UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

Špela ŠKRAJNAR

VPLIV PEGILACIJE ANALOGOV TNF-α NA FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI IN TOKSIČNOST PRI LABORATORIJSKIH MIŠIH IN PODGANAH

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 57.08:615.277.3:615.015.4:599.322/.324(043.3)

Špela ŠKRAJNAR, dr.vet.med.

VPLIV PEGILACIJE ANALOGOV TNF-α NA FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI IN TOKSIČNOST PRI LABORATORIJSKIH MIŠIH IN PODGANAH

Doktorska disertacija

INFLUENCE OF PEGYLATION OF TNF-α ANALOGUES ON PHARMACOKINETICS AND TOXICITY IN LABORATORY MICE AND RATS

Doctoral Thesis

Ljubljana, 2009

Špela Škrajnar

VPLIV PEGILACIJE ANALOGOV TNF-α NA FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI IN TOKSIČNOST PRI LABORATORIJSKIH MIŠIH IN PODGANAH

Delo je bilo opravljeno

- v Lek farmacevtski družbi, d. d.,
- v Laboratoriju za biosintezo in biotransformacijo Kemijskega inštituta v Ljubljani, vodja prof. dr. Radovan Komel, univ. dipl. kem.
- na Kliniki za prežvekovalce z ambulatorno kliniko Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, predstojnik prof. dr. Tomaž Zadnik, dr. vet. med., in prof. dr. Martina Klinkon Ogrinec, dr. vet. med.
- na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, predstojnik prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Javni zagovor je bil opravljen v Ljubljani, dne_____

Mentorica: doc. dr. Manica Černe, dr. vet. med.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

predsednica: prof. dr. Nataša Tozon, dr. vet. med.

član: doc. dr. Jernej Kužner, dr. vet. med.

članica: prof. dr. Maja Čemažar, univ. dipl. biol.

IZJAVA O DELU

Izjavljam, da je doktorsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela.
Delo kolegov, opravljeno v drugih laboratorijih, je omenjeno v poglavju Materiali in metode oz. v poglavju Zahvala.

Špela Škrajnar

Ljubljana, 7.12.2009

KAZALO

OKRAJŠAVE 11
IZVLEČEK 13
ABSTRACT 15
1 UVOD 17
2 PREGLED LITERATURE 19
2.1 TNF-α 19
2.1.1 Struktura TNF-α 19
2.1.2 Receptorji za TNF-α 21
2.2 Zdravljenje s TNF-α 23
2.3 Zakaj analogi TNF-α 26
2.4 Pegilacija 28
2.4.1 Modifikacija terapevtskih proteinov 28
2.4.2 Pegilacija 29
2.4.3 Vpliv pegilacije na protein 30
2.4.4 Toksikologija PEG-a in molekul, ki so modificirane s PEG-om 31
2.4.5 Pegilacija TNF-α 32
2.5 Farmakokinetika in toksikologija 32
2.5.1 Farmakokinetika 32
2.5.2 Toksikologija 33
3 MATERIALI IN METODE 35
3.1 Priprava in pegilacija substanc 35
3.2 Biološka aktivnost 39
3.3 Živali 40
3.4 Zasnova poskusa 41
3.4.1 PK poskusi na podganah 41
3.4.2 Toksikološko ovrednotenje na miših 42
3.5 Tehnika vstavljanja permanentnega jugularnega katetra pri podgani 43
3.6 Obdelava vzorcev in meritve 45
3.7 Test ELISA – določanje koncentracije substanc v serumu in v homogenatih organov 47
3.8 PK analiza podatkov 48
3.9 Priprava organov za histološke analize 50
3.10 Statistična obdelava podatkov 50
4 REZULTATI 52
4.1 Priprava in analiza substanc 52
4.2 PK poskus na podganah 53
4.2.1 Potek PK poskusov na podganah 53
4.2.2 Izmerjene koncentracije v serumu 54
4.2.3 Neprostorska PK analiza 56
4.2.4 Populacijska PK analiza 56
4.2.5 Distribucija po organih 58
4.2.6 Hematologija in teže organov 59
4.2.7 Makroskopska in histološka preiskava organov 60
4.3 Toksikološko ovrednotenje na miših 64
4.3.1 Simptomatologija 64
4.3.2 Temperatura 65

4.3.3 Telesna masa ... 67
4.3.4 Hematološke preiskave ... 68
4.3.5 Biokemijske preiskave ... 69
4.3.6 Makroskopska in histološka preiskava organov ter teže organov ... 70
5 DISKUSIJA ... 75
5.1 Priprava in analiza proteinov ... 75
5.2 PK poskusi na podganah ... 77
5.3 Toksikološko ovrednotenje na miših ... 85
6 ZAKLJUČKI ... 91
7 POVZETEK ... 93
8 SUMMARY ... 95
9 ZAHVALA ... 97
10 LITERATURA ... 98
11 PRILOGE ... 111
Hematološke preiskave ... 111
Biokemijske preiskave ... 113

OKRAJŠAVE

A	alanin
Ala	alanin
AST	aspartat-aminotransferaza
ALP	alkalna-fosfataza
ALT	alanin-aminotransferaza
ANOVA	analiza variance
aP	anorganski fosfor
C	cistein
CK	kreatin-kinaza
CL	*angl.* clearance; očistek
CO_2	ogljikov dioksid
Cys	cistein
DMSO	dimetilsulfoksid
E	glutamat
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ELISA	*angl.* enzyme linked immunosorbent assay; encimskoimunski test
EMEA	*angl.* European Medicines Agency; Evropska agencija za zdravila
FADD	*angl.* Fas-associated death domain protein; protein v signalnem kompleksu TNF-R1, ki se veže na Fas in vsebuje domeno smrti
HCT	hematokrit
HE	hematoksilin in eozin
HGB	hemoglobin
ILP	*angl.* isolated limb perfusion; izolirana perfuzija okončine
I-κB	inhibitor jedrnega faktorja kappa B
IOP	*angl.* isolated organ perfusion; izolirana perfuzija organa
i. v.	intravenozno
IVC	*angl.* individual ventilated cage; kletka z individualnim prezračevanjem
LDH	laktat-dehidrogenaza
LD_{50}	srednji smrtni odmerek
MCH	povprečna masa hemoglobina v eritrocitih
MCHC	povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih

MCV	povprečni volumen eritrocitov
MRT	*angl.* mean residence time; srednji čas zadrževanja
MTD	*angl.* maximum tolerable dose; največji tolerirani odmerek
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
NF-κB	jedrni faktor kappa B
NGF	*angl.* nerve growth factor; živčni rastni dejavnik
OD	optična gostota
PBS	fosfatni pufer
PEG	polietilenglikol
PGE_2	prostaglandin E_2
PK	farmakokinetični
PLT	število trombocitov
RBC	število eritrocitov
rcf	*angl.* relative centrifugal force; relativna centrifugalna sila
rpm	*angl.* revolutions per minute; število obratov na minuto
s. c.	podkožno
TACE	*angl.* TNF-α-converting enzyme; encim (membranska metaloproteinaza), ki odcepi TNF-α z membrane
TNF-α	dejavnik tumorske nekroze alfa
TNFR1	receptor za TNF-α 1
TNFR2	receptor za TNF-α 2
TRADD	*angl.* TNF-receptor1-associated death domain protein; adapterski protein
TRAF-1	*angl.* TNF receptor-associated factor-1; pomožni protein v signalnem kompleksu TNF-R1
TRAF-2	*angl.* TNF receptor-associated factor-2; pomožni protein v signalnem kompleksu TNF-R1
WBC	število levkocitov

Vpliv pegilacije analogov TNF-α na farmakokinetične lastnosti in toksičnost pri laboratorijskih miših in podganah

IZVLEČEK

Ključne besede: antineoplastiki – toksičnost; faktor tumorske nekroze-alfa – analogi in derivati; polietilenglikol – farmakokinetika; proteini, vezava – terapevtska uporaba; miši; podgane

Dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF-α) je protein, ki se kot terapevtik uporablja za lokalno zdravljenje rakavih obolenj, njegova širša uporaba v medicini pa je omejena zaradi hudih stranskih učinkov. Zato se poskuša spremeniti lastnosti molekule in izboljšati protitumorsko učinkovitost. Kovalentna modifikacija proteinov s polimeri pomeni pomemben pristop k izboljšavi učinkovitosti bioterapevtikov. S procesom pegilacije, v katerem na protein vežemo polimer polietilenglikol, dosežemo fizikalno-kemijske spremembe proteina, kar se kaže v spremenjenih bioloških in farmakokinetičnih (PK) lastnostih. Namen naše raziskave je bil pridobiti analog TNF-α, ki bi ga lahko usmerjeno pegilirali in s tem vplivali na daljši razpolovni čas in nižjo toksičnost. Izolirali smo rekombinantni TNF-α z naravnim zaporedjem aminokislin (LK-800) in analog LK-849, ki smo ju usmerjeno pegilirali. Vse štiri substance (LK-800, LK-849 in njuni pegilirani obliki P5-LK849 in N-LK800-5L) smo testirali na laboratorijskih miših in podganah ter določili PK lastnosti in toksikološke učinke. Preiskovane substance smo podganam aplicirali intravenozno (i. v.) in ob vnaprej določenih časovnih točkah odvzeli kri. V serumu smo določili koncentracije substanc in napravili PK profil. Na koncu poskusa smo podgane žrtvovali in odvzeli različne organe, ki smo jih pregledali makroskopsko in mikroskopsko. V nekaterih odvzetih organih smo določili koncentracije substanc. Mišim smo substance aplicirali i. v. ali subkutano (s. c.) v dveh različnih odmerkih. V obdobju 14 dni po aplikaciji smo spremljali klinične simptome, telesno temperaturo in telesno maso. Na koncu poskusa smo miši žrtvovali in odvzeli kri za določitev hematoloških in biokemijskih parametrov. Odvzeli smo organe ter jih makroskopsko in mikroskopsko pregledali. Rezultati kliničnih opazovanj, hematoloških in biokemijskih parametrov in histološke preiskave so potrdili naše hipoteze, da pegilirani analogi povzročajo manjše spremembe v organih in so na splošno manj toksični od nepegiliranih izhodnih substanc. PK profili potrjujejo hipotezo, da imajo pegilirani analogi TNF-α daljši biološki razpolovni čas in so za podgane manj toksični. Izboljšane PK in toksikološke lastnosti

preiskovanih pegiliranih analogov TNF-α narekujejo nadaljnje raziskovanje na živalskih modelih s tumorji in potrditev protitumorskega delovanja.

Influence of PEGylation of TNF-α analogues on pharmacokinetics and toxicity in laboratory mice and rats

ABSTRACT

Key words: antineoplastic agents – toxicity; tumor necrosis factor-alpha – analogs and derivates; polyethylene glycols – pharmacokinetics; protein binding – therapeutic use; mice; rats

TNF-α is used as a therapeutic protein in the local treatment of cancer, but its use in medicine is limited due to severe side effects. There have been many attempts to overcome these limitations and improve the anti-tumor properties. An important approach for improving the efficacy of biotherapeutics is covalent protein modification by polymers. With the attachment of the polymer polyethylene glycol, a process called PEGylation, the physicochemical characteristics of proteins are altered resulting in changed biological and pharmacological properties. The purpose of our investigation was to produce a TNF-α analogue which could be site-directly PEGylated. This could have an influence on the prolonged half-life and reduction of the toxicity. Therefore recombinant TNF-α with native amino acid sequence (LK-800) and analogue LK-849 were isolated and both site-specifically PEGylated to obtain well-defined conjugates. Behaviour of all four substances, LK-800, analogue LK-849 and their PEGylated forms (N-LK800-5L and P5-LK849) were then investigated in laboratory rats and mice to determine the pharmacokinetic properties of the molecules and to assess their toxicological effect. Rats were injected intravenously and blood was taken at pre-determined time points. Drug concentrations were determined in sera and PK profiles were constructed. At the end of the experiment animals were sacrificed and different organs were investigated macroscopically and histologically for changes, and the concentration of drug was determined in some of the organs. Mice were injected intravenously or subcutaneously with all four substances in two different doses. Clinical signs including body temperature were evaluated throughout a 14-day period. At the end, animals were sacrificed, blood was taken to evaluate clinical biochemistry and hematology parameters, while organs were macroscopically and histologically investigated. The results, based on clinical observations, biochemical and hematological parameters and histological examination, suggest that PEGylated TNF-α

analogs cause minor or no changes in the organs and are generally less toxic to mice. Pharmacokinetic profiles confirmed the hypothesis that PEGylated forms showed longer half-lives and are also less toxic to rats. Improved pharmacokinetic and toxicological properties of conjugates suggest additional testing on tumor-model systems to confirm the anti-tumor properties.

1 UVOD

Dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF-α) je protein iz družine vnetnih citokinov, ki se ga v medicini uporablja tudi za lokalno terapijo rakavih obolenj. Kot terapevtik je trenutno omejen na lokalno uporabo zdravljenja sarkomov mehkih tkiv, metastatskih melanomov in drugih neoperabilnih solidnih tumorjev (Eggermont in sod., 2004; Grünhagen in sod., 2006). V obolelem tkivu se lahko doseže stalno terapevtsko koncentracijo le z lokalno perfuzijsko terapijo. Pri sistemski terapiji (vnosu učinkovine v sistemski krvni obtok) je TNF-α učinkovit ob visokih apliciranih odmerkih, vendar ima precej nezaželenih učinkov na organe, ki niso tarčni organi, in zaradi tega se TNF-α šteje za sistemsko toksično molekulo (Spriggs in sod., 1987; Zwaveling, 1997). Potrebe po raziskavi dejavnikov, ki vplivajo na lastnosti TNF-α in izboljšujejo njegovo delovanje v smislu večje specifičnosti in nižje toksičnosti, so zato velike. Eden od pristopov k spremembi lastnosti molekule je razvoj analogov TNF-α, ki se v razmerah *in vitro* in *in vivo* obnašajo drugače od nativnega TNF-α (Menart in sod., 1996). Pegilacija pa je proces, pri katerem se na protein kovalentno veže različno dolg polimer polietilenglikol (PEG) (Braeckman, 1997). S tem dosežemo povečanje velikosti molekule (večji hidrodinamski radij), kar vpliva na farmakološke lastnosti proteina, zlasti na daljšo absorpcijo in biološki razpolovni čas proteina v krvi ter na manjši odstotek očistka molekule iz krvi (Caliceti in sod., 2003). Poleg tega je taka molekula bolj topna, manj imunogena (Abuchowski in sod., 1977a) in bolje zaščitena pred razgradnjo (Harris in sod., 2003). Zaradi nižje biološke aktivnosti pa se verjetno zniža sistemska toksičnost molekule (Caliceti in sod., 2003).

Namen raziskave

- Pridobiti cisteinski analog TNF-α s takšnim aminokislinskim zaporedjem, ki bo omogočalo izvedbo usmerjene pegilacije.
- Opredeliti farmakokinetične (PK) lastnosti pegiliranega cisteinskega analoga TNF-α pri predvidenih terapevtskih odmerkih.
- Potrditi, da teoretični terapevtski odmerek pegiliranega cisteinskega analoga TNF-α ni akutno toksičen.
- Določiti koncentracije TNF-α, pegiliranega TNF-α, cisteinskega analoga TNF-α in pegiliranega cisteinskega analoga TNF-α v organih podgan.

- Ovrednotiti uporabnost pegiliranega cisteinskega analoga TNF-α za morebitno nadaljnje raziskovanje in uporabo pri zdravljenju rakavih obolenj.

Z raziskavo smo želeli preveriti naslednje hipoteze:

- PK profil pegiliranega analoga TNF-α se izboljša glede na PK profil nepegilirane izhodiščne molekule (rekombinantni TNF-α) v smislu daljšega biološkega razpolovnega časa.

- Pegilirani analog TNF-α ima manjše toksično delovanje glede na nativni TNF-α zaradi spremenjenih PK lastnosti.

- Čas zadrževanja pegiliranega analoga TNF-α v telesu se podaljša, njegova toksičnost pa se zniža.

- Koncentracije pegiliranega analoga TNF-α, ki bodo dosežene v organih po enkratni aplikaciji, niso toksične.

- Pegiliran cisteinski analog TNF-α je zaradi izboljšanih PK lastnosti in nižje toksičnosti primerna molekula za nadaljnje raziskovanje.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 TNF-α

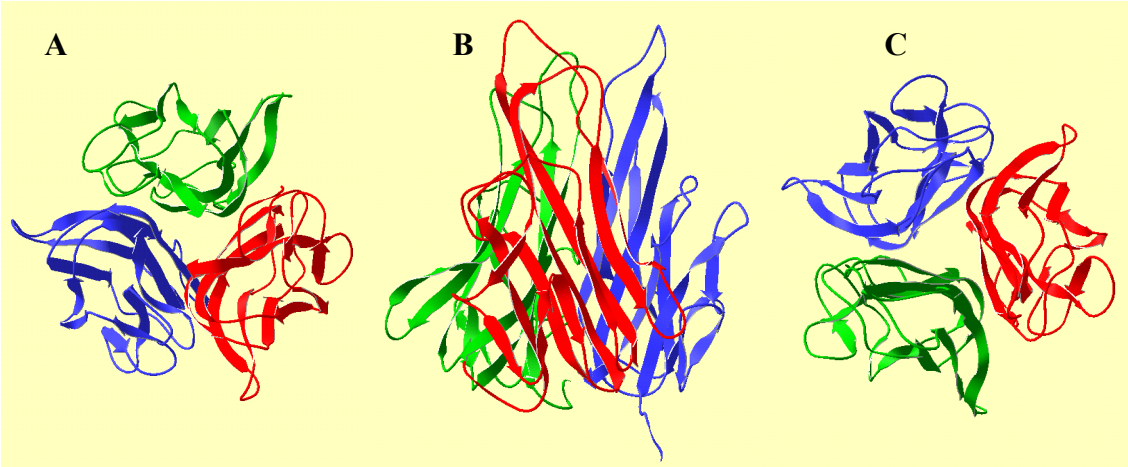
TNF-α je citokin, ki je vključen v številne procese v organizmu. Proizvaja ga mnogo telesnih celic, na prvem mestu monociti in makrofagi, v precejšnjih količinah pa tudi limfociti T in B, celice ubijalke, fibroblasti, nevtrofilni in eozinofilni granulociti, mastociti, astrociti, osteoblasti, endotelijske celice, mikroglia, gladke mišične celice in celo nekateri tipi rakavih celic, kot npr. tumorske celice ledvic, mlečne žleze in melanoma (Terlikowski, 2001; Vassalli, 1992). Je močan posrednik vnetja in aktivator imunskega sistema (Beutler in Cerami, 1988; Old, 1985), deluje pa protimikrobno, protiparazitarno in protitumorsko (Havell, 1989). Pomembno vlogo ima tudi pri razvoju nekaterih avtoimunskih bolezni, kot so revmatoidni artritis, Crohnova bolezen in psoriaza (Beutler, 1999; Tracey, 2002).

Njegova fiziološka vloga je zelo kompleksna, saj sodeluje pri rasti in razvoju številnih celic, poleg tega skoraj vse celice v organizmu izražajo receptorje za TNF-α. Delovanje je odvisno tudi od koncentracije TNF-α v telesu, saj pri nizkih koncentracijah deluje lokalno na endotelijske celice in na levkocite, pri srednje visokih koncentracijah, do katerih pride pri resnejših infekcijah, učinkuje že sistemsko, pri zelo visokih koncentracijah pa skupaj z drugimi citokini povzroči septični šok (Abbas in sod., 2000). Dolgotrajno sistemsko dajanje TNF-α poskusnim živalim povzroči presnovne spremembe, zmanjšanje občutka lakote in zaviranje sinteze lipoprotein-lipaze, kar privede do izgube mišičnih in maščobnih celic ter do zmanjšanja telesne mase ali kaheksije. Od tod izvira tudi nekdanje ime za TNF-α – kahektin (Tracey in sod., 1988).

2.1.1 Struktura TNF-α

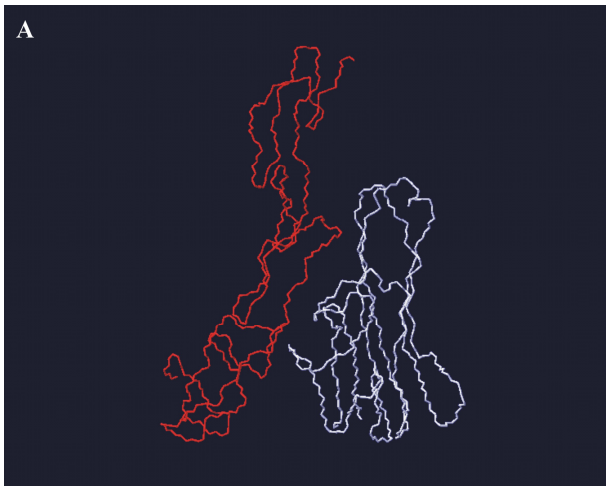
TNF-α se sintetizira v obliki transmembranske 26 kDa velike prekurzorske molekule. Encimsko cepljenje privede do nastanka topnega, 17 kDa velikega proteina. V procesu trimerizacije pride do povezovanja treh enakih enot bodisi transmembranske ali pa topne oblike proteina (Palladino in sod., 2003). Biološko aktivni TNF-α je torej homotrimer z molekulsko maso 52 kDa (Slika 2-1). Kristalna struktura TNF-α je bila določena že leta 1989 z rentgensko difrakcijo (Eck in Sprang, 1989; Jones in sod., 1989). Vsaka podenota ima 157 aminokislin, sestavljata pa jo dve beta ploskvi. Edina cisteina (Cys 69 in Cys 101) v molekuli

sestavljata intramolekularno disulfidno vez (Davis in sod., 1987), ki povezuje zanki obeh beta ploskev. Disulfidna vez ni bistvena za delovanje, prispeva pa k stabilnosti proteina (Narachi in sod., 1987). Monomeri so z nekovalentnimi vezmi povezani v trimer piramidne oblike. Po sredini teče kanal, ki ga na obeh straneh obkrožajo polarne in nabite, v osrednjem delu pa večinoma hidrofobne aminokisline. N-terminalni del je izpostavljen in fleksibilen, C-terminalni del pa je tesno vključen na robu kompaktne strukture v bazi molekule blizu osrednjega kanala (Eck in Sprang, 1989; Jones in sod., 1989). Vezavno mesto za oba receptorja (receptorja za TNF 1 in 2) leži v brazdi na stiku med dvema podenotama. TNF trimer ima torej tri ekvivalentna vezavna mesta za receptorje. Ključne aminokisline za vezavo ležijo na obeh podenotah (na obeh straneh brazde), večinoma v spodnjem delu molekule (Eck in Sprang, 1989; Jones in sod., 1989).



Slika 2-1: Tridimenzionalna struktura TNF-α
A – pogled z vrha, B – pogled s strani, C – pogled od spodaj.
Z različnimi barvami so prikazane posamezne podenote trimerne molekule (Kenig, 2007).

Priprava kristala kompleksa TNF-α z receptorjem TNFR1 in rentgenska analiza doslej še nista uspeli, vendar lahko na osnovi znane 3D strukture kompleksa TNF-β z receptorjem TNFR1 (Slika 2-2, Banner in sod., 1993) in dejstva, da se oba citokina (TNF-α in TNF-β) vežeta na iste receptorje, sklepamo, da je ob vezavi na membranski receptor TNF trimer usmerjen s konico proti membrani celice (Menart, 2000).



Slika 2-2: Kompleks monomernega TNF-β (svetlo modra barva) in topnega dela receptorja za TNF (rdeča barva), kjer sta zaradi boljše preglednosti dve podenoti TNF izpuščeni (Fonda in sod., 2005).

Po sintezi v celici in trimerizaciji se zgodi encimska cepitev TNF-α z membrane celice. Primarni encim, ki je odgovoren za cepljenje transmembranske oblike v topno (nevezano) obliko, je membranska metaloproteinaza TACE. Tako se večino pomembnih in izrazitih bioloških učinkov pripisuje topni trimerni obliki TNF-α, ki omogoči prenos signala v celico z vezavo na receptorje za TNF (Shalaby in sod., 1990). Tudi membransko vezani TNF-α je biološko aktiven, če je združen v homotrimer, in sicer prek celičnega kontakta z obema receptorjema (Kriegler in sod., 1988; Palladino in sod., 2003).

2.1.2 Receptorji za TNF-α

Biološki odziv na TNF-α je posredovan prek dveh različnih receptorjev, in sicer sta to TNF-α receptor 1 (= TNFR1, tudi p55) in TNF-α receptor 2 (= TNFR2, tudi p75). Oba receptorja sta transmembranska glikoproteina, ki spadata v družino receptorjev živčnih rastnih dejavnikov (NGF), za katere so značilna ponavljajoča se področja s cisteini povezanih regij na zunajcelični N-terminalni domeni (Naismith in sod., 1996). Čeprav sta zunajcelični domeni strukturno in funkcionalno homologni, se receptorja bistveno razlikujeta v znotrajcelični domeni. Pri TNFR1 je prisotna domena smrti, ki je pri TNFR2 ni. To je zaporedje približno sedemdesetih aminokislin, ki lahko sprožijo celično apoptozo (Beutler, 1999). Splošni princip delovanja receptorjev, ki imajo domeno smrti, je znotrajcelična interakcija med domeno smrti na receptorju in molekulo FADD (Fas-associated death domain). Pri receptorju TNFR1 se

FADD na domeno smrti veže prek adapterskega proteina TRADD (angl.: TNF-receptor1-associated death domain protein). Na molekuli FADD je efektorska domena smrti, ki vpliva na interakcijo s kaspazo 8, ta pa sproži kaspazno kaskado, katere rezultat je proteolitsko delovanje in sprožitev uničenja celice.
Obstaja pa še en faktor, to je TRAF-1/ -2, ki aktivira navzdolnje signalne proteine (JNK, NF-κB). TRAF-2 se v obliki dimera (homodimera ali heterodimera s TRAF-1) veže neposredno na C-konec TNF-R2, na TNF-R1 pa se veže prek N-konca adapterskega proteina TRADD. To vpliva na sprožitev navzdolnjega signala, ki aktivira dejavnik NF-κB. Ta deluje kot transkripcijski faktor v jedru celice. Ko je v neaktivnem stanju, je v citoplazmi celice, njegovo inaktivacijo pa vzdržuje I-κB (inhibitor κB). Do aktivacije pride, ko se po vezavi različnih kinaz I-κB ubikvitinira in razgradi v proteasomu. NF-κB lahko tedaj preide v jedro, kjer aktivira tarčne gene, ki vplivajo na to, da je celica zaščitena pred TNF inducirano apoptozo (Bradham in sod., 1998).

Receptorja za TNF-α obstajata v dveh oblikah: vezana na celično membrano ali pa v nevezani, topni obliki. Oba receptorja lahko s celične površine odcepijo encimi iz družine matriksnih metaloproteinaz v odzivu na vnetni signal, npr. ob vezavi TNF-α na receptor (Palladino in sod., 2003). Odcepljena zunajcelična domena receptorjev obdrži nespremenjeno sposobnost vezave TNF-α in tekmuje z membranskimi receptorji za vezavo ligandov. S tem deluje kot endogeni inhibitor, ki nevtralizira previsoke in nevarne koncentracije TNF-α in s tem zaščiti organizem (Engelman in sod., 1990). Po nekaterih podatkih pa topni receptorji delujejo tudi kot pospeševalci biološke aktivnosti in stabilizatorji strukture TNF-α (Aderka in sod., 1992). Z vidika diagnostike in terapije bolezni, pri katerih prihaja do prevelike produkcije ali kar kroničnega nastajanja TNF-α, so topni receptorji zanimivi kot mogoči nevtralizatorji previsokih količin TNF-α (Ksontini in sod., 1998; Van Zee in sod., 1992).

Večina citotoksičnih učinkov, pa tudi proliferacija fibroblastov in antivirusna aktivnost, izhaja iz delovanja TNF-α prek receptorja TNFR1 (Naismith in sod., 1996), medtem ko večina sistemskih efektov (proinflamatorni učinki, stimulacija produkcije limfocitov in aktivacija NF-κB) izhaja iz delovanja prek receptorja TNFR2. Patogeni dražljaji delujejo na TNF-α, ta pa sproži kaskado drugih vnetnih citokinov, kemokinov, rastnih faktorjev in endotelijskih adhezinov, ki rekrutirajo in aktivirajo niz celic na mestu infekcije ali tkivne poškodbe. Vnetna

kaskada, ki jo sprožijo TNF-α in njegovi receptorji, je modulirana s povratno inhibicijo in z regulacijo ekspresije receptorjev (Balkwill, 2002).

Receptorje za TNF izražajo vse celice z jedri, vendar se njihova razporejenost in koncentracija spreminjata glede na tip celice in glede na dražljaje iz okolja (Tartaglia in sod., 1991). TNFR1 je navzoč na skoraj vseh vrstah celic, TNFR2 pa je omejen na določen tip celic (večinoma na hematopoetske celice) in zmore razlikovati TNF-α različnih živalskih vrst (Balkwill, 2002). Receptorja se razlikujeta tudi glede na vezavno sposobnost, in sicer ima TNF-α nekoliko večjo afiniteto do receptorja TNFR2 v primerjavi z receptorjem TNFR1 (Grell in sod., 1995; Tartaglia in sod., 1991).

Eden od modelov mehanizma delovanja TNF-α je trimerizacija receptorjev, pri čemer trimerna molekula TNF-α deluje tako, da poveže dva ali tri zunajcelične dele receptorjev, zaradi česar se verjetno približajo znotrajcelične domene receptorjev in se sproži signal. Drugi model predvideva mreženje receptorjev, tretji pa molekularni preklop – konformacijsko spremembo receptorjev (Bazzoni in Beutler, 1996).

2.2 Zdravljenje s TNF-α

Ideja o zdravljenju rakavih obolenj na osnovi delovanja TNF-α se je porodila konec 18. stoletja, ko sam protein TNF-α še ni bil poznan. Newyorški kirurg William Coley je pri svojih pacientih dosegel izjemen uspeh regresije neoperabilnih tumorjev, ko je pacientom vbrizgal mešanico inaktiviranih bakterij *Streptococcus sp.* in *Serratia marcescens*. Poznejši poskusi so namreč pokazali, da so bakterijski lipopolisaharidi (LPS) tisti, ki imajo vpliv na regresijo tumorjev, in ob nadaljnjem raziskovanju je bil odkrit serumski protein, ki je imel lastnost povzročiti hemoragično regresijo tumorjev. Zaradi te lastnosti so ga poimenovali dejavnik tumorske nekroze alfa. V približno istem obdobju je bila neodvisno odkrita substanca, ki je povzročala kronično katabolno stanje, to pa je vodilo v hujšanje (kaheksijo) in smrt ter je zaradi tega dobila ime kahektin. Poznejše kloniranje genov, odgovornih za sintezo TNF-α in kahektina, pa je okoli leta 1985 razkrilo, da je to pravzaprav isti protein (Pennica in sod., 1984; Terlikowski, 2001; Wang in sod., 1985).

Številni *in vitro* poskusi so pokazali dokaj različne odzive celičnih linij na tretiranje s TNF-α: od popolne lize in uničenja celic do absolutne odpornosti in neodzivnosti (Mueller, 1998). Vendar so *in vivo* poskusi pokazali, da se rezultatov iz celičnih linij ne da tako preprosto

prenesti na živ organizem, saj so pri nekaterih tumorjih, ki *in vitro* niso bili občutljivi na TNF-α, dosegli visoko regresijo; in tudi obratno – nekateri tumorji, občutljivi v *in vitro* pogojih, so pokazali odpornost v *in vivo* pogojih (Carswell in sod., 1975; Jones in Selby, 1989).

Poskusi zdravljenja tumorjev so se zato nadaljevali s predkliničnimi poskusi na modelih miši s tumorji ali s humanimi tumorskimi presadki (Haranaka in sod., 1984), vendar je začetnim uspehom regresije tumorjev ob intratumoralni aplikaciji sledilo razočaranje zaradi neuspeha doseči regresijo tumorja ob sistemski aplikaciji (npr. i. v.) (Selby in sod., 1987). Tudi številni klinični poskusi na ljudeh niso dali dovolj zadovoljivih rezultatov, saj je na terapijo pozitivno reagiralo le od nekaj odstotkov do 60 odstotkov pacientov. Vzroki za neuspeh so prekratek izpostavitveni čas, omejeni odmerki, neželeni učinki, kratka biološka razpolovna doba in tudi progresivna narava bolezni (Terlikowski, 2001). Poleg tega se je izkazalo, da je največji tolerirani odmerek pri ljudeh deset- do petdesetkrat nižji kot pri živalih (Blick in sod., 1986; Kimura in sod., 1987; Lejeune in sod., 1998).

Zaradi visoke toksičnosti in neželenih učinkov je bila kot ena od alternativ za zdravljenje s TNF-α preizkušena metoda izolirane perfuzije okončin (ILP). Pri tej metodi gre za lokalno dostavo dokaj visokih odmerkov zdravila v izoliranem krvotoku okončine, zaradi česar so neželeni učinki zmanjšani, sistemska toksičnost pa je še sprejemljiva (Mueller, 1998; van der Veen in sod., 2000). Vendar se je tudi pri taki tehniki zdravljenja izkazalo, da TNF-α samostojno ni dovolj učinkovit; boljše rezultate so raziskovalci dosegali s kombinacijo s kemoterapevtiki (npr. melfalan, doksorubicin) in drugimi tehnikami (npr. hipertermija, radioterapija), ki s TNF-α delujejo sinergistično (Eggermont in sod., 1996; Gutman in sod., 1997; Lejeune, 1995). TNF-α namreč zaradi delovanja na žilni endotelij poveča prepustnost žil v tumorju in citostatik laže prehaja v tkivo, kjer nato pride do apoptoze tumorskih celic (de Wilt in sod., 2000). Evropska agencija za zdravila (EMEA) je leta 1999 odobrila uporabo zdravila Beromun® (Boehringer Ingelheim; učinkovita substanca je TNF-α z generičnim imenom tasonermin), ki je namenjeno zdravljenju bolnikov z neoperabilnim sarkomom mehkega tkiva okončin, v kombinaciji z melfalanom in ob rahli hipertermiji s tehniko ILP. Lahko se uporablja tudi pred operacijo za zmanjšanje velikosti tumorja ali namesto operacije, kadar kirurški poseg ni mogoč (EMEA/H/C/206; van Horssen in sod., 2006).

Uspehi pri zdravljenju s tehniko ILP so vodili v razvoj podobnih perfuzijskih tehnik na izoliranih organih (IOP), predvsem na ledvicah, jetrih in pljučih (Nakamoto in sod., 2000; van der Veen in sod., 2000).

Raziskovalci si prizadevajo za razvijanje in testiranje varnejših in učinkovitejših tehnik za uporabo TNF-α v terapevtske namene. Trenutne smernice za zdravljenje rakavih obolenj s TNF-α v prihodnosti nakazujejo bodisi uporabo TNF-α v netoksičnih odmerkih, in to skupaj z drugimi zdravili proti rakavim obolenjem ali s citokini zaradi sinergističnega delovanja in zmanjševanja neželenih učinkov, bodisi uporabo strukturno spremenjenih analogov TNF-α, ki ne povzročajo neželenih učinkov in jih organizem bolje prenaša. Sem lahko uvrstimo tudi mutacije in derivatizacije, ki vodijo do boljše biološke razpoložljivosti (npr. pegilacija). Možnosti se kažejo še v intraarterialni injekciji liposomov, ki vsebujejo TNF-α, in v genskem zdravljenju (Balkwil, 2009; Terlikowski, 2001), uspeh pa so dosegli tudi s sinergističnim delovanjem TNF-α in bleomicina pri elektrokemoterapiji na mišjem modelu sarkoma (Serša in sod., 1997).

