

Urbányi Zoltán

■ Richter Gedeon Nyrt.

# A biológikum-analitika kihívásai

**A** fehérjemolekulákat hatóanyagként tartalmazó gyógyszerek (biológikumok) elterjedése és felfutása az 1990-es években kezdődött és napjainkban is tart. 2014-os adatok szerint a világ 10 legnagyobb árbevételű gyógyszere közül 7 biológikum volt. Az ilyen gyógyszerek sikerét elsősorban a kismolekulákénál nagyobb specificitásuk és hatékonyságuk indokolja. Ezek a gyógyszer-molekulák nagy affinitással és nagy szelektivitással képesek felismerni a célmolekulát, ami lehet sejtfelszíni vagy szolubilis antigén, receptor, vagy akár a receptor ligandja. Ezen hatóanyagok nagy hatékonysága és mérete, szerkezetének komplexitása természetesen nem független egymástól. Mít értünk nagy méret és komplexitás alatt? Hogyan befolyásolja ez a gyógyszer-molekula biológiai aktivitását és persze az analitikus munkáját? Jelen cikkben erről kívánok rövid áttekintést nyújtani.

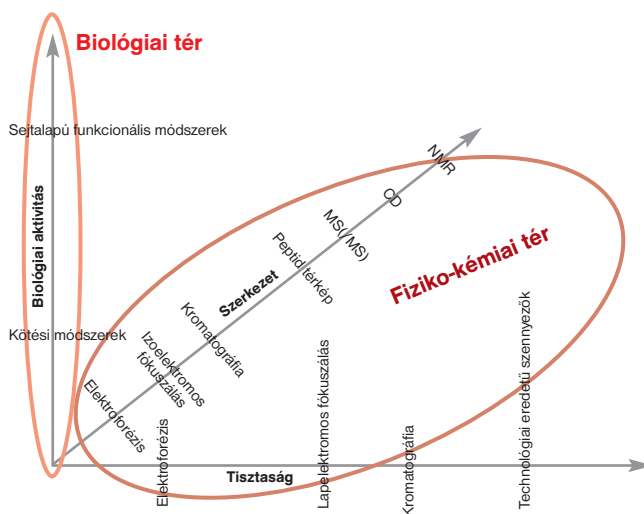
Első megközelítésben a fehérjék és az egyéb szerves molekulák kémiaiilag nem sokban különböznek. Egyaránt szén, hidrogén, nitrogén, kén, esetleg foszfor vagy fémionok építik fel, a molekulákban lévő kötéstípusok is megegyeznek a szerves kémiában ismert kötéstípusokkal. Mi tehát a különbség? Tényleg a méret a lényeg? Részben igen.

Ha közelebbről megnézzük ezeket a molekulákat, látjuk, hogy míg a Vinpocetin huszonkét szénatomot tartalmaz, addig egy közepes méretű terápiás fehérje, a Filgrastim nyolcszáznegyvenötöt, a klinikumban szintén elterjedt monoklonális antitestek pedig több mint háromezer-négyszázat. A nagy méret azonban nagyobb komplexitással, nagyobb változékonysággal is társul. Ennek forrása egyrészt a fehérjék térszerkezetének nagy variabilitása a másod-, harmad- és negyedrendű szerkezeti szinteken, másrészt a poszttranszlációs módosítások és egyéb olyan módosulatok keletkezése, amelyek akár a gyártás közben, akár a fehérje tárolása során is keletkezhetnek.

A poszttranszlációs módosulatok gyakori fajtája a glikoziláció. Az eritropoetin esetében több mint harmincféle glikozilációs változatot írtak le, melyek akár egyetlen kisserelési egységben együttesen is jelen lehetnek. A feldolgozás, illetve tárolás során különböző oxidált, deamidált és egyéb kémiaiilag módosított variánsok keletkeznek, ami tovább növeli a gyógyszer-molekula összetettségét. Steven Kozlowski, az FDA munkatársának becslése szerint monoklonális antitestek esetében a különböző variánsokból együttesen mintegy  $6 \cdot 10^8$  féle lehet jelen akár egyetlen ampullában [1]. Ezek a számok jól mutatják a biológikum-analitika előtt álló kihívásokat, a feladat bonyolultságát.

