

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLEMEN KODRIČ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLEMEN KODRIČ

MAGISTRSKA NALOGA

**POSPEŠENI TEST STABILNOSTI MODIFICIRANEGA  
TERAPEVTSKEGA PROTEINA**

**ACCELERATED TEST OF STABILITY OF THE MODIFIED  
THERAPEUTIC PROTEIN**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljajal na Razvojni analitiki Biofarmacevtike Mengeš, podjetja Lek, pod mentorstvom prof. dr. Darka Černeta in somentorstvom dr. Tadeja Čepeljnika.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se vsem, ki so pripomogli k nastanku magistrske naloge. Še posebno bi se rad zahvalil Tadeju Čepeljniku za vso pomoč in za vse nasvete, ki mi jih je nudil, ter mentorju prof. dr. Darku Černetu za pomoč pri izdelavi naloge. Zahvalil bi se rad tudi Tanji Rozman Peterka in drugim sodelavcem za marsikateri nasvet in za podporo pri zasnovi in izvedbi študije. Nenazadnje se zahvaljujem tudi svojemu dekletu, družini in prijateljem, ki so mi stali ob strani, mi pomagali, me spodbujali in me motivirali pri delu.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja prof. dr. Darka Černeta in somentorja dr. Tadeja Čepeljnika.

## Kazalo vsebine

1	UVOD .....	1
1.1	Biološka zdravila .....	1
1.2	Razvoj bioloških zdravil .....	2
1.3	Proizvodnja bioloških zdravil .....	5
1.4	Analitika bioloških zdravil.....	7
1.4.1	Kromatografija.....	8
1.5	Struktura in razgradne poti proteinov (nestabilnost proteinske strukture).....	11
1.5.1	Kemijske nestabilnosti.....	12
1.5.2	Fizikalne nestabilnosti .....	14
1.6	Testiranje stabilnosti bioloških zdravil .....	15
2	NAMEN DELA.....	17
3	MATERIALI IN METODE .....	18
3.1	Materiali.....	18
3.1.1	Kemikalije in potrošni material .....	18
3.1.2	Oprema .....	19
3.1.3	Raztopine in pufri .....	20
3.1.4	Standardi.....	21
3.2	Metode .....	21
3.2.1	Reverznofazna kromatografija .....	21
3.2.2	Izključitvena kromatografija.....	22
3.2.3	Ionsko izmenjevalna kromatografija .....	22
3.2.4	Priprava vzorcev .....	23
4	REZULTATI.....	27
4.1	Reverznofazna kromatografija.....	27
4.1.1	Nativni vzorec in vzorec inkubiran 24 ur pri sobni temperaturi.....	28
4.1.2	Vzorci, izpostavljeni povišani temperaturi .....	28
4.1.3	Vzorci, izpostavljeni različnim pH.....	29
4.1.4	Vzorec, izpostavljen mehanskemu stresu .....	31
4.1.5	Vzorci, izpostavljeni oksidirajočim in reducirajočim pogojem.....	31
4.1.6	Vzorci, izpostavljeni kovinskim ionom.....	32
4.2	Izključitvena kromatografija .....	34

4.2.1	Nativni vzorec in vzorec, inkubiran 24 ur pri sobni temperaturi.....	35
4.2.2	Vzorci, izpostavljeni povišani temperaturi.....	35
4.2.3	Vzorci, izpostavljeni različnim pH.....	36
4.2.4	Vzorec, izpostavljen mehanskemu stresu.....	38
4.2.5	Vzorci, izpostavljeni oksidirajočim in reducirajočim pogojem.....	38
4.2.6	Vzorci, izpostavljeni kovinskim ionom.....	39
4.3	Ionska izmenjevalna kromatografija.....	40
4.3.1	Nativni vzorec in vzorec, inkubiran 24 ur pri sobni temperaturi.....	41
4.3.2	Vzorci, izpostavljeni povišani temperaturi.....	42
4.3.3	Vzorci, izpostavljeni različnim pH.....	42
4.3.4	Vzorec, izpostavljen mehanskemu stresu.....	44
4.3.5	Vzorci, izpostavljeni oksidirajočim in reducirajočim pogojem.....	45
4.3.6	Vzorci, izpostavljeni kovinskim ionom.....	46
5	RAZPRAVA.....	49
5.1	Vzorci, izpostavljeni povišani temperaturi.....	49
5.2	Vzorci, izpostavljeni kislemu pH.....	51
5.3	Vzorci, izpostavljeni bazičnemu pH.....	53
5.4	Vzorec, izpostavljen mehanskemu stresu.....	55
5.5	Vzorec, izpostavljen oksidirajočim pogojem.....	56
5.6	Vzorec, izpostavljen reducirajočim pogojem.....	57
5.7	Vzorci, izpostavljeni kovinskim ionom.....	58
5.8	Povzetek rezultatov.....	60
6	SKLEP.....	61
7	VIRI IN LITERATURA.....	62

## **Kazalo slik**

Slika 1: Humulin® [56].....	2
Slika 2: Primer proizvodnje in čiščenja produkta [47].....	6
Slika 3: Shematski prikaz komponent sistema HPLC.....	8
Slika 4: Ponazoritev delovanja RPC [48].....	9
Slika 5: Ravni strukture proteinov [49].....	11
Slika 6: Prikaz mehanizma deamidacije asparagina [50].....	12
Slika 7: Disulfidne vezi [51].....	14
Slika 8: Agregacija proteinov [52].....	15

Slika 9: Prekrita kromatograma reverznofazne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C) in vzorca, inkubiranega 24 ur pri sobni temperaturi (oznaka RT 24h). .....	28
Slika 10: Prekrita kromatograma reverznofazne kromatografije vzorca izpostavljenega temperaturi 40 °C (oznaka 40°C 1W pH 5), in vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C (oznaka 60°C 24h pH 5). .....	28
Slika 11: Prekrita kromatograma reverznofazne kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C in pH 2 (oznaka 40°C 1W pH 2), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 2 (oznaka 60°C 24h pH2). .....	29
Slika 12: Prekrita kromatograma reverznofazne kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C in pH 8 (oznaka 40°C 1W pH 8), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 8 (oznaka 60°C 24h pH 8). .....	30
Slika 13: Prekriti kromatogrami reverznofazne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 2 (oznaka 60°C 24h pH 2), vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 5 (oznaka 60°C 24h pH 5), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 8 (oznaka 60°C 24h pH 8). .....	30
Slika 14: Prekrita kromatograma reverznofazne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C) in vzorca, izpostavljenega mehanskemu stresu (oznaka shaking). .....	31
Slika 15: Prekriti kromatogrami reverznofazne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca, izpostavljenega oksidirajočim pogojem (oznaka oxidation), ter vzorca, izpostavljenega reducirajočim pogojem (oznaka reduction). .....	32
Slika 16: Prekriti kromatogrami reverznofazne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca, izpostavljenega ionom Fe <sup>3+</sup> (oznaka Fe) in vzorca, izpostavljenega ionom Cu <sup>2+</sup> (oznaka Cu). .....	32
Slika 17: Rezultati reverznofazne kromatografije (delež komponente »peptide«, skupni delež komponent »pre-peaks«, delež komponente »main peak« ter skupni delež komponent »post-peaks«) stresnih vzorcev (za obrazložitev stresnih pogojev, katerim so bili vzorci navedeni na x-osi izpostavljeni, glej Preglednico VIII: Povzetek stresnih pogojev). .....	34
Slika 18: Prekrita kromatograma izključitvene kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C) in vzorca, inkubiranega 24 ur pri sobni temperaturi (oznaka RT 24h). .....	35
Slika 19: Prekrita kromatograma izključitvene kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C (oznaka 40°C pH 5), in vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C (oznaka 60°C pH 5). .....	36
Slika 20: Prekrita kromatograma izključitvene kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C in pH 2 (oznaka 40°C pH 2), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 2 (oznaka 60°C pH2). .....	36
Slika 21: Prekrita kromatograma izključitvene kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C in pH 8 (oznaka 40°C pH 8), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 8 (oznaka 60°C pH 8). .....	37
Slika 22: Prekriti kromatogrami izključitvene kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 2 (oznaka 60°C pH 2), vzorca izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 5 (oznaka 60°C pH 5), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 8 (oznaka 60°C pH 8). .....	37

Slika 23: Prekrita kromatograma izključitvene kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), in vzorca, izpostavljenega mehanskemu stresu (oznaka shaking). .....	38
Slika 24: Prekriti kromatogrami izključitvene kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca, izpostavljenega oksidirajočim pogojem (oznaka oxidation), ter vzorca, izpostavljenega reducirajočim pogojem (oznaka reduction). .....	38
Slika 25: Prekriti kromatogrami izključitvene kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca, izpostavljenega ionom Fe <sup>3+</sup> (oznaka Fe), ter vzorca, izpostavljenega ionom Cu <sup>2+</sup> (oznaka Cu). .....	39
Slika 26: Rezultati izključitvene kromatografije (deleži komponent »hMW-4«, »hMW-3«, »hMW-2«, »hMW-1« ter delež komponente »main peak«) stresnih vzorcev (za obrazložitev stresnih pogojev, katerim so bili vzorci navedeni na x-osi izpostavljeni, glej Preglednico X: Povzetek stresnih pogojev). .....	40
Slika 27: Prekrita kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), in vzorca, izpostavljenega 24 ur pri sobni temperaturi (oznaka RT 24h). .....	41
Slika 28: Prekrita kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C (oznaka 40°C 1W pH 5), in vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C (oznaka 60°C 24h pH 5). .....	42
Slika 29: Prekrita kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C in pH 2 (oznaka 40°C 1W pH 2), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 2 (oznaka 60°C 24h pH 2). .....	43
Slika 30: Prekrita kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C in pH 8 (oznaka 40°C 1W pH 8), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 8 (oznaka 60°C 24h pH 8). .....	43
Slika 31: Prekriti kromatogrami kationske izmenjevalne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 2 (oznaka 60°C 24h pH 2), vzorca izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 5 (oznaka 60°C 24h pH 5), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 8 (oznaka 60°C 24 h pH 8). .....	44
Slika 32: Prekrita kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), in vzorca, izpostavljenega mehanskemu stresu (oznaka shaking). .....	45
Slika 33: Prekriti kromatogrami kationske izmenjevalne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca, izpostavljenega oksidirajočim pogojem (oznaka oxidation), ter vzorca, izpostavljenega reducirajočim pogojem (oznaka reduction). .....	45
Slika 34: Prekriti kromatogrami kationske izmenjevalne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca, izpostavljenega ionom Fe <sup>3+</sup> (oznaka Fe), ter vzorca, izpostavljenega ionom Cu <sup>2+</sup> (oznaka Cu). .....	46
Slika 35: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije (delež komponente »main peak«, deleži posameznih vrhov »Lys«, skupni delež vrhov »VP«, skupni delež vrhov »NP«, delež vrha »DP« ter delež vrha »peptide«) stresnih vzorcev (za obrazložitev stresnih pogojev, katerim so bili vzorci navedeni na x-osi izpostavljeni, glej Preglednico XII: Povzetek stresnih pogojev). .....	47
Slika 36: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije (delež posameznih vrhov »Lys«, skupni delež vrhov »VP«, skupni delež vrhov »NP« ter delež vrha »peptide«)	

stresnih vzorcev (za obrazložitev stresnih pogojev, katerim so bili vzorci navedeni na x-osi izpostavljeni, glej Preglednico XIII: Povzetek stresnih pogojev). ..... 48

## Kazalo preglednic

Preglednica I: V EU odobrena (EMA) podobna biološka zdravila.....	3
Preglednica II: Uporabljene kemikalije in potrošni material ter proizvajalci .....	18
Preglednica III: Oprema in proizvajalci .....	19
Preglednica IV: Gradient metode RPC.....	21
Preglednica V: Gradient metode CEC.....	23
Preglednica VI: Povzetek stresnih pogojev .....	26
Preglednica VII: Rezultati reverznofazne kromatografije (delež komponente »peptide«, skupni delež komponent »pre-peaks«, delež komponente »main peak« ter skupni delež komponent »post-peaks«) stresnih vzorcev.....	33
Slika 17: Rezultati reverznofazne kromatografije (delež komponente »peptide«, skupni delež komponent »pre-peaks«, delež komponente »main peak« ter skupni delež komponent »post-peaks«) stresnih vzorcev (za obrazložitev stresnih pogojev, katerim so bili vzorci navedeni na x-osi izpostavljeni, glej Preglednico VIII: Povzetek stresnih pogojev). .....	34
Preglednica IX: Rezultati izključitvene kromatografije (deleži komponent »hMW-4«, »hMW-3«, »hMW-2«, »hMW-1« ter delež komponente »main peak«) stresnih vzorcev..	39
Slika 26: Rezultati izključitvene kromatografije (deleži komponent »hMW-4«, »hMW-3«, »hMW-2«, »hMW-1« ter delež komponente »main peak«) stresnih vzorcev (za obrazložitev stresnih pogojev, katerim so bili vzorci navedeni na x-osi izpostavljeni, glej Preglednico X: Povzetek stresnih pogojev).....	40
Preglednica XI: Rezultati kationske izmenjevalne kromatografije (delež komponente »main peak«, deleži posameznih vrhov »Lys«, skupni delež vrhov »VP«, skupni delež vrhov »NP«, delež vrha »DP« ter delež vrha »peptide«) stresnih vzorcev. ....	46
Slika 35: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije (delež komponente »main peak«, deleži posameznih vrhov »Lys«, skupni delež vrhov »VP«, skupni delež vrhov »NP«, delež vrha »DP« ter delež vrha »peptide«) stresnih vzorcev (za obrazložitev stresnih pogojev, katerim so bili vzorci navedeni na x-osi izpostavljeni, glej Preglednico XII: Povzetek stresnih pogojev).....	47
Slika 36: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije (deleži posameznih vrhov »Lys«, skupni delež vrhov »VP«, skupni delež vrhov »NP« ter delež vrha »peptide«) stresnih vzorcev (za obrazložitev stresnih pogojev, katerim so bili vzorci navedeni na x-osi izpostavljeni, glej Preglednico XIII: Povzetek stresnih pogojev). .....	48
Preglednica XIV: Rezultati reverznofazne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni povišani temperaturi .....	49
Preglednica XV: Rezultati izključitvene kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni povišani temperaturi .....	50
Preglednica XVI: Rezultati kationske izmenjevalne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni povišani temperaturi.....	50



Preglednica XVII: Rezultati reverznofazne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni kislemu pH.....	51
Preglednica XVIII: Rezultati izključitvene kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni kislemu pH.....	51
Preglednica XIX: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni kislemu pH .....	51
Preglednica XX: Rezultati reverznofazne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni bazičnemu pH.....	53
Preglednica XXI: Rezultati izključitvene kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni bazičnemu pH.....	53
Preglednica XXII: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni bazičnemu pH.....	54
Preglednica XXIII: Rezultati reverznofazne kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen mehanskemu stresu.....	55
Preglednica XXIV: Rezultati izključitvene kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen mehanskemu stresu.....	55
Preglednica XXV: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen mehanskemu stresu .....	55
Preglednica XXVI: Rezultati reverznofazne kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen oksidirajočim pogojem .....	56
Preglednica XXVII: Rezultati izključitvene kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen oksidirajočim pogojem .....	56
Preglednica XXVIII: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen oksidirajočim pogojem.....	56
Preglednica XXIX: Rezultati reverznofazne kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen reducirajočim pogojem.....	57
Preglednica XXX: Rezultati izključitvene kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen reducirajočim pogojem.....	57
Preglednica XXXI: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen reducirajočim pogojem.....	57
Preglednica XXXII: Rezultati reverznofazne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni kovinskim ionom.....	58
Preglednica XXXIII: Rezultati izključitvene kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni kovinskim ionom.....	59
Preglednica XXXIV: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni kovinskim ionom.....	59
Preglednica XXXV: delež glavnega vrha pri vseh metodah in pri vseh analiziranih vzorcih .....	60

## POVZETEK

Sodobna biološka zdravila predstavljajo najhitreje razvijajoče se področje v farmaciji in so izredno pomembna za zdravljenje mnogih bolezni. Zaradi specifičnosti delovanja so lahko zelo učinkovita, če so čista in stabilna. V nasprotnem primeru lahko povzročajo resne neželene učinke, na primer imunski odgovor. Zato je treba med procesom proizvodnje neprestano spremljati nastajajoči produkt in zagotavljati njegovo čistost. Poleg tega je treba pred pričetkom prodaje preveriti stabilnost biološkega zdravila. Stabilnost spremljamo pri običajnih pogojih shranjevanja, pri pospešenih pogojih ter pri stresnih pogojih. Razviti moramo tudi analitske metode, ki so sposobne zaznati spremembe, če do njih pride.

Tekom študije smo preverjali, ali pri stresnih pogoji prihaja do sprememb biološkega zdravila in ali analitske metode, ki jih uporabljamo za spremljanje dolgoročne stabilnosti proteina, te spremembe zaznajo. S tem namenom smo vzorce modelnega kemijsko modificiranega terapevtskega proteina izpostavili stresnim pogojem (temperatura, pH, mehanski stres, oksidirajoči pogoji, reducirajoči pogoji in izpostavitve kovinskim ionom). Nato smo z reverznofazno kromatografijo (RPC), izključitveno kromatografijo (SEC) in kationsko izmenjevalno kromatografijo (CEC) stresne vzorce in nativni (nestresni) vzorec analizirali. Z metodo RPC smo preverjali nastanek oblik proteinov s spremenjeno hidrofobnostjo, z metodo SEC nastanek oblik proteinov spremenjenih velikosti (na primer agregatov) ter z metodo CEC različno nabitih oblik molekul proteina. Dobljene rezultate smo primerjali z rezultati nativnega (nestresnega) vzorca. Največje spremembe smo zaznali pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni kombinaciji povišane temperature in različnih pH, ter pri vzorcu, ki je bil izpostavljen reducirajočim pogojem. Nobenih sprememb nismo opazili pri vzorcu, ki je bil izpostavljen mehanskemu stresu.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da je izbrani kemijsko modificiran protein zadostno obstojen pri sobni temperaturi in pri povišani temperaturi (40 °C, 60 °C) v osnovnem pufru z vrednostjo pH 5. Če ob spreminjanju temperature spreminjamo tudi pH, prihaja pri proteinu do sprememb, še posebno pri bazičnih vrednostih pH. Ugotovili smo tudi, da je protein odporen proti mehanskemu stresu, ter da se zanemarljivo spreminja ob izpostavitvi oksidirajočim pogojem ali kovinskim ionom. Zelo je občutljiv na reducirajoče pogoje. Ugotovili smo, da izbrani set analitskih metod zazna pomembnejše spremembe, ki nastanejo pri stresnih pogojih.

## **ABSTRACT**

Modern biopharmaceuticals represent the fastest growing branch of pharmacy and are very important for treatment of many different diseases. Because of their specific action on targets, biopharmaceuticals can be very effective if they are pure and stable. If this is not the case, they can cause serious adverse effects such as immune response. That is why it is necessary to monitor constantly the product that is being developed and to insure high purity of the product. It is also important to test the stability of the biopharmaceutical before it reaches the market. The stability of the product is monitored under normal storage conditions, accelerated conditions and stressed conditions. Furthermore, analytical methods must be developed in order to detect any alterations that might occur. During the study we have tested if any alterations to the product occur under stressed conditions, and if the selected analytical methods that we use for monitoring of the long term stability are capable of detecting these alterations. Samples of model chemically modified therapeutical protein were therefore exposed to stressed conditions (temperature, pH, mechanical stress, oxidative conditions, reductive conditions and exposure to metal ions). Afterwards, we have analyzed these stressed samples and the control sample using reversed-phase chromatography (RPC), size-exclusion chromatography (SEC) and cation-exchange chromatography (CEC). With RPC, stressed samples have been tested for the formation of protein forms with changed hydrophobicity, with SEC for the formation of protein forms with altered sizes (such as aggregates), and with CEC for the formation of protein forms with different charges. The results of stressed samples were then compared to those of the native (non-stressed) sample. We have detected substantial alterations in samples that were exposed to various combinations of elevated temperature and varying pH, and in the sample that was exposed to reducing conditions. No alterations have been detected in the sample that was exposed to mechanical stress. From the results we can conclude that the model chemically modified protein is sufficiently stable both at room temperature and when exposed to elevated temperatures (40 °C, 60 °C) in its primary buffering solution with pH value 5. If temperature and pH are varied, alterations to the protein occur, especially at basic pH values. We have also confirmed that the protein is resistant to mechanical stress, and that the protein alterations are negligible when exposed to oxidizing conditions or metal ions. It is, however, very sensitive to reducing conditions. The selected set of analytical methods has been found suitable for detecting the most important alterations that can arise in proteins exposed to stressed conditions.

## KLJUČNE BESEDE

Biološka zdravila, stabilnost, razgradnja, kromatografija.

## KEY WORDS

Biopharmaceuticals, stability, degradation, chromatography.

## SEZNAM OKRAJŠAV

---

<b>&lt; -60 °C</b>	nestresni (nativni) vzorec
<b>40 °C pH 2</b>	vzorec, izpostavljen 7 dni temperaturi 40 °C in vrednosti pH 2
<b>40 °C pH 5</b>	vzorec, izpostavljen 7 dni temperaturi 40 °C
<b>40 °C pH 8</b>	vzorec, izpostavljen 7 dni temperaturi 40 °C in vrednosti pH 8
<b>60 °C pH 2</b>	vzorec, izpostavljen 24 ur temperaturi 60 °C in vrednosti pH 2
<b>60 °C pH 5</b>	vzorec, izpostavljen 24 ur temperaturi 60 °C
<b>60 °C pH 8</b>	vzorec, izpostavljen 24 ur temperaturi 60 °C in vrednosti pH 8
<b>ACN</b>	acetonitril
<b>C18</b>	oktadecilna stacionarna faza
<b>C8</b>	oktilna stacionarna faza
<b>CEC</b>	kationska izmenjevalna kromatografija ( <i>ang. cation exchange chromatography</i> )
<b>CHO</b>	ovarijske celice kitajskih hrčkov ( <i>ang. Chinese hamster ovary cells</i> )
<b>Cu</b>	vzorec, izpostavljen ionom bakra
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina ( <i>ang. deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DS</b>	aktivna učinkovina ( <i>ang. drug substance</i> )
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EMA</b>	Evropska agencija za zdravila ( <i>ang. European Medicine Agency</i> )
<b>EU</b>	Evropska unija
<b>Fe</b>	vzorec, izpostavljen ionom železa
<b>FLD</b>	detektor fluorescence
<b>HPLC</b>	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (ločljivosti) ( <i>ang. high performance liquid chromatography</i> )

---

---

<b>ICH</b>	The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
<b>MCB</b>	osnovna celična banka ( <i>ang. master cell bank</i> )
<b>MFA</b>	mobilna faza A
<b>MFB</b>	mobilna faza B
<b>oxidation</b>	vzorec, izpostavljen oksidirajočim pogojem
<b>PES</b>	polietersulfon
<b>ppm</b>	število delcev na milijon ( <i>ang. parts per million</i> )
<b>reduction</b>	vzorec, izpostavljen reducirajočim pogojem
<b>RPC</b>	reverznofazna kromatografija ( <i>ang. reversed phase chromatography</i> )
<b>RPM</b>	število obratov na minuto ( <i>ang. revolutions per minute</i> )
<b>RT</b>	čas zadrževanja ( <i>ang. retention time</i> )
<b>RT 24h</b>	vzorec, izpostavljen 24 ur sobni temperaturi
<b>SEC</b>	izključitvena kromatografija ( <i>ang. size exclusion chromatography</i> )
<b>shaking</b>	vzorec, izpostavljen mehanskemu stresu
<b>TFA</b>	trifluorocetna kislina
<b>UV</b>	ultravijoločen
<b>V<sub>inj</sub></b>	volumen injiciranja
<b>WCB</b>	delovna celična banka ( <i>ang. working cell bank</i> )
<b>ZDA</b>	Združene države Amerike

---

# 1 UVOD

## 1.1 Biološka zdravila

Že od nekdaj poskuša človek lajšati simptome ter preprečevati in zdraviti bolezni – tudi s pomočjo različnih zdravilnih učinkovin. Te učinkovine so bile sprva rastlinskega in živalskega izvora, z razvojem medicine in farmacije pa so se v ta namen začele uporabljati tudi manjše sintetske organske molekule ter nekateri izolirani človeški ali živalski proteini. Izolirani proteini so se uporabljali redkeje, saj je njihova izolacija zahtevna, količinsko jih je malo in so zato taka zdravila običajno draga. Poleg tega so izolirani proteini lahko kužni. Z nadaljnjim razvojem medicine, farmacije in sorodnih ved se je poznavanje vzrokov bolezni in poznavanje bolezenskih procesov močno izboljšalo. S tem se je izboljšalo tudi znanje na področju zdravljenja in tako se je pojavil popolnoma nov pristop razvoja specifičnih učinkovin s pomočjo biotehnologije. Začela so nastajati sodobna biološka zdravila, ki so za razliko od tradicionalnih bioloških zdravil, ki so izolirana ali pridobljena s klasičnimi biotehnološkimi prijemi (na primer antibiotiki<sup>1</sup>), pridobljena s tehnologijo rekombinantne DNA – z genskim inženiringom. V to kategorijo spadajo predvsem terapevtski proteini, vendar prištevamo k sodobnim biofarmacevtikom tudi določene rekombinantne nukleinske kisline in rekombinantne proteine, namenjene diagnostiki. Ker so rekombinantni proteini v veliki meri podobni naravnim proteinom, delujejo tarčno in so zato bolj učinkoviti za zdravljenje. Bolezen lahko zdravijo, vplivajo na njen potek ter zmanjšujejo zaplete. Z določenimi tehnikami lahko naredimo te proteine še učinkovitejše, saj jih lahko tako spremenimo, da jim izboljšamo določene lastnosti (na primer hitrejše delovanje, manjša imunogenost, tarčno specifično delovanje, daljša obstojnost v telesu po aplikaciji ...). Prvo zdravilo, proizvedeno s tehnologijo rekombinantne DNA, je bil rekombinantni inzulin Humulin<sup>®</sup> (leta 1982 odobren v ZDA); od takrat mu je sledilo mnogo različnih sodobnih biofarmacevtikov: drugih hormonov, citokinov, encimov, rastnih faktorjev in protiteles. Terapevtski proteini se tako danes uporabljajo za zdravljenje mnogih različnih bolezni in predstavljajo najhitreje razvijajoče se področje v farmaciji. Največ bioloških zdravil je namenjenih zdravljenju rakavih, infektivnih,

---

<sup>1</sup> Klasični biotehnološki postopek za pridobivanje antibiotikov je fermentacija, kjer izbrani mikroorganizem gojimo v bioreaktorjih z medijem za rast.

avtoimunskih in kardiovaskularnih boleznih, genskih motenj in nevroloških nepravilnosti. [1] [2] [3] [4]

## 1.2 Razvoj bioloških zdravil

Od začetka razvoja do začetka prodaje biofarmaceutika je dolga, zahtevna in draga pot. Končni produkt je namreč v primerjavi s klasičnim zdravilom precej drugačen,



Slika 1: Humulin® [56]

saj izhaja iz živih organizmov, ima večjo molekularno maso in kompleksnejšo tridimenzionalno strukturo. Pogosto je produkt heterogena mešanica zelo podobnih molekul, ki imajo na primer isto aminoskislinsko zaporedje proteina, a različno glikozilacijo. Lahko je tudi imunogen, saj je produkt močno odvisen od proizvodnega procesa in od končne formulacije, transporta, shranjevanja in aplikacije zdravila. Tekom vseh teh faz se lahko nativna oblika proteina zaradi vplivov iz okolja spremeni. Lahko se na primer hidrofobne aminokisliline izpostavijo in proteini se med seboj povežejo v agregate, kar običajno vodi v večji imunski odziv bolnika na tako zdravilo. Telo se odzove s protitelesi, ki lahko zmanjšajo ali izničijo delovanje zdravila, v določenih primerih pa celo škodujejo bolniku. Zato je za zagotovitev varnosti treba spremljati in obvladovati vse stopnje proizvodnega procesa, v praksi pa je težko zagotoviti ponovljivost tako kompleksne proizvodnje in je produkt težko analitsko popolnoma ovrednotiti in določiti njegovo biološko aktivnost – kljub uporabi mnogih analitskih metod. Zato se za zagotavljanje čim višje stopnje varnosti poslužujemo pristopa, imenovanega Kakovost z načrtovanjem (»Quality by design«). Ta pomeni sistematičen pristop k razvoju, ki se začne z vnaprej postavljenimi cilji glede kakovosti produkta. Poudarek je na načrtovanju in razumevanju ter kontroliranju procesa in produkta, kar temelji na znanstveno utemeljenem pristopu in na upravljanju s tveganji glede kakovosti. [1] [5] [6]

Z dobrim poznavanjem produkta in proizvodnega procesa zagotavljamo varen produkt. To pomeni tudi, da vsebuje čim manj nečistot. Nečistote lahko izhajajo iz proizvodnje ali iz proizvoda. Nečistote, povezane s proizvodnjo, lahko izvirajo iz ekspresijskega sistema

(npr. virusi, ki se v celicah lahko namnožijo, ali DNA in proteini gostiteljskih celic), ali iz samega procesa proizvodnje in čiščenja (npr. komponente gojišč, kemikalije, ki jih uporabljamo med čiščenjem učinkovine ali različne snovi, ki se med procesom čiščenja lahko sperejo v produkt iz kolon, s filtrov ...). Nečistote, ki izvirajo iz proizvoda, pa so konformacijsko ali kemijsko spremenjeni produkti, ki imajo lahko spremenjeno biološko aktivnost ali so imunogeni.

