

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП
ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ
СТУДИСКА ПРОГРАМА ПО ФАРМАЦЕВТСКИ НАУКИ
Катедра за аналитика на лекови и фармацевтска хемија



ДОКТОРСКИ ТРУД

**СИНТЕЗА, ФИЗИЧКО-ХЕМИСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И СТУДИЈА ЗА
СТАБИЛНОСТ НА ЛИОФИЛИЗИРАНИ ИМУНОКОНЈУГАТИ НА
ДАРАТУМУМАБ – РАДИОФАРМАЦЕВТСКИ ПРЕПАРАТИ ЗА ЦЕЛНА
ТЕРАПИЈА**

Ментор:

Проф. д-р Емилија Јаневиќ-Ивановска

Кандидат:

Паулина Апостолова

број на индекс: 31168

Штип, септември 2026 г.

Интерен ментор	проф. д-р Емилија Јаневиќ-Ивановска редовен професор Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип, РС Македонија
Екстерен ментор	научен советник д-р Сања Врањеш-Ѓуриќ, насловен професор Институтот за нуклеарни науки „Винча“, Универзитет во Белград, Република Србија
Претседател	проф. д-р Зорица Арсова-Сарафиновска редовен професор Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип, РС Македонија
Член	проф. д-р Елена Дракалска Серсегова редовен професор Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип, РС Македонија
Член	проф. д-р Жан-Франсуа Жестен (Jean-François Gestin) научен советник / директор за истражување во ИНСЕРМ – Универзитет во Нант, Франција.
Научно поле	3.05 Други медицински науки
Научно потполе	3.05.02 Фармација
Научна област	3.05.02.01 Фармацевтска хемија 3.05.02.17 Друго: Радиофармација 3.05.02.08 Применета хемија и фармацевтски анализи
Датум на одбрана	4.9.2026 година
Датум на промоција	_____

Докторската дисертација е труд кој што е животен патоказ. Тоа е процес кој не нè учи само како да истражуваме, туку нè соочува и со трпеливоста, истрајноста и на силата, како секогаш да продолжиме понатаму. Нè учи да ја препознаеме вистинската вредност на луѓето кои остануваат покрај нас низ целиот пат. Секој од нив остави свој белег не само во создавањето на оваа дисертација, туку и во моето лично и професионално созревање.

Искрена и длабока благодарност упатувам до мојот интерен ментор, проф. д-р Емилија Јаневиќ-Ивановска, за довербата и посветеноста во текот на целиот овој пат. Нејзиното искуство и континуирано охрабрување беа од особено значење во сите фази од моето научно и истражувачко работење. Благодарна сум и за сите поддржани иницијативи, кои завршија со заеднички успеси и поддршката која многупати го надминуваше она што подразбира само менторство.

Особена благодарност упатувам до мојот екстерен ментор, проф. д-р Сања Врањеш-Ѓуриќ, за несебично споделеното знаење, довербата и можноста значаен дел од истражувањата да го реализирам во Институтот за нуклеарни науки „Винча“ во Белград. Благодарна сум што таму имав можност да работам, да учам и да бидам дел од средина во која науката се споделува со отвореност и колегијалност. Голема благодарност упатувам и до сите колеги од Институтот кои ме прифатија како дел од тимот и кои со својата стручност, трпение и подготвеност секогаш да помогнат оставија траен белег во моето истражувачко искуство.

Посебно место во овој пат има и мојот престој во Нант, Франција, и истражувачката работа во CRCI²NA – Nantes–Angers Cancer and Immunology Research Center. Благодарна сум за можноста да работам во една поинаква научна средина, да стекнам нови знаења и да запознаам луѓе од кои научив многу за радиофармацијата. Тоа искуство ме потсети дека науката ги надминува границите на лабораторијата и дека понекогаш најважните чекори во професионалниот развој ги правиме токму тогаш кога ќе се осмелиме да излеземе од она што ни е познато.

Посебна благодарност ѝ должам на Марија Атанасова Лазарева, со која го поминав најинтензивниот дел од овој пат. За сите часови поминати во

лабораторија, за непроспиените ноќи, за моментите кога работевме паралелно, за разговорите, дилемите и решенијата. Ти благодарам што си човек до мене – засекогаш.

Со цело срце им благодарам на Дино и Дијана, за секојдневната поддршка, за сите мали и големи работи во кои можев да сметам на нив, за секојдневното чувството дека никогаш не сум сама во целиот процес. Вашата достапност и искрена помош, ми значеа многу повеќе отколку што можам да изразам со неколку реченици.

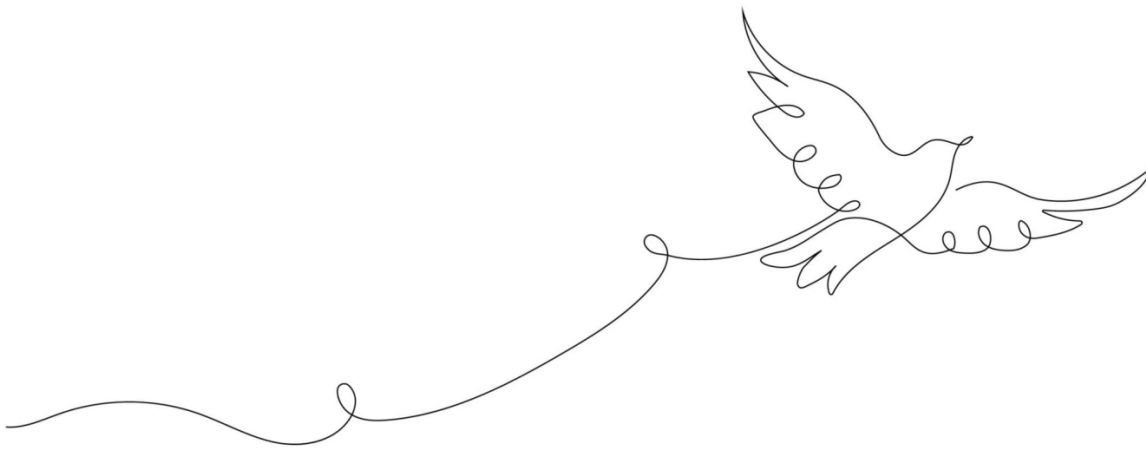
Искрена благодарност упатувам и до Бранка и Коце Апостолови за поддршката, разбирањето и помошта во текот на сите овие години. Ви благодарам што секогаш можев да сметам на вас и што верувавте во мене и во она што го работам.

На моите МАЈКА и ТАТКО им должам благодарност која не може целосно да се преточи во зборови. Нивната големина за мене е токму во тоа што, и покрај сè, останаа до мене. Во сите мои избори, успеси, разочарувања и тешки периоди, нивната љубов никогаш не зависеше од околностите. Ви благодарам што секогаш бевте мојата сигурност и што вашата верба во мене многупати беше посилна од мојата сопствена.

На мојот сопруг Игор му должам благодарност за трпението, разбирањето и за тоа што го помина овој долг и исцрпувачки период заедно со мене. За сите мои обврски, отсуства и моменти кога оваа дисертација стануваше дел и од нашето секојдневие. Ти благодарам што остана покрај мене и тогаш кога не беше лесно, што ја прифати цената на овој мој пат како дел од нашиот заеднички живот и што ми даде простор да истраам до крај.

А најнежната и најличната благодарност ја чувам за мојот син. Ти, без воопшто да знаеш, беше мојата најголема сила и најважната причина секогаш да продолжам понатаму.

Токму затоа, оваа докторска дисертација ти ја посветувам тебе,
Кристијан.



Знакот се препознава.
Небото е дом на возвишеноста и сведок на поврзаноста
помеѓу стаклените души.

За мојата небесна поддршка,
мојот брат, Александар.

Maja Ramona



Рецензирани и објавени научни трудови

1. **Apostolova, P.**, Gestin, J. F., Vranjes-Djuric, S., Arev, M., & Janevik-Ivanovska, E. (2024). Astatine-211 as an emerging radioisotope for targeted alpha therapy (TAT). *RAD Conference Proceedings*, 8, 53–58. doi:10.21175/RadProc.2024.11.
<https://eprints.ugd.edu.mk/id/eprint/35812>
2. **Apostolova, P.**, Atanasova Lazareva, M., Davalieva, K., Arev, M., Karpicarov, D., Makreski, P., Slaveska Spirevska, I., Mitrevska, I., Dimovski, A., Vranješ-Đurić, S., & Janevik-Ivanovska, E. (2026). *Freeze-dried kit formulation and physicochemical assessment of a daratumumab-based radiopharmaceutical*. *Acta Pharmaceutica*. doi: 10.2478/acph-260013.
<https://eprints.ugd.edu.mk/id/eprint/38440>

Презентации од научни собири

1. **Apostolova, P.**, Atanasova Lazareva, M., Arev, M., Slaveska Spirevska, I., Vranjes-Djuric, S., & Janevik-Ivanovska, E. (2025). *Evaluation of freeze-dried daratumumab immunoconjugate kits for lutetium-177 radiolabeling*. *FEBS Open Bio*, 15(Suppl. 2), S-07.1-2. (Short talks)
doi:10.1002/2211-5463.70069

Учество на конференции

1. **Apostolova, P.**, Maingueneau, C., Arev, M., Guérard, F., Gaschet, J., & Janevik-Ivanovska, E. (2023). *Preparation and characterization of immunoconjugates as an initial step for targeted alpha therapy*
Награда за најдобар постер
3rd Scientific Symposium SFUS, Archives of Pharmacy, Niš, Serbia.
2. Janevik-Ivanovska, E., & **Apostolova, P.** (2025). *Design and standardization of the technology for the production of ready-to-use kits for conjugated antibody daratumumab and protein FAPI-based radiopharmaceuticals, intended for labelling with Lu-177: Proof of concept for comparative oncology in the One Health approach*

2nd Research Coordinated Meeting on Development of Potential Lutetium-177 Radiopharmaceuticals: Design, Radiolabelling and Nonclinical Evaluation CRP F-22078, IAEA, Vienna, Austria.

3. Janevik-Ivanovska, E., Vranjes-Duric, S., Baloch, L., **Apostolova, P.**, Davalieva, K., Makreski, P., Gjorgoski, I., Arev, M., Jankovic, D., Mirkovic, M., Radovic, M., Gjorgieva Ackova, D., Smilkov, K., Rustemi-Ahmeti, H., Mindizova, N., Dimovski, A., & Duatti, A. (2025). *The emerging value of stable freeze-dried kit formulations for fast clinical translation of radiopharmaceuticals in targeted imaging and therapy.*

26th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, Gold Coast, Queensland, Australia.

4. **Apostolova, P.**, Atanasova Lazareva, M., Davalieva, K., Arev, M., Makreski, P., Mitrevska, I., Dimovski, A., Vranjes-Djuric, S., & Janevik-Ivanovska, E. (2026). *Development of a freeze-dried daratumumab-immunoconjugate for Lu-177 radiopharmaceutical preparation*

22nd European Symposium on Radiopharmacy and Radiochemistry, Bergen, Norway. *EANM Innovation, 2 (Suppl.1.)*, 100104
doi.org/10.1016/j.eanmi.2026.100104

5. Janevik-Ivanovska, E., **Apostolova, P.**, Jashari, A., Rustemi-Ahmeti, H., Atanasova Lazareva, M., Drakalska Sersemova, E. (2026). *Development of Freeze-Dried Ready-to Use Radiopharmaceuticals: From Molecular Design to Personalized Clinical Applications.*

Symposium of Chamber of Pharmacists of Kosova, health policies for pharmacy: from European standards to national implementation, Prishtina, Kosovo

6. **Apostolova, P.**, Atanasova Lazareva, M., Drakalska Sersemova, E., Vranjes-Duric, S., Janevik-Ivanovska, E. (2026). *Lyophilization as a platform technology for ready-to-use peptide and antibody based theranostic radiopharmaceutical kits: from formulation science to translational applications.*

PDA Italy Chapter - Engineering the Future of Lyophilization: From Formulation Science to Smart Manufacturing, Milan, Italy

Докторскиот труд е дел од Координативниот истражувачки проект на Меѓународната Агенција за атомска енергија (**IAEA CRP-F22078**): **Development of potential ¹⁷⁷Lu radiopharmaceuticals: design, radiolabelling and nonclinical evaluation (2023–2028)** со наслов „Design and standardization of the technology for the production of ready-to-use kits for conjugated antibody Daratumumab and protein FAPI-based radiopharmaceuticals, intended for labeling with Lu-177 - proof of concept for comparative oncology in a One Health approach“.

Други проекти поврзани со изработката на докторскиот труд

1. COST Action CA19114 – Network for Optimized Astatine Labeled Radiopharmaceuticals (NOAR) (2020–2024)

Учесник во проектот како член на одборот за менаџмент (Management Committee Member – MC), претставник од Република Северна Македонија.

Раководител на COST проектот: д-р Жан-Франсуа Жестен.

2. POLICY ANSWERS – R&I POLICY making, implementation and Support in the Western Balkans (11.2024–5.2025)

Грант за студентска мобилност со наслов на проектот: „Standardization of freeze-drying formulation and accelerated stability study for ready-to-use protein-based Lutetium-177 radiolabeled radiopharmaceuticals (THERALU)“.

Листа на скратеници

Скратеница	Англиски термин	Македонски термин / објаснување
ADC	Antibody-drug conjugate	Антитело-лек конјугат
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity	Антитело-зависна клеточна цитотоксичност
ADCP	Antibody-dependent cellular phagocytosis	Антитело-зависна клеточна фагоцитоза
ASAP	Accelerated stability assessment program	Програма за забрзана проценка на стабилност
ATR-FTIR	Attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy	FTIR со атенуирана тотална рефлексција
c.a.	Carrier-added	Со додаден носач
CAR	Chelator-to-antibody ratio	Однос хелатор/антитело
CDC	Complement-dependent cytotoxicity	Комплемент-зависна цитотоксичност
DMF	Dimethylformamide	Диметилформаид
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Диметилсулфоксид
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid	1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраоцетна киселина
DOTA-NHS	DOTA- <i>N</i> -hydroxysuccinimide ester	DOTA- <i>N</i> -хидроксисукцинамид естер
DSC	Differential scanning calorimetry	Диференцијална скенирачка калориметрија
EMA	European Medicines Agency	Европска агенција за лекови
Fab	Fragment antigen-binding	Антиген-врзувачки фрагмент
Fc	Fragment crystallizable	Кристализирачки фрагмент
FDA	Food and Drug Administration	Американска агенција за храна и лекови
HMWS	High-molecular-weight species	Високомолекулски видови (агрегати)
HPLC	High-performance liquid chromatography	Високоэффективна течна хроматографија
ICH	International Council for Harmonisation	Меѓународен совет за хармонизација
IgG	Immunoglobulin G	Имуноглобулин G
IRF	Immunoreactive fraction	Имунореактивна фракција

iTLC-SG	Instant thin-layer chromatography–silica gel	Инстант тенкослојна хроматографија на силика гел
LMWS	Low-molecular-weight species	Нискомолекулски видови (фрагменти)
mAb	Monoclonal antibody	Моноклонално антитело
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight	Матрикс-асистирана ласерска десорпција/јонизација со анализатор време на лет
MBq	Megabecquerel	Мегабекерел
MWCO	Molecular weight cut-off	Молекулска граница на пропустливост
PBS	Phosphate-buffered saline	Фосфатен пуфер со натриум хлорид
PET	Positron-emission tomography	Позитронско-емисиона томографија
RCP	Radiochemical purity	Радиохемиска чистота
Rf	Retention factor	Ретенциски фактор
RH	Relative humidity	Релативна влажност
RIC	Radioimmunoconjugate	Радиоимуноконјугат
RIT	Radioimmunotherapy	Радиоимунотерапија
RT	Retention time	Ретенционо време
SCN	Isothiocyanate	Изотиоцијанат
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	Електрофореза во полиакриламиден гел со натриум додецил сулфат
SE-HPLC	Size-exclusion high-performance Liquid Chromatography	Високоефикасна гел-филтрациска течна хроматографија
SPECT	Single-photon Emission Computed Tomography	Единечна фотонска емисиона компјутерска томографија
TAT	Targeted Alpha Therapy	Целна алфа терапија
TFA	Trifluoroacetic acid	Трифлуороцетна киселина
UPLC	Ultra-performance liquid chromatography	Ултраефикасна течна хроматографија
UV/Vis	Ultraviolet-visible spectroscopy	Ултравиолетова-видлива спектроскопија

**СИНТЕЗА, ФИЗИЧКО-ХЕМИСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И СТУДИЈА ЗА
СТАБИЛНОСТ НА ЛИОФИЛИЗИРАНИ ИМУНОКОНЈУГАТИ НА
ДАРАТУМУМАБ – РАДИОФАРМАЦЕВТСКИ ПРЕПАРАТИ ЗА ЦЕЛНА
ТЕРАПИЈА**

Краток извадок

Вовед: Радиоимуноконјугатите претставуваат значајна група радиофармацевтски препарати, кај кои специфичноста и предностите на моноклоналните антитела се комбинираат со терапевтскиот потенцијал на радионуклидите. Нивниот развој бара внимателна оптимизација на конјугацијата, избор на соодветен хелатор или простетична група, зачувување на структурниот интегритет на антителото, како и обезбедување стабилна фармацевтска формулација погодна за радиобележување непосредно пред употреба.

Цел: Целта на оваа докторска дисертација беше развој и физичко-хемиска карактеризација на лиофилизиран кит базиран на имуноконјугат на хуманото моноклонално антитело даратумумаб, наменет за подготовка на радиофармацевтски препарат по обележување со радионуклидот ^{177}Lu . Дополнително, беше проценета неговата применливост за обележување со други терапевтски радионуклиди, ^{161}Tb и ^{225}Ac , како и алтернативен пристап за подготовка на имуноконјугат наменет за обележување со алфа радионуклидот ^{211}At .

Материјали и методи: Во рамките на истражувањето беа испитани различни бифункционални хелатори, вклучувајќи DOTA-NHS, *p*-SCN-Bn-DOTA и *p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA, при различни услови на конјугација, со цел избор на најсоодветен имуноконјугат на даратумумаб. Беа развиени серии лиофилизирани формулации со користење на различни ексципиенси и беше оптимизиран циклусот на лиофилизација. Конјугацијата беше проценета со MALDI-TOF анализа, додека чистотата и структурниот интегритет на имуноконјугатот беа испитани со SE-HPLC, SDS-PAGE, UV/Vis, ATR-FTIR и Раманска спектроскопија. Радиохемиската чистота беше определена со iTLC и радио-SE-HPLC, а беше испитана и *in vitro* стабилноста на радиоимуноконјугатите. Стабилноста на оптимизираната лиофилизирана формулација беше определена преку забрзани, долготрајни и предиктивни ASAP студии.

Резултати: Имуноконјугатот даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, добиен со 30-пати моларен вишок на хелаторот, беше избран врз основа на односот хелатор/антитело, чистотата и структурниот интегритет. Од испитаните лиофилизирани формулации, формулацијата F5, подготвена со физиолошки раствор, која содржи манитол, трехалоза и полисорбат 20, имаше најниска содржина на резидуална влага и висока содржина на мономерот по лиофилизацијата од 98,31 %. Радиобележувањето со ^{177}Lu резултираше со висока радиохемиска чистота (RCP >98 %), без потреба од дополнително прочистување на радиоимуноконјугатот.

Долготрајните студии на стабилност покажаа дека претходно дефинираните параметри на квалитет беа задржани во текот на 12 месеци при чување на температура од $5 \pm 3^\circ\text{C}$. При забрзаната студија на стабилност, радиохемиската чистота по обележувањето со ^{177}Lu се намали на 95,22 % по три месеци, што е под претходно дефинираниот критериум за прифатливост. Предиктивната ASAP студија овозможи компаративна проценка за стабилноста на имуноконјугатот.

Беше проценета и применливоста на истиот имуноконјугат за радиобележување со ^{161}Tb и ^{225}Ac , што го потврди потенцијалот на формулацијата како платформа за различни терапевтски радиометали.

Како дополнителен експериментален пристап беше испитана подготовката на имуноконјугат на моноклоналното антитело 9E7.4 (анти-CD138) со простетична група за радиобележување со ^{211}At , со што се нагласи различната радиохемиска природа на астатинот и потребата од алтернативни стратегии за добивање радиоимуноконјугати со алфа радионуклидот.

Заклучок: Добиените резултати покажуваат дека лиофилизираниот даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA претставува стабилен и репродуцибилен прекурсор за подготовка на радиоимуноконјугати со терапевтски радионуклиди. Развиениот лиофилизиран кит обезбедува основа за понатамошен претклинички развој на радиофармацевтски препарати за целна радионуклидна терапија.

Клучни зборови: даратумумаб, имуноконјугат, *p*-SCN-Bn-DOTA, лиофилизација, радиоимуноконјугат, ^{177}Lu , ^{161}Tb , ^{225}Ac , ^{211}At , стабилност, конвенционални студии на стабилност, ASAP проценка

**SYNTHESIS, PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND STABILITY
STUDY OF FREEZE-DRIED DARATUMUMAB IMMUNOCONJUGATES-
RADIOPHARMACEUTICALS FOR TARGETED THERAPY**

Abstract

Introduction: Radioimmunoconjugates are an important class of radiopharmaceutical preparations that combine the specificity and advantages of monoclonal antibodies with the therapeutic potential of radionuclides. Their development requires careful optimization of conjugation, selection of an appropriate chelator or prosthetic group, preservation of antibody structural integrity, and establishment of a stable pharmaceutical formulation suitable for radiolabeling shortly before use.

Aim: The aim of this doctoral dissertation was the development and physico-chemical characterization of a freeze-dried kit based on an immunoconjugate of the fully human monoclonal antibody daratumumab, intended for the preparation of a radiopharmaceutical following radiolabeling with the radionuclide ^{177}Lu . In addition, its applicability for labeling with other therapeutic radionuclides, ^{161}Tb and ^{225}Ac , was evaluated, along with an alternative approach for preparing an immunoconjugate intended for radiolabeling with the alpha-emitting radionuclide ^{211}At .

Materials and methods: Different bifunctional chelators, including DOTA-NHS, *p*-SCN-Bn-DOTA, and *p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA, were investigated under different conjugation conditions to select the most suitable daratumumab immunoconjugate. A series of freeze-dried formulations with different excipient compositions was developed, and the freeze-drying cycle was subsequently optimized. Conjugation was evaluated by MALDI-TOF analysis, while the purity and structural integrity of the immunoconjugate were assessed using SE-HPLC, SDS-PAGE, UV/Vis, ATR-FTIR, and Raman spectroscopy. Radiochemical purity was assessed by iTLC and radio-SE-HPLC, while the *in vitro* stability of the radioimmunoconjugates was also determined. The stability of the optimized freeze-dried formulation was investigated using accelerated and long-term studies, as well as a predictive ASAP study.

Results: The optimized daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA immunoconjugate, obtained using a 30-fold molar excess of the chelator, was selected based on the chelator-to-antibody ratio, purity, and structural integrity. Among the freeze-dried formulations, formulation F5, prepared with saline and containing mannitol, trehalose, and polysorbate 20, showed the most favorable overall profile, combining low residual

moisture and high chromatographic purity, with a monomer content of 98.31% after freeze-drying. Radiolabeling with ^{177}Lu resulted in a high radiochemical purity (RCP >98%), without additional post-labeling purification.

Long-term stability studies demonstrated that the predefined critical quality attributes were preserved over 12 months of storage at $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Under accelerated conditions, radiochemical purity after radiolabeling with ^{177}Lu decreased to 95.22% after three months, falling below the predefined acceptance criterion of $\geq 98\%$. Predictive stability assessment using the ASAP approach complemented the conventional stability studies by providing additional insight into degradation trends and the expected time to reach the predefined specification limit under stressed conditions.

The applicability of the same immunoconjugate for radiolabeling with ^{161}Tb and ^{225}Ac was also evaluated, supporting its potential as a platform for different therapeutic radiometals.

As an additional experimental approach, the preparation of an immunoconjugate based on the monoclonal antibody 9E7.4 (anti-CD138) with a prosthetic group for radiolabeling with ^{211}At was investigated, highlighting the distinct radiochemical nature of astatine and the need for alternative strategies to obtain radioimmunoconjugates with alpha-emitting radionuclides.

Conclusion: The obtained results demonstrate that the freeze-dried formulation of daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA represents a stable and reproducible precursor for the preparation of radioimmunoconjugates with therapeutic radionuclides. The developed freeze-dried kit provides a basis for further preclinical development of radiopharmaceutical preparations for targeted radionuclide therapy.

Keywords: daratumumab, immunoconjugate, *p*-SCN-Bn-DOTA, freeze-drying, radioimmunoconjugate, ^{177}Lu , ^{161}Tb , ^{225}Ac , ^{211}At , stability, conventional stability studies, ASAP assessment

Содржина

1	ВОВЕД	1
2	ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА	4
2.1	Имуноконјугати	4
2.1.1	Видови и класификација на имуноконјугати	4
2.2	Моноклонални антитела како вектори	6
2.2.1	Даратумумаб	8
2.2.2	9E7.4	10
2.3	Конјугација на моноклонални антитела	10
2.3.1	Примена на MALDI-TOF анализа за контрола на реакција на конјугација	13
2.3.2	Предизвици при развојот и формулацијата на имуноконјугати	14
2.4	Лиофилизација на имуноконјугати	15
2.5	Физичко-хемиска карактеризација на лиофилизирани формулации на имуноконјугати	19
2.5.1	Изглед, време на реконституција, pH и резидуална влага	20
2.5.2	Квалитативна и квантитативна проценка	21
2.5.2.1	UV/Vis спектроскопија	21
2.5.2.2	ATR-FTIR и Раманска спектроскопија	21
2.6	Евалуација на чистота на лиофилизирани формулации на имуноконјугати	27
2.6.1	SE-HPLC	27
2.6.2	Електрофореза во редуцирачки и нередуцирачки услови	28
2.7	Радиоимуноконјугати	29
2.7.1	Радионуклиди (радиоактивни изотопи) за медицинска примена	31
2.7.1.1	Лутециум-177 (^{177}Lu)	33
2.7.1.2	Тербиум-161 (^{161}Tb)	34
2.7.1.3	Астатин-211 (^{211}At)	35
2.7.1.4	Актиниум-225 (^{225}Ac)	36
2.7.2	Радиобележан даратумумаб во дијагностички и терапевтски студии	39
2.8	Студии на стабилност на лиофилизирана формулација на имуноконјугати	40

2.8.1 Конвенционални студии на стабилност.....	41
2.8.2 Предиктивна проценка на стабилност со Accelerated Stability Assessment Program (ASAP).....	42
3 ЦЕЛИ НА ТРУДОТ	46
4 МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ.....	47
I. МОНОКЛОНАЛНО АНТИТЕЛО ДАРАТУМУМАБ	47
4.1 Вектор, хелирачки агенси и радионуклиди.....	47
4.1.1 Конјугација на антитело даратумумаб со хелатори	48
4.2 Формулации за лиофилизација.....	49
4.2.1 Протокол за лиофилизација	50
4.2.2 Диференцијално скенирачка калориметрија	53
4.3 Физичко-хемиска карактеризација на лиофилизирани формулации на имуноконјугати	54
4.3.1 Изглед, време на реконституција, pH и резидуална влага.....	54
4.3.2 Квалитативна и квантитативна проценка.....	54
4.3.2.1 MALDI-TOF MS.....	54
4.3.2.2 UV/Vis спектроскопија	56
4.3.2.3 ATR-FTIR и Раманска спектроскопија.....	56
4.4 Евалуација на чистота на лиофилизирани формулации на имуноконјугати	57
4.4.1 SE-HPLC	57
4.4.2 Електрофореза во редуцирачки и нередуцирачки услови.....	60
4.5 Радиобележување на имуноконјугат со радионуклиди	62
4.5.1 Метод на радиобележување со лутециум-177 (¹⁷⁷ Lu).....	62
4.5.1.1 Оптимизација на радиобележување	63
4.5.1.2 Карактеризација на радиоимуноконјугатот.....	63
4.5.1.3 Определување на радиохемиска чистота со радио SE-HPLC	63
4.5.2 Метод на радиобележување со актиниум-225 (²²⁵ Ac).....	64
4.5.3 Метод на радиобележување со тербиум-161 (¹⁶¹ Tb)	64
4.6 Студии на стабилност на лиофилизирана формулација на имуноконјугат.....	64
4.6.1 Конвенционални студии на стабилност.....	65

4.6.1.1 Забрзана студија на стабилност	65
4.6.1.2 Долготрајна студија на стабилност	65
4.6.1.3 Критериуми за прифатливост на параметрите следени во студиите на стабилност	66
4.6.2 Предиктивна проценка на стабилност со ASAPprime® софтвер	67
II. МОНОКЛОНАЛНО АНТИТЕЛО 9E7.4	73
4.7 Вектор, простетична група и радионуклид	73
4.7.1 Подготовка и карактеризација на немодифицираното анти тело	74
4.7.2 Спектроскопски профил на анти телото и неговиот имуноконјугат	74
4.7.3 Стабилност на простетичната група	74
4.7.4 Подготовка на имуноконјугати со анти тело 9E7.4	75
4.8 Постапка на радиобележување со астатин-211 (²¹¹At)	75
4.8.1 Контрола на квалитет на радиоимуноконјугатите	76
5 РЕЗУЛТАТИ	77
I. МОНОКЛОНАЛНО АНТИТЕЛО ДАРАТУМУМАБ	77
5.1 Конјугација на анти тело даратумумаб со бифункционални хелатори	77
5.2 Постапка на лиофилизација	77
5.2.1 Протоколи за лиофилизација	77
5.2.2 Формулации за лиофилизација	80
5.3 Физичко-хемиска карактеризација на лиофилизирани формулации на имуноконјугати	81
5.3.1 Изглед, време на реконституција, pH и резидуална влага	81
5.3.2 Квалитативна и квантитативна проценка	82
5.3.2.1 MALDI-TOF MS	82
5.3.2.2 UV/Vis спектроскопија	87
5.3.2.3 ATR-FTIR и Раманска спектроскопија	89
5.3.3 Евалуација на чистота на лиофилизирани формулации на имуноконјугати	94
5.3.3.1 SE-HPLC	94
5.3.3.2 Електрофореза во редуцирачки и нередуцирачки услови	111
5.4 Развој и оптимизација на методот за радиобележување со лутециум-177 (¹⁷⁷Lu)	112

5.4.1 Влијание на условите на реакција врз приносот по обележување.....	113
5.4.2 Карактеризација на радиоимуноконјугати со ^{177}Lu , ^{225}Ac и ^{161}Tb	114
5.4.3 Определување на принос по радиобележување и радиохемиска чистота на радиоимуноконјугатите со ^{177}Lu	115
5.4.3.1 In vitro стабилност на радиоимуноконјугатите.....	119
5.4.3.2 Влијание на составот на формулацијата врз радиохемиската чистота на радиоимуноконјугатот.....	121
5.4.3.3 Определување на радиохемиска чистота со радио SE – HPLC/UV	123
5.4.4 Определување на принос по радиобележување и радиохемиска чистота на радиоимуноконјугатот со ^{225}Ac	126
5.4.4.1 In vitro стабилност на радиоимуноконјугат со ^{225}Ac	126
5.4.5 Определување принос по радиобележување и радиохемиска чистота на радиоимуноконјугатот со ^{161}Tb	128
5.4.5.1 In vitro стабилност на радиоимуноконјугат со ^{161}Tb	128
5.5 Стабилност на лиофилизирана формулација на имуноконјугатот	129
5.5.1 Забрзана студија на стабилност.....	130
5.5.2 Долготрајна студија на стабилност	135
5.5.3 Предиктивна проценка на стабилноста и рокот на употреба со софтвер	140
II. МОНОКЛОНАЛНО АНТИТЕЛО 9E7.4.....	145
5.6 UV/Vis спектроскопска карактеризација и определување на концентрацијата	145
5.6.1 Стабилност на простетична група	146
5.7 Хроматографска проценка на интегритетот на антителото и имуноконјугатите	148
5.8 Конјугација на антитело 9E7.4 со простетична група	150
5.9 Радиобележување со астатин-211 (^{211}At)	151
5.9.1 Контрола на квалитет на радиоимуноконјугати радиобележани со ^{211}At	152
6 ДИСКУСИЈА.....	154
7 ЗАКЛУЧОК	171
8 КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА	174

1 ВОВЕД

Радиофармацевтските препарати имаат значајна улога во современата нуклеарна медицина, бидејќи овозможуваат дијагностика, следење на третман и целна терапија преку примена на соодветно избрани радионуклиди. Особено значаен развој во последните години бележи целната радионуклидна терапија, која се базира на селективна испорака на јонизирачко зрачење до клетки кои експримираат специфични молекуларни антигени. Овој пристап овозможува насочено дејство врз канцер клетките, со цел да се зголеми терапевтскиот ефект и истовремено да се ограничи изложеноста од зрачење на здравите ткива (Yeong et al., 2014).

Во овој контекст, радиоимуноконјугатите претставуваат значајна група целни радиофармацевтски препарати, кај кои биолошката специфичност на моноклоналното антитело се комбинира со дијагностичкиот или терапевтскиот потенцијал на радионуклидот (National Cancer Institute, n.d). Моноклоналните антитела се вектори од интерес поради нивната висока специфичност, афинитет кон тумор-асоцирани антигени и можност за селективно насочување кон канцер клетките. Затоа, нивната примена во радиофармацијата претставува основа за развој на радиоимуноконјугати наменети за дијагностика и насочена терапија (Parakh et al., 2022).

Даратумумаб е хумано моноклонално антитело од класата IgG1k, насочено кон CD38, трансмембрански гликопротеин кој е силно експримиран кај малигните плазма клетки кај мултипен миелом. Поради ваквата експресија на CD38 на малигните плазма клетки, тој претставува значаен таргет за насочени терапевтски и дијагностички пристапи, а даратумумаб соодветен биолошки вектор за развој на имуноконјугати и радиоимуноконјугати. Неговата примена како терапевтско антитело веќе ја потврдува важноста на CD38 како таргет, додека радиофармацевтскиот пристап овозможува проширување на оваа стратегија кон целна радионуклидна терапија (de Weers M et al., 2011; van de Donk & Usmani, 2018).

За подготовка на радиоимуноконјугати со радиометали неопходна е претходна конјугација на антителото со соодветен бифункционален хелатор. Хелаторот има двојна улога: ковалентно да се врзува за антителото и истовремено да формира стабилен комплекс со радионуклидот. Изборот на хелатор, условите

на конјугација и степенот на модификација се критични параметри, бидејќи прекумерната или несоодветна модификација може да доведе до промени во структурата, чистотата, хетерогеноста и стабилноста на антителото. DOTA-базираните хелатори имаат широка примена во радиофармацевтскиот развој поради нивната способност да формираат стабилни комплекси со терапевтски радиометали, вклучувајќи ^{177}Lu , ^{161}Tb и ^{225}Ac (Price & Orvig, 2014; Kostelnik & Orvig, 2019).

Покрај металните радионуклиди, посебно значење во целната алфа терапија имаат и радионуклидите со алфа распад со различна радиохемиска природа. ^{225}Ac може да се комплексира во цикличните DOTA-базирани хелатори, додека за ^{211}At , како радиоактивен халоген елемент, потребна е различна стратегија за радиобележување. За разлика од радиометалите, астатинот не се врзува преку класична метал-хелатор координациона хемија, туку најчесто бара примена на простетични групи и ковалентна модификација на антителото. Ова ја нагласува потребата од различни радиохемиски пристапи при развој на радиоимуноконјугати со терапевтски радионуклиди (Vanermen et al., 2024; Apostolova et al., 2024).

Покрај успешната конјугација и радиобележување, развојот на радиоимуноконјугати бара обезбедување на соодветна фармацевтска стабилност. Моноклоналните антитела и нивните конјугати се чувствителни на физичко-хемиски промени, како агрегација, фрагментација, денатурација, оксидација и деамидација, кои можат да влијаат врз чистотата, безбедноста, ефикасноста и репродукцибилноста на препаратот. Затоа, контролата на критичните параметри на квалитет е суштински дел од развојот на биолошки и радиофармацевтски препарати (ICH Q5C; Le Basle et al., 2020).

Леофилизацијата претставува значаен технолошки пристап за подобрување на стабилноста на протеински и биолошки препарати. Со отстранување на водата под контролирани услови се намалува молекуларната подвижност и се ограничуваат деградациските процеси поврзани со присуство на влага. Сепак, самиот процес на замрзнување и сушење може да предизвика стрес врз протеинската структура, поради што е неопходен внимателен избор на ексципиенси со криопротективна и леопротективна улога, како и оптимизација на циклусот за леофилизација (Wang, 2000; Shalaev et al., 2023).

Во развојот на радиофармацевтици, лиофилизираните формулации имаат практична предност, бидејќи овозможуваат подготовка на радиофармацевтски препарати по реконституција или по комбинирање со соодветни радионуклиди. Ваквата формулација претставува стабилен, не радиоактивен препарат (прекурсор) кој може да се чува, да подлежи на контрола на квалитет и да се радиобележи непосредно пред употреба. Оттука, развојот на лиофилизиран имуноконјугат наменет за подготовка на радиоимуноконјугат непосредно пред употреба (ready-to-use) бара интегриран пристап што ги поврзува биоконјугацијата, формулацијата, физичко-хемиската карактеризација, стабилноста по обележување и од студиите на стабилност на китот.

Во овој докторски труд фокусот е насочен кон синтеза, физичко-хемиска карактеризација и проценка на стабилноста на лиофилизирани имуноконјугати на даратумумаб како кит за радиобележување за целна радионуклидна терапија. Истражувањето опфаќа споредба на различни бифункционални хелатори, избор на најсоодветен имуноконјугат, развој на лиофилизирана формулација, проценка на критичните параметри на квалитет и испитување на радиобележувањето со ^{177}Lu , ^{161}Tb и ^{225}Ac , како и дефинирање на рокот на употреба преку дизајнирани студии на стабилност. Дополнително, како посебен експериментален пристап е испитана подготовка на имуноконјугат со моноклоналното антитело 9E7.4 и простетична група за радиобележување со ^{211}At , со што се опфаќа и алтернативна стратегија за добивање радиоимуноконјугати со радионуклиди со емисија на алфа зраци.

2 ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

2.1 Имуноконјугати

Според Медицинскиот речник за термини (Medical Subject Headings, MeSH) кој претставува контролиран речник на Националната медицинска библиотека на Соединетите Американски Држави, имуноконјугатите се дефинираат како комбинација од дијагностички или терапевтски супстанции поврзани со специфични молекули коишто предизвикуваат имун одговор, како што се имуноглобулини, моноклонални антитела или антигени. Често, супстанцијата што се користи за дијагностичка или терапевтска цел е радионуклид. Вака добиените имуноконјугати овозможуваат за целно насочување на лекови и/или радионуклиди за хемотерапија или радиоимунотерапија кон одредени видови канцер (National Library of Medicine, 1995). Поврзувањето помеѓу протеинската молекула и не протеинскиот дел се остварува преку линкер кој обезбедува нивно стабилно поврзување.

Во современата персонализирана и целна терапија, развојот на имуноконјугатите претставува значаен пристап за селективна испорака на цитотоксични агенси, радионуклиди или други терапевтски молекули до канцер клетките. На овој начин се овозможува зголемување на ефикасноста на третманот, додека несаканото оштетување на здравите ткива се сведува на минимум (Smaglo et al., 2014).

Имуноконјугатите кои содржат антитела или фрагменти од антитела како вектор за насочување кон специфичен таргет, често се применуваат како терапевтици. Клучен чекор во подготовката на имуноконјугатите е процесот на конјугација, односно ковалентното поврзување на протеинската молекула со соодветна ефекторна молекула, преку хелатор или простетична група (Stephanopoulos & Francis, 2011). Начините на конјугација на моноклонални антитела со хелаторите детално се опишани во поглавјето 2.3.

2.1.1 Видови и класификација на имуноконјугати

Имуноконјугатите може да се класифицираат на два начина:

- според молекулата вектор која е насочена кон одреден таргет, или
- според типот на ефекторната молекула со кој е конјугиран.

Според типот на векторот може да бидат: цели моноклонални антитела, фрагменти од моноклонални антитела, нанободи, пептиди, и други мали молекули, прикажани на слика 1 а).

Според типот на ефекторната молекула со која е конјугиран векторот може да се класифицираат како: антитело-лек конјугати, имунотоксини, имуноцитокени или радиоимуноконјугати, прикажани на слика 1 б) (Bruins, 2020).



Слика 1 а) Видови вектори за формирање на имуноконјугати

Figure 1 a) Types of vectors used for immunoconjugate formation



Слика 1 б) Видови на имуноконјугати според видот на ефекторната молекула

Figure 1 b) Types of immunoconjugates according to the type of effector molecule

Првиот антитело-лек конјугат (*antibody-drug conjugate*, ADC) одобрен од Американската агенција за храна и лекови (*Food and Drug Administration*, FDA) е гемтузимаб озогамицин (Mylotarg), кој претставува конјугат на анти-CD33 моноклонално антитело со цитотоксичниот агенс калихеамицин. Лекот првично бил одобрен од FDA во 2000 година, повлечен од пазарот во 2010 година, а повторно одобрен во 2017 година за третман на CD33-позитивна акутна миелоидна леукемија. Подоцна, Mylotarg добил и одобрение за ставање во промет во Европската Унија од Европска агенција за лекови во 2018 година (EMA, 2025). Други клинички одобрени антитело-лек конјугати се трастузумаб емтансин (Kadcyla), одобрен од FDA и EMA за HER2-позитивен карцином на дојка, и брентуксимаб ведотин (Adcetris), одобрен од FDA и EMA за одредени

CD30-позитивни лимфоми. Лорвотузумаб мертансин е антитело-лек конјугат насочен кон CD56 кој сè уште е во фаза на истражување и не е одобрен за клиничка примена од FDA или EMA (Hermanson, 2008; EMA, 2025a; EMA, 2025b).

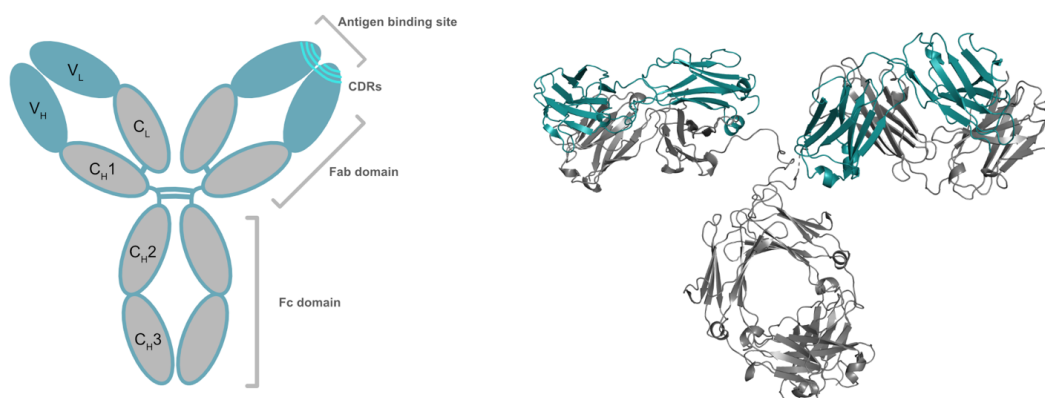
2.2 Моноклонални антитела како вектори

Голем број одобрени моноклонални антитела се неконјугирани, односно т.н. „голи антитела“ (naked antibodies), чиј механизам на дејство најчесто се заснова на блокирање на рецептори или неутрализација на молекули вклучени во сигналните патишта на канцер клетките со што се инхибира нивната биолошка активност (Hermanson, 2008; Sharkey, 2008). Моноклоналните антитела претставуваат едни од најзначајните биолошки вектори за подготовка на имуноконјугати, поради нивната висока специфичност и афинитет кон тумор-поврзаните антигени. Кај радиоимуноконјугатите, антителото служи како биолошка молекула кој го насочува радионуклидот кон целната клеточна популација, додека радионуклидот овозможува дијагностичка визуализација или терапевтски ефект, во зависност од типот на радиоактивниот распад.

Антителата, односно имуноглобулини, се протеини на адаптивниот имунолошки систем одговорни за специфично препознавање на антигени (Vidarsson et al., 2014). Имуноглобулините се поделени во пет класи: IgG, IgD, IgM, IgA и IgE (Schroeder & Cavacini, 2010). Најзастапена класа од вкупните имуноглобулини е IgG со 70–85 % и околу 20 % од серумските протеини. Оваа класа се дели на четири поткласи (IgG1–IgG4) со слична градба, но со различни биолошки функции (Jefferis, 2007). Поради својата висока застапеност и улогата во таргетирање на растворливи и мембрански врзани антигени, IgG имуноглобулините се најшироко применувани во истражувачки цели и за терапевтски примени.

Антителото од класата на IgG има карактеристична Y-форма и е составено од два идентични тешки (heavy chain-H) и два идентични лесни ланци (light chain-L), поврзани преку нековалентни и дисулфидни врски (слика 2). Тешкиот ланец содржи варијабилен домен (variable heavy-VH) и три константни домени (constant heavy-CH1–CH3), додека лесниот ланец има варијабилен (VL) и константен домен (CL). Домените VH, VL, CH1 и CL го формираат Fab-делот од антителото кој е одговорен за врзување со антигенот, и истиот ја определува

специфичноста на антителото. Врзувањето со антигенот се овозможува преку хиперваријабилните, односно комплементарно-детерминирачки региони (CDR-1, CDR-2 и CDR-3) (Li et al., 2004; Frieder et al., 2006). Домените CH2 и CH3 го формираат Fc-делот, кој поседува ефекторни функции и придонесува за долгиот полуживот на антителото од околу 21 ден (Pyzik et al., 2023).



Слика 2 Структура на моноклонално антитело

Figure 2 Monoclonal antibody structure

Во хуморалниот имун одговор, антителата делуваат преку неутрализација на антиген, опсонизација и активирање на ефекторни механизми. Fc-делот се врзува со Fc γ -рецептори на имуните клетки и може да иницира антитело-зависна клеточна цитотоксичност (ADCC) и антитело-зависна клеточна фагоцитоза (ADCP) (DiLillo & Ravetch, 2015; Wang et al., 2015). Дополнително, врзувањето со C1q активира патот на комплементот и води до комплемент-зависна цитотоксичност (CDC).

Бидејќи антителата се гликопротеини, Fc-делот носи специфични гликански структури кои значајно ја модулираат интеракцијата со Fc γ -рецепторите. Модификациите на гликаните можат да го променат афинитетот кон Fc γ -рецепторите и да ја зголемат ADCC ефикасноста кај одредени моноклонални антитела (Li et al., 2017; Pereira et al., 2018).

Поради големата молекулска маса, главниот начин на елиминација на моноклоналните антитела вклучува клеточно преземање преку пиноцитоза во ендозомите, проследено со интрацелуларен метаболизам преку лизозомална

деградација до пептиди и аминокиселини. Овие продукти потоа или се користат за синтеза на протеини или се излачуваат преку бубрезите. Ваквите фармакокинетски својства овозможуваат продолжена циркулација и постепена акумулација во канцерогеното ткиво, но истовремено може да резултираат со бавна ткивна пенетрација и зголемена изложеност на нормалните ткива (Castelli et al., 2019).

Моноклоналните антитела имаат широка клиничка примена во онкологијата, и во третманот на автоимуни и воспалителни заболувања.

Овие својства ја објаснуваат широката примена на моноклоналните антитела како вектори за подготовка на имуноконјугати, но истовремено ги нагласуваат и нивните ограничувања. Високата специфичност и продолжениот полуживот овозможуваат ефикасно таргетирање на канцер клетките, но бавната ткивна пенетрација и долгата циркулација можат да доведат до зголемена изложеност на нормалните ткива, особено кај терапевтски радиоимуноконјугати. Затоа, изборот на антителото, хелаторот и радионуклидот, како стратегијата за конјугација мора внимателно да се оптимизират во зависност од дијагностичката или терапевтската примена на препаратот.

2.2.1 Даратумумаб

Моноклоналното антитело даратумумаб е целосно хумано антитело од групата на имуноглобулини G1-kappa (IgG1-k) со молекулска формула: C₆₄₆₆H₉₉₉₆N₁₇₂₄O₂₀₁₀S₄₂ и молекулска маса од 148 300 g/mol (148 kDa) (DrugBank, 2025).

Таргет за даратумумаб е антигенот CD38 кој според податоците од The Human Protein Atlas е силно експресиран во хематопоезиските и лимфоидните ткива. Како трансмембрански гликопротеин, претежно е локализиран на површината на клетките, односно на плазматската мембрана, иако може да биде присутен и во интрацелуларните простори. Неговата експресија во повеќето други нормални ткива е ниска или не детектибилна што го потврдува CD38 како релевантен таргет кај мултипен миелом, со релативно ограничен потенцијал за токсичност кон здрави ткива (The Human Protein Atlas, 2025). Развиен е од компанијата Genmab во соработка со Janssen Biotech, при што првите претклинички податоци објавени во 2011 година ја покажале неговата способност да предизвика лиза на канцер клетки преку комплемент-зависна цитотоксичност (CDC), антитело-

зависна клеточно посредувана цитотоксичност (ADCC), антитело-зависна клеточна фагоцитоза (ADCP), индуцирана директна апоптоза, модулација на CD38 ензимската активност и зголемена цитотоксичност на ефекторните Т-клетки (de Weers M et al., 2011; Overdijk, 2016; Krejcik, 2016; Nooka et al., 2019). Првата клиничка примена на даратумумаб била евидентирана уште во раните фази на студиите GEN501 (NCT00574288) и SIRIUS (NCT01985126 (ClinicalTrials.gov, 2018), каде што се евалуирала неговата ефикасност и безбедност како монотерапија за примена кај претходно повеќекратно третирани пациенти со релапсен или рефракторен мултипен миелом (ClinicalTrials.gov, 2008; ClinicalTrials.gov, 2018). Резултатите покажале значителен одговор кај претходно третирани пациенти, што било причина за одобрување од страна на FDA во 2015 година, како прво моноклонално анти-CD38 антитело за третман на мултипен миелом (Lokhorst et al., 2015). Една година подоцна, во 2016 година, за истата индикација било одобрено и од ЕМА. Подоцна, клиничките студии POLLUX (NCT02076009 (ClinicalTrials.gov, 2014)) и CASTOR (NCT02195479) (ClinicalTrials.gov, 2014; ClinicalTrials.gov, 2014) го потврдиле значајното продолжување на преживувањето без прогресија при комбинирана терапија со имуномодулатори или протеазомски инхибитори, по што индикациите ги прошириле на пациенти со ново дијагностициран и трансплантациски неподобен мултипен миелом (Dimopoulos et al., 2016).

Според збирниот извештај за карактеристиките на лекот несаканите ефекти се класифицирани според тоа колку често се манифестираат, како и според системот на органи кај кои се појавуваат. Според тоа, многу чести несакани ефекти се инфекции (горни респираторни инфекции, пневмонија, грип), болести на крвта и крвотворните органи (анемија, неутропенија, тромбоцитопенија), периферна сензорна невропатија, замор, болки во мускулите и коските, гастроинтестинални реакции (дијареја, запек, гадење, повраќање), кашлица, тешкотии при дишење, периферен едем и треска. Поретки, но сериозни ефекти се сепса, пулмонарен едем, бронхитис, атријална фибрилација, синкопа и дехидрација (EMA, 2022).

И покрај значителната клиничка ефикасност, може да се развие и резистентност кон терапијата како резултат на различни молекуларни и имунолошки механизми (Ziccheddu et al., 2024). Првиот главен фактор е намалување на експресијата на

CD38 гликопротеинот на клеточната површина на канцер клетките на мултипен миелом, потоа зголемена експресија на инхибиторни молекули на комплементот (CD55, CD59) и/или дисфункција на клетките природни убијци (Nijhof et al., 2016; Verkleij et al., 2023).

Сите овие сознанија отвораат нови перспективи за истражување и развој на терапии и стратегии насочени кон третманот на мултипен миелом или други хематолошки малигнитети каде што даратумумаб или негови модифицирани деривати би можеле да имаат значајна терапевтска примена.

2.2.2 9E7.4

Моноклоналното анти-CD138 антитело 9E7.4 е добиено со имунизација на стаорец со пептид од 40 аминокиселини добиен од глувчешки CD138 протеин (Fichou et al., 2015). Ова антитело е насочено кон глувчешки CD138 антиген, и ги препознава клетките на мултипен миелом. Поради неговата докажана стабилност се користи како експериментален модел, за обележување со радионуклиди кои се во фаза на истражување за нивна поширока примена. Експресијата на Syndecan-1 (CD138) е опишана и кај клетки од човечки лимфом (Gattei et al., 1999). Радиобележаното анти-CD138 антителото со радионуклидот бакар-64 (^{64}Cu) може да има примена за детекција на субкутан мултипен миелом и лезии на коскена срцевина (Gattei et al., 1999; Bailly et al., 2018). Последните години истражувањето се насочени и кон негова примена за терапевтски цели каде како радиоимуноконјугат обележан со бизмут-213 (^{213}Bi) се испитува за третман на оваријален перитонеален канцер, додека по обележување со радионуклидот астатин-211 (^{211}At) е користено како пристап за таргетирана алфа терапија на мултипен миелом (Derrien et al., 2015; Gouard et al., 2020).

2.3 Конјугација на моноклонални антитела

При модификација на моноклоналните антитела, изборот на стратегија за конјугација зависи од повеќе фактори, меѓу кои како најзначајни може да се издвојат природата на молекулата (таргет) што треба да се поврзе со антителото, типот на хелаторот или друга функционална група, стабилноста на добиениот имуноконјугат и зачувувањето на имунореактивноста на антителото. Кога имуноконјугатот е наменет за понатамошно радиобележување, изборот на

хелаторот дополнително зависи од природата на радионуклидот, неговата координативна хемија и потребната стабилност на комплексот. Затоа, стратегијата за конјугација треба да се избере рационално, земајќи ги предвид структурата на антителото и понатамошната намена на добиениот имуноконјугат.

Во подготовката на имуноконјугати со моноклонални антитела кои подоцна може да се радиобележат, може да се користат различни хелатори, од кои најголемо значење имаат бифункционалните хелатори. Тие содржат две функционални целини: хелаторски дел, способен да формира координативни врски со металниот јон, и реактивна група, која овозможува ковалентно поврзување со антителото. На овој начин, бифункционалниот хелатор претставува линкер помеѓу антителото и металниот јон од радионуклидот. Во зависност од реактивната група на хелаторот и достапните функционални групи на антителото, конјугацијата може да се одвива преку примарни аминокиселини, сулфхидрилни групи, карбоксилни групи или преку модифицирани јаглехидратни структури на Fc-регионот (Chomet et al., 2021).

Најчесто применуван пристап е конјугација преку ϵ -аминогрупите на лизинските остатоци на антителото. Овој тип на конјугација се изведува со хелатори кои содржат изотиоцијанатна (SCN) или NHS-естерска реактивна група. Дериватите на 2,2',2'',2'''-(2-(4-изотиоцијанатобензил) (*p*-SCN-Bn), како што се 2,2',2'',2'''-(2-(4-изотиоцијанатобензил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраил) тетраоцетна киселина (*p*-SCN-Bn-DOTA) и (2-(4-изотиоцијанатобензил)-6-метил-диетилен-триамин пентаоцетна киселина (*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA), содржат изотиоцијанатна група која реагира со примарните аминокиселини на лизинските остатоци, при што се формира стабилна тиауреа врска. Од друга страна, 2,2',2''-(10-(2-((2,5-диоксопиролидин-1-ил)окси)-2-оксоетил)-1,4,7,10-тетраазоциклододекан-1,4,7-триил) триоцетна киселина (DOTA-NHS) содржи NHS-естерска група, која исто така реагира со примарните аминокиселини, при што се формира амидна врска (Cooper et al., 2012).

Иако лизинската конјугација е едноставна и широко применувана, таа најчесто е неселективна, бидејќи антителата содржат голем број достапни лизински остатоци на различни позиции. Како резултат на тоа, може да се добие хетерогена популација на имуноконјугати со различен број хелатори по

молекула од антитело и различни места на модификација. Ова може да влијае врз растворливоста, стабилноста, имунореактивноста и репродуктивноста на добиениот препарат. Друг пристап е конјугација преку сулфхидрилни групи, најчесто добиени со делумна редукција на дисулфидните врски во антителото или со претходна модифиција на антителото преку воведување на цистеински остатоци. Во овој случај се користат хелатори со малеимидна или сродна тиол-реактивна група, кои реагираат со сулфхидрилните групи и формираат тиестерска врска. Овој пристап може да овозможи поголема контрола врз бројот и местото на конјугација во споредба со класичната лизинска модификација, но бара внимателна оптимизација за да не се наруши структурниот интегритет на антителото. Конјугацијата може да се насочи и кон јаглехидратните структури на Fc-регионот на антителото. Овој пристап најчесто вклучува оксидација на гликанските остатоци, со што се создаваат алдехидни групи способни за реакција со хелатори кои содржат хидразидни и аминокси функционални групи. Предноста на овој пристап е тоа што модификацијата се одвива во Fc-регионот, оддалечено од Fab-регионот, со што се намалува ризикот од нарушување на имунореактивноста на антителото (Tsuchikama & An, 2018).

Во поновите стратегии сè поголемо внимание се посветува на селективната и специфичната конјугација кои овозможуваат подобра контрола врз местото на модификација и бројот на хелатори по молекула на антитело. Во споредба со неселективната конјугација, овие стратегии овозможуваат добивање похомогени имуноконјугати со подобро дефинирани физичко-хемиски и биолошки својства (Morais & Ma, 2018).

Ефикасноста на конјугацијата зависи од повеќе параметри при изведувањето на експериментот, вклучувајќи ги pH-вредноста, температурата, времето на инкубација, концентрацијата на реагенсите и моларниот однос на антителото со хелаторот. Оптимизацијата на овие услови е неопходна за добивање стабилен имуноконјугат со соодветен степен на модификација, при што треба да се зачувани структурата, имунореактивноста и биолошката активност на самото антитело користено при процесот на конјугација.

2.3.1 Примена на MALDI-TOF анализа за контрола на реакција на конјугација

Најголем дел од врските кои се остваруваат помеѓу бифункционалните хелатори и антителата се неспецифични и резултираат со варијабилен број на хелатори за едно антитело, и зависат и од моларниот вишок на хелаторот и од условите на конјугација. За да се процени успешноста на реакцијата на конјугација и просечниот број на прикачени групи кон едно антитело, една од клучните аналитички техники е масената спектрометрија, при што како метод од избор е матрикс-олеснета десорпциска јонизација со ласер со анализатор време на лет (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization-Time-of-Flight, MALDI-TOF) (Feiner et al., 2021). Принципот на MALDI-TOF анализата се базира на кокристализација на протеинот од интерес од соодветна органска матрица која апсорбира ласерска енергија и ја пренесува на анализот, овозможувајќи негова нежна десорпција и јонизација без значителна фрагментација. Создадените јони потоа се забрзуваат во електрично поле и нивното време на лет до детекторот е пропорционално на односот маса–полнеж (m/z), што овозможува прецизно определување на молекулската маса. Кај имуноконјугатите, зголемувањето на молекулската маса во споредба со неконјугираното антитело директно корелира со бројот на поврзани хелатори и овозможува пресметка на просечниот број на хелатори поврзани за антитело (Chelator-to-Antibody Ratio - CAR).

