

ANALIZNE TEHNIKE ZA VREDNOTENJE (NE)STABILNOSTI PROTEINOV

ANALYTICAL TECHNIQUES FOR EVALUATION OF PROTEIN (IN)STABILITY

AVTORJA / AUTHORS:

Nika Osel, mag. farm.

prof. dr. Robert Roškar, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: robert.roskar@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Zaradi razvoja na področju biotehnologije, ugotovitev bazičnih raziskav o tarčah in mehanizmih delovanja ter učinkovitosti pri terapiji številnih bolezni so proteini v zadnjih desetletjih postali hitro rastoča skupina zdravilnih učinkovin. Gre za velike in kompleksne molekule, ki imajo številne funkcionalne skupine in več nivojev strukture. Za svoje delovanje morajo imeti ohranjeno tridimenzionalno strukturo,

POVZETEK

Proteinske učinkovine so v zadnjih desetletjih močno preoblikovale trg zdravil. Gre za velike molekule z zapleteno strukturo, ki so nagnjene k različnim oblikam nestabilnosti. Posledice nestabilnosti so lahko zmanjšanje biološke aktivnosti ali povečanje imunogenosti, zato je izbira ustreznih analiznih tehnik za vrednotenje stabilnosti proteinov ključnega pomena za zagotavljanje kakovosti, učinkovitosti in varnosti zdravila. V primerjavi z nizkomolekularnimi učinkovinami je vrednotenje stabilnosti proteinov kompleksen in večplasten analizni izziv. Pri tem moramo vključiti tri glavne vidike stabilnosti: fizikalno, kemijsko in biološko stabilnost. Za celovito kvalitativno in kvantitativno oceno nestabilnosti proteinov je nujna uporaba kombinacije različnih analiznih tehnik. Poleg tega moramo vsak protein obravnavati individualno. V tem prispevku podajamo pregled analiznih tehnik, ki jih uporabljamo za vrednotenje najrazličnejših sprememb, ki so posledica nestabilnosti proteinov. Pri tem imajo glavno vlogo masna spektrometrija ter separacijske, spektroskopske in imunokemijske tehnike.

KLJUČNE BESEDE:

analizne tehnike, masna spektrometrija, nestabilnost, proteini

ABSTRACT

Therapeutic proteins have significantly transformed the pharmaceutical market in recent decades. These large molecules with complex structures are susceptible to various degradation pathways. Their instability may result in a decrease in biological activity or an increase in immunogenicity. Therefore, the selection of appropriate analytical techniques for the evaluation of protein stability is crucial to ensure quality, efficacy and safety of the medicine. Compared to small molecules, the evaluation of protein stability is a complex and multifaceted analytical challenge. Three main stability aspects have to be considered: physical, chemical and biological stability. A combination of different analytical techniques is necessary for a comprehensive qualitative and quantitative evaluation of protein instability. Moreover, an individual approach is required for each protein. This article reviews analytical tech-

niques used for the evaluation of various changes resulting from protein instability, with mass spectrometry, separation, spectroscopic and immunochemical techniques playing a major role.

KEY WORDS:

analytical techniques, instability, mass spectrometry, proteins

ki se lahko pod vplivom različnih dejavnikov hitro poruši (1, 2).

Nestabilnost proteinov delimo na fizikalno in kemijsko. Pri slednji pride do nastanka nove kemijske entitete zaradi cepitve ali nastanka kovalentnih vezi. Pri tem se spremeni primarna struktura proteina, posledično pa se lahko spremenijo tudi višji nivoji strukture (1–3). Pri fizikalni nestabilnosti molekula proteina kemijsko ostane nespremenjena, pride pa do sprememb v sekundarni, terciarni ali kvartarni strukturi proteina (3, 4). Med fizikalne oblike nestabilnosti uvrščamo denaturacijo, agregacijo, adsorpcijo proteinov na površine in obarjanje (1, 3, 5). Fizikalna in kemijska nestabilnost sta pogosto medsebojno povezani, ena oblika nestabilnosti lahko vodi do druge, tako pa se potencira verjetnost za pretvorbo proteina (1,3).

Posledice nestabilnosti so lahko zmanjšana aktivnost ali povečana imunogenost proteina, kar je neposredno povezano z učinkovitostjo in varnostjo zdravila (1, 6, 7). Zato je izbira kombinacije ustreznih analiznih tehnik za vrednotenje stabilnosti proteinov ključnega pomena za uspešen razvoj zdravila.

2 VREDNOTENJE NESTABILNOSTI PROTEINOV

V primerjavi z nizkomolekularnimi učinkovinami je vrednotenje stabilnosti proteinov precej bolj zapleteno. Stabilnosti proteina namreč ne moremo opredeliti izključno na podlagi njegove koncentracije ali odsotnosti razgradnih produktov (4). Za razumevanje nestabilnosti proteinov in njihovo ustrezno stabilizacijo v zdravilih je potrebno podrobno analizo vrednotenje posameznega proteina (8).