Zaradi kompleksnosti produkta in procesa proizvodnje je skorajda nemogoče, da bi neko podjetje izdelalo terapevtski protein s popolnoma identično zgradbo (oz. zmesjo izoform), kakor jo ima inovatorsko (referenčno) zdravilo, zato takih zdravil ne poimenujemo generični biofarmaceutiki, temveč podobna biološka zdravila (»Biosimilars«). Le-ta so enako učinkovita, varna in kakovostna kakor referenčno zdravilo, kar se dokazuje s predkliničnimi in kliničnimi testiranjmi, ki so sicer manj obsežna, a vseeno dolgotrajna in draga. Podobna biološka zdravila so pomembna za uravnavanje cen na trgu, inovatorska pa za razvoj novih učinkovin za zdravljenje bolezni, ki jih do njihovega razvoja ni bilo mogoče (tako učinkovito) zdraviti. [1] [2] [7]

### **Preglednica I: V EU odobrena (EMA) podobna biološka zdravila**

<b>ime (proizvajalec)</b>	<b>učinkovina</b>	<b>datum odobritve</b>	<b>referenčno zdravilo (proizvajalec)</b>	<b>indikacije</b>
<b>Omnitrope (Sandoz)</b>	somatropin	12. 4. 2006	Genotropin (Pfizer)	Otroci: Motnje rasti (pomanjkanje ravnega hormona, ledvične okvare, Turnerjev sindrom, Prader-Willov sindrom, če so rojeni majhni) Odrasli: pomanjkanje ravnega hormona [8]
<b>Binocrit (Sandoz)</b>	epoetin alfa	28. 8. 2007	Eprex/Erypo (Janssen-Cilag)	Anemija zaradi kronične ledvične odpovedi ali kemoterapije Povečanje volumna krvi, ki ga lahko bolnik z anemijo daruje zase pred svojo operacijo Zmanjšanje potreb po transfuziji pred operacijo kosti [9]
<b>Abseamed (Medice Arzneimittel Pütter)</b>	epoetin alfa	28. 8. 2007	Eprex/Erypo (Janssen-Cilag)	Iste kot za Binocrit [10]



<b>ime (proizvajalec)</b>	<b>učinkovina</b>	<b>datum odobritve</b>	<b>referenčno zdravilo (proizvajalec)</b>	<b>indikacije</b>
<b>Epoetin Alfa Hexal (Hexal)</b>	epoetin alfa	28. 8. 2007	Eprex/Erypo (Janssen-Cilag)	Iste kot za Binocrit [11]
<b>Retacrit (Hospira)</b>	epoetin zeta	18. 12. 2007	Eprex/Erypo (Janssen-Cilag)	Iste kot za Binocrit [12]
<b>Silapo (Stada Arzneimittel)</b>	epoetin zeta	18. 12. 2007	Eprex/Erypo (Janssen-Cilag)	Glej 1. in 2. točko pri zdravilu Binocrit [13]
<b>Tevagrastim (Teva)</b>	filgrastim	15. 9. 2008	Neupogen [Amgen]	- nevtropenija ob citotoksični kemoterapiji - nevtropenija med postopkom uničevanja kostnega mozga pred transplantacijo le-tega - povečanje št. nevtrofilcev pri pacientih s pogostimi hudimi infekcijami oziroma pri bolnikih okuženih s HIV - pred darovanjem krvotvornih matičnih celic (za izplavljanje iz kostnega mozga) [14]
<b>Ratiograstim (Ratiophar)</b>	filgrastim	15. 9. 2008	Neupogen [Amgen]	Iste kot za Tevagrastim [15]
<b>Biograstim (AbZ- Pharma)</b>	filgrastim	15. 9. 2008	Neupogen [Amgen]	Iste kot za Tevagrastim [16]
<b>Zarzio (Sandoz)</b>	filgrastim	6. 2. 2009	Neupogen [Amgen]	Iste kot za Tevagrastim [17]
<b>Filgrastim (Hexal)</b>	filgrastim	6. 2. 2009	Neupogen [Amgen]	Iste kot za Tevagrastim [18]
<b>Nivestim (Hospira)</b>	filgrastim	8. 6. 2010	Neupogen [Amgen]	Iste kot za Tevagrastim [19]
<b>Inflectra (Hospira UK Limited)</b>	infliximab	10. 9. 2013	Remicade [Janssen]	Protivnetno delujejo za revmatoidni arthritis, Chronovo bolezen, ulcerozni kolitis, ankilozirajoči spondilitis, psoriatični arthritis, psoriazoz; kadar ni zadostnega odziva na običajno zdravljenje [20]
<b>Remsima (Celltrion Healthcare)</b>	infliximab	10. 9. 2013	Remicade [Janssen]	Isti kot za Inflectro [21]

<b>ime (proizvajalec)</b>	<b>učinkovina</b>	<b>datum odobritve</b>	<b>referenčno zdravilo (proizvajalec)</b>	<b>indikacije</b>
<b>Ovaleap (Teva Pharma)</b>	folitropin alfa	27. 9. 2013	Gonal-f [Merck Serono]	Za ženske, ki ne morejo proizvesti jajčec in so neodzivne na klomifen citrat; za ženske ki se zdravijo za neplodnost; za ženske z nizkimi vrednostmi LH in FSH; za moške s hipogonadotropnim hipogonadizmom [22]
<b>Grastofil (Apotex)</b>	filgrastim	18. 10. 2013	Neupogen [Amgen]	Iste kot za Tevagrastim [23]
<b>Bemfola (Finox Biotech)</b>	folitropin alfa	27. 3. 2014	Gonal-f [Merck Serono]	Iste kot za Ovaleap [24]
<b>Abasaglar (Eli Lilly)</b>	insulin glargin	9. 9. 2014	Lantus [Sanofi]	Za zdravljenje diabetesa [25]
<b>Accofil (Accord Healthcare)</b>	filgrastim	18. 9. 2014	Neupogen [Amgen]	Iste kot za Tevagrastim [26]

Poleg podobnih bioloških zdravil obstaja še tako imenovana druga generacija bioloških zdravil («Biobetters»), ki so v primerjavi z inovatorskimi zdravili nekoliko spremenjena. Spremenjen imajo lahko način in pogostost aplikacije, učinkovitost, farmakološke parametre (na primer daljša razpolovna doba in izboljšana obstojnost zaradi pegiliranja, obsežnejše glikolizacije ipd.), biorazpoložljivost ali imunogenost. [1]

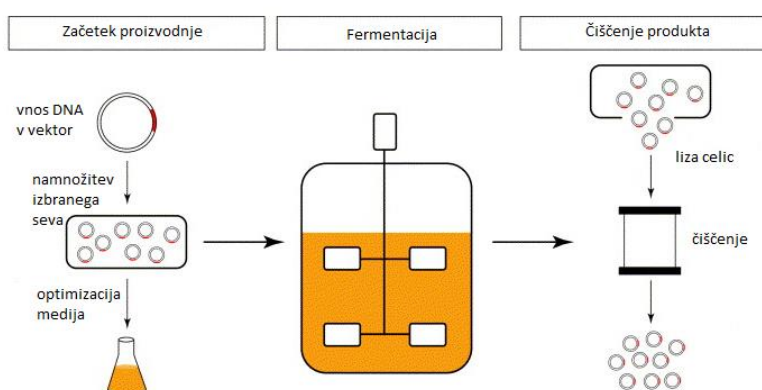
### 1.3 Proizvodnja bioloških zdravil

Proizvodnja bioloških zdravil je izredno kompleksna. Obstaja namreč mnogo različnih poti, kako priti od genetskega materiala, ki nosi zapis za določen protein, do terapevtskega proteina, ki bo varen in učinkovit. V strnjeni obliki je v nadaljevanju opisan eden izmed možnih načinov proizvodnje.

V prvi fazi želeni gen oziroma odsek DNA, ki kodira tarčni protein, izoliramo iz celice ter ga očistimo, namnožimo in fragmentiramo. Nato ustrezni fragment DNA vstavimo v vektor (na primer plazmid ali bakteriofag). Sedaj imamo rekombinantno DNA, ki jo s kemijskimi, biološkimi ali fizikalnimi postopki vnesemo v kompetentno gostiteljsko celico (ekspresijski sistem), kar imenujemo transfekcija (evkariontske celice) oziroma transformacija (bakterijske celice). [1] [2]

Obstajajo različni ekspresijski sistemi: bakterijski, glivni, rastlinski, insektni ter živalski, poleg teh pa poznamo še transgene živali in brezcelične sisteme. Odločitev glede izbire le-tega temelji na ekonomičnosti, hitrosti proizvodnje, lastnostih in čistosti produkta, predvsem pa varnosti. Produkt mora običajno biti čimbolj podoben v telesu prisotnemu proteinu in zato je zaželeno, da so izbrane gostiteljske celice čim bolj sorodne tistim, ki izdelujejo nativni protein. Zato so za humano medicino zelo primerne sesalske celice (na primer celice CHO), iz katerih je več kot polovica biofarmaceutikov, ki so trenutno na tržišču. [27] Poleg sorodnosti so sesalske celice pogosto uporabljene zato, ker lahko z njimi proizvajamo monoklonska protitelesa ter druge kompleksnejše produkte z več poudenotami, več disulfidnimi vezmi in s postranslacijskimi modifikacijami, česar bakterijske celice niso sposobne. Dodatna prednost evkariontskih celic je, da produkt izločajo ekstracelularno, bakterija *E. coli* pa proteine navadno zbere kot netopne in neaktivne agregate v inkluzijska telesa intracelularno, kar poveča kompleksnost in podraži proizvodnjo proteina. Po drugi strani so bakterijske celice enostavnejše za rokovanje, rastejo hitreje in v enostavnejših gojiščih, manj so občutljive za mehanski stres, ne morejo se okužiti s človeku nevarnimi patogenimi organizmi in so v splošnem cenejše in zato priljubljene za manj kompleksne produkte. [1] [2] [28]

Po prenosu tarčnega gena v ekspresijski sistem gojimo gostiteljske celice na selekcijskih gojiščih, da ugotovimo, v katerih celicah je prisoten vektor s tarčnim genom. Tiste celice, ki so sposobne proizvodnje ustreznega



**Slika 2: Primer proizvodnje in čiščenja produkta [47]**

tarčnega proteina namnožimo ter jih imenujemo »osnovna celična banka« (MCB; *ang. master cell bank*). Iz enega alikvota MCB pripravimo več alikvotov »delovne celične banke« (WCB; *ang. working cell bank*), iz enega alikvota WCB proizvedemo eno serijo učinkovine. Celične banke zagotavljajo, da so vse serije pripravljene iz istih celic in da nam materiala za produkt ne zmanjka. [1] [2]

Ko začnemo s proizvodnjo, en alikvot WCB namnožimo v majhni količini medija, nato vsebino prenesemo v nekoliko večjo količino medija ter nazadnje v bioreaktor, kjer začnemo s fermentacijo. Tekom fermentacije v bioreaktorjih vsebino neprestano mešamo ter skrbno spremljamo in uravnavamo pogoje, kot so nivo kisika, temperatura, pH, tlak, nivo glukoze in drugih hranil. V bioreaktorjih se celice množijo in proizvajajo proteine. Ko začne hranil v gojišču zmanjkovati, medij ni več primeren za nadaljnje gojenje. S tem je proces fermentacije zaključen. [1] [2]

Sledi čiščenje produkta. Najprej celice ločimo od fermentacijske brozge s pomočjo filtracije ali centrifugiranja. [1] [2] Zaželeno je, da se produkt izloča ekstracelularno v gojišče, iz katerega ga osamimo z več zaporednimi kromatografskimi metodami, pri katerih se proteini med seboj oziroma od ostalih nečistot ločujejo na podlagi fizikalno-kemijskih lastnosti. Kromatografske metode se uporabljajo tako v fazi čiščenja (t. i. preparativna kromatografija) kakor tudi v analitiki (t. i. analitska kromatografija). Njihovi podrobnejši opisi so podani v poglavju »Analitika bioloških zdravil«.

Tekom čiščenja lahko uporabimo različno število in različne kombinacije kromatografskih tehnik, odvisno od vrste produkta, medija, nosilca ter drugih faktorjev, ki vplivajo na nečistote. Uporabimo lahko na primer a) ionsko izmenjevalno kromatografijo, kjer se protein zaradi naboja veže na stacionarno fazo, nečistote pa potujejo skozi kolono; b) afinitetno kromatografijo, pri kateri se tarčni protein reverzibilno veže na imobiliziran ligand v stacionarni fazi kolone s specifičnimi biološkimi interakcijami; c) izključitveno kromatografijo, pri kateri se molekule ločujejo na podlagi velikosti in oblike; d) adsorpcijsko kromatografijo, kjer pride do adsorpcije tarčnega proteina na podlago zaradi na primer hidrofobnih interakcij.

Čiščenju običajno sledi koncentriranje in priprava končne formulacije produkta, pri kateri učinkovini dodamo pomožne snovi, ki jo stabilizirajo. Produkt moramo tudi ponovno prefiltrirati in ga v aseptičnih pogojih prenesti v embalažo. Po potrebi produkt tudi liofiliziramo, odvisno od njegove stabilnosti v tekoči formulaciji. [1] [2]

#### **1.4 Analitika bioloških zdravil**

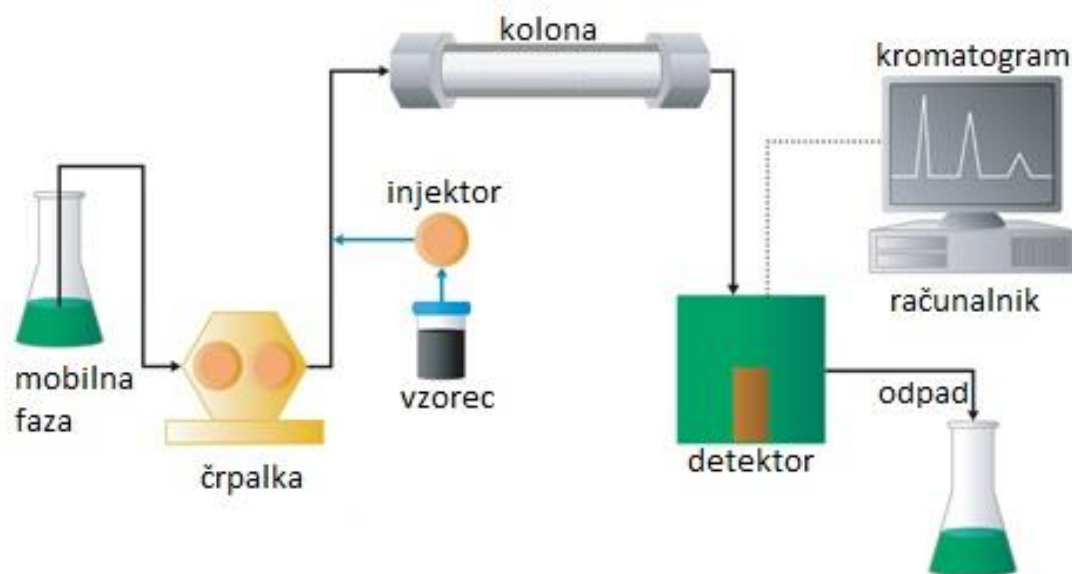
Med proizvodnjo je treba spremljati količino in kakovost nastajajočega produkta, zato moramo razviti in validirati analitske metode za določanje istovetnosti, vsebnosti in čistosti učinkovine. Večinoma so to separacijske (elektroforeza, kromatografija),

spektrofotometrične in imunokemijske metode. [1] Ker bomo tekom študije uporabljali tri različne kromatografske metode, so te podrobneje opisane v nadaljevanju.

### 1.4.1 Kromatografija

Kromatografija je nepogrešljiva separacijska tehnika za analizo širokega spektra molekul, saj omogoča ločbo med seboj zelo podobnih ali zelo različnih molekul. To je mogoče, ker lahko na zadrževanje v koloni ter s tem na ločbo molekul vplivamo preko različnih faktorjev, kot so priprava topil (t. i. mobilnih faz), hitrost pretoka in gradienta mobilne faze, izbora kolone, vrednosti pH, temperature ...

Tekočinsko kromatografijo poznamo že od začetka 20. stoletja, ko je ruski botanik Mikhail S. Cvet uspel kromatografsko ločiti pigmente, ki so bili ekstrahirani iz rastlin. Z leti je tehnika močno napredovala in je danes zelo pomembno orodje v analitiki. Najpogosteje uporabljamo tehniko z imenom Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC; *ang. High performance liquid chromatography*), kjer črpalka ustvarja visok tlak in potiska topilo po sistemu in skozi kolono do detektorja. [1] [29] [30]



**Slika 3: Shematski prikaz komponent sistema HPLC**

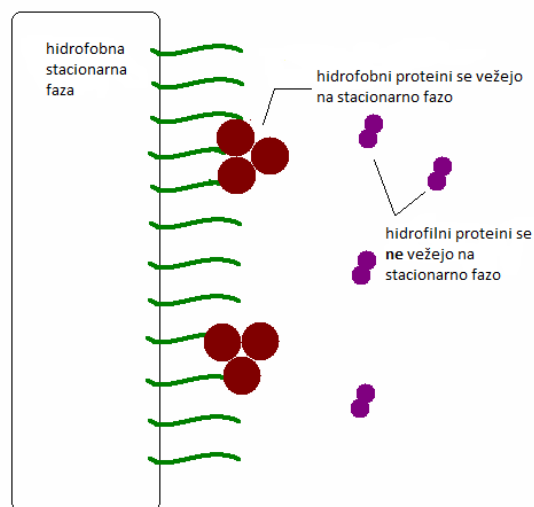
Topilo, imenovano tudi mobilna faza, potuje s pomočjo črpalke do kolone, napolnjene s stacionarno fazo, ki je ključna za separacijo. Injektor v mobilno fazo injicira vzorec, ki pride do kolone kot mešanica snovi. Znotraj kolone prihaja do separacije v odvisnosti od lastnosti molekul. Molekula z višjo afiniteto vezave na stacionarno fazo (oz. matirks kolone) se dlje zadrži na koloni kakor molekula z manjšo afiniteto. Detektor (na primer

ultravijolični ali fluorescenčni detektor) zazna posamezne komponente mešanice snovi, ki se spirajo iz kolone, ter signal pošlje računalniku, ki ga pretvori v kromatogram. Kromatogram je prikazan kot skupek bolj ali manj ločenih vrhov na časovni osi in predstavlja ponazoritev rezultata separacije. Z ustreznim računalniškim programom analiziramo površino pod krivuljo (pod posamičnimi kromatografskimi vrhovi). Površina vrha je namreč odvisna od koncentracije vzorca (rezultat poda vsebnost), za identifikacijo pa izkoristimo dejstvo, da imajo enaki analiti enake čase zadrževanja na koloni pri istih kromatografskih pogojih. [29] [31] [32]

Separacija v kromatografskih kolonah poteka v odvisnosti od fizikalno-kemijskih interakcij med analitom in mobilno oziroma stacionarno fazo. Glede na **polarnost** delcev ločimo normalnofazno in reverznofazno kromatografijo. Različni analiti imajo različne funkcionalne skupine, ki določajo polarnost molekule. Ker se molekule z enako polarnostjo med seboj privlačijo, lahko to izkoristimo za separacijo. V koloni s polarno stacionarno fazo imajo polarne molekule daljši zadrževalni čas in obratno. Mobilne faze so lahko polarne (voda), srednje polarne (acetonitril) ali nepolarne (heksan); stacionarne faze pa prav tako polarne (silika gel), srednje polarne (oktil silan - C8) ali nepolarne (oktadecil silan - C18). [33]

**Normalnofazna kromatografija:** Za to vrsto kromatografije je značilna polarna stacionarna faza, na katero se močneje vežejo polarne molekule in se v koloni dlje zadržijo od nepolarnih molekul. Mobilna faza je bolj nepolarna, da se v njej dlje zadržujejo nepolarne molekule in tako pride do ločbe. V analitiki proteinov jo redko uporabljamo. [1] [33]

**Reverznofazna kromatografija:** Pri reverznofazni kromatografiji (*ang. Reversed-phase chromatography - RPC*) ločujemo molekule na podlagi njihove hidrofobnosti. Stacionarna faza je – za razliko od normalnofazne kromatografije – nepolarna (na primer C18). Mobilna faza je bolj polarna mešanica, navadno iz različnih deležev vode in organskega topila, kot sta naprimer acetonitril ali



**Slika 4: Ponazoritev delovanja RPC [48]**

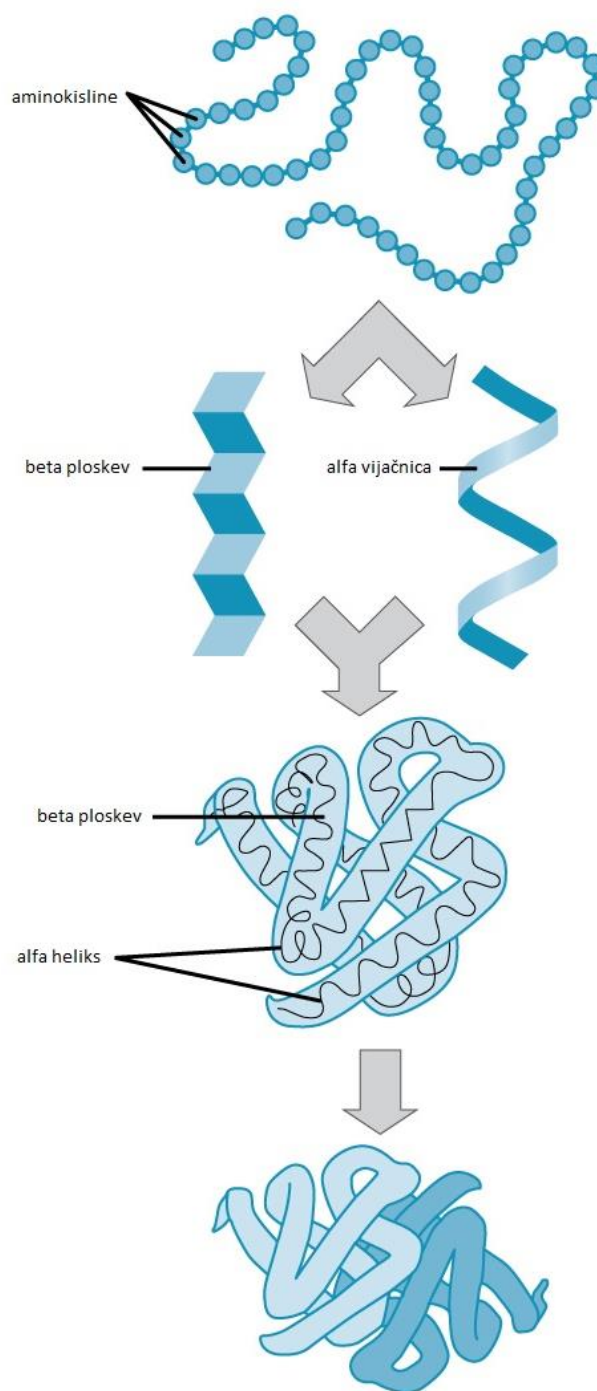
metanol. Ta vrsta kromatografije je zaradi široke uporabnosti, dobre resolucije, enostavne uporabe, visokih izkoristkov in dobre ponovljivosti zelo razširjena v analitiki, redko pa jo uporabljamo za izolacijo proteinov, saj je tridimenzionalna zgradba proteinov zelo občutljiva za ostre pogoje, ki jih pogosto uporabljamo pri RPC, in zato proteini običajno ne ohranijo biološko aktivne oblike. RPC je ena od metod, ki jih bomo uporabili v eksperimentalnem delu. [1] [29] [33]

