

Making a fragile peptide measurable and usable as an injectable drug

Psoriasis is described as a skin disease, the immune system and sensory nerves help shape the disease process. Calcitonin gene-related peptide, shortened to CGRP, is one of the nerve-derived signaling molecules that is linked to skin inflammation. A shortened fragment of the peptide, called CGRP 8-37, can block some signaling caused by the whole version of CGRP. That makes it interesting as a research molecule and as a possible starting point for a future treatment strategy.

Before a peptide like CGRP 8-37 can become a realistic medicine, two practical questions need to be answered. First, can the peptide be measured, detected and observed in a reliable manner? Second, can it be formulated in a liquid that stays stable and works for injection under the skin? This thesis focused on those two questions.

The development part tested how CGRP 8-37 behaved after being dissolved in different liquid vehicles and observed what happened when they were stored over time, regarding stability. The peptide did not behave like a table salt or sugar dissolved in water. Its apparent stability depended on concentration, the vehicle used to dissolve the peptide and contact with container surfaces that the samples came into contact with, such as storage vials. Low-concentration samples often lost measurable signal more strongly than higher-concentration samples. This led to an experiment where a protein called BSA was used to coat the inside of the storage vials, acting as a barrier between the peptide and the glass vial. The goal was to see if the peptide was getting stuck to the vials and therefore not getting detected when the samples were getting measured. In theory this matters more with lower concentration samples since only a set amount of peptide can get stuck to the containers before there is no more space for the peptide to stick to, for higher concentration samples this amount could be neglectable, but for smaller concentration samples most of the peptide could get stuck to the container vials. The results were that samples stored in BSA-coated vials gave higher signal in several conditions, which points toward that the peptide is sticking to glass or vial surfaces as one source of peptide loss.

The analytical part used HPLC, a machine that can be used to separate and quantify chemicals. For formulation samples and LC-MS, a machine that can separate and quantify like the HPLC, but can also identify chemicals, for blood-matrix experiments. HPLC worked as a practical tool for formulation and stability screening. In pilot experiments, CGRP and CGRP 8-37 signals changed rapidly after blood contact. In one experiment, signal decreased strongly between 30 seconds and 10 minutes. In another, an inhibitor-containing preparation gave unexpectedly high CGRP 8-37 signal while CGRP stayed low. These results do not yet give reliable concentrations in blood. They however show why blood sampling needs tighter control before volunteer or patient samples are analyzed.

The main conclusion is that CGRP 8-37 development is dependent on analytical control. A stable formulation cannot be judged if the method loses peptide to surfaces or sample preparation. Blood levels cannot be interpreted if the peptide changes during handling. The next research step should combine rapid blood quenching, internal standards for LC-MS, pH and osmolality testing, and long-term formulation stability studies.

Að gera viðkvæmt peptíð mælanlegt og nothæft sem sprautulyf

Psoriasis er lýst sem húðsjúkdómi, en ónæmiskerfið og skyntaugar taka einnig þátt í sjúkdómsferlinu. Calcitonin gene related peptide, skammstafað CGRP, er eitt af þeim boðefnum sem taugakerfið getur losað, en það getur haft áhrif á æðar, húð og ónæmissvör líkamans. CGRP 8-37 er minnuð útgáfa af CGRP og getur hindrað CGRP-tengdar boðleiðir. Þess vegna er það áhugavert í rannsóknum á sjúkdómum þar sem taugar, bólga og húðvefur tengjast.

Áður en peptíð eins og CGRP 8-37 getur orðið að raunhæfum stungulyfjakosti þarf að komast að gera tvennt. Í fyrsta lagi þarf að vera hægt að mæla peptíðið með áreiðanlegum hætti. Í öðru lagi þarf að leysa það upp í vökva sem helst stöðugur við geymslu og við meðhöndlun. Oft getur verið erfitt að vinna með peptíð, þar sem þau geta brotnað niður, loðað við gler eða plast, myndað agnir eða fallið út úr lausn.

Í fyrsta hluta verkefnisins var skoðað hvernig CGRP 8-37 hegðaði sér eftir að það var leyst upp í mismunandi vökvum og geymt yfir tíma. Peptíðið hegðaði sér ekki eins og borðsalt eða sykur í vatni. Stöðugleiki þess virtist ráðast af styrk, leysivökva og snertingu við yfirborð í ílátum. Sýni með lágan styrk töpuðu oft mælanlegu merki hlutfallslega meira en sýni með hærri styrk. Sýni sem voru geymd í glösum húðuðum með BSA, próteini sem getur minnkað hlutfall peptíða sem festast við yfirborð á glers og tilraunaglasa, með því að búa til filmu á milli glasis og peptíðins. Magn peptíða sem festist við yfirborð skiptir yfirleitt meira máli í sýnum með minni styrk, þar sem aðeins ákveðið magn peptíðsins getur fest sig við yfirborðið áður en ekkert pláss er til staðar fyrir fleiri peptíð að festa sig. Í sýnum með hærri styrk getur þessi yfirborðsfesting haft hverfandi áhrif, en í sýnum með veikari styrk getur það gerst að allt peptíðið festist við yfirborðið. Niðurstöðurnar voru að í sumum tilvikum var herra mælanlegt magn þegar mæliglös voru húðuð með BSA. Það bendir til þess að hluti tapsins geti stafað af því að peptíðið festist við ílátið frekar en að það brotni aðeins niður.

Í greiningarhluta verkefnisins var HPLC, mælitæki sem getur aðskilið og magngreint efni, notað fyrir mótunar- og stöðugleikasýni. LC-MS, mælitæki sem getur aðskilið og magngreint eins og HPLC en einnig borið kennsl á efni, var notað fyrir tilraunir með blóðsýni. HPLC reyndist gagnlegt tæki til að fylgjast með mótunar- og stöðugleikasýnum. Í forprófunum með blóðsýni reyndist hins vegar erfitt að mæla CGRP og CGRP 8-37 með fullnægjandi áreiðanleika. Blóð er flókið sýni. Ensím geta brotið niður peptíð eftir sýnatöku og mismunandi meðhöndlun sýna getur breytt því magni sem mælist. Þess vegna ætti að líta á blóðtilraunirnar í þessu verkefni sem aðferðarþróun, en ekki sem endanlega mælingu á peptíðmagni í fólki.

Meginniðurstaðan er sú að þróun á CGRP 8-37 byggir á góðri greiningarstjórnun. Ekki er hægt að meta stöðuga lyfjaformúleringu ef mæliaðferðin tapar peptíðinu í yfirborð, sýnameðhöndlun eða undirbúningi. Það er ekki heldur hægt að draga ályktanir um magn peptíðs í blóði fyrr en aðferðin nær betri stjórn á niðurbroti við sýnameðhöndlun og endurheimt. Næstu skref ættu því að vera skýr: bæta blóðsýnameðhöndlun, þróa LC-MS aðferð með innri staðli og rannsaka betur sýrustig, osmósupéttni, síun og geymslustöðugleika fyrir áframhaldandi þróun CGRP 8-37.