

Incremento de la biodisponibilidad del IFN α 2b cubano modificado por conjugación química con una molécula ramificada de Polietilenglicol.

Autoría principal

Rolando Páez Meireles¹.

Otros autores

Fidel R Castro Odio¹, José Ramón Hernández², Dinorah Torres Idavoy¹, Karelía Cosme Díaz¹, Hugo Nodarse Cuni¹, Oscar Cruz Gutierrez¹, Ernesto Urrutia Valdés¹, Carmen Chuay Silva¹, Jorge Luis Vega¹, Yolegnys Peña Varona,¹ Luis Herrera Martínez¹, Matilde López Abad¹, Pedro López Saura¹, Idrian García García¹, Odaly Amarante González¹, Eduardo Martínez Díaz¹, Iván Sosa Gallo¹, Joel Ferrero Bibilonia¹, Lourdes Costa Anguiano¹, Eduardo Fernández³, Yanet Terrero Socorro¹, Sheila Padrón Morales¹, Lázara Muñoz Hernández¹, Inalvis Herrera Riva¹s, Dania Bacardí Fernández¹, Yadira Hidalgo Boza¹, Isabel Apezteguía Rodríguez¹, Vivian Saez Martínez², Carlos Peniche Covas².

Colaboradores

Lázaro Heynngnezz, Catalina Álvarez, Hainer Martínez Cabrera, Manuel Enrique Montane, Iriaq Viscaino, Joana González, Reynier Baez, Liurdís Caballero González, Elian Cruz Peñalver, Yenisel Hernández, Niurys Gonzalez, Raymersy Aldana, Israel Martinez Mirabal, Lázaro Estenoz Cosme, Dary Fasco Tornés, Ernesto Olazabal Toledo, Jorge A. Presno Menéndez, Rafael del Toro Llanes, Mario Alberto Cuadras, Martha Pupo Peña, Mónica Navarro Mena, Dianelis Cabrera Perez, Yohanix López García, Víctor Arébalos Rodríguez, Luciano Hernández, Vivian Sáez, Raymersy Aldana, Maribel Vega Simón, José Luis Marcelo, Yanelys Palacio, Susset Valderrama, Jorge Luis Lopez, Lena Hernandez, Ileana Rosales, Cristina Rodríguez Rodríguez, Yurisleidydis Aldama, Joaquin González, Carlos Arturo, Ilena hernández, Mercedes Ortega, Yair Quiñones, Ana María Cinza, Norelbys Albelo, Ines Heredia, Yai Cruz, Susana Cubas, Dunieskys Jiménez, Ignacio Rodríguez, Carlos A. González Delgado, Alina Díaz Machado, Marisol Cruz Díaz, Orlando Pérez Pérez, Cimara H. Bermúdez Badell, Iraldo Bello Rivero, Carmen M. Valenzuela Silva, Aleydis Gómez Rios, Natacha Pérez Rodriguez, Denis Alvarez Betancourt, Marbel Ramos Alonso, Jose Francisco Calderon, Leonardo de la Guardia, Jose A Mederos Lastre, Alejandro Hernández Pagliery, Erick Sanchez Hernandez, Karla Ruiz Hernández, Maria de los A Denis, Gerardo Garcia Illera, Adisley Dorta Martínez, Indira Plá Parada, Angela Fidalgo Maceo, Michael Alderete, Ruben Lopez, Yenay Diaz, Lisbet Melo, Yalepsy Padilla, Rosa Aguilar, Galina Moya, Eugenio Hardy.

Entidad ejecutora principal

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

Entidades participantes

²Centro de Biomateriales (BIOMAT), Universidad de la Habana.

³IFAL Universidad de la Habana.

Autor para correspondencia

Rolando Páez Meireles.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

Apartado Postal 6162, C.P. 10600, Playa, Ciudad de La Habana.