Gensko zdravljenje je tehnika zdravljenja, pri kateri se genski material vnese v pacientove celice z namenom nadomestila, spremembe ali utišanja izražanja genov. Med genske terapije sodi tudi vnos dodatnih genov v žive celice, da bi spremenili njihove biološke lastnosti v terapevtske namene (Milisav, 2003). Z genom za TNF-α so transficirali tumor-infiltrirajoče limfocite, ki prepoznajo tumorske antigene. Taki limfociti se po injiciranju zbirajo na mestu tumorja in sproščajo visoko lokalno koncentracijo TNF-α v neposredni bližini tumorskih celic (Rosenberg in sod., 1993). Še novejši pristop je selektivna dostava TNF-α v tumor s pomočjo virusnega vektorja, ki vsebuje gene za TNF-α, ti pa so pod nadzorom promotorja *egr-1* (TNFerade, GenVec, ZDA). Promotor se aktivira pod vplivom ionizirajočega sevanja ali različnih substanc in omogoča izražanje TNF-α (Wang in Lin, 2008). Klinična preizkušanja faze I in II z vektorjem TNFerade so pokazala obetavne učinke pri zdravljenju raka požiralnika in trebušne slinavke ter rektalnega raka (Mauceri in sod., 2009).

Način ciljane dostave TNF-α v tumor so dosegli tudi s fuzijo TNF-α in monoklonskih protiteles, specifičnih za tumorske antigene. Ker protitelesa pripeljejo TNF-α natančno do tumorja, je protitumorski učinek večji, toksični neželeni učinki pa so manjši (Wang in Lin,

2008). S podobnim mehanizmom deluje tudi plazmidni vektor, v katerem so kodirani TNF-α in kratki peptidi, ki imajo sposobnost vezave na ožilje tumorja (Zarovni in sod., 2004).

Omeniti pa velja tudi drugi vidik terapije in antagoniste delovanja TNF-α – trenutno so registrirani štirje taki antagonisti (adalimumab (Humira®, Abbot, ZDA), etanercept (Enbrel®, Amgen Inc., ZDA), infliximab (Remicade®, Centocor Ortho Biotech Inc., ZDA) in certulizomab pegol (Cimzia®, UCB Pharma, Belgija)). TNF-α ima namreč veliko vlogo pri patogenezi nekaterih kroničnih vnetnih stanj (revmatoidni artritis, Crohnova bolezen, psoriatični artritis in ankilozirajoči spondilitis), pri katerih prihaja do povišanih koncentracij vnetnih posrednikov, med njimi tudi TNF-α (Tracey in sod., 2008). TNF antagonisti nevtralizirajo aktivnost TNF-α in s tem izboljšujejo vnetje. Izkazalo pa se je, da tudi maligne celice izločajo manjše količine TNF-α, ki skupaj z drugimi vnetnimi celicami in citokini pospešuje rast tumorjev in nastanek metastaz (Balkwill, 2009). Z omenjenimi TNF-α antagonisti so v kliničnih poskusih uspeli pri nekaterih pacientih z rakom stabilizirati bolezen. Zaradi omenjenih dejstev se zastavlja vprašanje, ali je pri rakavih obolenjih TNF-α tarča ali zdravilo (Balkwill, 2009; Dinarello, 2006)?

Današnje raziskave v zvezi s TNF-α so večinoma usmerjene v razjasnitev vloge družine TNF v različnih procesih (razvoj tkiva in homeostaza, patogeneza rakavih in vnetnih bolezni, imunska regulacija), predvsem z vidika mehanizmov in signaliziranja. Drugi poudarek pa je na terapiji, in sicer na odkrivanju mehanizmov patoloških in terapevtskih učinkov družine TNF, terapevtska modulacija in novi pristopi k terapiji. Ti zajemajo tako raziskovanje in izboljševanje delovanja družine TNF v zdravljenju rakavih obolenj kot tudi raziskovanje novih terapevtikov, ki imajo ligande družine TNF za tarčo (Program and abstracts from 12th International TNF Conference).

2.3 Zakaj analogi TNF-α

Z besedo analog označujemo kemijsko ali strukturno spremenjeno substanco, v kateri je eden ali več atomov, funkcionalnih skupin ali podstruktur spremenjenih oz. zamenjanih z drugačnimi atomi ali skupinami. Tako lahko pridemo do analogov, ki imajo spremenjene fizikalno-kemijske, biokemijske in farmakološke lastnosti. Mnogo raziskav je že bilo usmerjenih k ustvarjanju analogov TNF-α, ki bi imeli znižano sistemsko toksičnost in

ohranjeno ali povečano protitumorsko aktivnost (Fonda in sod., 2005; Loetscher in sod., 1993; Menart in sod., 1996; Nakamura in sod., 1991, Yan in sod., 2006). Poglavitne ugotovitve ob ustvarjanju analogov TNF-α so bile, da je **C-konec** molekule zelo občutljiv in že majhne spremembe privedejo do popolne izgube biološke aktivnosti (Sidhu in Bollon, 1989), **N-konec** pa je veliko boljše mesto za modifikacije, saj delecije ali pa zamenjave aminokislinskih ostankov povzročijo dvig *in vitro* specifične citotoksične aktivnosti (Creasey in sod., 1987; Kamijo in sod., 1989; Nakamura in sod., 1991; Yan in sod., 2006). Analogi s spremembami na **receptorskem mestu** nimajo velike uporabne vrednosti za zdravljenje raka, razen analogi z veliko afiniteto do posameznega tipa receptorja za TNF (Barbara in sod., 1994). Zelo primerno območje za uvedbo sprememb pa je **fleksibilna zanka** na konici molekule, predvsem na aminokislinskih mestih 107 in 108 (Menart in sod., 1996; Novaković in sod., 1997).

Menart in sod. (1996) opisujejo dve mutaciji, ki pri testu citotoksičnosti na celični liniji L929 kažeta višjo specifično aktivnost (180 odstotkov) v primerjavi z nativnim TNF-α. Zanimivo pa se je pri testiranju protitumorske aktivnosti na SA-1 fibrosarkomskem modelu na miših izkazalo, da ima eden od analogov podoben terapevtski učinek na tumor kot TNF-α, vendar povzroča manj toksičnih neželenih učinkov, medtem ko drugi analog kaže precej manjši učinek na tumor. To potrjuje že prej omenjeno dejstvo, da iz rezultatov biološke aktivnosti *in vitro* ne moremo preprosto sklepati na moč učinka na tumor v telesu.

V nadaljnjih poskusih so Novaković in sod. (1997) preizkušali učinek prej omenjenih analogov TNF-α na tumorje (tumorski modeli miši z implantiranimi SA-1 tumorji). Ugotovili so, da preiskovana analoga kot tudi nativni TNF-α nimajo citotoksičnega učinka na gojene SA-1 tumorske celice, poskusi *in vivo* pa so pokazali protitumorsko delovanje, katerega jakost je bila odvisna od odmerka. Bolje se je izkazal analog z mutacijo aminokisline 107 (E107K), ki je kazal učinke, zelo podobne nativnemu TNF, vendar je povzročil manj neželenih toksičnih učinkov in imel boljši terapevtski indeks.

S tem analogom je bilo opravljenih še več raziskav, ki so razkrile, da je pozitivni naboj na konici analoga potencialno odgovoren za močnejšo in hitrejšo vezavo na celično površino (Menart in sod., 2002).

Testiranje TNF-α in omenjenega analoga na treh reprezentativnih celičnih linijah – tumorskih, hepatocitnih in endotelijskih – pa je pokazalo značilno višjo citotoksičnost analoga LK-805 v primerjavi z nativnim TNF-α. Pojav je razložen z interakcijo, ki nastane med pozitivno nabito

konico analoga LK-805 in negativno nabitimi heparan sulfatnimi molekulami na celični površini (Fonda in sod., 2005).

2.4 Pegilacija

2.4.1 Modifikacija terapevtskih proteinov

Področje farmacevtske biotehnologije se je v zadnjih dveh desetletjih močno in hitro razvilo, kar je na področju terapije različnih bolezni (vključno z rakom) privedlo do proizvodnje in vrednotenja številnih peptidnih in proteinskih terapevtikov. Vsekakor je velika ovira pri trženju takih pripravkov njihov hiter očistek iz telesa (kratek razpolovni čas ter hiter očistek skozi ledvice), občutljivost za proteolitično razgradnjo in mogoč pojav imunogenosti (Mehvar, 2000). Zlasti slednja je ena poglavitnih slabih strani uporabe proteinov nehumanega izvora za terapevtske namene. Imunski odziv nevtralizira biološko učinkovitost, pospeši eliminacijo proteina in lahko povzroči preobčutljivostne reakcije (Harris in sod., 2001). Te probleme se poskuša obiti z različnimi pristopi, npr. s spreminjanjem aminokislinskih zaporedij beljakovin, s fuzijo z imunoglobulini ali albuminom, z vključevanjem v liposome ali s kovalentno vezavo sintetičnih in naravnih polimerov (npr. PEG) na proteine (Harris in Chess, 2003). Slednje privede do nastanka proteinsko-polimernih konjugatov, ki so pokazali obetaven terapevtski učinek (Mahmood in Green, 2005; Veronese in Pasut, 2005). V splošnem taka vezava doprinese k temu, da imunski sistem slabše prepozna protein, kar je dobro, ter da sta pojav imunogenosti in očistek proteina iz telesa manjša. Večina takšnih konjugatov ohrani farmakološko aktivnost nativnega proteina, vendar je ta do določene mere zmanjšana (Mehvar, 2000).

Na trgu je že nekaj pegiliranih terapevtskih produktov, ki potrjujejo učinkovitost in varnost tovrstnih produktov. Prve poskuse konjugacije PEG-a na protein je izvedel Abuchowski s sodelavci pred tremi desetletji (Abuchowski in sod., 1977a; Abuchowski in sod., 1977b) in opazil izboljšanje lastnosti takšnih pegiliranih proteinskih konjugatov. Prvi pegiliran biofarmacevtik, pegilirana oblika adenozin-deaminaze – Adagen® (Enzon Pharmaceuticals, ZDA), je FDA odobrila v zgodnjih devetdesetih za zdravljenje hude kombinirane imunodeficience (SCID), povzročene zaradi pomanjkanja encima adenozin deaminaze. Do danes je bilo odobrenih devet različnih pegiliranih produktov – osem pegiliranih proteinov in en pegiliran RNA oligonukleotid (pegaptanib, Macugen®, Eyetech Inc., ZDA). V skupino

pegiliranih produktov spadajo naslednja, po tržnem in terapevtskem deležu zelo pomembna zdravila: dve obliki pegiliranega interferona α – Pegintron® (pegiliran interferon α-2b, Schering-Plough, ZDA), odobren 2001, in Pegasys® (pegiliran interferon α-2a, Hoffman-La Roche, Inc., ZDA), odobren 2002 – oba za zdravljenje hepatitisa C; pegilirana oblika G-CSF – Neulasta® (Amgen, ZDA), odobrena 2002 za zdravljenje nevtropenije, povzročene s kemoterapijo; pegiliran epoietin-β – Mircera® (Hoffman-La Roche, Inc., ZDA), odobren 2007 za zdravljenje anemije pri kroničnem obolenju ledvic (Fishburn in sod., 2008). Na trgu je tudi že alternativa celotnim monoklonskim protitelesom, pegiliran fragment protiteles (Fab) – Cimzia® (UCB Pharma, Belgija), ki spada v družino zdravil za inhibicijo TNF-α in je bil odobren leta 2008 za zdravljenje Crohnove bolezni, 2009. pa še za revmatoidni artritis (Rivkin 2009; Scott in Cope, 2009). V različnih fazah kliničnih preizkušanj je še nekaj pegiliranih terapevtikov, ki jih lahko pričakujemo na trgu v bližnji prihodnosti. Eden od njih je pegiliran glikoziliran interferon β-1a proizvajalca BiogenIdec Inc. (ZDA) za zdravljenje multiple skleroze, ki je uspešno zaključil fazo II kliničnih preizkušanj in vstopa v fazo III (Baker in sod., 2006).

2.4.2 Pegilacija

S pojmom pegilacija poimenujemo proces kovalentne vezave ene ali več polimernih verig PEG-a na drugo molekulo, ponavadi na protein (Pasut in sod., 2004; Veronese in Pasut, 2005). Danes je pegilacija obetajoča metoda za dosego podaljšanega delovanja parenteralnih zdravil, saj terapevtskim proteinom in peptidom zniža imunogenost ter spremeni njihove farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti. Potencialne prednosti pegilacije so tudi daljši biološki razpolovni čas v krvnem obtoku, zmanjšani (akutni) neželeni učinki in imunogenost, ugodnejši režimi odmerjanja in višja kakovost življenja med zdravljenjem (Harris in sod., 2001).

PEG je nizko toksična in malo imunogena molekula, ki jo sestavljajo ponavljajoče enote etilen oksida s splošno strukturo $HO-(CH_2CH_2O)_n-H$, pri čemer je funkcionalizacija PEG-a omejena na uporabo terminalne primarne OH skupine (Shibata in sod., 2005). PEG polimeri z molekulsko maso pod 10 kDa so ponavadi linearni, medtem ko so PEG-i z višjimi molekulskimi masami lahko do različnih stopenj razvejani. Proteinski konjugati z razvejanim PEG-om imajo višjo termalno stabilnost ter so bolj odporni proti proteolitični razgradnji v

primerjavi s konjugati z linearnim PEG-om (Monfardini in sod., 1995), vendar je po konjugaciji z razvejanimi PEG-i ohranjena biološka aktivnost ponavadi nižja v primerjavi z linearnimi PEG-i.

Na proces priprave pegiliranega proteina z izboljšanimi farmakokinetičnimi, farmakodinamičnimi in drugimi lastnostmi vplivata tako PEG kot nativni protein. Do vezave PEG-a na protein pride prek aktivacije PEG-a, pri čemer med PEG-om in proteinom nastane vez, ki mora biti stabilna. V večini primerov se PEG kovalentno veže na N-konec polipeptidnih molekul in na aminokislino lizin, saj je ta aminokislina visoko reaktivna, pegilacijska reakcija pa je dovolj blaga, da se struktura beljakovine ne poruši (Harris in sod., 2001). Pegilacija, usmerjena na lizine, je nespecifična in problem lahko nastopi, če so vezavna mesta (lizin ali N-konec) v bližini aktivnih mest molekule (Shibata in sod., 2005; Tsutsumi in sod., 1995). V takem primeru pegilacija povzroči izgubo specifične aktivnosti beljakovine, kar pa se lahko kompenzira s podaljšanim biološkim razpolovnim časom (Harris in Chess, 2003). Naslednji problem pri nespecifični pegilaciji je tvorba PEG izomerov z različnimi molekulskimi masami, kar pri proizvodnji zdravil otežuje reprodukcijo serij učinkovine in s tem slabša klinično uporabnost. Zato se stremi k tistim tehnikam konjugacije, ki so ponovljive in dosegajo zahtevane standarde (Harris in sod., 2001). Z usmerjeno pegilacijo na izbrano mesto zmanjšamo izgubo biološke aktivnosti in imunogenost. Poleg usmerjene pegilacije na N-konec (Kinstler in sod., 2002), ki je široko patentno zaščitena, so idealne za ta namen tiolne skupine cisteinov, poleg tega se z genetskim inženiringom polipeptidom lahko zelo natančno doda cisteinske aminokisline (Harris in Chess, 2003; Roberts in sod., 2002).

2.4.3 Vpliv pegilacije na protein

Konjugacija proteinov z vodotopnimi polimernimi modifikatorji poveča molekulsko velikost in sterično oviranost. Pri PEG-u gre za vezavo vodnih molekul (na vsako podenoto PEG-a se vežejo dve do tri molekule vode), kar povzroči, da se pegiliran protein vede, kot da je pet- do desetkrat večji. Poleg tega vodne molekule delujejo kot ščit, ki molekulo varuje pred encimsko razgradnjo, hitrim ledvičnim očistkom in imunsko prepoznavo, ter vplivajo na izboljšanje biološkega razpolovnega časa proteinov v plazmi (Harris in Chess, 2003). S pegilacijo pa se spremenijo tudi druge fizikalno-kemijske lastnosti proteina (konformacija, hidrofobnost, lastnosti elektrostatične vezave, izoelektrična točka), kar znižuje sistemski

očistek prek številnih mehanizmov, vključujoč zmanjšanje ledvičnega očistka, proteolizo in opsonizacijo, vpliva pa tudi na vezavno afiniteto na celične receptorje, kar vodi v spremembe aktivnosti proteina (Harris in sod., 2001). Zaradi vseh teh učinkov je mogoče zmanjšati terapevtski odmerek in frekvenco aplikacije zdravila (Shibata in sod., 2005).

2.4.4 Toksikologija PEG-a in molekul, ki so modificirane s PEG-om

PEG se pogosto uporablja kot pomožna snov, ne samo v farmacevtskih proizvodih, temveč tudi v nefarmacevtskih proizvodih, kot so zobna pasta, šamponi, vlažilne kreme, barvila, hrana, pijača in deodoranti (Webster in sod., 2007). Niti akutne niti kronične toksikološke študije na glodavcih in neglodavcih niso pokazale značilnih toksikoloških ali neželenih učinkov, zato PEG velja za varno molekulo, ki prav tako nima neželenih učinkov na reproduktivni sistem ali karcinogenih učinkov. Oralni srednji smrtni odmerek (LD_{50}) za PEG za podgano je 31,7 g/kg (Bartsch in sod., 1976), za miš pa 35,6 g/kg (Smyth in sod., 1941).
Predklinični toksikološki poskusi s pegiliranimi proteini niso pokazali nikakršnih toksikoloških opažanj, ki bi bila vezana zgolj na PEG. Spremembe, ki so nastajale, so bile povezane s samo molekulo – proteinom, na katerega je bil vezan PEG (Bendele in sod., 1998).
Izpostavljenost toksičnim učinkom PEG-a iz pegiliranih bioloških zdravil ni višja, ampak velikokrat znatno nižja kot pri zdravilih, kjer je PEG pomožna snov. Je tudi bistveno nižja od količine PEG-a, ki pri ljudeh povzroči toksične učinke (akutno tubularno nekrozo). Zaradi majhne količine PEG-a, ki jo človek dobi s pegiliranim biološkim zdravilom, je zelo malo verjetno, da bi se pojavili neželeni učinki kot posledica prisotnosti PEG-a, uporabljenega za pegilacijo bioloških zdravil (Webster in sod., 2007).

Metabolizem kratkih PEG-ov je preprost, in sicer alkoholne skupine oksidirajo v karboksilno kislino s pomočjo encima alkohol-dehidrogenaze, v manjših količinah pa nastanejo tudi sulfatni konjugati in oksalna kislina. Pri večjih PEG-ih, ki so v uporabi za pegilacijo proteinov, pa se začne PEG izločati s pomočjo ledvic in jeter. Manjši delež se izloči s hepatobiliarnim očistkom, večina pa se skozi ledvice izloča s procesom pasivne glomerularne filtracije, ki je odvisna od molekulske mase (Webster in sod., 2007). Mejna vrednost molekulske mase nativnih globularnih proteinov pri izločanju skozi ledvice je 70 kDa, kar je velikost serumskega albumina. Proteini z večjo molekulsko maso se izločajo z jetrnim

očistkom ali pa jih odstranijo celice imunskega sistema (Caliceti in Veronese, 2003; Gursahani in sod., 2009). Terapevtski proteini so ponavadi manjši od navedene vrednosti, pegilirani proteini pa so svojevrsten problem. Pri njih moramo zaradi sposobnosti PEG-a, da veže vodne molekule, računati s tem, da je molekulski volumen nekoliko večji kot pri proteinih z enako molekulsko maso (Caliceti in Veronese, 2003; Caserman in sod., 2009; Kusterle in sod., 2008).

2.4.5 Pegilacija TNF-α

V preteklosti je že več skupin raziskovalcev poskusilo pegilirati TNF-α in ugotoviti učinek take molekule na tumorje. Tsutsumi in sodelavci (1994) so nespecifično pegilirali nativni humani TNF-α, ki je po pegilaciji ohranil 52 odstotkov biološke aktivnosti nativnega TNF-α, vendar je kljub temu pokazal 100-krat močnejše protitumorsko delovanje na miših. Poleg tega, da je ob manjšem odmerku povzročil hemoragično nekrozo tumorjev v enaki meri kot nativni TNF-α, je povzročil tudi manj kliničnih znakov, povezanih s toksičnimi učinki TNF-α, in manj poginov, pa tudi njegov biološki razpolovni čas je bil daljši. Pozneje je ista skupina avtorjev (Tsutsumi in sod., 1995; Tsutsumi in sod., 1996) raziskovala še vpliv različnih dolžin PEG-a na TNF-α in odnos med modifikacijo in biološko aktivnostjo. Poglavitni zaključki teh raziskav kažejo, da ima TNF-α, ki je optimalno modificiran s PEG-om, izrazito povečano protitumorsko učinkovitost in zmanjšane toksične stranske učinke ter da velikost molekule PEG-modificiranih proteinov, natančneje sterična oviranost, določena s stopnjo PEG modifikacije in z molekulsko maso PEG-a, lahko vpliva na klinično učinkovitost. Za optimalno bioaktivnost modificiranega proteina bi morali poznati optimalne velikosti molekul, ki jih dodajamo posameznemu proteinu.

2.5 Farmakokinetika in toksikologija

2.5.1 Farmakokinetika

Farmakokinetika je veja farmakologije, ki se ukvarja s tem, kako telo vpliva na vneseno substanco v smislu njene absorpcije, distribucije po telesu, metabolizma in izločanja. PK raziskave vključujejo tako eksperimentalne kot tudi teoretične pristope. Eksperimentalni vidik

vključuje razvoj tehnik zbiranja vzorcev, analitskih metod za merjenje koncentracije učinkovine in njenih metabolitov ter razvoj postopkov za lažje zbiranje in obravnavo podatkov. Teoretični vidik pa zajema razvoj PK modelov, ki predvidevajo, kako bodo po aplikaciji potekali absorpcija, distribucija, metabolizem in ekskrecija. Statistične analize so bistveni del PK študij, matematične in računalniške tehnike pa sestavljajo teoretično osnovo za mnoge PK metode (Shargel in sod., 2005).

Načrtovanje sodobnih farmacevtskih oblik temelji na načelih farmakodinamike, farmakokinetike in farmacevtske tehnologije. Racionalna farmakoterapija zahteva razvoj takih oblik zdravila, pri katerih so toksični učinki zmanjšani na minimum, terapevtski učinki pa povečani na maksimum (Grabnar in Mrhar, 1998). Integracija farmakokinetično-farmakodinamičnih konceptov na vseh stopnjah predkliničnega in kliničnega razvoja zdravila je zato zelo močno orodje v pridobivanju informacij in odločanju o nadaljnjih procesih med razvojem zdravila (Meibohm, 2006).

2.5.2 Toksikologija

Študije toksičnosti enkratnih odmerkov (angl.: single-dose toxicity studies) so ene najpomembnejših študij v predklinični stopnji razvoja zdravila in morajo biti izvedene pred izpostavljanjem ljudi kandidatu za zdravilo. Te študije dajo informacijo za izračun odmerka za toksičnost pri ponovljenih odmerkih, dajo preliminarno idejo o ciljnih organih, kjer se bo manifestirala toksičnost, in pomagajo pri izračunu začetnega odmerka substance, ki bo uporabljena pozneje v kliničnih testiranjih. Imenujejo se tudi študije kratkotrajne toksičnosti (angl.: short-term toxicity studies) ali študije akutne toksičnosti (angl.: acute toxicity studies) (Jorge-Nebert in sod., 2007).

Akutna toksičnost je definirana kot toksičnost, ki jo povzroči učinkovina, aplicirana enkratno ali v več odmerkih v razdobju, ki ne presega 24 ur. Tovrstni *in vivo* poskusi se ponavadi izvajajo na dveh živalskih vrstah – glodavcih (miši ali podgane) in neglodavcih. Testirani odmerek naj bi se gibal od količin, ki ne povzročijo neželenih učinkov, do količin, ki povzročijo večjo toksičnost ali celo ogrozijo življenje testirane živali. Učinkovino se aplicira na dva načina: tako, kot je predvideno za klinično uporabo in pa – če je mogoče – v žilo (Jorge-Nebert in sod., 2007).

Testirane živali se opazuje 14 dni po aplikaciji in se zapisuje naslednje parametre: vrsto, začetek in trajanje kliničnih znakov, izginevanje kliničnih znakov toksičnosti (reverzibilnost) ter čas in število smrti (mortalnost). Sekcijo se opravi pri poginulih in ciljano usmrčenih živalih ter po 14 dneh opazovanja še pri preostalih usmrčenih živalih. Klinična patologija in simptomi so ponavadi kontrolirani vsak dan skozi celotno trajanje poskusa. Histopatološke, hematološke in biokemijske spremembe pa se ugotavljajo med poskusom pri poginulih živalih in zadnji dan poskusa pri usmrčenih živalih. (3BS1A Pharmaco-Toxicological Guideline for Single Dose Toxicity; Council Directive 75/318/EEC; Jorge-Nebert in sod., 2007)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Priprava in pegilacija substanc

Priprava produkcijskega seva bakterije *Escherichia coli* za izražanje rekombinantnega humanega TNF-α (LK-800)

Produkcijski sev bakterije *E. coli* za izražanje rekombinantnega humanega TNF-α z naravnim aminokislinskim zaporedjem so pripravili na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. V ekspresijski plazmid pCyΔcI so vstavili kupljeni sintetski gen za humani protein TNF-α z optimiranimi kodoni za visoko izražanje v bakteriji *E. coli* (British Biotechnology, danes R&D Systems, ZDA) in ga transformirali v sev *E. coli* BL21(DE3) (Menart in sod., 1994).

Priprava produkcijskega seva *E. coli* za izražanje rekombinantnega cisteinskega analoga TNF-α LK-849

Sestavili smo teoretično aminokislinsko zaporedje za cisteinski analog TNF-α, ki se od nativnega TNF-α razlikuje v mutaciji aminokislin na mestih 69 in 101 (naravno prisotna cisteina sta zamenjana z alanini) in na mestu 107 (naravno prisotni glutamat je zamenjan s cisteinom). Zaporedje smo poslali v firmo Geneart (GENEART AG, Nemčija), kjer so sintetizirali sintetski gen z optimiranimi kodoni za visoko izražanje v bakteriji *E. coli*. Gen so na Kemijskem inštitutu v Ljubljani vstavili v ekspresijski plazmid pET9a in ga transformirali v sev *E. coli* BL21(DE3).

Pridobivanje proteina TNF-α (LK-800) in njegovega cisteinskega analoga TNF-α LK-849

Rekombinantni protein TNF-α in njegov cisteinski analog TNF-α LK-849 smo pridobivali v bakteriji *E. coli.* Protein se je v obeh primerih izražal znotrajcelično v topni in biološko aktivni obliki. Bakterije smo gojili v fermentorjih v GYSP mediju z dodatkom 100 mg/l ampicilina (Ampicillin Sodium Salt, Sigma-Aldrich, ZDA) pri 30 °C (LK-800) oz. 25 °C (LK-849). V vsako Erlenmayerjevo steklenico smo nacepili 15 ml predkulture, ki je bila gojena 7 ur na 30 °C (TNF-α) oz. na 25 °C (LK-849) pri 150 rpm. Gojenje bakterij smo zaključili po 16 urah kultivacije, ko so bile v stacionarni fazi, in jih ločili od gojišča s centrifugiranjem 5 minut pri 2700 x *g*. Bakterijske celice smo resuspendirali v pufru 50 mM TRIS-HCl, ki je vseboval 30 mM NaCl (pH 8,0), in jih homogenizirali z visokotlačnim

homogenizatorjem EmulsiFlex-C5 (Avestin). Homogenat smo centrifugirali 30 minut pri 17600 x *g,* s čimer smo ločili topno in netopno frakcijo. Nukleinske kisline smo odstranili z obarjanjem z 0,1-odstotnim polietileniminom. Po centrifugiranju pri 17600 x *g* smo v supernatant, ki je vseboval protein TNF-α, dodali amonijev sulfat do 65-odstotne nasičene raztopine in ponovno centrifugirali pri 17600 x *g*. Oborino, ki je vsebovala visok delež proteina TNF-α oziroma njegovega cisteinskega analoga, smo alikvotirali in jo do kromatografskega čiščenja shranili na + 4 °C.

Kromatografsko čiščenje proteina TNF-α (LK-800)

Vsi kromatografski postopki so bili izvedeni na sistemu Knauer HPLC z zbiralnikom frakcij FRAC-100 (Amersham Pharmacia Biotech).

TNF-α smo izolirali z dvostopenjskim kromatografskim postopkom, sestavljenim iz anionske stopnje na DEAE sefarozi FF (DEAE-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Anglija) in afinitetne kromatografije na nosilcu heparin-sefaroza (Heparin-Sepharose 6 Fast Flow, Amersham Biosciences). Amonsulfatno oborino, ki je vsebovala približno 50 mg celotnega proteina, smo raztopili v 15 ml 10 mM K-fosfatnega pufra (pH 8,0) in razsolili na PD-10 kolonah. Z enakim pufrom smo jo nato razredčili na 10 ml, končna koncentracija proteina pa je bila 5 mg/ml. Kolono HR10/10, pakirano z DEAE-sefarozo, smo predhodno uravnotežili z enakim pufrom in nanesli vzorec. Na tej kromatografski stopnji smo preizkusili različne solne gradiente za pridobitev najbolj optimalnega čiščenja TNF-α. Pretok je bil nastavljen na 2 ml/min, zbirali pa smo 2-ml frakcije, ki smo jih nato analizirali s SDS-PAGE. Tiste frakcije, ki so vsebovale TNF-α, smo združili in koncentrirali v ultrafiltracijski celici (Amicon) z membrano Millipore YM10. Zamenjali smo pufer in vzorec nato nanesli na HR10/10 kolono, pakirano s heparin sefarozo. Za boljšo vezavo na heparin sefarozo smo z 0,1 M *orto*-fosforno kislino pH uravnali na 6,0. Kolono smo ekvilibrirali z 10 mM K-fosfatnim pufrom (pH 6,0) in zopet preizkusili različne solne gradiente za najbolj optimalne izkoristke. Združili smo frakcije, ki so vsebovale čist TNF-α, zamenjali pufer in uravnali koncentracijo na 1 mg/ml. Produkt smo nato sterilno filtrirali s filtrom za brizgo ter alikvotirali v sterilne mikroepruvete (Microcentrifuge Tube, Brand, Nemčija). V nadaljnjem besedilu in poskusih je rekombinantni TNF-α z naravnim zaporedjem aminokislin označen kot **LK-800.**

Kromatografsko čiščenje cisteinskega analoga TNF-α LK-849

Cisteinski analog TNF-α LK-849 smo očistili z enakimi kromatografskimi stopnjami kot LK-800. Amonsulfatno oborino LK-849 smo raztopili v 10 mM K-fosfatnem pufru (pH 9,0). Prvo kromatografsko stopnjo smo izvedli na koloni, pakirani z DEAE-sefarozo, drugo kromatografsko stopnjo pa na koloni, pakirani s heparin-sefarozo. Nato smo zamenjali pufer in uravnali koncentracijo na 1 mg/ml. Produkt smo sterilno filtrirali s filtrom za brizgo ter alikvotirali v sterilne mikroepruvete.

Pegilacija cisteinskih analogov TNF-α

Cisteinskemu analogu TNF-α LK-849 smo dodali reducent DTT (10 mg DTT/ml Milli-Q vode) in 30 minut stresali raztopino na sobni temperaturi. Reducent smo nato odstranili na kolonah PD-10, ekvilibriranih z 10 mM K-fosfatnim pufrom (pH 7,2), brez NaCl. Eluat iz kolon smo ulovili v viale z že zatehtanim PEG-reagentom SUNBRIGHT® ME-120MA (NOF Corporation, Japonska) za pegilacijo z 12 kDa PEG-om in SUNBRIGHT ME-050MA (NOF Corporation, Japonska) za pegilacijo s 5 kDa PEG-om. Pegilacijsko mešanico smo takoj dobro prepihali z dušikom, neprodušno zaprli in stresali čez noč pri nizkih obratih in sobni temperaturi. Po stresanju smo raztopino nakisali s 100 mM H_3PO_4 na pH 6,5 in odvečni PEG reagent odstranili s kationsko kromatografijo na 8-ml koloni, napolnjeni s kromatografskim nosilcem TSK-GEL SP-5PW (Tosoh Bioscience, Japonska). Zbrane frakcije smo analizirali s SDS-PAGE, vezane frakcije združili in skoncentrirali. K združenim frakcijam smo dodali 5 M $(NH_4)_2SO_4$ do končne koncentracije 0,6 M ter pegiliran in nepegiliran protein ločili s hidrofobno interakcijsko kromatografijo na 8-ml koloni, polnjeni z nosilcem Macro-Prep Methyl HIC. Frakcije smo analizirali s SDS-PAGE in gele barvali z barvilom Simply Blue, ki obarva protein, in jodom, kar je specifično barvanje za PEG. Ustrezne frakcije smo združili, pomerili koncentracijo, zamenjali pufer (PBS, pH 7,4, 150 mM NaCl) in vzorec skoncentrirali do končne koncentracije nad 0,5 mg/ml. Pomerili smo še končno koncentracijo, sledilo pa je sterilno filtriranje produkta. Oznaki za pegilirana analoga sta **P5-LK849** za cisteinski analog LK-849, pegiliran s 5 kDa PEG reagentom in **P12-LK849** za cisteinski analog, pegiliran z 12 kDa PEG reagentom.

Pegilacija TNF-α (LK-800) s 5 kDa PEG-CHO reagentom

LK-800 je bil shranjen v raztopini PBS s pH 7,4 in pri koncentraciji 1 mg/ml. Pred pegilacijo smo LK-800 skoncentrirali na 6,4 mg/ml in naredili zamenjavo pufra v PBS pH 7,0. TNF-α smo pegilirali s trikratnim prebitkom 5 kDa PEG-CHO reagenta (SUNBRIGHT ME-050AL) v prisotnosti 40 mM natrijevega cianoborhidrida ($NaCNBH_3$), 16 h, pri 4 °C, brez stresanja. Pegilacijo smo prekinili z odstranitvijo reducenta na koloni PD-10. Ob tem smo zamenjali tudi pufer v 10mM Na-fosfat pH 6,0, ki omogoča vezavo pegiliranega TNF-α na kationsko kolono (SP-5PW), ki smo jo uporabili za izolacijo monopegiliranega TNF-α (ena veriga PEG na eno podenoto). Frakcije smo združili na podlagi rezultatov analize SDS-PAGE. Združenim frakcijam smo pomerili koncentracijo, zamenjali pufer (PBS, pH 7,4, 150 mM NaCl), vzorec skoncentrirali do končne koncentracije 0,959 mg/ml in sterilno filtrirali. Oznaka za TNF-α, pegiliran s 5 kDa PEG reagentom na N-koncu, je **N-LK800-5L**.

Končna analiza produkta

Končni prečiščeni LK-800 in analoge smo analizirali z metodo SDS-PAGE ob prisotnosti reducenta DTT in brez, na gelih, obarvanih z barvilom Simply blue. Z izoelektričnim fokusiranjem smo določili izoelektrično točko prečiščenega proteina. Istovetnost TNF-α smo potrdili z imunodetekcijo s primarnimi poliklonskimi kunčjimi protitelesi proti TNF-α, ki so jih pripravili na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. Kot sekundarno protitelo smo uporabili anti-kunčja IgG protitelesa, konjugirana s peroksidazo. Barvno reakcijo smo razvili s 4-kloro-1-naftolom. Rezidualne proteine bakterije *E. coli* smo zaznavali s prenosom Western s primarnimi poliklonskimi kunčjimi anti-*E. coli* protitelesi (DakoCytomation, Danska) in s sekundarnimi anti-kunčjimi IgG protitelesi, konjugiranimi z alkalno fosfatazo. Za zaznavo lis smo uporabili mešanico 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)/4-nitroblue tetrazolium (NBT), različne količine standarda proteinov bakterije *E. coli* pa smo uporabili za oceno količine proteinov *E. coli* v vzorcu. Standard proteinov *E. coli* smo pripravili iz supernatanta po soniciranju kulture *E. coli* BL21(DE3)/pET9a z obarjanjem z amonijevim sulfatom pri 100-odstotnem nasičenju.