Zaradi velike raznolikosti možnih strukturnih sprememb je vrednotenje stabilnosti proteinov kompleksen in večplasten analizen izziv, ki zahteva uporabo širokega spektra analiznih pristopov (slika 1) (5, 8). Pri tem moramo vključiti tri glavne

vidike stabilnosti: ovrednotiti moramo fizikalno stabilnost z vidika strukture proteina in agregacije, proučiti kemijske spremembe proteina in rezultate podkrepiti z ovrednotenjem biološke aktivnosti proteina (4).

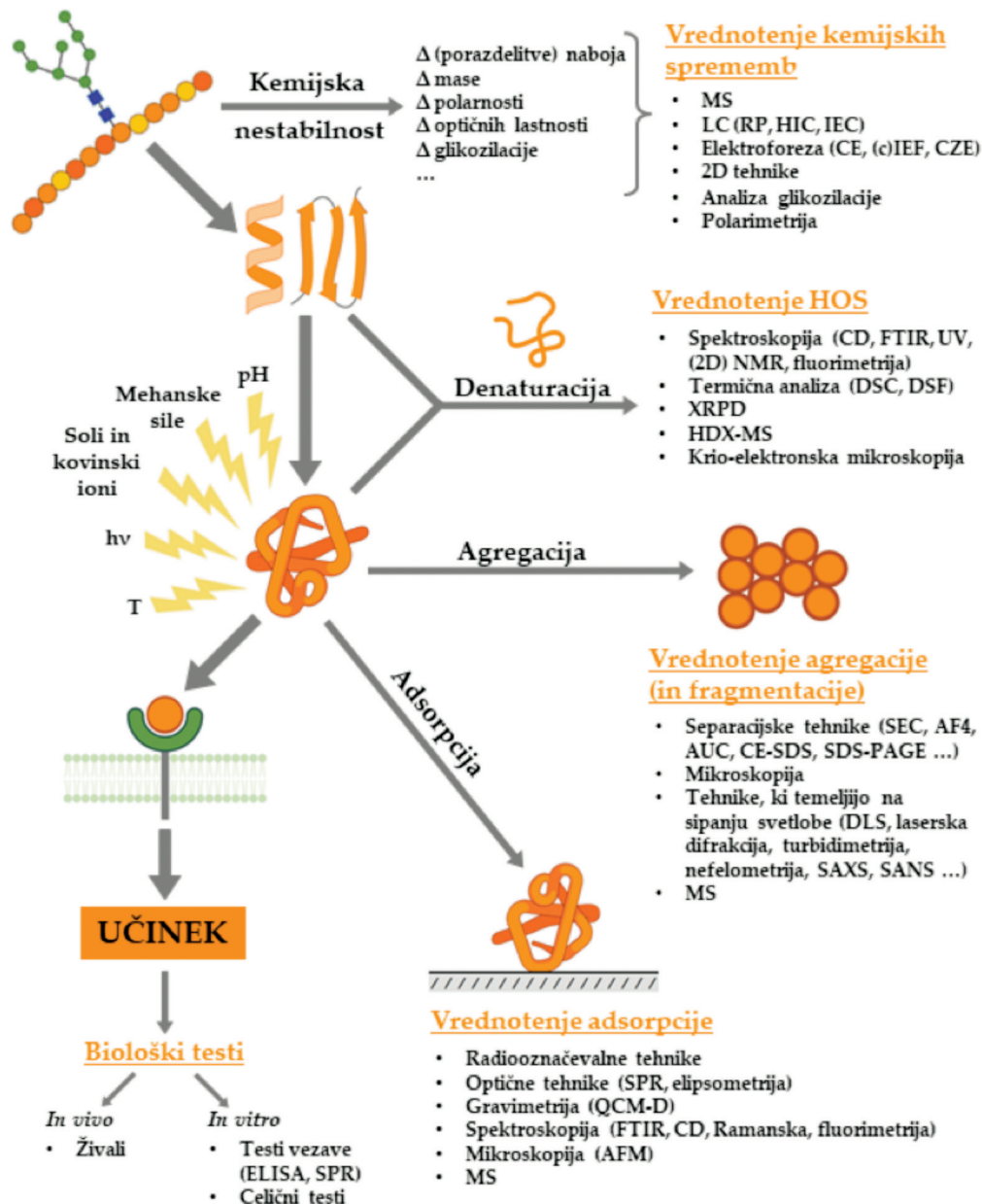
Izbira analiznih tehnik je odvisna od lastnosti proteina, formulacije, mehanizma razgradnje, destruktivnosti analizne metode in priprave vzorca (5). Trenutno ima le malo terapevtskih proteinov svoje monografije v farmakopejah (9). Splošne usmeritve za vrednotenje stabilnosti proteinov podajajo smernice Mednarodne konference o harmonizaciji (ICH) Q5C in Q6B. Smernica ICH Q5C podaja usmeritve proizvajalcem glede stabilnostnih študij, ki jih morajo izvesti za pridobitev dovoljenja za promet z biološkim zdravilom, saj služijo kot podpora predlaganim pogojem shranjevanja in roku uporabnosti (10). Smernica ICH Q6B pa podaja glavne principe za izbiro in utemeljitev specifikacij za biološka zdravila (11). Obe smernici naslavljata tudi problematiko analiznega vrednotenja stabilnosti proteinskih učinkovin.

