

# STABILNOST TERAPEVTSKIH PROTEINOV

## STABILITY OF THERAPEUTIC PROTEINS

AVTOR / AUTHOR:

Asist. Žane Temova Rakuša, mag. farm.  
Izr. prof. dr. Robert Roškar, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:  
E-mail: robert.roskar@ffa.uni-lj.si

## 1 UVOD

Biološke učinkovine, med katerimi prevladujejo učinkovine peptidne in proteinske narave, so bistveno spremenile zdravljenje nekaterih resnih akutnih in kroničnih bolezni, kot so rak, avtoimunske, nalezljive in krvne bolezni (1). V primerjavi s tradicionalnimi učinkovinami sinteznega izvora so proteini bistveno večje molekule z značilno zapleteno strukturo, ki zajema več nivojev zgradbe: od primarnega aminokislinskega zaporedja, preko sekundarnih in terciarnih struktur, do kvartarne strukture v primerih proteinov, zgrajenih iz več podenot. Biološka zdravila so nova in zelo aktualna generacija zdravil, ki pa imajo zaradi zapletenosti določene omejitve: nizka biološka uporabnost, fizikalna in kemijska nestabilnost, imunogenost ter kratek plazemski razpolovni čas. Ker je biološka uporabnost proteinov običajno zelo nizka, na tržišču prevladujejo parenteralne farmaceutke oblike (npr. raztopine in suspenzije za injiciranje),

## POVZETEK

Sodobna biološka zdravila pokrivajo širok spekter uporabe v terapiji različnih bolezni. V primerjavi s tradicionalnimi učinkovinami sinteznega izvora so učinkovine peptidne in proteinske narave bistveno večje in bolj zapletene molekule. Zaradi številnih funkcionalnih skupin in različnih nivojev strukture so terapevtski proteini izpostavljeni različnim oblikam nestabilnosti, ki jih v splošnem delimo na fizikalne in kemijske. Najpogostejša oblika fizikalne nestabilnosti je denaturacija proteinov s kasnejšo agregacijo, precipitacijo in adsorpcijo na površine. Kemijska nestabilnost proteina pa vključuje oksidacijo, deamidacijo in druge manj pogoste reakcije. Obe obliki nestabilnosti imata lahko za posledico zmanjšanje biološke aktivnosti in/ali povečanje imunogenosti, zato je v okviru zagotavljanja kakovosti potrebno proučiti mehanizme nestabilnosti. V prispevku povzemamo najpogostejše mehanizme nestabilnosti in dejavnike, ki povzročajo nestabilnost, ter predlagamo ustrezne pristope k stabilizaciji proteinov.

## KLJUČNE BESEDE:

biološka zdravila, nestabilnost, terapevtski proteini, stabilizacija

## ABSTRACT

Biopharmaceuticals represent an important class of pharmaceuticals that are widely used in clinical practice. Compared to traditional synthetic active ingredients, peptide and protein molecules are substantially larger with more complex structure. Because of their unique three dimensional structures and many functional groups, therapeutic proteins are susceptible to various degradation mechanisms, which can be divided in two general classes: chemical and physical instability. The most common form of physical instability is denaturation with subsequent aggregation, precipitation and surface adsorption. Chemical instabilities include oxidation, deamidation and other less frequent reactions. Both types of instability can increase the likelihood of adverse immunogenic effects and/or result in a decreased biological activity. Therefore, characterization of instability mechanisms is a critical part of quality assurance process. The article summarizes the most common degradation mechanisms and

factors, which affect proteins stability and also discusses appropriate approaches towards protein stabilization.

**KEY WORDS:**

biopharmaceuticals, instability, therapeutic proteins, stabilization

kjer so procesi nestabilnosti proteinov še bolj izraziti. Mehanizme nestabilnosti te skupine učinkovin v splošnem delimo na fizikalne in kemijske. Pri fizikalni nestabilnosti primarna struktura proteina ostane nespremenjena, spremeni se fizikalno stanje oz. višji nivoji strukture proteina. Najpogostejši proces fizikalne nestabilnosti je denaturacija proteinov s kasnejšo agregacijo, precipitacijo in adsorpcijo na površine. Možne posledice fizikalne nestabilnosti so zmanjšanje koncentracije proteina, znižanje ali izguba biološke aktivnosti in povečana imunogenost terapevtskega proteina. Kemijska nestabilnost vključuje procese, v katerih zaradi tvorbe ali cepitve kovalentne vezi prihaja do spremembe primarne strukture proteina, posledično pa lahko spremeni tudi njegove višje strukturne nivoje. Spremenjena primarna struktura proteina lahko povzroči fizikalne spremembe proteina in pogosto vpliva tudi na učinkovitost in/ali imunogenost proteina. Kemijska nestabilnost proteina vključuje oksidacijo, deamidacijo in/ali druge manj pogoste reakcije. Neredko se oblike nestabilnosti prepletajo: kemijske spremembe lahko sprožijo fizikalno nestabilnost, oksidaciji npr. pogosto sledi agregacija ali obratno, denaturacija proteinov lahko poveča njihovo kemijsko reaktivnost (2).