Sledove bakterijskih endotoksinov smo izmerili z uporabo testa QCL-1000 *Limulus amebocyte* lizat (Cambrex, ZDA). Sledove bakterijske DNA smo določili s kompletom Quanti T PicoGreen dsDNA (Molecular Probes Inc., ZDA).

Zaradi večje preglednosti so v tabeli predstavljene in opisane vse uporabljene substance in njihova modifikacija s PEG reagenti (Tabela 3-1).

Tabela 3-1: **Pregled uporabljenih substanc.** C = cistein; A = alanin; E = glutamat.

oznaka substance	opis substance	velikost polietilenglikola	mesto vezave polietilenglikola
LK-800	rekombinantni TNF-α z naravnim aminokislinskim zaporedjem	/	/
LK-849	rekombinantni TNF-α z mutacijami C69A, C101A in E107C	/	/
P5-LK849	pegiliran LK-849	5 kDa linearni	uvedeni cys107
P12-LK849	pegiliran LK-849	12 kDa linearni	uvedeni cys107
N-LK800-5L	pegiliran LK-800	5 kDa linearni	N-konec

3.2 Biološka aktivnost

Merjenje citotoksične aktivnosti TNF-α (LK-800) in analogov TNF-α (LK-849, P5-LK849, P12-LK849 in N-LK800-5L) ter ocena biološke aktivnosti

Biološka aktivnost TNF-α in analogov je bila ocenjena z meritvijo citotoksične aktivnosti na celični liniji L-929 (ATCC CCL-1). Postopek je bil povzet po Flicku in Giffordu (1984). Na mikrotitrsko ploščo s 96 jamicami smo nasadili 4 x 10^4 celic v 50 µl gojišča in jih 24 ur inkubirali na 37 °C in 5-odstotnem ogljikovem dioksidu (CO_2). Zaporedne redčitve internega standarda TNF-α, ki je bil predhodno kalibriran glede na mednarodni standard NIBSC 88/786 (WHO International Standard tumour necrosis factor alpha (human, natural), NIBSC, Anglija) in preiskovanega TNF-α oziroma analogov, smo pripravili na mikrotitrski plošči v prisotnosti 2 µg/ml aktinomicina D (Actinomycin D from *Streptomyces* sp., Sigma-Aldrich, ZDA). Z redčitvenimi vrstami smo tretirali celice. Po 20-urni inkubaciji na 37 °C in 5-odstotnem CO_2 smo celicam dodali raztopino MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich, ZDA) v koncentraciji 5 mg/ml. Po treh urah smo raztopili nastale kristale formazana v dimetilsulfoksidu (DMSO, CHROMASOLV®, Sigma-Aldrich, ZDA) in pomerili absorbanco pri 570 nm. Iz izmerjenih absorbanc smo izrisali krivulje standarda in vzorca ter s pomočjo programa PLA (PLA 2.0, Stegmann Systems, Nemčija) izračunali relativni premik premic vzorca glede na standard. Učinek proteinov TNF na celice smo določili *in vitro* s primerjanjem učinka redčitvenih vrst vzorcev in standarda. Biološko aktivnost vzorca smo

določili s primerjavo standarda, vzorca in relativnega premika krivulje vzorca. Standard predstavlja 100-odstotno biološko aktivnost in izračunana biološka aktivnost za vsak vzorec je relativna glede na standard. Vsako meritev smo izvedli trikrat vzporedno in določili povprečno učinkovitost, standardni odklon (SD) in koeficient variacije (CV).

3.3 Živali

Vse poskuse smo izvajali skladno z dovoljenjem Veterinarske uprave Republike Slovenije (št. 323-02-236/2005/2 in št. 323-02-236/2005/4) in skladno z načeli Konvencije ETS 123 (Convention ETS 123) in direktive 86/609/EEC (Directive 86/609/EEC).

Za PK poskuse smo uporabili laboratorijske podgane linije wistar, ki smo jih uvozili iz firme Harlan (Harlan Italy, San Pietro al Natisone, Italija). Uporabili smo samice, stare od 10 do 13 tednov in težke od 195 g do 260 g, iz konvencionalne reje. Uporabili smo 34 podgan, od katerih jih je bilo 28 vključenih v poskus.
Toksikološko ovrednotenje smo izvedli na miših ICR (CD-1), uvoženih iz reje Harlan v Italiji. Uporabili smo samice, stare 7 tednov in težke od 25 do 35 g, iz konvencionalne reje. Skupno smo uporabili 130 miši, od katerih jih je bilo s procesom naključnega izbora 114 vključenih v poskus.
Podgane in miši so bile nastanjene v Evrocage III Ehret polikarbonatnih kletkah z individualnim prezračevanjem (IVC) ter z žagovinastim nastiljem (Lignocel ¾). Podgane z vstavljenimi jugularnimi katetri so bile nastanjene individualno, podgane brez jugularnih katetrov pa po štiri na kletko. Miši so bile nastanjene po šest, v kletki so imele dodatno plastično hišico. Svetloba in tema se je menjavala v 12-urnem ciklu, s postopnim prehodom. Temperatura prostora je bila 21 ± 3 °C, relativna vlažnost od 40 do 70 odstotkov, izmenjava zraka pa je potekala 30-krat na uro. Menjava in čiščenje kletk sta se izvajala trikrat na teden. Živali so bile hranjene po želji (ad libitum) s certificirano komercialno hrano za laboratorijske glodavce (peletirana hrana Global Diet 2018, Harlan). V 500-ml stekleničkah so imele na voljo demineralizirano vodo po želji.

3.4 Zasnova poskusa

3.4.1 PK poskusi na podganah

Vsako substanco smo testirali na štirih podganah. Aplicirali smo 50 µg substance na podgano, kar je v povprečju 220 µg na kg telesne mase. Odmerek smo določili glede na LD_{50} za TNF-α, ki je 0,7 mg/kg za podgane (Tracey in sod., 1986), in glede na objavljene podatke iz PK poskusov, kjer so aplicirali od 2 do 500 µg/kg (Ferraiolo in sod., 1989; Zahn in Greischel, 1989). V predposkusu smo podkožno (s. c.) v področje med obema lopaticama (interskapularno) aplicirali LK-800 in P12-LK849 za prvo oceno PK parametrov in biološke razpoložljivosti. V poskusu smo LK-800, LK-849, P5-LK849, P12-LK849 in N-LK800-5L aplicirali intravenozno (i. v.). I. v. aplikacija je z vidika PK modeliranja in izračuna PK parametrov najpreprostejša in najbolj zaželena, saj celotni odmerek substance vstopi v krvni obtok neposredno in naenkrat, absorpcijski proces pa poteka istočasno (Shargel in sod., 2005). Izognemo se variabilnosti zaradi lokalnega krvnega obtoka, razpada proteina na mestu injiciranja in omejitev pri absorpciji, ki lahko nastopi pri s. c. aplikaciji proteinov (Tang in Meibohm, 2006). Za izvedbo i. v. PK poskusa smo podganam predhodno kirurško vstavili permanentne jugularne katetre, v katere smo aplicirali substance. Vse substance smo aplicirali v obliki raztopine. Ob vnaprej določenih časovnih točkah smo vsaki podgani odvzeli med 0,20 in 0,25 ml krvi iz orbitalnega kapilarnega pleteža v primeru podkožne aplikacije ali iz jugularnega katetra v primeru i. v. aplikacije. Če iz katetra nikakor nismo mogli dobiti krvi, smo vzorec krvi pridobili iz orbitalnega kapilarnega pleteža.

Časovne točke smo določili za vsako substanco posebej, in sicer glede na razpolovni čas, ki smo ga pričakovali – pri nepegiliranih substancah krajši in pri pegiliranih daljši. V primeru s. c. aplikacije smo po aplikaciji LK-800 kri odvzeli po 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 in 48 urah; po aplikaciji P12-LK849 pa po 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 120, 168 in 192 urah. V primeru i. v. aplikacije smo kri po aplikaciji LK-800 odvzeli po 3, 6, 10, 15, 20, 30, 45 in 60 minutah ter po 2, 4, 8, 12 in 24 urah. Po aplikaciji LK-849 in P5-LK849 smo kri odvzeli po pol, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48, 72 in 96 urah. Po aplikaciji P12-LK849 smo kri odvzeli po pol, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 in 96 urah. In po aplikaciji N-LK800-5L smo kri odvzeli po pol, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 56 in 72 urah.

Po odvzemu zadnjega vzorca krvi smo podgane žrtvovali z izpostavitvijo CO_2. Po nastopu smrti smo iz srca odvzeli od 5 do 7 ml krvi. Opravili smo raztelesbo ter makroskopsko pregledali organe in organske sisteme. Odvzeli smo naslednje organe: srce, pljuča, timus, jetra, trebušno slinavko, vranico, ledvice, nadledvične žleze, možgane, želodec, črevesje in mezenterialne bezgavke. Stehtali smo srce, pljuča, timus, vranico, jetra, trebušno slinavko, ledvice, nadledvične žleze in možgane in po tehtanju polovico vsakega organa (razen timusa in nadledvičnih žlez) spravili v prazno epruveto, polovico pa v posodico s formalinom (Shandon Formal-Fixx^{TM}, Thermo scientific, Anglija). V formalin smo shranili tudi druge odvzete organe, vključno s timusom in nadledvičnimi žlezami.

3.4.2 Toksikološko ovrednotenje na miših

Vsako substanco smo testirali na šestih miših, ki smo jih v skupine razporedili z naključnim izborom (randomizacija z naključnim izborom) in vsako pred injiciranjem stehtali, da smo določili volumen aplicirane substance za posamezno žival (0,1 ml na 20-g miš). Mišim smo substance aplicirali na dva različna načina – enkratno i. v. v repno veno ali enkratno s. c. v interskapularno področje – in v dveh različnih odmerkih. Nižji, terapevtski, odmerek smo določili glede na objavljene poskuse, v katerih so z apliciranjem nativnega TNF-α v odmerku 480 µg/kg miši z implantiranimi tumorji dosegli regresijo tumorjev (Kus in sod., 1993; Menart in sod., 1996). Pravzaprav lahko govorimo o območju terapevtskih odmerkov, saj so Novaković in sod. (1997) z apliciranjem nativnega TNF-α v razponu od 6 do 422 µg/kg dosegli inhibicijo rasti tumorjev, vendar je bil uspeh inhibicije večji z večanjem apliciranega odmerka (Novaković in sod., 1997). Tudi Palladino in sod. (1987) so z odmerki rekombinantnega humanega TNF-α v razponu od 250 do 2500 µg/kg dosegli inhibicijo rasti Meth A sarkomov na miših. Za terapevtski odmerek smo izbrali 500 µg/kg. Ker smo želeli določiti tudi največji tolerirani odmerek (MTD), smo substanco nameravali aplicirati v desetkratniku terapevtskega odmerka, vendar pri tem nismo želeli imeti poginov. LD_{50} za rekombinantni humani TNF-α za miši je 1,5 mg/kg (Novaković in sod., 1997), za nativni (wild type) TNF-α pa 0,39 mg/kg (Shibata in sod., 2004). Vendar obstajajo tudi drugi, neobjavljeni podatki (Černe in sod., interno poročilo Lek, 2003), po katerih niti pri odmerku 10 mg/kg ni prišlo do pogina miši.

Ker pa je že ob aplikaciji nižjega odmerka (500 µg/kg) prišlo do močno izraženih kliničnih simptomov, smo se odločili, da bo desetkratnik tega odmerka vendarle previsok za miši in bo

prišlo do poginov, zato smo na novo določili terapevtski odmerek, in sicer smo prejšnjega zmanjšali na polovico, torej na 250 µg/kg, kar še vedno učinkuje na tumorje. Za višji odmerek pa smo vzeli štirikratnik tega odmerka, to je 1000 µg/kg. Odločitev se je izkazala za pravilno, saj je v skupini miši, ki so dobile visok odmerek LK-800, ena miš od šestih že prvi dan poginila.

Odmerki, ki smo jih uporabili:

- Terapevtski odmerek (takšen, ki ima vpliv na tumorje – dokazano v predhodnih poskusih): 250 µg/kg
- 10-kratnik terapevtskega odmerka: 1000 µg/kg

V poskusu, ki je trajal 14 dni, smo vsak dan spremljali in zapisovali klinične simptome, ki so jih kazale živali. Telesno temperaturo smo merili z rektalnim termometrom Physitemp (Harvard apparatus, ZDA), prvi dan aplikacije po 1.5, 3 in 5 urah, nato pa vsak dan ali pa na dva dni. Miši smo prvi teden tehtali vsak dan, nato pa na dva dni.

Živali smo na zadnji dan poskusa žrtvovali z izpostavitvijo CO_2 in opravili nekropsijo. Iz srca smo odvzeli kri za hematološke in biokemijske preiskave. Za histološko preiskavo smo odvzeli naslednje organe: srce, pljuča, vranico, pankreas, jetra, ledvice, možgane, želodec, tanko črevo, debelo črevo, slepo črevo in mezenterialne bezgavke; vse smo spravili v lončke s formalinom (Shandon Formal-Fixx^{TM}, Thermo scientific, Anglija). Pred shranjevanjem v formalinu smo stehtali srce, pljuča, timus, vranico, jetra, ledvice, trebušno slinavko in možgane.

3.5 Tehnika vstavljanja permanentnega jugularnega katetra pri podgani

Tehniko vstavljanja permanentnih vaskularnih katetrov, ki zagotavlja visok odstotek prehodnosti v obdobju, potrebnem za izvedbo PK študije, smo opisali v članku (Peternel in sod., 2009).

Priprava na operacijo

Podgani smo v trebušno votlino aplicirali anestezijsko mešanico, sestavljeno iz ketamina (Bioketan, Vetoquinol Biowet, Poljska), ksilazina (Chanazine, Chanelle Pharmaceuticals Manufactoring Ltd., Ireland) in fiziološke raztopine v razmerju 5:4:5 v/v/v (20-odstotna w/v raztopina) v odmerku 2,2 ml/kg. Podgano smo vrnili v kletko in počakali, da je anestetik začel

delovati, kar smo videli po odsotnosti senzoričnih in motoričnih refleksov. Po očeh, ki jih med anestezijo podgana ne zapre, smo jo namazali z mazilom za oko Bivacyn (Lek farmacevtska družba, d. d., Slovenija). Nato smo jo obrili na desni strani spodnjega vratnega področja in na glavi tik za ušesi na področju tilnika ter obe mesti razkužili s povidon jodidom (povidon, 3,75-odstotno jodiran, v 0,45-odstotnem NaCl). Podgano smo s hrbtom položili na ogrevano in sterilno blazinico in celotno trebušno stran podgane prekrili s sterilnim prekrivalom (Steridrape, 3M, ZDA).

Priprava jugularnih katetrov

Jugularne katetre smo pripravljali sami, in sicer smo odrezali 15 cm dolg kos silikonske cevke z notranjim premerom 0,06 cm in zunanjim premerom 0,09 cm (RenaSil™ 0,09 cm OD x 0,06 cm ID, Braintree Scientific, ZDA). En konec cevke smo prirezali pod kotom 45 ° in 3,5 cm od tega konca smo okoli cevke nanesli silikon (Tekasil, TKK, Slovenija) v obliki kroglice – silikonska bunkica. Pripravili smo tudi L-oblikovano ukrivljeno cevko (25 G, Tik kanila, Slovenija), na katero smo namestili 0,5 x 0,5 cm velik kos mrežice za intraperitonealno kirurgijo (Premilene® Mesh, Aesculap, Nemčija), ki smo jo na kovinsko cevko pritrdili s histoakrilnim lepilom (Histoacryl®, B Braun, Nemčija).

Postopek vstavljanja jugularnega katetra

Vse operacije smo izvedli s pomočjo uporabe mikrokirurškega mikroskopa OPMI Pico (Zeiss, Nemčija). En centimeter dolg vzdolžni kožni rez smo začeli tik pred desno ključnico, na mestu, kjer se križata navidezni liniji med desnim ušesom in levo pazduho ter med brado in desno pazduho. S peanom smo topo preparirali vezno in maščobno tkivo, do jugularne vene. To smo na mestu, kjer se združita zgornječeljustna (v. maxillaris) in jezično-obrazna vena (v. linguofacialis), očistili okolnega vezivnega tkiva in jugularno veno podvezali na dveh mestih – rostralno in kavdalno – s 4-0 šivalnim materialom (Silkam, Braun, Nemčija) v razdalji petih mm. Rostralni vozel smo zategnili, da smo preprečili pritekanje krvi, kavdalni vozel pa je bil le nastavljen in nezategnjen. Z iglo (25 G) smo prebodli zgornjo površino jugularne vene in vstavili silikonski kateter (RenaSil™ 0,09 cm OD x 0,06 cm ID, Braintree Scientific, ZDA) v smeri srca do silikonske bunkice. Kateter je bil povezan z 1-ml injekcijsko iglo, napolnjeno s fiziološko raztopino, in takoj po vstavljanju smo preverili, ali je kateter uspešno vstavljen, tako, da smo povlekli nekaj krvi v kateter, nato pa aplicirali 0,1 ml fiziološke raztopine v veno. Sedaj smo zategnili kavdalni vozel in nit prevezali okoli katetra, prav tako smo nit

prevezali na rostralnem koncu. Oba konca šivalnega materiala smo še povezali skupaj prek silikonske bunkice. Nato smo podgano obrnili na trebušno stran in na obritem področju zatilja na glavi napravili rez kože, dolg 5 mm, ter podkožje v okolici preparirali s peanom. Prosti del katetra, vstavljenega v jugularno veno, smo s pomočjo mandrena po podkožju speljali na dorzalno vratno stran in ga skozi kožni rez v zatilju potisnili izpod podkožja. Rezno rano na ventralnem področju vratu smo zaprli s kirurškimi sponkami (9mm AutoClips, MikRon Precision, Inc., ZDA). Na področju zatilja smo prosti del katetra odrezali in nanj pritrdili kovinsko L-oblikovano cevko z mrežico ter mrežico potisnili v podkožje. Kožo smo zašili s kirurškim šivalnim materialom (Silkam, B Braun, Nemčija). Takoj smo preverili, ali lahko v kateter povlečemo kri ter kateter sprali s heparinizirano fiziološko raztopino (50 IU heparina/ml) in nazadnje aplicirali še čepno raztopino (60-odstotni v/v glicerol v fiziološki raztopini s 500 IU heparina/ml). Na kateter smo nataknili košček CO-EX cevke (Instech Solomon, ZDA) in vrh zavarili z vročim peanom, da smo preprečili vstop zraka oz. krvavitev. Obe kirurški rani smo popršili s sprejem Bivacyn (Bivacyn: neomicin/bacitracin, Lek farmacevtska družba, d. d., Slovenija), intramuskularno pa aplicirali antibiotik Trioxyl (amoksicilin trihidrat; Univet Ltd, Irska) v odmerku 0,1 ml/kg.

Postoperativna nega

Podgano smo po operaciji vrnili v kletko in spremljali prebujanje iz anestezije. Še 24 ur je podgana ostala v topli sobi (24 ± 2 °C), nato pa smo jo vrnili v prostor z drugimi podganami, kjer je ostala do začetka poskusa. Kirurška vstavitev permanentnega jugularnega katetra je bila izvedena najmanj en teden pred aplikacijo substance. Dan ali dva pred aplikacijo smo preverili, ali so jugularni katetri prehodni.

3.6 Obdelava vzorcev in meritve

Obdelava krvi do pridobitve seruma za merjenje koncentracije substanc

Kri za določitev koncentracije substanc smo odvzeli v prazne epruvete (Microcentrifuge Tube, Brand, Nemčija), ki smo jih pustili stati na sobni temperaturi približno pol ure. Po desetminutnem centrifugiranju pri 3,6 x *g* pri sobni temperaturi smo serum prenesli v prazne epruvete, ki smo jih še enkrat centrifugirali, tokrat pet minut pri enakih pogojih. Ves serum smo nato razporedili v čiste epruvete, ki smo jih do nadaljnje analize shranili v zamrzovalniku na -75 °C.

Merjenje hematoloških parametrov

Za določitev hematoloških parametrov smo kri shranili v epruvete z antikoagulantom EDTA (Microtainer K2E, BD, ZDA), ki smo jih postavili na mešalec. Meritve smo opravili v treh urah po odvzemu na hematološkem števcu Vet ABC (ABX Diagnostics, France). Števec podaja naslednje parametre: število eritrocitov (RBC), število levkocitov (WBC), število trombocitov (PLT), koncentracijo hemoglobina, hematokrit, povprečni volumen eritrocitov (MCV), povprečno maso hemoglobina v eritrocitih (MCH) in povprečno koncentracijo hemoglobina v eritrocitih (MCHC).

Merjenje biokemijskih parametrov

Za merjenje biokemijskih parametrov smo kri shranili v epruvete brez antikoagulanta (Microcentrifuge Tube, Brand, Nemčija), ki smo jih centrifugirali 10 min na 3400 obratih. Pridobljeni serum smo odpipetirali in ga poslali na Veterinarsko fakulteto v Ljubljani, kjer so v Kliničnem laboratoriju Klinike za prežvekovalce pomerili naslednje parametre: bilirubin, natrij, kalij, klor, encime aspartat-aminotransferaza (AST), alanin-aminotransferaza (ALT), laktat-dehidrogenaza (LDH), kreatin-kinaza (CK), alkalna-fosfataza (ALP), anorganski fosfor, ureo, kreatinin, trigliceride, proteine in albumine. Meritve bilirubina so bile izvedene na biokemijskem analizatorju COBAS MIRA (Roche, Švica), druge meritve pa na biokemijskem analizatorju RX Daytona (Randox Laboratories, Anglija). Analize so bile opravljene pri delovni temperaturi 37 °C z uporabo ustreznega reagenta za določitev posameznega parametra.

Homogenizacija podganjih organov za določitev koncentracije substanc z encimskoimunskim testom (ELISA)

Za določitev koncentracije apliciranih substanc v organih je bilo treba organe homogenizirati in pridobiti čist supernatant (homogenat). Celotni postopek smo izvajali tako, da se tkivo med pripravo ni segrelo na temperaturo, višjo od +4 °C.

Pripravili smo TNF pufer (0,5 M NaCl + 2,86 mM KCl + 10,14 mM Na_2HPO_4 + 1,76 mm KH_2PO_4 + 1-odstotni goveji serumski albumin; pH 7,4) in ga ohladili na +4 °C. Stehtali smo po 100 mg zamrznjenega organa, ga razrezali na manjše koščke in jih dali v homogenizator. Dodali smo 1 ml pufra na 100 mg organa in s premikanjem vrtečega pestila gor in dol dobili homogeno mešanico organa in pufra. Homogenat smo nalili v ustrezno število epruvet, ki smo

jih centrifugirali 10 minut na 4 °C pri 10,0 rcf. Po centrifugiranju smo odpipetirali ves supernatant in ga takoj zamrznili na -75 °C.

3.7 Test ELISA – določanje koncentracije substanc v serumu in v homogenatih organov

Za potrebe določanja TNF-α in njegovih analogov v serumu (PK profili) in za določanje distribucije molekul po organih smo uporabili test ELISA. Ker je ponudnikov kompletov ELISA na trgu veliko, smo preizkusili nekaj različnih kompletov za zaznavanje TNF-α in njegovih analogov. Naša poglavitna merila pri izbiri so bili vrsta in specifičnost testa, meja zaznave občutljivost testa in navzkrižne reakcije z glodavskimi molekulami TNF-α. Tako smo iskali direktni sendvič test ELISA, v katerem se uporablja protitelesa proti humanemu TNF-α, saj je osnovna molekula, ki smo jo preiskovali, humani rekombinantni TNF-α, in iz njega so prav tako izvirali vsi analogi. Ker so poskusi potekali na podganah, nismo želeli, da bi prihajalo do navzkrižnih reakcij s podganjim TNF-α.

Preizkusili smo več sistemov ELISA za določanje koncentracije humanega TNF-α in naleteli na ovire, kot so prenizka meja zaznave, slaba afiniteta pegiliranega analoga ali pa celo sploh ni bilo odziva. Za ustreznega se je izkazal Amersham High-Sensitivity TNF-alpha, Human Biotrak Assay (GE Healthcare, Anglija), ki smo ga uporabljali za večino nadaljnjih meritev. Ker se je zgodilo, da komplet občasno ni bil dobavljiv, smo uporabili tudi nekomercialno, v našem laboratoriju sestavljeno sendvič ELISO. Za primarna prekrivna protitelesa smo uporabili monoklonska humana protitelesa proti TNF-α (anti-human TNF-α antibody, R&D, MAB610), kot zaznavno protitelo pa smo uporabili biotinilirano humano protitelo proti TNF-α (biotinylated anti-human TNF-α antibody, R&D, BAF210). Izvedli smo primerjavo obeh ELIS in ugotovili, da sta obe zelo točni (vse meritve so bile v okviru 10-odstotne napake) in dajeta primerljive rezultate (koeficient variacije 6,5 %).

Za vsak test smo pripravili standardno krivuljo – za merjenje koncentracij TNF-α v serumu smo uporabili standardni hu-TNF-α (del kompleta ELISA), za merjenje koncentracij TNF-α analogov pa smo uporabili ustrezen analog, ki smo ga redčili v diluentu za standard. Z znanimi koncentracijami standarda ali ustreznega analoga smo pripravili serijske razredčine. Preiskovane vzorce seruma smo ustrezno razredčili ter jih hkrati z redčitvami standarda nanesli na mikrotitrsko ploščo. Po inkubaciji je sledilo izpiranje, nato pa nanos biotiniliranih protiteles, čemur je sledila ponovna inkubacija ter drugo izpiranje. Nanesli smo Amdex

raztopino za ojačitev signala, inkubirali in izprali ter dodali raztopino substrata. Reakcijo smo po zadnjem inkubiranju končali z dodatkom zaustavitvene raztopine (H_2SO_4) in odčitali absorbanco s čitalnikom mikrotitrskih ploščic BIO-TEK (Synergy HT, Multi-Detection Microplate Reader) pri 450 nm. Z različnimi razredčitvami standarda smo dobili standardno krivuljo. Rezultati vsebnosti substance v serumu so podani kot optična gostota (OD), iz česar smo s pomočjo standardne krivulje preračunali dejanske koncentracije substanc v serumu (ng proteina/ml seruma).

V primeru merjenja koncentracij v homogenatih organov smo za standard uporabili TNF-α ali ustrezen analog, razredčen v diluentu z 10-odstotnim dodatkom ustreznega homogenata kontrolnega organa. Pripravili smo serijske razredčine in test izvedli po enakem postopku kot za določevanje koncentracije v serumskih vzorcih. Rezultati vsebnosti substance v homogenatu organa so podani kot optična gostota, iz česar smo s pomočjo standardne krivulje preračunali dejanske koncentracije substanc v homogenatih organov (ng proteina/ml homogenata).

3.8 PK analiza podatkov

- **Neprostorska PK analiza**

Individualni plazemski koncentracijski profili so bili analizirani s programskim orodjem WinNonlin (WinNonlin software, Version 2.1, Pharsight Corp., USA). Hitrostna konstanta terminalne faze (λ_z) je bila izračunana kot terminalni naklon na semi-logaritemskem diagramu s pomočjo linearne regresije. Število točk, vključenih v izračun, je bilo tako, da smo dobili največji popravljeni R^2. Uporabljeni sta bili najmanj dve točki. Terminalni razpolovni čas je bil določen z deljenjem naravnega logaritma 2 (ln2) z λ_z. Površina pod krivuljo odvisnosti plazemske koncentracije od časa nič do zadnje merljive koncentracije (AUC_{last}) je bila izračunana po linearni trapezoidalni metodi. Koncentracija ob času nič (C^0) je bila izračunana z ekstrapolacijo logaritmiranih vrednosti prvih dveh izmerjenih koncentracij (C_1 in C_2) na čas nič. Če je bil C_2 večji kot C_1, je bila za C^0 privzeta vrednost C_1. Površina pod krivuljo odvisnosti plazemske koncentracije od časa na intervalu nič do neskončno (AUC_{inf}) je bila izračunana z ekstrapolacijo (seštevanje C_{last}/λ_z in AUC_{last}). Izračunani so bili tudi deleži ekstrapoliranega dela površine od C_{last} do neskončnosti (AUC_{Extrap}) in območje od C^0 do C_1

($AUC_{Back\ Extrap}$). Celokupni plazemski očistek (CL), volumen distribucije, temelječ na terminalni fazi (V_z), volumen distribucije v stacionarnem stanju (V_{ss}) in srednji čas zadrževanja (MRT), so bili določeni s standardnimi algoritmi za neprostorsko PK analizo.

- **Populacijska PK analiza**

Populacijska PK analiza je bila izvedena s pomočjo programskega orodja NONMEM (Version VI, level 2, GloboMax LLC, USA) in Perl speaks NONMEM (Version 2.3.0, http://psn.sourceforge.net). Za oceno parametrov modela je bila uporabljena aproksimacijska metoda FOCE. Za analizo sta bila uporabljena enoprostorni in dvoprostorni PK model z eliminacijo prvega reda (ADVAN1/TRANS2 in ADVAN3/TRANS4 rutini PREDPP podprograma NONMEM za i. v. aplikacijo, in ADVAN2/TRANS2 in ADVAN4/TRANS4 za s. c. aplikacijo). Za substance, pri katerih smo imeli na voljo rezultate meritev plazemskih profilov po i. v. in subkutani (s. c.) aplikaciji, smo parametre modela ocenjevali simultano s prileganjem modela podatkom po i. v. in s. c. aplikaciji in ocenjevali obseg absorpcije po s. c. aplikaciji (F). Interindividualne variabilnosti (ω^2) nismo ocenjevali. Rezidualno variabilnost (σ^2) smo opisali s proporcionalnim, aditivnim in kombiniranim modelom napake. Pri razvoju modelov smo upoštevali načelo parsimonije in kot končni model za posamezno substanco izbrali model z minimalnim številom strukturnih parametrov in parametrov variabilnosti, ki je ustrezno opisal podatke. Ustreznost modelov je bila ocenjena s standardnimi diagnostičnimi diagrami (odvisnost napovedanih od izmerjenih koncentracij in odvisnost uteženih rezidualov od izmerjenih koncentracij in časa). Dodatna merila za vrednotenje modelov so bila konvergenca minimizacijskega algoritma, število značilnih mest (>3), izračun kovariance in gradienti v zadnjem koraku optimizacije parametrov (med 10^{-3} in 10^2). Alternativne modele smo med seboj primerjali glede na znižanje vrednosti objektivne funkcije, katere gostota porazdelitve je podobna χ^2 (test razmerja verjetja). Merilo za izbor najustreznejšega modela je bil test razmerja verjetja, ki smo ga izvedli tako, da smo primerjali razliko minimalnih vrednosti objektivne funkcije (ΔOBJ) z vrednostjo 3,84 za en dodatni parameter modela, kar smo privzeli kot statistično pomembno ($p<0,05$). Ker smo modele uporabili zgolj za opisne namene, napovedovanja modelov nismo vrednotili.

3.9 Priprava organov za histološke analize

Fiksirane organe smo oblikovali na ustrezno velikost in jih z aparatom Hypercenter XP Shandon (Thermo Scientific, ZDA) dehidrirali, razmastili in prepojili s paraplastom (Bio-Plast Extra, Bio-Optica, Italija). Z aparatom Histocentre 2 Shandon (Thermo Scientific, ZDA) smo pripravili parafinske bloke z organi, ki smo jih z drsnim mikrotomom (model SM2000 R, Leica, Nemčija) rezali na 4 µm debele rezine in jih prenesli na z adhezivom premazana predmetna stekla. Ta smo v aparatu Varistan 24-4 Shandon (Thermo Scientific, ZDA) pobarvali po metodi hematoksilin in eozin (HE).

Predmetna stekla z rezinami jeter smo pobarvali posebej po metodi Oil-red-O s 60-odstotnim izpropilnim alkoholom in barvilom Oil-red-O, diferencirali s 60-odstotnim izopropanolom in spirali z destilirano vodo ter kontrastirali z Mayerjevim hematoksilinom.

Po končanem barvanju smo na preparate kanili nekaj kapljic kanadskega balzama (Shandon Xylene Substitute Mountant, Thermo Scientific, ZDA) in jih pokrili s čistim pokrovnim stekelcem.

Histološke preparate smo pregledali s pomočjo mikroskopa Olympus BX-51, kamere Olympus DP-12 in programske opreme Olympus DP-Soft BX-51 (vse Olympus, Nemčija).

3.10 Statistična obdelava podatkov

Podatki *in vitro* specifičnih citotoksičnosti, serumskih koncentracij substanc v PK poskusih ter parametri hematoloških in biokemijskih preiskav v toksikoloških poskusih so podani kot povprečje ± standardni odklon. Izračunani so bili s pomočjo programa Microsoft Excel (Microsoft Corporation, ZDA).

Podatki za koncentracije substanc v organih v PK poskusih in za gibanje telesne temperature v toksikoloških poskusih so podani kot povprečje ± standardna napaka. Izračunani so bili s programom GraphPad Prism (GraphPad Prism version 4.02 for Windows, GraphPad Software, ZDA).

Za testiranje razlik med skupinami v toksikoloških poskusih smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA) in Dunnettov post test, za testiranje razlik v hematoloških parametrih pri podganah na koncu PK poskusov pa enosmerno ANOVO in Bonferronijev post test (program

Graph Pad Prism version 4.02 for Windows, Graph Pad Software, ZDA). Rezultate smo opredelili kot statistično značilne pri $p < 0,05$.

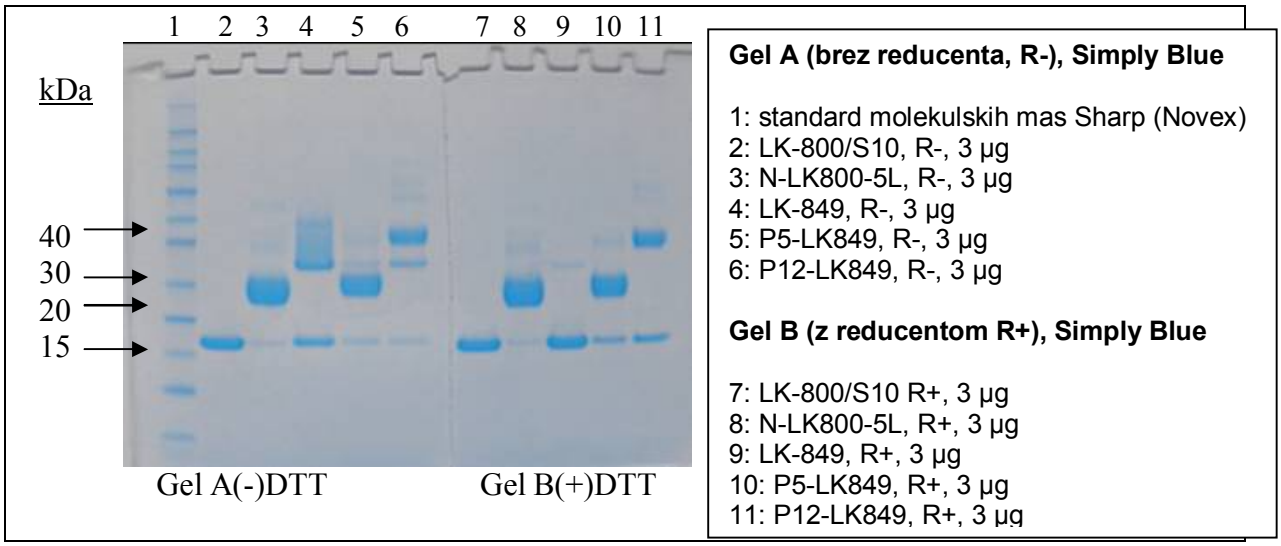
Za prikaz sprememb v gibanju telesne temperature v toksikoloških poskusih smo uporabili linearni regresijski model ($y=kx+n$), kjer je y merjeni parameter (temperatura), k je naklon, x je logaritem časovnih točk in n je vrednost y ob času nič. Razlike smo primerjali z enosmerno ANOVO in Dunnettovim post testom. Rezultate smo opredelili kot statistično značilne pri $p < 0,05$.