Оваа техника овозможува релативно брзо определување на молекулската маса на макромолекули, вклучувајќи ги моноклоналните антитела и нивните имуноконјугати, како и детекција на мали промени во маса кои настануваат како резултат на ковалентното поврзување на хелаторите (Källsten et al., 2018). Поради релативно едноставната подготовка на примероците, оваа техника е особена погодна за брз скрининг и проценка на просечниот број на врзани хелатори. Сепак, ограничување на MALDI-TOF анализата е тоа што најчесто обезбедува просечна вредност за степенот на конјугација и може да има пониска прецизност во споредба со примената на течна хроматографија поврзана со масена спектроскопија (LC-MS), особено кога е потребна детална карактеризација на хетерогени популации на имуноконјугати.

2.3.2 Предизвици при развојот и формулацијата на имуноконјугати

Успешно изведената реакција на конјугација не е доволна за добивање имуноконјугат кој би бил погоден за терапевтска примена. Еден од главните предизвици е да се постигне соодветен степен на модификација на антителото, без притоа да се нарушат неговата структура, растворливост, стабилност и способност за специфично препознавање на целниот антиген. Еден од важните аспекти при развојот на успешна формулација на имуноконјугат е зачувувањето на функционалните особини и на двете компоненти од кои е изграден. Местото на конјугација и бројот на прикачени функционални групи треба внимателно да се контролира, бидејќи модификацијата на аминокиселински остатоци во близина на регионите одговорни за врзување може да доведе до намалување на афинитетот и имунореактивноста на антителото (Fan et al., 2025).

Дополнителен предизвик при самата конјугација претставува изборот на хелаторот и неговата реактивна група, како и условите за реакцијата на конјугација. Моларниот однос помеѓу антителото и хелаторот треба внимателно да се оптимизира за да се постигне соодветен степен на модификација и да се добие имуноконјугат со задржани физичко-хемиски и биолошки својства. Поради тоа, промената на хелаторот, реактивната група или условите на конјугација може значително да влијае врз својствата и однесувањето на добиениот имуноконјугат *in vivo* (Hermanson, 2008).

Еден од главните предизвици при развојот на имуноконјугатите е и усогласувањето на својствата на антителото, целниот антиген и прикачената ефекторна молекула. Антителото треба селективно да се врзува за антиген кој е доволно експримиран на канцер клетките, а има ограничена експресија во нормалните ткива. Хетерогената експресија на антигенот во туморот, неговото ослободување од површината на канцер клетките и ограничената пенетрација на големите молекули во канцер клетките може да ја намалат ефикасноста на целната терапија. Истовремено, врската помеѓу антителото и прикачената компонента треба да биде доволно стабилна за време на циркулацијата, без притоа да се нарушат специфичноста и функционалноста на антителото (Smaglo et al., 2014).

Наведените предизвици може да придонесат за појава на имуноген одговор и алергиски реакции, несакано дејство врз здравите ткива, промени во

фармакокинетиката или намалена терапевтска ефикасност. Кај радиоимуноконјугатите пак, дополнителен предизвик претставува постигнувањето соодветна стабилност на комплексот помеѓу хелаторот и радионуклидот, бидејќи неговата дисоцијација *in vivo* може да доведе до несакана распределба на радиоактивноста и зголемена изложеност на здравите ткива.

Поради комплексноста на дизајнот и развојот на имуноконјугатите, потребна е внимателна контрола и оптимизација на секој поединечен чекор во процесот на подготовка. Ова вклучува избор на соодветен таргет антиген, антитело и хелатор, оптимизација на реакцијата на конјугација, прочистување и карактеризација на добиениот имуноконјугат, како и развој на формулација која ќе ја зачува неговата стабилност во текот на складирањето и примената.

2.4 Лиофилизација на имуноконјугати

Моноклоналните антитела и нивните конјугати претставуваат комплексни биомолекули чија стабилност во водени раствори често е ограничена. Поради нивната протеинска природа, тие се подложни на различни физички и хемиски процеси на деградација, како што се денатурација, агрегација, фрагментација, оксидација, деамидација, изомеризација, и хидролиза. Овие процеси можат да доведат до промена на структурата, намалување на биолошката активност, губење на имунореактивноста и формирање на агрегати. Стабилноста на моноклоналните антитела зависи од повеќе фактори, вклучувајќи ги составот и рН-вредноста на формулацијата, концентрацијата на протеинот, температурата, изложеноста на светлина, присуството на различни ексципиенси и механичкиот стрес (Le Basle et al., 2020). Кај имуноконјугатите, покрај зачувувањето на структурата и функцијата на антителото, потребно е да се зачува и функционалноста на ковалентно прикачениот хелатор или простетична група.

Процесот на лиофилизација скратено дефиниран како сушење со замрзнување, претставува еден од најчесто применуваните пристапи за подобрување на стабилноста на биофармацевтските препарати кои во основа содржат протеински молекули. Со отстранување на најголемиот дел од водата од формулацијата се намалува молекулската подвижност и се забавуваат процесите на физичките и хемиските деградација. На тој начин се добива цврст

фармацевтски облик со подобрена стабилност и продолжен рок на употреба, како и поедноставено складирање и транспорт. Овој пристап е особено значаен за моноклоналните антитела и нивните конјугати, кај кои зачувувањето на тридимензионалната структура е неопходно за одржување на специфичното врзување со антигенот. Меѓутоа, стабилноста на протеинот во лиофилизирана состојба зависи од соодветниот избор на составот на формулацијата и од оптимизацијата на самиот процес на лиофилизација (Butreddy et al., 2021; Cheng et al., 2025).

Процесот на лиофилизација се состои од три главни фази: замрзнување (freezing), примарно сушење (primary drying) и секундарно сушење (secondary drying). Во фазата на замрзнување, водениот раствор се лади под температурата на замрзнување, при што дел од водата се кристализира во форма на мраз, а протеинот и другите растворени се концентрираат во незамрзната фаза од формулацијата. Во текот на примарното сушење, замрзнатата вода се отстранува со сублимација под намален притисок, при што се отстранува најголем дел од водата и се формира порозна структура на лиофилизиран колач. Во секундарното сушење, преостанатата вода која е поврзана и заостаната во формулацијата се отстранува со десорпција при повисока температура.

Во некои протоколи, веднаш по замрзнувањето се применува дополнителен чекор на контролирано загревање, означен како annealing. При овој чекор замрзнатата формулација се одржува определено време на температура над температурата на стаклеста транзиција на максимално концентрираната замрзната фаза. На тој начин се овозможуваат раст и реорганизација на кристалите на мразот, при што се добиваат поголеми и порамномерно распределени кристали. По нивната сублимација се формираат поголеми пори со што може да се зголеми брзината на сублимацијата и да го скрати времетраењето на примарното сушење. Annealing-чекорот може да придонесе и за кристализација на ексципиенси, како што е манитолот (Cheng et al., 2025). Секоја од овие фази може значајно да влијае врз квалитетот на финалниот производ.

И покрај предностите, лиофилизацијата претставува процес кој може да предизвика физички и хемиски стрес врз протеинските молекули. Во текот на

замрзнувањето може да се појави денатурација која настанува при ладење, концентрирање на растворените компоненти и промени во рН-вредноста и раздвојување на фазите. Адсорпцијата на протеинските молекули на површината на замрзнатата вода може да предизвика нарушување на нивната структура и појава на агрегација. Дополнително, кристализацијата на компонентите од пуферот во текот на замрзнувањето може да го промени составот на незамрзнатата фаза и да предизвика промена на рН-вредноста. Во текот на сушењето, отстранувањето на молекулите на вода поврзани со површината на протеинот создава дехидратациски стрес, кој исто така може да доведе до денатурација и агрегација (Butreddy et al., 2021; Cheng et al., 2025).

Поради сите наведени можни причинители на „стрес“ кај протеинските молекули, клучен аспект при дизајнот на формулација за лиофилизација е изборот на соодветни стабилизатори и помошни супстанции. Во формулациите како ексципиенси најчесто се користат дисахариди, полиоли, аминокиселини, сурфактанти, пуфери и средства за зголемување на волуменот и формирање на лиофилизиран колач. Дисахаридите, како што се сахароза и трехалоза, се стабилизатори кои имаат улога на лиопротектанти, бидејќи ја зачувуваат протеинската структура за време на замрзнување и сушење. Во цврста состојба, нивното стабилизирачко дејство се поврзува со формирањето аморфна стаклеста формација, со која се намалува молекулската подвижност, како и со можноста да формираат водородни врски со протеинот на местото на отстранетите молекули на вода (Cheng et al., 2025).

Сурфактантите, како што се полисорбат 20 или 80, се додаваат со цел да делуваат како површински активни супстанции кои може да ја намалат агрегацијата на површините и да ја олеснат реконституцијата. Нивната концентрација треба внимателно да се оптимизира, бидејќи онечистувањата и продуктите на деградација кои потекнуваат од полисорбатите, вклучувајќи ги пероксидите, може да придонесат за оксидација и агрегација на протеинот.

Пуферите се избираат со цел да се одржи рН-вредноста во опсег погоден за стабилноста на антителото, при што треба да се земе предвид нивната можност за кристализација во текот на замрзнувањето. Делумната кристализација на компонентите на пуферот може да предизвика значителна промена на рН-вредноста во не замрзнатата фаза (Cheng et al., 2025).

Манитолот често се користи како полнител, односно средство за зголемување на волуменот и подобрување на механичката цврстина и изгледот на лиофилизираниот колач (bulking agent). Во текот на лиофилизацијата тој може да кристализира и да обезбеди структурна потпора на целиот колач. Сепак, кристалниот манитол вообичаено нема значително директно стабилизирачко дејство врз протеинот, поради што најчесто се комбинира со стабилизаторите со аморфна природа, како сахароза или трехалоза. Односот помеѓу манитолот и дисахаридот треба внимателно да се избере за да се обезбеди прифатлива структура на колачот, без да се намали заштитното дејство на аморфната фаза (Cheng et al., 2025).

При развојот на протокол за лиофилизација, критични се параметрите поврзани со фазите на замрзнување, примарно и секундарно сушење. Во фазата на замрзнување, брзината на ладење, температурата при која започнува формирањето на кристали од вода, степенот на суперладење и евентуалната примена на annealing-чекор, влијаат врз големината и морфологијата на добиените кристали, а со тоа и врз порозноста на финалниот колач, времетраењето на сушењето и времето на реконституција. Во фазата на примарно сушење, температурата на полиците, притисокот во комората и температурата на производот треба да бидат внимателно избрани со цел да се обезбеди понатамошна ефикасна сублимација, без нарушување, пукнатини или колапс на колачот. Нецелосното примарно сушење може да резултира со висока содржина на резидуална влага, колапс на структурата и намалена стабилност на производот. Во фазата на секундарно сушење, целта е контролирано намалување на резидуалната влага до ниво на целната содржина на резидуална влага (Cheng et al., 2025).

Квалитетот на финалниот лиофилизиран производ се проценува преку повеќе критични атрибути на квалитет, меѓу кои се изгледот и морфологија на лиофилизираниот колач, време на реконституција, рН-вредност по реконституција, присуството на видливи и субвидливи честички, содржина на резидуална влага, чистота, степен на агрегација, зачувување на структурата и биолошката активност на антителото или имуноконјугатот. Кај лиофилизираните имуноконјугатите дополнително е важно да се потврди дека процесот не

предизвикал промена врз конјугираната молекула, стабилноста на хелаторот и способноста за понатамошно радиобележување (Cheng et al., 2025).

Оттука, дизајнот на лиофилизирана формулација на имуноконјугати треба да се базира на истовремена рамнотежа помеѓу составот на формулацијата и параметрите на процесот, со прифатливи фармацевтско-технолошки карактеристики и практичност на процесот. Оптимизираниот протокол треба да овозможи добивање на стабилен препарат со зачувани физичко-хемиски карактеристики. Истовремено, процесот треба да биде репродуцибилен, ефикасен и погоден за понатамошно зголемување на производствениот обем.

Од фармацевтско-технолошки и индустриски аспект, течните формулации често се поповолни поради поедноставното и поекономично производство. Сепак, кога стабилноста во раствор е ограничена, лиофилизацијата претставува соодветна стратегија за добивање цврст фармацевтски облик, со подобрена стабилност при складирање и транспорт и продолжен рок на употреба (Le Basle et al., 2020; Butreddy et al., 2021). За да се ограничат нестабилностите на моноклоналните антитела во водени раствори, процесот на лиофилизација е метод од избор за добивање на цврст фармацевтски облик на моноклонални антитела.

2.5 Физичко-хемиска карактеризација на лиофилизирани формулации на имуноконјугати

Физичко-хемиската карактеризација претставува клучен интегриран дел при развојот на стабилни лиофилизирани формулации на имуноконјугати, бидејќи овозможува проценка на параметрите кои можат да влијаат врз квалитетот, стабилноста и понатамошната примена за обележување со радионуклид. Првичната карактеризација вклучува визуелна проценка на изгледот на лиофилизираната формулација, определување на време на реконституција, определување на рН-вредност, определување на содржина на резидуална влага и евалуација на чистота (ICH Q5C, 1995; Awotwe-Otoo et al., 2012). Овие параметри се показатели за квалитет на формулацијата и процесот на лиофилизација и служат како основа за подетална понатамошна аналитичка карактеризација, односно квалитативна и квантитативна проценка со примена на спектроскопски методи.

2.5.1 Изглед, време на реконституција, pH и резидуална влага

Изгледот на формулација е еден од првите параметри кои се оценуваат по завршување на процесот на лиофилизација. Идеално, лиофилизираниот колач треба да биде хомоген, компактен и без видливи знаци на колапс, пукнатини, топење или нерамномерна структура. Сепак, во литературата е нагласено дека изгледот на колачот не секогаш претставува критичен атрибут на квалитет, бидејќи одредени визуелни отстапувања можат да бидат последица на составот на формулацијата, садот, волуменот на полнење или условите на лиофилизација, без притоа да укажуваат на нарушена стабилност, безбедност или ефикасност на производот (Patel et al., 2017). Поради тоа, визуелната проценка треба да се интерпретира заедно со другите физичко-хемиски параметри, како што се времето на реконституција, pH-вредност, резидуална влага и чистотата (Garidel et al., 2015).

Времето на реконституција е практичен параметар кој покажува колку брзо и целосно лиофилизираниот препарат преминува во хомоген раствор по додавање на соодветен растворувач. За лиофилизирани формулации, реконституцијата вообичаено се дефинира како време потребно за добивање бистар раствор, односно раствор без присуство на видливи и нерастворени честици, по додавање на растворувачот (Awotwe-Otoo, et al., 2020). Пократкото време на реконституција е пожелно, особено кај препарати наменети за клиничка примена, бидејќи се олеснува ракувањето и се намалува можноста за варијабилност во текот на подготовката.

pH-вредноста на реконституираниот раствор е дополнителен показател за соодветноста на формулацијата. Кај моноклоналните антители, pH-вредноста може значајно да влијае врз структурната стабилност, како и врз склоноста кон агрегација или хемиска деградација. Оттука, мерењето на pH по реконституција е важно за да се потврди дека формулацијата обезбедува погодни услови за зачувување на стабилноста на имуноконјугатот и за понатамошно радиобележување. Дополнително, кај формулациите наменети за обележување со радионуклид, pH-вредноста може да влијае врз ефикасноста на формирањето стабилен комплекс со радионуклидот, како и врз квалитетот на финалниот препарат.

Резидуалната влага е показател за ефикасноста на секундарното сушење и претставува еден од атрибутите на квалитет на лиофилизираните формулации базирани на протеини. Оптималната содржина на резидуална влага зависи од видот и составот на формулацијата и треба да се потврди преку испитување на стабилноста (Wang, 2000). Содржината на резидуална влага кај лиофилизираните формулации на имуноглобулини е до 3 % (w/w) (Duralliu, 2020). Зголемената содржина може да ја намали стабилноста преку формирање на агрегати, преку деградација и формирање на фрагменти, како и преку хидролиза на врската помеѓу антителото и конјугираниот дел (Roy et al., 1992).

2.5.2 Квалитативна и квантитативна проценка

2.5.2.1 UV/Vis спектроскопија

Поради присуството на ароматични аминокиселини, пред сè тирозин и триптофан, моноклоналните антитела од групата на имуноглобулини покажуваат карактеристична апсорпција во UV подрачјето од околу 280 nm. Според тоа, мерењето на апсорбанцата на 280 nm се користи за квалитативна проценка на протеинската природа. Притоа, од особено значење е примерокот за анализа да се подготви во пуфер што не интерферира на оваа бранова должина (Seyedi et al., 2020).

Освен за квалитативна, UV/Vis спектроскопијата се користи и за квантитативна проценка на формулации на имуноконјугати. Поради тоа, по секоја подготвена развојна серија, освен идентитетот, потребно е да се определи и концентрацијата на имуноконјугатот, најчесто изразена во mg/mL. Споредено со хроматографските методи за определување на содржина, методите базирани на UV/Vis спектроскопија се релативно пократки и поедноставни за изведба, не вклучува употреба на стандард за квантификација на содржината и се работи со многу мали загуби на примерокот, без остаток од реагенси за отпад (Le Basle et al., 2020).

2.5.2.2 ATR-FTIR и Раманска спектроскопија

За структурна карактеризација на моноклоналните антитела и нивните конјугати може да се користат различни техники:

- нуклеарна магнетна резонантна спектроскопија (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy - NMR);
- циркуларен дихроизам (Circular Dichroism spectroscopy - CD);

- вибрациски спектроскопски техники:
 - инфрацрвена спектроскопија со Фуриерова трансформација (Fourier-Transform Infrared spectroscopy - FTIR) и
 - Раманска спектроскопија (Garidel, 2004).

Од наброените техники, вибрациските наоѓаат најширока примена за следење на промените во секундарната структура. Овие техники обезбедуваат информации за вибрациите на хемиските врски во молекулата. Се базираат на мерење на апсорбанците или трансмитанците од зрачењето, кои понатаму резултираат со појава на вибрации на врските во молекулата. Поради различните физички механизми на зајакнување на сигналот, FTIR и Раманската спектроскопија се сметаат за комплементарни техники една на друга. FTIR се темели на промени во диполниот момент, додека Раманската спектроскопија се темели на промени на молекулската поларизабилност, односно способноста на електронскиот облак на молекулата да се деформира под дејство на електромагнетно поле. Затоа, со FTIR може прецизно да се анализира амид I/II регионот, со кој се потврдува присуството на β -плочите, кои, пак, се доминантни кога структурата на IgG е зачувана, додека со Раманската спектроскопија се добиваат дополнителни информации и за амид III регионот, со кој се потврдува дека скелетната конформација, вклучително и на ароматичните аминокиселини, не е нарушена (Pelton & McLean, 2000). Комбинираната употреба на двете техники овозможува да се детектираат конформациски промени кои може да настанат при подготовка на примерокот, како и при додавање на ексципиентите во формулацијата.

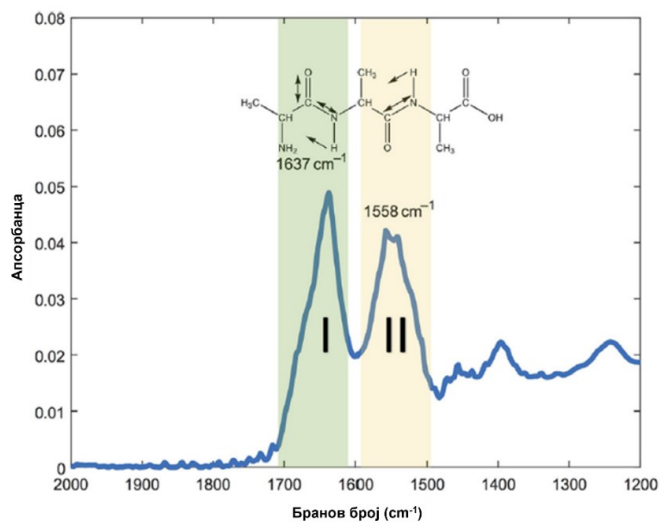
Атенуираната тотална рефлектанца со Фуриерова трансформација (Attenuated Total Reflectance Fourier-Transform Infrared spectroscopy - ATR-FTIR) претставува моќна, неструктивна техника која може да се користи при развој на протеински формулации поради можноста за утврдување на секундарната структура на протеините (Tiernan et al., 2020). Дополнително, оваа техника може да се користи и при изведба на студии на стабилност на протеински формулации, особено кога станува збор за детекција на агрегати во формулациите по завршување на процесот на лиофилизација (Telikepalli et al., 2014).

За разлика од класичниот пристап, каде инфрацрвените зраци не поминуваат низ примерокот, кај ATR-FTIR зраците патуваат до ATR кристал со висок индекс

на рефракција, каде се рефлектираат повеќекратно, со што се постигнува тотална внатрешна рефлексija. На границата помеѓу кристалот и примерокот се формира еванесцентен бран кој продира на мала длабочина во молекулата од примерокот. Како резултат на тоа, групи во молекулата апсорбираат дел од енергијата на овој бран. Намалувањето на рефлектираниот сигнал како функција од брановиот број се регистрира и по Фуриеровата трансформација се добива ATR-FTIR спектар, кој го одразува хемискиот состав и структурните карактеристики на материјалот од допирната површина. Најчесто користени материјали за изработка на ATR кристалите се: ZnSe, Ge, Si и дијамант. Притоа, изборот на кристал зависи од повеќе фактори, како, на пример: индекс на рефракција, механичка издржливост, работен pH опсег и чувствителност на примерокот (Byrne et al., 2020).

Сигналите кои се добиваат кај ATR-FTIR потекнуваат главно од вибрации на врските во скелетот на антителото и карактеристичните врски од страничните ланци во средниот инфрацрвен регион ($4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$). Според теоретските предвидувања и експерименталните податоци, во IR спектарот на протеините може да се карактеризираат амидни ленти кои, всушност, соодветствуваат со 9 амидни ленти, означени како: A, B, I-VII (Bandekar, 1992).

Најчесто карактеризирани се амид I ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) и амид II ($1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) лентите (Yang et al., 2015). Првата се должи на вибрации кои настануваат како резултат на истегнување на C=O и C–N групите од пептидната врска од α -хеликсите и β -плочите. Втората, пак, се должи на вибрации кои настануваат како резултат на свиткување на N–H врските, како и на истегнување на C–N и C–C врските (слика 3) (Schüle et al., 2007).



Слика 3 Графички приказ на амид I/II ленти

Figure 3 Graphical representation of the amide I/II bands

Сите карактеристични апсорпции за неконјугирано антитело и за имуноконјугат со новоформирани врски, се претставени во табела 1. Всушност, во имуноконјугатот се идентификуваат и дополнителни врски кои зависат од начинот на конјугацијата, односно дали истите се формирани преку лизинските или цистеинските остатоци.

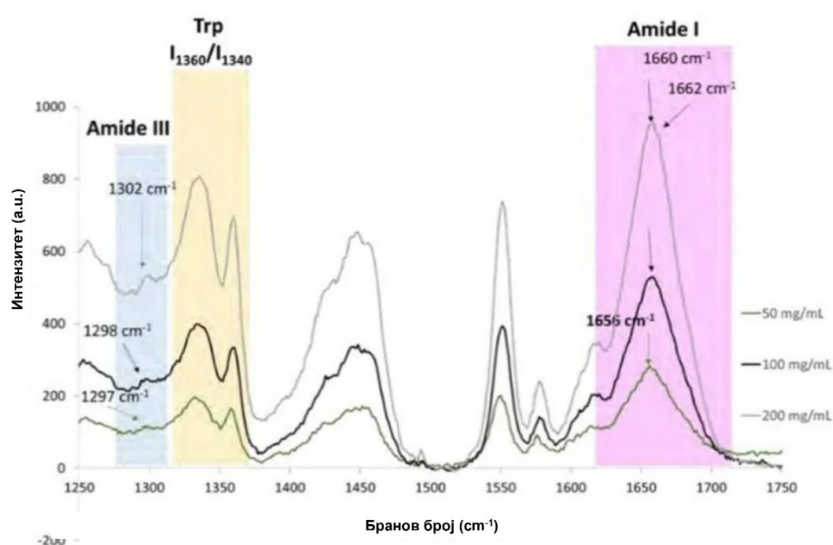
Табела 1 Интерпретација на карактеристични АТР-FTIR ленти кај антитела и имуноконјугати
Table 1 Interpretation of characteristic ATR-FTIR bands in antibodies and immunoconjugates

Структура	Апсорпциска лента (cm ⁻¹)	Антигено	Имуноконјугат
Амид I (1600–1700 cm ⁻¹)	Интрамолекуларна β-плоча	1615–1640; 1680–1695	Доминира во опсег од 1637–1640 cm ⁻¹ , без изразен пик „рамо“ во опсег од 1610–1620 cm ⁻¹
	α-хеликс	1648–1658	Не доминира, можен е слаб придонес
	Неуредна структура (Random coil)	1640–1648	Можен е мал придонес во опсег од 1640–1645 cm ⁻¹
	β-свртувања	1660–1680	Можна е појава на слаби ефекти во оваа лента
	Појава на агрегати	1637→1625	Поместување на лентата поради губење на интрамолекуларната β-плоча и формирање на интермолекуларна β-плоча
Амид II (1500–1600 cm ⁻¹)	Појава на агрегати	1610–1620; често и 1685–1695	Формирање на интермолекуларна β-плоча; Засилување во 1610–1620 cm ⁻¹
	N-H свиткување и C–N истегнување	1510–1580; често и 1540–1550	Присутна карактеристична амид II лента околу 1550 cm ⁻¹
Регион на „отпечаток од прст“	Изотиоцијанатна врска (SCN-конјугација)	1230–1285; често и 1050–1150	Не се очекува Можна појава или поинтензивна лента во опсег од 1230–1285 cm ⁻¹

*Интерпретацијата на асигнациите е направена според Jiang et al., 2011; Boulet-Audet et al., 2014; Вуте et al., 2020; Tiepman et al., 2020; Baird et al., 2020; Tinjor et al., 2024; van Naaen et al., 2024.

За да може да се утврди секундарната структура, поради силното препокривање на амидна I со вибрациите кои потекнуваат од водородните врски во молекулата на водата (1635 cm^{-1}), предвид се зема амидна III лентата ($1350\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$). Оваа лента се должи на комбинација од вибрации кои потекнуваат од истегнување на C–N врските и свиткување на N–H врските. Споредено со амидна I и амидна II, интензитетот на амидна III лентата е најмал и истата може да се визуелизира со Раманската спектроскопија (слика 4).

Раманската спектроскопија претставува вибрациска спектроскопска техника која се базира на нееластично расејување на монохроматска светлина, најчесто од ласерски извор. При интеракција на ласерското зрачење со молекулите, најголем дел од фотоните се расејуваат еластично, без промена на енергијата, додека мал дел се расејуваат нееластично, при што доаѓа до енергетско поместување кое одговара на вибрациите од врските во молекулата. Ваквото поместување се нарекува Раманско поместување и се изразува во cm^{-1} (Shipp et al., 2017; Pelton & McLean, 2000).



Слика 4 Графички приказ на карактеристични Рамански ленти од амид I/III региони

Figure 4 Graphical representation of characteristic Raman bands in the amide I/III regions

2.6 Евалуација на чистота на лиофилизирани формулации на имуноконјугати

2.6.1 SE-HPLC

За евалуација на чистотата на имуноконјугати кои во својата основа имаат моноклонално антителио се користи гел-филтрациската хроматографија (Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography – SE-HPLC).

SE-HPLC претставува аналитичка техника за раздвојување на протеините врз основа на нивната молекулска маса и нивната конформација и однесување во флуидот за разделување. Стационарната фаза е составена од сферични порозни честички со дефинирана големина на порите, додека раздвојувањето најчесто се изведува во водена мобилна фаза, при што треба да се внимава да се зачува нативната структура и да не настане денатурација на протеините. Во идеални услови, времето на елуирање на молекулите зависи од степенот до кој навлегуваат во порите на честичките (Arakawa et al., 2010).

Поголемите молекули не можат целосно да навлезат во порите, што значи дека кратко се задржуваат во колоната и се елуираат први. Помалите молекули навлегуваат во порите на честичките, поради што подолго се задржуваат во колоната и се елуираат подоцна. Следствено, при SE-HPLC анализа на моноклонални антителиа, високомолекулските видови, како што се агрегатите, се елуираат пред главниот мономер, додека нискомолекулските видови и фрагментите се елуираат по него (Mou et al., 2014).

Сепак, елуирањето не зависи исклучиво од молекулската маса, туку и од формата, конформацијата и хидродинамичките својства на протеинот. Дополнително, несаканите електростатски или хидрофобни интеракции со стационарната фаза може да влијаат врз задржувањето, обликот на пиковите и аналитичкиот принос (Arakawa et al., 2010).

При развој на метод базиран на SE-HPLC, раздвојувањето на главниот мономер од фрагментот со најблиска молекулска маса од 100 kDa, означен како LMWS 1+2 (Low Molecular Weight Species) што содржи (Fab')₂+Fab/c, претставува главен предизвик. Врз процесот на раздвојување влијание имаат различни фактори, меѓу кои најзначајни се составот, pH-вредноста и јонската јачина на мобилната фаза, како и температурата на колоната (Waters Corporation, 2023).

Во првата фаза од развојот на методот се врши оптимизација на мобилната фаза, така што најпрво се дефинира нејзиниот состав (комбинација од соодветен пуфер и сол), а потоа и јонската јачина.

Во втората фаза, вообичаено, како критични параметри се следат:

- резолуцијата помеѓу пиковите што соодветствуваат на главниот мономер и фрагментот LMWS 1+2;
- симетријата на главниот пик;
- бројот на теоретски подови за главниот мономер.

Конечната оптимизација на методот се постигнува со анализа на влијанието на протокот, рН-вредноста на мобилната фаза во опсег од 6,8–7,5, како и температура на примероците и колоната (Staub et al., 2011).

2.6.2 Електрофореза во редуцирачки и нередуцирачки услови

Натриум додецил сулфат – полиакриламид гел електрофореза (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis - SDS-PAGE) претставува широко користена аналитичка техника за раздвојување на протеините според нивната молекулска маса. Натриум додецил сулфат (SDS) предизвикува денатурација на протеините и им обезбедува негативен полнеж, поради што нивната миграција низ полиакриламидниот гел главно зависи од големината на молекулите. Протеините со помала молекулска маса мигрираат побрзо низ гелот во споредба со протеините со поголема молекулска маса.

За карактеризација на моноклонални антители и нивни конјугати, SDS-PAGE може да се изведува во редуцирачки и нередуцирачки услови. Во нередуцирачки услови не се применуваат редукциски средства, поради што дисулфидните врски меѓу полипептидните синџири остануваат зачувани. Во овој случај, немодифицираното антители се детектира како главна лента со молекулска маса од приближно 150 kDa. Оваа анализа овозможува процена на интегритетот на целата молекула и детекција на фрагменти или високомолекулски видови поврзани преку дисулфидни врски (Kirley & Norman, 2018).

Во редуцирачки услови, со додавање дитиотреитол или β -меркаптоетанол, се раскинуваат дисулфидни врски помеѓу полипептидните синџири. Како резултат на тоа, молекулата на IgG се раздвојува на тешки синџири со молекулска маса од приближно 50 kDa и лесни синџири со молекулска маса од приближно 25 kDa (Gallagher, 2012).

Споредбата на електрофоретскиот профил во двата услови обезбедува корисни информации за евентуалното присуство на фрагменти или други протеински онечистувања.

2.7 Радиоимуноконјугати

Радиоимуноконјугатите претставуваат посебна група имуноконјугати кај кои молекулата вектор, најчесто моноклонално антитело, фрагмент од антитело, пептид или друг биолошки вектор е поврзана со радионуклид. На овој начин се комбинира специфичноста на биолошкиот вектор за одреден молекуларен таргет со дијагностичките или терапевтските својства на радионуклидот. Во зависност од типот на радионуклидот и неговите физички карактеристики, радиоимуноконјугатите може да се користат за визуализација, радиоимунотерапија или тераностички пристапи.

Предноста на радиоимуноконјугатите е селективната испорака на радиоактивност до канцер клетките или нивната микросредина, со што се овозможува визуализација на канцерот или локално депонирање на доза од јонизирачко зрачење. Кај дијагностичките радиоимуноконјугати се користат радионуклиди погодни за SPECT или PET визуализација, додека кај терапевтските радиоимуноконјугати се применуваат β^- -честички, α -честички или Auger-ови електрони, чија енергија и домет на зрачење се избираат според големината, локализацијата и биологијата на самиот тумор.

Радиоимуноконјугатите може да се подготват преку неколку општи стратегии. Првиот пристап е директно радиобележување, при што радионуклидот се воведува директно во структурата на векторската молекула. Вториот и најчесто применуван пристап е индиректно радиобележување, при што векторот претходно се модифицира со бифункционален хелатор или простетична група, кои овозможуваат стабилно поврзување на радионуклидот. Простетична група се дефинира како мала органска молекула којашто е цврсто поврзана за моноклоналното антитело и којашто формира активен центар на модифицирано антитело и ќе биде местото каде што ќе се прикачи радионуклидот. Трет пристап е употреба на полимерни носачи, наночестички или други фармацевтски облици, кои можат да го транспортираат радионуклидот и истовремено да бидат функционализирани со таргет молекула.

Изборот на радионуклид зависи од планираната примена на радиоимуноконјугатот. За дијагностичка визуализација се користат мали молекули што овозможуваат поврзување на радионуклиди како ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{64}Cu , ^{68}Ga и ^{89}Zr , додека за терапевтска примена се користат радионуклиди како ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{161}Tb , ^{225}Ac , ^{211}At , ^{153}Sm , ^{166}Ho и ^{188}Re . Радиометалите, како ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{225}Ac и ^{161}Tb , најчесто се поврзуваат со векторот преку бифункционални хелатори, додека радионуклидите со халогена природа, како ^{131}I и ^{211}At , најчесто се воведуваат преку директна или индиректна халогенација, односно преку соодветни простетични групи (Liu, 2008; Walsh et al., 2021; Vanermen et al., 2024). Првиот клинички одобрен радиоимуноконјугат за терапевтска примена е ^{90}Y -ибритумомаб тиуксетан (Zevalin), анти-CD20 моноклонално антителио обележано со итриум-90, наменето за третман на одредени форми на не-Хочкинов лимфом. Овој пример ја покажува примената на моноклоналните антителиа како вектори за селективна испорака на терапевтски радионуклиди до туморските клетки.

Радиоимуноконјугатите припаѓаат во групата на радиофармацевтици, односно фармацевтски препарати кои содржат радионуклид и биолошки активна молекула наменета за дијагностичка или терапевтска примена. Како радиофармацевтици, тие мора да ги исполнуваат барањата за квалитет, безбедност и ефикасност дефинирани во соодветните фармакопеи и водичи, вклучувајќи радиохемиска чистота, стабилност, стерилност и апиногеност. Дизајнот на еден радиоимуноконјугат зависи од својствата на двете главни компоненти: биолошкиот вектор, кој ја определува специфичноста и биодистрибуцијата, и радионуклидот, кој ја определува дијагностичката или терапевтската функција.

При развој на радиоимуноконјугати, особено значајни се неколку предуслови: ефикасно и репродуктивно радиобележување, висока радиохемиска чистота, стабилност на радиоимуноконјугатот во физиолошки услови, зачувана имунореактивност на антителото, поволна биодистрибуција и минимална акумулација во други органи.

Радиохемиската чистота кај радиофармацевтиците најчесто се определува со инстант тенкослојна хроматографија (iTLC) и/или со радио-HPLC, бидејќи двете методи даваат комплементарни информации. iTLC е брза и едноставна метода за процена на приносот по реакција и радиохемиската чистота, при што лесно

може да се детектира слободен радионуклид, додека радио-HPLC обезбедува подобра резолуција и овозможува интеграција на сите радиоактивни пикови во хроматограмот. Кај радиобележани имуноконјугати со вектор моноклонално антители, радио-SE-HPLC дополнително овозможува процена дали радиоактивноста е поврзана со мономерот од имуноконјугат, агрегати или фрагменти. Затоа, iTLC и радио-HPLC може да се разгледуваат како комплементарни методи, односно iTLC за брза проверка на обележувањето и слободниот радионуклид, додека радио-HPLC детално го утврдува целокупниот радиохемиски профил и присуството на можни радиохемиски онечистувања.

Како предности на iTLC техниката се издвојуваат едноставниот начин на изведба, економичноста, можноста целата радиоактивност да биде детектирана и друго. Сепак недостатоците како, помалата ефикасност и често не можноста за добра резолуција помеѓу видовите, наметнува потреба некогаш да се користат истовремено, за дополнителна проверка (Gillings et al, 2020).

Еден од клучните аспекти при дизајнот на радиоимуноконјугати е процесот на модификација и радиобележување да не ја наруши биолошката активност на самиот вектор. Радиобележаниот имуноконјугат треба да ја задржи специфичноста, афинитетот кон целниот антиген, како и фармакокинетиката и биодистрибуцијата на немодифицираното антители. Прекумерната модификација со хелатори или простетични групи може да доведе до промени во полнежот, хидрофобноста, стабилноста, имунореактивноста и фармакокинетиката на молекулата. Затоа, бројот на хелаторски или простетични групи по молекула антители треба да биде контролиран и оптимизиран. Степенот на модификација се определува со соодветни аналитички методи, а добиените резултати се поврзуваат со радиобележувањето, стабилноста, имунореактивноста и биолошкото однесување на финалниот радиоимуноконјугат.

2.7.1 Радионуклиди (радиоактивни изотопи) за медицинска примена

Радионуклидите имаат централна улога во нуклеарната медицина, бидејќи овозможуваат визуализација на биолошки процеси, проценка на експресија на молекуларни таргети и селективна испорака на јонизирачко зрачење до целните ткива. Во зависност од физичките својства на радионуклидот и неговата медицинска примена, тие може да се користат за дијагностички, терапевтски или

тераностички цели. Тераностичкиот пристап претставува концепт во персонализираната медицина кој овозможува поврзување на дијагностиката и терапијата кон ист биолошки таргет. Во овој пристап, радиофармацевтикот како иста или структурно слична молекула може да се користи за визуализација и процена на биодистрибуцијата со користење на дијагностички радионуклид, а потоа, со соодветен терапевтски радионуклид, и за целна радионуклидна терапија.

Според видот на емитираното зрачење, радионуклидите што се применуваат во медицината најчесто се класифицираат како γ -емитери, позитронски емитери, β^- -емитери, α -емитери и Auger-ови електронски емитери. Одделни радионуклиди може да емитираат повеќе видови на честички или електромагнетно зрачење истовремено. Изборот на радионуклид зависи од неговиот физички полуживот, енергијата и типот на емитираното зрачење, досегот на честичките во ткивото, начинот на производство, достапноста, радиохемиските својства и можноста за стабилно поврзување со соодветна биолошка молекула. Кај радиофармацевтиците, особено е важно физичкиот полуживот на радионуклидот да биде усогласен со фармакокинетиката на биолошкиот вектор, како што се пептиди, мали молекули, фрагменти од антитела или интактни моноклонални антитела.

За дијагностичка примена се користат радионуклиди погодни за визуализација со единечна фотонска емисиона томографија (СПЕКТ) и позитронско емисиона томографија (ПЕТ). СПЕКТ-радионуклидите емитираат γ -фотони со енергија во опсег од 75-360 keV погодна за детекција со гама-камера, при што најчесто користени примери се и ^{99m}Tc , ^{131}I , ^{201}Tl , ^{111}In , ^{67}Ga . Технециум-99m има особено широка примена поради поволната γ -енергија, краткиот физички полуживот и достапноста преку генераторски систем. Од друга страна, ПЕТ-радионуклидите, како ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{89}Zr емитираат позитрони кои по анхилација со електрони создаваат два фотони со енергија од 511 keV, емитирани во спротивни насоки. Овој принцип овозможува добивање томографски слики со висока чувствителност и квантитативна процена на акумулацијата на радиофармацевтикот во ткивата.

За терапевтска примена се користат радионуклиди кои емитираат честички со доволна енергија за оштетување на канцер клетки. β^- -емитерите, како ^{90}Y , ^{177}Lu ,

^{131}I , ^{161}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho и ^{188}Re , имаат релативно подолг домет во ткивото и се погодни за третман на поголеми тумори или хетерогено распределени таргети. α -емитерите, како ^{225}Ac , ^{211}At , ^{223}Ra , ^{212}Pb и ^{212}Bi , испорачуваат зрачење со висок линеарен енергетски трансфер и краток домет, што овозможува интензивно локално оштетување на таргетираните клетки со ограничено влијание врз околното ткиво. Auger-овите електронски емитери имаат многу краток досег и се особено ефикасни кога радионуклидот е локализиран во непосредна близина на ДНК или во клеточното јадро.

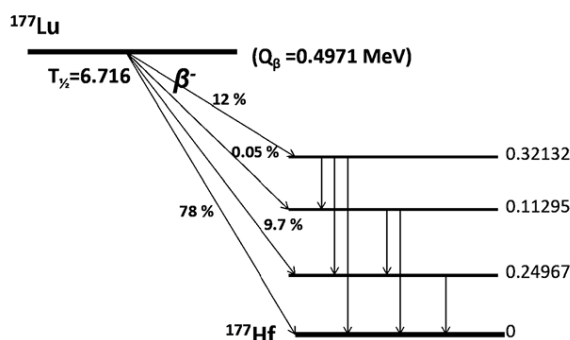
Во контекст на радиоимуноконјугатите, изборот на радионуклид мора да биде усогласен со биолошките својства на антителото или друг вектор. Моноклоналните антитела имаат долг циркулирачки полуживот и бавна акумулација во туморот, поради што за визуализација често се користат радионуклиди со подолг физички полуживот, како ^{89}Zr или ^{111}In . За терапевтски радиоимуноконјугати, радионуклиди како ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{131}I , ^{225}Ac , ^{211}At и ^{161}Tb се избираат според големината на туморот, експресијата на таргетот, потребниот досег на зрачењето и очекуваната токсичност во критичните органи на нивна акумулација (Gomes et al., 2020). Затоа, радионуклидот не се избира само според типот на емитираното зрачење, туку и според неговата компатибилност со векторот, хелаторот или простетичната група и крајната дијагностичка или терапевтска намена на радиоимуноконјугатот (Kufe et al., 2003; Gomes Marin et al., 2020).

Во оваа докторска дисертација посебно внимание е посветено на радионуклидите ^{177}Lu , ^{161}Tb , ^{211}At и ^{225}Ac , кои се од интерес поради нивните терапевтски својства и можноста за примена во развој на радиоимуноконјугати. Овие радионуклиди се избрани како предмет на истражување и се користени во експерименталниот дел на дисертацијата.

2.7.1.1 Лутециум-177 (^{177}Lu)

Лутециум-177 (^{177}Lu) е радионуклид кој за клиничка примена најчесто се произведува во нуклеарен реактор. Пристапи за добивање во акцелератор се опишани во литературата главно како истражувачка можност, но не и како рутинска постапка за производство (Vogel et al., 2021). Кога се користи нуклеарен реактор за негово производство, може да се добие директно, со озрачување со неутрони на таргет ^{176}Lu преку реакцијата $^{176}\text{Lu}(n,\gamma)^{177}\text{Lu}$, или индиректно преку

озрачување на итербиум-176 (^{176}Yb), при што најпрво се добива ^{177}Yb кој понатаму со β^- распад преминува во ^{177}Lu , според реакцијата $^{176}\text{Yb}(n,\gamma)^{177}\text{Yb} \rightarrow ^{177}\text{Lu}$. Главната разлика меѓу директниот и индиректниот начин е во специфичната активност на добиениот ^{177}Lu . Со директниот начин се добива ^{177}Lu со присутен носач (carrier-added (c.a)), додека со индиректниот начин, со радиохемиско одделување од таргетниот материјал се добива no-carrier-added ^{177}Lu (n.c.a) којшто има повисока специфична активност. Ова е особено важно при радиобележување на вектори во мали моларни количини. Распадот на ^{177}Lu е проследен со емисија на β^- честиси со различна енергија: 497 keV (78,6%), 384 keV (9,1%) и 176 keV (12,2%) и емисија на γ фотони со 113 keV (6,6%) и 208 keV (11%), што овозможува сцинтиграфска визуелизација и дозиметриска проценка. Преку β^- распадот се добива стабилно јадро од хафниум-177 (^{177}Hf), според шемата прикажана на слика 5. Периодот на полураспаѓање е 6,65 дена (Dash et al., 2015).



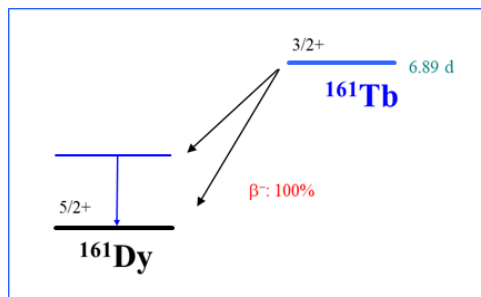
Слика 5 Поедноставена шема на распад на лутециум-177

Figure 5 Simplified decay scheme lutetium-177

2.7.1.2 Тербиум – 161 (^{161}Tb)

Тербиум-161 (^{161}Tb) е β^- емитирачки радионуклид кој најчесто се добива како no-carrier-added ^{161}Tb во нуклеарен реактор преку озрачување на збогатен гадолиниум-160 (^{160}Gd). Притоа, најпрво се формира ^{161}Gd , кој понатаму со β^- распад преминува во ^{161}Tb , според реакцијата $^{160}\text{Gd}(n,\gamma)^{161}\text{Gd} \rightarrow ^{161}\text{Tb}$ (слика 6). По радиохемиското одделување од таргетниот материјал се добива ^{161}Tb без додаден носач (no-carrier-added, (n.c.a.)) (IAEA, 2024). Неговиот период на полураспаѓање е приближно 6,89 дена до стабилен диспрозиум-161 (^{161}Dy), со

емисија на β^- честички, γ -зрачење и значителен број нискоенергетски и Auger-ови електрони (Gracheva et al., 2019)

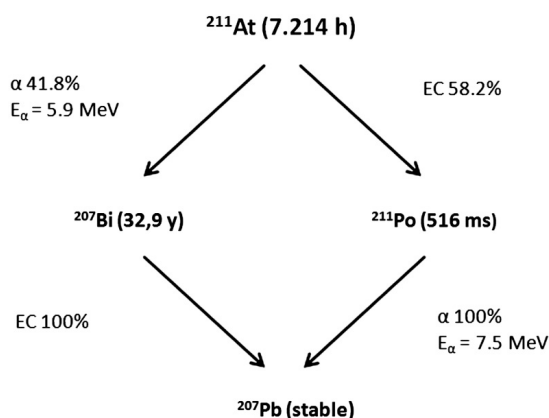


Слика 6 Поедноставена шема на распад на тербиум-161

Figure 6 Simplified decay scheme terbium-161

2.7.1.3 Астатин-211 (^{211}At)

Астатин-211 (^{211}At) е радионуклид со емисија на α честички. За разлика од ^{177}Lu и ^{161}Tb , кои најчесто се добиваат во нуклеарен реактор, ^{211}At главно се произведува во циклотрон со озрачување на природен бизмут-209 (^{209}Bi) со α -честички, преку нуклеарна реакција $^{209}\text{Bi}(\alpha, 2n)^{211}\text{At}$. Употребата на бизмут како таргет е практична, бидејќи природниот бизмут е моноизотопен. Енергијата на α -снопот мора внимателно да се контролира, и се одржува под приближно 28 MeV, бидејќи при повисоки енергии се активира конкурентната реакција $^{209}\text{Bi}(\alpha, 3n)^{210}\text{At}$ што резултира со создавање на онечистување од ^{210}At и последователното формирање на радиотоксичен полониум-210 (^{210}Po). По озрачувањето, ^{211}At се изолира од таргетот ^{209}Bi , најчесто со постапка на сува дестилација или со „влажни“ постапки со користење на растворувачи за екстракција (Zalutsky & Pruszyński, 2011). ^{211}At има период на полураспаѓање од околу 7,2 часа и се распаѓа преку две главни гранки. Приближно 42 % се распаѓа со директна α -емисија до ^{207}Bi , додека приближно 58 % се распаѓа преку електронски зафат до ^{211}Po , поради многу краткиот период на распаѓање понатаму се распаѓа со α -емисија до стабилно олово-207 (^{207}Pb). Поради тоа, секој распад на ^{211}At во крајна линија е придружен со емисија на една α -честичка (слика 7) (Guérard et al., 2013).



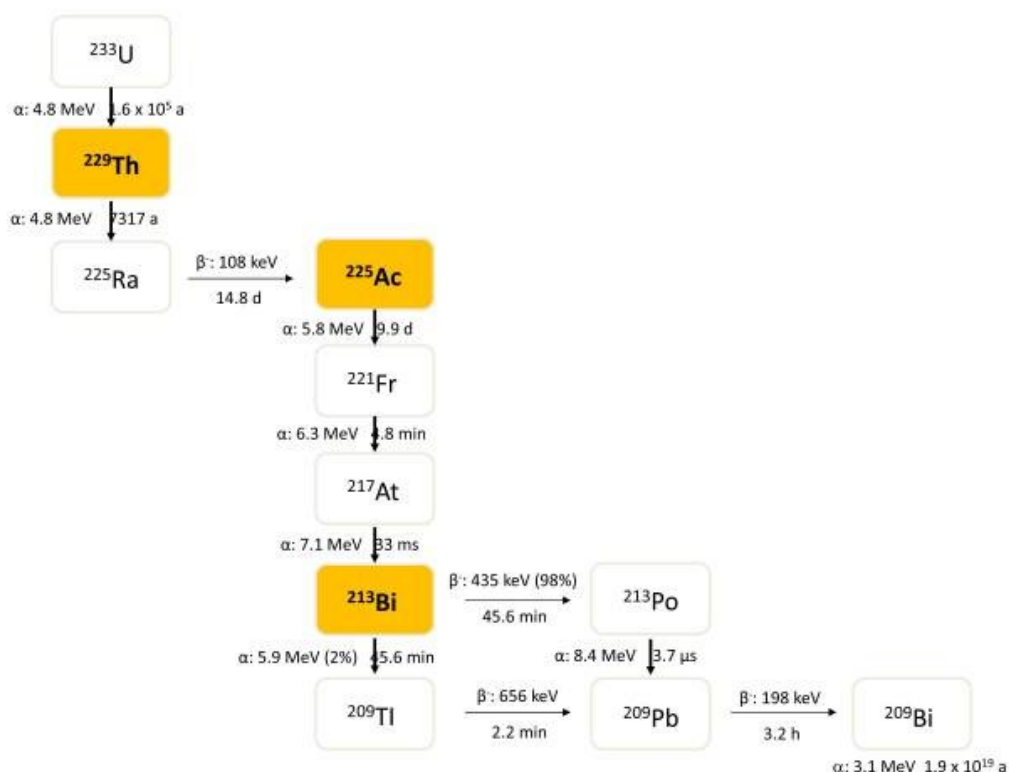
Слика 7 Поедноставена шема на распад на астатин-211

Figure 7 Simplified decay scheme astatine-211

За разлика од радиометалите, ^{211}At не се комплексира со класичните хелатори, како на пример DOTA. Радиоастатинирањето на антителата најчесто се изведува индиректно, со примена на простетични групи што овозможуваат формирање ковалентна врска меѓу астатинот и органската молекула, а потоа и нејзино поврзување со антителото.

2.7.1.4 Актиниум-225 (^{225}Ac)

Актиниум-225 (^{225}Ac) е α емитер со период на полураспаѓање од приближно 9,92 дена. Се распаѓа преку низа краткоживеачки изотопи потомци до практично стабилен ^{209}Bi , со емисија на вкупно четири α -честички (слика 8) (Morgenstern et al., 2018). Најчесто се добива од ториум-229/актиниум-225 ($^{229}\text{Th}/^{225}\text{Ac}$) генераторски систем, но поради ограничената достапност на ^{229}Th се развиваат и алтернативни производствени патишта, вклучувајќи озрачување на ^{232}Th со високоенергетски протони и производство во циклотрон преку реакцијата $^{226}\text{Ra}(p,2n)^{225}\text{Ac}$ (IAEA, 2024).



Слика 8 Поедноставена шема на распад на актиниум-225

Figure 8 Simplified decay scheme of actinium-225

Емисијата на четири α -честички во рамките на распадниот ланец овозможува депонирање висока енергија на кратко растојание и претставува основа за терапевтската примена на ^{225}Ac . Но од друга страна, пак, високата повратна енергија при α -распадот може да предизвика ослободување на радионуклиди-потомци од комплексот со хелаторот. Нивната последователна прераспределба и акумулација во неспецифични органи претставуваат важен предизвик за безбедноста на радиофармацевтскиот препарат.

Табела 2 Збирни карактеристики на радионуклиди од интерес
Table 2 Summarized characteristics of the radionuclides used

Радионуклид	Физички полуживот	Начин на распад	Досег во меко ткиво	Начин на производство
¹⁷⁷ Lu	6,65 дена	β ⁻ до ¹⁷⁷ Hf	β ⁻ досег 1,7–2,0 mm	Нуклеарен реактор директно ¹⁷⁶ Lu(n,γ) ¹⁷⁷ Lu или индиректно ¹⁷⁶ Yb(n,γ) ¹⁷⁷ Yb → ¹⁷⁷ Lu
¹⁶¹ Tb	6,95 дена	β ⁻ до стабилен ¹⁶¹ Dy; дополнително Auger-ови електрони	β ⁻ досег ~2 mm	Нуклеарен реактор ¹⁶⁰ Gd(n,γ) ¹⁶¹ Gd → ¹⁶¹ Tb
²¹¹ At	7,21 часа	α-емитер; делумно електронски зафат до ²¹¹ Po, со кумулативна α- емисија	α-досег 50–90 μm	Циклотрон ²⁰⁹ Bi(α,2n) ²¹¹ At
²²⁵ Ac	9,92 дена	α-емитер; низа на распад со вкупно 4 α-честички до ²⁰⁹ Bi	α-досег 40–100 μm	²²⁹ Th/ ²²⁵ Ac генераторски систем; или преку ²²⁶ Ra(p,2n) ²²⁵ Ac или високоенергетско озрачување на ²³² Th

2.7.2 Радиобележан даратумумаб во дијагностички и терапевтски студии

Радиобележувањето на даратумумаб ја проширува неговата примена од стандардна имунотерапија кон молекуларна визуализација и таргетирана радиоимунотерапија. Бидејќи даратумумаб специфично се врзува за CD38, кој е високо експресиран на клетките на мултипен миелом, неговите радиобележани деривати се испитуваат како потенцијални дијагностички и терапевтски радиофармацевтски препарати кај CD38-позитивни хематолошки малигнитети. За дијагностичка примена, [⁶⁴Cu]Cu-DOTA-даратумумаб во претклиничките истражувања, покажал специфично врзување за CD38-позитивни клетки од миелом и подобра специфичност за детекција на дисеминирана болест во споредба со [¹⁸F]FDG кој се користи во позитронско емисиона томографија со компјутерска томографија (ПЕТ/КТ) (Caserta et al., 2018). Дополнително, [⁸⁹Zr]DFO-даратумумаб е развиен како имуно-PET радиофармацевтик за визуализација на CD38-позитивни миеломски лезии, при што претклиничките резултати покажале чувствителна детекција на тумори со различна големина (Ghai, 2018). Сличен концепт е применет и кај лимфом, каде ⁸⁹Zr-обележаниот даратумумаб е испитуван за CD38-насочена имуно-ПЕТ визуализација (Kang et al., 2018).

За терапевтска примена, даратумумаб е испитуван како вектор за насочена испорака на α -емитери. Даратумумаб обележан со актиниум-225 (²²⁵Ac) во претклиничките истражувања се покажал како ветувачка терапевтска стратегија за третман за хематолошки тумори (Dawicki, 2019). Дополнително, даратумумаб обележан со олово-212 во претклинички истражувања покажал регресија на туморот и зголемено преживување, што го поддржува понатамошното испитување на овој пристап во алфа радиоимунотерапија за третман на мултипен миелом (Quelven, 2020). Овие студии ја потврдуваат релевантноста на даратумумаб како CD38-насочен вектор за развој на радиоимуноконјугати, особено за дијагностичка визуализација и таргетирана радионуклидна терапија кај мултипен миелом и други CD38-позитивни хематолошки малигнитети.

2.8 Студии на стабилност на лиофилизирана формулација на имуноконјугати

Целта на студиите на стабилност е да се потврди стабилноста на препаратот за време на чувањето и врз основа на добиените податоци да се определат условите за чување и рокот на употреба.

Антителата и нивните имуноконјугати, поради начинот на добивање со рекомбинантна технологија и нивната протеинска природа, според Законот за лековите и медицинските помагала се класифицираат како биолошки препарати (МАЛМЕД, 2007). Следствено на тоа, нивната стабилност треба да се проценува со примена на соодветни аналитички методи и според принципите дадени во релевантните водичи на Интернационалната конференција за хармонизација (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use - ICH), особено ICH Q5C – *Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products*, водич за тестирање на стабилност на биотехнолошки/ биолошки препарати (ICH Q5C, 1995).

Стабилноста на имуноконјугатите во голема мера зависи од способноста за зачувување на нивната конформација, чистота и биолошка активност. Поради нивната протеинска природа, тие се исклучително чувствителни на различни надворешни фактори, меѓу кои температурни промени, оксидација, изложеност на светлина, варијации во pH-вредноста и јонската јачина, присуство на влага и механички влијанија. Овие фактори може да доведат до структурни и физичко-хемиски промени, како што се агрегација, фрагментација, оксидација, деамидација или промени во молекулската хетерогеност, што може да влијае врз квалитетот и понатамошната примена на препаратот (Le Basle et al., 2020).

Согласно ICH Q5C водичот, кај биолошките лекови не постои еден единствен аналитички метод или параметар кој целосно може да ја прикаже нивната стабилност. Поради тоа, потребно е да се воспостави соодветен сет на аналитички методи со кои ќе може да се детектираат можни промени во идентитетот, чистотата, молекулската структура, потентноста и биолошката активност на препаратот. Овој пристап е особено значаен кај имуноконјугатите, бидејќи нивната стабилност зависи не само од протеинската структура, туку и од

стабилноста на конјугираниот продукт по модификациите во протеинската структура и нивната функционалност за понатамошна примена.

Според истиот водич, студијата на стабилност треба да биде поставена врз основа на добро дефиниран протокол, со однапред определени услови на чување, временски точки на испитување и спецификациски критериуми. Како значајни параметри за следење се наведуваат потентноста, чистотата и молекулската карактеризација, како и други физичко-хемиски карактеристики. Кај лиофилизираниите формулации дополнително значење имаат надворешниот изглед на лиофилизираниот колач, времето на реконституција, присуството на видливи честички по реконституција, pH-вредноста и содржината на резидуална влага (ICH Q5C, 1995; USP <790>, 2026; USP <791>, 2026; USP <921>; Fang et al., 2020).