Zaradi številnih funkcionalnih skupin in različnih nivojev strukture so terapevtski proteini dovzetni za spremembe, ki potekajo že pod milimi pogoji. Številni fizikalni in kemijski dejavniki lahko vplivajo na kakovost in stabilnost biofarmaceutskih izdelkov, zlasti pri dolgoročnem shranjevanju, saj bodo verjetno izpostavljeni temperaturnim spremembam, svetlobi in mehanskemu stresu zaradi dostave in shranjevanja. Zaradi tega predstavlja nestabilnost terapevtskih proteinov problem, ki se kaže v celotnem času od proizvodnje do uporabe, saj morajo terapevtski proteini ustrezati definiranim kakovostnim zahtevam do navedenega roka uporabnosti, da zagotovimo ustrezno varnost in učinkovitost zdravila.

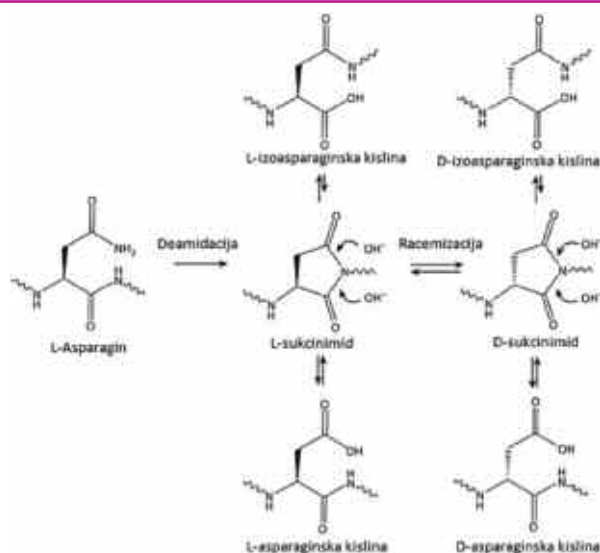
Vrednotenje stabilnosti bioloških zdravil zahteva uporabo zapletenih analiznih tehnik. Splošna načela testiranja stabilnosti biotehnoških izdelkov so navedena v okviru smernic Q5C Mednarodne konference o harmonizaciji (ICH).

Pristopi za proučevanje mehanizmov nestabilnosti kakor tudi dejavnikov, ki vplivajo na nestabilnost proteinov, so zaradi raznolikosti teh učinkovin posebej prilagojeni za posamezne proteine in temeljijo na kombinaciji ustreznih separacijskih, spektroskopskih in imunokemijskih metod (3).

## 2 KEMIJSKA NESTABILNOST PROTEINOV

### 2.1 DEAMIDACIJA

Deamidacija je ena glavnih kemijskih pretvorb peptidov in proteinov, pri kateri stranska veriga asparagina, redkeje tudi glutamina, hidrolizira do asparaginske oz. glutaminske kisline, kar povzroči dodaten negativen naboj na makromolekuli (slika 1). Posledice te spremembe so lahko denaturacija, spremenjena funkcija in možna encimska deaktivacija proteinov kakor tudi zmanjšana biološka aktivnost ter morebitna imunogenost proteina (2). Deamidacija poteka z neposredno hidrolizo ( $\text{pH} < 3$ ) ali preko ciklične imidne oblike ( $\text{pH} > 5$ ) (4). Stopnja deamidacije proteina je zelo odvisna od primarne strukture in položaja asparagina oz. glutamina znotraj tridimenzionalne strukture proteina kakor tudi od lastnosti raztopine ( $\text{pH}$ , temperatura, ionska moč) (5).