Teléfono: 271 6022 ext. 5218/ 5220

Fax: 271 3208

Correo electrónico: rolando.paez@cigb.edu.cu

Aporte científico de cada autor al resultado

- ✓ **Rolando Páez Meireles** (15%): Autor principal y líder del proyecto. Gerencia del proyecto desde sus inicios hasta su materialización. Concibió y diseñó el producto junto a otros autores. Diseñó los estudios del desarrollo del producto. Diseñó los estudios de desarrollo farmacéutico. Contribuyó al montaje de los métodos analíticos para el control y liberación del producto. Participó en la confección final del dossier para la solicitud del registro del producto. Participó en los estudios clínicos. Participó en los aspectos relacionados con la elaboración de las fichas de costos del producto. Participó en los aspectos relacionados con la producción y liberación de los lotes que se entregaron al MINSAP para la introducción del producto en Cuba. Participó en la transferencia al sistema productivo. Participó y diseñó las mejoras tecnológicas del proceso productivo.
- ✓ **Fidel Raúl Castro Odio** (14%): Participó en el diseño del producto y en su desarrollo. Diseñó y participó en los estudios de obtención del reactivo PEG. Participó en los estudios clínicos. Elaboró partes importantes del Registro del producto. Participó en los estudios de desarrollo farmacéutico. Participó en los aspectos relacionados con la producción y liberación de los lotes que se entregaron al MINSAP para la introducción del producto en Cuba. Participó en la transferencia al sistema productivo. Participó y diseñó las mejoras tecnológicas del proceso productivo.
- ✓ **Dinorah Torres Idavoy** (14%): Participó en el desarrollo analítico del producto. Elaboró partes importantes del Registro del producto. Participó en los estudios de desarrollo farmacéutico. Participó y diseñó las mejoras tecnológicas del proceso productivo. Estableció los ensayos para evaluar el producto. Participó en la transferencia al sistema productivo (incluye sistema de control de calidad). Participó en la producción y liberación de los lotes que se entregaron al MINSAP para la introducción del producto en Cuba.
- ✓ **Oscar Cruz Gutierrez** (11%): Garantizó todo lo relacionado con el ingrediente farmacéutico activo de IFN alfa 2b. Participó en los aspectos relacionados con la producción y liberación de los lotes que se entregaron al MINSAP para la introducción del producto en Cuba. Participó en la transferencia al sistema productivo. Participó en las mejoras tecnológicas del proceso productivo. Elaboró partes importantes del Registro del producto.
- ✓ **Hugo Nodarse Cuní** (11%): Fue Monitor Principal del estudio clínico. Coordinó la realización de los talleres de unificación de criterios. Diseñó, coordinó, participó y garantizó en el terreno el cronograma de ejecución del estudio. Facilitó los sueros para su análisis y colaboró en el procesamiento estadístico de los valores, finalmente confeccionó el informe final del estudio clínico. Elaboró partes importantes del Registro del producto. Diseñó el estudio clínico fase IV y participó en la elaboración de su informe final.
- ✓ **José Ramón Hernández** (8%): Participó en el diseño y gerencia del producto. Participó en su desarrollo. Es el autor principal de dos artículos relacionados con el producto. Diseñó y participó en los estudios de obtención del reactivo PEG.
- ✓ **Ernesto Urrutia Valdés** (2%): Garantizó todo lo relacionado con el ingrediente farmacéutico activo de IFN alfa 2b. Participó en los aspectos relacionados con la producción y liberación de los lotes que se entregaron al MINSAP para la introducción del producto en Cuba. Participó en la transferencia al sistema productivo. Participó en las mejoras tecnológicas del proceso productivo.