Za neprostorsko in populacijsko PK analizo smo uporabili programsko orodje WinNonlin (WinNonlin software, Version 2.1, Pharsight Corp., USA) in NONMEM (Version VI, level 2, GloboMax LLC, USA) in Perl speaks NONMEM (Version 2.3.0, http://psn.sourceforge.net). Podrobnejši opis PK analiz je podan v poglavju 3.3.

4 REZULTATI

4.1 Priprava in analiza substanc

Vse proteine in njihove konjugirane oblike smo po zadnji stopnji priprave analizirali z metodo SDS-PAGE na gelu z reducentom DTT in na gelu brez reducenta (Slika 4-1).



Slika 4-1: Gel SDS-PAGE s substancami, ki smo jih uporabili v nadaljnjih poskusih.

Na gelu brez prisotnosti reducenta (gel A) je za LK-800 prisotna lisa na mestu 17 kDa, kar je velikost ene podenote TNF-α. Pri analogu LK-849 se vidita dve lisi – ena na mestu 17 kDa, druga, nekoliko bolj razpotegnjena lisa, pa se začne na višini 34 kDa, kar najverjetneje pomeni povezavo dveh podenot (17 kDa + 17 kDa). Preostali del te lise pa predstavlja drugačne vrste povezav (verjetno tri ali štiri podenote), vendar je teh manjši delež. Pegilirani TNF-α (N-LK800-5L) oz. pegilirani analog LK-849 (P5-LK849 in P12-LK849) imajo zaradi PEG-a lise postavljene višje.

Ob dodatku reducenta (gel B) nastane redukcija disulfidne vezi in analog LK-849, ki je bil povezan z disulfidnimi vezmi, je zdaj na pričakovani višini 17 kDa. Pegilirani TNF-α (N-LK800-5L) oz. pegilirani analog LK-849 (P5-LK849 in P12-LK849) tudi po dodatku reducenta na gelu SDS-PAGE kažejo liso na prvotnem mestu, saj reducent ne odcepi PEG verige s proteina.

Pri pegiliranem analogu P12-LK849 pa se na gelu A (brez reducenta) vseeno vidi lisa, ki pripada dimerno povezanima podenotama analoga LK-849, po dodatku reducenta pa se lisa pojavi na mestu, kjer sicer vidimo TNF-α. To pomeni, da v tem primeru vse molekule oz. vse podenote molekule niso bile pegilirane. Podoben pojav smo opazili tudi pri pegiliranem analogu P5-LK849, vendar je delež nepegiliranega analoga oz. njegovih podenot manjši.

Iz meritev citotoksične aktivnosti na celični liniji L-929 smo ocenili biološko aktivnost preiskovanih substanc. Metoda je normirana na rekombinantni TNF-α, ki ima 100-odstotno biološko aktivnost, biološke aktivnosti preostalih substanc pa so relativne glede na TNF-α (Tabela 4-1). Pri cisteinskem analogu LK-849 je ta padla na tretjino (33 %), pri pegiliranih analogih pa še nižje – na 3 % za N-LK800-5L ter pod 1 % za P5-LK849 in P12-LK849.

Tabela 4-1: **Pregled povprečne relativne *in vitro* specifične citotoksičnosti; SD = standardni odklon; CV = koeficient variacije.**

substanca	**povprečna relativna *in vitro* citotoksičnost**	**SD (%)**	**CV (%)**
LK-800	100 %	-	-
LK-849	31,60 %	1,91	6,04
P12-LK849	0,71 %	0,10	14,34
P5-LK849	0,30 %	0,05	17,76
N-LK800-5L	3,03 %	0,31	10,18

4.2 PK poskus na podganah

4.2.1 Potek PK poskusov na podganah

Za faramakokinetični del poskusa smo uporabili wistar podgane. Ob aplikaciji in v času jemanja krvnih vzorcev za PK analizo smo opazovali tudi klinične znake, ki so povzeti v tabeli (Tabela 4-2). Omenjeni simptomi so se pojavili uro po aplikaciji in so trajali ves prvi dan, naslednji dan pa so izzveneli.

Tabela 4-2: **Pregled kliničnih znakov, ki so se pojavili na dan aplikacije substanc.**

nepegilirane substance	**pegilirane substance**
LK-800, LK-849	**P5-LK849, P12-LK849, N-LK800-5L**
• piloerekcija • sedacija • padec rektalne temperature • krvavi/rjavkast izcedek iz anusa (ne pri vseh živalih) • serozni izcedek iz oči (ne pri vseh živalih)	• piloerekcija (samo pri skupini N-LK800-5L)

4.2.2 Izmerjene koncentracije v serumu

Izmerjene koncentracije substanc v serumu po s. c. in i. v. aplikaciji so prikazane v tabelah (Tabela 4-3 in **Tabela 4-4**). Iz tabel je razvidno, koliko časa je trajal posamezni poskus (čas v urah).

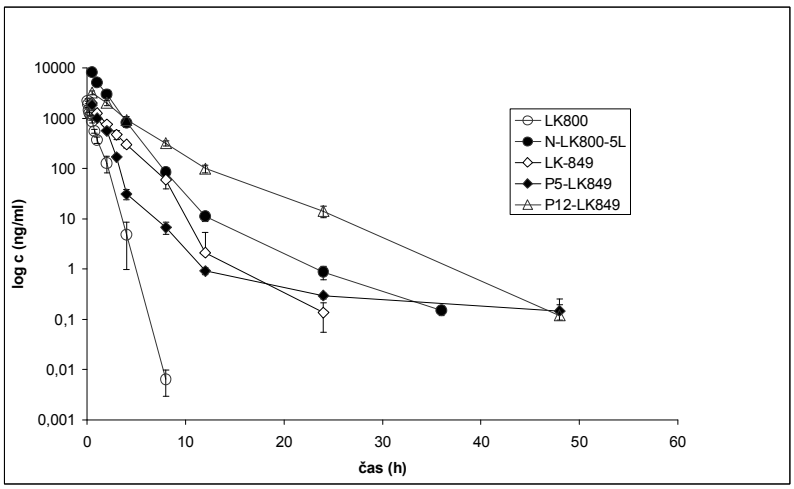
Tabela 4-3: **Izmerjene koncentracije substance v serumu po enkratni s. c. aplikaciji.** $\bar{x}$ = povprečje koncentracij za posamezno substanco, CV = koeficient variacije; LOQ = koncentracija pod mejo kvantifikacije.

čas (h)	**LK-800**	**P12-LK849**
	$\bar{x}$ (ng/ml) ± CV (%)	**$\bar{x}$ (ng/ml) ± CV (%)**
1	23,57 ± 54,31	-
2	26,97 ± 38,20	25,60 ± 83,48
4	3,63 ± 92,57	37,09 ± 74,73
6	0,599 ± 108,74	-
8	0,179 ± 132,62	18,84 ± 61,03
12	0,006 ± 54,59	23,19 ± 34,68
24	LOQ	9,28 ± 25,76
48	LOQ	0,871 ± 22,09
72	-	0,366 ± 16,77
120	-	LOQ
168	-	LOQ
192	-	LOQ

Tabela 4-4: **Izmerjene koncentracije substanc v serumu po enkratni i. v. aplikaciji.** $\bar{x}$ = povprečje koncentracij za posamezno substanco, CV = koeficient variacije; LOQ = koncentracija pod mejo kvantifikacije.

čas (h)	LK-800	LK-849	P5-LK849	P12-LK849	N-LK800-5L
	$\bar{x}$ (ng/ml) ± CV (%)	$\bar{x}$ (ng/ml) ± CV (%)	$\bar{x}$ (ng/ml) ± CV (%)	$\bar{x}$ (ng/ml) ± CV (%)	$\bar{x}$ (ng/ml) ± CV (%)
0,05	2228,5 ± 11,36	-	-	-	-
0,1	1905,7±15,42	-	-	-	-
0,167	1467,2 ± 10,76	-	-	-	-
0,25	1268,7 ± 10,86	-	-	-	-
0,333	1140,9 ± 1,82	-	-	-	-
0,5	872,1 ± 7,08	2027,6 ± 6,61	1841,2 ± 5,42	3218,4 ± 9,53	8265,0 ± 11,24
0,75	553,7± 9,47	-	-	-	-
1	369,5 ± 13,86	1267,6 ± 11,28	993,8 ± 4,15	-	5144,2 ± 12,57
2	127,5 ± 36,35	757,3 ± 7,02	564,7 ± 4,33	2028,1 ± 11,39	3023,2 ± 17,80
3	-	469,0 ± 19,76	170,0 ± 11,23	-	-
4	4,84 ± 79,65	299,6 ± 13,13	31,0 ± 21,66	932,2 ± 15,48	826,2 ± 21,46
8	0,006 ± 54,43	59,8 ± 33,48	6,71 ± 27,22	317,1 ± 11,52	84,7 ± 22,16
12	LOQ	2,103 ± 152,99	0,92 ± 16,49	100,1 ± 16,85	11,21 ± 22,18
24	LOQ	0,135 ± 59,40	0,294 ± 13,62	14,17 ± 25,06	0,88 ± 30,05
36	-	-	-	-	0,151 ± 21,00
48	-	LOQ	0,146 ± 33,09	0,120 ± 109,58	LOQ
56	-	-	-	-	LOQ
72	-	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ
96	-	LOQ	LOQ	LOQ	-

Skupni prikaz časovnega poteka serumskih koncentracij za vse i. v. aplicirane substance (Slika 4-2).



Slika 4-2: Časovni potek serumskih koncentracij za vse intravenozno aplicirane substance. Podatki so prikazani kot povprečje ± standardni odklon.

4.2.3 Neprostorska PK analiza

Z eksperimentalnimi podatki iz PK poskusov na podganah smo izvedli neprostorsko PK analizo. Za izračun terminalnega naklona krivulje smo uporabili najmanj tri točke. Najkrajši razpolovni čas smo izračunali pri LK-800 (najdaljšega pa pri cisteinskem analogu, ki je bil pegiliran s 5 kDa PEG-om. Očistek je bil največji pri LK-800, pri vseh preostalih apliciranih substancah pa manjši. Volumen distribucije je bil največji pri LK-800, manjši pri LK-849 in P12-LK849 ter približno enak pri P5-LK849 in N-LK800-5L.

Tabela 4-5: **Skupni rezultati neprostorske farmakokinetične analize za i. v. aplikacijo, prikazani kot povprečje za posamezno substanco.** Število λ_z točk = število točk, vključenih v izračun terminalne faze; $\lambda_{z\ spodnja}$ = spodnja točka hitrostne konstante; $\lambda_{z\ zgornja}$ = zgornja točka hitrostne konstante; AUClast = površina pod krivuljo od časa nič do zadnje merljive koncentracije; λ_z = hitrostna konstanta terminalne faze; $t_{1/2}$ = terminalni razpolovni čas; AUC_{inf} = površina pod krivuljo od časa nič do neskončno; Extrap = delež ekstrapoliranega dela površine od C_{last} do neskončnosti; Back Extrap = delež ekstrapoliranega dela površine od C^0 do C_1; Vz = volumen distribucije terminalne faze; CL = plazemski očistek; MRT = srednji čas zadrževanja; Vss = volumen distribucije v stacionarnem stanju.

Parameter	LK-800	LK-849	N-LK800-5L	P5-LK849	P12-LK849
število λ_z točk	4,5	7,3	3	3	4,5
$\lambda_{z\ spodnja}$	1,23	0,63	12	12	6,00
$\lambda_{z\ zgornja}$	6,5	18,0	36	24	48
AUClast (ng h/ml)	1357,4	5008,0	18765,1	3370,2	12829,4
λ_z (h^{-1})	1,4496	0,5532	0,1795	0,0950	0,2040
$t_{1/2}$ (h)	0,52	1,33	3,88	7,36	3,45
AUC_{inf} (ng h/ml)	1409,7	5008,5	18765,1	3373,3	12830,0
Extrap (%)	3,5	0,009	0,0046	39,0	0,0049
Back Extrap (%)	8,8	26,5	28,8	157,56	13,6
Vz (ml)	26,31	19,25	15,13	14,80	19,41
CL (ml/h)	35,7	10,1	2,7	14,8	3,9
MRT (h)	0,727	1,89	1,54	1,07	3,57
Vss (ml)	25,70	18,87	4,14	15,89	14,00

4.2.4 Populacijska PK analiza

Rezultati populacijske PK analize združenih podatkov za koncentracije so pokazali, da farmakokinetiko LK-800 in LK-849 najbolje opisuje enoprostorni PK model, farmakokinetiko vseh treh pegiliranih substanc (P5-LK849, P12-LK849 in N-LK800-5L) pa najbolje opisuje dvoprostorni PK model. Kombinirani model napake, ki vsebuje tako proporcionalno kot

aditivno napako, je bil uporabljen za rezidualno variabilnost LK-849, medtem ko je za preostale substance (LK800, P5-LK849, P12-LK849 in N-LK849-5L) ustrezal proporcionalni model napake. Rezultati populacijskih PK analiz so prikazani v tabeli (Tabela 4-6).

Tabela 4-6: **Skupni rezultati populacijske farmakokinetične analize. Podatki so podani kot povprečje ± standardna napaka (%). $t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$ in V_{ss} so izračunani po formulah* glede na druge izračunane podatke, zato nimajo podanih standardnih napak.** CL = očistek; V_1 = volumen (pri enoprostornem modelu) in volumen centralnega prostora (pri dvoprostornem modelu); V_2 = volumen perifernega prostora (pri dvoprostornem modelu); Q = distribucijski očistek (pri dvoprostornem modelu); F = biološka razpoložljivost (samo pri substancah, ki so bile aplicirane i. v. in s. c.); Ka = hitrostna konstanta absorpcije (samo pri substancah, ki so bile aplicirane i. v. in s. c.); $t_{1/2\alpha}$ = razpolovni čas v fazi α (pri dvoprostornem modelu); $t_{1/2\beta}$ = razpolovni čas v fazi β (pri dvoprostornem modelu); Vss = volumen distribucije v stacionarnem stanju; σ_1 = proporcionalni del rezidualne variabilnosti; σ_2 = aditivni del rezidualne variabilnosti.

Parameter	**LK800**	**LK-849**	**N-LK800-5L**	**P5-LK849**	**P12-LK849**
Model	enoprostorni	enoprostorni	dvoprostorni	dvoprostorni	dvoprostorni
CL (ml/h)	42,9 ± 6,9	12,1 ± 6,0	2,97 ± 5,2	18,1 ± 1,5	4,61 ± 6,8
V_1 (ml)	28,4 ± 5,8	25,8 ± 3,8	4,88 ± 5,7	23,6 ± 15,4	11,4 ± 15,4
V_2 (ml)	/	/	0,134 ± 14,9	1,5 ± 17,4	4,31 ± 17,4
Q (ml/h)	/	/	0,0193 ± 20,9	0,122 ± 31,1	1,1 ± 31,1
F (%)	6,73 ± 17,1	/	/	/	6,16 ± 23,7
Ka (1/h)	0,813 ± 5,8	/	/	/	0,0789 ± 4,6
$t_{1/2\alpha}$ (h)	/	/	1,13	0,90	1,20
$t_{1/2\beta}$ (h)	0,46	1,48	4,85	8,59	3,88
Vss (ml)	28,4	25,8	5,0	25,1	15,7
σ_1 (%)	48,6 ± 18,8	38,9 ± 7,0	18,6 ± 7,1	32,6 ± 1,9	47,8 ± 10,4
σ_2 (ng/ml)	/	0,124 ± 37,5	/	/	/

* formule za izračun $t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$ in Vss:

$$t_{1/2\alpha} = \frac{\ln(2)}{\frac{(k_{10}+k_{12}+k_{21})+\sqrt{(k_{10}+k_{12}+k_{21})^2-4k_{10}k_{21}}}{2}} \quad \text{(za dvoprostorne modele)}$$

$$t_{1/2\beta} = \frac{\ln(2)}{Cl/V_1} \quad \text{(za enoprostorne modele)}$$

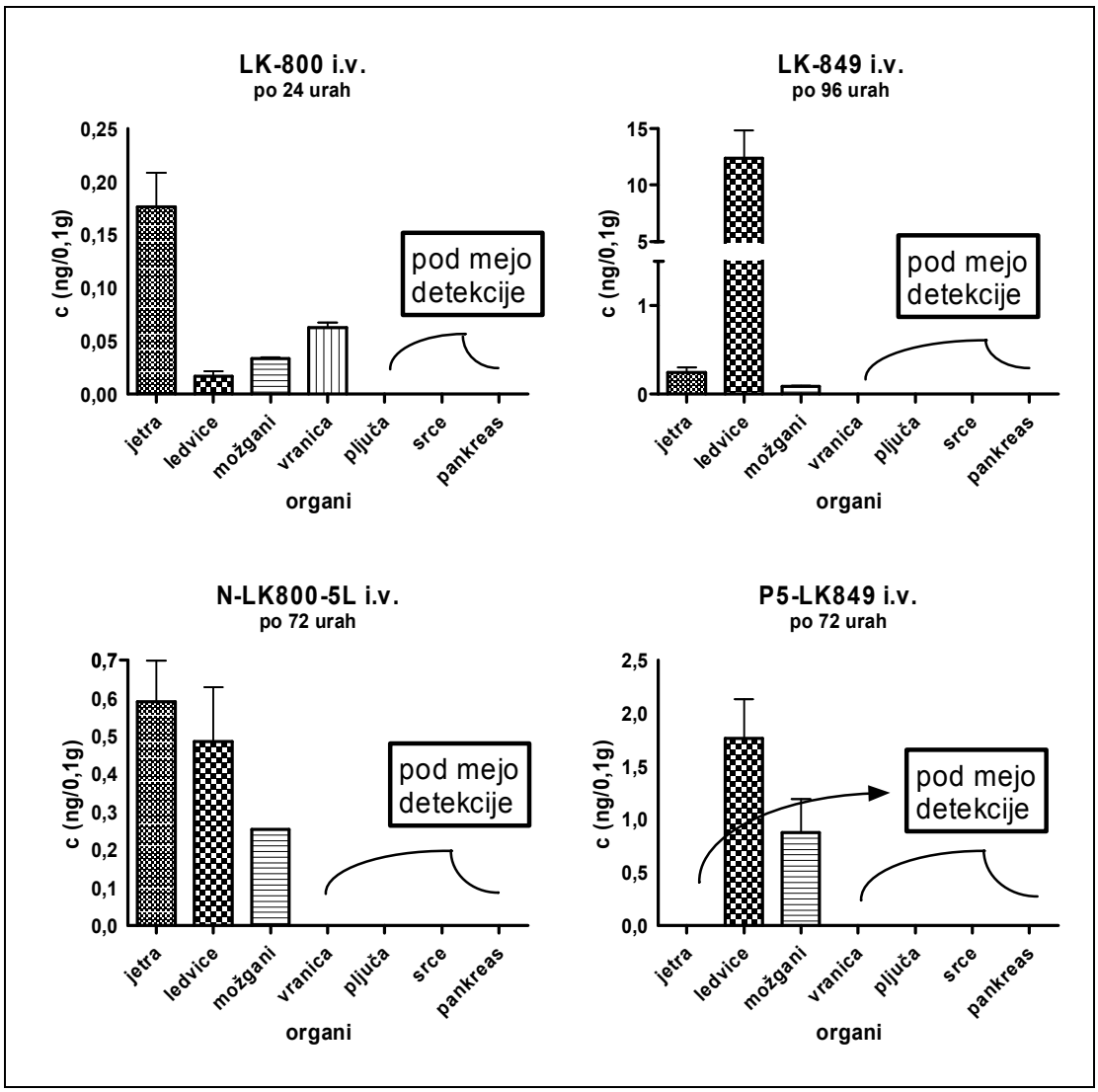
$$t_{1/2\beta} = \frac{\ln(2)}{\frac{(k_{10}+k_{12}+k_{21})-\sqrt{(k_{10}+k_{12}+k_{21})^2-4k_{10}k_{21}}}{2}} \quad \text{(za dvoprostorne modele)}$$

($k_{10} = CL/V_1$; $k_{12} = Q/V_1$; $k_{21} = Q/V_2$)

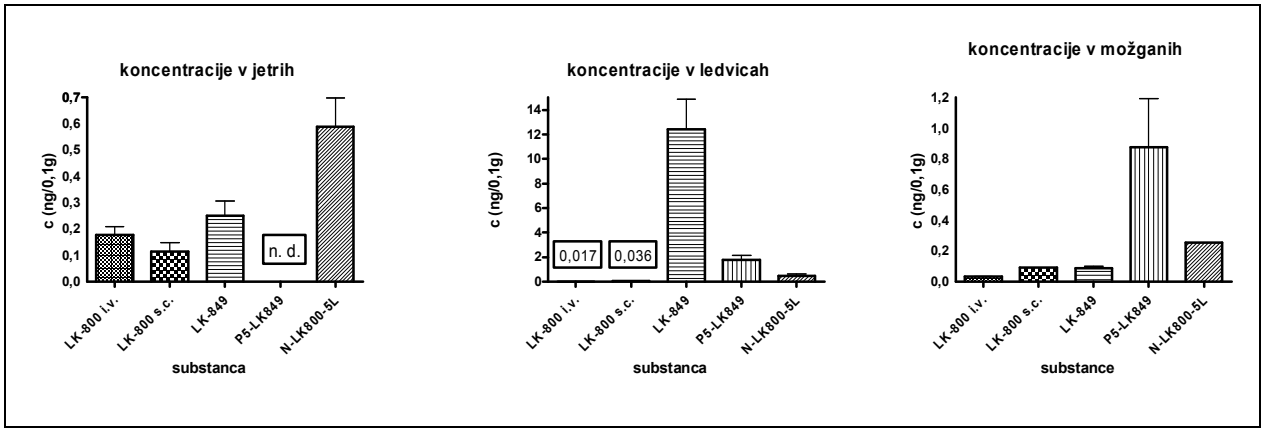
$V_{ss} = V_1 + V_2$

4.2.5 Distribucija po organih

Na grafih (Slika 4-3 in Slika 4-4) so predstavljene koncentracije substanc (LK-800, LK-849, P5-LK849 in N-LK800-5L), ki smo jih izmerili s testom ELISA po homogenizaciji organov. Koncentracije so predstavljene kot distribucija po organih glede na substanco (Slika 4-3) in kot primerjava distribucije različnih substanc po posameznem organu (Slika 4-4). Organi posameznih skupin so bili odvzeti ob različnih časih – ure so razvidne iz slike (Slika 4-3), ker smo vsak poskus končali takrat, ko smo pričakovali padec serumske koncentracije substance pod mejo zaznave.



Slika 4-3: Distribucija substance po organih glede na posamezno substanco. Vsaka vrednost je predstavljena kot povprečje + standardna napaka.



Slika 4-4: Primerjava distribucije substanc po posameznem organu. Vsaka vrednost je predstavljena kot povprečje + standardna napaka. n. d. = pod mejo zaznave.

4.2.6 Hematologija in teže organov

Hematologija

Na koncu poskusa smo podganam ob žrtvovanju odvzeli kri za hematološke preiskave (Tabela 4-7). Podgane, ki so dobile LK-800, LK-849, P5-LK849 in N-LK800-5L, so imele število eritrocitov, koncentracijo hemoglobina in hematokrit nekoliko pod spodnjo fiziološko mejo (Kohn in Clifford, 2002). Pri teh skupinah smo ugotovili statistično značilno znižanje števila eritrocitov, koncentracije hemoglobina in hematokrit, ko smo skupine med seboj primerjali s testom ANOVA in Bonferronijevim post testom. Število trombocitov pri skupini, ki je dobila LK-800, je bilo statistično značilno znižano, vendar vseeno v fizioloških mejah.

Tabela 4-7: **Rezultati hematoloških preiskav pri podganah na koncu poskusa. Podatki so podani kot povprečje ± SD. Enosmerna ANOVA in Bonferronijev post test, *p < 0.05 glede na druge skupine.** WBC = število levkocitov; RBC = število eritrocitov; HGB = koncentracija hemoglobina; HCT = hematokrit; PLT = število trombocitov.

skupine	WBC ($x10^9$/L)	RBC(10^{12}/L)	HGB (g/L)	HCT (L/L)	PLT(10^9/L)
LK-800	8,1 ± 1,0	4,32 ± 0,26*	86 ± 3*	0,246 ± 0,010*	438 ± 82*
LK-849	8,0 ± 2,8	4,88 ± 0,40*	102 ± 6*	0,299 ± 0,018*	824 ± 160
P5-LK849	10,5 ± 0,7	4,35 ± 0,48*	97 ± 10*	0,264 ± 0,033*	847 ± 65
N-LK800-5L	9,2 ± 0,8	4,50 ± 0,24*	93 ± 6*	0,265 ± 0,020*	917 ± 20
P12-LK849	5,6 ± 1,0	6,41 ± 1,50	131 ± 36	0,380 ± 0,093	1000 ± 112
referenčne vrednosti (Kohn in Clifford, 2002)	3,0 – 15,0	5,00 – 12,00	111 - 180	0,360 – 0,520	140 - 1000

Teže organov

Po makroskopskem pregledu smo stehtali organe (srce, pljuča, jetra, ledvice, trebušno slinavko, vranico in možgane). Povprečna teža vranic skupine podgan, ki je prejela LK-849, je bila statistično značilno višja glede na teže vranic drugih skupin ($p < 0,05$ glede na druge skupine; enosmerna ANOVA in Bonferronijev post test) in je odstopala tudi glede na fiziološke vrednosti (Lewi in Marsboom, 1981; Tucker, 1997). V težah drugih organov ni bilo značilnih razlik med skupinami, teža vseh organov je bila znotraj fizioloških meja (Lewi in Marsboom, 1981; Tucker, 1997).

4.2.7 Makroskopska in histološka preiskava organov

Makroskopska preiskava

LK-800 (i. v. aplikacija)

Ena podgana je poginila med poskusom, in sicer 3 ure po aplikaciji. Ob sekciji so bili organi brez makroskopskih posebnosti. Preostale tri podgane iz te skupine so bile žrtvovane po 24 urah. Pri eni od žrtvovanih podgan smo na pars rektumu kolona opazili tri krožne prstanaste krvavitve v sluznici, dolžine 4–5 mm, svetlo rdeče barve, uleknjene in brez leska (Slika 4-5, a).

LK-800 (s. c. aplikacija)

Vsi organi so bili pri vseh živalih makroskopsko brez posebnosti.

LK-849 (i. v. aplikacija)

Pri treh živalih smo opazili zmerno povečano vranico. Pri eni podgani sta bili na meji prehoda slepega v debelo črevo dve vzdolžni sivi področji z videzom sanirane erozije, velikosti 5 x 2 mm. Druge živali in drugi pregledani organi so bili makroskopsko brez posebnosti (Slika 4-5, b).

P12-LK849 (i. v. in s. c. aplikacija)

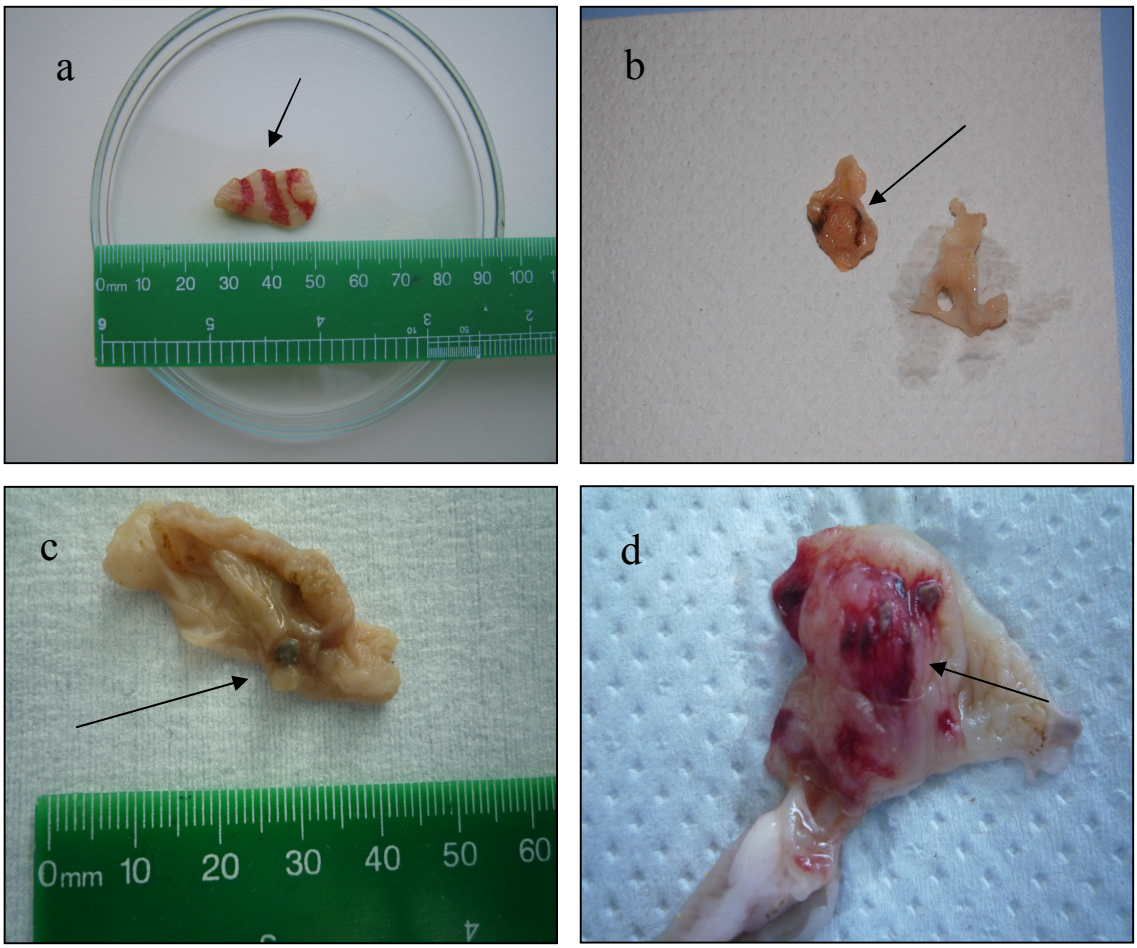
Vsi organi so bili pri vseh živalih makroskopsko brez posebnosti.

P5-LK849 (i. v. aplikacija)

Vsi organi so bili pri vseh živalih makroskopsko brez posebnosti.

N-LK800-5L (i. v. aplikacija)

Pri treh podganah smo na slepem črevesju opazili omejeno sivkasto območje s premerom 3 mm, ki je bilo rahlo izbočeno. Sprememba je dajala videz z vezivom sanirane erozije (Slika 4-5, c). Pri eni živali smo na slepem črevesu opazili hemoragično steno v velikosti 5 x 7 mm in krvavitve po sluznici. Na področju krvavitve je bila sluznica erodirana, rob med spremembo in okolico pa rahlo dvignjen (Slika 4-5, d). Drugi organi so bili brez posebnosti.

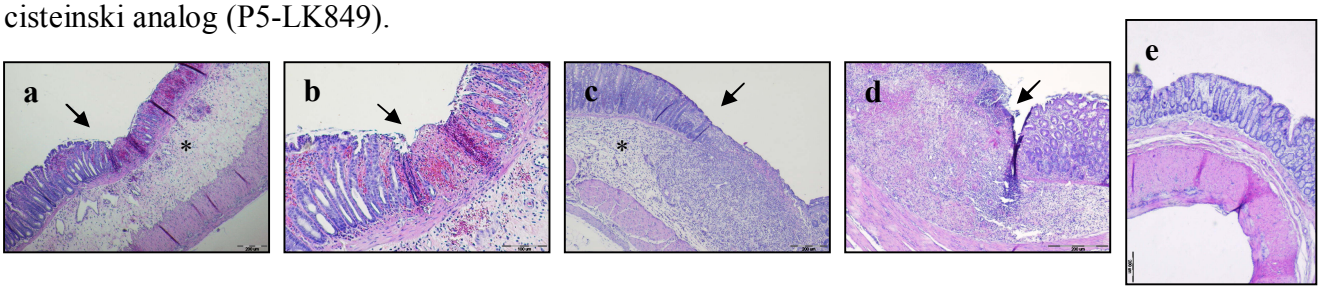


Slika 4-5: Fotografije sprememb na sluznici kolona in slepega črevesa podgan.
a- 24 ur po i. v. aplikaciji LK-800; krožne prstanaste krvavitve v sluznici kolona (puščica). **b-** 96 ur po i. v. aplikaciji LK-849; siva trakasta sprememba na sluznici slepega črevesa (puščica). **c-** 72 ur po i. v. aplikaciji N-LK800-5L; omejena sprememba na sluznici slepega črevesa (puščica). **d-** 72 ur po i. v. aplikaciji N-LK800-5L; krvavitve z erozijo na sluznici slepega črevesa (puščica).

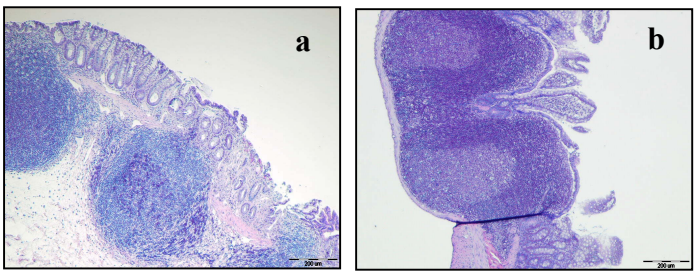
Histološka preiskava organov

Pod mikroskopom smo pregledali črevesje na vseh spremenjenih delih, pa tudi jetra, ledvice, pljuča, srce, trebušno slinavko in možgane vseh živali v poskusu.

Na histoloških preparatih črevesja, kjer so bile makroskopske spremembe, smo opazili omejena mesta brez epitelijske plasti celic (manjše omejene erozije), prežeta z eritrociti (omejena krvavitev) in vnetnimi celicami (polimorfonuklearni infiltrat). Mestoma je bila zelo odebeljena tudi podsluznična plast, v kateri so bile prav tako prisotne vnetne celice, pa tudi fibroblasti, eritrociti in makrofagi (Slika 4-6). Povečano in reaktivno je bilo tudi lokalno limfno tkivo, kjer so limfni folikli začeli sestavljati čezmerne formacije, v katerih smo opazili posamezne nekrotične in apoptotične limfocite (fokalna nekroza in limfocitoliza) (Slika 4-7). Spremembe so bile prisotne pri vseh skupinah podgan, razen pri skupini, ki je dobila pegiliran cisteinski analog (P5-LK849).



