

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja VOJKOVIĆ

**KARAKTERIZACIJA REAGENTOV POLIETILEN
GLIKOLA IN VPLIV NJIHOVE KAKOVOSTI NA
KAKOVOST PROTEINSKIH KONJUGATOV**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja VOJKOVIĆ

**KARAKTERIZACIJA REAGENTOV POLIETILEN GLIKOLA IN
VPLIV NJIHOVE KAKOVOSTI NA KAKOVOST PROTEINSKIH
KONJUGATOV**

MAGISTRSKO DELO

**CHARACTERIZATION OF POLYETHYLENE GLYCOL REAGENTS
AND IMPACT OF THEIR QUALITY ON THE QUALITY OF
PROTEIN CONJUGATES**

M.SC.THESES

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti s področja biotehnologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v podjetju Lek d.d., v Biofarmacevtiki Mengše, na oddelku Nove generacije proteinov.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete z dne 28. 09. 2015 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje magistrskega dela na Podiplomskem študiju bioloških in biotehniških znanosti s področja biotehnologije. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Nataša POKLAR ULRIH.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Hrvoje PETKOVIĆ
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Borut ŠTRUKELJ
 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Članica: viš. znan. sod. dr. Vladka GABERC POREKAR
 Kemijski inštitut

Datum zagovora: 06.07.2016

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Maja VOJKOVIĆ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Md
DK UDK 606:61:602.44:577.2(043.3)
KG reagenti polietilen glikola/ filgrastim/ proteinski konjugati/ analitska karakterizacija/
kakovost
AV VOJKOVIĆ, Maja, univ. dipl. inž. živilske tehnologije
SA POKLAR ULRIH , Nataša (mentorica)
KZ SI-1000, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških
znanosti, področje biotehnologije
LI 2016
IN KARAKTERIZACIJA REAGENTOV POLIETILEN GLIKOLA IN VPLIV NJIHOVE
KAKOVOSTI NA KAKOVOST PROTEINSKIH KONJUGATOV
TD Magistrsko delo
OP XII, 89 str., 50 pregl., 57 sl., 53 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Osnovni namen magistrskega dela je bila karakterizacija 30 kDa aldehidnih reagentov
polietilen glikola (PEG) in preučevanje vpliva njihove kakovosti na kakovost proteinskih
konjugatov. Za pripravo proteinskih konjugatov smo izbrali protein filgrastim in tri različne 30
kDa linearne reagente z aldehidno funkcionalno skupino (PEG 1, PEG 2, PEG 3). Izvedli smo
mestno-specifično N-terminalno pegilacijo in pripravili tri konjugate (P1, P2, P3). Dodatno
smo določili lastnosti reagentom PEG različnih velikosti in z različnimi funkcionalnimi
skupinami. Aldehidne reagente smo uspešno derivatizirali s PABA, medtem ko smo ugotovili,
da reagentov PEG s funkcionalnima skupinama NHS in MAL predhodno ni potrebno
derivatizirati, saj le-ti absorbirata v območju UV. Za karakterizacijo 30 kDa reagentov PEG in
njihovih proteinskih konjugatov smo uporabili sledeče kromatografske metode: RP-HPLC z
detekcijo FLD/UV/Corona, SE-HPLC z detekcijo FLD/UV/MALS/RI, AE-HPLC z detekcijo
RI ter CE-HPLC z detekcijo FLD. Konjugatom smo določili še vsebnost z UV-absorpcijsko
spektrofotometrijo in hidrodinamski radij z metodo DLS ter preverili njihovo stabilnost.. Z
metodo RP-HPLC smo določili največjo čistost reagentu PEG 1, zaporedno je sledila čistost
PEG 2 in PEG 3. Sorazmerno se je kakovost reagentov PEG odražala tudi v čistosti reakcijskih
mešanic proteinskih konjugatov v procesu pegilacije. Na kromatogramih RP-HPLC je med
reagenti PEG viden tudi zamik v retenzijskih časih, kar kaže na razlike v njihovi molekulski
masi. Enak trend je opazen na kromatogramih RP-HPLC konjugatov. Molekuli PEG 3 in P3
sta najbolj hidrofilni in molekuli PEG 1 in P1 najbolj hidrofobni. Na kromatogramih RP-HPLC
reagentov PEG so vidne tudi razlike v širinah vrhov. Širina vrhov PEG 1 in PEG 2 je
primerljiva, medtem ko je širina vrha PEG 3 opazno večja. Širina vrhov je povezana s
polidisperznostjo reagentov PEG. Rezultati so pokazali, da ima PEG 3 večjo polidisperznost v
primerjavi s PEG 1 in PEG 2. To se neposredno odraža tudi na polidisperznosti konjugatov, saj
so rezultati njihove polidisperznosti identični. Konjugati so stabilni pri temperaturi hranjenja
 5 ± 3 °C. Del razgradnje je možno zaslediti že pri temperaturi 25 °C, medtem ko je porast
razgradnih produktov bistveno večja pri temperaturi 40 °C. Vsi konjugati so pokazali tudi
izrazito občutljivost na oksidativni stres. Rezultati magistrskega dela potrjujejo temeljno
izhodno hipotezo, da kakovost reagentov polietilen glikola vpliva na kakovost proteinskih
konjugatov. Čistost, molekulski masa in polidisperznost reagentov PEG se neposredno
odražajo na čistosti, molekulski masi in polidisperznosti njihovih konjugatov. Nakazan je tudi
vpliv kakovosti reagentov PEG na stabilnost proteinskega konjugata, saj rezultati kažejo, da je
povečan delež oksidiranih oblik pri enem od konjugatov posledica nečistot v reagentu PEG.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UDC 606:61:602.44:577.2(043.3)
CX polyethylene glycol reagents/ filgrastim/ protein conjugates/ analytical characterization/ quality
AU VOJKOVIĆ, Maja
AA POKLAR ULRIH , Nataša (supervisor)
PP SI-1000, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate study of Biological and Biotechnical Sciences, Scientific field: Biotechnology
PY 2016
TI CHARACTERIZATION OF POLYETHYLENE GLYCOL REAGENTS AND IMPACT OF THEIR QUALITY ON THE QUALITY OF PROTEIN CONJUGATES
DT M.Sc. Thesis
NO XII, 89 p., 50 tab., 57 fig., 53 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The main purpose of the master study was to characterize 30 kDa aldehyde polyethylene glycol reagents (PEG) and investigate the impact of their quality on the quality of the protein conjugates. Protein filgrastim and three different 30 kDa linear PEG reagents with aldehyde functional group (PEG 1, PEG 2, PEG 3) were used for the preparation of conjugates. Three conjugates (P1, P2, P3) were prepared with site-specific N-terminal pegylation. Characterization of PEG reagents of different sizes and functional groups was performed as well. Aldehyde reagents were successfully derivatized with PABA, while the results showed that prior analysis derivatization for NHS and MAL functional groups is not needed, since they are UV absorbing. For the characterization of the 30 kDa aldehyde PEG reagents and their conjugates the following methods were used: RP-HPLC with FLD/UV/Corona detection, SE-HPLC with FLD/UV/MALS/RI detection, AE-HPLC with RI detection and CE-HPLC with FLD detection. In addition content of conjugates by UV-spectrophotometry and their hydrodynamic radius by DLS were determined and their stability tested. Results from RP-HPLC analysis showed that the PEG 1 reagent has the highest purity, followed by the purity of PEG 2 and PEG 3. Proportionally, the quality of PEG reagents was reflected in the purity of the conjugates reaction mixtures in the pegylation process. The difference in the retention times of PEG reagents on the RP-HPLC chromatograms was observed, showing differences in their molecular weight. The same trend was also observed on the RP-HPLC chromatograms of the corresponding conjugates. The molecules of PEG 3 and P3 are the most hydrophilic and the molecules of PEG 1 and P1 are the most hydrophobic. In the RP-HPLC chromatograms the differences in the peak width between PEG reagents were observed as well. The peak widths of the PEG 1 and PEG 2 are comparable, while PEG 3 has a clearly wider peak width. Results showed that PEG 3 has higher polydispersity in comparison to the PEG 1 and PEG 2. This is directly reflected in the polydispersity of their conjugates as the results of their polydispersity are identical. The conjugates are stable at temperature 5 ± 3 °C. To some extent degradation can already be detected at 25 °C, while the increase in degradation products is significantly higher at 40 °C. All conjugates showed a distinct sensitivity to the oxidative stress. Results of this study confirmed our core hypothesis that the quality of the protein conjugates is directly affected by the quality of the PEG reagents. Purity, molecular weight and polydispersity of the PEG reagents are directly reflected in the purity, molecular weight and polydispersity of their conjugates. The impact of the PEG reagents quality on the protein conjugate stability is also indicated, since the results have shown that impurities present in PEG reagent have caused the increased proportion of oxidized variants in one of the conjugates.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 REAGENTI POLIETILEN GLIKOLA IN PEGILACIJA	3
2.2 G-CSF, FILGRASTIM, PEGFILGRASTIM	6
2.3 KARAKTERIZACIJA	9
2.3.1 Karakterizacija reagentov polietilen glikola	9
2.3.2 Karakterizacija pegiliranih proteinov	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 MATERIALI	11
3.1.1 Osnovna oprema	11
3.1.2 Dodatna oprema in potrošni material	12
3.1.3 Kromatografske kolone in nosilci	13
3.1.4 Reagenti	13
3.1.5 Raztopine in pufri	15
3.1.6 Izvodni protein in reagenti polietilen glikol za pripravo konjugatov	16
3.2 METODE	16
3.2.1 Osnovna karakterizacija reagentov polietilen glikola	16
3.2.1.1 Analize RP-HPLC derivativiziranih reagentov polietilen glikola	18
3.2.1.2 Analize reagentov PEG različnih velikosti	19
3.2.2 Priprava konjugatov	19
3.2.3 Priprava končnih vzorcev	20
3.2.4 Stabilnost	20
3.2.5 Princip delovanja uporabljenih analitskih metod	21
3.2.5.1 Reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	22
3.2.5.2 Gelska kromatografija	22
3.2.5.3 Ionsko izmenjevalna kromatografija	23
3.2.5.4 UV-absorpcijska spektrofotometrija	23
3.2.5.5 Dinamično sipanje svetlobe	24
3.2.6 Analitske metode za karakterizacijo reagentov polietilen glikola	24
3.2.6.1 Metoda RP-HPLC	24
3.2.6.2 Metoda AE-HPLC	25
3.2.6.3 Metoda SE-HPLC	26
3.2.7 Analitske metode za karakterizacijo proteinskih konjugatov	27
3.2.7.1 UV-absorpcijska spektrofotometrija	27
3.2.7.2 Metoda RP-HPLC	27
3.2.7.3 Metoda CE-HPLC	27
3.2.7.4 Metoda SE-HPLC	28
3.2.7.5 Dinamično sipanje svetlobe	29

4	REZULTATI	30
4.1	OSNOVNA KARAKTERIZACIJA REAGENTOV POLIETILEN GLIKOLA	30
4.1.1	Derivatizacija reagentov polietilen glikola	30
4.1.2	Različne velikosti reagentov polietilen glikola	36
4.2	KARAKTERIZACIJA 30 kDa REAGENTOV POLIETILEN GLIKOLA	39
4.2.1	Analiza RP-HPLC	39
4.2.2	Analiza AE-HPLC	41
4.2.3	Analiza SE-HPLC	42
4.2.3.1	Polidisperznost in molekulska masa (RI)	42
4.2.3.2	Molekulska masa (MALS)	43
4.3	KARAKTERIZACIJA PROTEINSKIH KONJUGATOV	45
4.3.1	Optimizacija metod	45
4.3.2	Določanje vsebnosti	46
4.3.3	Analiza RP-HPLC	46
4.3.4	Analiza SE-HPLC	49
4.3.5	Analiza CE-HPLC	54
4.3.6	Določanje hidrodinamskih radijev (DLS)	54
4.3.7	Stabilnost	56
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	71
5.1	OSNOVNA KARAKTERIZACIJA REAGENTOV POLIETILEN GLIKOLA	71
5.2	PRIMERJAVA KAKOVOSTI REAGENTOV PEG IN KAKOVOSTI KONJUGATOV	75
6	POVZETEK (SUMMARY)	82
6.1	POVZETEK	82
6.2	SUMMARY	84
7	VIRI	86

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled pegiliranih zdravil na trgu (Kang in sod., 2009; Jevševar in sod., 2010; Ivens in sod., 2015; Biopharma ..., 2002)	4
Preglednica 2: Pregled podobnih bioloških zdravil pegfilgrastim v različnih fazah razvoja končnega produkta (Generics and biosimilar initiative ..., 2015)	6
Preglednica 3: Osnovna oprema	11
Preglednica 4: Dodatna oprema in potrošni material	12
Preglednica 5: Kromatografski nosilec za preparativno kromatografijo	13
Preglednica 6: Kromatografske kolone za analitsko kromatografijo	13
Preglednica 7: Reagenti	13
Preglednica 8: Raztopine in pufri	15
Preglednica 9: Izhodni protein za pripravo konjugatov	16
Preglednica 10: Reagenti PEG za pripravo konjugatov	16
Preglednica 11: Gradient metode RP-HPLC za analize derivatiziranih vzorcev PEG	19
Preglednica 12: Vsebnost konjugatov 30 kDa PEG-G-CSF	20
Preglednica 13: Pogoji hrانjenja in točke testiranja vzorcev P1, P2 in P3	20
Preglednica 14: Gradient metode RP-HPLC	25
Preglednica 15: Gradient metode CE-HPLC za analizo proteinskih konjugatov	28
Preglednica 16: Molekulske mase reagentov PEG, določene s SE-HPLC-MALS	38
Preglednica 17: Molekulske mase reagentov PEG določene s SE-HPLC-RI	38
Preglednica 18: Reaktivne nečistote in čistost 30 kDa reagentov PEG	39
Preglednica 19: Nečistote in čistost 30 kDa reagentov PEG	40
Preglednica 20: Terminalna aktivnost 30 kDa reagentov PEG	42
Preglednica 21: Polidisperznost in molekulska masa 30 kDa reagentov PEG	42
Preglednica 22: Molekulska masa 30 kDa reagentov PEG	43
Preglednica 23: Delež HMW v 30 kDa reagentih PEG	44
Preglednica 24: Vsebnost redčin 30 kDa PEG-G-CSF	46
Preglednica 25: Čistost pegilacijskih reakcijskih mešanic konjugatov	46
Preglednica 26: Čistost konjugatov določenih z metodo RP-HPLC	47
Preglednica 27: Rezultati nečistot določenih z metodo SE-HPLC	49
Preglednica 28: Molekulske mase konjugatov	51
Preglednica 29: Polidisperznost in molekulska masa konjugatov	53
Preglednica 30: Rezultati nečistot določenih z metodo CE-HPLC	54

Preglednica 31: R_h in PD proteinskih konjugatov izmerjena z DLS	55
Preglednica 32: Vrednost pH kontrolnih vzorcev konjugatov P1, P2, P3	57
Preglednica 33: Rezultati za HMW in LMW za P1, P2, P3 po točki testiranja 7 tednov	58
Preglednica 34: Molekulske mase konjugatov po 7 tednih na 5 ± 3 °C	61
Preglednica 35: Molekulske mase konjugatov po 7 tednih na 25 °C	61
Preglednica 36: Molekulske mase konjugatov po 7 tednih na 40 °C	61
Preglednica 37: Nečistote konjugata P1 določene z RP-HPLC	63
Preglednica 38: Nečistote konjugata P2 določene z RP-HPLC	63
Preglednica 39: Nečistote konjugata P3 določene z RP-HPLC	63
Preglednica 40: Nečistote (kisle oblike) - konjugat P1	66
Preglednica 41: Nečistote (kisle oblike) - konjugat P2	66
Preglednica 42: Nečistote (kisle oblike) - konjugat P3	67
Preglednica 43: Rezultati – vpliv oksidacije	69
Preglednica 44: Reagenti PEG in pripadajoči konjugati	75
Preglednica 45: Reagenti PEG, reakcijske mešanice in pripadajoči konjugati	75
Preglednica 46: Čistost in terminalna aktivnost reagentov PEG	77
Preglednica 47: Polidisperznost reagentov PEG in konjugatov	78
Preglednica 48: Molekulska masa reagentov PEG in konjugatov	78
Preglednica 49: Delež deam. oblik stabilitetnih vzorcev pri t_0 in po 7 tednih na 40 °C	81
Preglednica 50: Analiza RP-HPLC stabilitetnih vzorcev pri t_0 in po 7 tednih na 40 °C	81

KAZALO SLIK

Slika 1: Reakcija N-terminalne pegilacije (Roberts in sod., 2002: 465)	5
Slika 2: Zgradba hG-CSF (Zink in sod., 1994)	7
Slika 3: Aminokislinsko zaporedje filgrastima (DrugBank ..., 2015)	7
Slika 4: Struktura pegfilgrastima (Zink in sod., 1994)	8
Slika 5: Derivatizacija reagenta PEG-CHO s PABA - detekcija Corona	30
Slika 6: Derivatizacija reagenta PEG-CHO s PABA - detekcija UV	31
Slika 7: Derivatizacija reagenta PEG-NHS s PABA	31
Slika 8: Derivatizacija reagenta PEG-NHS z 6-aminofluoresceinom	32
Slika 9: Derivatizacija reagenta PEG-NHS z izoaminofluoresceinom	32
Slika 10: Derivatizacija reagenta PEG-MAL z MPA - detekcija Corona	33
Slika 11: Derivatizacija reagenta PEG-MAL z MPA - detekcija UV	33
Slika 12: Derivatizacija reagenta PEG-MAL z DTNB - detekcija Corona	34
Slika 13: Derivatizacija reagenta PEG-MAL z DTNB - detekcija UV	34
Slika 14: Derivatizacija reagenta PEG-MAL s fluoresceinom SAMSA	35
Slika 15: Analiza RP-HPLC nederivatiziranih reagentov PEG-MAL in PEG-NHS - detekcija Corona	36
Slika 16: Analiza RP-HPLC nederivatiziranih reagentov PEG-MAL in PEG-NHS - detekcija UV	36
Slika 17: Kromatogrami RP-HPLC-Corona reagentov PEG različnih velikosti	37
Slika 18: Kromatogrami SE-HPLC-RI reagentov PEG različnih velikosti	39
Slika 19: Kromatogrami 30 kDa reagentov PEG posneti z detekcijo UV	40
Slika 20: Kromatogrami 30 kDa reagentov PEG posneti z detekcijo Corona	41
Slika 21: Kromatogrami reagentov PEG za določanje polidisperznosti	43
Slika 22: Kromatogrami SE-HPLC 30 kDa reagentov PEG posneti z detekcijo UV	44
Slika 23: Kakovost 30 kDa reagentov PEG	45
Slika 24: Kromatogrami RP-HPLC RM konjugatov P1, P2, P3	47
Slika 25: Kromatogrami RP-HPLC konjugatov P1, P2, P3	48
Slika 26: Grafični prikaz rezultatov nečistot določenih z metodo RP-HPLC	48
Slika 27: Grafični prikaz rezultatov nečistot določenih z metodo SE-HPLC	49
Slika 28: Kromatogrami SE-HPLC konjugatov P1, P2, P3	50
Slika 29: Povečava kromatogramov SE-HPLC konjugatov P1, P2, P3	50
Slika 30: Kromatogram sisanja svetlobe (MALS) konjugata P1	52

Slika 31: Kromatogram sisanja svetlobe (MALS) konjugata P2	52
Slika 32: Kromatogram sisanja svetlobe (MALS) konjugata P3	53
Slika 33: Grafični prikaz rezultatov nečistot določenih z metodo CE-HPLC	54
Slika 34: Primer tipičnega signala meritev DLS, vzorec P3 5 ± 3 °C	55
Slika 35: Kromatogrami SE-HPLC kontrolnih vzorcev konjugatov P1, P2 in P3	57
Slika 36: Grafični prikaz rezultatov za HMW konjugatov P1, P2, P3 po 7 tednih hranjenja na testnih pogojih	59
Slika 37: Kromatogrami SE-HPLC konjugatov P1, P2 in P3 po 7 tednih na 5 ± 3 °C	59
Slika 38: Kromatogrami SE-HPLC konjugatov P1, P2 in P3 po 7 tednih na 25 °C	60
Slika 39: Kromatogrami SE-HPLC konjugatov P1, P2 in P3 po 7 tednih na 40 °C	60
Slika 40: Primer kromatografskega profila RP-HPLC konjugata P1 pri različnih temperaturah hranjenja po 7 tednih (5 ± 3 °C, 25 °C in 40 °C)	62
Slika 41: Grafični prikaz sorodnih snovi in nečistot - konjugat P1	64
Slika 42: Grafični prikaz sorodnih snovi in nečistot - konjugat P2	64
Slika 43: Grafični prikaz sorodnih snovi in nečistot - konjugat P3	65
Slika 44: Primer kromatografskega profila CE-HPLC konjugatov pri različnih temperaturah hranjenja po 7 tednih za konjugat P1 (5 ± 3 °C, 25 °C in 40 °C)	66
Slika 45: Grafični prikaz nečistot (kislih oblik) - konjugat P1	67
Slika 46: Grafični prikaz nečistot (kislih oblik) - konjugat P2	68
Slika 47: Grafični prikaz nečistot (kislih oblik) - konjugat P3	68
Slika 48: Primerjava kromatogramov izhodnega in oksidiranega konjugata P1	69
Slika 49: Primerjava kromatogramov izhodnega in oksidiranega konjugata P2	70
Slika 50: Primerjava kromatogramov izhodnega in oksidiranega konjugata P3	70
Slika 51: Nečistote reagentov PEG različnih velikosti	73
Slika 52: Razlike v odzivu sisanja svetlobe (MALS) za reagente PEG različnih velikosti pri enakem nanosu	74
Slika 53: Nečistote HMW reagentov PEG različnih velikosti	74
Slika 54: Kromatogrami RP-HPLC reagentov PEG, reakcijskih mešanic in njihovih konjugatov	76
Slika 55: Kromatogrami RP-HPLC PEG 1 in P1, PEG 2 in P2, PEG 3 in P3	77
Slika 56: Kromatografsko vedenje PEG 1, P1 in G-CSF na SE-HPLC z detektorjem RI	79
Slika 57: Kromatogrami konjugatov P1: nezamrznjen, Z/O in Z/O-Tween	80

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACN	acetonitril
AE-HPLC	anionsko izmenjevalna kromatografija (ang. <i>Anion Exchange Chromatography</i>)
AU	absorbanca enota
CE-HPLC	kationsko izmenjevalna kromatografija (ang. <i>Cation Exchange Chromatography</i>)
DAD	detektor ultravijolične svetlobe (ang. <i>Diode Array Detector</i>)
Deam	deamidirana oblika
DLS	dinamično sisanje svetlobe (ang. <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMSO	dimetil sulfoksid
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
ELISA	imunoencimska analiza (ang. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EU	Evropska unija
FLD	detektor fluorescenčne svetlobe (ang. <i>Fluorescence Light Detector</i>)
G-CSF	granulocitne kolonije spodbujajoči dejavnik (ang. <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>)
hG-CSF	humanji granulocitne kolonije spodbujajoči dejavnik
HMW	snovi z večjo molekulsko maso (ang. <i>High Molecular Weight variants</i>)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
INN	mednarodno nelastniško ime (angl. International Non-proprietary Name)
kDa	kiloDalton
LU	luminescenčna enota
LMW	snovi z manjšo molekulsko maso (ang. <i>Low Molecular Weight variants</i>)
MALS	sisanje svetlobe pri različnih kotih (ang. <i>Multi angle light scatter</i>)
MALDI TOF MS	masna spektrometrija z ionizacijo v matriksu z lasersko desorpcijo (ang. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>) in masnim analizatorjem časa preleta ionov (ang. <i>Time Of Flight</i>)
Met	metionin
MFB	mobilna faza B
Milli-Q	prečiščena voda z Milli-Q sistemom za čiščenje vode
min	minuta

NaCNBH ₃	natrijev cianoborohidrid
NaDS	natrijev dodecil sulfat
NMR	nuklearna magnetna resonanca
nRIU	enota lomnega količnika (ang. nano <i>Refractive Index Unit</i>)
Ox	oksidirana oblika
pA	pikoAmper
PABA	para-aminobenzojska kislina
PDB	spletna stran za dostop do strukturnih podatkov 3D za biološke molekule (ang. <i>Protein Data Bank</i>)
PdI	indeks polidisperznosti
PEG	polietilen glikol
PEG-CHO	aldehidni reagent PEG
PEG-MAL	maleimidni reagent PEG
PEG-NHS	reagent PEG z N-hidroksi-sukcinimidno reaktivno skupino
PEG-OH	neaktivirani polietilen glikol
PEG-SH	tiolni reagent PEG
pI	izoelektrična točka
rhG-CSF	rekombinantni humani G-CSF (ang. <i>recombinant human G-CSF</i>)
RI	lomni količnik, detektor lomnega količnika (ang. <i>refractive index</i>)
RM	reakcijska mešanica
RP-HPLC, RPC	kromatografija na reverzni fazi (ang. <i>Reverse Phase Chromatography</i>)
SE-HPLC, SEC	gelska kromatografija (ang. <i>Size Exclusion Chromatography</i>)
SPR	površinska plazmonska resonanca
t	teden
t ₀	točka 0 testiranja
TA	terminalna aktivnost
TFA	trifluorocetna kislina
SSN	sorodne snovi in nečistote
UV	ultravijolična (svetloba), detektor ultravijolične svetlobe
UV ₂₈₀	ultraviolična svetloba valovne dolžine 280 nm
ZDA	Združene države Amerike

1 UVOD

Kakovost pegiliranih učinkovin je odvisna od številnih dejavnikov, kot so kakovost uporabljenega proteina, kakovost reagentov, postopek pegilacije, postopek izolacije in čiščenja proteinskih konjugatov. V pegiliranem proteinu predstavlja reagent polietilen glikol znaten delež molekule, zato je njegova kvaliteta zelo pomembna. Potreba po karakterizaciji reagentov polietilen glikola (PEG) je ključnega pomena za razvoj in proizvodnjo kakovostne, varne in učinkovite pegilrane učinkovine. Uporaba reagentov PEG, kot dobro uveljavljenih in preučenih polimerov, v terapevtske namene narašča. Glavni namen pripetja reagenta PEG na protein je znatno podaljšanje razpolovnega časa v telesu, ki je predvsem posledica povečanja hidrodinamskega radija. Prav tako se izboljšata topnost in zaščita pred fizikalno-kemijskimi vplivi, kar vpliva na stabilnost učinkovine med hranjenjem. Pegilacija je dobro uveljavljena in zastopana tehnologija, ki hitro narašča. Številne pegilirane učinkovine na trgu potrjujejo njihovo varnost in učinkovitost. V zadnjem desetletju pa se je povečala tudi proizvodnja podobnih bioloških zdravil. Znanje ter razvoj na področju analitike reagentov PEG imata pri zagotavljanju primerljivosti z originatorskim zdravilom izredno pomembno vlogo.

Za izvedbo dela smo kot modelni protein izbrali filgrastim (rhG-CSF), proizveden v Sandozu, katerega član je tudi Lek. Lastnosti proteina so dobro znane. Protein rhG-CSF je precej hidrofoben. Nagnjen je k agregaciji, zato je dober kandidat za pegilacijo. Poleg tega vsebuje le štiri lizine, ki niso dovolj izpostavljeni, zato je idealen za pripetje reagenta PEG na N-konec proteina. Pripetje reagenta PEG na N-konec proteina vodi v homogen produkt, zaradi tega je tudi lažje oceniti zgolj vpliv lastnosti reagentov PEG na kakovost konjugatov. Pripetje reagenta PEG na različna mesta na proteinu lahko vpliva na različno obnašanje konjugatov. Reagent PEG po vezavi ščiti protein rhG-CSF pred agregacijo. Prav tako se proteinu znatno zviša topnost. Pripetje dovolj dolgega reagenta PEG na protein upočasni izločanje skozi ledvice. 20 kDa linearen PEG velja za velikost, ki predstavlja mejo za izločanje skozi ledvice in posledično znatno podaljša razpolovni čas proteina v telesu. Za proučevanje in pripravo konjugatov smo izbrali linearen reagent PEG velikosti 30 kDa, ki ga proizvedenega v skladu z dobro proizvodno praksou ponuja več proizvajalcev.

Osnovni namen magistrskega dela je bila karakterizacija treh različnih 30 kDa aldehidnih reagentov polietilen glikola in preučevanje vpliva njihove kakovosti na kakovost proteinskih konjugatov.

V okviru magisterske naloge smo izvedli tudi karakterizacijo reagentov PEG različnih velikosti in z različnimi funkcionalnimi skupinami. Osredotočili smo se predvsem na reagente PEG z aldehidno, NHS in maleimidno (MAL) funkcionalno skupino. Reagente PEG smo modifirali s procesom derivatizacije ter le-te analizirali z metodama reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (RP-HPLC) in gelska kromatografija (SE-HPLC). Derivatizacija poleg preučevanja različnih funkcionalnih skupin omogoča tudi karakterizacijo reagentov PEG z običajnimi kromatografskimi metodami, ki jih uporabljamo za analitiko proteinov, t.j. uporaba detekcije ultravijolične (UV) in fluorescenčne svetlobe (FLD). Hkrati smo reagente PEG analizirali tudi z metodama SE-HPLC z detekcijo sisanja svetlobe pri različnih kotih (MALS) in lomnega količnika (RI)

ter z RP-HPLC z detektorjem Corona, ki omogoča detekcijo reagentov PEG brez predhodne derivatizacije.

Lastnosti treh aldehidnih 30 kDa reagentov PEG različnih proizvajalcev smo ovrednotili na podlagi rezultatov sledečih analitskih metod: reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (detekcija UV, Corona), gelska kromatografija (detekcija UV, MALS, RI) in anionsko izmenjevalna kromatografija (detekcija RI). Reagenti PEG niso vidni v območju UV. Za namen detekcije v območju UV (reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti in gelska kromatografija) smo reagente PEG predhodno označili s para-aminobenzojsko kislino.

Z namenom preučevanja vpliva lastnosti reagentov PEG na kakovost pripravljenih proteinskih konjugatov smo pripravili proteinske konjugate. Na N-konec modelnega proteina filgrastim (rhG-CSF) smo vezali 30 kDa linearni aldehidni reagent PEG. Izbrali smo tržno dosegljive reagente PEG treh različnih proizvajalcev, ki ponujajo reagente PEG proizvedene s standardi dobre proizvodne prakse. Takšni reagenti PEG so primerni za proizvodnjo pegiliranih bioloških zdravil. Pripravili smo tri proteinske konjugate, ki smo jih dodatno izpostavili še različnim pogojem hranjenja, kot tudi procesu oksidacije. S testom stabilnosti smo namreč želeli oceniti tudi njihovo stabilnost. Karakterizacijo proteinskih konjugatov (30 kDa PEG-G-CSF) smo izvedli z uporabo sledečih analitskih metod: reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (detekcija FLD), gelska kromatografija (detekcija UV, MALS, RI, FLD), kationsko izmenjevalna kromatografija (detekcija FLD), UV- spektrofotometrija in dinamično sipanje svetlobe.

2 PREGLED OBJAV

2.1 REAGENTI POLIETILEN GLIKOLA IN PEGILACIJA

Reagenti polietilen glikola (PEG) so amfifilni polimeri sestavljeni iz n-kratnika podenot etilen oksida. Njihova splošna struktura oblika je HO-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-OH. So inertne in netoksične molekule, ki vsebujejo dve kemijsko aktivni terminalni hidroksilni skupini. Z namenom proizvodnje reagentov PEG z eno funkcionalno skupino se ena od njiju pretvori v metoksi ali v alkoxi skupino (Bailon in Berthold, 1998; Roberts in sod., 2002). Najbolj uporabni za modifikacijo polipeptidov so monometoksi reagenti PEG (mPEG) s strukturo CH₃O-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-OH, ki jim omogoča kovalentno vezavo z določeno funkcionalno skupino proteina. Poleg linearnih reagentov PEG se uporablajo tudi razvezjani reagent PEG (Bailon in Berthold, 1998; Roberts in sod., 2002; Cegnar in sod., 2007).

Prvi polimerni konjugati s proteinskimi učinkovinami so prav pegilirani proteini. Začetki kovalentne vezave polimera PEG na protein segajo že v leto 1970 (Abuchowski in sod., 1977a, 1977b). Prva generacija reagentov PEG je tekom razvoja napredovala v drugo generacijo. Druga generacija reagentov PEG je bila oblikovana z namenom odpraviti pomanjkljivosti prve (prisotnost nečistot, uporaba linearnih reagentov PEG z manjšo molekulsko maso (≤ 12 kDa), stranski učinki, nestabilna vez s konjugatom in pomanjkljiva selektivnost pri modifikaciji) (Roberts in sod., 2002).

Komercialno dostopne reagente PEG različnih velikosti, oblik in kemijskih struktur proizvajajo različni proizvajalci širom sveta (NOF Corporation - Japonska, SunBio – Južna Koreja, Chirotech Technology oziroma Dr. Reddy's – Velika Britanija, BioVectra – Kanada, itd.) (Jevševar in sod., 2010).

Zaradi povečane uporabe peptidov in proteinov kot bioloških učinkovin je zelo pomembna njihova modifikacija. Ena izmed njih je konjugacija z naravnimi in sintetičnimi polimeri, ki se je izkazala kot uspešna pri izboljšanju razpolovnega časa, topnosti, stabilnosti in znižanju imunogenosti (Roberts in sod., 2002; Pasut in Veronese, 2007). Med njimi je najuspešnejša metoda povečanja hidrodinamskega radija s kovalentno povezavo proteina s polimerom. Za konjugacijo se najpogosteje uporablja polimer PEG, zaradi biokompatibilnosti, neimunogenosti, netoksičnosti in topnosti v vodi in organskih topilih (Pasut in Veronese, 2007; Harris in Chess, 2003). Procesu kovalentne vezave ene ali več polimernih molekul reagenta PEG s proteinom pravimo pegilacija. Pegilacija je uveljavljen proces hitrega razvoja, ki zagotavlja varna in učinkovita zdravila (Jevševar in sod., 2010).

S pegilacijo se proteinu izboljšajo farmakološke in biološke lastnosti. Poveča se njegova biološka uporaba, zmanjša imunogenost in proteolizna razgradnja ter obenem poveča stabilnost in topnost (Cegnar in sod., 2007; Jevševar in sod., 2010; Roberts in sod., 2002). Pegilacija lahko spremeni tudi fizikalno-kemijske lastnosti proteina. Spremembe so lahko v elektrostatskih interakcijah in hidrofobnosti (Bailon in Berthold, 1998; Kusterle in sod., 2008).

Glavna pomankljivost pegilacije je običajno zmanjšana biološka učinkovitost *in vitro*, ki pa se *in vivo* kompenzira s podaljšanim zadrževanjem v telesu (Bailon in Berthold, 1998; Bailon in sod., 2001; Veronese in Pasut, 2005; Fishburn, 2008; Hamidi in sod., 2008; Caserman in sod., 2009).

Prav tako pa se s pegilacijo spremeni oziroma poveča tudi celotna velikost proteina, ki zmanjša izločanje skozi ledvice in spremeni biološko porazdelitev. Reagenti PEG niso biorazgradljivi in se iz telesa izločajo le s filtracijo skozi ledvice. Posledično je zelo pomembna njihova molekulska masa, ki za tovrstno izločanje ne sme presegati velikosti 20 kDa, število verig pripetega reagenta PEG, mesto vezave na proteinu in način vezave (Roberts in sod., 2002; Jevševar in sod., 2010). Proteinski konjugati z večimi reagenti PEG pa se iz telesa odstranijo skozi jetra, preko poti imunskega sistema in proteolizo proteinskega dela konjugata. Navedeni primeri so tudi predstavniki naravnih mehanizmov odstranjevanja večjih proteinskih molekul z molekulsko maso nad 70 kDa (Caliceti in sod, 2003).

Vzroki za pegilacijo peptidov in proteinov so torej številni. Po odobritvi prve pegilirane proteinske učinkovine s strani FDA leta 1990 se je njihovo število do leta 2010 povečalo na 9 (Jevševar in sod., 2010). Trenutno je tržno dostopnih 11 pegiliranih zdravil, katerih pregled je prikazan v preglednici 1.

Preglednica 1: Pregled pegiliranih zdravil na trgu (Kang in sod., 2009; Jevševar in sod., 2010; Ivens in sod., 2015; Biopharma ..., 2002)

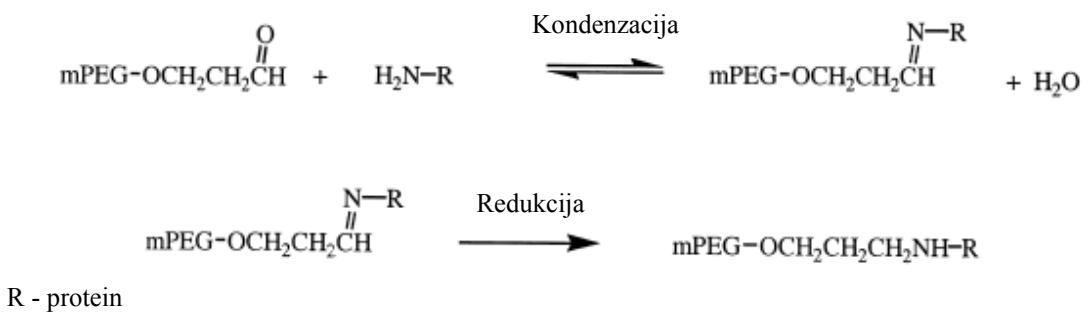
Tržno ime (INN) / Proizvajalec / Leto odobritve	Protein	PEG / pegilacija	Indikacije
Adagen® / Enzon / 1990 (ZDA)	Goveja adenozin deamidaza	5 kDa PEG / naključna	Huda kombinirana imunska pomankljivost (SCID)
Oncaspar®/ Enzon / 1994 (ZDA, EU)	Asparaginaza	5 kDa PEG / naključna	Akutna limfoblastna levkemija (ALL)
Pegintron® / Schering-Plough / 2000 (EU), 2001 (ZDA)	Interferon-alfa-2b	12 kDa PEG / naključna	Kronični hepatitis C
Pegasys® / Hoffmann-La Roche / 2002 (ZDA, EU)	Interferon alfa-2a	Razvezjani 40 kDa PEG z dvema linearima 20 kDa PEG / naključna	Kronični hepatitis C
Neulasta® / Amgen / 2002 (ZDA), 2003 (EU)	Granulocitne kolonije spodbujajoči dejavnik	20 kDa PEG / mestno specifična	Nevtropenija
Somavert® / Pharmacia Corporation / 2002 (EU), 2003 (ZDA)	Antagonist rastnega hormona	4-6 x 5 kDa PEG / naključna	Akromegalija
Macugen® / OSI/Pfizer / 2004 (ZDA), 2006 (EU)	Vazoaktivni endoteljski rastni faktor	Razvezjani 40 kDa PEG in 2x20 kDa linearni PEG / specifična	Neovaskularna makularna degeneracija

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1: Pregled pegiliranih zdravil na trgu (Kang in sod., 2009; Jevševan in sod., 2010; Ivens in sod., 2015; Biopharma ..., 2002)

Tržno ime (INN) / Proizvajalec / Leto odobritve	Protein	PEG / pegilacija	Indikacije
Mircera®/ Roche / 2007 (EU, ZDA)	Epoetin beta	30 kDa PEG / naključna	Anemija, povezana z ledvično odpovedjo
Cimzia® / UCB / 2008 (ZDA)	Fragment Fab protitelesa proti TNF	40 kDa PEG / mestno specifična	Chronova bolezen Revmatoidni artritis
Krystexxa ® / Savient / 2010 (ZDA), 2013 (EU)	Urat oksidaza	~40x10 kDa PEG / naključna	Protin
Plegridy ® / Biogen / 2014 (EU, ZDA)	Interferon beta-1a	20 kDa PEG / mestno specifična	Multipla skleroza

Na voljo so reagenti PEG z različnimi funkcionalnimi skupinami (aldehidna, maleimidna, NHS, itd.), ki omogočajo mestno specifične in nespecifične konjugacije. Funkcionalno skupino reagenta PEG izberemo glede na razpoložljivo aktivno skupino proteina. Tipične amino kisline proteinov primerne za vezavo so lizin, cistein, histidin, arginin, asparaginska kislina, glutaminska kislina, serin, treonin, tirozin, N-terminalna amino skupina in C-terminalna karboksilna kislina. Sprva je prevladovala uporaba naključne pegilacije (npr. pegilacija reagenta PEG s funkcionalno skupino NHS na lizin), že nekaj časa pa je trend uporaba reagentov PEG, ki omogočajo mestno specifično konjugacijo. Širše uveljavljeni mestno specifični pegilaciji sta pegilacija amino kisline cistein z reagentom PEG z maleimidno funkcionalno skupino in amino skupine N-konca z reagentom PEG z aldehidno funkcionalno skupino. N-terminalna pegilacija je dvostopenjski proces pri katerem se reagent PEG-aldehid (PEG-CHO) veže na amino skupino N-konca. V prvi stopnji gre za nukleofilno adicijo, v drugi stopnji pa za redukcijo imina do sekundarnega amina. Za redukcijo se največkrat uporablja NaCNBH₃ (Roberts in sod., 2002; Kinstler in sod., 2002; Bailon in Berthold, 1998; Means in Feeney, 1995). Reakcija reduktivnega alkiliranja je prikazana na sliki 1. Selektivnost konjugacije je poleg uporabe reagentov PEG z eno aktivno skupino lahko izboljšana še z reakcijskimi pogoji kot so pH, molarno razmerje med reagentom in proteinom, temperatura in čas reakcije (Bailon in Berthold, 1998).



