IFN- $\gamma$  Varianten sowie IFN- $\gamma$  wt aus CHO und IFN- $\gamma$  8x aus *E.coli* eingesetzt.

Als PEGylierungsreagenzien wurden mPEG-MAL mit 5.000 Da, 20.000 Da und 2x20.000 Da (im Folgenden PEG 40.000 genannt) Kettenlänge eingesetzt.

Zur PEGylierung wurde ein Volumen Protein-Lösung aus der Gelfiltration mit einem Volumen einer drei- (PEG 5.000) bis fünffach (PEG 40.000) konzentrierten PEG-Lösung im entsprechenden Gelfiltrationspuffer zusammengegeben und der Ansatz bei RT für 45 min (PEG 5.000) bis 2 h (PEG 40.000) inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Ansätze über eine 0,2  $\mu$ m Membran sterilfiltriert und anschließend bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Die PEGylierungsrate und -effizienz wurden mittels SDS-PAGE kontrolliert.

### 3.2.2.4.2 Amin-PEGylierung

Für die Amin-PEGylierung konnten alle Mutanten des IFN- $\alpha$  sowie alle Varianten des IFN- $\beta$  eingesetzt werden, da die Amin-PEGylierung an der terminalen NH<sub>2</sub>-Gruppe sowie jeder frei zugänglichen NH<sub>2</sub>-Gruppe eines Proteins stattfindet.

Als PEGylierungsreagenz wurden mPEG-SPAs mit 5.000 Da und 20.000 Da Kettenlänge eingesetzt.

Wie bei der Thiol-PEGylierung wurde auch bei der Amin-PEGylierung ein Volumen Proteinlösung aus der Gelfiltration mit einem Volumen einer dreifach konzentrierten PEG-Lösung versetzt.

Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Die PEGylierungsrate und -effizienz wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert.

### 3.2.2.5 SDS-PAGE

Zur Analyse von Aufarbeitungsfractionen und PEG-Ansätzen wurde eine SDS-PAGE nach Lämmli durchgeführt.

Hierzu wurden zunächst Gele gegossen. Als Trenngel kam ein 15 %iges Polyacrylamidgel zum Einsatz, als Sammelgel ein 3 %iges Polyacrylamidgel.

Die Rezepturen sahen im Einzelnen wie folgt aus:

#### Trenngel:

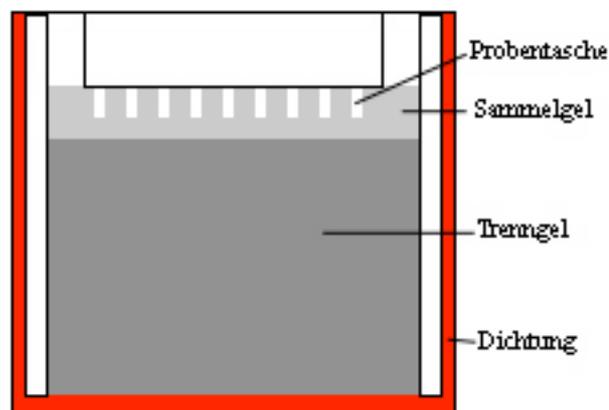
Substanz	2 Gele	4 Gele
Wasser	4 ml	8 ml
Lsg. B (1,5 M Tris, 0,4 % SDS pH 8,8)	4 ml	8 ml
Lsg. A (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1)	8 ml	16 ml
TEMED	8 $\mu$ l	16 $\mu$ l
10 % Ammoniumperoxodisulfat	160 $\mu$ l	320 $\mu$ l

**Sammelgel:**

Substanz	2 Gele	4 Gele
Wasser	3,3 ml	6,6 ml
Lsg. C (0,5 M Tris, 0,4 % SDS pH 6,8)	1,4 ml	2,8 ml
Lsg. A (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1)	1 ml	2 ml
TEMED	8 $\mu$ l	5 $\mu$ l
10 % Ammoniumperoxodisulfat	55 $\mu$ l	90 $\mu$ l

Zunächst wurden jeweils die ersten drei Zutaten vermischt und erst kurz vor dem Gießen wurden TEMED und APS zugesetzt. Das Trenngel wurde als Erstes bis 1,5-2 cm unter die obere Glaskante gegossen. Zur Glättung der Oberfläche wurde das Trenngel bis zum Aushärten mit *iso*-Butanol überschichtet.

Nach dem Aushärten wurde das *iso*-Butanol abgegossen, Reste durch Absaugen mit Filterpapierstreifen bzw. Trocknen im Pressluftstrom entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegeben. In das Sammelgel wurde der Probenkamm eingesetzt und bis zum Aushärten darin belassen. Den genauen Aufbau zeigt Abb 15.



**Abb. 17** Schematischer Aufbau eines SDS-Gels nach dem Gießen

Bevor Proben auf das Gel geladen werden konnten, mussten diese vorbereitet werden. Dazu wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt, der SDS- und mercaptoethanolhaltig war. Durch Aufkochen bei 95° C für 2 min wurden alle Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgelöst, so dass sich die Proteine nur noch durch ihre Masse voneinander unterscheiden. Das SDS brachte einen zweiten Effekt mit sich. Durch das Umhüllen der Aminosäurekette mit dem Alkananteil des SDS, so dass nur noch die Sulfatreste nach außen zeigen, wirkte die Aminosäurekette nach außen wie ein komplett negativ geladenes Teilchen.

Nach dem Auftrag von Proben und Marker auf das Gel wurde zunächst eine Stromstärke von 10 mA (1 Gel) oder 20 mA (2 Gele) angelegt. Sobald die Proben in das Gel eingedrungen waren, wurde die Stromstärke auf 25 mA bzw. 40 mA erhöht.

Die Elektrophorese wurde abgebrochen, als der Frontmarker die untere Kante des Geles erreicht hatte.

Das Gel wurde nun entweder gefärbt oder auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

### **3.2.2.5.1 Trenngele anderer Dichten**

Zur Analyse von Aggregationseffekten oder Degradationseffekten wurden zusätzlich zum 15 %igen Gel Trenngele anderer Dichte eingesetzt.

Zur Analyse von Degradationseffekten wurde ein 20 %iges Trenngel (höhere Dichte) benötigt, da dieses eine bessere Trennung im niedermolekularen Bereich zuließ.

Das Verhältnis der einzelnen Substanzen zueinander wurde hierzu wie folgt geändert:

<b>Substanz</b>	<b>2 Gele</b>
Wasser	1 ml
Lsg. B (1,5 M Tris, 0,4 % SDS pH 8,8)	4 ml
Lsg. A (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1)	11 ml
TEMED	8 µl
10 % Ammoniumperoxodisulfat	160 µl

Aggregationseffekte führen zu größeren Einheiten, hierzu wurde ein Gel geringerer Dichte benötigt, welches besser im höhermolekularen Bereich auftrennt.

Das Verhältnis der einzelnen Substanzen zueinander wurde wie folgt geändert:

<b>Substanz</b>	<b>2 Gele</b>
Wasser	6,5 ml
Lsg. B (1,5 M Tris, 0,4 % SDS pH 8,8)	4 ml
Lsg. A (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1)	5,5 ml
TEMED	8 µl
10 % Ammoniumperoxodisulfat	160 µl

An der Zusammensetzung des Sammelgels wurde in beiden Fällen keine Veränderung vorgenommen.

### 3.2.2.6 Coomassie-Färbung

Zur Coomassie-Färbung wurde ein Gel aus der SDS-PAGE in einer Lösung aus Coomassiefärbstoff in einem Gemisch aus 12 % Eisessig, 50 % Methanol und 38 % Wasser eingelegt. Nach ca. 30 min Inkubation bei RT oder 3-5 min unter Erhitzen wurde die Färbelösung gegen einen Entfärber (12 % Eisessig, 50 % Methanol, 38 % Wasser) ausgetauscht. In diesem Entfärber wurde das Gel 1 – 2 h inkubiert, wobei nach 30 und 60 min der Entfärber gewechselt wurde.

Auf dem Gel waren nun die Proteinbanden blau angefärbt.

Die Gele wurden in Entfärber über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten gelagert.

### 3.2.2.7 Silberfärbung

Zur Silberfärbung wurde das Roti-Black Kit der Firma Roth eingesetzt. Anders als in der Vorschrift wurden immer zwei Gele mit einem Ansatz behandelt.

Zunächst wurden die Gele in 100 ml Fixierlösung (15 ml Ethanol, 12 ml Eisessig, 50 µl Formaldehyd auf 100 ml mit *aqua bidest.* auffüllen) für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4° C inkubiert.

Nach der Fixierung wurden die Gele für 3 x 10 min in 15 % Ethanol gewaschen, bevor sie für eine Minute in 100 ml Natriumthiosulfatlösung sensibilisiert wurden, welche aus den mitgelieferten *aliquots* nach Vorschrift erstellt wurde.

Nach drei 20 sec Waschschritten mit je 100 ml *aqua bidest.* wurden die Gele mit 100 ml Silbernitratlösung imprägniert. Die Silbernitratlösung wurde aus den *aliquots* des Kits nach Vorschrift erstellt.

Zwei weitere Waschschrritte mit je 100 ml *aqua bidest.* entfernten überschüssiges Silbernitrat, bevor die Gele mit 100 ml Entwicklerlösung (nach Vorschrift aus Elementen des Kits angesetzt) entwickelt wurden.

Die Entwicklung wurde gestoppt, sobald Proteinbanden sichtbar wurden. Hierzu verwarf man den Entwickler und wusch die Gele sofort 2 x mit je 100 ml *aqua bidest.*

Anschließend wurde die Färbereaktion durch 2x Waschen der Gele in je 100 ml Stopplösung (15 % Ethanol, 12 % Eisessig mit *aqua bidest.* auf 100 ml auffüllen) für 30 sec gestoppt, bevor die Gele für 10 min in 100 ml Stopplösung inkubierten.

Nach dem Stoppen wurden die Gele für mehr als 20 min in 15 % Ethanol inkubiert, bevor sie für 30 min in Trocknerlösung (10 ml Glycerin, 15 ml Ethanol, 75 ml *aqua bidest.*) inkubierten. Anschließend konnten die Gele in einer Gelrocknerkammer getrocknet werden.

### 3.2.2.8 Western blot und Immunfärbung

Für den *western blot* nach dem *semi dry*-Verfahren wurden zunächst zwei Bogen Filterkarton und ein Bogen Nitrozellulosemembran auf die Größe eines SDS-Gels geschnitten. Die Stücke wurden nun in Transferpuffer getränkt und zu einem Sandwich mit dem Gel zusammengesetzt.



**Abb. 18** Schematischer Aufbau eines Transfersandwichs. in Rot ist das zu blottende Gel dargestellt, in Blau die Nitrozellulosemembran.

Nachdem das Sandwich zwischen den Platinelektroden der Blotapparatur aufgebaut worden war, wurde eine Stromstärke von 150 mA angelegt und das Gel für 1 h auf die Nitrozellulose geblottet.

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran zunächst reversibel mit Ponceau S rot gefärbt. Dabei sichtbare Proteinbanden dienten zur Kontrolle des Transfers.

Anschließend wurde die Membran in eine TBST-Lösung mit 15 % Magermilchpulver gelegt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Blot dreimal mit TBST gewaschen und anschließend mit 10 ml TBST überschichtet. In diesen Ansatz gab man den Primärantikörper (1  $\mu$ l/10 ml) gegen das Zielprotein.

Nach einer Inkubationsdauer von 45 min – 1 h wurde der Blot erneut dreimal mit TBST gewaschen und mit 10 ml TBST überschichtet. Hier wurde nun der Sekundärantikörper (1  $\mu$ l/10 ml) gegen die Spezies des Primärantikörpers zugefügt, welcher AP-gekoppelt ist.

Der Blot wurde nun mit dem Sekundärantikörper für 45 min inkubiert, bevor erneut dreimal mit TBST gewaschen wurde. An diesen Waschschrift schloss ein weiterer Waschschrift mit AP-Puffer an, bevor das Substrat (NBT/BCIP 1:100 in AP-Puffer) auf den Blot gegeben wurde. Nach einer Entwicklungszeit von 5 – 10 min im Dunklen wurde der Blot mit Wasser gewaschen.

Banden des Zielproteins waren nun violett angefärbt!

### 3.2.2.9 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurde das Mikrobiuret-Reagenz von BioRAD eingesetzt.

Hierzu wurden jeweils 800 µl einer Proteinlösung und 800 µl des entsprechenden Puffers benötigt. Zu diesen wurden je 200 µl des Mikrobiuret-Reagenz gegeben und durch Strudeln mit der Pipette vermischt.

Nach einer Inkubation zwischen 5 min und 20 min wurden die Pufferprobe als Referenz und die Proteinprobe in Plastikküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und mit einer zuvor vermessenen Eichreihe verglichen.

Eine recht gute Messung der Proteinkonzentration erfolgte im linearen Bereich der Eichkurve zwischen 1,25 und 25 µg/ml, bei höheren Konzentrationen musste entsprechend vorverdünnt werden.

### 3.2.2.10 Proteinbestimmung über UV-Extinktion

In Fällen von Proteinlösungen im Beisein von Detergenzien, welche die Bradford-Reaktion stören, musste von der beschriebenen Proteinbestimmung nach Bradford abgewichen und eine Proteinbestimmung über die UV-Extinktion nach Layne herangezogen werden.

In einer Quarzküvette wurde eine klare Proteinlösung bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm im Photometer gemessen. Als Referenz wurde der entsprechende Puffer mit Detergenz eingesetzt.

Zur Bestimmung der Konzentration in mg/ml wurde anschließend die Formel von Warburg und Christian angewandt.

$$c_{\text{Protein}} = 1,55 \times E_{280 \text{ nm}} - 0,76 \times E_{260 \text{ nm}}$$

Bei hinreichend kleinen Detergenzkonzentrationen (>1%) konnten so hinreichend genau Proteinkonzentrationen gemessen werden.

### 3.2.2.11 Spot-Blot

Für die qualitative Abschätzung IFN-haltiger Fraktionen aus verschiedenen Chromatographieläufen wurde ein Spot-Blot eingesetzt. Hierzu wurde eine Nitrozellulosemembran in 1 cm<sup>2</sup> große Felder unterteilt. In jedes dieser Felder wurden 10 µl der zu testenden Chromatographiefraktionen pipettiert. Zusätzlich wurde ein Feld mit 10 µl eines Standards (D3b oder Rebif) beladen.

Nach dem Trocknen der Membran an der Luft wurde wie bei der im Kapitel *western blot* und Immunfärbung beschriebenen Methode der Immunfärbung weiterverfahren.

### 3.2.2.12 ELISA

Zur Messung von IFN- $\gamma$ -Konzentrationen wurde der ELISA der Firma eBioscience eingesetzt. Alle Lösungen und Verdünnungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Assay-Verdünner angesetzt.

Zunächst wurde eine 96-well-Platte mit einer 1:250 Verdünnung des *capture*-Antikörpers beladen. Dazu wurde pro *well* 100  $\mu$ l Antikörperlösung aufgetragen. Durch die Inkubation über Nacht bei 4 °C band der *capture*-Antikörper unspezifisch an die Plastikoberfläche der Platte. Im zweiten Schritt wurde die nicht durch den Antikörper belegte Plattenoberfläche geblockt. Hierzu wurde zunächst die Antikörperlösung aus den *wells* entfernt und diese dreimal mit Waschpuffer (PBS + 0,05 % TWEEN-80) gewaschen. Anschließend wurden die *wells* für 1 h mit 200  $\mu$ l/*well* Assay-Verdünner bei RT inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Platte mit Proben (Reihe A-H und Spalte 1-10) und Standard (Spalten 11-12) beladen, die *wells* H9 und H10 blieben als *blank* zur Eigenextinktionsmessung der Platte frei. Die Proben wurden als Doppelbestimmung aufgetragen. Der Standard als 1:2 Verdünnungsreihe über 8 *vials* wurde mit einer Ausgangskonzentration von 500 pg/ml Protein in der ersten Reihe aufgetragen.

Nach dem Beladen wurde die Platte für 2 h bei RT inkubiert.

Nach einem fünfmaligen Waschen wurde der biotinkoppelte Detektionsantikörper aufgetragen. (100  $\mu$ l/*well* einer 1:250 Verdünnung).

Auf eine Inkubation von 1 h bei RT folgte erneut fünfmaliges Waschen, bevor eine 1:250 Verdünnung von avidinkoppelter Meerrettichperoxidase in die Platte pipettiert wurde (100  $\mu$ l/*well*).

Nach 30 min Inkubation bei RT wurde die Platte erneut gewaschen, wobei auf zwei Waschschrte, bei denen der Waschpuffer für zwei Minuten in den *wells* inkubierte, fünf normale Waschschrte folgten.

Zum Entwickeln wurden nun 100  $\mu$ l/*well* Substrat aufgetragen und für 15 min im Dunklen bei RT inkubiert. Die endgültige Farbentwicklung erfolgte durch Zugabe von 50  $\mu$ l/*well* Phosphorsäure (1 M).

Die Platte wurde nun bei 450 nm und 570 nm gemessen. Der 450 nm Wert ist der Messwert, der 570 nm Wert eine Korrekturgröße, die vom Messwert subtrahiert wurde. Als weitere Korrekturgröße wurde der Messwert des *blanks* von allen Werten subtrahiert.

Eine Auswertung erfolgte über einen Vergleich der einzelnen Messwerte mit der auf der Platte als Standard mitgeführten Verdünnungsreihe für das Zielprotein.

### 3.2.3 Methoden der Zellkultur

#### 3.2.3.1 Antiviraler Assay

Der Antivirale Assay diente zur Kontrolle der Interferone, sowie der Expression von IFN- $\alpha$  in CHO-Zellen. Dabei machte man sich die antivirale Aktivität der Interferone zunutze. Hierbei wurde geprüft, wie weit eine interferonhaltige Probe humane epitheliale Lungenzellen der Linie A549 vor der Lyse durch EMC-Virus schützten.

Zunächst wurden die Zellen der Zelllinie A549 in T-Flask-Kulturflaschen adhärent aufgezogen (37° C, 5 % CO<sub>2</sub>). Als Medium wurde RPMI 1640 mit 10 % FCS und 100 IU/ml Pen/Strep eingesetzt.

Zur Durchführung des Assay wurden zunächst die A549-Zellen mit Trypsin/EDTA aus der Kulturflasche gelöst. Anschließend wurde eine Zellzahl von 2,5 - 3 x 10<sup>5</sup>/ml mit oben beschriebenen supplementierten RPMI 1640 eingestellt. Die Zellen wurden nun in einer 96-*well*-Platte mit 100  $\mu$ l/*well* ausgesät und über Nacht inkubiert (37° C, 5 % CO<sub>2</sub>). Hierdurch bildete sich ein Monolayer aus.

Am zweiten Tag wurden die Zellen in der ersten Reihe mit jeweils 50  $\mu$ l Interferonproben bzw. Standard (100 IU/ml) beladen. Mit einer Mehrkanalpipette wurden die Proben nun 1:3 über die weiteren Reihen runterverdünnt. 4 *wells* in den unteren beiden Reihen der Standardverdünnung blieben für Vitalkontrolle (nur Medium) und Viruskontrolle (kein Interferon) frei. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37° C wurden die Zellen mit dem EMC-Virus beladen. Dazu wurde zunächst das Medium über den Zellen abgeschlagen und anschließend wurden die *wells* mit 100  $\mu$ l einer Virusverdünnung in RPMI 1640 gefüllt. Nur die *wells* der Vitalkontrolle wurden ausschließlich mit RPMI 1640 Medium gefüllt.

Die Platte wurde für 16 – 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Unter dem Mikroskop verfolgte man den Verlauf der Lyse. Konnte beim Standard ein deutlicher Übergang zwischen vitalen Zellen und lysierten Zellen im vierten bis fünften *well* erkannt werden, wurde die Inkubation beendet und der AVA mit Kristallviolett, einem Farbstoff, der nur lebende Zellen anfärbt, eingefärbt.

Die Auswertung des AVAs erfolgte optisch, indem die Zahl der geschützten *wells* einer Probe mit dem Standard verglichen wurde. Als Rechengrundlage diente folgende Formel:

$$IU / ml_{Probe} = \frac{3^{wells_{Probe}}}{3^{wells_{Standard}}} * 100 IU / ml * Vorverdünnung$$

### 3.2.3.2 Adaption der CHO-Zellklone 21A8(0,1)10 III und 17A1(10)16 an serumfreie Bedingungen

Die CHO-Zellen der Zelllinien 17A1(10)16 (IFN- $\alpha$  wt) und 21A8(0,1)10III (IFN- $\alpha$  9x) wurden nach identischen Protokollen behandelt.

Zunächst wurden die Zellen aus der Kryokultur in MEM- $\alpha$  mit 10 % FCS in 75 cm<sup>2</sup>-T-Flaschen angezogen. Die Zellen wuchsen zunächst adhärent und wurden zum Passagieren mit Trypsin/EDTA behandelt. Nach drei Passagen wurde das Medium auf 5 % FCS reduziert und wieder drei Passagen später wurde das Medium komplett umgestellt auf ein Mischmedium aus 49 % MEM- $\alpha$ , 49 % CHO-S-SFM II, 1 % MEM-Vitamine (100x) und 1 % HSA (50 mg/ml). Durch die Umstellung auf serumfreies Medium verloren die Zellen ihre Fähigkeit zur Adhäsion an der Oberfläche der Kulturflasche und blieben in Suspension.

Nach einem Medienwechselintervall von 3 x 7 Tagen hatten sich die Zellen soweit erholt, dass das Intervall schrittweise auf drei Passagen pro Woche umgestellt werden konnte. Zellen aus dieser Phase wurden für die weiteren Arbeiten in oben beschriebenem Medium mit 10 % DMSO bei -80° C eingefroren.

### 3.2.3.3 Umstellung der CHO-Zellen auf Natriumcholat als Lösungsvermittler für IFN- $\alpha$

Eine wichtige Aufgabe in der Produktion von IFN- $\alpha$  war der Wechsel vom HSA als Stabilisator hin zu Substanzen ohne Gefährdungspotential. Es bot sich hier Natriumcholat an, das Salz der Cholsäure, welches im Körper zu Lösung wasserabweisender und schlecht löslicher Substanzen produziert wird. Natriumcholat ist günstig in großen Mengen verfügbar ist und sollte auf Grund der möglichen synthetischen Herstellung keinen negativen Einfluss auf die Zulassung eines Medikamentes haben.

Zunächst wurden CHO-Zellen, die bereits an serumfreie Bedingungen gewöhnt waren, mit verschiedenen Konzentrationen von Natriumcholat im Medium an Stelle des HSA ausgesät.

Die Zellen wurden dann für 1 Woche bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Innerhalb dieser Inkubationsphase wurde einmal das Medium gewechselt. Nach einer Woche wurden die Zellkulturüberstände auf IFN- $\gamma$ -Gehalt getestet. Die Konzentration, bei der die Zellen die höchste Produktivität entwickelten, wurde für die weiteren Arbeiten eingesetzt.

#### **3.2.3.4 Gewinnung der Zellkulturüberstände**

Die Expressionskulturen von 17A1(10)16 und 21A8(0,1)10III wurden in 150 cm<sup>2</sup>-T-Flaschen mit einem Medienvolumen von 200 ml inkubiert. Als Medium diente oben genanntes Mischmedium. (mit 500  $\mu$ g/ml HSA oder 1ng/ml Natriumcholat). Ein Expressionzeitraum von 2-3 Tagen wurde angestrebt, wobei nach dieser Zeit 2/3 des Mediums ausgetauscht wurde.

In der Expressionkultur wurden alle 2 Tage 2/3 des Mediums ausgetauscht. Dazu wurde das gewünschte Volumen abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

Das abgenommene Medium wurde mittels Zentrifugation (1.000xg, 10 min) von den Suspensionszellen befreit. Die abzentrifugierten Zellen wurden entweder in einer neuen Expressionskultur angesetzt oder verworfen.

Die abzentrifugierten Zellkulturüberstände wurden bis zur Aufarbeitung bei 4° C gelagert.

Die Expressionskontrolle erfolgte mittels AVA.

#### **3.2.3.5 Pflege von Caco-2-Zellen**

Caco-2-Zellen wurden in DMEM mit einem Glucosegehalt von 4,5 mg/ml und 20 % FCS kultiviert. Zur Vermehrung wurden die Zellen in Petrischalen ( $\varnothing$  8,3 cm bzw. 13,4 cm) ausgesät. Nach 3 – 4 Tagen bei 37 ° C und 5 % CO<sub>2</sub> hatte sich ein Monolayer mit einer Dichte von 70 % ausgebildet, nach 6-7 Tagen konnten die Caco-2-Zellen gesplittet werden. Hierzu wurde das Medium von den Zellen entfernt, und der Monolayer mit 1 bzw. 2 ml Trypsin/EDTA gewaschen. Anschließend wurden 500  $\mu$ l bzw. 1 ml Trypsin/EDTA für 5 – 10 min auf den Zellen bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die abgelösten Zellen wurden nun in 10 ml frischem DMEM mit 20 % FCS aufgenommen und entweder auf 1/6 verdünnt in frischen Petrischalen ausgesät oder in das unten dargestellte Zweikammersystem überführt.