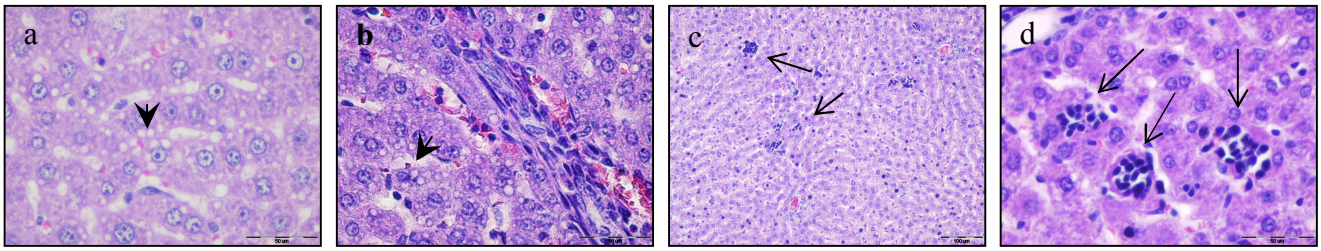
Slika 4-6: Črevesje podgan; hematoksilin in eozin. Polne puščice (➞) označujejo spremenjeno tkivo, prazne puščice (⇨) pa zdravo tkivo. Zvezdica (*) označuje odebelelo podsluznico s polimorfonuklearnim celičnim infiltratom. **a**- erozija sluznice kolona pri intravenozni aplikaciji TNF-α, 40-kratna povečava. **b**- enako mesto erozije kot pri a, le pri večji povečavi, 100-kratna povečava. **c**- erozija sluznice slepega črevesa pri intravenozni aplikaciji cisteinskega analoga LK-849, 40-kratna povečava. **d**- erozija sluznice slepega črevesa pri intravenozni aplikaciji pegiliranega TNF-α (N-LK800-5L), 40-kratna povečava. **e**- stena kolona brez poškodb pri intravenozni aplikaciji pegiliranega cisteinskega analoga (P5-LK849), 40-kratna povečava.



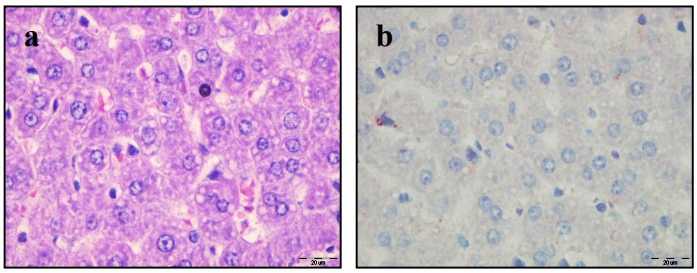
Slika 4-7: Hiperplastični limfni folikli v črevesni steni pri podganah; hematoksilin in eozin. **a**- reakcija po intravenozni aplikaciji LK-800, 40-kratna povečava. **b**- reakcija po intravenozni aplikaciji cisteinskega analoga LK-849, 40-kratna povečava.

V jetrih smo opazili prisotnost vakuol v citoplazmi hepatocitov v okolici portalnih ven (Slika 4-8, a in b) in posamezne manjše omejene limfocitne infiltrate (Slika 4-8, c in d). Omejeni limfocitni infiltrati so bili prisotni pri vseh skupinah podgan, medtem ko se je vakuolna degeneracija pojavila le pri skupinah, ki sta dobili LK-800 in njegovo pegilirano varianto (N-LK800-5L). Za dokaz maščobe v vakuolah (morebitna maščobna degeneracija) smo tkivne rezine jeter pobarvali tudi po postopku Oil-red-O za barvanje maščob, vendar je bil rezultat

negativen – vakuole se niso obarvale rdeče (Slika 4-9). Spremembe smo zato označili kot blago hidropsko degeneracijo hepatocitov, ki se je pojavljala na omejenem periportalnem območju.

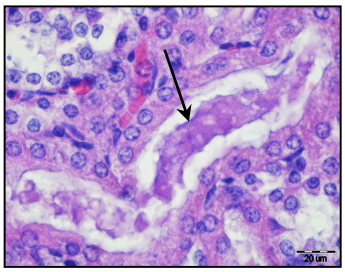


Slika 4-8: Jetra; hematoksilin in eozin. Glave puščic (➤) kažejo vakuole v hepatocitih, puščice (→) pa fokalne limfocitne infiltrate. **a**- vakuole v hepatocitih po intravenozni aplikaciji pegiliranega TNF-α (N-LK800-5L), 400-kratna povečava. **b**- vakuole v hepatocitih po intravenozni aplikaciji TNF-α, 400-kratna povečava. **c**- limfocitni infiltrati po intravenozni aplikaciji cisteinskega analoga (LK-849), 40-kratna povečava. **d**- limfocitni infiltrati po intravenozni aplikaciji pegiliranega cisteinskega analoga (P5-LK849), 400-kratna povečava.



Slika 4-9: Jetra. a- hematoksilin in eozin, 400-kratna povečava**. b**- Oil-red-O, 400-kratna povečava.

V ledvicah smo v distalnih tubulih opazili nekoliko odluščenih celic in hialinim podobne cilindre (Slika 4-10), vendar so bile spremembe prisotne le v manjšem obsegu in niso bile vezane le na eno skupino živali, ampak so se pojavile v različnih skupinah.

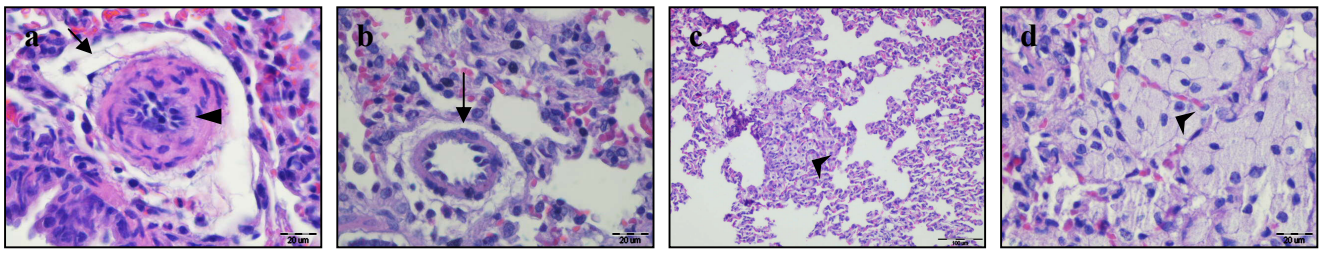


Slika 4-10: Ledvice; hematoksilin in eozin, 400-kratna povečava. Puščica (→) kaže odluščene celice in tvorbo cilindra v distalnem ledvičnem tubulu.

Pri eni podgani iz skupine, ki je dobila LK-800 v žilo, smo ugotovili omejena področja z intersticijsko in gnojno pljučnico. Pri preostalih treh podganah iz te skupine nismo ugotovili pljučnice.

Pri vseh podganah iz skupine, ki so dobile pegiliran LK-800 (N-LK800-5L), smo v peribronhialnem in perivazalnem področju pljuč opazili povišano število eozinofilcev.

Pri vseh podganah, ki so imele vstavljene permanentne jugularne katetre, smo opazili perivazalne edeme (predvsem okoli arterij), odebelitev interalveolarnih sten, pri štirih podganah pa tudi aktivirane alveolarne makrofage (Slika 4-11).



Slika 4-11: Pljuča; hematoksilin in eozin. Puščice (→) kažejo perivazalni edem, trikotnik (►) kaže odebeljeno steno arterije, glave puščic (➢) pa aktivirane alveolarne makrofage. **a**- perivazalni edem in odebeljena stena arterije, 400-kratna povečava. **b**- perivazalni edem in odebeljene interalveolarne stene, 400-kratna povečava. **c**- aktivirani alveolarni makrofagi, 100-kratna povečava. **d**- aktivirani alveolarni makrofagi, ki zapolnjujejo lumen, 400-kratna povečava.

Na srcu, možganih, trebušni slinavki in vranici nismo v nobeni skupini živali opazili sprememb.

4.3 Toksikološko ovrednotenje na miših

4.3.1 Simptomatologija

Miši smo opazovali ves čas trajanja poskusa, vendar smo klinične znake, ki so zajeti v tabelah (Tabela 4-8 in Tabela 4-9), opazili le na dan aplikacije. Močneje so bili izraženi pri skupinah, ki so dobile i. v. odmerek in pri skupinah, ki so dobile višji odmerek substanc (1000 µg/kg) .

4.3.1.a I. v. aplikacija

Tabela 4-8: ***Vrsta in gradacija kliničnih znakov pri intravenozni aplikaciji prvi dan***

skupina	odmerek (µg/kg)	pogin	sedacija	piloerekcija	dispnea	diareja	drugo
kontrola	-	0	-	-	-	-	-
LK-800	250	0	++	+	-	-	-
LK-800	500	0	++	++	+	-	-
LK-800	1000	1	++	++	++	+	porfirinski izcedek
LK-849	250	0	+	-	+	-	-
LK-849	1000	0	+	-	+	+	-
P5-LK849	250	0	(+)	-	-	-	-
P5-LK849	1000	0	(+)	(+)	-	-	-
N-LK800-5L	250	0	+	+	-	+	-
N-LK800-5L	1000	0	+	++ (3dni)	(+)	+	porfirinski izcedek

4.3.1.b S. c. aplikacija

Tabela 4-9: ***Vrsta in gradacija kliničnih znakov pri subkutani aplikaciji prvi dan***

skupina	odmerek (µg/kg)	pogin	sedacija	piloerekcija	dispnea	diareja	drugo
kontrola		0	-	-	-	-	-
LK-800	250	0	-	-	-	-	-
LK-800	1000	0	+	(+)	-	-	-
LK-849	250	0	-	-	-	-	-
LK-849	1000	0	+	-	-	(+)	-
P5-LK849	250	0	-	-	-	-	-
P5-LK849	1000	0	-	-	-	-	-
N-LK800-5L	250	0	-	-	-	-	-
N-LK800-5L	1000	0	-	-	-	-	-

Razlaga simbolov:

-	ni izraženo
+	šibko izraženo pri vseh živalih
++	zmerno izraženo pri vseh živalih
+++	močno izraženo pri vseh živalih
(+)	šibko izraženo pri nekaterih živalih

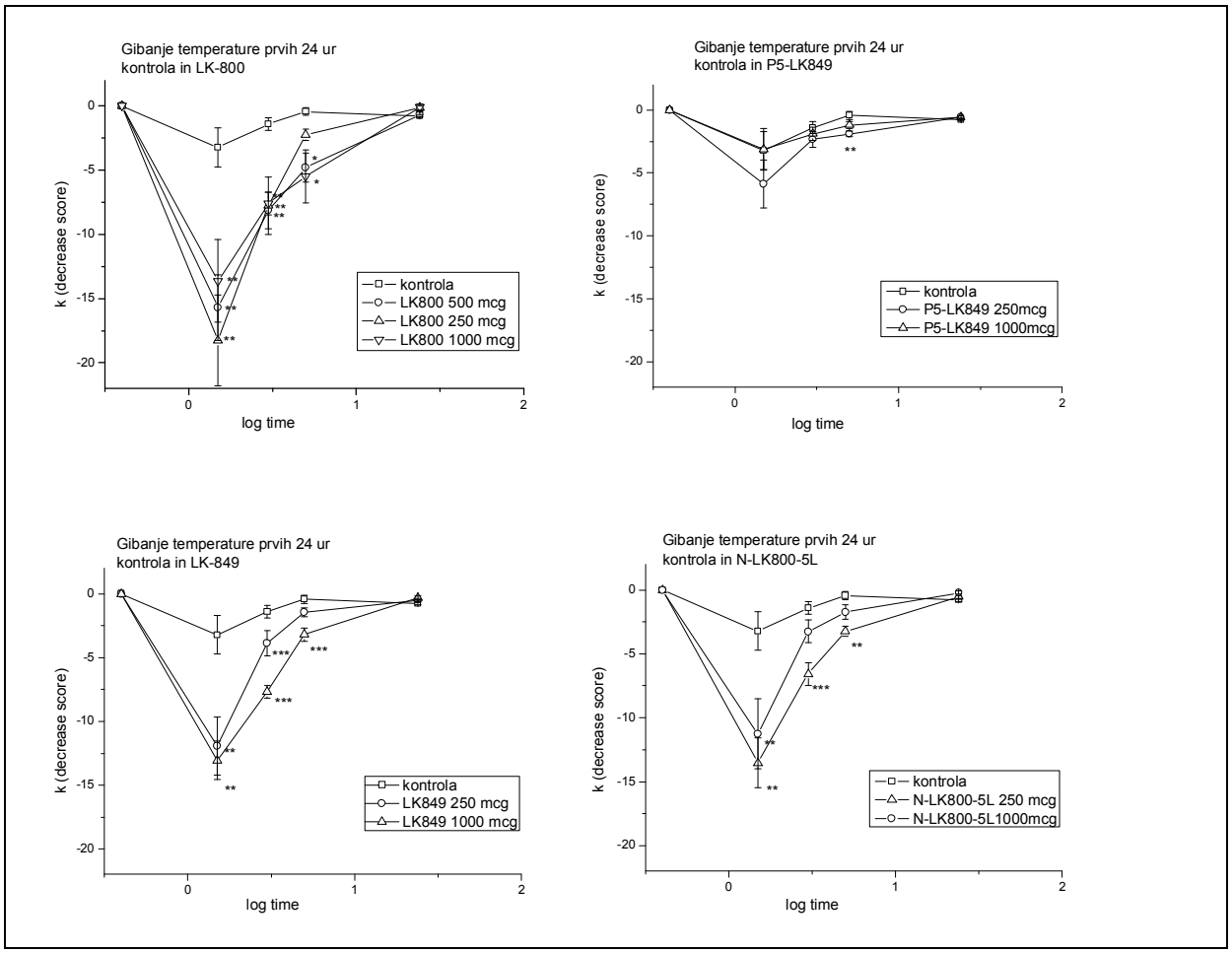
4.3.2 Temperatura

Rektalno temperaturo smo prvi dan izmerili štirikrat, v naslednjih dnevih pa na dva dni. Takoj po i. v. aplikaciji smo opazili padec temperature, ki pa se je po 24 urah normalizirala in

preostale dneve ni več odstopala od temperature kontrolne skupine živali (Slika 4-12). Po s. c. aplikaciji ni bilo opaziti urejenega vzorca v gibanju temperature (Slika 4-13).

4.3.2.a I. v. aplikacija

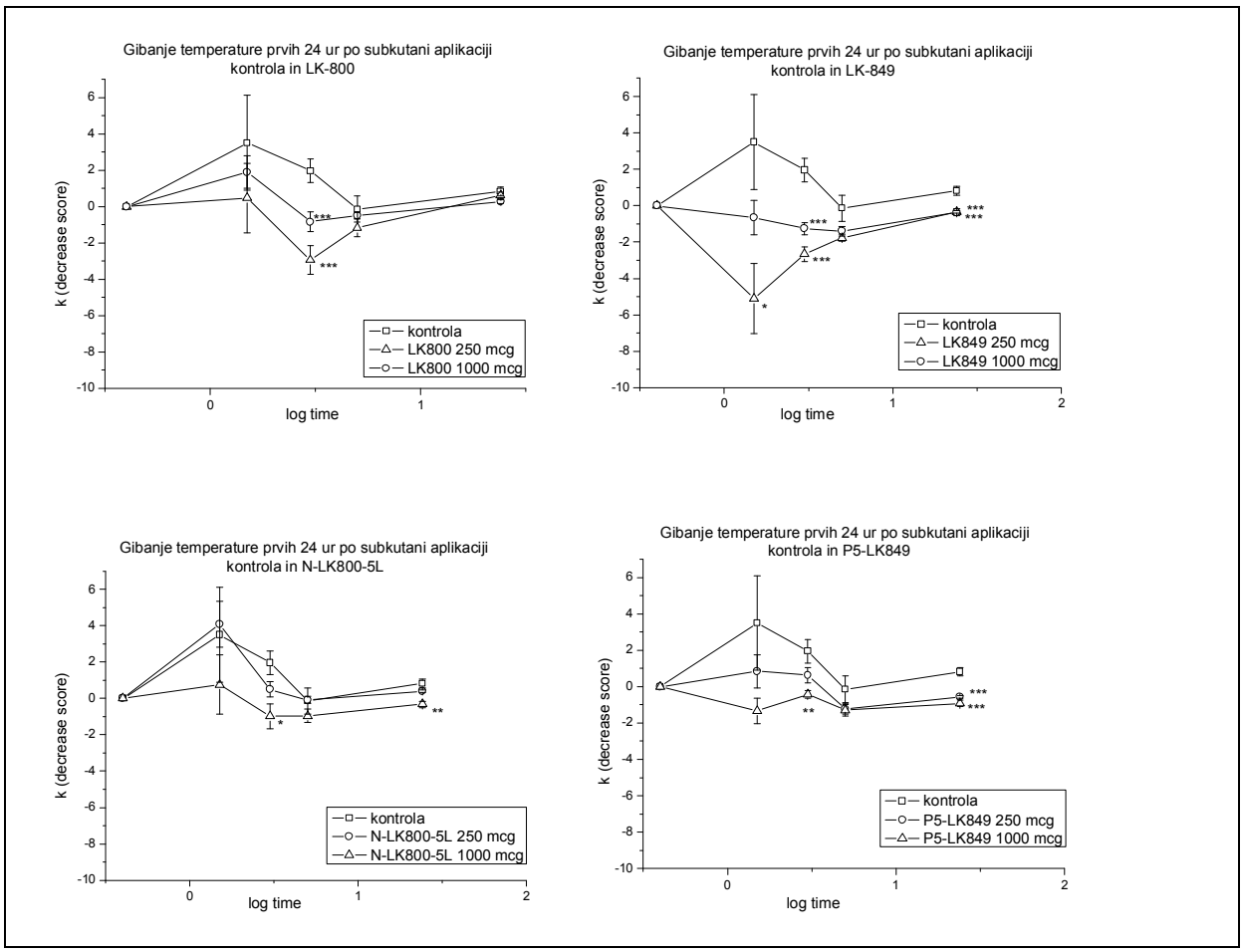
Po i. v. aplikaciji substanc smo opazili, da je rektalna temperatura že po uri in pol padla pri vseh skupinah. Padec se je statistično značilno razlikoval od kontrolne skupine in razlika je bila pri višjih odmerkih večja. Tudi med skupinami je opazna razlika, in sicer je temperatura najbolj padla pri LK-800, analogu LK-849 in pegiliranem TNF-α (N-LK800-5L), najmanj pa pri pegiliranem analogu P5-LK849 (Slika 4-12). V 24 urah se je temperatura povrnila na izhodiščno vrednost in druge dneve ni bilo razlik med skupinami.



Slika 4-12: Gibanje rektalne temperature pri miših prvih 24 ur po intravenozni aplikaciji. Primerjava kontrolne skupine in skupin z apliciranimi substancami. Podatki so prikazani kot povprečje ± standardna napaka. Enosmerna ANOVA, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 glede na kontrolno skupino. K (decrease score) = razlika v temperaturi; log time = logaritem časa; mcg =µg.

4.3.2.b S. c. aplikacija

Po s. c. aplikaciji se je sicer pojavilo gibanje temperature, tudi z značilnimi razlikami glede na kontrolno skupino, vendar so bile te spremembe majhne, individualne in brez opaznih vzorcev (Slika 4-13).



Slika 4-13 Gibanje rektalne temperature pri miših prvih 24 ur po subkutani aplikaciji. Primerjava kontrolne skupine in skupin z apliciranimi substancami. Podatki so prikazani kot povprečje ± standardna napaka. Enosmerna ANOVA, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 glede na kontrolno skupino. K (decrease score) = razlika v temperaturi; log time = logaritem časa; mcg =µg.

4.3.3 Telesna masa

Miši smo vsak dan tehtali in na koncu izračunali razliko med začetno in končno maso živali. Gibanje telesne mase je pri vseh skupinah, vključno s kontrolnimi, in pri obeh načinih aplikacije potekalo enako, in sicer so miši že prvi dan po aplikaciji izgubile nekaj telesne mase (povprečno 1,5 g), v naslednjih dneh pa se je telesna masa začela gibati proti izhodiščni

vrednosti in na zadnji dan eksperimenta je v večini skupin presegla začetno telesno maso (Tabela 4-10 in Tabela 4-11).

4.3.3.a I. v. aplikacija

Tabela 4-10: **Pregled začetne telesne mase miši in razlike na koncu poskusa pri i. v. aplikaciji.**

Skupina	Odmerek (µg/kg)	Povprečna začetna telesna masa (g)	Razlika med povprečno začetno in končno maso (g)
kontrola	-	33,38	+ 0,48
LK-800	250	31,45	+ 0,58
LK-800	500	32,17	+ 0,90
LK-800	1000	33,03	+ 0,41
LK-849	250	32,42	+ 0,63
LK-849	1000	33,42	- 0,12
P5-LK849	250	28,98	+ 0,17
P5-LK849	1000	29,12	+ 0,98
N-LK800-5L	250	29,48	+ 0,05
N-LK800-5L	1000	29,30	+ 0,08

4.3.3.b S. c. aplikacija

Tabela 4-11: **Pregled začetne telesne mase in razlike na koncu poskusa pri s. c.aplikaciji.**

Skupina	Odmerek (µg/kg)	Povprečna začetna telesna masa (g)	Razlika med povprečno začetno in končno maso (g)
kontrola		30,88	- 0,55
LK-800	250	31,67	- 1,33
LK-800	1000	31,15	- 0,42
LK-849	250	31,25	- 0,63
LK-849	1000	30,57	+ 0,03
P5-LK849	250	29,32	+ 0,60
P5-LK849	1000	26,50	+ 0,82
N-LK800-5L	250	27,45	+ 0,50
N-LK800-5L	1000	27,52	+ 0,65

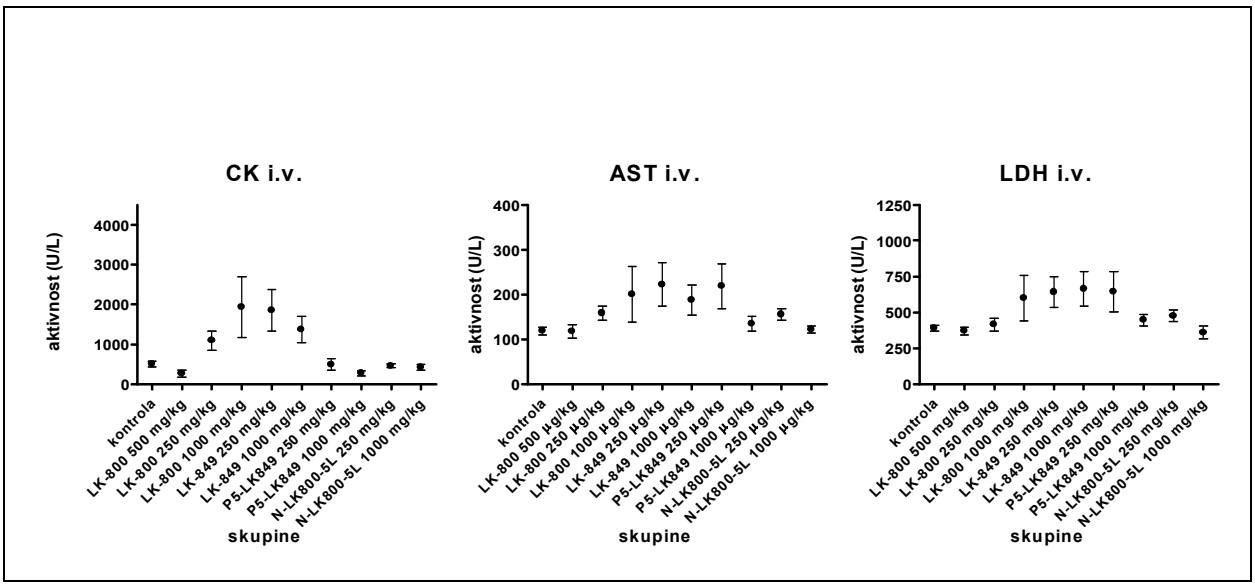
4.3.4 Hematološke preiskave

Na koncu poskusa smo mišim ob žrtvovanju odvzeli kri za hematološke in biokemijske preiskave.

Statistični testi so pokazali zelo malo statistično značilnih razlik v hematoloških parametrih med kontrolno skupino in skupinami, ki so dobile preiskovane substance. Edina značilna razlika pri i. v. aplikaciji se kaže v številu trombocitov, ki je bilo statistično značilno povišano pri vseh treh skupinah miši, ki so dobile LK-800. Pri s. c. aplikaciji se je le pri višjem odmerku LK-800 statistično značilno znižalo število levkocitov. Rezultati hematoloških preiskav pri miših so predstavljeni v tabelah (Tabela 11-1 in Tabela 11-2) v prilogi.

4.3.5 Biokemijske preiskave

Ugotovili smo statistično značilno povišanje encima kreatin-kinaze v skupinah, ki sta i. v. dobili visok odmerek LK-800 in nizek odmerek LK-849. Klorovi ioni so bili statistično značilno znižani v skupini, ki je i. v. dobila visok odmerek N-LK800-5L. Serumski albumin pa je bil statistično značilno znižan v obeh skupinah, ki sta i. v. dobili P5-LK849. Statistično značilno povišana je bila koncentracija encima kreatin kinaze v skupini, ki je s. c. dobila nizek odmerek LK-800. Koncentracija klorovih ionov je bila značilno povišana v skupini, ki je s. c. dobila visok odmerek N-LK800-5L in kreatinin je bil statistično značilno povišan v skupini, ki je dobila nizek odmerek P5-LK849. Rezultati biokemijskih preiskav pri miših so predstavljeni v tabelah (Tabela 11-3 in Tabela 11-4) v prilogi.



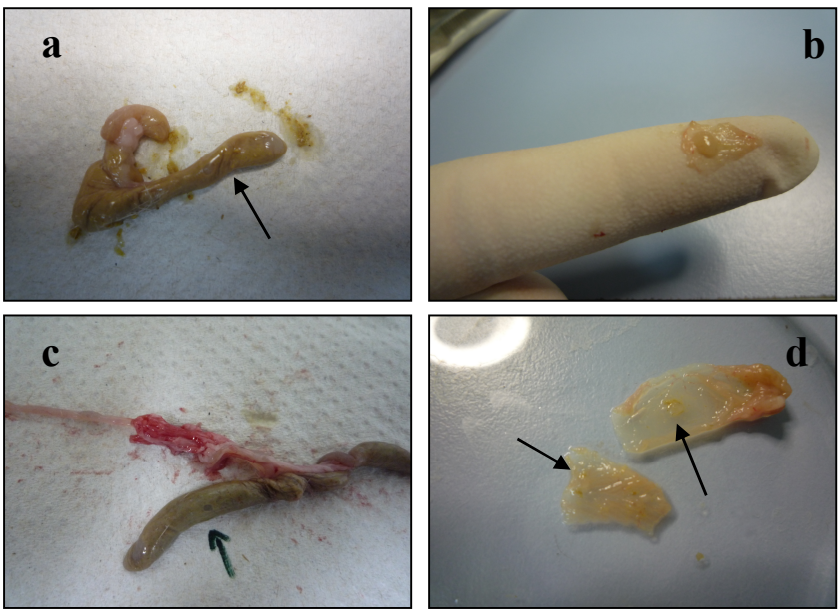
Slika 4-14 Encimi, ki s povišanimi vrednostmi kažejo na degenerativne in nekrotizirajoče mišične poškodbe, so kreatin-kinaza (CK), laktat-dehidrogenaza (LDH) in aspartat-aminotransferaza (AST). Vrednosti so podane kot povprečje ± standardni odklon.

4.3.6 Makroskopska in histološka preiskava organov ter teže organov

Makroskopska preiskava

Ena miš iz skupine, ki je dobila LK-800 v odmerku 1000 µg/kg i. v., je poginila 11 ur po aplikaciji. Raztelesbo smo opravili eno uro po poginu in našli nekaj sprememb v prebavnem traktu. Želodec je bil poln, želodčna vsebina pa kašasta, rumeno sive barve in s primesmi krvi. Sluznica slepega črevesa je bila rdečkasto obarvana (polnokrvnost sluznice). Na debelem črevesu pa smo videli dve rdeči površini v velikosti 2 x 1 mm in 2 x 2 mm (omejena krvavitev). Na drugih organih ni bilo makroskopskih sprememb.

Raztelesbo drugih živali smo opravili na koncu poskusa, po usmrtitvi. Pri nekaterih skupinah smo našli spremembe na črevesju, ki so prikazane na sliki (Slika 4-15). Opazili smo polnokrvno sluznico začetnega dela kolona ascendensa (pri skupinah, ki sta i. v. dobili 500 in 1000 µg/kg LK-800), povečano limfno tkivo v steni slepega črevesa (pri vseh skupinah, razen pri kontrolni; pogosteje izraženo v skupinah, ki so dobile višji odmerek substance) in polnokrvne mezenterialne bezgavke (v skupinah, ki sta dobili nizek in visok i. v. odmerek LK-849, v skupinah, ki sta dobili nizek in visok s. c. odmerek LK-800 ter pri skupini, ki je s. c. dobila nizek odmerek N-LK800-5L). Na drugih organih nismo našli makroskopskih sprememb.



Slika 4-15: Fotografije povečanega limfnega tkiva v steni črevesju miši. **a-** slepo in debelo črevo pri miši s hiperplastičnim limfnim tkivom (puščica). **b-** izolirano limfno tkivo, pogled s sluznične strani. **c-** polne krvne žile v serozi slepega črevesa in limfno tkivo (puščica). **d-** izolirano limfno tkivo, pogled s sluznične strani.

Teže organov

Po makroskopskem pregledu smo stehtali organe (srce, pljuča, jetra, ledvice, trebušno slinavko, vranico in možgane). Med skupinami ni bilo značilnih razlik v povprečnih težah srca, pljuč, jeter, ledvic, trebušne slinavke in vranice. Statistično značilno razliko smo izračunali pri relativni teži možganov (glede na telesno maso) v skupinah miši, ki sta dobili visok in nizek i. v. odmerek pegiliranega analoga (P5-LK849), in v skupini, ki je dobila nizek odmerek pegiliranega TNF-α (N-LK800-5L). V absolutni teži možganov ni bilo značilnih razlik. Spremenjene teže možganov zaradi odsotnosti histoloških sprememb nismo ocenili kot biološko pomembne.

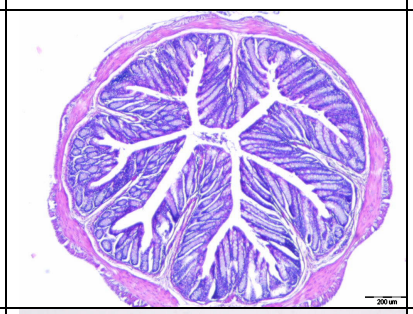
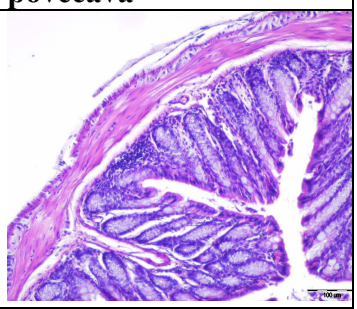
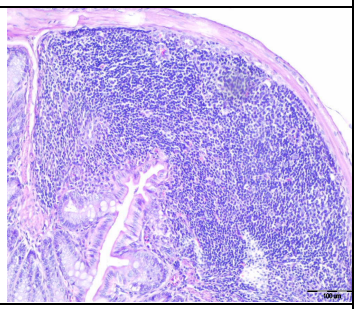
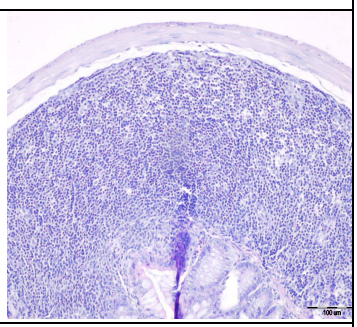
Histološka preiskava organov

Pod mikroskopom smo pregledali črevesje na vseh spremenjenih delih, pa tudi mezenterialne bezgavke, jetra, ledvice, pljuča, srce, trebušno slinavko in možgane vseh živali v poskusu.

Pri miši, ki je poginila prvi dan poskusa (skupina z i. v. apliciranim LK-800 v odmerku 1000 μg/kg), smo v žleznem delu želodca in v debelem črevesu našli veliko eritrocitov (rahla hiperemija sluznice), žile v kutanem delu želodca pa so bile rahlo razširjene in polne krvi. Prav tako so bile razširjene in polne krvi žile v jetrih, ledvicah in pljučih. Drugih sprememb nismo našli.

Za vse spremembe na črevesju, ki smo jih pri drugih živalih opazili makroskopsko kot belkasto prozorne okrogle odebelitve (Slika 4-15), se je izkazalo, da so povečano limfatično tkivo (limforetikularna hiperplazija). V debelem in slepem črevesu smo opazili tudi reaktivno povečanje črevesnega limfatičnega tkiva, ki makroskopsko ni bilo vidno. Zaradi lažjega ocenjevanja smo napravili sistem točkovanja in ocenili črevesje miši vseh skupin. Za debelo črevo je sistem točkovanja prikazan v tabeli (Tabela 4-12).

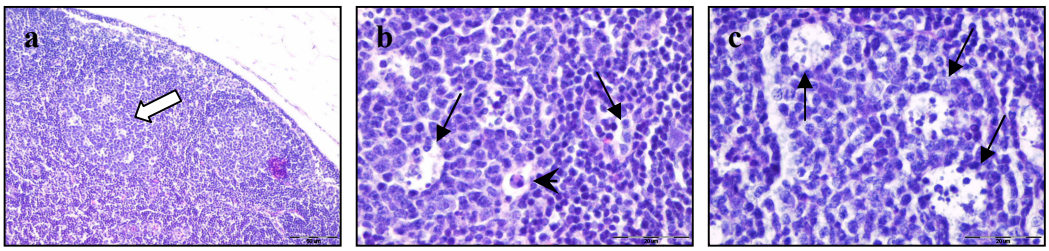
Tabela 4-12: **Sistem točkovanja za spremembe na debelem črevesju in primeri mikroskopskih slik pri dveh povečavah.**

debelo črevo (opis sprememb)	**ocena**	**mikroskopska slika (HE), 40-kratna povečava**	**mikroskopska slika (HE), 100-kratna povečava**
ustrezna zgradba limfnega tkiva	0		
1. povečan obseg limfnega tkiva **2.** formacija dodatnih centrov (na novo)	1		
1. povečan obseg limfnega tkiva **2.** formacija dodatnih centrov (na novo) **3.** odrinjeno okolno tkivo **4.** fokalne nekroze limfocitov **5.** polni limfni vodi izven formacije limfnega tkiva	2		

Na podoben način smo točkovali tudi spremembe v slepem črevesu (0 = brez sprememb; 1 = povečani, močno napolnjeni limfni folikli, tvorba novih centrov; 2 = povečani, slabše napolnjeni limfni folikli z nekrotičnimi in apoptotičnimi celicami).

Pregledali smo tudi mezenterialne bezgavke in opazili različne stopnje reaktivnosti (folikularno hiperplazijo, spremenjeno razmerje med skorjo in sredico bezgavke) in posamezne nekroze ter apoptotične celice. S sistemom točkovanja smo ocenili tudi bezgavke (0 = brez sprememb; 1 = reaktivna bezgavka s folikularno hiperplazijo, posamezne nekrotične

in apoptotične celice; 2 = zelo reaktivna bezgavka s folikularno hiperplazijo, veliko nekrotičnih in apoptotičnih celic in makrofagov).



Slika 4-16: Mezenterialne bezgavke miši: hematoksilin in eozin. Prazna puščica (⇨) označuje območje s fokalnimi nekrozami limfocitov in makrofagi. Polne puščice (➞) označujejo posamezne fokalne nekroze limfocitov in makrofage pri večji povečavi. Glava puščice (➢) označuje apoptotično celico. **a**- mezenterialna bezgavka miši iz skupine, ki je i. v. dobila N-LK800-5L v odmerku 1000 µg/kg, 100-kratna povečava. **b**- enako spremenjeno mesto kot pri a, le pri večji povečavi, 400-kratna povečava. **c**- mezenterialna bezgavka s fokalnimi nekrozami limfocitov miši iz skupine, ki je i. v. dobila LK-800 v odmerku 1000 µg/kg, 400-kratna povečava.