- ✓ **Karelia Cosme Díaz** (2%): Diseñó y participó en el desarrollo preclínico del producto. Elaboró partes importantes del Registro del producto.
- ✓ **Carmen Chuay Silva** (2%): Participó en la confección final del dossier para la solicitud del registro del producto. Participó en la confección y elaboración del material de envase del producto. Participó en la producción y liberación de los lotes que se entregaron al MINSAP para la introducción del producto en Cuba. Participó en la introducción del producto terminado en el Biocen.
- ✓ **Jorge Luis Vega** (1%): Garantizó todo lo relacionado con el ingrediente farmacéutico activo de IFN alfa 2b. Participó en la elaboración de los contratos entre las instituciones que forman el sistema productivo. Participó en los aspectos relacionados con la producción y liberación de los lotes que se entregaron al MINSAP para la introducción del producto en Cuba. Participó en la introducción del producto terminado en el Biocen.
- ✓ **Yolegnys Peña Varona** (1%): Coordinación y seguimiento de la introducción del producto en el Biocen. Participó en los aspectos relacionados con la producción y liberación de los lotes que se entregaron al MINSAP para la introducción del producto en Cuba. Participó en la introducción del producto terminado en el Biocen.
- ✓ **Luis Herrera Martínez** (1%): Aportó ideas a todos los diseños elaborados, propuso soluciones de tipo científicas y logísticas para que el proyecto se materializara.
- ✓ **Matilde López Abad** (1%): Diseñó y participó en los estudios de desarrollo farmacéutico del producto. Participó en los aspectos relacionados con la producción y liberación de los lotes que se entregaron al MINSAP para la introducción del producto en Cuba. Participó en la introducción del producto terminado en el Biocen.
- ✓ **Pedro López Saura** (1%): Uno de los investigadores principales del desarrollo clínico del producto. Aporte de conocimientos y experiencia sobre el IFN alfa 2b que permitió el diseño de los experimentos.
- ✓ **Idrian García García** (1%): Fue el Monitor Principal del estudio clínico. Coordinó la realización de los talleres de unificación de criterios. Diseñó, coordinó, participó y garantizó en el terreno el cronograma de ejecución del estudio. Facilitó los sueros para su análisis y colaboró en el procesamiento estadístico de los valores, finalmente confeccionó el informe final del estudio clínico.
- ✓ **Carlos Peniche Covas** (1%): Participó en la confección de uno de los artículos y Tutor de Tesis de Doctorado.
- ✓ **Odaly Amarante González** (1%): Participó en el desarrollo y transferencia de los controles analíticos del producto.
- ✓ **Eduardo Martínez Díaz** (1%): Aportó ideas a todos los diseños elaborados, propuso soluciones de tipo científicas y logísticas para que el proyecto se materializara.
- ✓ **Iván Sosa Gallo** (1%): Participó en la producción y transferencia del reactivo PEG.
- ✓ **Joel Ferrero Bibilonia** (1%): Participó en el desarrollo del producto.
- ✓ **Lourdes Costa Anguiano** (1%): Participó en la transferencia de los controles analíticos del producto. Participó en los aspectos relacionados con la liberación de los lotes que se entregaron al MINSAP para la introducción del producto en Cuba.
- ✓ **Eduardo Fernández** (1%): Diseñó y participó en los estudios preclínicos de farmacocinética del producto.

- ✓ **Yanet Terrero Socorro** (1%): Participó en el desarrollo y transferencia de los controles analíticos del producto.
- ✓ **Sheila Padrón Morales** (1%): Participó en el desarrollo y transferencia de los controles analíticos del producto.
- ✓ **Lázara Muñoz Hernández** (1%): Participó en el desarrollo y transferencia de los controles analíticos del producto.
- ✓ **Inalvis Herrera Rivas** (1%): Participó en el desarrollo y transferencia de los controles analíticos del producto.
- ✓ **Dania Bacardí Fernández** (1%): Diseñó y participó en el desarrollo preclínico del producto. Elaboró partes importantes del Registro del producto.
- ✓ **Yadira Hidalgo Boza** (1%): Participó en la confección y elaboración del desarrollo del material de envase del producto. Participó en la confección final del dossier para la solicitud del registro del producto.
- ✓ **Isabel Apezteguía Rodríguez** (1%): Participó en la transferencia del producto y de las técnicas analíticas al sistema productivo. Participó en la elaboración del dossier del producto.
- ✓ **Vivian Sáez Martínez** (1%): Participó en la confección de dos de las publicaciones. Participó en el diseño y realización de las técnicas analíticas para el control del producto en sus etapas iniciales.

Resumen

Los interferones (IFNs) comprenden a una familia de citocinas con propiedades biológicas definidas que incluyen efecto antiviral immunoregulador y actividad anti-proliferativa. La utilidad clínica de los fármacos basadas en los interferones ha estado limitada por la biodisponibilidad relativamente restringida del mismo en sangre. Durante los últimos años, la tecnología de Peguiliación (conjugación de péptidos y proteínas a moléculas de polientilenglicol (PEG) ha tenido grandes avances en el desarrollo de formulaciones de acción prolongada. Esta tecnología elimina muchas de las limitaciones en el uso de proteínas terapéuticas, como por ejemplo los IFNs.