**Abb. 19** Aufbau des Zweikammersystems zur Pflege von Caco-2-Zellen

### 3.2.3.6 Modell der Darmpassage von Proteinen durch Caco-2-Zellen

Das oben gezeigte Zweikammersystem bietet die Möglichkeit, Caco-2-Zellen entsprechend ihrer Morphologie in Form eines Darmepithels zu kultivieren. Die apikale Seite der Caco-2-Zellen wächst dabei in Richtung der oberen Kammer.

Gibt man nun nach Ausbildung einer geschlossenen Oberfläche Substanzen in die obere Kammer, so sollten diese durch den Caco-2-Layer in das untere Kompartiment transportiert werden. Je nach Größe der Substanzen kann der Transport aktiv oder passiv erfolgen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten für kleinere Substanzen zeigen, dass diese durch die Caco-2-Zellen transportiert (Faassen *et al.* 2003, Neuhoff *et al.* 2003), bzw. in den apikalen Bereich zurückgewiesen werden.

Für das IFN- $\gamma$  sollte nun gezeigt werden, dass dieses durch Caco-2-Zellen transportiert wird. Hierzu wurden in der oberen Kammer  $10^6$  Zellen/ml in DMEM mit 20 % FCS ausgesät. Dieser Ansatz wurde für 24 h bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, wobei die Caco-2-Zellen den oben beschriebenen Monolayer ausbilden, dessen Zellen mit der apikalen Seite in die obere Medienkammer weisen, während die basolaterale Seite an dem Kunststoffnetz adhärert.

Nun wurde in das Medium der oberen Kammer Rebif in Konzentrationen von  $10^2$  IU/ml bis  $10^4$  IU/ml gegeben. Nach einer erneuten Inkubation bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden aus der oberen und unteren Kammer Proben entnommen und im AVA getestet.

## 3.2.4 Biophysikalische Methoden

### 3.2.4.1 Stabilität von PEGylierten Proteinen

#### 3.2.4.1.1 Thermostabilität von Proteinen

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität wurden PEGyliertes (20.000 Da) und unPEGyliertes IFN- $\gamma$  7/69 S99C herangezogen. Für jeweils ein Stunde wurden gleichkonzentrierte Proben beider Modifikationsformen bei 37° C, 42 °C, 50° C, 65° C und

95° C inkubiert, bevor jeweils 20 µl *aliquots* zur Analyse über 15 %ige SDS-Gele abgenommen wurden. Zusätzlich wurden die Proben auf den Verlust ihrer Aktivität im AVA getestet.

#### **3.2.4.1.2 Stabilität in Anwesenheit von Proteasen**

Zur Betrachtung der Stabilität von PEGylierten Proteinen im Vergleich zu unPEGylierten Proteinen in Anwesenheit von Proteasen wurde die IFN- $\beta$ -Variante 7/69 S99C mit ihren verschiedenen PEG-Modifikationen eingesetzt.

Zunächst wurden gleiche Mengen (700 µg) IFN- $\beta$  7/69 S99C, 5.000 Da PEG 7/69 S99C (Thiol- und Amin-PEGylierung), 20.000 Da PEG 7/69 S99C (Thiol- und Amin-PEGylierung) und 40.000 PEG 7/69 S99C (Thiol-PEGylierung) auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. Zusätzlich wurde eine Probe 7/69 S99C mit 5 % PEG 10.000 gemischt. Diese fünf Proben wurden anschließend mit 1 µg Trypsin versetzt und bei 37° C inkubiert. Zusätzlich wurde als Nullwert eine Probe 7/69 S99C ohne Trypsin mitgeführt.

Nach zwei Stunden wurden 20 µl aus jedem Ansatz für ein SDS-Gel und *western-blot* entnommen. Der verbliebene Rest wurde für 24 h bei 37° C inkubiert, bevor auch dieser Rest für ein SDS-Gel und *western-blot* eingesetzt wurde.

Als SDS-Gel-Konzentration wurden ein 15 %iges Gel sowie ein 20 %iges Gel gewählt, da hier kleinere Fragmente besser bestimmbar sein sollten.

#### **3.2.4.1.3 Stabilität in saurem und basischem Milieu**

Zur Bestimmung der Stabilität von PEGylierten Proteinen wurde PEGyliertes IFN- $\beta$  mit unPEGyliertem IFN- $\beta$  verglichen.

Jeweils gleiche Mengen des unPEGylierten und PEGylierten IFN- $\beta$  wurden mit konzentrierter Salzsäure auf pH 3 bzw. mit konzentrierter Natronlauge auf pH 10 eingestellt und für 24 h bei RT inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die mit Salzsäure behandelten Proben mit Tris neutralisiert, bevor alle Proben über ein SDS-Gel mit anschließenden *western-blot* analysiert wurden.

### 3.2.5 Tierversuche

Die Tierversuche waren alle nach dem gleichen Schema aufgebaut und wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Löscher der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt.

Pro Testgruppe wurden 5-6 weibliche Wistarratten mit einem Gewicht zwischen 200 g und 300 g eingesetzt. Jedem Tier wurde eine IFN- $\gamma$ -haltigen Lösung mit einer Konzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  injiziert, so dass jedes Tier eine finale Dosis von  $8 \times 10^6$  IU/kg erhielt. Die Injektion erfolgte *subkutan*.

Vor der Injektion, nach 20 min, 60 min, 2 h, 4h, 8h, 24 h und 48 h wurde den Tieren *retrobulbär* Blut abgenommen und das Serum präpariert. Die Serumlevel von IFN- $\gamma$  wurden über einen AVA gemessen.

Im Einzelnen wurden folgende Varianten und Modifikationen im Tierversuch eingesetzt:

- IFN- $\gamma$ wt
- IFN- $\gamma$ 7/69
- IFN- $\gamma$ 7/69 20.000 Da Amin-PEGyliert
- IFN- $\gamma$ 7/69 D63C 5.000 Da Thiol-PEGyliert
- IFN- $\gamma$ 7/69 S99C 5.000 Da Thiol-PEGyliert
- IFN- $\gamma$ 7/69 S99C 20.000 Da Thiol-PEGyliert
- IFN- $\gamma$ 7/69 S99C 40.000 Da Thiol-PEGyliert

## 4 Ergebnisse

Die Ergebnisse meiner Arbeit lassen sich grob in drei Bereiche einteilen. Zunächst gibt es die Ergebnisse aus dem Bereich Expression in der Zellkultur und Aufarbeitung des IFN- $\gamma$ . Hierzu gehören auch die Formulierungsansätze für das IFN- $\gamma$ . Der zweite Bereich beschäftigt sich mit der Modifikation von IFN- $\gamma$  durch PEGylierung. Im dritten Teil werden die Ergebnisse aus den PEGylierungsversuchen am IFN- $\gamma$  und die entsprechenden Tierversuche aufgeführt.

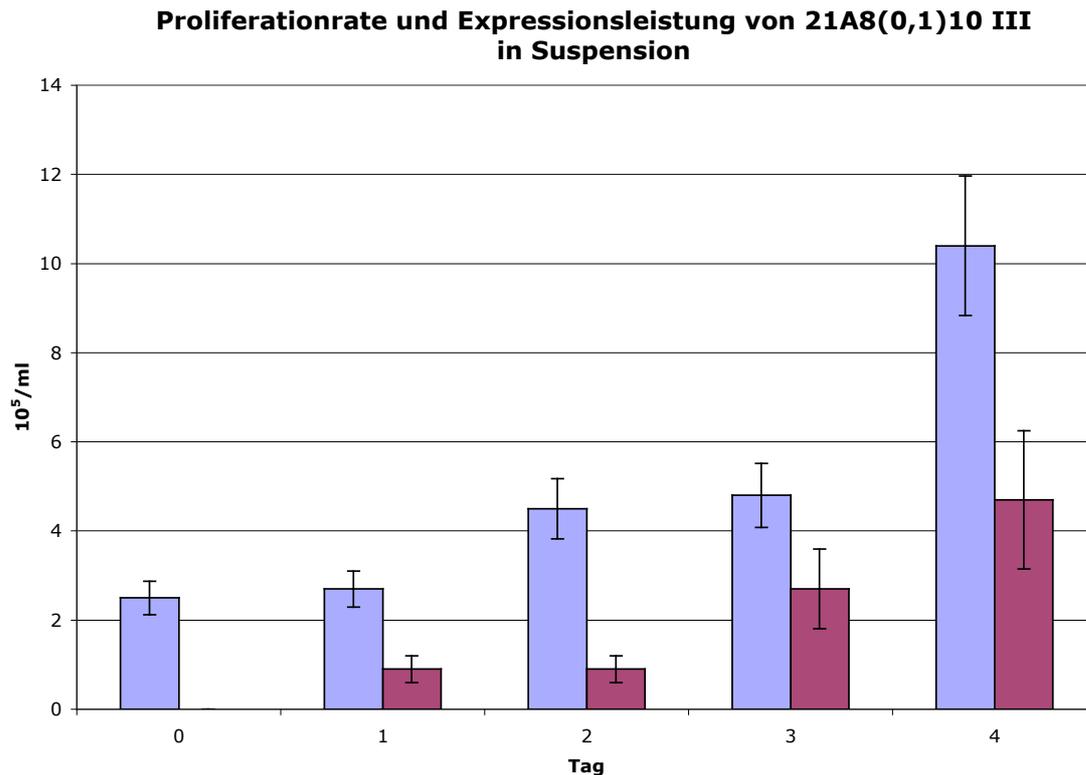
### **4.1 Umstellung der CHO-Zelllinien 21A8(0,1)10 III und 17A1(10)16 auf Suspensionskulturen**

Zunächst wurden die IFN- $\gamma$  exprimierenden Zelllinien 21A8(0,1)10 III und 17A1(10)16 als adhärenzte Kultur unter serumfreien Bedingungen gehalten. Hierbei wurde eine maximale Expression von  $1,2 \times 10^5$  IU/ml IFN- $\gamma$  ermittelt, wobei eine Expressionsleistung von  $1-1,5 \times 10^5$  IU/( $10^5$  Zellen  $\times$  24 h) erreicht wurde (Daten Thorsten Uwe Meyer). Beim Medienwechsel auf diesen adhärenzten Zellen wurden immer wieder Suspensionszellen gefunden. Hieraus ergab sich die Idee, von vornherein mit Suspensionszellen zu arbeiten.

Hierzu wurde ein neues Adaptionprotokoll eingesetzt, welches in nur drei Stufen das FCS ersetzt. Durch dieses Adaptionsverfahren wuchsen die Zellen bereits nach zwei Wochen in Suspension, jedoch war zu diesem Zeitpunkt die Expression von IFN- $\gamma$  stressbedingt sehr gering. Nach einer Akklimatisierungsphase von weiteren zwei bis drei Wochen konnte dann wiederum eine Expression des IFN- $\gamma$  gemessen werden. Gleichzeitig konnte eine Zelldichte von mehr als  $1 \times 10^6$  Zellen/ml erreicht werden.

Um nun die Expressionsleistung der Suspensionszellen mit der von adhärenzten Zellen vergleichen zu können, wurden exemplarisch 21A8(0,1)10 III in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml in 20 ml des Standardmediums aus 49 % MEM-a, 49 % CHO-S-SFM II, 1 % MEM-Vitamins und 1 % HSA (0,5 mg/ml final) angesetzt. Eine Inkubation erfolgte bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Alle 24 Stunden wurde eine Probe entnommen und die Zellzahl und die IFN- $\gamma$ -Aktivität im Überstand bestimmt. Nach zwei Tagen wurden 50 % des Mediums erneuert und die Kultur um weitere zwei Tage fortgeführt.



**Abb. 20** Proliferationsrate und Expressionsleistung von 21A8(0,1)10 III. In Violett ist die Expressionsleistung aufgetragen, in Blau die Proliferationsrate.

Bei der Betrachtung der Grafik fällt auf, dass die Zellen der Zelllinie 21A8(0,1)10 III eine deutliche *lag*-Phase in den ersten 24 Stunden nach der Aussaat haben, da sich zum Einen die Zellzahl nicht sonderlich steigert, als auch zum Anderen die Aktivität in den ersten 48 Stunden mit  $9 \times 10^4$  IU/ml recht gering ist. Erst der partielle Medienwechsel nach zwei Tagen führte zu einem deutlichen Anstieg von Expression und Proliferation.

Nach vier Tagen war eine Aktivität von  $4,7 \times 10^5$  IU/ml erreicht. Im Vergleich zur maximalen IFN- $\gamma$ -Konzentration bei adhärennten Zellen ist dies ein um einen Faktor von 4 höherer Wert. Bezieht man diesen Wert wiederum auf Zellzahl und Zeiteinheit, so ergibt sich eine Expressionsleistung von maximal  $0,22 \times 10^5$  IU/( $10^5$  Zellen x 24 h).

Ein analog behandelter Ansatz mit 17A1(10)16 lieferte eine maximale IFN- $\gamma$ -Konzentration im Medium von  $5,2 \times 10^5$  IU/ml und eine Expressionleistung von  $0,26 \times 10^5$  IU/( $10^5$  Zellen x 24 h) bei einer Zelldichte von  $9,8 \times 10^5$  Zellen/ml.

In der Kontrolle der semikontinuierlichen Expression konnten Expressionleistungen bis zu einer Rate von  $1,5 \times 10^5$  IU/( $10^5$  Zellen x 24 h) erreicht werden.

## **4.2 Medienuntersuchungen für CHO-Expressionskulturen**

Nach der Umstellung auf eine Suspensionskultur war die zweite Frage im Umgang mit den CHO-Zellen, die nach der Medienzusammensetzung. Für die serumfreie Kultur von CHO-Zellen wurde zunächst das folgende bereits von Thorsten Uwe Meyer eingesetzte Mischmedium benutzt. Dieses setzt sich wie folgt zusammen:

49 % MEM-□

49 % CHO-S-SFM II

1 % MEM-*vitamins*

1 % HSA (50 mg/ml)

Während MEM-□ und MEM-*vitamins* vollständig dokumentiert sind, ist die Rezeptur von CHO-S-SFM II durch die Herstellerfirma Invitrogen geschützt und wird nicht freigegeben. Laut Angaben des Herstellers (Flaschenaufdruck) enthält dieses Medium Wachstumsfaktoren aus humanen und/oder porcinen Quellen.

Um genauere Aussagen über die optimale Medienzusammensetzung machen zu können wurden verschiedene Ansätze zum Ersatz des CHO-S-SFM II-Medium untersucht.

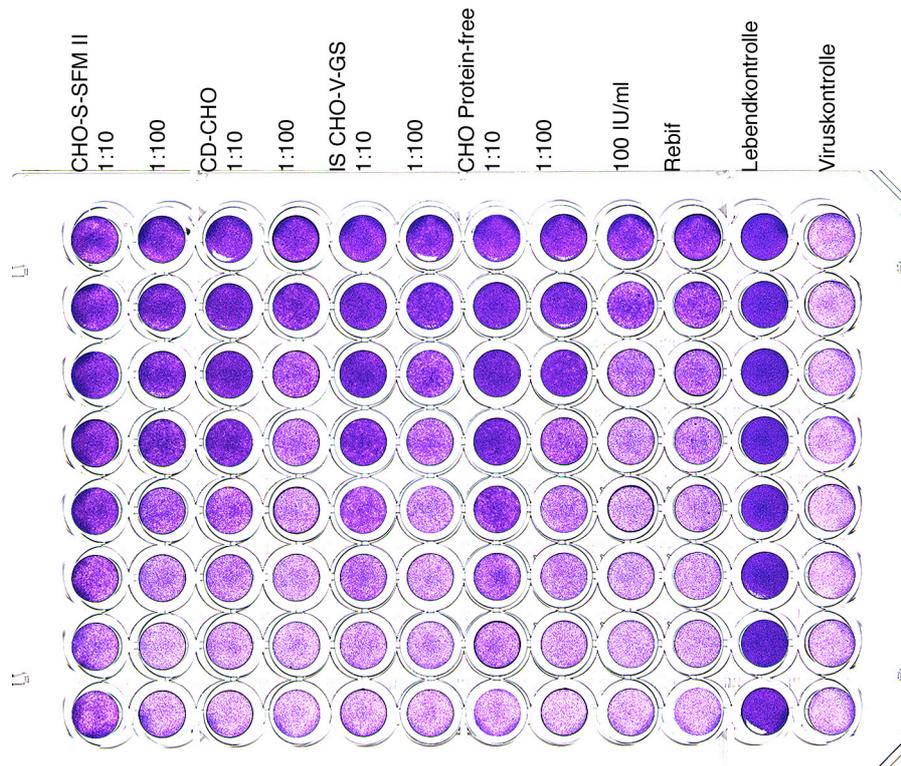
Eine weitere Schwierigkeit mit oben genanntem Medium stellt der Einsatz von HSA dar. HSA wird großtechnisch aus humanem Blutserum gewonnen. Hier besteht die Gefahr der Kontamination mit humanpathogenen Viren oder Endotoxinen. Um diese Gefahr zu umgehen, wurde nach einem Ersatz für HSA gesucht.

### **4.2.1 Medienalternativen zum CHO-S-SFM II in der Expression von IFN-□**

Vom Hersteller des CHO-S-SFM II-Mediums wurde ein weiteres CHO-Medium ohne jegliche Proteinzusätze bezogen (CD-CHO). Von den Konkurrenzanbietern Irvine Scientific und Sigma wurden die Medien IS CHO-V-GS (Irvine Scientific) und CHO Protein Free Medium (Sigma) bezogen.

In vier 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen wurden jeweils  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml der Zelllinie 17A1(10)16 in den drei zu untersuchenden Medien und im oben beschriebenen Mischmedium ausgesät. Als Kulturvolumen kamen dabei jeweils 20 ml zum Einsatz. Die zu untersuchenden Medien wurden wie das Mischmedium mit 1 % MEM-*vitamins* und 1 % HSA (50 mg/ml) supplementiert.

Nach einer Inkubation über 24 Stunden bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden zunächst die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet, bevor das Medium abgetrennt und im AVA getestet wurde.



**Abb. 21** Vergleich der IFN- $\gamma$ -Expression in verschiedenen Medien

Medium	Zellzahl und –morphologie	Aktivität im Überstand Aktivität pro $10^5$ Zellen
MEM- $\square$ / CHO-S-SFM II	$1,8 \times 10^5$ /ml, Ausbildung kleiner Zellcluster (Einheiten von 10-30 Zellen)	81.000 IU/ml $0,45 \times 10^5$ IU/ $10^5$ Zellen
CD-CHO	$1,2 \times 10^5$ /ml, Zellen vereinzelt	9.000 IU/ml $0,75 \times 10^4$ IU/ $10^5$ Zellen
IS CHO-V-GS	$1,35 \times 10^5$ /ml, Zellen vereinzelt	27.000 IU/ml $0,2 \times 10^5$ IU/ $10^5$ Zellen
CHO Protein-free Medium	$1,65 \times 10^5$ /ml, Ausbildung kleiner Zellkluster (Einheiten von 5 – 10 Zellen)	47.000 IU/ml $0,29 \times 10^5$ IU/ $10^5$ Zellen

Aus diesen Daten wird deutlich, dass ein völlig proteinfreies Medium wie das CD-CHO-Medium ohne eine Supplementierung mit Wachstumsfaktoren für eine Kultur der CHO-Zellen nicht geeignet ist, da die Zellen absterben ( $1,5 \times 10^5$ /ml  $\rightarrow$   $1,2 \times 10^5$ /ml) und die Expressionsleistung einbricht.

Etwas besser stellt sich das Medium IS-CHO-V-GS dar. Auch hier nimmt die Zellzahl ab, jedoch bricht die Expression weniger stark ein als bei CD-CHO-Medium.

Neben dem Mischmedium stellt sich das CHO-Protein-free Medium als das Beste heraus. Hier können die Zellen proliferieren und die Expressionsleistung liegt noch über der Hälfte des Mischmediums.

Betrachtet man nun die Zusammensetzung dieses Medium, so wird vom Hersteller angegeben, dass als Wachstumsfaktor Insulin aus rekombinanter Herstellung enthalten ist.

Insulin scheint also ein wichtiger Wachstumsfaktor für die CHO-Zellen zu sein.

#### **4.2.2 Wachstumsfaktoren für die IFN- $\beta$ -produzierenden CHO-Zellen**

Nachdem Insulin bereits aus dem Vergleich verschiedener Medien für die Kultur von CHO-Zellen als wichtiger Wachstumsfaktor erkannt worden war, wurde in der Literatur nach weiteren mögliche Wachstumsfaktoren gesucht.

Aus dieser Literatursuche gehen Insulin und die *Insulin-like growth factors* sowie Transferrin als Wachstumsfaktoren hervor. Zusätzlich findet man bei der Suche nach Wachstumsfaktorencocktails Natriumselenit als Apoptoseblocker. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde nun ein Versuch unternommen, die CHO-Zellen der Zelllinien 21A8(0,1)10 III und 17A1(10)16 in supplementierten MEM- $\beta$  zu kultivieren. Hierzu wurden Insulin (5  $\mu\text{g/ml}$ ), Transferrin (5  $\mu\text{g/ml}$ ) und Natriumselenit (5  $\text{ng/ml}$ ) zu frischem MEM- $\beta$  gegeben, wobei die Kombination dieser drei ebenso wie jede Zwei- aus Drei-Kombination und die Einzelfaktoren getestet wurden. Die gewählten Konzentrationen der einzelnen Wachstumsfaktoren entsprachen denen eines käuflichen Wachstumsfaktorencocktails.

Zusätzlich wurden die einzelnen Ansätze mit 1 % MEM-*Vitamins* (100 x) und 1 % HSA (50  $\text{mg/ml}$ ) supplementiert.

Als Referenzmedium wurde die oben beschriebene Formulierung aus 49 % MEM- $\beta$ , 49 % CHO-S-SFM II, 1 % MEM-*Vitamins* (100 x) und 1 % HSA (50  $\text{mg/ml}$ ) eingesetzt.

Für alle Zusammensetzungen wurden  $4 \times 10^5$  Zellen/ml der Zelllinie 21A8(0,1)10III bzw.  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml 17A1(10)16 in einer 24-well-Platte ausgesät. Die Platte wurde anschließend für 24 h bei  $37^\circ \text{C}$  inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen einer optischen Betrachtung unter dem Mikroskop unterzogen und das Medium zur Untersuchung im AVA entnommen.

Unter dem Mikroskop zeigten alle Zellen, die mit Insulin in jeglicher Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren behandelt wurden, ein dem Referenzmedium analoges Wachstum. Die Zellen proliferierten stark und bildeten Zellcluster von 10-30 Zellen aus.

Nicht ganz so ausgeprägt verhielten sich Zellen, die mit Transferrin oder Transferrin und Natriumselenit behandelt wurden. Hier proliferierten die Zellen etwas schlechter, dennoch wurden kleine Zellcluster von bis zu 15 Zellen gebildet. Ausschließlich mit Natriumselenit behandelte Zellen wiederum proliferieren kaum. Es bildeten sich keine Zellcluster.

Ein weiterer wichtiger Punkt in der Beurteilung der Wachstumsfaktoren war die Aktivität der Überstände. Während alle aus insulinhaltigen Ansätzen stammenden Überstände im AVA einen ebenso großen Schutz boten wie die Referenzproben ( $>10^5$  IU/ml), zeigten die Proben aus nicht mit Insulin behandelten Ansätzen geringere Expressionen. Während die transferrinbehandelten Proben noch Aktivitäten um  $3 \times 10^4$  IU/ml vermittelten, zeigten die selenitbehandelten Proben Aktivitäten von maximal  $9 \times 10^3$  IU/ml.

Zwischen den Zelllinien 17A1(10)16 und 21A8(0,1)10 III ergaben sich bei diesen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede.

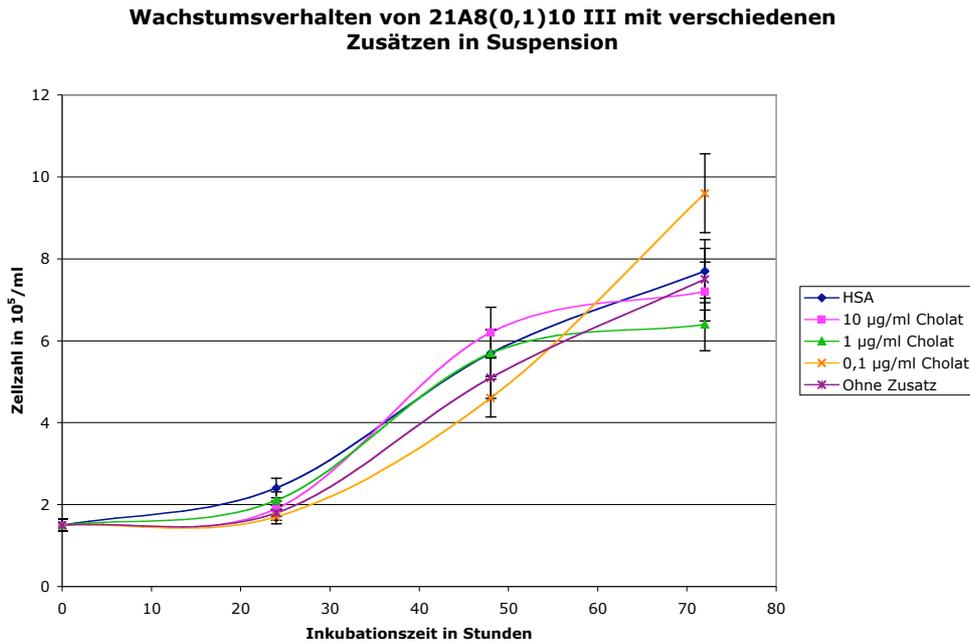
#### **4.2.3 Ersatz von HSA**

Parallel zu den Untersuchungen zum Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Produktivität von CHO-Zellen wurde nach einem Ersatz für HSA gesucht.