Slika 1: Reakcija N-terminalne pegilacije (Roberts in sod., 2002: 465)

Prvi primer terapevtskega proteina, ki je pripravljen z mestno specifično pegilacijo amino skupine N-konca, je Neulasta®. Učinkovina je N-terminalno mono-pegiliran filgrastim (G-CSF) z 20 kDa linearnim reagentom PEG (Kinstler in sod., 2002; Molineux, 2004). Na trgu je od leta 2002 in zanjo že obstajajo različice biološko podobih zdravil, ki so predstavljene v preglednici 2.

Odobrene različice biološko podobih zdravil so zaenkrat na voljo le v Indiji, medtem ko so le-te za visoko regulirane trge še v fazi vloge registracijske dokumentacije ozziroma v fazah kliničnega razvoja.

Preglednica 2: Pregled podobnih bioloških zdravil pegfilgrastim v različnih fazah razvoja končnega produkta (Generics and biosimilar initiative ..., 2015)

Podjetje / Država	Ime izdelka	Faza razvoja zdravila
Apotex, Kanada	-	Prošnja za odobritev v ZDA vložena decembra 2014
Dr Reddy's Laboratories, Indija	Peg-grafeel	Podobno biološko zdravilo odobreno v Indiji maja 2010
Intas Biopharmaceuticals, Indija	Neupeg	Podobno biološko zdravilo odobreno v Indiji avgusta 2007
Gennova Biopharmaceuticals (Emcure), Indija	Pegex	Podobno biološko zdravilo odobreno v Indiji januarja 2010
Lupin, Indija	Peg-filgrastim	Podobno biološko zdravilo odobreno v Indiji septembra 2013
Merck, ZDA	MK-6302	V kliničnem razvoju za namen zdravljenja nevtropenije od leta 2011
Sandoz, Švica	LA-EP2006	Registracijska dokumentacija vložena v EU in ZDA.

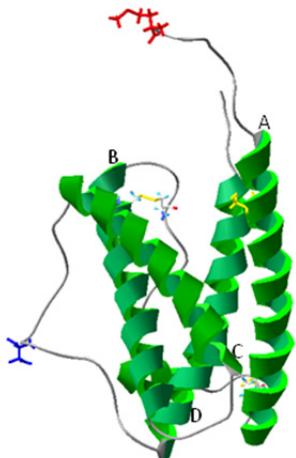
2.2 G-CSF, FILGRASTIM, PEGFILGRASTIM

Granulocitne kolonije stimulirajoči dejavnik (G-CSF, *granulocyte colony stimulating factor*) je naravno prisoten v človeškem telesu in ga uvrščamo med citokine. Citokini so skupina proteinov z majhno molekulsko maso, ki delujejo kot kemični prenašalci med celicami. G-CSF je hematopoetski rastni dejavnik, ki je nujen za zorenje krvnih celic. Spodbuja nastajanje nevtrofilcev, ki imajo zelo pomembno vlogo pri zaščiti telesa pred okužbami (Doljak, 2007; Wang in sod., 2001; Touw in sod., 2007).

Endogeni G-CSF je glikoprotein, ki ga proizvajajo monociti, fibroblasti in endotelijске celice. Glikozilacija ne vpliva na biološko aktivnost *in vitro* in *in vivo*, izboljša pa fizikalno stabilnost proteina *in vitro*, izboljša topnost in zmanjša proteolitsko razgradnjo *in vivo* (Bönig in sod., 2001; Fujii in sod., 1997). Molekula G-CSF je hidrofobna, saj je skoraj polovica aminokislinskih ostankov hidrofobnih aminokislin. Večina se jih nahaja v notranjosti molekule in imajo pomembno vlogo pri stabilizaciji proteina (Bönig in sod., 2001; Fujii in sod., 1997; Podobnik in sod., 2007).

Primarno zgradbo G-CSF sestavlja 174 aminokislin. Tridimenzionalna zgradba uvršča G-CSF med tipične proteine z zgradbo štirih vijačnic, ki jih povezujejo zanke. Molekula vsebuje skupno pet cisteinov in dva disulfidna mostička, ki stabilizirata molekulo. Prvi se nahaja v notranjosti molekule in drugi na njeni površini. Pri nižjih vrednostih pH je

stabilnost molekule še dodatno povečana zaradi prisotnosti prostega cisteina, ki se nahaja v hidrofobnem žepu tik pod površino in prepreči dimerizacijo (Arakawa in sod., 1993; Hill in sod., 1993; Podobnik in sod., 2007).



N-konec je označen z rdečo, prosti cistein z rumeno in glikozilacijsko mesto z modro. Prikazani so tudi cisteini dveh disulfidnih vezi, ki sta označeni z rumeno, rdečo, modro in belo barvo. Struktura hG-CSF je bila pripravljena s programom SWIS-Pdb Viewer 3.7, z uporabo koordinat 3D-strukture s kodo *PDB 1GNC*.

Slika 2: Zgradba hG-CSF (Zink in sod., 1994)

Filgrastim (rh-G-CSF) je generično ime za rekombinantno obliko G-CSF. Molekula je sestavljena iz 175 aminokislín in jo pridobivajo z rekombinantno bakterijo *E. coli*. Molekula filgrastima ni glikozilirana in se od naravnega človeškega G-CSF razlikuje po dodatni aminokislini, to je metioninu na N-koncu molekule (Podobnik in sod., 2007), sicer pa ima enako aminokislinsko zaporedje. Dodatna aminokislina je posledica sinteze v bakteriji, kjer se sinteza proteinov vedno začne s formil-metioninom. Rekombinantni proteini, proizvedeni v bakterijskih celicah, imajo zato na prvem mestu dodatno aminokislino metionin (Madigan in sod., 2000).

Posledično ima filgrastim v primerjavi s človeškim G-CSF za vse aminokislíne višjo zaporedno številko. Tako je prosti cistein na mestu Cys₁₈ in mesto, kjer ima človeški G-CSF pripeto sladkorno enoto, je Thr₁₃₄. Zaradi odstotnosti sladkorne enote je fizikalna in kemijska stabilnost filgrastima nekoliko slabša v primerjavi s hG-CSF (Ono, 1994; Podobnik in sod., 2007). Molekulska masa filgrastima je 18,8 kDa in njegova izoelektrična točka (pI) 5,65 (DrugBank ..., 2015). Aminokislinsko zaporedje prikazuje slika 3.

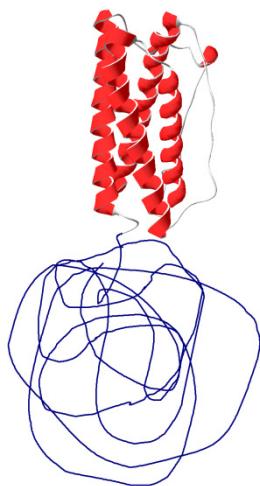
<pre>MTPLGPASSL PQSFLLKCLE QVRKIQGDGA ALQEKLCATY KLCHPEELVL LGHSLGIPWA PLSSCPSQAL QLAGCLSQLH SGLFLYCQGLL QALEGISPEL GPTLDCTQLD VADFATTIWC QMEEELCMAPA LQPTCQGAMPA FASAFCRRAG GVLVASHCQS FLEVSYRVLR HLAQP</pre>

Filgrastim: modra barva označuje Met₁, rumena prosti cistein Cys₁₈, siva disulfidni mostiček Cys₃₇-Cys₄₃, zelena disulfidni mostiček Cys₆₅-Cys₇₅ in roza glikozilacijsko mesto Thr₁₃₄; modra siva, vijolična in rumena črta označujejo vijačnice A, B, C in D.

Slika 3: Aminokislinsko zaporedje filgrastima (DrugBank ..., 2015)

Prvi filgrastim je proizvedlo podjetje Amgen in se pod tržnim imenom Neupogen® prodaja že od leta 1991. Najpogostejsa indikacija za uporabo rhG-CSF je zdravljenje nevtropenijs, največkrat za odpravljanje ciklične nevtropenijs med kemoterapijo s protitumorskimi ali protivirusnimi učinkovinami pri onkoloških bolnikih ali bolnikih, okuženih z virusom HIV. Eden glavnih stranskih učinkov kemoterapije je zmanjšanje števila levkocitov oziroma nevtrofilcev, saj večina kemoterapevtikov neselektivno deluje na vse hitro deleče se celice ter poleg inhibicije rasti tumorjev vplivajo tudi na zmanjšano nastajanje le-teh. Sočasna uporaba kemoterapevtika in filgrastima omogoča uporabo višjih odmerkov kemoterapevtika in s tem bolj učinkovito zdravljenje, saj rhG-CSF med kemoterapijo zviša raven nevtrofilcev in skrajša čas trajanja nevtropenijs. Druga najpogostejsa uporaba rhG-CSF je pri presaditvi perifernih prekurzorskih celic, ki se danes uporablja namesto klasične presaditve kostnega mozga. Zdravljenje z rhG-CSF ima malo neželenih stranskih učinkov in ga v splošnem bolniki dobro prenašajo. Najpogosteji nezaželen stranski učinek je bolečina kostne sredice, ki se pojavi pri 10 - 20% bolnikov (Doljak, 2007; Welte in sod., 1996).

Predstavnik druge generacije zdravila je pegfilgrastim (Neulasta®), ki ga je prav tako razvilo podjetje Amgen. Pegfilgrastim je filgrastim, ki ima na N-koncu kovalentno pripeto verigo 20 kDa linearrega reagenta PEG, zaradi katere so izboljšane fizikalno-kemijske in terapevtske lastnosti proteina (Kinstler in sod., 2002; Molineux, 2004). Velika molekula reagenta PEG ščiti molekulo filgrastim pred hitrim metabolizmom in zaradi upočasnjenega izločanja skozi ledvice podaljša njegovo delovanje. Pegfilgrastim ima podobne farmakokinamske in biološke učinke na nevtrofilce kot filgrastim. Zaradi podaljšanega razpolovnega časa se odmerja samo enkrat na cikel kemoterapije. Prav tako je kot filgrastim tudi pegfilgrastim indiciran za zdravljenje febrilne nevtropenijs, ki je posledica kemoterapije (Doljak, 2007; Van de Geijn in sod., 2003; Rofail in sod., 2012). Pegfilgastim v primerjavi s filgrastimom bistveno zmanjša pojav febrilne nevtropenijs (Rofail in sod., 2012; Cooper in sod., 2011).



Struktura PEG-G-CSF pripravljena s programom Swiss-PdbViewer 4.0.1, z uporabo koordinat strukture 3D s kodo PDB ID: 1GNC

Slika 4: Struktura pegfilgrastima (Zink in sod., 1994)

2.3 KARAKTERIZACIJA

Za razvoj varnih pegiliranih učinkovin in učinkovitega pegilacijskega procesa so potrebne ustrezne analitske metode za reagente PEG kot tudi za konjugate.

2.3.1 Karakterizacija reagentov polietilen glikola

Reagenti PEG predstavljajo kritično surovino v procesu pegilacije, zato je njihova karakterizacija ključnega pomena za razvoj in proizvodnjo pegilirane učinkovine. Kvaliteta reagentov PEG je odvisna od njihove molekulske mase, polidisperznosti, aktivnih in neaktivnih nečistot in stopnje aktivnih funkcionalnih skupin. Kakovost reagentov PEG neposredno vpliva na kakovost proteinskih konjugatov. Zelo pomembna lastnost reagentov PEG je terminalna aktivnost (TA) oziroma delež aktivnih funkcionalnih skupin v reagentu, ki je običajno 70-90%. TA ima direkten vpliv na učinkovitost pegilacijskega procesa. Poznavanje njene vrednosti omogoča prilagoditev dodane količine reagenta PEG v reakcijsko mešanico za doseganje ustreznega izkoristka oziroma stopnje pegilacije. Za kvalitativno in kvantitativno določanje TA se pogosto uporablja nuklearna magnetna resonanca (NMR). Alternativno pa so v uporabi tudi metode HPLC v povezavi s predhodno modifikacijo (derivatizacijo) reagenta PEG. Derivatizacijske metode omogočajo detekcijo reagentov PEG, saj so le-ti UV transparentni in ne flourescirajo. Ena izmed metod za določanje aktivnih nečistot reagenta je metoda RP-HPLC v kombinaciji z derivatizacijo. Reagente PEG je možno zaznati tudi brez predhodnega procesa derivatizacije. Na primer z uporabo metode RP-HPLC ali SE-HPLC z detektorjem Corona, ki omogoča detekcijo nečistot na osnovi razlik v molekulski masi oziroma hidrofobnosti. Ustrezno kontrolirana mora biti tudi molekulska masa reagenta PEG, saj predstavlja polovico ali več končnega konjugata kot tudi neposredno vpliva na njegovo biorazpoložljivost.

Natančno določanje molekulske mase omogoča metoda MALDI-TOF (Montaudo in sod., 2006), medtem ko je povprečna molekulska masa običajno določena z metodo SE-HPLC, s katero se določa tudi polidisperznost (Jevševar in sod., 2010). Regent PEG je kot vsi polimeri tipično polidisperzen. V primerjavi z ostalimi polimeri je njegova polidisperznost (porazdelitev molekulske mase) relativno ozka (Roberts in sod., 2002). V preteklosti so uporabljali reagente PEG z večjo polidisperznostjo, medtem ko je danes za reagente velikostnega razreda do 30 kDa sprejemljiv standardni indeks polidisperznosti približno 1,05. Za večje molekule (> 50 kDa) je sprejemljiva vrednost 1,1, vendar je tendenca po ožanju. Polidisperznost polimera je eden izmed dejavnikov, ki poslabša končno karakterizacijo proteinskih konjugatov in neposredno vpliva na polidisperznost konjugata (Jevševar in sod., 2010). Polidisperznost služi kot pokazatelj kakovosti in konsistence reagenta PEG in jo običajno merimo z metodo SE-HPLC v kombinaciji z detektorji RI in MALS. Potrebni so referenčni standardi znanih molekulskeih mas za kalibracijo sistema, identifikacijo analita in izračun polidisperznosti s pomočjo računalniškega programa (Kou in sod., 2009).

2.3.2 Karakterizacija pegiliranih proteinov

Na splošno ni enostavno predvidevati karakteristik pegiliranih proteinov, saj so močno odvisne od fizikalno-kemijskih lastnosti proteina, polimera, strukture vezavnega mesta in končnega konjugata. Vezava molekule reagenta PEG, ki je inerten, nevtralen in hidrofilen polimer, vpliva na lastnosti proteina. PEG ščiti protein in zmanjšuje njegove površinske interakcije. Ob vezavi molekule PEG na protein se bistveno spremeni njegova molekulska masa in velikost ter dodatno še njegove površinske lastnosti (naboj, hidrifobnost). Potencialne so tudi spremembe biološke aktivnosti. Izhodišča varnega in učinkovitega pegiliranega terapevtskega proteina so izhodni proteini visoke čistosti, odstranitev vseh stranskih produktov, ki nastanejo med pegilacijo in nezreagiranih reagentov, obseg pegilacije (število molekul PEG na molekulo proteina) in pozicijske izomere (mesto pripetja molekule PEG na molekuli proteina). Posledično morajo biti pred uporabo ustrezno očiščeni in karakterizirani. Poznavanje fizikalno-kemijskih lastnosti pegilirane molekule je bistvenega pomena za ločevanje tarčne molekule od drugih tako v preparativi kot analitiki. Molekulsko maso, velikost in obliko proteinskih konjugatov lahko določimo z različnimi metodami kot so SE-HPLC, masna spektroskopija, metode sipanja svetlobe, membrane, kapilarna in gelska elektroforeza. Zgradbo pegiliranih proteinov določamo s t.i. cirkularnim dihroizmom. Na podlagi razlik v hidrofobnosti je možno z metodo RP-HPLC ločiti pegilirane in ne-pegilirane komponente. Reagent PEG navadno obravnavamo kot hidrofilno molekulo, ki veže številne molekule vode. Pričakovali bi, da se pegilirani proteini eluirajo pred samim proteinom. V resnici pa imajo pegilirani proteini bistveno daljše retenzijske čase. Zadrževanje na kolonah RP-HPLC se povečuje z naraščajočo molekulsko maso reagenta PEG (Kusterle in sod., 2008), kar nakazuje delno hidrofilno oziroma amfifilno naravo molekule PEG. Robustna metoda RP-HPLC omogoča tudi določanje vsebnosti, čistosti in identifikacije pegiliranim proteinom. Elektrostatični naboj določamo z metodami CE-HPLC, AE-HPLC, izoelektrično fokusiranje, kapilarna elektroforeza in gelska elektroforeza z izoelektrično točko. Določamo jim lahko tudi imunokemijske lastnosti z metodami ELISA, Western blotting in SPR ter relativno topnost z vodnimi dvofaznimi sistemi. Dodatne karakterizacijske lastnosti je možno pridobiti tudi iz analiz za določanje biološke aktivnosti in farmakokinetike (Conan, 2009; Caserman in sod., 2009; Jevševar in sod., 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Osnovna oprema

Preglednica 3: Osnovna oprema
Table 3: General equipment

Oprema	Proizvajalec, tip
Avtoklav	Kambič, A-35/35-65/1
Centrifuga	Eppendorf, 5810 R; Eppendorf, 5702 RH
Detektor UV	Agilent, DAD Agilent 1200
Detektor FLD	Agilent, FLD Agilent 1200
Detektor MALS	Wyatt, MiniDawn TREOS
Detektor Corona	ESA, Corona Ultra
Detektor RI	Wyatt, Optilab ReX Agilent, RI Agilent 1200
Detektor dinamičnega sisanja svetlobe	Malvern, Zetasizer APS
Hladna soba 2-8 °C	LTH
HPLC sistem, analitski	Agilent, Agilent 1200
HPLC sistem, preparativni	GE Healthcare, Akta Purifier
Klima komora	Kambič, 190CH Binder KBF-240
Komora z laminarnim pretokom zraka	Iskra PIO, LFU 9
Magnetni mešalnik	Tehnica, Rotamix 560MM
pH meter	Metler Toledo, SevenEasy
Sistem za čiščenje vode	Millipore, Milli-Q Advantage A10
Spektrofotometer	Varian, Cary 5000; Hewlett Packard, Diode Array Spectrofotometer, 8452 A
Sušilnik	Kambič, SP-440C
Tehnica	Mettler Toledo, XP 205DR Mettler Toledo, AX205DR Mettler Toledo, XP56
Termoblok	Biosan, CH-100
Termomikser	Eppendorf, Thermomixer XX Eppendorf, Comfort
Vakuumska črpalka	Millipore, WP6122050
Vibracijski stresalnik	Tehnica, Vibromix 10 Tehnica, Vibromix 31
Zamrzovalna omara -70 ±10 °C	Angelantoni Industrie, Platinum 750V

3.1.2 Dodatna oprema in potrošni material

Preglednica 4: Dodatna oprema in potrošni material
Table 4: Additional equipment and consumables

Tip opreme / potrošnega materiala	Proizvajalec, kataloška številka
Brizge 1 ml	BD Plastipak, REF 300013
Brizge 10 mL	BD Plastipak, REF 302188
Centrifugirke Amicon 10000 MWCO, 15 ml	Millipore, UFC 901024
Centrifugirke, 50 mL	TPP, 91050
Filter za pipetman ACCU-JET, 0,2 µm	Brand, 26530
Filtri Costar SPIN-X, 0,22 µm celuloza acetat	Corning, 8160
Filtri Millex-GV, 0,22 µm PVDF	Millipore, SLGV033RS
Injekcijske igle	BD Plastipak, REF 301155
Filtri za filtracijo raztopin 0,22 µm PES, 1000 mL	Corning, 431098
Filtri za filtracijo raztopin 0,22 µm PES, 250 mL	Corning, 431096
Filtri 0,2 µm Costar Spin-X	Sigma, CLS8162
Filtri Millex-GV, 0,22 µm PVDF	Millipore, SLGV033RS
Kiveta za merjenje UV	Uvette, 952010069
Krioviale 1,0 mL	Nunc, 375353
Mehanska pipeta, 0,5-10 µL	Eppendorf, 3111 000.122
Mehanska pipeta, 2-20 µL	Eppendorf, 3111 000.130
Mehanska pipeta, 10-100 µL	Eppendorf, 3111 000.149
Mehanska pipeta, 20-200 µL	Eppendorf, 3111 000.157
Mehanska pipeta, 100-1000 µL	Eppendorf, 3111 000.165
Mikrotitrskra ploščica	Greiner bio-one, 675801
Nastavki za pipete, 10 µL	Eppendorf, 0030 000.811
Nastavki za pipete, 200 µL	Eppendorf, 0030077.555
Nastavki za pipete, 1000 µL	Eppendorf, 022491253
Nastavki za pipete, 5000 µL	Eppendorf,
Pipetman ACCU-JET	Brand, 26400
Pipeta, avtomatska	Eppendorf,
Polipropilenske viale za HPLC, 300 µL	Waters, 2639550640 Waters, 186002639
Polipropilenske viale 0,5 mL	Eppendorf, 022431005
Polipropilenske viale 2,0 mL	Eppendorf, 0030108.132
Polipropilenske viale 1,5 mL	Eppendorf, 022431081 Eppendorf, 0030108.11
Polipropilenske centrifugirne enote, 15 mL	Sigma, CLS430791
Razsoljevalne kolone PD-10	GE Healthcare, 17-0851-01
Sterilne pipete, 5 mL	TPP, 94005
Sterilne pipete, 10 mL	TPP, 94010
Viale za HPLC-pokrovčki	Waters, 186 000305

3.1.3 Kromatografske kolone in nosilci

Preglednica 5: Kromatografski nosilec za preparativno kromatografijo
Table 5: Chromatographic matrix for preparative chromatography

Kromatografski nosilec	Vrsta kromatografije	Proizvajalec, kataloška številka
Kromatografski nosilec	SP Sepharose HP	GE Healthcare, 17-1087-01
Kromatografska kolona	XK 26/40	GE Healthcare, 28-9889-49

Preglednica 6: Kromatografske kolone za analitsko kromatografijo
Table 6: Chromatographic columns for analytical chromatography

Kromatografska kolona	Vrsta kromatografije	Proizvajalec, kataloška številka
Asahipak ES-502N 7C	AE-HPLC	Shodex, 090311
YMC-Pack ODS-AQ	RP-HPLC	YMC, AQ20S03-1546WT
Discovery BIO Wide	RP-HPLC	Supelco Analytical, 567205-U
TSK-Gel G3000 SWXL	SE-HPLC	Tosoh Bioscience, 08541
TSK-Gel G4000 SWXL	SE-HPLC	Tosoh Bioscience, 08542
TSK-Gel SP-NPR	CE-HPLC	Tosoh Bioscience, 13076
Ultrahydrogel 500	SE-HPLC	Waters, WAT 011530
Ultrahydrogel 250	SE-HPLC	Waters, WAT 011525

3.1.4 Reagenti

Preglednica 7: Reagenti
Table 7: Reagents

Reagent	Proizvajalec, kataloška številka
Acetonitril	J.T.Baker, 8143
BSA	Sigma, A-7906
CH ₃ COOH	Fluka, 45731
CH ₃ COONa	Sigma-Aldrich, S7670
CH ₅ NO ₂	Fluka, 17843
DTNB, 5,5-dithiobis(2-nitro-benzoic acid), Ellmanov reagent	Sigma, D8130
DMSO	Sigma, D8418
Etanol	Sigma, 33209
Fluorescein SAMSA	Invitrogen, A685
H ₂ O ₂	Sigma, H1009
HCl	Merck, 100319
Izoaminofluorescein	Aldrich, 201626
K ₂ HPO ₄	Sigma, P3786

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 7: Reagenti

Reagent	Proizvajalec, kataloška številka
L-metionin	Merck, 1057070100
Metanol	Merck, 106007
MPA, Merkaptopropionska kislina	Aldrich, M5801
NaCNBH ₃	Fluka, 71435
NaCl	Sigma, S-9888
Na ₂ HPO ₄	Sigma, S-9763
NaH ₂ PO ₄	Sigma, S-9638
NaOH	Sigma, S-5881
NH ₄ OH	Merck, 105432
PABA	Sigma, A9878
Polietilen glikol 4 kDa	Agilent, PL2070-7001
Polietilen glikol 13 kDa	Agilent, PL2071-0001
Polietilen oksid 30 kDa	Agilent, PL2083-2001
Polietilen oksid 70 kDa	Agilent, PL2083-4001
Propilen glikol	Sigma, 82280
Sorbitol	Sigma, S-0900
6-aminofluorescein	Fluka, 07985
TCEP, imobiliziran	Pierce, 0077712
TFA, Trifluoroocetna kislina	Sigma, T6508
Tris	Sigma, T-1503
Tween-80	Sigma-Aldrich, P1754
10 kDa linearni PEG CHO	NOF, ME-100AL
20 kDa linearni PEG CHO	NOF, ME-200AL
30 kDa linearni PEG CHO	NOF, ME-300AL
40 kDa linearni PEG CHO	Chirotech, 008-005
45 kDa razvejani PEG CHO	NOF, GL3-400AL2
60 kDa linearni PEG CHO	Chirotech, 008-037
5 kDa PEG NHS	NOF, ME-050HS
20 kDa PEG NHS	NOF, MEGC-20TS NOF, ME-200HS
20 kDa PEG MAL	NOF, ME-200MA

3.1.5 Raztopine in pufri

Preglednica 8: Raztopine in pufri
Tabela 8: Solutions and buffers

Raztopina / pufer	Sestava
Raztopine za oksidacijo in deamidacijo:	
R _{ox} 1	50 mg/ml L-metionin
R _{ox} 2	3% H ₂ O ₂
R _{deam}	5 mM Tris
Raztopine za osnovno karakterizacijo reagentov PEG:	
P _{derivatizacija CHO/PABA}	200 mM Na-fosfat pH 4,5
P _{derivatizacija NHS/PABA}	25 mM Na-fosfat pH 8
P _{derivatizacija NHS/6-aminofluorescein}	20 mM Na-fosfat pH 7,5
P _{derivatizacija NHS/Izoaminofluorescein}	20 mM Borat, 140 mM NaCl pH 9
P _{derivatizacija NHS/PABA_DMSO}	20 mM Na-fosfat, 150 mM NaCl pH 7
P _{derivatizacija MAL/DTNB}	50 mM Na-fosfat, 150 mM NaCl pH 7
P _{derivatizacija MAL/Fluorescein_SAMSA}	20 mM Na-fosfat pH 7
MFA _{RPC_1}	50% ACN
MFB _{RPC_1}	95% ACN
MFA _{RPC_2}	50% ACN, 0,1% TFA
MFB _{RPC_2}	95% ACN, 0,1% TFA
Raztopine in pufri za analitsko kromatografijo 30 kDa reagentov PEG:	
P _{RPC PEG A}	10% ACN, 0,1% TFA
P _{RPC PEG B}	90% ACN, 0,1% TFA
P _{PdI}	100 mM Na-acetat, pH 5,2
P _{TA}	1,5 mM CH ₃ NO ₂ , pH 8,0
P _{TA 1}	0,1 M, CH ₃ COOH/C ₂ H ₃ NaO ₂ , pH 4,0
P _{TA 2}	40 mg/ml PABA v metanolu
P _{TA 3}	10 mg/ml NaBH ₃ CN v prečiščeni vodi
Raztopine in pufri za analitsko kromatografijo konjugatov:	
P _{P1, P2, P3}	10 mM CH ₃ COOH/NaOH, 5% sorbitol, pH 3,4
P _{30 kDa-G-CSF}	10 mM CH ₃ COOH/NaOH, 5% sorbitol, pH 4,0
P _{RPC A}	10% ACN, 0,1% TFA
P _{RPC B}	90% ACN, 0,1% TFA
P _{CEC A}	25 mM CH ₃ COOH/NaOH, pH 4,5
P _{CEC B}	25 mM CH ₃ COOH/NaOH, 150 mM NaCl, pH 4,5
P _{SEC}	20 mM NaH ₂ PO ₄ /NaOH, 150 mM NaCl, 2% ACN, 1% polietilenglikol, pH 6,4
Raztopina BSA	10 mg/ml v P _{SEC}

3.1.6 Izhodni protein in reagenti polietilen glikol za pripravo konjugatov

Preglednica 9: Izhodni protein za pripravo konjugatov
Table 9: Incoming protein for conjugation

Protein	Koncentracija [mg/ml]	Opis
rhG-CSF	4,1	Humani rekombinantni G-CSF, proizveden v bakteriji <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>). Priprava je opisana v referencah (Menart in sod., 2004; Jevševar in sod., 2005, 2010; Gaberc in Menart, 2009)

Preglednica 10: Reagenti PEG za pripravo konjugatov
Table 10: PEG reagents for conjugation

Reagent PEG	Velikost	Proizvajalec
PEG 1		Proizvajalec 1
PEG 2	30 kDa	Proizvajalec 2
PEG 3		Proizvajalec 3

3.2 METODE

3.2.1 Osnovna karakterizacija reagentov polietilen glikola

Derivatizacija aldehidnih reagentov (CHO) s PABA

Za derivatizacijo aldehidnih reagentov PEG s para-aminobenzojsko kislino (PABA) smo prilagodili postopek opisan v Meyer in sod. (2001).

30 kDa aldehidni reagent PEG smo raztopili v pufru $P_{\text{derivatizacija CHO/PABA}}$ v koncentraciji 100 mg/mL in ga v razmerju 1:1 zmešali z derivatizacijskim reagentom: 10 mg/mL NaCNBH₃; 0,35 M PABA v pufru $P_{\text{derivatizacija CHO/PABA}}$, 50% ACN (v/v). Pripravili smo tudi slepi in kontrolni vzorec. Za slepi vzorec smo namesto reagenta PEG derivatizacijskemu reagentu dodali samo pufer $P_{\text{derivatizacija CHO/PABA}}$. Za kontrolni vzorec smo raztopini reagenta PEG namesto derivatizacijskega reagenta dodali samo pufer $P_{\text{derivatizacija CHO/PABA}}$, 50% ACN (v/v). Vzorce smo inkubirali 1 uro na 60 °C v termobloku. Analizo smo izvedli pri pogojih opisanih v poglavju 3.2.6.1.

Derivatizacija reagentov NHS s PABA

- NHS/PABA poskus #1

Za prvi poskus derivatizacije PEG-NHS s PABA smo prilagodili postopek derivatizacije PEG-CHO s PABA.

20 kDa reagent PEG-NHS smo raztopili v pufru $P_{\text{derivatizacija}} \text{NHS/PABA}$ v koncentraciji 100 mg/mL mL in ga v razmerju 1:1 zmešali z derivatizacijskim reagentom: 0,35 M PABA v $P_{\text{derivatizacija}} \text{NHS/PABA}$, 50% ACN (v/v). Pripravili smo tudi slepi in kontrolni vzorec. Za slepi vzorec smo namesto reagenta PEG derivatizacijskemu reagentu dodali samo pufer $P_{\text{derivatizacija}} \text{NHS/PABA}$. Za kontrolni vzorec smo raztopini reagenta PEG namesto derivatizacijskega reagenta dodali samo samo pufer $P_{\text{derivatizacija}} \text{NHS/PABA}$, 50% ACN (v/v). Vzorce smo inkubirali 1 uro in testirali različne temperature: sobno temperaturo, 40 °C in 60 °C. Za 40 °C in 60 °C smo vzorce inkubirali v termobloku. Pred analizo z RP-HPLC smo vzorce 10× redčili z $\text{MFA}_{\text{RPC}_1}$. Na kromatografsko kolono smo injicirali 50 µL. Na detektorju UV smo spremljali absorbanco pri absorpcijskem vrhu PABA, 303 nm.

- NHS/PABA poskus #2

Za poskus optimizacije derivatizacije PEG-NHS s PABA smo uporabili krajši reagent PEG in derivatizacijo izvedli v DMSO.

7,5 mg 5 kDa reagenta PEG-NHS smo raztopili direktno v derivatizacijskem reagentu: 5 mg/mL PABA v DMSO. Del tako pripravljeni derivatizacijske mešanice smo inkubirali preko noči na stresalniku na sobni temperaturi. Drugemu delu derivatizacijske mešanice pa smo pred inkubacijo dodali še $P_{\text{derivatizacija}} \text{NHS/PABA}_\text{DMSO}$ v razmerju 8:1 (800 µL derivatizacijske mešanice + 100 µL boratnega pufra) in nato inkubirali preko noči na stresalniku na sobni temperaturi. Pred analizo z RP-HPLC vzorcev nismo redčili. Na kromatografsko kolono smo injicirali 2 µL vzorcev. Na detektorju UV smo spremljali absorbanco pri absorpcijskem vrhu PABA, 303 nm.

Derivatizacija reagentov NHS s 6-aminofluoresceinom

6-aminofluorescein smo raztopili v pufru $P_{\text{derivatizacija}} \text{NHS/6-aminofluorescein}$ v koncentraciji približno 0,4 mg/mL in tako pripravljeni derivatizacijski reagent prefiltrirali skozi 0,2 µm filter. 20 kDa reagent PEG-NHS smo raztopili direktno v derivatizacijskem reagentu v končni koncentraciji 14 mg/mL. Kot kontrolni vzorec smo pripravili raztopino reagenta PEG v pufru. Vzorce smo inkubirali 3 ure na sobni temperaturi in jih nato analizirali z RP-HPLC. Na kolono smo nanesli 2 µL derivatizacijske mešanice. Spremljali smo fluorescenco pri 495 / 520 nm in absorbanco pri 215 nm.

Derivatizacija reagentov NHS z izoaminofluoresceinom

Pripravili smo nasičeno raztopino izoaminofluoresceina v pufru $P_{\text{derivatizacija}} \text{NHS/Izoaminofluorescein}$: 8 mg izoaminofluoresceina smo raztopili v 2 mL pufra in neraztopljeni del odfiltrirali s filtrom 0,22 µm. V tako pripravljen derivatizacijski reagent smo raztopili 20 kDa PEG-NHS v končni koncentraciji 10 mg/mL. Spleti vzorec je bila nasičena raztopina derivatizacijskega reagenta. Kontrolni vzorec je bila raztopina PEG-NHS v pufru. Vzorce smo inkubirali eno uro na sobni temperaturi s stresanjem. Po inkubaciji smo vzorce analizirali z RP-HPLC, nanesli smo po 2 µL vzorcev. Spremljali smo fluorescenco pri 495 / 520 nm in absorbanco pri 215 nm.

Derivatizacija maleimidnih reagentov (MAL) z merkaptopropionsko kislino

20 kDa reagent PEG-MAL smo raztopili v vodi Milli-Q v koncentraciji 15 mg/mL. 400 µL raztopljenega reagenta PEG smo dodali 2 µL merkaptopropionske kisline (MPA) ter derivatizacijsko mešanico 4 ure stresali na sobni temperaturi. Za slepi vzorec smo 400 µL vode Milli-Q dodali 2 µL merkaptopropionske kisline. Za kontrolni vzorec smo pripravili vodno raztopino reagenta PEG (15 mg/mL). Slepi in kontrolni vzorec smo inkubirali enako kot derivatizacijsko mešanico. Vzorce smo analizirali z RP-HPLC. Pred analizo vzorcev nismo redčili. Na kromatografsko kolono smo injicirali 2 µL vzorcev. Spremljali smo fluorescenco pri 495 / 520 nm in absorbanco pri 215 nm.

Derivatizacija maleimidnih reagentov (MAL) z DTNB

20 kDa reagent PEG-MAL smo raztopili v pufru $P_{\text{derivatizacija MAL/DTNB}}$ v koncentraciji 20 mg/mL. 250 µL suspenzije TCEP smo dvakrat sprali s pufrom in nato približno 125 µL oborine dodali 500 µL pufra. Pripravili smo raztopino DTNB (Ellmanov reagent), 10 mg/mL, v mešanici pufer : ACN = 2:1. Nato smo suspenziji TCEP dodali 200 µL DTNB, mešanica se je obarvala intenzivno rumeno. Mešanico TCEP/DTNB smo centrifugirali in kot derivatizacijski reagent uporabili supernatant. Za derivatizacijo smo zmešali 100 µL raztopine PEG-MAL in 50 µL derivatizacijskega reagenta. Za kontrolni vzorec smo zmešali 100 µL raztpine PEG-MAL in 50 µL raztopine DTNB. Pripravili smo dva slepa vzorca, kjer smo namesto raztopine PEG MAL zmešali 100 µL pufra in 50 µL DTNB oziroma 50 µL derivatizacijskega reagenta. Vzorce smo inkubirali 30 minut na sobni temperaturi in nato analizirali z RP-HPLC. Spremljali smo absorbanco pri 215 nm in absorbanco pri absorpcijskem vrhu DTNB, 320 nm.

Derivatizacija maleimidnih reagentov (MAL) s fluoresceinom SAMSA

1,8 mg fluoresceina SAMSA smo raztopili v 180 µL 0,1 M NaOH in razapljali 15 minut. Mešanico smo nato nevtralizirali z 2 µL 6 M HCl. Ob tem se je fluorescein oboril, končni pH raztopine je bil približno 4. Reagent PEG-MAL smo raztopili v pufru $P_{\text{derivatizacija MAL/Fluorescein_SAMSA}}$ v koncentraciji 10 mg/mL. 690 µL raztopine PEG smo zmešali s celotnim volumnom raztopljenega derivatizacijskega reagenta. Kot kontrolni vzorec smo pripravili raztopino PEG-MAL v pufru. Kot slepi vzorec smo pripravili raztopino derivatizacijskega reagenta. Vzorce smo inkubirali 3 ure na sobni temperaturi in jih nato analizirali z RP-HPLC. Na kolono smo nanesli 2 µL vzorcev. Spremljali smo fluorescenco pri 495 / 520 nm in absorbanco pri 215 nm.

3.2.1.1 Analize RP-HPLC derivatiziranih reagentov polietilen glikola

Analizo RP-HPLC derivatiziranih aldehidnih reagentov (CHO) s PABA smo izvedli pri pogojih, opisanih v poglavju 3.2.6.1.

Analize RP-HPLC vseh ostalih derivatizacij smo izvedli na koloni YMC-Pack ODS-AQ z mobilnima fazama MFA_{RPC_1} in MFB_{RPC_1} (derivatizacija NHS/PABA) oziroma MFA_{RPC_2} in MFB_{RPC_2} (vse ostale derivatizacije). Ločitev je potekala s 30 minutnim gradientom mobilnih faz pri pretoku 1 ml/min.

Gradient je prikazan v preglednici 11. Redčenje vzorcev, nanos na kolono in valovne dolžine detekcije so opisani pri opisu posamezne derivatizacije.