Utilizando la peguiliación se la logrado incrementar el tiempo de vida media en sangre, mayor estabilidad y disminución de la inmunogenicidad del IFN. En la actualidad existen reportes en la literatura científica y productos de IFN alfa 2b peguiliado, disponibles comercialmente, basados en la conjugación de moléculas de PEG de 5 000, 12 000 Da.

En este trabajo se logró la modificación química de la molécula de IFN alfa 2b utilizando un polímero de PEG ramificado de 40 KDa de peso molecular, constituyendo el primer reporte de conjugación del IFN alfa 2b a una molécula específica de PEG ramificada. Se demostró el efecto de la peguiliación sobre el incremento del tiempo de vida media de la droga en sangre, al compararlo con la molécula de IFN no modificada, tanto en estudios preclínicos como clínicos. El protocolo clínico se realizó acorde a la Declaración de Helsinki y se aprobó por el comité de ética del hospital participante, así como por la Agencia Nacional Reguladora de Medicamentos (CECMED).

Como parte del trabajo se diseñó un proceso tecnológico para la conjugación, purificación y formulación de la molécula de IFN α 2b - PEG. La caracterización fisicoquímica y biológica demostró que cumple con los parámetros exigidos internacionalmente para poder ser usado como producto farmacéutico en el tratamiento de enfermedades como la hepatitis C por lo que le fue otorgado el registro Sanitario en el año 2009.

Este trabajo permitió el establecimiento de una plataforma tecnológica para la obtención de productos con moléculas conjugadas a PEG, en estos momentos ya se encuentran en fase de Desarrollo tres nuevas moléculas IFN-PEG 4,48 KDa, GCSF-PEG y EPO-PEG.

Este trabajo además ha sido publicado, en tres revistas internacionales (Pharmaceutical Research, Vol. 22, No. 8, August 2005. "PEGylated Interferon- α 2b: A Branched 40K Polyethylene Glycol Derivative"; Quim. Nova, Vol. 52, No. 6, 1426-1431, 2009. "Un método Reproducible para obtener PEG Biramificado Monofuncional de Alta Pureza " y BMC Pharmacology 2010, 10:15 <http://www.biomedcentral.com/1471-2210/10/15>. "Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of two "pegylated" interferon alpha-2 formulations in healthy male volunteers: a randomized, crossover, double-blind study".

Comunicación Corta

Introducción

Como se plantea, la utilización de los Interferones alfa como terapéutico se ha visto grandemente limitada por la baja biodisponibilidad de la proteína, siendo la modificación química de la proteína y, entre éstas, la conjugación a una molécula de Polietilenglicol (Peguilación) una de las alternativas más promisorias para la solución de los aspectos planteados.

La tecnología de peguilación enmascara u oculta epítopes de la proteína lo que reduce la eliminación vía retículoendotelial, así como el reconocimiento por el sistema inmune y la degradación por la acción de enzimas proteolíticas. También la conjugación con PEG provoca un incremento aparente de la talla molecular aspecto que reduce la filtración renal alterando la biodistribución. Los aspectos fundamentales que influyen en los efectos de la conjugación son:

- 1- Número de cadenas de PEG unidas a la proteína.
- 2- Talla molecular y estructura del PEG.
- 3- La posición de la cadena de PEG en la molécula.
- 4- La tecnología de conjugación utilizada.

Los primeros conjugados PEG-Proteínas se realizaron con los llamados PEG de primera generación que eran moléculas lineales de talla molecular \leq 12 KDa los que tenían como inconvenientes principales la presencia de reacciones colaterales y la formación de enlaces débiles en la conjugación con proteínas. Una segunda

generación constituida por moléculas de PEG ramificadas y de una mayor talla, eliminó los principales efectos indeseados.