In der Literatur wird Natriumcholat als potentieller Stabilisator für Proteine beschrieben. Nachdem zuvor Versuche mit Substanzen wie Detergenzien, Dextransulfat oder PEGs erfolglos verlaufen waren, wurde daher nun Natriumcholat als Ersatz für HSA in der Zellkultur untersucht. Hierzu wurde folgende Testreihe gewählt.

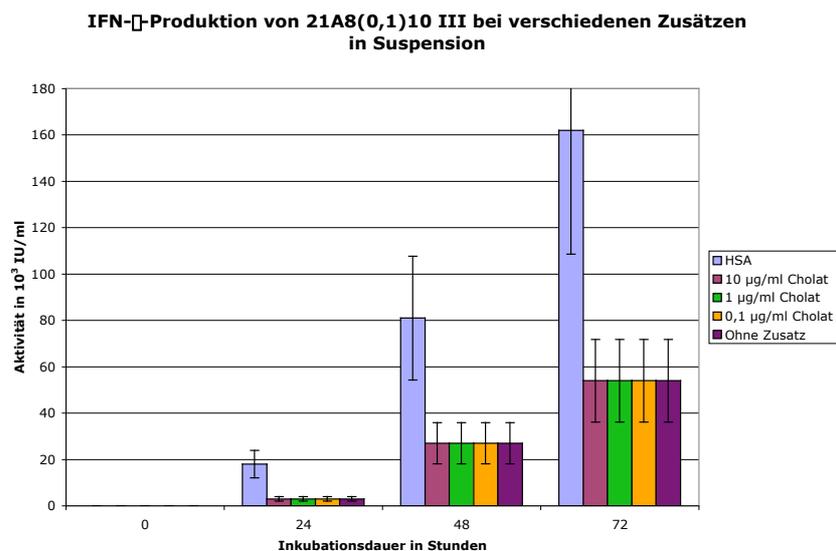
In 75 cm<sup>2</sup>-T-Flasks wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml der Zelllinie 21A8(0,1)10 III in 20 ml eines Mediums ausgesät, bestehend aus 49,5 % MEM-a, 49,5 % CHO-S-SFM II und 1 % MEM-Vitamins. In die Flaschen wurde zusätzlich 0,5 mg/ml HSA oder eine der folgenden Natriumcholatkonzentrationen gegeben (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml oder 0,1 µg/ml). Zusätzlich wurde eine Flasche ohne weitere Zusätze mitgeführt. Über drei Tage wurde die Zellzahl/ml in jedem Ansatz sowie die IFN- $\gamma$ -Aktivität verfolgt.

Aus den dargestellten Wachstumskurven wird ersichtlich, dass Natriumcholat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der CHO-Zellen besitzt. Einzig im Ansatz mit der niedrigsten Natriumcholatkonzentration scheint eine etwas stärkerer Zellproliferation nach drei Tagen aufzutreten.



**Abb. 22** Wachstumsverhalten von CHO-Zellen in Anwesenheit verschiedener Natriumchololkonzentrationen

In der Produktivität hingegen zeigen die Überstände der mit Natriumcholol behandelten Zellen eine um den Faktor 3 geringere Aktivität gegenüber den Überständen von mit HSA-haltigem Medium behandelten Zellen. Vergleicht man wiederum die Produktivität von Natriumcholol-behandelten Zellen mit der von unbehandelten Zellen, so lassen sich keine Unterschiede ausmachen.



**Abb. 23** Produktivität von CHO-Zellen in Anwesenheit von Natriumcholol und HSA

Aus den gewonnenen Daten lässt sich schließen, dass Natriumcholol in der Zellkultur nicht als Ersatz des HSA eingesetzt werden kann.

### 4.3 Alternative Kultursysteme

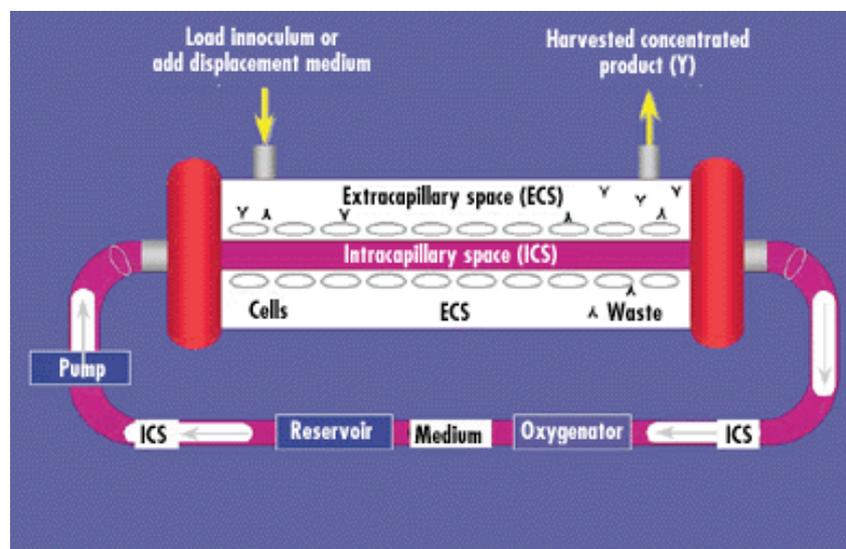
Neben den Medienuntersuchungen für die CHO-Zellen wurden verschiedene Expressionsysteme für CHO-Zellen getestet.

Ursprünglich wurden die IFN- $\beta$ -produzierenden CHO-Klone 17A1(10)16 und 21A8(0,1)10 III als adhärenente Zellen in Flachbettstapeln kultiviert. Bei dieser Methode ist die Zellzahl stark limitiert durch die maximale Zelldichte im *monolayer*.

Durch die Umstellung der Zellen auf ein Wachstum in Suspension veränderte sich die Situation deutlich. Zunächst wurden die Zellen in T-Flasks kultiviert, wobei eine Zellzahl eingestellt werden konnte, die dem 10–20fachen der Zellzahl bei Adhäsion pro ml entsprach. Eine Steigerung der maximalen Expression von  $10^5$  IU/ml auf  $10^6$  IU/ml konnte so erzielt werden.

Suspensionszellen können des Weiteren im *upscaling* in nahezu jedem Kultursystem kultiviert werden. Als Möglichkeiten stehen hier diverse Rührfermenter oder auch Hohlfasersysteme zur Verfügung.

Als Reaktorsystem zur technischen Herstellung von IFN- $\beta$  wurde zunächst in einem Hohlfaserreaktor der Firma Unisyn eine Hochzelldichtekultur getestet.



**Abb. 24** Schema eines Hohlfaserreaktors ([www.the-scientist.com](http://www.the-scientist.com))

Nach dem Inokulieren des Hohlfaserreaktors mit  $5 \times 10^6$  Zellen/ml der Zelllinie 21A8(0,1) 10 III wurde der Reaktor für zwei Tage betrieben, bevor erste Proben entnommen wurden. Da das System auf eine Anheftung der Zellen an die Kapillarmembranen ausgelegt war, konnten keine Zellzahlen für den Extracapillarraum bestimmt werden. Bei der Analyse der Überstände aus Extracapillarraum und Medienreservoir im AVA konnte über einen Zeitraum von einer

Woche keine signifikante IFN- $\gamma$ -Konzentrationssteigerung über einen Wert von  $10^4$  IU/ml hinaus festgestellt werden. Dieser Befund führte wiederum zu einer Untersuchung des Hohlfasermaterials. Dieses bestand aus regenerierter Zellulose.

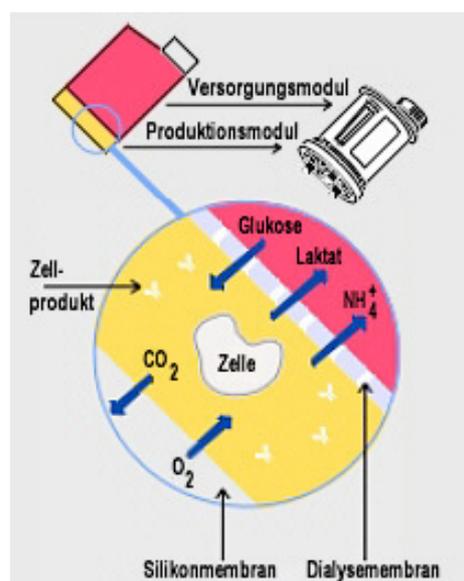
Zur Untersuchung des Verhaltens von IFN- $\gamma$  gegenüber regenerierter Zellulose wurde eine Testmembran mit einer Oberfläche von  $1 \text{ cm}^2$  über Nacht in einen IFN- $\gamma$ -haltigen Zellkulturüberstand eingelegt. Diese Membran wurde anschließend dreimal mit TBST gewaschen und wie ein *western blot* weiterbehandelt.

Nach der Immunfärbung war die Membran violett gefärbt, was zeigt, dass IFN- $\gamma$  an der regenerierten Zellulose bindet. Um also mit Hohlfasersystemen eine Produktion von IFN- $\gamma$  zu erlangen, muss das Membranmaterial so gewählt werden, dass keine Bindung von IFN- $\gamma$  erfolgt.

Da für dieses Hohlfasersystem keine Kapillarmembranen erhältlich waren, die nicht auf Zellulose basierten, wurde die Arbeit mit Hohlfaserreaktoren unterbrochen und mit einem anderen System versucht, die Membranprobleme zu lösen.

Hierzu wurden die Zellen der Zelllinie 21A8(0,1)10 III in zwei verschiedenen Zweikammersystemen untersucht.

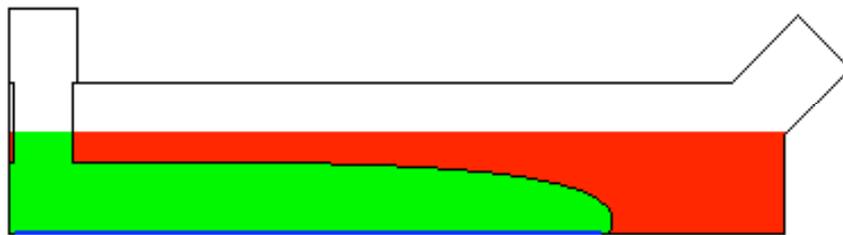
Zunächst wurde in einem Miniperme-Reaktor der Firma Heraeus mit verschiedenen Trennmembranen (regenerierte Cellulose mit geringer Proteinbindung, Celluloseacetat) eine Hochzelldichtekultur angesetzt und über zwei Tage expremiert. Die IFN- $\gamma$ -Produktion wurde nach diesen zwei Tagen über einen AVA sowohl für das Medium in der Zellkammer als auch für das Medium der Vorratskammer kontrolliert. Ein mögliches Anhaften des IFN- $\gamma$  an der Trennmembran wurde über eine Immunfärbung der Membran kontrolliert.



**Abb. 25** Funktionsschema eines Minipermeaktors

Da für die Kontrolle der Membranen der Reaktor zerlegt werden musste, war die Lebensdauer stark eingeschränkt, so dass für jeden Membrantest eine neue Kammer eingesetzt wurde. Der Minipermreaktor stellte also auch kein zufriedenstellendes System zur IFN- $\gamma$ -Produktion dar. Auch hier wurde wieder über eine Immunfärbung gezeigt, dass alle zellulosebasierenden Membranen produziertes IFN- $\gamma$  abfingen.

Im Anschluß wurde ein zweiter Versuch gestartet, die Zellen des Klons 21A8(0,1)10 III in einem Hohlfasersystem zu etablieren. Hierzu wurde zunächst eine Zweikammerzellkulturflasche eingesetzt, die die Umgebung in einem Hohlfaserreaktor simuliert. Die Zweikammerzellkulturflasche basierte auf einer T-Flask, in der eine Kunststofffolie mit einer Medienaustauschmembran zur Teilung in zwei Kammern eingesetzt war, wobei beide Kammern von außen zugänglich waren. Ein Gasaustausch mit der Umgebung wurde über eine Silikonmembran im Flaschenboden realisiert.



**Abb. 26** Schematische Darstellung einer Zweikammerflasche.  
In Rot ist das Medienreservoir, in Grün die Zellkammer und  
in Blau die Silikonmembran zum Gasaustausch dargestellt.

Als Membranen zwischen den Kammern kamen hier verschiedene Zellulosederivate aber auch auf Polyethersulfonsäure basierende Membranen zum Einsatz.

Mit einem kontinuierlichen Wechsel zwischen Über- und Unterdruck kann in diesem System ein aktiver Medienaustausch zwischen Zellkammer und Medienreservoir erzielt werden. Die Ernte des produzierten IFN- $\gamma$  erfolgte auch hier durch Entnahme eines Teils des Mediums aus der Zellkammer. Obwohl über dieses System Zelldichten von über  $10^7$  lebende Zellen/ml erzielt wurden, was auch in der Theorie in einem entsprechenden Hohlfaserreaktor erreichbar wäre, ließ sich die Ausbeute an IFN- $\gamma$  trotz dieser hohen Zelldichte nicht über  $10^6$  IU/ml steigern.

System	Vorteile	Nachteile
Flachbettstapel	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produktionsraum durch Wannenzahl nahezu beliebig skalierbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Komplizierte Handhabung</li> <li>• Erntemedium enthält immer Zellen</li> <li>• Semikontinuierlicher Betrieb nur schwer zu realisieren</li> </ul>
T-Flask	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einfache Handhabung</li> <li>• Semikontinuierliche Produktion möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schlechtes <i>upscaling</i></li> <li>• Erntemedium enthält immer Zellen</li> <li>• Hoher Personalaufwand</li> </ul>
Miniperm	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trennung von Zell- und Mediumkammer soll zur Anreicherung des IFN-<math>\alpha</math> in der Zellkammer führen</li> <li>• Hochzelldichtekultur möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nicht skalierbar</li> <li>• Hoher apparativer Aufwand</li> <li>• Hohes Kontaminationsrisiko</li> <li>• Membranabhängige IFN-<math>\alpha</math>-Konzentration</li> </ul>
Hohlfaserreaktor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trennung von Zell- und Mediumkammer soll zur Anreicherung des IFN-<math>\alpha</math> in der Zellkammer führen</li> <li>• Hochzelldichtekultur möglich</li> <li>• Kontinuierliche Produktion möglich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hoher apparativer Aufwand</li> <li>• Membranabhängige IFN-<math>\alpha</math>-Konzentration</li> </ul>

#### 4.4 Expression und Aufarbeitung von IFN- $\alpha$

Die Expression und Aufarbeitung von IFN- $\alpha$  wurde in zwei verschiedenen Synthesystemen durchgeführt. In Bakterienzellen wurden die Varianten IFN- $\alpha$  1x, IFN- $\alpha$  8x und IFN- $\alpha$  9x exprimiert. Dieses Material ist nicht glycosyliert.

In CHO-Zellen wurden die Varianten IFN- $\alpha$  wt und IFN- $\alpha$  9x exprimiert.

#### 4.4.1 Expression in Bakterienzellen und Aufarbeitung von IFN- $\gamma$

Die Varianten des IFN- $\gamma$  wurden aus BL21-Zellen gewonnen, die mit dem Plasmid pET19b mit dem entsprechenden Gen für die einzelnen Varianten transformiert waren.

Die Proteinexpression wurde hier über 1 M IPTG induziert. Die Expression wurde bei 37° C durchgeführt, wobei das produzierte IFN- $\gamma$  in *inclusion bodies* eingelagert wurde.

Nach einem Expressionszeitraum von ca. 5 h wurde aus einer 2 l Kultur ein Bakterienpellet mit einem Nassgewicht von 10-13 g je nach Ansatz geerntet.

Über mehrere Waschstschritte wurden die *inclusion bodies* von Zelltrümmern befreit, bevor das IFN- $\gamma$  über das zwitterionische Detergenz Sulfobetain SB 14 im alkalischen Milieu herausgelöst wurde. Nach Absenken des pH-Wertes auf pH 8,5 wurde die IFN- $\gamma$ -haltige Lösung über eine Zink-Chelatsäule gereinigt. Hierbei wurde die Sulfobetain-Konzentration bei 0,05 % gehalten. Das über die Zink-Chelatsäule gereinigte Material hatte bereits einen Reinheitsgrad größer 80 % und konnte nun bereits für Modifikationsversuche herangezogen werden.

##### 4.4.1.1 Alternative Lösungsvermittler für IFN- $\gamma$ aus Bakterienzellen

Wie beschrieben wurde IFN- $\gamma$  aus *inclusion bodies* über das zwitterionische Detergenz Sulfobetain SB 14 gelöst. Da dieses Detergenz wie unten geschildert die PEGylierungsreaktionen am IFN- $\gamma$  stört, wurde versucht, das IFN- $\gamma$  mit anderen lösungsvermittelnden Substanzen aus den *inclusion bodies* zu lösen. Hierbei wurden sowohl andere Detergenzien wie Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid und Tween 20 als auch inertes Polyethylenglycol 10.000 und Ethylenglycol untersucht.

Alle Substanzen wurden zunächst auf ihre Fähigkeit untersucht, IFN- $\gamma$  aus den *inclusion bodies* zu lösen. Dieses geschah mit Detergenzien sehr leicht. Auf der Zink-Chelatsäule zeigte sich dann der Nachteil dieser anders als Sulfobetain nichtionischen Detergenzien. Eine Bindung von IFN- $\gamma$  an das Säulenmaterial fand hier nicht statt, so dass eine weitere Aufarbeitung des Material nicht erfolgen konnte.

PEG 10.000 und Ethylenglycol wiederum scheiterten schon einen Schritt früher. Diese Substanzen waren nicht in der Lage, IFN- $\gamma$  aus *inclusion bodies* zu lösen, so dass mit diesen Lösungsvermittlern kein Material für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand.

#### 4.4.2 Expression in CHO-Zellen und Aufarbeitung von IFN- $\beta$

Anders als die Expression in Bakterienzellen erfolgte die Expression in CHO-Zellen in einem semikontinuierlichen Verfahren. Hierzu wurden IFN- $\beta$ -exprimierende CHO-Zellen in einem Mischmedium aus CHO-S-SFM II und MEM- $\beta$  mit HSA und MEM-*vitamins* als Suspensionszellen kultiviert.

Alle 2 – 3 Tage wurden 2/3 des Mediums durch frisches Medium ausgetauscht. Mit diesem Medienaustausch wurde gleichzeitig die Zellzahl auf ein Drittel reduziert.

Die durch diesen Medienaustausch gewonnenen Zellkulturüberstände wurden gepoolt und bei einem Volumen von 8,5 l aufgereinigt.

Das Aufreinigungsverfahren bestand aus drei chromatographischen Schritten, wobei zunächst eine Blue Sepharose-Säule eine grobe Abtrennung von verunreinigenden Proteinen brachte, aber gleichzeitig das Arbeitsvolumen auf 1/50 reduzierte. Im zweiten chromatographischen Reinigungsschritt wurde eine Zink-Chelat-Säule eingesetzt. Über diese wurde eine Aufreinigung auf eine Reinheit von 80-90 % (aus silbergefärbten SDS-Gel abgelesen) erreicht.

Im letzten Reinigungsschritt wurde eine Gelfiltrationssäule eingesetzt. Der Reinheitsgrad nach der Gelfiltration betrug ca. 95 %.

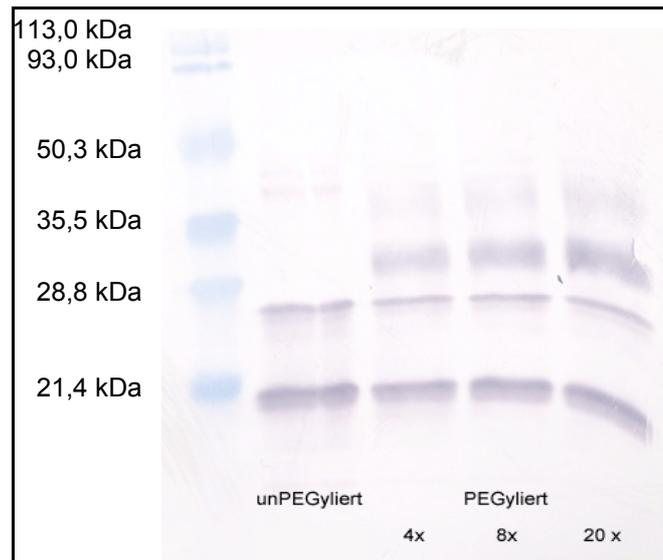
#### 4.5 PEGylierung von IFN- $\beta$

PEGylierungsreaktionen am IFN- $\beta$  wurden sowohl mit dem aus *inclusion bodies* stammenden Material als auch mit CHO-Material durchgeführt.

##### 4.5.1 PEGylierung am IFN- $\beta$ aus *inclusion bodies*

Zunächst wurde eine PEGylierung am Material aus *inclusion bodies* probiert. Als IFN- $\beta$ -Variante wurde hierzu die Variante IFN- $\beta$ -8x gewählt, da diese das einzige IFN- $\beta$ -Material aus *inclusion bodies* ist, welches über ein freies Cystein an Position 17 verfügt, was eine Thiol-PEGylierung ermöglichen würde.

Zunächst wurde das IFN- $\beta$  8x mit 5.000 Da mPEG-SPA bei verschiedenen Verhältnissen von Protein und PEG-Reagenz über Nacht bei RT inkubiert.

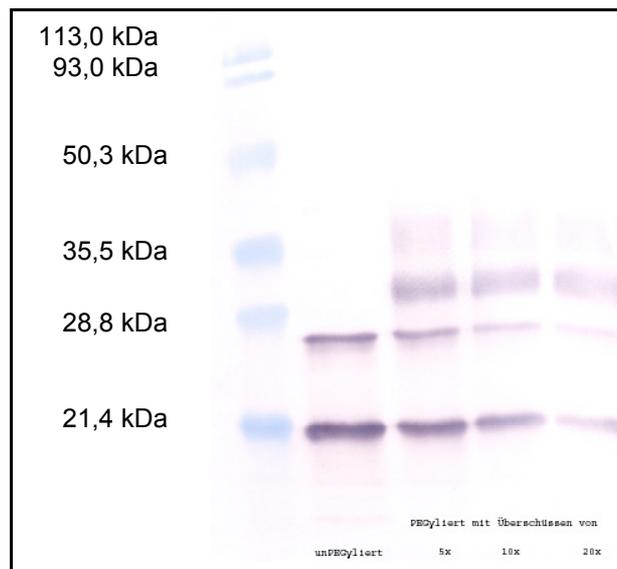


**Abb. 27** Vergleich von unPEGyliertem IFN- $\alpha$  mit 5kDa-Amin-PEGyliertem IFN- $\alpha$  bei verschiedenen PEG-Reagenzüberschüssen. Material aus *inclusion bodies*

Deutlich ist auf dem *western blot* die Zunahme der Bande für das einfach PEGylierte IFN- $\alpha$  aus Bakterienzellen bei 30 kDa mit steigender PEG-Reagenzkonzentration zu erkennen. Da jedoch selbst bei 20fachem Überschuss des PEG-Reagenzes nur maximal 20 % des IFN- $\alpha$  PEGyliert wurden (die Bande des unPEGylierten IFN- $\alpha$  8x bei 20 kDa nahm nicht signifikant ab), war davon auszugehen, dass Sulfobetain SB 14 einen negativen Einfluss auf die PEGylierungsreaktion hat.

Über verschiedene Wege wurde nun versucht, die Effizienz der PEGylierung zu steigern. Als einfachster Schritt war dabei die Abreicherung der Sulfobetainkonzentration über eine Verdünnung in einem zehnfachen Volumen eines Sulfobetain-freien Puffers und anschließende Volumensverringerng über Ultrafiltration anzusehen.

Das sulfobetainabgereicherte Konzentrat wurde anschließend mit einem 5fachen, 10fachen und 20fachen Überschuss des PEGylierungs-Reagenzes versetzt und über Nacht bei RT inkubiert.