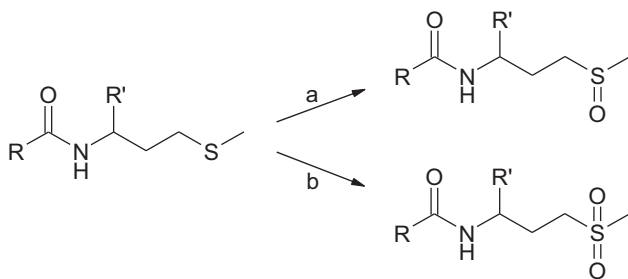


Slika 1: Mehanizem deamidacije asparagina ter racemizacije in izomerizacije asparaginske kisline v izoasparaginsko kislino, prevzeto po (6).  
Figure 1: Mechanism of asparagine deamidation and racemization and isomerization of aspartic acid into isoaspartic acid (6).



## 2.2 OKSIDACIJA

Oksidacija je zelo pogosta reakcija nestabilnosti za peptidne in proteinske učinkovine, pri kateri se v molekulo vključujejo bolj elektronegativni atomi (predvsem kisik) oz. pride do tvorbe intra- ali intermolekulske disulfidne vezi med dvema cisteinskima ostankoma. Aminokislina metionin in cistein (zaradi vsebujočega žvepla) ter histidin, tirozin in triptofan (zaradi aromatskega obroča) so najbolj dovzetne za oksidacijo (7). Na sliki 2 je prikazana oksidacija metionina, kjer pri milejših pogojih pride do reverzibilne pretvorbe tioetrne skupine v sulfoksid, pri ostrejših pogojih pa nastane sulfon – ta del reakcije je ireverzibilen. Oba produkta kažeta večjo hidrofilnost in polarnost lokalne strukture (8). Oksidacijo proteinov lahko sprožijo različni dejavniki: prisotnost kisika, peroksidov, radikalov, kovinskih ionov ali svetlobe. Oksidirani proteini imajo spremenjeno konformacijo in fizikalno-kemijske lastnosti, kar ima za posledico zmanjšano biološko aktivnost, spremenjeno farmakokinetiko in biološki razpolovni čas in potencialno imunogenost.



Slika 2: Oksidacija metionina pod milejšimi (a) in ostrejšimi pogoji (b), prevzeto po (8).

Figure 2: Methionine oxidation under milder conditions (a) and more rigorous conditions (b) (8).

### 2.2.1 Fotooksidacija

Izpostavljenost svetlobi lahko povzroči oksidacijo fotolabilnih aminokislin: triptofan, tirozin, fenilalanin in cistein. Razgradnja se začne z absorpcijo fotona, kar povzroči prehod elektrona v vzbujeno stanje in vodi v neposredno cepitev molekule ali v posredno oksidacijo preko kisika (9). Komponente zdravila lahko v nekaterih primerih vplivajo na fotooksidacijo; npr. fosfatni pufer pospeši oksidacijo metionina v primerjavi z drugimi pufrskimi sistemi (10).

## 2.4 RACEMIZACIJA IN $\beta$ -ELIMINACIJA

Ti dve obliki nestabilnosti sta medsebojno povezani, saj je začetna stopnja enaka pri obeh: bazično katalizirano de-

protoniranje  $\alpha$ -C atoma aminokislina, za katerega je potreben povišan pH. V nadaljnjem koraku se pri racemizaciji na nastali karboanion ponovno veže proton in nastane racemna zmes. Vse aminokislina razen glicina so lahko izpostavljene racemizaciji. Asparaginska kislina je v odvisnosti od svojega položaja in mobilnosti v proteinu najbolj dovzetna za racemizacijo (slika 1). Pri  $\beta$ -eliminaciji pa pride do preurejanja karboaniona in izstopa skupine iz  $\beta$ -C atoma, pri čemer se tvori dvojna vez med  $\alpha$ - in  $\beta$ -C atomom. Med aminokislinami je cistein najbolj podvržen  $\beta$ -eliminaciji (11).

## 2.5 IZMENJAVA DISULFIDNE VEZI

Preurejanje obstoječih disulfidnih vezi znotraj molekule lahko vpliva na celotno konformacijo in posledično biološko aktivnost proteina, čeprav se število in tip kemijskih vezi ne spremenita. Pri reakciji izmenjave disulfidne vezi sodelujeta disulfidna vez in ionizirana tiolna skupina cisteina, pri čemer je potreben višji pH. Prosti cisteinski ostanki (po redukciji disulfidov ali  $\beta$ -eliminaciji pri cisteinu) so osnova za tovrstne reakcije (12).

## 2.6 DRUGE REAKCIJE

Druge pomembne, manj pogoste poti razgradnje proteinov *in vitro* so: hidroliza peptidne vezi, encimsko katalizirana razgradnja proteinov in deglikozilacija proteinov (2).