Za celovito kvalitativno in kvantitativno oceno stabilnosti proteinov moramo uporabiti kombinacije ustreznih stabilnostno-indikativnih analiznih tehnik, največkrat spektroskopskih, separacijskih in imunokemijskih tehnik ter masne spektrometrije (MS), s katerimi ovrednotimo fizikalno-kemijske lastnosti, vsebnost in biološko aktivnost, v nekaterih primerih pa tudi imunokemijske lastnosti proteina (10, 11). Ovrednotiti moramo tudi čistost proteinske učinkovine, saj lahko nečistote vplivajo na stabilnost in imunogenost proteina (2, 7). Poleg tega morebitno prisotne nečistote otežijo analizo vrednotenje proteina. Za vrednotenje čistosti uporabljamo kombinacije specifičnih metod, kot so elektroforezne in kromatografske metode ter peptidno kartiranje, rezultat analize pa je odvisen od izbrane metode (10, 11).

2.1 VREDNOTENJE KEMIJSKE NESTABILNOSTI

Kemijska nestabilnost povzroči spremembe v primarni strukturi proteina zaradi reakcij, kot so deamidacija, oksidacija, hidroliza, izmenjava disulfidne vezi, izomerizacija, racemizacija, β -eliminacija, glikacija in deglikozilacija (1–3). Obseg kemijske spremembe je odvisen od formulacije, razmer shranjevanja in intrinzičnih lastnosti proteina, njene posledice pa so odvisne od lokacije sprememb (4, 12). Kemijska nestabilnost povzroči spremembe v fizikalno-kemijskih lastnostih proteina, kot so polarnost, masa, naboj in optične lastnosti (8, 13). Za vrednotenje teh sprememb najpogosteje uporabljamo kromatografske, elektroforezne in spektroskopske tehnike ter MS (12).





Slika 1: Prikaz kompleksnosti vrednotenja nestabilnosti proteinov.

Figure 1: Demonstration of the complexity of the evaluation of protein instability.

MS je v zadnjih desetletjih postala nepogrešljivo orodje pri analitiki proteinov. Najpogosteje jo uporabljamo za pridobivanje informacij o aminokislinskem zaporedju in točni molekularni masi, za določevanje mesta in narave posttranslacijskih modifikacij ter tudi za proučevanje višjih nivojev strukture in agregacije (14–16). Pomembno vlogo ima pri stresnih študijah, kjer jo uporabljamo za identifikacijo razgradnih poti in potencialnih kritičnih atributov kakovosti

(16). Vse to omogočajo različne izvedbe in načini delovanja masnih spektrometrov, različni načini ionizacije, fragmentacije in detekcije (8, 16). Za strukturno vrednotenje proteinov rutinsko uporabljamo tri strategije: MS intaktnih proteinov (*top-down approach*), MS po delni fragmentaciji proteinov (*middle-down / middle-up approach*) in peptidno kartiranje (*bottom-up approach*) (14–16). MS lahko uporabljamo samostojno ali pa je sklopljena z različnimi kro-

matografskimi tehnikami ali kapilarno elektroforezo (CE) (16).

Številne kemijske reakcije povzročijo spremembe v naboju ali porazdelitvi naboja, kar lahko proučujemo z ionsko-izmenjevalno kromatografijo (IEC), (kapilarnim) izoelektričnim fokusiranjem in kapilarno consko elektroforezo (4, 8, 12, 13). Za proučevanje deamidacije kot ene najpogostejših reakcij, pri katerih pride do spremembe naboja, obstajajo tudi specifične tehnike, kot so visokozmogljivostna bioluminiscenčna metoda (17), jedrska magnetna resonanca (NMR), 2D NMR in določitev nastalega amoniaka z encimskim testom ali selektivno elektrodo (12, 13).

Kemijska nestabilnost lahko povzroči tudi spremembe v hidrofobnosti proteinov, kar najpogosteje vrednotimo s kromatografskimi tehnikami, kot sta reverznofazna in hidrofobnointerakcijska kromatografija v kombinaciji z različnimi načini detekcije (8, 9, 14, 18). Pomembno orodje pri proučevanju kemijske nestabilnosti proteinov so tudi dvo- ali večdimenzionalne tehnike, kot sta 2D-gelska elektroforeza in dvo- ali večdimenzionalna tekočinska kromatografija (8). Slednja se je v zadnjih letih zelo razvila predvsem zaradi možnosti kombiniranja ortogonalnih separacijskih principov, izboljšane selektivnosti, ločljivosti in občutljivosti v primerjavi z enodimenzionalno kromatografijo, poleg tega pa omogoča uporabo MS-detekcije tudi pri vrstah kromatografije (npr. IEC), ki niso združljive s tem načinom detekcije (8, 15).

Fragmentacija proteinov je najpogosteje posledica hidrolize peptidne vezi ali redukcije intermolekularnih disulfidnih vezi. Poleg nekaterih tehnik, ki jih uporabljamo za vrednotenje agregacije proteinov (podpoglavje 2.2.3), za vrednotenje fragmentacije uporabljamo tudi CE in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z UV- ali elektrokemijsko detekcijo (8, 13). Enake tehnike uporabljamo tudi pri proučevanju sprememb zaradi tvorbe, cepitve ali izmenjave disulfidne vezi. Za proučevanje β -eliminacije uporabljamo voltametrijo s katodnim raztapljanjem, za proučevanje racemizacije pa uporabljamo polarimetrijo, MS pa le, ko do racemizacije pride v devteritranem mediju (13).