**Abb. 28** PEGylierung von IFN- $\gamma$  mit 5 kDa-Amin-PEG-Reagenz nach Sulfobetainabreicherung

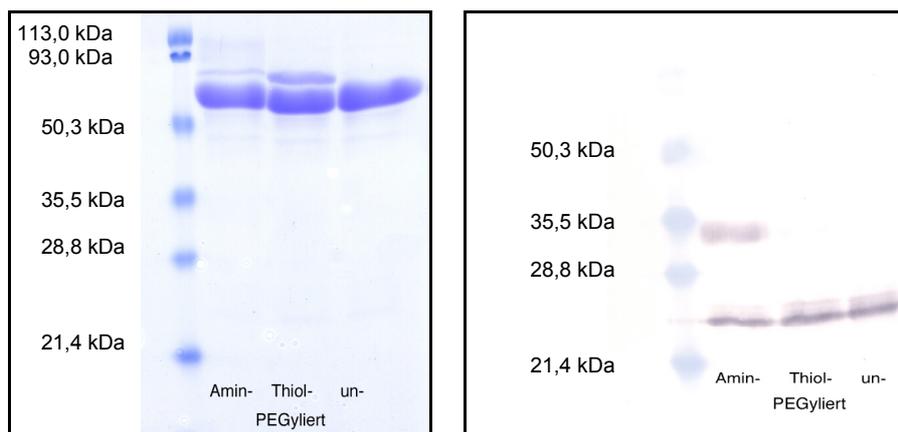
Wie auf dem *western blot* ersichtlich, zeigte sich bei hohen PEG-Reagenzüberschüssen (20 x) eine deutliche Abnahme der unPEGylierten IFN- $\gamma$ -Bande (20 kDa). Da in allen Ansätzen gleiche Mengen unPEGyliertes IFN- $\gamma$  eingesetzt wurden, musste man also von einem ungefähr 50 %igen Umsatz des IFN- $\gamma$  zum PEG-IFN- $\gamma$  bei einem 20fachen Überschuss des PEG-Reagenzes ausgehen. Da bei der 5.000 Da Amin-PEGylierung des IFN- $\gamma$  8x MehrfachPEGylierungen auftraten (Banden oberhalb 35 kDa, die schlecht anfärbbar waren), wurde von der Bestimmung der Aktivität abgesehen, da aus der Literatur bekannt war, dass MehrfachPEGylierungen zu einem massiven Aktivitätsabfall der PEGylierten Proteine führen. Ein zweiter Ansatz lief über eine Umpufferung von Sulfobetain auf Ethylenglycol, welches aufgrund seiner Struktur keine Störung der PEGylierungsreaktion hervorrufen sollte. Diese Umpufferung musste allerdings bereits während der Elution von der Zink-Chelat-Säule erfolgen, da nach diesem Schritt bereits die PEGylierungsversuche erfolgten. Hierzu wurde ein Elutionspuffer aus 0,1 M Natriumacetat (pH 5,5), 0,5 M NaCl und 10 % Ethylenglycol angesetzt. Hier musste jedoch festgestellt werden, dass IFN- $\gamma$  aus Bakterienzellen mit diesem Puffer nur schlecht von der Zink-Chelatsäule eluiert werden konnte, so dass eine PEGylierung mit diesem Eluat nicht durchführbar war.

#### 4.5.2 PEGylierung am IFN- $\gamma$ aus CHO-Zellen

Da Sulfobetain eine PEGylierung des IFN- $\gamma$  aus *inclusion bodies* stark störte, wurde ein zweiter Ansatz zur PEGylierung des IFN- $\gamma$  vorbereitet. Als Material kam hier das aus CHO-

Zellen gewonnene glycosylierte IFN- $\alpha$  zum Einsatz. Dieses konnte ohne Sulfobetain aufgearbeitet und formuliert werden, so dass von einer Störung der PEGylierungsreaktion durch Sulfobetain nicht auszugehen war.

Zunächst wurden die PEGylierungsversuche am IFN- $\alpha$  aus CHO-Zellen mit dem käuflichen Präparat Rebif durchgeführt, da dieses in hinreichender Menge zur Verfügung stand. Dabei stellte man fest, dass bei der PEGylierung von IFN- $\alpha$  aus CHO-Zellen mit 5.000 Da PEG-Reagenz die Anwesenheit von HSA anscheinend störte, da HSA im Überschuss in der Formulierung vorlag, so dass eher eine PEGylierung am HSA geschehen konnte, denn am Rebif. So konnte dann auch im *western blot* nur für die Amin-PEGylierung neben der diskreten Rebif-Bande bei 21 kDa eine Bande für ein einfach PEGyliertes Rebif gefunden werden. Auf dem zugehörigen coomassiegefärbten SDS-Gel wiederum erkannte man deutlich sowohl für die Thiol-PEGylierung als auch für die Amin-PEGylierung zwei HSA-Banden, was für eine zusätzliche partielle PEGylierung des HSA sprach, besonders bei der Thiol-PEGylierung war diese Bande deutlich zu erkennen.



**Abb. 29** PEGylierung von Rebif mit 5.000 Da mPEG bei pH 4,5  
Auf dem Gel konnten ausschließlich die HSA-Banden erkannt werden.

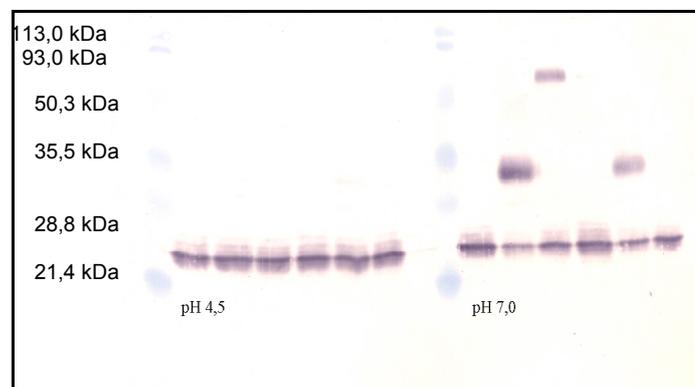
Bedingt durch diese Daten wurde nun nach einer Methode gesucht, IFN- $\alpha$  ohne HSA in Lösung zu halten. Hier wurde wieder auf das Natriumcholat ein Ersatz von HSA durch Natriumcholat angedacht, welches bereits in der Zellkultur getestet wurde.

Die Umstellung von HSA auf Natriumcholat wurde während der Aufarbeitung realisiert. Nachdem bereits im ersten Säulenschritt die HSA-Konzentration verringert wurde, wurde im zweiten Säulenschritt anders als in der Dissertation von Thorsten Uwe Meyer beschrieben, nicht 2 mg/ml HSA zur Stabilisation des eluierten IFN- $\alpha$  in die Sammelgefäße vorgelegt sondern 10  $\mu$ g/ml Natriumcholat. Nach dem Vereinigen der IFN- $\alpha$ -haltigen Fraktionen wurden diese auf ein 1/10 des Volumens eingengt und anschließend PEGyliert.

Die IFN- $\gamma$  *wt*-haltigen Fraktionen wurden anschließend gepoolt und auf ein Zehntel des ursprünglichen Volumens eingengt.

Nachdem in einem Vorversuch mit diesem durch Natriumcholat stabilisierten IFN- $\gamma$  *wt* keine PEGylierung festgestellt werden konnte, wurde überprüft, welche Parameter neben Fremdproteinen eine PEGylierung stören könnten. Als einzige weitere mögliche Störquelle in dem IFN- $\gamma$  *wt*-Eluat wurde der pH-Wert von 4,5 ausgemacht.

Für diesen neuen PEGylierungsversuch wurde die IFN- $\gamma$  *wt*-Lösung mit Tris auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt, bevor IFN- $\gamma$  *wt* sowohl bei pH-4,5 als auch bei pH 7,0 PEGyliert wurde. Dabei wurden Amin-PEGylierungen mit 5.000 und 20.000 Da Kettenlänge sowie Thiol-PEGylierungen mit 5.000, 20.000 und 40.000 Da Kettenlänge durchgeführt.

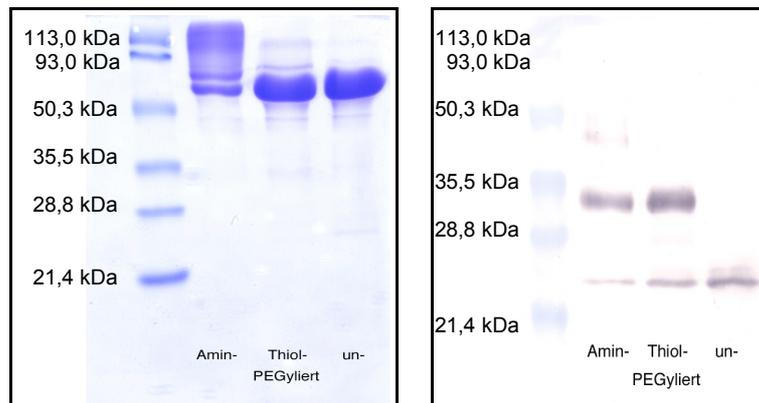


**Abb. 30** Vergleich verschiedener PEGylierungsansätze von IFN- $\gamma$  *wt* bei zwei pH-Werten. Von links nach rechts sind jeweils folgende PEG-Ansätze aufgetragen worden: unPEGyliert, 5.000 Da Thiol-PEG, 20.000 Da Thiol-PEG, 40.000 Da Thiol-PEG, 5.000 Da Amin-PEG und 20.000 Da Amin-PEG

Bis auf die Thiol-PEGylierung mit 40.000 Da und die Amin-PEGylierung mit 20.000 Da konnten für alle weiteren PEGylierungsansätze bei pH 7,0 deutliche PEGylierungsbanden gefunden werden, wobei für die 40.000 Da Thiol-PEGylierung eine schwache PEG-Bande im Original zu erkennen war, welche durch die Dokumentation verloren gegangen war. Für die 5.000 Da Amin-PEGylierung konnte des Weiteren bereits bei pH 4,5 eine leichte PEG-Bande gefunden werden, die ebenfalls durch die Dokumentation des *western blots* verloren gegangen war. Somit war bewiesen, dass für die PEGylierung von IFN- $\gamma$  *wt* die Einstellung des pH-Wertes entscheidend war.

Bedingt durch die Erkenntnis, dass ein saurer pH-Wert die PEGylierungsreaktionen empfindlich stört, sollte nun noch einmal der Einfluss von HSA auf die PEGylierungsreaktion überprüft werden. Hierzu wurde ein erneuter PEGylierungsansatz für Rebif gestartet. Für

dieses wurde zunächst der pH-Wert des Rebif-Präparates mit Tris neutralisiert, bevor mit 5.000 Da PEG-Reagenzien Amin- und Thiol-PEGyliert wurde.



**Abb. 31** PEGylierung von Rebif nach Neutralisation mit 5.000 Da mPEG-MAL und mPEG-SPA. Auf dem Gel konnten ausschließlich die HSA-Banden erkannt werden.

Deutlich ist erkennbar, dass Rebif nach Neutralisation sowohl Amin- als auch Thiol-PEGylierbar war. Im neutralen Bereich ließ sich mit den 5.000 Da PEG-Reagenzien PEGylierungsraten am Rebif größer 70 % erzielen. Im Vergleich von Amin-PEGylierung und Thiol-PEGylierung zeigte sich bei der Thiol-PEGylierung eine wesentlich stärkere diskrete Bande bei 34 kDa. Die Amin-PEGylierung hingegen zeigte erneut eine Tendenz zu mehrfachen PEGylierungen, wobei die bei der Dokumentation nicht erfasst werden konnten. Auffällig ist die Neigung des Amin-PEGylierungsreagenz bei pH 7 massiv am HSA zu PEGylieren.

## 4.6 Expression und Aufreinigung der IFN- $\gamma$ Varianten

Die Arbeiten am IFN- $\gamma$  wurden im Rahmen einer Studie zur Bioverfügbarkeit von IFN- $\gamma$  und seinen Varianten durchgeführt.

Im Gegensatz zum IFN- $\gamma$  ist IFN- $\beta$  wesentlich hydrophiler. Der Umgang mit IFN- $\beta$  aus Bakterienzellen erfordert keinen Einsatz von Lösungsvermittlern.

### 4.6.1 Vergleich von Expression in JM 105 und MM 294

Im Rahmen der Studie am IFN- $\beta$  wurde das Plasmid pKK233-2 mit den entsprechenden IFN- $\beta$ -Genen aus dem Bakterienstamm JM 105 in den Bakterienstamm MM 294 transformiert.

Mit beiden Bakterienstämmen konnte eine Expression nach dem patentierten löslichen Verfahren erfolgen. Beide Bakterienstämme wuchsen in YT + Amp-Medium.

Der Vorteil, den der Bakterienstamm MM294 gegenüber dem Stamm JM105 besaß, war die höhere Verdopplungsrate. So erreichte der MM294 bereits 2-2,5 h nach Beimpfen der Expressionskultur die Induktionsbedingung von einer optischen Dichte von  $OD_{600nm} = 0,6$ , der JM105 benötigte hier einen Zeitraum von 3 – 3,5 h. Nach der Induktion wuchs der MM294 auch bei zur löslichen Expression auf 25° C gesenkter Temperatur zügiger als der JM 105. So war für den MM294 bereits nach weiteren 2-3 h die Expressionsabbruchbedingung von einer  $OD_{600nm} > 1,8$  gegeben. Der JM 105 brauchte zum Erreichen der gleichen OD einen Zeitraum von 4 – 5 h. Mit beiden Stämmen ließen sich so 6 – 7 g Bakterien (Nassgewicht) gewinnen.

Da die beiden Stämme von der produzierten Proteinmenge nach Abbruch der Expression identisch waren, war der MM294 deutlich geeigneter für die Expression des IFN- $\gamma$  da im günstigsten Falle die Expression vom Beimpfen bis zur Ernte in der Hälfte der Zeit erfolgte, die für die Expression im JM105 benötigt wurde.

#### 4.6.2 Aufreinigung der IFN- $\gamma$ -Varianten

Alle IFN- $\gamma$ -Varianten wurden nach dem gleichen Verfahren aufgereinigt. Zunächst wurden die IFN- $\gamma$ -produzierenden Bakterienzellen vom Medium mittels Zentrifugation getrennt. Nach dem Waschen mit PBS erfolgte der Zellaufschluss durch Ultraschall in PBS.

Nach dem Aufschluss wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und der Überstand im *batch* an SP-Sepharose gebunden. Nach mehrfachem Waschen der SP-Sepharose mit PBS wurde das IFN- $\gamma$  mit einem Salzstoß (1M NaCl, 0,02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,0) im *batch* eluiert.

Mittels Ammoniumsulfatfällung wurde das Volumen auf 1/10 reduziert, bevor eine Endreinigung des IFN- $\gamma$  über eine Gelfiltration erfolgte.

Da über die Gelfiltration eine Volumenvergrößerung der Proteinlösung um den Faktor 5 bis 10 auftrat, wurde gegebenenfalls über einen Vivaspinkonzentrator aufkonzentriert.

Für die weiteren Arbeiten wurden die aufgereinigten IFN- $\gamma$ -Varianten sterilfiltriert und bei -20° C gelagert.

Die Ausbeuten nach der Gelfiltration für die einzelnen aufgearbeiteten Varianten bezogen auf ein Gramm Bakterienpellet (Nassgewicht) gemittelt über alle Aufarbeitungsansätze betragen:

7/69	0,47 mg
7/69 S99C	0,38 mg
7/69 D63C	0,45 mg
7/69 C-10	0,43 mg
7/69 S99C C-10 Q133L	0,55 mg

Im Vergleich der Aufarbeitungen aller Varianten lässt sich feststellen, dass alle Varianten bei der gleichen Aufarbeitungsmethode mit annähernd identischen Ausbeuten aufgearbeitet werden konnten. Unterschiede traten ausschließlich in der Konzentration der Gelfiltrationsfraktionen auf.

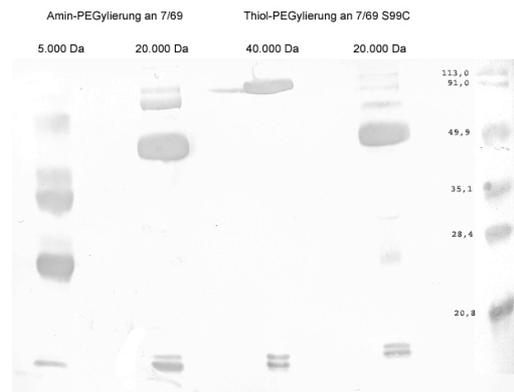
#### 4.7 PEGylierung von IFN- $\gamma$

Zum Auftakt der PEGylierungsarbeiten am IFN- $\gamma$  wurden die Varianten *wt* und 7/69 herangezogen. Diese besitzen in ihrer Aminosäuresequenz keine Cysteine (*wt*) bzw. sind so designt worden, dass die eingeführten Cysteine eine Disulfidbrücke knüpfen. Demnach konnte an diesen beiden Varianten nur Amin-PEGyliert werden.

Zunächst wurde eine 5.000 Da Amin-PEGylierung durchgeführt. Diese führte sowohl für *wt* als auch 7/69 zu MehrfachPEGylierungen, die sich auf dem SDS-Gel und dem *western blot* bemerkbar machten. Im Anschluss wurden beide Varianten mit 20.000 Da Amin-PEGyliert. Hierbei konnten bei *wt* und bei der 7/69-Variante erst nach einer fünfachen Aufkonzentration MehrfachPEGylierungen festgestellt werden.

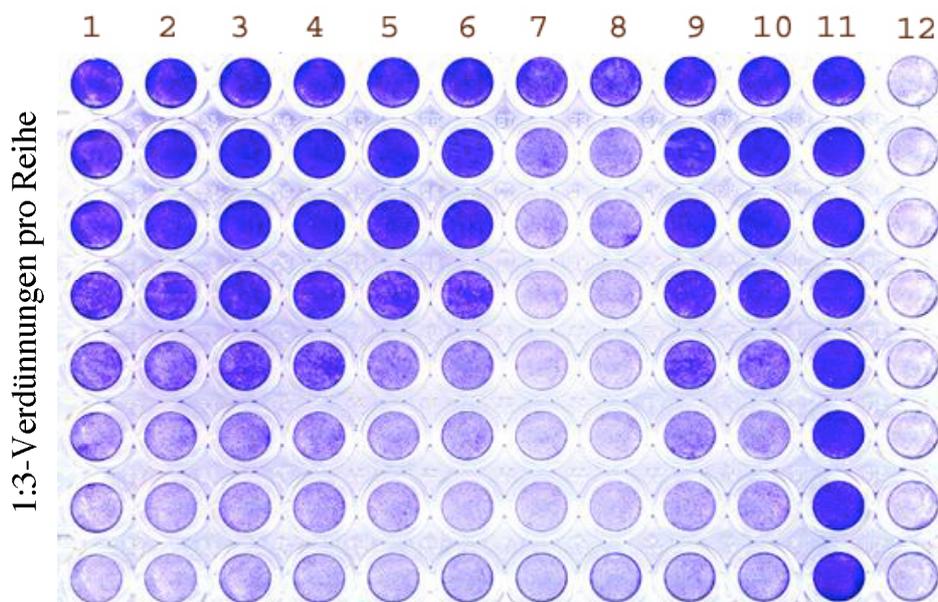
Da IFN- $\gamma$  pro Kette über 20 Lysinreste und einen N-Terminus verfügt, stehen pro Kette mehrere PEGylierungspositionen zur Amin-PEGylierung zur Verfügung. Über diese Positionen verteilt sich die Amin-PEGylierung statistisch.

Um definierte Produkte zu erhalten, wurde mit der Thiol-PEGylierung eine andere Methode der PEGylierung ausgewählt. Da wie oben beschrieben weder IFN- $\gamma$ *wt* noch 7/69 ein freies Cystein besitzen, wurde über eine Mutation ein Cystein in Position 63 bzw. 99 in das Protein eingefügt. Thiol-PEGylierungen mit allen verfügbaren Kettenlängen konnten an beiden Positionen durchgeführt werden, wobei eine fünfache Konzentration der Proben auch für die 20.000 Da Thiol-PEGylierte Variante Banden bei ungefähr 60 kDa zeigte, jedoch stimmten die Massen nicht mit mehrfach PEGyliertem IFN- $\gamma$  überein (IFN- $\gamma$ + 2 x 20.000 Da PEG-Rest müsste zu einer Masse von ca. 70 –75 kDa führen).



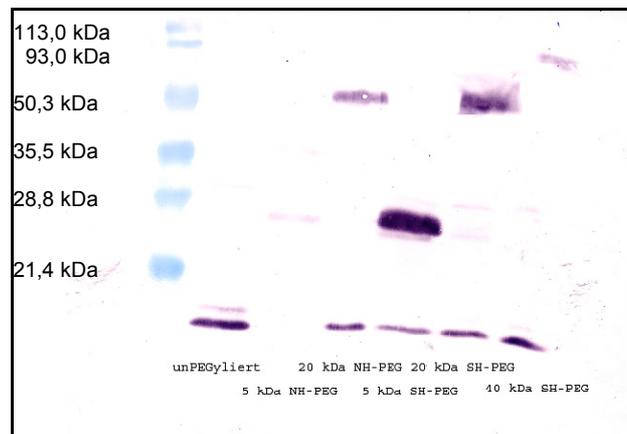
**Abb. 32** PEGylierungsmuster der Thiol- und Amin-PEGylierung exemplarisch am Beispiel der IFN- $\gamma$ -Varianten 7/69 und 7/69 S99C. Proben wurden fünffach konzentriert aufgetragen.

Zunächst wurde ein Vergleich zwischen den verschiedenen 5.000 Da modifizierten Varianten durchgeführt. Als Vergleichskriterium wurde die Aktivität im AVA herangezogen. Es wurden jeweils 5 ng/ml der verschiedenen modifizierten Varianten aufgetragen, was bei einer spezifischen Aktivität des IFN- $\gamma$  von  $2 \times 10^7$  IU/mg einer Aktivität von 33 IU im ersten *well* entspricht. Für die Thiol-PEGylierung wurden die modifizierten Varianten *wt* D63C, 7/69 D63C und 7/69 S99C eingesetzt. Für die Amin-PEGylierung wurde die modifizierte Variante 7/69 herangezogen.



**Abb. 33** Vergleich verschiedener mit 5 kDa PEGylierter IFN- $\gamma$ -Varianten. Aufgetragen wurden jeweils rechnerische 5 ng/ml Protein (entspricht unPEGyliert 100 IU/ml). Auftragsmuster: Spalten 1/2 IFN- $\gamma$  *wt* D63C Thiol-PEG, Spalte 3/4 IFN- $\gamma$  7/69 D63C Thiol-PEG, Spalte 5/6 IFN- $\gamma$  7/69 S99C Thiol-PEG, Spalte 7/8 IFN- $\gamma$  7/69 Amin-PEG, Spalte 9/10 Standard (100 IU/ml), Spalte 11 Lebendkontrolle, Spalte 12 Viruskontrolle

Aus dem AVA geht deutlich hervor, dass sowohl die Modifikation der Variante *wt* D63C als auch die Modifikationen der Varianten 7/69 D63C und 7/69 S99C Aktivitäten entsprechend der Aktivität eines nicht Pegylierten IFN- $\gamma$  haben. Eine Schwankung um ein *well* wie bei der Variante 7/69 S99C liegt im Rahmen der Messgenauigkeit des AVAs. Deutlich schlechter wiederum ist die Amin-PEGylierte Variante 7/69. Diese ist um einen Faktor 30 schlechter als das unPEGylierte IFN- $\gamma$ . Dieser starke Aktivitätsverlust lässt sich teilweise mit der Tendenz der Amin-PEGylierung zu MehrfachPEGylierungen gerade bei kurzen PEG-Ketten erklären. Für die weiteren Arbeiten wurde dann hauptsächlich die Variante 7/69 S99C herangezogen. Diese Variante wurde gewählt, da sie zum Einen die stabilisierende Disulfidbrücke (Waschütza et al. 1996) besitzt, zum Anderen befindet sich das Cystein an Position 99 in direkter Nachbarschaft einer der beiden natürlichen Glycosylierungstellen im IFN- $\gamma$ . Daraus resultierte die Überlegung, dass eine PEGylierung eher einer *in vivo*-Glycosylierung entspricht und somit nur einen geringen Einfluss auf die Struktur des Proteins nehmen sollte. Die Variante 7/69 S99C wurde daraufhin sowohl Amin- als auch Thiol-PEGyliert und in den Tierversuchen sowie den Stabilitätsversuchen eingesetzt. Neben der Effizienz der PEGylierung waren auch die Aktivität der verschiedenen PEGylierten Modifikationen interessant.