Rezultati primerjave sprememb so v tabeli (Tabela 4-13).

Tabela 4-13: **Rezultati sistema točkovanja za histološke spremembe na črevesju in bezgavkah miši. Enosmerna ANOVA in Dunnettov post test, *p < 0,05 glede na kontrolno skupino.**

Skupina	odmerek (i. v.)	*vsota točkovanja*	*povprečje*	skupina	odmerek (s. c.)	*vsota točkovanja*	*povprečje*
Kontrola	-	7	0,39				
LK-800	250	22*	1,22	kontrola	-	20	1,11
LK-800	500	14	0,78	LK-800	250	24	1,33
LK-800	1000	14	0,78	LK-800	1000	22	1,29
LK-849	250	23*	1,28	LK-849	250	15	0,88
LK-849	1000	14	0,82	LK-849	1000	21	1,17
P5-LK849	250	18	1,00	P5-LK849	250	20	1,18
P5-LK849	1000	25*	1,39	P5-LK849	1000	20	1,11
N-LK800-5L	250	17	0,94	N-LK800-5L	250	28	1,56
N-LK800-5L	1000	27*	1,50	N-LK800-5L	1000	20	1,11

V jetrih smo, tako kot pri podganah, pri vseh tretiranih skupinah opazili vakuolacijo citoplazme hepatocitov, predvsem v periportalnem območju. Po barvanju z Oil-red-O, ki ni pokazalo čezmerne zamaščenosti, smo spremembo označili kot blago stopnjo hidropske degeneracije, omejeno na periportalni prostor. Ponekod so bili prisotni mešani limfocitni fokalni infiltrati, predvsem okoli žolčevodov.

V ledvicah smo v distalnih tubulih opazili nekaj odluščenih celic, vendar so bile spremembe prisotne le v manjšem obsegu in niso bile vezane le na eno skupino živali, ampak so se pojavile v različnih skupinah.

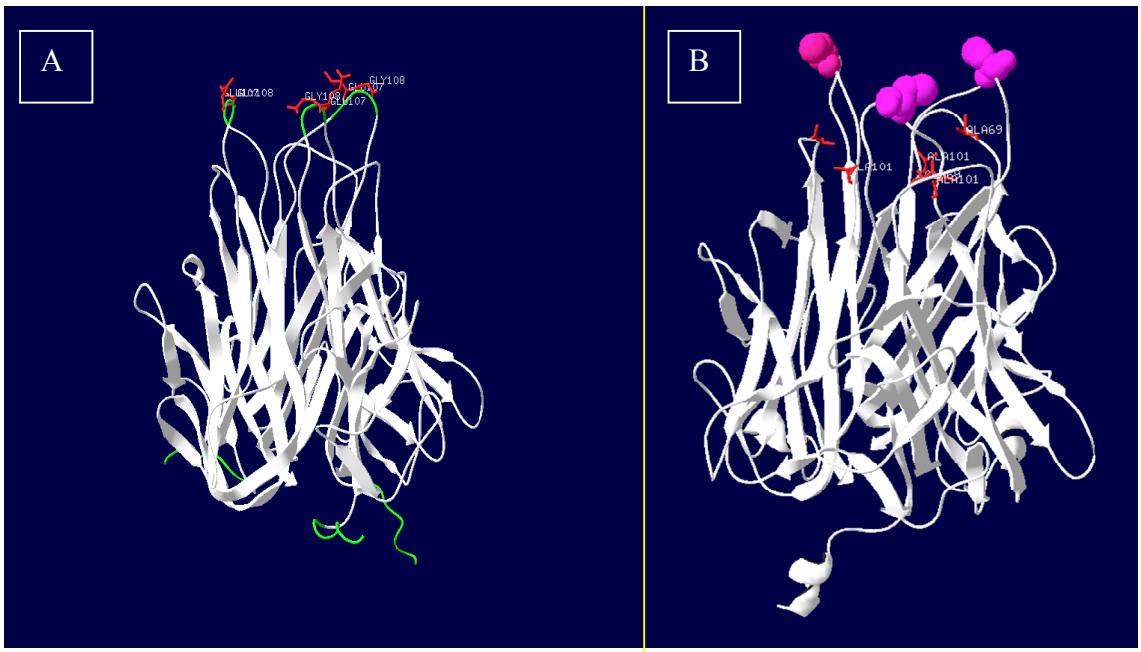
V drugih organih (srce, pljuča, vranica, trebušna slinavka, možgani) ni bilo mikroskopskih sprememb.

5 DISKUSIJA

5.1 Priprava in analiza proteinov

TNF-α ima citotoksične, citostatične in imunomodulatorne učinke na maligne tumorje, vendar je zaradi škodljivih neželenih učinkov, kot sta sistemski šok in splošni vnetni odziv, njegova uporaba v terapevtske namene zelo okrnjena (Jäättelä, 1991; Lucas in sod., 2005). Poleg tega so nekatere rakave celice odporne na toksične učinke, ki jih izzove TNF-α (Balkwill, 2009). Svojevrsten izziv je spremeniti molekulo TNF-α tako, da je njena specifična citotoksičnost za tumorske celice poudarjena, neželeni učinki pa omiljeni (Wang in Lin, 2008). Dva izmed številnih pristopov, ki izboljšujejo protitumorsko učinkovitost in zmanjšujejo sistemsko toksičnost, opisujeta uporabo mutiranih molekul TNF-α in zaščito ali enkapsulacijo TNF-α (Terlikowski, 2001; Wang in Lin, 2008). Združili smo oba pristopa in ju uporabili za dosego enega od ciljev doktorske naloge – pridobiti takšen analog TNF-α, ki bi ga lahko usmerjeno pegilirali. Z usmerjeno pegilacijo dosežemo visoko ponovljivost metode in bolje definiran produkt (Gaberc-Porekar in sod., 2008; Harris in sod., 2001). Sestavili smo aminokislinsko zaporedje, ki ima na fleksibilni zanki na vrhu molekule, točneje na aminokislinskem mestu 107, uveden cistein namesto glutamata. Tiolna skupina cisteina omogoča izvedbo usmerjene pegilacije (Roberts in sod., 2002), aminokislinsko mesto 107 pa se je že v preteklosti v raziskavah naše raziskovalne skupine izkazalo za zelo primerno mesto za uvedbo mutacij (Fonda in sod., 2005; Menart in sod., 1996; Menart 2000). Na ta način smo na molekuli TNF-α, ki je v naravni zgradbi trimer, pridobili tri cisteine, po enega na vsaki podenoti. Pri sestavljanju aminokislinskega zaporedja pa smo izvedli še eno spremembo glede na naravno zaporedje aminokislin v TNF-α in sicer smo oba naravno prisotna cisteina na mestih 69 in 101 zamenjali z alanini. Naravno prisotna disulfidna vez namreč ne vpliva na funkcionalnost TNF-α, prispeva pa k stabilizaciji proteina (Narachi in sod., 1987). Razlog za zamenjavo cisteinov z alanini so bili predhodni poskusi biosinteze in pegilacije analoga TNF-α, ki je imel samo na mestu 107 cisteinsko mutacijo, oba naravna cisteina pa sta bila prisotna. Med biosintezo proteina in tudi ob prvih poskusih pegilacije tega analoga se je pokazalo, da se cisteini med seboj kovalentno povezujejo z disulfidnimi mostički, kar je vodilo do napačnih povezav med cisteini in nastanek nepravilnih oblik TNF-α (di-trimer, tetramer) (Kenig in sod., 2007, neobjavljeni podatki). Tako smo prišli do analoga LK-849, ki ima namesto

naravnih cisteinov alanine (C69A in C101A) in namesto glutamata uveden cistein na konici molekule (E107C) (Slika 5-1).



Slika 5-1 **Tridimenzionalna struktura LK-800 (A) in LK-849 (B)**
A- z zeleno so na vrhu molekule označene zanke z aminokislinskimi mesti 107 in 108 (rdeča barva), N-konec na bazi molekule je označen z zeleno. **B-** uvedeni Cys so označeni z vijolično, mutacija Cys → Ala na mestih 69 in 101 pa z rdečo. Slika je narejena s programom Deep View/ Swiss-PDBViewer, ver. 4.0.

Znano je, da pegilacija vpliva na znižanje biološke aktivnosti proteinov (Bailon in Berthold, 1998; Fishburn, 2008; Gaberc-Porekar in sod., 2008), toda ob izračunu biološke aktivnosti znižanja pod en odstotek za pegiliran cisteinski analog vseeno nismo pričakovali. Odgovor na vprašanje, zakaj je obema pegiliranima cisteinskima analogoma (P5-LK849 in P12-LK849) biološka aktivnost padla pod odstotek, pa lahko dobimo z razlago o orientaciji molekule TNF-α na membranski receptor. Čeprav so receptorska mesta na molekuli v brazdi med dvema podenotama, je TNF-α ob vezavi na membranski receptor obrnjen z ožjim delom, torej s konico, proti celični membrani (Menart, 2000). Menart in sod. (2002) so ugotovili, da ima analog TNF-α LK805, ki na konici molekule vsebuje lizine, boljšo *in vitro* učinkovitost, verjetno zaradi elektrostatske interakcije med pozitivno nabitimi lizini in negativno nabitimi proteoglikani na površini celične membrane. Torej je mogoče, da ima pri TNF-α fleksibilna zanka z uvedenimi lizinskimi ostanki neko koreceptorsko funkcijo ob približevanju molekule k membrani (Fonda in sod., 2005). PEG, ki je pripojen na cisteine na konici molekule, verjetno ovira nemoteno približevanje membrani celice.

Kljub nizki biološki aktivnosti smo se odločili za testiranje dobljenih pegiliranih konjugatov, kajti na prvem mestu nas je zanimala farmakokinetika in toksikologija pridobljenih substanc. Ob potrjenih hipotezah, torej da so biološki razpolovni čas in preostali PK parametri izboljšani ter da je toksičnost znižana, bi vseeno prišli do molekule z izboljšanimi lastnostmi. Če ne za zdravljenje tumorjev, bi jo lahko uporabili za morebitne druge namene, npr. za razvoj dominantno negativne oblike TNF-α (Steed in sod., 2003). Poleg tega so Tsutsumi in sod. (1994) ugotovili, da pegiliran TNF-α obdrži le 52 odstotkov biološke aktivnosti, pa je vseeno stokrat bolj učinkovit kot nativni TNF-α. Zaradi tega lahko ob manjšem terapevtskem odmerku dosežemo enak učinek na tumor in hkrati ob tem pričakujemo manj neželenih učinkov. In ne nazadnje, na trgu so pegilirana proteinska zdravila s precej nižjo biološko aktivnostjo v primerjavi z nepegiliranimi izhodnimi proteini – npr. pegiliran interferon-α2a (Pegasys®), ki ima glede na antivirusni test samo 7 odstotkov ohranjene aktivnosti (Bailon in sod., 2001; Fishburn, 2008), glede na *in vitro* test RGA (test s poročevalskim genom) pa celo samo od 1 do 2 odstotka ohranjene aktivnosti (Caserman in sod., 2007), vendar je njegova učinkovitost toliko izboljšana, da so pegilirane oblike tako rekoč povsem izpodrinile prvo generacijo interferon-α iz trga.

5.2 PK poskusi na podganah

Farmakokinetika

Dobljeni eksperimentalni podatki, ki smo jih dobili v PK poskusih na podganah, omogočajo PK karakterizacijo testiranih substanc. Rezultati dveh analiznih metod – neprostorske in populacijske PK analize (Tabela 4-5 in Tabela 4-6) – se dobro ujemajo. Za nadaljnje primerjave smo upoštevali rezultate populacijske PK analize, ker so pri tej metodi najbolje upoštevane tudi napake meritev.

Biološki razpolovni čas TNF-α (27,6 min), ki smo ga izračunali iz rezultatov PK poskusov na podganah, se ujema z rezultati objavljenih raziskav. V večini raziskav poročajo o kratkem biološkem razpolovnem času – do 30 minut. Pri ljudeh v prvi fazi kliničnega testiranja so ugotovili, da se terminalni razpolovni čas TNF-α giblje od 11 do 30 minut in je odvisen od odmerka – pri nižjih odmerkih je krajši (11 min), pri višjih pa daljši (30 min) (Blick in sod., 1987; Chapman in sod., 1987; Creaven in sod., 1987; Gamm in sod., 1991; Moritz in sod., 1989). Pri poskusih na laboratorijskih živalih pa je farmakokinetika TNF-α najbolje ustrezala

opisu z dvoprostornim PK modelom (Bocci in sod., 1987; Ferraiolo in sod., 1988; Li in sod., 2001), zato so podatki za biološki razpolovni čas v teh člankih podani kot alfa in beta razpolovni časi. Tako se razpolovni čas alfa, ki opisuje distribucijsko fazo, giblje od 6 do 20 minut pri miših (Beutler in sod., 1985; Ferraiolo in sod., 1988) in okoli 2 minuti pri podganah (Ferraiolo in sod., 1989). Beta razpolovni čas, ki opisuje eliminacijsko fazo in je boljši približek terminalnega razpolovnega časa enoprostornih PK modelov, pa je od 14 do 35 minut pri podganah (Ferraiolo in sod., 1989) in do 100 minut pri miših (Ferraiolo in sod., 1988). Nekaj raziskav navaja enoprostorni PK model z biološkimi razpolovnimi časi okoli 20 do 30 minut (Kus in sod., 1993; Li in sod., 2001; Zahn in Greischel, 1989). Tudi pri laboratorijskih živalih je opisana odvisnost razpolovnega časa od odmerka (Zahn in Greischel, 1989). Rezultati naše populacijske PK analize združenih podatkov za koncentracije so pokazali, da farmakokinetiko LK-800 (TNF-α) najbolje opisuje enoprostorni model, razpolovni čas 28 minut pa se ujema z literaturnimi podatki.

Po pričakovanjih naj bi se z vezavo PEG-a podaljšal biološki razpolovni čas. Raziskovalna skupina z Japonske se je ukvarjala s farmakokinetiko in protitumorskimi učinki nativnega TNF-α, ki so ga nespecifično pegilirali na lizinih (Tsutsumi in sod., 1994; 1995; 1996). Njihove poglavitne ugotovitve so bile, da pegilacija vpliva na daljši razpolovni čas TNF-α, in sicer se z višanjem tako stopnje PEG modifikacije kot tudi molekulske teže PEG-a pričakovano podaljšuje biološki razpolovni čas modificiranega TNF-α (Tabela 5-1). Podoben princip nespecifične pegilacije so ubrali Li in sod. (2001), ki pa so pegilirali rekombinantni humani TNF-α z različno velikimi PEG reagenti in so z 20 kDa velikim PEG reagentom dosegli kar 57-kratno podaljšanje biološkega razpolovnega časa (Tabela 5-1).

Težava, s katero sta se srečali obe skupini raziskovalcev, je bila nespecifična pegilacija, saj se PEG veže na lizine, ki so locirani po celotni molekuli. Posledica je heterogeno pegiliran TNF-α, ki ga sestavlja mnogo različnih pozicijskih izomer z različnimi specifičnimi aktivnostmi. Ker so nekateri lizini zelo blizu aktivnega mesta, je tudi bioaktivnost precej nižja oz. včasih celo izničena (Shibata in sod., 2005). Rešitev te težave je specifična pegilacija, ki so se je Shibata in sod. (2004) lotili tako, da so z metodo predstavitve na fagu (angl.: phage display) prišli do mutante TNF-α brez lizinskih aminokislinskih ostankov, ki pa je hkrati kazala zelo visoko *in vitro* bioaktivnost na celični liniji. To mutanto so specifično pegilirali na N-koncu in dosegli podaljšanje biološkega razpolovnega časa (Tabela 5-1).

Tabela 5-1: **Pregled vpliva pegilacije TNF-α na biološki razpolovni čas v krvi laboratorijskih glodavcev (literaturni podatki in podatki naše raziskave).** PEG = polietilenglikol; $t_{1/2}$ = biološki razpolovni čas.

izhodna molekula	velikost PEG verige (kDa)	tip pegilacije	podaljšanje $t_{1/2}$ (nepegiliran → pegiliran)	faktor podaljšanja $t_{1/2}$	referenca
wTNF-α	5	nespecifična	3,5' → 2,5h	43x	Tsutsumi in sod., 1994
wTNF-α	5	nespecifična	3,2' → 117'	37x	Tsutsumi in sod., 1995
wHuTNF-α	5	nespecifična	12' → 24'	2x	Shibata in sod., 2004
m-TNF-K90R	5	specifična (N-konec)	24' → 49'	2x	Shibata in sod., 2004
rHuTNF-α	5	nespecifična	28,8' → 6,25h	13x	Li in sod., 2001
rHuTNF-α	12	nespecifična	28,8' → 9,28h	19x	Li in sod., 2001
rHuTNF-α	20	nespecifična	28,8' → 24,77h	57x	Li in sod., 2001
rHuTNF-α	5	specifična (N-konec)	27,6' → 4,85 h	11x	naši rezultati
Cys-TNF-α	5	specifična (uvedeni cisteini)	88.8' → 8.59 h	6x	naši rezultati
Cys-TNF-α	12	specifična (uvedeni cisteini)	88.8' → 3.88 h	3x	naši rezultati

Razlaga:

wTNF-α = wilde type TNF-α, nativni TNF-α
m-TNF-K90R = mutanta TNF-α brez lizinskih ostankov
rHuTNF-α = rekombinantni humani TNF-α
Cys-TNF-α = cisteinski analog TNF-α (LK-849)

Tudi rezultati naših PK poskusov so pokazali, da nam je s pripenjanjem PEG-a uspelo podaljšati biološki razpolovni čas osnovne molekule, in sicer v primeru pegilacije s 5 kDa PEG reagentom na 8,59 ur, kar pomeni za šestkrat glede na izhodiščno molekulo, ki smo jo pegilirali (torej LK-849), oz. za 19-krat, če ta razpolovni čas primerjamo z osnovnim rekombinantnim TNF-α. Pri pegilaciji z 12 kDa PEG reagentom pa je razpolovni čas sicer tudi podaljšan na 3,88 ure, vendar je to presenetljivo malo glede na protein z daljšim PEG-om. Po pričakovanjih bi moral biti ta čas še daljši. Razlog za to je verjetno manj uspešna pegilacija z 12 kDa PEG reagentom (Slika 4-1), saj ni prišlo do popolne pegilacije vseh podenot v trimerni molekuli. Zaradi tega je aplicirana substanca (P12-LK849) delovala kot mešanica nepegiliranih proteinov s krajšim biološkim razpolovnim časom in pegiliranih proteinov z daljšim biološkim razpolovnim časom. Koncentracije v serumu, ki smo jih

pomerili z ELISO, pa so mešanica obojega, saj metoda ne loči med pegiliranimi in nepegiliranimi proteini.

Mehanizem, ki vpliva na podaljšanje biološkega razpolovnega časa pri pegiliranih produktih, temelji na dveh principih: manjši ledvični očistek pegiliranih molekul in pa povečana zaščita pred proteolitsko razgradnjo (Fishburn, 2008; Harris in Chess, 2003). Očistek naših pegiliranih proteinov se je zmanjšal glede na izhodiščne nepegilirane proteine, kar se ujema z drugimi raziskavami (Shibata in sod., 2004; Tsutsumi in sod. 1995). Podaljšal se je tudi srednji čas zadrževanja, distribucijski očistek pa se je zmanjšal, kar vse vpliva na daljše zadrževanje molekul v krvnem obtoku.
Zanimivo je, da smo spremenjene PK parametre (daljši biološki razpolovni čas, manjši očistek, daljši čas zadrževanja, idr.) opazili že pri samem cisteinskem analogu (LK-849). Razpolovni čas je bil trikrat daljši glede na LK-800. Analiza na gelu SDS-PAGE je pokazala, da se trimerne molekule cisteinskega analoga LK-849 med seboj povezujejo z disulfidnimi mostički (Slika 4-1). Zaradi tega ima molekula LK-849 dvakratno velikost osnovne molekule in verjetno tudi v telesu delno obstaja v obliki di-trimera, kar pa vpliva na farmakokinetiko. Tudi če ga reduktivno okolje v telesu vseeno reducira, se najbrž to ne zgodi hipno in hitrost redukcije zelo verjetno vpliva na razpolovni čas. Torej so že dokaj preproste mutacije treh aminokislin vplivale na spremenjene PK lastnosti analoga. Pegilacija še dodatno potencira te lastnosti, kar je pripeljalo do analoga s skoraj dvajsetkrat daljšim biološkim razpolovnim časom glede na osnovno molekulo LK-800.

Distribucija po organih

V farmakokinetiki učinkovin je tudi distribucija po tkivih in organih pomemben parameter, saj lahko le s celovitim razumevanjem potovanja učinkovine skozi telo, interakcije s celicami in eliminacije dovolj učinkovito določimo najboljši način in načrt odmerjanja učinkovine (Lanao in Fraile, 2005). Pri raziskovanju distribucije učinkovin po organih pri laboratorijskih glodavcih velikokrat uporabljajo metodo radioaktivnega označevanja učinkovine in nato zaznavanje s števcem za zaznavanje žarkov gama. Tudi pri raziskovanju tkivne distribucije TNF-α naletimo na članke, kjer je opisano označevanje proteina z radioaktivnim jodom (^{125}I) ali tritijem (^{3}H) (Beutler in sod., 1985; Ferraiolo in sod., 1988; Li in sod., 2001; Palladino in sod., 1987; Pessina in sod., 1987). Poglavitne ugotovitve v navedenih raziskavah so bile, da

do največjega kopičenja označenega TNF-α prihaja v jetrih in ledvicah, zaznali pa so ga tudi v vranici, pljučih, prebavnem traktu in koži. Ko se TNF-α veže na tkivo, se dokaj hitro metabolizira in razgradi. Zavedati se je treba, da gre pri opisani metodi za zaznavanje radioaktivnega elementa, ne pa proteina. Že Ferraiolo in sod. (1988) omenjajo, da noben od označevalcev (^{3}H in ^{125}I) ni idealen za preučevanje distribucije po organih zaradi dehalogenizacije in razpada proteina na označene peptide in/ali aminokisline ter da je očistek radioaktivnega označevalca iz polne krvi lahko drugačen kot odstranjevanje iz seruma.

Naš prvotni namen je bil, da bi TNF-α označili z zlatimi nanodelci (Bergen in sod., 2006), kar bi nam omogočilo uporabo analitske tehnike nevtronske aktivacijske analize (NAA) (Hillyer in sod., 2001, James in sod., 2007) za zaznavanje razporejanja proteina po organih. Vendar smo pri označevanju z zlatim nano reagentom (Au-NHS) naleteli na težave, saj proteina nismo mogli označiti z dovolj veliko količino reagenta. Poleg tega so bili pred kratkim objavljeni podatki (de Jong in sod., 2008), da z vezavo zlatih nanodelcev celo vplivamo na fizikalno-kemijske lastnosti nosilca zlatih nanodelcev in s tem na distribucijo v organe. To potrjujejo tudi naše lastne raziskave z drugim proteinom, pri katerem smo z vezavo zlatih nanodelcev ugotovili spremenjeno distribucijo.

Tako se je za najboljšo metodo za naš namen izkazala ELISA. Velika pomanjkljivost naših distribucijskih raziskav je vsekakor to, da so bili organi različnih skupin odvzeti ob različnem času, kar onemogoča direktno primerjavo. Res je sicer, da so to pegilirani proteini, ki se dlje časa zadržujejo v telesu, vendar bi za natančnejšo raziskavo distribucije morali ubrati drugačen pristop, ki bi poleg tega, da bi organe odvzeli ob enakih urah, vključeval tudi odvzeme tkiva v krajšem času po aplikaciji. Literaturni podatki namreč navajajo odvzeme po 8, 15, 30 ali 90 minutah (Beutler in sod., 1985; Palladino in sod., 1987; Pessina in sod., 1987). Vseeno lahko iz naših raziskav distribucije povzamemo, da smo merljive koncentracije substanc zaznali v jetrih, ledvicah, vranici in možganih. Slednje nas je nekoliko presenetilo, saj Beutler in sod. (1985) ter Pessina in sod. (1987) poročajo, da TNF-α ne prehaja v centralni živčni sistem. Vendar poznejše raziskave kažejo, da TNF-α lahko prečka krvno-možgansko bariero z receptorsko posredovanim prenosom (Pan in sod., 1997; Pan in Kastin, 2007). Koncentracija pegiliranih proteinov (P5-LK849 in N-LK800-5L), kot tudi cisteinskega analoga (LK-849), je v ledvicah večja v primerjavi s TNF-α, kar pa se ujema s tem, da zaradi večjega hidrodinamskega radija pride do oviranega očistka skozi ledvice (Fishburn, 2008; Harris in Chess, 2003).

Učinki na organe in organske sisteme

Vsi preiskani krvni parametri so bili pri vseh skupinah podgan v fizioloških mejah (Kohn in Clifford, 2002), vendar smo med skupinami vseeno ugotovili statistično značilne razlike (Tabela 4-7). Število eritrocitov, hematokrit in koncentracija hemoglobina so se spustili pod fiziološko mejo (Kohn in Clifford, 2002) in so bili tudi statistično značilno nižji pri skupinah podgan, ki so i. v. dobile LK-800, LK-849, P5-LK849 in N-LK800-5L. Pri tem moramo upoštevati, da s pogostim jemanjem krvi vplivamo predvsem na omenjene tri parametre, ki se brez pravilnega nadomeščanja tekočin lahko spustijo pod fiziološko mejo (Škrajnar in sod., 2009). Frekvenca in število krvnih odvzemov sta bila zaradi različnih PK lastnosti substanc različna in izkazalo se je, da je bil režim jemanja vzorcev pri aplikaciji substance P12-LK849 najmanj pogost in v najdaljšem časovnem obdobju (devet odvzemov krvi v 96 urah). To bi lahko bil razlog, zakaj so bili omenjeni krvni parametri pri tej skupini znotraj fiziološke meje, pri drugih skupinah pa pod njo. Seveda daljša, 12 kDa veriga PEG-a, bolj prekriva površino proteina, kar se na splošno kaže v manj izrazitih toksičnih učinkih, vendar je zaradi zasnove poskusa oziroma režima vzorčenja tukaj ta razlaga manj verjetna.

Prav tako lahko razliko v številu trombocitov pripišemo jemanju krvi. Skupina podgan, ki je dobila i. v. odmerek LK-800, je imela glede na preostale skupine statistično značilno nižje število trombocitov oz. so imele vse druge skupine podgan višje število trombocitov. Število trombocitov je lahko višje ob izgubi krvi (Smith in sod., 2002), kar se ujema z zgornjo razlago. Skupina podgan, ki je i. v. dobila LK-800, je bila žrtvovana že po 24 urah. To pa je prekratek čas, da bi organizem že odgovoril s povečano tvorbo trombocitov na dražljaj, ki je nastal ob izgubi krvi.

Pri makroskopskem pregledu organov ob žrtvovanju podgan smo ugotovili spremembe na črevesju, kar se ujema z literaturnimi podatki, ki pravijo, da je na toksične učinke parenteralno apliciranega TNF-α zlasti občutljiv gastrointestinalni trakt (Kahky in sod., 1990; Patton in sod., 1987; Tracy in sod., 1986). Pri podganah, ki so dobile i. v. infuzijo TNF-α, Tracy in sod. (1986) opisujejo segmentalno ishemijo s hemoragičnimi regijami in nekrozo v črevesju. Še zlasti občutljivo je bilo slepo črevo, kjer so se vedno pojavile infarkcije. Patton in sod. (1987) so histološke spremembe na črevesju miši in podgan opazili že 3,5 ure po enkratni bolusni aplikaciji TNF-α v odmerku 0,25 mg/kg, kar je enako našemu odmerku TNF-α v PK poskusih. Isti avtorji navajajo, da je v tankem in debelem črevesju prišlo do blagega enteritisa

s kopičenjem vnetnih celic v sluznici, vzdolž vnetnih območij v proprii pa so se pojavila piknotična in fragmentirana jedra, limfangiektazija in edem. Krvavitve v črevesju, predvsem v slepem črevesu, so se pojavile 4–6 ur po aplikaciji, spremljal pa jih je edem v submukozi, ki je po 24 urah dobil ekstremne razsežnosti. Spremembe pa so se pojavile tudi na vaskulaturi, in sicer je prišlo v štirih urah po injiciranju do prominence endotelija in marginacije levkocitov. V 24 urah so te spremembe postale še bolj očitne.

Podobne rezultate smo dobili tudi sami, saj smo v skupini podgan, ki je dobila enkratni i. v. odmerek TNF-α, opazili krvavitve v debelem črevesju ter krvavitve v slepem črevesu (Slika 4-5), te spremembe pa smo še potrdili z mikroskopskim pregledom (Slika 4-6). Kot drugi raziskovalci smo tudi mi naleteli na odluščeno plast črevesne vrhnjice, krvavitve, vdor vnetnih celic in odebelelo podsluznično plast zaradi vnetnega infiltrata in edema.

Tudi pegilirana varianta TNF-α (N-LK800-5L) je kljub tridesetkrat manjši *in vitro* biološki aktivnosti povzročila krvavitve v črevesju, ki so bile zlasti omejene na slepo črevo (Slika 4-5). Pri vseh histoloških preparatih te skupine smo opazili odebelelo podsluznično plast in vnetne celice, pri nekaterih živalih pa tudi mesta brez sluznične plasti in skupke vnetnih celic. Podobne spremembe so nastale tudi pri cisteinskem analogu (LK-849). Povsod, kjer so se pojavile omenjene spremembe, smo našli tudi reakcijo okolnega črevesnega limfnega tkiva, ki je bilo povečano po obsegu.

Opisanih sprememb pa nismo našli pri nobenem od pegiliranih variant cisteinskega analoga (P5-LK849 in P12-LK849), kar vsaj v gastrointestinalnem traktu kaže na zmanjšan toksični učinek zaradi pegilacije (Slika 4-6, e).

Naslednji organ, ki je precej občutljiv na toksične učinke TNF-α, so jetra. Zlasti pri infuzijskem načinu aplikacije direktno v portalno veno podgan se izraža direktna jetrna citotoksičnost (Gaskil III, 1988; Kahky in sod., 1990; Nakamoto in sod., 2000b), ki se kaže kot pasivna kongestija, povečanje hepatocitov, vakuolarna degeneracija, zoženje sinusoidnih prostorov in periportalni infiltrat vnetnih celic. Tracey in sod. (1988) ob i. v. aplikaciji opisujejo tudi proliferacijo majhnih žolčevodov v portalnih traktih jeter, ki jih obdaja vnetni infiltrat mononuklearnih celic. Občasno pa so prisotne tudi fokalne nekroze jetrnih celic. Sami smo opazili predvsem posamezne polimorfonuklearne limfocitne infiltrate, in sicer pri vseh skupinah podgan (Slika 4-8, c in d). Pri podganah, tretiranih s TNF-α (LK-800) in s pegilirano varianto TNF-α (N-LK800-5L), pa smo opazili tudi blago vakuolarno degeneracijo hepatocitov v okolici portalnih ven (Slika 4-8, a in b), redkeje pa celo fokalni mononuklearni

hepatitis. Za vakuolarno degeneracijo smo z barvanjem Oil-red-O dokazali, da ne gre za maščobno degeneracijo, zato sklepamo, da je prišlo do hidropske degeneracije. Tako da tudi z vidika jetrne toksičnosti morda lahko potrdimo manjši toksični učinek cisteinskega analoga TNF-α (LK-849) in njegove pegilirane različice (P5-LK849).

V ledvicah pri nobeni skupini podgan nismo opazili sprememb, ki bi jih lahko pripisali TNF-α, kar se z nekaterimi raziskavami ujema (Gaskil III, 1988; Tracey in sod., 1988), z drugimi pa ne, saj nekateri avtorji opisujejo akutno tubularno nekrozo po aplikaciji TNF-α (Kahky in sod., 1988; Tracey in sod., 1986). Drugačna vrsta spremembe v ledvicah pa je povezana s pegiliranimi proteini. Dovolj visoki odmerki pegiliranih proteinov (10-40 mg/kg), ki ne presegajo molekulske mase 70 kDa, namreč tudi ob enkratni aplikaciji povzročijo vakuolizacijo v proksimalnih ledvičnih tubulih (Bendele in sod., 1998). Resnost sprememb je obratno sorazmerna z velikostjo pripetega PEG-a (Harris in sod., 2001). Sam PEG nima tega učinka. V naših poskusih nismo opazili omenjene vakuolizacije, kar lahko razložimo s tem, da je odmerek, ki smo ga aplicirali, manjši od tistega, ki je v literaturi omenjen za povzročitev takšnih sprememb.

V pljučih podgan, ki so dobile i. v. odmerek TNF-α, Tracey in sod. (1986) opisujejo pojav intersticijske in peribronhialne pljučnice, odebelitev alveolarnih membran in okluzijo večjih arterij s trombi, sestavljenimi iz polimorfonuklearnih levkocitov. Kahky in sod., (1990) pa opisujejo edem in fokusne konsolidacije pljuč. V naših poskusih smo našli le en primer omejene mešane intersticijske in gnojne pljučnice, ki pa jo lahko na osnovi dejstev, da je bil to edini primer pljučnice in da literatura navaja podobna patološka stanja ob kateterizaciji ven (de Jong in sod., 2001; Paston in sod., 1993), pripišemo infektu, ki smo ga v pljuča vnesli skozi jugularni kateter ob aplikaciji ali ob jemanju krvi. Pri vseh podganah, ki so imele vstavljene permanentne jugularne katetre, smo opazili odebelitev interalveolarnih sten in edem okoli pljučnih žil, zlasti arterij ter odebelitev medie arterij. Pri nekaterih podganah smo v lumnu alveol našli aktivirane alveolarne makrofage. Te spremembe so značilne za kronično pljučno hipertenzijo (Durmowitz in Stenmark, 1999; Pietra in sod., 1989), ki pa jo v naših primerih lahko pripišemo permanentni kateterizaciji jugularne vene. Ta namreč lahko povzroči začasno povišan pritisk (Paulose in Dakshinamurti, 1987) in tvorbo trombov v pljučnih arterijah (de Jong in sod., 2001). Glede na to, da so bile te spremembe prisotne v

vseh skupinah podgan, ki so bile kronično kateterizirane, lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da niso posledica delovanja substanc, ampak posledica kirurškega posega.
V pljučih podgan, ki so i. v. dobile N-LK800-5L, smo opazili večje število eozinofilnih granulocitov. Takšno reakcijo bi lahko povzročili vdihani alergeni iz okolja, vendar je bilo okolje, v katerem so bile podgane nastanjene, enako kot pri drugih skupinah podgan, ki v pljučih niso imele povišanega števila eozinofilcev. Zato ostaja vzrok pojava večjega števila eozinofilcev neznan.

Sprememb ob i. v. aplikaciji TNF-α, ki jih Tracey in sod. (1988) pri podganah opisujejo na drugih organih (edematozna trebušna slinavka s fokalnimi krvavitvami, fokalna subendokardialna infiltracija srca z vnetnimi celicami ter fokalna hipereozinofilija in nekroza miokardnih celic, vranica z izpraznjenimi marginalnimi conami limfnih foliklov), pa nismo zaznali.