Vrednotenje sprememb v glikozilacijskih vzorcih je zaradi njihove kompleksnosti in heterogenosti zelo zahtevno in obsega štiri glavne analize pristope: i) z analizo mase intaktnega proteina dobimo informacije o različnih glikoforinah posameznega glikoproteina; ii) analiza glikopeptidov nam omogoča določitev mesta in stopnje glikozilacije; iii) oligosaharidne profile proteina določimo z analizami sproščenih glikanov; iv) z določanjem monosaharidov identificiramo in kvantificiramo posamezne monosaharide (9, 16). Pri tem ima glavno vlogo MS v kombinaciji z različnimi se-

paracijskimi tehnikami in uporabo reagentov za označevanje (9, 14, 16).

2.2 VREDNOTENJE FIZIKALNE STABILNOSTI

2.2.1 Vrednotenje višjih nivojev strukture

Zaradi delovanja različnih stresnih dejavnikov lahko pride do sprememb na vseh nivojih strukture proteina (5, 8). Pri fizikalni nestabilnosti se primarna struktura proteina ne spremeni, spremenijo pa se višji nivoji strukture (1). V ta namen uporabljamo kombinacije različnih ortogonalnih analizijskih tehnik, ki se med seboj razlikujejo po količini pridobljenih informacij, ločljivosti, dostopnosti, enostavnosti, zmogljivosti ter potrebi po specializirani in dragi opremi (8).

Za proučevanje višjih nivojev strukture primarno uporabljamo različne spektroskopske tehnike, ki jih v splošnem uvrščamo med tehnike z nizko ločljivostjo (8, 12, 19). To so cirkularni dikroizem (CD), infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (FTIR), ramanska, UV- in fluorescenčna spektroskopija, v nekaterih primerih tudi NMR (4, 8, 15, 20, 21). S temi tehnikami lahko za molekulo proteina pridobimo značilne spektroskopske prstne odtise in opazimo večje spremembe v sekundarni, terciarni ali kvartarni strukturi proteina, ki morajo biti prisotne pri relativno velikem deležu molekul v vzorcu (8, 9). Slabost teh tehnik pa je, da ne moremo zaznati majhnih razlik v konformaciji proteinov in pridobiti specifičnih informacij o lokaciji sprememb in njihovi dinamiki, zato jih uporabljamo v t. i. primerjalnih študijah (*comparability studies*) (8, 15). Med nizkoločljivostne tehnike uvrščamo tudi metode termične analize, kot so diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC), diferenčna dinamična fluorimetrija in izotermična kalorimetrija (4, 9, 19, 20, 22). Tudi s temi tehnikami lahko pridobimo le informacije, ki odsevajo globalne spremembe v strukturi proteinov (9).

Z nekaterimi tehnikami pa lahko pridobimo specifične strukturne in prostorske informacije za posamezne domene, funkcionalne skupine ali celo atome v molekuli proteina. Temeljna visokoločljivostna tehnika za določanje strukture proteinov je rentgenska praškovna difrakcija (XRPD). Krio-elektronska mikroskopija nam omogoča opazovanje nativne strukture proteinov s skoraj atomsko ločljivostjo (8). NMR je uveljavljena tehnika za proučevanje strukturnih sprememb z visoko ločljivostjo, vendar je zaradi kompleksnosti, relativno slabe občutljivosti, omejene prisotnosti aktivnih jeder v naravi in omejitev pri velikosti proteinov (do 25 kDa) rutinsko ne uporabljamo za vrednotenje višjih nivojev strukture (9, 21).



Občutno izboljšanje omenjenih pomanjkljivosti je omogočil razvoj 2D NMR (2D ^{13}C NMR in 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ NMR). S to tehniko lahko pridobimo NMR prstne odtise proteinov z ločljivostjo na nivoju posameznih aminokislin, kar lahko neposredno uporabimo v primerjalnih študijah (8, 21). Sodobnejša tehnika, s katero lahko pridobimo komplementarne informacije o višjih nivojih strukture, je MS (8, 16). Uporabljamo različne pristope MS, in sicer MS ionske mobilnosti, kemično premreženje v kombinaciji z MS-analizo ter izmenjavo vodika in devterija v kombinaciji z MS (HDX-MS) (16). Predvsem slednja postaja v zadnjih letih vedno bolj priljubljena, saj je občutljiva, neomejena z velikostjo proteina, potrebna je majhna količina vzorca, možna je tudi avtomatizacija (8, 9, 16). S HDX-MS lahko ovrednotimo konformacijske spremembe, jih lokaliziramo in proučujemo dinamiko zvižanja proteina na nivoju 3–10 aminokislin velikih regij proteina (9, 16, 21). Pri tem moramo uporabiti vodne raztopine vzorcev in mehke metode ionizacije (npr. elektrorazprševalna ionizacija), da se nekovalentne interakcije ne porušijo (16). Alternativa uporabi tehnik z visoko ločljivostjo je izdelava empiričnih faznih diagramov. Pri tem z več različnimi nizkoločljivostnimi tehnikami izvedemo analize pri številnih pogojih, da pridobimo veliko količino podatkov, v katerih z matematično analizo iščemo vzorce, ki kažejo na strukturne spremembe (21).