# 3 FIZIKALNA NESTABILNOST PROTEINOV

## 3.1 DENATURACIJA

Denaturacijo proteinov definiramo kot porušenje tridimenzionalne native strukture proteina, kar posledično vodi v zmanjšanje ali izgubo biološke aktivnosti in večje tveganje za pojav imunogenosti. Zaradi denaturacije se lahko izpostavijo hidrofobne skupine iz notranjosti, kar vodi v nastanek drugih oblik fizikalne in kemijske nestabilnosti.

## 3.2 AGREGACIJA

Agregacija proteinov je najpogostejša oblika fizikalne nestabilnosti, ki se lahko pojavi v skoraj vseh stopnjah razvoja zdravila. Osnova za agregacijo je najpogosteje denaturacija

oz. razvitje molekule proteina. Mehanizmi agregacije so različni: združevanje nativnih monomerov, agregacija konformacijsko spremenjenih monomerov, agregacija kemijsko spremenjenih monomerov ali površinsko povzročena agregacija. Do agregacije lahko pride zaradi nekovalentnih ali kovalentnih povezav (na primer disulfidnih), kar vpliva tudi na reverzibilnost agregacije. Agregati terapevtskih proteinov so potencialno imunogeni, manj učinkoviti zaradi manjše vsebnosti nativnih topnih in aktivnih monomerov ter lahko spremenijo videz farmacevtskega izdelka (13, 14).

### 3.3 PRECIPITACIJA

Precipitacija je makroskopsko vidna agregacija, ki se kaže kot zamotnitev ali sedimentacija biofarmacevtskega pripravka. Zaradi delnega ali celotnega razvitja proteina se hidrofobne skupine izpostavijo na površino in povežejo med seboj preko hidrofobnih interakcij; nastali agregati so ireverzibilni (15).

### 3.4 ADSORPCIJA NA POVRŠINE

Proteini se lahko v vodnih raztopinah zaradi svoje amfilne narave adsorbirajo na različne površine (steklo, plastika, filtri ...). Adsorpcija proteinov zmanjša koncentracijo terapevtsko uporabnega proteina, kar je še posebej pomembno pri zdravilih z majhnimi odmerki. Ta interakcija je energijsko ugodnejša, če je molekula proteina delno razvita in se njena hidrofobnost poveča. Na adsorpcijo poleg konformacije proteina vplivajo tudi narava in razpoložljivost površine in lastnosti raztopine (pH, ionska moč). (16).

## 4 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA KEMIJSKO IN FIZIKALNO NESTABILNOST PROTEINOV

Najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na kemijsko nestabilnost proteinov so: struktura proteina, pH, temperatura in svetloba. Na fizikalno nestabilnost proteina bistveno vplivajo struktura proteina, temperatura, pH in koncentracija proteina.

**Prostorska razporeditev** aminokislinskih stranskih verig vpliva na vse kemijske pretvorbe proteinov. Npr. aminokislini glicin ali serin ob asparaginskem ostanku močno povečata reaktivnost asparagina zaradi manjšega steričnega oviranja imidne strukture, medtem ko aminokislina z velikimi stranskimi verigami (na primer prolin) na teh mestih zmanjšajo

dovzetnost asparagina za deamidacijo (17). Podobno je pri racemizaciji: tvorba izoasparaginske kisline je bolj verjetna, če ima asparaginska kislina na sosednjem mestu ostanke z majhnimi stranskimi verigami (18). Izpostavljene oksidativno nestabilne aminokislina (metionin, cistein, histidin, tirozin in triptofan) so v splošnem bolj dovzetne za oksidacijo.

V splošnem se pri povišanem **pH** poveča težnja za reakcije oksidacije zaradi povečanega oksidativnega potenciala sistema. Prav tako se poveča ionizacija aminokislinskih ostankov (npr. cistein in histidin), kar tudi poveča obseg izmenjave disulfidnih vezi. Za reakcije racemizacije in  $\beta$ -eliminacije je ravno tako potreben bazičen pH medija. V splošnem je deamidacija najmanj izrazita pri pH od 3 do 5. Pri zelo nizkih vrednostih pH (< 3) lahko pride do izomerizacije in neposredne hidrolize stranskih verig asparagina in glutamina (17). Vzrok za fizikalno nestabilnost proteinov pri ekstremnih vrednostih pH je ionizacija in posledično povečan elektrostatski odboj med enako nabitimi stranskimi verigami posameznih aminokislinskih. Povečana elektrostatska prosta energija povzroči proces denaturacije proteina, ki deluje v smeri zmanjšanja energije (19, 20). Proteini so fizikalno najbolj stabilni v ozkih območjih pH, najpogosteje pri pH 7 (21).