Preglednica 11: Gradient metode RP-HPLC za analize derivatiziranih vzorcev PEG
Table 11: RP-HPLC method gradient for the analysis of derivatized PEG samples

Čas [min]	Odstotek MFB [%]
0,0	8
4,0	8
19,0	28
19,1	100
21,0	100
21,1	8
30,0	8

3.2.1.2 Analize reagentov PEG različnih velikosti

Linearne aldehidne reagente PEG velikosti 10 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa in 60 kDa ter aldehidni razvejani reagent PEG velikosti 45 kDa smo raztopili v pufru P_{Pdl} v koncentraciji 100 mg/mL. Pred analizani smo jih redčili $10 \times$ v P_{Pdl} za analizo SE-HPLC z detektorjem MALS oziroma v 10% ACN za analizo RP-HPLC z detektorjem Corona.

Analizo RP-HPLC z detektorjem Corona smo izvedli pri pogojih, opisanih v poglavju 3.2.6.1. Testirali smo 30 µg, 60 µg in 100 µg nanos na kolono.

Analizo SE-HPLC z detektorjem MALS smo izvedli pri pogojih, opisanih v poglavju 3.2.6.3., le da smo uporabili drugo mobilno fazo. Uporabili smo mobilno fazo P_{Pdl} . Testirali smo 40 µg, 60 µg, 100 µg, 200 µg in 500 µg nanos na kolono.

3.2.2 Priprava konjugatov

V laboratorijskem merilu smo pripravili tri konjugate PEG-G-CSF (P1, P2 in P3) po prilagojenem postopku Kinstler in sod. (1999) ter Molineux (2004). Izvedli smo N-terminalno pegilacijo filgrastima (rhG-CSF) s trem različnimi reagenti PEG velikosti 30 kDa. Reakcija je potekala v kislem pH preko noči s prebitkom reagenta PEG in pod reducirajočimi pogoji, zaradi prisotnosti $NaCNBH_3$. Po končani inkubaciji smo monopegiliran rhG-CSF izolirali s kationsko izmenjevalno kromatografijo. Uporabili smo kolono z nosilcem SP Sepharose HP. Frakcije, ki so vsebovale monopegilirano obliko rhG-CSF, smo združili in nadaljevali pripravo konjugatov z zamenjavo pufra, koncentriranjem in sterilno filtracijo. Koncentrirane vzorce smo sterilno filtrirali in jih v laminarju alikvotirali v sterilne viale.

Vsebnost konjugatov smo določili spektrofotometrično po postopku opisanem v poglavju 3.2.7.1. Rezultati za vsebnost konjugatov so prikazani v preglednici 12.

Preglednica 12: Vsebnost konjugatov 30 kDa PEG-G-CSF
Table 12: Content of 30 kDa PEG-G-CSF conjugates

Konjugat (PEG-G-SCF)	Vsebnost [mg/ml]
P1	16,6
P2	15,0
P3	14,1

3.2.3 Priprava končnih vzorcev

Priprava končnih vzorcev je potekala v komori z laminarnim pretokom zraka z uporabo sterilne opreme oziroma pribora. Plastične dele opreme, ki je prišla v stik z vzorci, smo temeljito oprali, sprali z vodo Milli-Q in posušili v sušilniku pri 60 °C. Zapakirali smo jih v sterilizacijske vrečke in avtoklavirali (15 minut, 121 °C).

Vzorce smo pripravili iz konjugatov 30 kDa PEG-G-CSF (poglavje 3.2.2), ki so bili do priprave hranjeni na temperaturi 5±3 °C. V 15 ml centrifugirnih enotah smo vzorce 30 kDa PEG-G-CSF (P1, P2, P3) redčili s pufrom P_{P1, P2, P3}, ki smo ga predhodno sterilno filtrirali, na koncentracijo 5 mg/ml. Iz redčine vzorcev 30 kDa PEG-G-CSF smo nato pripravili analitske alikvote. V 1 ml kriovialo smo razdelili po 250 µl vzorca P1, P2, P3. Alikvote vzorcev smo do analiz hranili pri temperaturi -70±10 °C, z izjemo alikvotov, ki smo jih namenili testu stabilnosti (poglavje 3.2.4). Po en alikvot vsakega konjugata smo hranili pri temperaturi 5±3 °C.

3.2.4 Stabilnost

Vpliv temperature

Testirali smo temperaturno stabilnost pripravljenih konjugatov 30 kDa-PEG-G-CSF. Stabilitetni plan je podrobnejše opisan v preglednici 13 (pogoji hranjenja in točke testiranja).

Kontrolni vzorec vzorcev P1, P2 in P3 predstavlja vzorec v točki 0 testiranja (t_0), ki smo ga takoj po pripravi hranili pri temperaturi -70±10 °C.

Preglednica 13: Pogoji hranjenja in točke testiranja vzorcev P1, P2 in P3

Table 13: Storage conditions and stability testing points of samples P1, P2 and P3

Točka testiranja [teden]	Pogoji hranjenja			
	-70±10 °C	5±3 °C	25±2 °C / 60±5 RH	40±2 °C / 75±5 RH
0	x	n.a.	n.a.	n.a.
1	n.a.	x	x	x
2	n.a.	x	x	x
4	n.a.	x	x	x
7	n.a.	x	x	x

x ... izvedba točke testiranja (odvzem s pogojev hranjenja); n.a. ... ni aplikativno

Za vsako neodvisno točko testiranja smo iz predvidenih pogojev hranjenja (Preglednica 13) odvzeli obe viali vzorcev P1, P2 in P3 in vzorce prenesli na temperaturo -70 ± 10 °C. Vzorce, namenjene testu stabilnosti, smo do karakterizacijskih analiz hranili pri temperaturi -70 ± 10 °C. Za takšen pristop smo se odločili z namenom testiranja vseh vzorcev znotraj iste analize in posledično učinkovitejše primerjave rezultatov. Izjema so vzorci odvzeti s pogojev hranjenja po sedmih tednih, saj smo le-te analizirali takoj, brez predhodnega hranjenja pri temperaturi -70 ± 10 °C.

Vpliv oksidacije

Filgrastim, rhG-CSF, vsebuje štiri aminokisline metionin (Met1, Met122, Met127 in Met138). Tri so naravno prisotne, medtem ko je dodatna aminokislina metionin na N-koncu (Met1) posledica izražanja v bakteriji *E.coli*. Posledično je protein občutljiv na oksidativni stres, ki vodi v razgradnjo proteina. Oksidacijo proteina povzroči koncentracija peroksida od 0,3 – 3% (Reubaet J. L. E. in sod., 1998; Roge in sod., 2013; Brümmmer, 2011).

Za preverjanje stabilnosti konjugatov 30 kDa PEG-G-CSF pri pogojih, ki povzročajo oksidacijo, smo uporabili 3% raztopino vodikovega peroksida (H_2O_2). Vzorce P1, P2 in P3 s koncentracijo 2 mg/ml smo redčili z raztopino H_2O_2 v razmerju 15:1. Po končani inkubaciji (2 uri na sobni temperaturi) smo reakcijo oksidacije prekinili z raztopino metionina. Vzorcem smo dodali isto količino raztopine metionina s koncentracijo 50 mg/ml kot smo dodali raztopine H_2O_2 . Vzorce smo do analize z metodo RP-HPLC hranili pri temperaturi 5 ± 3 °C.

3.2.5 Princip delovanja uporabljenih analitskih metod

Za karakterizacijo 30 kDa reagentov PEG in njihovih proteinskih konjugatov smo uporabili kromatografske separacijske metode, ki so nam omogočile ločitev posameznih komponent v vzorcu na osnovi razlik v fizikalno-kemijskih lastnostih. Analize smo izvedli na sistemih HPLC Agilent z uporabo različnih detektorjev (UV tipa DAD, FLD, Corona, RI in MALS). Za vrednotenje rezultatov smo uporabili računalniški program Empower 3 in Astra VI v primeru določanja molekulske mase. Rezultate za čistost ozziroma nečistote smo na podlagi posnetih kromatogramov vrednotili kot relativni površinski odstotek (Enačba 1).

$$rel. površinski \% = \frac{100 \times Površina_{vrha}}{\sum Površin_{vseh\ vrhov}} \quad \dots (1)$$

Proteinskim konjugatom smo spektrofotometrično izmerili vsebnost in hidrodinamski radij z metodo dinamičnega sisanja svetlobe.

3.2.5.1 Reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Pri metodi RP-HPLC se komponente vzorca porazdelijo med stacionarno in mobilno fazo na osnovi razlik v hidrofobnosti. Stacionarna fazo predstavlja organosiloksanska porozna površina, kot mobilna faza pa se uporablja mešanica vode ali vodnega pufra in organskega topila, najpogosteje metanola, acetonitrila ali tetrahidrofurana. Iz kolone se prej eluirajo bolj hidrofilne (polarne) molekule in nato bolj hidrofobne, saj so manj polarne se bolj intenzivno porazdelijo v stacionarno fazo. RP-HPLC metodo lahko uporabljamo za določanje prisotnih sorodnih snovi in nečistot, za analizo peptidnih fragmentov, za potrjevanje istovetnosti ter določanje vsebnosti (Kočevan in sod., 2007).

3.2.5.2 Gelska kromatografija

Gelska ali izključitvena kromatografija (SE-HPLC), pri kateri uporabljamo organske mobilne faze, ločuje molekule na osnovi njihove velikosti in/ali oblik. Kromatografska kolona je napolnjena s stacionarno fazo, ki je zamrežen polimer v obliki gela s točno definirano velikostjo por, ponavadi dekstran, agarosa, poliakrilamid ali polistiren. Velikost por kolone definira območje velikosti delcev, ki se bodo ločevali. Največje molekule ne morejo prehajati v pore nosilca, zato tudi potujejo hitreje. Manjše molekule pa vstopajo v inertne pore nosilca in se zato eluirajo kasneje kot večje molekule. Izključitveno kromatografijo uporabljamo za ločevanje molekul različnih velikosti, razsoljevanje vzorcev, določanje molekulske mase in določanje porazdelitve velikosti molekul analita (Herron in sod., 1995; Holthuis in Driebergen, 1995; Kočevan in sod., 2007).

Detekcija MALS se večinoma uporablja v kombinaciji z metodo SE-HPLC za določanje molekulske mase. Njena glavna prednost je, da je metoda absolutna in posledično ne potrebuje kalibracijskih standardov. MALS je metoda statičnega sisanja svetlobe, kjer vzorec presvetimo s primarnim žarkom svetlobe in z detektorjem detektiramo kotno odvisnost intenzitete svetlobe. Je najbolj razširjena metoda za ugotavljanje absolutne porazdelitve molekulske mase ter za ugotavljanje povprečne molekulske mase polimerov in proteinov. Visoka občutljivost detektorja omogoča določanje molekulske mase agregatom z nizko koncentracijo. Za izvedbo analize potrebujemo sistem HPLC in dva zaporedno vezana detektorja. MALS in RI. Detektor MALS zazna statično sisanje svetlobe pri različnih kotih in meri razliko v intenziteti vpadane in sipane svetlobe. Za topljence v raztopini s statičnim sisanjem svetlobe lahko določimo absolutno molekulsko maso, premer molekule in drugi virialni koeficient, ki opisuje topnost molekule v raztopini. Detektor RI pa zazna razliko v lomnem količniku med referenčno celico, napolnjeno z mobilno fazo in merilno celico skozi katero potuje vzorec. Ko je svetloba v interakciji s snovjo, povzroči polarizacijo nabojev. Več je prostih elektronov, večje je sisanje svetlobe in bolj polarizabilna molekula bolj sipa svetlogo. Polarizabilnost je povezana z lomnim količnikom in je za topljence izražena kot povečanje specifičnega lomnega količnika dn/dc (n =lomni količnik, c =koncentracija). Količnik dn/dc je konstanten za posamezne razrede molekul, spreminja pa se v različnih raztopinah. Iz odziva RI dobimo koncentracijo vzorca. Na podlagi intenzitete sisanja in koncentracije vzorca računalniški program izračuna molekulsko maso vzorca ob poznavanju vrednosti. Konstantna vrednost dn/dc za proteine je 0,185 in za reagente PEG 0,140 (Čerkić, 2012).

Sipanje je odvisno od velikosti molekul. Molekule, večje od 10 nm, svetlobo sipajo anizotropno, sipanje je pri različnih kotih različno. Molekule manjše od 10 nm pa svetlobo sipajo izotropno, enakomerno v vse smeri. Posledično je določanje premera molekule možno v razponu velikosti topljencev od 10 do 50 nm. Pod 10 nm premera ne moremo meriti, še vedno pa lahko določimo absolutno molekulsko maso.

Metoda SE-HPLC se lahko poleg detektorja MALS uporablja tudi v kombinaciji z detektorjem RI. Takšen princip delovanja se na primer uporablja za določanje indeksa polidisperznosti. Indeks polidisperznosti se uporablja za določanje širine porazdelitve molekulskih mas in je definiran kot:

$$PdI = \frac{M_w}{M_n} \quad \dots (2)$$

M_w utežna molekuljska masa; M_n številčna molekuljska masa

Večji kot je PDI, širša je porazdelitev molekulskih mas in obratno. Polidisperznost 1 pomeni, da imajo vse molekule v vzorcu identično velikost in da je vzorec monodisperzen.

3.2.5.3 Ionsko izmenjevalna kromatografija

Ločevanje molekul z ionsko izmenjevalno kromatografijo temelji na elektrostatskih interacijah med molekulami z nasprotnimi naboji. Stacionarna fazo predstavlja osnovni matriks (agaroza, celuloza, dekstran) na katerega so kovalentno vezani ionski izmenjevalci (anionski, kationski), ki na svoji površini nosijo skupine z nabojem. Glede na vrsto ionskega izmenjevalca ločimo tudi anionsko (AE-HPLC) in kationsko kromatografijo (CE-HPLC). Na negativno nabite skupine kationsko-izmenjevalnega matriksa se vežejo proteini s pozitivnim celokupnim naboljem. Na pozitivno nabite skupine anionskega-izmenjevalca se vežejo proteini z negativnim celokupnim naboljem. Celokupni nabolj proteinov je odvisen od vrednosti pH. V kislem pride do protoniranja amino skupine, v bazičnem pa do disociacije karboksilne skupine. Pri vrednosti pH, kjer je celokupni nabolj nič, ima protein izoelektrično točko (pI). Protein ima negativni celokupni nabolj pri pH vrednostih pufra višjih od pI in pozitivni celokupni nabolj pri pH vrednostih pufra nižjih od pI (Holthuis in Driebergen, 1995; Kočevar in sod., 2007).

3.2.5.4 UV-absorpcijska spektrofotometrija

Pri absorpcijski spektrofotometriji merimo absorbanco pri različnih valovnih dolžinah ultravijoličnega (UV) spektra (380-10 nm) (Kočevar in sod., 2007). Absorbanca pri 280 nm je specifična za proteine. V bližini te valovne dolžine so absorpcijski vrhovi aromatskih aminokislín tirozin (274 nm) in triptofan (278 nm), prispevek fenilalanina je manjši zaradi nizkega ekstinkcijskega koeficiente in bolj oddaljenega absorpcijskega vrha (258 nm). Absorbanca je sorazmerna koncentraciji in ob upoštevanju ekstinkcijskega koeficiente molekule, ki jo merimo, lahko izračunamo koncentracijo proteina.

3.2.5.5 Dinamično sisanje svetlobe

Z metodo dinamičnega sisanja svetlobe (DLS) preučujemo dinamične lastnosti delcev v raztopini. Metodo imenujemo tudi fotonska korelacijska spektroskopija (ang. *PCS, Photon Correlation Spectroscopy*) ali kvazi-elastično sisanje svetlobe (ang. *QELS, Quasi-Elastic Light Scattering*). Z metodo DLS smo proteinskim konjugatom določili hidrodinamski radij ter polidisperznost. Meritve smo izvedli z napravo DynaPro in rezultate vrednostili z računalniškim programom Zetasizer APS.

Pomanjkljivosti metode so nizka resolucija, nezmožnost ločevanja med monomeri in dimeri kot tudi težje ločevanje med oligomeri in agregati. Prav tako so za zanesljive meritve potrebne višje koncentracije vzorca. Metodo najpogosteje uporabljamo za ugotavljanje velikosti delcev med 3 in 3000 nm v raztopinah proteinov, nanodelcev, v koloidnih raztopinah, tekočih kristalih, gelih, emulzijah in polimerih. Pod kotom 90° se meri časovna odvisnost nihanja intenzitete sisanja svetlobe skozi raztopino vzorca. Nihanje intenzitete se opiše s korelacijsko funkcijo, ki opiše, kako dolgo je signal koreliran. Korelacijska funkcija z linearno časovno osjo pada približno eksponentno, na logaritemski časovni skali pa ima sigmoidno obliko. Hitrost difuzije delca v raztopini je povezana z njegovo velikostjo: difuzija večjih delcev je počasnejša. Prevoj sigmoidne krivulje določa difuzijski koeficient, širina pa je povezana s polidisperznostjo.

Iz difuzijskega koeficiente, viskoznosti topila in temperature, pri kateri izvajamo meritve, program po Stokes-Einsteinovi enačbi (enačba 4) izračuna hidrodinamski radij (R_h) delcev:

$$R_h = \frac{k_b T}{6\pi\eta D_t} \quad \dots (3)$$

R_h : hidrodinamski radij, k_b : Boltzmannova konstanta, T : temperatura, η : viskoznost topila, D_t : difuzijski koeficient.

R_h je povprečje več meritvev in predstavlja vrednost, ki nam pove kako delec v raztopini difundira. Poleg R_h smo ocenili tudi polidisperznost (PD%). PD% je relativni standardni odklon od povprečja izmerjenih R_h vrhov v vzorcu. V splošnem velja, da imajo monodisperzni vzorci PD% pod 20%, polidisperzni pa nad 30%. Rezultati so podani kot odstotek intenzitete signala. Delci z večjo molekulsko maso (na primer agregati) imajo večje sisanje in zato večji odstotek intenzitete, vendar dejansko predstavljajo manjši odstotek mase. Rezultate posameznih populacij v vzorcu zato ponavadi preračunamo na odstotek mase v vzorcu (Fidler, 2011; Čerkić, 2012).

3.2.6 Analitske metode za karakterizacijo reagentov polietilen glikola

3.2.6.1 Metoda RP-HPLC

Z metodo RP-HPLC smo 30 kDa reagentom PEG določili čistost oziroma nečistote. Z namenom določanja tako reaktivnih kot neaktivnih nečistot smo uporabili dva tipa detekcije, ki sta nam to razlikovanje omogočila.

- Detekcija UV

Z uporabo detekcije UV smo reagentom določili reaktivne nečistote. Ker so reagenti PEG UV transparentni jih je bilo potrebno predhodno ustrezno modificirati. Izvedli smo postopek derivatizacije reagentov s PABA opisan v poglavju 3.2.1. S PABA označen PEG ločimo od ostalih reaktivnih nečistot na osnovi razlik v hidrofobnosti. Na detektorju UV smo spremljali absorbanco pri absorpcijskem vrhu PABA, 303 nm.

- Detekcija Corona

Detektor Corona deluje na principu aerosola z nabojem in omogoča detektiranje v neodvisnosti od kemijske strukture molekule. Z uporabo le-tega smo reagentom PEG določili vsoto vseh nečistot, reaktivnih in neaktivnih, kar je tudi njegova prednost.

Analizo smo izvedli na koloni Discovery BIO Wide. Kot mobilni fazi smo uporabili vodni raztopini acetonitrila z dodatkom kisline TFA. Ločitev je potekala s 30 minutnim gradientom mobilnih faz $P_{RPC\text{ PEG A}}$ in $P_{RPC\text{ PEG B}}$ pri pretoku 1 ml/min. Gradient je prikazan v preglednici 14. Pred analizo smo vzorce 10-krat redčili z mobilno fazo $P_{RPC\text{ PEG A}}$. Na kolono smo nanesli 40 µg vzorca.

Preglednica 14: Gradient metode RP-HPLC

Table 14: RP-HPLC method gradient

Čas [min]	Odstotek $P_{RPC\text{ B}}$ [%]
0,0	54
5,0	54
20,0	66
20,1	100
25,0	100
25,1	54
30,0	54

3.2.6.2 Metoda AE-HPLC

Z metodo AE-HPLC smo reagentom PEG določili delež aktivnega reagenta oziroma terminalno aktivnost (TA). Uporabili smo detektor RI, ki omogoča ločevanje molekul na osnovi razlik v lomnem količniku (refrakcijskem indeksu-RI). Reagenti PEG, ki smo jih karakterizirali in uporabili za pripravo proteinskih konjugatov, so aktivirani s funkcionalno skupino CHO, ki je tudi njihova glavna komponenta. Poleg glavne komponente vsebuje reagent PEG tudi nečistote (neaktivne, reaktivne in neaktivni reagent PEG). Za določanje terminalne aktivnosti smo reagente PEG označili s PABA, saj se PABA veže na molekulo PEG le preko aktivne funkcionalne skupine. Na osnovi razlik v lomnem količniku ločimo delež aktivnega reagenta PEG, torej tistega, ki ima vezano PABA oziroma aktivno funkcionalno skupino, od ostalih nečistot.

Reagente PEG smo označili s PABA po nekoliko prilagojenem postopku, ki ga navaja Meyer in sod. (2001). Raztopili smo jih v P_{TA} 1 na koncentracijo 10 mg/ml ter dodali raztopini P_{TA} 3 in P_{TA} 2. Vzorce smo inkubirali približno dve uri pri temperaturi 75 °C. Po končani inkubaciji smo vzorce očistili z uporabo PD-10 kolon.

Za analizo smo uporabili šibko anionsko kolono in mobilno fazo P_{TA} . Ločitev je potekala z izokratsko elucijo.

3.2.6.3 Metoda SE-HPLC

Določanje polidisperznosti

Z metodo SE-HPLC in detektorjem RI smo reagentom PEG določili indeks polidisperznosti (Pdl) in molekulsko maso.

Z redčenjem v mobilni fazi P_{Pdl} smo pripravili mešanico standardov. Vzorce PEG smo raztopili v mobilni fazi P_{Pdl} . Analizo smo izvedli na dveh zaporedno vezanih kolonah Ultrahydrogel 500 in Ultrahydrogel 250. Analiza je potekala izokratsko z mobilno fazo P_{Pdl} . Polidisperznost reagentov PEG smo določili s pomočjo umeritvene krivulje standardov.

Določanje molekulske mase

Analizo SE-HPLC smo izvedli na koloni TSK-Gel G4000 SWXL. Uporabili smo mobilno fazo P_{SEC} in izokratsko metodo. Sočasno smo izvedli dva tipa detekcije:

- Detekcija MALS

Reagentom PEG smo določili molekulsko maso z analizo SE-HPLC in detektorjem MALS. Vzorcev nismo redčili, ampak smo prilagodili volumen injiciranja in na kolono nanesli 40 µg vzorca. Poleg vzorcev smo analizirali še raztopino BSA s katero smo umerili detektor MALS. Na kolono smo nanesli 50 µg standardne raztopine BSA. Umerjanje zajema normalizacijo detektorja, poravnavo vrhov in poravnavo širine vrhov. Za detekcijo smo uporabili tri detektorje, UV, MALS in RI. Detektor MALS zazna statično sipanje svetlobe pri treh kotih (45°, 90° in 135°), medtem ko detektor RI da informacijo o koncentraciji vzorca. HPLC sistem je preko detektorja UV povezan s preostalima dvema detektorjema. Vrednotenje rezultatov in izračun molekulskih mas smo izvedli s pomočjo računalniškega programa Astra.

- Detekcija UV

Z uporabo detekcije UV smo reagentom določili nečistote različnih molekulskih mas. Ker so reagenti PEG v območju UV transparentni, jih je bilo potrebno predhodno ustrezno modifcirati. Izvedli smo postopek derivatizacije reagentov s PABA opisan v poglavju 3.2.1. S PABA označen PEG ločimo od ostalih reaktivnih nečistot na osnovi razlik v hidrofobnosti. Na detektorju UV smo spremljali absorbanco pri absorpcijskem vrhu PABA, 303 nm.

3.2.7 Analitske metode za karakterizacijo proteinskih konjugatov

3.2.7.1 UV-absorpcijska spektrofotometrija

Koncentracije proteina filgrastim smo določali na spektrofotometru Varian Cary 5000. Predhodno smo jih redčili s pufrom $P_{30 \text{ kDa-G-CSF}}$ na koncentracijo 0,7-1,0 mg/ml in jih prenesli v kiveto za enkratno uporabo (dolžina optične poti 1 cm). Izmerili smo absorbanco pufra $P_{30 \text{ kDa-G-CSF}}$ in proteinskih konjugatov pri 280 nm in 320 nm. Izvedli smo korekcijo absorbance, tako da smo od absorbance izmerjene pri 280 nm odšteli absorbanco pri 320 nm pri kateri potencialno absorbirajo prisotni proteinski agregati. Iz korigirane absorbance in Beer-Lambertovega zakona smo z upoštevanjem faktorja redčenja in teoretičnega ekstinkcijskega koeficiente za G-CSF ($0,879 \text{ mL/mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) vzorcem določili koncentracijo (Enačba 3).

$$c = \frac{A_{\text{korigirana}}}{l \times \epsilon} \times F \quad \dots (4)$$

- A... absorbanca
- c... koncentracija [mg/ml]
- l... dolžina poti [cm]
- ε... ekstinkcijski koeficient [$\text{mL}/(\text{mg}^*\text{cm})$]
- F... Faktor redčenja

3.2.7.2 Metoda RP-HPLC

Z analizo RP-HPLC in uporabo detekcije FLD smo proteinskim konjugatom določli čistost oziroma sorodnih snovi in nečistot. RP-HPLC metoda omogoča tudi razlikovanje med različnimi strukturnimi oblikami sorodnih snovi in nečistot. Tako smo lahko na osnovi razlik v njihovi hidrofobnosti konjugatom določili delež oksidiranih in delež deamidiranih oblik. Oksidirane oblike (Ox) na kromatogramu predstavljajo vrhovi, ki se eluirajo pred vrhom konjugata. Deamidirane oblike (Deam) pa vrhove, ki se eluirajo za vrhom konjugata.

Analizo smo izvedli na koloni Discovery BIO Wide. Kot mobilni fazi smo uporabili vodni raztopini acetonitrila z dodatkom kisline TFA, $P_{RPC \text{ A}}$ in $P_{RPC \text{ B}}$. Ločitev je potekala 30 minut pri pretoku 1 ml/min in gradientu prikazanem v preglednici 14. Vzorce smo predhodno redčili s pufrom $P_{30 \text{ kDa-G-CSF}}$ na koncentracijo približno 0, 3 mg/ml. Injicirali smo 10 μl vzorca in uporabili detekcijo FLD z ekscitacijsko valovno dolžino 280 nm in emisijsko 345 nm.

3.2.7.3 Metoda CE-HPLC

Z analizo CE-HPLC in uporabo detekcije FLD smo proteinskim konjugatom določli čistost oziroma delež nečistot, ki jih predstavljajo različno pegilirane oblike proteina (na primer multi-pegliran, di-pegliran) in razgradni produkti (na primer deamidirane in oksidirane oblike). Ločevanje poteka na kationskem izmenjevalcu na osnovi razlik v elektrostatskih

interacijah med molekulami z nasprotnimi naboji. Molekule s pozitivnim nabojem se eluirajo prve, in sicer s pomočjo elucijskega pufra, ki ima drugačno ionsko jakost kot vezavni pufer. Konjugiran protein ima pozitivni nabolj in se veže na nosilec pri nižjih vrednostih pH in odstotkih soli. Z naraščanjem vrednosti soli v mobilni fazi pa se eluira.

Analizo smo izvedli po prilagojenem postopku, opisanem v Piedmonte in Treuheit (2008). Uporabili smo kolono TSK-Gel SP-NPR z mobilnima fazama $P_{CEC\ A}$ in $P_{CEC\ B}$. Ločitev je potekala pri pretoku 1,5 ml/min in 30 minutnem gradientu prikazanem v preglednici 15. Vzorce smo predhodno redčili s puferom $P_{30\ kDa\text{-G-CSF}}$ na koncentracijo približno 0,3 mg/ml. Injicirali smo 10 µl vzorca in uporabili detekcijo FLD z ekscitacijsko valovno dolžino 280 nm in emisijsko 345 nm.

Preglednica 15: Gradient metode CE-HPLC za analizo proteinskih konjugatov

Table 15: CE-HPLC method gradient for analysis of protein conjugates

Čas [min]	Odstotek $P_{CEC\ B}$ [%]
0,0	0
5,0	0
20,0	70
25,0	100
27,0	100
27,1	0
30,0	0

3.2.7.4 Metoda SE-HPLC

Z metodo SE-HPLC smo na osnovi razlik v velikosti molekul proteinskim konjugatom določili čistost oziroma delež sorodnih snovi (oligomeri, topni agregati, rhG-CSF). Z uporabo detekcije FLD smo določili delež snovi z večjo molekulske maso (HMW) in snovi z manjšo molekulske maso (LMW). Na kromatogramu predstavljajo HMW vrhovi, ki se eluirajo pred vrhom konjugata in LMW vrhovi, ki se eluirajo za njim. Uporaba detekcije MALS pa nam je omogočila določitev njihove molekulske mase.

- Detekcija FLD

Analizo smo izvedli po prilagojenem postopku, opisanem v Piedmonte in Treuheit (2008). Uporabili smo kolono TSK-Gel G3000 SWXL. Uporabili smo mobilno fazo P_{SEC} in 25 minutno izokratsko metodo s pretokom 0,7 ml/min. Vzorcev nismo redčili, saj lahko redčenje vpliva na detekcijo aggregatov. Volumen injiciranja vzorcev smo prilagodili in na kolono nanesli približno 40 µg vzorca. Uporabili detekcijo FLD z ekscitacijsko valovno dolžino 280 nm in emisijsko 345 nm.

- Detekcija MALS

Analizo SE-HPLC z detektorjem MALS smo izvedli na isti koloni in pri istih pogojih kot analizo z detekcijo FLD. Poleg vzorcev smo analizirali še raztopino BSA s katero smo umerili detektor MALS. Umerjanje zajema normalizacijo detektorja, poravnava vrhov in poravnava širine vrhov. Vzorcev tudi pri tej analizi nismo redčili, ampak smo prilagodili volumen injiciranja. Na kolono smo nanesli približno 40 µg vzorca in 50 µg standardne raztopine BSA. Za detekcijo smo uporabili tri detektorje, UV, MALS in RI. Detektor MALS zazna statično sisanje svetlobe pri treh kotih (45° , 90° in 135°), medtem ko detektor RI poda informacijo o koncentraciji vzorca. HPLC sistem je preko detektorja UV povezan s preostalima dvema detektorjema. Vrednotenje rezultatov in izračun molekulskih mas smo izvedli s pomočjo računalniškega programa Astra .

- Polidisperznost

Z metodo SE-HPLC in detektorjem RI smo konjugatom določili indeks polidisperznosti (PdI) in molekulsko maso. Analizo smo izvedli pri istih pogojih kot pri določanju polidisperznosti 30 kDa reagentom PEG, le da smo predhodno prilagodili nanose konjugatov. To smo storili tako, da smo dobili primerljive odzive med reagenti PEG in konjugati. Le-to smo dosegli pri pri 8 µL nanosu (40 µg nanos konjugatov). Pogoji analize so opisani v poglavju 3.2.6.3.

3.2.7.5 Dinamično sisanje svetlobe

Za meritev DLS predhodna priprava (redčenje) vzorcev ni bila potrebna. Vzorce konjugatov smo pred meritvijo zgolj prefiltrirali skozi 0,22-µm (PVCT) *microwell* filter. Rezultati so povprečje 5 zaporednih meritev vsakega vzorca. Za obdelavo podatkov smo uporabili program Zetasizer (Zetasizer APS).

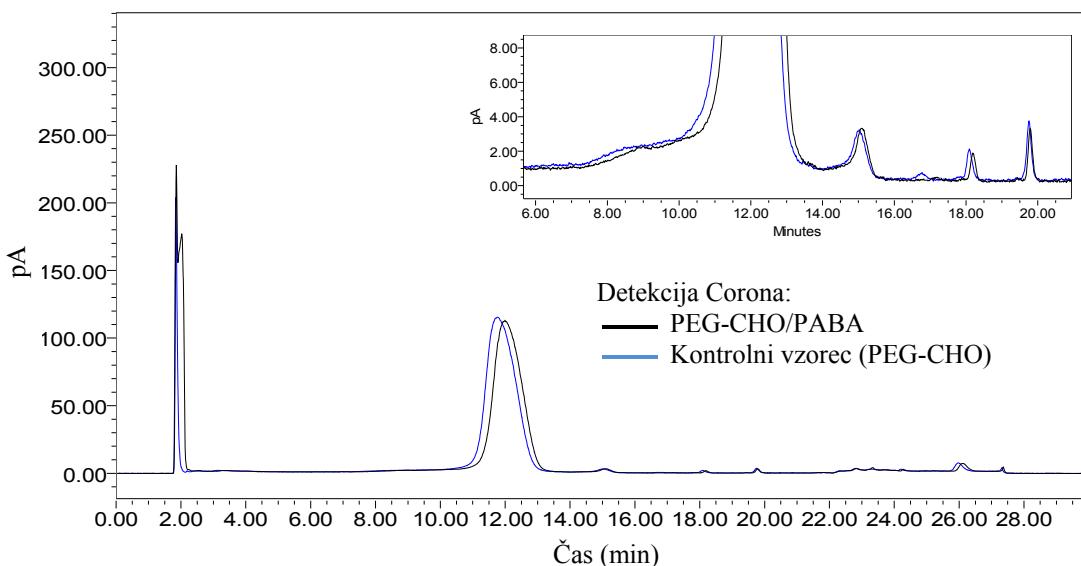
4 REZULTATI

4.1 OSNOVNA KARAKTERIZACIJA REAGENTOV POLIETILEN GLIKOLA

4.1.1 Derivatizacija reagentov polietilen glikola

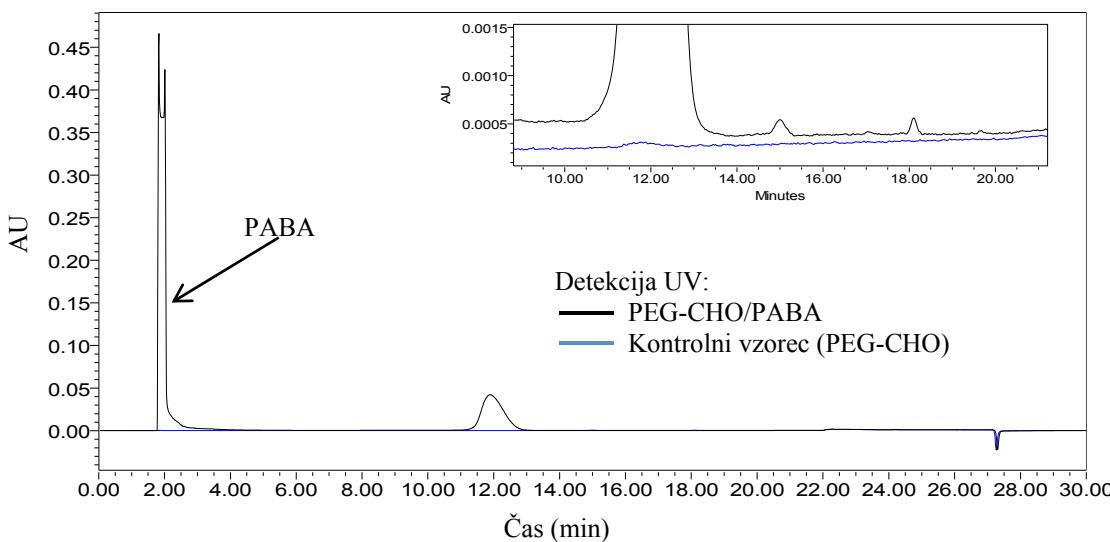
Derivatizacija aldehidnih reagentov (CHO) s PABA

Derivatizirani in kontrolni vzorec smo analizirali z metodo RP-HPLC z detektorjem Corona (detekcija vseh molekul) in UV (detekcija molekul, ki absorbirajo v območju UV). Prikaz kromatogramov na sliki 5 in 6. Na detektorju Corona je bila intenziteta signala za derivatizirani in kontrolni vzorec enaka, kar potrjuje enak nanos vzorcev. Poleg glavnega vrha pri približno 12 min so vidne tri dobro ločene nečistote reagenta PEG, ki se eluirajo pri retensijskih časih približno 15, 18 in 20 minut (Slika 5). Na kromatogramu UV prikazanem na sliki 6 je viden samo derivatizirani vzorec PEG in dve dobro ločeni nečistoti pri retensijskih časih približno 15 in 18 minut.



Slika 5: Derivatizacija reagenta PEG-CHO s PABA - detekcija Corona

Figure 5: Derivatization of PEG-CHO reagent with PABA - Corona detection

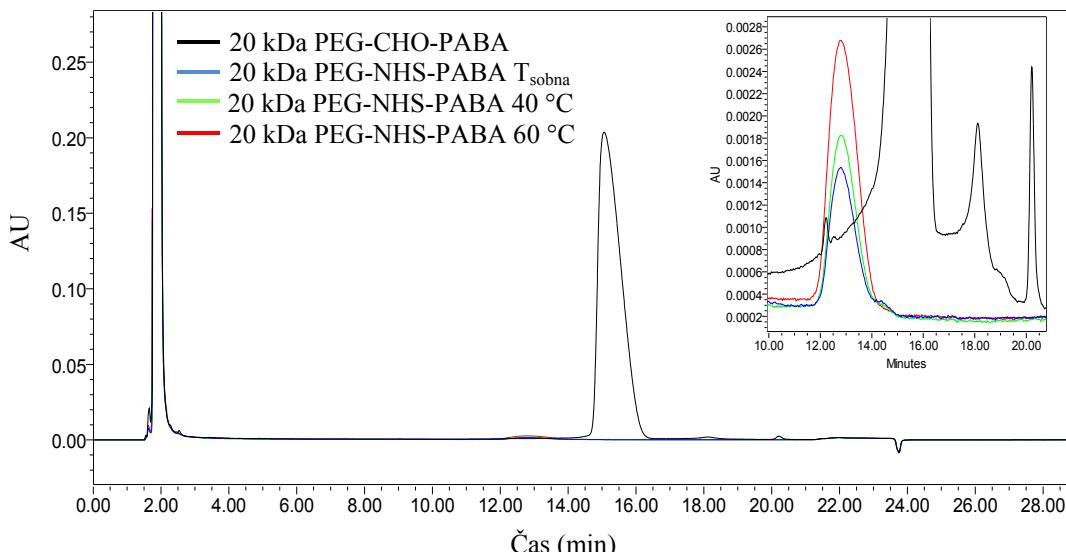


Slika 6: Derivatizacija reagenta PEG-CHO s PABA - detekcija UV
 Figure 6: Derivatization of PEG-CHO reagent with PABA - UV detection

Derivatizacija reagentov NHS s PABA

- NHS/PABA poskus #1

Vzorce smo analizirali z metodo RP-HPLC. Prikaz kromatogramov na sliki 7. V primerjavi z derivatizacijo aldehidnih reagentov je rezultat derivatizacije reagentov NHS s PABA bistveno slabši. Izmed testiranih temperatur derivatizacije (sobna temperatura, 40 °C in 60 °C) je bila intenziteta signala UV pri absorpcijskem vrhu PABA (303 nm) najvišja pri vzorcu, inkubiranem na 60 °C.



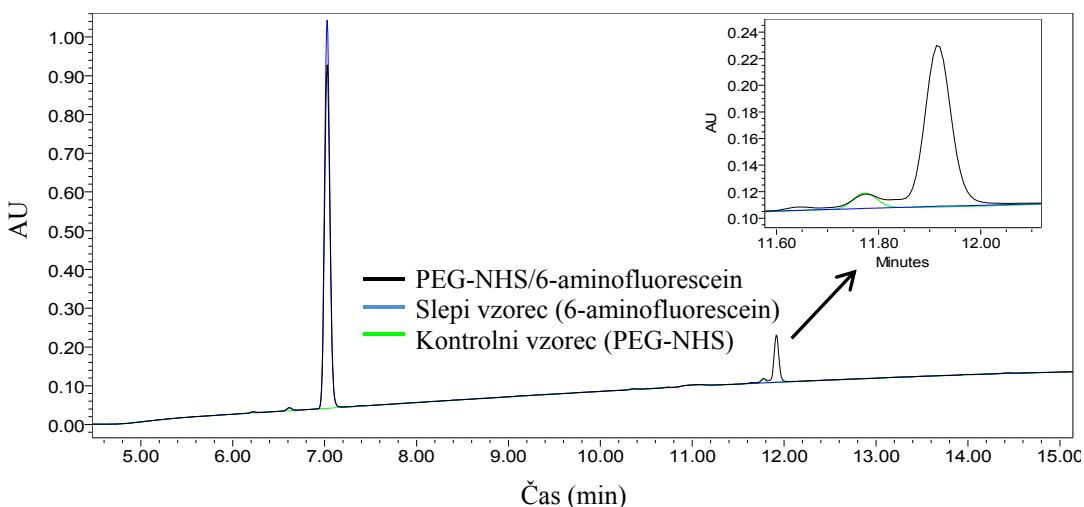
Slika 7: Derivatizacija reagenta PEG-NHS s PABA
 Figure 7: Derivatization of PEG-NHS reagent with PABA

- NHS/PABA poskus #2

Derivatizacija ni bila uspešna, na kromatogramih RP-HPLC z detekcijo UV pri absorpcijskem vrhu PABA (303 nm) nismo zaznali vrhov.