2.8.1 Конвенционални студии на стабилност

Конвенционалните студии на стабилност претставуваат основен пристап за дефинирање на условите и времето на чување на фармацевтските препарати, бидејќи овозможуваат следење на квалитетот на препаратот во реални или забрзани услови во текот на подолг временски период (ICH Q1A(R2), 2003). Кај лиофилизираниите формулации базирани на протеини, ваквата проценка е особено значајна, бидејќи стабилноста зависи од составот на формулацијата, процесот на лиофилизација и условите на чување (Wang, 2000).

Според ICH Q1A(R2) – *Stability Testing of New Drug Substances and Products*, стабилноста на новите лековити супстанции и производи се проценува преку добро дефиниран протокол на стабилност, кој вклучува долготрајни (Long-term stability study), интермедиерни студии (Intermediate stability study) и забрзани (Accelerated stability study) студии, а кога е применливо и дополнителни стрес испитувања за подобро разбирање на патиштата на деградација и нивните продукти. Овие студии се спроведуваат со поставување на примероците во комори за стабилност, во нивното примарно и секундарно пакување, при однапред дефинирани услови на температура (T) и релативна влажност (RH). Во претходно определени временски точки се земаат примероци за анализа и се испитуваат според воспоставената спецификација за време на чување на финалниот производ.

За препарати наменети за чување во фрижидер на 2–8 °C, ICH Q1A(R2) наведува долготрајни студии на стабилност во времетраење од најмалку 12 месеци, на температура од 5°C ± 3°C, без дефиниран услов за релативна влажност, додека забрзаните студии на стабилност се изведуваат на 25°C ± 2°C/ 60% RH ± 5% RH, во период од 6 месеци.

Доколку за време на забрзаната студија се појави значителна промена помеѓу третиот (Т3) и шестиот (Т6) месец на тестирање, интерпретацијата на рокот на употреба треба да се базира првенствено на податоците од долготрајната студија. Доколку значајна промена се појави во првите три месеци од тестирањето при забрзани услови на складирање, потребно е да се дискутира можниот ефект од краткотрајни отстапувања надвор од означените услови на чување, како што може да се јават за време на транспорт или ракување со препаратот.

Иако конвенционалните студии на стабилност се неопходни за дефинирање на условите на чување и рокот на употреба, тие се временски долготрајни и финансиски оптоварувачки. Ова претставува ограничување во раната фаза на развој, кога е потребна брза споредба на повеќе формулации и избор на најсоодветен состав. Поради тоа, покрај конвенционалните студии, во современиот фармацевтски развој се користат и предиктивни софтверски пристапи за побрза проценка на стабилноста.

2.8.2 Предиктивна проценка на стабилност со Accelerated Stability Assessment Program (ASAP)

Со цел да се надминат дел од ограничувањата на конвенционалните студии, развиени се предиктивни методологии за проценка на стабилноста во пократок временски период, како што се: Risk based predictive stability, Accelerated Stability assessment, Accelerated Stability Assessment Program (ASAP) и други (Qiu et al., 2017). Овие не ги заменуваат класичните студии на стабилност, туку овозможуваат рано добивање информации за однесувањето на формулацијата и нејзината чувствителност кон одредени стрес услови.

Accelerated Stability Assessment Program (ASAP) претставува предиктивен пристап за забрзана проценка на стабилноста, кој овозможува добивање на рани податоци за стабилноста на формулацијата преку изложување на примероците на контролирани услови на покачена температура и релативна влажност. Иако

ASAP концептот првично е развиен и најшироко применуван кај мали молекули и цврсти фармацевтски дозирани форми, во поновите истражувања се забележува негова применливост како предиктивен модел за стабилност кај биолошки молекули базирани на моноклонални антители. Ваквиот пристап е особено корисен во фазите на развој, кога е потребно брзо донесување одлуки за избор на формулација, оптимизација на составот и проценка на влијанието на пакувањето (Lennard et al., 2024).

Во поновите студии е покажано дека пристапот со користење на предиктивни студии на стабилност може да се примени и кај лиофилизирани формулации, при што проценката на влијанието на температурата и резидуалната или апсорбираната влага има особено значење за стабилноста на протеинските формулации (Shalaev et al., 2023). Дополнително, ASAP пристапот е применлив и за комплексни формулации од антители и нивни имуноконјугати кои се во цврста агрегатна состојба (Dai et al., 2024). Ова е особено релевантно за формулацијата испитувана во овој докторски труд, бидејќи станува збор за лиофилизиран имуноконјугат базиран на моноклонално антитело, кај кој зачувувањето на мономерната форма е критично за понатамошна примена.

Основниот принцип на ASAP се базира на изоконверзиски пристап, при што не е неопходно да се следи целосна кинетичка крива на деградација или однапред да се претпостави ред на реакцијата. Наместо тоа, се дефинира спецификациски лимит, односно праг на промена, за избран критичен параметар за квалитет, а потоа се определува времето потребно тој лимит да биде достигнат при различни комбинации на температура и релативна влажност (T/RH услови). На овој начин се овозможува предикција на стабилноста и во случаи кога деградацијата не следи едноставна кинетика, што е особено важно кај биомолекули, каде истовремено може да се јават повеќе патишта на деградација (Waterman, 2011).

Во ASAPprime[®] софтверот, влијанието на температурата и релативната влажност врз степенот на деградација се опишува преку модифицирана Арениусова равенка, односно со интеграција и на влијанието од влажноста (humidity-corrected Arrhenius) модел. Овој модел ја поврзува изоконверзиската временска точка, односно времето потребно да се достигне спецификацискиот лимит со температурата, енергијата на активација и факторот на чувствителност

кон влага. Практично, софтверот ја поврзува изоконверзиската временска точка (t_{iso}) со T и RH според следнава равенка:

$$\ln \frac{1}{t_{iso}} = \ln(k) \ln A - \frac{E_a}{RT + B(RH)}, \text{ каде}$$

$\frac{1}{t_{iso}}$ – изоконверзациско време (times to specification limits) или

k – брзина на деградација, односно реципрочна вредност на изоконверзиското време;

A – предекспоненцијален фактор;

E_a – енергија на активација, J/mol;

R – универзална гасна константа, 8,314 J/(mol·K);

T – апсолутна температура, K.

Ваквиот пристап овозможува екстраполација кон предвидените услови на чување и добивање на предиктивна проценка за стабилноста на формулацијата. Овој пристап е литературно поткрепен и применет во комерцијално достапниот ASAPprime® софтвер (FreeThink Technologies, н.д.).

При интерпретација на ASAP резултатите кај формулации базирани на моноклонални антитела и нивни имуноконјугати, намалувањето на мономерната форма, појавата на високомолекулски видови, односно агрегати, и појавата на нискомолекулски видови, односно фрагменти, претставуваат значајни индикатори за нарушување на стабилноста. Кај лиофилизираниите формулации, ваквиот пристап е особено значаен, бидејќи влагата претставува еден од главните фактори што може да ја забрза физичката и хемиската деградација на протеинските молекули. Поради тоа, кај лиофилизирани имуноконјугати, ASAP не треба да се разгледува како замена за конвенционалните студии на стабилност, туку како предиктивна и компаративна алатка која овозможува рано препознавање на ризиците за нестабилност и рационален избор на формулација за понатамошно следење во реални услови на чување.

Во ASAP пристапот, примероците најчесто се тестираат надвор од финалното затворено примарно пакување, во отворени шишенца поставени во затворени комори со контролирана температура и релативна влажност. На тој начин се овозможува директен контакт меѓу лиофилизираната формулација и дефинираната влажност од средината, со цел побрзо достигнување на рамнотежна влажност и забрзување на деградациските процеси чувствителни

на влага. По завршување на дефинираниот временски стрес, примероците се отстрануваат од коморите и се чуваат на предвидената температура на складирање до моментот на анализа, со цел да се минимизира дополнителната деградација пред испитувањето (Rack, 2017; Williams, 2018).

За лиофилизираните протеински формулации, ASAP е особено корисен развоен пристап, бидејќи поставените услови ги забрзуваат деградациските процеси, а при тоа времетраењето на оваа студија најчесто е до 30 дена. Повеќето студии покажале дека ASAP моделите за антитела во лиофилизирана форма може да дадат резултати кои се во согласност со податоци од долготрајните студии. Сепак, ваквите предвидувања треба да се интерпретираат внимателно, бидејќи стабилноста на протеинските молекули може да биде резултат на повеќе паралелни физички и хемиски процеси (Legrand et al., 2023; Luo et al., 2025).

Во развојот на лиофилизираните формулации базирани на имуноконјугати, примената на ASAP има посебна практична вредност, бидејќи стабилноста на китот кој служи за обележување е директно поврзана со понатамошното ефикасно радиобележување. Зачувувањето на мономерната форма, ограничената појава на агрегати и фрагменти, како и одржувањето на стабилен хроматографски профил се важни предуслови за репродукцибилна подготовка на радиоимуноконјугат со висока радиохемиска чистота.

Со оглед на тоа што во реални услови примарното пакување ја намалува директната изложеност на лиофилизираниот кит на влага, ASAP пристапот треба да се разгледува како предиктивна и компаративна алатка за проценка на чувствителноста на формулацијата кон температура и влажност.

3 ЦЕЛИ НА ТРУДОТ

Главната цел на оваа докторска дисертација беше развој, оптимизација и физичко-хемиска карактеризација на лиофилизираната формулација на имуноконјугат базиран на даратумумаб како вектор, наменета за подготовка на [^{177}Lu]Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA радиофармацевтик, со потенцијална примена во целна радионуклидна терапија на мултипен миелом. Дополнително, концептот беше поставен така што добиената лиофилизирана формулација да биде платформа за радиобележување со други терапевтски радиометали, како што се ^{161}Tb и ^{225}Ac .

За реализација на главната цел, беа поставени следниве посебни цели:

- да се подготват имуноконјугати базирани на моноклоналното антитело даратумумаб со различни бифункционални хелатори и да се оптимизираат условите за конјугација;
- да се развијат лиофилизирани формулации на избраниот имуноконјугат со користење различни ексципиенси;
- да се изврши карактеризација на добиените лиофилизирани формулации преку определување на физичко-хемиските карактеристики и профилот на чистота;
- да се развие и оптимизира постапка за радиобележување со ^{177}Lu на избраната лиофилизирана формулација и да се изврши проценка на квалитетот на добиениот радиофармацевтик;
- да се процени стабилноста на лиофилизираната формулација преку забрзани, долготрајни и предиктивни студии на стабилност, со цел дефинирање на условите за чување и рокот на употреба.

Како независен истражувачки сегмент, предвидена е и прелиминарна студија за потврда на концептот (proof-of-concept) за развој на ^{211}At -обележан радиоимуноконјугат на моноклоналното антитело 9E7.4 со соодветна простетична група.

Во рамките на оваа студија, беше испитан алтернативен пристап за подготовка на радиоимуноконјугат, како почетен чекор кон понатамошен развој на ^{211}At -обележани радиоимуноконјугати и воспоставување нова истражувачка насока во областа на таргетираната алфа терапија на мултипен миелом.

4 МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Во оваа докторска дисертација, како вектори за истражување беа користени две моноклонални антитела, даратумумаб и 9E7.4. Материјалите и методите поврзани со даратумумаб се опишани во дел I, додека за анти-CD138 моноклоналното антитело 9E7. се прикажани во дел II.

I. МОНОКЛОНАЛНО АНТИТЕЛО ДАРАТУМУМАБ

4.1 Вектор, хелирачки агенси и радионуклиди

- Вектор

Како вектор беше користен даратумумаб, целосно хумано анти-CD38 моноклонално антитело (Janssen Biologics B.V., The Netherlands). Антителото беше користено за подготовка на имуноконјугати со различни бифункционални хелатори, наменети за обележување со ^{177}Lu , ^{225}Ac и ^{161}Tb . Во комерцијалната формулација, на секои 100 mg даратумумаб, се присутни следниве ексципиенти: глацијална оцетна киселина (0,9 mg), натриум ацетат трихидрат (14,8 mg), натриум хлорид (17,5 mg), манитол (127,5 mg), полисорбат 20 (2,0 mg) и вода за инјекции. Комерцијалниот производ претставува концентрат за подготовка на интравенска инфузија, со pH-вредност приближна од 5.5 (EMA, 2024).

- Бифункционални хелатори

За конјугација на даратумумаб беа користени следниве бифункционални хелатори:

- **p-SCN-Bn-DOTA** - 2,2',2'',2'''-(2-(4-изотиоцијанатобензил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетраил) тетраоцетна киселина (MedChemExpress EU, Sweden);
- **DOTA-NHS естер** - 2,2',2''-(10-(2-((2,5-диоксипиролидин-1-ил)окси)-2-оксоетил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7-триил) триоцетна киселина (MedChemExpress EU, Sweden);
- **p-SCN-Bn-1B4M-DTPA** - (2-(4-изотиоцијанатобензил)-6-метил-диетилен-триамин пентаоцетна киселина).

- Радионуклиди

За радиобележување беа користени следниве радионуклиди:

- Лутециум – 177 во облик на $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ во воден раствор на 0,04 M HCl (EndolucinBeta 40 GBq/mL, ITM, Germany n.c.a);
- Актиниум – 225 во облик на $[^{225}\text{Ac}]\text{AcCl}_3$ (ITG Garching, Germany);
- Тербиум – 161 во облик на $[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$ (TerThera (Breda, The Netherlands)).

Експериментите со радионуклидот ^{177}Lu беа реализирани во Институтот за нуклеарни науки „Винча“, Универзитет во Белград, Република Србија.

Експериментите со радионуклидите ^{161}Tb и ^{225}Ac беа изведени во Лабораторија за радиохемиски истражувања, Институт за нуклеарни и радиолошки науки и технологија, енергија и безбедност, Национален центар за научни истражувања „Демокритос“, Атина, Грција.

4.1.1 Конјугација на антитело даратумумаб со хелатори

Пред конјугацијата, комерцијалната формулација на даратумумаб беше прочистена и неговата концентрација беше определена спектрофотометриски и прилагодена во опсег од 2–4 mg/mL. За добивање на имуноконјугатите беа користени три бифункционални хелатори: *p*-SCN-Bn-DOTA, DOTA-NHS естер и *p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA, применети во различен моларен вишок во однос на антителото, односно 10-, 20-, 30- и 50-пати моларен вишок.

Беа искористени два протоколи на конјугација со користење на различни пуфери и тоа 0,1 M карбонатен пуфер (pH 8,5) и 0,1 M фосфатен пуфер (pH 8,0 и 8,5). Во првиот протокол, реакцијата на конјугација беше изведена во 0,1 M фосфатен пуфер (pH 8,0), со инкубација на 4 °C, во времетраење од 18 часа. Во вториот протокол, конјугацијата беше изведена и во двата пуфери на pH 8,5, со инкубација на 37 °C, во времетраење од 1,5 часа. Во сите случаи, реакционите смеси беа инкубирани со благо мешање, за да се обезбеди рамномерна реакција меѓу достапните аминокиселини на антителото и реактивните групи на хелаторите. По завршување на реакцијата, добиените имуноконјугати беа прочистени со три последователни циклуси на ултрафилтрација со користење на 0,15 M амониум ацетатен пуфер (pH 7,0) (Carl Roth), користејќи филтри за ултрацентрифугирање, Amicon® Ultra-4 (30 kDa, Merck, Germany) на 5000 rpm. На овој начин беа отстранети неврзаните хелатори и нискомолекулските видови од реакционата смеса. По прочистувањето, концентрацијата на сите

имуноконјугати беше определена спектрофотометриски и приспособена до концентрација од 1 mg/mL, како работна концентрација на имуноконјугатите во сите понатамошни испитувања.

Хелаторите беа подготвени непосредно пред употреба, со растворање во соодветниот реакционен пуфер користен за конјугација и краткотрајно мешање до целосно растворање.

4.2 Формулации за лиофилизација

Формулациите за лиофилизација беа подготвени во две основни серии, при што во секоја серија беа опфатени по пет формулации, означени како F1–F5. Сите формулации беа приспособени на крајна концентрација на имуноконјугатот од 1 mg/mL. Во првата серија означена како W.F1–F5, како растворувач беше користена ултрачиста вода, произведена во лабораторијата (TKA MicroPure-ST, Германија). Во втората серија, означена како S.F1–F5, формулациите беа подготвени со идентичен состав на формулациите, но со 0,9 % (w/v) раствор на NaCl (физиолошки раствор) (Алкалоид А.Д., Северна Македонија) како растворувач.

Во двете серии, формулациите F1 и F2 се разликуваа според концентрацијата на фосфатниот пуфер, при што и двете содржеа 1 % (w/v) манитол како ексципиент за формирање на лиофилизиран колач. Формулациите F3–F5 беа подготвени без пуфер и содржеа комбинација од манитол и сахароза како крио- и лиопротективи. Во формулациите F3 и F4 беа применети различни односи на манитол и сахароза, додека формулацијата F5 дополнително содржеше и 0,02% (v/v) полисорбат 20 како сурфактант.

Дополнително, за формулацијата F5 беше подготвена и споредбена варијанта во која сахарозата беше заменета со трехалоза, со цел да се процени влијанието на лиопротектантот врз физичко-хемиските својствата на лиофилизираниот имуноконјугат.

Деталниот состав на формулациите, изразен како моларни односи на ексципиентите, е прикажан во табела 3.

Имуноконјугат кој беше користен за развој на формулациите за лиофилизација е даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA подготвен со 30-пати моларен вишок.

Табела 3 Состав на формулациите за лиофилизација: пуфер и односи на
ексципиенси

Table 3 Composition of freeze-drying formulations: buffer and excipient ratios

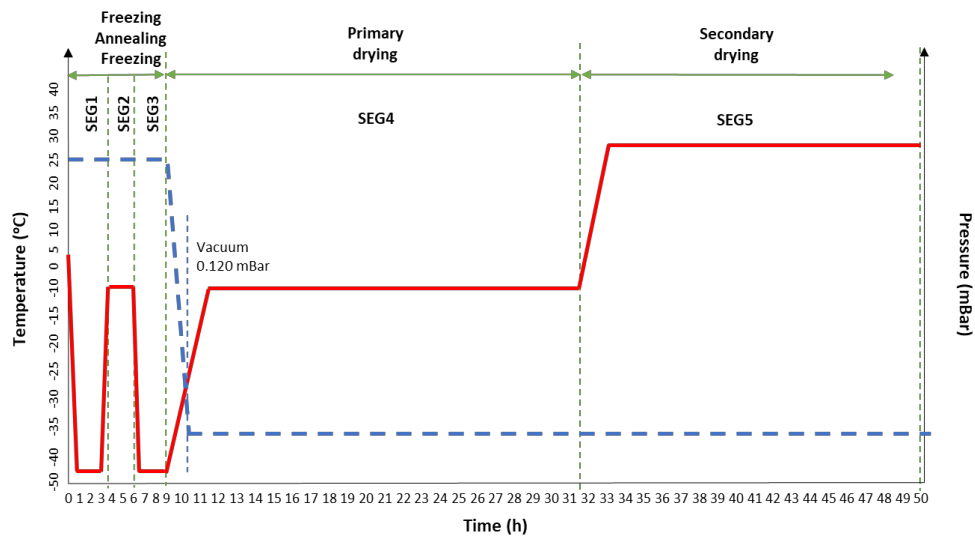
Формулација 1 (F1)	0,1 М фосфатен пуфер (pH 8,0); 1% (w/v) манитол
Формулација 2 (F2)	0,01 М фосфатен пуфер (pH=8,0); 1% (w/v) манитол
Формулација 3 (F3)	сахароза:mAb = 1:450; манитол:сахароза= 2:1
Формулација 4 (F4)	сахароза:mAb = 1:450; манитол:сахароза= 4:1
Формулација 5 (F5)	сахароза/ трехалоза:mAb = 1:450; манитол:сахароза/ трехалоза = 2:1; 0,02% (v/v) Полисорбат 20

4.2.1 Протокол за лиофилизација

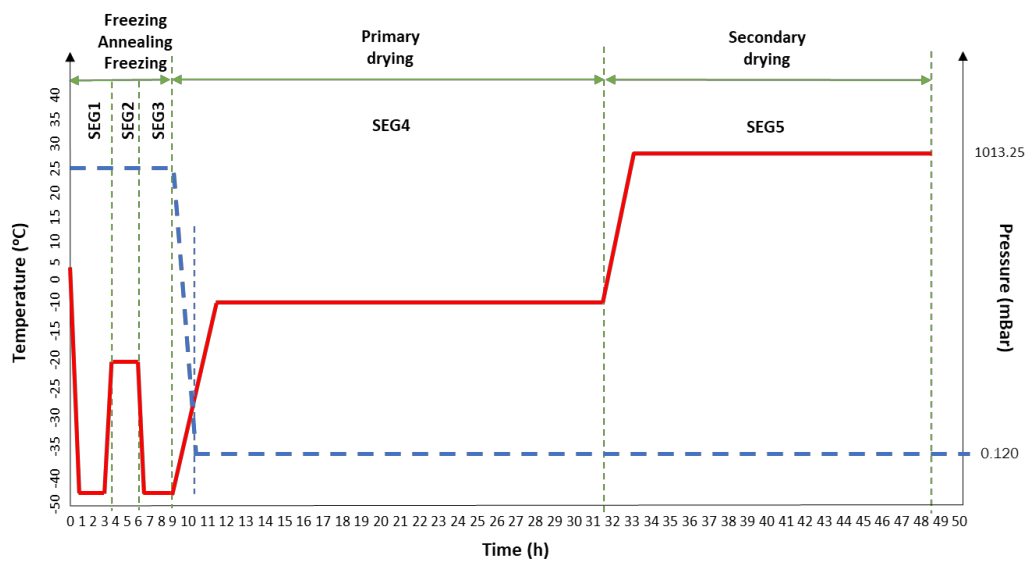
Леофилизацијата беше изведена со лабораториски леофилизатор за мали серии FreeZone 6 Liter, опремен со полици и систем за автоматско затворање на шишенцата во комората (stoppering tray) (Labconco, USA). Од секоја булк течна формулација на имуноконјугат беше префрлен по 1 mL во стаклени шишенца од тип I, со капацитет од 3 mL. Шишенцата беа делумно затворени со гумени затворачи (бутил) од 13 mm со две „нозе“. Сите примероци беа истовремено поставени на полиците претходно изладени на 4 °C.

Леофилизацијата беше изведена според три различни протоколи, кои се разликуваа во температурата на примарното сушење и времетраењето на секундарното сушење. Секој протокол вклучуваше пет последователни сегменти: замрзнување, annealing-чекор, повторно замрзнување, примарно и секундарно сушење. Температурата на полиците, брзината на промена на температурата, времетраењето на секој сегмент, како и притисокот во комората, како и времетраењето на секој сегмент се прикажани во табела 4, додека графичките прикази на протоколите се дадени на сликите 9–11.

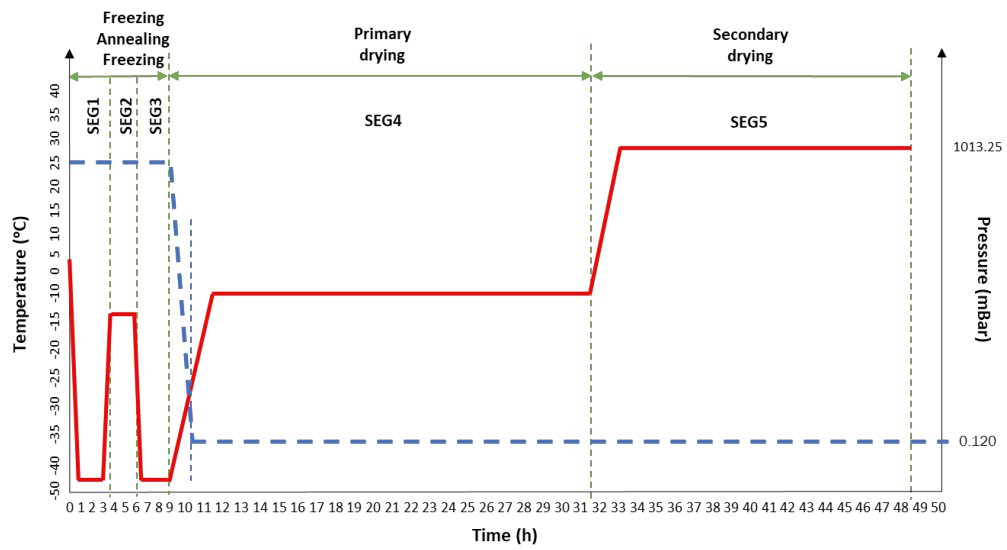
Вкупното времетраење на циклусите кај трите протоколи изнесуваше приближно 50 часа, со мали разлики меѓу протоколите, главно како резултат на различните услови во фазите на примарно и секундарно сушење.



Слика 9 Графички приказ на протокол 1 за лиофилизација
Figure 9 Graphical representation of freeze-drying protocol 1



Слика 10 Графички приказ на протокол 2 за лиофилизација
Figure 10 Graphical representation of freeze-drying protocol 2



Слика 11 Графички приказ на протокол 3 за лиофилизација
Figure 11 Graphical representation of freeze-drying protocol 3

Табела 4 Температурни параметри и времетраење на сегментите во
протоколите за лиофилизација
Table 4 Temperature parameters and segment duration in the freeze-drying
protocols

Сегмент	Параметар	Протокол 1	Протокол 2	Протокол 3
1 Замрзнување	Поставена Т (°C)	-40	-40	-40
	Брзина на промена на температурата / Ramp rate (°C/min)	1,0	1,0	1,0
	Времетраење (h)	3	3	3
2 Annealing - чекор	Поставена Т (°C)	-10	-10	-10
	Брзина на промена на температурата / Ramp rate (°C/min)	0,5	0,5	0,5
	Времетраење (h)	2	2	2
3 Замрзнување	Поставена Т (°C)	-40	-40	-40
	Брзина на промена на температурата / Ramp rate (°C/min)	1,0	1,0	1,0
	Времетраење (h)	1,5	1,5	1,5
4 Примарно сушење	Поставена Т (°C)	-10	-20	-15
	Брзина на промена на температурата / Ramp rate (°C/min)	0,15	0,15	0,15
	Времетраење (h)	18	18	18
5 Секундарно сушење	Поставена Т (°C)	+25	+25	+25
	Брзина на промена на температурата / Ramp rate (°C/min)	0,15	0,15	0,15
	Времетраење (h)	8	8	11

4.2.2 Диференцијална скенирачка калориметрија

Диференцијално скенирачката калориметрија (DSC) беше користена како метод со кој се добија дополнителни информации за физичките својства на матриксот, односно термалните карактеристики на лиофилизираниот матрикс, како и за детекција на фазните промени кои настануваат при контролирано ладење и загревање на примероците. Анализата беше изведена според однапред дефиниран температурен протокол, со прилагодување на минималната температура согласно работниот температурен опсег на инструментот

(NETZSCH DSC 204F1, Germany) (Horn et al., 2018). Примероците најпрво беа ладени од 25 °C до -75 °C со брзина од 0,5 °C/min, а потоа беа загревани до 50 °C со брзина од 20 °C/min. За интерпретација на резултатите главно беше разгледувана температурата на стаклест премин, при што беа следени евентуални промени на базната линија и појава на термички процеси.

4.3 Физичко-хемиска карактеризација на лиофилизирани формулации на имуноконјугати

4.3.1 Изглед, време на реконституција, pH и резидуална влага

За визуелна проценка на изгледот, лиофилизираните формулации беа фотографирани во кутија со црна основа (black photo box). При проценката беа земени предвид хомогеноста на лиофилизираната формулација, нејзината компактност и присуството на евентуални видливи промени, како што се пукнатини, колапс или нерамномерна структура.

Времето на реконституција беше определено по додавање 1 mL физиолошки раствор во секоја од формулациите. Всушност, беше мерено времето потребно да се добие бистар и хомоген раствор, без присуство на остаток од видливи и нерастворени честици.

По реконституцијата, pH-вредноста на добиените раствори беше измерена на собна температура со pH-метар Jenway 3510 (Cole-Parmer, USA).

Резидуалната влага во лиофилизираните формулации, беше определена со волуметриска титрација по Карл Фишер, користејќи титратор Compact V20S (Mettler Toledo, USA). За анализа беа одмерени приближно 20 mg од секоја лиофилизирана формулација, под контролирани услови на влажност и при температура од 25 °C.

4.3.2 Квалитативна и квантитативна проценка

4.3.2.1 MALDI-TOF MS

За определување на односот антитело/хелатор беше користена техниката MALDI-TOF масена спектроскопија. За таа цел, соодветните имуноконјугати беа растворени во 1 mL ултрачиста вода. Поради чувствителноста на инструментот на присуство на соли (на пример, NaCl), пуфери (на пример, фосфатен или карбонатен) и нискомолекулски ексципиенси (на пример, полисорбат 20),

примероците беа претходно десалтирани со ултрафилтрација. Десалтирањето беше изведено преку три последователни циклуси на ултрафилтрација, користејќи Amicon® Ultra-0.5 (30 kDa, Merck, Germany) филтри. По ултрафилтрацијата, прочистениот имуноконјугат беше задржан како концентриран примерок од приближно 20 μ L и користен за понатамошна анализа.

За оптимизација на кристализацијата на матриксот и подобрување на десорпцијата/јонизацијата, на концентрираниот примерок беа додадени 80 μ L раствор за ресуспензија, составена од 30 % (v/v) ацетонитрил и 70 % (v/v) 0,1 % трифлуороцетна киселина (TFA). Вака подготвените раствори беа хомогенизирани и употребени *ex tempore*.

MALDI-TOF анализата беше изведена на Axima Performance масен спектрометар (Shimadzu, Јапонија), користејќи не'рфосувачка челична таргет-плочка. За подготовка на дамката со примерок, 1 μ L од примерокот беше нанесен на таргет-плочката и веднаш прекриен со 1 μ L раствор на матриксот. Како матрикс беше користен раствор на синапинска киселина во концентрација од 20 mg/mL, подготвен со растворање во 50 % (v/v) ацетонитрил и 0,1% (v/v) TFA. Овој матрикс е најчесто применуван за протеини со висока молекулска маса и обезбедува стабилни сигнали и соодветна десорпција во линеарен режим. По сушење на дамката на собна температура, спектрите беа аквизирани во линеарен режим на позитивни јони.

За работа на инструментот беа поставени следниве параметри: повторување на ласерот 1, ласерска моќност 85, пулсна екстракција 150000 и опсег на маса 10–300 kDa. За секој примерок беа собирани спектри под исти услови, со цел споредба меѓу неконјугираното антитело и соодветните имуноконјугати.

Обработката на сигналите беше изведена со стандарден протокол за детекција и центроидизација на пиковите: ширина на пик 80 канали, average smoothing и gradient-centroid детекција на пик.

За секој имуноконјугат, добиен со различен моларен вишок на хелатор, беше определена привидната молекулска маса и споредена со масата на прочистено неконјугирано антитело, измерено во идентични услови. Односот хелатор/антитело беше пресметан според равенката:

$$CAR = \frac{Mr \text{ (имуноконјугат)} - Mr \text{ (антитело)}}{Mr \text{ (хелатор)}}$$

4.3.2.2 UV/Vis спектроскопија

За идентификација на имуноконјугатот беа снимени спектри во опсег на бранова должина од 200 до 400 nm. Понатаму, за квалитативна проценка на протеинската природа, вака добиените спектри беа споредени со спектарот добиен од прочистеното неконјугирано антитело.

UV/Vis спектроскопијата беше искористена и за квантитативна проценка на имуноконјугатот, со мерење на апсорбанцата на 280 nm. За пресметка на концентрацијата беше користен соодветен моларен апсорпциски коефициент за имуноконјугат базиран на даратумумаб, кој изнесува $225\,552\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

И квалитативната и квантитативната анализа беа изведени на UV/Vis спектрофотометар VWR® UV-1600PC (Avantor, USA).

4.3.2.3 ATR-FTIR и Раманска спектроскопија

За проценка на структурниот интегритет на лиофилизираните формулации на имуноконјугати беа користени две вибрациски спектроскопски техники, ATR-FTIR и Раманска спектроскопија.

За споредбена проценка на потенцијалните промени во секундарната структура, беа снимени FTIR спектри на лиофилизираните примероци, користејќи Cary 630 спектрометар, опремен со дијамантски ATR кристал (Agilent Technologies, USA). Конкретно, спектрите беа снимени во опсег од $2000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Спектралната резолуција беше поставена на 4 cm^{-1} , со акумулација на 64 скенирања по примерок и позадински спектар земен пред секое поставување на примерок. Леофилизираниот примерок беше поставени на површината од ATR кристалот, а за аквизиција на спектрите и нивна иницијална обработка беше користен софтверот MicroLabPC (Agilent Technologies, USA).

Бидејќи вибрациите на врските од матриксот и присуството на резидуална влага можат значајно да интерферираат во средниот IR регион, особено околу 1640 cm^{-1} , под истите услови беа анализирани и плацебо примероци што ги содржеа истите ексципиенси (фосфатен пуфер, NaCl, сахароза/трехалоза, манитол и полисорбат 20). Плацебо спектрите беа користени за контрола на ефектите од

матриксот и, по потреба, за добивање на секундарен деривативен спектар, со цел појасна интерпретација на амид I/II лентите.

Раманските спектри беа снимени на собна температура во опсег од 2000–100 cm^{-1} , со микро-Рамански мултиканален спектрометар JobinYvon LabRam 300 Infinity (Horiba, France). Екситацијата беше изведена со He–Ne ласер ($\lambda = 632 \text{ nm}$), без употреба на филтер за атенуација, а мерењата се изведуваа со Olympus MPlanN конфокален микроскоп со објектив (x50). Спектралната резолуција беше поставена на 4 cm^{-1} , со конфокален отвор од приближно 2 μm , при што позицијата на примерокот на површината беше контролирана со моторизирана x–y платформа. Калибрацијата на Раманското поместување беше изведена со пиковите на силика на 520,7 cm^{-1} . Времето на аквизиција и бројот на акумулации беа поставени на 20 секунди и 20 скенирања, соодветно. Лиофилизираните примероци беа поставувани директно под ласерскиот зрак.

4.4 Евалуација на чистота на лиофилизирани формулации на имуноконјугати

4.4.1 SE-HPLC

Систем и хроматографски услови

За евалуација на чистотата на лиофилизираните формулации на имуноконјугатите беше користен HPLC систем Waters Alliance, кој се состои од модул за раздвојување e-2695 и Waters 2489 UV/Vis детектор (Waters, Corporation, USA). Овој систем беше адаптиран за изведба на SE-HPLC, имајќи предвид дека целата анализа беше направена на колона XBridge Premier Protein SEC (250 Å, 2,5 μm , 7,8 mm I.D. $\times$ 300 mm) (Waters Corporation, USA).

Развој на метод

Развојот на SE-HPLC методот беше предизвик за да може целосно да се следи чистотата и стабилноста на имуноконјугатот. Развојот започнува со избор на мобилна фаза, односно со користење на пуфер кој нема да влијае на обликот на протеинскиот дел во имуноконјугатот. Затоа, на самиот почеток се користеше пуфер со најниска концентрација, односно 25 mM фосфатен пуфер ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) со pH 7,0. Во пуферот беше додаден и 200 mM калиум хлорид (KCl) со цел да се намалат јонските интеракции помеѓу протеинските видови. Првиот употребен проток за оваа анализа беше 0,4 mL/min, по што на

добиениот хроматограм се забележа преклопување на пиковите од главниот мономер со молекулска маса од 150 kDa и фрагментот Fab/c со молекулска маса од 100 kDa. Затоа, протокот беше намален на 0,3 mL/min, со што повторно се добија незадоволителни резултати, односно недоволна резолуција помеѓу истите пикови. Потоа, развојот на методот се движеше кон зголемување на јачината на фосфатниот пуфер на 50 mM, со дополнително вклучување на 150 mM NaCl и 50 mM KCl, со иста pH 7,0. И покрај ваквата промена, сè уште не беше добиена задоволителна резолуција (Half Height, HH), според USP.

Во мобилната фаза беше додадено 10 % ацетонитрил, со цел да се намалат секундарните хидрофобни интеракции помеѓу имуноконјугатот и стационарната фаза, кои може да влијаат врз резолуцијата, симетријата на пикот и содржината. Ваквиот пристап е во согласност со податоците дека органските растворувачи може да го подобрат раздвојувањето во SE-HPLC, а тоа беше забележано и во конкретниот случај, бидејќи кај одредени примероци беше добиена подобра резолуција. Сепак, за да не се уништи колоната, да не се намали растворливоста или, пак, да не настане денатурација на протеинот во колоната, потребно е органските растворувачи да се користат контролирано и во ограничена концентрација (Arakawa et al., 2010; Waters Corporation, 2023).

Следно, беше подготвен 75 mM Na-фосфатен пуфер (pH 7,0) заедно со 200 mM KCl и анализата беше изведена со различни протоци во опсег од 0,3–0,5 mL/min. Ниту промената во однос на јачината на пуферот, ниту промените во однос на протокот, не резултираа со подобрување на резолуцијата. Затоа, развојот продолжи со зголемување на pH-вредноста на Na-фосфатниот пуфер на 7,4, со додаток на 200 mM KCl. Ниту оваа промена не ја даде потребната резолуција.

По завршениот развој, крајно беа воспоставени условите за изведба на методот: како мобилна фаза беше користена смеса од водена и органска фаза во меѓусебен сооднос 90:10 (v/v). Во составот на водената фаза беа вклучени 50 mM фосфатен пуфер (pH 6,8), 150 mM NaCl и 50 mM KCl, а како органска фаза беше употребен ацетонитрил. Протокот на мобилната фаза беше поставен на 0,5 mL/min.

Времетраењето на една анализа изнесуваше 25 min и во текот на анализата, температурата на автосемплерот беше одржувана на 4 °C, а температурата на колоната на 25 °C. Детекцијата беше направена на бранова должина од 280 nm, а

сите добиените резултати беа интегрирани со Empower 3 софтверот (Waters Corporation, USA).

Интерпретација на резултати

Како параметри за евалуација на чистотата беа дефинирани:

- содржината (%) на главниот мономер;
- содржината (%) на HMWS (агрегати);
- содржината (%) на LMWS (фрагменти).

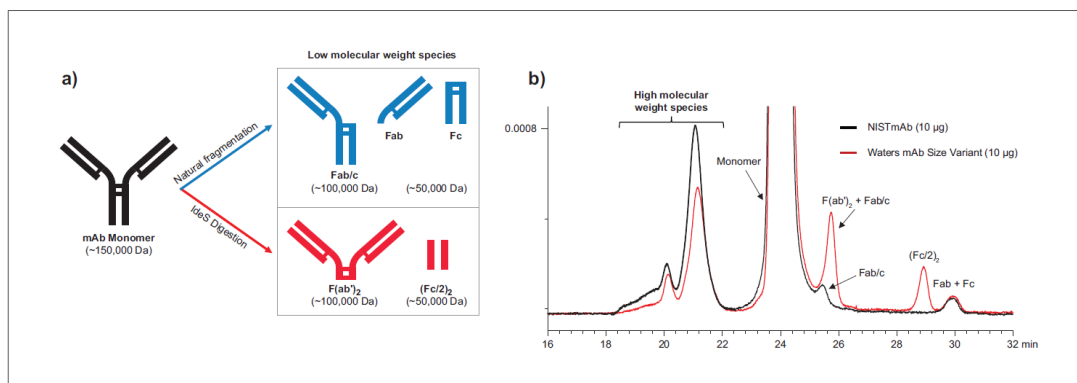
Во сите случаи, содржината беше определена со метод на нормализација на површината под хроматографските пикови, така што квантификацијата беше направена во однос на пикот добиен за главниот мономер.

Подготовка на примероци

Лиофилизираните примероци беа реконституирани во 1 mL ултрачиста вода и филтрирани преку PVDF филтер со низок процент за врзување на протеини. Волуменот на инјектирање изнесуваше 10 μ L.

Подготовка на стандард

Стандардот mAb Size Variant Standard содржи NISTmAb (NIST референтен материјал [RM] 8671 што соодветствува на хуманизирано моноклонално антитело, како и не редуцирани IdeS дигигестирани NISTmAb фрагменти F(ab')₂ (~100,000 Da) и (Fc/2)₂ (~50,000 Da), два фрагменти со слична молекулска маса како и Fab/c и Fab или Fc, соодветно (слика 12). Вкупната маса на стабилизираниите и лиофилизираните протеини во стандардот изнесува 160 μ g (Waters Corporation, USA). Стандардот беше растворен во ултрачиста вода, со цел добивање на концентрација од 1 mg/mL.



Слика 12 Репрезентативен хроматограм на mAb Size Variant Standard, користен за идентификација на пиковите

Figure 12 Representative chromatogram of the mAb size-variant standard used for peak assignment

4.4.2 Електрофореза во редуцирачки и нередуцирачки услови

Електрофореза во редуцирачки услови

За изведба на SDS-PAGE во редуцирачки услови беа користени стандардни реагенси со аналитичка чистота и тоа: акриламид/бисакриламид (ACR/BIS) раствор 29:1, 40 % (w/v) (OmniPur™), натриум додецил сулфат (Sigma-Aldrich), β-меркаптоетанол (Sigma-Aldrich), глицерол (Kemika) и бромфенол сино (Sigma-Aldrich). За подготовка на пуферите за електрофореза се користеше тризма база (Tris) (Sigma-Aldrich). Како маркери за молекулската маса беа употребени стандарди со опсег од 10-180 kDa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific). Сите раствори беа приготвени со ултрачиста вода.

Подготовка на пуфер за апликација на примероците во бунарчињата

На секој од подготвените примероци се додава пуфер кој се состои од:

- 2,5 mL фаза А: 10 mM Tris (pH 6,8), 1 mM EDTA и 1% SDS;
- 1 mL фаза В: β-меркаптоетанол како редуцирачки агенс;
- 1,5 mL фаза С: 30% глицерол и 0,02 % бромфенол сино како индикатор за миграцијата на примероците.

Подготовка на полиакриламиден гел

Електрофорезата беше изведена во вертикален систем MultiGel Long (Biometra, Germany), со користење на два полиакриламидни гелови:

- гел за раздвојување, подготвен како 12 % ACR/BIS гел, кој служи за раздвојување на протеините само според нивната молекулска маса;

- гел за аплицирање на примероците, подготвен како 4 % ACR/BIS гел, кој овозможува примероците да имаат иста појдовна позиција за раздвојување.

Полимеризацијата беше иницирана од соодветен оксидациски реагенс, односно 10% амониум персулфат (APS) (Sigma-Aldrich) и катализирана со тетраметил етилендиамин (TEMED) (Merck), во сооднос и количина дадени во табела 5.

Табела 5 Состав на гелови за SDS-PAGE

Table 5 SDS-PAGE gel composition

Гел за аплицирање на примероци			Гел за раздвојување		
Процент	4		Процент	12	
Раствор	Волумен	Единици	Раствор	Волумен	Единици
Дестилирана вода	3,18	mL	Дестилирана вода	6,54	mL
ACR/BIS (40%)	0,50	mL	ACR/BIS (40%)	4,50	mL
1M Tris pH = 6,8	1,25	mL	1M Tris pH = 8,8	3,75	mL
10% SDS	50	µL	10% SDS	150	µL
10% APS	18,3	µL	10% APS	54,94	µL
TEMED	2,9	µL	TEMED	8,81	µL

Подготовка на пуфер за раздвојување

Пуферот за раздвојување се состоеше од 250 mM Tris, 1,92 M глицин и 1% SDS кој се подготвува во 10-пати повисока концентрација и се разрежува непосредно пред употреба.

Подготовка на примероци

Леофилизираните имуноконјугати и неконјугираниот даратумумаб, кој служи како контролен примерок, беа реконституирани во 1 mL физиолошки раствор до добивање на концентрација од 1 mg/mL. Примероците кои содржат 30 µg имуноконјугат беа измешани во однос 3:1 со пуферот за аплицирање на примероци, по што беа загревани на 95°C во времетраење од 5 минути и на крај центрифугирани за време од 5 минути, со брзина од 5000 вртежи во минута.

Услови за изведба на електрофореза

Електрофоретското движење на имуноконјугатот се изведува при константен напон од 300 V со јачина на струја до ~50 mA во гелот за раздвојување. Миграцијата беше изведена сè додека бојата не достигна до крајот на гелот.

По завршување на електрофорезата, геловите беа фиксирани во смеса од 50 % метанол, 10 % оцетна киселина, 40 % ултрачиста вода, а за визуализација на лентите, во смесата беше додадена и бојата Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fluka). Боењето траеше 20 часа, а обезбојувањето на гелот беше извршено со истата смеса, но без присуство на боја, за време од 12 часа.

Добиените електрофорограми беа анализирани со споредување на миграцијата на протеините со молекулскиот маркер, со цел да се утврди присуството на тешкиот (~50 kDa) и лесниот (~25 kDa) ланец, чијашто појава е карактеристична за електрофореза во редуцирачки услови.

Електрофореза во нередуцирачки услови

За изведба на SDS-PAGE во нередуцирачки услови беа воспоставени истите услови, со исклучок на подготовката на гелот за раздвојување и подготовката на примероците. Конкретно, за раздвојување се користеше 6 % ACR/BIS гел, а за аплицирање на примероците 4 % ACR/BIS гел. За да не настане редукција на дисулфидните врски, во пуферот за аплицирање на примероците не се додава β -меркаптоетанол. Електрофоретското движење на имуноконјугатот се изведува при константен напон од 220 V со јачина на струја до ~50 mA во гелот за раздвојување.

4.5 Радиобележување на имуноконјугатите со радионуклиди

4.5.1 Метод на радиобележување со лутециум-177 (^{177}Lu)

Радиобележувањето беше изведено по реконституција на лиофилизираните примероци во растворувачи како аскорбинска киселина (0,1 g/mL; w/v), 0,1 M натриум ацетат и физиолошки раствор, при што pH-вредноста беше приспособена на 4,5. Радиобележувањето беше иницирано со додавање на приближно 11–20 MBq п.с.а. [^{177}Lu]LuCl₃ во воден раствор на 0,04 M HCl (EndolucinBeta, 40 GBq/mL; ITM, Германија; п.с.а.). Реакцијата се изведуваше со инкубација на 37 °C со благо мешање.

4.5.1.1 Оптимизација на радиобележување

Ефикасноста на радиобележувањето беше проценета со инкубација на радиоимуноконјугатот даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA со [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ во временски интервал од 5–60 min на 37 °C, со благо мешање. Во дефинирани временски точки (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 и 60 минути) беа земани примероци од реакционата смеса, а приносот на обележување беше определен со iTLC (услови опишани во дел 4.5.1.2.1).

4.5.1.2 Карактеризација на радиоимуноконјугатот

4.5.1.2.1 Одредување на ефикасност и принос по обележување (iTLC)

Ефикасноста на обележувањето беше проценета како однос на вкупната со врзаната радиоактивност на антителото, користејќи [¹⁷⁷Lu]Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA како репрезентативен примерок. За таа цел беше применет метод со iTLC на силика гел (SG) ленти (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) и 0,1 М натриум ацетатен пуфер (pH 4,5) како мобилна фаза. Волумени од 10 µL од радиоимуноконјугатите беа нанесени на лентите, по што хроматограмите беа скенирани со Scan-RAM радио-TLC скенер (LabLogic Group, South Yorkshire, UK) и анализирани со Laura 6 софтвер. Истата iTLC постапка беше користена и за определување на радиохемиската чистота на обележаниот производ.

4.5.1.2.2 *In vitro* стабилност на радиоимуноконјугат

In vitro стабилноста на [¹⁷⁷Lu]Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA и [¹⁷⁷Lu]Lu-даратумумаб-Bn-SCN-1B4M-DTPA беше проценета во комерцијално достапен хуман серум при собна температура. Примероците беа анализирани на секои 24 часа, во период од 168 часа (7 дена), со примена на претходно опишаниот iTLC метод.

4.5.1.3 Определување на радиохемиска чистота со радио SE-HPLC

Радиохемиската чистота беше определена и со метод на високоперформансна течна хроматографија, со методот на гел филтрациска хроматографија опишан како и кај методот за определување на чистота на лиофилизираната формулација. За таа цел се користеше LC-40 Nexera X3 UHPLC систем (Shimadzu, Japan), со кој во серија се поврзани детектор за радиоактивност (Berthold HERM LB 500 NaI) и UV/Vis детектор со низа на диоди (SPD-M40, PDA).

4.5.2 Метод на радиобележување со актиниум-225 (^{225}Ac)

Радиобележувањето со ^{225}Ac беше изведено по реконституција на репрезентативниот лиофилизиран примерок од даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, во 500 μL 0,1 М натриум ацетатен пуфер со pH 4,5. Радиобележувањето беше иницирано со додавање на приближно 50 kBq ^{225}Ac , по што реакционата смеса беше инкубирана во времетраење од 60 минути на 37 °C, со благо мешање при 300 rpm.

Приносот по обележување и радиокемиската чистота беа определени со инстант тенкослојна хроматографија, со користење на силика гел (SG) ленти и 0,1 М натриум ацетатен пуфер (pH 4,5) како мобилна фаза.

4.5.3 Метод на радиобележување со тербиум-161 (^{161}Tb)

Радиобележувањето со ^{161}Tb беше изведено по реконституција на репрезентативниот лиофилизиран примерок од даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, во 500 μL 0,1 М натриум ацетатен пуфер со pH 4,5. Радиобележувањето беше иницирано со додавање на приближно 15 MBq ^{161}Tb , по што реакционата смеса беше инкубирана за време од 60 минути на 37 °C, со благо мешање при 300 rpm.

Приносот по обележување и радиокемиската чистота беа определени со инстант тенкослојна хроматографија, со користење на SG ленти и 0,1 М натриум ацетатен пуфер (pH 4,5) како мобилна фаза.

4.6 Студии на стабилност на лиофилизирана формулација на имуноконјугат

Студиите на стабилност беа спроведени со цел да се процени профилот на стабилност на избраната лиофилизирана формулација на имуноконјугатот даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA во текот на чувањето. Испитувањето опфати конвенционални студии на стабилност, односно забрзана и долготрајна студија, како и предиктивна проценка на стабилност со примена на ASAPprime® софтвер. Примероците наменети за забрзаната и долготрајната студија беа подготвени на идентичен начин, во финално затворено примарно пакување, со секундарно пакување во картонска кутија и беа поставени во соодветните комори за стабилност, без дополнителна манипулација со пакувањето во текот на студиите.

Во почетната временска точка (T0), кај примероците од двете студии беше извршена проценка на надворешниот изглед на лиофилизираниот колач, времето на реконституција и рН-вредноста по реконституција. Испитувањето на останатите критични атрибути на квалитет, како и анализата на примероците во предвидените временски точки од забрзаната, долготрајната и ASAP студијата, се опишани поодделно во соодветните потпоглавја, а претставени во табела 6.

4.6.1 Конвенционални студии на стабилност

4.6.1.1 Забрзана студија на стабилност

Примероците беа складирани во комора за стабилност на 25 ± 2 °C / $60 \pm 5\%$ RH, како услови за забрзана студија на стабилност за формулации предвидени за чување во фрижидер. Анализите беа извршени во временска точка T0 (почеток), по 3 (T3) и 6 (T6) месеци.

Во секоја временска точка беа следени содржината на резидуална влага, спектроскопскиот и хроматографскиот профил на чистота. Како еден од параметрите со најголема значајност беше обележувањето со радионуклидот ^{177}Lu , по што беше определена радиохемиската чистота на добиениот радиоимуноконјугат.

4.6.1.2 Долготрајна студија на стабилност

За изведба на оваа студија, примероците беа складирани во фрижидер и чувани на 5 ± 3 °C. Релативната влажност при овие услови беше амбиентална. Примероците беа следени во период од 12 месеци и беа анализирани во точка 0 (почеток), како и по 3 (T3), 6 (T6), 9 (T9) и 12 (T12) месеци.

Табела 6 Протокол за реализација на конвенционалните студии на стабилност
Table 6 Protocol for conventional stability studies

Почеток T0	A, P, pH, RM, E, УВ, ИП, Раман, SEC, RCP				
	Услови за изведба	Месеци			
		T3	T6	T9	T12
Забрзана студија	25 °C/ 60 % RH	RM, УВ, ИП, P, SEC, RCP	RM, УВ, ИП, P, SEC, E, RCP	/	/
Долготрајна студија	5 °C/ амбиентална влажност	RM, ИП, Раман, SEC, RCP	SEC, RCP	SEC, RCP	RM, ИП, Раман, SEC, RCP

A – надворешен изглед; **P** – време на реконституција; **pH** – pH-вредност по реконституција; **RM** – резидуална влага; **E** – SDS-PAGE електрофореза; **УВ** – Спектрофотометриско определување; **ИП** – FTIR инфрацрвена спектроскопија; **Раман** – Раман спектроскопија; **SEC** – гел-филтрациска хроматографија; **RCP** – радиохемиска чистота.

4.6.1.3 Критериуми за прифатливост на параметрите следени во студиите на стабилност

Наведените критериуми претставуваат работна спецификација за потребите на овој докторски труд за определување на стабилноста во рамките на развојната фаза на лиофилизираниот имуноконјугат. Критериумите се дефинирани врз основа на релевантните насоки од релевантните ICH насоки за фармацевтски и биолошки производи, релевантни литературни податоци, почетниот квалитативен профил на лиофилизираната формулација и критичните атрибути на квалитет следени со применетите аналитички методи.

Табела 7 Работна спецификација за параметрите за следење при долготрајните и забрзани студии на стабилност на лиофилизираниот имуноконјугат

Table 7 Working specification for parameters tested during the stability study of the freeze-dried immunoconjugate

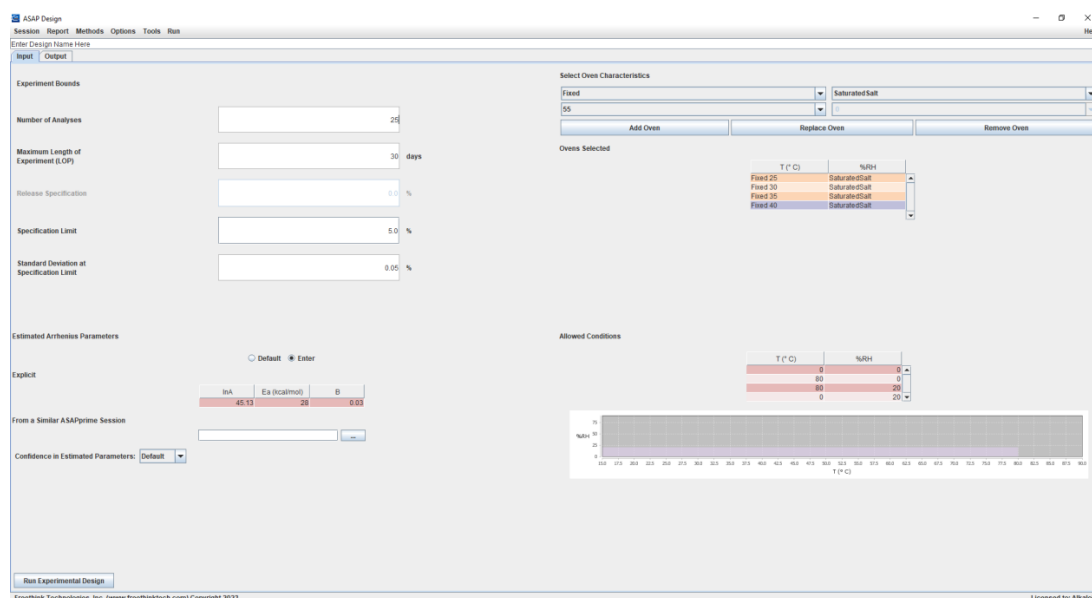
Испитуван параметар		Критериум за прифатливост	
1. Надворешен изглед		Хомоген лиофилизиран колач, без видливи пукнатини или колапс (ICH Q5C, 1995; Patel et al., 2017)	
2. Време на реконституција		≤ 1 минута по додавање на 1 mL растворувач (Kulkarni et al., 2020)	
3. Изглед по реконституција		Бистар до слабо опалесцентен раствор, без видливи честички (USP <790>, 2026)	
4. pH-вредност по реконституција		pH 6,5–7,5 (USP <791>, 2026)	
5. Резидуална влага		≤ 3% (m/m) (USP <921>, 2026)	
6. Идентификација			
6.1 ATR-FTIR спектроскопија		Споредбени профили со T0 примерокот, без значајни промени во карактеристичните региони	
6.2 Раманска спектроскопија		Споредбени профили со T0 примерокот, без значајни промени во карактеристичните региони	
7. Концентрација на имуноконјугат определена со UV/Vis		+ 10% од таргет концентрација (Jameel et al., 2021)	
8. Чистота			
8.1 SE-HPLC		Главниот мономерен пик да остане доминантен во хроматографскиот профил	
Главен мономерен пик		≥ 95,0 % од вкупната површина на пиковите (Thiagarajan et al., 2016)	
HMWS / агрегати		<5%	Како вкупни онечистувања ≤ 5,0 % (Committee, 2021) (Knoll et al., 2023)
LMWS / фрагменти		<2%	
8.2 SDS-PAGE			
		Нередуцирачки услови	~150 kDa
		Редуцирачки услови	~50 kDa и ~25 kDa
9. Радиохемиска чистота (RCP) определено со iTLC		≥ 98,0 %	

4.6.2 Предиктивна проценка на стабилност со ASAPprime® софтвер

Во основниот прозорец на ASAPprime® софтверот беа поставени параметрите за дизајн на експериментот, дефинирани врз основа на литературно достапни податоци, природата на испитуваниот препарат и предвидените услови на чување. Како услов за чување беше избрана опцијата за лиофилизирана формулација наменета за чување во фрижидер. Максималното времетраење на предиктивната студија беше поставено на 31 ден, а како критериум за промена

беше дефинирана граница од $5 \pm 0,05$ % за намалување на процентот на главниот мономерен пик од имуноконјугатот.

Во дизајнот беа дефинирани четири температурни услови на коморите за стабилност: 25 °C, 30 °C, 35 °C и 40 °C. За секој температурен услов беа поставени две вредности на релативна влажност: 0 % RH и 11 % RH. Со вака поставените параметри, ASAPprime® софтверот ги генерираше временските точки за изложување на примероците, како и иницијалните параметри за математичкото моделирање: $\ln A = 45,13$, $E_a = 28$ kcal/mol и $B = 0,03$. Дизајнот на експериментот е прикажан на слика 13.