Jogosan vetődik fel a kérdés: ilyen fokú komplexitás mellett hogyan lehet esély arra, hogy ezeket a fehérjéket a gyógyszerek esetében elvárt alapossgággal, részletességgel és pontossággal vizsgáljuk? Ezt csak akkor tudjuk megtenni, ha az ortogonális mód-

szerek arzenálját vetjük be és a kapott adatokat komplexen értelkeljük, hiszen minden egyes vizsgálat a fehérje jellemzőinek kis részéről ad információt. Méretükből és komplexitásukból adódóan még a modern spektroszkópiai és diffrakciós módszerek sem képesek arra, hogy pontos képet adjanak a molekula háromdimenziós szerkezetéről, ezért a szerkezeti és biológiai aktivitás adatokat együttesen kell értékelnünk. A biológiai aktivitásban tapasztalt eltérések utalhatnak olyan szerkezeti különbségekre, amelyeket fizikokémiai módszerekkel nem tudunk detektálni. Az **1. ábrán** bemutatott 3 dimenziós grafikon ezt hivatott szemléltetni.



**1. ábra.** A biológiai tér és a fizikai kémiai tér

Ahhoz, hogy gyógyszerhatóanyagunkat megfelelően jellemezzni tudjunk, a szerkezeti paramétereket, a variánsokat, a szennyezőket és a biológiai tulajdonságokat együttesen szükséges elemezni, és ebből a megfelelő következtetéseket levonni. Bár az állatkísérletek szükségessége az originális biológikumok fejlesztése során nem kérdőjeleződött meg, ez, valamint a hatóságok (EMA, FDA) azon felismerése, hogy az in vivo preklinikai vizsgálatok nem minden esetben relevánsak (gyakran az immunválasz nagy fajspecifitása miatt), az analitikai vizsgálatok mennyisége és súlya jelentősen megnőtt a „hagyományos” kismolekulás gyógyszerek fejlesztéséhez képest.

A különböző hatósági „guideline”-ok jó iránymutatást adnak a biológikumok jellemzéséhez szükséges analitikai vizsgálatok köréről [2, 3]. Ezeket a vizsgálatokat és a lehetséges analitikai módszereket az **1. táblázat** foglalja össze.



1. táblázat. Fehérje gyógyszerhatóanyagok analitikai vizsgálati módszerei

Azonosság/szerkezet	Elsődleges szerkezet	Aminosavsorrend	HPLC–MS/MS, Edman-lebontás	
		Aminosav-összetétel	Aminosav-analízis	
	Magasabb rendű szerkezet Másodrendű szerkezet Harmadrendű szerkezet		„Far UV–CD” (190–250 nm)	„Near UV–CD” (250–350 nm)
			Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)	FT infravörös spektroszkópia
			Hidrogén-deutérium csere (HDX) MS	NMR
			Röntgendiffrakció	Konformációs ELISA
			HPLC–MS/MS	Szabad tiol meghatározása/ Ellman-módszer
			HPLC–MS/MS	
	Poszttranszlációs módosítások	Diszulfidhidak	HPLC–MS/MS	Szabad tiol meghatározása/ Ellman-módszer
			HPLC–MS/MS	
		Glikoziláció helye	HPLC–MS/MS	
		kvantitatív cukorösszetétel	Fluoreszcens származékképzést követő HILIC–HPLC	
monoszacharid-meghatározás		magas pH-jú ioncserélő HPLC pulzáló amperometriás detektálással		
szíalsavtartalom		HPLC		
glikoformák szerkezete		HPLC–MS/MS		
Tisztaság/variánsok	Különböző töltésű variánsok	IgG C-terminális Lys-variánsok	Ioncsere-kromatográfia, izoelektromos fókuszálás,	
		Deamidáció (Asn, Gln)	HPLC–MS	
	Oxidáció			
	N-terminális piroglutamát-képződés		HPLC(–MS)	
	Eltérő méretű variánsok	Dimer, trimer		Méretkizárásos kromatográfia, analitikai ultracentrifuga, fényszóráson alapuló módszerek, mikroáramlásos képalkotás (microflow imaging, MFI)
Nagy aggregátumok				
Fragmensek			Méretkizárásos kromatográfia, HPLC–MS	
Hatóanyag-tartalom		Koncentrációmérés	RP–HPLC, Protein A–HPLC (IgG), UV-abszorbanca	
		Extinkciós koefficiens meghatározása	Aminosav-analízis	
Biológiai aktivitás	Kötésen alapuló módszerek	Receptor-ligand	Felületi plazmonrezonancia (SPR), bioréteg-interferometria (BLI), ELISA	
		Atigén-antitest		
		Fc-receptorok		
		Komplement komponensek) (C1q		
	Sejtalapú módszerek	Receptor- aktiválás/gátlás		
		IgG Fc-funkciók	ADCC CDC	
		Egyéb	Hatásmechanizmustól függően	