Derivatizacija reagentov NHS s 6-aminofluoresceinom

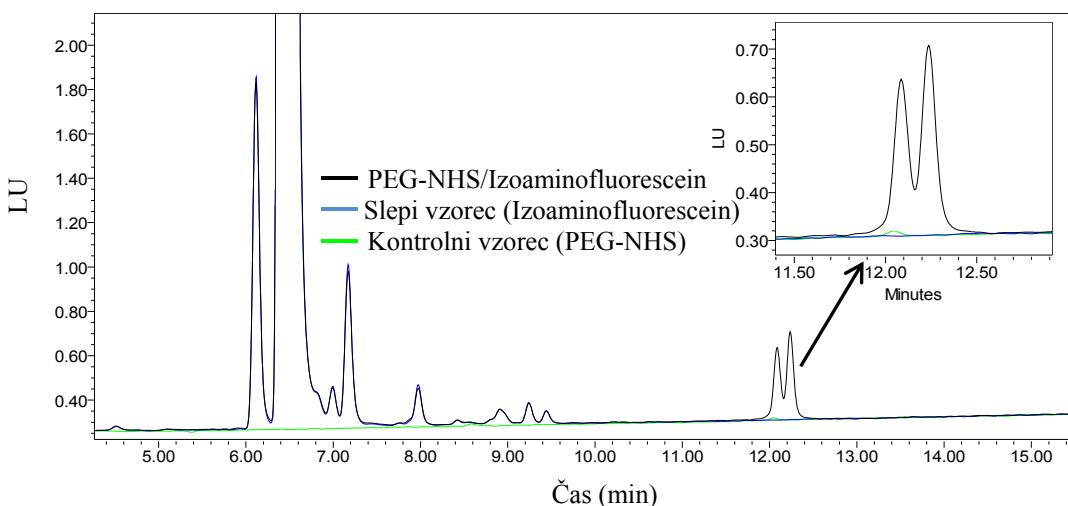
Vzorce smo analizirali z metodo RP-HPLC. Prikaz kromatogramov na sliki 8. Elucijo derivatiziranega PEG-NHS opazimo pri retenzijskem času približno 12 minut.



Slika 8: Derivatizacija reagenta PEG-NHS z 6-aminofluoresceinom
Figure 8: Derivatization of PEG-NHS reagent with 6- amino fluorescein

Derivatizacija reagentov NHS z izoaminofluoresceinom

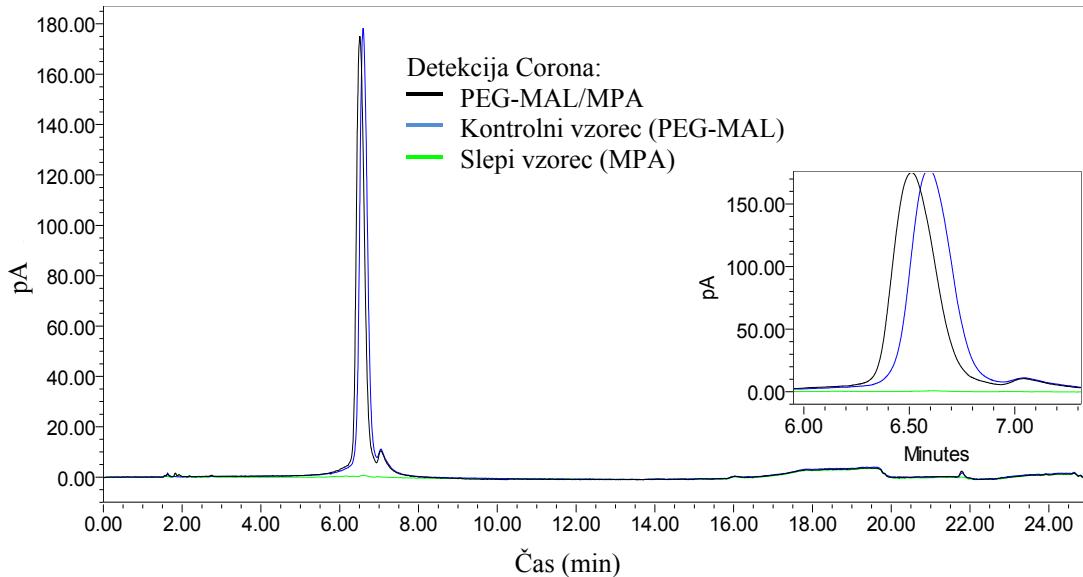
Vzorce smo analizirali z metodo RP-HPLC. Prikaz kromatogramov na sliki 9. Elucijo derivatiziranega PEG-NHS opazimo pri retenzijskem času približno 12 minut.



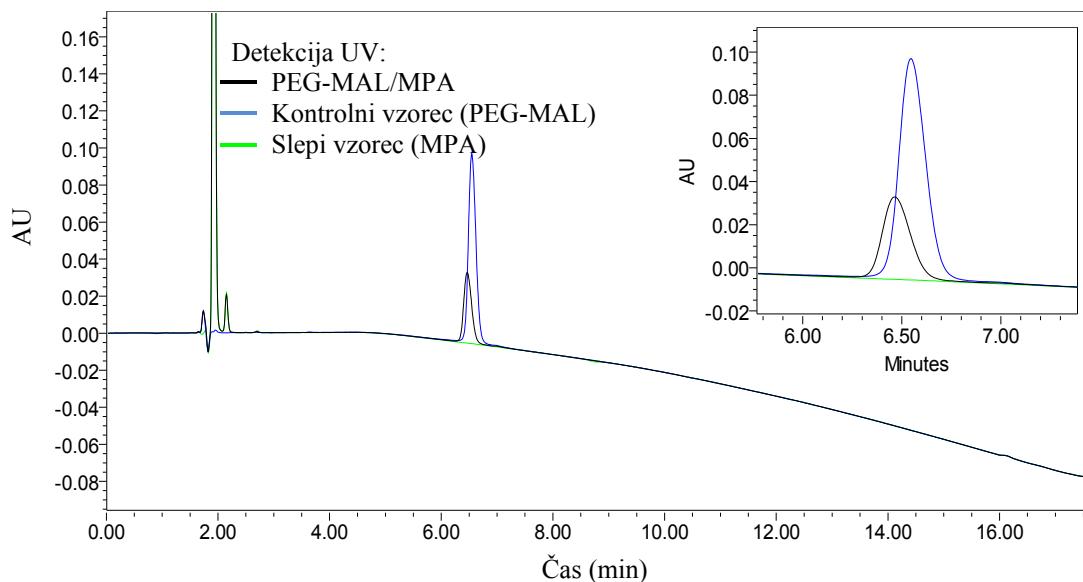
Slika 9: Derivatizacija reagenta PEG-NHS z izoaminofluoresceinom
Figure 9: Derivatization of PEG-NHS reagent with izoaminofluorescein

Derivatizacija maleimidnih reagentov (MAL) z merkaptopropionsko kislino

Derivatizirani in kontrolni vzorec smo analizirali z metodo RP-HPLC z detektorjem UV (detekcija molekul, ki absorbirajo v območju UV) in Corona (detekcija vseh molekul). Prikaz kromatogramov na sliki 10 in 11. Na detektorju Corona je bila intenziteta signala za derivatizirani in kontrolni vzorec enaka, kar potrjuje enak nanos vzorcev (Slika 10). PEG-MAL je viden v UV tudi brez derivatizacije (kontrolni vzorec), derivatiziranemu vzorcu se je absorbanca v UV znižala (Slika 11).



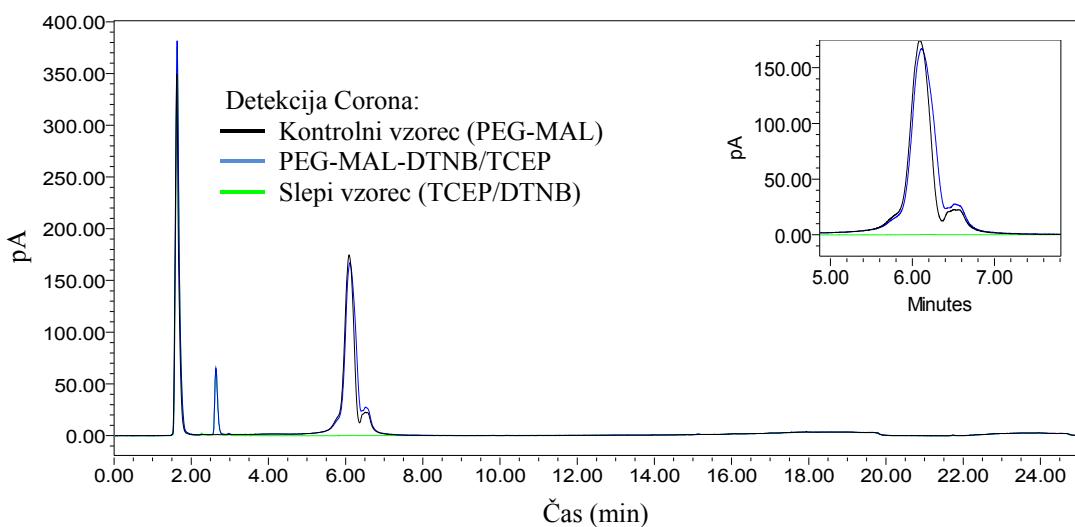
Slika 10: Derivatizacija reagenta PEG-MAL z MPA - detekcija Corona
 Figure 10: Derivatization of PEG-MAL reagent with MPA - Corona detection



Slika 11: Derivatizacija reagenta PEG-MAL z MPA - detekcija UV
 Figure 11: Derivatization of PEG-MAL reagent with MPA - UV detection

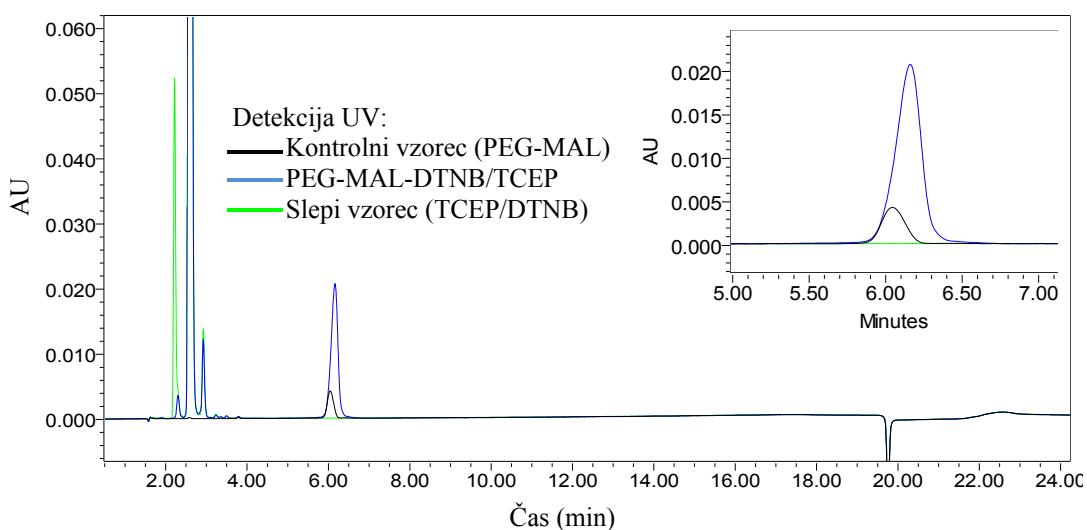
Derivatizacija maleimidnih reagentov (MAL) z DTNB

Vzorce smo analizirali z metodo RP-HPLC z detektorjem UV (detekcija molekul, ki absorbirajo v območju UV) in Corona (detekcija vseh molekul). Prikaz kromatogramov na sliki 12 in 13. Na detektorju Corona je bila intenziteta signala za derivatizirani in kontrolni vzorec enaka, kar potrjuje enak nanos vzorcev (Slika 12). Na detektorju UV pri 320 nm je intenziteta derivatiziranega vzorca večja od intenzitete kontrolnega vzorca, kar pomeni, da se je DTNB uspešno vezal na maleimidno skupino. Tudi kontrolni vzorec pri valovni dolžini 320 nm rahlo absorbira zaradi maleimidne skupine (Slika 13).



Slika 12: Derivatizacija reagenta PEG-MAL z DTNB - detekcija Corona

Figure 12: Derivatization of PEG-MAL reagent with DTNB - Corona detection

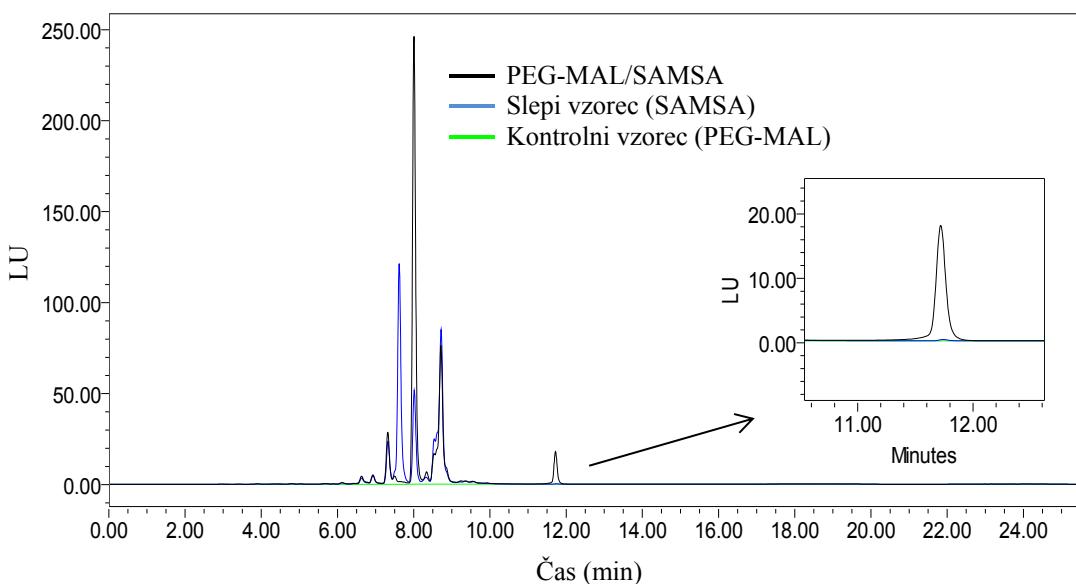


Slika 13: Derivatizacija reagenta PEG-MAL z DTNB - detekcija UV

Figure 13: Derivatization of PEG-MAL reagent with DTNB - UV detection

Derivatizacija maleimidnih reagentov (MAL) s fluoresceinom SAMSA

Vzorce smo analizirali z metodo RP-HPLC. Prikaz kromatogramov na sliki 14. Elucijo derivatiziranega PEG-MAL opazimo pri retenzijskem času približno 12 minut.



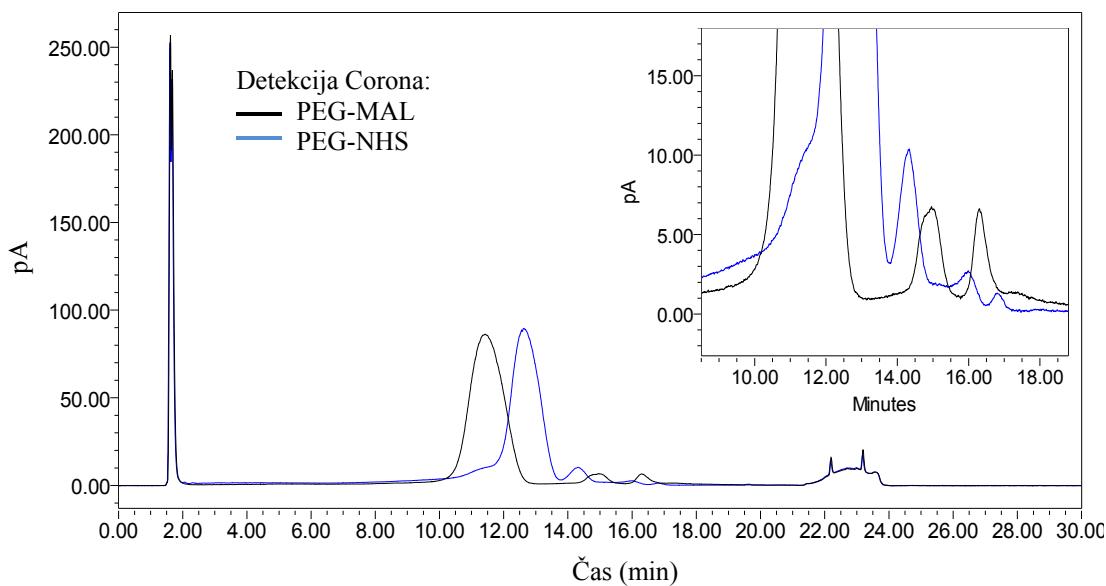
Slika 14: Derivatizacija reagenta PEG-MAL s fluoresceinom SAMSA
Figure 14: Derivatization of PEG-MAL reagent with fluoresceine SMASA

Analiza nederivatiziranih reagentov PEG-NHS in PEG-MAL

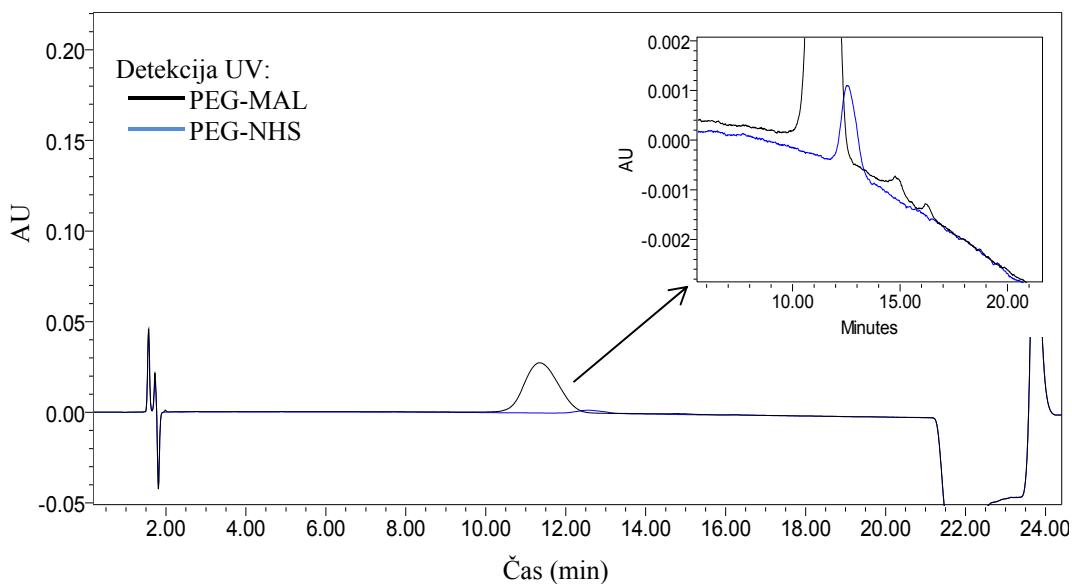
Iz analiz kontrolnih, nederivatiziranih vzorcev PEG-NHS in PEG-MAL je razvidno, da derivatizacija za kontrolo kakovosti reagenta ni potrebna. Funkcionalni skupini absorbirata v območju UV in iz kromatogramov UV (detekcija molekul, ki absorbirajo v območju UV) in Corona (detekcija vseh molekul) lahko neposredno določimo delež celokupnih in delež reaktivnih nečistot.

Nanos reagentov PEG-NHS in PEG-MAL je enak (Sliki 15 in 16). Odziv na detektorju Corona je primerljiv, medtem ko je odziv na detektorju UV za PEG-NHS bistveno slabši kot za PEG-MAL. Vzrok je v hidrolizi aktivne skupine NHS, ki v vodnih raztopinah poteka zelo hitro. Po hidrolizi reagent PEG ni več viden v območju UV.

Tudi velikost obeh reagentov je enaka, 20 kDa. Vzrok za razliko v retenzijskem času je razlika v funkcionalnih skupinah - funkcionalna skupina nekoliko vpliva na jakost vezave na kromatografski nosilec za reverzno fazo.



Slika 15: Analiza RP-HPLC nederivativiranih reagentov PEG-MAL in PEG-NHS - detekcija Corona
 Figure 15: RP-HPLC analysis of underderivatized reagents PEG-MAL and PEG-NHS - Corona detection



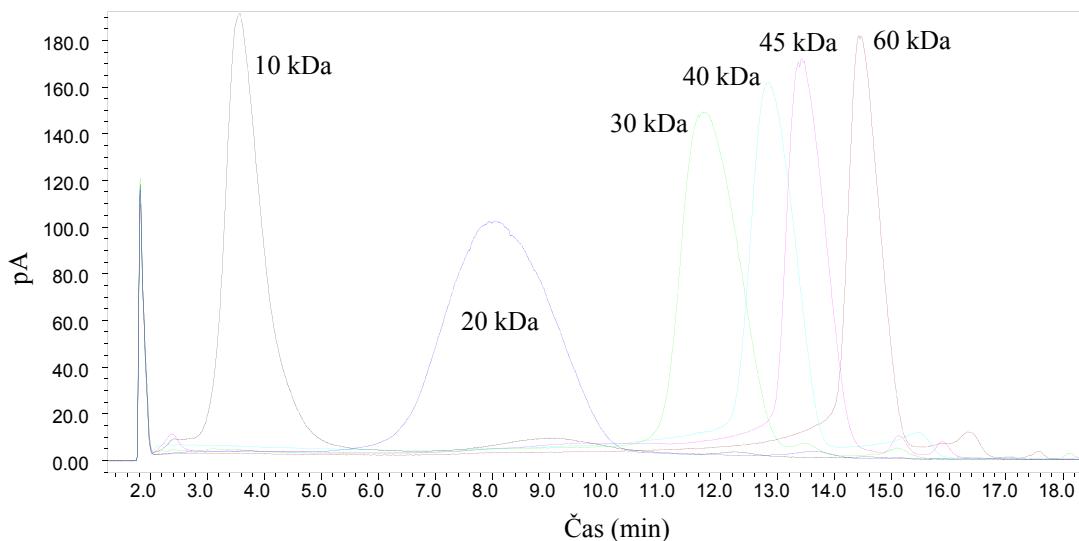
Slika 16: Analiza RP-HPLC nederivativiranih reagentov PEG-MAL in PEG-NHS - detekcija UV
 Figure 16: RP-HPLC analysis of underderivatized reagents PEG-MAL and PEG-NHS - UV detection

4.1.2 Različne velikosti reagentov polietilen glikola

Vsi testirani reagenti so bili linearni, razen razvejanga reagenta velikosti 45 kDa. Razvejanji reagent je sestavljen iz dveh linearnih verig velikosti 20 kDa in povezovalnega dela velikosti 5 kDa.

- Analiza RP-HPLC z detektorjem Corona

Po izvedenem testiranju nanosov smo za obdelavo rezultatov izbrali 60 µg nanos. Pri nižjem nanosu (30 µg) nekaterih nečistot v reagentih nismo dobro zaznali, pri večjem nanosu (100 µg) pa so se signali bližali nasičenosti detektorja. Pri analizi RP-HPLC se reagenti PEG ločijo po hidrofobnosti: najkrajši reagent se eluira najhitreje in najdaljši najpozneje (Slika 17).



Slika 17: Kromatogrammi RP-HPLC-Corona reagentov PEG različnih velikosti
Figure 17: RP-HPLC-Chromatograms of PEG reagents of different sizes

Retenzijski čas ene od nečistot, ki se eluirajo po glavnem vrhu posameznega reagenta, približno ustreza retenzijskemu času dvakrat večjega reagenta (Slika 51 v diskusiji), vendar ujemanje retenzijskih časov ni tako dobro, da bi lahko zagotovo trdili, da gre za PEG dvojne velikosti.

- Analiza SE-HPLC z detektorjem MALS

Za analizo SE-HPLC z uporabo detektorja MALS smo najprej optimizirali nanos na kolono, pri katerem smo za celoten razpon testiranih reagentov dobili ustrezno velik signal sisanja svetlobe. Najprej smo testirali tri različne nanose 30 kDa reagenta PEG, 40 µg, 60 µg in 100 µg. Pri nižjih dveh nanosih je bil signal MALS prešibek za zanesljivo obdelavo podatkov, pri 100 µg nanosu je bil signal že ustrezno velik. V nadaljevanju smo za vse reagente testirali 100 µg, 200 µg in 500 µg nanos. Za optimizacijo nanosa je bil najbolj kritičen 10 kDa reagent PEG, saj večje molekule močneje sipajo svetlobo in ustrezni signal MALS pri reagentih PEG večje velikosti hitreje dosežemo. Ustrezno visok signal MALS smo dosegli že pri 100 µg nanosu 10 kDa reagenta PEG, ovrednotili pa smo vse tri nanose. Pri vseh testiranih reagentih PEG so bili rezultati molekulskih mas primerljivi pri 200 µg in 500 µg nanosih, pri 100 µg pa so nekoliko odstopali (razlika 1-2 kDa). V preglednici 16 podajamo rezultate, izmerjene pri 200 µg nanosih, za razpon testiranih reagentov PEG od 10 kDa do 60 kDa.

Preglednica 16: Molekulske mase reagentov PEG, določene s SE-HPLC-MALS
Table 16: Molecular masses of PEG reagents determined by SE-HPLC-MALS

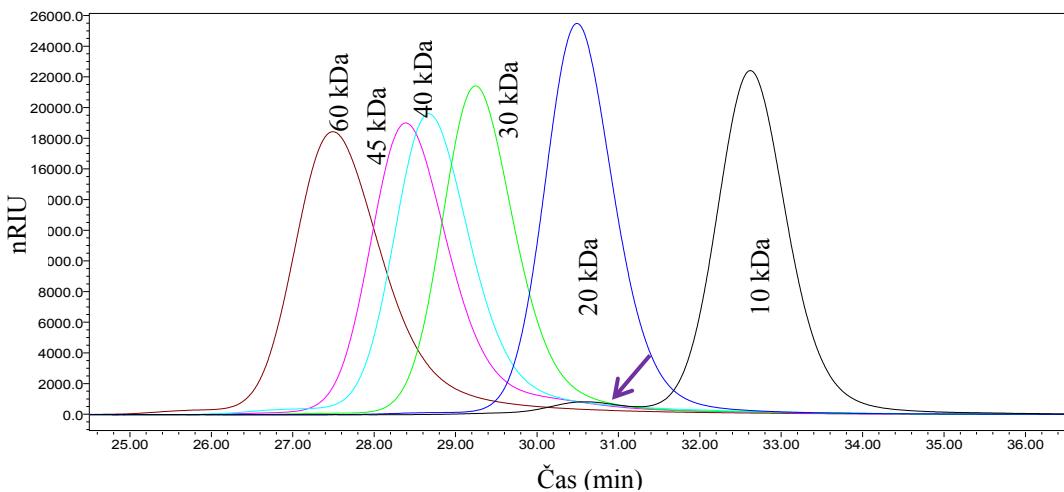
Reagent PEG	Molekulska masa MALS [kDa]
10 kDa	10,1
20 kDa	20,1
30 kDa	30,4
40 kDa	37,3
45 kDa	42,0
60 kDa	56,9

- Analiza SE-HPLC z detektorjem RI

Z uporabo metode SE-HPLC in detektorja RI smo poleg molekulskih mas glavnih vrhov reagentov določili tudi nečistote z višjo molekulsko maso (HMW). Rezultati so prikazani v preglednici 17. Ločba reagentov glede na njihovo molekulsko maso je prikazana na sliki 18. Nečistote z večjo molekulsko maso (za 10 kDa reagent označeno s puščico na sliki 18) po kromatografskem vedenju in izmerjeni masi ustrezajo približno dvakratni velikosti reagenta.

Preglednica 17: Molekulske mase reagentov PEG določene s SE-HPLC-RI
Table 17: Molecular masses of PEG reagents determined by SE-HPLC-RI

Reagent PEG	Molekulska masa RI – glavni vrh [kDa]	Molekulska masa RI – HMW [kDa]
10 kDa	10,3	22,0
20 kDa	21,3	42,2
30 kDa	31,6	65,6
40 kDa	37,4	76,0
45 kDa	40,9	80,2
60 kDa	54,9	112,8



Slika 18: Kromatogrami SE-HPLC-RI reagentov PEG različnih velikosti

Figure 18: SE-HPLC-RI chromatograms of PEG reagents of different sizes

4.2 KARAKTERIZACIJA 30 kDa REAGENTOV POLIETILEN GLIKOLA

Karakterizirali smo 30 kDa reagente PEG (Preglednica 10), ki smo jih uporabili za pripravo konjugatov PEG-G-CSF (P1, P2, P3). Kakovost reagentov PEG smo ocenili z uporabo kromatografskih metod različnih tipov detekcije z namenom določanja vseh nečistot (reaktivnih in neaktivnih) prisotnih v reagentih PEG. Za detekcijo reagentov PEG v območju UV smo le-te modificirali s procesom derivatizacije po postopku opisanem v poglavju 3.2.1.

4.2.1 Analiza RP-HPLC

Z metodo RP-HPLC smo reagentom PEG na osnovi razlik v hidrofobnosti določili čistost z uporabo dveh tipov detekcije:

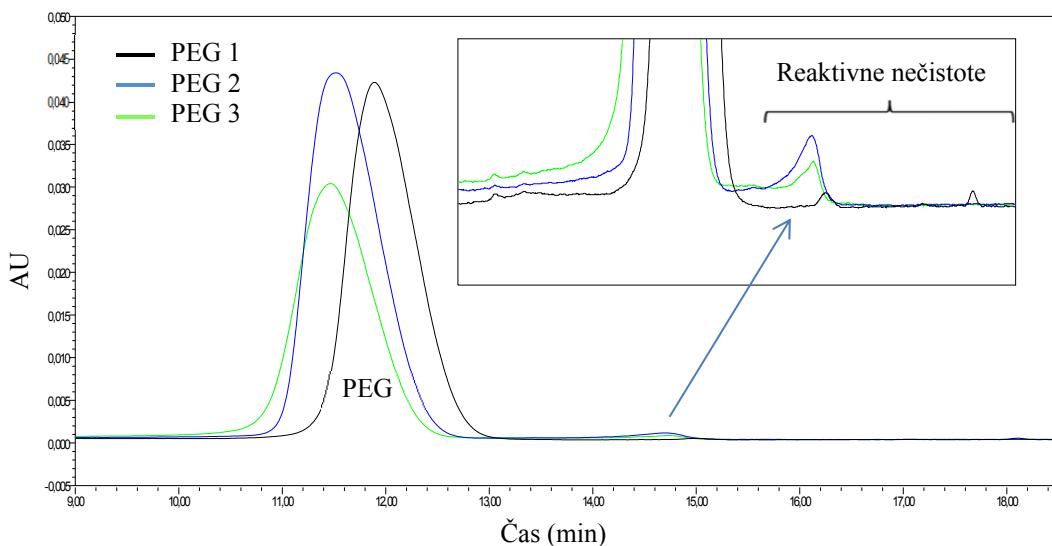
- Detekcija UV

Za detekcijo UV je bilo predhodno potrebno reagente označiti s para-aminobenzojsko kislino (PABA). S PABA označen PEG ločimo od ostalih reaktivnih nečistot na osnovi razlik v hidrofobnosti. Reaktivne nečistote oziroma čistost reagentov je podana v preglednici 18 kot površinski odstotek (relativna površina). Prikaz kromogramov na sliki 19.

Preglednica 18: Reaktivne nečistote in čistost 30 kDa reagentov PEG

Table 18: Reactive impurities and purity of 30 kDa PEG reagents

Reagent PEG	Reaktivne nečistote [%]	Čistost [%]
PEG 1	1,0	99,0
PEG 2	2,3	97,7
PEG 3	3,2	96,8



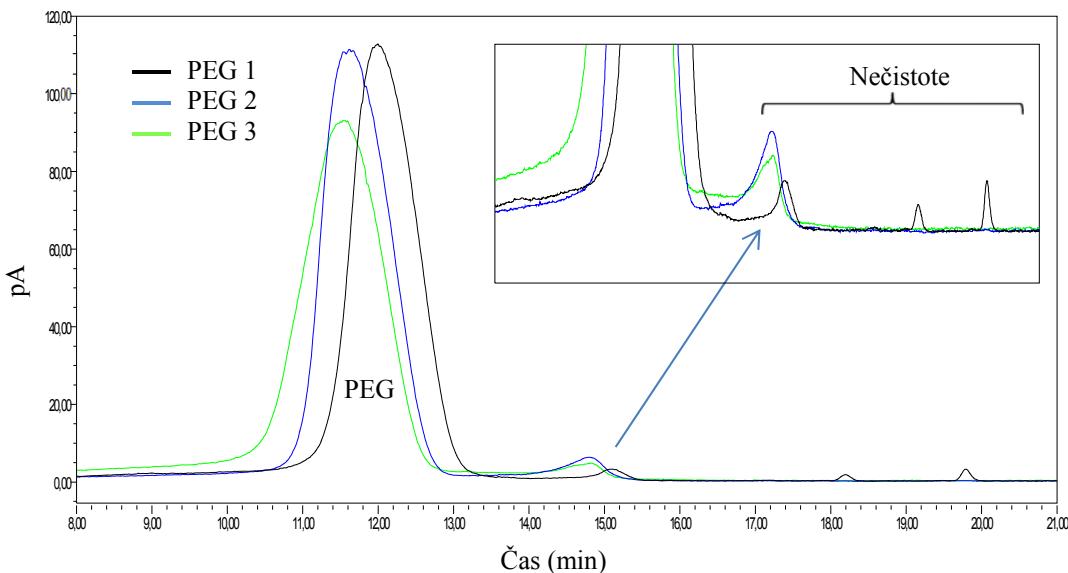
Slika 19: Kromatogrami 30 kDa reagentov PEG posneti z detekcijo UV
Figure 19: Chromatograms of 30 kDa PEG reagents using UV detection

- Detekcija Corona

Z uporabo detektorja Corona smo v reagentih PEG določili vse nečistote, tako reaktivne kot neaktivne. Nečistote oziroma čistost reagentov je podana v preglednici 19 kot površinski odstotek (relativna površina). Prikaz kromatogramov na sliki 20.

Preglednica 19: Nečistote in čistost 30 kDa reagentov PEG
Table 19: Impurities and purity of 30 kDa PEG reagents

Reagent PEG	Nečistote [%]	Čistost [%]
PEG 1	4,5	95,5
PEG 2	6,5	93,5
PEG 3	7,0	93,0



Slika 20: Kromatogrami 30 kDa reagentov PEG posneti z detekcijo Corona
Figure 20: Chromatograms of 30 kDa PEG reagents using Corona detection

Iz kromatogramov (slika 19 in 20) je razvidna razlika v hidrofobnosti analiziranih reagentov PEG. Najbolj hidrofilna je molekula PEG 3, ki ima najkrajši čas elucije, medtem ko je molekula PEG 1 najbolj hidrofobna. Pričakovano smo omenjene razlike v hidrofilnosti oziroma hidrofobnosti sorazmerno določili tudi pri konjugatih PEG-G-CSF, saj lastnosti reagentov PEG direktno vplivajo na lastnosti konjugatov (poglavlje 4.3.3). Prav tako se kromatografski vrh reagenta PEG 3 po obliki nekoliko razlikuje od vrhov reagentov PEG 2 in PEG 1. Vrh reagenta PEG 3 je nižji in širši, kljub temu, da so bili nanosi na kolono vseh treh vzorcev enaki. Takšna oblika nakazuje, da so molekule reagenta PEG 3 manj enakomerno porazdeljene v primerjavi z reagentoma PEG 2 in PEG 1. To potrjujejo tudi rezultati izmerjene polidisperznosti (poglavlje 4.2.3.1).

Na podlagi rezultatov analize RP-HPLC smo ugotovili, da je v reagentu PEG 1 prisotnih najmanj reaktivnih kot tudi najmanj celokupnih nečistot. Sledi mu reagent PEG 2 in nato reagent PEG 3.

4.2.2 Analiza AE-HPLC

Terminalno aktivnost reagentov PEG smo določili z anionsko izmenjevalno kromatografijo (AE-HPLC) na osnovi razlik v lomnem količniku (refrakcijskem indeksu). Predhodno je bilo potrebno reagente PEG označiti s PABA, ki se veže le na aktivno funkcionalno skupino CHO. Rezultat za terminalno aktivnost je ekvivalenten deležu reagenta PEG z aktivno funkcionalno skupino. Terminalna aktivnost reagentov PEG je podana v preglednici 20.

Preglednica 20: Terminalna aktivnost 30 kDa reagentov PEG
Table 20: Terminal activity of 30 kDa PEG reagents

Reagent PEG	Terminalna aktivnost [%]
PEG 1	93
PEG 2	96
PEG 3	78

Reagent PEG 2 ima največji delež aktivnih vezavnih mest oziroma je delež primerljiv med reagentoma PEG 2 in PEG 1. Reagent PEG 3 ima bistveno manj funkcionalnih skupin v primerjavi s preostalima reagentoma.

4.2.3 Analiza SE-HPLC

4.2.3.1 Polidisperznost in molekulska masa (RI)

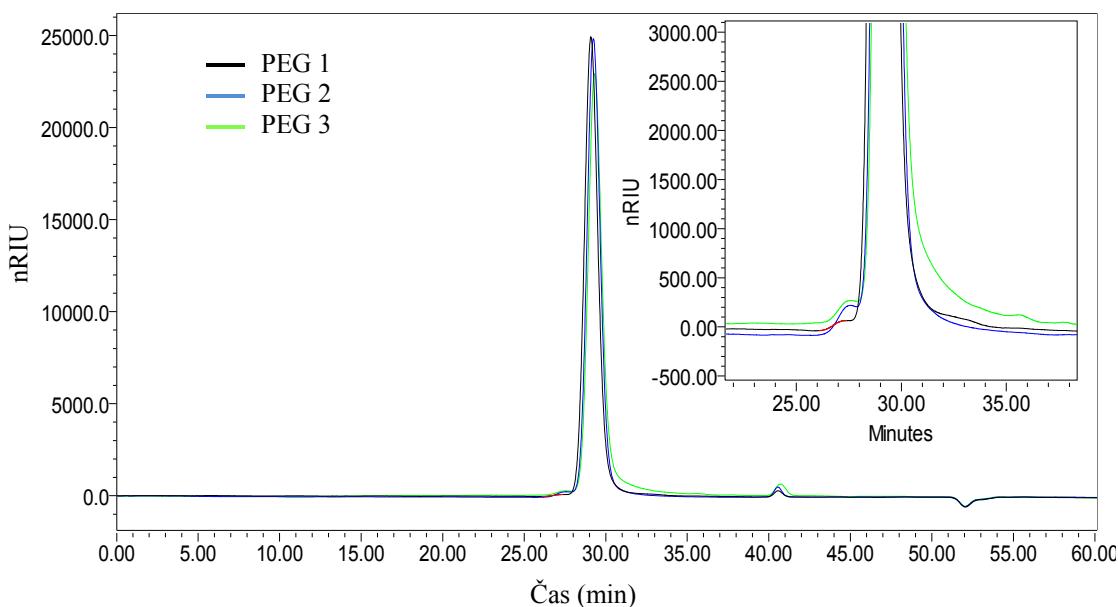
Porazdelitev molekulskih mas (polidisperznost) in molekulske mase reagentov PEG smo določili z metodo SE-HPLC z detektorjem RI s pomočjo umeritvene krivulje standardov. Indeksi polidisperznosti reagentov PEG in molekulske mase so podani v preglednici 21.