Слика 13 Дизајн на експеримент со ASAPprime® софтвер

Figure 13 Experimental design generated using ASAPprime® software

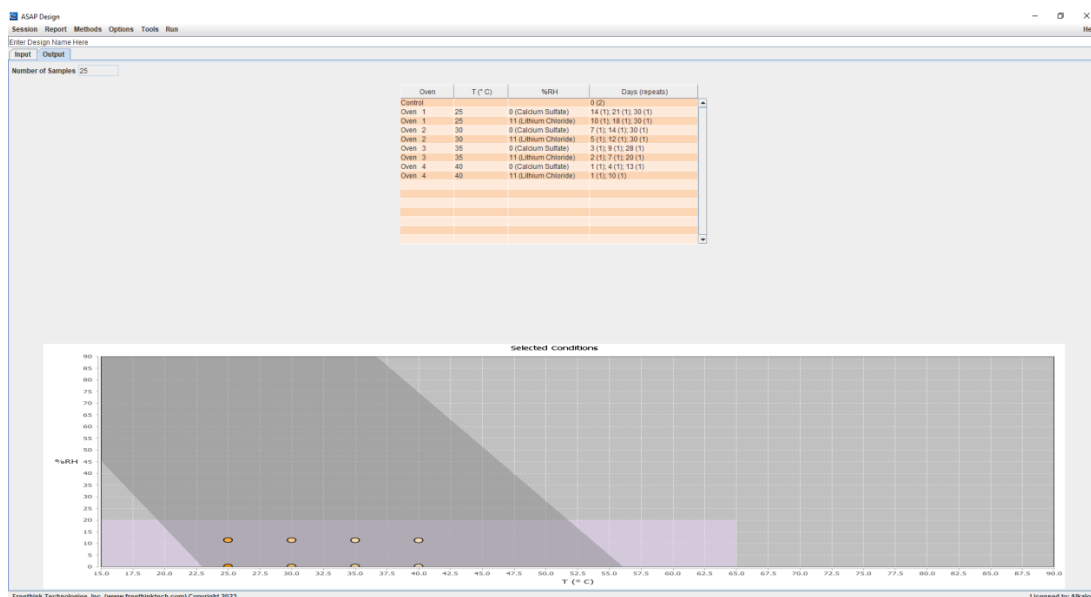
Практично, лиофилизираните примероци на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA беа отворени со отстранување на алуминиумската заштита и гумениот затворац, со цел лиофилизитот да биде во директен контакт со контролираниот услов на релативна влажност. Отворените шишенца беа поставени во херметички затворени садови заедно со соодветна сол за регулирање на релативната влажност. За обезбедување услови со целна RH = 0 % беше користен безводен бакар(II) сулфат како десикант, додека за обезбедување услови со RH = 11 % беше користен цврст литиум хлорид.

Вака подготвените садови беа херметички затворени, изолирани од надворешно влијание на влага и инкубирани во температурни комори според T/RH условите и временските точки дефинирани од ASAPprime® софтверот. Планот на услови, распоредот на примероците и временските точки се прикажани на сликите 14–16 и во табела 8.

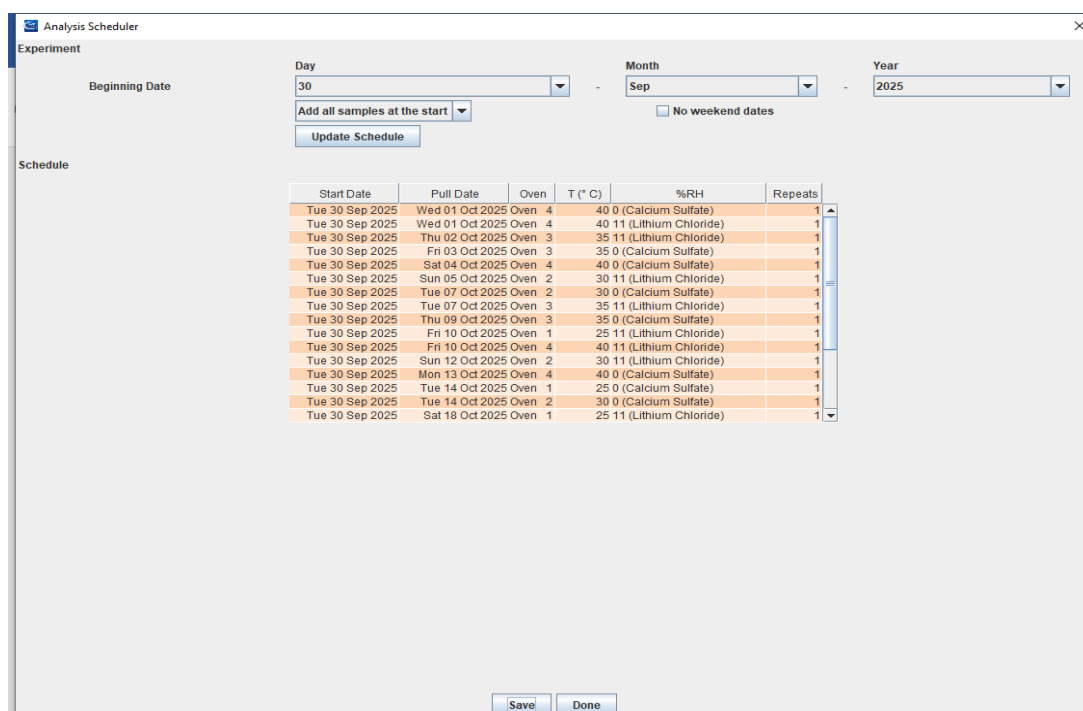


Слика 14 Приказ на подготвени примероци за ASAP анализа

Figure 14 Prepared samples for ASAP analysis



Слика 15 План на услови во комори за чување и соодветни временски точки
Figure 15 Chamber storage conditions and corresponding time points



Слика 16 а) Детален дневен распоред за изведба на ASAP експериментот
Figure 16 a) Detailed daily schedule for the ASAP experiment

Start Date	Pull Date	Oven	T (°C)	%RH	Repeats
Tue 30 Sep 2025	Tue 07 Oct 2025	Oven 3	35	11 (Lithium Chloride)	1
Tue 30 Sep 2025	Thu 09 Oct 2025	Oven 3	35	0 (Calcium Sulfate)	1
Tue 30 Sep 2025	Fri 10 Oct 2025	Oven 1	25	11 (Lithium Chloride)	1
Tue 30 Sep 2025	Fri 10 Oct 2025	Oven 4	40	11 (Lithium Chloride)	1
Tue 30 Sep 2025	Sun 12 Oct 2025	Oven 2	30	11 (Lithium Chloride)	1
Tue 30 Sep 2025	Mon 13 Oct 2025	Oven 4	40	0 (Calcium Sulfate)	1
Tue 30 Sep 2025	Tue 14 Oct 2025	Oven 1	25	0 (Calcium Sulfate)	1
Tue 30 Sep 2025	Tue 14 Oct 2025	Oven 2	30	0 (Calcium Sulfate)	1
Tue 30 Sep 2025	Sat 18 Oct 2025	Oven 1	25	11 (Lithium Chloride)	1
Tue 30 Sep 2025	Mon 20 Oct 2025	Oven 3	35	11 (Lithium Chloride)	1
Tue 30 Sep 2025	Tue 21 Oct 2025	Oven 1	25	0 (Calcium Sulfate)	1
Tue 30 Sep 2025	Tue 28 Oct 2025	Oven 3	35	0 (Calcium Sulfate)	1
Tue 30 Sep 2025	Thu 30 Oct 2025	Oven 1	25	0 (Calcium Sulfate)	1
Tue 30 Sep 2025	Thu 30 Oct 2025	Oven 1	25	11 (Lithium Chloride)	1
Tue 30 Sep 2025	Thu 30 Oct 2025	Oven 2	30	0 (Calcium Sulfate)	1
Tue 30 Sep 2025	Thu 30 Oct 2025	Oven 2	30	11 (Lithium Chloride)	1

Слика 16 б) Детален дневен распоред за изведба на ASAP експериментот
(продолжение)

Figure 16 b) Detailed daily schedule for the ASAP experiment (continued)

Табела 8 План за T/RH услови и временски точки за ASAP студијата

Table 8 T/RH conditions and time points for the ASAP study

Комора со фиксно поставена T	Релативна влажност	Број на примероци	Ден
40 °C	0 % RH	3	2, 5, 14
	11 % RH	2	2, 11
35 °C	0 % RH	3	4, 9, 29
	11 % RH	3	3, 8, 21
30 °C	0 % RH	3	8, 15, 31
	11 % RH	3	6, 13, 31
25 °C	0 % RH	3	15, 22, 31
	11 % RH	3	11, 19, 31

За изведба на експериментот беа користени вкупно 25 примероци за ASAP проценката, од кои 23 примероци беа изложени на дефинираните T/RH услови, додека преостанатите два примероци беа користени како почетни, односно

контролни примероци. По истекот на секоја временска точка, шишенцата беа отстранети од коморите, повторно затворени со гумен затворац, кримпирани и складирани на 4 °C до моментот на анализа, со цел да се минимизира понатамошна деградација пред мерењето.

Како параметри за следење на квалитетот во ASAP студијата беа определени процентуалната застапеност на главниот мономерен пик, процентот на високомолекулски видови (HMWS, агрегати) и процентот на нискомолекулски видови (LMWS, фрагменти). Овие параметри беа определени со гел-филтрациска хроматографија, согласно претходно опишаниот протокол. Намалувањето на главниот мономерен пик и зголемувањето на HMWS и LMWS беа користени како индикатори за промени во стабилноста на лиофилизираниот имуноконјугат.

II. МОНОКЛОНАЛНО АНТИТЕЛО 9E7.4

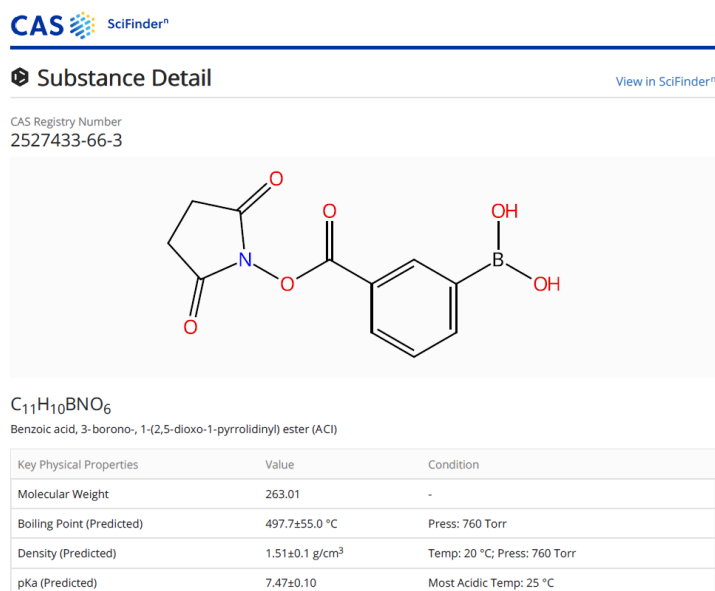
4.7 Вектор, простетична група и радионуклид

- Вектор: моноклонално антитело

Како вектор за овој дел од истражувањето беше користено 9E7.4, анти-CD138 глувчешко моноклонално антитело, произведено и обезбедено од истражувачката група на радиобиологи во лабораторијата во научно истражувачкиот центар на Универзитетот во Нант, Франција, тим 2 нуклеарна онкологија, CRCI²NA (<https://crci2na.univ-nantes.fr/en/research/team-2>).

- Простетична група

Простетичната група која се користи во оваа формулација е синтетизирана од радиокемичарите во научно-истражувачкиот центар на Универзитетот во Нант, Франција, тим 2 нуклеарна онкологија, CRCI²NA и претставува арил естер на бензоева киселина, поточно 3-(сукцинимидилоксикарбонил) фенил борна киселина (3-борна 1-(2,5-диоксо-1-пиролидинил) естер на бензоева киселина). Нејзините особини се утврдени преку софтвер SciFinder (слика 17), според кој е нерастворлива во вода, растворлива во диметилсулфоксид (DMSO), со pKa вредност 7,47 и со молекулска маса од 263,01 g/mol.



Слика 17 Структура и карактеристики на простетичната група

Figure 17 Structure and characteristics of the prosthetic group

- Радионуклид

Астатин – 211 беше произведен во Argonax, Нант, Франција и дистрибуиран на тергетниот материјал ^{209}Bi , прочистен со постапка на сува дестилација и изолиран во хлороформ.

- Реагенси и помошни материјали

Од реагенси и помошни материјали беа користени 0,1 М боратен пуфер со различни pH вредности, 0,5 М Трис пуфер со pH 6,0, DMSO, диметилформамид (DMF), натриум сулфит, Cu(II) катализатор, 1,10-фенантролин, Amicon® Ultra-4 (30 kDa, Merck, Germany) филтри и PD-10 колони пакувани со Sephadex G-25 (Cytiva, USA).

4.7.1 Подготовка и карактеризација на немодифицираното антитело

Пред подготовката на имуноконјугатите беше извршена почетна карактеризација на немодифицираното антитело со цел да се потврди неговиот интегритет и соодветност за понатамошна конјугација. Интегритетот на антителото беше проценет со течна хроматографија под висок притисок, конкретно со гел-филтрациска хроматографија, користејќи ултраефикасна течна хроматографија (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC).

4.7.2 Спектроскопски профил на антителото и неговиот имуноконјугат

За да се евалуира спектроскопскиот профил на немодифицираното антитело, како и неговиот имуноконјугат и за да се определат нивните концентрации, беше користен спектрофотометар за мали количини на примерок (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific, USA). Со користење на NanoDrop One Viewer софтверот концентрацијата беше директно определена со масен екстинциски коефициент $13,7 \text{ L/gm} \cdot \text{cm}$ на 280 nm , за 1 % раствор (10 mg/mL). Оваа формула е соодветна за имуноглобулини кои имаат молекулска маса од 150 kDa , за кој моларниот екстинциски коефициент е околу $210\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.7.3 Стабилност на простетичната група

Простетична група која е користена за конјугација на антителото 9E7.4 содржи естерска функционална група, која е лесно подложна на хидролиза во водена средина. Поради тоа, беше испитана нејзината стабилност во боратен пуфер со различни pH вредности, во кои се вршеше и самата конјугација. За таа цел, 25 mM раствор на простетичната група беше инкубиран во боратен пуфер со pH

7,5; 8,0; 8,5 и 9,0. Примероците беа анализирани во дефинирани временски точки до најмногу 180 минути, со цел да се определи процентот на не хидролизираната естерска форма.

Стабилноста на простетичната група беше следена со реверзно-фазна HPLC метода. Анализата беше изведена на Waters Alliance e2695 систем со UV/Vis детектор, со изократски метод, користејќи мобилна фаза составена од ацетонитрил и вода со 0,05 % TFA. Беше користена ODS2 колона, времето на анализа изнесуваше 27 минути, волуменот на инјектирање беше 40 μL , а детекцијата беше изведена на 254 nm и 280 nm. На хроматограмите беа следени два карактеристични пика: пик со ретенционо време од околу 8,5 минути, кој одговара на естерската форма, и пик со ретенциско време од околу 6 минути, кој одговара на хидролизираниот продукт во форма на арилборна киселина.

4.7.4 Подготовка на имуноконјугати со антитело 9E7.4

Најпрвин, простетичната група беше растворена во мал волумен од органскиот растворувач DMSO. Степенот на хидролиза на естерот е определен во физиолошки pH услови, што е неопходно за да се определат условите на конјугација, односно точната концентрација на антитело и времето потребно за изведба на реакцијата. Конјугацијата беше изведена во боратен пуфер на четирите pH-вредности, на собна температура со времетраење од два часа, со постојано мешање.

По завршување на реакцијата, добиените имуноконјугати беа прочистени со гел-филтрациска постапка со користење на PD-10 колони и елуција со трис пуфер (pH 6,0). Последователно, примероците беа концентрирани со Amicon филтри до концентрација од приближно 6 mg/mL, која беше предвидена како соодветна за понатамошно радиобележување.

4.8 Постапка на радиобележување со астатин-211 (^{211}At)

За радиобележување со ^{211}At во ова истражување беше применета нуклеофилна ароматична супституција на атом на бор со халоген атом во присуство на бакар(II) катализатор (Copper mediated halodeboronation) (Eychenne et al., 2021). Пред радиобележување, ^{211}At беше прочистен од таргетниот материјал ^{209}Bi со

постапка на сува дестилација, собран во хлороформ со струење на инертен азот, а потоа испарен и редуциран со натриум сулфит до посакуваната At^- форма.

Во реакционата смеса за радиобележување беа додадени $[^{211}At]At^-$, натриум сулфит, $Cu(II)$ катализатор, 1,10-фенантролин и трис пуфер (pH 6,0). Улогата на $Cu(II)$ катализаторот и 1,10-фенантролинот е да го зголемат приносот на радиобележување. По завршување на реакцијата, радиоимуноконјугатите беа прочистени со гел-филтрација со користење на PD-10 колони, а радиоактивноста на секоја елуирана фракција беше измерена одделно.

4.8.1 Контрола на квалитет на радиоимуноконјугатите

Квалитетот на добиените радиоимуноконјугати беше оценет преку определување на приносот на радиобележување, радиохемиската чистота и процентот на имунореактивна фракција со користење на магнетни честички. Радиохемиската чистота и приносот беа определени со iTLC-SG хроматографија, со метанол како мобилна фаза, а добиените хроматограми беа детектирани со Cyclone Plus систем (PerkinElmer, Shelton, USA) и анализирани со OptiQuant software (Version 5). Имунореактивноста беше следена со мерење и пресметки на радиоактивноста на обележаниот радиоимуноконјугат со користење на гама бројач.

5 РЕЗУЛТАТИ

I. МОНОКЛОНАЛНО АНТИТЕЛО ДАРАТУМУМАБ

5.1 Конјугација на антитело даратумумаб со бифункционални хелатори

Првичната конјугација на даратумумаб со бифункционалниот хелатор DOTA-NHS беше изведена според претходно воспоставени и користени протоколи за конјугација на глувчешки и химерни антитела со бифункционални хелатори во 10-пати моларен вишок во фосфатен пуфер (pH 8,0) (Gjorgieva Ackova et al., 2015; Sterjova et al., 2019). Конкретно, како реакциони услови беа избрани температура од 4 °C во тек на 18 часа, со постојано мешање. Првичната анализа со MALDI-TOF покажа дека при овие услови се прикачува помалку од еден хелатор по молекула антитело (CAR = 0,17).

Поради тоа, со цел оптимизација на конјугацијата, беа испитани дополнителни услови со вклучување и на хелаторите *p*-SCN-Bn-DOTA и *p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA, како и зголемување на моларниот вишок, односно 20-, 30- и 50-пати моларен вишок во однос на антителото. Конјугацијата беше изведена во двата различни пуфери, фосфатен и карбонатен со повисока pH-вредност од 8,5.

5.2 Постапка на лиофилизација

5.2.1 Протоколи за лиофилизација

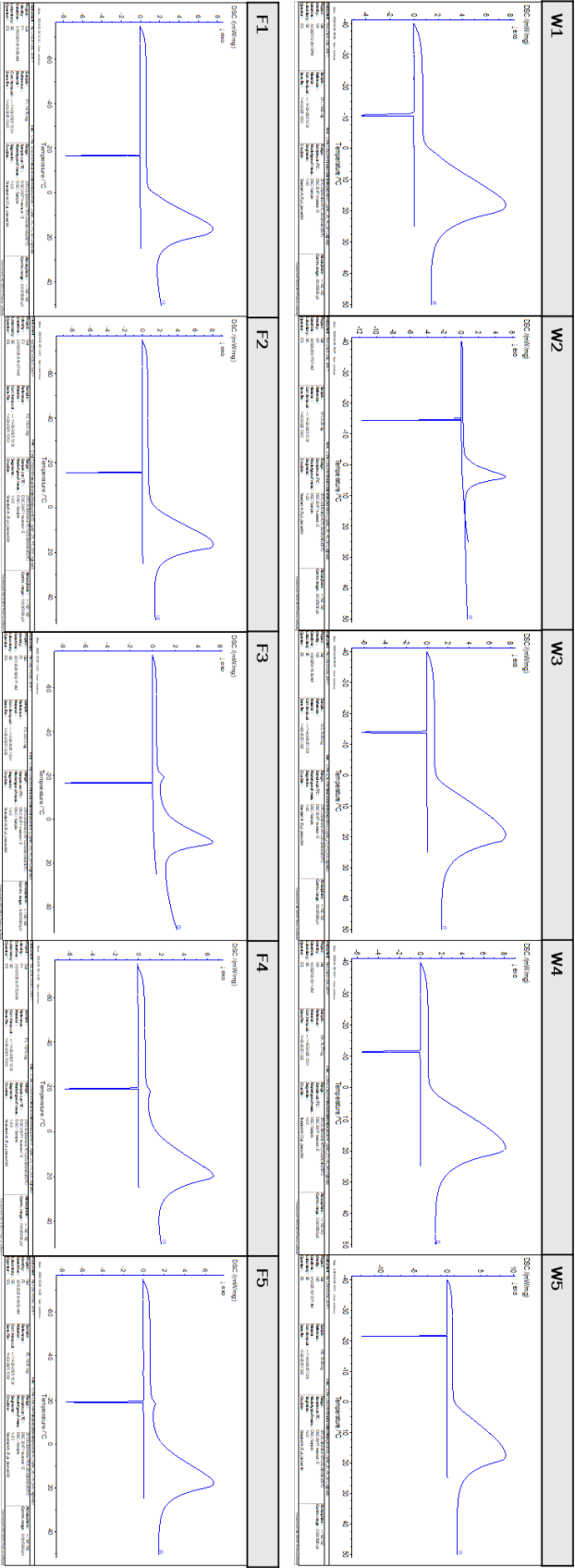
Ллиофилизацијата на подготвените формулации првично беше изведена со примена на протокол 1, детално опишан во делот 4.2.1. По завршување на циклусот, кај добиените примероци беше забележан колапс на ллиофилизираниот колач, што укажа на потреба од оптимизација на параметрите на протокол 1.

Со цел оптимизација на протоколот од извршената DSC анализа кај двете серии, беше определена температурата на стаклест премин (T_g/T_g') од приближно -20 °C. Притоа, не беа забележани изразени разлики помеѓу термограмите на двете серии. Врз основа на добиените резултати (слика 18), во протокол 2 температурата на примарното сушење беше поставена на -20 °C.

И покрај променетата температура на примарното сушење, примероците добиени со протокол 2 покажаа незадоволителни резултати во однос на

резидуалната влага. Поради тоа, беше применет протокол 3, со дополнително модифицирани параметри на циклусот.

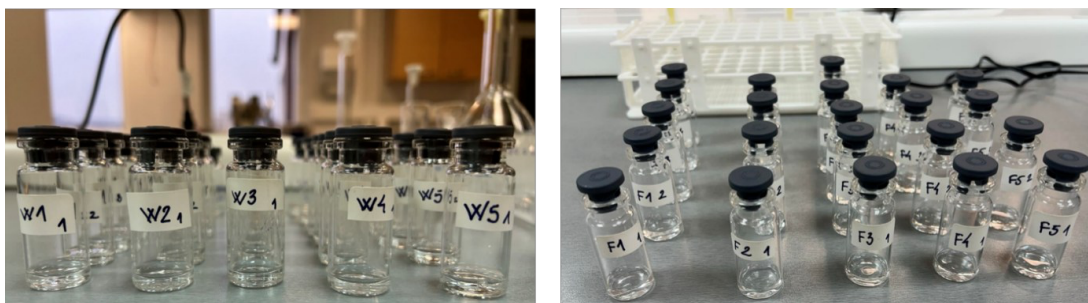
Со протокол 3 беше обезбеден прифатлив макроскопски изглед, односно дел од колачите беа компактни и со соодветни проценти за резидуална влага, поради што беше избран за понатамошна подготовка на сите лиофилизирани примероци. Сите прикажани резултати за формулациите (W.F1–F5 и S.F1–F5) се од примероци лиофилизирани со Протокол 3.



Слика 18 Термограми на формулации за лиофилизација
Figure 18 Thermograms of the freeze-drying formulations

5.2.2 Формулации за лиофилизација

Во испитувањата во оваа докторска дисертација беа вклучени формулациите W.F1–F5 и S.F1–F5, подготвени според составот прикажан во табела 3. Пред лиофилизација, течните формулации беа визуелно хомогени и бистри раствори (слика 19). Сите формулации беа рамномерно распределени на полиците во лиофилизаторот, поставени наизменично по серии/ формулации, при што температурата на продуктот беше следена со сензор директно поставен во репрезентативни примероци, а лиофилизацијата беше изведена со избраниот протокол 3 (слика 20).



Слика 19 Изглед на течните лиофилизациски формулации пред лиофилизација (W.F1–F5 и S.F1–F5)

Figure 19 Appearance of the liquid freeze-drying formulations before freeze-drying (W.F1–F5 and S.F1–F5)



Слика 20 Распоред на шишенцата со примероци на полиците, поставени наизменично по формулации/ серии

Figure 20 Arrangement of sample vials on the shelves, placed alternately by formulation/ series

5.3 Физичко-хемиска карактеризација на лиофилизирани формулации на имуноконјугати

5.3.1 Изглед, време на реконституција, pH и резидуална влага

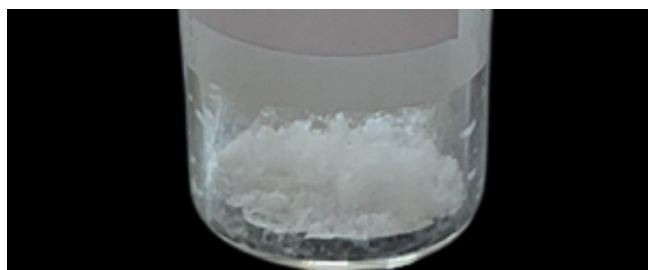
Визуелниот изглед на лиофилизираните формулации на имуноконјугати беше проценет веднаш по завршување на процесот на лиофилизација, преку евалуација на хомогеноста на колачот, која вклучува утврдување на присуство на пукнатини и/или колапс (слика 21).



Слика 21 Макроскопски изглед на лиофилизираните формулации

Figure 21 Macroscopic appearance of the freeze-dried formulations

Кај повеќето примероци првично беше забележан компактен колач, кој при лесно протресување на шишенцето преминуваше во прашок (слика 22). Исклучок беше формулацијата S.F4, која беше во прашкаста форма веднаш по завршување на процесот на лиофилизација.



Слика 22 Визуелен изглед на репрезентативен примерок по протресување на шишенцето

Figure 22 Visual appearance of a representative sample after vial shaking

Дополнително, лиофилизираните примероци беа оценети според времето на реконституција и рН-вредноста по реконституција во 1 mL физиолошки раствор. Кај сите испитани формулации беше забележана брза реконституција, со време пократко од 30 секунди, по што беа добиени хомогени раствори, без остаток од видливи и нерастворени честици. рН-вредноста на реконституираните примероци беше приближно 7, без значајни разлики во формулациите.

Процентот на резидуална влага беше определен кај двете серии на лиофилизирани примероци (W и S), а добиените резултати се прикажани во Табела 9. Кај формулациите од серијата W, резидуалната влага се движеше во опсег од 5,10–6,06 %, додека кај формулациите од серијата S беше забележан понизок процент, кој се движеше во опсег од 1,90–5,01 %.

Највисока вредност на резидуална влага беше забележана кај формулацијата W.F3 (6,06 %), додека најниска кај S.F5 (1,90 %). Генерално, формулациите подготвени со физиолошки раствор (серија S) покажаа пониски вредности на резидуална влага во споредба со соодветните формулации од серијата W.

Табела 9 Резидуална влага во формулациите од двете серии
Table 9 Residual moisture content in the formulations from both series

Формулација	Серија W (%)	Серија S (%)
F1	5,54	5,01
F2	5,60	2,73
F3	6,06	2,17
F4	6,05	2,83
F5	5,10	1,90

5.3.2 Квалитативна и квантитативна проценка

5.3.2.1 MALDI-TOF MS

Просечната вредност за CAR беше определена со MALDI-TOF спектроскопија, при што добиените резултати беа споредени во однос на условите за конјугација, видот на хелаторот и применетиот моларен вишок (табела 10, слика 23 и 24).

Во однос на условите за конјугација, споредбата помеѓу фосфатен и карбонатен пуфер на иста рН-вредност (рН 8,5) покажаа дека, речиси кај сите хелатори,

конјугацијата во карбонатен пуфер на температура од 37 °C, резултира со повисоки вредности за CAR. Овој тренд беше најизразен кај конјугатите со *p*-SCN-Bn-DOTA, но беше забележан и кај DOTA-NHS, додека кај *p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA, разликите помеѓу двата пуфера беа помалку изразени.

Во однос на видот на хелаторот, највисоки вредности за CAR беа добиени кај конјугатите со *p*-SCN-Bn-DOTA, особено при конјугација во карбонатен пуфер, за разлика од конјугатите со DOTA-NHS, кај кои беа добиени најниски вредности. Кај DOTA-NHS, највисоката вредност за CAR беше добиена со 50-пати моларен вишок во карбонатен пуфер (CAR = 0,46). Конјугатите со *p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA покажаа пониски вредности за CAR во споредба со *p*-SCN-Bn-DOTA, со релативно мали разлики меѓу 20-, 30- и 50-пати моларен вишок.

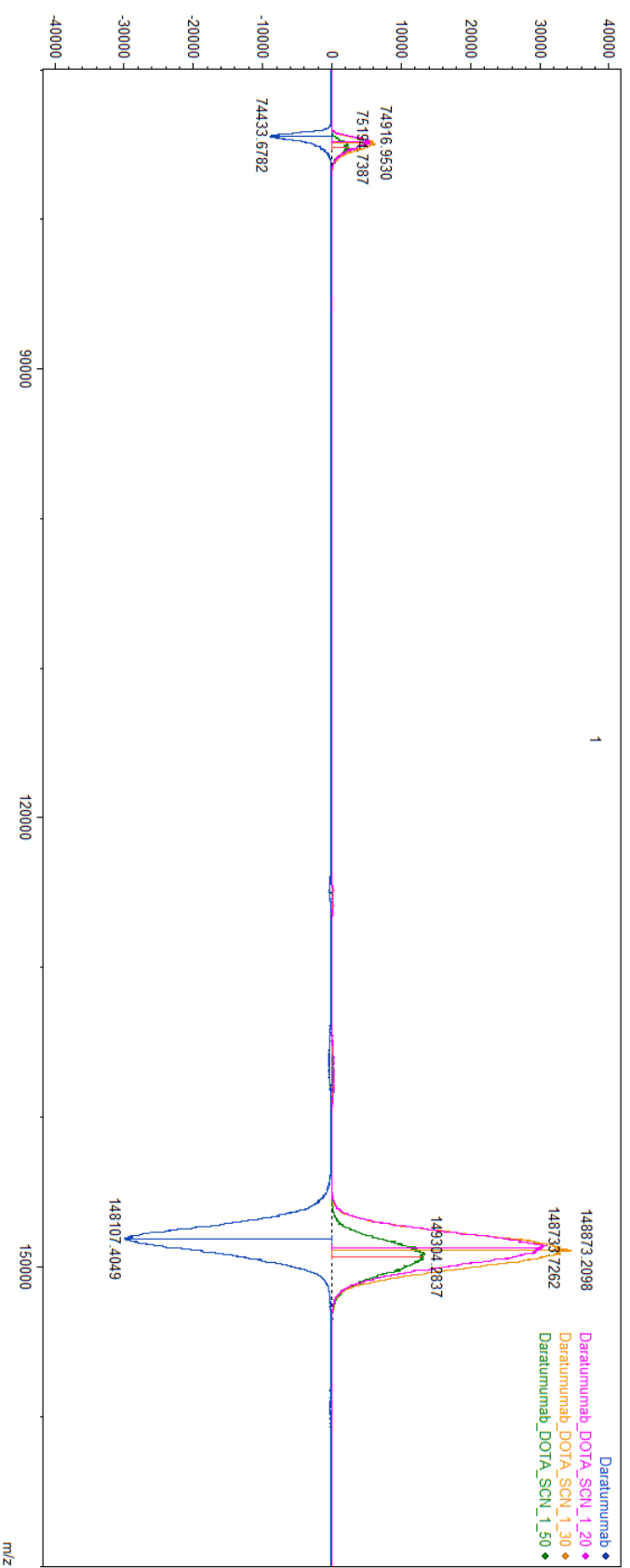
Во однос на применетиот моларен вишок, кај конјугатите со *p*-SCN-Bn-DOTA беше забележана правопрпорционална зависност помеѓу вредноста за CAR и моларниот вишок (1:20 < 1:30 < 1:50), како во фосфатниот, така и во карбонатниот пуфер. Сличен, но помалку изразен тренд беше забележан и кај *p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA. Кај DOTA-NHS, вредностите за CAR останаа ниски во сите испитани услови.

Врз основа на добиените вредности за CAR, за понатамошни испитувања беа избрани имуноконјугатите даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA и даратумумаб-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA, подготвени со 20- и 30-пати моларен вишок, додека конјугатот добиен со 50-пати моларен вишок од DOTA-NHS беше вклучен во понатамошната евалуација како компаративен примерок.

Табела 10 Просечна вредност за SAR кај даратумумаб-имуноконјугатите добиени во фосфатен и карбонатен пуфер (pH 8,5)

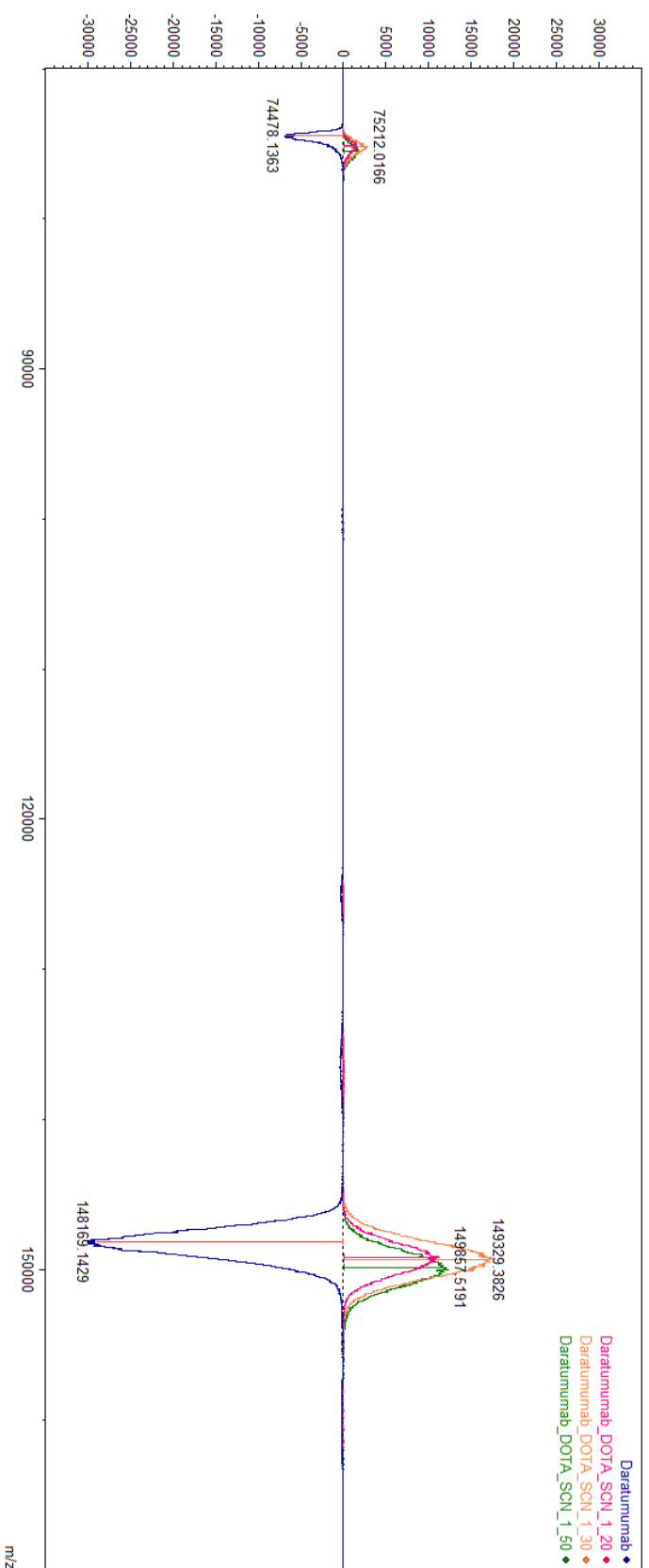
Table 10 Average SAR values of daratumumab immunoconjugates obtained in phosphate and carbonate buffer (pH 8,5)

Ред. бр.	Пуфер	Имуноконјугат	Релативна молекулска маса добиена од N ⁺	Разлика во маса (конјугирано-неконјугирано антителио	Вредност за SAR
Фосфатен пуфер pH 8,5					
		Даратумумаб прочистен, во фосфатен пуфер	147848,32	/	/
		Даратумумаб во PBS, третиран на 37 °C, 1.5h	148107,40	/	/
1		Даратумумаб-ДОТА-NHS 1:20	147998,06	149,74	0,00
2		Даратумумаб-ДОТА-NHS 1:30	147897,49	49,18	0,00
3		Даратумумаб-ДОТА-NHS 1:50	148300,26	451,94	0,20
4		Даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-ДОТА 1:20	148733,73	885,41	1,27
5		Даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-ДОТА 1:30	148873,21	1024,89	1,75
6		Даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-ДОТА 1:50	149304,28	1455,97	2,76
7		Даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-1B4M-DTPA 1:20	148453,88	605,56	0,40
8		Даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-1B4M-DTPA 1:30	148407,05	558,73	0,65
9		Даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-1B4M-DTPA 1:50	148406,23	557,91	0,78
Карбонатен пуфер pH 8,5					
		Даратумумаб прочистен, во карбонатен пуфер	147801,50	/	/
		Даратумумаб во карбонат, третиран на 37 °C, 1.5h	148169,14	/	/
10		Даратумумаб-ДОТА-NHS 1:20	148211,04	409,53	0,18
11		Даратумумаб-ДОТА-NHS 1:30	148194,41	392,90	0,10
12		Даратумумаб-ДОТА-NHS 1:50	148335,89	534,39	0,46
13		Даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-ДОТА 1:20	149180,78	1379,28	2,31
14		Даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-ДОТА 1:30	149329,38	1527,88	2,66
15		Даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-ДОТА 1:50	149857,52	2056,02	3,77
16		Даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-1B4M-DTPA 1:20	148217,90	416,40	0,36
17		Даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-1B4M-DTPA 1:30	148435,57	634,07	0,76
18		Даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-1B4M-DTPA 1:50	148433,75	632,25	0,85



Слика 23 MALDI-TOF MS спектар од даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA добиен при конјугација во фосфатен пуфер (рН 8,5). Броевите укажуваат на центарот на пикот. Пиковите со ~ 75 kDa се двојно наелектризирани молекулски јони кои ја покажуваат половината од молекулска маса на даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA

Figure 23 MALDI-TOF MS of daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA conjugates in phosphate buffer (pH 8,5). Numbers shown refer to the center of the peaks. Peaks with ~ 75 kDa are the doubly charged molecular ions displaying the half-MWs of daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA conjugates



Слика 24 MALDI-TOF спектар од даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA добиен при конјугација во карбонатен пуфер (pH 8,5).

Броевите укажуваат на центарот на пикот. Пиковите со ~75 kDa се двојно наелектризирани молекулски јони кои ја

покажуваат половината од молекулска маса на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA

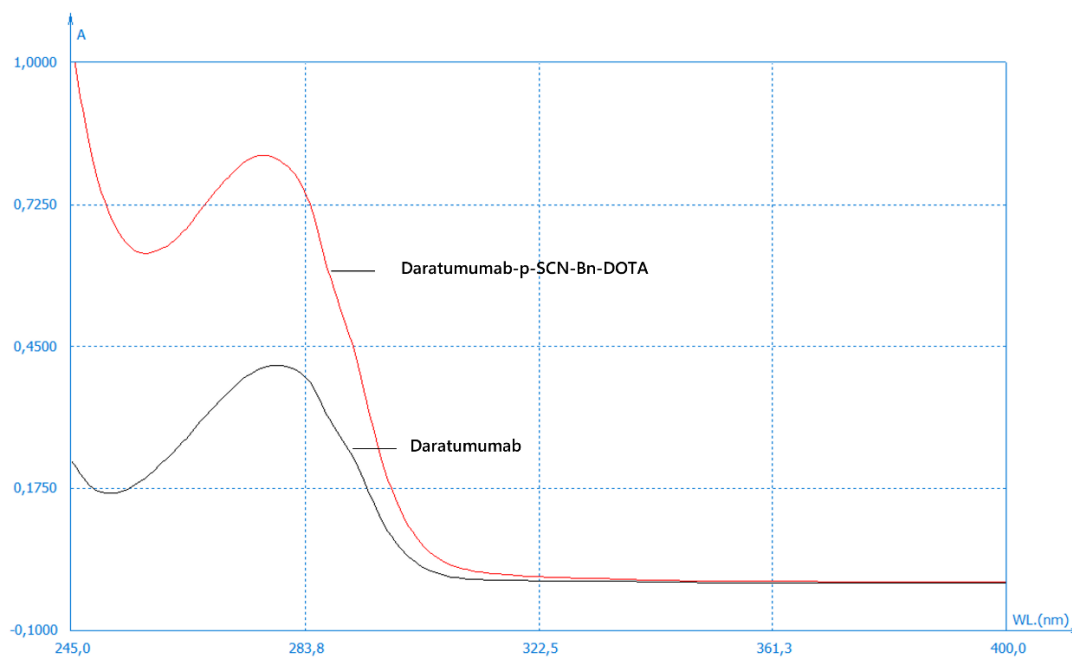
Figure 24 MALDI-TOF MS of daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA conjugates in carbonate buffer (pH 8,5). Numbers shown refer to the center of the peaks. Peaks with ~75 kDa are the doubly charged molecular ions displaying the half-MWs of daratumumab-*p*-SCN-

Bn-DOTA conjugates

При дополнителната MALDI-TOF анализа, врз основа на средните вредности добиени од три независно подготвени серии од даратумумаб конјугиран со 50-пати моларен вишок од DOTA-NHS во карбонатен пуфер, на температура од 37 °C и со благо мешање, формулирани со трexалоза и лиофилизирани според протокол 3, просечната вредност за CAR изнесуваше 0,46. При истите услови на конјугација и лиофилизација, вредностите за CAR за имуноконјугатот *p*-SCN-Bn-DOTA, изнесуваа 2,31 и 2,66, при 20-пати и 30-пати моларен вишок, соодветно. Во споредба, *p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA даде пониски вредности за CAR, односно 0,36 и 0,76 при 20-пати и 30-пати моларен вишок, соодветно.

5.3.2.2 UV/Vis спектроскопија

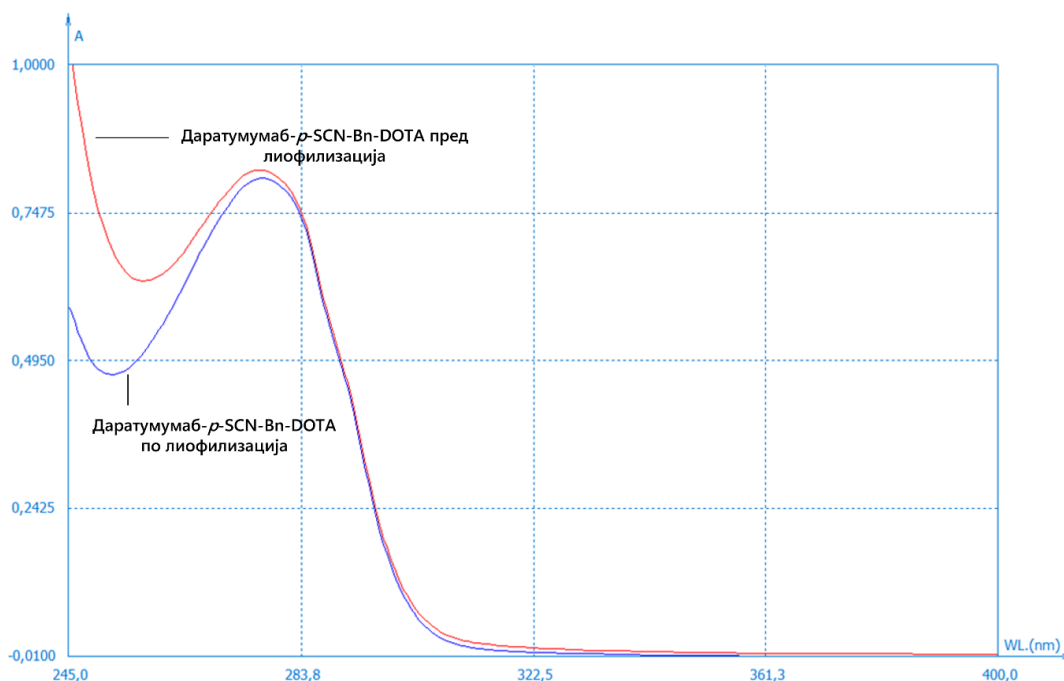
Квалитативната UV/Vis анализа во опсег на бранова должина од 200–400 nm покажа дека прочистениот, лиофилизиран даратумумаб и репрезентативниот имуноконјугат, даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, покажаа слични спектри, со доминанта апсорпција на бранова должина од околу 280 nm. Особено важно е што кај имуноконјугатот, позицијата на апсорпцискиот максимум остана непроменета во однос на неконјугираното антителио, што, пак, укажува дека конјугацијата не резултирала со промена во основниот спектрален профил на протеинската компонента (слика 25).



Слика 25 Преклопени UV/Vis спектри на прочистен, лиофилизиран даратумумаб и репрезентативен имуноконјугат даратумумаб-p-SCN-Bn-DOTA

Figure 25 Overlay UV-Vis spectra of purified, freeze-dried daratumumab and a representative daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA immunoconjugate

Дополнително, беше направена споредба на спектрите на имуноконјугатот пред и по процесот на лиофилизација, при што беше утврдено дека максималната апсорпција останува непроменета. Ова укажува дека по лиофилизацијата не се забележуваат промени во UV/Vis спектарот на антителото (слика 26).



Слика 26 Преклопени UV-Vis спектри на репрезентативен имуноконјугат даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA пред и по лиофилизација

Figure 26 Overlay UV-Vis spectra of a representative daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA immunoconjugate before and after freeze-drying

По конјугацијата, концентрацијата на имуноконјугатот беше определена и приспособена на 1 mg/mL. Вака подготвените примероци беа користени за лиофилизација и понатамошните испитување.

5.3.2.3 ATR-FTIR и Раманска спектроскопија

Анализата со ATR-FTIR покажа дека спектрите на прочистениот, лиофилизиран даратумумаб и репрезентативниот имуноконјугат, даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA се практично идентични (слика 27 и 28). Истовремено, беше забележано изразено преклопување со спектарот на плацебо формулацијата, што укажува дека ексципиенсите апсорбираат во средниот IR регион и можат да ја отежнат директната интерпретација на карактеристичните асигнации, особено кај амид I/II лентите (слика 29).



Sample ID: Daratumumab purified Lyo 400-
2000cm-1

Sample Scans: 64

Background Scans: 64

Resolution: 4

System Status: Good

File Location: C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\Daratumumab purified Lyo 400-
2000cm-1_2025-12-24T15-26-49.a2r

Method

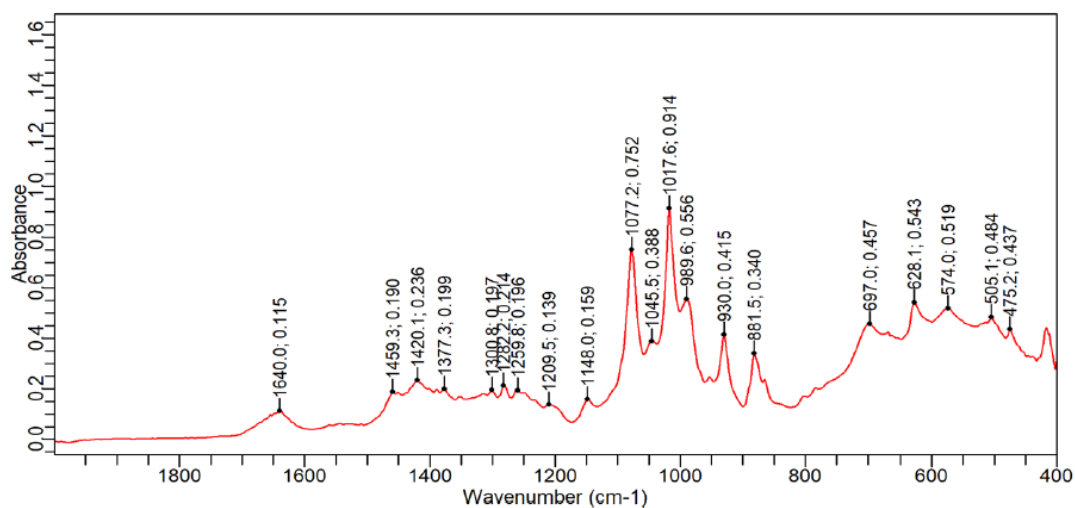
Name: C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLa
b\Methods\mAb.a2m

User: Paulina A

Date/Time: 12/24/2025 3:25:18 PM

Range: 2000 - 400

Apodization: Happ-Genzel



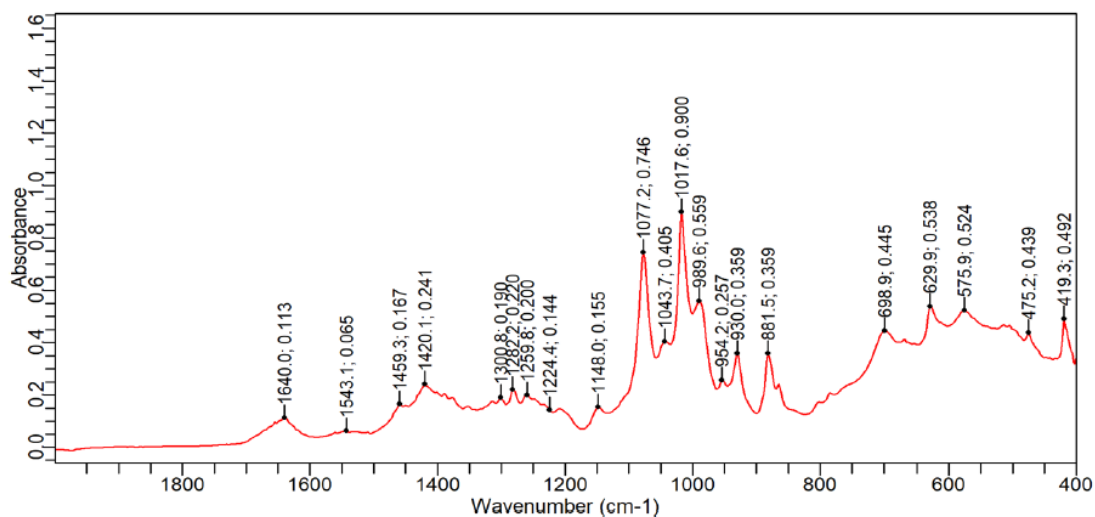
Слика 27 ATR-FTIR спектар на прочистен, лиофилизиран даратумумаб

Figure 27 ATR-FTIR spectra of purified, freeze-dried daratumumab

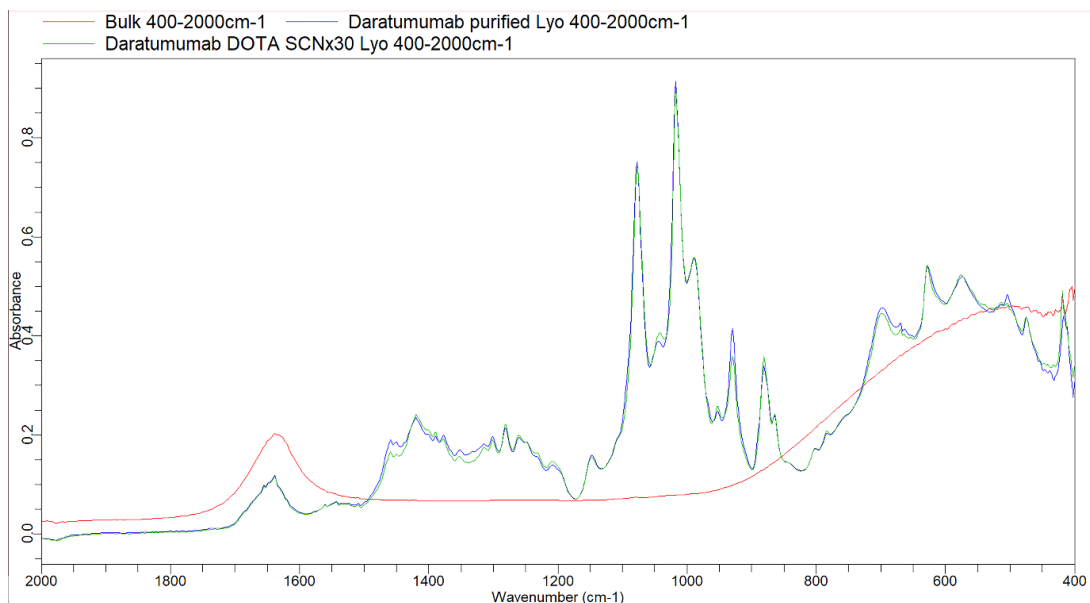


Sample ID: Daratumumab DOTA SCNx30 Lyo 400-2000cm-1
Sample Scans: 64
Background Scans: 64
Resolution: 4
System Status: Good
File Location: C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\Daratumumab DOTA SCNx30 Lyo 400-2000cm-1_2025-12-24T16-39-37.a2r

Method
Name: C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Methods\mAb.a2m
User: Paulina A
Date/Time: 12/24/2025 3:31:05 PM
Range: 2000 - 400
Apodization: Happ-Genzel

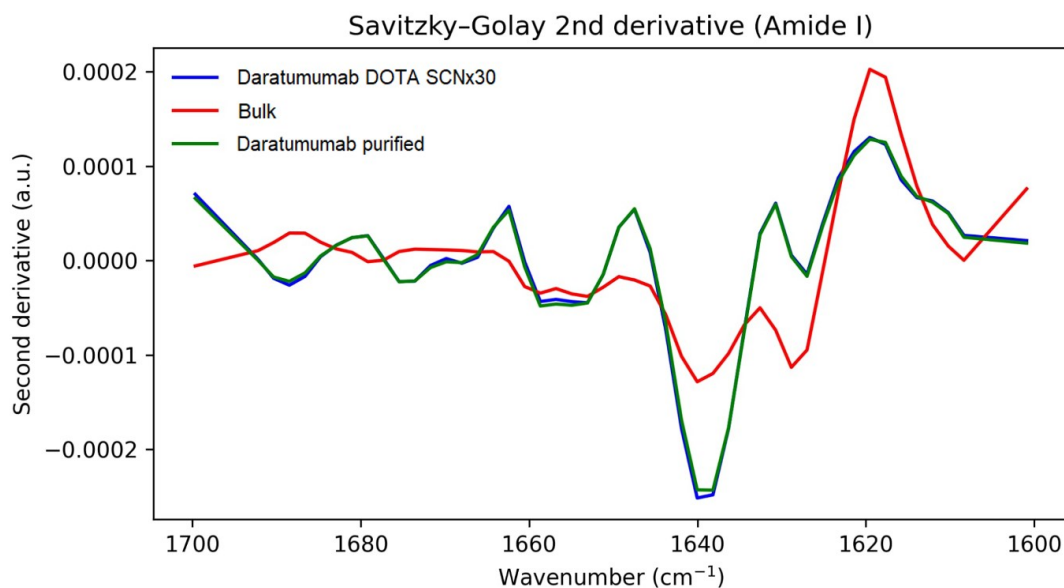


Слика 28 ATR-FTIR спектар на прочистен, лиофилизиран имуноконјугат
Figure 28 ATR-FTIR spectra of purified, freeze-dried immunoconjugate



Слика 29 Преклопени ATR-FTIR спектри од прочистено, лиофилизирано
антитело, репрезентативен имуноконјугат и плацебо
Figure 29 Overlay ATR-FTIR spectra of purified, freeze-dried daratumumab, a
representative immunoconjugate and placebo

Поради ваквото преклопување, спектрите беа обработени преку пресметување на втор извод, со цел да се подобри резолуцијата и да се овозможи попрецизна интерпретација на лентите (Слика 30). Во пресметаниот втор деривативен спектар (Savitzky-Golay 2nd derivative spectra) беше забележано целосно преклопување помеѓу прочистениот, лиофилизиран даратумумаб и репрезентативниот имуноконјугат, без појава на нови ленти и без значајни поместувања во карактеристичните региони.



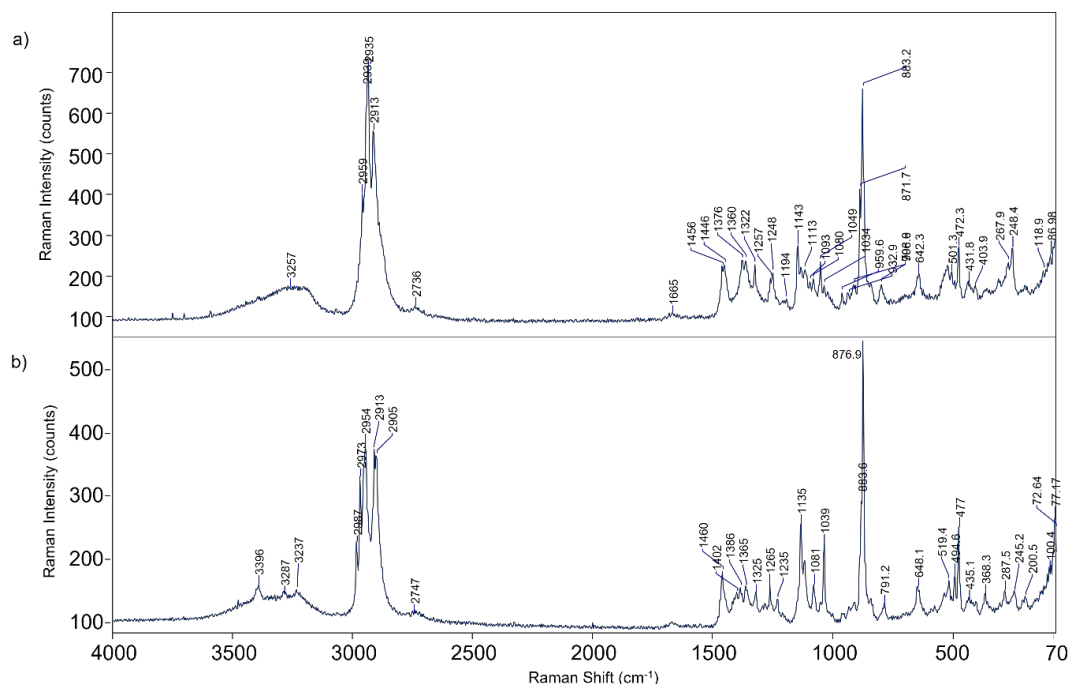
Слика 30 Втор деривативен ATR-FTIR спектар на прочистен, лиофилизиран даратумумаб и репрезентативен имуноконјугат

Figure 30 Second derivative ATR-FTIR spectra of purified, freeze-dried daratumumab and a representative immunoconjugate

Најважно, кај амид I/II лентите не беа забележани разлики помеѓу споредбените спектри. Овие резултати укажуваат дека структурниот интегритет на антителото е зачуван и дека конјугацијата со хелаторот, како и последователната лиофилизација, не довеле до детектибилни промени во неговата секундарна структура.

Кај Раманските спектри на прочистениот, лиофилизиран даратумумаб и репрезентативниот имуноконјугат, даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, беше забележано нивно преклопување, без појава на нови ленти и без детектибилни поместувања на доминантните пикови (слика 31).