Poleg kromatografij, ki temeljijo na polarnosti, poznamo tudi takšne, ki temeljijo na **naboju**, t. i. **ionske izmenjevalne kromatografije**. Analiti z različnim nabojem se med seboj ločujejo zaradi različno močnih elektrostatskih interakcij s stacionarno fazo, ki vsebuje ionske izmenjevalce, kovalentno vezane na matriks. Če je stacionarna faza negativno nabita privlači katione, zato jo imenujemo kationska izmenjevalna kromatografija (*ang. Cation-exchange chromatography – CEC*). To bomo tudi uporabili v eksperimentalnem delu. Je hitra in izredno selektivna tehnika za separacijo proteinov. Vrednost pH, pri katerem je celokupni pozitivni naboj enak celokupnemu negativnemu naboju in je neto naboj proteina 0, se imenuje izoelektrična točka (pI). Če se protein nahaja v raztopini s pH, nižjim od pI, bo imel pozitiven neto naboj, in obratno. Izoelektrična točka je odvisna od aminokislinskega zaporedja in jo zato lahko predvidimo in izberemo ustrezno sestavo pufra, da bo imel protein ustrezen naboj. Običajno protein sprostimo iz kolone s povišanjem ionske jakosti (ioni se namesto analita vežejo na stacionarno fazo) ali s spremembo pH (neto naboj se spremeni) mobilne faze. [1] [29] [34]

Zadnja skupina kromatografskih ločb, ki jo bomo opisali in ki jo bomo uporabili v eksperimentalnem delu, temelji na separaciji molekul glede na **velikost in obliko** – t. i. **izključitvena kromatografija** (*ang. Size-exclusion chromatography – SEC*). Ločba poteka v kolonah z matriksom iz različnih inertnih materialov. Matriks vsebuje pore znane velikosti. Majhne molekule, ki vstopijo v tako kolono, lahko difundirajo v veliko število por in se tako zadržijo na koloni dlje časa kakor večje molekule. Te lahko vstopajo samo v večje pore ali pa sploh ne morejo vstopati v pore, temveč se zgolj gibljejo med delci matriksa in se tako sperejo iz kolone zelo hitro. Mobilna faza, v katerem so analiti raztopljeni, služi prenosu teh analitov skozi kolono ter preprečuje intrakcije med analitom in stacionarno fazo, saj mora ločba potekati samo na podlagi velikosti in oblike. [1] [29] [33]

## 1.5 Struktura in razgradne poti proteinov (nestabilnost proteinske strukture)

Biološka zdravila so večinoma terapevtski proteini, zato je poznavanje njihove strukture izrednega pomena – tako za razvoj in proizvodnjo proteinskih terapevtikov kakor tudi za testiranje njihove stabilnosti. Poznamo štiri ravni strukture proteinov. Na primarni ravni so proteini sestavljeni iz aminokislin. Te so med seboj povezane s peptidnimi vezmi v verigo. Aminokislina vsebuje stranske verige, ki zaradi svoje polarnosti in naboja vplivajo na strukturo proteinov. Aminokislina se med seboj lahko poveže tudi z disulfidnimi vezmi, ki so poleg peptidne vezi edine kovalentne vezi znotraj proteinov. Zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti aminokislin pride do zvijanja in intramolekularnega povezovanja verige v sekundarne strukture – najpogosteje v alfa vijačnice ali beta ploskve. Več sekundarnih struktur znotraj proteina tvori tridimenzionalno strukturo proteina – terciarno strukturo. Več takih podenot se lahko poveže med seboj in tvori kvartarno strukturo proteina. [35]



**Slika 5: Ravni strukture proteinov [49]**

Z razvojem analize kemije smo spoznali in preučili veliko možnih poti razgradnje, do katerih lahko pride pri terapevtskih proteinih. Proteini se sčasoma lahko spreminjajo, kar

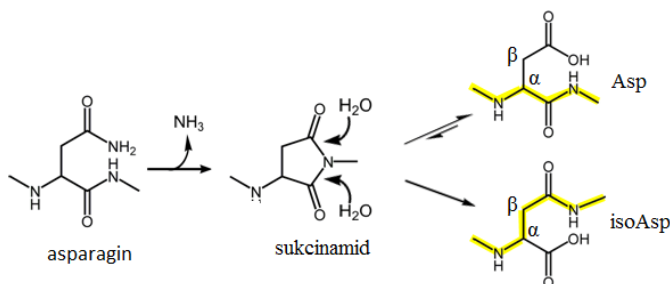


lahko vpliva na njihovo stabilnost. Proteinske nestabilnosti delimo v dve skupini: a) **kemijske nestabilnosti**, ki imajo neposredni vpliv na primarno strukturo proteinov, saj prihaja do nastanka ali cepitve kovalentnih vezi in tako nastanejo drugačne kemijske strukture; b) **fizikalne nestabilnosti**, pri katerih se spremeni samo fizikalno stanje in s tem ureditev molekule, primarna struktura pa se ohrani. Včasih sta ti dve skupini povezani, saj lahko na primer oksidacija, ki sodi med kemijske nestabilnosti, vodi v agregacijo, ki sodi med fizikalne. Obratno lahko sprememba fizikalnega stanja molekule (na primer delno razvitje) povzroči izpostavitve nekaterih aminokislin, ki so nato lahko podvržene kemijskim spremembam. Opisali bomo pomembnejše poti razgradnje proteinov, ter jih razvrstili v omenjeni skupini. [36] [37]

### 1.5.1 Kemijske nestabilnosti

Mednje sodijo take spremembe proteinov, pri katerih se tvorijo in/ali cepijo kovalentne vezi, kar pomeni, da se spreminja primarna struktura proteinov. Opisali bomo nekatere izmed možnih kemijskih nestabilnosti.

**Deamidacija:** Je pogost pojav spremembe primarne strukture pri proteinih. Pri deamidaciji pride do hidrolize amidne skupine v stranskih verigah asparagina ali glutamina, ki vodi v nastanek proste karboksilne skupine. Ker



**Slika 6: Prikaz mehanizma deamidacije asparagina [50]**

deamidacija vpliva na fizikalno-kemijsko stabilnost, na biološko aktivnost proteina in ker lahko povzroča imunogenost, je obseg njene pojavnosti treba nadzorovati. Pri kislem pH poteka deamidacija tako, da amid neposredno hidrolizira in nastane asparaginska oziroma glutaminska kislina. Pri nevtralnem ali bazičnem pH pa deamidacija asparagina poteka tako, da najprej pride do nastanka cikličnega intermedija sukcinamida, ta pa se hidrolizira v asparaginsko kislino ali v izoasparaginsko kislino. Podobno se dogaja pri nevtralnem in bazičnem pH z glutaminom, le da je intermediat, ki nastane pri tej reakciji, manj stabilen kakor intermediat v reakciji asparagina, in je zato ta reakcija redkejša. Na proces deamidacije poleg pH vplivajo še aminokislinsko zaporedje in molekulska struktura,

temperatura, ionska moč in sestava pufru (višja ionska moč ter prisotnost boratnih ali fosfatnih ionov proces deamidacije pospešijo) ter denaturacija. [36] [37] [38]

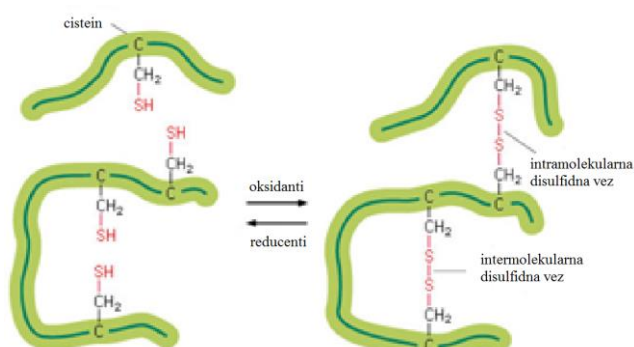
**Hidroliza:** Proteini so razgradnji oziroma hidrolizi podvrženi tako pri kislem kakor pri bazičnem pH. Pri tistih proteinih, ki vsebujejo asparaginsko kislino, se ta modifikacija zgodi hitreje. Do hidrolize lahko pride po deamidaciji asparagina v asparaginsko kislino pri podobnih pH, ki povzročajo tudi deamidacijo ( $< 3$  ali  $> 6$ ). Tudi povišana temperatura pospešuje hidrolizo. [37] [38]

**Oksidacija:** Je kemijska degradacija proteina, do katere pride predvsem na proteinih, ki vsebujejo aminokislino metionin, cistein, histidin, triptofan ali tirozin; v posebnih okoliščinah se lahko oksidirajo tudi nekatere druge. Aminokislino reagirajo s kisikovimi radikali v svojem okolju, metionin in cistein zaradi tiolnih skupin, ostale tri pa zaradi aromatskega obroča. Najpogosteje se oksidira metionin, lahko že spontano zaradi prisotnosti atmosferskega kisika med čiščenjem in shranjevanjem proteinov. Oksidacija proteinov lahko povzroči spremembo fizikalno-kemijskih lastnosti proteina, kar vodi v agregacijo ali fragmentacijo, to pa lahko pomeni spremenjeno biološko aktivnost in večjo imunogenost. Stopnja oksidacije je odvisna tudi od strukture proteina, izpostavljenosti za oksidacijo občutljivih aminokislin, fleksibilnosti proteinskega ogrodja ter vrste in pH pufru (če spremenjeni pH povzroči konformacijske spremembe, se aminokislino, ki so občutljive za oksidacijo, lahko izpostavijo). Tudi prisotnost kovinskih ionov lahko povzroči oksidacijo, če se ti lahko vežejo na del proteina. To lahko vodi v konformacijske spremembe in posledično v agregacijo. Kovinski ioni reagirajo s peroksidi in tvorijo hidroksilni radikal, ki je nespecifični oksidant. Kovinski ioni lahko povzročijo tudi disulfidno izmenjavo, kakor to zasledimo pri redukciji ali denaturaciji s sečnino in gvanidinijevim kloridom. [39] [40]

**Fotodegradacija:** Svetloba, kateri je protein lahko izpostavljen, lahko povzroči razgradnjo, ta lahko vodi tudi v agregacijo. Aminokislino, ki so najbolj dovzetne za fotodegradacijo so cistein in aromatske aminokislino fenilalanin, tirozin in triptofan. Razgradnja je odvisna od strukture proteina, formulacije, embalaže ter od valovne dolžine, jakosti in časa izpostavitve svetlobi. Najpogostejša fotodegradacijska pot je fotooksidacija,

ki lahko povzroči spremembe primarne, sekundarne ali terciarne strukture proteina in lahko spremeni stabilnost, biološko aktivnost ter imunogenost proteina. [36] [37] [39] [41]

**Redukcija:** Pri reducirajočih pogojih lahko pride do cepitve disulfidnih vezi med cisteini, kar spremeni konformacijo proteina. Disulfidne vezi se lahko tudi napačno ponovno vzpostavijo. [36] [38]



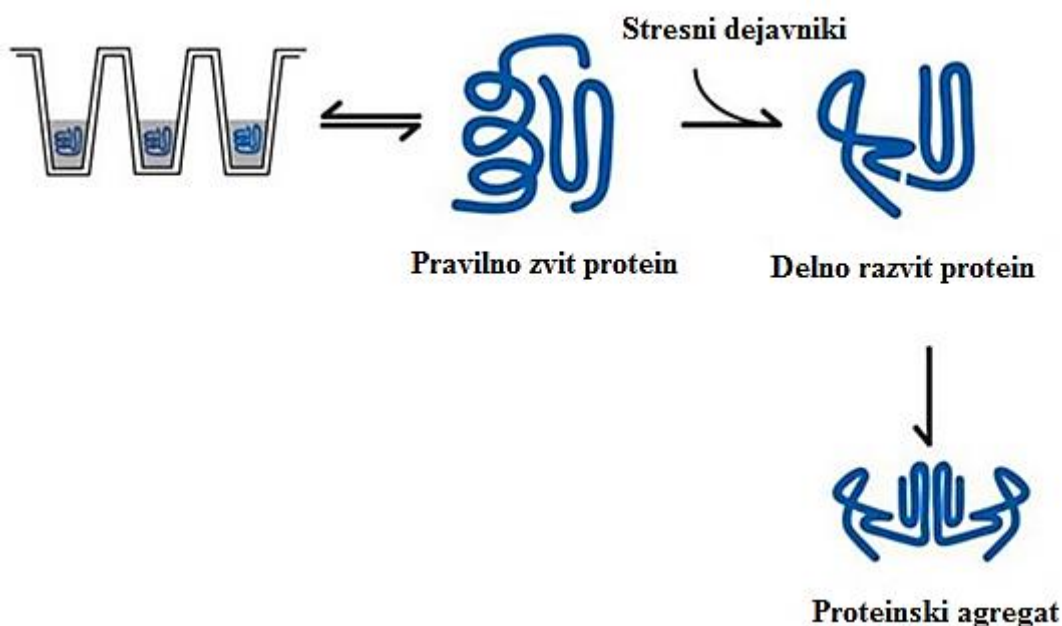
**Slika 7: Disulfidne vezi [51]**

### 1.5.2 Fizikalne nestabilnosti

**Denaturacija:** Pomeni izgubo native oblike proteina zaradi (delnega) razvitja, do katerega lahko pride zaradi povišane temperature, ekstremnih vrednosti pH ali denaturantov, kot sta sečnina in gvanidinijev klorid. Denaturacija lahko vodi v nastanek agregatov in je zato lahko ireverzibilna sprememba. [37]

**Agregacija:** Je pogost pojav, ki lahko povzroča zmanjšano aktivnost in topnost terapevtika ter imunski odziv bolnikov na zdravilo. Agregati lahko nastanejo zaradi nekovalentnih povezav, na primer po delni denaturaciji in izpostavitvi hidrofobnih regij proteina, ali zaradi kovalentnih povezav z disulfidnimi mostički. Agregati so lahko reverzibilni ali ireverzibilni ter topni ali netopni. Vzrokov za nastanek agregatov je mnogo, pomembnejši za industrijo so nepravilno zvitje proteina ob ekspresiji ter stresni dejavniki, ki izhajajo iz procesa proizvodnje (na primer čiščenja ali filtracije), transporta, shranjevanja in aplikacije. Ti so na primer sprememba pH, temperature, zamrzovanje, strižne sile, spremembe v ionski jakosti topila in koncentraciji proteina, večkratno zamrzovanje in odtaljevanje, adsorpcija na površino<sup>2</sup>, oksidacija proteina ... Agregati lahko zrastejo do te mere, da postanejo netopni precipitati. Če precipitati nastanejo z izsoljevanjem, so ti reverzibilni in ohranijo biološko aktivnost. [36] [37]

<sup>2</sup> Adsorpcija na površino lahko povzroči spremembo konformacije proteinov.



**Slika 8: Agregacija proteinov [52]**

## 1.6 Testiranje stabilnosti bioloških zdravil

Ker imajo lahko biološka zdravila neželene učinke (povzročajo lahko na primer imunski odgovor ali alergijske reakcije), moramo bolnikom zagotavljati stabilna zdravila visoke čistosti in znane sestave, da zagotavljamo čim višjo stopnjo varnosti in učinkovitosti. Zato moramo imeti dobro nadzorovan proces proizvodnje, saj ta močno vpliva na sestavo produkta. Protein, katerega proizvajamo, moramo s pomočjo raznovrstnih analitskih metod čim boljše opisati in njegovo proizvodnjo s temi metodami neprestano spremljati. Poleg tega je treba produkt z ustrezno formulacijo in embalažo zaščititi pred vplivi iz okolja, ki bi lahko povzročali spremembe proteina. Terapevtski proteini so namreč lahko nehote izpostavljeni stresnim dejavnikom med proizvodnjo, polnjenjem, transportom, shranjevanjem ter aplikacijo. Če želimo ugotoviti, kako stabilen je terapevtski protein, moramo opraviti dolgoročno testiranje stabilnosti pri predvidenih pogojih za shranjevanje zdravila in pospešeno testiranje stabilnosti pri nekoliko višjih temperaturah, ki pomagajo pri napovedovanju dolgoročne stabilnosti in dajo vpogled v spremembe, do katerih bi prišlo, če bi se pogoji shranjevanja za krajši čas spremenili, na primer med transportom zdravila. Tako za dolgoročno kakor za pospešeno testiranje stabilnosti obstajajo ICH-smernice, ki se jih moramo pri testiranju stabilnosti držati.

Poleg tega moramo izvesti tudi stresno študijo, ki omogoča opredelitev razgradnih poti proteina ter nastalih razgradnih produktov pri različnih stresnih pogojih. Pomaga tudi opredeliti, katere analitske metode so sposobne zaznati spremembe, do katerih lahko pride med testiranjem stabilnost. Poleg tega s tako študijo preverimo ustreznost formulacije, ki jo lahko glede na rezultate po potrebi tudi tako spremenimo, da se obstojnost terapevtskega proteina izboljša, ter nam omogoča izboljšave v procesu proizvodnje, če je študija izvedena dovolj zgodaj v razvoju terapevtika.

Ker nastajajo pri različnih pogojih različni razgradni produkti, potrebujemo več komplementarnih analitskih metod, da dobimo čim več informacij. Stresne pogoje izbreemo glede na pogoje, ki jim je naš produkt lahko nehote izpostavljen, na primer višja temperatura od priporočene temperature shranjevanja med transportom zdravila, ali izpostavitve zdravila svetlobi med aplikacijo bolniku. Lahko se tudi zgodi, da med stresno študijo ne dobimo razgradnih produktov. To je sprejemljivo, če so izbrani stresni pogoji dovolj ostri in nam zagotavljajo, da se zdravilo kljub nehoteni izpostavitvi stresnim dejavnikom ne spreminja in postane s tem manj učinkovito ali manj varno. Po stresni študiji je treba metode, ki so se izkazale kot primerne za zaznavo sprememb, tudi validirati in z njimi spremljati dolgoročno testiranje stabilnosti produkta. [2] [39] [40] [42] [43]

## 2 NAMEN DELA

Tekom študije bomo preverili, ali bi pri pogojih, ki jim je izbrani kemijsko modificiran terapevtski protein lahko hote ali nehote med proizvodnjo, polnjenjem, shranjevanjem, transportom ali aplikacijo izpostavljen, prišlo do kemijskih in/ali fizikalnih sprememb ter ali z izbranimi analitskimi metodami te spremembe lahko zaznamo in ovrednotimo. Te spremembe lahko namreč vplivajo na učinkovitost in varnost zdravila in jih moramo zato preveriti.

To bomo naredili tako, da bomo protein izpostavili različnim pogojem, ki so navedeni v nadaljevanju, ter z analitskimi kromatografskimi metodami RPC, SEC in CEC preverili, ali se je ob tem protein spremenil.

Za testiranje dolgoročne in pospešene stabilnosti proteina smernice ICH predpisujejo pogoje, za stresno študijo in za določanje sposobnosti metod za zaznavo sprememb pa so smernice ohlapne, zato si pomagamo z literaturnimi podatki. Upoštevati moramo tudi zgradbo produkta in sestavo formulacije, saj močno vplivata na stabilnost oziroma razgradnjo. Ker je izbran protein kemijsko modificiran tako, da ima izboljšano obstojnost, bodo nekateri izbrani pogoji bolj poostreni. Nekaterih pogojev, ki so priporočeni v literaturi, kot sta naprimer večkratno zamrzovanje in odtaljevanje ter fotooksidacija, ne bomo preverili, saj bodo proučeni v ločenih študijah. Glede na rezultate, pridobljene v študiji, nameravamo ugotoviti, katere spremembe nastajajo in ali izbrane metode te spremembe zaznajo. Glede na to bomo sklepali, ali je treba uvesti dodatne metode za spremljanje stabilnosti proteina oziroma, ali je formulacijo in s tem obstojnost izbranega kemijsko modificiranega terapevtika treba izboljšati.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Materiali

##### 3.1.1 Kemikalije in potrošni material

Vse kemikalije, ki jih bomo med študijo potrebovali, so navedene v Preglednici II. Naveden je tudi potrošni material.

**Preglednica II: Uporabljene kemikalije in potrošni material ter proizvajalci**

<b>kemikalija / potrošni material</b>	<b>proizvajalec, kataloška številka</b>
<b>natrijev hidroksid</b>	Merck (Darmstadt, Nemčija) 106498
<b>natrijev klorid</b>	Merck, 1.06404
<b>ditiotreitol (DTT)</b>	Sigma (St. Louis, Misuri, ZDA) 43815
<b>vodikov peroksid</b>	Merck, 107209
<b>dinatrijev fosfat dihidrat</b> ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, 1.06580
<b>natrijev fosfat dihidrat</b> ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, 1.06345
<b>natrijev fosfat monohidrat</b> ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma, S-9638
<b>klorovodikova kislina</b>	Merck, 109057
<b>sukcinska kislina</b>	Merck, 100682
<b>pH pufri</b>	Merck, različne kataloške številke
<b>acetonitril (ACN)</b>	Merck, 1.00030
<b>trifluoroacetna kislina (TFA)</b>	Merck, 1.08262
<b>bakrov(II) sulfat (<math>\text{CuSO}_4</math>)</b>	Sigma, C1297-100g
<b>železov(III) klorid heksahidrat</b> ( $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma, F2877-100g
<b>tween-80</b>	Sigma, 93781 / P-6349
<b>očetna kislina</b>	Merck, 1.00063
<b>metanol</b>	Merck, 1.06009

<b>kemikalija / potrošni material</b>	<b>proizvajalec, kataloška številka</b>
<b>kalijev klorid</b>	Sigma, P9541
<b>etanol</b>	Merck, 1.00986
<b>aprotinin</b>	N/A
<b>kromatografska kolona za RPC</b>	YMC (Kyoto, Japonska) YMC-ODS (C18) 4.6 x 150 MM, kat. št.: AQ20S03
<b>kromatografska kolona za SEC</b>	YMC-Pack-Diol-300, 6.0 mm x 300 mm, kat. št.: DL30S053006WT
<b>kromatografska kolona za CEC</b>	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, ZDA) Dionex ProPac WCX-10 Column, 4 x 250 mm, kat. št.: 054993
<b>PES-filter 0,22 µm</b>	Corning (New York, ZDA), 431098
<b>viale</b>	Waters (Milford, Massachusetts, ZDA), 186002639
<b>mikrocentrifugirke</b>	Eppendorf (Hamburg, Germany), 022431081

### 3.1.2 Oprema

Oprema, ki jo bomo tekom študije uporabljali, je naštet v Preglednici III.

#### Preglednica III: Oprema in proizvajalci

<b>oprema</b>	<b>proizvajalec, model</b>
<b>HPLC</b>	Agilent (Santa Clara, California, ZDA), 1200 series
<b>programska oprema za HPLC</b>	Empower 3 (Orlando, Florida, ZDA)
<b>sistem za prečiščevanje vode</b>	Millipore (Billerica, Massachusetts, ZDA) Milli-Q Advantage A10
<b>tehnica</b>	Mettler Toledo (Greifensee, Švica), XP205 in XP26
<b>pH-meter</b>	Metrohm (Herisau, Švica) 780
<b>vorteks</b>	VELP Scientifica (Usmate, Italija)
<b>centrifuga</b>	Eppendorf MiniSpin plus
<b>pipete</b>	Sartorius (Göttingen, Nemčija) Biohit, m-line



<b>oprema</b>	<b>proizvajalec, model</b>
<b>magnetno mešalo</b>	IKA (Staufen, Nemčija) C-MAG MS 10
<b>inkubator</b>	Kambič (Semič, Slovenija) I-105 CK
<b>termomikser</b>	Eppendorf Thermomixer comfort
<b>zamrzovalnik ≤ - 60 °C</b>	Panasonic (Kadoma, Japonska) MDF – U55V - PE
<b>črpalka za filtriranje</b>	Millipore Billerica, MA 01281
<b>hladilnik 2-8 °C</b>	Angelantoni industrie (Perugia, Italija) EKOFRIGOLAB 700
<b>termometer</b>	Hanna instruments (Woonsocket, Rhode Island, ZDA) Checktemp °C
<b>klimakomora</b>	Binder (Tuttlingen, Nemčija) Climatic Chamber KBF 240

### **3.1.3 Raztopine in pufri**

Vsi pufri bodo pripravljene s prečiščeno vodo Milli-Q.

#### **Pufer za redčenje (DS-pufer)**

7 mM sukcininska kislina, pH 5,0:

83 mg sukcininske kisline raztopimo v 90 mL Milli-Q vode ter raztopini med mešanjem dodajamo 1 M NaOH, dokler ne dosežemo pH 5,0. Nato raztopino v merilni buči (V = 100 mL) dopolnimo do oznake z vodo Milli-Q ter jo prefiltriramo skozi PES-filter. Tako pripravljeno raztopino imenujemo DS-pufer.

#### **Pufer za pripravo vzorcev za RPC (RPC-pufer)**

acetatni pufer pH 5; 5 mg/mL Tween-80:

5 mL očetne kisline in 0,5 g Tween-80 raztopimo v 90 mL vode Milli-Q, pH s 5 M NaOH umerimo na 5,0. Nato raztopino v merilni buči (V = 100 mL) z vodo Milli-Q dopolnimo do oznake. Tako pripravljeno raztopino imenujemo RPC-pufer.

#### **Pufer za pripravo vzorcev za SEC**

Vzorci pripravljamo (redčimo) z mobilno fazo za SEC.

### **Pufer za pripravo vzorcev za CEC (CEC-pufer)**

10 mM natrijev fosfat, pH 6,5; 0,5 % (w/v) Tween-80:

1,38 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  raztopimo v 950 mL vode Milli-Q in s 5 M NaOH pH umerimo na 6,5. Raztopino prelijemo v bučo ( $V = 1 \text{ L}$ ) in jo z vodo Milli-Q dopolnimo do oznake. Nato zatehtamo 0,5 g Tween-80, ki ga raztopimo v približno 90 mL tako pripravljene raztopine. Raztopino prenesemo v bučo ( $V = 100 \text{ mL}$ ) in z isto raztopino dopolnimo do oznake. Nazadnje raztopino prefiltriramo skozi PES-filter.