Preglednica 21: Polidisperznost in molekulska masa 30 kDa reagentov PEG
Table 21: Polydispersity and molecular weight of 30 kDa PEG reagents

Reagent PEG	Polidisperznost [%]	Molekulska masa (MW) [kDa]
PEG 1	1,04	31,5
PEG 2	1,04	30,0
PEG 3	1,06	28,9

Rezultati polidisperznosti sovpadajo z obliko kromatografskih vrhov reagentov PEG, ki smo jih določili pri analizi RP-HPLC. Kromatografski vrh reagenta PEG 3 je širši v primerjavi z vrhovoma reagenta PEG 1 in PEG 2. Posledično je rezultat za polidisperznost reagenta PEG 3 višji. Oblika kromatografskih vrhov reagenta PEG 1 in PEG 2 je primerljiva (poglavlje 4.2.1) in rezultat za polidisperznost enak.

Prav tako je iz primerjave kromatogramov analize SE-HPLC razvidno, da je kromatografski vrh reagenta PEG 3 širši v primerjavi z reagentoma PEG 1 in PEG 2 (Slika 21).



Slika 21: Kromatogrami reagentov PEG za določanje polidisperznosti

Figure 21: Chromatograms of 30 kDa PEG reagents for determination of polydispersity

4.2.3.2 Molekulska masa (MALS)

- Detekcija MALS

Molekulska maso reagentov PEG smo izmerili na osnovi sisanja svetlobe (detektor MALS) z metodo SE-HPLC. Rezultati so prikazani v preglednici 22. Najvišjo molekulsko maso smo izmerili reagentu PEG 1, sledita mu PEG 2 in PEG 3. Čeprav so absolutne številke meritev s tipom detekcije MALS nekoliko nižje kot s tipom detekcije RI, izmerjene molekulske mase z MALS dobro sovpadajo z rezultati meritev RI.

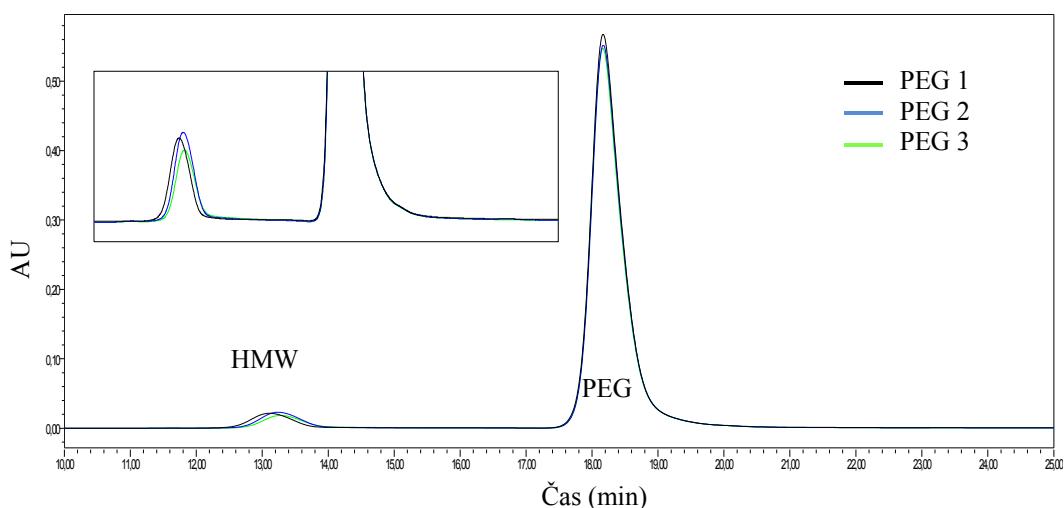
Preglednica 22: Molekulska masa 30 kDa reagentov PEG

Table 22: Molecular mass of 30 kDa PEG reagents

PEG	Molekulska masa [kDa]
PEG 1	30,8
PEG 2	28,9
PEG 3	28,1

- Detekcija UV

Pri analizi za določanje molekulske mase reagentov smo uporabili tudi detekcijo UV, preko katere deluje detektor MALS ter sočasno določili čistost reagentov PEG na podlagi razlik v velikosti molekul. Analizo smo izvedli s PABA označenimi (derivativiranimi) reagenti PEG. Iz kromatogramov vzorcev (Slika 22) in rezultatov (Preglednica 23) je razvidno, da imajo reagenti primerljiv delež snovi z večjo molekulsko maso (HMW).

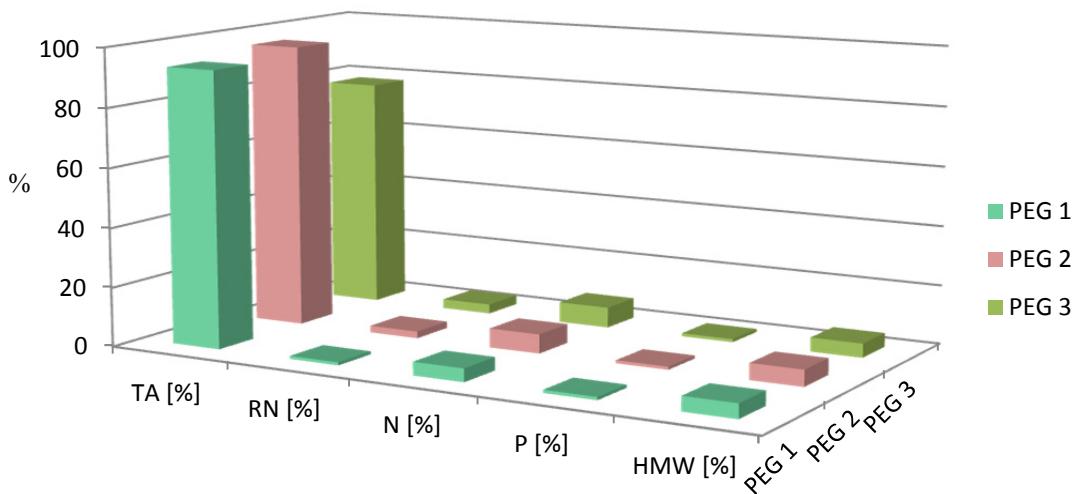


Slika 22: Kromatogrami SE-HPLC 30 kDa reagentov PEG posneti z detekcijo UV
Figure 22: SE-HPLC chromatograms of 30 kDa PEG reagents using UV detection

Preglednica 23: Delež HMW v 30 kDa reagentih PEG
Table 23: Proportion of HMW in 30 kDa PEG reagents

Reagent PEG	HMW [%]
PEG 1	4,9
PEG 2	5,6
PEG 3	4,8

Karakterizacija 30 kDa reagentov PEG (Slika 23) je pokazala, da je v reagentu PEG 1 prisotnih najmanj nečistot, tako reaktivnih kot celokupnih. Zaporedno mu sledita reagenta PEG 2 in PEG 3. Precej nižji rezultat za terminalno aktivnost reagenta PEG 3 izstopa v primerjavi z reagentoma PEG 1 in PEG 2. Slednji ima največji delež aktivnih funkcionalnih skupin, vendar je delež relativno primerljiv med reagentoma PEG 2 in PEG 1. Reagent PEG 3 ima tudi slabšo (t.j. širšo) porazdelitev molekulske mase v primerjavi z reagentoma PEG 1 in PEG 2. Prisotnost snovi z večjo molekulsko maso je nekoliko višja pri reagentu PEG 2 v primerjavi z reagentoma PEG 1 in PEG 3, katerih vrednost je primerljiva. Vključjoč variabilnost analitskih rezultatov lahko zaključimo, da sta reagenta PEG 1 in PEG 2 kakovostno skoraj primerljiva, medtem ko je reagent PEG 3 nekoliko slabše kakovosti. Pretežno je kakovost reagenta PEG 3 slabša, zaradi manjšega deleža aktivnih aldehidnih skupin.



Legenda:

Reaktivne nečistote – RN

Nečistote – N

Polidispersnost – P

Terminalna aktivnost – TA

HMW – Vsota snovi z večjo molekulsko maso

Slika 23: Kakovost 30 kDa reagentov PEG

Figure 23: Quality of 30 kDa PEG reagents

4.3 KARAKTERIZACIJA PROTEINSKIH KONJUGATOV

Karakterizirali smo izhodne pegilacijske mešanice in iz njih izolirane konjugate 30 kDa PEG-G-CSF, v nadaljevanju P1, P2 in P3 (poglavje 3.2.3). Koncentracijo konjugatov smo določili spektrofotometrično, za oceno njihove kakovosti smo primarno uporabili optimirane analitske kromatografske separacijske metode z različnimi tipi detekcije (RP-HPLC, SE-HPLC, SE-HPLC-RI, SE-HPLC-UV/MALS/RI in CE-HPLC). Na osnovi razlik v njihovem delovanju smo konjugatom določili vrsto in količino prisotnih nečistot. Dodatno smo izvedli še določanje hidrodinamskega radija z analizo DLS. Vzorci konjugatov so bili do analiz hranjeni pri temperaturi 5 ± 3 °C.

4.3.1 Optimizacija metod

Analitske metode, ki smo jih uporabili za karakterizacijo konjugatov P1, P2 in P3, smo predhodno optimirali. Prilagodili smo kromatografske pogoje za doseganje ustrezne ločbe konjugatov od sorodnih snovi in nečistot. Z optimizacijo in uporabo različnih analitskih metod smo uspeli detektirati tudi podobne oblike z drugačno strukturo ter objektivno oceniti kakovost konjugatov brez morebitnega vpliva pripetega reagenta PEG na njihove lastnosti. Za karakterizacijo in test stabilnosti smo uporabili iste metode.

4.3.2 Določanje vsebnosti

Vsebnost konjugatov smo določili spektrofotometrično po postopku opisanem v poglavju poglavje 3.2.7.1. Vse konjugate smo ustrezeno redčili na ciljno koncentracijo 5 mg/ml. Rezultati so podani v preglednici 24. Izmerjena vsebnost konjugata P1 je nekoliko višja od vsebnosti konjugatov P2 in P3, ki sta identični.

Preglednica 24: Vsebnost redčin 30 kDa PEG-G-CSF

Table 24: Content of 30 kDa PEG-G-CSF dilutions

Vzorec	Vsebnost [mg/ml]
P1	5,3
P2	5,1
P3	5,1

4.3.3 Analiza RP-HPLC

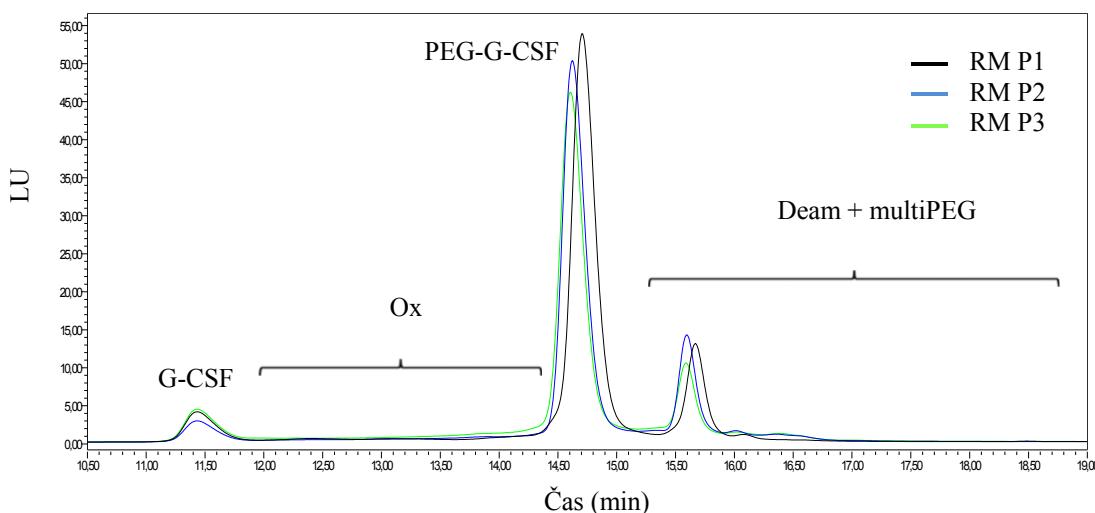
Za spremljanje učinkovitosti procesa priprave konjugatov smo po končani reakciji pegilacije izmerili čistost reakcijskih mešanic (RM), t.j. delež monopegiliranega proteina, z metodo RP-HPLC. Glavni vrh (PEG-G-CSF), ki predstavlja željeni monopegilirani konjugat, se na RP-HPLC eluira pri retensijskem času približno 14,7 min (Slika 24). Levo od glavnega vrha, pri času približno 11,5 min, zaznamo izhodni protein, rhG-CSF, ki se tekom pegilacije ni vezal z reagentom PEG. Vrh za glavnim vrhom, ki se eluira pri času približno 15,7 min, pa predstavlja dipegiliran konjugat, t.j. molekula rhG-CSF z dvema molekulama reagenta PEG.

Najvišji delež pretvorbe v monopegiliran produkt smo dosegli pri reakcijski mešanici konjugata P1, nekoliko nižjega v primeru mešanice P2 in najnižji delež pretvorbe pri mešanici P3. Rezultati so prikazani v preglednici 25.

Preglednica 25: Čistost pegilacijskih reakcijskih mešanic konjugatov

Table 25: Purity of pegylation reaction mixtures of conjugates

Reakcijska mešanica	Čistost (delež monopegiliranega proteina) [%]
P1	71,1
P2	66,4
P3	64,1

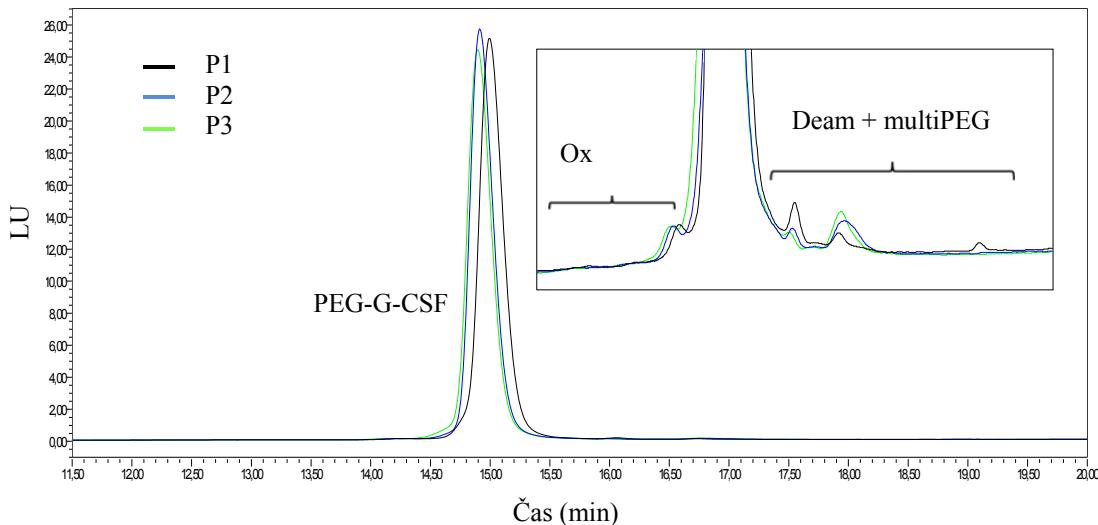


Slika 24: Kromatogrami RP-HPLC RM konjugatov P1, P2, P3
Figure 24: RP-HPLC chromatograms of RM of conjugates P1, P2, P3

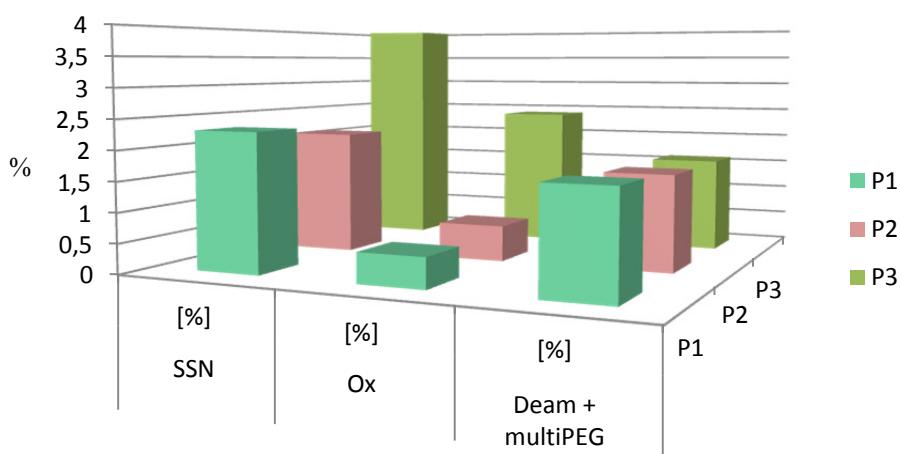
Iz posameznih pegilacijskih mešanic smo s preparativno kromatografijo izolirali željeni produkt, t.j. monopegiliran filgrastim. Odstranili smo višje pegilirane oblike in nepegiliran protein ter procesne nečistoče t.j. prebitek reagenta PEG in NaCNBH₃. Prekriti kromatogrami RP-HPLC analiz vseh treh konjugatov (Slika 25) kažejo nekaj razlik v kakovosti posameznih konjugatov. Konjugat P3 izkazuje nekoliko drugačno obliko začetnega dela glavnega vrha, medtem ko je zadnji del kromatografskega vrha primerljiv za vse tri konjugate. Vsi trije konjugati izkazujejo značilen vrh pred glavnim vrhom, prav tako vidimo pri vseh dva značilna vrha za glavnim vrhom, ki pa se razlikujeta po višini. Prisotnost obeh vrhov zaznamo že na kromatogramu pegilacijskih mešanic: prvi vrh za glavnim vrhom pripada dipegilirani obliki. Čistost očiščenih konjugatov, določena z RP-HPLC, je prikazana v preglednici 26. Z metodo RP-HPLC smo poleg čistosti monopegiliranega proteina določili tudi delež sorodnih snovi in nečistot (SSN), ki ga tvorijo predvsem oksidirane in deamidirane proteinske oblike ter višje pegilirani produkti. Na podlagi razlik v hidrofobnosti smo določili oksidirane oblike (Ox) kot površinski odstotek vseh vrhov, ki se eluirajo pred vrhom konjugata. Deamidirane oblike (Deam) in višjepegilirane oblike (multiPEG) pa kot površinski odstotek vseh vrhov, ki se eluirajo za vrhom konjugata. Deleži omenjenih nečistot, ki smo jih določili, so prikazani v preglednici 26 in sliki 26.

Preglednica 26: Čistost konjugatov določenih z metodo RP-HPLC
Table 26: Purity of conjugates determined by RP-HPLC

Konjugat	Delež monoPEGiliranega proteina	SSN	Ox	Deam + multiPEG
		[%]		
P1	97,7	2,3	0,5	1,7
P2	97,9	2,1	0,6	1,6
P3	96,0	4,0	2,4	1,6



Slika 25: Kromatogrami RP-HPLC konjugatov P1, P2, P3
Figure 25: RP-HPLC chromatograms of conjugates P1, P2, P3



Slika 26: Grafični prikaz rezultatov nečistot določenih z metodo RP-HPLC
Figure 26: Graphic presentation of the results for impurities determined by RP-HPLC method

Največjo RP-HPLC čistost smo določili konjugatu P2 oziroma čistost je med konjugatoma P2 in P1 primerljiva. V deležu SSN izstopa konjugat P3, saj ima v primerjavi s preostalima prisotnih kar za približno 2-krat več nečistot. Iz rezultatov je razvidno, da so deleži deamidiranih oblik med konjugati primerljivi. Razlike v čistosti med konjugati so posledica razlik v deležu oksidiranih oblik. Prav tako so med konjugati vidne razlike v hidrofobnosti (Slika 25), ki so posledica razlik molekulskih mas reagentov PEG. Najbolj hidrofilen je konjugat P3 in najbolj hidrofoben konjugat P1.

4.3.4 Analiza SE-HPLC

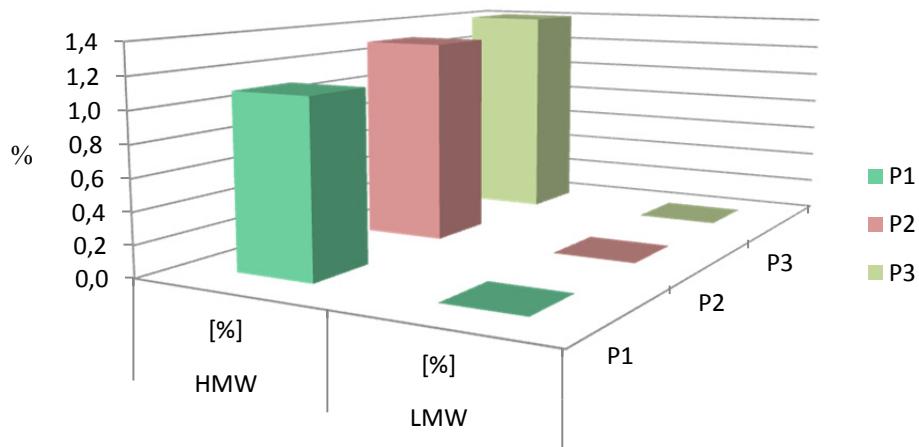
- Določanje nečistot (detekcija FLD)

Na osnovi razlik v velikosti molekul smo z metodo SE-HPLC v konjugatih določili delež snovi z večjo molekulsko maso (oligomeri, agregati, ...) in delež snovi z manjšo molekulsko maso (molekula rhG-CSF).

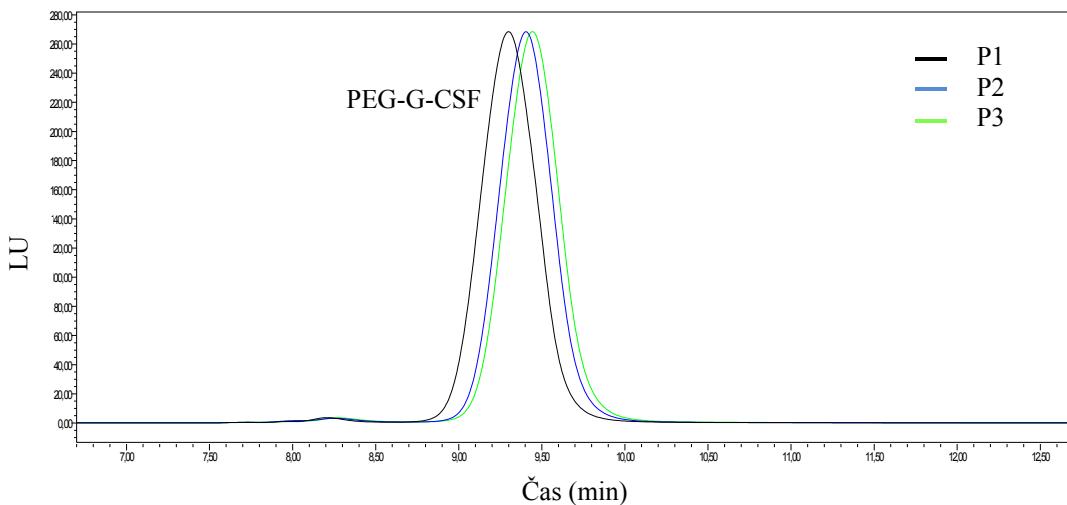
Snovi z večjo molekulsko maso (HMW) predstavljajo kromatogramske vrhove, ki se eluirajo pred vrhom konjugata. Snovi z manjšo molekulsko maso (LMW) pa predstavljajo kromatogramske vrhove, ki se eluirajo za vrhom konjugata. Delež HMW in LMW je izračunan kot površinski odstotek vrhov. Rezultati so prikazani v preglednici 27 in sliki 27.

Preglednica 27: Rezultati nečistot določenih z metodo SE-HPLC
Table 27: Results for impurities determine by SE-HPLC method

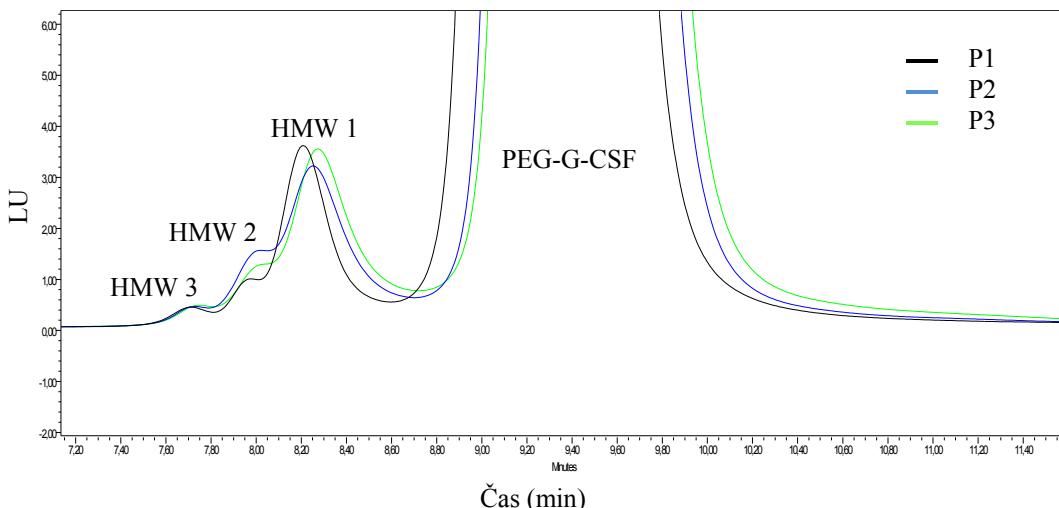
Vzorec	HMW	LMW [%]
P1	1,1	0,0
P2	1,3	0,0
P3	1,4	0,0



Slika 27: Grafični prikaz rezultatov nečistot določenih z metodo SE-HPLC
Figure 27: Graphic presentation of the results for impurities determine by SE-HPLC method



Slika 28: Kromatogrami SE-HPLC konjugatov P1, P2, P3
Figure 28: SE-HPLC chromatograms of conjugates P1, P2, P3



Slika 29: Povečava kromatogramov SE-HPLC konjugatov P1, P2, P3
Figure 29: Zoomed SE-HPLC chromatograms of conjugates P1, P2, P3

Med konjugati ni velike razlike v prisotnosti snovi z večjo molekulsko maso, kar je razvidno tudi iz primerjave kromatogramov (Sliki 28 in 29). Najmanj HMW smo določili konjugatu P1 in največ konjugatu P3. Prisotnost snovi z manjšo molekulsko maso je zanemarljiva oziroma je njihova vrednost pod 0,05% površinskega deleža.

- Določanje molekulske mase (detekcija UV/MALS/RI)

Z metodo SE-HPLC in uporabo detektorja MALS smo konjugatom določili molekulsko maso proteinskega dela molekule in molekulsko maso molekule reagenta PEG, in sicer za vsako posamezno komponento (kromatografski vrh), ki smo jo detektirali. Za določanje

molekuskih mas posameznih komponent konjugatov (ločeno vrednotenje proteinskega in polimernega dela) je potrebna kombinacija signalov treh detektorjev: UV, MALS in RI.

Kot smo ugotovili že z detekcijo UV, je delež snovi z manjšo molekulsko maso v konjugatih zanemarljiv. To smo potrdili tudi z detekcijo MALS, saj za glavnim vrhom odziva nismo zaznali. Snovi z večjo maso smo na kromatogramih označili kot HMW 1, HMW 2 in HMW 3. Tipični kromatogrami konjugatov posneti z detekcijo MALS so prikazani na slikah 30, 31 in 32. Molekulske mase, ki smo jih določili konjugatom, so predstavljene v preglednici 28.

Preglednica 28: Molekulske mase konjugatov

Table 28: Molecular mas of conjugates

Vzorec	Mw [Da]			Razmerje Mw*				
	Konjugat	HMW 1	HMW 2	HMW 3	HMW 1/ Konjugat	HMW 2/ Konjugat	HMW 3/ Konjugat	
P1	Protein	17560	51070	165000	/	3	9	/
	PEG	30750	94640	481900	/	3	16	/
P2	Protein	17240	25630	34580	129900	1	2	8
	PEG	28860	76110	159100	892300	3	6	31
P3	Protein	17590	33450	57970	865600	2	3	49
	PEG	28120	71220	160200	2305000	3	6	82

/ ... brez zaznanega odziva

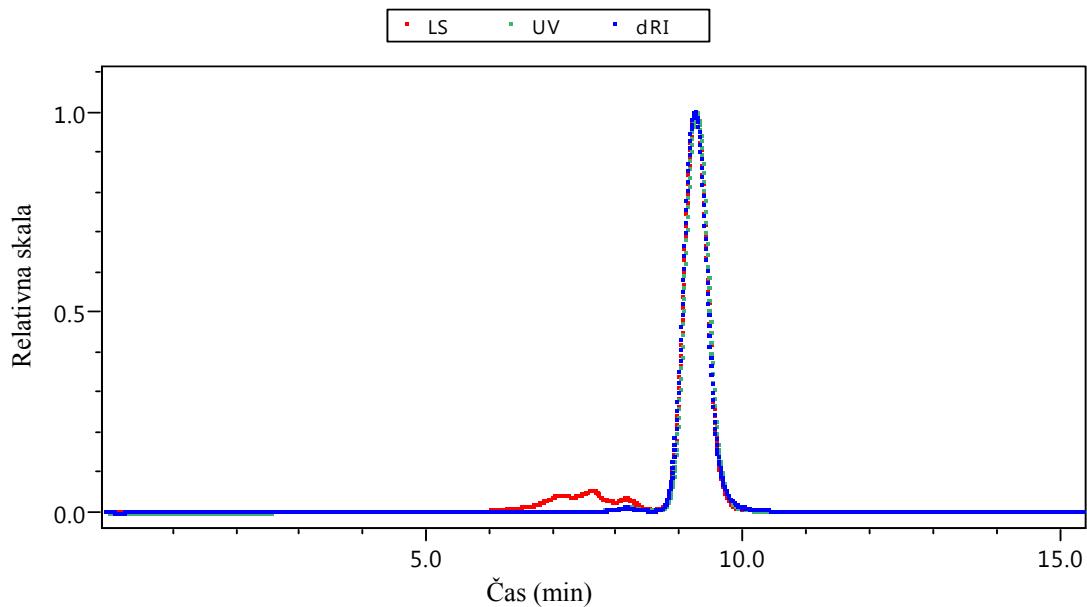
*vrednosti so približne, zaradi zaokroževanja

Molekulska masa filgrastima je 18,8 kDa in reagentov PEG 30 kDa. Določili smo, da je molekulska masa proteinskega dela molekule konjugatov med približno 17,2 kDa in 17,6 kDa. Molekulska masa molekule reagenta PEG pa med približno 28 kDa in 31 kDa. Zaznana razlika med molekulskimi masami proteinskega dela posameznih konjugatov je znotraj napake metode. Medtem ko razliko, zaznano med molekulskimi masami polimernega dela posameznih konjugatov, zaznamo tudi kot razlike v retenzijskih časih z metodama SE-HPLC in RP-HPLC, tako na nivoju reagentov PEG, kot tudi na nivoju konjugatov.

Iz razmerja molekulskeih mas smo ocenili naravo višjemolekularnih oblik. Izračunano razmerje molekulskeih mas za vrh HMW 1 se gibljeje med ena in tri, kar kaže, da vrh HMW 1 sestavlajo manjši oligomeri, skupki 2-3 osnovnih molekul konjugata (P1 in P3). Pri konjugatu P2 je razmerje proteinskega dela molekule enako 1, razmerje PEG pa 3, kar kaže, da vrh HMW 2 vsebuje višejepgilirane oblike konjugata P2.

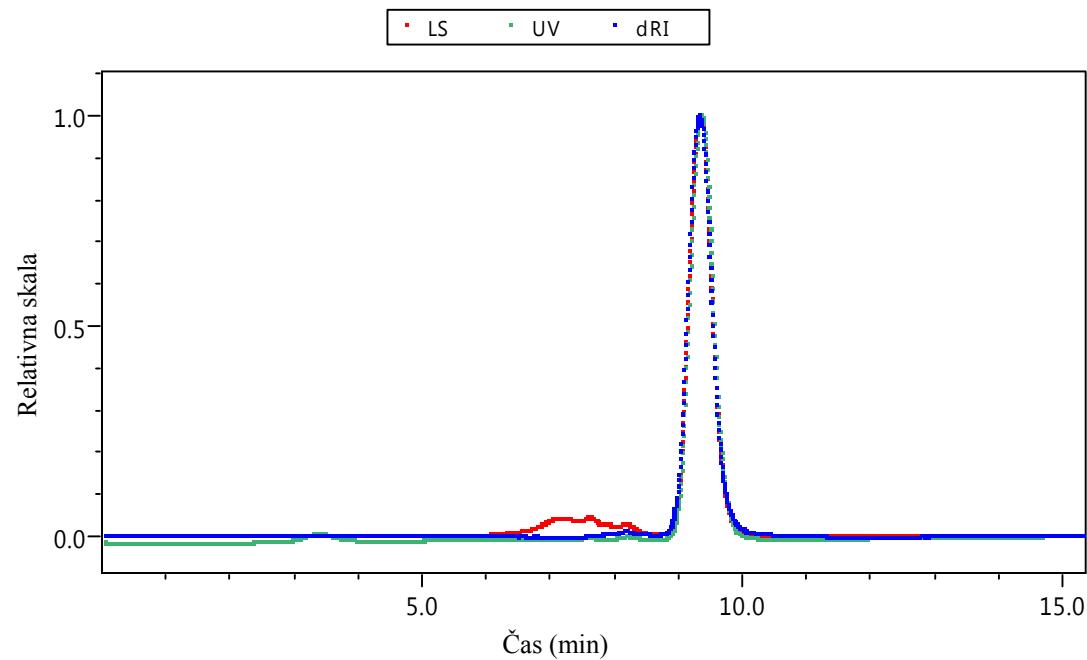
Razmerja molekulskeih mas glede na osnovno molekulo so za vrh HMW 2 večja, poleg tega so pri pri vseh treh konjugatih večje tudi razlike v razmerjih za proteinski del in za polimeri del. Vrednosti kažejo, da vrh HMW 2 vsebuje višejepgilirane oblike, lahko pa je tudi mešanica višejepgiliranih oblik in nekoliko večjih oligomerov.

V vrhu HMW 3 so razmerja molekulskeih mas glede na izhodni konjugat od 8-32 kar kaže, da vrh HMW 3 predstavlja aggregate. Pri konjugatu P1 je bil vrh HMW 3 viden na UV in MALS, vendar ga nismo mogli ovrednotiti, ker je bil signal RI prešibek.



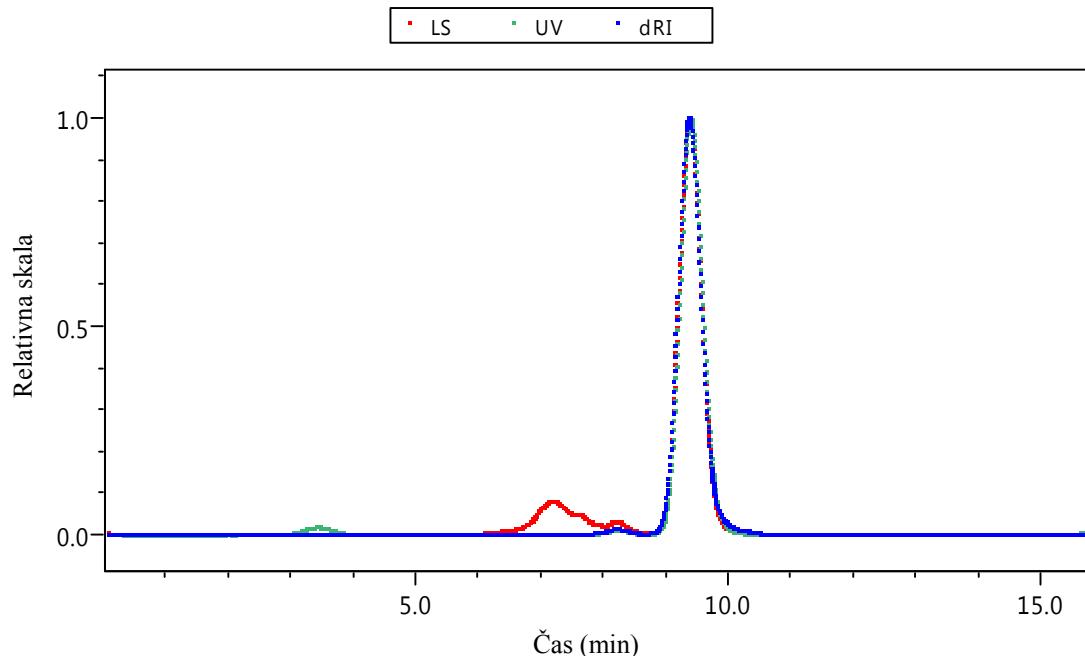
Slika 30: Kromatogram sisanja svetlobe (MALS) konjugata P1

Figure 30: MALS chromatogram of conjugate P1



Slika 31: Kromatogram sisanja svetlobe (MALS) konjugata P2

Figure 31: MALS chromatogram of conjugate P2



Slika 32: Kromatogram sipanja svetlobe (MALS) konjugata P3
Figure 32: MALS chromatogram of conjugate P3

- Določanje polidisperznosti in molekulske mase (detekcija RI)

Porazdelitev molekulskih mas (polidisperznost) in molekulske mase konjugatov smo določili enako kot za reagente PEG, z metodo SE-HPLC s pomočjo umeritvene krivulje standardov. Rezultati so podani v preglednici 29.

Preglednica 29: Polidisperznost in molekulska masa konjugatov
Table 29: Polydispersity and molecular weight of conjugates

Konjugat	Polidisperznost [%]	Molekulska masa (MW) [kDa]
P1	1,04	25,7
P2	1,04	24,0
P3	1,06	23,4

Rezultati polidisperznosti sovpadajo z obliko kromatografskih vrhov konjugatov, ki smo jih določili pri analizi RP-HPLC. Kromatografski vrh konjugata P3 je širši v primerjavi z vrhovoma konjugatov P1 in P2. Posledično je rezultat za polidisperznost konjugata P3 višji. Oblika kromatografskih vrhov konjugatov P1 in P2 je primerljiva (poglavje 4.3.3) in rezultat za polidisperznost enak.

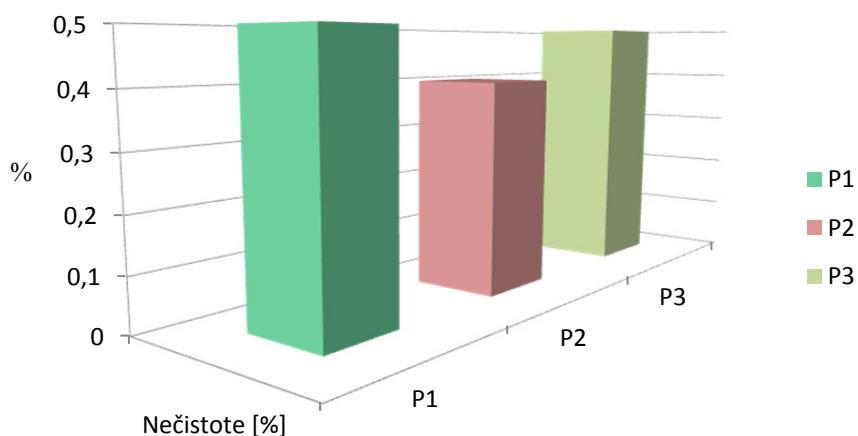
Molekulske mase konjugatov, ki smo jih izmerili s to metodo, močno odstopajo od dejanskih molekulskih mas, o čemer razpravljamo v diskusiji.

4.3.5 Analiza CE-HPLC

S kromatografskimi pogoji analize CE-HPLC smo v konjugatih določali prisotnost nečistot oziroma deamidiranih variant. Ločba konjugatov od sorodnih snovi je potekala na osnovi razlik v njihovem naboju. Nečistote, kjer največji delež predstavljajo deamidirane oblike, so podane kot površinski odstotek vseh kromatogramskih vrhov, ki se eluirajo pred vrhom konjugata. Rezultati so predstavljeni v preglednici 30 in sliki 33.