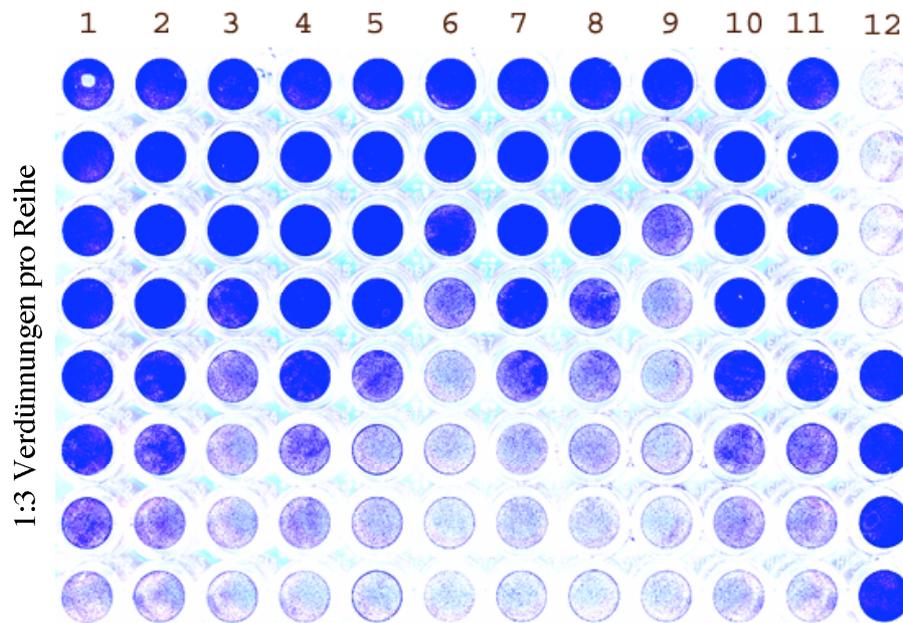
**Abb. 34** Vergleich verschiedener PEGylierungsreaktionen am IFN- $\gamma$  7/69 S99C. Bei der 5.000 Da Amin-PEGylierungen treten oberhalb 45 kDa mehrere schwach anfärbare Banden auf, die durch die Dokumentation verlorengegangen sind.

Zur Überprüfung der Effizienz der PEGylierungsreaktionen wurden identische Mengen IFN- $\gamma$  7/69 S99C mit mPEG-SPA und mPEG-MAL der verschiedenen Kettenlängen PEGyliert. Nach der PEGylierungsreaktion wurden die die PEGylierungsansätze über ein SDS-Gel mit anschließenden *western blot* analysiert.

Wie auf dem oben dargestellten *western blot* zu erkennen ist, war beiden PEGylierungsreaktionen gemeinsam, dass die Rate an PEGyliertem IFN- $\gamma$  mit steigender Kettenlänge sinkt, was auf die steigende sterische Hinderung durch die immer längere, nicht an der eigentlichen PEGylierungsreaktion beteiligte PEG-Kette zurückzuführen ist. Die Ausbeute an PEGyliertem IFN- $\gamma$  kann jedoch durch Varianz der Reaktionsdauer und der Reaktionstemperatur gesteuert werden, wobei es jedoch nicht möglich ist, einen 100 %igen Umsatz zu erzielen. Bei der Reaktionstemperatur muss auf eine moderate Veränderung geachtet werden, damit nicht, wie später gezeigt, Inaktivierungsreaktionen am PEG-Reagenz ablaufen.

Interessant erscheint hierbei, dass die Amin-PEGylierung mit 5.000 Da scheinbar einen vollständigen Umsatz erzielt, jedoch zeigt das Original des oben abgebildeten *western blots*, dass das meiste IFN- $\gamma$  mehrfach PEGyliert wurde und somit schwerer durch den Antikörper angefärbt werden konnte. In Folge dieser mehrfachen PEGylierungen war auch die Bande des unPEGylierten IFN- $\gamma$  stark reduziert.

Zwischen Amin-PEGylierung und Thiol-PEGylierung fällt auf, dass die Amin-PEGylierung bei längeren mPEG-Ketten schärfere Banden auf dem *western blot* zeigte als die Thiol-PEGylierung. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf die Homogenität der PEGylierungsreagenzien ziehen. Demnach wäre die Kettenlänge bei dem Amin-PEGylierungsreagenz stärker auf die gewünschte Länge fokussiert, während das Thiol-PEGylierungsreagenz eher eine größere Streuung der Kettenlänge der mPEG-Ketten aufweist. Bei der PEGylierung interessiert neben dem Umsatz auch der Aktivitätserhalt eines PEGylierten Proteins. Hierzu wurden Proben der verschiedenen PEGylierungsvarianten der IFN- $\gamma$  7/69 auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt und im AVA getestet.



**Abb. 35** Vergleich der Aktivität von IFN- $\gamma$  7/69 S99C modifiziert über eine Thiol-PEGylierung mit verschiedenen PEG-Kettenlängen.

Die Thiol-PEGylierten Proben wurden nach ihrer ursprünglichen IFN- $\gamma$ -Konzentration in 1.000 IU/ml, 500 IU/ml und 100 IU/ml aufgetragen. In den Spalten 1-3 wurde die 5.000 Da Form, in 4-6 die 20.000 Da Form und in 7-9 die 40.000 Da Form aufgetragen. In den Spalten 10 und 11 wurde der IFN- $\gamma$ -Standard D3b mit 100 IU/ml aufgetragen. Die Spalte 12 wurde zur Vitalkontrolle und zur Viruskontrolle genutzt.

Im Rahmen der Messgenauigkeit eines AVAs lässt sich feststellen, dass die 5.000 Da Form eine spezifische Aktivität besitzt, die  $1/3$  bis  $1/5$  der spezifischen Aktivität des unPEGylierten IFN- $\gamma$  entspricht. Für die 20.000 Da Form ergibt sich hier ein Verhältnis von  $1/9$  bis  $1/15$ . Das Verhältnis für die 40.000 Da Form liegt bei  $1/27$  bis  $1/45$ .

Die Amin-PEGylierten Varianten wiederum fallen gegenüber dem Standard ungleich stärker ab. So konnte für die 5.000 Da Amin-PEGylierte Variante ein Verhältnis gegenüber dem Standard kleiner als  $1/100$  gemessen werden, wobei hier jedoch ein Gemisch der verschiedenen PEGylierungsstufen eingesetzt wurde.

#### 4.7.1 Darstellung der Variante 7/69 S99C C-10 Q133L des IFN- $\gamma$

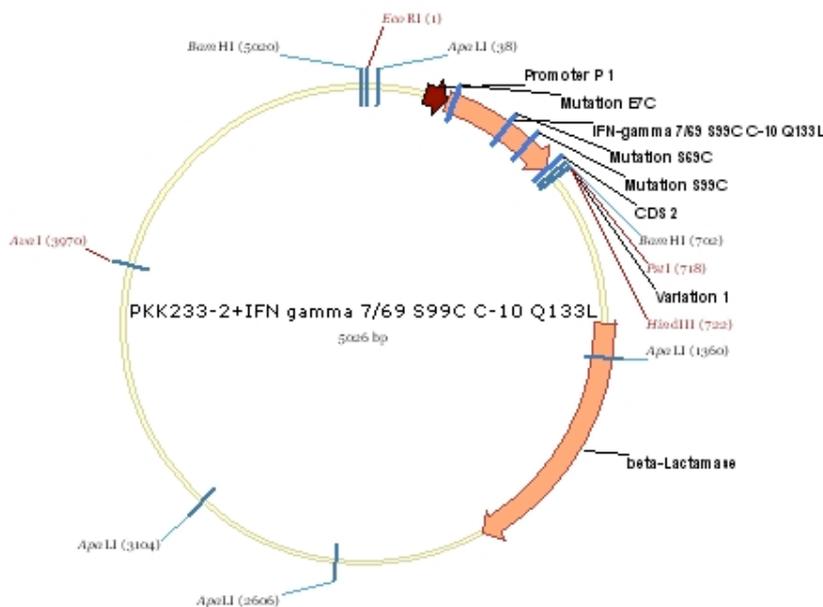
Bedingt durch die mit steigender PEG-Kettenlänge geringeren spezifischen Aktivitäten der modifizierten Varianten wurde an der Darstellung einer weiteren Variante des IFN- $\gamma$  gearbeitet, die eine höhere spezifische Aktivität als IFN- $\gamma$  *wt* besitzt. Diese Variante mit der

Bezeichnung 7/69 C-10 Q133L wurde als Folge der Arbeiten von Waschütza *et al.* (1996) und Slodowski *et al.* (1991) konstruiert. Pechenov *et al.* (2002) bestätigten eine höhere spezifische Aktivität ( $7,5 \times 10^7$  IU/mg) dieser Variante.

Zunächst wurde eine Methode gewählt, über ein Primerpaar, welches zur Darstellung der Variante 7/69 S99C eingesetzt worden war, die S99C-Mutation in die Variante 7/69 C-10 Q133L einzuführen. Da dieser Ansatz immer wieder Clone hervorbrachte, die zwar die Mutation S99C aber auch eine weitere Punktmutation in der näheren Umgebung der S99C-Mutation hatten, die zu *frame-shifts* führten, wurde von diesem Ansatz abgewichen.

Die Veränderung des Ansatzes brachte schließlich den gewünschten Erfolg. Die Variante 7/69 S99C wurde über eine Primerpaar verkürzt. Im Rahmen der Verkürzung wurde die Mutation Q133L mitgeführt.

Ein Klon mit der richtigen Sequenz für IFN- $\gamma$  7/69 S99C C-10 Q133L wurde zur weiteren Arbeit herangezogen.



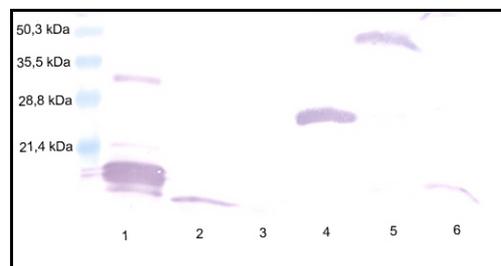
**Abb. 36** IFN- $\gamma$ -Mutante 7/69 S99C C-10 Q133L

Leider gelang die Darstellung der Variante 7/69 S99C C-10 Q133L zu spät, so dass die Stabilitätsversuche und die Tierversuche mit den verschiedenen Varianten und Modifikationen ohne diese Variante durchgeführt wurden.

#### 4.8 Stabilität von PEGyliertem IFN- $\gamma$

Ein wichtiger Effekt der PEGylierung von Proteinen ist die Erhöhung der Stabilität. Für das IFN- $\gamma$  sind hier vor allen Dingen Proteasestabilität, Thermostabilität und pH-Stabilität interessant.

Zur Überprüfung der Proteasestabilität wurden unPEGyliertes IFN- $\gamma$  7/69 S99C und die verschiedenen PEGylierten Varianten mit Trypsin inkubiert bei 37° C. Als Referenz wurde IFN- $\gamma$  7/69 S99C ohne PEGylierung mit inkubiert. Um reine PEG-Effekte ausschließen zu können, wurde eine weitere Probe unPEGyliertes IFN- $\gamma$  in einem 5 % PEG 10.000 (inert) haltigen Puffer mitinkubiert. Nach zwei Stunden und 24 Stunden wurden Proben entnommen und auf einem 20%igen SDS-Gel mit dem zugehörigen *western blot* analysiert.

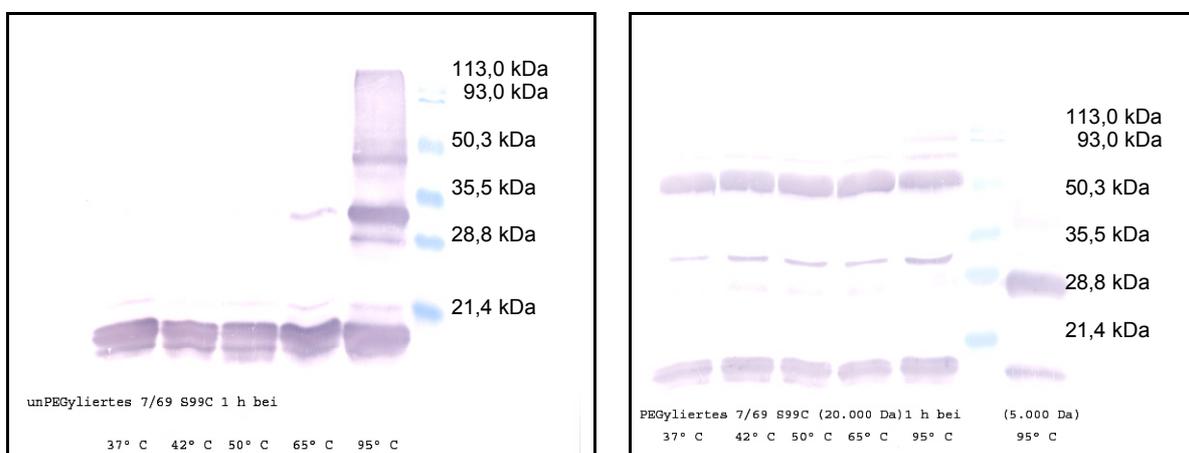


**Abb. 37** Trypsinverdau verschiedener Thiol-PEG-IFN- $\gamma$ -Modifikationen nach 24 h Inkubation.  
 (1) unverdaut, (2) – (5) verdaut mit 40 u/ml Trypsin, (2) ohne Zusätze, (3) mit PEG 10.000-Puffer, (4) modifiziert mit 5.000 Da PEG, (5) modifiziert mit 20.000 Da PEG, (6) modifiziert mit 40.000 Da PEG

Da nach zwei Stunden nur sehr geringe Unterschiede auftraten, wurde der 24 h-Verdau abgewartet. Wie auf dem *western blot* nach einer 24stündigen Inkubation der Proben mit Trypsin zu erkennen ist, zeigte sich eine deutliche Abnahme der IFN- $\gamma$ -Hauptbande beim unPEGylierten und in PEG-Puffer befindlichen Ansatz. Hingegen zeigte sich bei allen PEGylierten Ansätzen keine Verringerung der Bandenintensität. Dass die Banden bei längeren PEG-Ketten weniger intensiv waren als bei kurzen Ketten oder dem unPEGylierten Protein, liegt an der schlechteren Bindung des Primärantikörpers aufgrund des PEG-Restes. Die 40.000 Da Thiol-PEG-IFN- $\gamma$ -Bande konnte auf dem *western blot* nicht sichtbar gemacht werden, da das 40.000 Da Thiol-PEG-IFN- $\gamma$  nur ansatzweise in das Trenngel eingewandert war.

In einem zweiten Ansatz wurde die 20.000 Da-Modifikation der IFN- $\gamma$ -Variante 7/69 S99C PEGyliert und parallel zur unPEGylierten Variante bei verschiedenen Temperaturen

inkubiert. Während sich beim unPEGylierten IFN- $\gamma$  nach einer Stunde bei 65° C und 95° C ein von Lauren *et al.* (1993) sowie Bumelis *et al.* (2002) beschriebenes kovalent verknüpftes Dimer bildet, kann dies für die 20.000 Da-PEG-Variante ebensowenig gezeigt werden wie für die nur bei 95° C mitgeführte 5.000 Da-PEG-Variante. Die bei der 20.000 Da-PEG-Variante auf Höhe von ca. 30 kDa auftretende Bande konnte über das silbergefärbte Gel auf ein Gelartefakt bedingt durch freies inaktiviertes PEG-Reagenz zurückgeführt werden, welches aufgrund seines Laufverhaltens auf der gleichen Höhe wie das 20.000 Da modifizierte IFN- $\gamma$  lief. Dieses inaktivierte PEG verschiebt die Bande für das PEGylierte IFN- $\gamma$  in den Bereich von 30 kDa und 50 kDa.



**Abb. 38** Vergleich von UnPEGyliertem IFN- $\gamma$  und PEGyliertem IFN- $\gamma$  der Variante 7/69 S99C bei verschiedenen Temperaturen nach einer Stunde

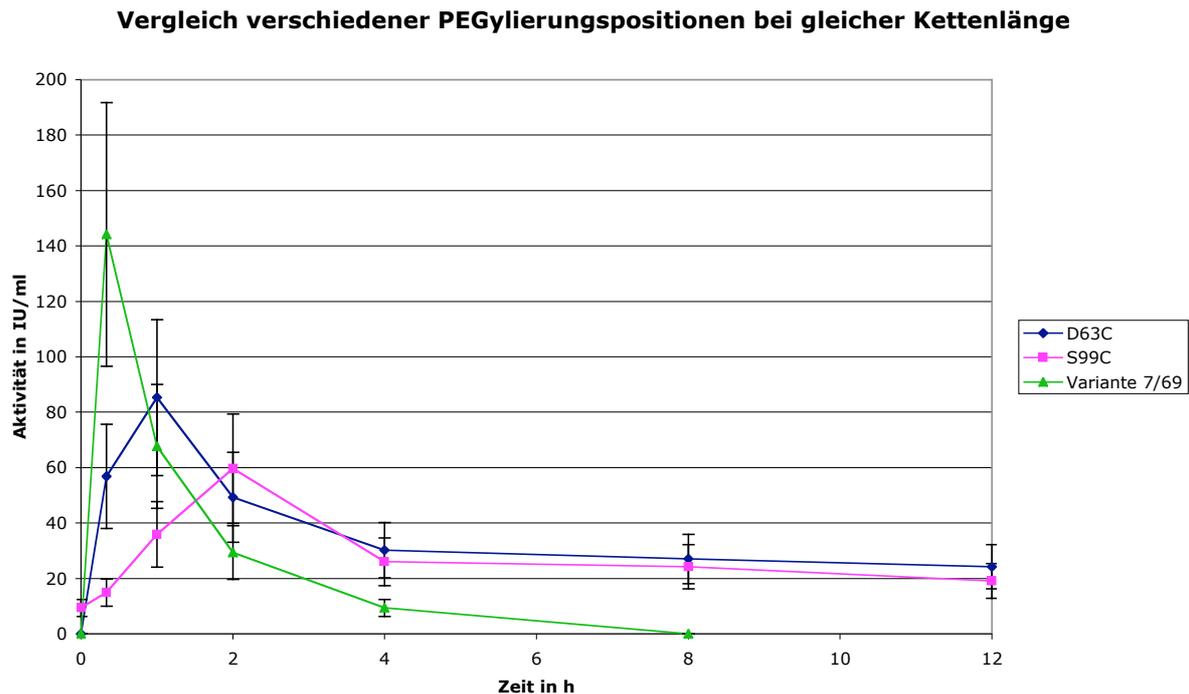
Im dritten Ansatz wurde PEGyliertes und unPEGyliertes IFN- $\gamma$  7/69 S99C unter sauren pH-Bedingungen (pH 3) und basischen pH-Bedingungen (pH 10) für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Proben wurden anschließend über ein SDS-Gel mit *western blot* analysiert. Weder für die PEGylierte noch für die unPEGylierte Form konnten Veränderungen auf einem Gel oder *western blot* festgestellt werden.

#### 4.9 Tierversuch

Eine der wichtigsten Eigenschaften, die eine PEGylierung an einem Protein bringt, ist die Veränderung des Proteinverhaltens *in vivo*. Aus diesem Grund wurden Tierversuche in der Ratte mit verschiedenen modifizierten und nicht modifizierten Varianten des IFN- $\gamma$  durchgeführt. Die Ratten erhielten hierzu  $8 \times 10^6$  IU/kg subkutan injiziert.

Zunächst wurde IFN- $\gamma$  7/69 gegen IFN- $\gamma$  wt jeweils unPEGyliert an 2 x 6 Tieren getestet, wobei es keine Unterschiede zwischen den beiden Varianten in der Bioverfügbarkeit und dem Abbau in der Blutbahn gibt. Im weiteren Verlauf wurden dann an jeweils 5 – 6 Tieren die verschiedenen modifizierten Varianten des IFN- $\gamma$  getestet.

Zunächst wurden die 5.000 Da Thiol-PEG-Varianten 7/69 D63C und 7/69 S99C gegeneinander untersucht und mit dem unPEGylierten 7/69 verglichen.



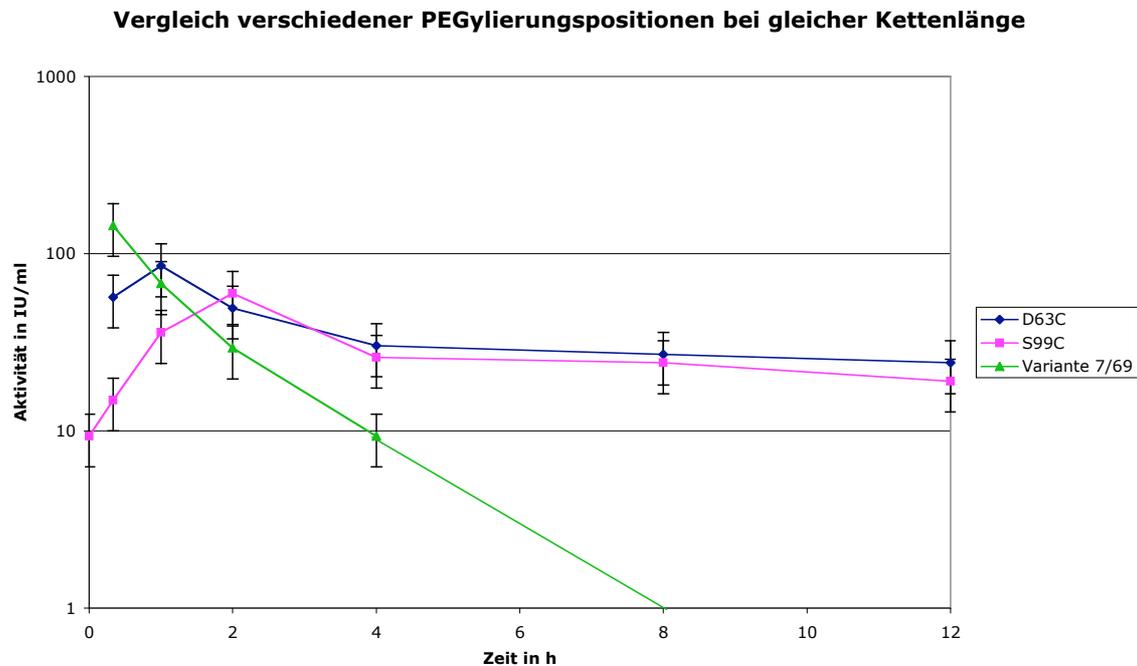
**Abb. 39** Vergleich verschiedener PEGylierungspositionen bei gleicher Kettenlänge. Aufgetragen sind die Aktivitätsdaten über 5 Tiere pro Ansatz gemittelt.

Bereits bei den oben dargestellten Kurven erkennt man deutlich, dass durch die PEGylierung die Aufenthaltsdauer des IFN- $\gamma$  in der Blutbahn der Ratte stark verlängert ist. Während das unPEGylierte IFN- $\gamma$  bereits nach 8 Stunden so weit aus der Blutbahn entfernt worden ist, dass kein IFN- $\gamma$  im AVA nachweisbar war, zeigten die PEGylierten Varianten auch nach 12h noch deutliche Aktivität im AVA. Diese verlängerte Aufenthaltsdauer wiederum geht zu Lasten der maximalen IFN- $\gamma$ -Aktivität im Serum.

Gerade der Abbau des IFN- $\gamma$  in der Blutbahn, sei es durch aktiven Abbau des Proteins oder durch Nierenfiltration, wird noch deutlicher bei der Betrachtung im halblogarithmischen Maßstab. In der halblogarithmischen Darstellung zeigt sich sehr deutlich der starke Aktivitätsverlust für die UnPEGylierte Variante. Beide PEGylierten Varianten sind hier deutlich bevorzugt, wobei jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Modifikation

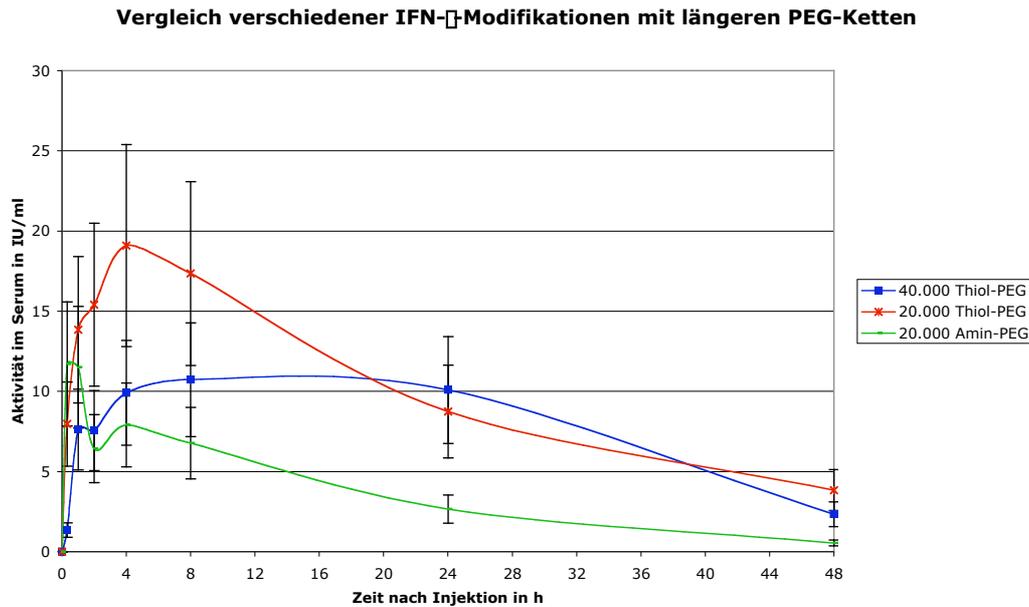
mit der PEGylierung in Position 99 und der Modifikation mit PEGylierung in Position 63 auftritt.

Der einzige nennenswerte Unterschied liegt im Maximum der beiden Varianten. So hat die Variante D63C ihre maximale Serumaktivität nach 1 Stunde, die Variante S99C nach zwei Stunden.