Mindenekelőtt meg kell határozni, milyen paramétereket szükséges vizsgálnunk termékünk jellemzéséhez. A szóba jöhető minőségi jellemzők (quality attributes) közül kockázatértékelés keretében meg kell határozni a kritikusakat (critical quality attributes, CQA). Ennek során értékelni kell, milyen hatása lehet az adott minőségi jellemzőnek a termék terápiás szempontból legfontosabb tulajdonságaira, mint a biológiai aktivitás, farmakokinetika, farmakodinamika, hatásosság és gyógyszerbiztonság, ezen belül is kiemelten az immunogenitási jellemzőkre. A kritikuság értékeléséhez figyelembe kell venni az adott molekulával vagy rokon szerkezetű molekulákkal (pl immunoglobulinok esetében) nyert tapasztalatokat és az irodalmi adatokat is megfelelő súlyozással [4]. Az alábbiakban a különböző minőségi paraméterek vizsgálatára alkalmas módszereket mutatom be.

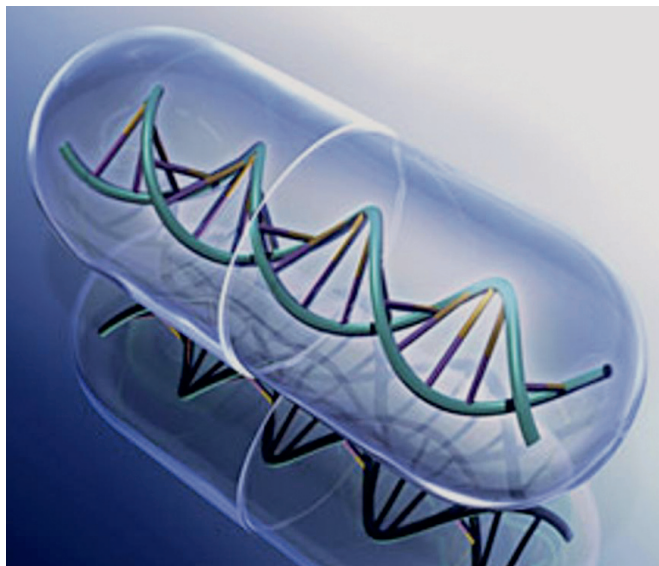
Egy fehérje vizsgálatának alfája és mindennek alapja a primer aminosavsorrend, amely elsődlegesen befolyásolja az adott fehérje funkcióját, biológiai aktivitását, a gyógyszer hatásosságát és biztonságosságát. Kiemelten fontos annak biztosítása és igazolása, hogy a fehérje-hatóanyag aminosav-szekvenciája megegyezik a tervezett, és abban sem a gyártás során, sem a gyógyszer életciklusában nem következhet be eltérés. Az aminosavszekvencia-meghatározás majdnem egyeduralgató módszere az MS/MS-szekvenálás, amely során először a nagyméretű fehérjét több (általában két-három) enzimmel párhuzamos reakciókban peptidre hasítják. A peptidre HPLC-n elválasztva, majd a tömegspektrométer ionforrásába vezetve az MS/MS-spektrumokból szoftveres és/vagy manuális kiértékeléssel az aminosavsorrendet visszafejtik. Mivel a jelenlegi tömegspektrometriás módszerek kevés kivételtől eltekintve nem képesek különbséget tenni az azonos tömegű (izobár) leucin és izoleucin aminosavak között, ezen aminosavak meghatározására a hagyományos Edman-lebontásra is szükség lehet. Tömegspektrometriás módszerrel lehetőség nyílik különböző poszttranszlációs módosulások, diszulfidhidak pozíciójának meghatározására is.