### **3.1.4 Standardi**

Za zagotavljanje zanesljivosti rezultatov bomo v analizah uporabljali interni standard, t. j. lasten proizvod, ki je dobro kvantitativno in kvalitativno opredeljen.

## **3.2 Metode**

### **3.2.1 Reverznofazna kromatografija**

Uporabili bomo sledeči mobilni fazi:

**Mobilna faza A (MFA – RPC): 10 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA**

V 900 mL vode Milli-Q dodamo 1 mL TFA. Raztopini nato dodamo še 100 mL ACN ter jo dobro premešamo.

**Mobilna faza B (MFB – RPC): 80 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA**

V 200 mL vode Milli-Q dodamo 1 mL TFA. Raztopini nato dodamo 800 mL ACN ter jo dobro premešamo.

Uporabili bomo gradientno metodo s pretokom mobilne faze 1 mL/min in temperaturo kolone 65 °C.

**Preglednica IV: Gradient metode RPC**

<b>čas (min)</b>	<b>MFA – RPC (%)</b>	<b>MFB – RPC (%)</b>
<b>2</b>	85	15
<b>10</b>	40	60
<b>19</b>	20	80
<b>19.1</b>	0	100
<b>21</b>	0	100
<b>21.1</b>	95	5

čas (min)	MFA – RPC (%)	MFB – RPC (%)
22	95	5
24	0	100
26	0	100
26.1	85	15
30	85	15

Opomba: Sestavi MFA – RPC in MFB – RPC sta opisani v besedilu nad preglednico (glej poglavje 3.2.1)

Vzorci bomo pred analizo z ustreznim pufrom redčili na končno koncentracijo 1,5 mg/mL. Injicirali bomo tak volumen vzorca, da bo vseboval nominalno 15 µg proteina. Detekcija bo potekala pri valovni dolžini 215 nm z detektorjem UV.

### 3.2.2 Izključitvena kromatografija

Uporabili bomo sledečo mobilno fazo:

**Mobilna faza (MF – SEC): 20 mM natrijev fosfat, 270 mM KCl, pH 6,5; 10 % (v/v) etanol**

2,18 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1,075 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  in 20,13 g KCl raztopimo v približno 890 mL Milli-Q vode. Nato z 1 M NaOH pH umerimo na 6,5 in v merilnem valju raztopino z Milli-Q vodo dopolnimo do volumna 900 mL. Raztopino nato prefiltriramo skozi PES-filter. Raztopini dodamo 100 mL etanola in jo dobro premešamo.

Uporabili bomo izokratsko metodo s pretokom mobilne faze 0,5 mL/min in temperaturo kolone 30 °C. Vzorce bomo pred analizo z ustreznim pufrom redčili na končno koncentracijo 1,2 mg/mL. Injicirali bomo tak volumen vzorca, da bo vseboval nominalno 12 µg proteina. Detekcija bo potekala pri valovni dolžini 215 nm z detektorjem UV.

### 3.2.3 Ionsko izmenjevalna kromatografija

Uporabili bomo sledeči mobilni fazi:

**Mobilna faza A (MFA – CEC): 9 mM natrijev fosfat, pH 6,5; 10 % (v/v) ACN**

1,38 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  raztopimo v približno 950 mL Milli-Q vode. Raztopini pH umerimo na 6,5 s 5 M NaOH ter jo prenesemo v merilno bučo ( $V = 1 \text{ L}$ ). Raztopino z vodo Milli-Q dopolnimo do oznake in jo dobro premešamo. V 900 mL tako pripravljene raztopine dodamo 100 mL ACN in jo prefiltriramo skozi PES-filter.

**Mobilna faza B (MFB – CEC): 36 mM natrijev fosfat, 180 mM NaCl, pH 8,5; 10 % (v/v) ACN**

5,52 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  in 11,69 g NaCl raztopimo v približno 950 mL vode Milli-Q. Raztopini pH umerimo na 8,5 s 5 M NaOH ter jo prenesemo v merilno bučo ( $V = 1 \text{ L}$ ). Raztopino z vodo Milli-Q dopolnimo do oznake in jo dobro premešamo. V 900 mL tako pripravljene raztopine dodamo 100 mL ACN in jo prefiltriramo skozi PES-filter.

Uporabili bomo gradientno metodo s pretokom mobilne faze 1 mL/min in temperaturo kolone 65 °C.

**Preglednica V: Gradient metode CEC**

čas (min)	MFA – CEC (%)	MFB – CEC (%)
0	85	15
15	55	45
15.1	0	100
21	0	100
21.1	85	15
30	85	15

Opomba: Sestavi MFA – CEC in MFB – CEC sta opisani v besedilu nad preglednico (glej poglavje 3.2.3)

Vzorci bomo pred analizo z ustreznim pufrom redčili na končno koncentracijo 1,0 mg/mL. Injicirali bomo tak volumen vzorca, da bo vseboval nominalno 10 µg proteina. Detekcija bo potekala pri valovni dolžini 215 nm z detektorjem UV.

### 3.2.4 Priprava vzorcev

Analize bomo izvedli z vzorci DS s koncentracijo 18 mg/mL. Vzorcev pred izpostavitvijo stresnim pogojem ne bomo redčili – razen v primerih, ko bo to potrebno (glej nadaljevanje). Redčenje bo zanemarljivo vplivalo na koncentracijo proteina. Poleg vzorcev, izpostavljenih stresnim pogojem, bomo analizirali tudi nativni vzorec, ki ne bo izpostavljen stresnim pogojem – kontrolni vzorec. Pripravili bomo šest alikvotov vzorcev pri vsakem pogojem, da zagotovimo dovoljšnjo količino v primeru, da katera od analiz ne bi bila veljavna. Poleg tega bomo naknadno, po potrebi, iste vzorce analizirali še z nekaterimi drugimi metodami, ki so trenutno v fazi zgodnjega razvoja. Te metode bi nam lahko

dodatno pojasnile kaj se s proteinom dogaja ob izpostavitvi posameznim stresnim pogojem. Analizirali bomo po en alikvot vsakega stresnega vzorca.

#### ***3.2.4.1 Vzorci, izpostavljeni povišani temperaturi***

Po en alikvot vzorca bomo izpostavili naslednjim pogojem:

- 24 ur pri sobni temperaturi,
- 7 dni pri 40 °C (glej podpoglavje 3.2.4.2),
- 24 ur pri 60 °C (glej podpoglavje 3.2.4.2).

**Utemeljitev izbranih pogojev:** pri sobni temperaturi je izbrani protein predvidoma obstojen. Pri 40 °C in 60 °C bomo preverili, ali prihaja do denaturacije in/ali agregacije proteinov (oziroma ali prihaja do drugih sprememb) in ali z izbranimi metodami te spremembe zaznamo.

#### ***3.2.4.2 Vzorci, izpostavljeni različnim pH vrednostim***

Po en alikvot vzorca bomo izpostavili naslednjim pogojem:

**pH 5:** Vzorci imajo zaradi sukcinatnega pufrja pH okoli 5, zato tem vzorcem zgolj izmerimo pH in jih izpostavimo sledečim pogojem:

- 24 ur pri 60 °C,
- 7 dni pri 40 °C.

**pH 2:** Vzorcem ( $V = 200 \mu\text{L}$ ) umerimo pH na približno 2 z 1 M HCl (za to bo na podlagi preliminarnih testiranj potreben dodatek zgolj nekaj  $\mu\text{L}$ , zato je redčenje proteina zanemarljivo). Nato vzorce izpostavimo sledečim pogojem:

- 24 ur pri 60 °C,
- 7 dni pri 40 °C.

**pH 8:** Vzorcem ( $V = 200 \mu\text{L}$ ) umerimo pH na približno 8 z 0,5 M NaOH (za to bo na podlagi preliminarnih testiranj potreben dodatek zgolj nekaj  $\mu\text{L}$ , zato je redčenje proteina zanemarljivo). Nato vzorce izpostavimo naslednjim pogojem:

- 24 ur pri 60 °C,
- 7 dni pri 40 °C.

**Utemeljitev izbranih pogojev:** pri proteinu, ki je bil izpostavljen spremenjenemu pH lahko pride do deamidacije, hidrolize, oksidacije, denaturacije in/ali nastanka agregatov.

Pri povišani temperaturi so lahko te spremembe še večje, zato bomo preverili kombinacijo temperatur 40 °C oz. 60 °C in ekstremnih pH vrednosti.

#### **3.2.4.3 Vzorci, izpostavljeni mehanskemu stresu**

200 µL vzorca bomo izpostavili mehanskemu stresu tako, da ga bomo stresali pri 1000 obratih na minuto 24 ur pri sobni temperaturi.

**Utemeljitev izbranih pogojev:** Pri proteinu, ki je izpostavljen mehanskemu stresu, lahko pride do delnega razvitja in nastanka agregatov. Poleg strižnih sil je pomemben faktor za nastanek agregatov tudi povečan stik z zrakom med mešanjem, pri čemer pride do delnega razvitja proteina, ki lahko vodi v agregacijo.

#### **3.2.4.4 Vzorci, izpostavljeni oksidirajočim pogojem**

295 µL vzorca bomo dodali 5 µL 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, da bo končna vsebnost H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 %. Tako pripravljen vzorec inkubiramo 24 ur pri sobni temperaturi.

**Utemeljitev izbranih pogojev:** Oksidant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je pogosto uporabljen oksidant v stresnih študijah. Za tak pogoj smo se odločili zato, ker na podlagi literaturnih podatkov vemo, da bi taka vsebnost H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> morala povzročiti spremembo proteina, vendar ne vemo, ali bomo te spremembe zaznali z izbranimi metodami. Prav tako ne vemo, ali bo kemijski modifikator, ki je vezan na protein, oksidacijo proteina omejil oziroma preprečil. Če se protein oksidira, pride do konformacijskih sprememb, ki lahko vodijo tudi v agregacijo.

#### **3.2.4.5 Vzorci, izpostavljeni reducirajočim pogojem**

Najprej bomo pripravili 1 M DTT tako, da bomo zatehtali 154 mg DTT in ga raztopili v 1 mL DS-pufra. Nato bomo 5 µL 1 M DTT dodali v 328 µL vzorca, da bo raztopina DTT 15 mM. Tako pripravljen vzorec bomo 24 ur inkubirali pri sobni temperaturi.

**Utemeljitev izbranih pogojev:** Reducent DTT lahko povzroči redukcijo disulfidnih vezi, kar pomeni, da se spremeni nativna struktura proteina in s tem lahko tudi njegova biološka aktivnost. Nastanejo lahko tudi agregati.

#### **3.2.4.6 Vzorci, izpostavljeni kovinskim ionom**

- **Cu<sup>2+</sup>:** Najprej bomo zatehtali 48,4 mg CuSO<sub>4</sub> in ga raztopili v 9 mL vode Milli-Q. Nato bomo v merilni buči (V = 10 mL) z vodo Milli-Q raztopino dopolnili do

oznake in premešali. 5  $\mu\text{L}$  te raztopine bomo dodali v 495  $\mu\text{L}$  vzorca, da bomo dobili približno 10 ppm  $\text{Cu}^{2+}$ . Tako pripravljen vzorec bomo inkubirali 7 dni pri 40  $^{\circ}\text{C}$ .

- **$\text{Fe}^{3+}$** : Najprej bomo zatehtali 25,1 mg  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  in ga raztopili v 9 mL vode Milli-Q. Nato bomo v merilni buči ( $V = 10 \text{ mL}$ ) z vodo Milli-Q raztopino dopolnili do oznake in premešali. 5  $\mu\text{L}$  te raztopine bomo dodali v 495  $\mu\text{L}$  vzorca, da bomo dobili približno 10 ppm  $\text{Fe}^{3+}$ . Tako pripravljen vzorec bomo inkubirali 7 dni pri 40  $^{\circ}\text{C}$ .

**Utemeljitev izbranih pogojev:** Določene snovi, s katerimi lahko protein pride v stik, lahko povzročajo nastanek različnih degradacijskih produktov zaradi oksidacije ali adsorpcije na površino. Pride lahko tudi do nastanka agregatov. Ti dve vrsti ionov smo izbrali zato, ker z njimi protein pride v stik tekom proizvodnje. Temperaturo 40  $^{\circ}\text{C}$  smo izbrali zato, da se lahko dodatno izpostavijo mesta, kamor se kovinski ioni lahko vežejo.

#### 3.2.4.7 Povzetek pogojev

V spodnji preglednici so naštetni vsi pogoji, ki jim bodo vzorci tekom študije izpostavljeni.

**Preglednica VI: Povzetek stresnih pogojev**

stresni pogoj	ime vzorca	trajanje izpostavitve
nestresni (nativni) vzorec	<- 60 $^{\circ}\text{C}$	/
sobna temperatura	RT 24h	24 ur
temperatura 60 $^{\circ}\text{C}$	60 $^{\circ}\text{C}$ pH 5	24 ur
temperatura 40 $^{\circ}\text{C}$	40 $^{\circ}\text{C}$ pH 5	7 dni
temperatura 60 $^{\circ}\text{C}$ in pH 2	60 $^{\circ}\text{C}$ pH 2	24 ur
temperatura 40 $^{\circ}\text{C}$ in pH 2	40 $^{\circ}\text{C}$ pH 2	7 dni
temperatura 60 $^{\circ}\text{C}$ in pH 8	60 $^{\circ}\text{C}$ pH 8	24 ur
temperatura 40 $^{\circ}\text{C}$ in pH 8	40 $^{\circ}\text{C}$ pH 8	7 dni
stresanje na 1000 rpm, sobna temperatura	shaking	24 ur
oksidacija z 0,5 % $\text{H}_2\text{O}_2$ , sobna temperatura	oxidation	24 ur
redukcija s 15 mM DTT, sobna temperatura	reduction	24 ur
kovinski ion: 10 ppm $\text{Cu}^{2+}$ , 40 $^{\circ}\text{C}$	Cu	7 dni
kovinski ion: 10 ppm $\text{Fe}^{3+}$ , 40 $^{\circ}\text{C}$	Fe	7 dni

## 4 REZULTATI

V nadaljevanju so podani rezultati (kromatogrami) vzorcev, izpostavljenih različnim stresnim pogojem, razdeljeni po analitskih tehnikah. Za primerjavo so podani tudi rezultati nativnega (nestresnega) vzorca.

### 4.1 Reverznofazna kromatografija

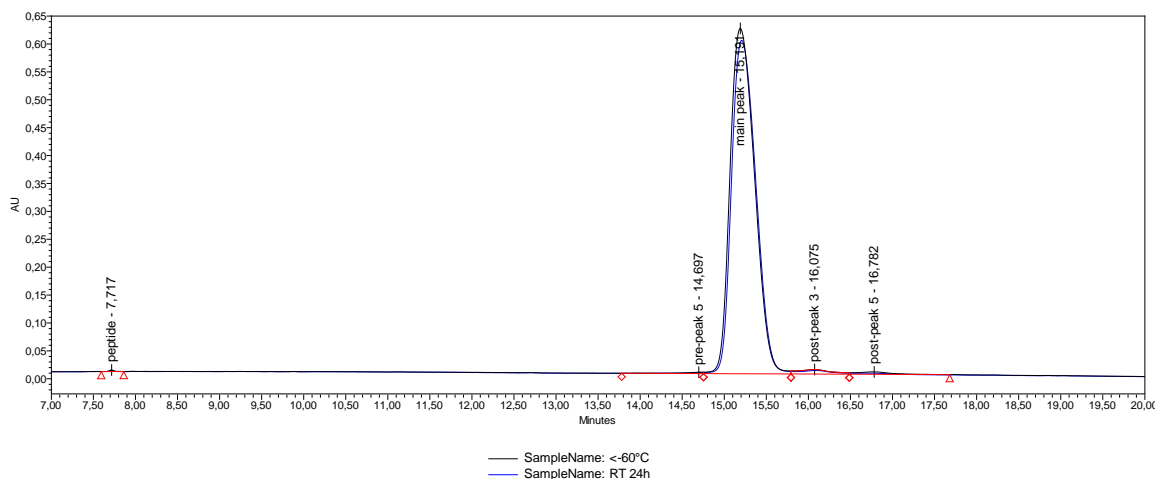
Pri reverznofazni kromatografiji se proteinske oblike ločujejo na podlagi razlik v njihovi hidrofobnosti. V primeru izbranega modelnega kemijsko modificiranega proteina metoda loči osnovni (t. j. nemodificiran) protein, ki se iz kolone spira precej zgodaj, od modificirane oblike s pred- in post- vrhovi (*ang. pre-/post-peak*). Vrhovi so v kromatogramih poimenovani z angleškimi izrazi, poleg imena je zapisan še njihov čas zadrževanja na koloni, ki omogoča ustrezno identifikacijo posamičnih vrhov.

Čistost, ki jo mora izbrani produkt doseči, je  $\geq 90,0\%$  (to pomeni relativni delež površine glavnega vrha v primerjavi s celotno površino vseh vrhov v kromatogramu, ki jih integriramo). Ta vrednost je bila določena na podlagi zmožnosti proizvodnega procesa, zmožnosti metode in na podlagi podatkov, pridobljenih na osnovi predhodno izvedenih stabilnostnih študij, ki niso del te magistrske naloge. Če predpisane stopnje čistosti vzorec ne dosega, pomeni, da je proizvedena serija neprimerna za proizvodnjo končnega produkta, saj lahko tak končni produkt povzroča neželene učinke.



#### 4.1.1 Nativni vzorec in vzorec inkubiran 24 ur pri sobni temperaturi

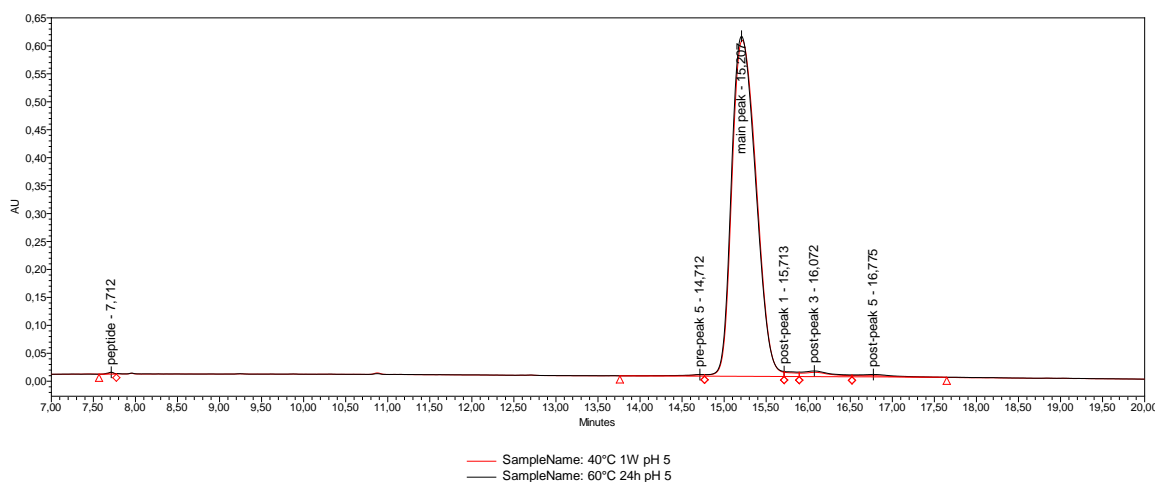
Na Sliki 9 sta prikazana kromatograma reverznofazne kromatografije nativnega vzorca in vzorca, ki smo ga 24 ur inkubirali pri sobni temperaturi. Njuna čistost je primerljiva (približno 97 %).



**Slika 9: Prekrita kromatograma reverznofazne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C) in vzorca, inkubiranega 24 ur pri sobni temperaturi (oznaka RT 24h).**

#### 4.1.2 Vzorci, izpostavljeni povišani temperaturi

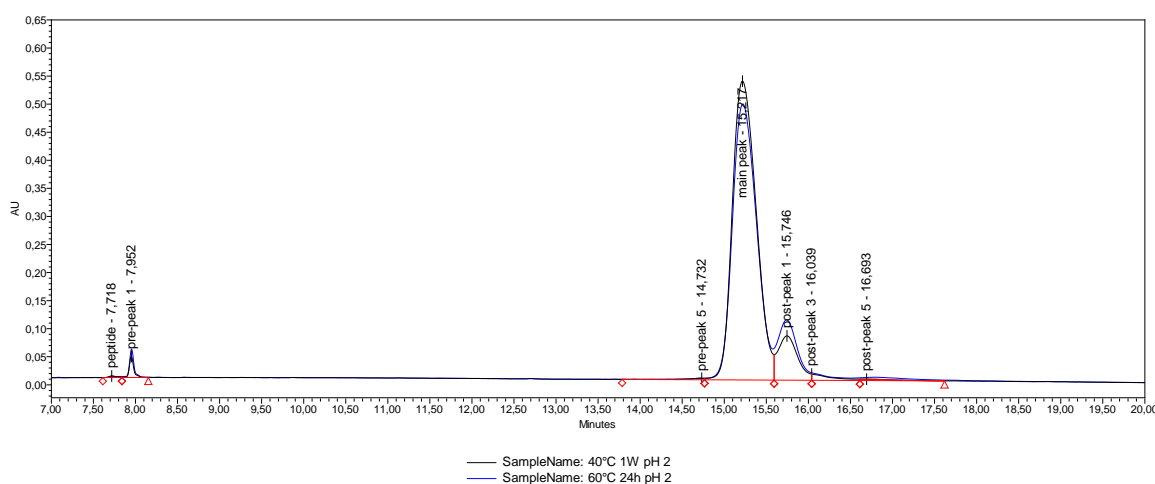
Na Sliki 10 sta prikazana kromatograma reverznofazne kromatografije vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C, in vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C. Njuna čistost je primerljiva čistosti nativnega vzorca (približno 96 %). Pojavi se dodaten vrh (post-peak 1), vendar je njegova površina zanemarljiva (glej preglednico VII).



**Slika 10: Prekrita kromatograma reverznofazne kromatografije vzorca izpostavljenega temperaturi 40 °C (oznaka 40°C 1W pH 5), in vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C (oznaka 60°C 24h pH 5).**

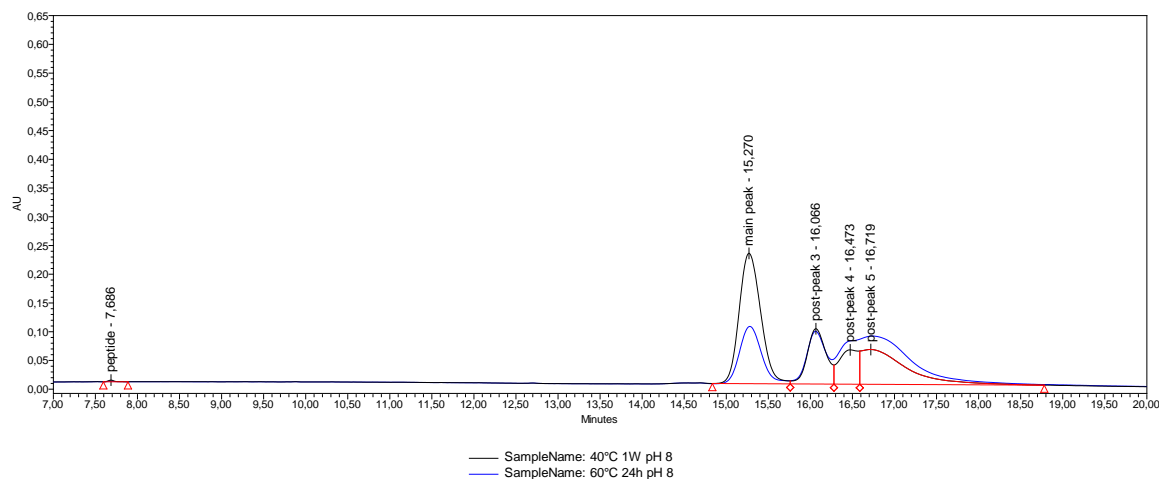
### 4.1.3 Vzorci, izpostavljeni različnim pH

Na Sliki 11 sta prikazana kromatograma reverznofazne kromatografije vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C in pH 2, in vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C in pH 2. Čistost vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C in pH 2, je približno za 10 % nižja od čistosti nativnega vzorca (približno 86 %). Čistost vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen 60 °C in pH 2, je približno za 15 % nižja (približno 81 %) od čistosti nativnega vzorca. Čistost se v obeh primerih zmanjša na račun povečanja površine vrha »pre-peak 1« in predvsem vrha »post-peak 1«.



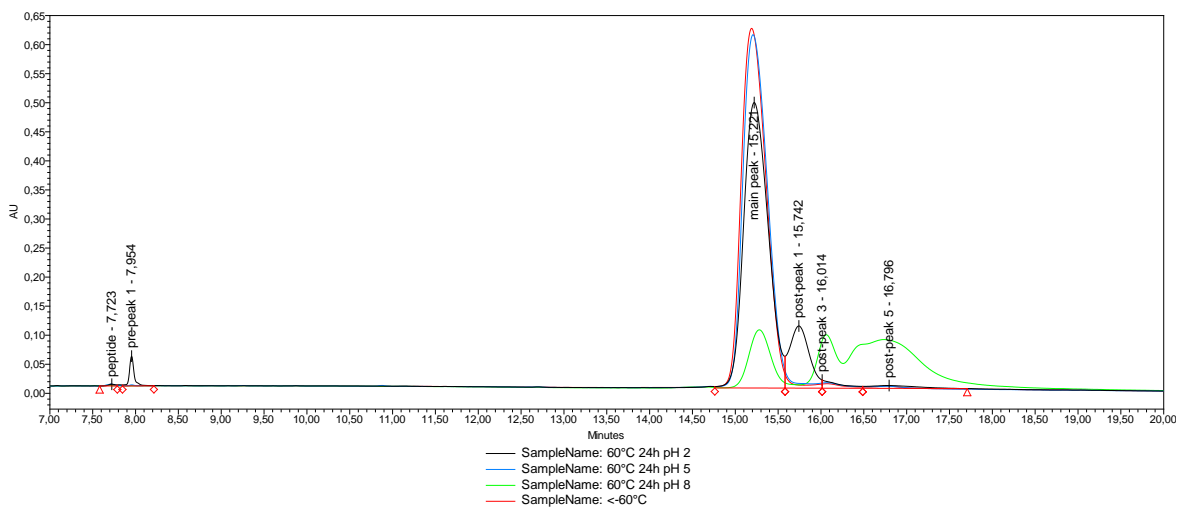
**Slika 11: Prekrita kromatograma reverznofazne kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C in pH 2 (oznaka 40°C 1W pH 2), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 2 (oznaka 60°C 24h pH2).**

Na Sliki 12 sta prikazana kromatograma reverznofazne kromatografije vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C in pH 8, in vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C in pH 8. Čistost vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C in pH 8, je približno za 50 % nižja od čistosti nativnega vzorca (približno 46 %). Čistost vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen 60 °C in pH 8, je približno za 70 % nižja od čistosti nativnega vzorca (približno 23 %). Čistost se zmanjša predvsem na račun močnega povečanja deležov vrhov, ki se sperejo za glavnim vrhom (t.j. »post-peak« 3, 4 in 5).