Кај амид I/III лентите не беа забележани промени во однос на нивната положба или облик. Дополнително, во двата спектри беа идентификувани типичните асигнации за протеинската структура, вклучително и амидните ленти, како и лентите поврзани со ароматичните аминокиселински остатоци. Добиените резултати укажуваат дека постапките на конјугација и лиофилизација не предизвикале детектибилни промени во структурата на антителото.



Слика 31 Раман спектри на а) прочистен, лиофилизиран даратумумаб и б)
репрезентативен имуноконјугат даратумумаб-p-SCN-Bn-DOTA

Figure 31 Raman spectra of a) purified, freeze-dried daratumumab and b)
representative daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA immunoconjugate

Добиените резултати од ATR-FTIR и Раманската спектроскопија, меѓусебно се надополнуваат и конзистентно потврдуваат дека, дури и по завршување на постапките на конјугација и лиофилизација, антителото го задржува својот карактеристичен спектрален профил и не покажува детектибилни промени во неговата секундарна структура кога е модифицирано како имуноконјугат.

5.3.3 Евалуација на чистота на лиофилизирани формулации на имуноконјугати

5.3.3.1 SE-HPLC

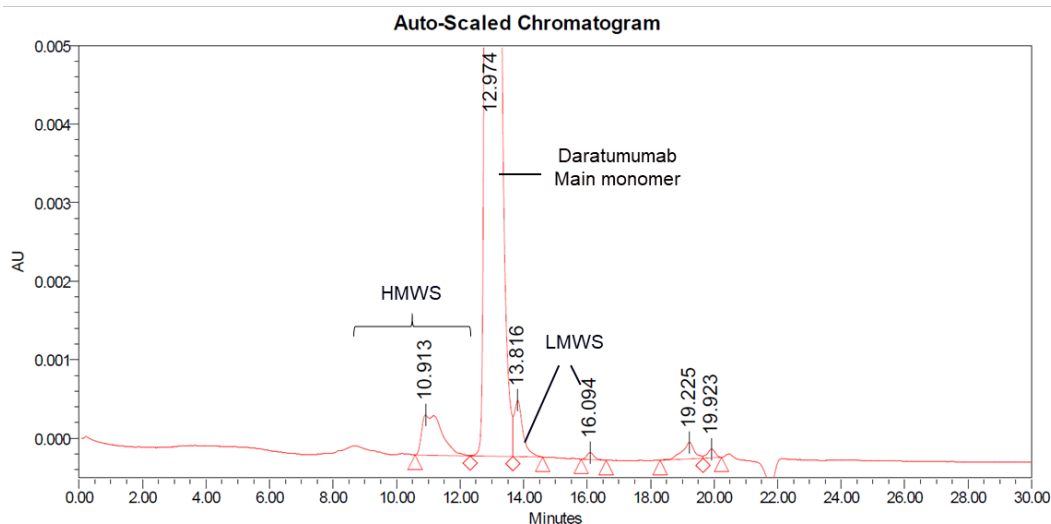
Чистотата на прочистените, лиофилизирани имуноконјугати, беше проценета со употреба на SE-HPLC, преку следење на содржината на главниот мономер, како и потенцијалната појава на агрегати или фрагменти. Всушност, на овој начин беше оценето влијанието на модификацијата на антителото во текот на конјугацијата, земајќи го предвид и влијанието на двата пуфери, фосфатен и карбонатен (pH 8,5).

Кај прочистениот неконјугиран даратумумаб, ретенциското време на главниот мономер изнесува 12,974 минути, додека нискомолекулските фрагменти беа детектирани во 13,816 минута и 16,094 минута. Високомолекулските агрегати, пак, во истиот примерок беа детектирани во 10,913 минута. Од друга страна, кај репрезентативниот примерок даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, освен нискомолекулските фрагменти, детектирани во 13,649 минута, беше детектиран и еден високомолекулски агрегат во 11,065 минута. Кај имуноконјугатот, главниот мономер беше детектиран во 12,813 минута.

Пред конјугација, содржината на главниот мономер кај прочистениот даратумумаб изнесуваше 99,56 %, а кај имуноконјугатот даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, земен како репрезентативен примерок, содржината на главниот мономер изнесуваше 98,31 %.

Добиените хроматограми по завршување на конјугацијата, а пред изведба на постапката на лиофилизација, се дадени на сликите 32 и 33.

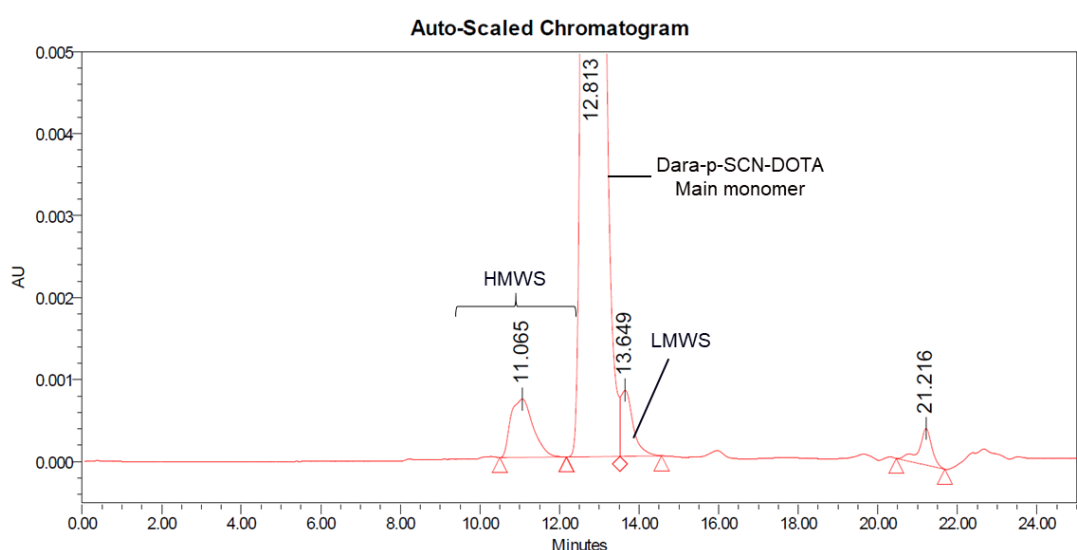
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Daratumumab purified 0,1M	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Dara purified SSM
Vial:	10	Acq. Method Set:	Daratumumab 50mM PBS MS
Injection #:	1	Processing Method:	Dara PM
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	30.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 280nm
Date Acquired:	3/11/2025 2:36:26 PM CET		
Date Processed:	12/7/2025 3:09:16 PM CET		



Слика 32 Хроматограм на прочистен, неконјугиран даратумумаб

Figure 32 Chromatogram of purified, unmodified daratumumab

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Dara-30xSCN Carb	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	Dara DOTA NHS SCN PBS ACN
Vial:	18	Acq. Method Set:	Daratumumab 50mM PBS ACN
Injection #:	1	Processing Method:	LC PQ ApexTrack
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	25.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 280nm
Date Acquired: 5/11/2025 1:43:21 AM CEST			
Date Processed: 12/8/2025 3:47:59 PM CET			



Слика 33 Хроматограм на прочистен имуноконјугат даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA

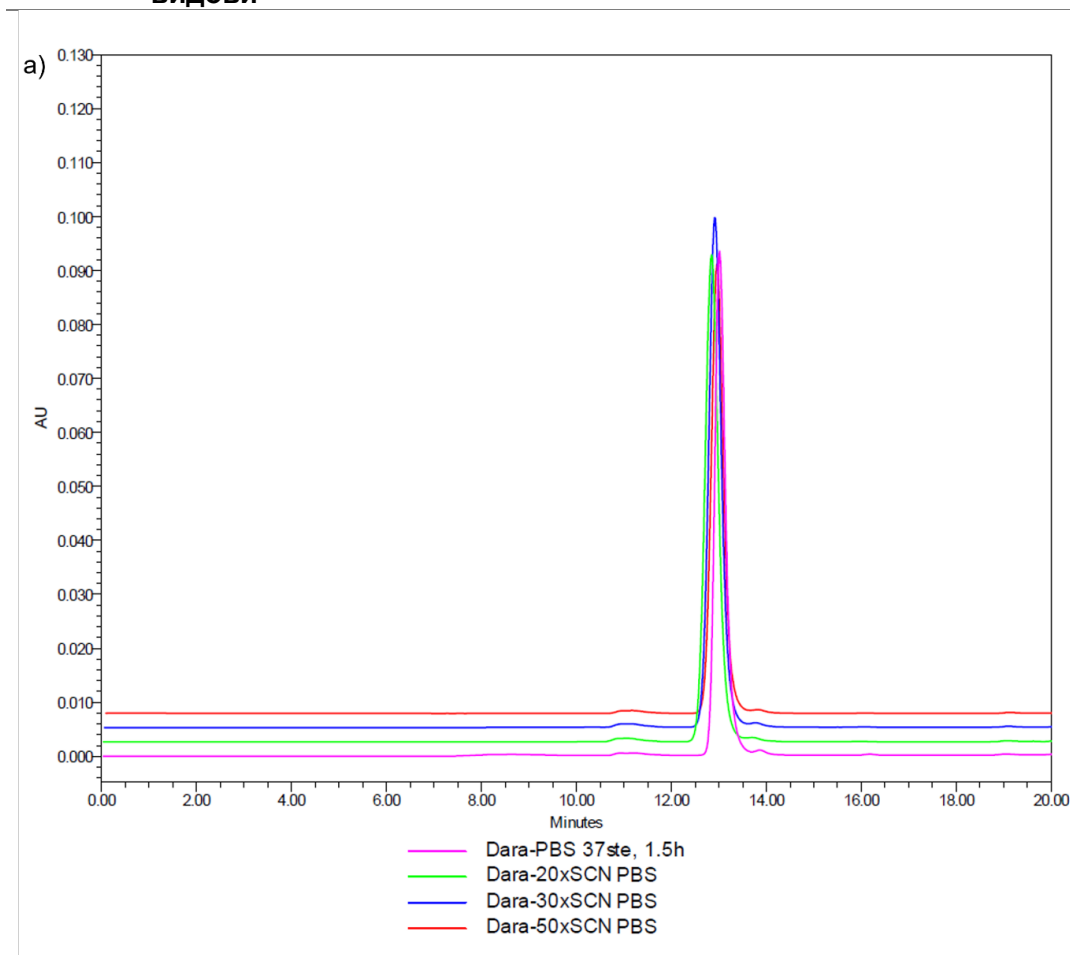
Figure 33 Chromatogram of purified daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA immunoconjugate

Влијанието на различните пуфери за време на конјугацијата, исто така, беше евалуирано преку промената на содржината на главниот мономер. Од преклопените хроматограми на репрезентативниот примерок даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA во различен моларен вишок на хелатор, прикажани на сликите 34 и 35, беше забележано дека содржината на главниот мономер при конјугација во фосфатен пуфер изнесува 97,87 %, а при конјугација во карбонатен пуфер изнесува 97,06 %. Деталните резултати се прикажани во табела 11, а соодветните преклопени хроматограми добиени по анализа на конјугираниот даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA во двата пуфера, се дадени на слика 36.

Табела 11 Влијание на пуферот врз содржината на молекулските видови при процесот на конјугација

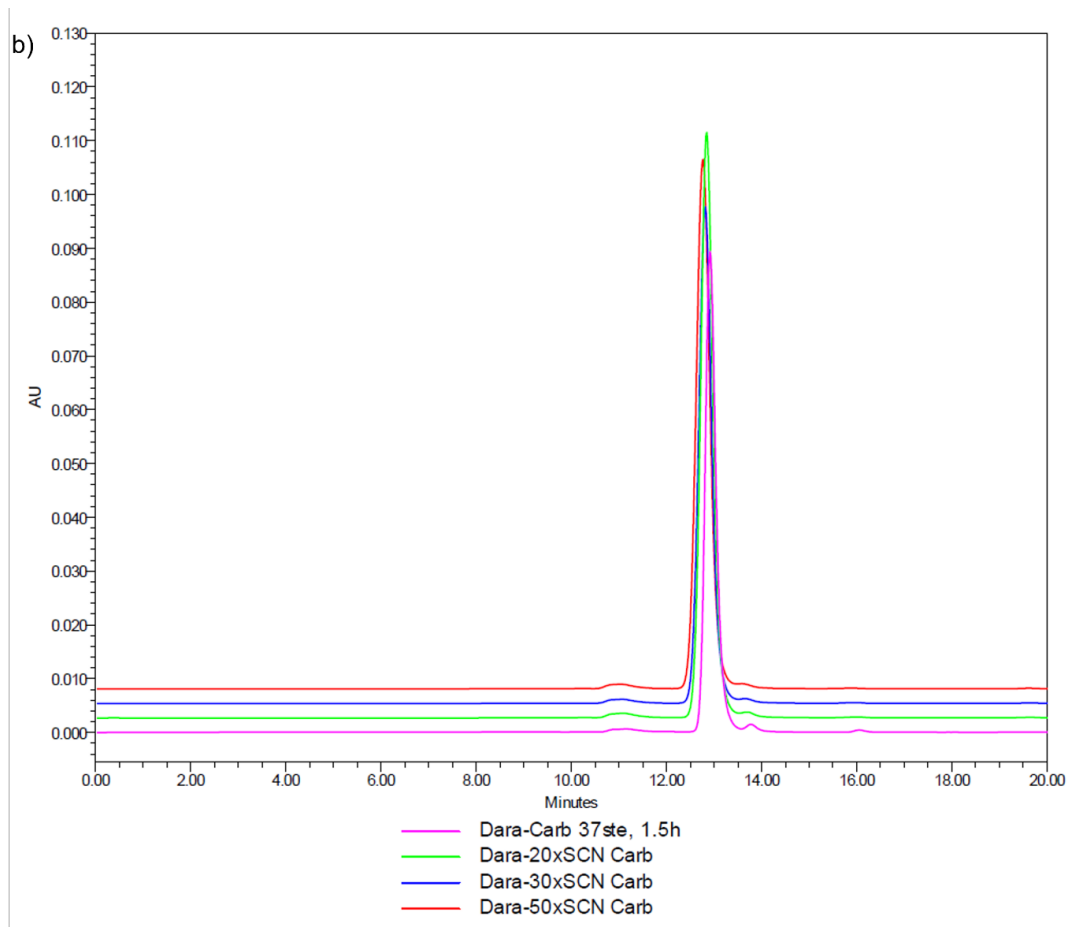
Table 11 Effect of the buffer on the content of molecular species during the conjugation process

Молекулски вид	Содржина при конјугација во фосфатен пуфер (%)	Содржина при конјугација во карбонатен пуфер (%)
Главен мономер	97,87	97,06
Високомолекулски видови	1,37	1,47
Нискомолекулски видови	0,24	0,93



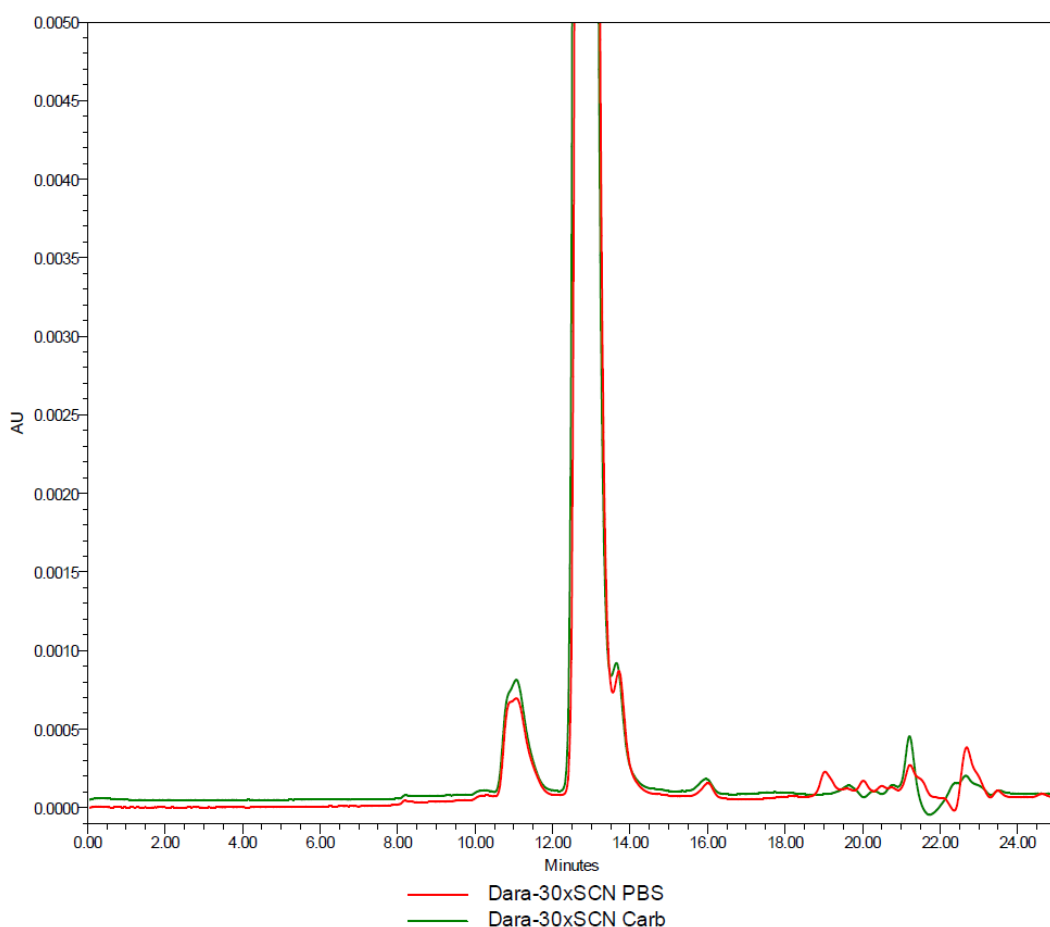
Слика 34 Преклопени хроматограми на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA со различен моларен вишок на хелатор при конјугација во фосфатен пуфер

Figure 34 Overlay chromatograms of daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA conjugated with different chelator molar excesses in phosphate buffer



Слика 35 Преклопени хроматограми на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA со различен моларен вишок на хелатор при конјугација во карбонатен пуфер

Figure 35 Overlay chromatograms of daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA conjugated with different chelator molar excesses in carbonate buffer



Слика 36 Преклопени хроматограми на репрезентативниот имуноконјугат даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA добиен по конјугација во фосфатен и карбонатен пуфер

Figure 36 Overlay chromatograms of representative daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA immunoconjugates prepared in phosphate and carbonate buffer

Истиот метод беше применет и за евалуација на чистотата на имуноконјугатите добиени со различни хелатори, при нивни различни моларни односи со антителото.

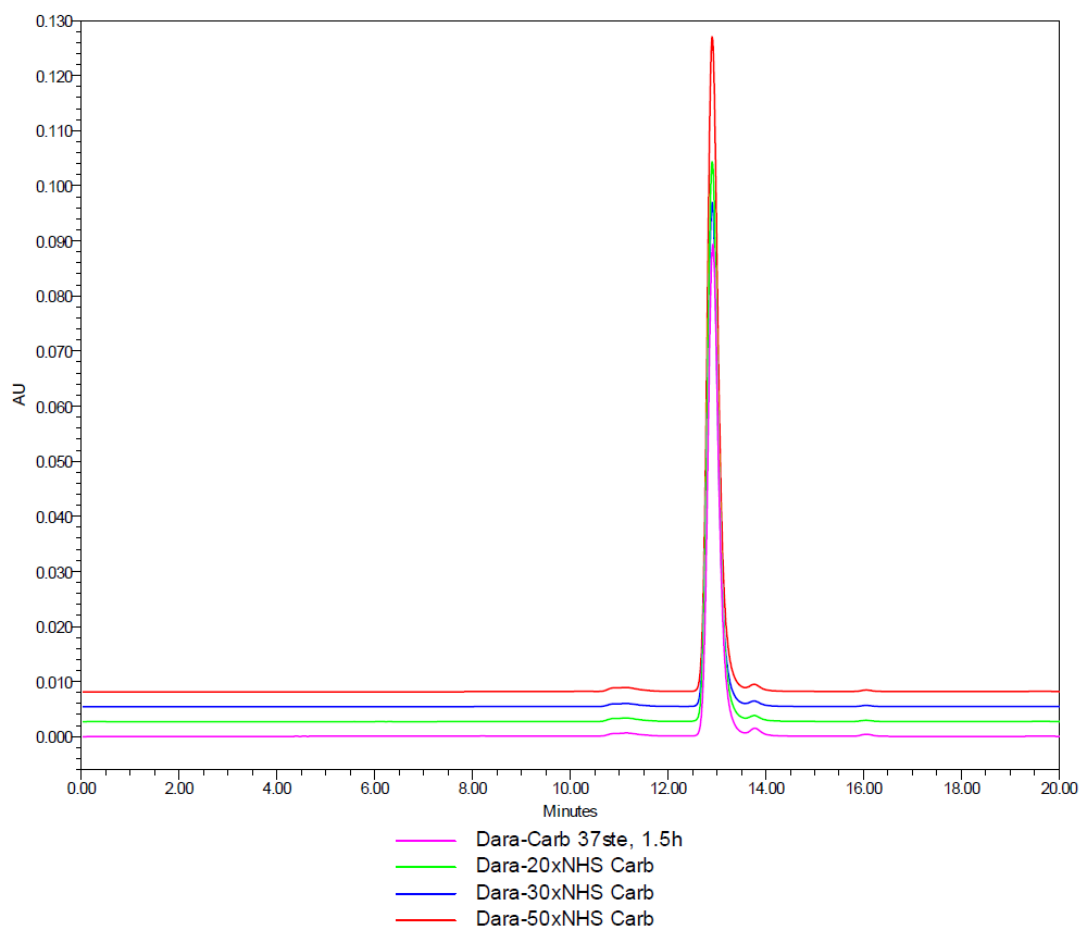
Врз основа на површината под пикот што одговара на главниот мономер, беа добиени резултатите за чистотата на имуноконјугатите во двата пуфера, кои се прикажани во табела 12. Кај сите анализирани имуноконјугати, содржината на главниот мономер се движеше во опсег од 96,62–99,55 %.

Табела 12 Површина на главниот мономерен пик кај имуноконјугатите при различни пуфери за конјугација, различни хелатори и моларни односи
Table 12 Main monomer peak area of immunoconjugates prepared in different buffer systems, with different chelators and ratios

Имуноконјугат	Моларен вишок од хелатор	Површина на главен мономер при конјугација во фосфатен пуфер (%)	Површина на главен мономер при конјугација во карбонатен пуфер (%)
Даратумумаб-NHS-DOTA	20	99,55	99,51
	30	99,54	99,48
	50	97,60	97,94
Даратумумаб-p-SCN-Bn-DOTA	20	97,73	97,68
	30	97,87	97,06
	50	96,95	96,94
Даратумумаб-p-SCN-Bn-1B4M-DTPA	20	97,93	97,07
	30	97,96	96,83
	50	97,30	96,62

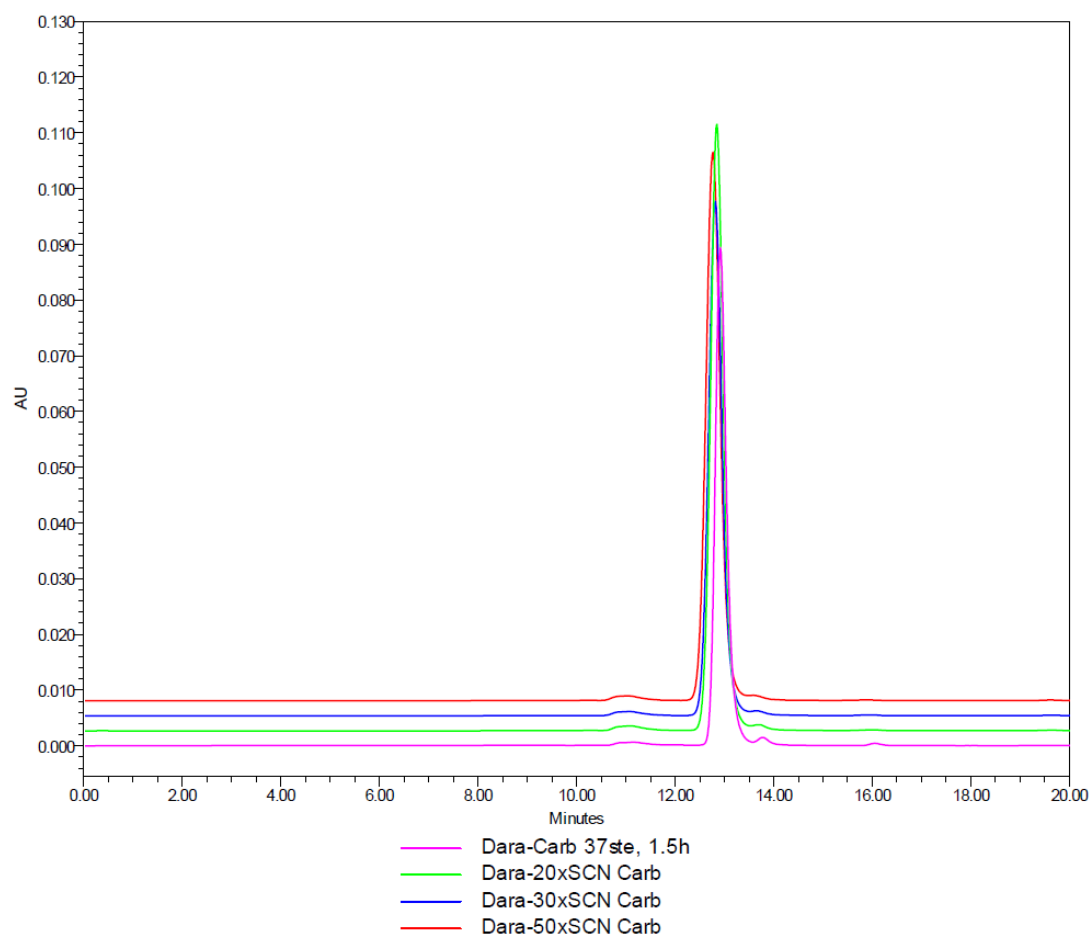
Согласно воспоставениот критериум за прифатливост на чистотата на имуноконјугатот, според кој површината под пикот што одговара на главниот мономер треба да изнесува најмалку 95,00 %, може да се заклучи дека сите испитувани имуноконјугати го исполнуваат овој критериум. Притоа, во споредба со останатите имуноконјугати, највисоки вредности беа забележани кај даратумумаб-NHS-DOTA, како во фосфатен, така и во карбонатен пуфер. Кај даратумумаб-p-SCN-Bn-DOTA, застапеноста на главниот мономер се движеше во релативно тесен опсег од 96,94–97,87 %, без изразени разлики помеѓу двата пуфери. Кај даратумумаб-p-SCN-Bn-1B4M-DTPA, вредностите добиени во фосфатен пуфер останаа релативно високи и се движеа во опсег од 97,30–97,96 %, додека во карбонатен пуфер беа конзистентно пониски, односно во опсег од 96,62–97,07 %. Ваквите резултати укажуваат на мала, но перзистирачка разлика помеѓу двата пуфери во однос на зачувувањето на структурата на главниот мономер.

Преклопените хроматограми на имуноконјугатите со различните хелатори и нивниот моларен вишок добиени во карбонатен пуфер се прикажани на сликите 37–39.



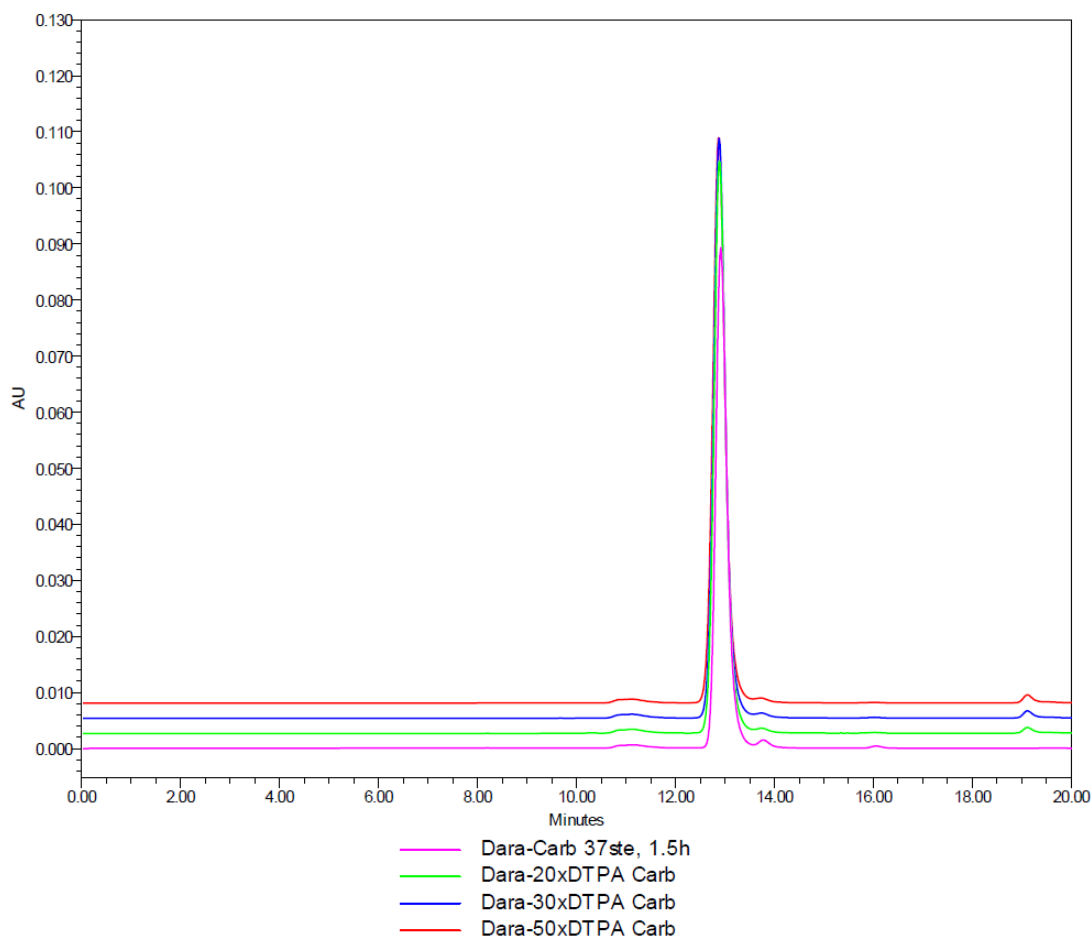
Слика 37 Преклопени хроматограми на даратумумаб-DOTA-NHS добиен при различен моларен вишок на хелаторот

Figure 37 Overlay chromatograms of daratumumab-DOTA-NHS obtained using different molar excesses of the chelator



Слика 38 Преклопени хроматограми на даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA добиен
при различен моларен вишок на хелаторот

Figure 38 Overlay chromatograms of daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA obtained using
different molar excesses of the chelator



Слика 39 Преклопени хроматограми на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA
добиеи при различен моларен вишок на хелаторот

Figure 39 Overlay chromatograms of daratumumab-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA obtained
using different molar excesses of the chelator

Дополнително, SE-HPLC методот беше применет и за проценка на влијанието на лиофилизацијата врз хроматографскиот профил на чистота на прочистениот даратумумаб и на репрезентативниот имуноконјугат даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA. Целта беше да се утврди дали процесот на лиофилизација предизвикува промени во содржината на главниот мономер, како и промени во содржината на високомолекулските и нискомолекулските видови.

Кај прочистениот неконјугиран даратумумаб, содржината на главниот мономер изнесува 99,56 % во течна форма, односно 99,60 % по лиофилизација. Високомолекулски видови не беа детектирани во ниту еден од двата примерока,

додека присуството на нискомолекулски видови беше минимално и изнесуваше 0,44 % кај течниот, односно 0,40 % кај лиофилизираниот даратумумаб. Овие резултати потврдуваат дека лиофилизацијата не предизвикува појава на агрегати, ниту, пак, зголемување на содржината на фрагменти кај неконјугираното антителио.

Сличен тренд беше забележан и кај репрезентативниот имуноконјугат даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA. Содржината на главниот мономер во овој имуноконјугат изнесуваше 98,31 %, како кај течната, така и кај лиофилизираната формулација. Содржината, пак, на првиот високомолекулски вид изнесуваше 1,73 % кај течниот, односно 1,69 % кај лиофилизираниот имуноконјугат. Вториот високомолекулски вид не беше детектиран во овој примерок, ниту во течна, ниту во лиофилизирана состојба. Нискомолекулските видови беа застапени со содржина од 1,15 % кај течната, односно 1,20 % кај лиофилизираната формулација.

Севкупно, добиените резултати потврдуваат дека процесот на лиофилизација не резултираше со значајни промени во хроматографскиот профил на чистота на даратумумаб и даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA. Постојаното одржување на висока содржина на главниот мономер, отсуството на агрегати и минималните промени во содржината на фрагменти, укажуваат дека избраните услови за лиофилизација се соодветни за зачувување на структурниот интегритет и чистотата на антителото и неговиот имуноконјугат.

Деталните резултати се прикажани во табела 13.

Табела 13 Проценка на влијанието на лиофилизацијата врз хроматографскиот профил на чистота на прочистен даратумумаб и даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA

Table 13 Assessment of the effect of freeze-drying on the chromatographic purity profile of purified daratumumab and daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA

	Параметар	Прочистен, неконјугиран даратумумаб		Даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA	
		Течен	Леофилизиран кит	Течен	Леофилизиран кит
Главен мономер	Rt (min)	13,423	13,365	13,207	13,196
	AUC (mAU)	1611017	1465974	1962125	1910508
	AUC (%)	99,56	99,60	98,31	98,31
Прв агрегат	Rt (min)	n.d.*	n.d.	11,426	11,428
	AUC (mAU)	n.d.	n.d.	35033	33185
	AUC (%)	n.d.	n.d.	1,73	1,69
Втор агрегат	Rt (min)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	AUC (mAU)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	AUC (%)	0,00	0,00	0,00	0,00
LMW видови	Rt (min)	14,328	14,266	14,060	14,027
	AUC (mAU)	7096	5913	23317	23688
	AUC (%)	0,44	0,40	1,15	1,20

*n.d – не беше детектиран пик во претходно дефинираното време на ретенција за високомолекулски видови при применетите хроматографски услови

Понатаму, беше направена проценка на влијанието на растворувачот за подготовка на формулациите (вода или физиолошки раствор) врз нивниот хроматографски профил на чистота.

Како што е прикажано во табела 14, кај првите две формулации, F1 и F2, беа детектирани високомолекулски видови и во двете серии, со содржина во опсег од 4,80–5,90 % и 6,67–8,55 %, соодветно.

Наспроти тоа, кај формулациите F3 и F5 беше исполнет воспоставениот критериум за прифатливост во однос на профилот на чистота, така што содржината на главниот мономер изнесуваше над 98,00 % во двете серии. Притоа, не беа детектирани високомолекулски, но беше забележано минимално присуство на нискомолекулските видови.

Кај формулацијата F4, имуноконјугатот подготвен со вода, беше главно застапен во неговата мономерна форма, без присуство на високомолекулските видови, додека во серијата подготвена со физиолошки раствор, високомолекулските видови беа детектирани со минимално присуство.

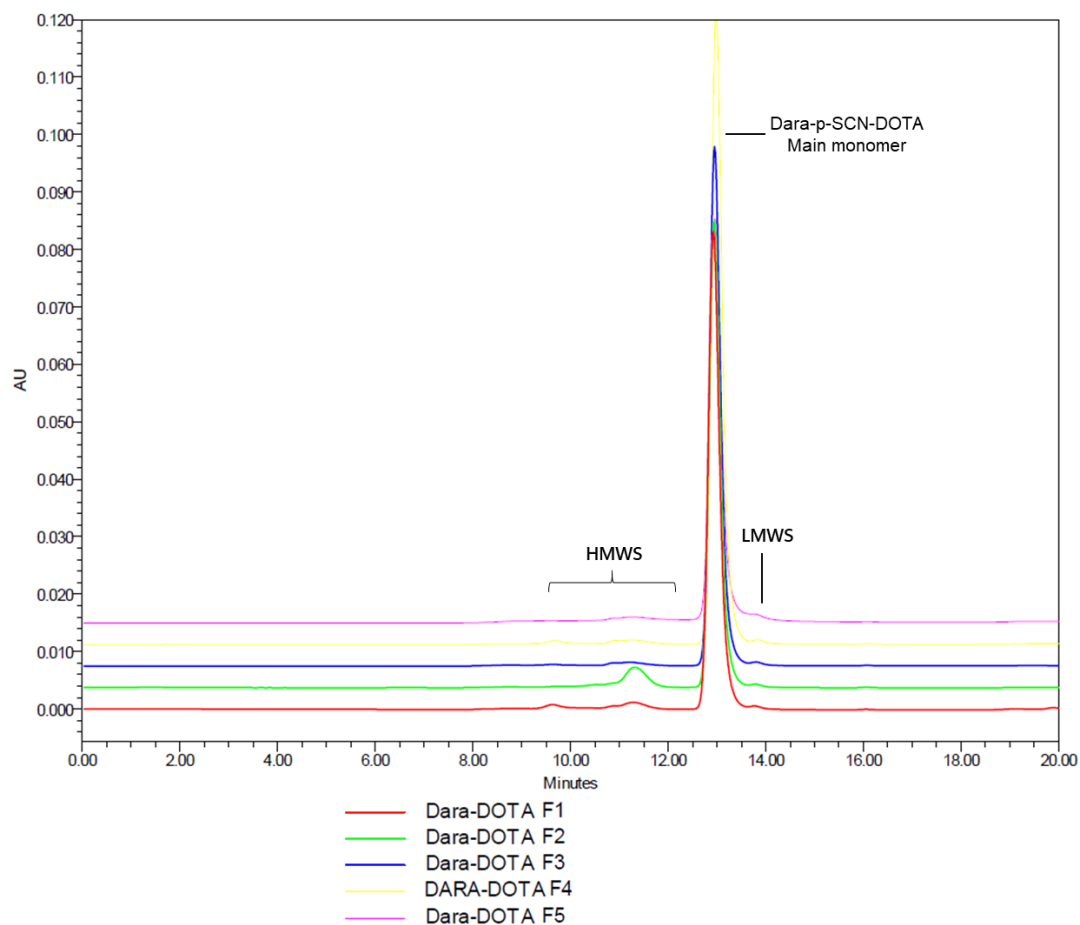
Влијанието на главниот растворувач врз содржината на молекулските видови во различните формулации може да се забележи преку преклопените хроматограми на репрезентативниот примерок даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, прикажани на сликите 40 и 41.

Табела 14 Хроматографски профил на чистота на лиофилизирани формулации на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA подготвени со вода (W) и физиолошки раствор (S)

Table 14 Chromatographic purity profile of water-based (W) and saline-based (S) freeze-dried daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA formulations

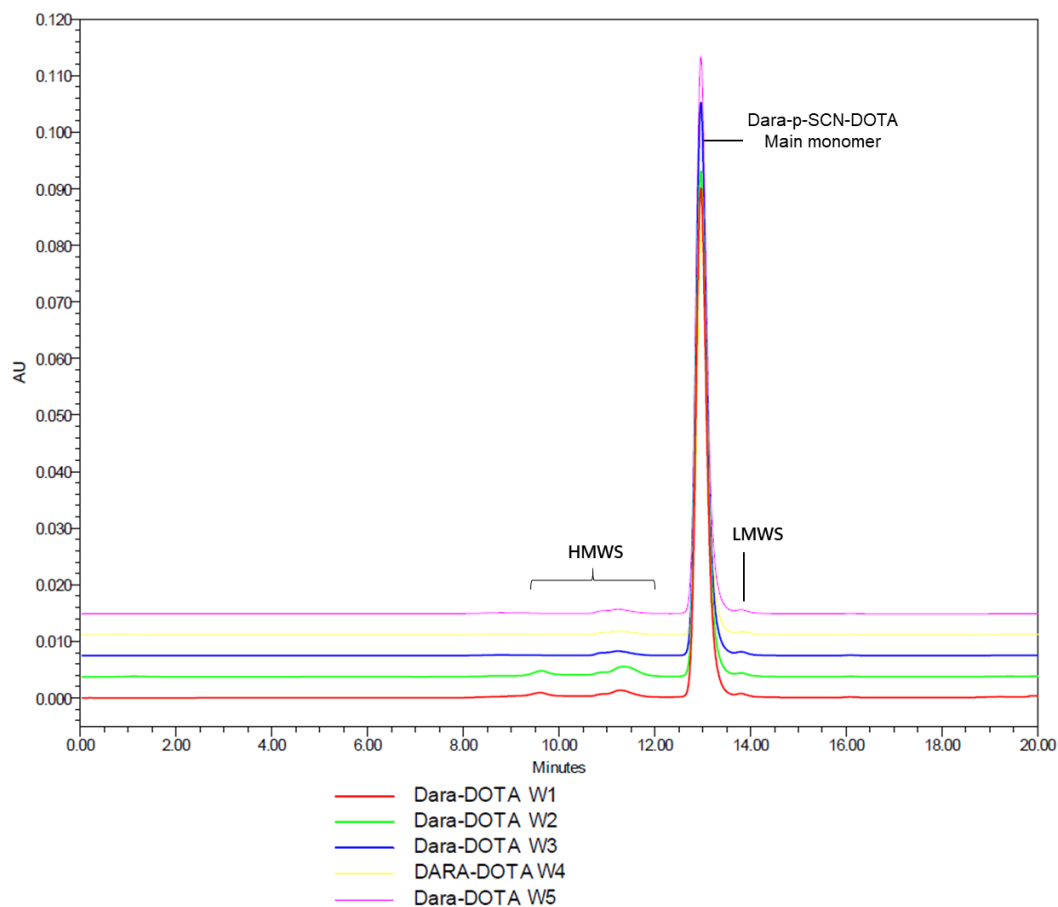
Формулација (F)	Содржина на главен мономер (%)		Содржина на агрегати (%)		Содржина на фрагменти (%)	
	W	S	W	S	W	S
1	93,86	94,98	5,90	4,80	0,24	0,22
2	93,01	91,23	6,67	8,55	0,23	0,22
3	99,76	99,75	n.d.*	n.d.	0,24	0,25
4	99,73	98,90	n.d.	0,85	0,27	0,25
5	99,76	99,75	n.d.	n.d.	0,24	0,25

*n.d. – не беше детектиран пик во претходно дефинираното време на ретенција за високомолекулски видови при применетите хроматографски услови



Слика 40 Преклопени хроматограми на реконституираните формулации од даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA подготвени со физиолошки раствор (S) како главен растворувач

Figure 40 Overlay chromatograms of reconstituted daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA formulations prepared with saline (S) as the main solvent



Слика 41 Преклопени хроматограми на реконституираните формулации од даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA подготвени со вода (W) како главен растворувач
Figure 41 Overlay chromatograms of reconstituted daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA formulations prepared with вода (W) as the main solvent

Дополнително, при проценката на лиофилизираните формулации беше утврдено и влијанието на употребениот дисахарид со лиопротективна улога, врз хроматографскиот профил на чистота.

Проценката беше направена според формулацијата F5, која беше избрана како најсоодветна за понатамошните испитувања, при што дел од примероците содржеа сахароза, а дел трехалоза. Целта беше да се утврди дали видот на дисахаридот влијае врз зачувувањето на мономерната форма на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, како и врз појавата на високомолекулски и нискомолекулски видови по лиофилизација.

Како што е прикажано во табела 15, кај формулацијата F5, која е подготвена со трехалоза, содржината на главниот мономер изнесуваше 98,31 %, што е повисоко во споредба со соодветната формулација која е подготвена со сахароза, каде што вредноста за содржината на главниот мономер изнесуваше 97,01 %. Содржината на високомолекулските видови беше речиси идентична кај двете формулации и изнесуваше 1,67 % кај формулацијата со сахароза, односно 1,69 % кај формулацијата со трехалоза. Позначајна разлика беше забележана во однос на нискомолекулските видови, кои беа застапени со 1,23 % кај формулацијата со сахароза, додека кај формулацијата со трехалоза не беа детектирани.

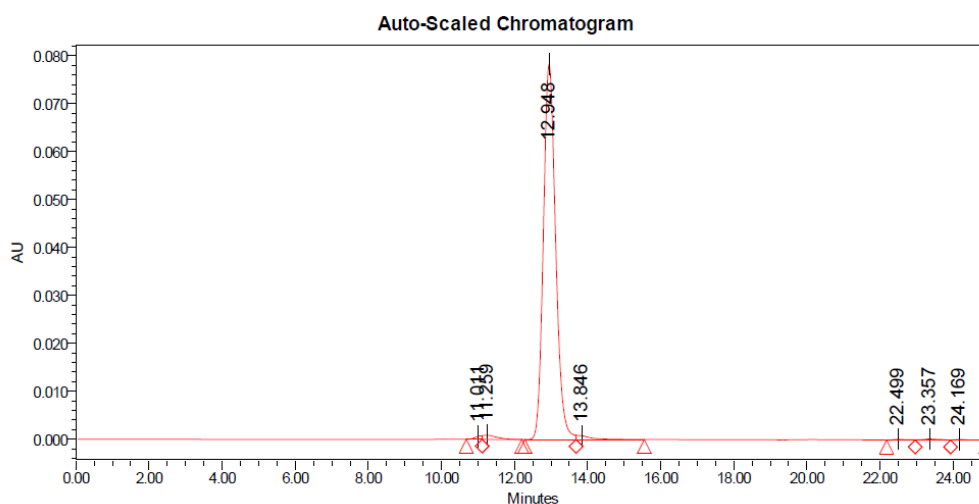
Репрезентативните хроматограми од формулацијата F5 подготвена со сахароза и трехалоза се дадени на сликите 42 и 43.

Табела 15 Влијание на дисахаридот врз хроматографскиот профил на чистота
Table 15 Effect of the disaccharide on the chromatographic purity profile

Молекулски вид	Содржина во формулација F5 со сахароза (%)	Содржина во формулација F5 со трехалоза (%)
Главен мономер	97,01	98,31
Високомолекулски видови	1,67	1,69
Нискомолекулски видови	1,23	n.d.*

*n.d. – не беше детектиран пик во претходно дефинираното време на ретенција за нискомолекулските видови при применетите хроматографски услови

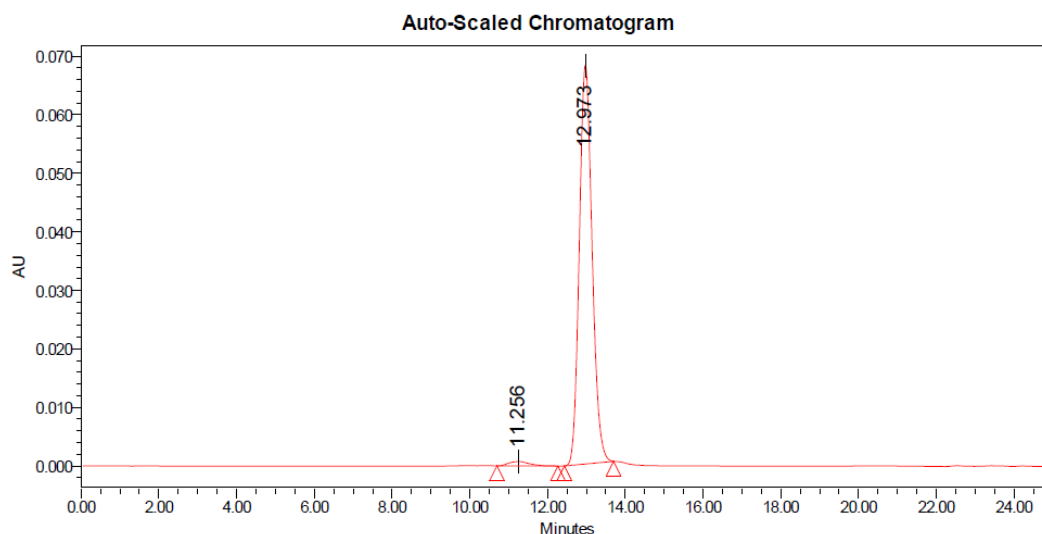
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	DARA-SCN X 30 Sucrose 5.2025	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	DARA SCN treh i sah stabil SS
Vial:	31	Acq. Method Set:	Daratumumab 50mM PBS ACN
Injection #:	1	Processing Method:	LC PQ ApexTrack
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	25.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 280nm
Date Acquired: 8/14/2025 4:58:55 PM CEST			
Date Processed: 8/14/2025 7:05:49 PM CEST			



Слика 42 Репрезентативен хроматограм на лиофилизирана формулација F5 на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA подготвен со сахароза

Figure 42 Representative chromatogram of the freeze-dried F5 formulation of daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA prepared with sucrose

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	DARA-SCN X 30 Trehalose	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	DARA SCN treh i sah stabil SS
Vial:	32	Acq. Method Set:	Daratumumab 50mM PBS ACN
Injection #:	1	Processing Method:	LC PQ ApexTrack
Injection Volume:	10.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	25.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 280nm
Date Acquired:	8/14/2025 5:24:36 PM CEST		
Date Processed:	8/14/2025 7:07:50 PM CEST		

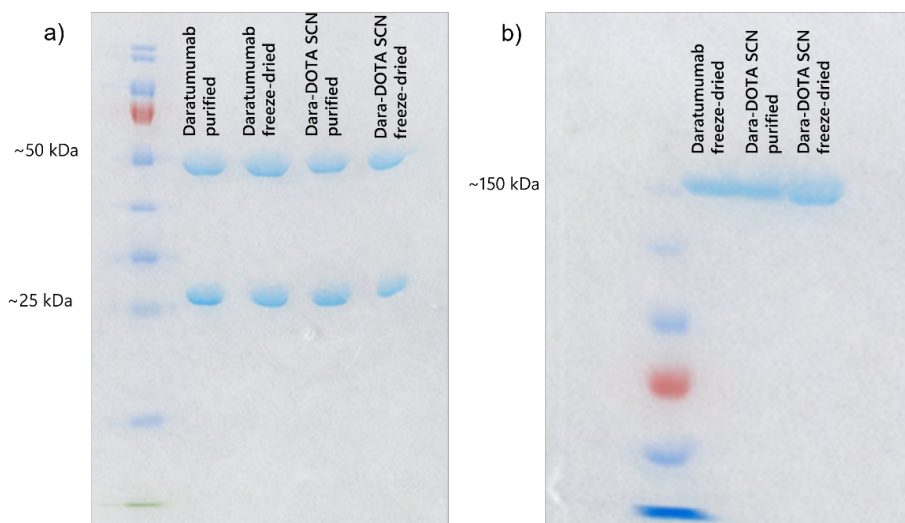


Слика 43 Репрезентативен хроматограм на лиофилизирана формулација F5 на даратумумаб-p-SCN-Bn-DOTA подготвен со трехалоза

Figure 43 Representative chromatogram of the freeze-dried F5 formulation of daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA prepared with trehalose

5.3.3.2 Електрофореза во редуцирачки и нередуцирачки услови

SDS-PAGE анализата, спроведена во редуцирачки и нередуцирачки услови, го потврдува структурниот интегритет на антителото преку детекција на потенцијално присуство на агрегати или фрагменти, што е во директна согласност и со утврдувањето на профилот на чистота на имуноконјугатот (слика 44).



Слика 44 Електроферограм во а) редуцирачки и б) нередуцирачки услови
Figure 44 Electropherogram under a) reducing and b) non-reducing conditions

Во редуцирачки услови, кај сите анализирани примероци беа забележани очекуваните ленти за тешката (~50 kDa) и лесната (~25 kDa) верига на антителото, без појава на дополнителни ленти кои би укажувале на присуство на фрагменти.

Во нередуцирачки услови, беше забележана доминантна лента на ~150 kDa, која одговара на непроменето IgG антитело, без појава на видливи ленти кои би укажувале на присуство на агрегати.

5.4 Развој и оптимизација на методот за радиобележување со лутециум-177 (^{177}Lu)

За да се постигне ефикасно обележување со радиоизоотопот 177, беше неопходно да се изведува во кисела средина, во опсег од pH 4–5. Со таа цел беа испитани два медиуми за реконституција на лиофилизиранта формулација и тоа со растворање на имуноконјугатот во 0,5 mL свежо подготвен раствор на аскорбинска киселина (100 mg/mL) со pH 4,5 и со растворање во 0,5 mL 0,1 M натриум ацетатен пуфер со pH 4,5.

По развојот на методот за радиобележување, беше утврдено дека формулацијата растворена во 0,5 mL 0,1 M натриум ацетат со pH 4,5 покажуваа повисок принос по обележување, а со тоа и повисока радиохемиска чистота, во

споредба со формулацијата растворена во раствор на аскорбинска киселина. Поради тоа, 0,1 М натриум ацетатен пуфер (pH 4,5) беше избран како медиум за растворање во понатамошните експерименти на радиобележување. На секој од примероците беа додадени 11-18,5 MBq (300-500 μ Ci) радиоактивен ^{177}Lu .

5.4.1 Влијание на условите на реакција врз приносот по обележување

Влијанието на времето на инкубација врз приносот по обележувањето беше испитано кај ^{177}Lu -даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA како репрезентативен примерок, при температура од 37 °C и благо мешање. Ефикасноста на обележувањето беше следена во интервал од 5 до 60 минути, а добиените вредности за приносот по обележувањето се прикажани во табела 16.

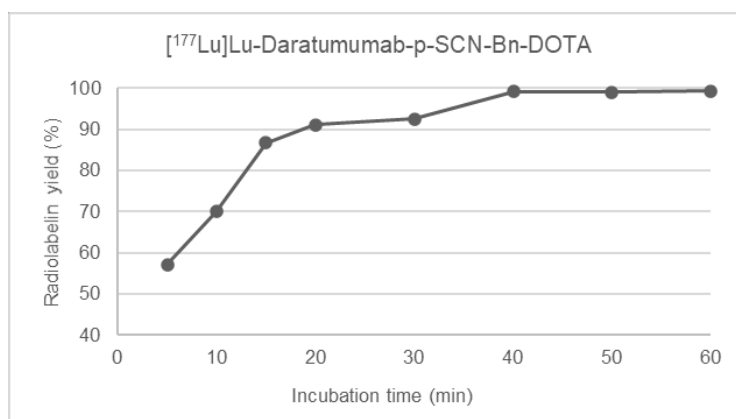
Резултатите покажаа јасно временски зависно зголемување на приносот по радиобележување, проследено со намалување на процентот на онечистувања како слободен ^{177}Lu - Lu^{3+} , ^{177}Lu -*p*-SCN-Bn-DOTA, како и фрагменти обележани со ^{177}Lu (табела 16). По 5 минути инкубација, приносот изнесуваше 57,21 %, а по 10 минути се зголеми на околу 70,01 %. По 15 минути беше забележано понатамошно зголемување до 86,66%, додека по 20 и 30 минути беа добиени вредности од 91,10 % и 92,47 %, соодветно. Највисок принос, од над 99,00 %, беше постигната по 40 минути инкубација. По овој временски интервал не беше забележано значајно понатамошно зголемување, при што вредностите останаа практично непроменети и по 50 и 60 минути.

Графичкиот приказ даден на слика 45 јасно го покажува трендот каде најинтензивното зголемување на приносот има во првите 15–20 минути, по што следи побавно приближување кон максималните вредности. По 40 минути се постигнува плато, при што приносот останува практично непроменет до крајот на испитуваниот временски интервал од 60 минути.

Табела 16 Временска зависност на приносот на обележување и онечистувањата кај [^{177}Lu]Lu-даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA

Table 16 Effect of incubation time on radiolabeling yield and impurities during labeling of daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA with ^{177}Lu

Време (мин)	Вкупни радиохемиски онечистувања (%)	Принос по обележување (%)
5	42,79	57,21
10	29,99	70,01
15	13,34	86,66
20	8,90	91,10
30	7,53	92,47
40	0,83	99,17
50	1,00	99,00
60	0,65	99,35



Слика 45 Графички приказ на зависноста на приносот на обележување од времетраење на инкубацијата

Figure 45 Graphical representation of the dependence of radiolabeling yield on incubation time

5.4.2 Карактеризација на радиоимуноконјугати со ^{177}Lu , ^{225}Ac и ^{161}Tb

Кај радиоимуноконјугатите што покажаа принос по радиобележувањето со ^{177}Lu повисок од 98,0%, не беше потребен дополнителен чекор на прочистување. Тоа

овозвозможи да бидат директно користени за следните испитувања на нивната радиохемиска чистота и *in vitro* стабилноста.

Условите оптимизирани за радиобележување со ^{177}Lu беа употребени како почетна основа за испитувањата со ^{225}Ac и ^{161}Tb . Поради разликите во координативната хемија на радионуклидите, приносот по радиобележување, радиохемиската чистота и *in vitro* стабилноста беа одделно оценети за секој добиен радиоимуноконјугат.

5.4.3 Определување на принос по радиобележување и радиохемиска чистота на радиоимуноконјугатите со ^{177}Lu

Врз основа на претходно определените CAR вредности, за понатамошно обележување со радионуклидот ^{177}Lu , беа одбрани пет имуноконјугати: даратумумаб-DOTA-NHS добиен со 50-пати моларен вишок, даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA добиен со 20- и 30-пати моларен вишок, како и даратумумаб-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA добиен со 20- и 30-пати моларен вишок.

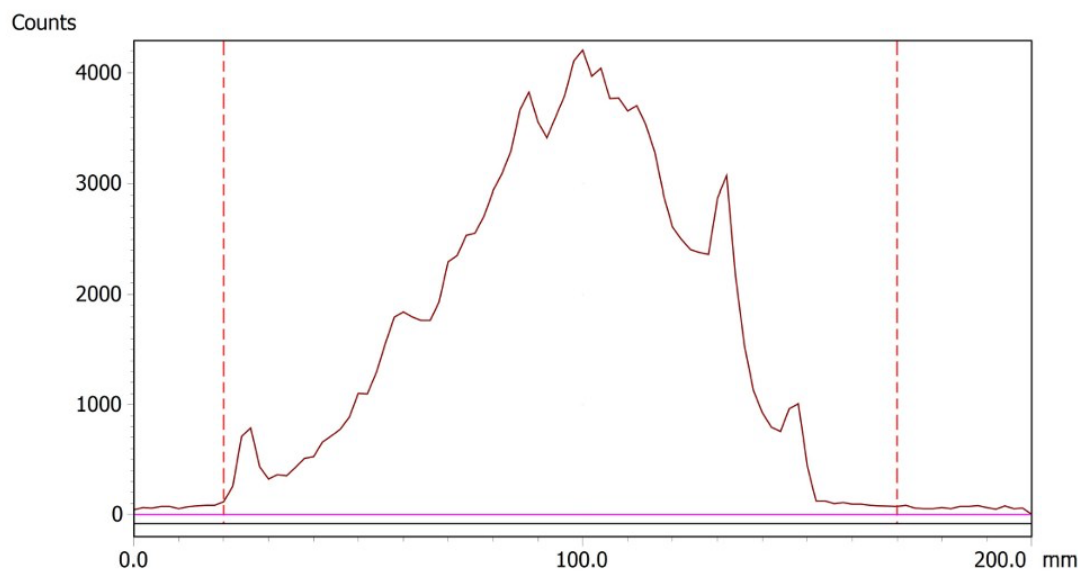
Кај даратумумаб-DOTA-NHS, добиен со 50-пати моларен вишок на хелатор, беше добиен низок принос по обележувањето, под 30%. Кај даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, приносот на обележувањето изнесуваше 86,0% за конјугатот добиен со 20-пати моларен вишок и 99,8 % за конјугатот добиен со 30-пати моларен вишок. Кај двата даратумумаб-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA имуноконјугати, приносот на радиобележувањето беше над 98,0 %.