A teljes lefedettségű MS/MS-szekvenálás rendkívül munkaigényes és időrabló, ezért lehetőség van a primer szerkezet ellenőrzéséhez az úgynevezett peptid térkép (peptide mapping) alkalmazására, amely a rutin analitikai vizsgálatokra is alkalmazható. Ebben az esetben csak egy enzimmel történik az emésztés, a peptid térkép kromatogram-meghatározása fordított fázisú HPLC-vel, UV- vagy MS-detektálással történik. Ebben az esetben elvárás a peptidszinten meghatározott legalább 90–95%-os lefedettség.

Számos olyan poszttranszlációs módosításról vagy a gyártás során keletkező módosulatról is számot kell adni, melyek biológiai aktivitással rendelkeznek, ezért nem tekinthetjük őket szennyezőknek, hanem variánsokként kell kezelniük.

A poszttranszlációs módosítások közül az egyik legfontosabb a glikoziláció, amely jelentősen befolyásolhatja a fehérje biológiai aktivitását és farmakokinetikai viselkedését [5]. Az egyik leggyakoribb terápiás fehérjecsald, a monoklonális antitestek esetében a nehéz lánc C-terminális lizinje a fehérje processzálódása során enzimatikusan lehasadhat, illetve az N-terminálison piroglutaminsav képződhet.

Ezek vizsgálatának általánosan használt módszere a tömegspektrometriás analízis, azonban nagy műszer- és munkaigénye miatt egyszerűbb, célzott módszerekre is szükség van. A glikoziláció rutinszerű vizsgálata leggyakrabban a cukorrész lehasítását és fluoreszcens származékképzést követően kromatográfiás analízissel (pl. HILIC) történik. A már említett C-terminális lizinvariánsok mellett a különböző aszparagin és glutamin aminosavak



dezamidálódásával (és egyéb módokon) keletkező töltésvariánsok ioncsere-kromatográfiával, a metionon vagy cisztein aminosavak oxidációjával keletkező formák célzott peptid térkép-vizsgálattal, a tenyésztő közeg vagy a formuláló közeg redukáló cukortartalmával és a lizin-oldalláncok reakciójával keletkező úgynevezett glikált módosulatok pedig boronát affinitáskromatográfiával vizsgálhatóak.

Íde sorolandók még az eltérő molekulatömegű variánsok is, melyek közül a különböző aggregátumok lehetnek dimerek, trimerek vagy akár több millió dalton tömegű nagy asszociátumok. Ezek, lévén potenciálisan immunogének, elsősorban immunológiai kockázatot jelenthetnek.

Ezek vizsgálata rendszerint valamilyen kromatográfiás technikával történhet, melyeket az **1. táblázat** foglal össze. Mivel ezek a variánsok biológiailag aktívak, ezért nemcsak szerkezetüket és mennyiségüket, de terápiás szempontból releváns biológiai aktivitásukat is részleteiben fel kell deríteni, meg kell határozni, illetve ezeket megfontolva kockázatukat értékelni kell!