Pri **višjih temperaturah** so v splošnem kemijske reakcije izrazitejšje, vendar je tukaj pomembnejša fizikalna destabilizacija proteinov. Povišana temperatura je najpogostejši razlog za denaturacijo, ki je največkrat ireverzibilna. **Nizka temperatura** lahko v nekaterih primerih tudi povzroči denaturacijo proteinov. Ta proces je znan kot *hladna denaturacija proteinov* in je večinoma reverzibilen. **Zamrzovanje** proteinov, še posebej pa cikli zamrzovanja in odtajevanja, lahko vodi v agregacijo in precipitacijo proteinov zaradi strukturnih sprememb na površini kristalov ledu ali ostalih pomožnih snovi. Tovrstne spremembe se lahko pojavijo tudi pri procesu liofilizacije (22).

Učinek **sol** je zelo raznolik in odvisen od narave in koncentracije soli, od narave ionskih interakcij ter od naboja stranskih verig aminokislinskih ostankov. Različne soli lahko stabilizirajo, destabilizirajo (povzročijo denaturacijo) ali pa ne vplivajo na stabilnost proteinov (2). Goveji serumski albumin je npr. stabiliziran v prisotnosti natrijevega tiocianata in natrijevega perklorata, destabilizirata pa ga gvanidinijev klorid in litijev perklorat (23).

**Kovinski ioni**, predvsem ioni prehodnih elementov (npr. železa ali bakra) destabilizirajo proteine. Pogosto delujejo kot katalizatorji oksidacij, tako da omogočajo odcep elektrona iz molekule in s tem nastanek radikala. Nastali radikali reagirajo s kisikom, lahko pa tudi neposredno s stransko verigo določenega aminokislinskega ostanka (npr. s tiolno

skupino cisteina), da nastane radikal, ki kasneje vodi v različne produkte oksidacije (24). Nekateri izmed njih (kalcij, cink in kobalt) pa lahko v ozkem koncentracijskem območju tudi stabilizirajo proteine (2).

**Svetloba** lahko povzroči notranje in zunanje spremembe proteinov. Med notranje sodijo neposredne spremembe strukture proteinov zaradi oksidacije nekaterih aminokislinskih ostankov (najpogosteje na metioninu), kar lahko vodi v deaktivacijo, denaturacijo in agregacijo proteinov. Do zunanjih sprememb prihaja zaradi vpliva svetlobe na raztopino: spremembe v topilu ali pomožnih snoveh. Nekatere pomožne snovi, kot so kovinski ioni, makrogoli, polisorbati, askorbinska kislina in lipidi, lahko pod vplivom svetlobe tvorijo reaktivne vrste, ki povzročajo oksidativne spremembe proteinov (19).

**Mehanske sile**, kot so stresanje, strižne sile in visoki pritiski, lahko sprožijo denaturacijo in kasnejšo agregacijo proteinov (2).

## 5 PRISTOPI K STABILIZACIJI PROTEINOV

Zaradi raznolikosti molekul proteinov je pri pristopih za stabilizacijo potrebna individualna obravnava. V splošnem poznamo tri pristope za stabilizacijo proteinov: notranja in zunanja stabilizacija ter stabilizacija z liofilizacijo. Za zagotavljanje stabilnosti je seveda pomembna tudi izbira ustrezne ovojnine, ki mora biti inertna in zagotavljati ustrezno zaščito pred zunanjimi dejavniki (svetloba, kisik).

### 5.1 NOTRANJA STABILIZACIJA

Tehnologija rekombinantne DNA nam omogoča, da naredimo spremembe na nivoju aminokislinskega zaporedja proteinov, z namenom povečanja njihove fizikalne in kemijske stabilnosti.

#### *Pegilacija*

Najbolj znan pristop za povečanje tako kemijske kot fizikalne stabilnosti je pegilacija proteina (kovalentno pripenjanje verig polietilenglikola na proteinsko molekulo), kar spremeni njegove fizikalno-kemijske lastnosti (konformacija, elektrostatične interakcije, hidrofobnost). V prvi vrsti je pegilacija proteinov namenjena izboljšanju farmakokinetike (daljši razpolovni čas, manjši volumen porazdelitve in manjši očistek), kar omogoča manj pogosto aplikacijo in boljši farmakodinamični učinek zdravila. Vendar pegilacija prinaša

tudi številne prednosti v smislu priprave stabilne končne farmacevtske oblike, saj imajo pegilirani proteini boljšo *in vitro* stabilnost in topnost, kar je še posebej pomembno pri hidrofobnih proteinih, ki so nagnjeni k agregaciji in adsorpciji na površine (22, 25).