5.3 Toksikološko ovrednotenje na miših

Na miših smo želeli napraviti presejalni toksikološki pregled, torej opazovati, ali se ob injiciranju substanc pojavijo neželeni učinki, ki jih med poskusom opazimo kot nenavadno vedenje živali, na koncu poskusa pa jih zaznamo kot spremembe fizioloških (hematoloških, biokemijskih) parametrov in kot makroskopske ali histološke spremembe na organih. Z višino odmerjenih substanc smo želeli priti do zgornje meje, ki jo miši tolerirajo, hkrati pa smo želeli ostati pod letalnim odmerkom, pri katerem miši začnejo poginjati. Temu odmerku smo se približali z i. v. aplikacijo LK-800 v odmerku 1000 μg/kg, pri kateri je ena miš od šestih že prvi dan poginila. Izraženo v odstotkih je to 16,6 % vseh enako tretiranih miši, kar predstavlja LD_{17} za LK-800.

Pri opazovanju kliničnih simptomov takoj po aplikaciji se je jasno izrazil vpliv različnih substanc, odmerka in načina aplikacije. Za vsako substanco smo ugotovili, da so klinični znaki pri višjem odmerku bodisi bolj izraziti ali pa se pojavi več različnih simptomov hkrati. Ko smo vpliv i. v. apliciranih substanc na pojav kliničnih znakov primerjali med seboj, smo ugotovili, da ima LK-800 daleč najmočnejši vpliv na pojav kliničnih znakov. Opažanje je skladno z literaturnimi podatki, ki ob i. v. aplikaciji TNF-α mišim ali podganam navajajo

pojav nasršenosti oz. piloerekcijo (Old, 1985; Tracey in sod., 1986; Tsutsumi in sod., 1994), diarejo (Kahky in sod., 1990; Patton in sod., 1987; Tracey in sod., 1986) in dispnejo (Gaskil III, 1988; Kahky in sod., 1990; Tracey in sod., 1986). Opisani simptomi so bili opazni le na dan aplikacije, pozneje pa ne več. Pegilirana različica LK-800 (N-LK800-5L) in cisteinski analog LK-849 sta imela ob i. v. aplikaciji milejši vpliv na pojav kliničnih znakov, medtem ko je prišlo pri pegiliranem analogu P5-LK849 do najmilejših sprememb, pa še te niso bile izražene pri čisto vseh miših v skupini (Tabela 4-8).
Pri s. c. aplikaciji pa smo opazili redek pojav kliničnih simptomov (Tabela 4-9), in sicer le pri višjem odmerku rekombinantnega TNF-α in analoga LK-849. V literaturi podatkov o takšnem načinu aplikacije pri laboratorijskih glodavcih skorajda ni, je pa za peritumoralno aplikacijo opisano, da se niso pojavili neželeni učinki (Kus in sod., 1993). Pri ljudeh Chapman in sod. (1987) po s. c. aplikaciji opisujejo pojav enakih simptomov kot pri i. v. aplikaciji, vendar v milejši obliki.

TNF-α je pirogeni citokin – prek aktivacije hipotalamusnega prostaglandina E_2 (PGE_2) in s stimuliranjem interlevkina-1 povzroči dvig telesne temperature (Dinarello, 2004). Pojav povišane telesne temperature je opisan pri ljudeh, ki so i. v. dobili TNF-α (Moritz in sod., 1989; Warren in sod., 1987), prav tako pa pri opicah (Van Zee in sod., 1994) in kuncih (Dinarello in sod., 1986). V omenjenih poskusih so se odmerki TNF-α gibali od 1 do100 µg/kg. Tudi Bibby in Grimble (1989) pri laboratorijskih podganah opisujeta porast temperature pri odmerkih od 10 do 100 µg/kg, medtem ko pri višjih odmerkih (od 200 do 400 µg/kg) rektalna temperatura pade, pri čemer sta opazila odvisnost od odmerka. Do zanimivih zaključkov so prišli Kettelhut in sod. (1987, 1988), ki so pri podganah po s. c. aplikaciji TNF-α v precej visokem odmerku 4000 µg/kg opazili dvig telesne temperature, po i. v. aplikaciji enakega odmerka pa znaten padec telesne temperature in 100-odstotno smrtnost. Naše rezultate spremljanja telesne temperature lahko umestimo v opisana opazovanja, saj smo po i. v. aplikaciji substanc v odmerkih 250 ali 1000 µg/kg opazili, da je rektalna temperatura že po uri in pol padla pri vseh skupinah, padec pa je bil odvisen od odmerka (Slika 4-12). S. c. aplikacija pa je povzročila neurejeno gibanje telesne temperature in ne moremo trditi, da je prišlo do povišanja ali znižanja (Slika 4-13).

V času poskusa smo spremljali telesno maso miši, saj je TNF-α znan tudi kot povzročitelj kaheksije (staro ime: kahektin) (Beutler in Cerami, 1988). Prvi dan po aplikaciji so miši

izgubile nekaj telesne mase, v naslednjih dneh pa se je ta začela gibati proti izhodiščni vrednosti in na zadnji dan eksperimenta je v večini skupin presegla začetno telesno maso. Glede na to, da smo pojav izgube telesne mase opazili tudi pri kontrolnih skupinah, ga lahko pripišemo stresu, ki je nastal ob rokovanju z mišmi prvi dan – tehtanje, aplikacija in merjenje temperature (Balcombe in sod., 2004). Pozneje miši tega verjetno niso več doživljale kot stres. Pri s. c. aplikaciji je bila končna telesna masa miši v skupinah, ki sta dobili TNF-α, sicer nižja kot začetna, vendar je bila tudi masa kontrolne skupine nižja in zato je pripisovanje nekega pomena temu vprašljivo. Več skupin raziskovalcev je prišlo do zaključka, da ima TNF-α, apliciran laboratorijskim glodavcem več dni zaporedoma, sicer vpliv na izgubo telesne mase (hujšanje), ki je odvisno od odmerka, vendar je že naslednji dan (torej po drugi aplikaciji) opazna toleranca do tega efekta (Fraker in sod., 1988; Kettelhut in Goldberg, 1988; Michie in sod., 1989; Palladino in sod., 1987; Stovroff in sod., 1988; Tracey in sod., 1988). Tolerance pa ni, če je infuzija TNF-α kontinuirana (Darling in sod., 1990). Vseeno so Tsutsumi in sod. (1994) opazili izgubo telesne mase tudi le ob enkratnem i. v. apliciranju TNF-α, vendar v zelo visokem odmerku. Enkratni odmerek v naših poskusih je bil verjetno premajhen stimulus za povzročitev izgube telesne mase.

Hematološke in biokemijske preiskave krvi smo opravili na zadnji, 14. dan poskusa. Statistični testi so pokazali zelo malo značilnih razlik v hematoloških parametrih med kontrolno skupino in skupinami, ki so dobile preiskovane substance. Edina značilna razlika pri i. v. aplikaciji se kaže v številu trombocitov, ki je bilo statistično značilno povišano pri vseh treh skupinah miši, ki so dobile LK-800. Vendar je faktor povišanja glede na kontrolno skupino majhen in povišanje števila trombocitov ni sorazmerno z odmerkom, zato tega povišanja nismo pripisali toksičnim učinkom TNF-α. Pri s. c. aplikaciji pa se je le pri višjem odmerku LK-800 statistično značilno znižalo število levkocitov. Tracey in sod. (1988) opisujejo statistično značilno znižanje števila eritrocitov in koncentracije hemoglobina ter povišanje števila levkocitov pri podganah, ki so osem dni v trebušno votlino dobivale TNF-α v odmerku 250 μg/kg dvakrat na dan. Ob enkratnem injiciranju pa isti avtorji (Tracey in sod., 1986) niso opazili sprememb v hematokritu. Ob tretiranju s TNF-α enkrat na dan v ciklusu petih dni je pri ljudeh v fazi I kliničnih testiranj prišlo do padca števila levkocitov in trombocitov, ki pa se je po koncu terapije povrnilo na prejšnje stanje (Kimura in sod., 1987; Moritz in sod., 1989, Sherman in sod., 1988). Bistvena razlika med opisanimi poskusi in našim poskusom je število aplikacij, saj so večinoma izvajali večkratno injiciranje.

Parametri testov klinične biokemije dajejo informacijo o metabolizmu ogljikovih hidratov, lipidov in proteinov ter o (ne)okrnjenosti urinarnega, hepatobiliarnega, gastrointestinalnega, mišičnokostnega in kardiovaskularnega sistema. Spremembe v koncentracijah encimov ALT, AST, LDH in ALP so povezane s spremembami v hepatobiliarnem sistemu in kažejo na poškodbe jetrnih celic, zmanjšanje funkcionalne mase jeter, spremenjeno delovanje Kupferjevih celic in zastajanje žolča (Smith in sod., 2002). Naši poskusi niso pokazali statistično značilnih razlik v teh parametrih v primerjavi s kontrolno skupino živali. Pri i. v. aplikaciji LK-800 je sicer opaziti povečanje koncentracij encimov AST in LDH glede na kontrolno skupino, vendar razlike niso statistično značilne. Pri ljudeh z rakom v kliničnih poskusih so ob petdnevni infuziji TNF-α opazili statistično značilno povišanje koncentracij jetrnih encimov (AST, ALT, GGT in ALP), ki je višek doseglo tretji dan, proti koncu petdnevnega cikla pa so vrednosti začele upadati in so se v dveh tednih vrnile na osnovni nivo (Gamm in sod., 1991; Moritz in sod., 1989; Sherman in sod., 1988). V teh istih poskusih so opazili milejše toksično delovanje na ledvice, saj je prišlo le do zmernega dviga serumskega kreatinina in proteinurije. V naših poskusih je bil kreatinin značilno povišan le v skupini, ki smo ji podkožno aplicirali pegiliran cisteinski analog P5-LK849, v vrednosti uree pa ni bilo statistično značilnih sprememb. Elektroliti (Na^+, K^+ in Cl^-) so pokazatelji hidracijskega statusa in statistično značilno razliko smo opazili le pri skupini, ki je dobila visok odmerek pegiliranega TNF-α (N-LK800-5L), pri kateri so bili ioni klora v serumu ob i. v. aplikaciji statistično značilno znižani, pri s. c. pa statistično značilno povišani.

Encimi, ki s povišanimi vrednostmi kažejo na degenerativne in nekrotizirajoče mišične poškodbe, so CK, LDH in AST. Pri aplikaciji LK-800 je prišlo do povišanih vrednosti LDH in AST (sicer statistično neznačilnih), prav tako pa smo opazili povišane vrednosti encima CK, ki je bil pri i. v. aplikaciji povišan pri skupinah, ki so dobile rekombinantni TNF-α (LK-800) in analog LK-849 (značilno je povišan pri visokem odmerku TNF-α in nizkem odmerku LK849), ter pri s. c. aplikaciji nizkega odmerka TNF-α. Nekaj raziskav poroča o povezavi TNF-α s kaheksijo in mišično distrofijo, povezano s kroničnimi vnetnimi procesi (Pierno in sod., 2007; Reid in Li, 2001). TNF-α namreč prek aktivacije NF-κB pospeši razgradnjo mišičnih proteinov (Langen in sod., 2001; Langen in sod., 2002). Podatek se ujema s kliničnimi testiranji, saj so pacienti, ki so dobili TNF-α, pogosto poročali o mišičnih bolečinah (Gamm in sod., 1991; Moritz in sod., 1989). Pri tehniki ILP s TNF-α pri podganah pa Seynhaeve in sod. (2002) niso opazili oslabljenih mišičnih funkcij in histoloških mišičnih poškodb, medtem ko Kettelhut in Goldberg (1988) poročata, da i. v. aplikacija TNF-α pri

podganah ne povzroči razgradnje mišičnih proteinov. Tudi v našem primeru nismo opazili nekroz v srčni mišičnini, zato je malo verjetno, da bi povišane koncentracije encimov povzročilo delovanje TNF-α.

Pri makroskopskem in histološkem pregledu organov miši smo opazili spremembe, ki so bile najpogosteje prisotne v limfatičnem tkivu, zlasti v gastrointestinalnem traktu in mezenterialnih bezgavkah.
Hiperplazija germinativnih centrov v bezgavkah (folikularna hiperplazija) se pri glodavcih pojavlja kot posledica infekcije ali pa vnosa kemikalij, še zlasti če jo spremlja tudi poškodba tkiva (Greaves, 2000). V vseh skupinah miši, razen v kontrolnih skupinah, smo opazili reaktivno povečanje mezenterialnih bezgavk s hiperplastičnimi (povečanimi) folikli in germinativnimi centri. Ti so kazali t. i. izgled zvezdnatega neba, kar označuje apoptozo limfocitov in prisotnost makrofagov s celičnimi ostanki (debris). Taki makrofagi izražajo faktor MFG-E8, ki prepozna apoptotične celice, se nanje veže in pospešuje endocitozo apoptotičnih celic (Hanayama in sod., 2004). S sistemom točkovanja sprememb smo ugotovili, da so se pri skupinah miši, ki so dobile i. v. odmerke substanc, pojavile reakcije, ki jih pri kontrolni skupini ni bilo videti. S statistično analizo smo pokazali, da je do statistično značilnih razlik prišlo v obeh skupinah, ki sta i. v. dobili visok odmerek pegiliranih substanc (P5-LK849 in N-LK800-5L), ter v skupinah, ki sta i. v. dobili nizek odmerek nepegiliranih substanc (LK-800 in LK-849). V skupinah, ki so dobile s. c. odmerek substanc, ni bilo statistično značilnih razlik glede na kontrolno skupino miši.
Drugih sprememb, ki bi kazale na škodljivo delovanje apliciranih substanc, nismo opazili. To si lahko razložimo s tem, da smo substance aplicirali le enkrat, in to v odmerku, ki ni povzročil sprememb na organih ali pa so poškodbe, ki so ob tem nastale, imele reverzibilno naravo in so se v času, ki je pretekel od aplikacije do raztelesbe (14 dni), že pozdravile.

Zaključimo lahko, da smo z mutacijo treh aminokislinskih mest in usmerjeno pegilacijo molekule TNF-α pridobili substanco s precej znižano biološko aktivnostjo, vendar z znatno daljšim biološkim razpolovnim časom in manjšim toksičnim delovanjem. Menimo, da bi bilo v pridobljeni pegilirani cisteinski analog vredno vložiti dodatne raziskave in ovrednotiti predvsem delovanje na tumorje v živem organizmu. Drugi vidik uporabe pa se zaradi tako znižane biološke aktivnosti in hkrati manjše toksičnosti kaže v razvoju dominantno-negativne

oblike TNF-α, ki je uporabna za zniževanje lokalno povišanih koncentracij TNF-α pri kroničnih boleznih.

6 ZAKLJUČKI

Naš osnovni namen je bil pridobiti analog TNF-α, ki bi ga lahko usmerjeno pegilirali in s tem izboljšali PK lastnosti ter znižali toksičnost. V naši raziskavi smo z določitvijo PK lastnosti, koncentracij v organih in toksikološkim pregledom ovrednotili rekombinantni TNF-α, analog LK-849 ter njuni usmerjeno pegilirani varianti P5-LK849 in N-LK800-5L.

Z zamenjavo aminokisline glutamat s cisteiniom na mestu 107 v molekuli TNF-α smo izpolnili pogoj za izvedbo usmerjene pegilacije na cisteinu.

Z mutacijo treh aminokislin (C69, C101 in E107) rekombinantnega TNF-α smo spremenili PK lastnosti analoga LK-849.

Z usmerjeno pegilacijo rekombinantnega TNF-α in cisteinskega analoga LK-849 smo dosegli znižanje biološke aktivnosti obeh molekul glede na biološko aktivnost izhodiščnih molekul.

Z usmerjeno pegilacijo rekombinantnega TNF-α in cisteinskega analoga LK-849 smo dosegli podaljšanje biološkega razpolovnega časa, zmanjšanje distribucijskega očistka in podaljšanje srednjega časa zadrževanja.

V homogenatih organov smo s testom ELISA potrdili prisotnost in merljivost tako TNF-α in njegovega analoga LK-849 kot tudi njunih pegiliranih variant (P5-LK849 in N-LK800-5L).

Čas zadrževanja pegiliranih substanc (P5-LK849 in N-LK800-5L) in nepegiliranega cisteinskega analoga LK-849 v telesu je bil daljši v primerjavi z osnovno molekulo LK-800, vendar je bila toksičnost teh molekul kljub temu nižja kot toksičnost osnovne molekule.

Pri podganah je imel v gastrointestinalnem traktu pegiliran cisteinski analog P5-LK849 manjši toksični učinek kot rekombinantni TNF-α, cisteinski analog LKL-849 ali pegilirani TNF-α (N-LK800-5L).

Pri miših je po i. v. in s. c. načinu aplikacije LK-800 deloval najbolj toksično, pegilirani cisteinski analog P5-LK849 pa najmanj toksično.

Pri i. v. aplikaciji so TNF-α (LK-800), cisteinski analog LK-849 in njuni pegilirani varianti (P5-LK849 in N-LK800-5L) povzročili več sprememb, kot če smo jih aplicirali s. c.

Višji odmerki apliciranih substanc (LK-800, LK-849, P5-LK849 in N-LK800-5L) so glede na preučevane parametre povzročili pri miših večjo toksičnost kot nižji odmerki istih substanc, kar potrjuje od odmerka odvisno toksičnost.

Organski sistem, na katerega je TNF-α pri podganah in miših deloval najbolj toksično, je bil gastrointestinalni trakt s pripadajočim črevesnim limfatičnim sistemom.

Izmed vseh testiranih molekul (LK-800, LK-849, P5-LK849 in N-LK800-5L) smo na podlagi izboljšanih PK lastnosti in nižje toksičnosti izbrali pegiliran cisteinski analog P5-LK849 kot najbolj obetavno molekulo.

Zaradi omenjenih izboljšanih lastnosti je pegiliran cisteinski analog P5-LK849 primeren za nadaljnje raziskovanje, predvsem na *in vivo* sistemih, na katerih bi bilo smiselno ugotoviti toksično delovanje ob večkratnih zaporednih aplikacijah in njegovo delovanje na tumorje.

7 POVZETEK

Strukturno spremenjeni analogi TNF-α, ki ob terapiji ne povzročajo neželenih učinkov, so ena od možnosti za razvoj varnejših in učinkovitejših terapevtikov na področju zdravljenja rakavih obolenj. Modifikacija terapevtskih proteinov je sodoben korak pri izboljšanju lastnosti proteinskih zdravil. Pegilacija, s katero dosežemo podaljšanje biološkega razpolovnega časa, manjšo imunogenost in ugodnejši režim odmerjanja zdravila, je na področju modifikacije terapevtskih proteinov že uveljavljena metoda, kar dokazujejo tovrstni produkti na trgu.

V naši raziskavi smo združili oba pristopa in pridobili analog TNF-α, ki smo ga usmerjeno pegilirali, da smo dobili dobro definiran produkt. Odločili smo se za mutacijo oz. zamenjavo aminokisline na mestu 107 v fleksibilni zanki na konci molekule TNF-α ter zaradi uspešnejše pegilacije in čistejšega produkta tudi za zamenjavo aminokislin, ki sestavljata disulfidni mostiček. Na novo uvedenih cisteinih smo izvedli pegilacijo s 5 kDa PEG-om in pridobili produkt (P5-LK849), ki smo ga testirali na laboratorijskih živalih. Primerjali smo ga z rekombinantnim TNF-α, z nepegiliranim cisteinskim analogom LK-849 in z N-terminalno pegiliranim TNF-α (N-LK800-5L).

Za začetek se je izkazalo, da smo z mutacijo aminokislin izgubili dve tretjini biološke aktivnosti, s pegilacijo pa še skoraj vso preostalo biološko aktivnost in pristali na manj kot en odstotek. Za primerjavo je pegiliran TNF-α (N-LK800-5L) obdržal tri odstotke biološke aktivnosti. Cisteinski analog P5-LK849 se je vseeno zdel dovolj zanimiv za nadaljnje testiranje.

S PK poskusi na podganah se je izkazalo, da nam je že s samo mutacijo uspelo podaljšati biološki razpolovni čas analoga LK-849 za trikrat (1,48 ure), s pegilacijo pa smo dosegli enajstkrat daljši razpolovni čas za pegiliran TNF-α N-LK800-5L (4,85 ure) in dvajsetkrat daljši razpolovni čas za pegiliran cisteinski analog P5-LK849 (8,59 ure) v primerjavi z razpolovnim časom rekombinantnega TNF-α LK-800 (27,6 minute).

Poleg tega je pegiliran cisteinski analog P5-LK849 pri podganah povzročil manj kliničnih simptomov po i. v. aplikaciji in manj toksičnih učinkov na organe. Zlasti LK-800 in njegova

pegilirana varianta N-LK800-5L sta na gastrointestinalni trakt delovala toksično in v debelem ter slepem črevesu povzročila krvavitve in reakcijo limfnega tkiva.

V toksikološkem ovrednotenju preiskovanih substanc na miših se je izkazalo, da enkratne aplikacije terapevtskih odmerkov in štirikratnikov terapevtskih odmerkov ne povzročijo drastičnih toksikoloških učinkov. Vseeno smo med substancami in odmerki ugotovili nekaj razlik. Z i. v. odmerkom smo povzročili večjo toksičnost kot s s. c. odmerkom. Toksičnost je bila večja tudi pri višjih odmerkih istih substanc. Nekoliko je izstopal TNF-α (LK-800), ki je povzročil največ kliničnih simptomov in celo en pogin ter največjo spremembo v padcu telesne temperature. Najmanj toksično pa je deloval pegiliran cisteinski analog P5-LK849. Kljub očitnim kliničnim znakom takoj po aplikaciji substanc in padcu telesne temperature pa po štirinajstih dneh nismo ugotovili izrazitih posledic toksičnosti, saj so bili izvidi hematoloških in biokemijskih preiskav znotraj fizioloških meja. Makroskopski in histološki pregled organov sta pokazala le manjše spremembe na limfatičnem tkivu črevesja, ki so bili večinoma povezani z višjim odmerkom apliciranih substanc.

Z mutacijo rekombinantnega TNF-α smo dobili analog, ki smo ga usmerjeno pegilirali in pridobili substanco s precej znižano biološko aktivnostjo, vendar z znatno daljšim biološkim razpolovnim časom in manjšim toksičnim delovanjem. Pegiliran cisteinski analog ima dovolj obetavne lastnosti, da bi bilo vanj vredno vložiti dodatne raziskave, predvsem na *in vivo* sistemih.

8 SUMMARY

Structurally changed TNF-α analogues without adverse side effects are one of the possibilities for safer and more efficient anti-cancer drug development. Therapeutic protein modification is a contemporary step in improvement of protein therapeutics. A half-live extension, decreased immunogeneicity and privileged application of the drug can be assessed by PEGylation, which is a well established method in the therapeutic protein modification area. Some of the PEGylated drugs are approved and on the market.

We have combined both methods and produced TNF-α analogue, which was site-directly PEGylated to get a well defined product. Mutation of the amino acid 107 in the flexible loop at the end of the molecule was performed. The natural two amino acids, which form the disulphide bond, were also changed to obtain more efficient PEGylation and more pure product. PEGylation with the 5 kDa polyethylene glycol was performed on the newly introduced cysteines to get the product P5-LK849, which was tested on the laboratory animals. Recombinant TNF-α, cysteine analogue LK-849, N-terminally PEGylated TNF-α (N-LK800-5L) and PEGylated cysteine analogue P5-LK849 were compared.

The mutation of the amino acids resulted in the loss of the 2/3 of the biologic activity, which was additionally reduced by the PEGylation to the final 1 %. PEGylated TNF-α (N-LK800-5L) retained 3 % of biologic activity. Nevertheless, cysteine analogue P5-LK849 was interesting enough for further evaluation and testing.

Pharmacokinetic studies on rats revealed that the mutation of amino acids were sufficient to prolong the half-life of analogue LK-849 3-times (to 1,48 h). PEGylation led to further improvement in half-lives, being 11-times longer for the PEGylated TNF-α N-LK800-5L (4,85 h) and 20-times longer for the PEGylated cysteine analogue P5-LK849 (8,59 h). The half-life of recombinant TNF-α LK-800 was 27,6 minutes.
Additionally, PEGylated cysteine analogue P5-LK849 caused less clinical symptoms in intravenously injected rats and was less toxic for the organs. LK-800 and its PEGylated variant N-LK800-5L were particularly toxic to the gastro intestinal tract causing hemorrhages and the reaction of lymph tissue in the large intestine and cecum.

The toxicological screening in mice showed that a single application of the therapeutic dose and 4-time the therapeutic dose did not cause drastic toxicological effects. Some differences among the substances and dosages were observed. Intravenously injected substances were more toxic than subcutaneously injected substances. The toxicity was more pronounced in the higher dose of the same substance. The most of the clinical symptoms, which resulted in one death and the most pronounced drop in the body temperature, were caused by TNF-α (LK-800). The least toxic was PEGylated cysteine analogue P5-LK849. In spite of all the clinical symptoms and the body temperature drop immediately after the application no explicit signs of toxicity were observed after the 14-day period. All the parameters of hematological and biochemical tests were within the physiological limits. Macroscopical and histological investigation of the organs showed only minor changes on the lymph tissue, which were in association with the higher dose of the administered substances.

The mutation of the recombinant TNF-α and the site-directed PEGylation resulted in the substance with markedly decreased biologic activity but significantly prolonged half-life and diminished toxic effects. The nature of this PEGylated cysteine analogue is promising enough to encourage the further investigation, especially in *in vivo* systems.

9 ZAHVALA

Najlepša hvala mentorici doc. dr. Manici Černe za začetno uvajanje v poskuse in histološko diagnostiko, za spremljanje rezultatov, pogovore, posvetovanje in številne nasvete, ko se je kaj zataknilo.

Hvala predsednici in članoma komisije prof. dr. Nataši Tozon, prof. dr. Maji Čemažar in doc. dr. Jerneju Kužnerju za izčrpen pregled doktorskega dela ter vse pripombe in napotke, ki so to delo izboljšali.

Posebna zahvala gre dr. Simoni Jevševar in dr. Vladki Gaberc Porekar, ki sta več kot suvereno nadaljevali razvijanje in udejanjanje idej po smrti dr. Viktorja Menarta. Vedno sta mi priskočili na pomoč pri interpretaciji rezultatov ter mi vlivali zaupanje v raziskovalno delo, ki je nastajalo.

Hvaležna sem Ministrstvu za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo, Lek farmacevtski družbi d. d. in državi Sloveniji za finančno podporo vsa leta izobraževanja.

Hvala vsem sodelavcem z oddelka Nove generacije proteinov iz Leka, ki so priskočili na pomoč ob izolaciji in pegilaciji proteinov in mi razjasnjevali procese, ki jih nisem poznala. Maja, Menči, Katja, Irena, Vanja, Mateja K., Mateja S., Karmen, Marija, Barbara, Špela, Jaka, Mateja K. in Matejka J. – hvala!

Hvala tudi ekipi sodelavcev Kemijskega inštituta v Ljubljani, ki so prav tako prispevali velik delež, da sem sploh lahko uporabljala proteine in njihove derivate ter poznala njihovo biološko aktivnost: Simon, Maja, Špela, Gorazd, Tanja, Ana, Tea, Jelka.

Za tehnično pomoč, dobro voljo in številne inovativne nasvete ob izvedbi poskusov na živalih se najlepše zahvaljujem Darku Vojvodi, Tatjani Zajc in Špeli Kočar.

Dr. Iztoku Grabnarju se zahvaljujem za vpeljavo v svet farmakokinetike in za pomoč pri izvedbi vseh farmakokinetičnih analiz.

Mag. Mariji Nemec se zahvaljujem za biokemijske analize, izvedene v laboratoriju Klinike za prežvekovalce.

Hvala Katji Lomovšek, ki je skrbela za to, da so vsi pogodbe, aneksi in poročila vedno pravočasno prispeli na vse naslove.

Hvala tudi Doris Tibaut, dr. Ester Lovšin in dr. Luki Peternelu za raznovrstno pomoč.

Andrej Dolinšek in Stanko Mencigar sta skrbela za zdravje in dobrobit živali – hvala!

Zahvaljujem se mag. Brigiti Grecs Smole za pregled literature, Tini Škrajnar Petrovič za lektoriranje in Barbari Kmet za pregled angleškega besedila.

Biljana Hacin – popestrila si številne raziskovalne dneve, diskusije s tabo pa so olajšale raziskovalno delo.

Staršema, mami Danili in očetu Branku, se zahvaljujem za vsestransko pomoč, še zlasti za finančno pomoč ob začetku podiplomskega študija. Hvala tudi sestrama Tini in Maji – nikoli nista dvomili vame.

Iztok moj, hvala ti za vse vzpodbude in kritike, za raziskovalne napotke in za diskusije, ki so včasih trajale vso pot iz Ljubljane do Maribora. In, ne nazadnje, hvala ti tudi za družbo pri kolesarjenju v navdihujoči naravi, kjer so se nemalokrat porodile najboljše raziskovalne ideje!

10 LITERATURA

Abbas AK. Cytokines. In: Abbas AK, Lichtman AH eds. Cellular and molecular immunology. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2003: 239-60.

Abuchowski A, Mccoy JR, Palczuk NC, Vanes T, Davis FF. Effect of covalent attachment of polyethylene-glycolon immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. J Biol Chem 1977a; 252: 3582–6.

Abuchowski A, Vanes T, Palczuk NC, Davis FF. Alteration of immunological properties of bovine serum-albumin by covalent attachment of polyethylene-glycol. J Biol Chem 1977b; 252: 3578–81.

Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. J Exp Med 1992; 175: 323–9.

Bailon P, Berhold W. Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins. Pharm Sci Technol Today 1998; 1: 352–6.

Bailon P, Palleroni A, Schaffer CA et al. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: A 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon-α-2a for the treatment of hepatitis C. Bioconjug Chem 2001; 12: 195–202.

Baker DP, Lin EY, Lin K et al. N-terminally PEGylated human interferon-beta-1a with improved pharmacokinetic properties and in vivo efficacy in a melanoma angiogenesis model. Bioconjug Chem 2006; 17: 179–88.

Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C. Laboratory routines cause animal stress. Contemp Top Lab Anim Sci 2004; 43: 42–51.

Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? Cytokine Growth Factor Rev 2002; 13: 135–41.

Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. Nat Rev Cancer 2009; 9: 361-71.

Banner DW, D'Arcy A, Janes W et al. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNFβ complex: Implications for TNF receptor activation. Cell 1993; 73: 431–45.

Barbara JAJ, Smith WB, Gamble JR et al. Dissociation of TNF-α cytotoxic and proinlammatory activities by p55 receptor- and p75 receptor-selective TNF-α mutants. EMBO J 1994; 13: 843–50.

Bartsch W, Sponer G, Dietmann K, Fuchs G. Acute toxicity of various solvents in the mouse and rat. LD50 of ethanol, diethylacetamide, dimethylformamide, dimethylsulfoxide, glycerine, N-methylpyrrolidone, polyethylene glycol 400, 1,2-propanediol and Tween 20. Arzneimittelforschung 1976; 26: 1581–3.

Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. N Engl J Med 1996; 334: 1717–25.

Bendele A, Seely J, Richey C, Sennelo G, Shopp G. Renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins: short communication. Toxicol Sci 1998; 42: 152–7.

Bergen JM, von Recum HA, Goodman TT, Massey AP, Pun SH. Gold nanoparticles as a versatile platform for optimizing physicochemical parameters for targeted drug delivery. Macromol Biosci 2006; 6: 506–16.

Beutler BA. The role of tumor necrosis factor in health and disease. J Rheumatol 1999; 26: 16–21.

Beutler B, Cerami A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. Annu Rev Biochem 1988; 57: 505–18.

Beutler BA, Milsark IW, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. J Immunol 1985; 135: 3972–7.

Bibby DC, Grimble RF. Temperature and metabolic changes in rats after various doses of tumor necrosis factor alpha. J Physiol 1989; 410: 367–80.

Blick M, Sherwin SA, Rosenblum M, Gutterman J. Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients. Cancer Res 1987; 47: 2986–9.

Bocci V, Pacini A, Pessina GP, Maioli E, Naldini A. Studies on tumor necrosis factor (TNF): I. Pharmacokinetics of human recombinant TNF in rabbits and monkeys after intravenous administration. Gen Pharmacol 1987; 18: 343–6.

Bradham CA, Plümpe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein C. Mechanisms of hepatic toxicity I. TNF-induced liver injury. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 1998; 275: 387–92.

Braeckman R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of peptide and protein drugs. In: Crommelin DJA, Sindelar RD, eds. Pharmaceutical biotechnology. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997: 116–7.

Caliceti P, Veronese FM. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. Adv Drug Deliv Rev 2003; 55: 1261–77.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 1975; 72: 3666–70.

Caserman S, Kusterle M, Kunstelj M et al. Correlations between in vitro potency of polyethylene glycol-protein conjugates and their chromatographic behavior. Anal Biochem 2009; 389: 27–31.

Caserman S, Menart V, Gaines Das R, Williams S, Meager A. Thermal stability of the WHO international standard of interferon alpha 2b (IFN-α2b): application of new reporter gene assay for IFN-α2b potency determinations. J Immunol Methods 2007; 319: 6–12.

Chapman PB, Lester TJ, Casper ES et al. Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patient with advanced cancer. J Clin Oncol 1987; 5: 1942–51.

Council Directive 75/318/EEC of 20 May 1975 on the approximation of the laws of Member States relating to analytical, pharmaco-toxicological and clinical standards and protocols in respect of the testing of proprietary medicinal products.
Off J L 147, 09/06/1975: 1–12.

Creasey AA, Doyle LV, Reynolds MT, Jung T, Lin LS, Vitt CR. Biological effects of recombinant human tumor necrosis factor and its novel muteins on tumor and normal cell lines. Cancer Res 1987; 47: 145–9.

Creaven PJ, Plager JE, Dupre S et al. Phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. Cancer Chemother Pharmacol 1987; 20: 137–44.

Darling G, Fraker DL, Jensen JC, Gorschboth CM, Norton JA. Cachectic effects of recombinant human tumor necrosis factor in rats. Cancer Res, 1990; 50: 4008–13.

Davis JM, Narachi MA, Alton NK, Arakawa T. Structure of human tumor necrosis factor alpha derived from recombinant DNA. Biochemistry 1987; 26: 1322–6.

de Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJAM, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration.
Biomaterials 2008; 29: 1912–9.

de Jong WH, Timmerman A, van Raaij MTM. Long-term cannulation of the vena cava of rats for blood sampling: local and systemic effects observed by histopathology after six weeks of cannulation. Lab Anim 2001; 35: 243–8.

de Wilt JHW, ten Hagen TLM, DeBoeck G, Van Tiel ST, deBruijn EA, Eggermont A M. Tumour necrosis factor alpha increases melphalan concentration in tumour tissue after isolated limb perfusion. Br J Cancer 2000; 82: 1000–3.

Dinarello CA. Review: Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. J Endotoxin Res 2004; 10: 201-22.

Dinarello CA. The paradox of pro-inflammatory cytokines in cancer.
Cancer Metastasis Rev 2006; 25: 307-13.

Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA Jr, O'Connor JV. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. J Exp Med 1986; 163: 1433–50.

Durmowicz AG, Stenmark KR. Mechanisms of structural remodeling in chronic pulmonary hypertension. Pediatr Rev 1999; 20: 91–102.

Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-α at 2.6 Å resolution. J Biol Chem 1989; 264: 17595–605.

Eggermont AMM, Schraffordt Koops H, Klausner JM et al. Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas. The cumulative multicenter European experience. Ann Surg 1996; 224: 756–64.

Eggermont AMM, Brunstein F, Grünhagen D, ten Hagen TLM. Regional treatment of metastasis: role of regional perfusion. State of the art isolated limb perfusion for limb salvage. Ann Oncol 2004; 15: iv107–12.