A fehérjék magasabb rendű szerkezete, melyet részben meghatároz a primer szerkezet, biológiai aktivitás szempontjából szintén kiemelt jelentőségű, azonban vizsgálata már nem olyan egyértelmű, mint az elsődleges szerkezeté. A másodlagos szerkezet vizsgálatára alkalmazott cirkuláris dikroizmus spektroszkópia nagyobb fehérjék esetében már nem kellőképpen érzékeny a kisebb szerkezeti eltérésekre, de ugyanez igaz a harmadlagos szerkezet vizsgálatára használt fluoreszcens spektroszkópiára is. Érzékeny módszer az egy- és kétdimenziós NMR, amely jól használható a spektrumok ujjlenyomatszerű összehasonlítására, azonban a bonyolult spektrumokban a jelek asszignációja rendkívül nehéz. Elterjedten használt módszer a fehérjék magasabb rendű, térbeli szerkezetének felderítésére a röntgendiffrakció, ahol nagyméretű fehérjék esetén komoly kihívást jelent a kristályosítás. További, jelentős, részben még kihasználatlan lehetőségek lehetnek a kis szögű röntgen- és neutronszórás technikákban és egy teljesen új megközelítést alkalmazó konformációs ELISA módszerben is.

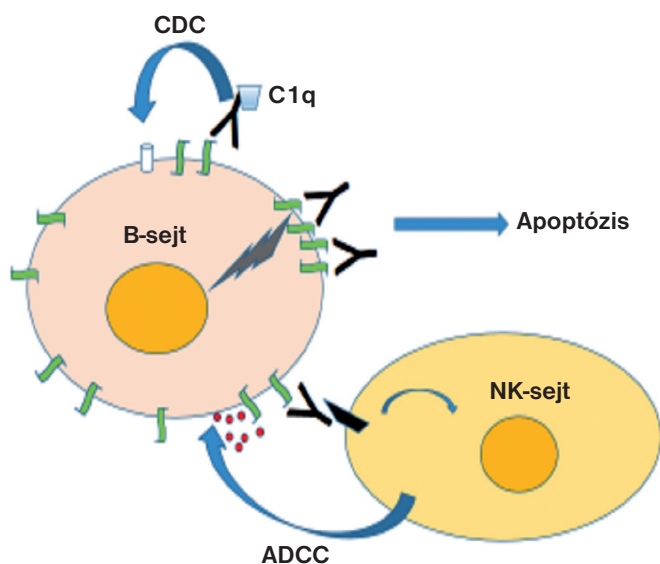
A biológiai/funkcionális vizsgálatok szerepe esetünkben lényegesen nagyobb, mint a kismolekulás gyógyszerhatóanyagok esetében, mivel a szerkezet bonyolultsága és nagyfokú variabilitása nem teszi lehetővé, hogy pontos, részletes és teljes képet kapjunk a fehérje szerkezetéről és az attól való lehetséges eltérésekről. Amellett, hogy a biológiai aktivitás mérés fontos információt ad a fehérje funkcionalitásáról, a biológiai aktivitásban tapasztal-



ható eltérések a szerkezetvizsgálati módszerek által nem látható szerkezeti különbségekre is felhívhatják a figyelmünket. A biológiai/funkcionális vizsgálatokról nem lehet általános megoldásokat bemutatni, hiszen az alkalmazott megközelítéseknek és módszereknek tükrözniük kell a vizsgált fehérje biológiai funkcióit és a terápiás szempontból releváns hatásmechanizmusukat. Ezek természetesen a fehérjénként eltérőek. Az alkalmazott modelleknek ki kell terjedniük az adott hatásmechanizmus felderítésére és vizsgálatára a megfelelő kölcsönhatások (leggyakrabban fehérje-fehérje kölcsönhatás) közvetlen mérésével, a kötési állandók meghatározásával és a sejtszintű folyamatok vizsgálatára is.

Általánosnak tekinthető iránymutatást a monoklonális antitestek esetében a releváns EMA guideline-ból [2] kaphatunk. Bár a guideline bioszimiláris monoklonális antitestekre érvényes, az ebben megfogalmazott főbb irányvonalak originális monoklonális antitestek jellemzésére is figyelembe vehetők és veendőek. Az alábbiakban, a feladat komplexitását bemutató, az egyik legkorábban engedélyezett monoklonális antitest, a rituximab példáján mutatom be, milyen módon vizsgálható-vizsgálendő egy terápiás fehérje biológiai aktivitása.