Denaturacijo proteina lahko (kvantitativno) vrednotimo tudi z reverznofazno HPLC, saj se pri denaturaciji izpostavijo hidrofobne skupine iz notranjosti proteina, posledično pa se spremeni hidrofobnost proteina. Da je prišlo do razvija proteinske strukture, lahko ugotavljamo tudi z imunokemijskimi metodami, kot je encimskoimunski test (ELISA). Za proučevanje kvinarne strukture, ki je značilna za nekatera monoklonska protitelesa, pa lahko uporabimo izključitveno kromatografijo (SEC) in ^1H NMR spektroskopijo z multivariantno analizo (4).

2.2.2 Vrednotenje strukture v trdnem agregatnem stanju

Eden od načinov stabilizacije proteinov je izbira trdnih farmacevtskih oblik, med katerimi so najpogostejši liofilizati (1, 23). Na ta način proteine stabiliziramo, upočasnimo njihovo razgradnjo, izboljšamo odpornost proteinov proti temperaturnim spremembam in mehanskemu stresu, podaljšamo rok uporabnosti zdravila in se izognemo hladni verigi (1, 5). Po drugi strani pa so proteini med sušenjem izpostavljeni ostrim pogojem, kar je prav tako problematično z vidika stabilnosti (5, 23).

Čeprav je že skoraj polovica zdravil s proteini v trdnih oblikah, je na voljo relativno malo analiznih tehnik za vredno-

tenje proteinov v trdnem agregatnem stanju (23). Z izbranimi tehnikami lahko proučujemo lokalne in globalne spremembe v strukturi proteinov (24). Za proučevanje sekundarne in terciarne strukture proteinov najpogosteje uporabljamo spektroskopske metode, kot so FTIR, bližnja infrardeča in ramanska spektroskopija, CD ter fluorescenčna in UV-VIS-spektroskopija v trdnem stanju. DSC uporabljamo za vrednotenje mobilnosti molekul, kinetike kristalizacije, stopnje kristalizacije in denaturacije ter za določanje temperature steklastega prehoda, ki jo rutinsko določamo pri razvoju trdnih formulacij. XRPD nam omogoča ugotavljanje kristalnosti oziroma amorfности praška. S HDX-MS proučujemo strukturo proteinov v trdnem stanju z visoko ločljivostjo in tako odkrivamo spremembe v konformaciji proteinov, ki kažejo na fizikalno nestabilnost. S proteolizo devteriranih proteinov pa lahko te spremembe ovrednotimo tudi na lokalnem nivoju (23, 24). Za proučevanje interakcij med proteini in pomožnimi snovmi uporabljamo fotolitsko označevanje v trdnem stanju in NMR v trdnem stanju (23). Slednje poleg ozkokotnega nevtronskega sipanja uporabljamo tudi za vrednotenje strukturnih in dinamičnih sprememb (24).

2.2.3 Vrednotenje agregacije

Najpogostejša, najkompleksnejša in najbolj raznolika oblika fizikalne nestabilnosti proteinov je nastanek agregatov (4, 12). Agregati so skupki nativnih ali denaturiranih proteinskih molekul (monomerov), ki so med sabo povezane s kovalentnimi ali šibkimi nespecifičnimi nekovalentnimi vezmi (4, 5). Pri tem nastanejo topni dimeri ali oligomeri ali pa večji skupki nevidnih ali celo vidnih delcev (21, 25). Agregati se razlikujejo po velikosti, morfologiji, proteinski strukturi, vrsti medmolekulskih vezi, topnosti, mehanizmu nastanka in reverzibilnosti, nastanejo pa lahko tako v tekočih kot tudi trdnih formulacijah (4–6, 8, 25). Trenutno sprejeta meja za prisotnost topnih agregatov v proteinskih formulacijah je 5–10 % (5).

Največji izziv pri analizi agregatov predstavlja neznan narava nastalih agregatov in ogromen razpon njihovih velikosti, ki sega od nekaj nm do nekaj mm (25, 26). Z nobeno tehniko ne moremo določiti vseh želenih parametrov v celotnem območju velikosti, zato moramo za celovito ovrednotenje agregacije uporabiti kombinacijo komplementarnih in ortogonalnih tehnik (12, 25, 26).

Na voljo je velik nabor analiznih tehnik, ki se razlikujejo po fizikalnem principu meritve, posledično pa nam omogočajo ovrednotenje različnih vidikov agregacije (preglednica I) (8, 25, 26). Nekatere tehnike so farmakopejske (npr. vizualni pregled), druge, predvsem robustne kvantitativne tehnike,

so primerne za uporabo v kontroli kakovosti (npr. SEC), tretje so namenjene podpori pri razvoju izdelka ali pa potrditvi ustreznosti metod za kontrolo kakovosti (npr. dinamično sipanje svetlobe), nekatere tehnike, kot so samointerakcijska in navzkrižnointerakcijska kromatografija ter izotermična kalorimetrija, pa uporabljamo za napovedovanje agregacije (4, 21, 25). Analizne tehnike za vrednotenje agregatov temeljijo na osnovi določanja velikosti, zato je večina primerna tudi za vrednotenje fragmentacije proteinov (8).