En el caso de los interferones han sido reportados conjugados con moléculas de PEG de 5 y 12 KDa con el IFN α 2b y PEG de 40 KDa con IFN α 2a para el que se reportan resultados superiores comparados con los anteriores de menor talla molecular.

Desarrollo

Para el desarrollo de la molécula modificada del IFN alfa 2b por conjugación con polietilenglicol se consideraron los aspectos teóricos antes planteados. En la estrategia de trabajo, como primera etapa, se diseñó y desarrollo la tecnología de obtención del PEG de 40 KDa de dos ramas, teniendo en cuenta los avances reportados para las moléculas de PEG de segunda generación.

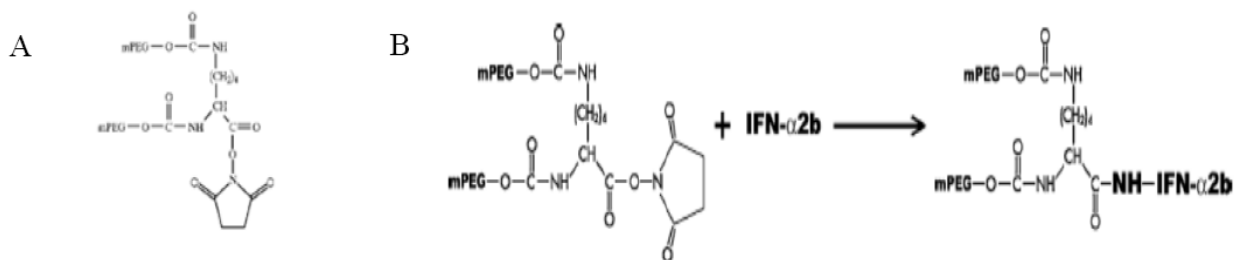


Fig 1: Estructura del PEG 2,40 NHS (A). Reacción de conjugación del PEG con la molécula de IFN α 2b (B)

La molécula de PEG se hace funcional para la conjugación, en forma de éster de Nhidroxisucinimida. (Fig 1).

Una vez obtenida la molécula de PEG con las características, de pureza (≥ 95 %) y grado de activación (≥ 60 %), requeridas para la conjugación, se pasó al desarrollo de la tecnología de conjugación con el IFN alfa 2b, considerando la realización de la reacción en condiciones básicas de pH, para dirigir la unión del PEG hacia los grupos amino de las lisinas.

La reacción desarrollada permitió obtener el producto por formación de enlaces tipo amida de alta fortaleza, lo que facilita la estabilidad de la molécula IFN-PEG formada producto de la conjugación fig 1 (B). Es de destacar que para lograr niveles de conjugación superiores al 40 %, fue necesario diseñar una estrategia en que se incluyó la presencia de solventes que facilitarían las condiciones de estructura requerida durante la reacción de conjugación, aspecto no reportado y que permitió un incremento en los recobrados de proceso.

Teniendo en cuenta que el objetivo final de este trabajo fue el uso como terapéutico de la molécula de IFN-PEG diseñada, se hace necesario, como parte fundamental de este desarrollo, el diseño de una tecnología que permita la obtención de un producto con calidad de un fármaco de uso parenteral. La tecnología desarrollada permitió que la molécula conjugada cumpliera con los estándares establecidos de seguridad y eficacia de acuerdo a los requerimientos regulatorios internacionales.

Para demostrar la seguridad se diseñó un estudio toxicológico que arrojó resultados satisfactorios. De igual forma fueron monitoreados los niveles de pureza, contaminantes y actividad biológica, por lo que fue necesario, desarrollar el conjunto de técnicas requeridas para su control, en todos los casos los niveles de contaminantes fueron inferiores al 5 %.

Los estudios de estabilidad demostraron tiempos superiores a los 12 meses sin cambios en los atributos de calidad asignados de acuerdo al diseño del producto, presentando una alta resistencia a la acción de proteasas y una marcada estabilidad térmica.

Los estudios farmacocinéticos desarrollados demostraron un incremento significativo de la biodisponibilidad del producto respecto a la molécula no conjugada. Comparativamente, la formulación peguilada muestra una más lenta eliminación, visible en el mayor rango de tiempo de medición posible, lo cual ya indica que la formulación peguilada se corresponden al objetivo para el cual fue diseñada. Estas características se muestran en la Fig. 2. El valor de aclaramiento disminuye considerablemente, siendo índice de ser el mecanismo central por lo cual aumenta la biodisponibilidad del producto.