Со примена на iTLC анализата за определување на радиохемиска чистота се забележа различна миграција на поединечните радиохемиски видови, при што радиобележаниот имуноконјугат остануваше на стартната линија ($R_f = 0$), слободниот $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}^{3+}$ се детектираше во интервал од $R_f = 0,3-0,5$ (Слика 46), додека нискомолекулските обележани видови, односно обележаниот хелатор, мигрираа кон фронтот на растворувачот ($R_f = 1,0$).

Споредбените iTLC профили на селектираните $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -даратумумаб-имуноконјугати се прикажани на сликите 47-49.

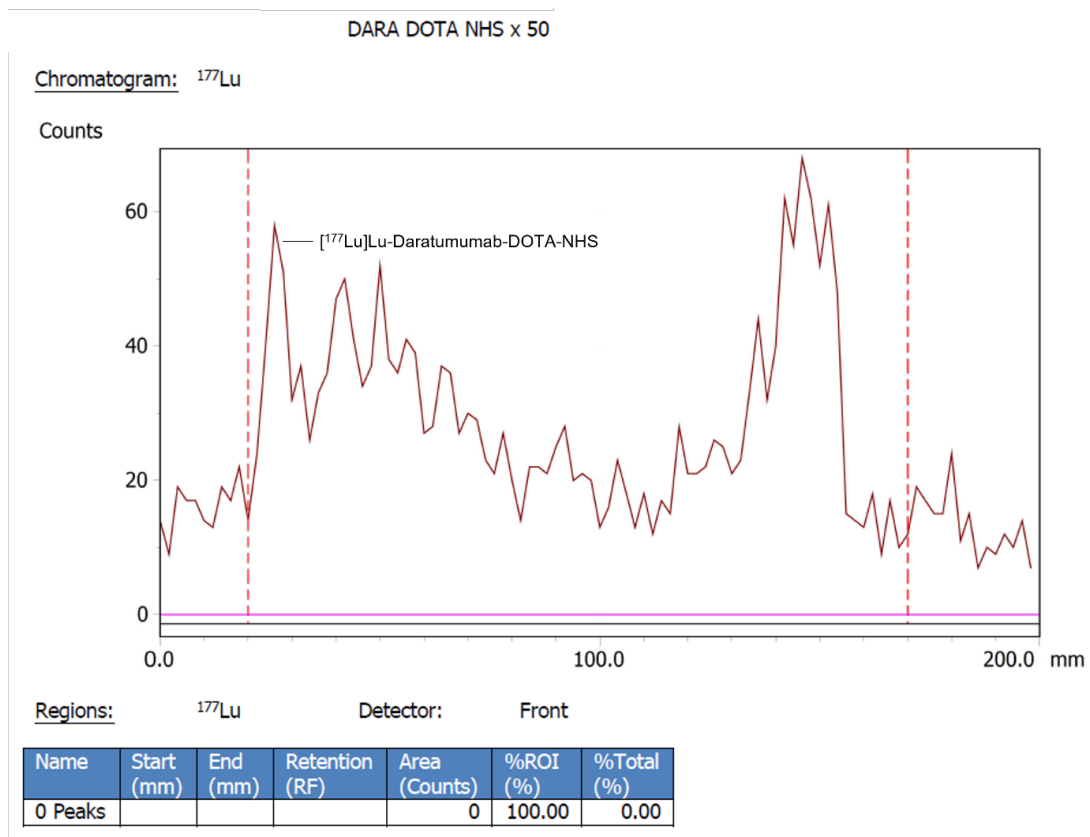
LuCl₂ 48h Acetate 27.8. Run 1.Measurement

Chromatogram: ¹⁷⁷Lu



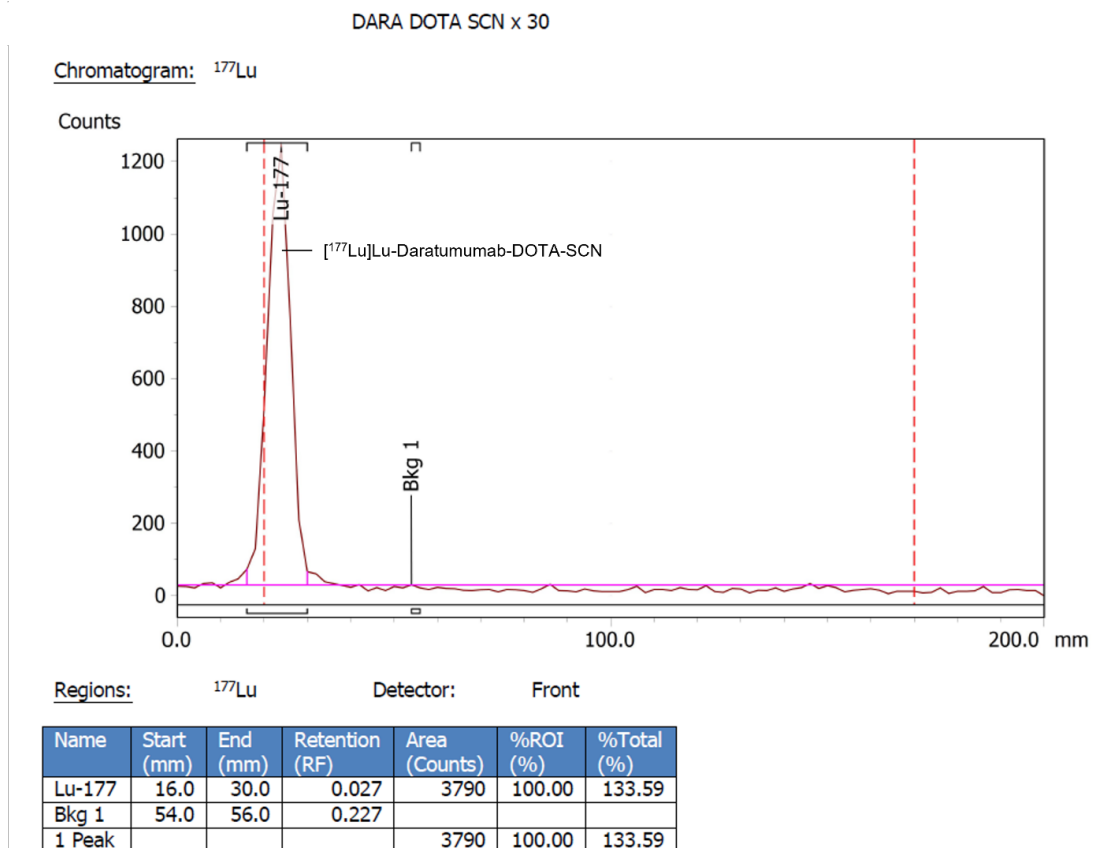
Слика 46 iTLC профил на слободен [¹⁷⁷Lu]Lu³⁺ (Rf = 0,3–0,5)

Figure 46 iTLC profile of free [¹⁷⁷Lu]Lu³⁺ (Rf = 0,3–0,5)



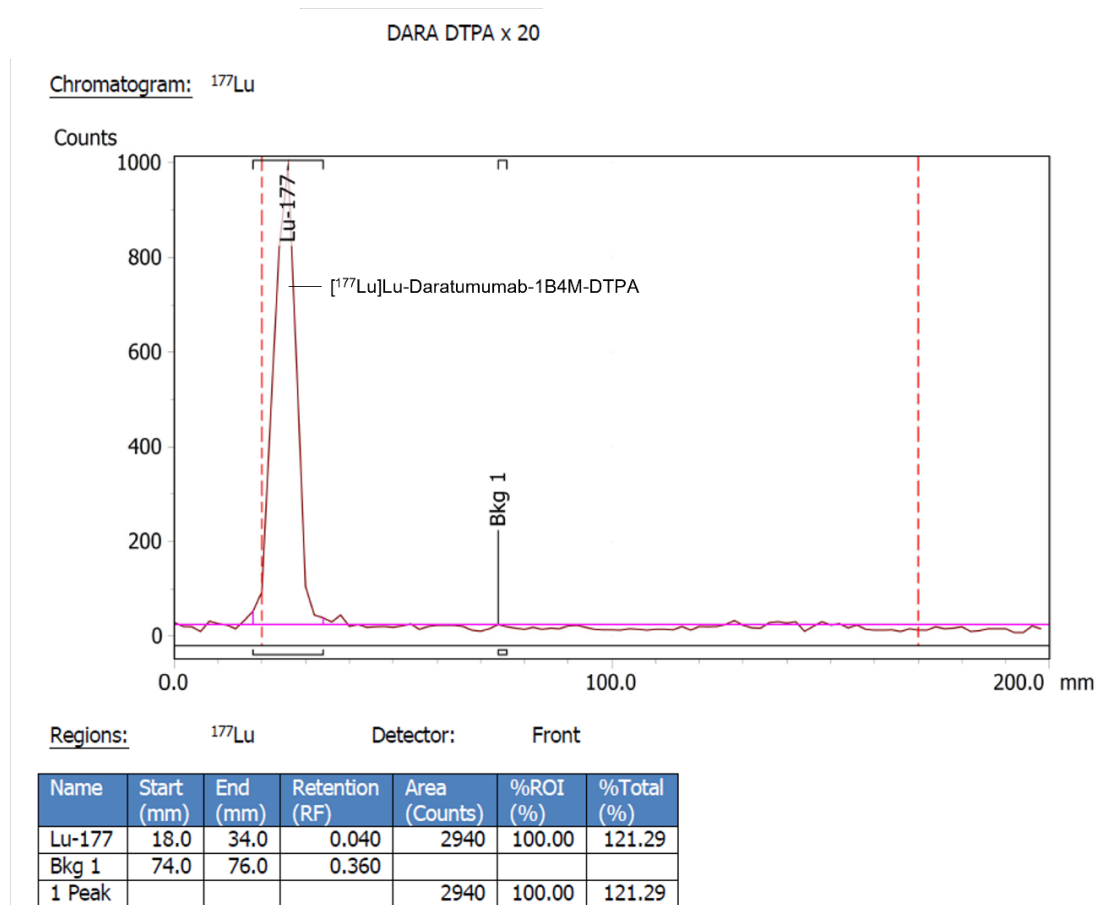
Слика 47 iTLC профил на радиохемиска чистота на ^{177}Lu Lu-даратумумаб-DOTA-NHS (50-пати моларен вишок)

Figure 47 iTLC profile of radiochemical purity of ^{177}Lu Lu-daratumumab-DOTA-NHS (50-fold molar excess)



Слика 48 iTLC профил на радиокемиска чистота на ^{177}Lu Lu-даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA (30-пати моларен вишок)

Figure 48 iTLC profile for radiochemical purity of ^{177}Lu Lu-daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA (30-fold molar excess)



Слика 49 iTLC профил на радиохемиска чистота на ^{177}Lu Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA (20-пати моларен вишок)

Figure 49 iTLC profile for radiochemical purity of ^{177}Lu Lu-daratumumab-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA (20-fold molar excess)

Врз основа на добиените резултати, за понатамошна евалуација на *in vitro* стабилноста, беа избрани даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA со 30-пати моларен вишок и даратумумаб-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA со 20-пати моларен вишок на хелатор. Двата имуноконјугати покажаа радиохемиска чистота над 98,0 %, со минимално присуство на слободен ^{177}Lu и нискомолекулски радиобележани видови.

5.4.3.1 *In vitro* стабилност на радиоимуноконјугатите

In vitro стабилноста на двата селектирани радиоимуноконјугати, ^{177}Lu Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA и ^{177}Lu Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA, беше проценета преку следење на процентот на радиоактивност врзана за

радиоимуноконјугатот во однос на вредноста определена на почетокот на инкубацијата.

Добиените резултати прикажани во табела 17, покажаа изразена разлика во стабилноста меѓу двата испитувани радиоимуноконјугати. Кај [¹⁷⁷Lu]Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, повеќе од 95,93 % од лутециум-177 остана врзан за антителото во текот на 168 часа, што укажува на висок степен на стабилност на формиранитот радиокомплекс.

Наспроти тоа, [¹⁷⁷Lu]Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA покажа пониска стабилност. Намалувањето на врзаната радиоактивност беше забележливо уште по 48 часа инкубација кога беа задржани 80,78 % од почетната вредност, додека по приближно еден физички полуживот на ¹⁷⁷Lu, само 25,22 % од активноста остана поврзана со имуноконјугатот.

Овие резултати покажуваат дека, иако двата радиоимуноконјугати првично покажаа висока радиохемиска чистота [¹⁷⁷Lu]Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA обезбедува значително постабилно задржување на радиометалот во текот на времето. Поради тоа, земајќи ги предвид и високиот почетен принос на обележувањето и супериорната *in vitro* стабилност, даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA беше избран како најсоодветен кандидат за понатамошните студии на стабилност на лиофилизираната формулација.

Табела 17 *In vitro* стабилност на [¹⁷⁷Lu]Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA и [¹⁷⁷Lu]Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA

Table 17 *In vitro* stability of [¹⁷⁷Lu]Lu-daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA and [¹⁷⁷Lu]Lu-daratumumab-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA

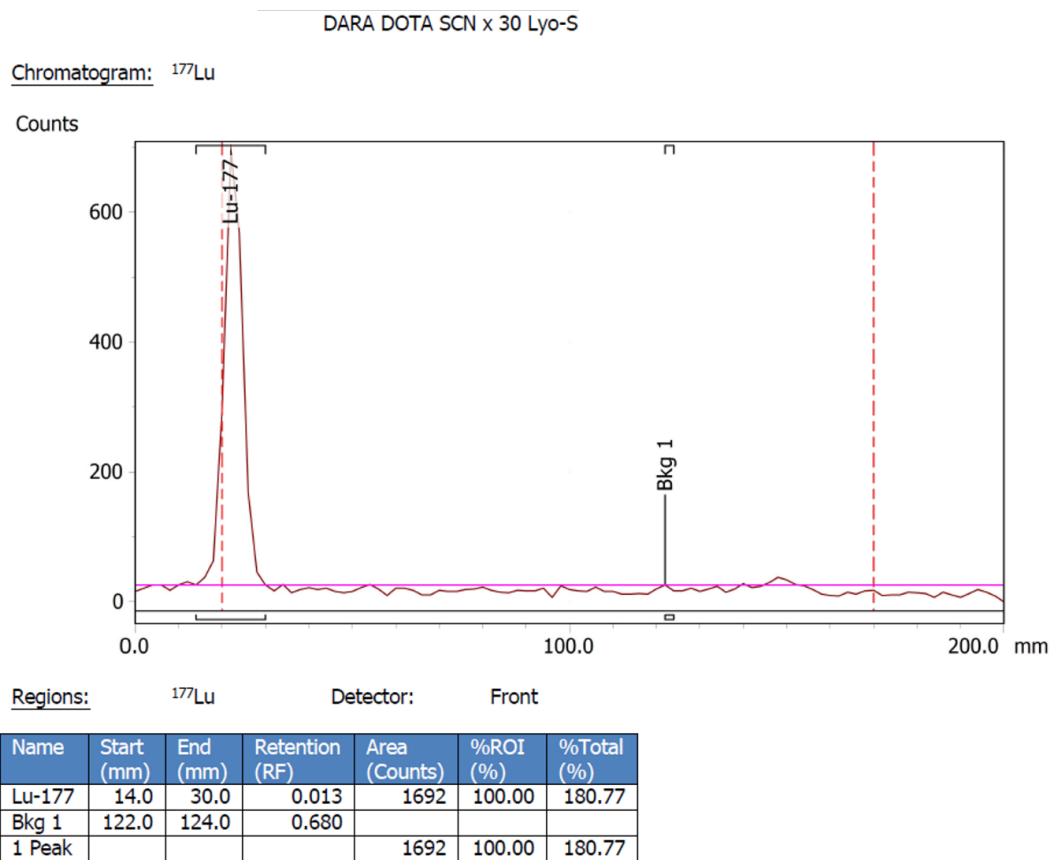
Време (h)	Радиохемиска чистота [¹⁷⁷ Lu]Lu- даратумумаб- <i>p</i> -SCN- Bn-DOTA (%)	Радиохемиска чистота [¹⁷⁷ Lu]Lu-даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-1B4M-DTPA (%)
0	100	100
24	99,80	89,72
48	98,90	80,79
72	97,90	51,91
96	97,11	44,17
120	96,02	30,01
168	95,93	25,22

5.4.3.2 Влијание на составот на формулацијата врз радиохемиската чистота на радиоимуноконјугатот

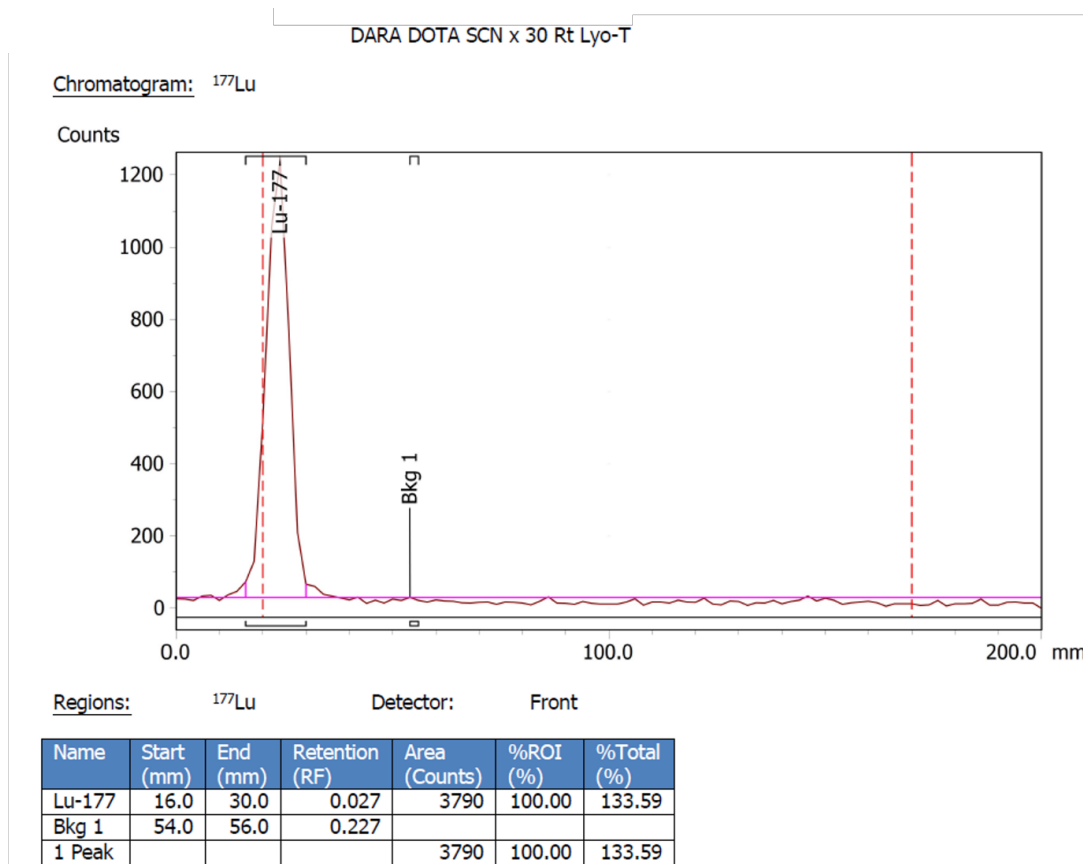
По изборот на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA како најсоодветен имуноконјугат, беше дополнително проценето дали составот на лиофилизираната формулација влијае врз радиохемиската чистота по радиобележување со ^{177}Lu . За таа цел беа подготвени лиофилизирани китови базирани на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, при што како лиопротективна компонента беше употребена сахароза или трехалоза. По реконституција, китовите беа радиобележани со $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ под истите услови како претходно оптимизираното радиобележување, а радиохемиската чистота беше проценета со iTLC.

Добиените iTLC профили покажаа дека видот на дисахаридот во составот на лиофилизираната формулација не предизвикува изразено намалување на радиохемиската чистота на $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA. Кај двете лиофилизирани формулации, доминантниот дел од радиоактивноста беше задржан на стартната линија, што одговара на радиобележаниот имуноконјугат, додека присуството на слободен ^{177}Lu и нискомолекулски радиобележани видови беше минимално. Овие резултати укажуваат дека избраниот имуноконјугат ја задржува способноста за ефикасно радиобележување и по лиофилизација, независно од употребениот дисахарид како лиопротективна компонента.

Репрезентативните радиохроматограми од формулацијата F5 подготвена со сахароза и трехалоза се дадени на сликите 50 и 51.



Слика 50 iTLC профил на радиохемиска чистота на [^{177}Lu]Lu-даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA по радиобележување на лиофилизиран кит со сахароза
Figure 50 iTLC profile of radiochemical purity of [^{177}Lu]Lu-daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA after radiolabelling of the sucrose-containing freeze-dried kit



Слика 51 iTLC профил на радиохемиска чистота на [^{177}Lu]Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA по радиобележување на лиофилизиран кит со трехалоза
Figure 51 iTLC profile of radiochemical purity of [^{177}Lu]Lu-daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA after radiolabelling of the trehalose-containing freeze-dried kit

5.4.3.3 Определување на радиохемиска чистота со радио SE – HPLC/UV

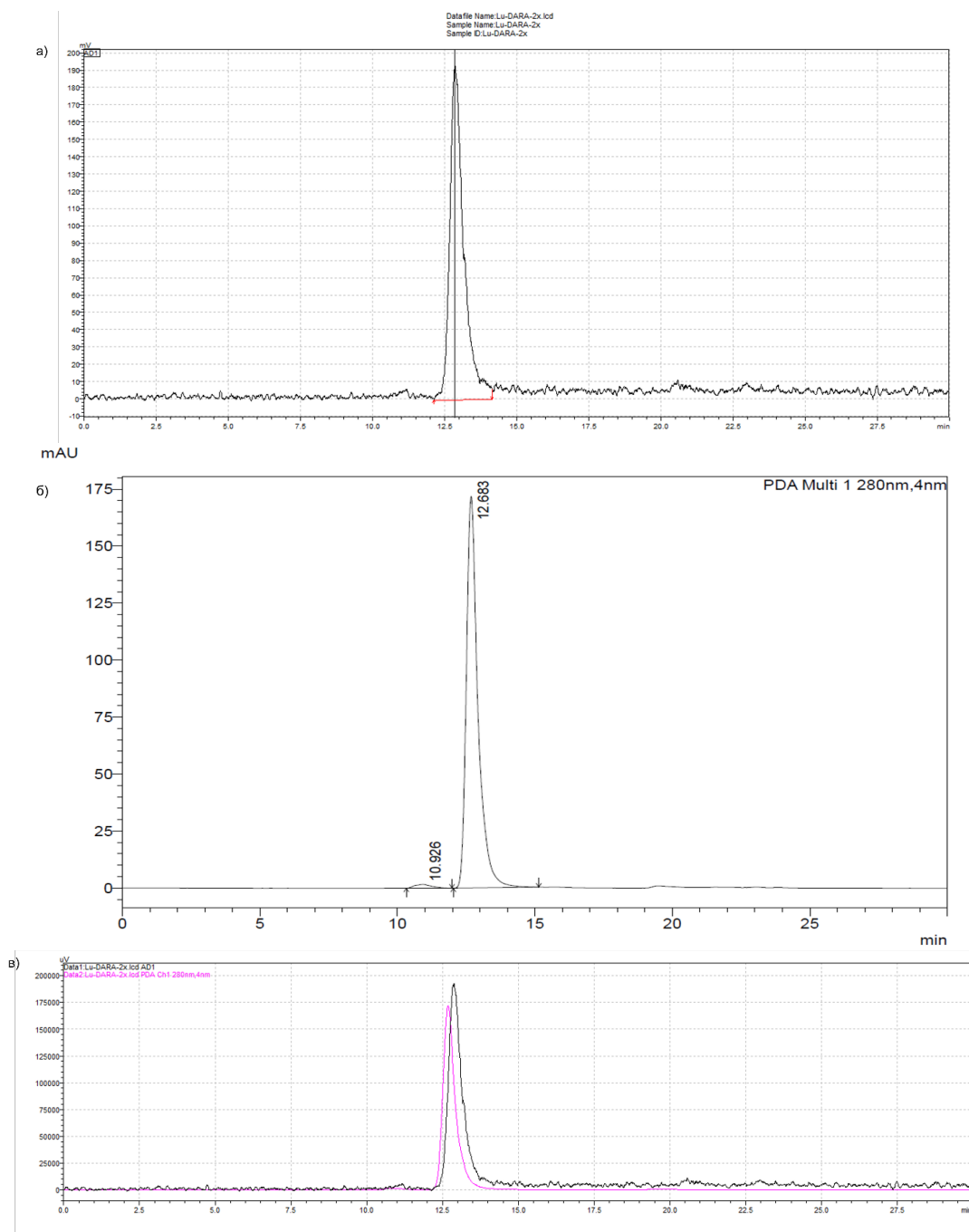
За потврдување и детално анализирање на радиохемиската чистота на радиоимуноконјугатот [^{177}Lu]Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, беше изведена анализа со радио SE-HPLC/UV. На слика 52 а) е прикажан радиохроматограмот добиен со радиодетекторот, на слика 52 б) е прикажан UV хроматограмот на истиот примерок и на слика 52 в) е прикажан преклопен хроматограм од двата детектори. На радиохроматограмот беше детектиран единствен, јасно изразен пик со ретенциско време 12,687 минута, кој соодветствуваше со ретенциското време на главниот пик со UV-сигналот добиен на 280 nm. Ова укажува дека целата додадена радиоактивност ефикасно е поврзана со имуноконјугатот, без да се забележуваат дополнителни радиоактивни пикови кои би укажувале на

присуство на слободен $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}^{3+}$, радиобележани агрегати, фрагменти или други радиохемиски онечистувања.

Во UV-хроматограмот се забележува пик пред главниот пик од имуноконјугатот, со ретенциско време околу 10,926 минута и содржина од 1,333 %, кој соодветствува на високомолекулските видови, односно агрегати. Сепак, во истиот регион на радиохроматограмот, не се детектира соодветен радиоактивен пик, што укажува дека овие молекулски видови детектирани со UV подрачјето, не се радиобележани со $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$.

Добиениот профил ја потврдува успешноста на реакцијата на радиобележување и формирање на стабилен $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA комплекс.

Доминантниот пик од радиоимуноконјугатот претставуваше 100 % од вкупната површина на радиоактивни пикови детектирани на радиохроматограмот.



Слика 52 Радиохемиска чистота на $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA: а) радиохроматограм; б) UV хроматограм на главниот пик; в) преклопени хроматограми добиени од радиодетекторот и DAD детекторот
Figure 52 Radiochemical purity of $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA: a) radiochromatogram; b) UV chromatogram of the main peak; c) overlay chromatograms obtained with the radioactivity detector and DAD detector

5.4.4 Определување на принос по радиобележување и радиохемиска чистота на радиоимуноконјугатот со ^{225}Ac

Имајќи предвид дека ^{177}Lu -даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA покажа најдобра стабилност меѓу испитуваните радиоимуноконјугати по обележување со ^{177}Lu , беше избран за испитување на неговата применливост за радиобележување со алфа емитери кои се користат како терапевтски радиометали, и за кои истиот хелатор е применлив.

Кај ^{225}Ac -даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA беше добиена радиохемиска чистота од 99,43 %. Високата почетна радиохемиска чистота укажува на успешно комплексирање на ^{225}Ac со хелаторот под применетите услови. Дополнителен чекор на прочистување, како и по обележувањето со ^{177}Lu , не беше потребен.

iTLC анализата покажа дека радиобележаниот ^{225}Ac -даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA остануваше на стартната линија, при $R_f = 0$, додека слободниот ^{225}Ac мигрираше со мобилната фаза кон повисоки R_f -вредности, во интервал од $R_f = 0,8-1,0$. Ова овозможи определување на радиохемиската чистота со применливиот iTLC систем и метод.

5.4.4.1 *In vitro* стабилност на радиоимуноконјугат со ^{225}Ac

Стабилноста на ^{225}Ac -даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA беше следена во период од 9 дена. При испитување на стабилноста на температура од 20-25 °C, радиохемиската чистота изнесуваше 98,28 % на првиот ден, 99,19 % на шестиот ден и 95,43 % на деветтиот ден (табела 18). Овие резултати покажуваат задржување на висока радиохемиска чистота во текот на испитуваниот период.

Табела 18 *In vitro* стабилност на ^{225}Ac -даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA на собна температура

Table 18 *In vitro* stability of ^{225}Ac -daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA at room temperature

Радиохемиска чистота на собна температура (%)		
Ден	^{225}Ac -даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-DOTA	Слободен ^{225}Ac
1	98,28	1,72
6	99,19	0,81
9	95,43	4,57

Во PBS (pH 7,0) радиокемиската чистота изнесуваше 97,46 % на првиот ден, 95,96 % на шестиот и 93,86 % на деветтиот ден (табела 19).

Табела 19 In vitro стабилност на [^{225}Ac]Ac-даратумумаб-p-SCN-Bn-DOTA во PBS пуфер

Table 19 In vitro stability of [^{225}Ac]Ac-daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA in PBS buffer

Радиокемиска чистота во PBS (%)		
Ден	[^{225}Ac]Ac-даратумумаб-p-SCN-Bn-DOTA	Слободен ^{225}Ac и други нискомолекулски радиоактивни видови
1	97,46	2,54
6	95,96	4,04
9	93,86	6,14

Во хуман серум беа добиени пониски вредности за радиокемиската чистота во споредба со вредностите определени во PBS и кај примероците на собна температура. Кај нецентрифугираните примероци, радиокемиската чистота изнесуваше 84,44% на првиот ден, 83,88% на шестиот и 80,93% на деветтиот ден. Во анализираниот супернатант по центрифугирањето, вредностите за радиокемиската чистота изнесуваа 86,80 % на првиот ден, 76,59 % на шестиот и 77,82 % на деветтиот ден (табела 20).

Табела 20 Стабилност на [^{225}Ac]Ac-даратумумаб-p-SCN-Bn-DOTA во серум

Table 20 Stability of [^{225}Ac]Ac-daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA in serum

Радиокемиска чистота во серум (%)				
Ден	Не центрифугиран примерок		Супернатант по центрифугирање	
	[^{225}Ac]Ac-даратумумаб-p-SCN-Bn-DOTA	Слободен ^{225}Ac	[^{225}Ac]Ac-даратумумаб-p-SCN-Bn-DOTA	Слободен ^{225}Ac
1	84,44	15,56	86,80	13,20
6	83,88	16,12	76,59	23,41
9	80,93	19,07	77,82	22,18

5.4.5 Определување принос по радиобележување и радиохемиска чистота на радиоимуноконјугатот со ^{161}Tb

За радиобележување со ^{161}Tb беше користен избраниот лиофилизиран имуноконјугат даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA, добиен со 30-пати моларен вишок на хелаторот.

Кај формулацијата на $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb}$ -даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA беше определна почетната радиохемиска чистота од 98,53 %, што укажува на ефикасно комплексирање на ^{161}Tb со хелаторот при применетите услови. Поради високата радиохемиска чистота, примерокот беше употребен за понатамошните испитувања без дополнително прочистување, како што беше случај и по радиобележувањето со ^{177}Lu и ^{225}Ac .

iTLC анализата покажа дека радиобележаниот $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb}$ -даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA остануваше на стартната линија, при $R_f = 0$, додека слободниот ^{161}Tb се детектираше во интервал од $R_f = 0,3-0,5$. Ова овозможи јасна проценка на радиохемиската чистота и уделот на слободен радиоактивен метал.

5.4.5.1 *In vitro* стабилност на радиоимуноконјугат со ^{161}Tb

Стабилноста на $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb}$ -даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA беше следена во период од 9 дена. При испитување на стабилноста на собна температура, радиохемиската чистота изнесуваше 98,05% на првиот ден, 96,46 % на шестиот ден и 94,52 % на деветтиот ден (табела 21).

Табела 21 *In vitro* стабилност на $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb}$ -даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA на собна температура

Table 21 *In vitro* stability of $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb}$ -daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA at room temperature

Радиохемиска чистота на собна температура (%)		
Ден	$[^{161}\text{Tb}]\text{Tb}$ -даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA	Слободен ^{161}Tb
1	98,05	1,95
6	96,46	3,54
9	94,52	5,48

Во PBS (pH 7,0) радиохемиската чистота изнесуваше 97,70% на првиот ден, 94,21 % на шестиот ден и 97,61 % на деветтиот ден (табела 22).

Табела 22 *In vitro* стабилност на [¹⁶¹Tb]Tb-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA во PBS
Table 22 *In vitro* stability of [¹⁶¹Tb]Tb-daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA in PBS buffer

Радиокемиска чистота во PBS (%)		
Ден	[¹⁶¹ Tb]Tb-даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-DOTA	Слободен ¹⁶¹ Tb
1	97,70	2,30
6	94,21	5,79
9	97,61	2,39

Во хуман серум радиокемиската чистота беше пониска во споредба со стабилноста определена во PBS пуфер и при определување на собна температура. Радиокемиската чистота изнесуваше 88,91% на првиот ден, 83,88 % на шестиот ден и 88,68 % на деветтиот ден (табела 23).

Табела 23 *In vitro* стабилност на [¹⁶¹Tb]Tb-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA во хуман серум

Table 23 *In vitro* stability of [¹⁶¹Tb]Tb-daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA in human serum

Радиокемиска чистота во хуман серум (%)		
Ден	[¹⁶¹ Tb]Tb-даратумумаб- <i>p</i> -SCN-Bn-DOTA	Слободен ¹⁶¹ Tb
1	88,91	11,09
6	83,88	16,12
9	88,68	11,32

Варијациите меѓу шестиот и деветтиот ден не покажуваат јасен временски тренд и треба да се интерпретираат земајќи ја предвид варијабилноста на применетиот аналитички метод или случајна грешка.

5.5 Стабилност на лиофилизирана формулација на имуноконјугатот

Стабилноста на лиофилизираната кит формулација на имуноконјугатот даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA беше оценета преку следење на критичните параметри на квалитет во рамките на забрзаната и долготрајната студија на стабилност. Дополнително беше применет ASAP пристапот со употреба на ASAPprime® софтвер за предвидување на стабилност и рокот на траење. Во

студиите на стабилност беа применети нерадиоактивни тестови, вклучувајќи мерење на рН-вредност, хроматографија (SE-HPLC), електрофореза (редуцирачка и нередуцирачка SDS-PAGE) и спектроскопија (UV/Vis, FTIR и Раманска спектроскопија).

Како клучен показател за стабилноста на лиофилизираниот имуноконјугат беше оценета способноста за обележување со радионуклидот ^{177}Lu , преку определување на радиохемиската чистота на добиениот радиоимуноконјугат со iTLC.

Сите применети методи беа изведени согласно претходно опишаните постапки користени при развојот на имуноконјугатот и неговата физичко – хемиска карактеризација.

5.5.1 Забрзана студија на стабилност

Забрзаната студија на стабилност беше дизајнирана со анализа на примероците во почетната временска точка (T0), како и по 3 (T3) и 6 (T6) месеци чување на $25 \pm 2^\circ\text{C}$ / $60 \pm 5\%$ RH. Добиените резултати се прикажани во табела 24, а резултатите од репрезентативните SE-HPLC, iTLC, Раман и FTIR анализи се прикажани на сликите 53–56. Поради неисполнување на критериумот за радиохемиска чистота во T3, анализите во T6 не беа спроведени.

Во рамките на забрзаната студија на стабилност, најголем дел од испитуваните параметри останаа во рамките на претходно дефинираните критериуми за прифатливост во точка T3. Концентрацијата на имуноконјугатот остана во прифатливиот опсег, и изнесуваше 1,00 mg/mL во T0 и 1,06 mg/mL во T3. рН-вредноста по реконституција остана исто така стабилна, со вредности 6,92 и 6,95 во двете временски точки, соодветно.

SE-HPLC анализата покажа мало намалување на содржината на главниот мономер, од 98,31 % во T0 на 96,73 % во T3, но сепак во дефинираниот критериум од $\geq 95,0\%$. Истовремено, беше забележано мало зголемување на агрегатите од 1,69 % на 1,90 % и на фрагментите од 1,20 % на 1,38 %, без надминување на критериумот за вкупни SE-HPLC онечистувања. Вкупните SE-HPLC онечистувања останаа под дефинираниот критериум од $\leq 5,0\%$, што укажува дека во оваа временска точка не беше забележана изразена агрегација или фрагментација на имуноконјугатот.

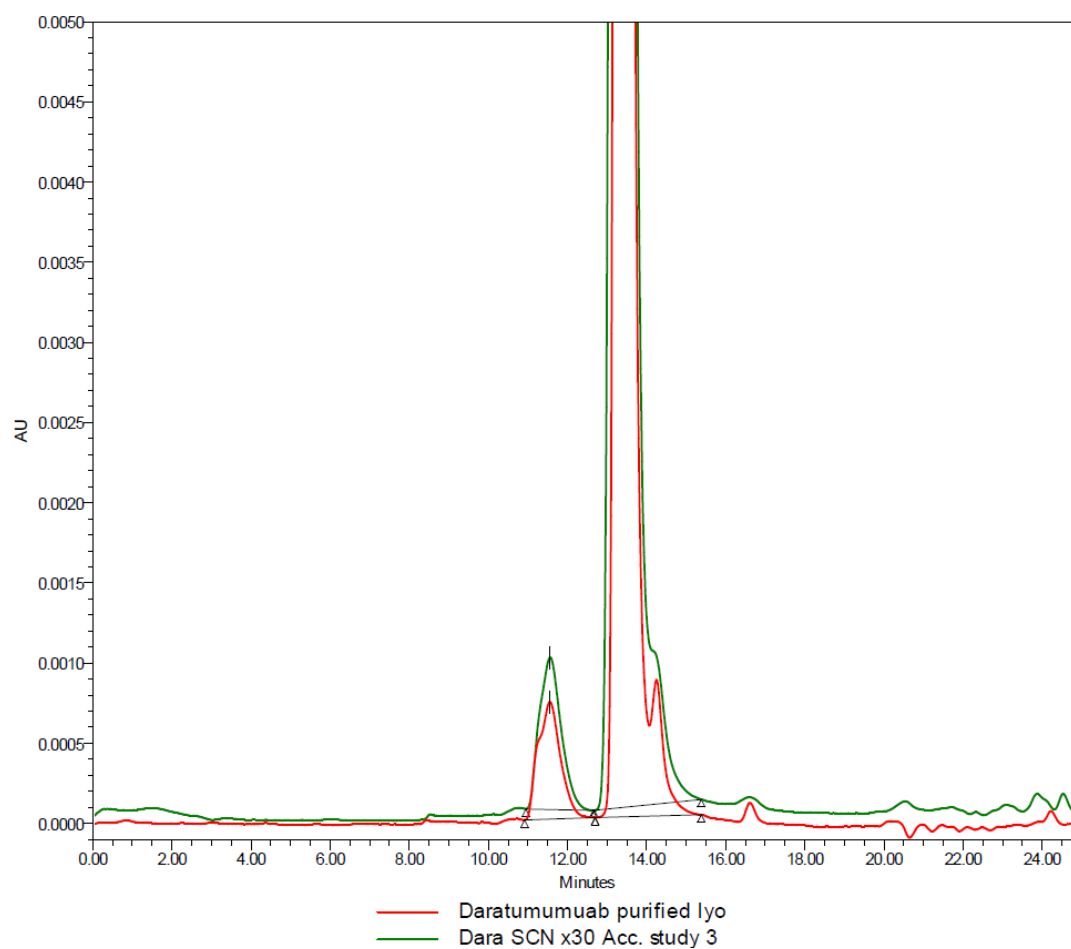
Електрофоретскиот профил, како и Раманските и FTIR спектроскопските профили, останаа споредливи со почетниот примерок, споредбата на карактеристичните амидни региони, особено амид I/ II кај FTIR спектрите и амид I/III кај Раманските спектри. Овие резултати укажуваат дека во анализираниот период не беа детектирани изразени промени во електрофоретскиот или спектроскопскиот профил на лиофилизираниот имуноконјугат.

Сепак, радиокемиската чистота по радиобележување со ^{177}Lu се намали од 100,00 % во T0 на 95,22 % по 3 месеци чување, со што не беше исполнет претходно дефинираниот критериум за прифатливост од $\geq 98,0$ %. Со оглед на тоа што способноста за успешно радиобележување претставува критичен параметар за применливоста на лиофилизираниот имуноконјугат како прекурсор за радиофармацевтски препарат, забележаното намалување беше оценето како значајно отстапување.

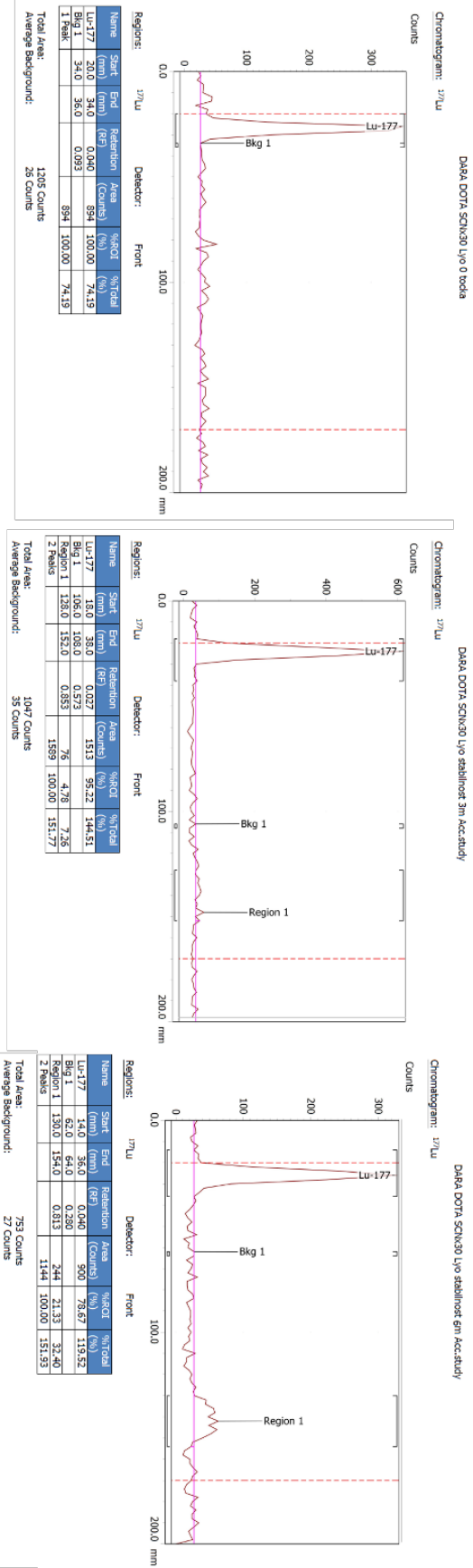
Поради ова, забрзаната студија на стабилност не беше завршена до крај и не беше користена како основа за дефинирање на рокот на употреба.

Табела 24 Резултати од забрзаната студија на стабилност
Table 24 Results of the accelerated stability study

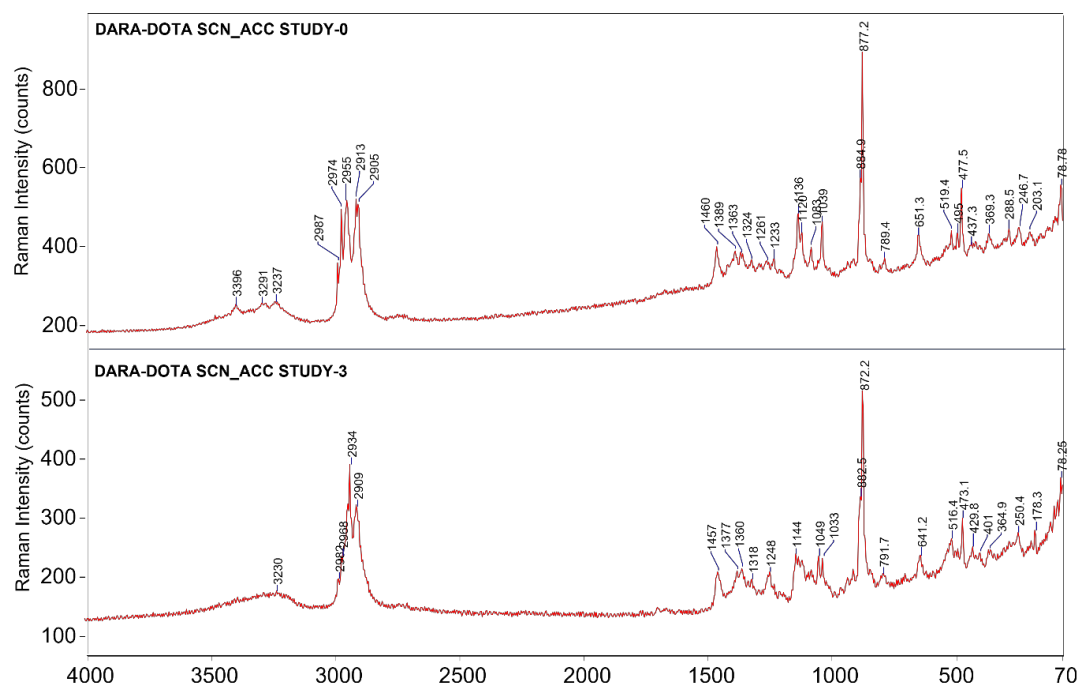
Тест за карактеризација	Метод	T0	T3	T6
Концентрација на имуноконјугат (mg/mL)	Спектрофотометриски	1,00	1,06	/
pH	pH метар	6,92	6,95	/
Профил на чистота (%)	SE-HPLC			
	Главен мономер	98,31	96,73	/
	Агрегат	1,69	1,90	/
	Фрагмент	1,20	1,38	/
Електрофоретски профил	Редуцирачка SDS PAGE	одговара	-	/
	Нередуцирачка SDS PAGE	одговара	-	/
Спектроскопски профил	PAMAN	одговара	одговара	/
	FTIR	одговара	одговара	/
Радиокемиска чистота (%)	iTLC	100,00	95,22	/



Слика 53 Преклопени SE-HPLC хроматограми на лиофилизираниот даратумумаб-р-SCN-DOTA при T0 и T3 во забрзаната студија на стабилност
Figure 53 Overlay SE-HPLC chromatograms of the freeze-dried daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA at T0 and T3 during the accelerated stability study

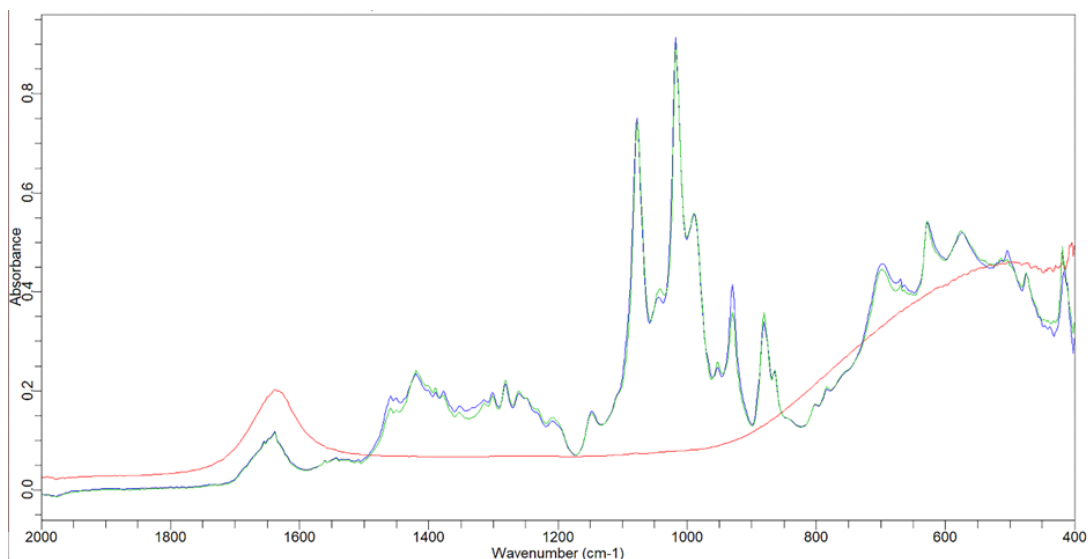


Слика 54 Споредбени iTLC радиохроматограми на радиоимуноконјугатот $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -даратумумаб-p-SCN-Bn-DOTA при T0, T3 и T6 во забрзана студија на стабилност during the accelerated stability study



Слика 55 Споредбени Рамански спектри на лиофилизираниот даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA при T0 и T3 во забрзаната студија на стабилност

Figure 55 Comparative Raman spectra of the freeze-dried daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA at T0 and T3 during the accelerated stability study



Слика 56 Споредбени FTIR спектри на лиофилизираниот даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA при T0 и T3 во забрзана студија на стабилност

Figure 56 Comparative FTIR spectra of the freeze-dried daratumumab-*p*-SCN-Bn-DOTA at T0 and T3 during the accelerated stability study

5.5.2 Долготрајна студија на стабилност

Долготрајната студија на стабилност беше спроведена со цел да се процени периодот во кој се зачувани критичните параметри за квалитет на лиофилизираната формулација од даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA на температура од $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, како и да се дефинира рокот на употреба. Анализата беше извршена во претходно утврдени временски точки во текот на 12 месеци, односно во T0, T3, T6, T9 и T12, со избрани параметри. Стабилноста на примероците беше оценета преку следење на истите параметри како и за забрзаната студија, со земање на SE-HPLC и iTLC беа земени како критични параметри за квалитет и клучни показатели за стабилноста и функционалната применливост на формулацијата. Резултатите се прикажани во табела 25, а издвоени се и резултати од репрезентативните SE-HPLC и iTLC анализи се дадени на сликите 57–59.

Во текот на долготрајната студија, главниот мономерен пик остана доминантен во SE-HPLC профилот на лиофилизираниот имуноконјугат. По три месеци, содржината на главниот мономер се намали од почетните 98,31 % на 96,73 %, додека во T6 и T9 изнесуваше 98,05 % и 98,37 %, соодветно. Во последната

точка (T12), содржината се задржа на 98,38 %. Добиените вредности покажаа дека содржината на главниот мономер не се менува значајно и се задржува во рамките на критериумот на прифатливост.

Електрофоретскиот профил остана споредлив со почетниот примерок, без појава на дополнителни изразени ленти.

Структурниот интегритет на лиофилизираниот имуноконјугат беше следен со FTIR и Раман спектроскопија. Кај FTIR спектрите беа споредувани амид I/II регионите, додека кај Раман спектрите беа следени амид I/III регионите. Спектрите по долготрајно чување беа споредливи со почетниот примерок, без релевантни поместувања или појава на нови асигнации.

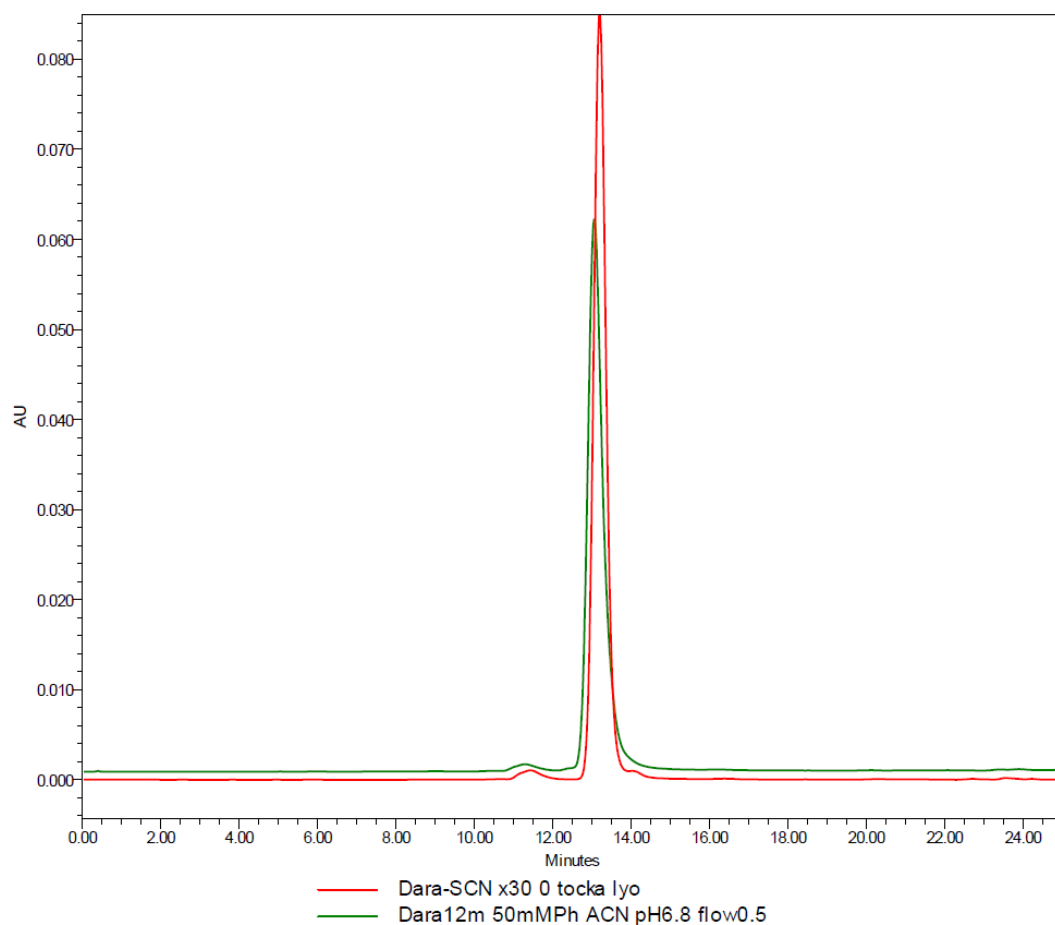
Радиокемиската чистота по обележувањето со радионуклидот ^{177}Lu беше следена како критичен параметар за проценка на применливоста на лиофилизираниот имуноконјугат. Радиокемиската чистота остана во рамките на критериумот за прифатливост до T12, при што не беше забележано намалување под дефинираниот критериум во текот на целата студија.

Според досега прикажаното, лиофилизираната формулација на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA покажа соодветна стабилност при чување на температура од $5 \pm 3^\circ\text{C}$ до 12 месеци, што ја поддржува нејзината применливост како прекурсор за подготовка на радиофармацевтик во тој период. Исто така, овој временски период се поклопува и со рокот на чување на самото не модифицирано антителио.

Согласно добиените резултати, рокот на употреба на лиофилизираната формулација може да се дефинира до 12 месеци при услови на чување од $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

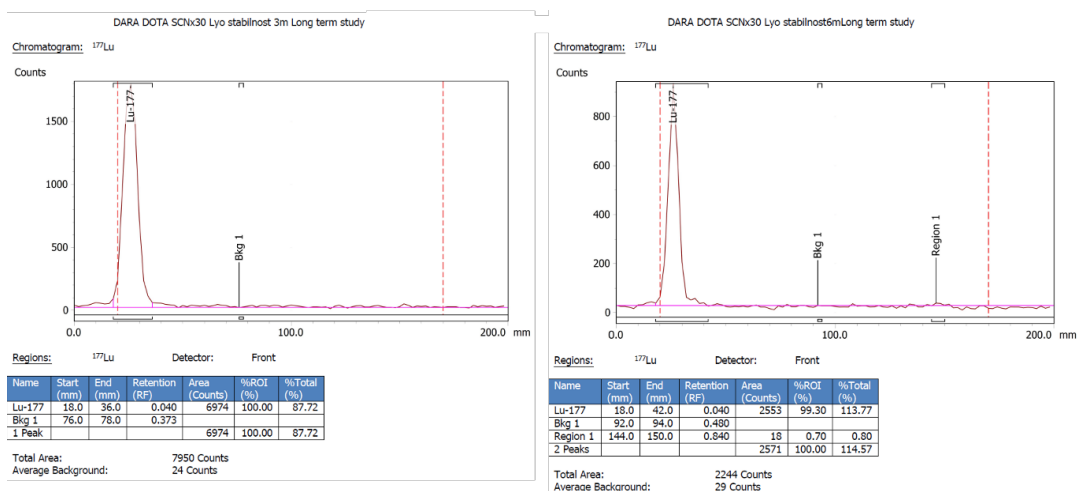
Табела 25 Резултати од долготрајната студија на стабилност
Table 25 Results of the long-term stability study

Параметар	Метод	T0	T3	T6	T9	T12
Концентрација на имуноконјугат (mg/mL)	Спектроскопски	1,00	-	1,06	-	1,03
	pH метар	6,95	-	7,21	-	7,25
SE HPLC						
Профил на чистота (%)	Главен мономер	98,31	96,73	98,05	98,37	98,38
	Агрегат (HMWS)	1,69	1,92	1,70	1,63	1,62
	Фрагмент (LMWS)	1,20	1,38	1,45	1,20	1,20
Електрофоретски профил	Редуцирачка SDS PAGE	одговара	/	одговара	-	одговара
	Нередуцирачка SDS PAGE	одговара	/	одговара	-	одговара
Спектроскопски профил	РАМАН	одговара	одговара	-	-	одговара
	FTIR	одговара	одговара	-	-	одговара
Радиохемииска чистота (%)	ITLC	100,00	100,00	99,30	99,50	98,35



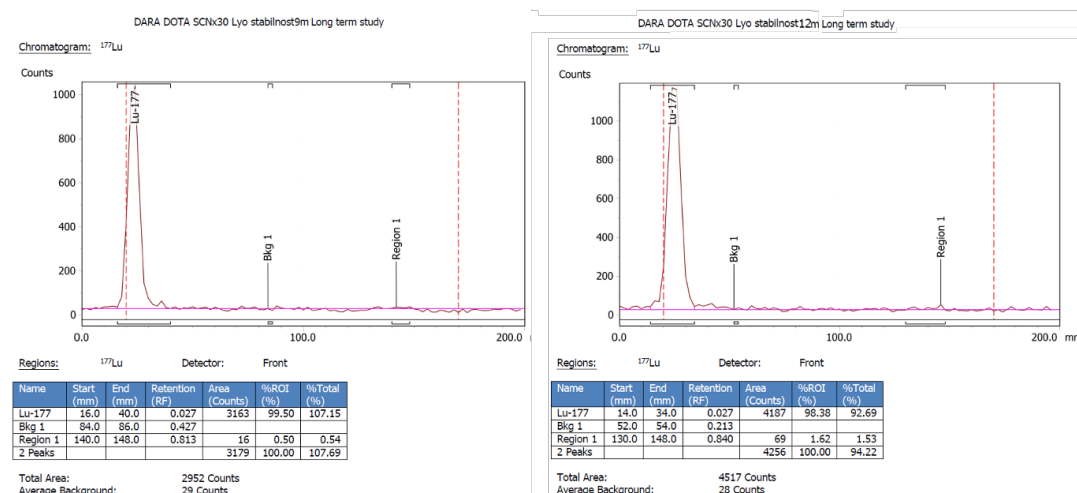
Слика 57 Преклопени SE-HPLC хроматограми на лиофилизиран даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA при T0 и T12 во долготрајната студија на стабилност

Figure 57 Overlay SE-HPLC chromatograms of the freeze-dried daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA immunoconjugate at T0 and T12 during the long-term stability study



Слика 58 а) Споредбени iTLC радиохроматограми на радиоимуноконјугатот radiolabeled [¹⁷⁷Lu]Lu-даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA при T3 и T6 во долготрајната студија на стабилност

Figure 58 a) Comparative iTLC radiochromatograms of the radioimmunoconjugate radiolabeled [¹⁷⁷Lu]Lu-daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA at T3 и T6 during the long-term stability study



Слика 59 б) Споредбени iTLC радиохроматограми на радиоимуноконјугатот radiolabeled [¹⁷⁷Lu]Lu-даратумумаб-р-SCN-Bn-DOTA при T9 и T12 во долготрајната студија на стабилност

Figure 59 b) Comparative iTLC radiochromatograms of the radioimmunoconjugate radiolabeled [¹⁷⁷Lu]Lu-daratumumab-p-SCN-Bn-DOTA at T9 и T12 during the long-term stability study

5.5.3 Предиктивна проценка на стабилноста и рокот на употреба со помош на софтвер

ASAP студијата беше спроведена со цел да се процени чувствителноста на лиофилизираниот имуноконјугат даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA кон забрзана деградација при различни температурни услови и релативна влажност. Стабилноста беше следена преку промените на SE-HPLC профилот, односно преку чистотата на формулацијата на имуноконјугатот. Конкретно, се следеше содржината на главниот мономер од имуноконјугатот и пиковите од присутните агрегати (HMWS) и/или фрагменти (LMWS 1,2,3,4). Добиените резултати се претставени во табела 26.