EMEA. Evropsko javno poročilo o oceni zdravila (EPAR) beromun. EMEA/H/C/206. London: EMEA, 1995-2009. Dostop: 5. junij 2008 na: http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Beromun/000299sl1.pdf

EMEA. 3B Pharmaco-Toxicological Guidelines. 3BS1a Single Dose Toxicity. EudraLex Vol. 3. London: EMEA, 1995-2009. Dostop: 27. marec 2007 na: http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/3bs1aen.pdf

Ferraiolo BL, McCabe J, Hollenbach S, Hultgren B, Pitti R, Wilking H. Pharmacokinetics of recombinant human tumor necrosis factor-α in rats. Effect of size and number of doses and nephrectomy. Drug Metab Dispos 1989; 17: 369–72.

Ferraiolo BL, Moore JA, Crase D, Gribling P, Wilking H, Baughman RA. Pharmacokinetics and tissue distribution of recombinant human tumor necrosis factor-α in mice. Drug Metab Dispos 1988; 6: 270–5.

Fishburn CS. The pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to generate novel therapeutics. J Pharm Sci 2008; 97: 4167–83.

Flick DA, Gifford GE. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. J Immunol Methods 1984; 68: 167–75.

Fonda I, Pernuš M, Gaberc-Porekar V et al. Improvement of potential therapeutic value of tumor necrosis-α (TNF-α) by charge modulation in the tip region. Eur Cytokine Netw 2005; 16: 17–26.

Fraker DL, Stovroff MC, Merino MJ, Norton JA. Tolerance to tumor necrosis factor in rats and the relationship to endotoxin tolerance and toxicity. J Exp Med 1988; 168: 95–105.

Gaberc-Porekar V, Zore I, Podobnik B, Menart V. Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins. Curr Opin Drug Discov Devel 2008; 11: 242–50.

Gamm H, Lindemann A, Mertelsmann R, Herrmann F. Phase I trial of recombinant human tumour necrosis factor-α in patients with advanced malignancy. Eur J Cancer 1991; 27: 856–63.

Gaskil III HV. Continuous infusion of tumor necrosis factor: mechanisms of toxicity in the rat.
J Surg Res 1988; 44: 664–71.

Grabnar I, Mrhar A. Načrtovanje eksperimentov, optimizacijske tehnike in modeliranje pri razvoju farmacevtskih oblik. In: Kristl J, ed. Farmacevtska tehnologija na prelomu tisočletja: zbornik referatov. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo, 1998: 81–95.

Greaves P. Histopathology of preclinical toxicity studies. Interpretation and relevance in drug safety evaluation. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2000: 87–156.

Grell M, Douni E, Wajant H et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. Cell 1995; 83: 793–802.

Grünhagen DJ, de Wilt JH, Graveland WJ, Verhoef C, van Geel AN, Eggermont AM. Outcome and prognostic factor analysis of 217 consecutive isolated limb perfusions with tumor necrosis factor-alpha and melpahalan for limb-threatening soft tissue sarcoma.
Cancer 2006; 15: 1776–84.

Gursahani H, Riggs-Sauther J, Pfeiffer J, Lechuga-Ballesteros D, Fishburn CS. Absorption of polyethylene glycol (PEG) polymers: The effect of PEG size on permeability.
J Pharm Sci 2009; 98: 2847–56.

Gutman M, Sofer D, Lev-Chelouche D, Merimsky O, Klausner JM. Synergism of tumor necrosis factor-α and melphalan in systemic and regional administration: animal study.
Invasion Metastasis 1997; 17: 169–75.

Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K et al. Autoimune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. Science 2004; 304: 1147–50.

Haranaka K, Satomi N, Sakurai A. Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice.
Int J Cancer 1984; 34: 263-7.

Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals.
Nat Rev Drug Discov 2003; 2: 214–21.

Harris JM, Martin NE, Modi M. Pegylation A novel process for modifying pharmacokinetics.
Clin Pharmacokinet 2001; 40: 539-51.

Havell EA. Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance.
J Immunol 1989; 143: 2894–9.

Hillyer JF, Albrecht RM. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. J Pharm Sci 2001; 90: 1927–36.

Jäättelä M. Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor-α/ cachectin (Biology of disease). Lab Invest 1991; 64: 724–42.

James WD, Hirsch LR, West JL, O'Neal PD, Payne JD. Application of INAA to the build-up and clearance of gold nanoshells in clinical studies in mice. J Radioanal Nucl Ch 2007; 271: 455-9.

Jones EY, Stuart DI, Walker NPC. Structure of tumour necrosis factor. Nature 1989; 338: 225–8.

Jorge-Nebert LF, Derkenne S, Nebert DW. Drugs and the mouse: pharmacology, pharmacogenetics, and pharmacogenomics. In: Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL, eds. The mouse in biomedical research. Vol. 1. 2nd ed. Amsterdam, Boston: Elsevier, Academic Press, 2007: 289–320.

Kahky MO, Daniel CO, Cruz AB, Gaskill III HV. Portal infusion of tumor necrosis factor increases mortality in rats. J Surg Res 1990; 49: 138–45.

Kamijo R, Takeda K, Nagumo M et al. Induction of differentiation of human monoblastic and myeloblastic leukemia cell lines by TNF muteins.
Biochem Biophys Res Commun 1989; 160: 820–27.

Kenig M. Razvoj metod afinitetne kromatografije za izolacijo rekombinantnih proteinov iz bakterije *Escherichia coli*: doktorska disertacija. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2007.

Kettelhut IC, Fiers W, Goldberg AL. The toxic effects of tumor necrosis factor *in vivo* and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84: 4273-7.

Kettelhut IC, Goldberg AL. Tumor necrosis factor can induce fever in rats without activating protein breakdown in muscle or lipolysis in adipose tissue. J Clin Invest 1988; 81: 1384-9.

Kimura K, Taguchi T, Urushizaki I et al. Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor. Cancer Chemother Pharmacol 1987; 20: 223–9.

Kinstler O, Molineux G, Treuheit M, Ladd D, Gegg C. Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)-protein conjugates. Adv Drug Deliv Rev 2002; 54: 477–85.

Kohn DF, Clifford CB. Biology and diseases of rats. In: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, eds. Laboratory animal medicine, 2nd ed. Amsterdam, London: Academic Press, 2002: 121-65.

Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. Cell 1988; 53: 45–53.

Ksontini R, MacKay SL, Moldawer LL. Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. Arch Surg 1998; 133: 558–67.

Kus B, Serša G, Novaković S, Urbančič J, Štalc A. Modification of TNF-α pharmacokinetics in SA-1 tumor-bearing mice. Int J Canc 1993; 55: 110–4.

Kusterle M, Jevševar S, Gaberc-Porekar V. Size of pegylated protein conjugates studied by various methods. Acta Chim Slov. 2008; 55: 594–601.

Lanao JM, Fraile MA. Drug tissue distribution: study methods and therapeutic implications. Curr Pharm Des 2005; 11: 3829-45.

Lejeune FJ. High-dose recombinant tumor necrosis factor (rTNFα) administred by isolation perfusion for advanced tumours of the limbs: A model for biochemotherapy of cancer. Eur J Cancer 1995; 31: 1009–16.

Lejeune FJ, Rüegg C. Recombinant human tumor necrosis factor: an efficient agent for cancer treatment. Electron J Oncol 2006; 93: 90–100.

Lejeune FJ, Rüegg C, Lienard D. Clinical applications of TNF-α in cancer. Curr Opin Immunol 1998; 8: 817-36.

Lewi PJ, Marsboom RP. Toxicology reference data – Wistar rat. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1981: 69-177.

Li Y, Pei Y, Zhou Z et al. PEGylated recombinant human tumor necrosis factor alpha: pharmacokinetics and anti-tumor effects. Biol Pharm Bull 2001; 24: 666–70.

Loetscher H, Stueber D, Banner D, Mackay F, Lesslauer W. Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. J Biol Chem 1993; 268: 26350–7.

Lucas R, Kresse M, Latta M, Wendel A. Tumor necrosis factor: how to make a killer molecule tumor-specific? Curr Cancer Drug Targets 2005; 5: 381-92.
Mackay F, Rothe J, Bluethmann H, Loetscher H, Lesslauer W. Differential responses of fibroblasts from wild-type and TNF-R55-deficient mice to mouse and human TNF-alpha activation. J Immunol 1994; 153: 5274–84.

Mahmood I, Green MD. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the development of therapeutic proteins. Clin Pharmacokinet 2005; 44: 331–47.

Mauceri HJ, Beckett MA, Liang H, Sutton HG et al. Translational strategies exploiting TNF-α that sensitize tumors to radiation therapy. Cancer Gene Ther 2009, 16: 373-81.

Mehvar R. Modulation of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of proteins by polyethylene glycol conjugation. J Pharm Pharm Sci 2000; 3: 125–36.

Meibohm B. The role of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of biotech drugs. In: Meibohm B ed. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of biotech drugs. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006: 3–13.

Menart V. Novi analogi faktorja tumorske nekroze (TNF-α) - možnosti uporabe v molekularni biologiji ter pri zdravljenju in diagnostiki rakastih bolezni: doktorska disertacija. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2000.

Menart V, Fonda I, Kenig M, Gaberc Porekar V. Increased in vitro cytotoxycity of TNF-α analog LK-805 is based on the interaction with cell surface heparan sulfate proteoglycan. Ann N Y Acad Sci 2002; 973: 194–206.

Menart V, Gaberc-Porekar V, Kraševec N, Miličić S, Komel R. Production of recombinant human tumor necrosis factor [alpha] in two different *Escherichia coli* expression systems. Zdrav Vestn 1994; 63 (Suppl 2): 43–47.

Menart V, Kus B, Novaković S et al. Searching for new TNF-α analogs having potential application in cancer therapy. Pflugers Arch 1996; 432 (Suppl): R233–4.

Michie HR, Sherman ML, Spriggs DR, Rounds J, Christie M, Wilmore DW. Chronic TNF infusion causes anorexia but not accelerated nitrogen loss. Ann Surg 1989; 209: 19–24.

Milisav I. Zdravljenje z gensko terapijo. Zdrav Vestn 2003; 72: 85-9.

Monfardini C, Schiavon O, Caliceti P et al. A branched monomethoxypoly(ethylene glycol) for protein modification. Bioconjug Chem 1995; 6: 62–9.

Moritz T, Niederle N, Bauman J et al. Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor α in advanced malignant disease. Cancer Immunol Immunother 1989; 29: 144–50.

Mueller H. Tumor necrosis factor as an antineoplastic agent: pitfalls and promises. Cell Mol Life Sci 1998; 54: 1291–8.

Naismith JH, Brandhuber BJ, Devine TQ, Sprang SR. Seeing double: crystal structures of the type I TNF receptor. J Mol Recognit 1996; 9: 113–7.

Nakamoto T, Inagawa H, Takagi K, Soma GA New method of antitumor therapy with a high dose of tnf perfusion for unresectable liver tumors. Anticancer Res 2000a; 20: 4087–96.

Nakamoto T, Inagawa H, Takagi K et al. Reduction of hepatotoxicity of tumor necrosis factor in isolated hepatic perfusion by administration of glucocorticoid as well as lipopolysaccharide. Anticancer Res 2000b; 20: 623–8.

Nakamura S, Masegi T, Fukuoka M, Kitai et al. Interactions between novel tumor necrosis factor-α mutants and receptors on tumor and normal cells. Agric Biol Chem 1991; 55: 53–7.

Narachi MA, Davis JM, Hsu Y, Arakawa T. Role of single disulfide in recombinant human tumor necrosis factor-α. J Biol Chem 1987; 262: 13107–10.

Novaković S, Menart V, Gaber-Porekar V et al. New TNF-α analogues: a powerful but less toxic biological tool against tumours. Cytokine 1997; 9: 597–604.

Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). Science 1985; 230: 630-2.

Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. Anti-TNF-α therapies: the next generation. Nat Rev Drug Discov 2003; 2: 736–46.

Palladino MA, Shalaby MR, Kramer SM et al. Characterization of the antitumor activitites of human tumor necrosis factor-α and the comparison with other cytokines: induction of tumor-specific immunity. J Immunol 1987; 138: 4023–32.

Pan W, Banks WA, Kastin AJ. Permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to interferons. J Neuroimmunol 1997; 76: 105–11.

Pan W, Kastin AJ. Tumor necrosis factor and stroke: Role of the blood-brain barrier. Prog Neurobiol 2007; 83: 363–74.

Paston MJ, Meguid RA, Muscaritoli M et al. Dynamics of central venous catheter-related sepsis in rats. J Clin Microbiol 1993; 31: 1652-5.

Pasut G, Guiotto A, Veronese FM. Protein, peptide and non-peptide drug PEGylation for therapeutic application. Expert Opin Ther Patents 2004; 14: 859–94.

Patton JS, Peters PM, McCabe J, et al. Development of partial tolerance in the gastrointestinal effects of high doses of recombinant tumor necrosis factor-α in rodents. J Clin Invest 1987; 80:1587–96.

Paulose CS, Dakshinamurti K. Chronic catheterization using vascular-access-port in rats: blood sampling with minimal stress for plasma catecholamine determination. J Neurosci Methods, 1987; 22: 141–6.

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. Nature 1984; 312: 724–9.

Pessina GP, Pacini A, Bocci V, Maioli E, Naldini A. Studies on tumor necrosis factor (TNF): II. Metabolic fate and distribution of human recombinant TNF. Lymphokine Res 1987; 6: 35–44.

Peternel L, Škrajnar Š, Černe M. A comparative study of four cannulation procedures in rats. J Pharmacol Toxicol Methods 2009; article in press - doi:10.1016/j.vascn.2009.07.004.

Pietra GG, Edwards WD, Kay JM et al. Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National heart, lung, and blood institute, Primary pulmonary hypertension registry. Circulation 1989; 80: 1198–206.

Rivkin A. Certolizumab pegol for the management of Crohn's disease in adults. Clin Ther 2009; 31: 1158–76.

Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGylation. Adv Drug Deliv Rev 2002; 54: 459–76.

Rosenberg SA, Anderson WF, Blaese M et al. The development of gene therapy for the treatment of cancer. Ann Surg 1993; 218: 455-64.

Scott DL, Cope A. New tumour necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis: are there benefits from extending choice? Ann Rheum Dis 2009; 68: 767–9.

Selby P, Hobbs S, Viner C et al. Tumour necrosis factor in man: clinical and biological observations. Br J Cancer 1987; 56: 803–8.

Serša G, Čemažar M, Menart V, Gaberc-porekar V, Miklavčič D. Anti-tumor effectiveness of electrochemotherapy with bleomycin is increased by TNF-α on SA-1 tumors in mice. Cancer Lett 1997; 116: 85-92.

Seynhaeve ALB, de Wilt JHW, van Tiel ST, Eggermont AMM, ten Hagen TLM. Isolated limb perfusion with actinomycin D and TNF-alpha results in imprived tumour response in soft-tissue sarcoma-bearing rats but is accompanied by severe local toxicity. Br J Cancer 2002; 86: 1174–9.

Shalaby MR, Sundan A, Loetscher H, Brockhaus M, Lesslauer W, Espevik T. Binding and regulation of cellular functions by monoclonal antibodies against human tumor necrosis factor receptors. J Exp Med 1990; 172: 1517–20.

Shargel L, Wu-Pong S, Yu ABC. Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics. 5th ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2005: 1–19.

Shargel L, Wu-Pong S, Yu ABC. Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics. 5th ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2005: 52–72.

Sherman ML, Spriggs DR, Arthur KA, Imamuro K, Frei III E, Kufe DW. Recombinant human tumor necrosis factor admninistered as a five-day continuous infusion in cancer patients: phase I toxicity and effect on lipid metabolism. J Clin Oncol 1988; 6: 344–50.

Shibata H, Nakagawa S, Tsutsumi Y. Optimization of protein therapies by polymer-conjugation as an effective DDS. Molecules 2005; 10: 162–80.

Shibata H, Yoshioka Y, Ikemizu S et al. Functionalization of tumor necrosis factor-α using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window. Clin Cancer Res 2004; 10: 8293–300.

Sidhu RS, Bollon AP. Tumor necrosis factor analogs: identification of functional domains. Anticancer Res 1989; 9: 1569–76.

Smith GS, Hall RL, Walker RM. Applied clinical pathology in preclinical toxicology testing. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA eds. Handbook of toxicologic pathology. 2nd ed.
San Diego: Academic Press, 2002: 123–56.

Smyth HF, Seaton J, Fischer L. The single dose toxicity of some glycols and derivatives. J Ind Hyg Toxicol 1941; 23: 259-68.

Spriggs DR, Sherman ML, Frei E 3rd, Kufe DW. Clinical studies with tumor necrosis factor. Ciba Found Symp 1987; 131: 206–27.

Steed PM, Tansey MG, Zalevsky et al. Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants. Science 2003; 301: 1895–8.

Stovroff MC, Fraker DL, Swedenberg JA, Norton JA. Cachectin/tumor necrosis factor: a possible mediator of cancer anorexia in the rat. Cancer Res 1988; 48: 4567–72.

Škrajnar Š, Černe M, Božič M, Peternel L. Effect of replacement fluids saline, gelofusine, and blood on biochemical and hematological parameters in rats subjected to repeated blood sampling. Med Sci Monit 2009; 15: BR293-300.

Tang L, Meibohm B. Pharmacokinetics of peptides and proteins. In: Meibohm B, ed. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of biotech drugs. 1st ed. Weinheim: WILEY-VCH, 2006: 17-44.

Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA, Goeddel DV. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses.
Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88: 9292–6.

Terlikowski SJ. Tumour necrosis factor and cancer treatment: a historical review and perspectives. Rocz Akad Med Bialymst 2001; 46: 5–18.

Tracey D, Klareskog L, Sasso E, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. Pharmacol Ther 2008; 117: 244–79.

Tracey KJ. The inflammatory reflex. Nature 2002; 420: 853–9.

Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science 1986; 234: 470–4.

Tracey KJ, Wei H, Manogue K et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. J Exp Med 1988; 167: 1211–27.

Tsutsumi Y, Kihira T, Yamamoto S et al. Chemical modofication of natural human tumor necrosis factor-α with polyethylene glycol increases its anti-tumor potency.
Jpn J Cancer Res 1994; 85: 9–12.

Tsutsumi Y, Kihira T, Tsunoda S, Kanamori T, Nakagawa S, Mayumi T. Molecular design of hybrid tumour necrosis factor alpha with polyethylene glycol increases its anti-tumour potency. Br J Cancer 1995; 71: 963–8.

Tsutsumi Y, Tsunoda S, Kamada H et al. Molecular design of hybrid tumour necrosis factor-α II: the molecular size of polyethylene glycol-modified tumour necrosis factor-α affects its anti-tumour potency. Br J Cancer 1996; 74: 1090–5.

Tucker MJ. Diseases of the Wistar rat. London: Taylor & Francis, 1997: 1-22.

van der Veen AH, ten Hagen TL, de Wilt JH, van Ijken MG, Eggermont AM. An overview on the use of TNF-alpha: our experience with regional administration and developments towards new opportunities for systemic application. Anticancer Res 2000; 20: 3467–74.

van Horsen R, ten Hagen TLM, Eggermont AMM. TNF-α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects and clinical utility. Oncologist 2006; 11: 397–408.

Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 4845–9.

Van Zee KJ, Stackpole SA, Montegut WJ et al. A human tumor necrosis factor (TNF) α mutant that binds exclusively to the p55 receptor produces toxicity in the baboon.
J Exp Med 1994; 179: 1185–91.

Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors.
Annu Rev Immunol 1992; 10: 411–52.

Veronese FM, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery.
Drug Discov Today 2005; 10: 1451–8.

Wang AM, Creasey AA, Ladner MB et al. Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. Science 1985; 228: 149–54.

Wang X, Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?
Acta Pharmacol Sin 2008; 29: 1275-88.

Warren RS, Starnes F, Gabrilove JL, Oettgen HF, Brennan MF. The acute metabolic effects of tumor necrosis factor administration in humans. Arch Surg 1987; 122: 1396-1400.

Webster R, Didier E, Harris P et al. PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. Drug Metab Dispos 2007; 35: 9-16.

Yan Z, Zhao N, Wang B et al. A mutated human tumor necrosis factor-alpha improves the therapeutic index *in vitro* and *in vivo*. Cytotherapy 2006; 8: 415-23.

Zahn G, Greischel A. Pharmacokinetics of tumor necrosis factor alpha after intravenous administration in rats; Dose dependence and influence of tumor necrosis factor beta. Arzneimittelforschung 1989; 39: 1180–2.

Zarovni N, Monaco L, Corti A. Inhibition of tumor growth by intramuscular injection of cDNA encoding tumor necrosis factor alpha coupled to NGR and RGD tumor-homing peptides.
Hum Gene Ther 2004; 15: 373-82.

Zwaveling JH, Maring JK, Girbes ARJ, Koops HS. Side effects of cancer treatment with recombinant human tumor necrosis factor alpha: a new challenge for the intensive care. In:

Zwaveling JH, ed. Systemic side effects of isolated limb perfusion with tumor necrosis factor alpha. Doctoral Thesis. Groningen: Rijksuniversiteit, 1997: 9–24.

11 PRILOGE

Hematološke preiskave

Intravenozna aplikacija

Tabela 11-1: **Rezultati hematoloških preiskav pri miših na koncu poskusa. Podatki so podani kot povprečje ± SD. Enosmerna ANOVA in Dunnettov post test, *p<0,05 glede na kontrolno skupino. WBC = število levkocitov; RBC = število eritrocitov; HGB = koncentracija hemoglobina; HCT = hematokrit; PLT = število trombocitov; MCV = povprečni volumen eritrocitov; MCH = povprečna masa hemoglobina v eritrocitih; MCHC = povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih.**

skupina in odmerek (μg/kg)	WBC (10^9/L)	RBC (10^{12}/L)	HGB (g/L)	HCT (L/L)	PLT (10^9/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)
kontrola	5,07 ± 0,66	8,56 ± 1,96	137,8 ± 28,5	0,438 ± 0,091	999 ± 314	51,3 ± 2,0	16,2 ± 0,7	316,5 ± 7,8
LK-800 (500)	4,93 ± 1,01	8,69 ± 0,57	138,5 ± 7,8	0,442 ± 0,030	1390 ± 96*	51,0 ± 1,4	16,0 ± 0,5	314,0 ± 4,1
LK-800 (250)	7,45 ± 1,39	9,17 ± 0,28	146,0 ± 3,5	0,465 ± 0,021	1345 ± 138*	50,8 ± 1,2	16,0 ± 0,5	314,5 ± 9,8
LK-800 (1000)	5,38 ± 0,40	8,80 ± 0,34	141,6 ± 3,3	0,446 ± 0,009	1421 ± 131*	50,8 ± 1,9	16,1 ± 0,5	317,8 ± 3,6
LK-849 (250)	5,83 ± 2,11	8,89 ± 0,40	142,5 ± 8,3	0,456 ± 0,027	994 ± 382	51,3 ± 2,0	16,1 ± 0,5	312,8 ± 5,2
LK-849 (1000)	7,45 ± 2,35	8,81 ± 0,29	140,3 ± 6,3	0,453 ± 0,019	1257 ± 81	51,3 ± 1,5	15,9 ± 0,3	310,2 ± 5,9
P5-LK849 (250)	5,92 ± 1,88	9,15 ± 0,37	147,3 ± 5,1	0,464 ± 0,020	1006 ± 127	50,5 ± 1,5	16,1 ± 0,5	317,5 ± 3,7
P5-LK849 (1000)	6,10 ± 2,19	8,70 ± 0,66	140,8 ± 8,8	0,442 ± 0,030	1125 ± 184	50,8 ± 1,5	16,2 ± 0,7	319,2 ± 4,8
N-LK800-5L (250)	7,43 ± 2,09	9,05 ± 0,73	147,3 ± 9,5	0,462 ± 0,037	1026 ± 225	51,0 ± 2,0	16,3 ± 0,8	319,8 ± 7,5
N-LK800-5L (1000)	6,12 ± 1,27	8,89 ± 0,58	142,0 ± 6,9	0,453 ± 0,031	961 ± 190	51,2 ± 1,2	16,0 ± 0,6	313,8 ± 7,7

Subkutana aplikacija

Tabela 11-2**: Rezultati hematoloških preiskav pri miših na koncu poskusa. Podatki so podani kot povprečje ± SD. Enosmerna ANOVA in Dunnettov post test, *p<0,05 glede na kontrolno skupin. WBC = število levkocitov; RBC = število eritrocitov; HGB = koncentracija hemoglobina; HCT = hematokrit; PLT = število trombocitov MCV = povprečni volumen eritrocitov; MCH = povprečna masa hemoglobina v eritrocitih; MCHC = povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih.**

skupina in odmerek (µg/kg)	WBC (10^9/L)	RBC (10^{12}/L)	HGB (g/L)	HCT (L/L)	PLT (10^9/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)
kontrola	8,30 ± 1,77	9,52 ± 0,70	149,5 ± 6,2	0,474 ± 0,026	1042 ± 57	49,8 ± 1,2	15,8 ± 0,6	315,8 ± 8,4
LK-800 (250)	6,85 ± 0,83	8,85 ± 0,28	144,2 ± 6,0	0,458 ± 0,021	1001 ± 168	51,8 ± 1,9	16,3 ± 0,6	314,5 ± 5,0
LK-800 (1000)	5,57 ± 1,36*	9,19 ± 0,52	142,0 ± 4,2	0,448 ± 0,015	1032 ± 258	49,0 ± 2,8	15,5 ± 1,0	316,7 ± 5,4
LK-849 (250)	7,70 ± 1,74	9,20 ± 0,44	146,7 ± 6,0	0,463 ± 0,019	921 ± 199	50,2 ± 2,1	16,0 ± 0,7	317,0 ± 7,8
LK-849 (1000)	6,98 ± 2,09	9,03 ± 0,55	142,5 ± 8,2	0,454 ± 0,023	832 ± 372	50,2 ± 1,7	15,8 ± 0,4	314,0 ± 7,9
P5-LK849 (250)	6,95 ± 1,38	9,40 ± 0,65	149,3 ± 3,5	0,476 ± 0,021	827 ± 146	50,7 ± 1,8	15,9 ± 0,8	314,2 ± 9,7
P5-LK849 (1000)	6,26 ± 0,82	9,03 ± 0,37	144,9 ± 6,0	0,473 ± 0,017	818 ± 219	52,6 ± 1,6	16,0 ± 0,4	306,1 ± 4,7
N-LK800-5L (250)	9,18 ± 1,96	9,32 ± 0,70	148,2 ± 7,0	0,474 ± 0,034	822 ± 323	50,8 ± 0,8	15,9 ± 0,5	313,0 ± 9,4
N-LK800-5L (1000)	6,30 ± 1,27	8,57 ± 1,08	137,3 ± 17,4	0,442 ± 0,057	597 ± 225	51,8 ± 1,2	16,0 ± 0,1	310,5 ± 8,3

Biokemijske preiskave

Intravenozna aplikacija

Tabela 11-3: **Rezultati biokemijskih preiskav seruma pri miših na koncu poskusa. Podatki so podani kot povprečje ± SD. Enosmerna ANOVA in Dunnettov post test, *p<0,05 glede na kontrolno skupino. AST = aspartat-aminotransferaza; ALT = alanin-aminotransferaza; LDH = laktat-dehidrogenaza; CK = kreatin-kinaza; aP = anorganski fosfor; ALP = alkalna-fosfataza.**

skupina in odmerek (µg/kg)	bilirubin (µmol/L)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	LDH (U/L)	CK (U/L)
kontrola	5,84 ± 1,10	144,8 ± 2,5	7,99 ± 1,38	109 ± 1	118,2 ± 19,6	39 ± 7	390 ± 46	503 ± 190
LK-800 (500)	5,42 ± 1,60	145,7 ± 1,2	7,25 ± 0,67	110 ± 1	117,3 ± 37,7	52 ± 31	371 ± 66	263 ± 219
LK-800 (250)	6,33 ± 1,27	145,8 ± 1,5	7,38 ± 1,06	108 ± 1	158,3 ± 38,9	39 ± 10	415 ± 106	1088 ± 598
LK-800 (1000)	3,89 ± 2,44	146,3 ± 3,1	8,16 ± 1,30	109 ± 1	239,8 ± 129,3	52 ± 16	721 ± 288	2319 ± 1787*
LK-849 (250)	5,47 ± 1,89	146,6 ± 1,7	7,34 ± 0,69	109 ± 2	222,0 ± 117,7	55 ± 20	641 ± 261	1851 ± 1299*
LK-849 (1000)	5,15 ± 1,34	147,5 ± 2,3	7,35 ± 0,60	110 ± 1	187,5 ± 80,7	65 ± 41	663 ± 296	1367 ± 810
P5-LK849 (250)	5,25 ± 2,36	148,7 ± 3,1	6,99 ± 0,59	112 ± 3	218,3 ± 123,2	69 ± 60	645 ± 343	491 ± 365
P5-LK849 (1000)	5,31 ± 1,64	145,8 ± 1,9	7,02 ± 0,34	111 ± 2	134,3 ± 41,6	32 ± 5	446 ± 99	276 ± 160
N-LK800-5L (250)	6,31 ± 1,01	142,6 ± 0,5	7,84 ± 0,76	108 ± 0	155,3 ± 29,5	36 ± 8	476 ± 100	461 ± 122
N-LK800-5L (1000)	5,29 ± 2,09	139,2 ± 7,8	6,91 ± 0,84	105 ± 5*	121,7 ± 21,0	35 ± 5	360 ± 112	420 ± 191

skupina in odmerek (µg/kg)	aP (mmol/L)	urea (mmol/L)	kreatinin (µmol/L)	ALP U/L)	trigliceridi (mmol/L)	proteini (g/L)	albumin (g/L)
kontrola	2,34 ± 0,68	7,78 ± 0,52	53 ± 2	87 ± 25	1,74 ± 0,41	54,0 ± 1,7	35,6 ± 1,0
LK-800 (500)	2,12 ± 0,24	6,66 ± 0,57	50 ± 1	83 ± 24	1,44 ± 0,36	56,1 ± 3,5	37,1 ± 1,6
LK-800 (250)	2,43 ± 0,37	7,37 ± 0,70	49 ± 7	80 ± 25	1,59 ± 0,31	55,0 ± 2,3	35,1 ± 2,5
LK-800 (1000)	2,51 ± 0,32	8,13 ± 0,32	49 ± 1	78 ± 5	1,80 ± 17,20	55,9 ± 0,6	36,2 ± 1,2
LK-849 (250)	2,11 ± 0,32	7,44 ± 0,32	49 ± 1	77 ± 5	1,72 ± 18,51	59,3 ± 0,5	36,2 ± 5,2
LK-849 (1000)	1,82 ± 0,29	8,42 ± 1,29	43 ± 11	78 ± 26	1,92 ± 0,94	53,9 ± 5,1	33,3 ± 3,2
P5-LK849 (250)	1,77 ± 0,30	8,75 ± 1,61	52 ± 5	101 ± 29	1,21 ± 0,31	55,1 ± 2,4	33,4 ± 1,3*
P5-LK849 (1000)	1,80 ± 0,15	7,24 ± 0,68	51 ± 6*	94 ± 24	1,26 ± 0,25	55,7 ± 4,0	33,4 ± 1,2*
N-LK800-5L (250)	2,18 ± 0,51	7,86 ± 0,77	47 ± 4	106 ± 17	1,18 ± 0,31	54,8 ± 3,2	35,1 ± 1,7
N-LK800-5L (1000)	1,78 ± 0,18	7,07 ± 0,84	45 ± 6	85 ± 24	1,22 ± 0,48	50,4 ± 4,1	32,5 ± 2,6

Subkutana aplikacija

Tabela 11-4: **Rezultati biokemijskih preiskav seruma pri miših na koncu poskusa. Podatki so podani kot povprečje ± SD. Enosmerna ANOVA in Dunnettov post test, *p<0,05 glede na kontrolno skupino. AST = aspartat-aminotransferaza; ALT = alanin-aminotransferaza; LDH = laktat-dehidrogenaza; CK = kreatin-kinaza; aP = anorganski fosfor; ALP = alkalna-fosfataza.**

skupina in odmerek (μg/kg)	bilirubin (μmol/L)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	LDH (U/L)	CK (U/L)
kontrola	6,19 ± 1,12	140,7 ± 5,5	6,97 ± 0,68	106 ± 4	138,7 ± 38,9	32 ± 6	432 ± 137	611 ± 427
LK-800 (250)	6,43 ± 1,72	143,7 ± 1,5	8,31 ± 0,92	110 ± 1	191,2 ± 104,3	48 ± 29	517 ± 242	1173 ± 850*
LK-800 (1000)	5,13 ± 1,01	145,5 ± 1,4	7,29 ± 0,60	110 ± 1	127,7 ± 22,5	33 ± 7	410 ± 71	381 ± 240
LK-849 (250)	5,51 ± 1,84	146,0 ± 1,2	8,04 ± 1,58	109 ± 1	160,2 ± 79,5	60 ± 63	606 ± 414	438 ± 145
LK-849 (1000)	5,43 ± 1,03	144,2 ± 1,5	7,38 ± 0,81	109 ± 1	163,0 ± 68,7	39 ± 9	450 ± 194	766 ± 575
P5-LK849 (250)	6,12 ± 1,20	143,7 ± 5,5	6,97 ± 0,28	108 ± 4	144,5 ± 44,1	39 ± 13	434 ± 117	671 ± 355
P5-LK849 (1000)	5,97 ± 0,75	139,6 ± 5,1	6,46 ± 0,24	105 ± 5	177,7 ± 80,1	40 ± 7	512 ± 135	690 ± 472
N-LK800-5L (250)	5,83 ± 1,84	144,0 ± 1,6	8,23 ± 1,24	111 ± 1	136,3 ± 36,4	41 ± 10	412 ± 99	362 ± 99
N-LK800-5L (1000)	4,96 ± 1,04	145,4 ± 1,5	7,02 ± 0,29	111 ± 2*	182,5 ± 91,9	44 ± 13	514 ± 185	426 ± 284

skupina in odmerek (μg/kg)	aP (mmol/L)	urea (mmol/L)	kreatinin (μmol/L)	ALP U/L)	trigliceridi (mmol/L)	proteini (g/L)	albumin (g/L)
kontrola	1,93 ± 0,32	7,37 ± 0,82	46 ± 7	102 ± 21	1,53 ± 0,70	52,8 ± 2,1	36,7 ± 1,8
LK-800 (250)	1,91 ± 0,24	7,11 ± 0,71	45 ± 5	75 ± 18	1,30 ± 0,56	53,0 ± 2,4	35,1 ± 2,2
LK-800 (1000)	1,93 ± 0,24	7,02 ± 0,38	45 ± 3	83 ± 27	1,12 ± 0,21	54,9 ± 2,0	36,2 ± 2,5
LK-849 (250)	1,97 ± 0,38	7,73 ± 1,40	51 ± 6	86 ± 25	1,40 ± 0,40	56,4 ± 2,1	35,8 ± 2,1
LK-849 (1000)	2,14 ± 0,42	7,10 ± 1,14	51 ± 3	80 ± 15	1,52 ± 0,50	52,8 ± 5,3	34,1 ± 3,3
P5-LK849 (250)	1,84 ± 0,33	7,29 ± 0,79	56 ± 5*	95 ± 11	1,41 ± 0,20	54,2 ± 4,6	34,2 ± 3,1
P5-LK849 (1000)	1,67 ± 0,22	7,36 ± 1,08	52 ± 2	86 ± 31	1,49 ± 0,25	54,2 ± 2,2	33,5 ± 2,5
N-LK800-5L (250)	2,00 ± 0,44	7,87 ± 0,50	52 ± 4	94 ± 14	1,71 ± 0,32	56,2 ± 4,0	36,1 ± 2,6
N-LK800-5L (1000)	1,78 ± 0,31	8,88 ± 1,54	49 ± 4	100 ± 31	1,87 ± 0,37	56,0 ± 1,7	35,4 ± 1,9