2.2.4 Vrednotenje adsorpcije proteinov

Proteini so površinsko aktivne molekule, ki se zlahka adsorbirajo na hidrofobne površine in medfaze. Adsorpcija vodi v zmanjšanje koncentracije proteina, lahko pa vpliva tudi na stabilnost, povzroči strukturne spremembe ali izzove agregacijo proteina (4, 5, 28). Proučevanje adsorpcije proteinov je zahtevno zaradi povezanosti proteina s površino in majhne količine adsorbiranega proteina. Izbira analizne tehnike je odvisna od površine, količine adsorbiranega proteina, kompleksnosti vzorca in želenih informacij (kinetika adsorpcije, konformacija, orientacija in količina adsorbiranega proteina).

S posameznimi tehnikami ne moremo opisati celotnega procesa adsorpcije, zato tudi v tem primeru uporabljamo kombinacije najrazličnejših tehnik, kot so radiooznačevalne, imunokemijske (npr. ELISA), gravimetrične (npr. kvarčna mikrotehnika z meritvami disipacije), optične (npr. površinska plazmonska resonanca (SPR), elipsometrija), spektroskopske (npr. FTIR, CD, ramanska in fluorescenčna spektroskopija) in mikroskopske (npr. mikroskopija na atomsko silo) tehnike ter MS in metoda izpraznitve (28–30).

2.3 VREDNOTENJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

Vzporedno s fizikalno-kemijskim vrednotenjem je treba ovrednotiti tudi biološko aktivnost proteina (4, 9, 22). Biološke teste uporabljamo le kot komplementarne teste, saj ohranjena biološka aktivnost ne pomeni, da je struktura proteina nespremenjena in torej niso zadosten dokaz za stabilnost proteina (4). Uporabni pa so za oceno pomembnosti ugotovitev iz študij stabilnosti z vidika kliničnih učinkov (9).

Biološke teste delimo na teste *in vivo* in teste *in vitro*. Pri testih *in vivo* učinkovino apliciramo živali in spremljamo njen odziv (31, 32). Pomanjkljivosti testov *in vivo* so visoki

stroški, slabi specifičnost in občutljivost, visoka variabilnost rezultatov med živalmi, časovna potratnost ter etični vidiki, prednost pa boljša klinična relevantnost rezultatov, poleg tega pa lahko opazimo tudi morebitne neželene učinke (32).

S testi *in vitro* spremljamo in merimo odziv specifičnega receptorja ali mikrobiološke ali tkivne celične linije po dodatku proteinske učinkovine (31). Prednosti testov *in vitro* pred testi *in vivo* so manjša variabilnost ter cenejša in hitrejša izvedba. Po drugi strani pa so testi *in vitro* le nadomestni kazalec biološke aktivnosti in ne odražajo dejanskih razmer v okolju *in vivo*, predvsem kadar pri njihovi izvedbi uporabimo spremenjene celice, poleg tega pa so lahko podvrženi številnim interferencam (32).

Biološke teste *in vitro* delimo na celične teste in na teste vezave. Slednji temeljijo na ELISA ali SPR in jih pogosto uporabljamo pri razvoju bioloških zdravil (8). S številnimi in raznolikimi celičnimi testi spremljamo vpliv učinkovine na proliferacijo, diferenciacijo in adhezijo celic, citotoksičnost, izražanje genov, sintezo DNA, sproščanje citokinov, aktivacijo kinaznih receptorjev, izražanje in sintezo različnih proteinov, ki jih sekundarno določamo z imunokemijskimi testi, ter vrednotimo genotoksične učinke učinkovine (8, 31, 32). Z uporabo pristopa reporterskih genov se je razvoj bioloških testov bistveno poenostavil (8).

3 SKLEP

Stabilnost proteina je temeljna lastnost, ki določa, pod katerimi pogoji je protein pravilno zvit in zato aktiven. Zaradi prepletanja različnih dejavnikov in velike raznolikosti možnih sprememb je opredelitev strategij za vrednotenje stabilnosti proteinov ključnega pomena za uspešen razvoj zdravila in predstavlja velik izziv za strokovnjake s področja analitike. Poleg tega moramo analizne pristope zaradi raznolikosti teh učinkovin individualno prilagoditi posameznim proteinom. Izbiramo lahko med številnimi tehnikami, kot so separacijske, spektroskopske, imunokemijske in mikroskopske tehnike, biološki testi, metode termične analize in druge. Nepogrešljivo orodje za analitiko proteinov in vrednotenje njihove stabilnosti pa je v zadnjih desetletjih postala MS, saj zaradi različnih izvedb in načinov delovanja masnih spektrometrov ter možnosti sklopitve z drugimi tehnikami omogoča proučevanje najrazličnejših sprememb, ki so posledica tako kemijske kot tudi fizikalne nestabilnosti. Zaradi

Preglednica 1: Pregled analiznih tehnik za vrednotenje agregacije proteinov (4, 5, 8, 12, 25–27).