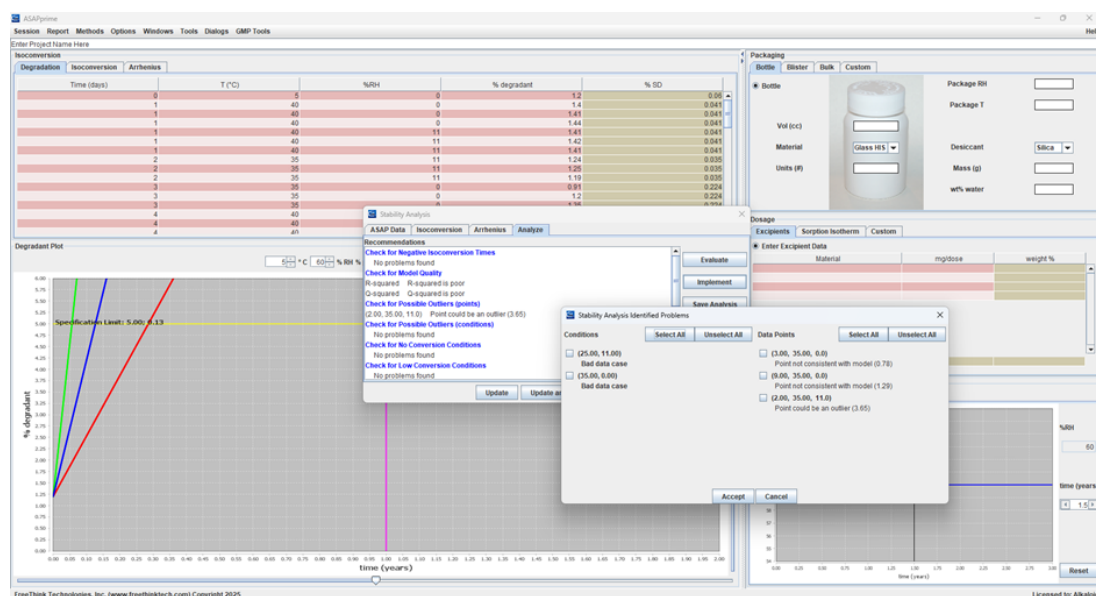
Во текот на испитувањето беше забележано постепено намалување на главниот мономерен пик и зголемување на вкупните онечистувања, особено на фрагментите, додека агрегатите останаа релативно ниски и не покажаа изразен пораст. При 25 °C и 30 °C намалувањето на главниот пик беше постепено, додека на повисоките температури, особено при 35 °C и 40 °C, деградацијата беше поизразена и се јавуваше во пократок временски период.

Според поставениот критериум за прифатливост, односно најмногу 5 % загуба од почетниот процент на главниот пик, не повеќе од 5 % агрегати, не повеќе од 2 % фрагменти и вкупни онечистувања до 5 %, дел од примероците изложени на подолги временски интервали и повисоки температури го надминаа критериумот. Надминувањето главно се должеше на зголемување на фрагментите и вкупните онечистувања, додека агрегатите останаа во рамките на поставениот лимит.

При софтверската евалуација, како проблематични беа означени условите 25 °C/11 % RH и 35 °C/0 % RH, класифицирани како „bad data case“. Дополнително, точките на третиот и деветтиот ден при 35 °C/0 % RH беа означени како неконзистентни со моделот, додека точката на вториот ден при 35 °C/11 % RH беше означена како можен outlier (слика 60 и 61).

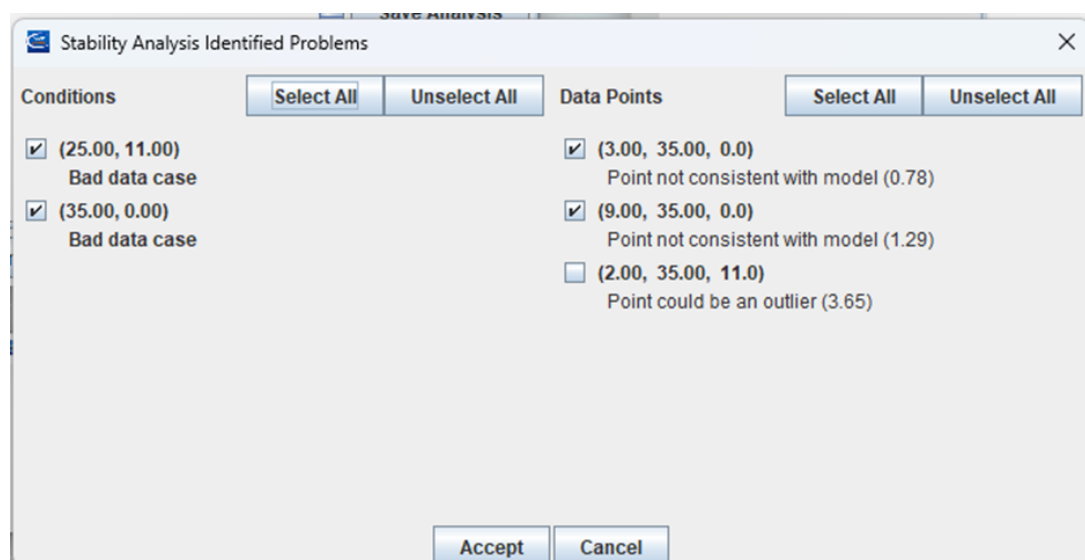
Табела 26 Резултати од ASAP студијата на стабилност
Table 26 Results of the ASAP stability study

Протокол	Ден	Главен пик		Агрегат		Фрагмент		Вкупни онечистувања
Почеток	0	Површина под пик	%	Површина под пик	%	Површина под пик	%	%
		1911638	97.11	33185	1.69	23688	1.20	2.89
25°C/ 0% RH	14	1620615	94.78	29087	1.70	60108	3.51	5.22
	21	1581597	93.41	29264	1.73	82388	4.86	6.59
	30	1576137	91.98	31382	1.83	106001	6.19	8.02
25°C/ 11% RH	10	1602256	95.84	41938	2.51	27610	1.65	4.16
	18	1580594	92.38	29758	1.74	100626	5.88	7.62
	30	1566040	91.86	30433	1.79	108420	6.36	8.14
30°C/ 0% RH	7	1687666	96.30	28655	1.64	36224	2.07	3.70
	14	1582161	94.02	30116	1.79	70523	4.19	5.98
	30	1567808	92.27	31887	1.88	99487	5.85	7.73
30°C/ 11% RH	5	1591365	96.26	27110	1.64	34739	2.10	3.74
	12	1550171	94.63	39728	2.43	48192	2.94	5.37
	30	1628190	92.39	30667	1.74	103405	5.87	7.61
35°C/ 0% RH	3	1662407	97.16	28851	1.69	19751	1.15	2.84
	9	1702927	96.20	29862	1.69	37487	2.12	3.80
	28	1531339	90.69	32127	1.90	125151	7.41	9.31
35°C/ 11% RH	2	1750430	97.31	26396	1.47	22063	1.23	2.69
	7	1644923	95.75	29697	1.73	43311	2.52	4.25
	20	1508287	91.78	32575	1.98	102545	6.24	8.22
40°C/ 0% RH	1	1725756	96.65	34573	1.94	25273	1.42	3.35
	4	1582823	95.98	29668	1.80	36545	2.22	4.02
	13	1555502	92.35	33318	1.98	95750	5.67	7.65
40°C/ 11% RH	1	1746006	96.68	34435	1.91	25531	1.41	3.32
	10	1459432	93.84	43661	2.81	52184	3.35	6.16



Слика 60 Софтверски приказ на идентификуваните проблематични услови и точки на отстапувања во ASAP анализата

Figure 60 Software display of the identified problematic conditions and deviating data points in the ASAP analysis

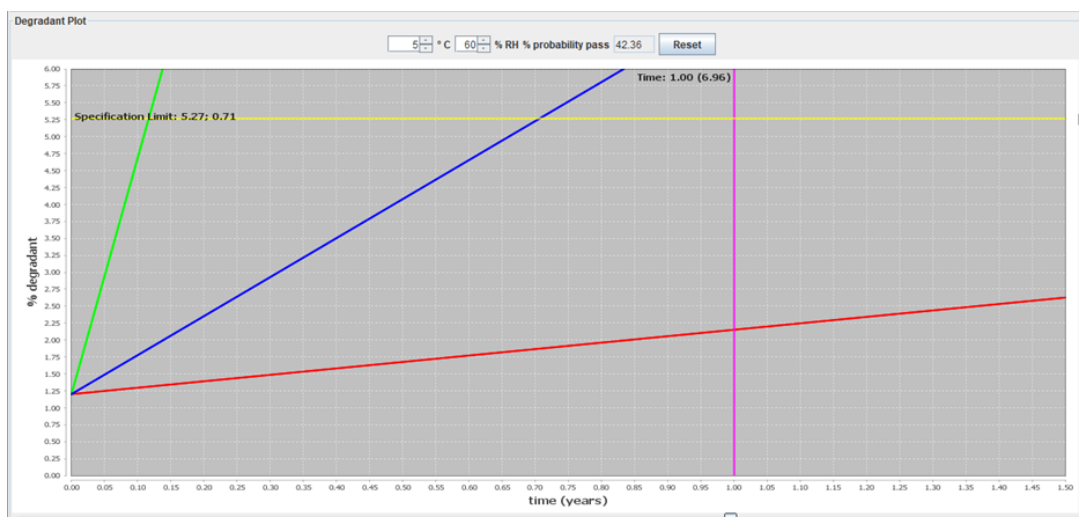


Слика 61 Зголемен софтверски приказ на идентификуваните точки на отстапување во ASAP анализата

Figure 61 Enlarged software view of the identified deviating data points in the ASAP analysis

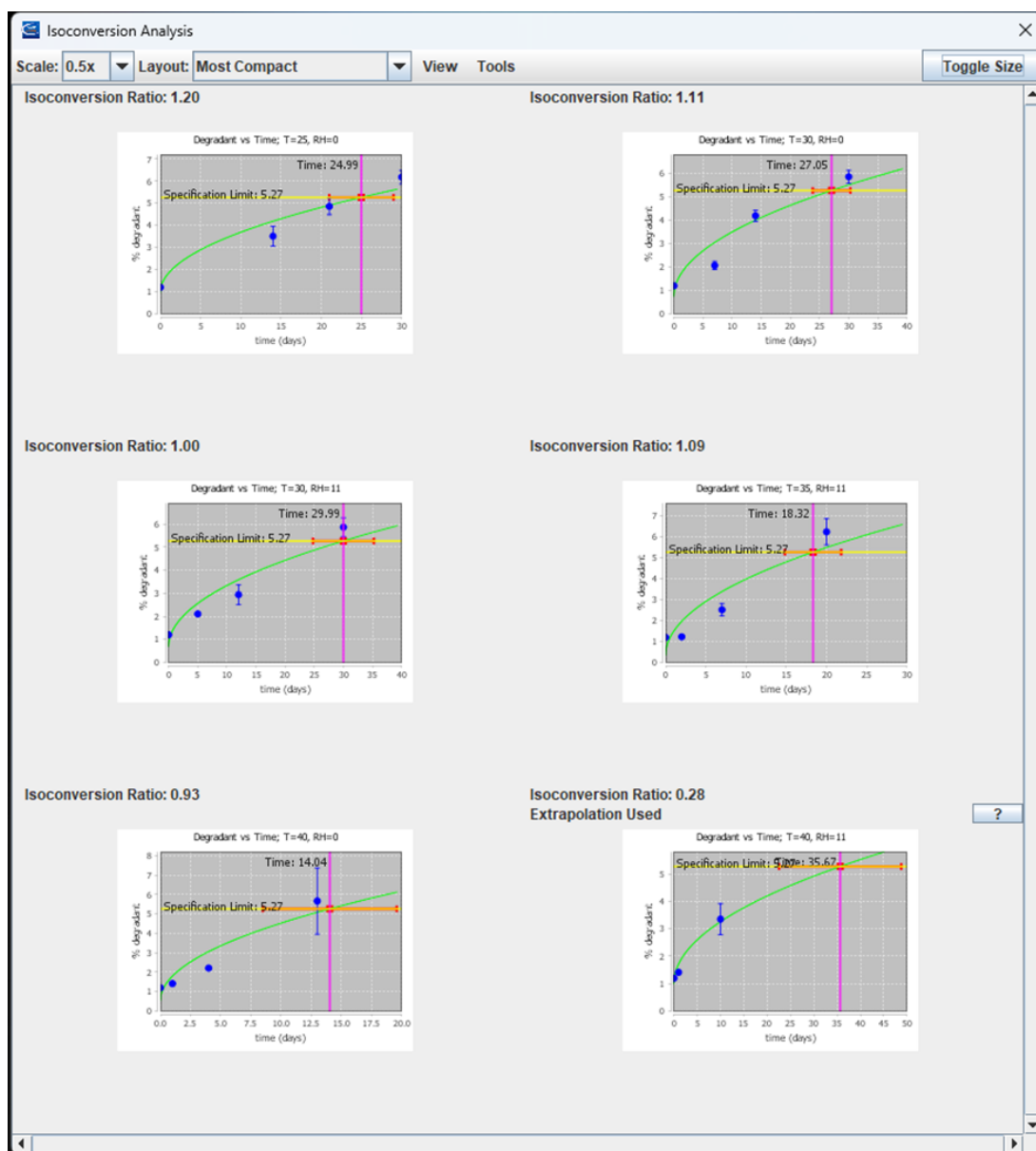
Предвиденото време до достигнување на лимитот беше околу 0,65–0,71 година, што пресметано изнесува приближно 8 месеци. Овој резултат треба да се толкува како предиктивна и конзервативна проценка, а не како конечен рок на употреба, особено затоа што моделот идентификуваше повеќе отстапувања и имаше ограничена усогласеност на дел од експерименталните точки.

Затоа, ASAP резултатите укажуваат на потенцијален ризик од деградација при продолжено чување и ја нагласуваат потребата рокот на употреба да се потврди со долготрајната студија на стабилност при реални услови на складирање. Во оваа фаза, ASAP анализата може да се користи како поддршка за проценка на деградацискиот тренд, но не како самостојна основа за дефинирање на финален рок на употреба.



Слика 62 Софтверски приказ на предвиденото време до достигнување на спецификацискиот лимит во ASAP анализата

Figure 62 Software display of the predicted time to reach the specification limit in the ASAP analysis



Слика 63 Изоконверзиска анализа на ASAP податоците со приказ на времето до достигнување на спецификацискиот лимит

Figure 63 Isoconversion analysis of the ASAP data showing the time to reach the specification limit

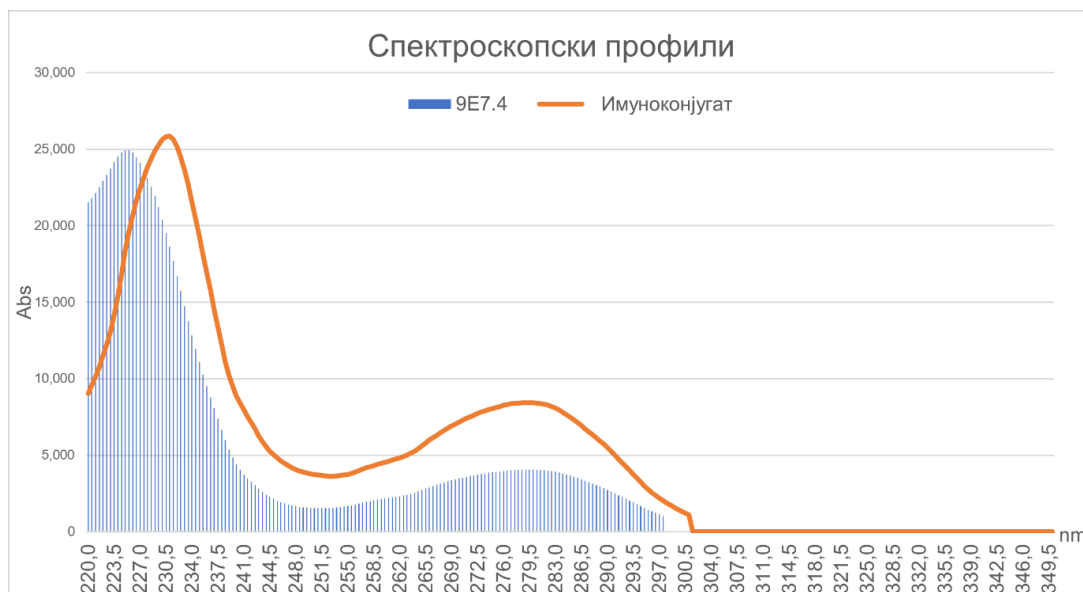
II. МОНОКЛОНАЛНО АНТИТЕЛО 9E7.4

5.6 UV/Vis спектроскопска карактеризација и определување на концентрацијата

Со помош на UV/Vis спектроскопијата добиени се спектроскопските профили на немодифицираното антитело 9E7.4 и добиениот имуноконјугат прикажани на слика 64. Кај двата примероци се забележува карактеристичен апсорпциски профил со изразена апсорпција во регионот околу 280 nm. Овој сигнал беше искористен како основа за нивна квантификација и определување на концентрацијата.

Спектарот на немодифицираното антитело 9E7.4 покажа понизок интензитет на апсорпција во споредба со имуноконјугатот, што е во согласност со разликата во концентрацијата на примероците пред и по постапката на концентрирање, конкретно концентрацијата на антителото пред конјугација беше приспособена на приближно 4 mg/mL, што овозможи негово понатамошно користење за подготовка на имуноконјугати. Кај имуноконјугатот се забележува повисока апсорпција во целиот испитуван UV регион, особено во областа од 220 до 240 nm, како и јасно изразен сигнал околу 280 nm.

Определувањето на точната концентрација беше изведено директно на 280 nm, со користење на NanoDrop One Viewer софтверот со вграден масен екстинциски коефициент. По прочистување и концентрирање, добиените имуноконјугати имаа концентрација од приближно 6 mg/mL, што беше соодветно за нивна понатамошна примена во постапката на радиобележување. Овие резултати покажуваат дека применетиот спектрофотометриски метод е соодветен за брза проценка на концентрацијата на антителото и имуноконјугатот во мали волумени на примерок.



Слика 64 Споредбен спектроскопски профил на антитело 9E7.4 и неговиот имуноконјугат

Figure 64 Comparative spectroscopic profile of the 9E7.4 antibody and its immunoconjugate

5.6.1 Стабилност на простетична група

Поради подложноста на хидролиза, беше определена стабилноста на простетичната група во боратниот пуфер користен за конјугација, при различни рН вредности, а добиените резултати се прикажани на табела 27 и слика 65. При тоа, резултатите се изразени како процент на нехидролизирана естерска форма во однос на вкупната вредност на содржината на естерската форма и хидролизниот продукт. Добиените резултати покажаа изразена рН-зависна хидролиза на простетичната група. Најголема стабилност беше забележана при рН 7,5, каде по 180 минути, процентот на нехидролизирана форма изнесуваше 54,75 %, што укажува дека при оваа рН-вредност естерската група останува релативно стабилна во временскиот интервал предвиден за конјугација.

При рН 8,0 беше забележано побрзо намалување на естерската форма. По 60 минути останаа 50,34 % од естерската форма, додека по 180 минути беа присутни само 7,83 % од нехидролизираната естерска форма, што покажува дека зголемувањето на рН-вредноста значително ја забрзува хидролизата. Овој ефект беше уште поизразен при рН 8,5, каде по 120 минути естерската форма

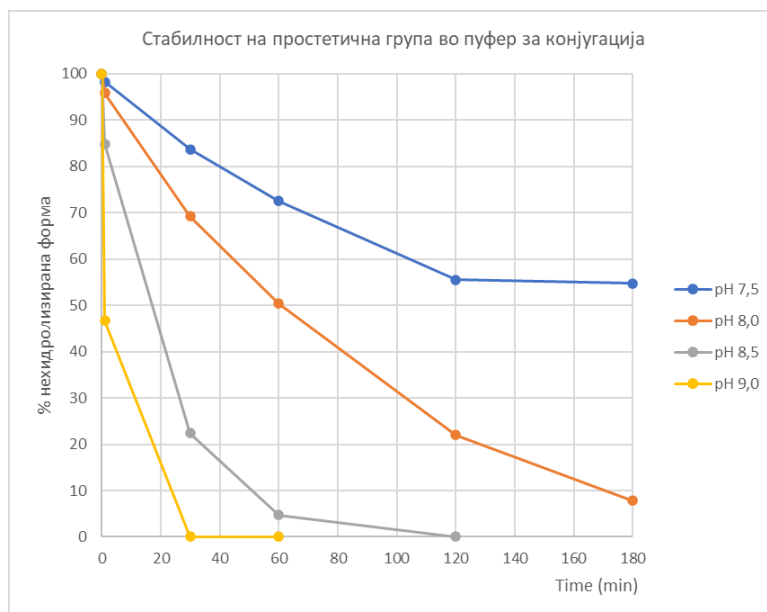
целосно беше хидролизирана. Најбрза хидролиза беше забележана при pH 9,0, каде уште по 1 минута процентот на естерската форма се намали на 46,67 %, а по 30 мин беше целосно хидролизирана.

Од испитуваните услови, pH 7,5 се покажа како најповолна вредност за зачувување на активната естерска форма во текот на конјугацијата, додека pH 8,5 и pH 9,0 не се соодветни за подолга реакција поради брза и речиси целосна хидролиза на простетичната група.

Табела 27 Стабилност на простетичната група во боратен пуфер со различна pH-вредност

Table 27 Stability of the prosthetic group in borate buffer at different pH values

Временска точка (min)	AUC	%	AUC	%	AUC
	Естер		Борон бензоева киселина		Вкупно
	RT ~ 8,5 min		RT ~ 6,5 min		
pH 7.5					
0	8699604	100			
1	11044020	98.25	196210	1.75	11240230
30	9000629	83.72	1750448	16.28	10751077
60	7397021	72.52	2802258	27.48	10199279
120	5644813	55.51	4524019	44.49	10168832
180	5248316	54.75	4337564	45.25	9585880
pH 8.0					
0	8699604	100			
1	10539368	95.80	462630.00	4.20	11001998
30	7166299	69.21	3187741.00	30.79	10354040
60	4877717	50.34	4811698.00	49.66	9689415
120	2056766	22.01	7289767.00	77.99	9346533
180	671856	7.83	7906599.00	92.17	8578455
pH 8.5					
0	8699604	100			
1	9178103	84.84	1639844	15.16	10817947
30	2106610	22.43	7286969	77.57	9393579
60	391894	4.74	7884583	95.26	8276477
120	0	0.00	8389667	100.00	8389667
pH 9.0					
0	8699604	100			
1	4796631	46.67	5480863	53.33	10277494
30	0	0.00	9157460	100.00	9157460
60	0	0.00	9224774	100.00	9224774



Слика 65 Графички приказ на стабилност на простетичната група во боратен пуфер со различна pH-вредност

Figure 65 Graphical representation of the prosthetic group stability in borate buffer at different pH values

5.7 Хроматографска проценка на интегритетот на антителото и имуноконјугатите

Почетната карактеризација со споредба на немодифицираното антитело со имуноконјугатите означени со A, B, C и D, соодветно на различната pH користена за конјугација, покажа споредлив хроматографски профил, што беше потврдено со хроматографската анализа.

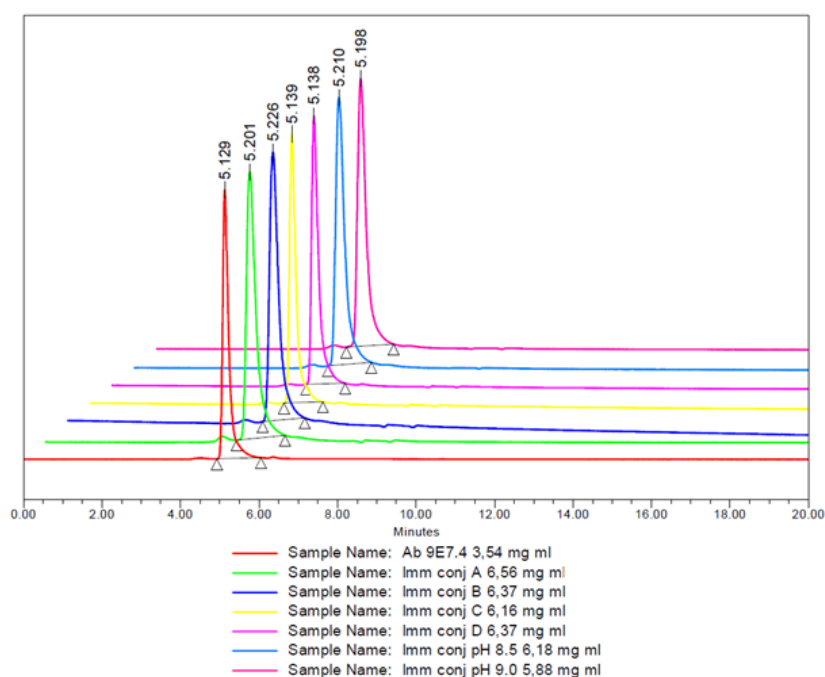
Кај сите анализирани примероци беше детектиран еден доминантен хроматографски пик од главниот мономер, што изнесува 100,00 % (табела 28). Ова укажува дека во интегрираниот профил не се детектирани дополнителни пикови кои би укажале на присуство на агрегати или фрагменти. Немодифицираното антитело покажа ретенционо време од 5,129 минути, додека имуноконјугатите имаа блиски ретенциони времиња во опсег од 5,138 до 5,226 минути. Малите разлики во ретенционото време по конјугација може да се поврзат со структурната модификација на антителото со простетичната група, но без појава на дополнителни хроматографски пикови. Овие резултати

покажуваат дека процесот на конјугација не довел до значајна промена во хроматографскиот профил на антителото и дека добиените имуноконјугати се со зачуван интегритет и соодветна чистота за понатамошно радиобележување.

Табела 28 Хроматографски параметри на немодифицираното антитело и добиените имуноконјугати подготвени при различни pH-вредности

Table 28 Chromatographic parameters of the unmodified antibody and immunoconjugates prepared at different pH values

Примерок	pH на подготовка	RT на главен пик (min)	Area (AU)	% Area
9E7.4	/	5,129	984055	100,00
Имуноконјугат А	7,5	5,201	841390	100,00
Имуноконјугат В	8,0	5,226	726882	100,00
Имуноконјугат С	8,5	5,139	849804	100,00
Имуноконјугат D	9,0	5,138	828251	100,00

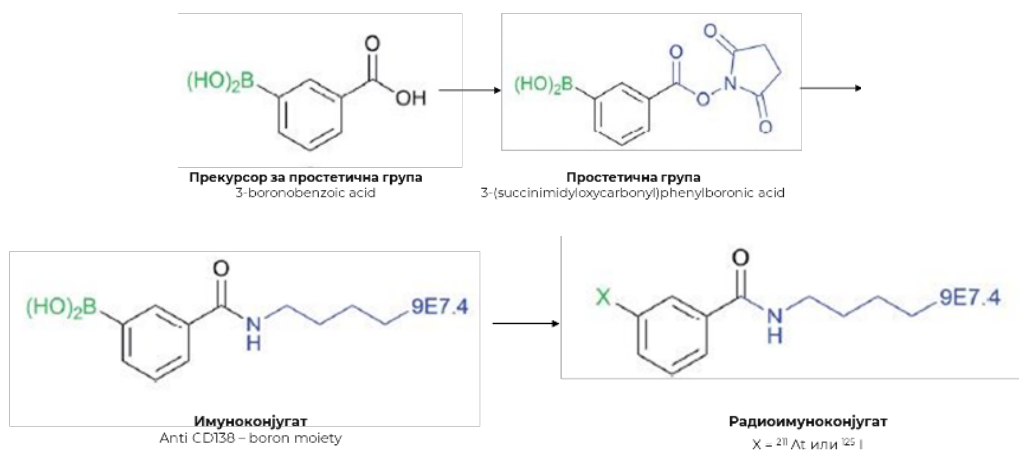


Слика 66 Преклопени SE-UPLC хроматограми на немодифицираното антитело и имуноконјугатите подготвени при различни pH-вредности

Figure 66 Overlay SE-UPLC chromatograms of the unmodified antibody and immunoconjugates prepared at different pH values

5.8 Конјугација на антитело 9E7.4 со простетична група

Конјугацијата на антителото 9E7.4 со простетичната група се одвиваше според реакцијата прикажана на слика 67. Активираниот NHS-естер на простетичната група реагира со достапните примарни аминогрупи на антителото, при што се формира нова амидна врска и се ослободува N-хидроксисукцинимид. На овој начин во структурата на антителото се воведува арилборна група, која понатаму овозможува замена со радиоактивни халогени, односно со астатин-211 или со јод-125 (Berdal, 2012).



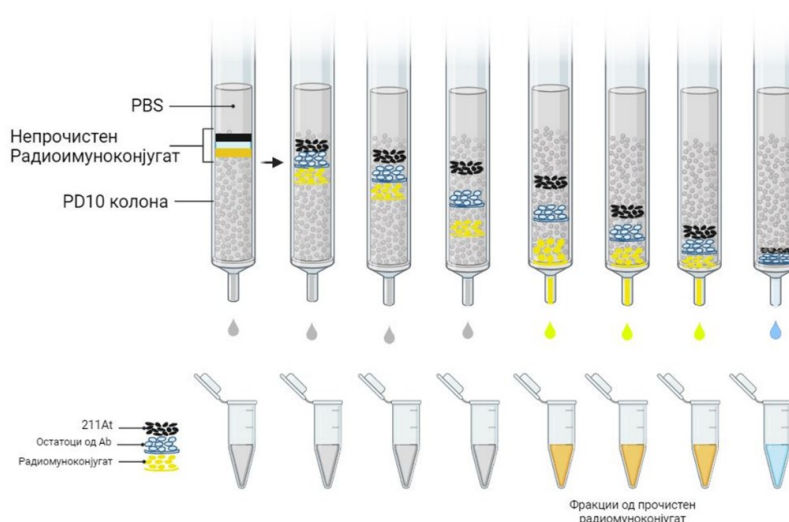
Слика 67 Реакција на конјугација на антителото 9E7.4 со простетична група

Figure 67 Conjugation reaction of the 9E7.4 antibody with the prosthetic group

По завршување на реакцијата, формираните имуноконјугати беа елуирани, прочистени и концентрирани со соодветните трис пуфер низ PD-10 колоните. Со оваа постапка беа отстранети вишокот од простетична група и нискомолекулските компоненти од реакционата смеса. Добиените концентрации беа блиски до посакуваната работна концентрација пред радиобележување од приближно 6 mg/mL. Ова покажа дека применетата постапка овозможува добивање доволна количина прочистен и концентриран имуноконјугат за понатамошното истражување.

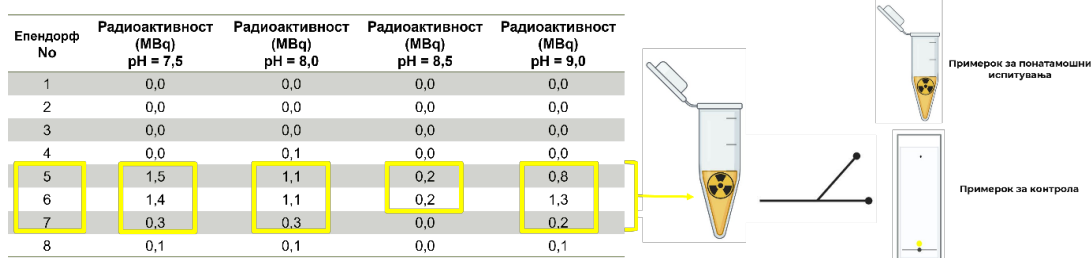
5.9 Радиобележување со аstatин-211 (^{211}At)

По радиобележување со ^{211}At и прочистување со гел-филтрација (слика 68 а), најголем дел од радиоактивноста се елуираше во фракциите 5 – 7, што укажува дека токму овие фракции го содржат прочистениот радиоимуноконјугат. Кај примерокот подготвен на pH 7,5 беа измерени 1,5 и 1,4 MBq во фракциите 5 и 6, додека кај pH 8,0 беа измерени по 1,1 MBq во истите фракции. Кај pH 8,5 радиоактивноста во овие фракции беше значително пониска, а кај pH 9,0 беше измерена радиоактивност од 0,8 и 1,3 MBq (слика 68 б).



Слика 68 а) Сливовит приказ на прочистување на радиобележаниот имуноконјугат со ^{211}At со гел-филтрација на PD-10 колона

Figure 68 а) Schematic representation of the purification of the ^{211}At radiolabeled immunoconjugate by gel filtration using a PD-10 column



Слика 68 б) Распределба на радиоактивноста по фракции по прочистување на радиобележаните имуноконјугати со ^{211}At , подготвени при различни pH-вредности

Figure 68 b) Distribution of radioactivity across fractions after purification of ^{211}At radiolabeled immunoconjugates prepared at different pH values

5.9.1 Контрола на квалитет на радиоимуноконјугати радиобележани со ^{211}At

За проценка на квалитетот на радиоимуноконјугатите со ^{211}At беа применети однапред дефинирани критериуми за прифатливост на добиениот радиоимуноконјугат. Како прифатлив се сметаше препарат со радиохемиска чистота поголема од 96 %, принос на радиобележување поголем од 50 %, како и зачувана имунореактивна фракција (IRF %) во споредба со немодифицираното антитело. Овие параметри беа користени како основа за евалуација на квалитетот на радиобележаниот имуноконјугат по прочистување со гел-филтрација.

Радиохемиската чистота на радиоимуноконјугатите со ^{211}At беше висока за повеќето примероци. Примерокот подготвен на pH 7,5 имаше радиохемиска чистота од 100 %, принос на радиобележување од 36 % и имунореактивност од 73 %. Примерокот на pH 8,0 исто така покажа радиохемиска чистота од 100 %, но со нешто понизок принос од 29 % и имунореактивност од 69 %. Примерокот на pH 8,5 покажа најнеповолни резултати, со радиохемиска чистота од 75 %, принос од 6 % и имунореактивност од 23 %. Примерокот на pH 9,0 имаше радиохемиска чистота од 99 %, принос од 25 % и имунореактивност од 76 %.

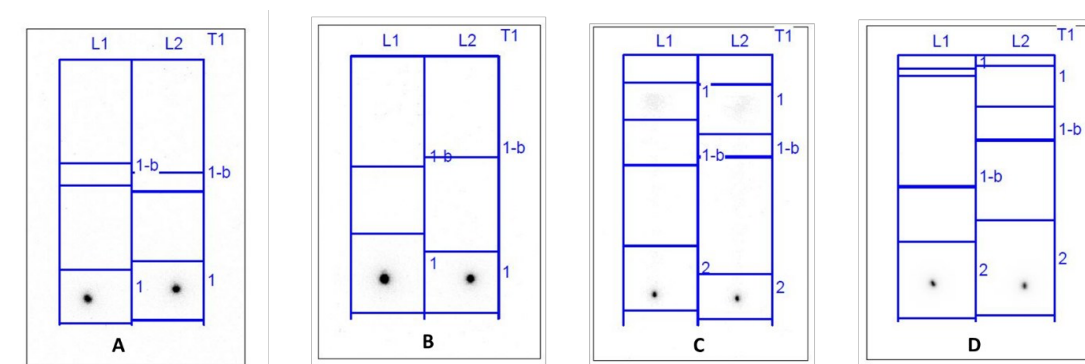
Според поставените критериуми, радиохемиската чистота треба да биде повисока од 96 %, а приносот на радиобележување повисок од 50 %. Иако кај примероците pH 7,5, 8,0 и 9,0 беше постигната задоволителна радиохемиска чистота, приносот на радиобележување кај сите примероци беше под

посакуваната вредност. Најповолен однос помеѓу стабилност на простетичната група, радиохемиска чистота, принос и имунореактивност беше забележан кај примерокот подготвен на pH 7,5. Сепак, добиениот принос од 36 % укажува дека постапката бара дополнителна оптимизација. Резултатите се прикажани во табела 29 и слика 69.

Табела 29 Збирни карактеристики од радиобележување на 9E7.4
имуноконјугатот со ^{211}At

Table 29 Summarized results of ^{211}At radiolabeling of the 9E7.4 immunoconjugate

Примерок	Почетна активност (MBq)	Радиоактивност по обележување (MBq)	Радиохемиска чистота (%)	Принос на радиобележување (%)	Имунореактивност (%)
A pH=7,5	10	8,1	100	36	73
B pH=8,0	10	7,2	100	29	69
C pH=8,5	7,5	6,5	75	6	23
D pH=9,0	8,1	7,8	99	25	76



Слика 69 iTLC – SG хроматограми по обележување на 9E7.4 со ^{211}At

Figure 69 iTLC – SG chromatograms after labeling 9E7.4 with ^{211}At

6 ДИСКУСИЈА

I. МОНОКЛОНАЛНО АНТИТЕЛО ДАРАТУМУМАБ

Радиоимунотерапијата претставува добро познат пристап за целна терапија, чишто принципи веќе се применети во клиничката пракса, главно преку употреба на радиоимуноконјугати базирани на моноклонални антитела. Примери за вакви препарати се тоситумумаб обележан со јод-131 (Веххар) и ибритумомаб тиуксетан обележан со итриум-90 (Zevalin), кои ја потврдуваат можноста за селективна испорака на терапевтски радионуклиди до целните места.

Сепак, овие препарати претставуваат готови радиофармацевтски производи, односно тие не се формулирани како нерадиоактивни лиофилизирани прекурсори, кои би можеле да се обележуваат со различни терапевтски радионуклиди непосредно пред нивната примена. Во тој контекст, развојот на лиофилизирана формулација претставува додадена вредност, бидејќи овозможува добивање стабилен нерадиоактивен прекурсор, погоден за складирање, транспорт и понатамошно радиобележување по реконституција.

Ваквиот пристап може да ја зголеми практичната примена, достапноста, како и флексибилноста при подготовката на радиоимуноконјугати. Сепак, важно е да се нагласи дека при развојот на овие формулации се наметнуваат значајни предизвици, како од технолошки, така и од аналитички аспект. Крајната лиофилизирана формулација треба да ја зачува структурата и имунореактивноста на антителото, да овозможи брза и репродуцибилна реконституција и, по додавање на соодветен радионуклид, да се добие готов радиофармацевтски препарат со висока радиохемиска чистота.

Научно-истражувачката пракса дозволува комерцијално достапните моноклонални антитела, вклучително и даратумумаб, да се користат како вектори при формулација на имуноконјугати. Токму поради оваа причина, акцентот на ова истражување е ставен на хуманото антителото даратумумаб, не само поради неговата специфичност како вектор кој го таргетира CD38 антигенот, туку и поради неговата клиничка релевантност за третман кај мултипен миелом. Конкретно, фокусот на истражувањето беше насочен кон подготовка на лиофилизирана формулација од даратумумаб со хелатор, кој може да се користи за радиобележување со различни терапевтски

радионуклиди. Оттука, изборот на бифункционален хелатор, условите на конјугација, составот на формулацијата и зачувувањето на способноста за радиобележување беа разгледувани како меѓусебно поврзани параметри, а не како одделни развојни чекори.

Изборот на соодветен бифункционален хелатор и условите на конјугација кои ќе овозможат процена на CAR вредноста (однос хелатор/антитело), без притоа да се наруши структурниот интегритет на антителото беа проценети преку MALDI-TOF MS. Резултатите од оваа анализа покажаа дека ефикасноста на конјугацијата зависи од повеќе фактори, вклучувајќи го видот на хелаторот и применетиот моларен вишок на хелаторот во однос на антителото, како и од применетите услови во кои се изведува реакцијата.

Споредбата меѓу хелаторите кои беа предмет на истражување, преку пресметка на бројот на прикачени хелатори за секое антитело, покажа дека *p*-SCN-Bn-DOTA овозможува најповолен однос помеѓу степенот на конјугација и зачувувањето на чистотата на антителото.

Почетниот пристап со примена на хелаторот DOTA-NHS во фосфатен пуфер (pH 8,0) при пониска температура (4 °C) не обезбеди доволен степен на модификација. Ова укажува дека условите за конјугација, кои претходно беа применети кај други антитела, не може да се применат за конјугација на даратумумаб без дополнителна оптимизација. И покрај зголемувањето на 50-пати моларен вишок и оптимизацијата на условите за конјугација, не беше постигнат задоволителен степен на конјугација. Овој резултат најверојатно е поврзан со пониската ефикасност на реакцијата на NHS-естерот во применетите услови, како и со можната хидролиза на активната форма на хелаторот во водена средина (Beck et al., 2017). Конечно, DOTA-NHS не беше избран како соодветен хелатор за понатамошен развој, туку формируаниот имуноконјугат беше задржан само како споредбен примерок.

Во споредба со DOTA-NHS, конјугацијата со *p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA покажа повисоки вредности за CAR, но пониски од *p*-SCN-Bn-DOTA (табела 10). Прелиминарното обележување со Lu-177 на двата имуноконјугати, со различен моларен вишок на хелаторите, резултираше со висок принос по обележувањето, што укажува дека кај даратумумаб овие хелатори овозможуваат координативно инкорпорирање на радионуклидот. И покрај ниските вредности за CAR при 20-

пати и 30-пати моларен вишок (0,36 и 0,76, соодветно), сепак овие имуноконјугати покажаа висок процент на радиохемиска чистота (над 98,0 %) по радиобележување со ^{177}Lu , што беше одлучувачки фактор да бидат избрани за понатамошна евалуација.

Од друга страна, имуноконјугатите со хелаторот *p*-SCN-Bn-DOTA при 20-пати и 30-пати моларен вишок (вредности за CAR од 2,31 и 2,66, соодветно), беа избрани како најрелевантни за радиобележување, имајќи предвид дека и кај двата имуноконјугати имаше доволен број на прикачени хелатори, без притоа да има потреба од зголемување на степенот на модификација.

Кај двата хелатори, *p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA и *p*-SCN-Bn-DOTA, највисоките вредности за CAR кај 50-пати моларниот вишок (0,85 и 3,77, соодветно) не подразбираат обезбедување на подобар кандидат за понатамошна евалуација, бидејќи прекумерната модификација може да го зголеми ризикот од структурни промени, агрегација или промена на биолошките својства на антителото.

Протоколот кој вклучува употреба на карбонатен пуфер (pH 8,5), на температура од 37 °C и во тек на еднoчасовно нежно мешање, се покажа како најсоодветен за изведба на реакцијата на конјугација, особено при употреба на *p*-SCN-Bn-DOTA како хелатор.

По изборот на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA подготвен со 30-пати моларен вишок од хелатор како репрезентативен примерок, следниот чекор беше развој на лиофилизирана формулација која би имала дефинирани услови за чување при кои би биле задржани сите нејзини физичко-хемиски својства, односно би бил обезбеден последователно висок принос по радиобележување. Лيوфилизацијата е воспоставен фармацевтско-технолошки пристап за подобрување на стабилноста на препарати кои во својата основа имаат протеини, бидејќи со намалување на присутната влага се ограничуваат резултирачките деградациски процеси. Сепак, самиот процес на лиофилизација истовремено претставува и стрес за протеинската структура, поради што составот на формулацијата, како и параметрите на циклусот, мора да се оптимизираат заедно (Wang, 2000).

Првичните протоколи за лиофилизација покажаа дека поставените параметри значајно влијаат врз квалитетот на крајниот производ, при што појавата на

колапс при примарно сушење на температура од $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ укажа на потреба од оптимизација на циклусот.

Врз основа на добиените термограми од лиофилизираните формулации, беше забележано дека кај формулациите F3–5 се јавува мала термичка промена во нискотемпературниот регион, приближно околу $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ваквата промена условно може да се поврзе со стаклестиот премин на аморфната, односно семиаморфната фаза на матриксот во формулациите. Ова е очекувано, имајќи предвид дека овие формулации содржат дисахариди, чиј механизам како лиопротективни агенси се поврзува токму со формирањето аморфен стаклест матрикс по завршување на процесот на лиофилизација. За разлика од нив, кај формулациите F1 и F2 не беше забележана ваква термичка промена во истиот температурен регион, што може да се објасни со отсуството на дисахариди во составот на матриксот.

Во високо температурниот регион, кај сите анализирани формулации беше забележана ендотермна промена. Оваа промена не може еднозначно да се припише на стаклест премин, туку поверојатно е поврзана со други термички процеси, како што се топење на кристална фаза, губење на резидуална влага или специфично термичко однесување на присутните ексципиенси.

Со термограмите од DSC анализата беше идентификувана температурата на колапс како блиска до температурата на стаклест премин, што беше земено предвид при дефинирање на температурата и времетраењето на примарното сушење, заедно со резултатите од определената содржина на резидуална влага. Од трите развиени протоколи за лиофилизација, како најсоодветен беше избран протокол 3, кој вклучуваше примарно сушење на $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ за времетраење од 18 часа. Овој избор беше направен со цел да се задржи контролирана промена само на еден од поставените параметри. Добиениот лиофилизиран кит се карактеризираше со задоволителен квалитет, прифатлив визуелен изглед и содржина на резидуална влага $\leq 3\%$.

По дефинирањето на протоколот за лиофилизација, беше пристапено кон оптимизација на најсоодветната формулација. Сет од две серии (S и W), секоја со по пет формулации (F1-5), беше дизајниран за да се процени влијанието на видот на растворувачот за подготовка на формулацијата. Освен тоа, беше направена евалуација на влијанието на присутните ексципиенси врз

карактеристиките на лиофилизираната формулација. Конкретно, беше евалуирано влијанието на присутниот лиопротективен агенс, анјонските површински супстанции и полнителот.

Формулациите подготвени во физиолошки раствор (S.F1-5) покажаа пониски вредности за содржината на резидуална влага во споредба со формулациите подготвени во вода (W.F1-5), при што најниска вредност беше добиена кај S.F5 (1,90 %). Кај лиофилизираните формулации на антитела, високата вредност за содржина на влага може да ја намали хемиската стабилност, но од друга страна, не мора да значи дека најниската вредност за содржина на влага секогаш би резултирала со најголема физичка стабилност (Breen et al., 2001). Затоа, резидуалната влага не треба да се разгледува како единствен критериум при избор на најсоодветна формулација.

Кај формулациите F3-5, како лиопротективни агенси беа вклучени дисахаридите сахароза и трехалоза, од причина што формираат аморфен стаклест матрикс, кој ја зачувува протеинската структура. Манитолот беше вклучен како полнител поради ниската концентрација на имуноконјугатот, а истовремено и за добивање на колач со прифатлив визуелен изглед. Кај формулациите F1 и F2, 1 % манитол беше вклучен како единствен ексципиент во функција на полнител, но имајќи предвид дека истиот не секогаш обезбедува доволна стабилизација на протеинот, кај формулациите F3 и F4, беше комбиниран со дисахаридите сахароза или трехалоза, во однос 2:1 и 4:1, соодветно (Cleland et al., 2001; Bjelošević et al., 2020). Дополнително, во формулацијата F5 беше вклучен и полисорбат 20, со цел да придонесе кон ограничен површински индуциран стрес кој пак доведува до слепување на протеините со допирната површина со садовите.

Конечно, крајниот избор на формулација се темелеше на заедничка проценка на визуелниот изглед, содржината на резидуална влага, времето на реконституција, pH-вредноста, профилот на чистота, ефикасноста за радиобележување, како и постигнатата радиохемиска чистота.

При физичко-хемиската карактеризација на подготвените формулации, најпрвин беше направена визуелна проценка на нивниот изглед. И покрај тоа што речиси кај сите формулации беше забележана нехомогеност на колачот, со присуство на помали или поголеми пукнатини, ваквиот изглед не претставуваше критичен

квалитативен атрибут за исклучување на формулациите од понатамошните испитувања.

Времето на реконституција кај сите формулации изнесуваше помалку од 30 секунди, при што беа добиени хомогени раствори без присуство на остатоци од видливи и нерастворени честици. Всушност, брзото време на реконституција е очекувано, имајќи ја превид ниската концентрација на имуноконјугатот (Sane et al., 2020).

Во сите примероци, рН-вредноста по реконституција е во рамки на воспоставениот критериум на прифатливост и се движеше околу 7.

Овие резултати покажуваат дека избраната формулација со манитол, дисахарид и полисорбат 20, без присуство на пуфер, овозможува добивање на лиофилизирана формулација со соодветни физички карактеристики, која понатаму ќе подлежи на подетална карактеризација.

Резултатите од ATR-FTIR и Раманската спектроскопија дадоа комплементарни информации за структурниот интегритет на имуноконјугатот. Конкретно, кај ATR-FTIR анализата беше забележано очекувано преклопување на спектрите на прочистеното антителио, имуноконјугатот и плацебо формулацијата, бидејќи во формулацијата се присутни ексципиенси кои апсорбираат во средниот IR регион (слика 29). Поради тоа, спектрите беа дополнително обработени преку пресметување на втор извод, со цел да се овозможи појасна интерпретација на амидните региони. Отсуството на значајни поместувања во амид I/II лентите укажува дека конјугацијата и лиофилизацијата не предизвикале значајни промени во секундарната структура (слика 30).

Раманските спектри дополнително го потврдија структурниот интегритет на протеинскиот дел од имуноконјугатот, особено преку споредба на амид I/III лентите помеѓу прочистеното неконјугирано антителио и прочистениот имуноконјугат. Врските во овие ленти се чувствителни на промени кои би можеле да ја нарушат стабилноста на секундарната структура на протеините. Затоа, нивната стабилност е важен показател дека е зачувана конформациската структура на протеинот. Дополнително, отсуството на нови асигнации или значајни поместувања на амид I/III лентите ја потврдија хипотезата дека е задржан структурниот интегритет на даратумумаб по завршување на конјугацијата и лиофилизацијата.

Влијанието на составот на формулацијата врз содржината на главниот мономер од даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, односно врз појавата на високомолекулски и нискомолекулски видови, со цел да се определи чистотата на формулациите, беше оценето со примена на SE-HPLC.

Сите испитувани имуноконјугати, независно од применетиот пуфер, видот на хелаторот и моларниот вишок на хелаторот, го исполнуваат воспоставениот критериум за прифатливост во однос на чистотата.

Според добиените резултати, изборот на пуфер за конјугација имаше мало влијание врз чистотата на имуноконјугатите (табела 11). Единствено, при употреба на карбонатен пуфер, беше забележана повисока содржина на нискомолекулски видови, што укажува на поголема склоност кон фрагментација, но сè уште незабележително влијание врз содржината на главниот мономер и појавата на агрегати.

Од друга страна, моларниот вишок на хелаторот имаше поголемо влијание врз зачувувањето на главниот мономер (табела 12), но овој параметар не беше единствен одлучувачки фактор за конечниот избор на пуфер за конјугација.

Кај имуноконјугатот даратумумаб-NHS-DOTA беа добиени највисоки вредности за површината под пикот што одговара на главниот мономер, особено при 20- и 30-пати моларен вишок на хелаторот, без изразени разлики помеѓу фосфатниот и карбонатниот пуфер. При 50-пати моларен вишок беше забележано намалување на оваа вредност, што укажува дека поголемиот моларен вишок може умерено да влијае врз чистотата на имуноконјугатот.

Кај даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, вредностите останаа во релативно тесен опсег при сите испитувани услови, што укажува на сличен профил на чистота во избраните пуфери. Мало намалување беше забележано при 50-пати моларен вишок на хелаторот, но без изразена разлика помеѓу фосфатниот и карбонатниот пуфер.

Кај даратумумаб-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA беше забележана појасна разлика помеѓу двата пуфери. Во фосфатниот пуфер вредностите останаа релативно високи при сите испитувани моларни вишоци, додека во карбонатниот пуфер беа конзистентно пониски и покажаа благо намалување со зголемување на моларниот вишок на хелаторот. Ова укажува дека кај овој имуноконјугат карбонатниот пуфер, во комбинација со поголем моларен вишок на хелаторот,

може да има нешто поголемо влијание врз намалувањето на застапеноста на главниот мономер.

Иако од аспект на чистота, фосфатниот пуфер покажа нешто поповолни резултати кај дел од имуноконјугатите, разликите беа многу мали и незначајни. Поради тоа, изборот на карбонатниот пуфер за конјугација може да се оправда со значително поповолните резултати добиени во однос на вредноста за CAR и последователното радиобележување.

Во формулациите за лиофилизација кои се подготвени со пуфер и 1 % манитол, но без дисахариди (F1 и F2), без разлика на јачината на пуферот (10 mM или 100 mM), беше забележано зголемено присуство на високомолекулски видови, што укажува на можни промени во pH-вредноста за време на процесот на лиофилизација. Наспроти тоа, формулациите кои содржеа манитол и дисахарид во моларен однос 2:1 (F3 и F5), покажаа најповолна чистота, со висок процент на содржина на главниот мономер, со минимално присуство на фрагменти и без детектирани агрегати (табела 14). Ова укажува дека присуството на дисахарид како лиопротективен агенс има значајна улога во зачувувањето на мономерната форма на имуноконјугатот.

Формулацијата F4, исто така, покажа релативно задоволителна чистота, особено во серијата подготвена со ултрачиста вода, додека во серијата подготвена со физиолошки раствор беше забележано присуство на високомолекулски видови. Поради тоа, F4 не беше издвоена како најповолна формулација. Ваквиот резултат покажува дека не е важно само присуството на дисахарид како лиопротективен агенс, туку и неговиот однос со полнителот, вклучително и со целокупниот состав на формулацијата.

Во споредба со другите формулации, F5 се издвојува како најсоодветна, бидејќи има најголема чистота утврдена преку поволен хроматографски профил, најниска содржина на резидуална влага во серијата подготвена со физиолошки раствор, брза реконституција и приближно неутрална pH-вредност. Дополнителното присуство на полисорбат 20 во оваа формулација може да има значајна улога во намалувањето на површински индуцираниот стрес при замрзнување и сушење. Во оваа формулација беше споредено и влијанието на сахарозата и трехалозата како лиопротективни агенси. При употреба на трехалоza, беше забележан повисок процент за содржината на главниот

мономер. Сепак, поизразена разлика беше забележана во однос на содржината на нискомолекулските видови, кои беа детектирани кај формулацијата со сахароза, но не и кај формулацијата со трехалоза. Овој резултат укажува дека трехалозата може да обезбеди подобра заштита на имуноконјугатот во однос на фрагментација. Содржината на високомолекулските видови, пак, во двата случаи беше речиси идентична.

Сумирано, резултатите од SE-HPLC анализата ја потврдија важноста на составот на формулацијата во обезбедување на чистотата на лиофилизираниот даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA. Формулацијата F5, особено во серијата подготвена со физиолошки раствор и трехалоза како лиопротективен агенс, покажа најповолен севкупен профил, поради што беше избрана како за понатамошна карактеризација и проценка на способноста за радиобележување. Агрегатите и структурните промени кај моноклоналните антитела треба да се карактеризираат со различни аналитички пристапи, бидејќи различни стрес-услови можат да предизвикаат различни физичко-хемиски промени (Hawe et al., 2009). Во таа насока, за дополнителна потврда на чистотата, беше изведена и SDS-PAGE анализа во редуцирачки и нередуцирачки услови, при што беа добиени комплементарни резултати со SE-HPLC.

Во редуцирачки услови беа забележани двете очекувани ленти кои потекнуваат од тешкиот и лесниот ланец, додека во нередуцирачки услови доминираше само една лента што одговара на непроменетото антитело, а со тоа и на репрезентативниот имуноконјугат. Отсуството на дополнителни ленти укажува дека процесите на конјугација и лиофилизација не резултирале со формирање на фрагменти или агрегати кои би можеле да се детектираат со развиените методи на електрофореза.

Во UV/Vis спектрите на прочистениот даратумумаб и репрезентативниот даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA беше забележана максимална апсорпција на бранова должина од околу 280 nm, без нејзино релевантно поместување. Со ова се покажа дека протеинскиот дел на молекулата го задржува очекуваниот апсорпциски профил, што е од особена важност при идентификување на протеинската природа на имуноконјугатот, односно потенцијална идентификација на други, главно високомолекулски видови. Сепак, UV/Vis анализата не беше земена предвид како самостоен доказ за зачувување на

повисоката структура или степенот на конјугација, туку се користеше само за споредба на спектралните профили пред и после конјугација и лиофилизација, како и за квантификација на концентрацијата на имуноконјугатот.

Физичко-хемиската карактеризација покажа дека не беа забележани значајни детектибилни промени во спектралниот, електорофоротскиот и хроматографскиот профил на избраниот имуноконјугат по конјугацијата и лиофилизацијата и не довеле до значајно нарушување на основната структура на даратумумаб и неговата чистота. Врз основа на добиените резултати од различните аналитички техники, беше направена сеопфатна и интегрирана проценка на квалитетот на препаратот, што е многу подобар пристап отколку заклучокот да се донесе само врз основа на поединечен аналитички метод. Добиените резултати ја потврдија соодветноста на имуноконјугатот за понатамошно радиобележување со соодветни радионуклиди.