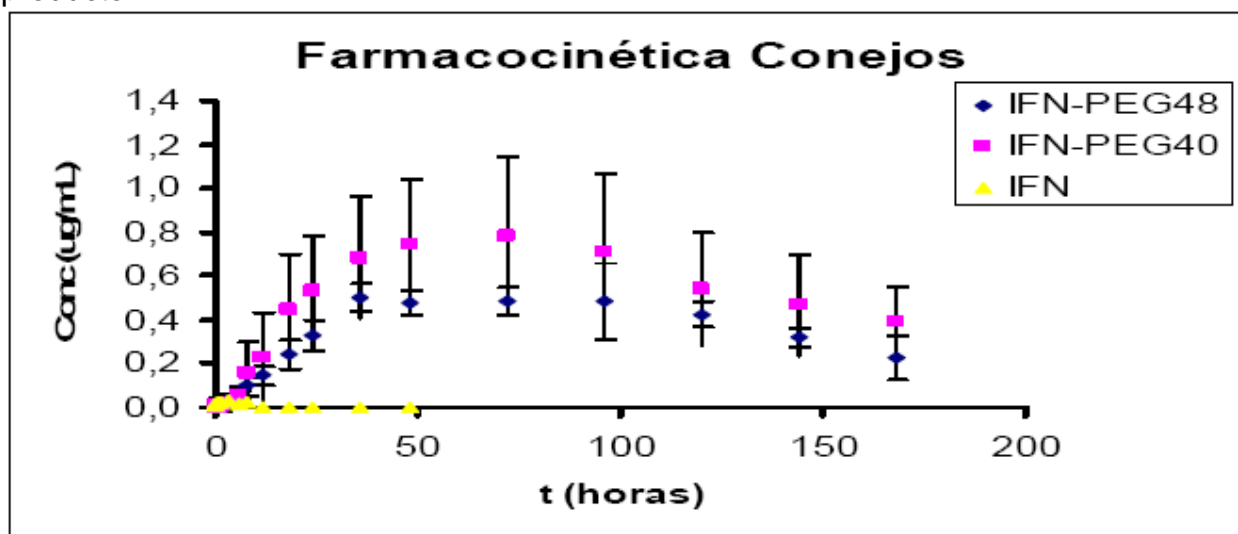


Fig. 2.- Representación de los registros primarios de concentración sanguínea vs. tiempo. Valores promedios de $n=6$, +/- D.E. IFN-PEG 40 KDa.

Por otra parte se demostró la estabilidad físico-química de la molécula IFN-PEG 40 KDa estabilizada en una formulación líquida conteniendo tween 80, la sal del ácido etilendiaminotetra-acético y tamponada con tampón fosfato a pH 7,2. La formulación de IFN-PEG 40 KDa fue estable por 24 meses almacenada a 4°C y por 6 meses a 28°C. Los estudios en condiciones de estrés demuestran su estabilidad físico-química, aún almacenada a altas temperaturas. La agregación a 60°C fue identificada como la inestabilidad que se promueve en estas condiciones. No se identifican degradaciones de la molécula peguilada, a diferencias del IFN sin peguilar, el cual es muy inestable en solución.

Se realizó un estudio clínico en voluntarios sanos que demostró la bioequivalencia de la molécula de IFN α 2b, conjugada con el PEG 40 KDa, con el Pegasys (IFN alfa 2a- PEG 40 KDa), que es el biosimilar que se encuentra actualmente en el mercado. Los resultados mostraron de igual forma el incremento del tiempo de vida media del producto en sangre, comparado con la molécula de IFN alfa 2b no conjugada con el PEG. El protocolo clínico se realizó acorde a la Declaración de Helsinki y se aprobó por el comité de ética del hospital participante, así como por la Agencia Nacional Reguladora de Medicamentos (CECMED).