A rituximab forgalomba hozatalát 1998-ban engedélyezték reumatoid arthritis és non-Hodgkin-limfómák kezelésére. Európában MabThera, az Egyesült Államokban és Japánban Rituxan néven van forgalomba. Hatásának alapja az érett B-sejteken kifejeződő sejt felszíni CD20 fehérjeantigén felismerése és megkötése. Ezt követően az így „megjelölt” B-sejtek eliminációja három fő csapás mentén haladhat (2. ábra).



**2. ábra. A B-sejtek eliminációja**

A CD20 megkötésének eredményeképpen, mivel egy rituximab molekula két antigénmolekula megkötésére képes, a CD20 fehérje dimerizálásán keresztül a célsejt apoptózist indíthatja be, aminek következtében a célsejt aktív módon elpusztítja önmagát. Az IgG1 molekula, jelen esetben a rituximab, amennyiben kialakult az antigén-antitest komplex Fc-régiója, képes megkötni a komplement-rendszer első komponensét, a C1q fehérjekomplext, ami a komplement-kaskád folyamat aktiválásához vezet, és a célsejt lízist váltja ki (complement mediated cytotoxicity, CDC). Amennyiben az antigén-antitest komplexben kötött IgG1 (rituximab) Fc-régiója a természetes ölősejt (natural killer cell, NK-sejt) felszínén expresszálandó CD16a (FcγRIIIa) receptorhoz

Csak Fab-régióhoz kötött hatások	CD20 antigén-kötés	SPR, BLI, ELISA, áramlási citometria
	Apoptózis	Sejtes módszer
Fc-régió keresztül megvalósuló hatások	FcγRIIIa (nagy affinitású) receptorkötés	SPR, BLI
	FcγRIIIa ) (kis affinitású) receptorkötés	
	FcγRIIIb receptorkötés	
	FcγRIIa receptorkötés	
	FcγRIIb receptorkötés	
	FcγRI receptorkötés	
	FcRn receptorkötés	
	CDC	Sejtes módszer
	ADCC	

**2. táblázat. A rituximab biológiai/funkcionális analitikai módszerei**

kötődik, úgy az aktiválja az NK-sejtet. Az aktivált NK-sejt olyan fehérjét (perforin, granzyme B) bocsát ki, amelyek a térben hozzá közel lévő célsejt pusztulását okozzák (antibody-dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC). Ezen három fő útvonal mellett egyéb, terápiás szempontból lényegesen kisebb jelentőségű útvonalak is szóba jöhetnek, mint például a fagocitózis (ADCP) vagy a sejtproliferáció gátlása.

Megfontolva a fentebb ismertetett hatásmechanizmusokat a hatósági elvárások függvényében a 2. táblázatban összefoglalt biológiai/funkcionális módszerpanel kidolgozása tekinthető szükségesnek és elégségesnek.

Tekintettel a fehérje gyógyszerhatóanyagok méretére, szerkezetük összetettségére és nagyfokú variabilitására, ezen molekulák jellemzése és minősítése csak a különböző szakterületekről származó adatok együttes értékelésével lehetséges. Csak a szerkezeti, tisztasági és biológiai adatok együttes értékelésével kaphatunk tiszta és egyértelmű képet ezeknek a molekuláknak a minőségéről, emiatt az ezen a területen dolgozó analitikusoknak a kémia és a biológia határmezsgyéjén mozogva kell megtervezniük, kivitelezniük és értékelniük az analitikai vizsgálatokat.

**IRODALOM**

[1] S. Kozłowski, P. Swann: Current and future issues in the manufacturing and development of monoclonal antibodies, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2006) 58, 707–722.  
 [2] Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products, ICH Harmonised Tripartite Guideline Q6B  
 [3] Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues EMA/CHMP/BMWP/403543/2010  
 [4] N. Alt et al.: Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles, *Biologicals* (2016) 44, 291–305.  
 [5] D. Pace et al.: Characterizing the Effect of Multiple Fc Glycan Attributes on the Effector Functions and FcγRIIIa Receptor Binding Activity of an IgG1 Antibody, *Bio-technol. Prog.* (2016) 32. 1181–1192l.