**Slika 12: Prekrita kromatograma reverznofazne kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C in pH 8 (oznaka 40°C 1W pH 8), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 8 (oznaka 60°C 24h pH 8).**

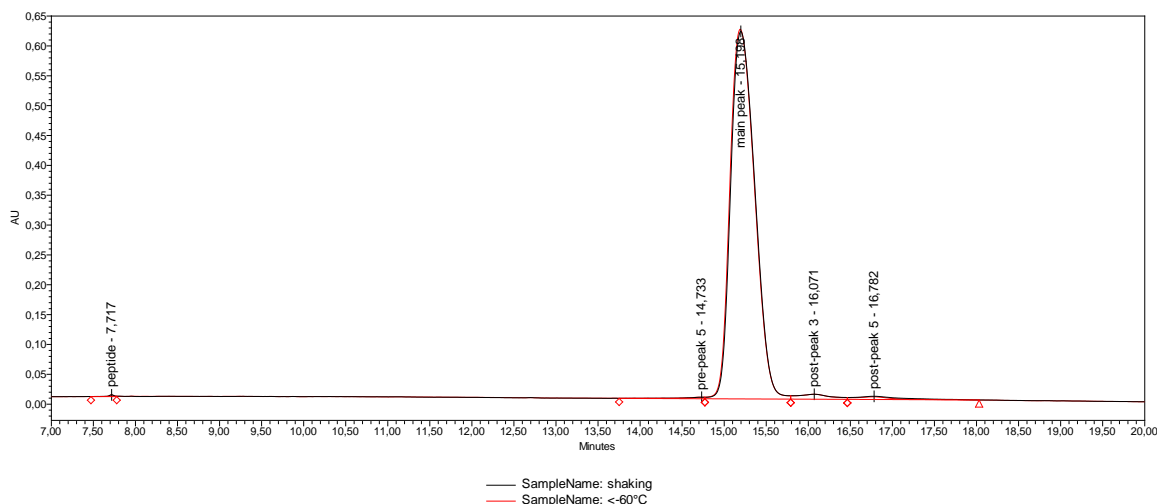
V naslednjem kromatogramu (Slika 13) so prekriti kromatogrami reverznofazne kromatografije nativnega vzorca in vseh treh vzorcev, ki so bili izpostavljeni temperaturi 60 °C in različnim pH. Iz te slike je razvidno, kako se kromatogrami spreminjajo v odvisnosti od pH pri povišani temperaturi.



**Slika 13: Prekriti kromatogrami reverznofazne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 2 (oznaka 60°C 24h pH 2), vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 5 (oznaka 60°C 24h pH 5), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 8 (oznaka 60°C 24h pH 8).**

#### 4.1.4 Vzorec, izpostavljen mehanskemu stresu

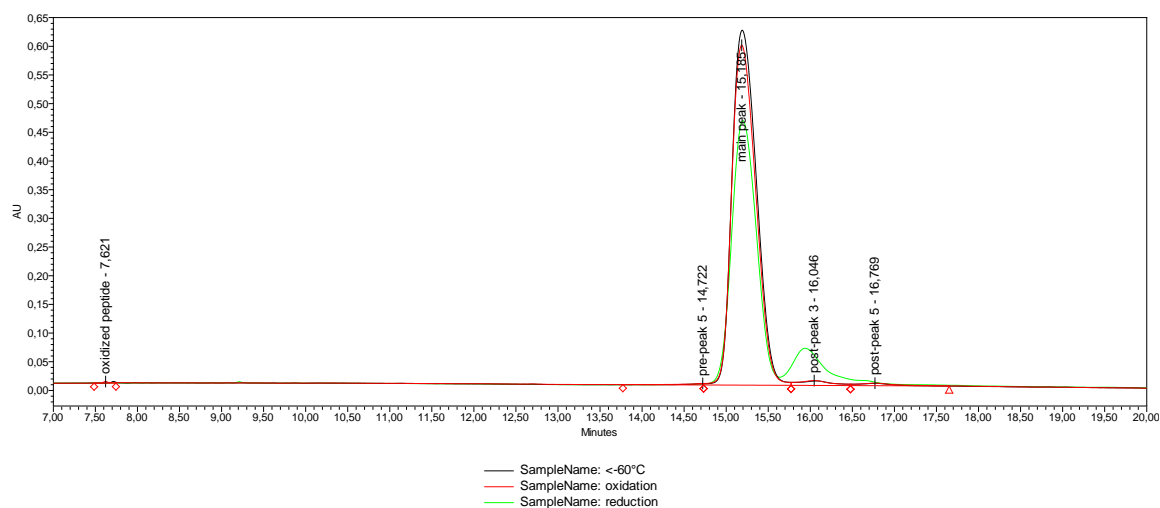
Na Sliki 14 sta prikazana kromatograma reverznofazne kromatografije nativnega vzorca in vzorca, ki je bil izpostavljen mehanskemu stresu. Njuni čistosti sta primerljivi (približno 96 %).



**Slika 14: Prekrita kromatograma reverznofazne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C) in vzorca, izpostavljenega mehanskemu stresu (oznaka shaking).**

#### 4.1.5 Vzorci, izpostavljeni oksidirajočim in reducirajočim pogojem

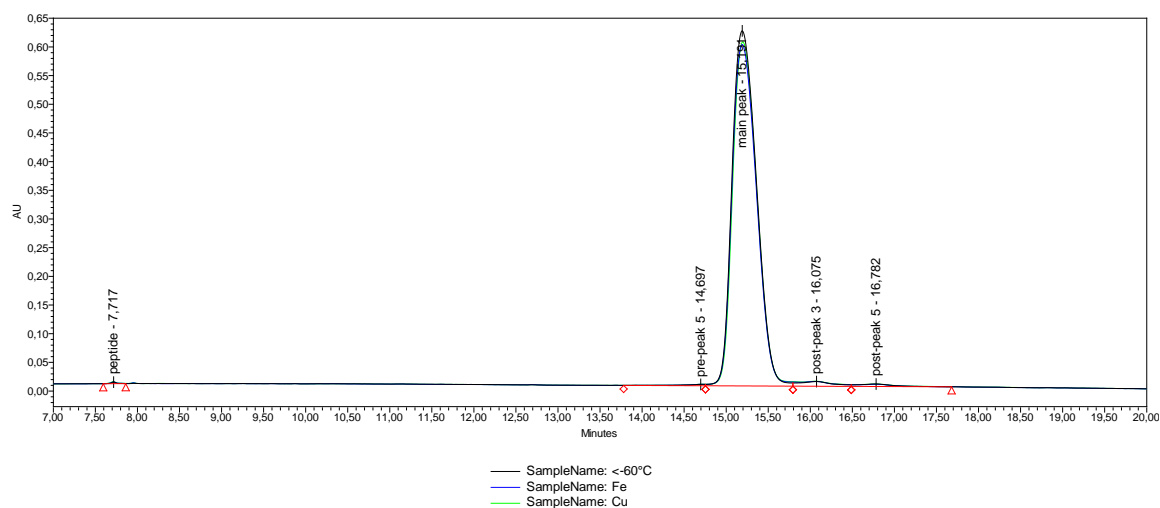
Na Sliki 15 so prikazani kromatogrami reverznofazne kromatografije nativnega vzorca, vzorca, ki je bil izpostavljen oksidirajočim pogojem, in vzorca, ki je bil izpostavljen reducirajočim pogojem. Čistost vzorca, ki je bil izpostavljen oksidirajočim pogojem, je primerljiva s čistostjo nativnega vzorca (približno 97 %). Vrh, ki je označen z »oxidized peptide«, predstavlja oksidirano obliko nemodificiranega proteina. Čistost vzorca, ki je bil izpostavljen reducirajočim pogojem, je približno za 15 % nižja od čistosti nativnega vzorca (približno 83 %).



**Slika 15: Prekriti kromatogrami reverznofazne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca, izpostavljenega oksidirajočim pogojem (oznaka oxidation), ter vzorca, izpostavljenega reducirajočim pogojem (oznaka reduction).**

#### 4.1.6 Vzorci, izpostavljeni kovinskim ionom

Na Sliki 16 so prikazani kromatogrami reverznofazne kromatografije nativnega vzorca, vzorca, ki je bil izpostavljen  $\text{Fe}^{3+}$ -ionom, in vzorca, ki je bil izpostavljen  $\text{Cu}^{2+}$ -ionom. Čistost vzorca, ki je bil izpostavljen  $\text{Fe}^{3+}$ -ionom, je primerljiva s čistostjo nativnega vzorca (približno 96 %). Enako velja za vzorec, ki je bil izpostavljen  $\text{Cu}^{2+}$ -ionom (približno 96 %).



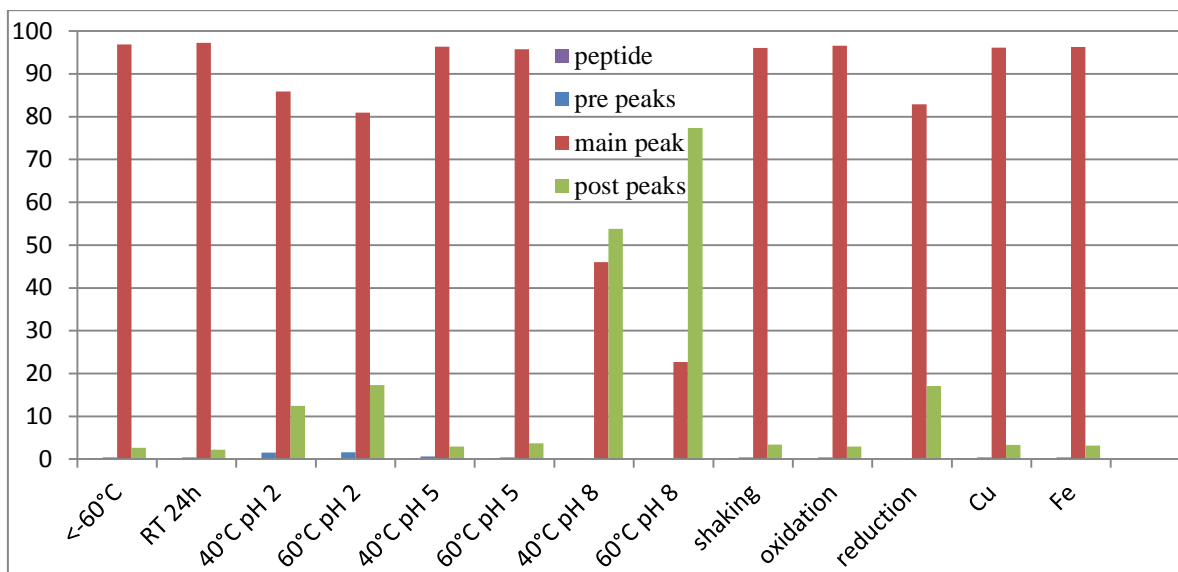
**Slika 16: Prekriti kromatogrami reverznofazne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca, izpostavljenega ionom  $\text{Fe}^{3+}$  (oznaka Fe) in vzorca, izpostavljenega ionom  $\text{Cu}^{2+}$  (oznaka Cu).**

V Preglednici VII in na Sliki 17 so podani rezultati čistosti (»main peak«), delež nemodificiranega proteina (»peptide«), skupni delež »pre-peaks« (ti predstavljajo bolj hidrofilne oblike od glavnega vrha, saj se manj časa zadržijo na koloni) ter skupni delež »post-peaks« (ti predstavljajo bolj hidrofobne oblike od glavnega vrha, saj se dlje časa zadržijo na koloni).

**Preglednica VII: Rezultati reverznofazne kromatografije (delež komponente »peptide«, skupni delež komponent »pre-peaks«, delež komponente »main peak« ter skupni delež komponent »post-peaks«) stresnih vzorcev.**

<b>ime vzorca</b>	<b>peptide (%)</b>	<b>pre-peaks (%)</b>	<b>main peak (%)</b>	<b>post-peaks (%)</b>
<b>&lt;-60 °C</b>	0,1	0,4	96,9	2,7
<b>RT 24h</b>	0,1	0,4	97,3	2,2
<b>40°C pH 2</b>	0,1	1,5	85,9	12,4
<b>60°C pH 2</b>	0,1	1,6	81,0	17,3
<b>40°C pH 5</b>	0,1	0,6	96,4	2,9
<b>60°C pH 5</b>	0,1	0,4	95,8	3,7
<b>40°C pH 8</b>	0,2	0,0	46,1	53,8
<b>60°C pH 8</b>	0,0	0,0	22,7	77,3
<b>shaking</b>	0,1	0,4	96,1	3,4
<b>oxidation</b>	0,1*	0,4	96,6	2,9
<b>reduction</b>	0,0	0,0	82,9	17,1
<b>Cu</b>	0,2	0,4	96,1	3,3
<b>Fe</b>	0,1	0,4	96,3	3,2

\*oksidirana oblika (nemodificiranega) proteina



**Slika 17: Rezultati reverznofazne kromatografije (delež komponente »peptide«, skupni delež komponent »pre-peaks«, delež komponente »main peak« ter skupni delež komponent »post-peaks«) stresnih vzorcev (za obrazložitev stresnih pogojev, katerim so bili vzorci navedeni na x-osi izpostavljeni, glej Preglednico VI: Povzetek stresnih pogojev).**

## 4.2 Izključitvena kromatografija

Med izključitveno kromatografijo se molekule ločujejo na podlagi velikosti in oblike. V primeru izbranega modelnega kemijsko modificiranega proteina metoda loči modificiran protein od variant z večjo molekulsko maso. Vrhovi so v kromatogramih poimenovani z angleškimi izrazi, poleg imena je zapisan še čas zadrževanja na koloni, ki omogoča ustrezno identifikacijo posameznih vrhov.

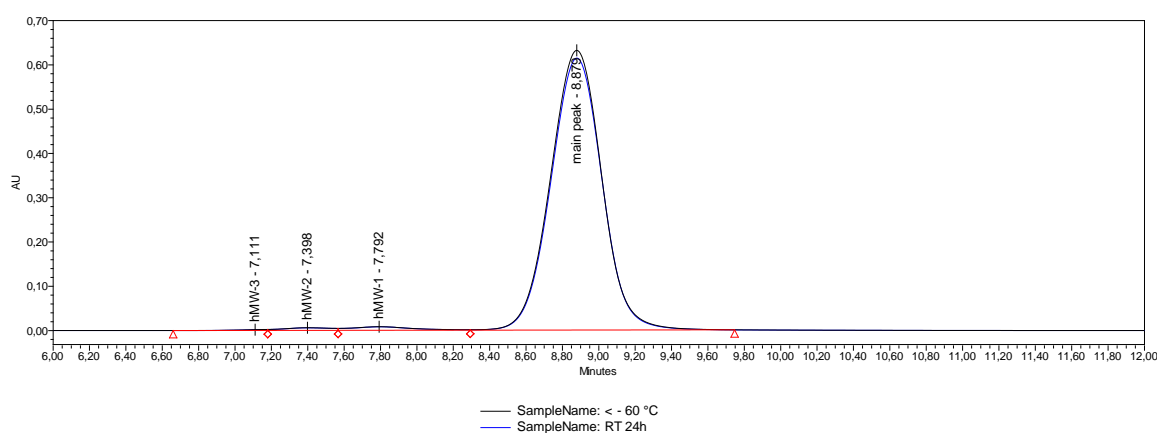
V kromatogramu je z »main peak« označen glavni vrh, ki predstavlja modificiran protein. Pred glavnim vrhom so na kromatogramu molekule, ki so večje od modificiranega proteina in zato hitreje prehajajo kolono. Te smo poimenovali s »hMW«. Najbližje glavnemu vrhu in najmanjši izmed njih je »hMW1«, nato si po velikosti sledijo »hMW2«, »hMW3« in »hMW4«. Predstavljajo proteine, ki imajo vezanih več kemijskih modifikatorjev, ter proteinske agregate. Vzorci morajo izpolnjevati naslednje kriterije glede čistosti:

- $\geq 90,0$  % modificirane oblike (t. j. relativni delež površine glavnega vrha »main peak« v primerjavi s celotno površino vseh vrhov v kromatogramu, ki jih integriramo),
- $\leq 7,0$  % variant z višjo molekulsko maso (»hMW«).

Te vrednosti so bile določene na podlagi zmožnosti proizvodnega procesa, zmožnosti metode in na podlagi podatkov, pridobljenih na osnovi predhodno izvedenih stabilnostnih študij, ki niso del te magistrske naloge.

#### 4.2.1 Nativni vzorec in vzorec, inkubiran 24 ur pri sobni temperaturi

Na Sliki 18 sta prikazana kromatograma izključitvene kromatografije nativnega vzorca (na slikah in v preglednicah označen kot <-60°C) in vzorca, ki smo ga 24 ur inkubirali pri sobni temperaturi. Njuna čistost je primerljiva (približno 98 %).

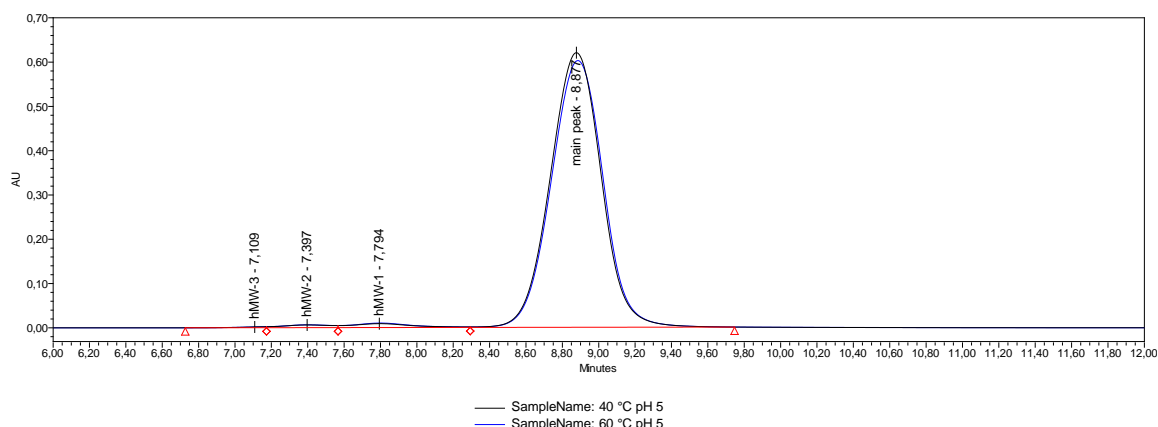


**Slika 18: Prekrita kromatograma izključitvene kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C) in vzorca, inkubiranega 24 ur pri sobni temperaturi (oznaka RT 24h).**

#### 4.2.2 Vzorci, izpostavljeni povišani temperaturi

Na Sliki 19 sta prikazana kromatograma izključitvene kromatografije vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C, in vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C. Čistost vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C, je primerljiva s čistostjo nativnega vzorca (približno 97 %). Enako velja tudi za vzorec, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C (približno 97 %).

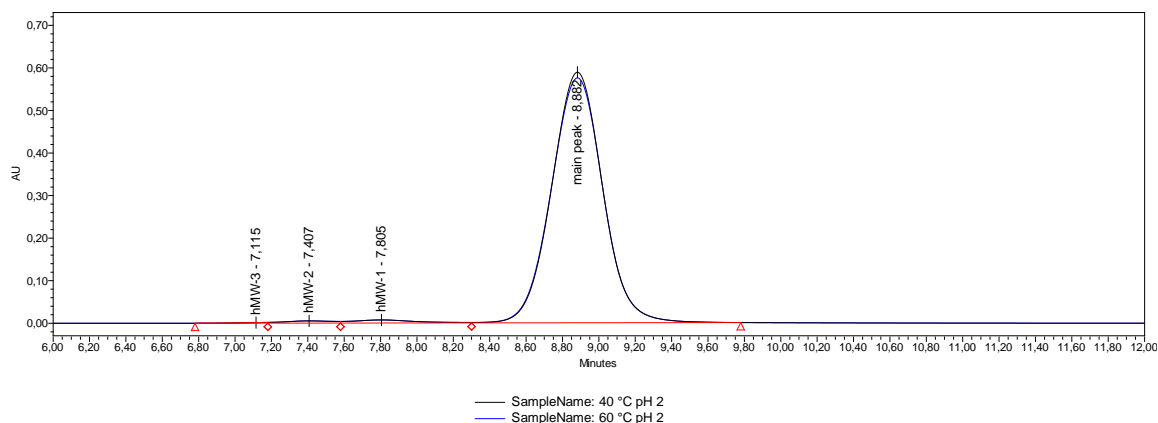




**Slika 19: Prekrita kromatograma izključitvene kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C (oznaka 40°C pH 5), in vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C (oznaka 60°C pH 5).**

#### 4.2.3 Vzorci, izpostavljeni različnim pH

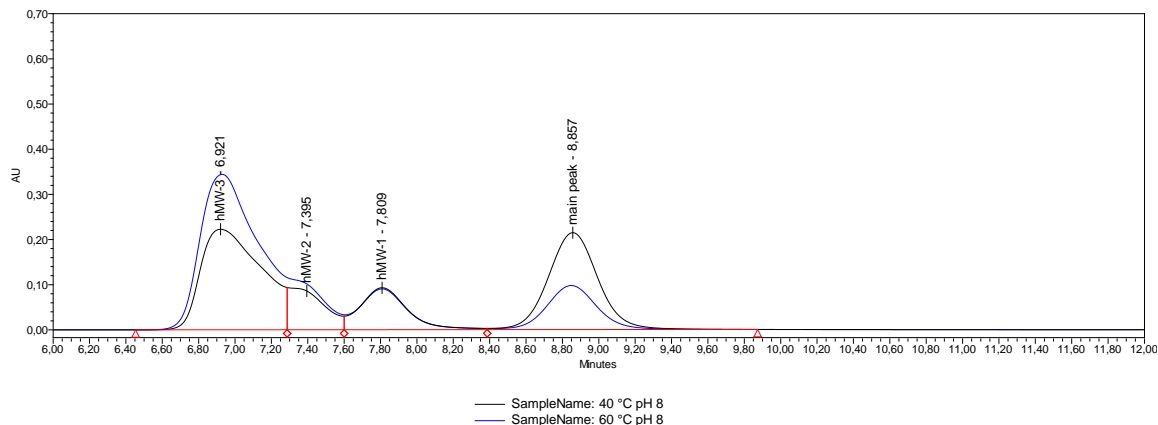
Na Sliki 20 sta prikazana kromatograma izključitvene kromatografije vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C in pH 2, in vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C in pH 2. Čistost vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C in pH 2, je primerljiva s čistostjo nativnega vzorca (približno 98 %). Enako velja za vzorec, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C in pH 2 (približno 98 %).



**Slika 20: Prekrita kromatograma izključitvene kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C in pH 2 (oznaka 40°C pH 2), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 2 (oznaka 60°C pH2).**

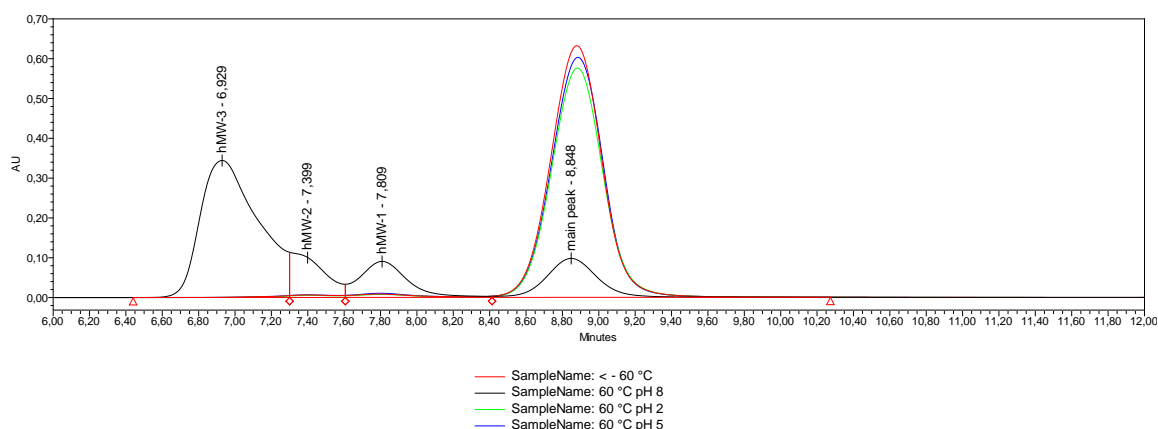
Na Sliki 21 sta prikazana kromatograma izključitvene kromatografije vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C in pH 8, in vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C in pH 8. Čistost vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C in pH 8, je

približno za 65 % nižja od čistosti nativnega vzorca (približno 34 %). Čistost vzorca, ki je bil izpostavljen 24 ur temperaturi 60 °C in pH 8, je približno za 80 % nižja od čistosti nativnega vzorca (približno 15 %). Čistosti se zmanjšata predvsem na račun močnega povečanja deleža vrhov, ki se sperejo pred glavnim vrhom (t. j. »hMW«).