La obtención del registro sanitario permitió la introducción de este producto en la práctica médica con resultados satisfactorios al ser comparados con el IFN no conjugado.

La disponibilidad del PEG-Heberon® ofrece a la población cubana una alternativa terapéutica que incrementa, como mínimo, un 9% la expectativa de respuesta virológica sostenida respecto a la variante interferón alfa convencional y ribavirina anteriormente disponible en el país y representa un 27% de incremento en beneficio para el control de la hepatitis C crónica, comparado con los 23 años transcurridos desde la descripción por primera vez del genoma del virus de la hepatitis C en el año 1991 y los tratamientos con el interferón alfa convencional en monoterapia.

Tales resultados en la población cubana de pacientes con hepatitis C crónica, mayoritariamente compuesta por genotipos 1b (el más opuesto a la respuesta de IFN alfa) han sido considerados como excelentes por los gastroenterólogos vinculados a la prescripción del PEG-Heberon®. Los porcentajes de respuesta virológica en todos los momentos evaluados han estado en el rango reportado por los productos similares existentes en el mercado farmacéutico internacional.

Tomando en cuenta el número de pacientes tratados, el significativo porcentaje de eficacia terapéutica alcanzado, el apropiado balance de eventos adversos demostrado y la cantidad de viales de PEG-Heberon® empleados sin que haya ocurrido ningún evento adverso grave, podemos concluir que la formulación diseñada por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología y comercializada por la empresa Heber Biotec S.A. cuenta con eficacia terapéutica y adecuado perfil de seguridad.

Los resultados obtenidos avalan que la conjugación de la molécula de IFN alfa 2b con la molécula de PEG de 40 KDa, permite la obtención de un conjugado estable. El producto obtenido resulta seguro cuando se administra por vía parenteral e incrementa el tiempo de vida medio de la droga en sangre, aumentando su biodisponibilidad lo que permite la reducción del número de administraciones necesarias para lograr el efecto terapéutico deseado. También se reporta un incremento del efecto terapéutico de la molécula conjugada en comparación con el IFN no modificado.

Conclusiones:

- Se logró la modificación química de la molécula de IFN alfa 2b utilizando un polímero de PEG ramificado de 40 KDa, constituyendo el **primer reporte** de conjugación del IFN alfa 2b a moléculas específicas de PEG ramificadas.
- Se demostró el efecto de la peguiliación sobre el incremento del tiempo de vida media de la droga en sangre, al compararlo con la molécula de IFN no modificada.
- Se diseñó un proceso tecnológico para la conjugación y purificación del conjugado de IFN α 2b -PEG. La caracterización fisicoquímica y biológica demostró que cumple con los parámetros exigidos internacionalmente para poder ser usado como producto farmacéutico en el tratamiento de enfermedades como la hepatitis C.
- Los estudios clínicos demostraron la bioequivalencia de la molécula de IFN α 2b conjugada con el PEG 40 KDa con el Pegasys (IFN alfa 2a- PEG 40 KDa), que es el biosimilar que se encuentra actualmente en el mercado y el incremento del tiempo de vida medio en sangre del fármaco.
- La introducción de este producto en la práctica médica ha demostrado la eficacia del producto en el tratamiento de entidades virales como la Hepatitis C.

Publicaciones

- ✓ Publicación. Un método Reproducible para obtener PEG Biramificado Monofuncional de Alta Pureza. "Quim. Nova, Vol. 52, No. 6, 1426-1431, 2009.
- ✓ Publicación. PEGylated Interferon- α 2b: A Branched 40K Polyethylene Glycol Derivative Pharmaceutical Research, Vol. 22, No. 8, August 2005.
- ✓ Publicación. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of two "pegylated" interferon alpha-2 formulations in healthy male volunteers: a randomized, crossover, double-blind study. BMC Pharmacology 2010, 10:15 <http://www.biomedcentral.com/1471-2210/10/15>.
- ✓ Obtención de Registro Sanitario, PEGYFERON (Interferon alfa 2b hu-rec conjugado a polietilenglicol). 2009.
- ✓ Detection of PEGylated proteins in polyacrylamide gels by reverse staining with zinc and imidazole salts, Electrophoresis 2008, 29, 2363–2371