Preglednica 30: Rezultati nečistot določenih z metodo CE-HPLC
Table 30: Results for impurities determine by CE-HPLC method

Vzorec	Nečistote [%]
P1	0,5
P2	0,4
P3	0,5



Slika 33: Grafični prikaz rezultatov nečistot določenih z metodo CE-HPLC
Figure 33: Graphic presentation of the results for impurities determined by CE-HPLC method

Med konjugati ni bistvene razlike v prisotnosti nečistot določenih z metodo CE-HPLC. Konjugata P1 in P3 imata identičen delež prisotnih nečistot, medtem ko je delež nečistot v konjugatu P2 nižji za 0,1%.

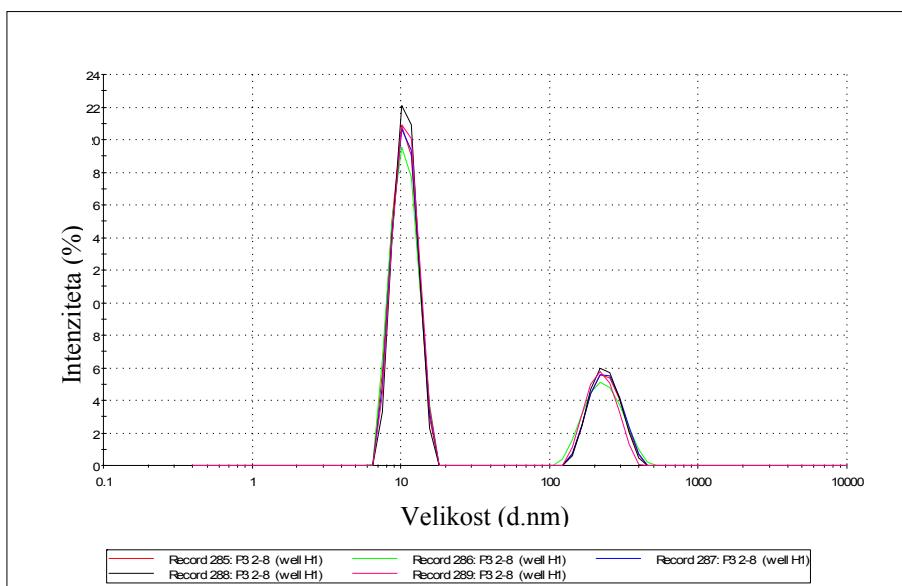
4.3.6 Določanje hidrodinamskih radijev (DLS)

Z metodo dinamičnega sipanja svetlobe smo preučili dinamične lastnosti delcev v raztopini konjugatov. Določili smo hidrodinamske radije (R_h) ter polidisperznost vzorcev (PD%). Izhodni konjugati so označeni kot P1, P2 in P3, konjugati z dodatno oznako Z/O pa so vzorci, izpostavljeni enemu ciklu zamrzovanja in odmrzovanja, pri katerih smo pri analizi SE-HPLC opazili povečan delež snovi z večjo molekulsko maso. Rezultati so prikazani v preglednici 31. Izhodna konjugata P1 in P2 imata primerljiv povprečen hidrodinamski radij: 5,2 oziroma 5,1 nm. Konjugat P3 ima nekoliko večji hidrodinamski radij: 6,3 nm. Po zamrzovanju in odmrzovanju se je povprečni hidrodinamski radij vsem konjugatom

povečal: na 5,6 nm za konjugata P1 in P2 ter na 7,3 nm za konjugat P3. Polidisperznost konjugata P3 je 50%, medtem ko je polidisperznost ostalih vzorcev 20%. V splošnem velja, da imajo monodisperzni vzorci vrednost PD pod 20%, polodisperzni pa nad 30%. Izhodni protein ter konjugata P1 in P2 so na zgornji meji monodisperznosti (PD 20%), medtem ko je konjugat P3 polodisperzen (PD 50%). Konjugatom, ki so bili izpostavljeni enemu ciklu zamrzovanja in odmrzovanja se je povprečni R_h povečal, kar sovpada tudi z rezultati, ki smo jih dobili pri analizi SE-HPLC v sklopu testa stabilnosti (poglavlje 4.3.7). Na sliki 34 je prikazan tipičen signal meritev DLS.

Preglednica 31: R_h in PD proteinskih konjugatov izmerjena z DLS
Table 31: R_h and PD of conjugates measured with DLS

Protein / konjugat	R_h - povprečni [nm]	PD [%]
P1	5,2	20
P2	5,1	20
P3	6,3	50
P1 Z/O	5,6	20
P2 Z/O	5,6	20
P3 Z/O	7,3	50



Slika 34: Primer tipičnega signala meritev DLS, vzorec P3 5 ± 3 °C
Figure 34: Example of typical chromatogram of DLS measurement, sample P3 5 ± 3 °C

Na podlagi rezultatov analiz za določanje čistosti konjugatov lahko zaključimo, da je delež sorodnih snovi in nečistot določenih z metodama SE-HPLC in CE-HPLC med konjugati primerljiv. Razlika med konjugati je bolj opazna pri analizi RP-HPLC, in sicer v prisotnosti oksidiranih oblik. Konjugat P3 ima bistveno večji delež oksidiranih oblik kot

konjugata P1 in P2, pri katerih je delež primerljiv. Prav tako je med konjugatoma P1 in P2 primerljiv tudi povprečni hidrodinamski radij, medtem ko ima konjugat P3 nekoliko večjega. Konjugat P3 ima tudi slabšo (t.j. širšo) porazdelitev molekulske mase v primerjavi z konjugatoma P1 in P2. Vključujoč variabilnost analitskih rezultatov lahko zaključimo, da sta konjugata P1 in P2 kakovostno skoraj primerljiva, medtem ko je konjugat P3 nekoliko slabše kakovosti. Pretežno je kakovost konjugata P3 slabša, zaradi večjega deleža vsote sorodnih snovi in nečistot, ki smo jih določili z RP-HPLC analizo.

4.3.7 Stabilnost

Vpliv temperature

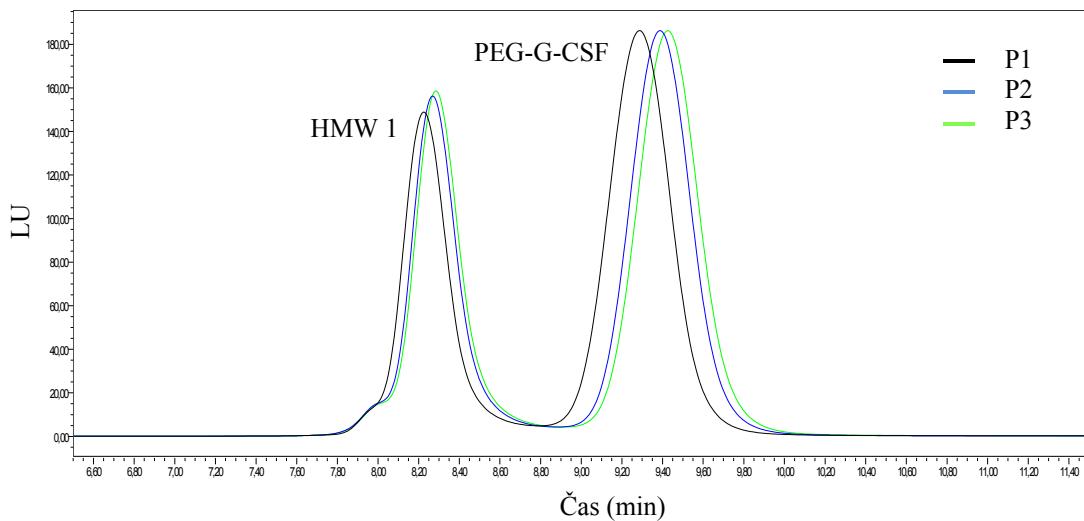
Najpogosteji stres, ki povzroča konformacijske spremembe v molekuli proteina, je temperaturni stres. Posledično smo konjugate P1, P2 in P3 izpostavili trem različnim temperaturam (5 ± 3 °C, 25 °C in 40 °C) ter jih po enem, dveh, štirih in sedmih tednih analizirali z metodami za določanje čistosti: RP-HPLC, SE-HPLC in CE-HPLC. Sočasno smo s testom stabilnosti preverili tudi vpliv zamrzovanja in odmrzovanja na kakovost konjugatov. Vzorce smo do analiz hranili pri temperaturi -70 ± 10 °C, jih za namen testiranja tajali in nato analizirali, oziroma jih do analiz hranili pri temperaturi 5 ± 3 °C.

Izjema so vzorci odvzeti s pogojev hranjenja po sedmih tednih, ki niso bili izpostavljeni ciklu zamrzovanja in odtaljevanja. Točko 0 testiranja vseh pogojev hranjenja predstavlja kontrolni vzorec, ki je bil do analize hranjen na pogojih -70 ± 10 °C.

Rezultati analize SE-HPLC

- Določanje nečistot (detekcija FLD)

Rezultati analize SE-HPLC vzorcev t_0 ter vzorcev po 1, 2 in 4 tednih so pokazali nepričakovano visok delež snovi z višjo molekulsko maso (oligomeri, agregati...). Delež snovi z nižjo molekulsko maso LMW je bil zanemarljiv v vseh izmerjenih vzorcih, medtem ko je bil izmerjen delež HMW pri vseh konjugatih izrazito visok, ne glede na to, katerim pogojem hranjenja so bili izpostavljeni. Posledično iz rezultatov vseh treh konjugatov ni možno oceniti vpliva različnih temperatur na njihovo stabilnost, saj so vsi rezultati za razgradne produkte relativno primerljivi. Prav tako so med seboj primerljivi tudi kromatogrami vseh analiziranih stabilitetnih vzorcev po 1, 2 in 4 tednih. Iz primera kromatogramov kontrolnih vzorcev konjugatov P1, P2 in P3 (Slika 35) je razvidno, da poleg glavnega vrha, ki predstavlja konjugat, prevladuje vrh, ki smo ga označevali kot HMW 1. Delež kromatografskega vrha HMW 1 skoraj v celoti predstavlja vsoto snovi z večjo molekulsko maso. Sočasno smo izvedli tudi analizo SE-HPLC z detekcijo MALS, s katero smo posameznim kromatografskim vrhom določili molekulsko maso. Iz razmerja molekulskih mas smo ocenili, da je molekulska masa proteinskega in PEG dela v vrhu HMW 1 2-krat večja kot izhodni molekuli, kar nakazuje prisotnost dimernih oblik.



Slika 35: Kromatogrami SE-HPLC kontrolnih vzorcev konjugatov P1, P2 in P3

Figure 35: SE-HPLC chromatograms of control sample of conjugates P1, P2 and P3

Na podlagi izkušenj z 20 kDa PEG rhG-CSF konjugatom takšnega deleža dimer nikakor nismo pričakovali, zato smo iskali morebiten vzrok za takšen rezultat. Kot morebitni vzrok za tovrstne rezultate smo sprva pripisali neustrezni vrednosti pH končnega formulacijskega pufra vzorcev. Kontrolnim vzorcem konjugatov smo izmerili vrednost pH (Preglednica 32). Rezultati meritev vrednosti pH kažejo vrednosti pH=3,4, kar po naših predhodnih izkušnjah s stabilnostjo 20 kDa PEG rhG-CSF konjugata po zamrzovanju ne bi smel biti vzrok za dimerizacijo.

Preglednica 32: Vrednost pH kontrolnih vzorcev konjugatov P1, P2, P3

Table 32: pH value of control sample of P1, P2, P3 conjugates

Vzorec	Vrednost pH
P1	3,4
P2	3,4
P3	3,4

Ker so bili vsi vzorci pred analizo izpostavljeni enemu ciklu zamrzovanja in tajanja, smo izvedli analizo vzorcev brez predhodnega zamrzovanja. Vzorce, ki smo jih prvotno namenili tri mesečni točki odvezema s pogojev hranjenja, smo odvezeli s pogojev po sedmih tednih in jih takoj analizirali. Iz rezultatov je razvidno, da po sedmih tednih temperaturi 5 ± 3 °C in 25 °C ne vplivata na stabilnost konjugatov, medtem ko je opazna izrazita razgradnja pri temperaturi 40 °C. Rezultati konjugatov so za delež snovi z večjo in manjšo molekulsko maso primerljivi med temperaturama 5 ± 3 °C in 25 °C. Delež snovi z manjšo molekulsko maso je pri omenjenih temperaturah praktično zanemarljiv, medtem ko se nekoliko poveča pri 40 °C. Pri 40 °C se bistveno poveča delež snovi z večjo molekulsko maso, torej delež dimerov in agregatov molekule rhG-CSF.

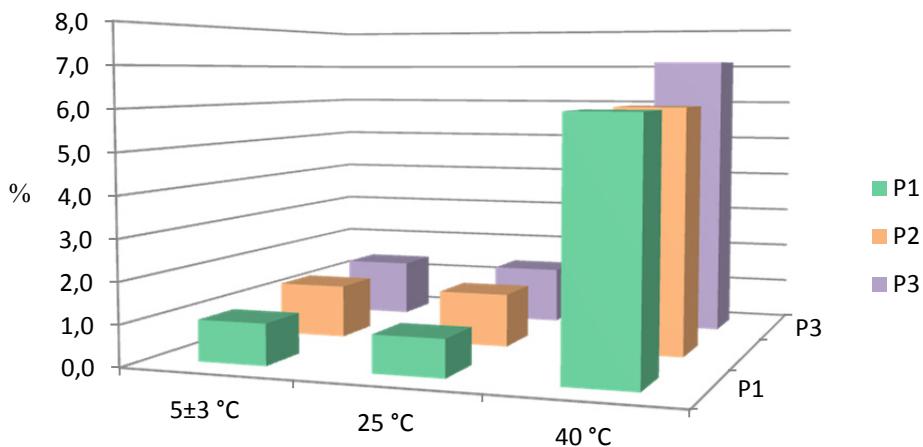
Pri analizi vzorcev po sedmih tednih hranjenja so rezultati in kromatografski profil vzorcev (Slika 37, 38, 39) popolnoma drugačni kot pri analizi predhodnih točk testiranja, kar kaže, da je vendarle zamrzovanje (in odmrzovanje) induciralo dimerizacijo konjugatov.

V vseh vzorcih, ki smo jih do analize shranili zamrznjene vključno s kontrolni vzorec (t_0), smo izmerili visok delež HMW (dimer). Zato lahko rečemo, da smo z uporabo metode SE-HPLC zaznali prave razlike vpliva pogojev hranjenja na agregacijo zgolj po 7 tednih, ko smo vzorce analizirali brez predhodnega zamrzovanja. Te analize pa kažejo primerljivo obnašanje vseh treh konjugatov na vseh pogojih ter stabilno obnašanje vseh treh konjugatov na 5 ± 3 °C in 25 °C po 7 tednih. Pričakovano smo opazili razliko pri konjugatih hranjenih na 40 °C. Zato smo zgolj te rezultate upoštevali za oceno stabilnosti vezano na agregacijo. Rezultati so prikazani v preglednici 33 in sliki 36. Analize SE-HPLC vzorcev s predhodnim zamrzovanjem so namreč zaznale tolikšen vpliv cikla zamrzovanja, ki je zamaskiral razlike med različnimi temperaturi hranjenja.

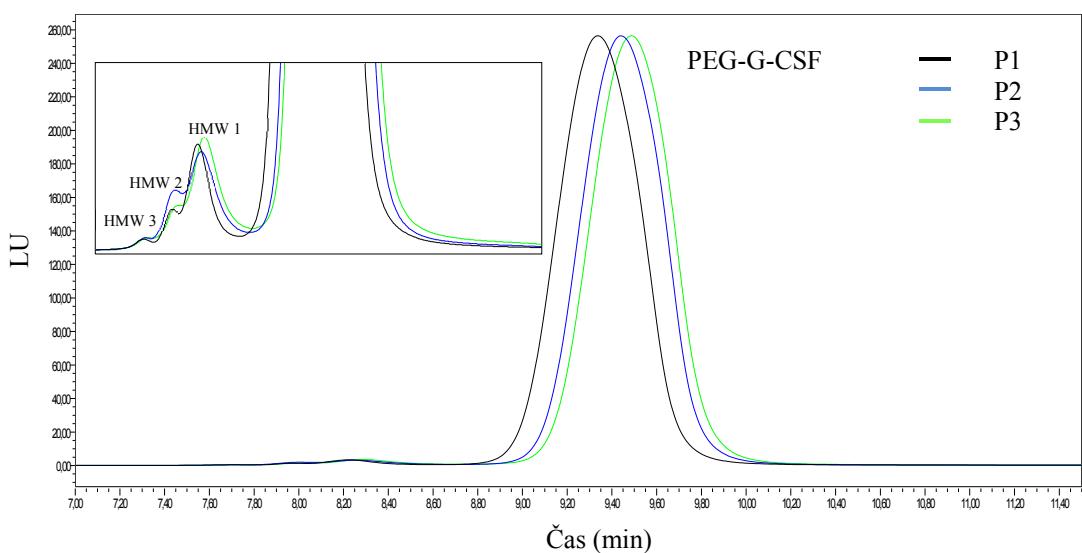
Rezultati analiz RP-HPLC in CE-HPLC, kažejo, da cikel zamrzovanja in tajanja nima vpliva na generirane rezultate obeh analiz in jih lahko uporabimo za oceno stabilnosti na vseh analiziranih točkah. Kromatografski pogoji za RP-HPLC in CE-HPLC namreč izključujejo možnost detekcije dimerov in agregatov, saj le-ti disociirajo. Konjugat P1 (izbran kot primer) s povečano vsebnostjo dimer po odmrzovanju smo dodatno testirali z dodatkom 0,004% Tween-80. Preveriti smo žeeli, ali bo Tween povzročil tudi disociacijo dimerov pri analizi SE-HPLC. Po dodatku Tweena je kromatografski profil zamrznjenega/odmrznjenega konjugata P1 z uporabo metode SE-HPLC ponovno primerljiv nezamrznjenim vzorcem (Slika 57).

Preglednica 33: Rezultati za HMW in LMW za P1, P2, P3 po točki testiranja 7 tednov
Table 33: Results for HMW and LMW for P1, P2, P3 after testing point of 7 weeks

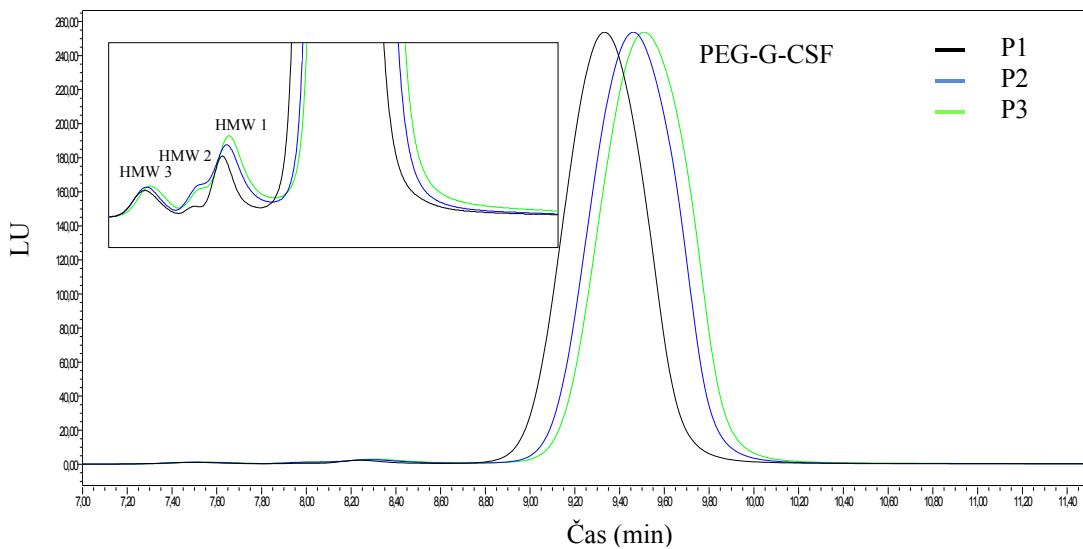
Točka testiranja	Pogoji hranjenja	Vzorec							
		P1		P2		P3			
		HMW	LMW	HMW	LMW	HMW	LMW	[%]	
7 tednov	5±3 °C	1,0	0,0	1,3	0,0	1,4	0,0		
	25 °C	0,9	0,2	1,3	0,2	1,4	0,2		
	40 °C	6,0	1,0	6,0	1,0	7,1	1,0		



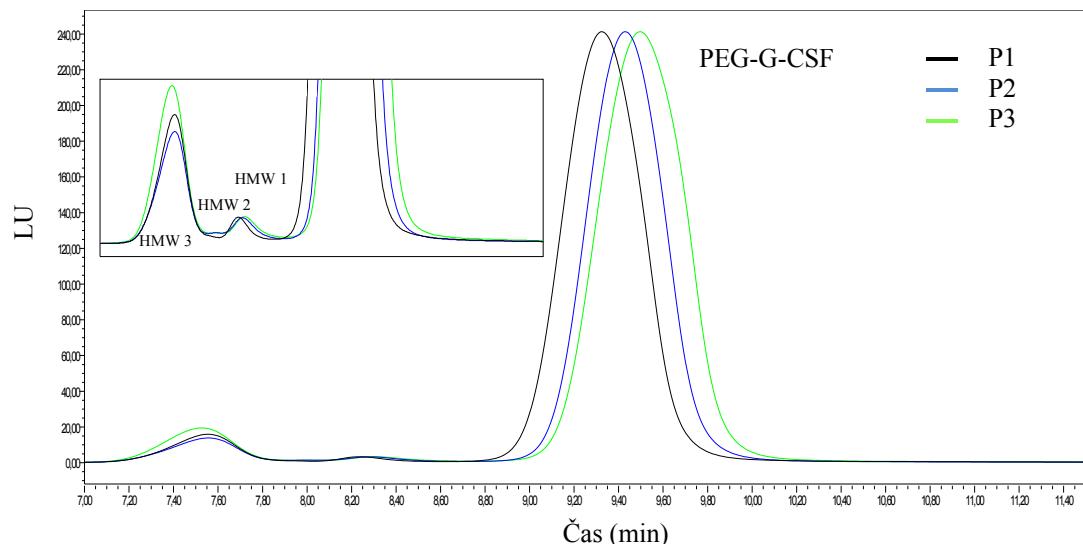
Slika 36: Grafični prikaz rezultatov za HMW konjugatov P1, P2, P3 po 7 tednih hranjenja na testnih pogojih
 Figure 36: Graphic presentation of results for HMW for P1, P2, P3 conjugat after testing point of 7 weeks



Slika 37: Kromatogrami SE-HPLC konjugatov P1, P2 in P3 po 7 tednih na 5±3 °C
 Figure 37: SE-HPLC chromatograms of conjugates P1, P2 and P3 after 7 week at 5±3 °C



Slika 38: Kromatogrami SE-HPLC konjugatov P1, P2 in P3 po 7 tednih na 25 °C
Figure 38: SE-HPLC chromatograms of conjugates P1, P2 and P3 after 7 week at 25 °C



Slika 39: Kromatogrami SE-HPLC konjugatov P1, P2 in P3 po 7 tednih na 40 °C
Figure 39: SE-HPLC chromatograms of conjugates P1, P2 and P3 after 7 week at 40 °C

- Določanje molekulske mase (detekcija UV/MALS/RI)

Z metodo SE-HPLC in uporabo detektorja MALS smo stabilitetnim vzorcem konjugatov določili molekulsko maso. Določili smo proteinski del molekule in del molekule reagenta PEG in iz razmerja molekulskih mas ocenili naravo višjemolekularnih oblik prisotnih v vzorcih po 7 tednih na stabilitetnih pogojih (Preglednice 34-36). Pri vseh treh testiranih temperaturah je izračunano razmerje molekulskih mas za vrh HMW 1 je 2, tako za proteinski kot za polimerni del. Vrh HMW1 torej sestavlja dimeri. Pri 5±3 °C in 25 °C so

razmerja molekulskih mas glede na osnovno molekulo za vrh HMW 2 2 - 4, kar kaže, da so v tem vrhu prisotni oligomeri. Pri 40 °C pa je razmerje za vrh HMW 2 bistveno večje, 5-10, torej so prisotni večji oligomeri. Rezultati razmerij za HMW 3 so zelo raznoliki. Pri 5±3 °C so razmerja molekulskih mas za konjugat P1 izjemno velika, vendar ta rezultat ni zanesljiv zaradi izredno šibkejšega signala RI za vrh HMW 3. Ostala dva konjugata pri tej temperaturi in vsi konjugati pri višjih temperaturah imajo močnejši signal RI za HMW 3 in so vrednosti zanesljivejše. Iz rezultatov za vrh HMW 3 vsekakor lahko zaključimo, da ta vrh predstavlja agregate.

Preglednica 34: Molekulske mase konjugatov po 7 tednih na 5±3 °C

Table 34: Molecular mas of conjugates after 7 weeks at 5±3 °C

Vzorec	Konjugat	Mw [Da]			Razmerje Mw*		
		HMW 1	HMW 2	HMW 3	HMW 1/ Konjugat	HMW 2/ Konjugat	HMW 3/ Konjugat
P1	Protein	17330	37140	38220	524600000	2	2
	PEG	29150	55540	96360	698000000	2	3
P2	Protein	17210	35830	38360	9657000	2	2
	PEG	29000	56400	102200	14290000	2	4
P3	Protein	17350	34580	57200	500000	2	3
	PEG	28300	53430	90310	419800	2	3

*vrednosti so približne, zaradi zaokroževanja

Preglednica 35: Molekulske mase konjugatov po 7 tednih na 25 °C

Table 35: Molecular mas of conjugates after 7 weeks at 25 °C

Vzorec	Konjugat	Mw [Da]			Razmerje Mw*		
		HMW 1	HMW 2	HMW 3	HMW 1/ Konjugat	HMW 2/ Konjugat	HMW 3/ Konjugat
P1	Protein	17110	35700	35270	108000	2	2
	PEG	30780	59940	112600	2195000	2	4
P2	Protein	17410	36610	43290	3985000	2	2
	PEG	29130	56460	106600	1152000	2	4
P3	Protein	17330	35670	67130	1598000	2	4
	PEG	28410	55100	103200	161300	2	4

*vrednosti so približne, zaradi zaokroževanja

Preglednica 36: Molekulske mase konjugatov po 7 tednih na 40 °C

Table 36: Molecular mas of conjugates after 7 weeks at 40 °C

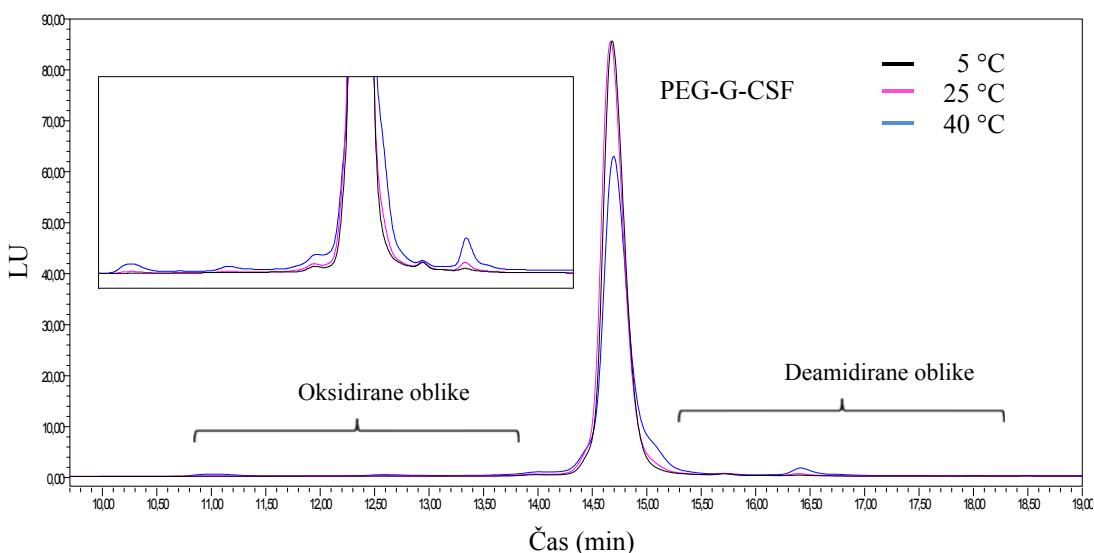
Vzorec	Konjugat	Mw [Da]			Razmerje Mw*		
		HMW 1	HMW 2	HMW 3	HMW 1/ Konjugat	HMW 2/ Konjugat	HMW 3/ Konjugat
P1	Protein	17140	37890	116900	3247000	2	7
	PEG	31530	63050	261000	2679000	2	8
P2	Protein	17200	37200	172100	3734000	2	10
	PEG	29680	59650	299500	2629000	2	10
P3	Protein	17450	39670	79640	4312000	2	5
	PEG	28910	58800	164200	2410000	2	6

*vrednosti so približne, zaradi zaokroževanja

Bistvenih razlik med agregacijo posameznih konjugatov po 7 tednih nismo opazili. Pri 40 °C je za konjugat P3 v primerjavi s P1 in P2 (HMW 6%) sicer nakazan nekoliko večji delež aggregatov (HMW 7,1%), vendar razlika ni tolikšna, da bi lahko trdili, da je konjugat P3 bolj občutljiv za agregacijo.

Rezultati analize RP-HPLC

Rezultati so prikazani v preglednicah 37, 38 in 39. Vsi trije konjugati so stabilni pri temperaturi hranjenja 5 ± 3 °C skozi celotno obdobje testiranja. Prav tako razgradnih procesov nismo zaznali pri temperaturi hranjenja 25 °C do dveh tednov. Po štirih in sedmih tednih hranjenja na 25 °C pa se vpliv temperature že kaže v nekoliko povišanih vrednostih SSN vseh treh konjugatov. Izrazito povečana razgradnja konjugatov pa je prisotna pri temperaturi hranjenja na 40 °C, in sicer v vseh točkah testiranja. SSN pri temperaturi 40 °C narašča tekom testiranja. Vpliv temperature 25 °C in 40 °C se kaže v povišanih vrednostih tako oksidiranih kot deamidiranih oblik. Porast deamidiranih oblik je nekoliko višja v primerjavi z oksidiranimi, kar je razvidno tudi iz primera kromatograma na sliki 40. Rama za kromatografskim vrhom konjugatov je še posebej izrazita pri temperaturi 40 °C. Konjugati imajo za posamezno točko in pogoj testiranja primerljiv kromatografski profil. Na sliki 40 je prikazan primer vpliva različnih temperatur hranjenja po 7 tednih za konjugat P1.



Slika 40: Primer kromatografskega profila RP-HPLC konjugata P1 pri različnih temperaturah hranjenja po 7 tednih (5 ± 3 °C, 25 °C in 40 °C)

Figure 40: Example of the RP-HPLC chromatogram for the conjugat P1 after 7 weeks storage at different temperatures (5 ± 3 °C, 25 °C and 40 °C)

Preglednica 37: Nečistote konjugata P1 določene z RP-HPLC
Table 37: Impurities of P1 conjugate determined by RP-HPLC

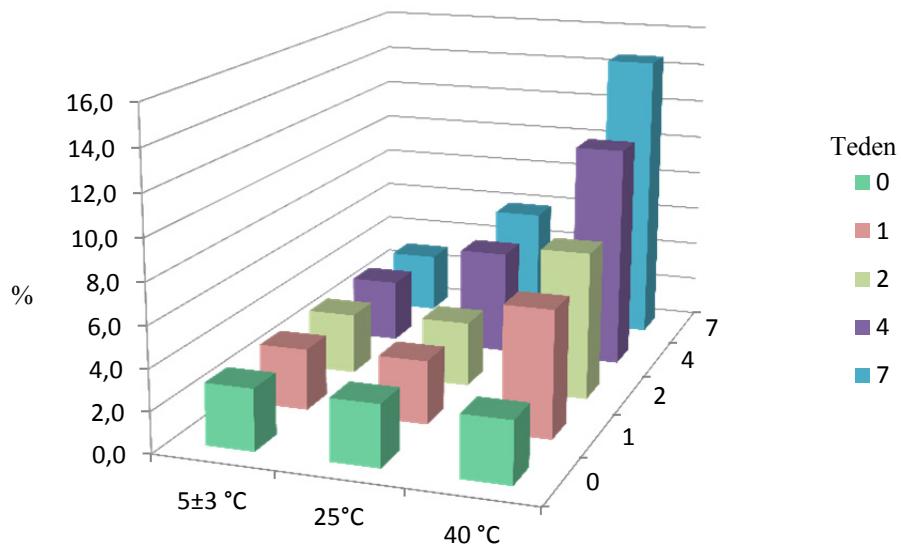
Točka testiranja [teden]				Pogoji hranjenja					
	SSN [%]	Ox [%]	Deam [%]	SSN [%]	Ox [%]	Deam [%]	SSN [%]	Ox [%]	Deam [%]
	5±3 °C			25 °C			40 °C		
0	3,0	1,0	2,0	3,0	1,0	2,0	3,0	1,0	2,0
1	3,0	1,0	2,0	3,1	1,1	2,0	6,2	1,5	4,7
2	3,0	1,1	2,0	3,2	1,2	2,0	7,3	1,9	5,4
4	3,1	1,1	2,0	5,2	1,3	3,9	11,1	2,9	8,2
7	3,0	1,1	2,0	5,9	1,6	4,3	14,6	3,8	10,7

Preglednica 38: Nečistote konjugata P2 določene z RP-HPLC
Table 38: Impurities of P2 conjugate determined by RP-HPLC

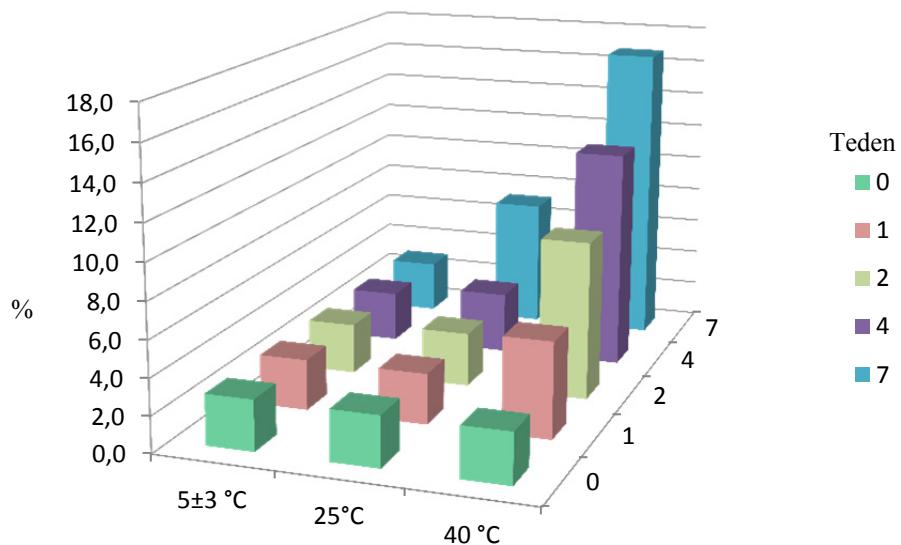
Točka testiranja [teden]				Pogoji hranjenja					
	SSN [%]	Ox [%]	Deam [%]	SSN [%]	Ox [%]	Deam [%]	SSN [%]	Ox [%]	Deam [%]
	5±3 °C			25 °C			40 °C		
0	2,8	1,0	1,8	2,8	1,0	1,8	2,8	1,0	1,8
1	2,8	1,0	1,8	2,8	1,1	1,8	5,3	1,5	3,8
2	2,8	1,0	1,8	3,0	1,2	1,9	8,8	3,5	5,3
4	2,8	1,1	1,8	3,4	1,3	2,1	12,2	4,6	7,5
7	2,9	1,1	1,9	7,2	2,7	4,5	16,8	6,6	10,2

Preglednica 39: Nečistote konjugata P3 določene z RP-HPLC
Table 39: Impurities of P3 conjugate determined by RP-HPLC

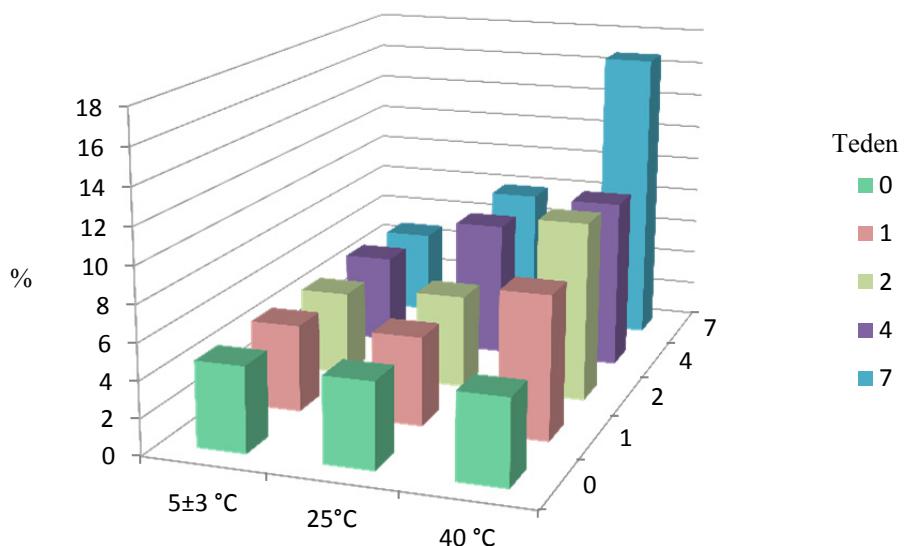
Točka testiranja [teden]				Pogoji hranjenja					
	SSN [%]	Ox [%]	Deam [%]	SSN [%]	Ox [%]	Deam [%]	SSN [%]	Ox [%]	Deam [%]
	5±3 °C			25 °C			40 °C		
0	4,7	2,8	1,9	4,7	2,8	1,9	4,7	2,8	1,9
1	4,8	2,9	1,9	4,9	2,9	2,0	7,9	3,7	4,2
2	4,7	2,8	1,9	5,2	3,2	2,0	10,0	4,7	5,2
4	5,0	3,1	1,9	7,6	3,5	4,1	9,5	2,4	7,1
7	4,8	2,9	1,9	7,9	3,8	4,1	16,7	6,7	10,0



Slika 41: Grafični prikaz sorodnih snovi in nečistot - konjugat P1
 Figure 41: Graphic presentation of product related substances and impurities - P1



Slika 42: Grafični prikaz sorodnih snovi in nečistot - konjugat P2
 Figure 42: Graphic presentation of product related substances and impurities - P2



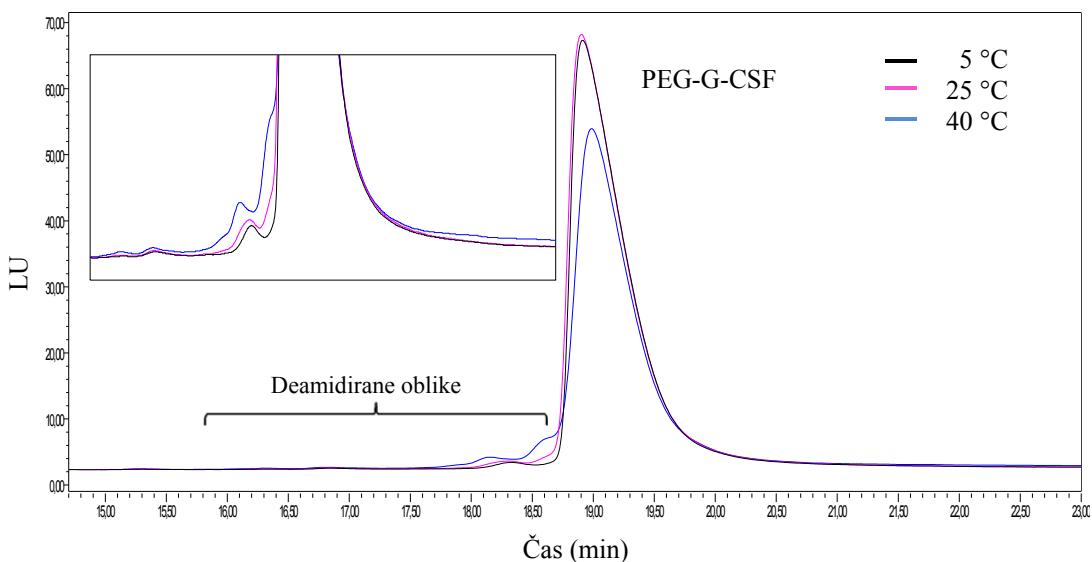
Slika 43: Grafični prikaz sorodnih snovi in nečistot - konjugat P3

Figure 43: Graphic presentation of product related substances and impurities - P3

Rezultati analize CE-HPLC

Rezultati analize CE-HPLC so prikazani v preglednicah 40, 41, 42. Z rezultati smo potrdili trend, ki smo ga opazili pri vrednotenju rezultatov analize RP-HPLC. Vsi konjugati so stabilni pri temperaturi hranjenja 5 ± 3 °C skozi celotno obdobje testiranja. V zadnjih dveh točkah testiranja opazimo nekoliko povečano razgradnjo pri temperaturi hranjenja na 25 °C. Razgradne produkte detektiramo že v prvi točki testiranja pri temperaturi hranjenja na 40 °C in naraščajo tokom testiranja stabilnosti. Porast deamidiranih oblik je razviden tudi iz kromatogramov vzorcev. Kromatografski vrh pred glavnim vrhom konjugatov je bistveno bolj izrazit pri temperaturi 40 °C (Slika 44). Konjugati imajo za posamezno točko in pogoj testiranja primerljiv kromatografski profil. Na sliki 44 je prikazan primer profila po 7 tednih hranjenja na različnih temperaturah za konjugat P1.