**Slika 21: Prekrita kromatograma izključitvene kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C in pH 8 (oznaka 40°C pH 8), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 8 (oznaka 60°C pH 8).**

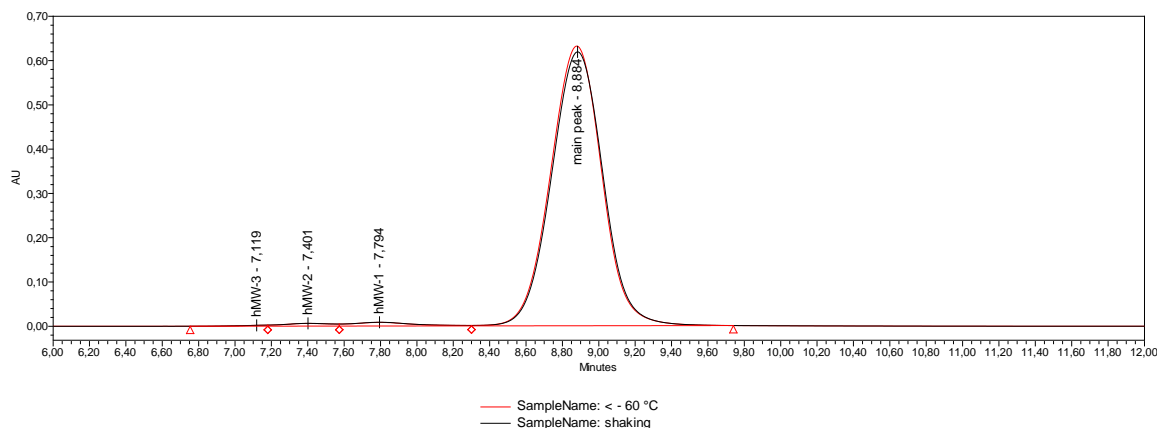
Na naslednjem kromatogramu (Slika 22) so prekrite kromatogrami izključitvene kromatografije nativnega vzorca in vseh treh vzorcev, ki so bili izpostavljeni temperaturi 60 °C in različnim pH. Iz te slike je razvidno, kako se kromatogrami SEC spreminjajo v odvisnosti od pH pri povišani temperaturi.



**Slika 22: Prekriti kromatogrami izključitvene kromatografije nativnega vzorca (oznaka <60°C), vzorca izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 2 (oznaka 60°C pH 2), vzorca izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 5 (oznaka 60°C pH 5), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 8 (oznaka 60°C pH 8).**

#### 4.2.4 Vzorec, izpostavljen mehanskemu stresu

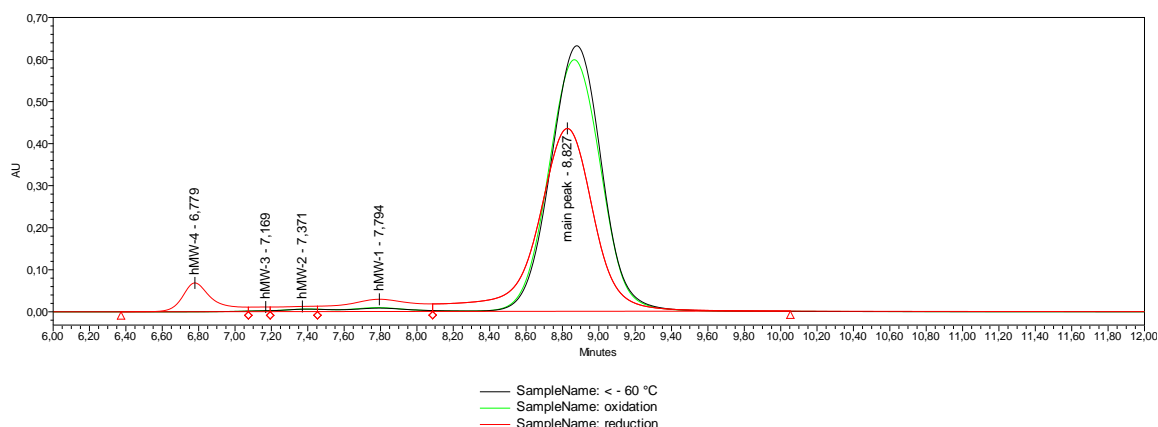
Na Sliki 23 sta prikazana kromatograma izključitvene kromatografije nativnega vzorca in vzorca, ki je bil izpostavljen mehanskemu stresu. Čistost vzorca, ki je bil izpostavljen mehanskemu stresu, je primerljiva s čistostjo nativnega vzorca (približno 97 %).



**Slika 23: Prekrita kromatograma izključitvene kromatografije nativnega vzorca (oznaka <math>< -60^{\circ}\text{C}</math>), in vzorca, izpostavljenega mehanskemu stresu (oznaka shaking).**

#### 4.2.5 Vzorci, izpostavljeni oksidirajočim in reducirajočim pogojem

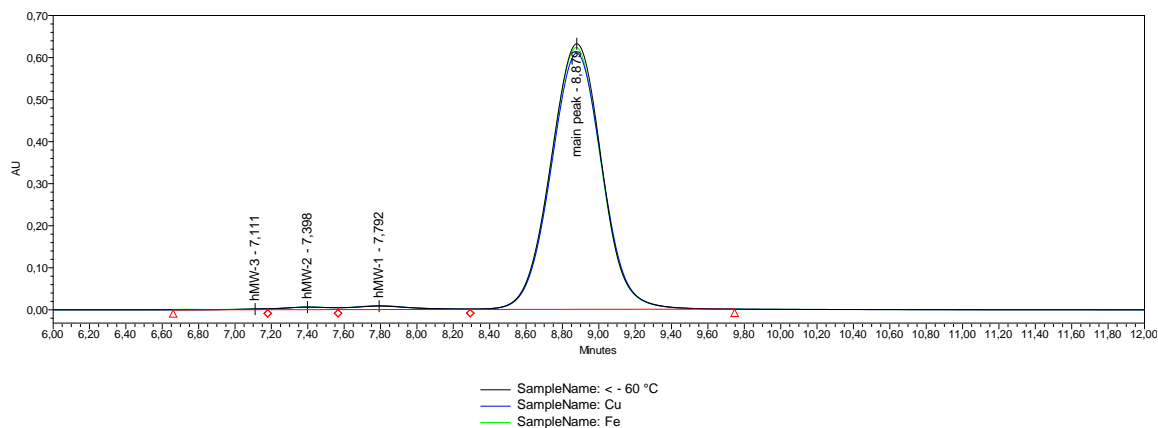
Na Sliki 24 so prikazani kromatogrami izključitvene kromatografije nativnega vzorca, vzorca, ki je bil izpostavljen oksidirajočim pogojem, in vzorca, ki je bil izpostavljen reducirajočim pogojem. Čistost vzorca, ki je bil izpostavljen oksidirajočim pogojem, je primerljiva s čistostjo nativnega vzorca (približno 97 %). Čistost vzorca, ki je bil izpostavljen reducirajočim pogojem, je približno za 15 % nižja od čistosti nativnega vzorca (približno 84 %). Pojavi se nov vrh – »hMW 4«.



**Slika 24: Prekriti kromatogrami izključitvene kromatografije nativnega vzorca (oznaka <math>< -60^{\circ}\text{C}</math>), vzorca, izpostavljenega oksidirajočim pogojem (oznaka oxidation), ter vzorca, izpostavljenega reducirajočim pogojem (oznaka reduction).**

## 4.2.6 Vzorci, izpostavljeni kovinskim ionom

Na Sliki 25 so prikazani kromatogrami izključitvene kromatografije nativnega vzorca, vzorca, ki je bil izpostavljen  $\text{Fe}^{3+}$ -ionom, in vzorca, ki je bil izpostavljen  $\text{Cu}^{2+}$ -ionom. Čistosti vzorca, ki je bil izpostavljen  $\text{Fe}^{3+}$ -ionom in vzorca, ki je bil izpostavljen  $\text{Cu}^{2+}$ -ionom, sta primerljivi s čistostjo nativnega vzorca (približno 97 %).



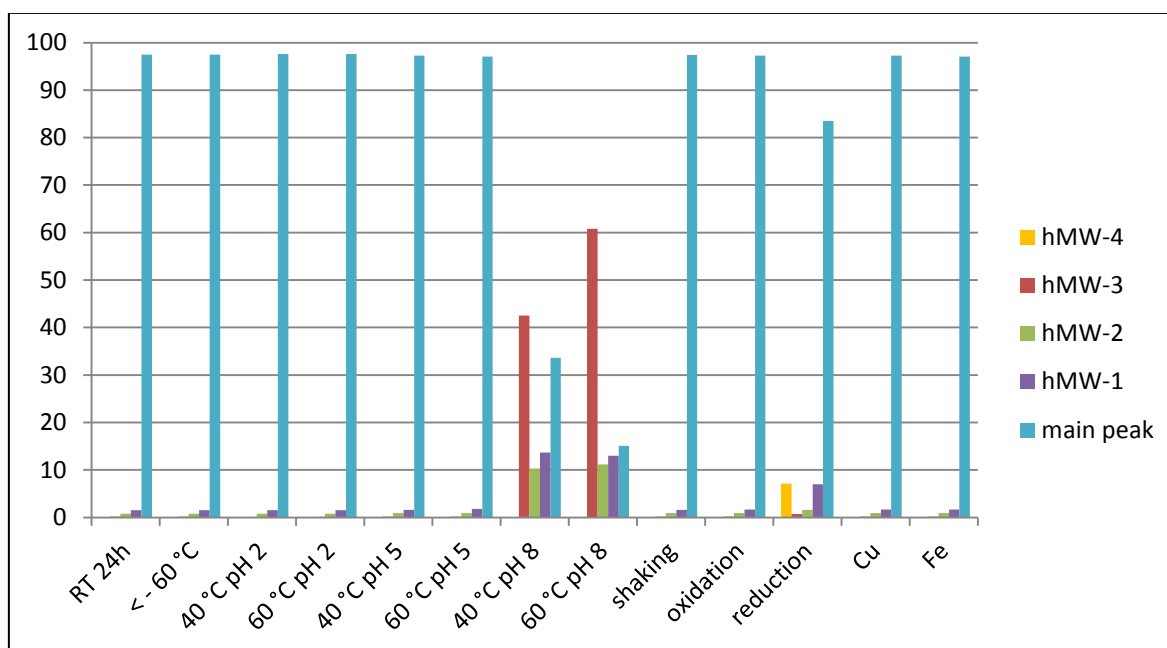
**Slika 25: Prekriti kromatogrami izključitvene kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca, izpostavljenega ionom  $\text{Fe}^{3+}$  (oznaka Fe), ter vzorca, izpostavljenega ionom  $\text{Cu}^{2+}$  (oznaka Cu).**

V Preglednici VIII in na Sliki 26 so podani rezultati čistosti (delež »main peak«) ter deleži posameznih »hMW«, ki predstavljajo večje molekule.

**Preglednica VIII: Rezultati izključitvene kromatografije (deleži komponent »hMW-4«, »hMW-3«, »hMW-2«, »hMW-1« ter delež komponente »main peak«) stresnih vzorcev.**

	hMW-4 (%)	hMW-3 (%)	hMW-2 (%)	hMW-1 (%)	main peak (%)
<- 60 °C		0,2	0,8	1,5	97,5
RT 24 h		0,2	0,8	1,5	97,5
40 °C pH 2		0,1	0,8	1,5	97,6
60 °C pH 2		0,1	0,8	1,5	97,6
40 °C pH 5		0,2	0,9	1,6	97,3
60 °C pH 5		0,2	0,9	1,8	97,1
40 °C pH 8		42,5	10,3	13,7	33,6
60 °C pH 8		60,8	11,2	13,0	15,1
shaking		0,2	0,9	1,6	97,4
oxidation		0,2	0,9	1,7	97,3
reduction	7,1	0,7	1,6	7,0	83,5

	hMW-4 (%)	hMW-3 (%)	hMW-2 (%)	hMW-1 (%)	main peak (%)
<b>Cu</b>		0,2	0,9	1,7	97,3
<b>Fe</b>	0,1	0,2	0,9	1,7	97,1



**Slika 26:** Rezultati izključitvene kromatografije (deleži komponent »hMW-4«, »hMW-3«, »hMW-2«, »hMW-1« ter delež komponente »main peak«) stresnih vzorcev (za obrazložitev stresnih pogojev, katerim so bili vzorci navedeni na x-osi izpostavljeni, glej Preglednico VI: Povzetek stresnih pogojev).

### 4.3 Ionska izmenjevalna kromatografija

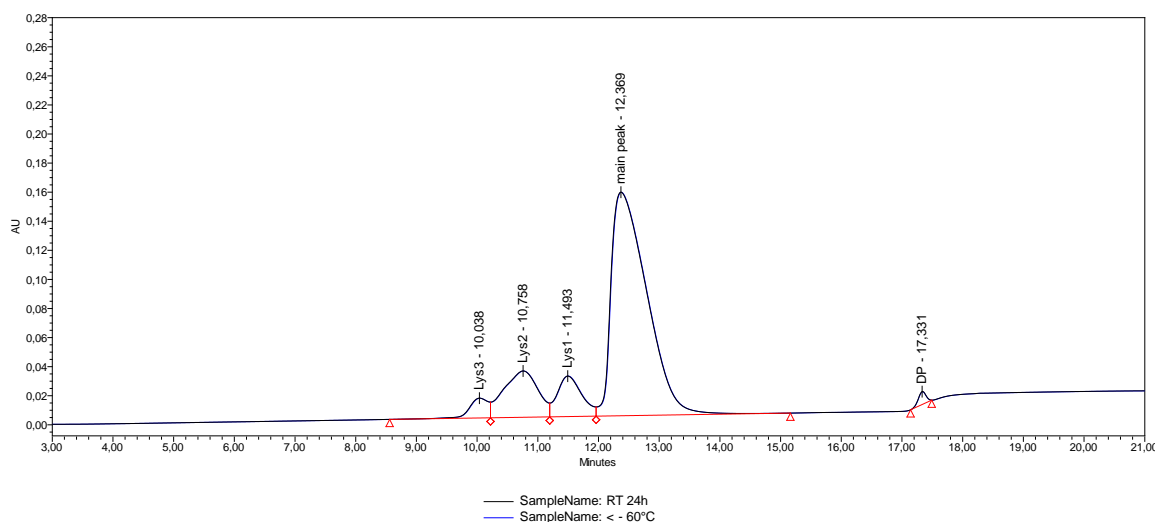
Med ionsko izmenjevalno kromatografijo se molekule ločujejo na podlagi naboja. Uporabili smo kationsko izmenjevalno kromatografijo, pri kateri se molekule s pozitivnim nabojem dlje zadržujejo na koloni kakor molekule, ki imajo bolj negativen naboj. Vrhovi so v kromatogramih poimenovani z angleškimi izrazi, poleg imena je zapisan še čas zadrževanja na koloni, ki omogoča ustrezno identifikacijo posamičnih vrhov.

V kromatogramu je z »main peak« označen glavni vrh, ki predstavlja glavno obliko modificiranega terapevtskega proteina. Ta ima kemijsko modificiran N-konec (t. j. vezano

komponento, ki poveča obstojnost). Pred njim se sproščajo oblike proteina, ki imajo kemijsko modifikacijo vezano na lizine. Glede na to, na katerem lizinu je modifikacija, jih poimenujemo »Lys1«, »Lys2« ter »Lys3«. Znotraj vrha »Lys3« se lahko nahajajo tudi deamidirane oblike modificiranega proteina. Podatki, ki pojasnjujejo, zakaj se ta dva vrhova prekrivata, niso del te magistrske naloge. Pred »Lys« vrhovi se sproščajo bolj negativno (manj pozitivno) nabite oblike proteina – kisle oblike, ki jih poimenujemo z oštevilčenimi »VP«. Te vrhove smo sešteli in podali kakor skupino. Za glavnim vrhom se sproščajo bolj pozitivno nabite oblike proteina – bazične oblike, ki jih poimenujemo z oštevilčenimi »NP«. Tudi te vrhove smo sešteli in podali kakor skupino. Vrhovi, ki smo jih poimenovali z »DP«, predstavljajo s proizvodom povezane nečistote. Za njimi se sprošča še najbolj pozitivna oblika proteina – nemodificiran protein. Ta se najdlje zadrži na koloni zato, ker ni modificiran, in zato njegov naboj ni zamaskiran z modifikatorjem. Pomembna je čistost proteina, ki mora biti večja od 60 %. Ta vrednost je bila določena na podlagi zmožnosti proizvodnega procesa, zmožnosti metode in na podlagi podatkov, pridobljenih na osnovi predhodno izvedenih stabilnostnih študij, ki niso del te magistrske naloge.

#### 4.3.1 Nativni vzorec in vzorec, inkubiran 24 ur pri sobni temperaturi

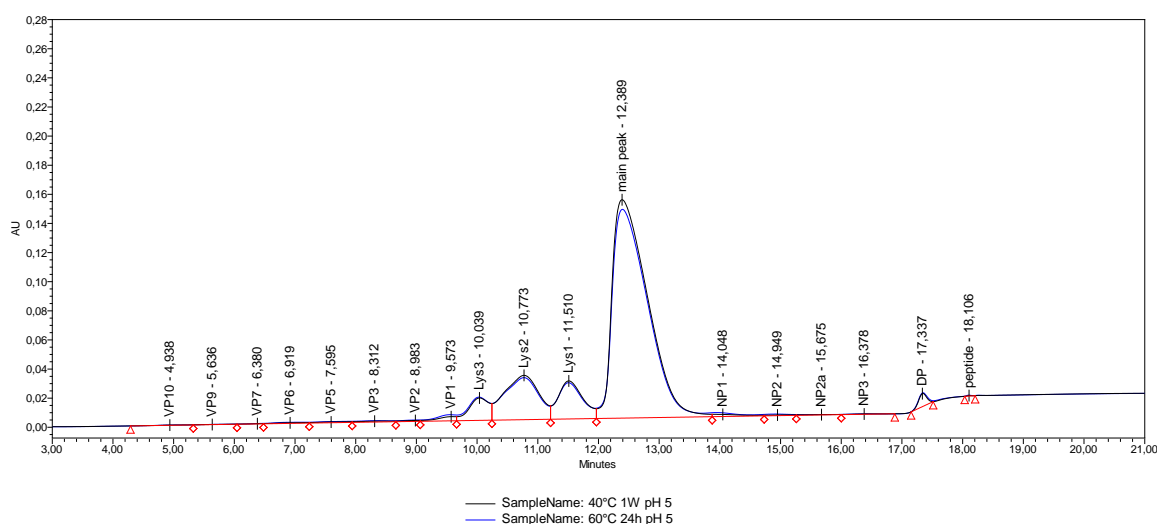
Na Sliki 27 sta prikazana kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije nativnega vzorca (na slikah in v preglednicah označen kot <-60°C) in vzorca, ki smo ga inkubirali 24 ur pri sobni temperaturi. Njuna čistost je primerljiva (približno 72 %).



**Slika 27: Prekrita kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), in vzorca, izpostavljenega 24 ur pri sobni temperaturi (oznaka RT 24h).**

### 4.3.2 Vzorci, izpostavljeni povišani temperaturi

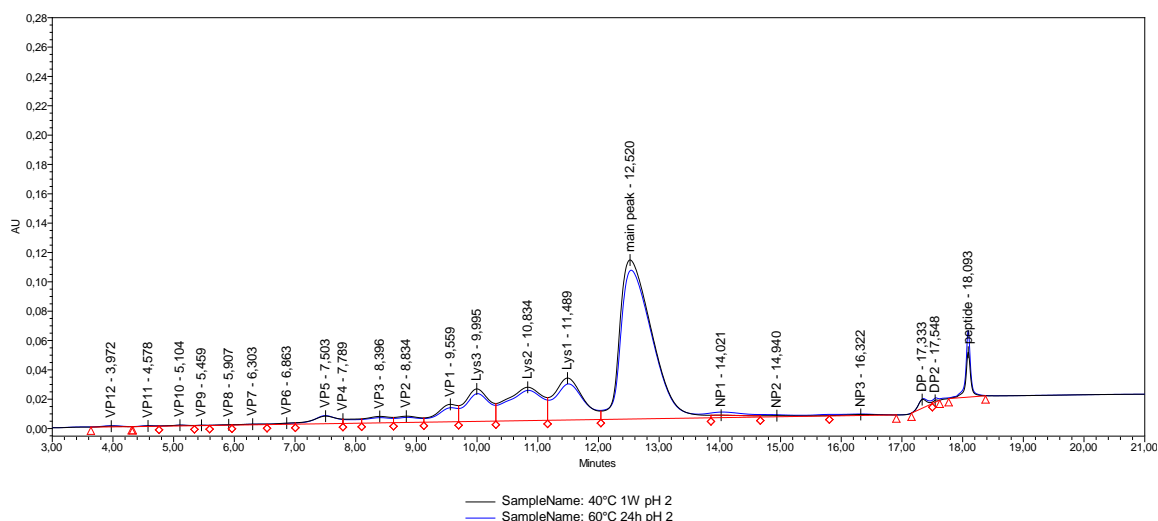
Na Sliki 28 sta prikazana kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C, in vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C. Čistost vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C, je približno za 2 % nižja od čistosti nativnega vzorca (približno 70 %). Enako velja tudi za čistost vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C (približno 69 %).



**Slika 28: Prekrita kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C (oznaka 40°C 1W pH 5), in vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C (oznaka 60°C 24h pH 5).**

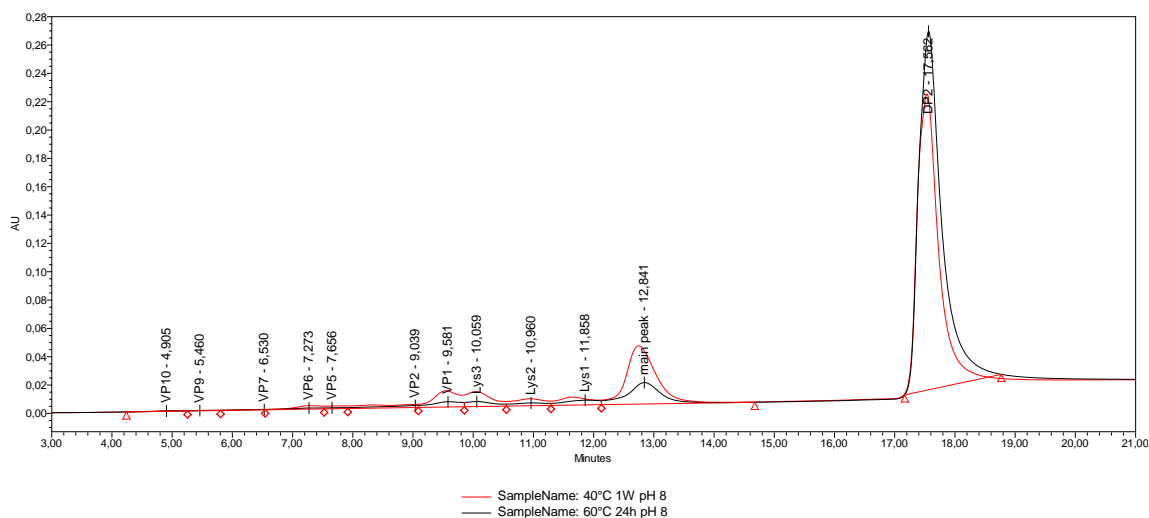
### 4.3.3 Vzorci, izpostavljeni različnim pH

Na Sliki 29 sta prikazana kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C in pH 2, in vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C in pH 2. Čistost vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C in pH 2, je približno za 20 % nižja v primerjavi s čistostjo nativnega vzorca (približno 53 %). Enako velja za čistost vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C in pH 2 (približno 52 %).



**Slika 29: Prekrita kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C in pH 2 (oznaka 40°C 1W pH 2), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 2 (oznaka 60°C 24h pH 2).**

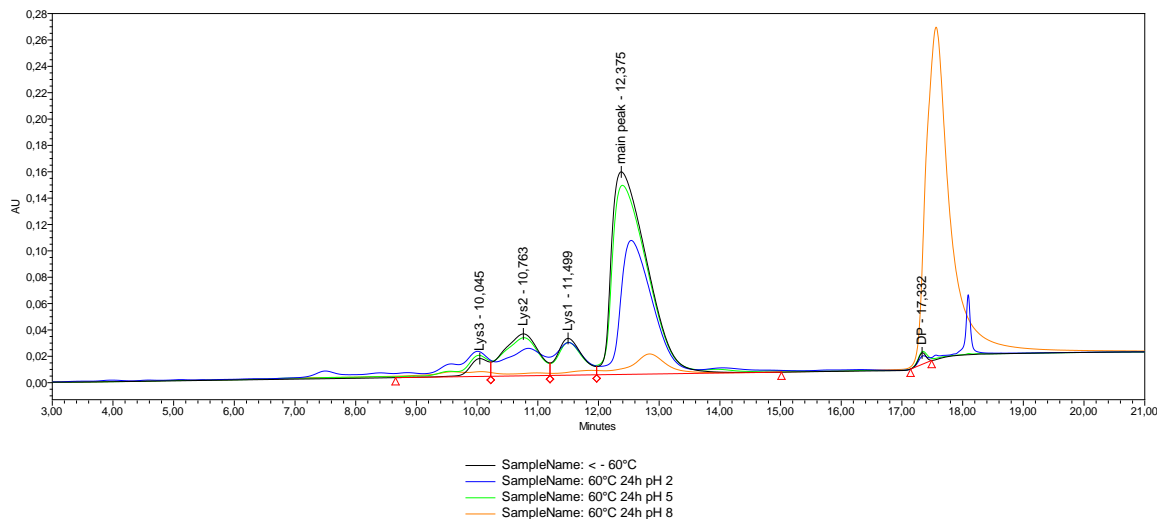
Na Sliki 30 sta prikazana kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C in pH 8, in vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C in pH 8. Čistost vzorca, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C in pH 8, je približno za 55 % nižja v primerjavi s čistostjo nativnega vzorca (približno 18 %). Čistost vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C in pH 2, je približno za 65 % nižja od čistosti nativnega vzorca (približno 8 %).