#### *Glikozilacija*

Konjugacija proteinov s sladkorji lahko poveča njihovo stabilnost, vendar imajo lahko glikoproteini drugačne fizikalno-kemijske lastnosti, kar vpliva tudi na biološko aktivnost (26). Tako npr. odstranitev N-vezanih polisaharidov s koagulacijskega faktorja VIII, ki ga uporabljamo za zdravljenje hemofilije A, vodi v več kot 30-odstotno izgubo aktivnosti in znatno poveča nagnjenost k agregaciji (27).

#### *Zamenjava aminokislin*

Eden od pristopov za zmanjšanje oksidativne pretvorbe proteinov je zamenjava aminokislin, dovzetnih za oksidacijo, z aminokisljinami, odpornimi na oksidacijo, če to narava proteina dopušča. Zamenjava cisteina s serinom na mestu 17 v terapevtskem interferonu beta tako npr. poveča njegovo stabilnost ob primerljivi učinkovitosti (28).

#### *Tvorba disulfidnih vezi*

Medsebojno povezovanje prostih tiolnih skupin cisteina poveča stabilnost proteinov tako, da preprečuje oz. otežuje razvitje polipeptidne verige in posledično porušenje terciarne strukture in nadaljnjo agregacijo. Poleg tega tudi zmanjša možnosti za reakcije kemijske nestabilnosti (izmenjava disulfidne vezi in oksidacije) (29).

### 5.2 ZUNANJA STABILIZACIJA

Eden od najenostavnejših pristopov za stabilizacijo je shranjevanje raztopljenih proteinov pri nizkih temperaturah, večinoma pri 2–8 °C, kar v splošnem podaljša njihov rok uporabnosti. Proteini so občutljivi na temperaturne spremembe in lahko pri nizkih temperaturah denaturirajo, vendar je denaturacija v tem primeru reverzibilna, za razliko od denaturacije pri povišani temperaturi. Z zamrzovanjem lahko dosežemo še nižje temperature, vendar lahko večkratno zamrzovanje in odtajevanje močno spodbudi agregacijo proteinov. Reakcije oksidacije in drugih sprememb proteinov lahko omejimo z ustrezno izbiro in nadzorovanjem različnih dejavnikov: pH, koncentracija proteina, temperatura in sestava pufru. V splošnem, pH vrednost raztopine med 3 in 5 zmanjša deamidacijo in oksidacijo proteinov, vendar je za izbiro optimalne vrednosti pH potreben individualen pristop glede na stabilnost posameznega proteina. Pufrne raztopine lahko stabilizirajo proteine po različnih mehanizmih. Poleg tega da vzdržujejo ustrezen pH raztopine, posamezne komponente pufrrov delujejo kot lovilci



radikalov, kelatorji kovinskih ionov ali se neposredno vežejo na proteine ter tako povečajo stabilnost konformacije (2). Dodatek stabilizatorjev je široko uporabljan pristop za preprečevanje različnih oblik nestabilnosti pri terapevtskih proteinih. Najpogosteje uporabljane stabilizatorje in njihove mehanizme delovanja opisujemo v nadaljevanju:

*Aminokislina:* stabilizirajo s preferenčno interakcijo (glicin), z antioksidativnim delovanjem (metionin in cistein), s kelacijo kovinskih ionov (asparaginska in glutaminska kislina) in s preprečevanjem agregacije (arginin) (19, 22).

*Antioksidanti:* glutation, askorbinska kislina, kelatorji kovinskih ionov (EDTA, citronska kislina) in sladkorji ali poliolli preprečujejo oksidativno nestabilnost proteinov (2).

*Humani serumski albumin* kot inertni protein, ki zasede površino vsebnika, dodajamo v prebitku za omejevanje adsorpcije proteinov na površine (18).

*Kovinski ioni:* ione kalcija, magnezija in cinka lahko uporabimo kot proteinske stabilizatorje, saj se vežejo na protein in tako naredijo strukturo proteina bolj togo, kompaktno in stabilno (30).

*Organska sotpila:* npr. glicerol in etanol. V majhnih koncentracijah zmanjšajo dielektrično konstanto raztopine in posledično omejujejo reakcije deamidacije in izomerizacije, vendar je pri njihovi uporabi potrebna previdnost, saj lahko v primerih dvofaznega organsko-vodnega sistema pride do denaturacije proteinov na meji faz (30).