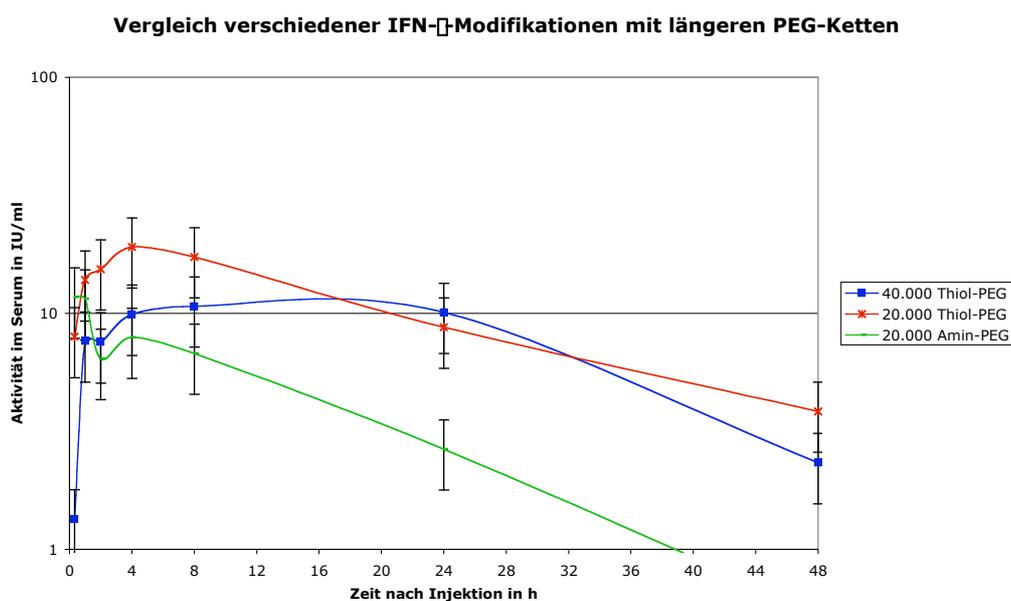
**Abb. 40** Halblogarithmischer Auftrag der beiden 5.000 Da Thiol-PEGylierten Varianten des IFN- $\gamma$

Nachdem gezeigt werden konnte, dass bereits eine 5.000 Da Thiol-PEGylierung eine deutliche Verlängerung der Aufenthaltsdauer des IFN- $\gamma$  in der Blutbahn der Ratte bedingt, wurden nun weitere Modifikation der Variante 7/69 S99C untersucht. Diese Variante wurde hierzu mit mPEG-MAL der Kettenlängen 5 kDa, 20 kDa und 40 kDa an der freien SH-Gruppe des Cysteins in Position 99 PEGyliert. Auf die Variante 7/69 D63C wurde verzichtet, da diese Variante gegenüber der Variante 7/69 S99C keine signifikanten Unterschiede gezeigt hat. Des Weiteren wurde vermutet, dass die Variante 7/69 S99C stärker dem natürlichen glycosylierten IFN- $\gamma$  als die Variante 7/69 D63C ähnelt, da die Position S99C in direkter Nachbarschaft zur Glycosylierungsstelle am N97. Im dritten Tierversuch wurden nun die 20.000 Da und 40.000 Da Modifikation der Variante 7/69 S99C untersucht. Parallel wurde auch eine 20.000 Da Amin-PEGylierte Modifikation dieser Variante mitgeführt.



**Abb. 41** Vergleich verschiedener IFN- $\gamma$ -Modifikationen mit längeren PEG-Ketten

Deutlich erkennbar ist die wesentlich schlechtere Pharmakokinetik der 20.000 Da Amin-PEGylierten IFN- $\gamma$ -Modifikation gegenüber den Thiol-PEGylierten Varianten. Diese hat ihre maximale Aktivität bereits nach 20 min erreicht und fällt dann relativ schnell ab. Das Maximum der Aktivität bei der Amin-PEGylierten Variante liegt mit 12 IU/ml auf dem Niveau der 40.000 Da Thiol-PEGylierten Variante, wobei diese ihr Maximum erst ca. 16 Stunden nach Injektion erreicht.



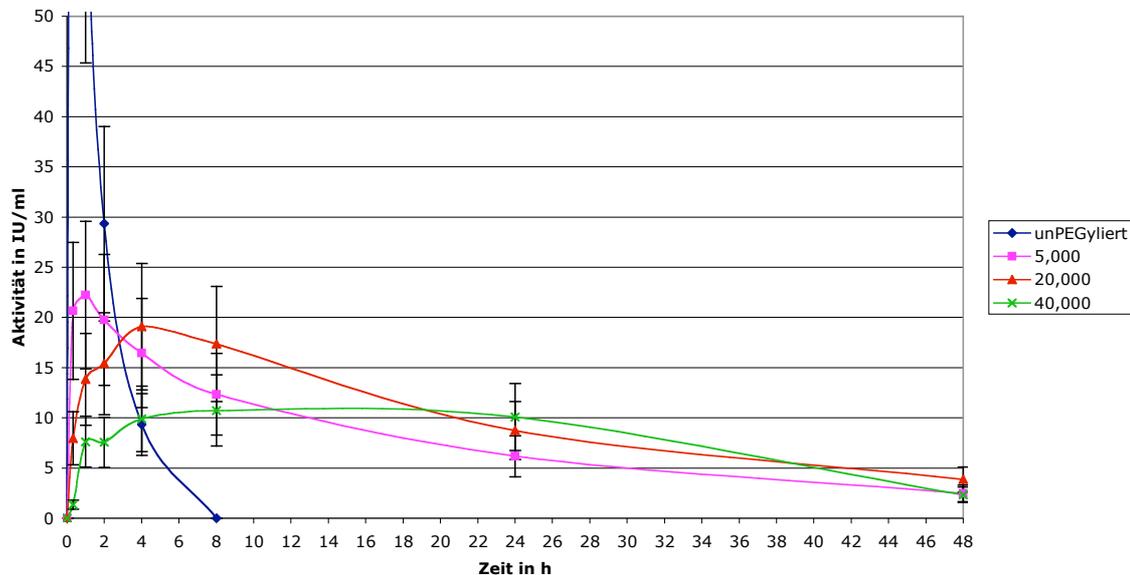
**Abb. 42** Halblogarithmischer Auftrag der Aktivität der Serumproben verschiedener PEG-Modifikationen des IFN- $\gamma$ 7/69 S99C

Im halblogarithmischen Maßstab erkennt man deutlich die Vorzüge einer Thiol-PEGylierten Modifikation des IFN- $\gamma$  7/69 S99C gegenüber einer gleich großen Amin-PEGylierung. Während die Aktivität der 20.000 Da Thiol-PEGylierten Modifikation in der Blutbahn der Versuchstiere langsam über 48 Stunden abnimmt, ist die Abnahme der Aktivität der 20.000 Da Amin-PEGylierten Modifikation wesentlich stärker.

Besonders die 20.000 Da Modifikationen zeigen deutlich die Vorteile der Thiol-PEGylierung am IFN- $\gamma$  gegenüber der Amin-PEGylierung

Zum Abschluss der Tierversuche sollten noch die einzelnen Thiol-PEGylierten Modifikationen des IFN- $\gamma$  7/69 S99C untereinander und mit der unPEGylierten Variante verglichen werden.

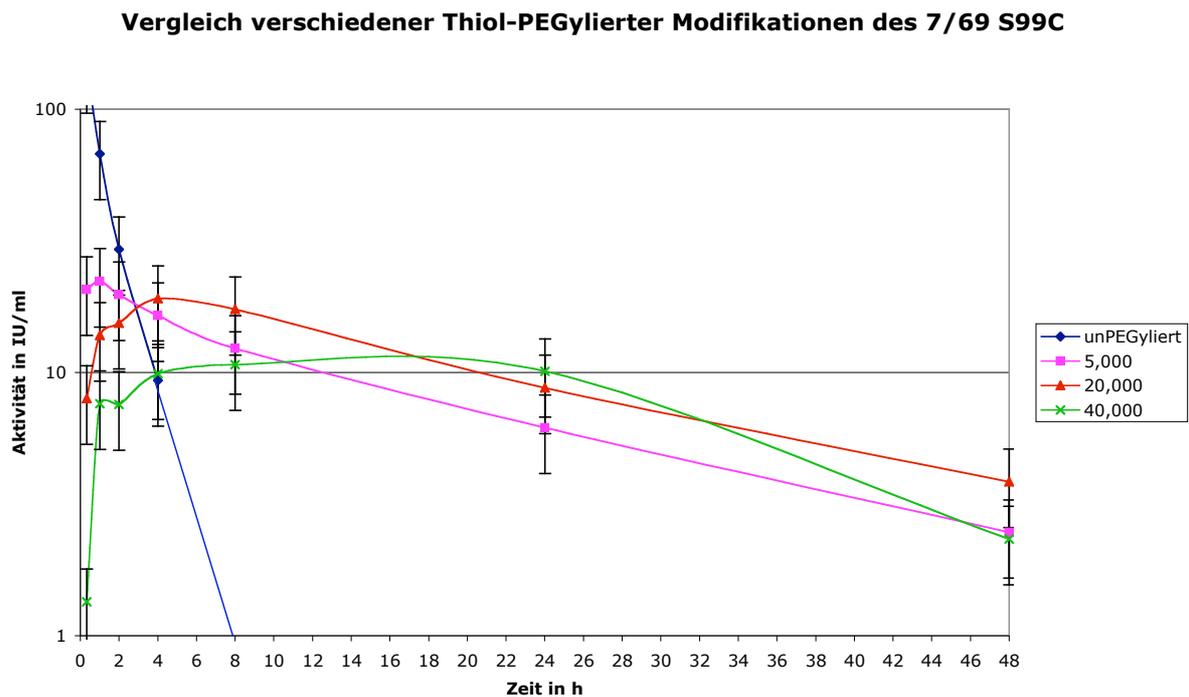
**Vergleich verschiedener PEG-Längen an 7/69 S99C (Florian)**



**Abb. 43** Ergebnisse des Tierversuchs zum Vergleich verschiedener Thiol-PEGylierter mit dem entsprechenden unPEGyliertem IFN- $\gamma$ . Zur besseren Verdeutlichung der Ergebnisse für die PEGylierten Varianten wurde die Skalierung der y-Achse auf 50 IU/ml Maximum beschränkt. Zur genaueren Darstellung der Kurve für das unPEGylierte IFN- $\gamma$  siehe **Abb. 39**.

Bereits in der oben dargestellten Grafik erkennt man die beiden wichtigsten Unterschiede zwischen PEGylierten IFN- $\gamma$  und unPEGyliertem IFN- $\gamma$ . Zunächst wird deutlich, dass das unPEGylierte IFN- $\gamma$  wesentlich früher die Blutbahn der Versuchstiere erreicht. Das Maximum der Aktivität ist 20 min nach subkutaner Injektion des IFN- $\gamma$ -Präparats bereits erreicht. Ein maximaler Serumspiegel von 140 IU/ml liegt zu diesem Zeitpunkt an. Die PEGylierten Modifikationen hingegen erreichen die Blutbahn langsamer, wobei das Erreichen der maximalen Aktivität abhängig von der Kettenlänge des eingesetzten PEG-Reagenz ist. Je

länger die angehängte PEG-Kette ist, desto länger benötigt das Protein für die Wanderung durch das Gewebe in die Blutbahn. Der maximale Serumspiegel ist demzufolge ebenfalls von der Länge der PEG-Kette abhängig. Jedoch unterscheiden sich die maximalen Serumspiegel der PEGylierten Modifikationen deutlich von dem maximalen Serumspiegel der unPEGylierten Variante. Für die PEGylierten Modifikationen liegen diese zwischen 10 IU/ml (40.000 Da PEG) und 22 IU/ml (5.000 Da PEG).



**Abb. 44** Halblogarithmischer Auftrag des Vergleichs verschiedener Thiol-PEGylierter Modifikationen des IFN- $\gamma$  7/69 S99C mit unPEGyliertem IFN- $\gamma$  im Tierversuch

Nahezu wichtiger als der maximale Serumspiegel in der Blutbahn der Versuchstiere ist die Abbaurate des IFN- $\gamma$ . Aus dem halblogarithmischen Auftrag geht deutlich hervor, dass alle Thiol-PEGylierten Modifikationen des IFN- $\gamma$  wesentlich langsamer in der Blutbahn der Versuchstiere abgebaut oder über die Niere ausgeschieden werden. Besonders die Modifikationen 5.000 Da und 20.000 Da werden sehr langsam abgebaut.

Die 40.000 Da Modifikation hingegen fällt etwas stärker in ihrer Aktivität im Serum ab als die kürzeren Modifikationen. Als wichtiger pharmakologisch relevanter Parameter neben der Maximalkonzentration ( $c_{\max}$ ) und der Zeit zum Erreichen der Maximalkonzentration ( $t_{\max}$ ) wurde die AUC (area under the curve) und für die drei Thiol-PEGylierten sowie das unPEGylierte IFN- $\gamma$  berechnet.

IFN- $\gamma$ 7/69 S99C	AUC [(IU/ml) x h]
UnPEGyliert	222,6
5.000 Da Thiol-PEGyliert	397,0
20.000 Da Thiol-PEGyliert	514,8
40.000 Da Thiol-PEGyliert	434,8

Aus der AUC geht deutlich noch einmal der Vorteil der 20.000 Da Thiol-PEGylierten Modifikation gegenüber den übrigen PEGylierten und unPEGylierten Modifikationen hervor. So ist die AUC der 20.000 Da-Thiol-PEGylierten Modifikation um nahezu 20 % größer als die der 40.000 Da Modifikation. Gegenüber der unPEGylierten Form wiederum sind es nahezu 150 %!

## 5 Diskussion

### 5.1 Vergleich einer adhärennten Zellkultur mit einer Suspensionszellkultur für CHO-Zellen

Wie beschrieben wurden die IFN- $\beta$ -exprimierenden CHO-Zellen von einem adhärennten Wachstum auf ein Wachstum in Suspension umgestellt. Ziel dieser Umstellung war, eine höhere Zelldichte der CHO-Zellen zu erreichen und damit auch eine höhere maximal erreichbare Konzentration an IFN- $\beta$  im Medium. Während die höhere Zelldichte (maximal  $10^7$ /ml) problemlos zu erzielen war, konnte die maximal erreichbare Konzentration an IFN- $\beta$  im Medium nicht im gleichen Umfang gesteigert werden. Konzentrationen von  $10^6$  IU/ml konnten zu keinem Zeitpunkt überschritten werden. Diese Konzentration lag jedoch um den Faktor 10 höher als die maximal erreichbare Konzentration im Überstand von adhärennten Zellen.

Die Maximalkonzentration von  $10^6$  IU/ml spricht sehr dafür, dass IFN- $\beta$  trotz einer hohen Speziesspezifität einen Einfluss auf die CHO-Zellen ausübt. Denkbar ist hier, dass das IFN- $\beta$  auf den CHO-Zellen einen Effekt auf die RNA-Synthese ausübt, welcher schon von der antiviralen Aktivität der Interferone bekannt ist. Für diese Theorie spräche, dass adhärennte Zellen ein geringeres Expressionsmaximum erreichen, da in adhärennten Kulturen die Zell-Zell-Kontakte in einem Monolayer dichter als in einer Suspensionskultur sind. Exprimiertes IFN- $\beta$  müsste dort noch rascher wirken, als in einer Suspensionskultur.

Wurde die IFN- $\beta$ -Expression in einer Suspensionskultur mit einer hinreichend hohen Zelldichte ( $5 \times 10^5$ /ml –  $10^6$ /ml) im semikontinuierlichen Verfahren durchgeführt, wurden nach spätestens 48 h  $10^6$  IU/ml erreicht, was wiederum ein Vorteil der semikontinuierlichen Expression gegenüber der *batch*-Expression ist. Die *batch*-Expression benötigt zunächst eine lag-Phase von ungefähr 24 h bevor die IFN- $\beta$ -Expression beginnt.

Ein weiterer wichtiger Vorteil der Kultur der CHO-Zellen in Suspension ist das einfachere *upscaling*. Suspensionszellen können nahezu in jedem beliebigen Zellkulturreaktor gehalten werden. Zur Wahl stehen hier Rührreaktoren, Rollreaktoren, Wippreaktoren (Wave-System) oder Hohlfaserreaktoren. Adhärennte CHO-Zelle können hingegen nur über den Umweg von Plastikbeads in den meisten Reaktorsystemen gehalten werden. Als einziges relativ einfach nutzbares Kultursystem für die großtechnische Produktion stehen hier Flachbettstapel und mit Einschränkungen Hohlfaserreaktoren zur Verfügung.

## **5.2 Ersatz von HSA im Umgang mit rhIFN- $\alpha$**

Humanes Serumalbumin (HSA) wird als Stabilisator bei der Formulierung von Proteintherapeutika eingesetzt. Auch IFN- $\alpha$  gehört zu den Proteintherapeutika, welche mit HSA formuliert werden. Das hierzu verwendete HSA wird vielfach aus humanem Blutplasma gewonnen. Obwohl ein Virustest von den Herstellern durchgeführt wird, gilt HSA solange es nicht rekombinanten Ursprungs ist, als problematisch und in Medikamentenformulierungen wenig erstrebenswert. Das Ziel sollte also ein Ersatz des HSA durch andere unproblematischere Substanzen sein.

Erste Ansätze in der HSA-freien Formulierung von IFN- $\alpha$ -Präparaten durch hohe Konzentrationen der Aminosäure Arginin sind bereits durchgeführt worden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun ein weiterer Ansatz zur HSA-freien Formulierung von IFN- $\alpha$  durch den Einsatz von Natriumchololat untersucht. Dabei mussten drei Schritte getrennt voneinander betrachtet werden.

Zunächst war die Frage, ob Natriumchololat als Ersatz des HSA in der Zellkultur eingesetzt werden kann. Während die IFN- $\alpha$  produzierenden CHO-Zellen weder von den eingesetzten Konzentrationen an Natriumchololat noch von dem als Referenz eingesetzten HSA in ihrem Wachstum beeinflusst wurden, zeigte sich bei der Messung der Aktivität der Überstände der entsprechenden Ansätze, dass mit Natriumchololat behandelte Zellen wesentlich weniger IFN- $\alpha$  produzierten als die entsprechenden mit HSA behandelten Zellen. Von dem Einsatz von Natriumchololat in der Zellkultur für die Produktion des IFN- $\alpha$  ist daher abzuraten.

Als nächstes stellte sich die Frage nach dem Einsatz von Natriumchololat während der Aufarbeitung von IFN- $\alpha$ . Hierzu wurden HSA-stabilisierte Zellkulturüberstände mittels des von Thorsten Uwe Meyer entwickelten Verfahrens aufgearbeitet. Bereits im ersten Säulenschritt wird HSA dabei stark abgereichert. Eine Stabilisierung des IFN- $\alpha$  erfolgte über 60 % Ethylenglycol. Im zweiten Säulenschritt wiederum wurde das Ethylenglycol entfernt. Nun musste eine Stabilisierung des IFN- $\alpha$  durch Zusatz eines Stabilisators in das Säuleneluat erfolgen. Nach dem beschriebenen Verfahren sollten hier 2 mg/ml HSA zugeführt werden. Alternativ wurde jetzt 10  $\mu$ g/ml Natriumchololat zugesetzt, ohne das IFN- $\alpha$  aggregierte. Eine Volumenverringerng des Eluats um den Faktor 10 und eine damit einhergehende Konzentration des IFN- $\alpha$  auf über 120  $\mu$ g/ml war in Anwesenheit von Natriumchololat problemlos zu erreichen.

Ein großer Vorteil des Natriumchololats gegenüber dem HSA wird bei der Aufreinigungskontrolle mittels silbergefärbten SDS-Gels deutlich. Während HSA immer

wieder Verunreinigungen mitbringt, ist mit Natriumcholat stabilisiertes IFN- $\gamma$  bereits nach zwei Säulenschritten mehr als 90 % sauber. Aus diesen Daten ergibt sich wiederum, dass Natriumcholat als Stabilisator während der Aufarbeitung in den Schritten, in denen eine zusätzliche Stabilisation des IFN- $\gamma$  nötig ist, ein sehr guter Ersatz des HSA ist.

In der Formulierung von IFN- $\gamma$  wiederum kann Natriumcholat durchaus als Ersatz des HSA eingesetzt werden, jedoch unterliegt der Einsatz von Natriumcholat als Stabilisator von Proteinen mehreren Patenten, so dass es hier von Vorteil wäre, einen anderen Stabilisator einzusetzen.

Abschließend lässt sich feststellen, dass Natriumcholat außer in der Zellkultur sehr gut geeignet ist, HSA als Stabilisator des IFN- $\gamma$  zu ersetzen, jedoch muss für einen kommerziellen Einsatz nach einem patentfreien Ersatz gesucht werden.

### **5.3 Optimierung der PEGylierungsreaktionen**

Zur Optimierung der PEGylierungsreaktionen wurden die Parameter Reaktionsdauer, Reaktionstemperatur und Mischungsverhältnis PEG-Reagenz zum Protein herangezogen.

Eine Kontrolle der PEGylierungsreaktion hinsichtlich des Mischungsverhältnisses zwischen Protein und PEG-Reagenz besteht darin, dass längere PEG-Ketten in ihrer Reaktion mit Proteinen gehindert werden. Diese Hinderung wiederum ist durch den im Vergleich zur reaktiven Endgruppe sehr großen PEG-Reste bedingt. Bei Kontakten zwischen Protein und PEG-Reagenz ist somit der Fall eines Kontaktes zwischen reaktiver Endgruppe des PEG-Reagenz und PEGylierbarer Aminosäure im Protein seltener. Um diesem entgegenzusteuern, wurde das Mischungsverhältnis zwischen Protein und PEG-Reagenz für die längeren PEG-Ketten zu gunsten des PEG-Reagenz verschoben. 5.000 Da PEG-Reagenz wurde im 3fachen, 20.000 Da PEG-Reagenz im 4fachen und 40.000 Da PEG-Reagenz im 5fachen Konzentrationsüberschuss eingesetzt.

Aus dem gleichen Grund hatte auch die Reaktionsdauer einen ähnlichen Einfluss auf die Thiol-PEGylierung. Je länger die PEG-Ketten waren, desto länger musste inkubiert werden. Für die 5.000 Da Thiol-PEGylierung wurden 45 bis 60 min Inkubationsdauer eingesetzt, für die 20.000 Da Thiol-PEGylierung 1,5 h und für die 40.000 Thiol-PEGylierung 2 h. Eine Ausnahme von dieser Regel stellten die Amin-Pegylierungen dar. Diese wurden über Nacht (mindestens 8 h) inkubiert, so dass eine Verlängerung der Reaktionsdauer keine Verbesserung brachte, sondern eher kontraproduktiv war. Nach einer Inkubation über Nacht traten am Amin-PEG-Reagenz erste Inaktivierungsprozesse auf.

Die Reaktionstemperatur wiederum stellt einen entscheidenden Faktor für alle PEGylierungsreaktionen dar. So führen zu geringe Temperaturen (4° C) oder zu hohe Temperaturen (37° C und höher) zu stark verringerten Ausbeuten. Bei Temperaturen größer 37° C betrug die Ausbeute der PEGylierungsreaktion 0 %. Bei zu hohen Temperaturen inaktiviert das PEG-Reagenz durch Reaktion zweier PEG-Ketten miteinander und ist dann nicht mehr für PEGylierungsreaktionen am Protein einsetzbar.

Eine zu geringe Temperatur wiederum bedingt einen geringeren Energieinhalt des Reaktionsansatzes, so dass Kontakte zwischen Protein und PEG-Reagenz nicht genug Energie besitzen, um eine Reaktion auszulösen.