**Slika 30: Prekrita kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije vzorca, izpostavljenega temperaturi 40 °C in pH 8 (oznaka 40°C 1W pH 8), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 8 (oznaka 60°C 24h pH 8).**



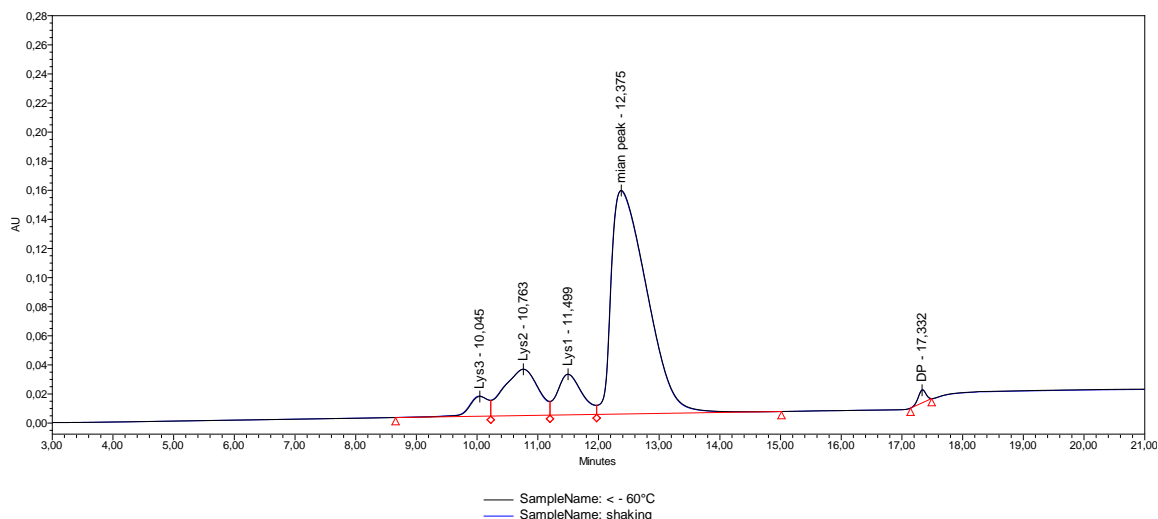
V naslednjem kromatogramu (Slika 31) so prekriti kromatogrami nativnega vzorca in vseh treh vzorcev, ki so bili izpostavljeni temperaturi 60 °C in različnim pH. Iz te slike je razvidno, kako se kromatogrami CEC spreminjajo v odvisnosti od pH ob povišani temperaturi.



**Slika 31: Prekriti kromatogrami kationske izmenjevalne kromatografije nativnega vzorca (oznaka < -60°C), vzorca izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 2 (oznaka 60°C 24h pH 2), vzorca izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 5 (oznaka 60°C 24h pH 5), ter vzorca, izpostavljenega temperaturi 60 °C in pH 8 (oznaka 60°C 24 h pH 8).**

#### 4.3.4 Vzorec, izpostavljen mehanskemu stresu

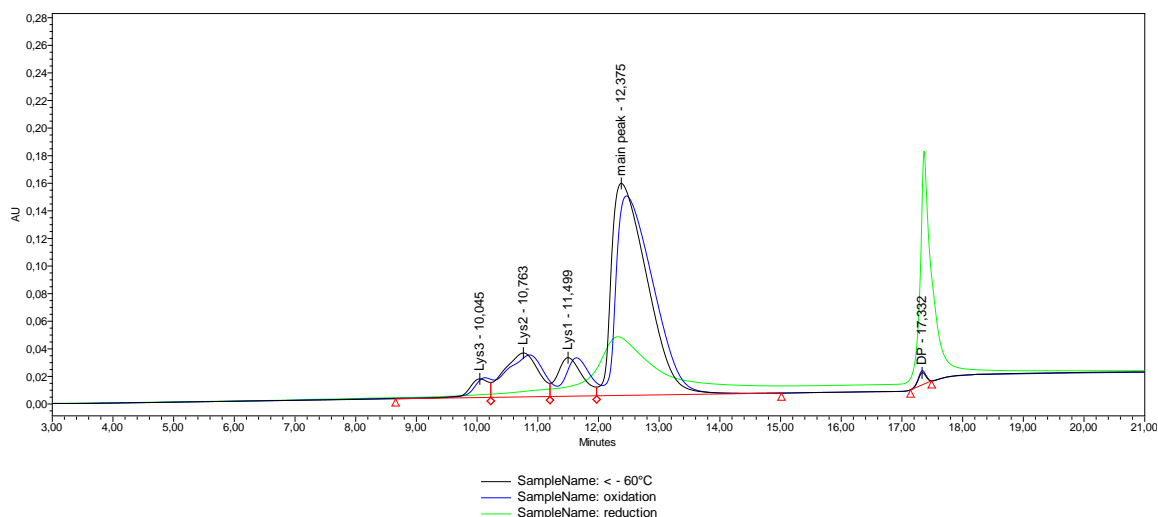
Na Sliki 32 sta prikazana kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije nativnega vzorca in vzorca, ki je bil izpostavljen mehanskemu stresu. Njuni čistosti sta primerljivi (približno 72 %).



**Slika 32: Prekrita kromatograma kationske izmenjevalne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), in vzorca, izpostavljenega mehanskemu stresu (oznaka shaking).**

#### 4.3.5 Vzorci, izpostavljeni oksidirajočim in reducirajočim pogojem

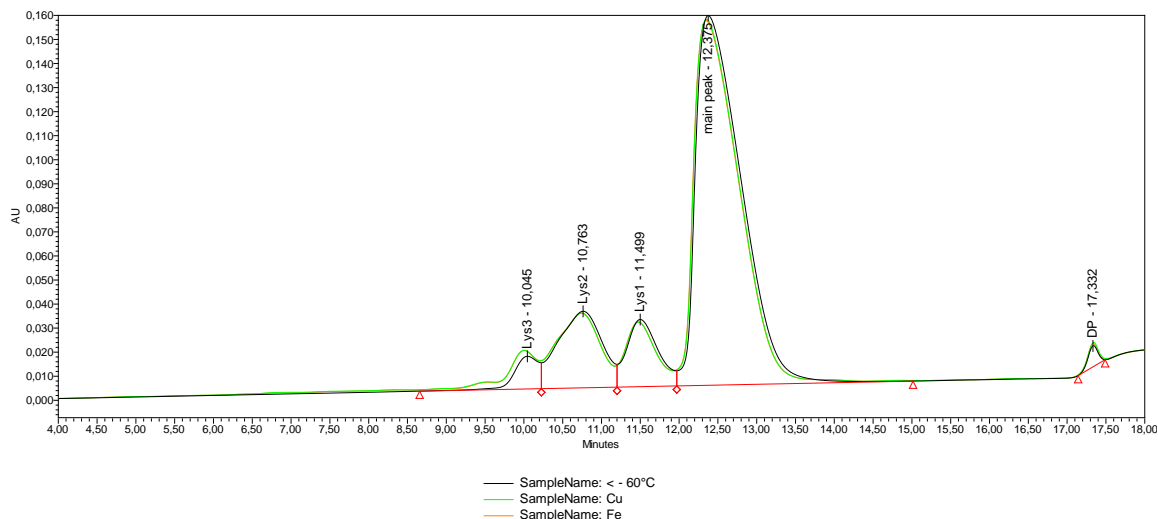
Na Sliki 33 so prikazani kromatogrami kationske izmenjevalne kromatografije nativnega vzorca, vzorca, ki je bil izpostavljen oksidirajočim pogojem, in vzorca, ki je bil izpostavljen reducirajočim pogojem. Čistost vzorca, ki je bil izpostavljen oksidirajočim pogojem, je za 1 % nižja od čistosti nativnega vzorca (približno 71 %). Čistost vzorca, ki je bil izpostavljen reducirajočim pogojem, je približno za 30 % nižja od čistosti nativnega vzorca (približno 44 %).



**Slika 33: Prekriti kromatogrami kationske izmenjevalne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca, izpostavljenega oksidirajočim pogojem (oznaka oxidation), ter vzorca, izpostavljenega reducirajočim pogojem (oznaka reduction).**

### 4.3.6 Vzorci, izpostavljeni kovinskim ionom

Na Sliki 34 so prikazani kromatogrami kationske izmenjevalne kromatografije nativnega vzorca, vzorca, ki je bil izpostavljen  $\text{Fe}^{3+}$ -ionom, in vzorca, ki je bil izpostavljen  $\text{Cu}^{2+}$ -ionom. Čistosti vzorca, ki je bil izpostavljen  $\text{Cu}^{2+}$ -ionom, in vzorca, ki je bil izpostavljen  $\text{Fe}^{3+}$ -ionom, sta približno za 2 % nižji od čistosti nativnega vzorca (približno 70 %).



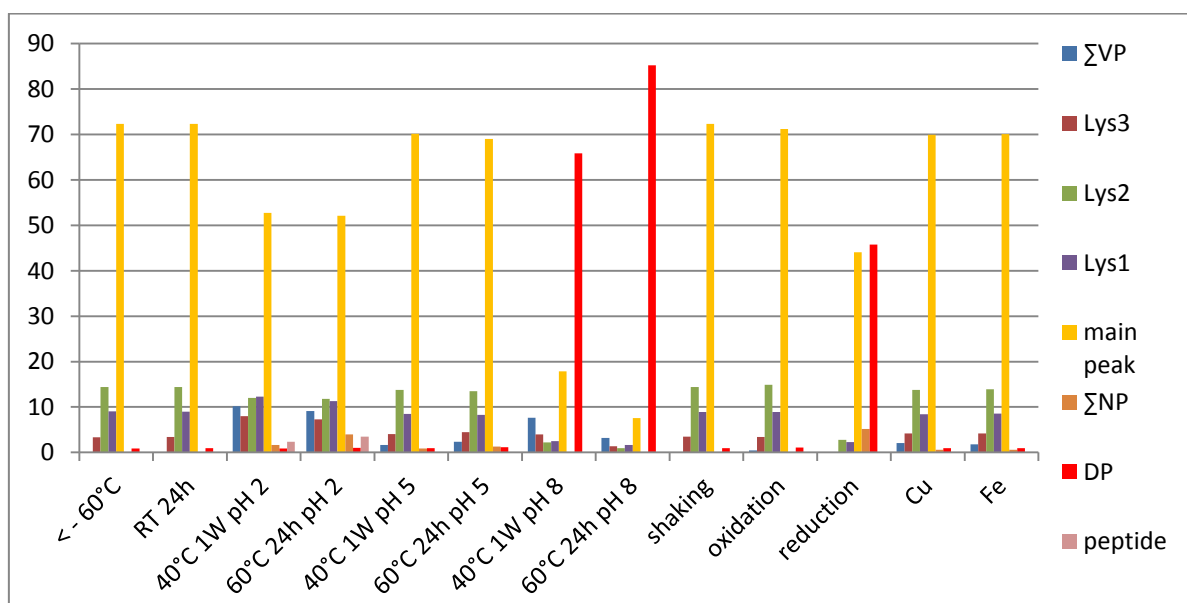
**Slika 34: Prekriti kromatogrami kationske izmenjevalne kromatografije nativnega vzorca (oznaka <-60°C), vzorca, izpostavljenega ionom  $\text{Fe}^{3+}$  (oznaka Fe), ter vzorca, izpostavljenega ionom  $\text{Cu}^{2+}$  (oznaka Cu).**

V Preglednici IX in na Sliki 35 so podani rezultati čistosti (»main peak«), deleži posameznih vrhov »Lys«, skupni delež vrhov »VP«, skupni delež vrhov »NP«, delež vrha »DP« ter delež vrha »peptide«. Dodatno so za lažjo predstavo o nastalih spremembah na Sliki 36 grafično predstavljeni še rezultati brez deležov komponente »main peak« in »DP«, ki predstavljata največja deleža.

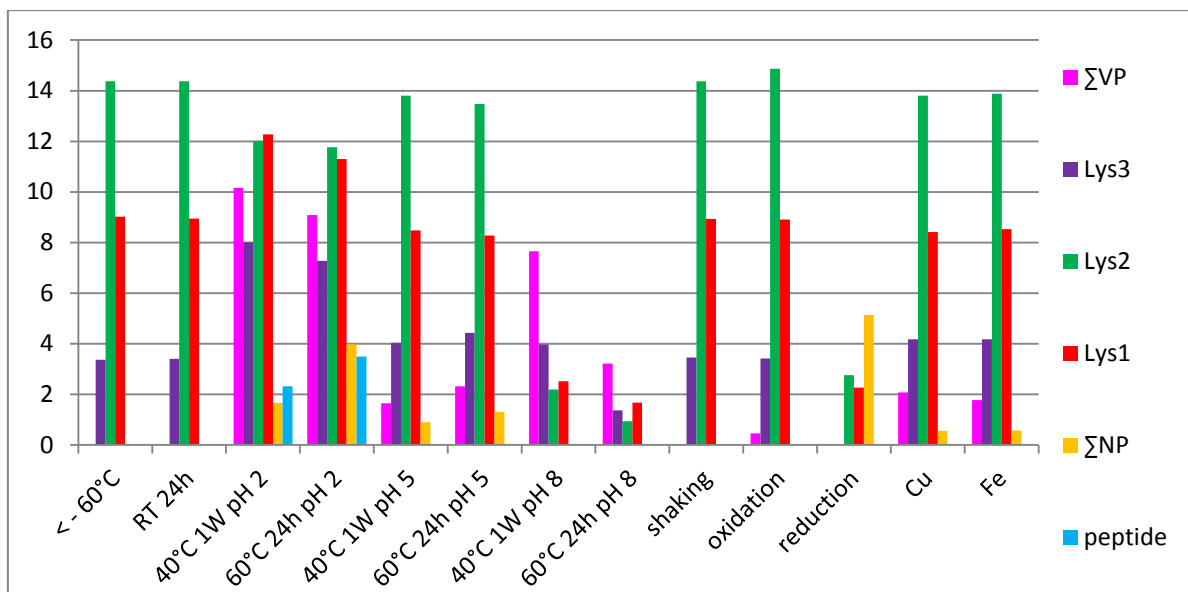
**Preglednica IX: Rezultati kationske izmenjevalne kromatografije (delež komponente »main peak«, deleži posameznih vrhov »Lys«, skupni delež vrhov »VP«, skupni delež vrhov »NP«, delež vrha »DP« ter delež vrha »peptide«) stresnih vzorcev.**

	$\sum$ VP	Lys3	Lys2	Lys1	main peak	$\sum$ NP	DP	peptide
< - 60 °C	0,0	3,4	14,4	9,0	72,3	0,0	0,9	0,0
RT 24h	0,0	3,4	14,4	9,0	72,4	0,0	0,9	0,0
40 °C pH 2	10,2	8,0	12,0	12,3	52,7	1,7	0,8	2,3
60 °C pH 2	9,1	7,3	11,8	11,3	52,1	4,0	1,0	3,5

	$\Sigma$ VP	Lys3	Lys2	Lys1	main peak	$\Sigma$ NP	DP	peptide
<b>40 °C pH 5</b>	1,6	4,0	13,8	8,5	70,1	0,9	1,0	0,0
<b>60 °C pH 5</b>	2,3	4,4	13,5	8,3	69,0	1,3	1,1	0,0
<b>40 °C pH 8</b>	7,7	4,0	2,2	2,5	17,8	0,0	65,8	0,0
<b>60 °C pH 8</b>	3,2	1,4	0,9	1,7	7,5	0,0	85,3	0,0
<b>shaking</b>	0	3,5	14,4	8,9	72,3	0,0	1,0	0,0
<b>oxidation</b>	0,5	3,4	14,9	8,91	71,2	0,0	1,1	0,0
<b>reduction</b>	0	0	2,76	2,3	44,0	5,1	45,8	0,0
<b>Cu</b>	2,1	4,2	13,8	8,4	70,0	0,6	1,0	0,0
<b>Fe</b>	1,8	4,2	13,9	8,5	70,1	0,6	0,9	0,0



**Slika 35: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije (delež komponente »main peak«, deleži posameznih vrhov »Lys«, skupni delež vrhov »VP«, skupni delež vrhov »NP«, delež vrha »DP« ter delež vrha »peptide«) stresnih vzorcev (za obrazložitev stresnih pogojev, katerim so bili vzorci navedeni na x-osi izpostavljeni, glej Preglednico VI: Povzetek stresnih pogojev).**



**Slika 36: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije (deleži posameznih vrhov »Lys«, skupni delež vrhov »VP«, skupni delež vrhov »NP« ter delež vrha »peptide«) stresnih vzorcev (za obrazložitev stresnih pogojev, katerim so bili vzorci navedeni na x-osi izpostavljeni, glej Preglednico VI: Povzetek stresnih pogojev).**

## 5 RAZPRAVA

Tekom razvoja in proizvodnje terapevtskih proteinov je treba neprestano zagotavljati take pogoje, da je nastajajoči produkt znane strukture, čist in obstojen, ter tako učinkovit in varen za bolnike. Kakršne koli nastale spremembe lahko namreč vplivajo na učinkovitost in varnost terapevtika. Zato smo v študiji preverili, ali izpostavitvev terapevtika – t. j. modelnega modificiranega proteina – stresnim pogojem, kakršnim je lahko zdravilo nehote izpostavljeno kadar koli od proizvodnje do aplikacije, vpliva na strukturo (čistost), ter ali so izbrane metode RPC, SEC in CEC sposobne zaznati nastale spremembe. Vsaka sprememba ne pomeni nujno »grožnje«, zato so pri vsaki metodi postavljeni kriteriji (specifikacijske meje), katere morajo vzorci izpolnjevati. V primeru neizpolnjevanja kriterijev moramo ugotoviti, zakaj je do tega prišlo. Lahko gre namreč za analitsko napako, za težavo v proizvodnji, lahko pa je razlog tudi v napačni pripravi vzorca. Če ugotovimo, da je tekom proizvodnje prišlo do odstopanj in da analiziran vzorec zaradi teh odstopanj ne izpolnjuje kriterijev, takega materiala ne uporabimo za končno formulacijo, saj bi lahko potencialno ogrozili bolnike.

V naslednjih podpoglavjih bomo predstavili in opisali spremembe, ki smo jih zaznali, ter jih razdelili glede na stresne pogoje, ki so jim bili vzorci izpostavljeni.

### 5.1 Vzorci, izpostavljeni povišani temperaturi

**Preglednica X: Rezultati reverznofazne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni povišani temperaturi**

RPC	peptide	pre-peaks	main peak	post-peaks
<- 60 °C	0,1	0,4	96,9	2,7
RT 24h	0,1	0,4	97,3	2,2
40 °C pH 5	0,1	0,6	96,4	2,9
60 °C pH 5	0,1	0,4	95,8	3,7

**Preglednica XI: Rezultati izključitvene kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni povišani temperaturi**

SEC	hMW-4	hMW-3	hMW-2	hMW-1	main peak
<- 60 °C		0,2	0,8	1,5	97,5
RT 24h		0,2	0,8	1,5	97,5
40 °C pH 5		0,2	0,9	1,6	97,3
60 °C pH 5		0,2	0,9	1,8	97,1

**Preglednica XII: Rezultati kationske izmenjevalne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni povišani temperaturi**

CEC	$\Sigma$ VP	Lys3	Lys2	Lys1	main peak	$\Sigma$ NP	DP	peptide
<- 60 °C	0,0	3,4	14,4	9,0	72,3	0,0	0,9	0,0
RT 24h	0,0	3,4	14,4	9,0	72,4	0,0	0,9	0,0
40 °C pH 5	1,6	4,0	13,8	8,5	70,1	0,9	1,0	0,0
60 °C pH 5	2,3	4,4	13,5	8,3	69,1	1,3	1,1	0,0

Na podlagi rezultatov je razvidno, da je modificiran protein obstojen 24 ur pri sobni temperaturi, saj se čistost pri tem pogoju bistveno ne spremeni pri nobeni izmed treh analitskih metod.

Vzorec, ki je bil 7 dni izpostavljen temperaturi 40 °C, ima nekoliko zmanjšano čistost glede na čistost nativnega vzorca, vendar je razlika pri vseh treh analitskih metodah zanemarljiva. Vzorec, ki je bil 24 ur izpostavljen temperaturi 60 °C, ima še nekoliko nižjo čistost, vendar gre ponovno za zanemarljivo razliko pri vseh metodah.

Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da je protein odporen proti povišani temperaturi – v primerjavi z nativnim vzorcem se čistost ne spremeni bistveno ne glede na temperaturo (24 ur pri sobni temperaturi oz. pri 60 °C ali 7 dni pri temperaturi 40 °C). V vseh primerih so izpolnjene postavljene specifikacijske meje. To pomeni, da v primeru, ko se na primer pokvari hladilnik, kjer shranjujemo terapevtik, in se njegova vsebina segreje na sobno temperaturo, vzorci ne bodo ogroženi in jih lahko uporabimo, če jih na primerne pogoje postavimo v roku 24 ur. Kljub tem rezultatom shranjevanje pri višjih temperaturah ni priporočljivo.

## 5.2 Vzorci, izpostavljeni kislemu pH

**Preglednica XIII: Rezultati reverznofazne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni kislemu pH**

RPC	peptide	pre-peaks	main peak	post-peaks
<- 60 °C	0,1	0,4	96,9	2,7
40 °C pH 2	0,1	1,5	85,9	12,4
60 °C pH 2	0,1	1,6	81,0	17,3

**Preglednica XIV: Rezultati izključitvene kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni kislemu pH**

SEC	hMW- 4	hMW- 3	hMW- 2	hMW- 1	main peak
<- 60 °C		0,2	0,8	1,5	97,5
40 °C pH 2		0,1	0,8	1,5	97,6
60 °C pH 2		0,1	0,8	1,5	97,6

**Preglednica XV: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni kislemu pH**

CEC	$\Sigma$ VP	Lys3	Lys2	Lys1	main peak	$\Sigma$ NP	DP	peptide
<- 60 °C	0,0	3,4	14,4	9,0	72,3	0,0	0,9	0,0
40 °C pH 2	10,2	8,0	12,0	12,3	52,7	1,7	0,8	2,3
60 °C pH 2	9,1	7,3	11,8	11,3	52,1	4,0	1,0	3,5

Čistost vzorca, ki je bil izpostavljen temperaturi 40 °C in kislemu pH, je nižja od čistosti nativnega vzorca, in sicer pri metodi RPC za približno 10 % in pri metodi CEC za približno 20 %. Pri metodi SEC je čistost nespremenjena, kar pomeni, da ob izpostavitvi vzorca kislemu pH ne pride niti do nastanka agregatov niti razgradnih produktov, ki bi jih



lahko zaznali s to metodo. To bi namreč opazili, saj se pri metodi SEC molekule različne velikosti različno dolgo zadržujejo v koloni. [44]

Iz metode CEC je razvidno, da je do znižanja čistosti prišlo predvsem na račun komponent, ki se izločajo iz kolone pred glavnim vrhom. Povečanje deleža vrha Lys3 je najverjetneje posledica deamidacije (podatki o razlagi tega pojava niso vključeni v magistrsko nalogo). Deamidacija najpogosteje povzroči pretvorbo aminokislina asparagin v asparaginsko kislino, ki deluje bolj kislo od asparagina in se zato hitreje sprostí iz kationskega izmenjevalca. [45] Povečanje deleža vrha Lys1 in vrhov, označenih z »VP«, predstavlja nastanek proteinskih variant z bolj negativnim nabojem. Možno je, da je to posledica delnega razvitja proteina zaradi kislega pH, zaradi česar lahko pride do izpostavitve aminokislín z več negativnimi naboji oziroma izpostavitve aminokislín, ki so dodatno podvržene deamidaciji in se zato iz kolone sproščajo pred glavnim vrhom. Opazimo tudi povečanje deleža vrha »peptide«, ki predstavlja nemodificiran protein, kar lahko pomeni, da je prišlo do odcepitev kemijskega modifikatorja od proteina. Nekoliko so tudi povečani deleži vrhovi »NP«, ki predstavljajo proteinske oblike z bolj pozitivnim nabojem od glavnega vrha. [45]

Iz metode RPC je razvidno, da je do zmanjšanja čistosti prišlo v manjšem deležu na račun vrhov, ki se sproščajo iz kolone pred glavnim vrhom (»pre-peaks«) in so bolj hidrofilni od glavnega vrha. V večjem deležu se je čistost zmanjšala na račun povečanja deleža komponent »post-peaks«, ki predstavljajo bolj hidrofobne nečistote in se na koloni zadržujejo dlje od glavnega vrha. Ti vrhovi so lahko posledica deamidacije ali izpostavitve bolj hidrofobnih aminokislín zaradi spremembe proteinske strukture, povzročene s kislim pH. Pri RPC je razvidno tudi, da se je pri nekaterih proteinskih kemijskih modifikatorjih odcepil, kar zaznamo kot povečanje deleža komponente »pre-peak 1«, ki predstavlja protein po odcepitevi modifikatorja, kar potrjuje zgoraj opisane rezultate pri metodi CEC.

Čistost vzorca, ki je bil izpostavljen temperaturi 60 °C in kislemu pH, je še nižja kakor za zgoraj podrobneje opisan vzorec, ki je bil izpostavljen temperaturi 40 °C. To pomeni, da povišana temperatura dodatno pospeši opisane procese.

Razlika, ki jo med vzorcema, ki sta bila izpostavljena temperaturama 40 °C in 60 °C, zaznamo pri analitski metodi CEC, je v tem, da pri višji temperaturi naraste delež komponente, ki se iz kolone sproščajo za glavnim vrhom in so torej bolj pozitivno nabite od komponente glavnega vrha (»NP«). Opazimo tudi povečanje deleža komponente

»peptide«. To bi enako kot prej lahko pomenilo, da se pri višji temperaturi v kislem okolju kemijski modifikator v večji meri odceplja od proteina.

Pri analitski metodi RPC pa je razlika med vzorcema predvsem v komponentah, ki se iz kolone sproščajo za glavnim vrhom in so torej bolj hidrofobne (»post-peaks«). Opazimo tudi dodatno povečanje deleža vrha »pre-peak 1«, kar nakazuje, da se pri višji temperaturi kemijski modifikator v večji meri odceplja od proteina.

Ker tako kislemu pH vzorci ponavadi niso izpostavljeni, ne moremo sklepati, da je protein neobstoje. Ugotovili smo tudi, da so uporabljene metode sposobne zaznati spremembe, nastale pri izpostavitvi terapevtika kislemu pH. Če bi te spremembe želeli podrobneje opredeliti in razložiti, bi bila potrebna analiza še npr. z masno spektrometrijo, kar pa je izven obsega te študije.