Največji delež nečistot (kisle oblike) predstavljajo deamidirane oblike, ki jih detektiramo tudi z ortogonalno kromatografsko metodo RP-HPLC. Iz primerjave rezltatov je razvidno, da je delež določenih deamidiranih oblik med analizama RP-HPLC in CE-HPLC primerljiv med različnimi pogoji testiranja za vse konjugate.



Slika 44: Primer kromatografskega profila CE-HPLC konjugatov pri različnih temperaturah hranjenja po 7 tednih za konjugat P1 (5 ± 3 °C, 25 °C in 40 °C)

Figure 44: Example of the CE-HPLC chromatogram for the conjugat P1 after 7 weeks storage at different temperatures (5 ± 3 °C, 25 °C and 40 °C)

Preglednica 40: Nečistote (kisle oblike) - konjugat P1

Table 40: Impurities (acidic variants) - P1

Točka testiranja [teden]	Pogoji hranjenja		
	5±3 °C	25 °C	40 °C
0		1,0	
1	1,1	1,2	2,0
2	1,2	1,2	2,5
4	1,2	2,0	3,9
7	1,1	2,2	5,7

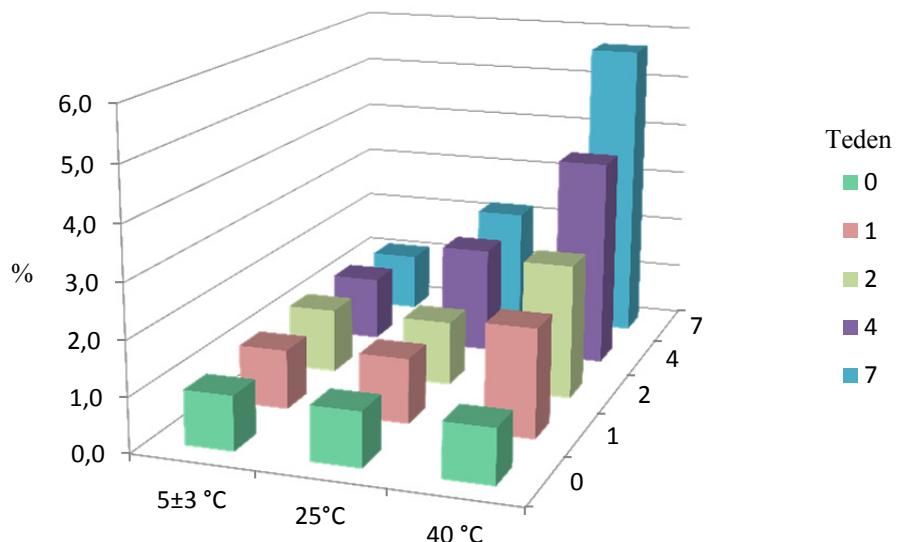
Preglednica 41: Nečistote (kisle oblike) - konjugat P2

Figure 41: Impurities (acidic variants) - P2

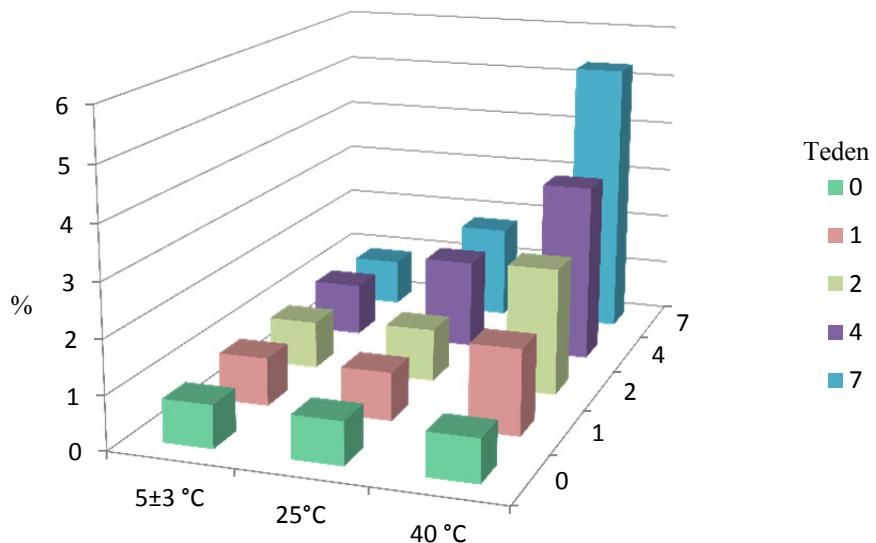
Točka testiranja [teden]	Pogoji hranjenja		
	5±3 °C	25 °C	40 °C
0		0,8	
1	0,9	0,9	1,6
2	0,9	1,0	2,4
4	1,0	1,7	3,4
7	0,9	1,8	5,3

Preglednica 42: Nečistote (kisle oblike) - konjugat P3
 Table 42: Impurities (acidic variants) - P3

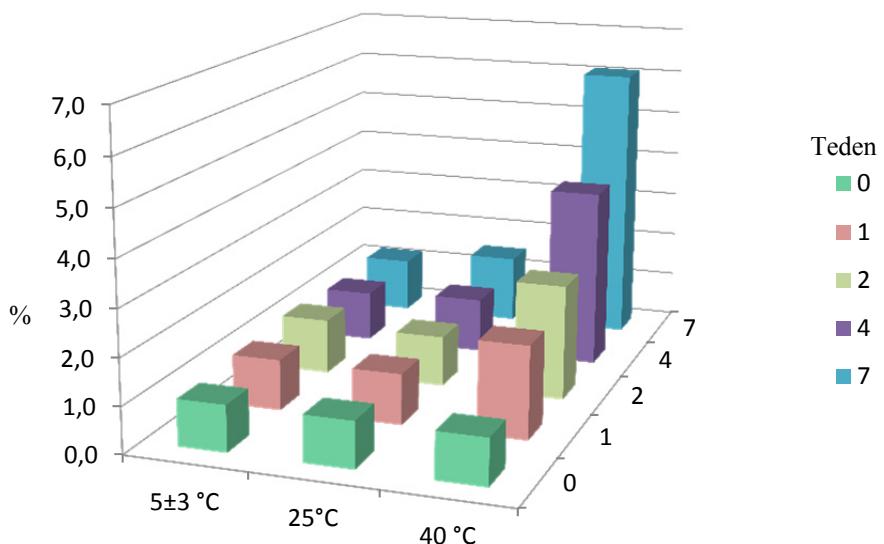
Točka testiranja [teden]	Pogoji hranjenja		
	5±3 °C	25 °C	40 °C
	Nečistote [%]		
0		1,0	
1	1,1	1,1	2,0
2	1,2	1,1	2,5
4	1,1	1,2	3,9
7	1,2	1,5	6,1



Slika 45: Grafični prikaz nečistot (kislih oblik) - konjugat P1
 Figure 45: Graphic presentation of impurities (acidic variants) - P1



Slika 46: Grafični prikaz nečistot (kislih oblik) - konjugat P2
 Figure 46: Graphic presentation of impurities (acidic variants) - P2



Slika 47: Grafični prikaz nečistot (kislih oblik) - konjugat P3
 Figure 47: Graphic presentation of impurities (acidic variants) - P3

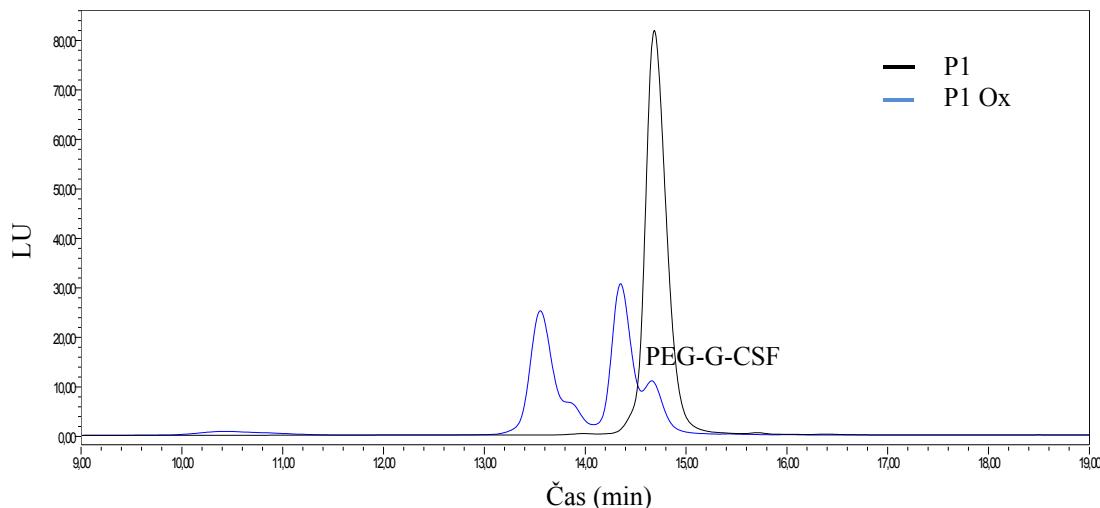
Vpliv oksidacije

Konjugate P1, P2 in P3 smo izpostavili 3% raztopini vodikovega peroksida (poglavlje 3.2.4) ter jih nato analizirali z metodo RP-HPLC, s katero smo detektirali oksidirane oblike. Zaradi razlik v hidrofobnosti so se oksidirane oblike eluirale pred vrhom konjugata. Vrednotili smo jih kot površinski odstotek. Rezultati so prikazani v preglednici 43. Iz rezultatov je razvidno, da so vsi konjugati izrazito občutljivi na oksidativni stres, saj so se v danih pogojih skoraj v celoti razgradili. Razgradnja je dobro razvidna tudi iz primerjave kromatogramov vzorcev izhodnih konjugatov in konjugatov, ki so bili izpostavljeni oksidaciji (Slika 48, 49, 50).

Preglednica 43: Rezultati – vpliv oksidacije

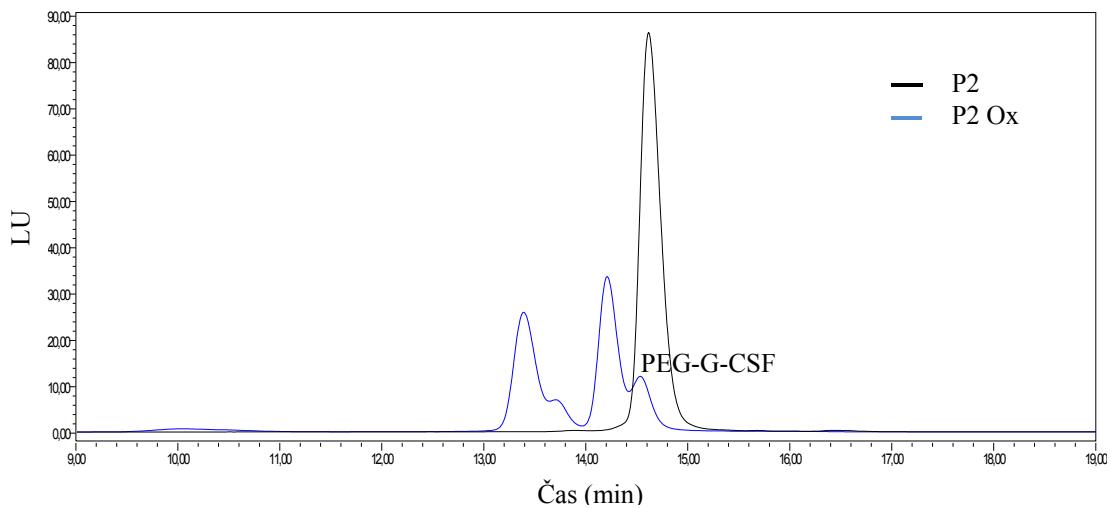
Table 43: Results – oxidative stress

Vzorec	SSN	Ox [%]	Deam
P1	86,0	85,2	0,9
P2	84,9	84,4	0,5
P3	90,8	90,1	0,7



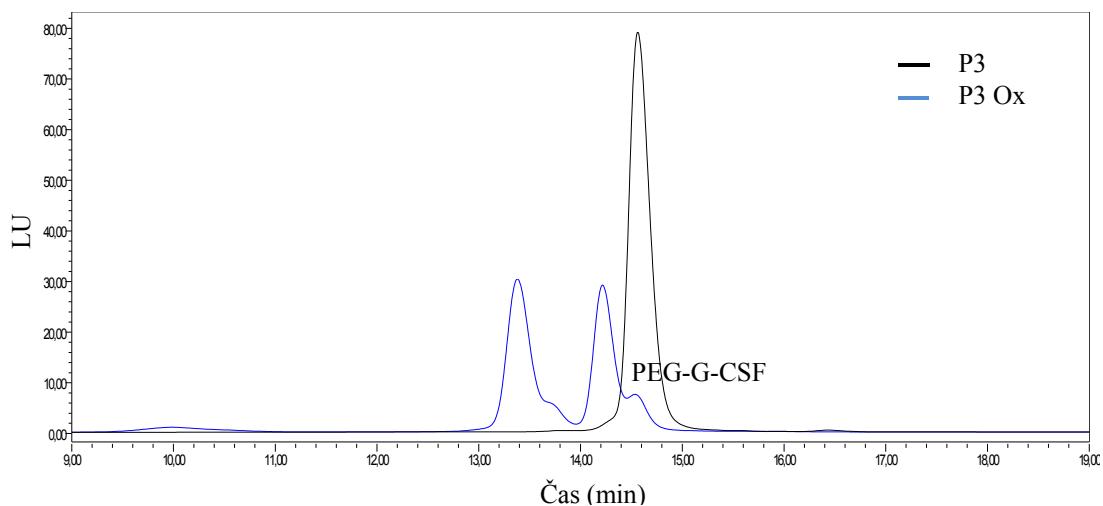
Slika 48: Primerjava kromatogramov izhodnega in oksidiranega konjugata P1

Figure 48: Comparison of chromatograms of incoming conjugate and oxidized conjugate P1



Slika 49: Primerjava kromatogramov izhodnega in oksidiranega konjugata P2

Figure 49: Comparison of chromatograms of incoming conjugate and oxidized conjugate P2



Slika 50: Primerjava kromatogramov izhodnega in oksidiranega konjugata P3

Figure 50: Comparison of chromatograms of incoming conjugate and oxidized conjugate P3

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 OSNOVNA KARAKTERIZACIJA REAGENTOV POLIETILEN GLIKOLA

Derivatizacija reagentov PEG z različnimi funkcionalnimi skupinami

Pri uporabi reagentov PEG za modifikacijo proteinov je čistost reagenta ena najpomembnejših karakteristik reagenta. PEG nima absorpcijskih lastnosti in analitika s klasičnimi detektorji, kot sta detektor UV in detektor za zaznavanje fluorescence, praviloma ni mogoča. Mogoča je le v primeru, ko funkcionalne skupine reagenta absorbirajo v UV.

Nereaktivne nečistote lahko zaznamo samo z detektorji, ki zaznavajo UV-nevidne delce. Taka detektorja sta Corona in detektor za zaznavanje sprememb v lomnem količkinu (RI). Detektor Corona je primeren za analitske metode, ki v mobilnih fazah ne vsebujejo soli, saj tudi sol zazna kot delec in je šum ozadja prevelik, da bi iz njega izločili signal analizirane molekule. Primeren je torej za analize RP-HPLC. Z RP-HPLC smo uspeli dobro ločiti nečistote od glavnega vrha (Slika 5 - PEG-CHO in Slika 15 - PEG-MAL in PEG-NHS), upoštevati pa moramo, da s Corono zaznamo oboje, tako reaktivne kot nereaktivne molekule. Da ločimo med njimi, potrebujemo dodatno informacijo. To dodatno infomacijo lahko dobimo z derivatizacijo reagentov, o kateri bomo govorili v nadaljevanju.

Detektor RI je primeren zgolj za izokratske metode, saj mora biti referenčna detektorska celica ves čas napolnjena z identično sestavo mobilne faze kot je mobilna faza, ki potuje skozi merilno celico. Detektor RI bi lahko uporabli za analize reagentov s SE-HPLC, vendar se za to analizo za določanje deleža nečistot nismo odločili. SE-HPLC ločuje molekule zgolj po razlikah v velikosti, uspešno bi torej lahko ločili zgolj nečistote z bistveno večjo ali bistveno manjšo velikostjo od reagenta PEG. V nasprotju s SE-HPLC nam je za naš namen metoda RP-HPLC dala več informacij. RP-HPLC ločuje molekule po hidrofobnosti. Bistveno večje ali bistveno manjše molekule od reagenta PEG imajo različno hidrofobnost in se na reverzni fazah dobro ločijo, poleg tega pa se na reverzni fazah dodatno lahko ločijo enako velike molekule, ki se med seboj razlikujejo po hidrofobnosti. Prisotnost nereaktivnih nečistot sicer ne predstavlja težav, saj zaradi odsotnosti funkcionalne skupine ne more priti do reakcije s proteinsko molekuljo. Delež nereaktivnih molekul bi bil pomemben zgolj v primeru, da bi predstavljal znaten delež in bi bilo potrebno v pegilacijskih mešanicah povečati prebitke reagenta. Reaktivne nečistote se zaradi prisotne funkcionalne skupine tekom pegilacijske reakcije vežejo na protein in tako predstavljajo procesne nečistote v končnem izdelku.

Za določanje deleža reaktivnih nečistot potrebujemo analitske metode, ki zaznajo prisotnost funkcionalne skupine. V primeru aldehidnih reagentov PEG je nujna derivatizacija, saj skupina CHO ne absorbira. Aldehidne reagente smo uspešno derivatizirali s para-aminobenzojsko kislino (PABA). Iz primerjave kromatogramov Corona in UV (Slike 5 in 6) vidimo, da sta od treh glavnih nečistot, ki ju vidimo na kromatogramu Corona, reaktivni nečistoti samo dve. Z integracijo kromatograma UV lahko določimo delež reaktivnih nečistot v reagentu.

S PABA smo poskušali derivatizirati tudi reagente NHS, vendar poskus ni bil uspešen (Slika 7). Skupina NHS v vodnih medijih zelo hitro razpada in predvidevali smo, da je to vzrok slabe derivatizacije v poskusu #1. V poskusu #2 smo zato derivatizacijo izvedli v DMSO, vendar je bila povsem neuspešna - na kromatogramu UV nismo zaznali vrhov. Nadaljevali smo s poskusi derivatizacije reagenta NHS z dvema fluoresceinoma, 6-aminofluoresceinom in izoaminofluoresceinom. Z obema molekulama je do derivatizacije prišlo, vendar je bil signal glavnega vrha tako šibek, da nismo zaznali nobene nečistote in smo sklepali, da se je derivatiziral le majhen delež molekul.

Reagente PEG-MAL smo poskušali derivatizirati z merkaptopropionsko kislino (MPA), DTNB in fluoresceinom SAMSA. Reagentu PEG-MAL se je po vezavi MPA absorbanca znižala, ter po vezavi DTNB ali fluoresceina SAMSA povečala. Derivatizacija z MPA ni primerna za analitiko reagentov PEG-MAL. DTNB in SAMSA pa sta reagentu PEG-MAL signal ojačala premalo, da bi zaznali nečistote.

Ob pregledu kromatogramov nederivatiziranih vzorcev smo ugotovili, da funkcionalna skupina reagenta PEG-MAL nudi dovolj močen signal v UV, da za analizo čistosti derivatizacije ne potrebujemo (Slika 16). Na kromatogramu, posnetem z detektorjem Corona, vidimo, da smo z analizo RP-HPLC uspeli dobro ločiti nečistote od glavnega vrha. Na kromatogramu, posnetem v UV pa vidimo, da sta obe ločeni nečistoti reaktivni nečistoti. Z integracijo kromatograma UV lahko za reagente PEG-MAL neposredno določimo delež reaktivnih nečistot.

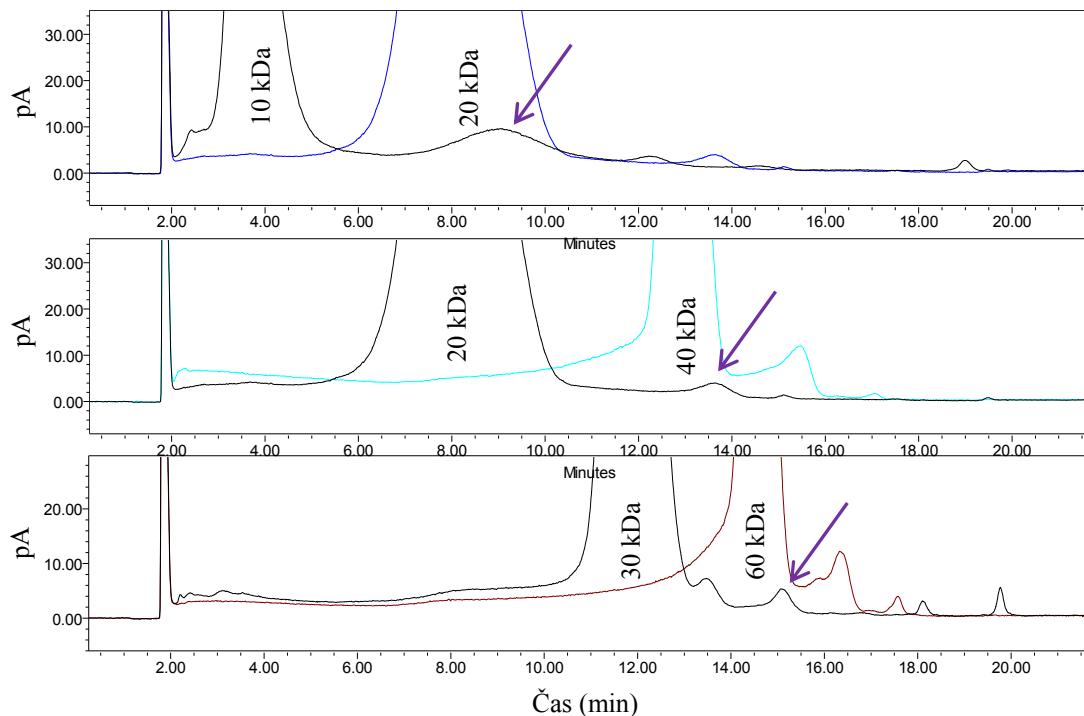
Tudi kromatogram reagenta PEG-NHS, posnet z detektojem Corona, kaže, da smo z analizo RP-HPLC uspeli dobro ločiti nečistote od glavnega vrha in tudi funkcionalna skupina NHS absorbira v UV. Najverjetneje je možno tudi PEG-NHS analizirati neposredno, brez predhodne derivatizacije, je pa signal je v primerjavi z maleimidno skupino bistveno šibkejši (Slika 15). Zagotovo je delno vzrok temu hitro potekajoča hidroliza skupine NHS v vodnih medijih. Signal na kromatogramu UV v našem poskusu je prešibek, da bi zaznali nečistote. Za zagotovitev ustrezno visokega signala, bi lahko še testirali naslednje: večji nanos vzorca, priprava (razapljanje) vzorca tik pred injiciranjem, razapljanje vzorca v DMSO namesto v vodnem pufru.

Karakterizacija reagentov PEG različnih velikosti

Analiza RP-HPLC z detektorjem Corona je ustrezna za analizo širokega razpona molekulskeih mas reagentov PEG. Metoda omogoča dobro ločevanje reagentov po velikosti in dobro ločevanje nečistot. V primeru aldehidnih reagentov bi z enako metodo lahko določali tudi delež reaktivnih nečistot - reagente bi derivatizirali s PABA ter namesto detektorja Corona uporabili detektor UV.

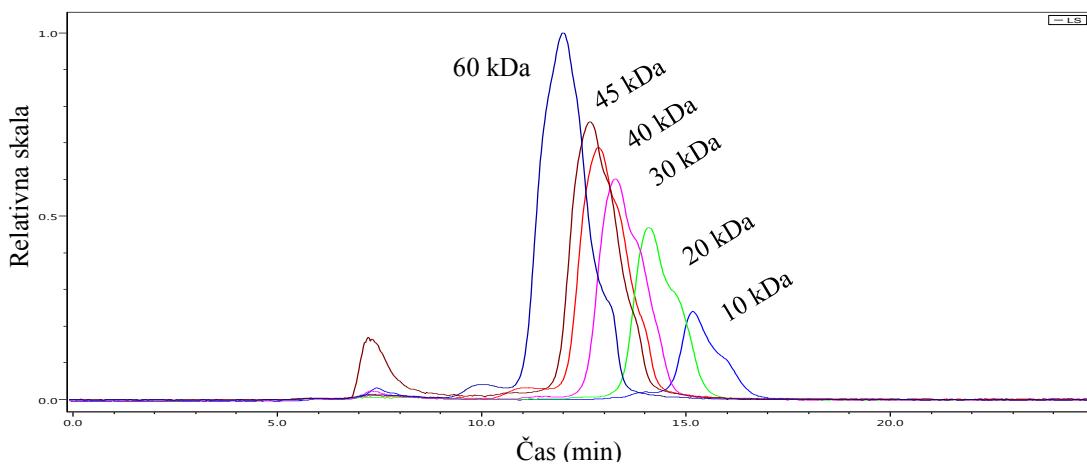
Retenzijski časi ene od nečistot posameznih reagentov nakazujejo, da morda zaznamo nečistote označene s puščico, ki ustrezajo dvakratni velikosti reagenta (Slika 51). Ujemanje retenzijskih časov sicer ni zelo dobro, vendar je vzrok za to lahko več. Slabo ujemanje retenzijskih časov je lahko posledica dejstva, da so molekulske mase reagentov 10 kDa, 20 kDa in 30 kDa samo približno 10 kDa, 20 kDa oziroma 30 kDa. Za te reagente nimamo na voljo certifikatov proizvajalcev o točnih molekulskeih masah, razlike v molekulskeih masah

pa močno vplivajo na hidrofobnost molekul in s tem na retensijski čas. Da reagenti PEG vsebujejo nečistote z večjo molekulske maso, smo potrdili z analizo SE-HPLC-RI, s katero smo določili tudi molekulske mase tako glavnega vrha kot nečistot. Rezultati so prikazani v nadaljevanju.



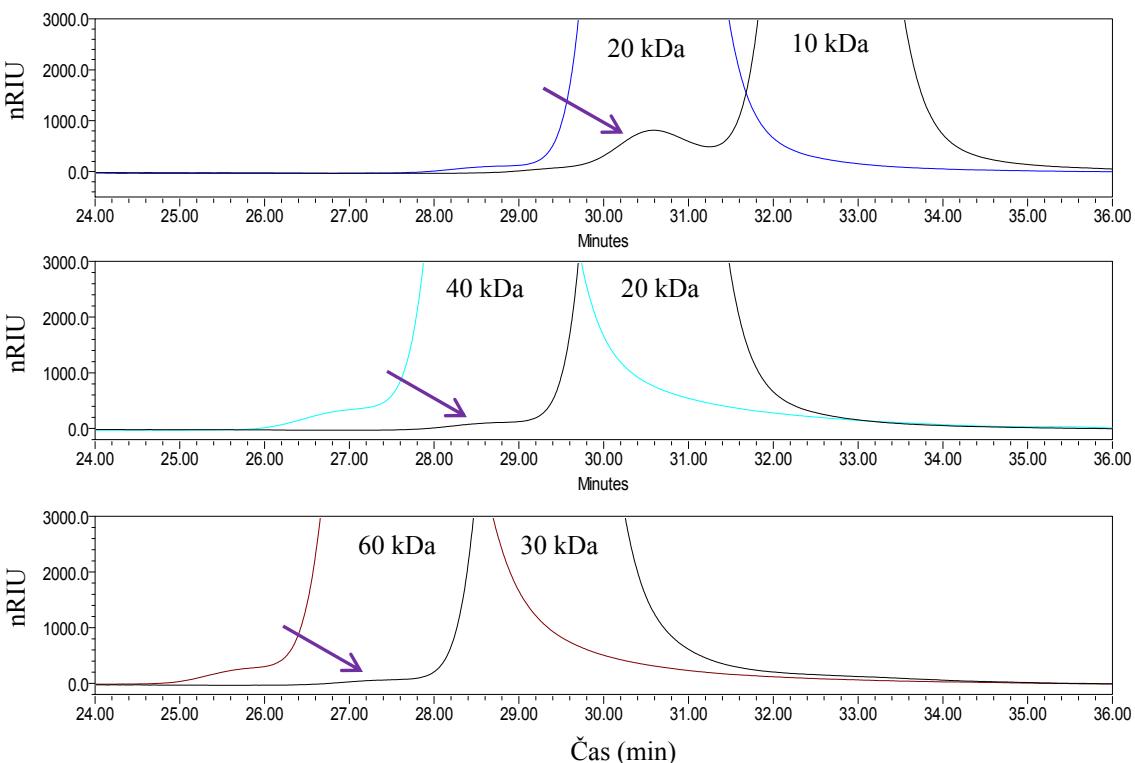
Slika 51: Nečistote reagentov PEG različnih velikosti
Figure 51: Impurities of PEG reagents of different sizes

Molekulske mase reagentov smo določili z metodo SE-HPLC na dva načina: neposredno z detekcijo sipanja svetlobe (MALS) in posredno s pomočjo umeritvene krivulje (RI). Slika 52 prikazuje razlike v intenziteti odziva za reagente PEG različnih velikosti. Sipanje svetlobe je odvisno od velikosti delcev in večje molekule svetlobo sipajo močneje, zato pri večjih molekulah pri enakem nanosu zabeležimo močnejši signal. Kot smo pokazali pri rezultatih smo ustrezne in primerljive rezultate molekulske mas izmerili pri 200 in 500 µg nanosih, kar pa je za kolono SE-HPLC, ki smo jo uporabili, izjemo velik nanos. Predvidevamo, da je ta izjemna velikost nanosa tudi vzrok, da oblika vrhov ni več simetrična, pri vseh reagentih opazimo ramo na desni strani glavnega vrha. Na določanje molekulske mas to ne vpliva, saj program oceni velikost populacije vseh delcev v posameznem vrhu. Nesimetrični vrhi so nastali tudi pri 100 µg nanosih. Če primerjamo sliko 52 s sliko 18, kjer smo na isti kromatografski koloni analizirali 40 µg nanose derivativiziranih 30 kDa reagentov PEG, vidimo, da je kromatografska ločba reagentov pri nižjih nanosih ustrezna in vrhovi simetrični.



Slika 52: Razlike v odzivu sisanja svetlobe (MALS) za reagente PEG različnih velikosti pri enakem nanosu
 Figure 52: Differences in MALS signal intensities of different sizes of PEG reagents at equal loads

Slika 52 podobno kot slika 53 prikazuje nečistote reagentov PEG različnih velikosti, tokrat z ločbo SE-HPLC in detekcijo RI. Nečistote, označene s puščico, po potovanju ustrezajo približno dvakratni masi velikosti reagenta, kar potrjujejo tudi izmerjene molekulske mase (Preglednica 17).



Slika 53: Nečistote HMW reagentov PEG različnih velikosti
 Figure 53: HMW impurities of PEG reagents of different sizes

Molekulske mase reagentov, določene z metodama MALS (neposredno) in RI (umeritvena krivulja), so primerljive (Preglednici 16 in 17). Največje odstopanje, 2,0 kDa, smo izračunali pri 60 kDa reagentu. Odstopanja so: 10 kDa reagent - 0,2 kDa (10,1 kDa, 10,3 kDa), 20 kDa reagent - 1,2 kDa (20,1 kDa, 21,3 kDa), 30 kDa reagent - 1,2 kDa (30,4 kDa, 31,6 kDa), 40 kDa reagent - 0,1 kDa (37,3 kDa, 37,4 kDa), 45 kDa reagent - 1,1 kDa (42,0 kDa, 40,9 kDa) in 60 kDa reagent - 2,0 kDa (56,9 kDa, 54,9 kDa).

Rezultati metode SE-HPLC-RI z uporabo umeritvene krivulje so bolje ponovljivi kot SE-HPLC-MALS. Metoda SE-HPLC-RI omogoča enostavno in hitro kontrolo velikosti reagentov PEG, medtem ko metoda RP-HPLC z detektorjem Corona omogoča enostavno in hitro ločevanje nečistot po hidrofobnosti. Kot smo pokazali v poglavju 4.2.1, pa enaka metoda RP-HPLC z uporabo detektorja UV omogoča tudi enostavno in hitro določanje deleža reaktivnih nečistot za derivatizirane aldehidne reagente PEG.

5.2 PRIMERJAVA KAKOVOSTI REAGENTOV PEG IN KAKOVOSTI KONJUGATOV

Reagent PEG po vezavi na protein predstavlja znaten del učinkovine, zato je njegova kakovost pomemben del kakovosti končnega konjugata. Iz preglednice 44 je razvidno, kateri 30 kDa aldehidni reagent PEG je sestavni del določenega konjugata PEG-G-CSF.

Preglednica 44: Reagenti PEG in pripadajoči konjugati

Table 44: PEG reagents and its conjugates

Reagent PEG	Konjugat
PEG 1	P1
PEG 2	P2
PEG 3	P3

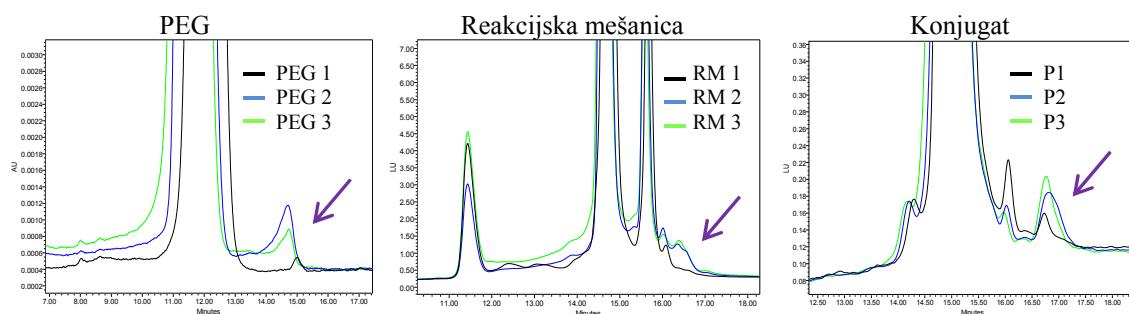
Čistost reagenta PEG lahko neposredno vpliva na čistost konjugata, saj se reaktivne nečistote lahko vežejo na protein. V preglednici 45 je prikazana primerjava čistosti RP-HPLC reagentov PEG (delež reagenta PEG z aktivno funkcionalno skupino glede na prisotne raktivne nečistote) in čistosti pripadajočih reakcijskih mešanic in končnih konjugatov (delež monopegiliranega proteina).

Preglednica 45: Reagenti PEG, reakcijske mešanice in pripadajoči konjugati

Table 45: PEG reagents, reaction mixtures and their conjugates

PEG	Čistost [%]	Reakcijska mešanica	Čistost [%]	Konjugat	Čistost [%]
PEG 1	99,0	RM P1	71,1	P1	97,7
PEG 2	97,7	RM P2	66,4	P2	97,9
PEG 3	96,8	RM P3	64,1	P3	96,0

Z metodo RP-HPLC smo določili največjo čistost reagentu PEG 1, zaporedno sta sledila PEG 2 in PEG 3. Sorazmerno se je kakovost reagentov PEG odražala tudi v čistosti reakcijskih mešanic (RM) konjugatov v procesu pegilacije. Največjo čistost oziroma delež monopegiliranega proteina smo določili RM konjugata P1, sledila je mešanica konjugata P2 in nato konjugata P3. Prav tako je iz primerjave kromatografskega profila derivativiziranih reagentov PEG, reakcijskih mešanic in konjugatov (Slika 54) razvidno, da sta profila reagentov PEG 2 in PEG 3 primerljiva, kot sta tudi primerljiva profila RM P2 in P3 ter konjugata P2 in P3. Povsod opazimo povečan delež nečistot, ki se eluirajo za glavnim vrhom (označeno s puščico). Da je prisotnost teh nečistot v reakcijskih mešanicah in končnih konjugatih povezana s kakovostjo reagenta PEG, dokazujejo kromatogrami PEG 1 ter RM P1 in P1. V reagentu PEG 1 je tovrstnih nečistot bistveno manj, posledično skoraj ne zaznamo v RM P1 in jih je bistveno manj v konjugatu P1.



Slika 54: Kromatogrami RP-HPLC reagentov PEG, reakcijskih mešanic in njihovih konjugatov
Figure 54: RP-HPLC chromatograms of PEG reagents, reaction mixtures and their conjugates

Identitete nečistot, ki se eluirajo za glavnim vrhom reagentov PEG, nismo potrjevali. Najverjetnejše pa gre za molekule PEG z večjo molekulsko maso. Pri proizvodnji reagentov med polimerizacijo zaradi prisotnih sledi vode nastaja tudi PEG diol, ki zaradi polimerizacije na obeh koncih lahko doseže precej večjo molekulsko maso od načrtovane (Roberts in sod, 2002). Če so v reagentih PEG prisotne tovrstne molekule z aktivno funkcionalno skupino, se lahko vežejo na protein. V reagentih PEG 1, PEG 2 in PEG 3 smo preverili prisotnost snovi z večjo molekulsko maso z uporabo metode SE-HPLC in zaznali 5 - 6% tovrstnih molekul (rezultati v poglavju 4.2.3.2).