### 5.3.1 Einfluss des pH-Wertes auf die PEGylierungsreaktion

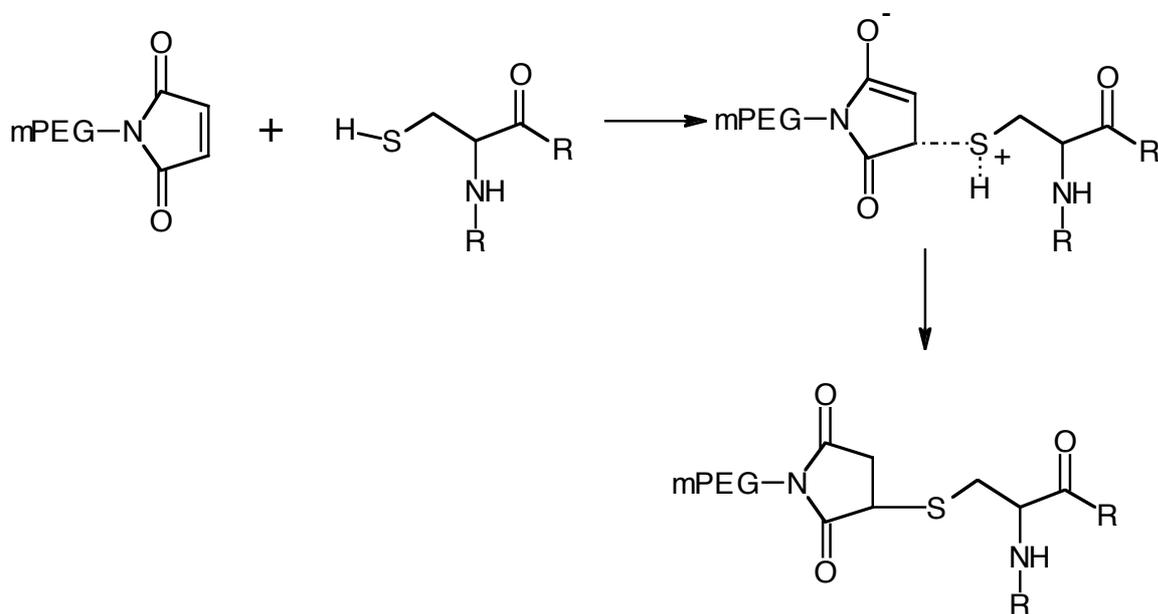
Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde wie beschrieben IFN- $\gamma$  bei saurem und neutralem pH-Wert Thiol- und Amin-PEGyliert. Dabei ließ sich jedoch nur die Amin-PEGylierung mit 5.000 Da im sauren Bereich durchführen. Diesen Effekt der Amin-PEGylierung im sauren und neutralen Milieu wurde von Wylie *et al.* (2001) für die Präparation des PEGylierten rhuIFN- $\gamma$  beschrieben. Dieser beschrieb eine Verschiebung der PEGylierungsreaktion mit aminreaktiven PEG-Reagenzien von Lysinresten bei neutralem pH-Wert zu Histidinresten bei saurem pH-Wert.

Zunächst betrachtet man die Reaktion, die zur Amin-PEGylierung führt. Hierbei muss das Stickstoffatom der Aminofunktion über sein nichtbindendes Elektronenpaar an dem zentralen Kohlenstoff der Carboxylfunktion der Succinimidylfunktion des PEG-Reagenz angreifen. Aminofunktionen liegen jedoch nur im neutralen oder basischen pH-Bereich unprotoniert vor. Im sauren pH-Bereich hingegen wird die Aminofunktion protoniert und liegt somit als Ammoniumion ( $H_3N^+-R$ ) vor. Bei diesem existiert kein freies nichtbindendes Elektronenpaar mehr, so dass der nukleophile Angriff auf die Carboxylfunktion des Succinylimids unterbleibt. Wie jedoch das Beispiel der PEGylierung von Rebif bei saurem und neutralem pH-Wert zeigt, kann mit kurzkettigen mPEG-SPA auch im sauren pH-Wert PEGyliert werden. Im sauren pH-Bereich sollte die PEGylierungsreaktion protonenkatalysiert am Histidin nach dem in der Theorie beschriebenen Mechanismus ablaufen.

Interessant an dieser Stelle ist, dass bei einer Amin-PEGylierung im sauren pH-Bereich mit dem 5.000 Da Amin-PEG-Reagenz eine diskrete Bande für das PEGylierte Protein auftritt. Bei neutralem pH-Wert hingegen zeigt sich bei der Amin-PEGylierung wiederum neben der Bande für das einfach PEGylierte IFN- $\gamma$  noch mindestens die Bande für ein zweifach PEGyliertes IFN- $\gamma$ . Dieses Ergebnis spricht sehr dafür, dass die hier geschilderte Theorie über

Lysin-PEGylierungen bei neutralem pH-Wert und einer Histidin-Pegylierung bei saurem pH-Wert auf das IFN- $\alpha$  angewandt werden kann. Um hierüber jedoch eine abschließende Aussage zu erhalten, müsste eine *peptide mapping* durch Massenanalyse erfolgen.

Etwas anders verhält sich die Thiol-PEGylierung, da hier eine nukleophile Addition nach dem Mechanismus der Michael-Addition abläuft (Roberts *et al.* 2002). Bei diesem Prozess greift das Schwefelatom in der Thiolgruppe des Cysteins mit einem nichtbindenden Elektronenpaar an einem Kohlenstoffatom der Doppelbindung des Maleinimids an. Die Elektronen des dabei entstehenden Carbanions werden sofort über die Vinylposition delokalisiert. Beim anschließenden Einfangen eines Protons kommt es sofort zur Keto-Vinylumlagerung und damit zum unten dargestellten Thiol-PEGylierungsprodukt.



**Abb. 45** Mechanismus der Michael-Addition bei der Thiol-PEGylierung

Bei einem Protonenüberschuss wiederum, wie er bei saurem pH-Wert herrscht, tritt eine säurekatalysierte Hydrolyse am Maleinimid auf. Hierbei addiert ein Proton am Stickstoffatom der *tertiären* Amin-Funktion. Es kommt zu einer Ringöffnung. Im zweiten Schritt wird Wasser eingefangen und ein Proton abgespalten. Der gebildete Übergangszustand fängt im Anschluß ein zweites Proton an der Stickstofffunktion ein. Es kommt zur vollständigen Ablösung des mPEG-Amin und zu einer Ausbildung einer Maleinsäure. Diese beiden Substanzen können nicht mit dem Thiolrest eines Cysteins reagieren.

### 5.3.2 Einfluss von Lösungsvermittlern auf die PEGylierungsreaktion

Als Lösungsvermittler werden hauptsächlich verschiedene Detergenzien eingesetzt. Sie wirken über eine Umhüllung des zu lösenden Proteins mit ihrem unpolaren oder schwach polaren Anteil. Hierdurch wirkt ein Protein nach außen wie ein polares Detergenzteilchen. Da jedoch zur PEGylierung entsprechende Aminosäurereste zugänglich sein müssen, bedeutet dies, dass ein mit Detergenzien gelöstes Protein für das PEG-Reagenz nicht oder nur sehr schwer zugänglich ist. Ein zweiter Effekt, der bei einem gemeinsamen Einsatz von PEG-Reagenz und Detergenz auftritt, ist die Ausbildung gemischter Mizellen aus Tensid und PEG-Reagenz. Diese Mizellen wiederum können zwar Proteine umhüllen und somit die Proteine in Lösung halten, jedoch ist die Ausrichtung der PEG-Moleküle analog der Ausrichtung der Detergenzmoleküle, so dass die PEG-Reagenzien mit ihren nicht reaktiven Enden in der Nähe des umhüllten Proteins sind. In dieser Ausrichtung kann keine PEGylierungsreaktion stattfinden, da der Kontakt zwischen aktivierter Endgruppe des PEG-Reagenzes und dem Protein nicht gegeben ist.

Wie bei der PEGylierung des IFN- $\gamma$  8x aus *inclusion bodies* gezeigt, welches über das Detergenz Sulfobetain gelöst wird, benötigt man einen grossen Überschuss des PEGylierungsreagenzes um eine PEGylierungsreaktion einleiten zu können. Eine Abreicherung der Detergenzkonzentration führt zu einer Verringerung der reinen Detergenzmizellen, wodurch eine Verbesserung der Ausbeute an PEGyliertem Protein größer 50 % möglich ist. Jedoch muss hierzu ein großer Überschuss des PEG-Reagenzes eingesetzt werden, was wiederum zu Ausbildung der eben beschriebenen Mischmizellen führt.

Zum Schluss lässt sich aus diesen Daten feststellen, dass während der PEGylierungsreaktion möglichst kein Detergenz im Reaktionsansatz vorhanden sein sollte. Erst nach der PEGylierung kann das PEGylierungsprodukt wieder mit Detergenzien in Mizellen überführt werden.

## 5.4 Vergleich von unPEGyliertem IFN- $\gamma$ mit PEGyliertem IFN- $\gamma$

### 5.4.1 Wahl der PEGylierungsposition

Während für die Amin-PEGylierung des IFN- $\gamma$  keine neuen Varianten nötig waren, wurde für die Thiol-PEGylierung ein freies Cystein in der Aminosäurekette des IFN- $\gamma$  benötigt. Da IFN- $\gamma$  wt über keine Cysteine in der Aminosäuresequenz bzw. als Variante 7/69 über zwei mittels einer Disulfidbrücke verbundene Cysteine verfügt, wurde am Strukturmodell nach

möglichen Positionen für einen Aminosäureeintausch gesucht. Als Optionen wurden die Positionen D63 und S99 gewählt. Beide Positionen befinden sich in Bereichen, die möglichst weit von der aktiven Domäne des IFN- $\gamma$  entfernt liegen. Beide Aminosäuren wurden mutiert und probeweise PEGyliert. Da beide Positionen ohne Probleme für die PEGylierung zugänglich waren, wurde ein anderes Auswahlkriterium für eine der beiden Varianten gesucht. Gefunden wurde dies in der Position der beiden ausgetauschten Aminosäuren. Während die Position D63C in einem funktionfreien Bereich des IFN- $\gamma$  lag, befand sich in direkter Nachbarschaft der Position S99C eine der im natürlichen IFN- $\gamma$  glycosylierten Aminosäuren (N97).

Die Hoffnung, die sich aus der Wahl der Position S99C für die weitere PEGylierung des IFN- $\gamma$  ergab, war, dass ein PEG-Rest in dieser Position eine Glycosylierung in Position 97 räumlich simulieren würde und damit ähnliche Einflüsse auf die Struktur des Proteins nehmen sollte. Diese Theorie konnte zwar nicht bestätigt werden, dennoch wurden weitere Arbeiten ausschließlich mit der Variante 7/69 S99C durchgeführt.

#### 5.4.2 *In vitro*-Vergleich

Als Vergleichskriterien *in vitro* wurden Aktivität, Thermostabilität und Proteasestabilität von PEGyliertem und unPEGyliertem IFN- $\gamma$  untersucht. Eher unfreiwillig wurde die Erkennung des PEGylierten IFN- $\gamma$  durch Antikörper bei diesen Untersuchungen mit durchgeführt.

Wie auf nahezu allen immungefärbten western blots zu erkennen ist, bindet der monoklonale Primärantikörper schlechter an die PEGylierten Varianten des IFN- $\gamma$  als an die unPEGylierten. Auffällig hierbei ist, dass sowohl längere PEG-Ketten als auch mehrfache PEGylierungen diesen Effekt hervorrufen. Dies verdeutlicht die bereits in der Theorie beschriebene erwünschte Maskierung eines Proteins durch PEG-Reste. Unterschiede zwischen Amin-PEGylierungen und Thiol-PEGylierungen treten hierbei nicht auf.

Wie gezeigt, waren die PEGylierten Modifikationen des IFN- $\gamma$  sowohl in der Thermostabilität als auch in Hinblick auf Proteasestabilität deutlich besser als das entsprechende unPEGylierte IFN- $\gamma$ . Hierbei spielte es keine Rolle, ob das IFN- $\gamma$  über eine Thiol- oder eine Amin-PEGylierung modifiziert wurde. Auch die Kettenlänge spielte zumindest bei der Thiol-PEGylierung.

Bei der Amin-PEGylierung muss zwischen der 5.000 Da Modifikation und der 20.000 Da Modifikation unterschieden werden. Die 20.000 Da Modifikation ist eine reine EinfachPEGylierung, wobei die Position des PEG-Restes wie beschrieben nicht definiert ist. Die Modifikation mit 5.000 Da mPEG-SPA hingegen führt neben dem *mono*PEG-Produkt

auch zu einem *di*PEG- und mindestens einem *tri*PEG-Produkt. Auch wenn diese Produkte in ihrer Summe gleiche Stabilitätseigenschaften haben wie die übrigen PEGylierten IFN- $\gamma$ -Varianten, so zeigt sich der Nachteil dieses heterogenen Gemisches spätestens bei der Aktivitätsmessung im AVA.

Über die Bestimmung der Aktivität der PEGylierten und unPEGylierten Varianten sollte der Einfluss der PEGylierung auf die Bindung des IFN- $\gamma$  an seinen Rezeptor überprüft werden. Erwartet wurde hier ein Rückgang der Aktivität mit steigender Kettenlänge des PEG-Restes aufgrund der sterischen Hinderung durch den PEG-Rest. Diese Vermutung bestätigte sich durch die Messung der Aktivität im AVA. Die kürzeste Thiol-PEG-Modifikation besaß im Rahmen der Messgenauigkeit des AVAs die gleiche Aktivität wie der Standard (100 IU/ml bei einer Konzentration von 5 ng/ml). Mit steigender Kettenlänge wurde die Aktivität geringer. Für die 20.000 Da Modifikation wurden 33 IU/ml bei einer IFN- $\gamma$ -Konzentration von 5 ng/ml gemessen. Die 40.000 Da Modifikation wiederum besaß eine Aktivität von 11 IU/ml. Ganz anders verhielt sich die 5.000 Da Amin-PEG-Modifikation. Wie bereits beschrieben, bestand hier das PEGylierungsprodukt aus *mono*-, *di*- und *tri*PEGyliertem IFN- $\gamma$ . Im AVA zeigte dieses Gemisch eine sehr niedrige Aktivität, die gegenüber dem Standard um den Faktor 100 niedriger war. Vergleicht man wiederum diese Daten mit den Daten aus den ersten PEGylierungsversuchen am IFN- $\gamma$ , so wird deutlich, dass sich die Amin-PEGylierung mit 5.000 Da ähnlich den PEGylierungsversuchen mit PEG-Reagenzien erster Generation verhält. Die Amin-PEGylierung mit 5.000 Da ist also wesentlich schlechter als die übrigen PEGylierungsreaktionen.

#### **5.4.3 Bioverfügbarkeit von PEGyliertem und unPEGyliertem IFN- $\gamma$**

Bereits für mehrere Proteine konnte gezeigt werden, dass eine PEGylierung zu einer besseren Bioverfügbarkeit dieser Proteine trotz teilweise schlechterer *in vitro*-Eigenschaften führt. Sinn einer PEGylierung ist eine Verlängerung der Aufenthaltsdauer im Blut eines Versuchstieres und später eines Patienten. Als Gründe für diese längere Verweildauer werden hier eine langsamere Wanderungsgeschwindigkeit durch das Gewebe in die Blutbahn, eine geringere Nierenfiltration der PEGylierten Substanzen und eine Abschirmung gegen Abbauprozesse im Blut genannt.

Für die modifizierten Varianten des IFN- $\gamma$  wurden daher Tierversuche in der Ratte durchgeführt. Verglichen wurden dabei Thiol-PEGylierungen an zwei verschiedenen Positionen im IFN- $\gamma$  bei gleicher Kettenlänge, Thiol-PEGylierungen unterschiedlicher Kettenlänge an einer Position und eine 20.000 Da Amin-PEGylierte Modifikation. Auf die

5.000 Da Amin-PEGylierte Modifikation wurde bewusst im Tierversuch verzichtet, da diese ein heterogenes Gemisch aus unterschiedlich häufig PEGylierten Proteinen ist.

Im Vergleich der beiden PEGylierungspositionen für eine Thiol-PEGylierung des IFN- $\gamma$  (D63C oder S99C) ergeben sich nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Varianten. Während  $c_{\max}$  für die Variante D63C um 25 % höher ist als bei der Variante S99C, ist  $t_{\max}$  für die Variante S99C um eine Stunde gegenüber der D63C nach hinten verschoben. Alles in allem sind jedoch die Unterschiede zwischen diesen beiden Varianten nicht sehr groß.

Aus diesem Grund wurden nun die Modifikationen mit verschiedenen PEG-Längen an der Position S99C in ihrer Bioverfügbarkeit miteinander verglichen. Als Referenz wurde unPEGyliertes IFN- $\gamma$  mitgeführt. Als Vergleichskriterien für die Bioverfügbarkeit wurden  $c_{\max}$ ,  $t_{\max}$  und AUC bestimmt.

Erwartungsgemäß waren Modifikationen mit kurzen PEG-Ketten bei der Maximalkonzentration  $c_{\max}$  bevorzugt. Bei der Zeit zum Erreichen der Maximalkonzentration  $t_{\max}$  waren wiederum längere PEG-Ketten bevorzugt. Am interessantesten war die Betrachtung der AUC. Hier spielt die 20.000 Da Modifikation ihren Vorteil eines gegenüber der 5.000 Da nur geringfügig niedrigeren  $c_{\max}$  von 18 IU/ml und einer  $t_{\max}$  von 4 h aus. So ist die AUC der 20.000 Da Modifikation um nahezu 20 % höher als bei der 40.000 Da Modifikation und um nahezu 30 % höher als bei der 5.000 Da Modifikation. Von den PEGylierten Modifikationen zeigt also die 20.000 Da Modifikation die interessantesten Ergebnisse. Noch aussagekräftiger werden diese Daten im Vergleich zur unPEGylierten Variante. Diese hat zwar einen weit höheren  $c_{\max}$ -Wert als die PEGylierten Modifikationen, jedoch ist  $t_{\max}$  mit 20 min extrem kurz und die AUC mit 222,6 (IU/ml) x h weniger als 50 % des AUC der 20.000 Da PEGylierten Modifikation.

Auf eine Betrachtung der 20.000 Da Amin-Pegylierten Modifikation wurde bewusst verzichtet, da diese Modifikation in ihrem Kurvenverlauf dem Kurvenverlauf der 5.000 Da Thiol-PEGylierten Modifikation entspricht, wobei jedoch zu allen Zeitpunkten nur die Hälfte der Aktivität der 5.000 Da Thiol-PEGylierten Modifikation gemessen wurde.

Aus den Tierversuchsdaten geht hervor, dass eine Entscheidung für eine PEGylierung des IFN- $\gamma$  von der gewählten Anwendung abhängig ist. Möchte man eine hohe kurzzeitige Konzentration als Effekt der Gabe von IFN- $\gamma$  haben, muss IFN- $\gamma$  unPEGyliert eingesetzt werden. Ist jedoch eine längeranhaltende, niedrige Dosis gewünscht, ist aufgrund der AUC die 20.000 Da Thiol-PEGylierte Modifikation bevorzugt. Eine Entscheidung hierüber kann jedoch erst im Applikationsmodell getroffen werden.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde IFN- $\gamma$  in den Expressionssystemen CHO-Zelle und *E.coli* expremiert. Für das System CHO-Zelle wurden dabei Kulturansätze mit adhärennten Zellen und Suspensionszellen untersucht.

IFN- $\gamma$  aus CHO-Zellen wurde bisher über den gesamten Produktionprozess mit HSA stabilisiert. Mir ist es gelungen, HSA in der Aufarbeitung und Formulierung des IFN- $\gamma$  durch die Substanz Natriumcholat zu ersetzen. Ausschließlich in der Zellkultur muss auch weiterhin auf HSA zurückgegriffen werden.

Durch eine Arbeit von Pepinski *et al.* (2001) angeregt wurden Versuche unternommen, IFN- $\gamma$  zu PEGylieren. Hierzu wurde sowohl Material aus Bakterienzellen als auch aus CHO-Zellen eingesetzt. Nachdem die PEGylierungsreaktion im Hinblick auf den pH-Wert optimiert wurde, gelang es, IFN- $\gamma$  aus CHO-Zellen zu PEGylieren. Die PEGylierung aus bakteriellen Quellen hingegen muss als gescheitert angesehen werden, da es nicht möglich ist, in Anwesenheit von Detergenzien mit vernünftigen Ausbeuten zu PEGylieren.

Im Rahmen einer Studie wurde parallel zu den Arbeiten am IFN- $\gamma$  IFN- $\gamma$  in verschiedenen Varianten aus Bakterienzellen aufgearbeitet und modifiziert. Die Modifikation erfolgte über zwei verschiedene PEGylierungsreaktionen, von denen die Amin-PEGylierung relativ unspezifisch und die Thiol-PEGylierung sehr spezifisch war.

Verschiedene dieser Modifikationen wurden zunächst auf Stabilität *in vitro* untersucht, bevor Tierversuche mit diesen unternommen wurden. Bereits *in vitro* wurde die 5.000 Da Amin-PEGylierung vom den Tierversuch ausgenommen, da aufgrund der MehrfachPEGylierung die Aktivität bereits *in vitro* stark reduziert war. Bei den Stabilitätsuntersuchungen konnten keine Unterschiede zwischen den modifizierten IFN- $\gamma$  gefunden werden, jedoch konnte gegenüber den unPEGylierten Varianten eine deutliche Stabilitätsverbesserung gegenüber Temperatureinflüssen und Proteasen gezeigt werden.

Von den im Tierversuch eingesetzten Modifikationen zeigte die 20.000 Da Thiol-PEGylierte Variante die höchste Bioverfügbarkeit. Für weitere Untersuchungen sollte somit die 20.000 Da Thiol-PEGylierte Variante 7/69 S99C eingesetzt werden.

## 7 Ausblick

Die PEGylierung stellt eine sehr gute Methode zur Modifikation von Proteinen dar. Die Wahl der PEGylierungsmethode ist dabei eher zweitrangig, wichtiger ist die Wahl der richtigen Kettenlänge.

Während IFN- $\gamma$  mit allen in dieser Arbeit verwandten PEGylierungsreagenzien behandelt werden konnte, war das IFN- $\alpha$  in dieser Hinsicht schwieriger. Dieses ließ sich ausschließlich mit kürzeren mPEG-Ketten PEGylieren, wobei die Thiol-PEGylierung ausschließlich bei neutralem pH-Wert funktionierte. Partiiell konnte auch mit 20.000 Da mPEG-MAL PEGyliert werden.

Für die PEGylierten IFN- $\alpha$ -Varianten konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass sie eine wesentlich längere Verweildauer im Blut der Versuchstiere haben, auch die Stabilität gegenüber Temperatureinflüssen und Proteasen ist gegenüber den unPEGylierten Varianten deutlich erhöht. Leider ist es nicht möglich, aus diesen Daten bereits Rückschlüsse auf die Wirksamkeit eines PEGylierten IFN- $\alpha$  im Patienten zu schließen. Aus diesem Grund müssen sich hier nun weitere Untersuchungen anschließen, bei denen tierisches IFN- $\alpha$  im entsprechenden Organismus vor und nach der PEGylierung untersucht wird. Hierzu sollte ein Kaninchenmodell mit modifizierten Varianten des Kaninchen-IFN- $\alpha$  bei zystischer Fibrose untersucht werden.

Des Weiteren sollten die bisher gewonnenen Erkenntnisse zu den PEGylierten IFN- $\alpha$  auf die neue Variante 7/69 S99C C-10 Q133L übertragen werden. Da deren Ursprungsvariante 7/69 C-10 Q133L laut Pechenov *et al.* eine höhere spezifische Aktivität als die nicht verkürzten Varianten des IFN- $\alpha$  besitzt, besteht die Hoffnung, dass die Variante 7/69 S99C C-10 Q133L eine ähnlich erhöhte Aktivität wie die 7/69 C-10 Q133L besitzt und daher nach PEGylierung im Tierversuch höhere Serumspiegel erreichen könnte als die unverkürzten Varianten.