Резултатите од оптимизацијата на радиобележувањето со ^{177}Lu покажаа дека ефикасноста на комплексирањето на радиометалот, изразена преку приносот по обележување и радиохемиската чистота, зависи од видот и рН-вредноста на медиумот за реконституција на лиофилизираната формулација, како и времетраењето на инкубацијата. При евалуацијата на двата растворувачи кои најчесто се користат за реконституција, ацетатен пуфер и раствор на аскорбинска киселина, поефикасно и репродуцибилно обележување се постигна во присуство на ацетатен пуфер. За хелаторите во чија основа е DOTA, како и за DTPA, кисела средина во рН опсег од 4–5 е поволна за комплексирање на тривалентни радиометали. Истовремено, рН-вредноста на медиумот треба да се контролира за да не ја наруши структурата на антителото.

Временската зависност на обележувањето покажа постепено зголемување на приносот, со најизразен пораст во првите 15–20 минути и достигнување плато по околу 40 минути. Овој тренд е очекуван за процес на комплексирање кога текот на првичната реакција е побрз, а потоа реакциската смеса постепено се приближува кон максимален принос.

Споредбата меѓу различните имуноконјугати по обележување со ^{177}Lu јасно ја покажа предноста на имунокојугатот со хелаторот *p*-SCN-Bn-DOTA. Даратумумаб-DOTA-NHS подготвен со 50-пати моларен вишок од хелаторот даде низок принос, што е во корелација и со претходно добиените ниски

вредности за CAR. Овој резултат потврдува дека недоволно успешната конјугација на самиот почеток, директно се одразува врз способноста за радиобележување во финалната фаза. Кај даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, повисокиот моларен вишок на хелаторот од 30-пати значајно го подобри приносот, што покажува дека бројот на достапни групи (вредност за CAR 2,66) е доволен за ефикасно обележување со ^{177}Lu . Исто така, и кај даратумумаб-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA и со најмалиот однос од 20-пати моларен вишок, единствениот прикачен хелатор се покажа дека е доволен за да се добие вредност повисока од 98,00 % за радиохемиска чистота.

Испитувањето на *in vitro* стабилноста беше вклучено како важен критериум за селекција, со цел да се избере најсоодветниот имуноконјугат кој ги исполнува сите дефинирани параметри за квалитет. Иако и *p*-SCN-Bn-DOTA и *p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA покажаа висока почетна радиохемиска чистота, [^{177}Lu]Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA покажа значително постабилно комплексирање на радиометалот во текот на 168 часа. Наспроти тоа, кај [^{177}Lu]Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA беше забележано изразено намалување на врзаната радиоактивност, која што по само 72 часа се намали на половина. Ова покажува дека почетниот принос по обележување и радиохемиската чистота не треба да се користат како единствени критериуми, бидејќи стабилноста на комплексот метален радионуклид со хелатор во биолошки услови е многу важна за потенцијалната терапевтска применливост.

Фактот дека [^{177}Lu]Lu-даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA може да се добие со висока радиохемиска чистота без дополнително прочистување е практично значаен, затоа што секој дополнителен чекор на прочистување може да доведе до губење на радиоактивноста, продолжување на времето на подготовка и поголема варијабилност на финалниот препарат. Затоа, добивањето на радиоимуноконјугат со прифатлива радиохемиска чистота директно по обележувањето, ја поддржува применливоста на лиофилизираната формулација како ready-to-use кит.

По изборот на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA како најсоодветен кандидат за радиобележување со ^{177}Lu , истиот беше обележан и со други радионуклиди, како што се ^{225}Ac и ^{161}Tb . Овој пристап е оправдан, бидејќи DOTA е еден од најкористените хелатори за тривалентни радиометали и овозможува

проширување на идејата за лиофилизираната формулација да биде основа за различни терапевтски радионуклиди. Во овој момент, овие радионуклиди се од најголем истражувачки интерес и поседуваат најголем потенцијал за примена во клиничката пракса.

Високата радиохемииска чистота добиена по обележување со ^{225}Ac , укажува дека имуноконјугатот останува функционален и кога ќе се обележи со овој алфа радионуклид. Овој резултат е важен затоа што ^{225}Ac има различни радиохемииски и физички карактеристики во споредба со ^{177}Lu , а неговата примена во радиоимунотерапијата бара формирање на стабилен комплекс и минимално присуство на слободен радиометал. Почетната радиохемииска чистота од 99,43 % покажува дека применетите услови овозможуваат успешно комплексирање, без потреба од дополнително прочистување.

Стабилноста на ^{225}Ac -даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA беше повисока при собна температура и во PBS, отколку во хуман серум. Намалената радиохемииска чистота во серум може да биде резултат на комплексната биолошка средина, присуството на протеини и потенцијални конкурентни компоненти за врзувачкото место, како и можни интеракции со радиоактивни ќерки-продукти. Овој резултат не ја намалува успешноста на почетното обележување, но покажува дека за обележување со ^{225}Ac се потребни дополнителни испитувања, особено во поглед на *in vivo* стабилноста, задржувањето на радионуклидот и потенцијалната биолошка дистрибуција.

Обележувањето со ^{161}Tb , исто така, даде висока почетна радиохемииска чистота, што дополнително ја потврдува применливоста на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA како прекурсор за различни терапевтски радиометали. ^{161}Tb е особено интересен поради неговите карактеристики и потенцијална терапевтска примена, а добиената радиохемииска чистота од 98,53 % покажува дека условите воспоставени врз основа на ^{177}Lu , може успешно да се применат и за овој радионуклид.

In vitro стабилноста на ^{161}Tb -даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA беше релативно добра при собна температура и во PBS, додека во хуман серум беа добиени пониски вредности. Овој тренд е сличен со оној кај ^{225}Ac и укажува дека серумот претставува реален предизвик за стабилноста на радиоимуноконјугатите базирани на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA.

Севкупно, резултатите со ^{177}Lu , ^{161}Tb и ^{225}Ac покажуваат дека даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA има потенцијал да служи како универзална формулација за обележување со тривалентни радиометали. Детално е потврдена неговата претклиничка примена кога е обележан со ^{177}Lu , при што се добиени висока радиохемиска чистота и прифатлива, но не доволна *in vitro* стабилност. Обележувањето со ^{161}Tb и ^{225}Ac ја проширува применливоста на концептот, но истовремено покажува дека секој радионуклид бара посебна проценка на стабилноста, со можност за негова истовремена примена. Потребно е да бидат изведени дополнителни испитувања сè со цел подобрување на *in vitro* стабилноста на радиоимуноконјугатите со ^{161}Tb и ^{225}Ac .

По утврдување на квалитетот на лиофилизираниот имуноконјугат даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA со примена на различни аналитички техники, следната цел беше дефинирање на рокот на употреба на оваа формулација. Стабилноста на лиофилизираниот имуноконјугат даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA беше проценета преку следење на физичко-хемиските параметри и способноста за обележување со радионуклидот ^{177}Lu . Ваквиот пристап е оправдан, бидејќи кај лиофилизиран радиоимуноконјугат не е доволно да се потврди само профилот на чистота, туку треба да се потврди и дека препаратот по складирање може успешно да се користи како лиофилизирана формулација за добивање радиоимуноконјугат со прифатлива радиохемиска чистота.

Во забрзаната студија на стабилност, примероците покажаа релативно зачувани физичко-хемиски карактеристики. pH-вредноста и концентрацијата останаа во прифатливиот опсег, а SE-HPLC анализата покажа мало намалување на содржината на главниот мономер, со истовремено зголемување на присуството на агрегати и фрагменти. Сепак, и овие вредности останаа во рамките на работната спецификација, укажувајќи дека до ТЗ не се детектирани промени со применетите аналитички методи.

Најзначајното отстапување во забрзаната студија беше намалувањето на радиохемиската чистота по обележување со ^{177}Lu под дефинираниот критериум за прифатливост во ТЗ временската точка. Овој резултат покажува дека способноста за радиобележување е покритичен функционален показател за проценка на стабилноста на лиофилизираниот имуноконјугат, отколку профилот на чистота. Затоа, иако резултатите добиени од SE-HPLC, SDS-PAGE, ATR-FTIR

и Раманска спектроскопија останаа во прифатливи граници, намалената радиохемиска чистота претставува значајно отстапување, кое ја ограничува практичната применливост на препаратот. Затоа, забрзаната студија на стабилност не беше искористена за утврдување на рокот на употреба.

Долготрајната студија овозможи релевантна проценка на стабилноста, бидејќи примероците беа чувани во затворено примарно пакување и во услови предвидени за реално складирање на 5 °C. Во текот на 12-месечната студија, содржината на главниот мономер и радиохемиската чистота останаа во воспоставените граници на прифатливост, што потврдува дека лиофилизираниот кит го задржал својот квалитет. Според тоа, со оваа студија може да се предложи рок на употреба од 12 месеци, под услов формулацијата да се чува на 5 °C и на релативна влажност која одговара на испитуваната климатска зона.

Анализата со софтверот ASAP дополнително ја потврди чувствителноста на формулацијата кон температурни промени и влажност, што се рефлектираше преку постепено намалување на содржината на главниот мономер и истовремено зголемување на содржината на вкупните онечистувања, главно поради формирањето на фрагменти. Притоа, софтверот направи предикција дека содржината на главниот мономер би останала во спецификацискиот лимит до 95,00 % за време од околу 0,65–0,71 година, односно предложениот рок на употреба би изнесувал приближно 8 месеци. Вака добиениот резултат се разликува од резултатот добиен со долготрајната студија, според која рокот за употреба беше дефиниран на 12 месеци.

Сепак, предикцијата со ASAP софтверот треба да се толкува како прелиминарна проценка, а не како самостојна основа за дефинирање на финалниот рок на употреба. Софтверски утврдената доверба од 45 %, како и присуството на проблематични услови и атипични точки (outliers), укажуваат дека моделот има ограничена сигурност и дека е потребно повторување на ASAP студијата со оптимизиран дизајн на експерименти. Ова е во согласност со литературата, според која предиктивните модели кај лиофилизирани протеински формулации, вклучително и моноклонални антитела, треба да се потврдат со долготрајни студии на стабилност (Kuzma et al., 2021; Shalaev et al., 2023; Huelsmeyer et al., 2023; Luo et al., 2025).

Дополнително, Waterman и Williams истакнуваат дека ASAP пристапот е особено корисен за рана проценка на стабилноста, споредба на формулациите, проценка на влијанието на температурата и влажноста, како и за поддршка при избор на пакувањето (Waterman, 2011; Williams, 2018). Кај испитуваниот лиофилизиран имуноконјугат, ASAP примероците беа изложени во отворени шишенца, со директен контакт со дефинирана релативна влажност, што претставува построг услов од реалното чување во затворено примарно пакување. Затоа, добиената предикција повеќе укажува на чувствителноста на формулацијата кон температурни промени и влага, отколку на нејзиниот рок на употреба, кој се дефинира во согласност со финалните услови на складирање.

Севкупно, резултатите од развојната фаза покажуваат дека предложениот рок на употреба на лиофилизираната формулација на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA изнесува 12 месеци, доколку истата се чува во фрижидер на температура од 5 ± 3 °C, во затворено примарно пакување.

Врз основа на прикажаните резултати од студиите на стабилност, не може да се предложи подолг рок на употреба, освен ако не се продолжи долготрајната студија на стабилност.

II. МОНОКЛОНАЛНО АНТИТЕЛО 9E7.4

Со користење на *N*-хидроксисукцинамидил естер се овозможува реакција со примарните amino-групи и формирање на амидна врска. Овој естер ги вклучува *N*-терминалните amino групи и ϵ -amino групите, на лизинските остатоци. Поради тоа, конјугацијата не е место-специфична и може да резултира со хетерогена популација на имуноконјугати. Овој начин на поврзување, кој се означува како „насосочена конјугација“, е погоден бидејќи се овозможува соодветна ориентација на антителото за поврзување со антигенот (Hermanson, 2008).

Добиените резултати од спектроскопската и хроматографската анализа, како и од определувањето на стабилноста, обезбедуваат збирна проценка за почетните реакциски услови за поврзување на антителото 9E7.4 со соодветната простетична група базирана на арилборна киселина.

Во UV/Vis спектрите, добиени од антителото и имуноконјугатот, се забележува максимална апсорпција на бранова должина од околу 280 nm, што е во согласност со очекуваното однесување на молекулите базирани на IgG, кај кои

апсорпцијата главно потекнува од ароматичните аминокиселински остатоци во протеинската структура. Иако прикачената простетична група може да влијае врз вкупната апсорпција, сепак преку мерење на апсорбанцата не може директно да се определи бројот на врзани простетични групи. Дополнително, со спектроскопската анализа се обезбеди и брза проценка на концентрацијата на немодифицираното антитело и добиените имуноконјугати, што е особено значајно при работа со ограничени волумени на примерок. Зголемениот интензитет на апсорпција кај имуноконјугатот може да се поврзе со повисоката финална концентрација на примерокот, но и со можниот придонес на прикачената простетична група. Поради тоа, UV/Vis анализата треба да се интерпретира заедно со хроматографските и резултатите добиени од стабилноста на простетичната група.

Испитувањето на стабилноста на простетичната група покажа дека рН-вредноста на реакциската средина е еден од клучните фактори за зачувување на активната естерска форма. Имено, зголемувањето на рН-вредноста резултира со забрзана хидролиза на естерската група, при што се формира хидролизиран продукт, односно арилборна киселина. Овој наод е во согласност со претходни студии за хемијата на NHS-естерската група, во кои е покажано дека реакцијата со примарни аминокиселини и хидролизата во водена средина се два конкурентни процеси. Во такви системи, зголемувањето на рН-вредноста може да ја зголеми реактивноста на аминокиселините, но истовремено и да ја забрза хидролизата на активниот естер, со што се намалува достапноста на простетичната група за ковалентно врзување со антителото (Lim et al., 2014).

Овој баланс помеѓу реактивноста на антителото и стабилноста на простетичната група е особено важен при модификација на антитела, бидејќи прекумерната хидролиза на естерската група може да доведе до намалена ефикасност на конјугацијата, додека несоодветно оптимизирани услови може да влијаат врз структурата и интегритетот на протеинот. Слично, во случаи на радиојодинација и астатицинација на антителото 9E7.4 со естер од арилборна киселина како простетична група, потребно е внимателно контролирање на реакциските услови, особено рН-вредноста на средината и концентрацијата на антителото. Ваквиот пристап е неопходен за успешна подготовка на модифицираното антитело, која, пак, понатаму претставува предуслов за негово ефикасно радиобележување.

Хроматографската анализа покажа дека процесот на конјугација не довел до појава на дополнителни детектибилни онечистувања, кои би укажале на формирани агрегати или можна фрагментација на антителото. Ретенциските времиња и хроматограмите на немодифицираното антитело и имуноконјугатите, потврдуваат дека модификацијата со простетичната група не предизвикала нарушување на интегритетот на антителото. Овој резултат е значаен, бидејќи зачувувањето на протеинскиот интегритет е предуслов за понатамошна радиохемиска примена и за потенцијално зачувување на биолошката активност на радиоимуноконјугатот.

Кога резултатите се разгледуваат заедно, најповолни услови за подготовка на имуноконјугатот се оние што овозможуваат зачувување на активната естерска форма на простетичната група, добивање соодветна концентрација на имуноконјугатот и одржување на профилот на чистота на антителото. Повисоките рН-вредности може да бидат поволни од аспект на зголемување на реактивноста на аминокрупите, но истовремено претставуваат ризик поради забрзана хидролиза на NHS-естерот. Затоа, оптимизацијата на рН-вредноста е неопходен чекор во развојот на имуноконјугати наменети за последователно радиобележување со аstatin-211.

Во согласност со резултатите од испитувањето, имуноконјугатот подготвен при рН 7,5 покажа најповолен вкупен профил, со радиохемиска чистота од 100 %, изолиран радиохемиски принос од 36 % и имунореактивна фракција од 73 %. Високата радиохемиска чистота покажува дека со применетата стратегија може да се добие прочистен радиоимуноконјугат со ^{211}At . Сепак, приносот остана под однапред дефинираниот критериум од 50 %, поради што постапката не може да се смета за целосно оптимизирана. Пониските приноси при повисоки рН-вредности може да се поврзат со забрзаната хидролиза на NHS-естерот, но врз резултатот може да влијаат и ефикасноста на халодеборонирањето, прочистувањето и обновувањето на активноста. Поради тоа, потребна е дополнителна оптимизација на моларниот однос, времето на конјугација, концентрацијата на антителото, условите на радиобележување и постапката на прочистување, при што резултатите од оваа фаза претставуваат почетна основа за понатамошен развој на стабилен радиоимуноконјугат со ^{211}At .

7 ЗАКЛУЧОК

Врз основа на спроведените експериментални испитувања и добиените резултати, може да се заклучи дека во рамките на оваа докторска дисертација беше развиена, оптимизирана и карактеризирана лиофилизирана формулација базирана на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA имуноконјугат, наменета за подготовка на терапевтски радиоимуноконјугати. Истражувањето покажа дека изборот на бифункционален хелатор, моларниот вишок на хелаторот, условите на конјугација, составот на формулацијата и параметрите на лиофилизација имаат клучно влијание врз квалитетот, стабилноста и понатамошната применливост на добиениот препарат.

Од испитуваните имуноконјугати, даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA, добиен со 30-пати моларен вишок на хелаторот, се покажа како најсоодветен кандидат за понатамошен развој. Конјугацијата со DOTA-NHS под испитуваните услови, не резултираше со задоволителни параметри по радиобележување со ^{177}Lu . Дополнително, иако *p*-SCN-Bn-1B4M-DTPA овозможи добивање радиоимуноконјугат со висока радиохемиска чистота, добиениот препарат не покажа задоволителна *in vitro* стабилност.

Леофилизацијата се покажа како соодветна фармацевтско-технолошка постапка за стабилизација и продолжување на рокот на употреба на избраниот имуноконјугат. Оптимизираната формулација обезбеди прифатлив визуелен изглед на лиофилизираниот колач, брза реконституција, соодветна pH-вредност, прифатлива содржина на резидуална влага и висок степен на чистота, со зачувување на мономерната форма на имуноконјугатот. Спектроскопските и хроматографските испитувања потврдија дека процесот на лиофилизација не предизвикува значајни детектибилни промени во секундарната структура, ниту нарушување на профилот на чистота на имуноконјугатот.

Радиобележувањето на лиофилизираниот даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA со ^{177}Lu резултираше со висок принос по обележување и висока радиохемиска чистота, без потреба од дополнителен чекор на прочистување. Овој резултат претставува значајна практична предност, бидејќи овозможува поедноставена подготовка на радиоимуноконјугатот, како и пократко време на изложеност. Дополнително, добиените резултати покажаа дека истиот лиофилизиран имуноконјугат може успешно да се примени и за радиобележување со ^{161}Tb и

²²⁵As, со што се потврдува потенцијалот на развиената формулација како платформа за подготовка на радиоимуноконјугати со различни терапевтски радионуклиди. Овие резултати претставуваат основа за потенцијалната применливост на развиената формулација како платформа за подготовка на радиоимуноконјугати со различни терапевтски радиометали. Сепак, варијабилните резултати од испитувањата во PBS и хуман серум укажуваат на потребата од дополнителна оптимизација и потврда преку биолошка карактеризација, имунореактивност, *in vivo* стабилност, биодистрибуција и дозиметриски испитувања.

Резултатите од конвенционалните студии на стабилност потврдија дека лиофилизираната формулација го задржува дефинираниот квалитет во сите анализирани временски точки, при што добиените вредности од испитуваните параметри останаа во рамките на критериумите за прифатливост. Овие студии обезбедија директна потврда за стабилноста на препаратот во реални услови на чување од една година, додека со забрзаните студии се прикажа чувствителноста на формулацијата кон деградација и формирање на онечистувања. ASAP проценката даде дополнителни предиктивни податоци за чувствителноста на формулацијата кон забрзана деградација. ASAP пристапот овозможи дополнителна процена на чувствителноста на формулацијата кон температурата и влагата и даде конзервативна предикција од приближно осум месеци. Тој претставува корисна алатка за проценка на ризик, оптимизација на формулација и планирање на студии на стабилност, но дефинирањето на рокот на употреба, сепак треба да се базира на долготрајни студии во примарното пакување и реалните услови на чување.

Во дополнителниот експериментален сегмент, антителото 9E7.4 беше модифицирано со простетична група базирана на арилборонска киселина и радиобележано со ²¹¹At. Овој процес претставува почетна основа за понатамошен развој на обележани радиоимуноконјугати со ²¹¹At. Добиените резултати укажуваат дека имуноконјугатот подготвен при pH 7,5 покажа најповолен вкупен профил, со радиохемиска чистота од 100 %, изолиран радиохемиски принос од 36 % и имунореактивна фракција од 73 %. Ниту еден од испитаните услови не го исполни критериумот за принос повисок од 50 %, поради што оваа постапка претставува почетна основа за понатамошна

оптимизација, а не целосно развиен радиофармацевтски процес. Добиените резултати укажуваат на потребата од дополнителна оптимизација и стратегијата за радиобележување, имајќи ја предвид специфичната и комплексна хемија на астатин.

Во целина, добиените резултати ја потврдуваат научната и практичната применливост на развиената лиофилизирана формулација базирана на даратумумаб-*p*-SCN-Bn-DOTA како стабилен и ready-to-use кит за подготовка на терапевтски радиоимуноконјугати. Развиениот пристап претставува значајна основа за понатамошен претклинички и клинички развој, при што идните истражувања ќе бидат насочени кон подобрување на *in vivo* стабилноста на обележаните радиоимуноконјугати со ^{161}Tb и ^{225}Ac , како и кон развој на лиофилизирана формулација за подготовка на радиоимуноконјугати обележани со ^{211}At , со крајна цел унапредување на таргетираната алфа-терапија.

8 КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Apostolova, P., Gestin, J.-F., Vranjes-Djuric, S., Arev, M., & Janevik-Ivanovska, E. (2024). Astatine-211 as an emerging radioisotope for targeted alpha therapy (TAT). *RAD Conference Proceedings*, 8, 53-58. doi:10.21175/RadProc.2024.11
2. Arakawa, T., Ejima, D., Li, T., & Philo, J. S. (2010). The critical role of mobile phase composition in size exclusion chromatography of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(4), 1674–1692. doi:10.1002/jps.21974
3. Awotwe-Otoo, D., Agarabi, C., Wu, G.K., Casey, E., Read, E., Lute, S., Brorson, K.A., Khan, M.A., Shah, R.B. (2012). Quality by design: Impact of formulation variables and their interactions on quality attributes of a lyophilized monoclonal antibody. *International Journal of Pharmaceutics*, 438(1-2), 167-175. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.08.033
4. Awotwe-Otoo, D., Agarabi, C., Wu, G. K., Casey, E., Read, E., Lute, S., Shah, R. B. (2020). Standardization of the reconstitution procedure of protein lyophilizates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(3), 1075-1084. doi:10.1016/j.xphs.2019.11.001
5. Bailly, C., Gouard, S., Lacombe, M., Remaud-Le Saëc, P., Chalopin, B., Bourgeois, M., Chouin, N., Tripier, R., Halime, Z., Haddad, F., Faivre-Chauvet, A., Kraeber-Bodéré, F., Chérel, M., & Bodet-Milin, C. (2018). Comparison of Immuno-PET of CD138 and PET imaging with $^{64}\text{CuCl}_2$ and ^{18}F -FDG in a preclinical syngeneic model of multiple myeloma. *Oncotarget*, 9(10), 9061-9072. doi:10.18632/oncotarget.23886
6. Baird, G., Farrell, C., Cheung, J., Semple, A., Blue, J., & Ahl, P. L. (2020). FTIR spectroscopy detects intermolecular β -sheet formation above the high temperature T_m for two monoclonal antibodies. *The Protein Journal*, 39(4), 318–327. doi:10.1007/s10930-020-09907-y
7. Bandekar, J. (1992). Amide modes and protein conformation. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1120(2), 123-143. doi:10.1016/0167-4838(92)90261-B
8. Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C., & Corvaia, N. (2017). Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(5), 315-337. doi:10.1038/nrd.2016.268
9. Berdal, M., Gouard, S., Eychenne, R., Marionneau-Lambot, S., Croyal, M., Faivre-Chauvet, A., Chérel, M., Gaschet, J., Gestin, J.-F., & Guérard, F. (2020). Investigation on the reactivity of nucleophilic radiohalogens with arylboronic acids in water: access

- to an efficient single-step method for the radioiodination and astatination of antibodies. *Chemical Science*, 12, 1458–1468. doi: 10.1039/D0SC05191H
10. Bjelošević, M., Zvonar Pobirk, A., Planinšek, O., & Ahlin Grabnar, P. (2020). Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: Contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*, 119029. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119029
 11. Boulet-Audet, M., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2014). High-throughput thermal stability analysis of a monoclonal antibody by attenuated total reflection FT-IR spectroscopic imaging. *Analytical Chemistry*, 86(19), 9786–9793. doi:10.1021/ac502529q
 12. Breen, E. D., Curley, J. G., Overcashier, D. E., Hsu, C. C., & Shire, S. J. (2001). Effect of moisture on the stability of a lyophilized humanized monoclonal antibody formulation. *Pharmaceutical Research*, 1345-1353.
 13. Bruins, W. S. (2020). Targeted Therapy With Immunoconjugates for Multiple Myeloma. *Frontiers in immunology*, 19(11), 1155. doi:10.3389/fimmu.2020.01155
 14. Butreddy, A., Janga, K. Y., Ajjarapu, S., Sarabu, S., & Dudhipala, N. (2021). Instability of therapeutic proteins - An overview of stresses, stabilization mechanisms and analytical techniques involved in lyophilized proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 309-325. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.188
 15. Byrne, B., Beattie, J. W., Song, C. L., & Kazarian, S. G. (2020). ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging of proteins. Bo Y. Ozaki, M. Baranska, I. K. Lednev, & B. R. Wood (Yp.), *Vibrational Spectroscopy in Protein Research: From Purified Proteins to Aggregates and Assemblies* (стр. 1–22). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-818610-7.00001-3
 16. Caserta E., C. J. (2018). Copper 64-labeled daratumumab as a PET/CT imaging tracer for multiple myeloma. *Blood*, 137(7), 741-745. doi:10.1182/blood-2017-09-807263
 17. Castelli, M. S., McGonigle, P., & Hornby, P. J. (2019). The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacology Research & Perspectives*, 7(6), e00535. doi:10.1002/prp2.535
 18. Cheng, Y., Duong, H. T., Hu, Q., Shameem, M., & Tang, X. (2025). Practical advice in the development of a lyophilized protein drug product. *Antibody Therapeutics*, 8(1), 13-25. doi:10.1093/abt/tbae030
 19. Chomet, M., van Dongen, G. A., & Vugts, D. J. (2021). State of the Art in Radiolabeling of Antibodies with Common and Uncommon Radiometals for Preclinical and Clinical

- Immuno-PET. *Bioconjugate Chemistry*, 32(7), 1315-1330. doi:10.1021/acs.bioconjchem.1c00136
20. Cleland, J. L., Lam, X., Kendrick, B., Yang, J., Yang, T. H., Overcashier, D., Carpenter, J. F. (2001). A specific molar ratio of stabilizer to protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(3), 310-321. doi:10.1002/1520-6017(200103)90:3<310::AID-JPS6>3.0.CO;2-R
21. ClinicalTrials.gov. (2008). *Study of CD38 Monoclonal Antibody HuMax-CD38 (Daratumumab) in Multiple Myeloma (NCT00574288)*. Преземено September 15, 2025 од <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00574288?term=daratumumab%20OR%20humax-cd38&viewType=Table&rank=1>
22. ClinicalTrials.gov. (2014). *A Study of Daratumumab plus Lenalidomide and Dexamethasone in Participants With Newly Diagnosed Multiple Myeloma Who Are Ineligible for Autologous Stem Cell Transplantation (NCT02195479)*. Преземено September 15, 2025 од <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT02195479>
23. ClinicalTrials.gov. (2014). *Study to Assess Daratumumab in Combination With Bortezomib, Dexamethasone, and Lenalidomide in Subjects With Multiple Myeloma (NCT02076009)*. Преземено September 2025, 2025 од <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02076009>
24. ClinicalTrials.gov. (2018). *A Study to Evaluate Daratumumab in Combination With Lenalidomide and Dexamethasone vs Lenalidomide and Dexamethasone Alone in Participants With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma (NCT01985126)*. Преземено September 15, 2025 од <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01985126>
25. Committee, N. P. (2021). *A standard protocol for deriving and assessment of stability, part 2: aseptic preparations (biopharmaceuticals)*. NHS Pharmaceutical Quality Assurance Committee. Преземено 12 6, 2025 од <https://www.sps.nhs.uk/wp-content/uploads/2017/03/Stability-Part-2-Biopharmaceuticals-v5.pdf>
26. Cooper, M. S., Ma, M. T., Sunassee, K., Shaw, K. P., Williams, J. D., Paul, R. L., Donnelly, P. S., & Blower, P. J. (2012). Comparison of ⁶⁴Cu-Complexing Bifunctional Chelators for Radioimmunoconjugation: Labeling Efficiency, Specific Activity, and in Vitro/in Vivo Stability. *Bioconjugate Chemistry*, 23(5), 1029-1039. doi:10.1021/bc300037w

27. Corporation, W. (2023). *XBridge Premier Protein SEC Columns*. Milford, MA: Waters Corporation. <https://www.waters.com/>
28. Dai, L., Davis, J., Nagapudi, K., Mantik, P., Zhang, K., Pellett, J. D., & Wei, B. (2024). Predicting Long-Term Stability of an Oral Delivered Antibody Drug Product with Accelerated Stability Assessment Program Modeling. *Molecular Pharmaceutics*, 21(1), 325-332. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.3c00877
29. Dash, A., Pillai, M. R., & Knapp, F. F. (2015). Production of ¹⁷⁷Lu for Targeted Radionuclide Therapy. *Current Radiopharmaceuticals*, 8(2), 67-82. doi:10.2174/18744711008666150501100329
30. Dawicki, W. A. (2019). Daratumumab-225Actinium conjugate demonstrates greatly enhanced antitumor activity against experimental multiple myeloma tumors. *Oncoimmunology*, 8(8), 1607673. doi:10.1080/2162402X.2019.1607673
31. de Weers, M., Tai, Y. T., van der Veer, M. S., Bakker, J. M., Vink, T., Jacobs, D. C., Parren, P. W. (2011). Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *Journal of Immunology*, 186(3), 1840-1848. doi:10.4049/jimmunol.1003032
32. Derrien, A., Gouard, S., Maurel, C., Gaugler, M.-H., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Faivre-Chauvet, A., Classe, J.-M., & Chérel, M. (2015). Therapeutic Efficacy of Alpha-RIT Using a ²¹³Bi-Anti-hCD138 Antibody in a Mouse Model of Ovarian Peritoneal Carcinomatosis. *Frontiers in Medicine*, 2, 88. doi:10.3389/fmed.2015.00088
33. DiLillo, D. J., & Ravetch, J. V. (2015). Fc-Receptor Interactions Regulate Both Cytotoxic and Immunomodulatory Therapeutic Antibody Effector Functions. *Cancer Immunology Research*, 3(7), 704–713. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0120
34. Dimopoulos, M. A., Oriol, A., Nahi, H., San-Miguel, J., Bahlis, N. J., Usmani, S. Z., Rabin, N., Orlowski, R. Z., Komarnicki, M., Suzuki, K., Plesner, T., Yoon, S.-S., Ben Yehuda, D., Richardson, P. G., Goldschmidt, H., Reece, D., Lisby, S., Khokhar, N. Z., O'Rourke, L., Chiu, C., Qin, X., Guckert, M., Ahmadi, T., & Moreau, P. (2016). Daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone for multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*, 375(14), 1319–1331. doi:10.1056/NEJMoa1607751.
35. DrugBank. (2025). *Daratumumab (DB09331) – uses, interactions, mechanism of action*. Преземено September 15, 2025 од <https://go.drugbank.com/drugs/DB09331>

36. Duralliu, A. M. (2020). The influence of moisture content and temperature on the long-term storage stability of freeze-dried high concentration immunoglobulin G (IgG). *Pharmaceutics*, 12(4). doi:10.3390/pharmaceutics12040303
37. European Medicines Agency. (2024). *Darzalex: Summary of Product Characteristics*. European Medicines Agency (EMA). Преземено од https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/darzalex-epar-product-information_en.pdf
38. European Medicines Agency. (2025). *Adcetris (brentuximab vedotin): An overview of Adcetris and why it is authorised in the EU*. European Medicines Agency. Преземено 03 27, 2026 од https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/adcetris-epar-medicine-overview_en.pdf
39. European Medicines Agency. (2025, September 17). *Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin): An overview of Mylotarg and why it is authorised in the EU*. European Medicines Agency. Преземено 5 11, 2026 од European Medicines Agency: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/mylotarg-epar-summary-public_en.pdf
40. Eychenne, R., Alliot, C., Gestin, J.-F., & Guérard, F. (2021). Radiolabeling Chemistry with Heavy Halogens Iodine and Astatine. *Biomedical Sciences*. doi:10.1016/B978-0-12-822960-6.00013-2
41. Fan, Q., Chen, H., Wei, G., Wei, D., Wang, Z., Zhang, L., Wang, J., & Zhu, M. (2025). A review of conjugation technologies for antibody drug conjugates. *Antibody Therapeutics*, 8(2), 157-170. doi:10.1093/abt/tbaf010
42. Fang, R., Bogner, R. H., Nail, S. L., & Pikal, M. J. (2020). Stability of Freeze-Dried Protein Formulations: Contributions of Ice Nucleation Temperature and Residence Time in the Freeze-Concentrate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(6), 1896-1904. doi:10.1016/j.xphs.2020.02.014
43. Feiner, I. V. J., Longo, B., Gómez-Vallejo, V., Calvo, J., Chomet, M., Vugts, D. J., Windhorst, A. D., Padro, D., Zanda, M., Rejc, L., & Llop, J. (2021). Comparison of analytical methods for antibody conjugates with application in nuclear imaging – Report from the trenches. *Nuclear Medicine and Biology*. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2021.08.001
44. Fichou, N., Gouard, S., Maurel, C., Barbet, J., Ferrer, L., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., Faivre-Chauvet, A., Bigot-Corbel, E., Davodeau, F., Gaschet, J., &

- Chérel, M. (2015). Single-Dose Anti-CD138 Radioimmunotherapy: Bismuth-213 is More Efficient than Lutetium-177 for Treatment of Multiple Myeloma in a Preclinical Model. *Frontiers in Medicine*, 2, 76. doi:10.3389/fmed.2015.00076
45. FreeThink Technologies. (н.д.). *ASAP prime® Stability Testing Software*. Преземено 14/09/2025 од <https://freethinktech.com/stability-modeling-software/>
46. Frieder, D., Larijani, M., Tang, E., Parsa, J.-Y., Basit, W., & Martin, A. (2006). Antibody diversification: mutational mechanisms and oncogenesis. *Immunological Research*, 35(1-2), 75-88. doi:10.1385/IR:35:1:75
47. Gallagher, S. R. (2012). One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 68(1), 10.1.1–10.1.44. doi:10.1002/0471140864.ps1001s68
48. Garidel, P. (2004). What can we learn from infrared spectroscopy for the development of protein formulations? Bo A. K. Banga, *Formulation and Drug Delivery Strategies for Biopharmaceuticals* (стр. 1-21). Stuttgart: CRC Press / IBC Life Sciences.
49. Garidel, P., Pevestorf, B., & Bahrenburg, S. (2015). Stability of buffer-free freeze-dried formulations: A feasibility study of a monoclonal antibody at high protein concentrations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 125-139. doi:10.1016/j.ejpb.2015.09.017
50. Gattei, V., Godeas, C., Degan, M., Rossi, F. M., Aldinucci, D., & Pinto, A. (1999). Characterization of anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells. *British Journal of Haematology*, 104(1), 152-162. doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01132.x
51. Ghai, A. M. (2018). Preclinical Development of CD38-Targeted [89Zr]Zr-DFO-Daratumumab for Imaging Multiple Myeloma. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 59(2), 216-222. doi:10.2967/jnumed.117.196063
52. Gillings, Nic; Todde, Sergio; Behe, Martin; Decristoforo, Clemens; Elsinga, Philip; Ferrari, Valentina; Hjelstuen, Olaug; Kolenc Peitl, Petra; Koziorowski, Jacek; Laverman, Peter; Mindt, Thomas L.; Ocak, Meltem; Patt, Mariann. (2020). EANM guideline on the validation of analytical methods for radiopharmaceuticals. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, 5, 7. doi:10.1186/s41181-019-0086-z
53. Gjorgieva Ackova, D., Smilkov, K., Janevik-Ivanovska, E., Stafilov, T., Arsova-Sarafinovska, Z., & Makreski, P. (2015). Evaluation of non-radioactive lutetium- and

- yttrium-labeled immunoconjugates of rituximab – A vibrational spectroscopy study. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 34(2), 351-362. doi:10.20450/mjcce.2015.627
54. Gomes Marin, J. F., Nunes, R. F., Coutinho, A. M., Zaniboni, E. C., Costa, L. B., Barbosa, F. G., Queiroz, M. A., Cerri, G. G., & Buchpiguel, C. A. (2020). Theranostics in Nuclear Medicine: Emerging and Re-emerging Integrated Imaging and Therapies in the Era of Precision Oncology. *RadioGraphics*, 40(6), 1715-1740. doi:10.1148/rg.2020200021
55. Gouard, S., Maurel, C., Marionneau-Lambot, S., Dansette, D., Bailly, C., Guérard, F., Chouin, N., Haddad, F., Alliot, C., Gaschet, J., Eychenne, R., Kraeber-Bodéré, F., & Chérel, M. (2020). Targeted-Alpha-Therapy Combining Astatine-211 and anti-CD138 Antibody in a Preclinical Syngeneic Mouse Model of Multiple Myeloma Minimal Residual Disease. *Cancers*, 12(9), 2721. doi:10.3390/cancers12092721
56. Gracheva, N., Müller, C., Talip, Z., Heinitz, S., Köster, U., Zeevaart, J. R., Vögele, A., Schibli, R., & van der Meulen, N. P. (2019). Production and characterization of no-carrier-added ¹⁶¹Tb as an alternative to the clinically-applied ¹⁷⁷Lu for radionuclide therapy. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, 4(12), 1-15. doi:10.1186/s41181-019-0063-6
57. Guérard, F., Gustin, J.-F., & Brechbiel, M. W. (2013). Production of [(211)At]-Astatinated Radiopharmaceuticals and Applications in Targeted Alpha-Particle Therapy. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 28(1), 1-20. doi:10.1089/cbr.2012.1292
58. Hawe, A., Kasper, J. C., Friess, W., & Jiskoot, W. (2009). Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze-thawing and thermal stress. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(2), 79-87. doi:10.1016/j.ejps.2009.06.001
59. Hermanson, G. T. (2008). *Bioconjugate Techniques* (2nd изд.). Academic Press. Преземено од <https://shop.elsevier.com/books/bioconjugate-techniques/hermanson/978-0-12-370501-3>
60. Horn, J., Schanda, J., & Friess, W. (2018). Impact of fast and conservative freeze-drying on product quality of protein-mannitol-sucrose-glycerol lyophilizates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127, 342–354. doi:10.1016/j.ejpb.2018.03.003

61. Huelsmeyer, M., Kuzman, D., Bončina, M., Martinez, J., Steinbrugger, C., Weusten, J., Calero-Rubio, C., Roche, W., Niederhaus, B., VanHaelst, Y., Hrynyk, M., Ballesta, P., Achard, H., Augusto, S., Guillois, M., Pszczolinski, C., Gerasimov, M., Neyra, C., Ponduri, D., Ramesh, S., & Clénet, D. (2023). A universal tool for stability predictions of biotherapeutics, vaccines and in vitro diagnostic products. *Scientific Reports*, 13, 10077. doi:10.1038/s41598-023-35870-6
62. International Atomic Energy Agency. (2024, 5 8). *160Gd(d,n)161Tb*. <https://www-nds.iaea.org/medical/gdd61tb8.html>
63. International Atomic Energy Agency. (2024). *Production and Quality Control of Actinium-225 Radiopharmaceuticals*. Vienna: International Atomic Energy Agency. doi:10.61092/iaea.95h3-2ji2
64. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (1995). *ICH Q5C*. Преземено од <https://www.ich.org/page/ich-guidelines: QUALITY OF BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS: STABILITY TESTING OF BIOTECHNOLOGICAL/BIOLOGICAL PRODUCTS Q5C>
65. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2003). *ICH Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products*. Преземено 6 16, 2026 од ICH Quality Guidelines: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
66. Tintor, Đ., Ninković, K., Milošević, J., & Polović, N. Đ. (2024). Gaining insight into protein structure via ATR-FTIR spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 134, 103726. doi:10.1016/j.vibspec.2024.103726
67. Jameel, F., Alexeenko, A., Bhambhani, A., Sacha, G., Zhu, T., Tchessalov, S., Sharma, P., Moussa, E., Iyer, L., Luthra, S., Srinivasan, J., Tharp, T., Azzarella, J., Kazarin, P., & Jalal, M. (2021). Recommended Best Practices for Lyophilization Validation 2021 Part II: Process Qualification and Continued Process Verification. *AAPS PharmSciTech*, 22(8), 266. doi:10.1208/s12249-021-02107-6
68. Jefferis, R. (2007). Antibody therapeutics: isotype and glycoform selection. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7(9), 1401-1413. doi:10.1517/14712598.7.9.1401
69. Jiang, Y., Li, C., Nguyen, X., Muzammil, S., Towers, E., Gabrielson, J., & Narhi, L. (2011). Qualification of FTIR spectroscopic method for protein secondary structural

- analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(11), 4631–4641. doi:10.1002/jps.22686
70. Källsten, M., Hartmann, R., Artemenko, K., Bergström Lind, S., Lehmann, F., & Bergquist, J. (2018). Qualitative analysis of antibody–drug conjugates (ADCs): an experimental comparison of analytical techniques of cysteine-linked ADCs. *Analyst*, 143(22), 5487–5496. doi:10.1039/C8AN01178H
71. Kang, L., Jiang, D., England, C. G., Barnhart, T. E., Yu, B., Rosenkrans, Z. T., Wang, R., Engle, J. W., Xu, X., Huang, P., & Cai, W. (2018). ImmunoPET imaging of CD38 in murine lymphoma models using 89Zr-labeled daratumumab. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 45(8), 1372–1381. doi:10.1007/s00259-018-3941-3
72. Kirley, T. L., & Norman, A. B. (2018). Unfolding of IgG domains detected by non-reducing SDS-PAGE. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(2), 944–949. doi:10.1016/j.bbrc.2018.06.100
73. Knoll, L., Thiesen, J., Klassen, M. D., Reinders, L. M., Tuerk, J., & Kraemer, I. (2023). In-use stability of ready-to-administer daratumumab subcutaneous injection solution in plastic syringes. *European Journal of Hospital Pharmacy*, 1–7. doi:10.1136/ejhpharm-2023-003928
74. Kostelnik, T. I., & Orvig, C. (2019). Radioactive main group and rare earth metals for imaging and therapy. *Chemical Reviews*, 119(2), 902–956. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00294
75. Krejcik, J. C. (2016). Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*, 128(3), 384–394. doi:10.1182/blood-2015-12-687749
76. Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., Bast, R. C., Gansler, T. S., Holland, J. F., & Frei, E. I. (2003). *Holland-Frei Cancer Medicine*. Hamilton (ON): BC Decker Inc. Преземено од <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12354/>
77. Kulkarni, S. S., Patel, S. M., & Bogner, R. H. (2020). Reconstitution Time for Highly Concentrated Lyophilized Proteins: Role of Formulation and Protein. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(10), 2975–2985. doi:10.1016/j.xphs.2020.05.029
78. Kuzman, D., Bunc, M., Ravnik, M., Reiter, F., Žagar, L., & Bončina, M. (2021). Long-term stability predictions of therapeutic monoclonal antibodies in solution using

- Arrhenius-based kinetics. *Scientific Reports*, 11, 20534. doi:10.1038/s41598-021-99875-9
79. Le Basle, Y., Chennell, P., Tokhadze, N., Astier, A., & Sautou, V. (2020). Physicochemical stability of monoclonal antibodies: A review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(1), 169-190. doi:10.1016/j.xphs.2019.08.009
80. Legrand, P., Dufaÿ, S., Mignet, N., Houzé, P., & Gahoual, R. (2023). Modeling study of long-term stability of the monoclonal antibody infliximab and biosimilars using liquid-chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(1), 179-192. doi:10.1007/s00216-022-04396-7
81. Lennard, A., Zimmermann, B., Clenet, D., Molony, M., Tami, C., Oliva Aviles, C., Moran, A., Pue-Gilchrist, P., & Flores, E. (2024). Stability modeling methodologies to enable earlier patient access. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 113(12), 3406–3412. doi:10.1016/j.xphs.2024.09.018
82. Li, T., DiLillo, D. J., Bournazos, S., Giddens, J. P., Ravetch, J. V., & Wang, L.-X. (2017). Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(13), 3485–3490. doi:10.1073/pnas.1702173114
83. Li, Z., Woo, C. J., Iglesias-Ussel, M. D., Ronai, D., & Scharff, M. D. (2004). The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes & Development*, 18(1), 1-11. doi:10.1101/gad.1161904
84. Lim, C. Y., Owens, N. A., Wampler, R. D., Ying, Y., Granger, J. H., Porter, M. D., Takahashi, M., & Shimazu, K. (2014). Succinimidyl Ester Surface Chemistry: Implications of the Competition between Aminolysis and Hydrolysis on Covalent Protein Immobilization. *Langmuir*, 30(43), 12868-12878. doi:10.1021/la503439g
85. Liu, S. (2008). Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(12), 1347–1370. doi:10.1016/j.addr.2008.04.006
86. Lokhorst, H. M., Plesner, T., Laubach, J. P., Nahi, H., Gimsing, P., Hansson, M., Minnema, M. C., Lassen, U., Krejcik, J., Palumbo, A., van de Donk, N. W. C. J., Ahmadi, T., Khan, I., Uhlar, C. M., Wang, J., Sasser, A. K., Losic, N., Lisby, S., Basse, L., Brun, N., & Richardson, P. G. (2015). Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*, 373(13), 1207-1219. doi:10.1056/NEJMoa1506348

87. Luo, L., Meleties, M., Beaudet, J., Cao, Y., Wang, W., Hu, Q., Sidnam, S., Lastro, M., Liu, D., & Shameem, M. (2025). Prediction of long-term stability of high-concentration formulations to support rapid development of antibodies against SARS-CoV-2. *mAbs*, 17(1), 2471465. doi:10.1080/19420862.2025.2471465
88. Morais, M., & Ma, M. T. (2018). Site-specific chelator-antibody conjugation for PET and SPECT imaging with radiometals. *Drug Discovery Today: Technologies*, 30, 91-104. doi:10.1016/j.ddtec.2018.10.002
89. Morgenstern, A., Apostolidis, C., Kratochwil, C., Sathekge, M., Krolicki, L., & Bruchertseifer, F. (2018). An Overview of Targeted Alpha Therapy with ²²⁵Actinium and ²¹³Bismuth. *Current Radiopharmaceuticals*, 11(3), 200-208. doi:10.2174/1874471011666180502104524
90. Mou, X., Yang, X., Li, H., Ambrogelly, A., & Pollard, D. J. (2014). A high throughput ultra performance size exclusion chromatography assay for the analysis of aggregates and fragments of monoclonal antibodies. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 2(2), 141-156. doi:10.2217/PBP.14.7
91. National Library of Medicine. (1995). *MeSH*. <https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?ui=D018796>
92. National Cancer Institute. (n.d.). Radioimmunoconjugate. NCI Dictionary of Cancer Terms. Пристапено на август 18, 2026, <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/radioimmunoconjugate>
93. Nijhof, I. S., Groen, R. W., Lokhorst, H. M., van Kessel, B., Bloem, A. C., van Velzen, J., & al. (2016). CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. *Blood*, 128(7), 959-970. doi:10.1182/blood-2016-02-690264
94. Nooka, A. K., Kaufman, J. L., Hofmeister, C. C., Joseph, N. S., Heffnep, T. L., Gupta, V. A., & Lonial, S. (2019). Daratumumab in multiple myeloma. *Cancer*, 125(14), 2364-2382. doi:10.1002/cncr.32065
95. Overdijk, M. B. (2016). The therapeutic CD38 monoclonal antibody daratumumab induces programmed cell death via Fcγ receptor-mediated cross-linking. *Blood*, 127(10), 1329-1339. doi:10.1182/blood-2015-06-652412
96. Parakh, S., Lee, S. T., Gan, H. K., & Scott, A. M. (2022). Radiolabeled antibodies for cancer imaging and therapy. *Cancers*, 14(6), 1454. doi:10.3390/cancers14061454

97. Patel, S. M., Nail, S. L., Pikal, M. J., Geidobler, R., Winter, G., Hawe, A., Davagnino, J., & Rambhatla Gupta, S. (2017). Lyophilized Drug Product Cake Appearance: What Is Acceptable? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(7), 1706-1721. doi:10.1016/j.xphs.2017.03.014
98. Pelton, J. T., & McLean, L. R. (2000). Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Analytical Biochemistry*, 277(2), 167-176. doi:10.1006/abio.1999.4320
99. Pereira, N. A., Chan, K. F., Lin, P. C., & Song, Z. (2018). The “less-is-more” in therapeutic antibodies: Afucosylated anti-cancer antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *MAbs*, 10(5), 693-711. doi:10.1080/19420862.2018.1466767
100. Price, E. W., & Orvig, C. (2014). Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chemical Society Reviews*, 43(1), 260-290. doi:10.1039/C3CS60304K
101. Pyzik, M., Kozicky, L. K., Gandhi, A. K., & Blumberg, R. S. (2023). The therapeutic age of the neonatal Fc receptor. *Nature Reviews Immunology*, 23(7), 415-432. doi:10.1038/s41577-022-00821-1
102. Qiu, F., Wu, Y., Hahn, D., McMahon, M., Orr, R., Webb, D., Debie, E., Sechler, L., Williams, H., Stephens, D., & Hoaglund Hyzer, C. (2017). *Risk-Based Predictive Stability—An Industry Perspective*. Преземено February 3, 2026 од Pharmaceutical Technology: <https://www.pharmtech.com/view/risk-based-predictive-stability-industry-perspective>
103. Quelven, I., Monteil, J., Sage, M., Saidi, A., Mounier, J., Bayout, A., Garrier, J., Cogne, M., & Durand-Panteix, S. (2020). 212Pb α -Radioimmunotherapy Targeting CD38 in Multiple Myeloma: A Preclinical Study. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 61(7), 1058-1065. doi:10.2967/jnumed.119.239491
104. Rack, C. (2017, August 15). *An Introduction to the Accelerated Stability Assessment Program*. Преземено February 3, 2026 од American Pharmaceutical Review: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/341253-An-Introduction-to-the-Accelerated-Stability-Assessment-Program-ASAP>

105. Roy, M. L. (1992). The effects of formulation and moisture on the stability of a freeze-dried monoclonal antibody-vinca conjugate: A test of the WLF glass transition theory. *Developments in Biological Standardization*, 74, 323-339.
106. Sane, P. B. (2020). Reconstitution of highly concentrated lyophilized proteins: Part 1. Amorphous formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(5), 1681–1691. doi:10.1016/j.xphs.2020.02.006
107. Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 suppl.), S41–S52. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046
108. Schüle, S., Frieß, W., Bechtold-Peters, K., & Garidel, P. (2007). Conformational analysis of protein secondary structure during spray-drying of antibody/mannitol formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(1), 1-9. doi:10.1016/j.ejpb.2006.08.014
109. Seyedi, S. S., Parvin, P., Jafargholi, A., Hashemi, N., Tabatabaee, S. M., Abbasian, A., & Khorrami, A. (2020). Spectroscopic properties of various blood antigens/antibodies. *Biomedical Optics Express*, 11(4), 2298-2312. doi:10.1364/BOE.387112
110. Shalae, E., Ohtake, S., Moussa, E. M., Searles, J., Nail, S., & Roberts, C. J. (2023). Accelerated storage for shelf-life prediction of lyophiles: Temperature dependence of degradation of amorphous small molecular weight drugs and proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112(6), 1509–1522. doi:10.1016/j.xphs.2023.02.008
111. Sharkey, R. M. (2008). Use of antibodies and immunoconjugates for the therapy of more accessible cancers. *Advanced drug delivery reviews*, 60(12), 1407-1420. doi:10.1016/j.addr.2008.04.011.
112. Shipp, D. W., Sinjab, F., & Notingher, I. (2017). Raman spectroscopy: techniques and applications in the life sciences. *Advances in Optics and Photonics*, 9(2), 315–428. doi:10.1364/AOP.9.000315
113. Smaglo, B. G., Aldeghaither, D., & Weiner, L. M. (2014). The development of immunoconjugates for targeted cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11(11), 637–648. doi:10.1038/nrclinonc.2014.159
114. Staub, A., Guilleme, D., Schappler, J., Veuthey, J.-L., & Rudaz, S. (2011). A high throughput ultra performance size exclusion chromatography assay for the analysis of

- aggregates and fragments of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography A*, 1218(27), 4071–4079. doi:10.1016/j.chroma.2011.05.050
115. Stephanopoulos, N., & Francis, M. B. (2011). Choosing an effective protein bioconjugation strategy. *Nature Chemical Biology*, 7(12), 876–884. doi:10.1038/nchembio.720
116. Sterjova, M., Džodić, P., Makreski, P., Živković, J., & Janevik-Ivanovska, E. (2019). Electrophoresis and Raman spectroscopy characterization of integrity and secondary structure of p-SCN-Bn-DTPA- and p-SCN-Bn-1B4M-DTPA-conjugated trastuzumab. *Farmacia*, 67(4), 621–626.
117. Telikepalli, S. N., Kumru, O. S., Kalonia, C., Esfandiary, R., Joshi, S. B., Middaugh, C. R., & Volkin, D. B. (2014). Structural characterization of IgG1 mAb aggregates and particles generated under various stress conditions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(3), 796–809. doi:10.1002/jps.23839
118. The Human Protein Atlas. (2025). *CD38 expression overview (ENSG00000004468)*. Преземено September 15, 2025 од <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000004468-CD38>
119. Thiagarajan, G., Semple, A., James, J. K., Cheung, J. K., & Shameem, M. (2016). A comparison of biophysical characterization techniques in predicting monoclonal antibody stability. *mAbs*, 8(6), 1088–1097. doi:10.1080/19420862.2016.1189048
120. Tiernan, H., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2020). ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 241, 118636. doi:10.1016/j.saa.2020.118636
121. Tsuchikama, K., & An, Z. (2018). Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein & Cell*, 9(1), 33–46. doi:10.1007/s13238-016-0323-0
122. U.S. Food and Drug Administration. (2020). *Clinical pharmacology and chemistry review: Darzalex (daratumumab)*. U.S. Department of Health and Human Services. Преземено од https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2020/761145Orig1s000ChemR.pdf

123. United States Pharmacopeial Convention. (2026). 〈790〉 Visible Particulates in Injections. Bo *United States Pharmacopeia and National Formulary / USP–NF*. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.
124. United States Pharmacopeial Convention. (2026). 〈791〉 pH. Bo *United States Pharmacopeia and National Formulary / USP–NF*. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.
125. United States Pharmacopeial Convention. (2026). 〈921〉 Water Determination. Bo *United States Pharmacopeia and National Formulary / USP–NF*. United States Pharmacopeial Convention.
126. van de Donk, N. W., & Usmani, S. Z. (2018). CD38 antibodies in multiple myeloma: Mechanisms of action and modes of resistance. *Frontiers in Immunology*, 9, 2134. doi:10.3389/fimmu.2018.02134
127. van Haaren, C., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2024). Study of monoclonal antibody aggregation at the air–liquid interface under flow by ATR-FTIR spectroscopic imaging. *Langmuir*, 40(11), 5858–5868. doi:10.1021/acs.langmuir.3c03730
128. Vanermen, M., Ligeour, M., Oliveira, M.-C., Gestin, J.-F., Elvas, F., Navarro, L., & Guérard, F. (2024). Astatine-211 radiolabelling chemistry: From basics to advanced biological applications. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, 9, 13. doi:10.1186/s41181-024-00298-4
129. Verkleij, C. P., Frerichs, K. A., Broekmans, M. E., Duetz, C., O'Neill, C. A., Bruins, W. S., Homan-Weert, P. M., Minnema, M. C., Levin, M.-D., Broijl, A., Bos, G. M. J., Kersten, M. J., Klein, Abraham, Y. (2023). NK Cell Phenotype Is Associated With Response and Resistance to Daratumumab in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Hemasphere*, 7(5), e881. doi:10.1097/HS9.0000000000000881
130. Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5, 520. doi:10.3389/fimmu.2014.00520
131. Vogel, W. V., van der Marck, S. C., & Versleijen, M. W. (2021). Challenges and future options for the production of lutetium-177. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 48(8), 2329-2335. doi:10.1007/s00259-021-05392-2
132. Walsh, S. J., Bargh, J. D., Dannheim, F. M., Hanby, A. R., Seki, H., Counsell, A. J., Ou, X., Fowler, E., Ashman, N., Takada, Y., Isidro-Llobet, A., Parker, J. S., Carroll, J.

- S., & Spring, D. R. (2021). Site-selective modification strategies in antibody–drug conjugates. *Chemical Society Reviews*, 50, 1305–1353. doi:10.1039/D0CS00310G
133. Wang, W. (2000). Lyophilization and Development of Solid Protein Pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 203(1-2), 1-60. doi:10.1016/S0378-5173(00)00423-3
134. Wang, W., Erbe, A. K., Hank, J. A., Morris, Z. S., & Sondel, P. M. (2015). NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 6, 368. doi:10.3389/fimmu.2015.00368
135. Waterman, K. C. (2011). The Application of the Accelerated Stability Assessment Program (ASAP) to Quality by Design (QbD) for Drug Product Stability. *AAPS PharmSciTech*, 12(3), 932–937. doi:10.1208/s12249-011-9657-3
136. Williams, H. (2018). Predictive Stability Testing Utilizing Accelerated Stability Assessment Program (ASAP) Studies. Bo S. Bajaj, & S. Singh, *Methods for Stability Testing of Pharmaceuticals* (стр. 213-232). New York: Humana Press. doi:10.1007/978-1-4939-7686-7_10
137. Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A., & Yu, S. (2015). Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nature Protocols*, 10(3), 382–396. doi:10.1038/nprot.201.024
138. Yeong, C.-H., Cheng, M.-H., & Ng, K.-H. (2014). Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: Current and future prospects. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 15(10), 845-863. doi:10.1631/jzus.B1400131
139. Zalutsky, M. R., & Pruszynski, M. (2011). Astatine-211: Production and Availability. *Current Radiopharmaceuticals*, 4(3), 177-185. doi:10.2174/1874471011104030177
140. Ziccheddu, B., Bosi, A., Cascavilla, N., et al. (2024). Genomic and immune determinants of resistance to daratumumab-based therapy in relapsed refractory multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*, 14(1):117. doi: 10.1038/s41408-024-01096-6.
141. Агенцијата за лекови и медицински средства на Република С. Македонија (МАЛМЕД). (2007). Преземено од: <https://malmed.gov.mk/%d0%b7%d0%b0%d0%ba%d0%be%d0%bd%d0%b8/>