

Povzetek

Monoklonska protitelesa so eno izmed najhitreje rastočih razredov zdravilnih učinkovin. Čeprav je njihovo aminokislinsko zaporedje skoraj popolnoma človeško, je zaradi invazivne aplikacije še vedno veliko pozornosti potrebno nameniti omejevanju števila neželenih imunskih odzivov. Ti so največkrat posledica nastanka različnih agregatov v zdravilu. Že zgodaj v razvoju biološkega zdravila je zato potrebno poiskati pogoje, ki učinkovito zavirajo nastanek agregatov, da se zagotovi njegova učinkovitost, varnost in kakovost do konca roka uporabe. Vrednotenje in optimizacija dolgoročne stabilnosti je torej ključen korak v razvoju bioloških zdravil, ki pa je še vedno dolgotrajen in vnaša precej tveganja v razvoj. Do danes namreč še ni bilo nedvoumno pokazano, da povečanje termodinamske in koloidne stabilnosti, kar je v zadnjih letih glavna strategija, vodi v zmanjšanje hitrosti agregacije. Po drugi strani se želi razvoj pospešiti tako, da se primerja prirast agregatov v različnih formulacijah po inkubaciji pri povišanih temperaturah. Tak pristop pa praviloma ne odraža sprememb do konca roka uporabe pri temperaturi shranjevanja, ponavadi tri leta pri 5 °C.

V tem delu predstavljam nekaj različnih pristopov za skrajšanje časa potrebnega za vrednotenje dolgoročne agregacije in s tem pospešitev optimizacije formulacije, s ciljem zmanjšanja hitrosti agregacije prav pri pogojih shranjevanja. Za množico protiteles, ki se uporabljajo v onkologiji, imunološki terapiji, revmatologiji, pri zdravljenju osteoporoze in krvnih boleznih, sem z uporabo kinetičnega mehanizma agregacije, ki vsebuje dve poti, nizko- in visokotemperaturno pot, uspešno opisal podatke agregacije v širokem temperaturnem in koncentracijskem območju. Model natančno napove delež agregatov po treh letih z uporabo podatkov dobljenih v mnogo krajšem časovnem obdobju.

Na obstoj dveh različnih od temperature odvisnih poti razvejan kinetični mehanizem agregacije nakazuje le posredno, zato sem izoliral različne frakcije agregatov izbranega protitelesa mAb1. Analiza kemijskih modifikacij protitelesa v posameznih frakcijah z metodama cIEF in PepMap-MS ter vrednosti aktivacijskih energij je pokazala, da se agregati nastali pri temperaturi značilni za nizkotemperaturno pot pomembno razlikujejo od agregatov nastalih pri temperaturi značilni za visokotemperaturno pot. Poleg razlik v nivoju oksidacije in deamidacije, ti rezultati s pomočjo vpogleda v kristalno strukturo človeškega protitelesa IgG kažejo na možnost, da visokotemperaturno agregacijo spremlja tudi delno razvitje protitelesa.

Analiza agregacije po dveh poteh zahteva obširno študijo za vsako evalvirano formulacijo, kar je za farmacevtski razvoj zelo nepraktično. Poenostavljen kinetični model, ki obravnava agregacijo kot reakcijo (psevdo) prvega reda, omogoča veliko pospešitev in poenostavitev pri razvoju formulacij z vidika agregacije, kadar je koncentracija protitelesa v vrednotenih

formulacijah enaka. Na podlagi stabilnostnih podatkov dobljenih pri vsaj treh temperaturah, pri katerih visokotemperaturna pot ne prispeva k agregaciji, lahko izračunamo dolgoročno hitrost agregacije pri poljubni temperaturi z zadovoljivo natančnostjo. Pri dovolj nizki temperaturi lahko formulacije primerjamo med sabo tudi neposredno in tako kar najhitreje zožimo nabor pomožnih snovi in pogojev, ki uspešno upočasnjujejo agregacijo pri temperaturi shranjevanja.

Navidezna standardna Gibbsova prosta energija denaturacije, dobljena z analizo kemijske denaturacije protitelesa, predstavlja termodinamsko stabilnost, ki je dober pokazatelj nagnjenosti protitelesa k agregaciji. Dobljeni fazni prostor agregacije je razkril, da pri protitelesih z nizko termodinamsko stabilnostjo povečanje le-te bistveno vpliva na upočasnitev agregacije preko zmanjšanja začetne koncentracije intermedata, ki agregira. Pri protitelesih z visoko termodinamsko stabilnostjo pa s spremembo termodinamske stabilnosti vplivamo predvsem na kinetično konstanto nastanka tega intermedata. Posledično je vpliv termodinamske stabilnosti na hitrost agregacije veliko manjši. Tudi analiza toplotne denaturacije ponudi uporabno informacijo za farmacevtski razvoj, in sicer nudi oceno temperature, do katere agregacija po visokotemperaturni poti ne poteka, ki je približno 15 oz. 25 °C nižja od temperatur prehoda pri toplotni denaturaciji domen CH₂ in Fab.

Strategija, ki združuje kinetično in termodinamično analizo povečuje učinkovitost razvoja in proizvodnje bioloških zdravil ter prispeva tudi k boljšemu razumevanju molekularnih mehanizmov agregacije protiteles.