Table 1: Overview of analytical techniques used for the evaluation of protein aggregation (4, 5, 8, 12, 25–27).

Tehnika	Opazovana lastnost	Velikostni razred
Vizualni pregled	ocenitev bistrosti, opalescence, motnosti	> 50 μm – mm
Optična mikroskopija	velikost in morfologija delcev, štetje delcev	> 1 μm – mm
Metoda zatemnitve svetlobe (<i>Light obscuration</i>)	koncentracija in velikost delcev	1–150 μm ⁽⁴⁾ 2–100 μm ⁽²⁵⁾
Pretočna mikroskopija (MFI)	koncentracija, velikost in morfologija delcev (oblika, transparentnost, kompaktnost)	1–100 μm ⁽¹²⁾ 1–400 μm ⁽²⁵⁾ > 1 μm ⁽⁴⁾
Fluorescenčna mikroskopija	velikost in oblika (delci, amiloidni proteini)	> 1 μm –mm
Coulterjev števec (EZS)	koncentracija in velikost delcev	0,4–1200 μm
Laserska difrakcija*	koncentracija in velikost delcev	20 nm – 2 mm
Dinamično sipanje svetlobe (DLS)	hidrodinamska velikost, homogenost vzorca	0,3 nm – 10 μm ⁽⁴⁾ 1 nm – 5 μm ⁽²⁵⁾ 10 nm – 5 μm ⁽⁵⁾
Metoda sledenja nanodelcem (NTA)	hidrodinamska velikost, koncentracija delcev (semikvantitativno)	20 nm – 1 μm ⁽²⁵⁾ 30 nm – 0,8 μm ⁽⁶⁾ 30 nm – 1 μm ⁽⁴⁾ 40 nm – 1 μm ⁽¹²⁾
Resonančno merjenje mase (RMM)	koncentracija in velikost delcev, gostota delca	50 nm – 5 μm ⁽⁴⁾ 200 nm – 2 μm ⁽⁸⁾ 300 nm – 5 μm ⁽¹²⁾
Pretočna citometrija	štetje delcev, relativna velikost, intenziteta fluorescence, notranja kompleksnost (struktura) delca	0,2–150 μm ⁽⁸⁾ > 500 nm ⁽¹²⁾
Večkotno sipanje laserske svetlobe (MALLS)	molekulska masa, velikost (polmer vrtenja)	kDa – MDa
Nefelometrija, turbidimetrija	optična gostota ali intenziteta sipanja svetlobe je odvisna od razmerja med velikostjo delcev in koncentracijo	Ni relevantno
Izključitvena kromatografija (SEC)	molekulska masa, oblika, hidrodinamska velikost	1–50 nm
Nativna poliakrilamidna gelska elektroforeza	elektroforetska mobilnost	kDa – MDa
Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (SDS-PAGE)	navidezna molekulska masa, prisotnost disulfidnih vezi, čistost	kDa – MDa
Kapilarna SDS elektroforeza (CE-SDS)	navidezna molekulska masa, prisotnost disulfidnih vezi, čistost	kDa – MDa
Pretočni sistem z asimetričnim prečnim pretokom (AF4)	hidrodinamska velikost	1 nm – nekaj μm
Elektronska mikroskopija (TEM, SEM, CryoEM)	velikost in morfologija delcev (oblika, površinske lastnosti, sestava, atomska struktura)	nm – mm
Mikroskopija na atomsko silo (AFM)	velikost in morfologija delcev	nm območje
Ozkokotno rentgensko / nevtronsko sipanje (SAXS / SANS)	velikost in oblika molekul / agregatov v raztopini	nm območje
Nativna masna spektrometrija	razmerje med maso in nabojem	atomska ločljivost do območja MDa
Spektrometrija ionske mobilnosti (IMS-MS)	masa, štetje delcev	3–65 nm
Analitsko ultracentrifugiranje (AUC)	molekulska masa, velikost, oblika	1–100 nm
Taylorjeva disperzijska analiza (TDA)	hidrodinamska velikost, ocenjevanje polidisperznosti vzorca	0,1 nm – nekaj 100 nm
Vodna ¹ H jedrska magnetna resonanca (wNMR)	kvantifikacija topnih in netopnih agregatov ter nevidnih delcev	nekaj nm – nekaj μm

* Novejša različica te tehnike je kvantitativna laserska difrakcija, s katero lahko ocenjujemo koncentracijsko porazdelitev proteinskih delcev s premerom med 0,2 in 10 μm (12).

nenehnega razvoja pričakujemo, da bo MS v prihodnosti še bolj uveljavila vlogo nenadomestljive tehnike za vrednotenje stabilnosti proteinov.