*Polimeri:* makrogole uporabljamo kot krioprotektante ter za zaščito pred adsorpcijo in obarjanjem proteinov. Ciklodekstrini izboljšajo topnost in povečajo fizikalno stabilnost proteinov (2, 30).

*Površinsko aktivne snovi:* najpogosteje uporabljamo Tween 20, Tween 80 in Brij 35, vendar je njihovo kakovost zaradi možnega onečiščenja s peroksidi potrebno nadzorovati. Adsorbirajo se na mejne površine in preprečujejo adsorpcijo proteinov na površine ter njihovo medfazno denaturacijo in agregacijo (30).

*Sladkorji in poliolli:* glukoza, saharoza, trehaloza, sorbitol, manitol, glicerol, etilenglikol. Mehanizem njihovega delovanja je stabilizacija native strukture proteina zaradi preferenčne interakcije in antioksidativnega delovanja (22).

*Soli:* stabilizirajo ali destabilizirajo protein. Za stabilizacijo največkrat uporabljamo NaCl in KCl, ki stabilizirata proteine na osnovi elektrostatskih interakcij in tvorbe ionskih mostov (31).

### 5.3 LIOFILIZACIJA

Naslednji pristop pri stabilizaciji je izbira trdne farmacevtske oblike oz. omejitev mobilnosti molekul proteina z liofilizacijo

oz. sušenjem z zamrzovanjem, kar ugodno vpliva na dolgoročno stabilnost proteina in njegovo odpornost pri transportu in proti temperaturnim spremembam. Ta postopek je s stabilnostnega stališča prav tako problematičen, saj lahko tako sušenje kot zamrzovanje povzročita spremembe proteina in zahtevata dodatne pristope k stabilizaciji. Kot stabilizatorje uporabljamo krioprotektante (sladkorji, poliolli, aminokislina), ki ščitijo pred zamrzovanjem, in lioprotektante (sladkorji), ki ščitijo pred dehidracijo (2, 30).

## 6 SKLEP

Razvoj stabilnih terapevtskih proteinov je aktualno področje farmacevtske industrije, hkrati pa tudi zelo zahtevno, saj so proteini zaradi svoje zapletene strukture in številnih funkcionalnih skupin tako kemijsko kot fizikalno nestabilne molekule. Najpogostejša oblika fizikalne nestabilnosti je denaturacija proteinov s kasnejšimi agregacijo, precipitacijo in adsorpcijo na površine, kar lahko posledično zmanjša koncentracijo ali biološko aktivnost terapevtsko uporabnega proteina ali celo poveča njegovo imunogenost. Pri kemijskih reakcijah (najpogosteje deamidacija in oksidacija) se spremeni primarna struktura, posledično tudi višji strukturni nivoji in fizikalne lastnosti proteina, kar vpliva na učinkovitost in/ali imunogenost proteina. Z vidika zagotavljanja kakovosti posebno pozornost posvečamo nestabilnosti oz. stabilizaciji proteinov, kjer je zaradi raznovrstnosti in zapletenosti potrebna individualna obravnava posameznega proteina. Izmed številnih pristopov za stabilizacijo proteinov najpogosteje uporabljamo pegilacijo, ki izboljša njihove *in vitro* in *in vivo* lastnosti.

## 7 LITERATURA

1. Lagassé HAD, Alexaki A, Simhadri VL, Katagiri NH, Jankowski W, Sauna ZE, et al. Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research*. 2017 Feb;6:113.
2. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm Res*. 2010 Apr;27(4):544-75.
3. ICH International Conference on Harmonization . Quality of biotechnological products: Stability testing of biotechnological/biological products Q5C. 1995.