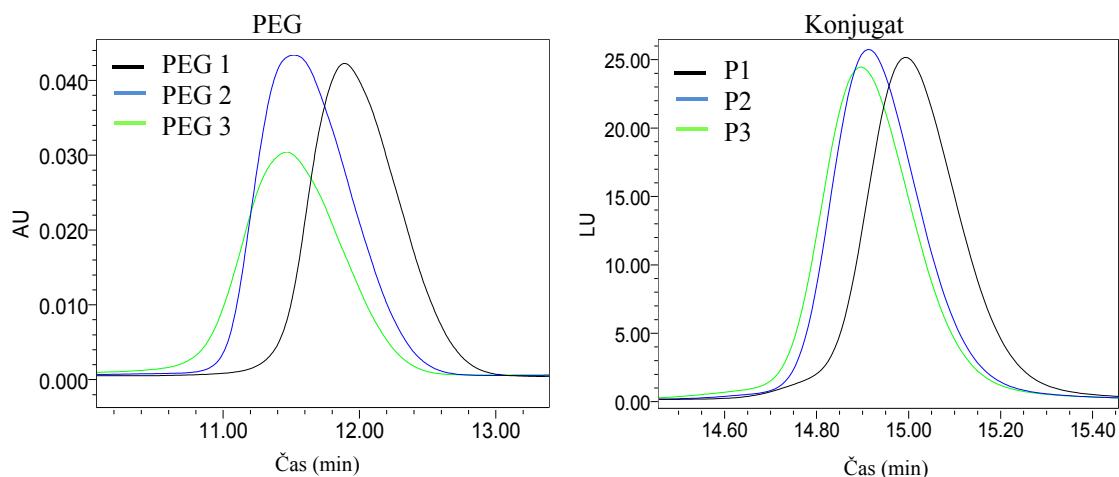
Delež aktivnega reagenta PEG smo določili tudi z analizo AE-HPLC. Od zgoraj omenjene analize RP-HPLC se razlikuje v tem, da smo z RP-HPLC zaznali samo molekule z aktivno funkcionalno skupino (reaktivne nečistote in reaktivni PEG), z AE-HPLC pa smo zaznali tako aktivne kot neaktivne molekule in rezultat terminalne aktivnosti predstavlja celokupen delež molekul z aktivno funkcionalno skupino glede na delež neaktivnih molekul. Rezultati so prikazani v preglednici 46. Največji delež aktivnih funkcionalnih skupin (terminalno aktivnost) smo določili reagentu PEG 2. Ne glede na rezultate za terminalno aktivnost, ki vpliva na izkoristek pegilacije, smo največjo čistost oziroma delež monopegiliranega proteina določili RM konjugata P1. Kaže, da bi na ta rezultat lahko vplivalo dejstvo, da reagent PEG 1 vsebuje tudi najnižji delež reaktivnih nečistot (najvišji odstotek čistosti). Rezultati čistosti oziroma deleža monopegiliranega proteina v RM kažejo, da stopnja terminalne aktivnosti ne vpliva bistveno na konverzijo, kar lahko razložimo z dejstvom, da

v pegilacijski reakciji uporabimo 3-kratni prebitek reagenta PEG, ki je očitno zadosten za kompenzacijo nižje stopnje funkcionalizacije.

Preglednica 46: Čistost in terminalna aktivnost reagentov PEG
Table 46: Purity and terminal activity of PEG reagents

PEG	Čistost [%]	Terminalna aktivnost [%]
PEG 1	99,0	93
PEG 2	97,7	96
PEG 3	96,8	78

Poleg razlik v nečistotah reagentov PEG je na kromatogramih RP-HPLC med reagenti PEG viden tudi zamik v retenzijskih časih. Enak trend je opazen pri retenzijskih časih RP-HPLC konjugatov (Slika 55). Opažene razlike v retenzijskih časih so posledica razlik v molekulski masi reagenta, molekulska masa reagenta PEG pa direktno vpliva na molekulsko maso konjugata. Kraje molekule PEG imajo krajši čas zadrževanja na RP-HPLC kot daljše molekule, enako velja za konjugate s krajšimi molekulami PEGa v primerjavi z daljšimi. Določili smo, da je molekula reagenta PEG 3 in konjugata P3 najbolj hidrofilna (najkrajši PEG) in najbolj hidrofobna sta reagent PEG 1 in konjugat P1. Na kromatogramih RP-HPLC so vidne tudi razlike v širinah vrhov. Širina vrhov reagentov PEG 1 in PEG 2 je primerljiva, medtem ko je širina vrha reagenta PEG 3 opazno večja.



Slika 55: Kromatogrami RP-HPLC PEG 1 in P1, PEG 2 in P2, PEG 3 in P3
Figur 55: RP-HPLC chromatograms of PEG 1 and P1, PEG 2 and P2, PEG 3 and P3

Širina vrhov na kromatogramih RP-HPLC je povezana s polidisperznostjo reagentov PEG. Rezultati so prikazani v preglednici 47. Ugotovili smo, da ima reagent PEG 3 slabšo (širšo) porazdelitev molekulske mase (polidisperznost) v primerjavi z reagentoma PEG 1 in PEG 2, kar se neposredno odraža na polidisperznosti konjugatov, saj so rezultati polidisperznosti konjugatov identični. Rezultatov DLS ne moremo direktno primerjati z rezultati polidisperznosti, določene z uporabo metode SE-HPLC-RI, potrjujejo pa večjo polidisperznost PEG 3 in P3.

Preglednica 47: Polidisperznost reagentov PEG in konjugatov
Table 47: Polydispersity of PEG reagents and conjugates

PEG	Polidisperznost		Konjugat	Polidisperznost	
	RI			RI	DLS [%]
PEG 1	1,04		P1	1,04	20
PEG 2	1,04		P2	1,04	20
PEG 3	1,06		P3	1,06	50

Rezultati molekulskih mas so prikazani v preglednici 48, detekciji RI in UV/RI/MALS pri analizi SE-HPLC dajeta primerljive rezultate za velikost reagentov PEG, obe sta potrdili največjo molekulsko maso PEG 1, sledi velikost PEG 2 in nato velikost PEG 3. S temi rezultati smo potrdili, da je razlika v retenzijskih časih reagentov PEG in konjugatov na kromatogramih RP-HPLC posledica razlik v molekulski masi reagentov: PEG 3 in P3 se pri analizi RP-HPLC eluirata najhitreje, saj je ta PEG najkrajši.

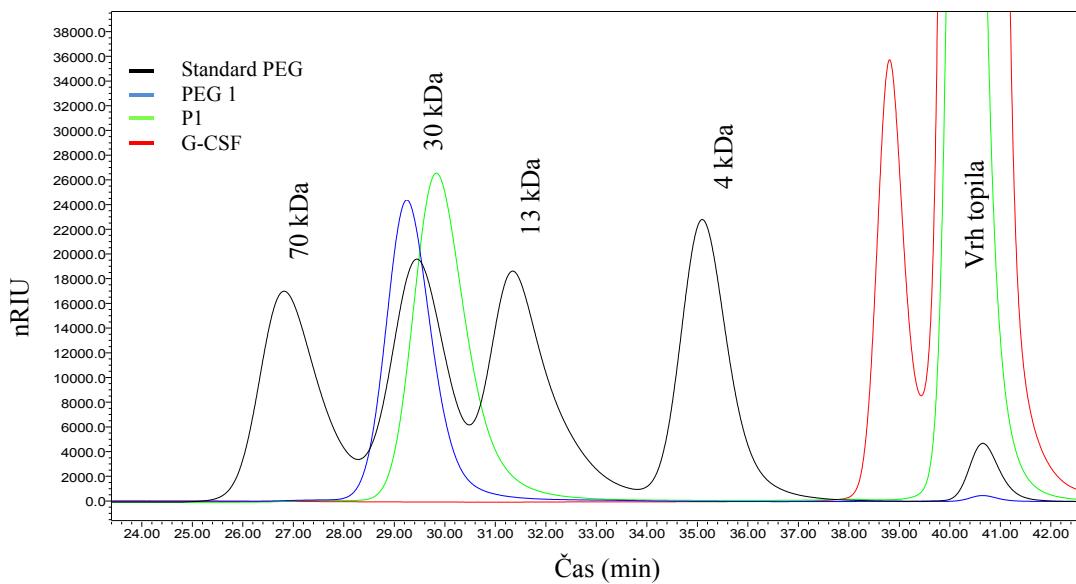
Preglednica 48: Molekulsa masa reagentov PEG in konjugatov
Table 48: Molecular mass of PEG reagents and conjugates

PEG	Molekulsa masa		Konjugat	Celokupna molekulsa masa	
	[kDa] RI	UV/RI/MALS		[kDa] RI	UV/RI/MALS
PEG 1	31,5	30,8	P1	25,7	48,31
PEG 2	30,0	28,9	P2	24,0	46,10
PEG 3	28,9	28,1	P3	23,4	45,71

Celokupne molekulskie mase, izmerjene z uporabo metode SE-HPLC in detekcijo UV/RI/MALS, so znotraj pričakovanj. Rezultati celokupne molekulskie mase konjugatov, določene z uporabo metode SE-HPLC in detekcije RI (Preglednica 48), pa močno odstopajo od dejanske molekulskie mase konjugatov, ki je okoli 50 kDa (18,8 kDa protein in 30 kDa PEG). Z detektorjem RI smo izmerili približno pol manjšo molekulsko maso. Nizke vrednosti izmerjenih molekulskih mas konjugatov so ob uporabi PEG standardov povsem pričakovane. Pri analizi SE-HPLC konjugati tudi dejansko potujejo kot manjše molekule v primerjavi s potovanjem standardov PEG. Reagenti PEG so linearne molekule in predvidevamo, da v raztopini zavzamejo bistveno večji hidrodinamski radij, kot proteini oziroma konjugati, kjer je proteinski del globularen. To predpostavko potrjuje tudi kromatografsko vedenje rhG-CSF: kljub velikosti 18,8 kDa se je eluiral bistveno pozneje kot najmanjši standard PEG (4 kDa). Določanje molekulskih mas z metodo SE-HPLC zahteva uporabo umeritvenih krivulj. Za analizo konjugatov PEG-protein niso primerni ne proteinski standardi kot tudi ne standardi PEG. Znano je namreč, da vsaka etilenoksidna

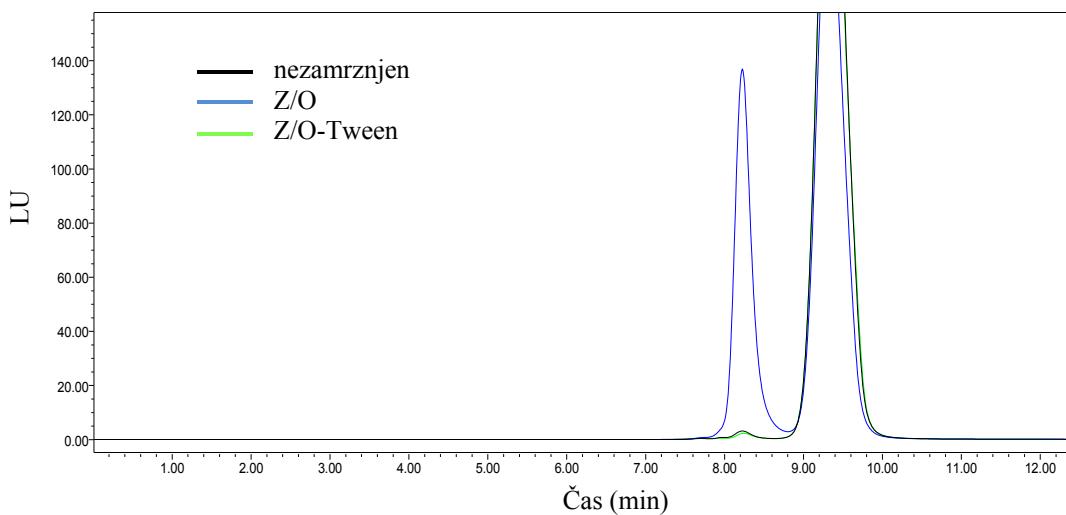
enota PEG veže več molekul vode, zaradi česar se zelo povečata molekulska masa in hidrodinamski volumen. Basu in sod. (2006) navajajo, da reagenti PEG zavzemajo 5 do 10-krat večji volumen kot protein z enako nominalno molekulske maso. Tudi Kusterle in sod. (2008) poročajo, da se tri različne molekule (PEG, konjugat PEG-protein in protein) s približno enako molekulske maso 40 kDa izrazito ločijo z uporabo metode SE-HPLC. Kot največja molekula se eluira PEG, sledi konjugat PEG-protein in kot najmanjši protein.

Primer kromatograma za PEG 1 in P1 je prikazan na sliki 56. Kromatografsko vedenje PEG 2/P2 in PEG 3/P3 je primerljivo.



Slika 56: Kromatografsko vedenje PEG 1, P1 in G-CSF na SE-HPLC z detektorjem RI
Figure 56: Chromatographic behaviour of PEG 1, P1 and G-CSF on SE-HPLC with RI detector

V rezultatih smo že omenili prese netljiv rezultat SE-HPLC stabilitetnih vzorcev konjugatov P1, P2 in P3 in tekom raziskave vzroka smo ugotovili, da je zamrzovanje (in odmrzovanje) induciralo dimerizacijo konjugatov: povečan delež HMW (dimer) smo opazili v vseh vzorcih, ki smo jih do analize hranili zamrznjene in v nobenem od vzorcev, ki smo jih do analize hranili na 5 ± 3 °C. To nas je prese netilo, saj ne znamo razložiti, zakaj bi se konjugati rhG-CSF s prijetim 30 kDa reagentom PEG obnašali drugače kot konjugati rhG-CSF s prijetim 20 kDa reagentom PEG, s katerim podobne izkušnje nimamo. Naravo dimer smo preverili z dodatkom detergenta Tween-80 na zamrznjenem/odmrznjenem (Z/O) konjugatu P1. Kromatografski profil zamrznjenega/odmrznjenega konjugata P1 z dodatkom Tween (Z/O-Tween) pri analizi SE-HPLC je primerljiv vzorcu, ki ni bil izpostavljen zamrzovanju. Tween je povzročil disociacijo dimer (Slika 57).



Slika 57: Kromatogrami konjugatov P1: nezamrznjen , Z/O in Z/O-Tween

Figure 57: Chromatograms of P1 conjugates: non-frozen , frozen/thawed and frozen/thawed-Tween

Z metodo SE-HPLC smo agregacijo ocenili samo na vzorcih, ki niso bili izpostavljeni ciklu zamrzovanja in odmrzovanja (točka 7 tednov). Pri vseh ostalih analizah je bilo kromatografsko vedenje vseh vzorcev pričakovano in smo stabilnost lahko ocenili na vseh vzorcih.

Analiza SE-HPLC z detekcijo MALS in FLD lepo pokaže dinamiko agregacije proteinskih konjugatov pri povišanih temperaturah (Preglednice 34-36, Slike 37-39). Vrh HMW 1 vsebuje dimere in delež dimerov z višanjem temperature ne narašča, poleg tega se narava HMW 1 ne spreminja. Naraščata pa delež HMW 2, poleg tega se z višanjem temperature spreminja njegova narava: velikost oligomerov je pri 40 °C večja kot pri nižjih temperaturah. HMW 3 je vrh, ki vsebuje aggregate in njegov delež pri povečani temperaturi bistveno naraste. Bistvenih razlik med agregacijo posameznih konjugatov po 7 tednih nismo opazili, vsi trije konjugati so primerljivo stabilni oziroma primerljivo občutljivi za temperaturno inducirano agregacijo.

Pri deamidaciji nismo zaznali znatnih razlik med konjugati, ne z metodo RP-HPLC (Deam %) kot tudi ne z metodo CE-HPLC (Nečistote %). Pri vseh konjugatih pri t_0 zaznamo z uporabo metode RP-HPLC okoli 2% in z metodo CE-HPLC okoli 1% deamidiranih variant. Pri vseh konjugatih pri 7 tednih na 40 °C zaznamo z metodo RP-HPLC 10 – 11% in z metodo CE-HPLC 5 – 6% deamidiranih variant. Razlike med rezultati med obema metodama so posledica variabilnosti med posameznimi analitskimi metodami. Obe uporabljeni metodi pa ponujata enak zaključek: med konjugati ni razlik glede občutljivosti za deamidacijo.

Preglednica 49: Delež deam. oblik stabilitetnih vzorcev pri t_0 in po 7 tednih na 40 °C
Table 49: Content of deamidated variants in stability samples at t_0 and after 7 weeks at 40 °C

Konjugat	Deam [%] (RP-HPLC)	Vsota nečistot [%] (CE-HPLC)		
	t_0	7t 40 °C	t_0	7t 40 °C
P1	2,0	10,7	1,0	5,7
P2	1,8	10,2	0,8	5,3
P3	1,9	10,0	1,0	6,1

Razlika med konjugati pa se je pokazala pri analizi RP-HPLC pri določanju oksidiranih variant. Po 7 tednih hranjenja pri temperaturi 40 °C se delež oksidiranih oblik poveča v vseh treh konjugatih, najmanj v P1 in primerljivo več v P2 in P3. Konjugat P3 že pri t_0 vsebuje nekoliko več oksidiranih variant. Tudi ta razlika morda kaže na vpliv kakovosti reagenta PEG na stabilnost konjugatov. Rezultati oksidacije pri t_0 in po 7 tednih na 40 °C so prikazani v preglednici 50.

Preglednica 50: Analiza RP-HPLC stabilitetnih vzorcev pri t_0 in po 7 tednih na 40 °C
Table 50: RP-HPLC analysis of stability samples at t_0 and after 7 weeks at 40 °C

Konjugat	Ox [%] t_0	t_0	
		7t 40 °C	
P1	1,0	3,8	
P2	1,0	6,6	
P3	2,8	6,7	

Ker so bili vsi trije konjugati, P1, P2 in P3, narejeni iz istega izhodnega proteina rhG-CSF, bi teoretično morali vsebovati primerljiv delež oksidiranih variant izhodnega proteina. Dejstvo, da je ob t_0 v konjugatu P3 prisotnih več oksidranih oblik kaže, da se je delež oksidacije povečal tekom pegilacijske reakcije. Predvidevamo, da pegilacijski reagent PEG 3 vsebuje nečistote, ki povzročajo oksidacijo proteina. Tovrstna nečistota bi lahko bili peroksiidi.

Rezultati magistrske naloge potrjujejo temeljno izhodno hipotezo, da kakovost reagentov polietilen glikola neposredno vpliva na kakovost proteinskih konjugatov. Čistost (prisotnost reaktivnih nečistot), molekulska masa in polidisperznost reagentov PEG se neposredno odražajo na čistoti, molekulski masi in polidisperznosti konjugatov. Nakazan je tudi vpliv kakovosti reagentov PEG na stabilnost proteina, saj rezultati kažejo, da je povečan delež oksidiranih oblik pri enem od konjugatov posledica nečistot v reagentu PEG.

Primerjava s podobnimi raziskavami drugih avtorjev je težavna. Tovrstne raziskave znotraj farmacevtske industrije seveda obstajajo, saj so ključne za ustrezeno analitsko karakterizacijo biofarmacevtskih zdravil tako tekom razvoja, kot tudi za nadzor ustreznih kvalitet pri proizvodnji. Ker pa izredno kakovostna analitska karakterizacija predstavlja konkurenčno prednost, je objava izsledkov tovrstnih raziskav temu primerno omejena.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Kakovost reagentov PEG neposredno vpliva na kakovost pegiliranih učinkovin, saj po vezavi predstavljajo znaten delež učinkovine. Posledično je potreba po njihovi karakterizaciji in poznavanju njihove kakovosti ključnega pomena za razvoj in proizvodnjo kakovostne, varne in učinkovite pegilane učinkovine.

Osnovni namen magistrskega dela je bila karakterizacija 30 kDa aldehidnih reagentov polietilen glikola (PEG) in preučevanje vpliva njihove kakovosti na kakovost proteinskih konjugatov. Kot modelni protein smo izbrali protein filgrastim (rhG-CSF), katerega lastnosti so dobro znane. Zaradi nagnjenosti k agregaciji je dober kandidat za pegilacijo, saj mu pripetje reagenta PEG znatno zviša topnost in ga ščiti pred agregacijo. Na voljo so reagenti PEG z različnimi funkcionalnimi skupinami (aldehidna, maleimidna, NHS, itd.), ki omogočajo mestno specifične in nespecifične konjugacije. Funkcionalno skupino reagenta PEG izberemo glede na razpoložljivo aktivno skupino proteina. Za zagotovitev ustrezne in učinkovite primerjave kakovosti reagenta PEG in proteinskega konjugata smo se odločili za izvedbo specifične pegilacije, s katero smo se izognili vezavi reagenta PEG na različna mesta na proteinu in posledično različnemu obnašanju konjugatov. S tem namenom smo izbrali tri linearne aldehidne reagente PEG dolžine 30 kDa (PEG 1, PEG 2 in PEG 3). Z vezavo reagentov PEG na amino skupino N-konca proteina smo pripravili tri konjugate (P1, P2 in P3).

Izvedli smo karakterizacijo 30 kDa reagentov PEG. Dodatno smo določili lastnosti tudi reagentom PEG različnih velikosti in z različnimi funkcionalnimi skupinami. PEG nima absorpcijskih lastnosti in analitika s klasičnimi detektorji, kot sta detektor UV in detektor za zaznavanje fluorescence, praviloma ni mogoča. Posledično smo reagente PEG za te analize predhodno modificirali. Učinkovitost derivatizacije aldehidne (CHO), maleimidne (MAL) in NHS funkcionalne skupine smo preverili z različnimi snovmi, ki absorbirajo (PABA, 6-aminofluorescein, izoaminofluorescein, DTNB, fluorescein SAMSA, merkaptopropionska kislina). Aldehidne reagente smo uspešno derivatizirali s PABA, medtem ko smo ugotovili, da reagentov PEG s funkcionalnima skupinama NHS in MAL predhodno ni potrebno derivatizirati, saj le-ti absorbirata UV. Karakterizacijo 30 kDa reagentov PEG smo izvedli z metodami različnih tipov detekcije RP-HPLC-UV/Corona, SE-HPLC-RI, SE-HPLC-UV/MALS/RI in AE-HPLC-RI. Ugotovili smo, da sta reagenta PEG 1 in PEG 2 kakovostno skoraj primerljiva, medtem ko je reagent PEG 3 nekoliko slabše kakovosti.

Za oceno kakovosti proteinskih konjugatov pa smo primarno uporabili optimizirane analitske kromatografske seperacijske metode z različnimi tipi detekcije (RP-HPLC-FLD, SE-HPLC-FLD, SE-HPLC-RI, SE-HPLC-UV/MALS/RI in CE-HPLC-FLD). Dodatno smo jim spektrofotometrično določili še vsebnost in hidrodinamski radij z analizo DLS. Ugotovili smo, da sta konjugata P1 in P2 kakovostno skoraj primerljiva, medtem ko je konjugat P3 nekoliko slabše kakovosti. Konjugate smo izpostavili še različnim pogojem hranjenja in procesu oksidacije. Konjugati so stabilni pri temperaturi hranjenja 5 ± 3 °C, del razgradnje je možno zaslediti že pri temperaturi 25 °C, medtem ko je porast razgradnih

produktov bistveno večji pri temperaturi 40 °C. Vsi konjugati so pokazali tudi izrazito občutljivost na oksidativni stres.

Z metodo RP-HPLC smo določili največjo čistost reagentu PEG 1, zaporedno je sledila čistost PEG 2 in PEG 3. Sorazmerno se je kakovost reagentov PEG odražala tudi v čistosti reakcijskih mešanic konjugatov v procesu pegilacije. Poleg razlik v nečistotah reagentov PEG je na kromatogramih RP-HPLC med reagenti PEG viden tudi zamik v retenzijskih časih, kar kaže na razlike v njihovi molekulski masi. Enak trend je opazen pri retenzijskih časih RP-HPLC konjugatov. Opažene razlike v retenzijskih časih so posledica razlik v molekulski masi reagenta, molekulska masa reagenta PEG pa direktno vpliva na molekulsko maso konjugata. Ugotovili smo, da sta molekuli reagenta PEG 3 in konjugata P3 najbolj hidrofilni in molekuli reagenta PEG 1 in konjugata P1 najbolj hidrofobni. Na kromatogramih RP-HPLC reagentov PEG so vidne tudi razlike v širinah vrhov. Širina vrhov reagentov PEG 1 in PEG 2 je primerljiva, medtem ko je širina vrha reagenta PEG 3 opazno večja. Širina vrhov na kromatogramih RP-HPLC je povezana s polidisperznostjo reagentov PEG. Rezultati so pokazali, da ima reagent PEG3 večjo polidisperznost (slabšo (porazdelitev molekulske mase) v primerjavi z reagentoma PEG 1 in PEG 2, kar se neposredno odraža na polidisperznosti konjugatov, saj so rezultati njihove polidisperznosti identični.

Rezultati magistrske naloge potrjujejo temeljno izhodno hipotezo, da kakovost reagentov polietilen glikola neposredno vpliva na kakovost proteinskih konjugatov. Čistost (prisotnost reaktivnih nečistot), molekulska masa in polidisperznost reagentov PEG se neposredno odražajo na čistoti, molekulski masi in polidisperznosti njihovih konjugatov. Nakazan je tudi vpliv kakovosti reagentov PEG na stabilnost proteinskega konjugata, saj rezultati kažejo, da je povečan delež oksidiranih oblik pri enem od konjugatov posledica nečistot v reagentu PEG.

6.2 SUMMARY

The quality of the PEG reagents directly influences the quality of the pegylated active ingredients, since after conjugation PEG represents a significant portion of the active ingredient. Consequently the need for their characterization and knowing their quality is of crucial importance for the development of a quality, safe and efficient pegylated active ingredient.

The main purpose of the master study was to characterize 30 kDa aldehyde polyethylene glycol reagents (PEG) and investigate the impact of their quality on the quality of the protein conjugates. Protein filgrastim (rhG-CSF) was selected as a model protein, since its properties are well known. Being prone to aggregation makes it a good candidate molecule for pegylation, since PEG attachment significantly increases its solubility and protects it from aggregation. PEG reagents with different functional groups are available (aldehyde, maleimide, NHS, etc.) which enable site-specific and random conjugations. The functional group is selected based on the available active group on the protein. To ensure an adequate and efficient comparison of PEG reagent and protein conjugate we decided to perform site-specific pegylation. By this we avoided the random PEG attachments to different protein sites and consequently we avoided the different behaviour of conjugates. We selected three linear 30 kDa PEG aldehyde reagents (PEG 1, PEG 2 and PEG 3). By PEG attachment to the N-terminal amino group of the protein we prepared three conjugates (P1, P2 and P3).

We performed characterization of 30 kDa aldehyde PEG reagents. In addition we performed the characterization of PEG reagents of different sizes and functional groups. PEG has no absorption properties and the analytics by classic detectors, such as UV and fluorescence detector, is in general not possible. For this reason PEG reagents were modified prior such analysis. The derivatization efficiency of the aldehyde (CHO), maleimide (MAL) in NHS functional groups was checked by different chromofors (PABA, 6-aminofluorescein, isoaminofluorescein, DTNB, SAMSA fluorescein, mercaptopropionic acid). Aldehyde reagents were successfully derivatized with PABA. It was revealed that NHS and MAL PEG reagents need no prior derivatization since both these functional groups are UV-absorbing. The characterization of the 30 kDa aldehyde PEG reagents was performed by RP-HPLC-UV/Corona, SE-HPLC-RI, SE-HPLC-UV/MALS/RI and AE-HPLC-RI methods. It was demonstrated that PEG 1 and PEG 2 reagents are of almost comparable quality while the quality of PEG 3 is somewhat inferior.

To evaluate the quality of protein conjugates optimized chromatographic separation techniques with different types of detection were used (RP-HPLC-FLD, SE-HPLC-FLD, SE-HPLC-RI, SE-HPLC-UV/MALS/RI and CE-HPLC-FLD). In addition we determined the content of conjugates by spectrophotometry and their hydrodynamic radius by DLS. It was demonstrated that P1 and P2 conjugated are of almost comparable quality while the quality of P3 conjugate is somewhat inferior. The conjugates were also exposed to different storage conditions and oxidation. The conjugates are stable at storage conditions at 5 ± 3 °C, to some extent degradation can already be detected at 25 °C, while the increase in degradation products is significantly higher at 40 °C. All conjugates also showed a distinct sensitivity to the oxidative stress.

Results from RP-HPLC analysis showed that PEG 1 reagent has the highest purity, followed by the purity of PEG 2 and PEG 3. Proportionally, the quality of PEG reagents was reflected in the purity of the conjugation reaction mixtures in the pegylation process. In addition to the differences in the proportion of impurities present in the PEG reagents as well the differences in the retention times (RT) of PEG reagents on the RP-HPLC chromatograms were observed. The observed differences in RT are due to differences in the molecular weight of the PEG reagents. PEG molecular weight directly influences the molecular weight of the conjugate. The molecules of PEG 3 reagent and conjugate P3 are the most hydrophilic and the molecules of PEG 1 reagent and conjugate P1 are the most hydrophobic. In the RP-HPLC chromatograms the differences in the peak width between PEG reagents were observed as well. The peak widths of the PEG 1 and PEG 2 reagents are comparable while PEG 3 has a clearly wider peak width. The polydispersity of PEG reagents is related to the peak width on RP-HPLC chromatograms. The results showed that the molecular weight distribution of the PEG 3 reagent is broader (higher polydispersity) in comparison to the PEG 1 and PEG 2 reagents, which is directly reflected in the polydispersity of the conjugates, since the polydispersity results of the conjugates are identical.

The results of the master study confirmed our core hypothesis that the quality of the protein conjugates is directly affected by the quality of the PEG reagents. Purity (the presence of reactive impurities), molecular weight and polydispersity of the PEG reagents are directly reflected in the purity, molecular weight and polydispersity of their conjugates. The impact of the PEG reagents quality on the protein stability is also indicated, since the results have shown that impurities present in PEG reagent have caused the increased proportion of oxidized variants in one of the conjugates.

7 VIRI

- Abuchowski A., Van Es T., Palczuk N. C., Davis F. F. 1977. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *The Journal of Biological Chemistry*, 252, 11: 3582-3586
- Abuchowski A., McCoy J. R., Palczuk N. C., Van Es T., Davis F. F. 1977. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 252, 11: 3578-3581
- Arakawa T., Prestrelski S. J., Narhi L. O., Boone T. C., Kenney W. C. 1993. Cysteine 17 of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor is partially solvent-exposed. *Journal of Protein Chemistry*, 12, 5: 525-531
- Bailon P., Berthold W. 1998. Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 1, 8: 352-356
- Bailon P., Palleroni A., Schaffer C. A., Spence C. L., Fung W. J., Porter J. E., Ehrlich G. K., Pan W., Xu Z. X., Modi M. W., Farid A., Berthold W. 2001. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: A 40 kD branched polyethylene glycol-conjugated interferon α -2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjugate Chemistry*, 12, 2: 195–202
- Basu A., Yang K., Wang M. L., Liu S., Chintala R., Palm T., Zhao H., Peng P., Wu D., Zhang Z., Hua J., Hsieh M. C., Zhou J., Petti G., Li X., Janjua A., Mendez M., Liu J., Longley C., Zhang Z., Mehlig M., Borowski V., Viswanathan M., Filpula D. 2006. Structure - function engineering of interferon- β -1b for improving stability, solubility, potency, immunogenicity and pharmacokinetic properties by site-selective mono-PEGylation. *Bioconjugate Chemistry*, 17, 3: 618-630
- Biopharma. 2002. Biopharmaceutical products in the U.S and European markets.
<http://www.biopharma.com/approvals.html> (21.12.2015)
- Bönig H., Silbermann S., Weller S., Kirschke R., Körholz D., Janssen G., Göbel U., Nürnberger W. 2001. Glycosylated vs non-glycosylated granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)- results of a prospective randomised monocentre study. *Bone Marrow Transplantation*, 28, 3: 259-26
- Brümmer H. 2011. How to approach a forced degradation study. *Life Science*, 31: 1-4
- Biosimilars of pegfilgrastim. 2015. Generics and biosimilar initiative.
<http://www.gabionline.net/Biosimilars/General/Biosimilars-of-pegfilgrastim> (21.12.2015)
- Caliceti P., Veronese F. M. 2003. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 10: 1261-1277
- Caserman S., Kusterle M., Kunstelj M., Milunović T., Schiefermeier M., Jevševar S., Gaberc Porekar V. 2009. Correlations between in vitro potency of polyethylene glycol-protein conjugates and their chromatographic behavior. *Analytical Biochemistry*, 389, 1: 27-31

- Cegnar M., Obermajer N., Kos J., Kristl J. 2007. Nosilni sistemi za dostavo bioloških učinkovin. V: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljna, Slovensko farmacevtsko društvo: 210-247
- Cooper K. L., Madan J., Whyte S., Stevenso M. D., Akehurst R. L. 2011. Granulocyte colony-stimulating factors for febrile neutropenia prophylaxis following chemotherapy: systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 11, 404, doi: 10.1186/1471-2407-11-404: 11 str.
- Čerkić K. 2012. Zaščitna vloga pegilcije pri stabilnosti zelo hidrofobnega proteina v tekoči farmacevtski obliki. Magistrsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 61 str.
- Doljak B. 2007. Rastni in drugi hematopoezni dejavniki. V: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljna, Slovensko farmacevtsko društvo: 310-336
- Drug Bank. 2015. Filgrasim DB00099.
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00099> (21.12.2015)
- Fidler K. 2011. Priprava in opredelitev dimerov Met-G-CSF in pegiliranih konjugatov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 137 str.
- Fishburn C. S. 2008. The pharmacology of pegylation: balancing PD with PK to generate novel therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 10: 4167-4183
- Fujii I., Nagahara Y., Yamasaki M., Yokoob Y., Itohb S., Hirayama N. 1997. Structure of KW-2228, a tailored human granulocyte colony-stimulating factor with enhanced biological activity and stability. *FEBS Letters*, 410, 2-3: 131-135
- Gaberc Porekar V., Menart V. 2009. Process for the purification and/or isolation of biologically active granulocyte colony stimulating factor. Patent EP1458757 (B1)
- Hamidi M., Rafiei P., Azadi A. 2008. Designing PEGylated therapeutic molecules: advantages in ADMET properties. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 3, 11: 1293-1307
- Harris J. M., Chess R. B. 2003. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2: 214-221
- Hill C. P., Osslund T. D., Eisenberg D. 1993. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 5167-5171
- Ivens I. A., Achanzar W., Baumann A., Brändli-Baiocco A., Cavagnaro J., Dempster M., Depelchin B. O., Irizarry Rovira A. R., Dill-Morton L., Lane J. H., Reipert B. M., Salcedo T., Schweighardt B., Tsuruda L. S., Turecek P. L., Sims J. 2015. Pegylated biopharmaceuticals: current experience and considerations for nonclinical development. *Toxicologic Pathology*, 43, 7: 959-983
- Jevševar S., Gaberc Porekar V., Fonda I., Podobnik B., Grdadolnik J., Menart V. 2005. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnology Progress*, 21, 2: 632-639
- Jevševar S., Kunstelj M., Gaberc Porekar V. 2010. PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnology Journal*, 5: 113-128

- Jevševar S., Menart V. 2010. Synthetic gene coding for human granulocyte-colony stimulating factor for the expression in E. coli. Patent US7655437 (B2)
- Kang J. S., DeLuca P. P., Lee K. C. 2009. Emerging PEGylated drugs. Expert Opinion, 14, 2: 363-380
- Kinstler Q., Molinex G., Treuheit M., Ladd D., Gegg C. 2002. Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)-protein conjugates. Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 4: 477-485
- Kinstler O. B., Gabriel N. E., Farrar C. E., DePrince R.B. 1999. N-terminally chemically modified protein compositions and methods. Patent US5985265 A
- Kou D., Manius G., Zhan S., Chokshi H. P. 2009. Size exclusion chromatography with corona charged aerosol detector for the analysis of polyethylene glycol polymer. Journal of Chromatography A, 1216: 5424-5428
- Kusterle M., Jevševar S., Gaberc Porekar V. 2008. Size of pegylated protein conjugates studied by various methods. Acta Chemica Slovenica, 55, 3: 594-601
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganisms. 9th edition. New Jersey, Prentice Hall: 991 str.
- Means G. E., Feeney R. E. 1995. Reductive alkylation of proteins. Analytical Biochemistry, 224, 1: 1-16
- Menart V., Gaberc Porekar V., Jevševar S. 2004. Process for the production of a heterologous protein. Patent WO 2004/015124 (A1)
- Meyer A., Raba C., Fischer K. 2001. Ion-pair RP-HPLC determination of sugars, amino sugars and uronic acids after derivatization with p-Aminobenzoic acid. Analytical Chemistry, 73, 11: 2377-2382
- Molineux G. 2004. The design and development of pegfilgrastim (PEG-rmetHuG-CSF, Neulasta®). Current Pharmaceutical Design, 10, 11: 1235-1244
- Montaudo G., Samperi F., Montaudo M. S. 2006. Characterization of synthetic polymers by MALDI-MS. Progress in Polymer Science, 31, 3: 277-357
- Ono M. 1994. Physicochemical and biochemical characteristics of glycosylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor (lenograstim). European Journal of Cancer, 30, 3: 7-11
- Pasut G., Veronese F. M. 2007. Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies. Progress in Polymer Science; 32, 9: 933-961
- Piedmonte D. M., Treuheit M. J. 2008. Formulation of Neulasta (pegfilgrastim). Advanced Drug Delivery Review, 60, 1: 50-58
- Podobnik B., Gaberc Porekar V., Menart V. 2007. Razvoj farmacevtskih oblik pri bioloških zdravilih. V: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljna, Slovensko farmacevtsko društvo: 186-207
- Reubaet J. L. E., Beijnen J. H., Bult A., Ed Hop E., Scholten S. D. 1998. Oxidation of recombinant methionyl human granulocyte colony stimulating factor. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 17: 283-289

- Roberts M. J., Bentley M. D., Harris J. M. 2002. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54: 459-476
- Rofail P., Tadros M., Ywakim R., Tadrous M., Krug A., Cosler L. E. 2012. Pegfilgrastim: a review of the pharmacoeconomics for chemotherapy-induced neutropenia. *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research*, 12, 6: 699-709
- Roge A. B., Tarte P. S., Kumare M. M., Shendarkar G. R., Vadvalkar S. M. 2013. Forced degradation study: an important tool in drug development. *APhP*, 3, 4: 198-201
- Touw I. P., Gert-Jan M. van de G. 2007. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal myeloid cell development, leukemia and related blood. *Frontiers in Bioscience*, 12: 800-815
- Van de Geijn G. J. M., Aarts L. H. J., Erkeland S. J., Prasher J. M., Touw I. P. 2003. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal hematopoietic cell development and myeloid disease. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 149: 53-71
- Veronese F. M., Pasut G. 2005. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today*, 10: 1451-1458
- Wang B., Ludden T. M., Cheung E. N., Schwab G. G., Roskos L. K. 2001. Population pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of filgrastim (r-metHuG-CSF) in healthy volunteers. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 28, 4: 321-342
- Welte K., Gabrilove J., Bronchud M. H., Platzer E., Morstyn G. 1996. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood*, 88, 6:1907-1929
- Zink T., Ross A., Lüers K., Cieslar C., Rudolph R., Holak T. A. 1994. Structure and dynamics of the human granulocyte colony-stimulating factor determined by NMR spectroscopy. Loop mobility in a four-helix-bundle protein. *Biochemistry*, 33, 28: 8453-846

ZAHVALA

Z mislijo naj ohramim nekaj prostora v svojem srcu za nemogoče, vam danes pišem NAJLEPŠA HVALA! Ni bilo lahko, vendar mi je z vašo pomočjo uspelo.

Iz srca največja hvala Katarini Fidler in Simoni Jevševar, ki sta mi pomagali vse od začetka pa do konca. Hvala za neprecenljivo podporo in strokovno pomoč. Neizmerno in za večno sem vama hvaležna. Katarini Fidler še posebna zahvala za požrtvovalnost, spodbudo in izjemno vsesplošno pomoč. Predvsem pa za pozitivno energijo, ki mi je v težkih trenutkih dvignila krila.

Hvala Menči Kunstelj za pripravo proteinskih konjugatov, delitev pisarne, nasvete in razprave. Hvala tudi Mateji Kusterle za pomoč pri derivatizaciji reagentov PEG ter vsem ostalim članom oddelka Nove generacije proteinov za gostovanje.

Hvala Urški Kvas za izvedbo analize za določanje terminalne aktivnosti reagentom PEG in Dejanu Arzenšku za izvedbo meritev DLS.

Hvala Nadji Kociper in Jerici Rozman Pungerčar za podarjen čas, da sem lahko končala to magistrsko delo.

Hvala mentorici in članom komisije za pregled magistrskega dela ter dragocene predloge in komentarje.

Zahvala gre tudi vsem mojim najbližnjim za vse spodbudne besede in vero vame. Še posebej hvala Jasmini Božič za potrpežljiv posluh, spodbudne besede in misli. Ostani za vedno kot to magistrsko delo.

Draga moja mami, kot vedno si mi tudi tokrat z vsem srcem in dušo stala ob strani. Moj svet je lepši, ker te imam.

Občutek, ko imaš ob sebi ljudi, ki verjamejo vate in ti pomagajo na poti proti zadanemu cilju, je neprecenljiv. Vsaka spodbuda in pomoč, pa naj se zdi še tako malenkostna, šteje. Zato najlepša hvala vsem za podporo.