4 LITERATURA

1. Temova Rakuša Ž, Roškar R. Stabilnost terapevtskih proteinov. *Farm Vestn.* 2018;69:236–42.
2. Banga AK. *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems.* 3rd ed. Taylor & Francis Group; 2015.
3. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: An update. *Pharm Res.* 2010;27(4):544–75.
4. Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):169–90.
5. Butreddy A, Janga KY, Ajarapu S, Sarabu S, Dudhipala N. Instability of therapeutic proteins — An overview of stresses, stabilization mechanisms and analytical techniques involved in lyophilized proteins. *Int J Biol Macromol [Internet].* 2021;167:309–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.188>
6. Staub A, Guillaume D, Schappler J, Veuthey JL, Rudaz S. Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;55(4):810–22.
7. Bratkovič Tomaž. Imunogenost bioloških zdravil. *Farm Vestn.* 2017;68:345–54.
8. Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B. *Pharmaceutical biotechnology.* 5th editio. Springer Nature Switzerland AG; 2019.
9. Parr MK, Montacir O, Montacir H. Physicochemical characterization of biopharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal [Internet].* 2016;130:366–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.028>
10. ICH. Q5C - Quality of biotechnological products: Stability testing of biotechnological / biological products [Internet]. [cited 2021 Feb 22]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-topic-q-5-c-quality-biotechnological-products-stability-testing-biotechnological/biological-products_en.pdf
11. ICH International Conference on Harmonization. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products Q6B [Internet]. 1999 [cited 2021 Oct 26]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf
12. Patke S. Current Status of Analytical Techniques for Characterization of Protein Stability [Internet]. 2018 [cited 2021 Sep 29]. p. 1–7. Available from: <https://biopharma-asia.com/featured-article/current-status-of-analytical-technique-s-for-characterization-of-protein-stability/>
13. Reubsaet JLE, Beijnen JH, Bult A, Van Maanen RJ, Marchal JAD, Underberg WJM. Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: Physical instability. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;17(6–7):979–84.
14. Fekete S, Guillaume D, Sandra P, Sandra K. Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal Chem.* 2016;88(1):480–507.
15. Graf T, Heinrich K, Grunert I, Wegele H, Habeger M, Bulau P, et al. Recent advances in LC–MS based characterization of protein-based bio-therapeutics – mastering analytical challenges posed by the increasing format complexity. *J Pharm Biomed Anal [Internet].* 2020;186:113251. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113251>
16. Rathore D, Faustino A, Schiel J, Pang E, Boyne M, Rogstad S. The role of mass spectrometry in the characterization of biologic protein products. *Expert Rev Proteomics [Internet].* 2018;15(5):431–49. Available from: <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1469982>
17. Hsiao K, Alves J, Patel R, Adams M, Nashine V, Goueli S. A High-Throughput Bioluminescent Assay to Monitor the Deamidation of Asparagine and Isomerization of Aspartate Residues in Therapeutic Proteins and Antibodies. *J Pharm Sci [Internet].* 2017;106(6):1528–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2017.02.022>
18. Osel N, Parfant TP, Kristl A, Roškar R. Stability-indicating analytical approach for stability evaluation of lactoferrin. *Pharmaceutics.* 2021;13(7).
19. Hamborg L, Horsted EW, Johansson KE, Willemoës M, Lindorff-Larsen K, Teilum K. Global analysis of protein stability by temperature and chemical denaturation. *Anal Biochem.* 2020;605(July).
20. Jeong SH. Analytical methods and formulation factors to enhance protein stability in solution. *Arch Pharm Res.* 2012;35(11):1871–86.
21. Federici M, Lubiniecki A, Manikwar P, Volkin DB. Analytical lessons learned from selected therapeutic protein drug comparability studies. *Biologicals.* 2013;41(3):131–47.
22. Ma H, Ó Fágáin C, O’Kennedy R. Antibody stability: A key to performance - Analysis, influences and improvement. *Biochimie.* 2020;177:213–25.
23. Chen Y, Mutukuri TT, Wilson NE, Zhou Q (Tony). Pharmaceutical protein solids: Drying technology, solid-state characterization and stability. *Adv Drug Deliv Rev [Internet].* 2021;172:211–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.02.016>
24. Bolje A, Gobec S. Analytical techniques for structural characterization of proteins in solid pharmaceutical forms: An overview. *Pharmaceutics.* 2021;13(4).
25. Den Engelsman J, Garidel P, Smulders R, Koll H, Smith B, Bassarab S, et al. Strategies for the assessment of protein aggregates in pharmaceutical biotech product development. *Pharm Res.* 2011;28(4):920–33.
26. Khodabandehloo A, Chen DDY. Particle sizing methods for the detection of protein aggregates in biopharmaceuticals. *Bioanalysis.* 2017;9(3):313–26.
27. Taraban MB, Depaz RA, Lobo B, Yu YB. Use of Water Proton NMR to Characterize Protein Aggregates: Gauging the Response and Sensitivity. 2019;
28. Martins MCL, Sousa SR, Antunes JC, Barbosa MA. Protein Adsorption Characterization. In: Navarro M, Planell JA, editors. *Nanotechnology in Regenerative Medicine Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols).* Humana Press; 2012. p. 141–61.
29. Nakanishi K, Sakiyama T, Imamura K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J Biosci Bioeng.* 2001;91(3):233–44.



30. Hlady V, Buijs J, Jennissen HP. *Methods for studying protein adsorption. Methods Enzymol.* 1999;309:402–29.
31. Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B. *Pharmaceutical biotechnology. 3rd editio. Current Opinion in Biotechnology.* 2008.
32. Tang L, Persky AM, Hochhaus G, Meibohm B. *Pharmacokinetic aspects of biotechnology products. J Pharm Sci.* 2004;93(9):2184–204.