- [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q5C/Step4/Q5C\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5C/Step4/Q5C_Guideline.pdf)
4. Robinson NE. Protein deamidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 16;99(8):5283-8.
  5. Robinson NE, Robinson AB. Prediction of protein deamidation rates from primary and three-dimensional structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001 Apr;98(8):4367-72.
  6. Takahashi O, Kirikoshi R, Manabe N. Racemization of the Succinimide Intermediate Formed in Proteins and Peptides: A Computational Study of the Mechanism Catalyzed by Dihydrogen Phosphate Ion. *Int J Mol Sci*. 2016 Okt;17(10).
  7. Li S, Schoneich C, Borchardt RT. Chemical instability of protein pharmaceuticals: Mechanisms of oxidation and strategies for stabilization. *Biotechnol Bioeng*. 1995 Dec 5;48(5):490-500.
  8. Drazic A, Winter J. The physiological role of reversible methionine oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2014 2014/08/01;1844(8):1367-82.
  9. Kerwin BA, Remmele RL, Jr. Protect from light: photodegradation and protein biologics. *J Pharm Sci*. 2007 Jun;96(6):1468-79.
  10. Fransson J, Hagman A. Oxidation of human insulin-like growth factor I in formulation studies, II. Effects of oxygen, visible light, and phosphate on methionine oxidation in aqueous solution and evaluation of possible mechanisms. *Pharm Res*. 1996 Oct;13(10):1476-81.
  11. Cohen SL, Price C, Vlasak J. Beta-elimination and peptide bond hydrolysis: two distinct mechanisms of human IgG1 hinge fragmentation upon storage. *J Am Chem Soc*. 2007 Jun 6;129(22):6976-7.
  12. Wang Y, Lu Q, Wu SL, Karger BL, Hancock WS. Characterization and comparison of disulfide linkages and scrambling patterns in therapeutic monoclonal antibodies: using LC-MS with electron transfer dissociation. *Anal Chem*. 2011 Apr 15;83(8):3133-40.
  13. Hermeling S, Crommelin DJ, Schellekens H, Jiskoot W. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm Res*. 2004 Jun;21(6):897-903.
  14. Bratkovič T. Imunogenost Bioloških zdravil. *Farmaceutski vestnik*. 2017 Dec;68(5):345-54.
  15. Trevino SR, Scholtz JM, Pace CN. Measuring and increasing protein solubility. *J Pharm Sci*. 2008 Oct;97(10):4155-66.
  16. Hlady VV, Buijs J. Protein adsorption on solid surfaces. *Curr Opin Biotechnol*. 1996 Feb 1;7(1):72-7.
  17. Tyler-Cross R, Schirch V. Effects of amino acid sequence, buffers, and ionic strength on the rate and mechanism of deamidation of asparagine residues in small peptides. *J Biol Chem*. 1991 Nov 25;266(33):22549-56.
  18. Fujii N, Momose Y, Ishii N, Takita M, Akaboshi M, Kodama M. The mechanisms of simultaneous stereoinversion, racemization, and isomerization at specific aspartyl residues of aged lens proteins. *Mech Ageing Dev*. 1999 Mar 15;107(3):347-58.
  19. Jalpa Patel RK, Rashbehari Tunga, Nadine M. Ritter, Binita S. Tunga. *Stability Considerations for Biopharmaceuticals, Part 1: Overview of Protein and Peptide Degradation Pathways*. *BioProcess Int*. 2011 Jan;9:20-31.
  20. Yang Z-c, Yang L, Zhang Y-x, Yu H-f, An W. Effect of Heat and pH Denaturation on the Structure and Conformation of Recombinant Human Hepatic Stimulator Substance. *Protein J*. 2007 Aug;26(5):303-13.
  21. Talley K, Alexov E. On the pH-optimum of activity and stability of proteins. *Proteins*. 2010 Sep;78(12):2699-706.
  22. Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Apr;4(4):298-306.
  23. Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF. Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation. *Pharm Res*. 2003 Sep;20(9):1325-36.
  24. Roškar R, Kmetec V. Preučevanje oksidativne stabilnosti izbranih aminokislin in manjših peptidov ter načrtovanje njihove stabilizacije: doktorska disertacija. 2005 Nov.
  25. Dozier JK, Distefano MD. Site-Specific PEGylation of Therapeutic Proteins. *Int J Mol Sci*. 2015 Oct 28;16(10):25831-64.
  26. Solá RJ, Griebenow K. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J Pharm Sci. Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009 Apr;98(4):1223-45.
  27. Pisal DS, Kosloski MP, Balu-Iyer SV. Delivery of therapeutic proteins. *J Pharm Sci*. 2010 Jun;99(6):2557-75.
  28. Mark DF, Lu SD, Creasey AA, Yamamoto R, Lin LS. Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Sep;81(18):5662-6.
  29. Maulik VT, Jennifer SL, Teruna JS. The Role of Thiols and Disulfides on Protein Stability. *Current Protein & Peptide Science*. 2009 Dec;10(6):614-25.
  30. Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*. 2000 Aug;203(1-2):1-60.
  31. Bosshard HR, Marti DN, Jelesarov I. Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *J Mol Recognit*. 2004 Jan-Feb;17(1):1-16.