### 5.3 Vzorci, izpostavljeni bazičnemu pH

**Preglednica XVI: Rezultati reverznofazne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni bazičnemu pH**

RPC	peptide	Pre-peaks	main peak	Post-peaks
<- 60 °C	0,1	0,4	96,9	2,7
40 °C pH 8	0,2	0,0	46,1	53,8
60 °C pH 8	0,0	0,0	22,7	77,3

**Preglednica XVII: Rezultati izključitvene kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni bazičnemu pH**

SEC	hMW-4	hMW-3	hMW-2	hMW-1	main peak
<- 60 °C		0,2	0,8	1,5	97,5
40 °C pH 8		42,5	10,3	13,7	33,6
60 °C pH 8		60,8	11,2	13,0	15,1

**Preglednica XVIII: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni bazičnemu pH**

CEC	$\Sigma$ VP	Lys3	Lys2	Lys1	main peak	$\Sigma$ NP	DP	peptide
<- 60 °C	0,0	3,4	14,4	9,0	72,3	0,0	0,9	0,0
40 °C pH 8	7,7	4,0	2,2	2,5	17,8	0,0	65,8	0,0
60 °C pH 8	3,2	1,4	0,9	1,7	7,5	0,0	85,3	0,0

Spremembe pri vzorcu, ki je bil izpostavljen povišani temperaturi in bazičnemu pH, so še večje od sprememb v kislemu okolju. Npr. čistost vzorca v bazičnem okolju pri 40 °C je nižja od čistosti nativnega vzorca, in sicer pri metodi RPC za približno 50 %, pri metodi CEC za približno 55 % in pri metodi SEC za približno 65 %.

Iz metode RPC je razvidno, da je čistost nižja predvsem na račun vrhov, ki predstavljajo bolj hidrofobne oblike (»post-peaks«), ki se dlje zadržujejo na koloni (podobno kot se je izkazalo v kislem okolju).

V nasprotju z izpostavitvijo vzorcev kislemu okolju, pa iz metode CEC lahko razberemo, da je nastalo nekaj kislih oblik (»VP«), vendar je čistost znižana predvsem na račun velikega povečanja deleža nečistot, ki so povezane s proizvodom (»DP«). To nakazuje, da je prišlo do še večje spremembe proteina kot v kislemu okolju.

Iz metode SEC lahko sklepamo, da je ta sprememba najverjetneje agregacija, saj se je čistost močno zmanjšala ravno na račun porasta deleža vrhov »hMW«, ki vsebujejo tudi proteinske agregate. Najverjetneje so se proteini zaradi ekstremnih pogojev (delno) razvili in so se izpostavile hidrofobne regije, kar je vodilo v agregacijo. [44]

Čistost vzorca, ki je bil izpostavljen temperaturi 60 °C in bazičnemu pH, je še nižja kakor za zgoraj opisani vzorec. To pomeni, da povišana temperatura pospeši opisane procese v bazičnem okolju.

## 5.4 Vzorec, izpostavljen mehanskemu stresu

**Preglednica XIX: Rezultati reverznofazne kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen mehanskemu stresu**

RPC	peptide	pre peaks	main peak	post peaks
<- 60 °C	0,1	0,4	96,9	2,7
shaking	0,1	0,4	96,1	3,4

**Preglednica XX: Rezultati izključitvene kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen mehanskemu stresu**

SEC	hMW-4	hMW-3	hMW-2	hMW-1	main peak
<- 60 °C		0,2	0,8	1,5	97,5
shaking		0,2	0,9	1,6	97,4

**Preglednica XXI: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen mehanskemu stresu**

CEC	$\Sigma$ VP	Lys3	Lys2	Lys1	main peak	$\Sigma$ NP	DP	peptide
<- 60 °C	0,0	3,4	14,4	9,0	72,3	0,0	0,9	0,0
shaking	0,0	3,5	14,4	8,9	72,3	0,0	1,0	0,0

Čistost vzorca, ki je bil 24 ur izpostavljen mehanskemu stresu, je primerljiva s čistostjo nativnega vzorca, pri vseh treh analitskih metodah. To pomeni, da je modificiran terapevtski protein dobro zaščiten proti strižnim silam in da je formulacija, v kateri se protein nahaja, ustrezna. Če bi bil protein občutljiv za strižne sile, bi najverjetneje prišlo do vsaj delnega razvitja proteinske strukture in posledično lahko tudi do agregacije. [36] Informacija, da je protein odporen na tovrstni stres, je koristna v primeru, če prihaja na primer med transportom do stresanja vzorcev.

## 5.5 Vzorec, izpostavljen oksidirajočim pogojem

**Preglednica XXII: Rezultati reverznofazne kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen oksidirajočim pogojem**

RPC	peptide	pre peaks	main peak	post peaks
<- 60 °C	0,1	0,4	96,9	2,7
<b>oxidation</b>	0,1*	0,4	96,6	2,9

\*Gre za oksidirani nemodificiran protein

**Preglednica XXIII: Rezultati izključitvene kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen oksidirajočim pogojem**

SEC	hMW-4	hMW-3	hMW-2	hMW-1	main peak
<- 60 °C		0,2	0,8	1,5	97,5
<b>oxidation</b>		0,2	0,9	1,7	97,3

**Preglednica XXIV: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen oksidirajočim pogojem**

CEC	$\Sigma$ VP	Lys3	Lys2	Lys1	main peak	$\Sigma$ NP	DP	peptide
<- 60 °C	0,0	3,4	14,4	9,0	72,3	0,0	0,9	0,0
<b>oxidation</b>	0,5	3,4	14,9	8,9	71,2	0,0	1,1	0,0

Čistost vzorca, ki je bil izpostavljen oksidirajočim pogojem, je primerljiva s čistostjo nativnega vzorca pri vseh treh analitskih metodah. Pri metodi CEC se je delež vrhov »VP« (kislinski oblik) zanemarljivo povečal.

Iz metode RPC lahko razberemo, da se je delež vzorca, ki ni kemijsko modificiran (označen z »peptide«), oksidirala. To zaznamo kot premik časa zadrževanja v smer bolj hidrofilnih oblik, saj je oksidirani protein bolj hidrofilen od neoksidiranega. [45] Oksidirala se je najverjetneje zato, ker ni zaščiten s kemijsko modifikacijo.

Primerljiva čistost vzorca, izpostavljenega oksidirajočim pogojem, s čistostjo nativnega vzorca, je lahko posledica zaščite proteina s kemijsko modifikacijo. Možno je tudi, da

nobena od uporabljenih metod ne zazna oksidacije modificiranega proteina. To bi lahko preverili z drugimi metodami, kar pa je izven obsega te magistrske naloge.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je vzorec ustrezno zaščiten pred oksidacijo – najverjetneje zaradi kemijske modifikacije. [37] Ta ugotovitev je pomembna v primeru, kadar je vzorec izpostavljen zraku (na primer med redčenjem vzorca pred analizo) in bi se lahko oksidiral. To bi vodilo v spremembo fizikalno-kemijskih lastnosti proteina, saj se nativna oblika proteina zaradi nastanka oksidiranih (in s tem večjih in bolj polarnih) stranskih verig aminokislin spremeni, kar lahko posledično vodi v agregacijo ali razgradnjo. [36] [39]

## 5.6 Vzorec, izpostavljen reducirajočim pogojem

**Preglednica XXV: Rezultati reverznofazne kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen reducirajočim pogojem**

RPC	peptide	pre peaks	main peak	post peaks
<- 60 °C	0,1	0,4	96,9	2,7
reduction	0,0	0,0	82,9	17,1

**Preglednica XXVI: Rezultati izključitvene kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen reducirajočim pogojem**

SEC	hMW-4	hMW-3	hMW-2	hMW-1	main peak
<- 60 °C		0,2	0,8	1,5	97,5
reduction	7,1	0,7	1,6	7,0	83,5

**Preglednica XXVII: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije vzorca, ki je bil izpostavljen reducirajočim pogojem**

CEC	$\sum$ VP	Lys3	Lys2	Lys1	main peak	$\sum$ NP	DP	peptide
<- 60 °C	0,0	3,4	14,4	9,0	72,3	0	0,9	0,0
reduction	0,0	0,0	2,8	2,3	44,0	5,1	45,8	0,0

Čistost vzorca, ki je bil izpostavljen reducirajočim pogojem, je nižja glede na čistost nativnega vzorca, in sicer pri metodah RPC in SEC za približno 15 %, pri metodi CEC pa za skoraj 30 %.

Iz metode SEC lahko razberemo, da je najverjetneje prišlo do nastanka agregatov, saj opazimo porast deleža komponent »hMW«. [44]

Iz metode RPC je razvidno, da je čistost nižja na račun bolj hidrofobnih oblik (»post-peaks«), te oblike bi lahko nastale zaradi agregacije.

Iz metode CEC vidimo, da je čistot nekoliko nižja zaradi nastanka bolj bazičnih oblik (»NP«) z bolj pozitivnim nabojem, predvsem pa je znižanje čistosti povzročila pojavnost nečistot, povezanih s produktom (»DP«) – najverjetneje agregatov, kar še dodatno podpira rezultate drugih dveh metod.

Vzrok za nastanek agregatov je najverjetneje v tem, da je reducent cepil disulfidne vezi med cisteini. Po cepitvi lahko pride do nepravilne povezave med njimi, kar lahko vodi v agregacijo, če se povežeta cisteina iz dveh proteinskih molekul. [36] [37] [38]

Ta ugotovitev je podprta z rezultati metode SEC, saj opazimo nastanek vrha »hMW-4«, ki vsebuje, glede na čas zadrževanja na koloni, večje molekule od agregatov, ki nastanejo pri bazičnemu pH. Možno je, da so »hMW-4« večji zato, ker se več proteinskih molekul poveže med seboj z intermolekularnih disulfidnimi povezavami.

## 5.7 Vzorci, izpostavljeni kovinskim ionom

**Preglednica XXVIII: Rezultati reverznofazne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni kovinskim ionom**

RPC	peptide	pre-peaks	main peak	post-peaks
<- 60 °C	0,1	0,4	96,9	2,7
<b>Cu</b>	0,2	0,4	96,1	3,3
<b>Fe</b>	0,1	0,4	96,3	3,2

**Preglednica XXIX: Rezultati izključitvene kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni kovinskim ionom**

SEC	hMW-4	hMW-3	hMW-2	hMW-1	main peak
<- 60 °C		0,2	0,8	1,5	97,5
<b>Cu</b>		0,2	0,9	1,7	97,3
<b>Fe</b>	0,1	0,2	0,9	1,7	97,1

**Preglednica XXX: Rezultati kationsko izmenjevalne kromatografije vzorcev, ki so bili izpostavljeni kovinskim ionom**

CEC	$\Sigma$ VP	Lys3	Lys2	Lys1	main peak	$\Sigma$ NP	DP	peptide
<- 60 °C	0	3,4	14,4	9,0	72,3	0	0,9	0,0
<b>Cu</b>	2,1	4,2	13,8	8,4	70,0	0,6	1,0	0,0
<b>Fe</b>	1,8	4,2	13,9	8,5	70,1	0,6	0,9	0,0

Čistost vzorcev, ki so bili izpostavljeni kovinskim ionom, je primerljiva s čistostjo nativnega vzorca.

Pri metodi CEC opazimo rahlo povečanje deleža vrhov, ki se iz kolone sproščajo pred glavnim vrhom in imajo torej bolj negativen naboj (so bolj kisle – »VP«).

To, da ob stiku s kovinskimi ioni ne prihaja do večjih sprememb, je pomembno zato, ker lahko protein pride v stik s temi elementi na primer med proizvodnjo ali med aplikacijo (na primer interakcija z ioni, ki bi se lahko izlužili iz injekcijske igle).



## 5.8 Povzetek rezultatov

V Preglednici XXXI so povzeti rezultati čistosti vseh stresnih vzorcev, podani kot delež glavnega vrha v odstotkih.

**Preglednica XXXI: delež glavnega vrha pri vseh metodah in pri vseh analiziranih vzorcih**

<b>vzorec</b>	<b>RPC (%)</b>	<b>SEC (%)</b>	<b>CEC (%)</b>
<- 60 °C	96,9	97,5	72,3
<b>RT 24h</b>	97,3	97,5	72,4
<b>40 °C pH 5</b>	96,4	97,3	70,1
<b>60 °C pH 5</b>	95,8	97,1	69,1
<b>40 °C pH 2</b>	<b>85,9</b>	97,6	<b>52,7</b>
<b>60 °C pH 2</b>	<b>81,0</b>	97,6	<b>52,1</b>
<b>40 °C pH 8</b>	<b>46,1</b>	<b>33,6</b>	<b>17,8</b>
<b>60 °C pH 8</b>	<b>22,7</b>	<b>15,1</b>	<b>7,5</b>
<b>shaking</b>	96,1	97,4	72,3
<b>oxidation</b>	96,6	97,3	71,2
<b>reduction</b>	<b>82,9</b>	<b>83,5</b>	<b>44,0</b>
<b>Cu</b>	96,1	97,3	70,0
<b>Fe</b>	96,3	97,1	70,1

Z rdečo barvo označeni deleži glavnega vrha v odstotkih predstavljajo rezultate, pri katerih kriteriji za čistost niso izpolnjeni. Iz rezultatov je razvidno, da kljub temu, da izbrane tri analitske metode delujejo na različnem principu, vseeno prikazujejo podobne trende. Pri vseh treh metodah je namreč očitno, da kombinacija bazičnega pH in povišane temperature protein spremenita v tolikšni meri, da ne izpolnjuje kriterijev za čistost. Enako velja za reducirajoče pogoje, ki so za izbrani kemijsko modificiran protein očitno preostri. Takoj je tudi očitno, da je protein v kislem pH bolj obstojen kakor v bazičnem pH. Sicer je čistost pri izpostavitvi kislemu pH pri metodah RPC in CEC tudi izven dovoljenih mej, vendar ne v taki meri kakor za vzorec, ki je bil izpostavljen bazičnemu pH.

## 6 SKLEP

Tekom študije smo prišli do številnih sklepov, ki bodo pomembno vplivali na nadaljnji razvoj dodatnih metod in na potek testiranja dolgoročne stabilnosti proteina.

Metoda RPC: Ugotovili smo, da je metoda RPC sposobna zaznati spremembe, do katerih pride pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni kombinaciji različnih temperatur in pH. Pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni mehanskemu stresu, sprememb nismo zaznali. Pri oksidirajočih pogojih smo spremembo zaznali samo pri nemodificiranem proteinu. Pri izpostavitvi vzorcev reducirajočim pogojem spremembo s to metodo zaznamo, pri izpostavitvi kovinskim ionom pa ne.

Metoda SEC: Ugotovili smo, da je metoda SEC sposobna zaznati spremembe, do katerih pride pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni povišani temperaturi in bazičnemu pH, ne pa tudi kislemu pH. Pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni mehanskemu stresu, sprememb nismo zaznali. Prav tako sprememb nismo zaznali pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni oksidirajočim pogojem. Pri izpostavitvi vzorcev reducirajočim pogojem spremembe s to metodo zaznamo, pri izpostavitvi kovinskim ionom pa ne.

Metoda CEC: Ugotovili smo, da je metoda CEC sposobna zaznati spremembe, do katerih pride pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni kombinaciji različnih temperatur in pH. Pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni mehanskemu stresu, sprememb nismo zaznali. Pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni oksidirajočim pogojem, je zaznana sprememba zanemarljiva. S to metodo zaznamo spremembe, nastale pri izpostavitvi vzorca reducirajočim pogojem. Prav tako opazimo spremembo pri izpostavitvi vzorcev kovinskim ionom, četudi je ta sprememba minimalna.

Izbrane tri analitske metode se med seboj dobro dopolnjujejo in je iz njihovih rezultatov mogoče dobiti predstavo o tem, kaj se z vzorcem dogaja, če ga izpostavimo različnim stresnim pogojem. Menimo, da so metode sposobne zaznati spremembe, do katerih lahko pride kadarkoli od faze razvoja terapevtika in vse do njegove aplikacije. Največje spremembe zaznamo pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni kombinaciji povišane temperature in visokih ali nizkih pH, ter ob izpostavitvi reducirajočim pogojem. Zato moramo biti pazljivi, da vzorcev ne izpostavimo takim pogojem.

Kljub temu, da z izbranimi metodami zaznamo nastale spremembe, bi bilo modro vzpostaviti še dodatne metode in preveriti, kaj določene spremembe, ki jih s temi tremi metodami sicer zaznamo, a jih ne moremo bolj podrobno opisati, pomenijo za naš protein in seveda posledično za bolnike.

Glede formulacije, v kateri se nahaja izbran kemijsko modificiran protein, menimo, da je ustrezna in je ni treba izboljševati, saj pride do sprememb samo pri zelo ostrih pogojih. To pomeni, da je obstojnost terapevtika v taki formulaciji ustrezna.

## 7 VIRI IN LITERATURA

- [1] Štrukelj K, Kos J, Bozovičar K, Bratkovič T, Lunder M, Glavač I, Kristl J, Doljak B, Slanc P, Kočevar N. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. 1. izdaja. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo, 2007: 4-23, 61-64, 68-71, 76-79, 99-102, 114-132, 136-142, 189-192.
- [2] G. Walsh, Biopharmaceuticals: Biochemistry and biotechnology. 2. izdaja. West Sussex: John Wiley, 2003: 1-8, 112-116, 124-158.
- [3] Almeida H , Amaral MH, Lobão P. Drugs obtained by biotechnology processing. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 2011; 47:199-207.
- [4] Bhopale GM, Nanda RK. Recombinant DNA expression products for human therapeutic use. Current science 2005; 89:614-622.
- [5] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline. Pharmaceutical development Q8(R2) 2009.
- [6] Fraser J. Solving the Quality by Design Dilemma: Great theory, tough application. Quality digest 2012.  
<http://www.qualitydigest.com/inside/twitter-ed/taking-holistic-approach-quality-design.html#> (dostopno 22.6.2015).
- [7] Strohl WR, Knight DM. Discovery and development of biopharmaceuticals: current issues. Current Opinion in Biotechnology 2009;20:668 – 672.
- [8] European Medicines Agency. EMEA/H/C/607. European Public Assessment Report (EPAR). OMNITROPE. EPAR summary for the public 2008.
- [9] European Medicines Agency. EMA/289660/2012. EMEA/H/C/000727. EPAR summary for the public. Binocrit (epoetin alfa) 2014.
- [10] European Medicines Agency. EMA/306822/2012. EMEA/H/C/000727. EPAR summary for the public. Abseamed (epoetin alfa) 2012.
- [11] European Medicines Agency. EMA/401926/2012. EMEA/H/C/000727. EPAR summary for the public. Epoetin Alfa Hexal (epoetin alfa) 2012.
- [12] European Medicines Agency. EMA/556801/2011 EMEA/H/C/000872. EPAR summary for the public. Retacrit (epoetin zeta) 2011.

- [13] European Medicines Agency. EMA/448577/2012 EMEA/H/C/000760. EPAR summary for the public. Silapo (epoetin zeta) 2014.
- [14] European Medicines Agency. EMEA/H/C/827. European Public Assessment Report (EPAR). TEVAGRASTIM. EPAR summary for the public 2008.
- [15] European Medicines Agency. EMA/434816/2014 EMEA/H/C/000825. EPAR summary for the public. Ratiograstim (filgrastim) 2014.
- [16] European Medicines Agency. EMEA/H/C/826. European Public Assessment Report (EPAR). BIOGRASTIM. EPAR summary for the public 2008.
- [17] European Medicines Agency. EMA/434861/2014 EMEA/H/C/000917. EPAR summary for the public. Zarzio (filgrastim) 2014.
- [18] European Medicines Agency. EMA/434854/2014 EMEA/H/C/000918. EPAR summary for the public. Filgrastim Hexal (filgrastim) 2014.
- [19] European Medicines Agency. EMA/201987/2010 EMEA/H/C/1142. EPAR summary for the public. Nivestim (filgrastim) 2014.
- [20] European Medicines Agency. EMA/402688/2013 EMEA/H/C/002778. EPAR summary for the public. Inflectra (infliximab) 2013.
- [21] European Medicines Agency. EMA/407240/2013 EMEA/H/C/002576. EPAR summary for the public. Remsima (infliximab) 2013.
- [22] European Medicines Agency. EMA/562331/2013 EMEA/H/C/002608. EPAR summary for the public. Ovaleap (follitropin alfa) 2013.
- [23] European Medicines Agency. EMA/348183/2014 EMEA/H/C/002150. EPAR summary for the public. Grastofil (filgrastim) 2014.
- [24] European Medicines Agency. EMA/CHMP/50313/2014 EMEA/H/C/002615. EPAR summary for the public. Bemfola (follitropin alfa) 2014.
- [25] European Medicines Agency. EMA/760389/2014 EMEA/H/C/002835. EPAR summary for the public. Abasaglar (insulin glargine) 2015.
- [26] European Medicines Agency. EMA/612763/2014 EMEA/H/C/003956. EPAR summary for the public. Accofil (filgrastim) 2014.
- [27] Zhu J. Mammalian cell expression for biopharmaceutical protein. Science Direct 2011;30:1158-1170.

- [28] Zhang J. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. ASM Press 2010;3: 157-78.
- [29] Aguilar MI. HPLC of Peptides and proteins: Methods and Protocols. Totowa: Humana Press, 2004: 3-43, 55-73.
- [30] Waters. HPLC - High Performance Liquid Chromatography: What Is HPLC (High Performance Liquid Chromatography)?  
[http://www.waters.com/waters/en\\_SI/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?locale=en\\_SI&cid=10048919](http://www.waters.com/waters/en_SI/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?locale=en_SI&cid=10048919)  
 (dostopno: 22. 6. 2015).
- [31] Waters. HPLC - High Performance Liquid Chromatography: How Does High Performance Liquid Chromatography Work?  
[http://www.waters.com/waters/en\\_SI/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_SI](http://www.waters.com/waters/en_SI/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_SI)  
 (dostopno: 22. 6. 2015).
- [32] Waters. HPLC - High Performance Liquid Chromatography: Identifying and Quantitating Compounds.  
[http://www.waters.com/waters/en\\_SI/Identifying-and-Quantitating-Compounds/nav.htm?cid=10049064&locale=en\\_SI](http://www.waters.com/waters/en_SI/Identifying-and-Quantitating-Compounds/nav.htm?cid=10049064&locale=en_SI) (dostopno: 22. 6. 2015).
- [33] Waters. HPLC - High Performance Liquid Chromatography: HPLC Separation Modes.  
[http://www.waters.com/waters/en\\_SI/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076](http://www.waters.com/waters/en_SI/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076) (dostopno: 22. 6. 2015).
- [34] Bio-Rad. Cation Exchange Chromatography.  
<http://www.bio-rad.com/en-si/applications-technologies/cation-exchange-chromatography> (dostopno: 22. 6. 2015).
- [35] Scitable by nature education. Essentials of Cell Biology. Unit 2: How Do Cells Decode Genetic Information into Functional Proteins? The Functions of Proteins Are Determined by Their Three-Dimensional Structures.  
<http://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/122996920> (dostopno: 22. 6. 2015).
- [36] Patel J, Kothari R, Tunga R, Ritter NM, Tunga BS. Stability Considerations for Biopharmaceuticals, Part 1: Overview of Protein and Peptide Degradation Pathways. BioProcess International 2011;20-31.
- [37] Manning M C, Chou D K, Murphy B M, Payne R W, Katayama D S. Stability of protein pharmaceuticals: an update. Pharmaceutical research 2010;4:544-575.

- [38] Yu J. Intentionally degrading protein pharmaceuticals to validate stability-indicating analytical methods. *Biopharm International* 2000;46-50.
- [39] Hawe A, Wiggenhorn M, van de Weert M, Garbe JH, Mahler HC, Jiskoot W. Forced degradation of therapeutic proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011;895-913.
- [40] Kats M. Forced Degradation Studies: Regulatory Considerations and Implementation. Stress testing studies are conducted to challenge specificity of stability-indicating and impurity- monitoring methods as part of validation protocol. *BioPharm International* 2005;18.
- [41] Yang M. Stress and Protein Instability During Formulation and Fill/Finish Processes. *BioPharm International* 2015;28.
- [42] ICH Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products 2013:1-22 (»The International Conference on Harmonisation«).
- [43] ICH, Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Q5C 1995:1-8.
- [44] Reubsæet JL, Beijnen JH, Bult A, van Maanen RJ, Marchal JA, Underberg WJ. Analytical techniques used to study the degradation of proteins: physical instability. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998;17:979–984.
- [45] Reubsæet JL, Beijnen JH, Bult A, van Maanen RJ, Marchal JA, Underberg WJ. Analytical techniques used to study the degradation of proteins: chemical instability. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998;17:955–978.
- [46] MR. Umesh. Pharmaceutical “Quality by Design” (QbD): An Introduction, Process Development and Applications 2012.  
<http://www.askaboutgmp.com/51895-pharmaceutical-quality-by-design-qbd-an-introduction-process-development-and-applications> (dostopno: 22. 6. 2015).
- [47] Ferreira GN, Monteiro GA, Prazeres DM, Cabral JM. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends Biotechnol.* 2000;18:380-388.
- [48] Grell L, Butarbuta A. Protein Separations – Chromatography: Reversed Phase [https://en.wikibooks.org/wiki/Proteomics/Protein\\_Separations\\_-\\_Chromatography/Reversed\\_Phase](https://en.wikibooks.org/wiki/Proteomics/Protein_Separations_-_Chromatography/Reversed_Phase) (dostopno: 22. 6. 2015).

- [49] Boundless: Protein Structure  
[https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/biological-macromolecules-3/proteins-56/protein-structure-304-11437/images/fig-ch03\\_04\\_09/](https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/biological-macromolecules-3/proteins-56/protein-structure-304-11437/images/fig-ch03_04_09/) (dostopno: 22. 6. 2015).
- [50] Boston University School of Medicine. Fourier Transform Mass Spectrometry Lab. The Isoaspartame.  
<http://www.bumc.bu.edu/ftms/research/isoaspartame/> (dostopno: 22. 6. 2015).
- [51] Herbert TJ. Biology College of Arts and Sciences. University of Miami.  
[http://www.bio.miami.edu/tom/courses/protected/ECB/CH05/5\\_22.jpg](http://www.bio.miami.edu/tom/courses/protected/ECB/CH05/5_22.jpg)  
(dostopno: 22. 6. 2015).
- [52] Shen D, Patton W, Banks P. A Novel Protein Aggregation Assay for Biologics Formulation Studies and Production QA/QC: ProteoStat<sup>®</sup> Fluorescent Reagent for Microplate-based Aggregate Quantitation. BioTek, 2011.  
<http://www.biotek.com/resources/articles/novel-protein-aggregation-assay.html>  
(dostopno: 22. 6. 2015).