Ungleich mehr Arbeit sollte in die weitere Untersuchung der PEGylierten IFN- $\alpha$ -Varianten investiert werden. Während die PEGylierung ihre Vorzüge bei der Stabilisation von IFN- $\alpha$  bei neutralem pH-Wert bereits im Rahmen der PEGylierungsreaktion unter Beweis gestellt hat, müssen weitere Stabilitätsuntersuchungen im Bereich Temperaturverhalten und Proteasestabilität durchgeführt werden. Hierzu sollte auch weitere Arbeit in die HSA-freie Formulierung von IFN- $\alpha$  fließen, da die Stabilisierung mit Natriumcholat zwar funktioniert, aber durch sehr umfassende Patente abgesichert ist. Ebenfalls interessant wäre, hier einen Tierversuch analog des von Pepinski *et al.* Beschriebenen durchzuführen. Auch hier stellt sich

schlussendlich die Frage, wie wirksam ist ein PEGyliertes IFN- $\alpha$  im Patienten. Auch dazu könnte man in ein Tiermodell (EAE-Modell) gehen.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b>	Strukturmodell des rhuIFN- $\gamma$ .....	3
<b>Abb. 2</b>	Modell des humanen IFN- $\gamma$ .....	5
<b>Abb. 3</b>	Einfaches Modell einer entzündlichen Reaktion im ZNS .....	6
<b>Abb. 4</b>	Positionen der auszutauschenden Aminosäuren im IFN- $\gamma$ .....	8
<b>Abb. 5</b>	Vergleich der Oberfläche von humanem IFN- $\gamma$ <i>wt</i> (links) und der 9x-Varianten (rechts) .....	8
<b>Abb. 6</b>	Modell des humanen IFN- $\gamma$ (blau) mit zwei Rezeptorketten (grün) .....	9
<b>Abb. 7</b>	Modell eines unPEGylierten und eines PEGylierten Proteins (Quelle: <a href="http://www.nektar.com">www.nektar.com</a> ) .....	13
<b>Abb. 8</b>	Maskierungseffekte durch PEGylierung (Quelle <a href="http://www.nektar.com">www.nektar.com</a> ) .....	14
<b>Abb. 9</b>	Polymerisation zu PEG .....	14
<b>Abb. 10</b>	Polymerisation zu mPEG .....	15
<b>Abb. 11</b>	Mechanismus der N-terminalen Amin-PEGylierung .....	17
<b>Abb. 12</b>	Alternative Amin-PEGylierung an der $\epsilon$ -Aminofunktion von Lysin .....	18
<b>Abb. 13</b>	Mechanismus der Thiol-PEGylierung .....	18
<b>Abb. 14</b>	Mechanismus der Histidin-PEGylierung .....	19
<b>Abb. 15</b>	Oxidative Aktivierung eines Zuckers der Glycanstruktur eines Glycoproteins ...	20
<b>Abb. 16</b>	Mechanismus der reversiblen PEGylierung .....	21
<b>Abb. 17</b>	Schematischer Aufbau eines SDS-Gels nach dem Gießen .....	48
<b>Abb. 18</b>	Schematischer Aufbau eines Transfersandwichs .....	51
<b>Abb. 19</b>	Aufbau des Zweikammersystems zur Pflege von Caco-2-Zellen .....	57
<b>Abb. 20</b>	Proliferationsrate und Expressionleistung von 21A8(0,1)10 III .....	61
<b>Abb. 21</b>	Vergleich der IFN- $\gamma$ -Expression in verschiedenen Medien .....	63
<b>Abb. 22</b>	Wachstumsverhalten von CHO-Zellen in Anwesenheit verschiedener Natriumcholatkonzentrationen .....	66
<b>Abb. 23</b>	Produktivität von CHO-Zellen in Anwesenheit von Natriumcholat und HSA ....	66
<b>Abb. 24</b>	Schema eines Hohlfaserreaktors ( <a href="http://www.the-scientist.com">www.the-scientist.com</a> ) .....	67
<b>Abb. 25</b>	Funktionsschema eines Minipermreaktors .....	68
<b>Abb. 26</b>	Schematische Darstellung einer Zweikammerflask .....	69
<b>Abb. 27</b>	Vergleich von unPEGyliertem IFN- $\gamma$ mit 5kDa-Amin-PEGyliertem IFN- $\gamma$ bei verschiedenen PEG-Reagenzüberschüssen. Material aus <i>inclusion bodies</i> .....	73

<b>Abb. 28</b>	PEGylierung von IFN- $\gamma$ mit 5 kDa-Amin-PEG-Reagenz nach Sulfobetainabreicherung .....	74
<b>Abb. 29</b>	PEGylierung von Rebif mit 5.000 Da mPEG bei pH 4,5.....	75
<b>Abb. 30</b>	Vergleich verschiedener PEGylierungsansätze von IFN- $\gamma$ <i>wt</i> bei zwei pH-Werten.....	76
<b>Abb. 31</b>	PEGylierung von Rebif nach Neutralisation mit 5.000 Da mPEG-MAL und mPEG-SPA. Auf dem Gel konnten ausschließlich die HSA-Banden erkannt werden. ...	77
<b>Abb. 32</b>	PEGylierungsmuster der Thiol- und Amin-PEGylierung exemplarisch am Beispiel der IFN- $\gamma$ -Varianten 7/69 und 7/69 S99C. ....	80
<b>Abb. 33</b>	Vergleich verschiedener mit 5 kDa PEGylierter IFN- $\gamma$ -Varianten.....	80
<b>Abb. 34</b>	Vergleich verschiedener PEGylierungsreaktionen am IFN- $\gamma$ 7/69 S99C. ....	81
<b>Abb. 35</b>	Vergleich der Aktivität von IFN- $\gamma$ 7/69 S99C modifiziert über eine Thiol-PEGylierung mit verschiedenen PEG-Kettenlängen.....	83
<b>Abb. 36</b>	IFN- $\gamma$ -Mutante 7/69 S99C C-10 Q133L .....	84
<b>Abb. 37</b>	Trypsinverdau verschiedener Thiol-PEG-IFN- $\gamma$ -Modifikationen nach 24 h Inkubation. ....	85
<b>Abb. 38:</b>	Vergleich von UnPEGyliertem IFN- $\gamma$ und PEGyliertem IFN- $\gamma$ der Variante 7/69 S99C bei verschiedenen Temperaturen nach einer Stunde.....	86
<b>Abb. 39</b>	Vergleich verschiedener PEGylierungspositionen bei gleicher Kettenlänge.....	87
<b>Abb. 40</b>	Halblogarithmischer Auftrag der beiden 5.000 Da Thiol-PEGylierten Varianten des IFN- $\gamma$ .....	88
<b>Abb. 41</b>	Vergleich verschiedener IFN- $\gamma$ -Modifikationen mit längeren PEG-Ketten.....	89
<b>Abb. 42</b>	Halblogarithmischer Auftrag der Akitität der Serumproben verschiedener PEG-Modifikationen des IFN- $\gamma$ 7/69 S99C.....	89
<b>Abb. 43</b>	Ergebnisse des Tierversuchs zum Vergleich verschiedener Thiol-PEGylierter mit dem entsprechenden unPEGyliertem IFN- $\gamma$ .....	90
<b>Abb. 44</b>	Halblogarithmischer Auftrag des Vergleichs verschiedener Thiol-PEGylierter Modifikationen des IFN- $\gamma$ 7/69 S99C mit unPEGyliertem IFN- $\gamma$ im Tierversuch .....	91
<b>Abb. 45</b>	Mechanismus der Michael-Addition bei der Thiol-PEGylierung .....	97

## Literaturverzeichnis

- [1] Adolf GR, Maurer-Fogy I, Kalsner I, Cantell K; **Purification and characterization of natural human interferon omega 1. Two alternative cleavage sites for the signal peptidase**; *J Biol Chem* **265(16)** (1990) Seiten 9290 – 9295
- [2] Adolf GR; **Human interferon omega--a review**; *Mult Scler* **1 Suppl 1** (1995) S 44 - 47
- [3] Bogan JS, McKee AE, Lodish HF; **Insulin-Responsive Compartments Containing GLUT4 in 3T3-L1 and CHO-Cells: Regulation by Amino Acid Concentration**; *Mol Cell Biol* **Vol 21 No 14** (2001) Seiten 4785 – 4806
- [4] Barnard DL; **Pegasys (Hoffmann-La Roche)**; *Curr Opin Investig Drugs* **2(11)** (2001) Seiten 1530 - 1538
- [5] Branca AA, Baglioni C; **Down regulation of the interferon receptor**; *J Biol Chem* **257** (1982) Seiten 13197 – 13200
- [6] Bukowski RM, Tendler C, Cutler D, Rose E, Laughlin MM, Statkevich; **Treating cancer with PEG Intron: pharmacokinetic profile and dosing guidelines for an improved interferon-alpha-2b formulation**; *Cancer* **95(2)** (2002) Seiten 389 - 396
- [7] Bumelis VA, Bumelkiene Z, Gedminiene G, Smirnova V, Sereikaite J, Medelyte I; **Investigation of thermal stability of recombinant human interferon-gamma**; *Biologija* **2** (2002) Seiten 37 – 41
- [8] Caliceti P, Veronese FM; **Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates**; *Adv Drug Deliv Rev* **55(10)** (2003) Seiten 1261 - 1277
- [9] Cantin AM, Woods DE, Cloutier D, Dufour EK, Leduc R; **Polyethylene glycol conjugation at Cys232 prolongs the half-life of alpha1 proteinase inhibitor**; *Am J Respir Cell Mol Biol* **27(6)** (2002) Seiten 659 - 665
- [9] Crawford J; **Pegfilgrastim administered once per cycle reduces incidence of chemotherapy-induced neutropenia**; *Drugs* **62 Suppl 1** (2002) Seiten 89 - 98
- [10] Dinarello CA, Mier JW; **Lymphokines**; *N Engl J Med* **317(15)** (1987) Seiten 940 - 945
- [11] Diwan M, Park TG; **Stabilization of recombinant interferon- $\gamma$  by pegylation for encapsulation in PLGA microspheres**; *Int J Pharm* **252** (2003), Seiten 111 – 122
- [12] Ealick SE, Cook WJ, Vijay-Kumar S, Carson M, Nagabhushan TL, Trotta PP, Bugg CE; **Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma**; *Science* **252(5006)** (1991) Seiten 698-702

- [13] Faassen F, Vogel G, Spanings H, Vromans H; **Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs**; *Int J Pharm* **263** (2003) Seiten 113 – 122
- [14] Foser S, Schacher A, Weyer KA, Brugger D, Dietel E, Marti S, Schreitmüller T; **Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon alpha-2a (PEGASYS)**; *Protein Expr Purif.* **30(1)** (2003) Seiten 78 - 87
- [15] Galvani DW; **Cytokines: biological function and clinical use**; *R Coll Physicians Lond* **22(4)** (1988) Seiten 226 - 231
- [16] Garbe J; **Darstellung und Charakterisierung einer neuen Interferon-b-Variante mit verbesserter Löslichkeit**; *Diplomarbeit* (1998)
- [17] Gasser F, Mulsant P, Gillois M; **Long-term multiplication of the chinese hamster ovary (CHO) cell line in serum-free medium**; *In Vitro Cell Dev Biol* **21 (10)** (1985) Seiten 588 – 592
- [18] Gbadamosi JK, Hunter AC, Moghimi SM; **PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance**; *FEBS Lett* **532(3)** (2002) Seiten 338 - 344
- [19] Grace M, Youngster S, Gitlin G, Sydor W, Xie L, Westreich L, Jacobs S, Brassard D, Bausch J, Bordens R; **Structural and biologic characterization of pegylated recombinant IFN-alpha2b**; *J Interferon Cytokine Res* **21(12)** (2001) Seiten 1103 - 1115
- [20] Graddis TJ, Remmele RL Jr, McGrew JT; **Designing proteins that work using recombinant technologies**; *Curr Pharm Biotechnol* **3(4)** (2002) Seiten 285 - 297
- [21] Grzesiek S, Dobeli H, Gentz R, Garotta G, Labhardt AM, Bax A; **1H, 13C, and 15N NMR backbone assignments and secondary structure of human interferon-gamma**; *Biochemistry* **31(35)** (1992) Seiten 8180-8190
- [22] Harris JM, Chess RB; **Effect of pegylation on pharmaceuticals**; *Nat Rev Drug Discov* **2(3)** (2003) Seiten 214 - 221
- [24] Hauptmann R, Swetly P; **A novel class of human type I interferons**; *Nucleic Acids Res* **13(13)** (1985) Seiten 4739-4749
- [25] Isaacs A, Lindemann J; **Virus interference. The Interferon**; *Proc. Royal Soc. Lond.* **147** (1957) Seiten 258 – 267
- [26] Jensen-Pippo KE, Whitcomb KL, DePrince RB, Ralph L, Habberfield AD; **Enteral bioavailability of human granulocyte colony stimulating factor conjugated with poly(ethylene glycol)**; *Pharm Res* **13(1)** (1996) Seiten 102 - 107

- [27] Johnson MK; **Variable sensitivity in the microbiuret assay of protein**; *Anal Biochem* **86(1)** (1978) Seiten 320 – 323
- [28] Karpusas M, Nolte M, Benton CB, Meier W, Lipscomb WN, Goelz S; **The crystal structure of human interferon beta at 2.2-Å resolution**; *Proc Natl Acad Sci* **94(22)** (1997) Seiten 11813-11818
- [29] Karpusas M, Whitty A, Runkel L, Hochman P; **The structure of human interferon-beta: implications for activity**; *Cell Mol Life Sci* **54(11)** (1998) Seiten 1203-1216
- [30] Kita Y, Rohde MF, Arakawa T, Fagin KD, Fish EN, Banerjee K; **Characterization of a polyethylene glycol conjugate of recombinant human interferon- $\beta$** ; *Drug Des Deliv* **6**(1990) Seiten 157 – 167
- [31] Lamerz J; **Expression, Aufreinigung und biophysikalische Charakterisierung des humanen Interferon- $\beta$  und einer Variante aus CHO-Zellen**; *Diplomarbeit* (2000)
- [32] Lauren SL, Arakawa T, Stoney K, Rohde MF; **Covalent dimerization of recombinant human interferon-gamma**; *Arch Biochem Biophys* **306(2)** (1993) Seiten 350 – 353
- [33] Layne E; *Meth Enzymol* **3** Seiten 447 - 454
- [34] Lin L; **Betaseron**; *Dev Biol Stand* **96** (1998) Seiten 97-104
- [34] Luxon BA, Grace M, Brassard D, Bordens R; **Pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C infection**; *Clin Ther* **24(9)** (2002) Seiten 1363 - 1383
- [35] Meyer TU; **Expression, Aufreinigung und Charakterisierung einer Variante des humanen Interferon- $\beta$  aus CHO-Zellen mit verbesserten biochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften**; *Doktorarbeit* (2000)
- [36] Mironova R, Niwa T, Dimitrova R, Boyanova M, Ivanov I; **Glycation and post-translational processing of human interferon-gamma expressed in Escherichia coli**; *Biol Chem* (2003) [Epub ahead of print]
- [37] Momot T; **Konstruktion und Reinigung einer Variante des humanen Interferon-beta**; *Diplomarbeit* (2000)
- [38] Monfardini C, Schiavon O, Caliceti P, Morpurgo M, Harris JM, Veronese FM; **A branched monomethoxypoly(ethylene glycol) for protein modification**; *Bioconjug Chem* **6(1)** (1995) Seiten 62 - 69

- [39] Neuhoff S, Ungell AL, Zamora I, Artursson P; **pH-dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions**; *Pharm Res* **20(8)** (2003) Seiten 1141 – 1148
- [40] Niven RW, Whitcomb KL, Shaner L, Ip AY, Kinstler O; **The pulmonary absorption of aerosolized and intratracheally instilled rhG-CSF and monoPEGylated rhG-CSF**; *Pharm Res* **12(9)** (1995) Seiten 1343 -1349
- [41] Nyman TA, Tölö H, Parkkinen J, Kalkkinen N; **Identification of nine interferon-alpha subtypes produced by Sendai virus-induced human peripheral blood leucocytes**; *Biochem J* **329 (Pt 2)** (1998) Seiten 295 - 302
- [42] Nyman TA, Kalkkinen N, Tölö H, Helin J; **Structural characterisation of N-linked and O-linked oligosaccharides derived from interferon-alpha2b and interferon-alpha14c produced by Sendai-virus-induced human peripheral blood leukocytes**; *Eur J Biochem* **253(2)** (1998) Seiten 485 - 493
- [43] Obert H-J, Pöhlau D; **Beta-Interferon Schwerpunkt Multiple Sklerose**; *Springer-Verlag* (2000)
- [44] Osborn BL, Olsen HS, Nardelli B, Murray JH, Zhou JX, Garcia A, Moody G, Zaritskaya LS, Sung C; **Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys**; *J Pharmacol Exp Ther* **303(2)** (2002) Seite 540-548
- [45] Pechenov SE, Tikhonov RV, Shingarova LN, Korobko VG, Yakimov SA, Klyushnichenko VE, Babajantz AA, Beliaev DL, Kuznetsov VP, Shvetz VI, Wulfson AN; **Methods for Preparation of Recombinant Cytokine Proteins V. Mutant Analogues of Human Interferon-g with Higher Stability and Activity**; *Prot Exp Pur* **24** (2002) Seiten 172 – 180.
- [46] Pepinsky RB, LePage DJ, Gill A, Chakraborty A, Vaidyanathan S, Green M, Baker DP, Whalley E, Hochman PS, Martin P; **Improved pharmacokinetic properties of a polyethylene glycol-modified form of interferon-beta-1a with preserved *in vitro* bioactivity**; *J Pharmacol Exp Ther* **297(3)** (2001) Seiten 1059 – 1066
- [47] Rajender Reddy K, Modi MW, Pedder S; **Use of peginterferon alfa-2b (40 KD) (Pegasys®) for the treatment of hepatitis C**; *Advanced Drug Delivery Reviews* **54** (2002) Seiten 571 – 586
- [48] Reimer U, Reineke U, Schneider-Mergener J; **Peptide assays: from macro to micro**; *Curr Opin Biotechnol* **13(4)** (2002) Seiten 315 – 320
- [49] Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM; **Chemistry for peptide and protein PEGylation**; *Advanced Drug Delivery Reviews* **54** (2002) Seiten 459 – 476

- [50] Robinson SN, Talmadge JE; **Sustained release of growth factors; *In Vivo* 16(6)** (2002) Seiten 535 - 540
- [51] Runkel L, deDios C, Karpusas M, Betzenhauser M, Muldowney C, Zafari M, Benjamin CD, Miller S, Hochman PS, Whitty A; **Systematic mutational mapping of sites on human interferon-beta-1a that are important for receptor binding and functional activity; *Biochemistry* 39(10)** (2000) Seite 2538 – 2551
- [52] Sanfeliu A, Chung JD, Stephanopoulos G; **Effect of insulin stimulation on the proliferation and death of Chinese hamster ovary cells; *Biotechnol Bioeng* 70(4)** (2000) Seiten 421 - 427
- [53] Slodowski O, Bohm J, Schone B, Otto B; **Carboxy-terminal truncated rhuIFN-gamma with a substitution of Gln133 or Ser 132 to leucine leads to higher biological activity than the wild type; *Eur J Biochem* 202 (3)** (1991) Seiten 1133 – 1140
- [54] Sandhu P, Guo Z, Baba T, Martin MV, Tukey RH, Guengerich FP; **Expression of modified human cytochrome P450 1A2 in *Escherichia coli*: stabilization, purification, spectral characterization, and catalytic activities of the enzyme; *Arch Biochem Biophys* 309(1)** (1994) Seiten 168 - 177
- [55] Schneider-Fresenius C; **Entwicklung eines neuen Interferon- $\beta$  mit erhöhter Löslichkeit und verbesserter Bioverfügbarkeit; *Doktorarbeit*** (1999)
- [56] Soos JM, Stuve O, Youssef S, Bravo M, Johnson HM, Weiner HL, Zamvil SS; **Cutting edge: oral type I IFN- $\tau$  promotes a Th2 bias and enhances suppression of autoimmune encephalomyelitis by oral glatiramer acetate; *J Immunol* 169(5)** (2002) Seiten 2231 - 2235
- [57] Sung C, Nardelli B, Lafleur DW, Blatter E, Corcoran M, Olsen HS, Birse CE, Pickeral OK, Zhang J, Shah D, Moody G, Gentz S, Beebe L, Moore PA; **An IFN- $\gamma$ -Albumin Fusion Protein That Displays Improved Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties in Nonhuman Primates; *J Interferon Cytokine Res* 23(2003)** Seiten 25 – 36
- [58] Sunstrom NA, Gay RD, Wong DC, Kitchen NA, DeBoer L, Gray PP; **Insulin-like growth factor-I and transferrin mediate growth and survival of Chinese hamster ovary cells; *Biotechnol Prog* 16(5)** (2000) Seiten 698 - 702
- [59] Thiel DJ, le Du MH, Walter RL, D'Arcy A, Chene C, Fountoulakis M, Garotta G, Winkler FK, Ealick SE; **Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon-gamma receptor complex. *Structure Fold Des* 8(9)** (2000) Seiten 927 – 936
- [60] Thomas T; **PEGylierung des rekombinanten humanen Interferon- $\beta$  (rhu-IFN- $\beta$ ); *Diplomarbeit*** (2002)

- [61] Tucker SP, Thornton CL, Wimmer E, Compans RW; **Bidirectional entry of poliovirus into polarized epithelial cells**; *J Virol* **67(1)** (1993) Seiten 29 - 38
- [62] Tucker SP, Thornton CL, Wimmer E, Compans RW; **Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells**; *J Virol* **67(7)** (1993) Seiten 4274 - 4282.
- [63] Veronese FM; **Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions**; *Biomaterials* **22** (2001) Seiten 405 – 417
- [64] Vijay-Kumar S, Senadhi SE, Ealick SE, Nagabhushan, TL, Trotta PP, Kosecki R, Reichert P, Bugg CE; **Crystallization and Preliminary X-ray Investigation of a Recombinant Form of Human  $\beta$ -Interferon**; *J Biol Chem* **262 (10)** (1987) Seiten 4804 – 4805
- [65] Walsh S, Shah A, Mond J; **Improved pharmacokinetics and reduced antibody reactivity of lysostaphin conjugated to polyethylene glycol**; *Antimicrob Agents Chemother* **47(2)** (2003) Seiten 554 - 558
- [66] Wang Y, Youngster S, Grace M, Bausch J, Bordens R, Wyss DF; **Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications**; *Advanced Drug Delivery Reviews* **54** (2002) Seiten 547 – 570
- [67] Wang YS, Youngster S, Bausch J, Zhang R, McNemar C, Wyss DF; **Identification of the major positional isomer of pegylated interferon alpha-2b**; *Biochemistry* **39(35)** (2000) Seiten 10634 - 10640
- [68] Waschütza G; **Disulfidbrücken und Proteinstabilität**; *Doktorarbeit* (1995)
- [69] Waschütza G, Li V, Schäfer T, Schomburg D, Villmann C, Zakaria H, Otto B; **Engineered disulfide bonds in recombinant human interferon-gamma: the impact of the N-terminal helix A and the AB-loop on protein stability**; *Protein Eng* **9(19)** (1996) Seiten 905-912
- [70] Wheelock EF; **Virus replication and high-titered interferon production in human leukocyte cultures inoculated with Newcastle disease virus**; *J Bacteriol* **92(5)** (1966) Seiten 1415 - 1421
- [71] Wylie DC, Voloch M, Lee S, Liu YH, Cannon-Carlson S, Cutler C, Pramanik B; **Carboxyalkylated histidine is a pH-dependent product of pegylation with SC-PEG**; *Pharm Res* **18(9)** (2001) Seiten 1354 - 60.
- [72] Youngner JS, Salvin SB; **Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity**; *J Immunol* **111(6)** (1973) Seiten 1914 - 1922

- [73] Youngster S, Wang YS, Grace M, Bausch J, Bordens R, Wyss DF; **Structure, biology, and therapeutic implications of pegylated interferon alpha-2b**; *Curr Pharm Des* **8(24)** (2002) Seiten 2139 – 2157
- [74] Yowell SL, Blackwell S; **Novel effects with polyethylene glycol modified pharmaceuticals**; *Cancer Treat Rev* **28 Suppl A** (2002) Seiten 3 - 6
- [75] Zalipsky S, Qazen M, Walker JA 2nd, Mullah N, Quinn YP, Huang SK; **New detachable poly(ethylene glycol) conjugates: cysteine-cleavable lipopolymers regenerating natural phospholipid, diacyl phosphatidylethanolamine**; *Bioconjug Chem* **10(5)** (1999) Seiten 703 - 707
- [76] Zang Y, Hong J, Robinson R, Li S, Rivera VM, Zhang JZ; **Immune regulatory properties and interactions of Copolymer-I and beta-interferon 1a in multiple sclerosis**; *J Neuroimmunology* **137** (2003), Seiten 144 – 153

## Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Bernd Otto für die Aufgabenstellung, die zu dieser Doktorarbeit geführt hat.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Gentechnologie,

Herrn Dr. rer. nat. Hayssam Zakaria

Herrn Dr. rer. nat. Marco Kresin

Herrn Dr. rer. nat. Andreas Busche

Herrn Dr. rer. nat. Christian Schmalz

danke ich für die vielen konstruktiven Gespräche, die mich immer wieder auf neue spannende Ansätze gebracht haben und die mich immer von Irrwegen abgebracht haben.

Bei Herrn Dipl.-Biochem. Tobias Thomas bedanke ich mich für die Grundlagen der PEGylierungschemie, die wir gemeinsam während seiner Diplomarbeit erarbeitet haben.

Frau Reinhild Bähr danke ich für ihre Engelsgeduld bei der Konstruktion der IFN- $\lambda$ -Variante 7/69 S99C C-10 Q133L.

Frau Dr. med. vet. Heidrun Potschker von der Arbeitsgruppe Löscher der TiHo Hannover danke ich für die Betreuung der Tierversuche.

Meiner Freundin Melanie Kohl möchte ich für die Unterstützung und das Verständnis danken, dass sie mir während der letzten sechs Jahre entgegengebracht hat.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, für ihre ständige Unterstützung und ihren unerschütterlichen Glauben in meine Fähigkeiten.

## Circulum vitae

- 08.06.74                    Geboren in Hannover, als Sohn des Dipl.-Chem. Winfried Battermann und der Lehrerin Sophie Battermann geb. Fritz
- 07.80 – 06.84            Besuch der Adolf-Reichwein-Grundschule in Langenhagen
- 07.84 – 06.86            Besuch der Orientierungsstufe Brinker Schule in Langenhagen
- 07.86 – 06.93            Besuch des Gymnasiums Langenhagen mit dem Abschluß Abitur
- 10.93 – 09.94            Ableistung des Grundwehrdienstes
- 10.94 – 12.99            Studium im Fach Biochemie an der Universität Hannover
- 12.99                      Diplomprüfung in Biochemie
- 12.99 – 06.00            Diplomarbeit bei Herrn Professor Bernd Otto in der Arbeitsgruppe Gentechnologie am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB)  
Thema der Diplomarbeit:  
                                Darstellung und vergleichende Charakterisierung von drei Interferon- $\alpha$ -Varianten
- 06.00 – 10.03            Doktorarbeit in Biochemie  
Thema der Doktorarbeit:  
                                Proteinmodifikation zur Verbesserung pharmakologischer Eigenschaften am Beispiel der PEGylierung der Interferone- $\alpha$  und - $\beta$
- 14.11.03                   Tag der Promotion