



Kiss Róbert¹ – Fizil Ádám² – Szántay Csaba¹

¹Richter Gedeon Nyrt., Szerkezetkutatási osztály

²Richter Gedeon Nyrt., Biotechnológiai Analitikai osztály

Az NMR-spektroszkópia szerepe a biologikumok analitikájában

Bevezetés

Az elmúlt két évtizedben a gyógyszeripar globális piaca jelentős átalakulásokon ment keresztül, melyek közül kétségtelenül a leglátványosabb a biotechnológiai úton előállított gyógyszereknek a hagyományos (kismolekulás, azaz tipikusan néhány száz Da molekulatömegű) gyógyszerekkel szemben való térnyerése. A biotechnológiai gyógyszerkészítmények (ún. biologikumok) hatóanyaga – amely többnyire fehérje – nem csupán az előállítás módjában különbözik a hagyományos gyógyszerhatóanyagoktól, hanem a molekula méretében (a nagyobb terápiás fehérjék kb. 1300 aminosavból álló és közel 150 000 Da tömegű „monstrumok”), szerkezetének összetettségében és szerkezeti heterogenitásában is nagyságrendnyi különbségek vannak. A biológiai gyógyszerhatóanyagok szerkezetének jellemzésében a mágneses magrezonancia (*nuclear magnetic resonance*, NMR) spektroszkópia és a tömegspektrometria (*mass spectrometry*, MS) nyújtják a legbővebb – a többi spektroszkópiai módszerhez képest egyedülálló módon atomi felbontású – információt (itt eltekintünk az ugyancsak atomi felbontású egykristály-röntgendiffrakciótól, amelynek használata a jelen cikkben tárgyalt analitikai problémák tekintetében erősen limitált). Fontos hangsúlyozni, hogy az „NMR-spektroszkópia” és az „MS” is gyűjtőfogalom, hiszen mindkettő jelenleg is intenzíven fejlesztett módszerek sokaságát foglalja magában.

A kismolekulás gyógyszerhatóanyagok és a biologikumok szerkezetvizsgálatában az NMR és MS önmagukban is, továbbá egymás kiegészítőként is merőben más szerepet töltenek be, más-más módszertani apparátust használva. A kismolekulák esetében a „szerkezet” fogalma egyértelmű abban a tekintetben, hogy adott hatóanyag egyetlen és csakis egyetlen, egzaktul definiált konstitúcióval, illetve relatív és abszolút konfigurációval rendelkező molekulát jelent. Bárki, bárhol és bármikor állítja elő ezt a hatóanyagot (például az originátor hatóanyagát egy generikus gyártó), minden sarzs minden egyes hatóanyag-molekulájának pontosan ilyen szerkezetűnek kell lennie, amit az esetek túlnyomó többségében NMR és MS segítségével egyértelműen bizonyítani is lehet. A kismolekulák szerkezetvizsgálatában az MS legfőbb szerepe az elemi összetétel meghatározása, esetlegesen kiegészítve a konstitúcióra vonatkozó hasznos, de nem mélyreható adatokkal, míg az NMR „dolga”, hogy a molekula konstitúcióját és térszerkezetét mélyrehatóan és egzaktul feltárja, amire többnyire *ab initio* módon (tehát referens szerkezetekkel való összehasonlítás nélkül) is képes. Ezek a szerepekörök jól ismertek és jól körülhatároltak. Ezzel szemben a biologikumok világában (később bő-

vebben részletezett okokból) már maga a *szerkezet* definíciója is más értelmezést kíván meg, és így merőben más típusú fizikai-kémiai jellemzést, új analitikai módszerek kidolgozását teszi szükségessé, amelyben az MS és NMR alkalmazott módszertana és szerepköre is teljesen eltérő. A *szerkezet* értelmezésével kapcsolatban az okozza az egyik nehézséget, hogy adott gyártásból származó hatóanyag-sarzsok belül megjelenik némi szerkezeti variabilitás az egyes biomolekulák között, és a különböző helyeken és időben gyártott sarzsok sem pontosan egyformák a szerkezet minden részlete tekintetében. A szabadalom lejártával az originátor hatóanyagát „másoló” gyártók hatóanyaga ezért sohasem egyezik meg *pontosan* az eredetivel, a reális cél csak az lehet, hogy *kellően hasonló* legyen hozzá. Ezért van az, hogy az ilyen „másolt” biologikumokat nem biogenerikus, hanem „*biohasonló*” vagy „*bioszimiláris*” (angolul *biosimilar*) gyógyszereknek nevezzük. A nemzetközi gyógyszeripari tevékenységeket szabályozó hatóságoknak – ilyen az Európai Unióban a European Medicines Agency (EMA), az USA-ban pedig a Federal Drug Administration (FDA) – tehát a biologikumokra nézve olyan új gyógyszerbiztonsági és minőségi kritériumokat kellett kidolgozniuk, amelyek sok tekintetben különböznek a hagyományos gyógyszerekétől [1, 2]. Ezeknek a minőségi kritériumoknak a lefedetése rengeteg kihívást jelent, hiszen közel sem egyértelmű, hogy a biomolekulák számos szerkezeti aspektusát számításba véve pontosan mit értünk „kellően hasonló” alatt, és hogy ezt a hasonlóságot milyen analitikai módszerekkel és milyen mélységben kell, illetve lehet megfelelően demonstrálni. A terület jelenleg is számos „szürke zónát” tartalmaz, de folyamatosan fejlődik, méghozzá a gyógyszeripari analitikusok, az analitikai műszergyártók és a hatóságok olyan dinamikus, egymást presszionáló/inspiráló kölcsönhatásában, ahol a szakmai és technikai kérdéseken túl az egyes gyógyszeripari szereplők közötti verseny is döntő szerepet kap.

Habár a jelenlegi általános gyakorlat szerint különösen a nagyméretű fehérjék szerkezeti jellemzésének legfőbb eszköze az MS, a jelen cikkkel arra szeretnénk rávilágítani, hogy mennyire kivételes, olykor nélkülözhetetlen szerepet tölthet be az NMR a biologikumok, leginkább a fehérjealapú biohasonló biologikumok fejlesztésében. Azért tartjuk fontosnak tisztázni ennek az egyedülálló szerepnek a mibenlétét, mert az részben a biologikumokat érintő hatósági szabályozások jelenleg is tartó formálódása miatt, részben pedig a gyógyszeripar rendkívül összetett, multidiszciplináris működéséből adódóan sem a szűkebb szakma (gyógyszeralitika, spektroszkópia), sem pedig a biologikum ipar tágabban vett szereplői számára nem mondható jól megértett és letisztult



státuszának. Az elmúlt három-öt év során ebben a témában megjelent szakirodalom összefoglalásával és a Richter Gedeon Nyrt.-ben egy évtizede folyó biotechnológiai fejlesztések során összegyűlt szakmai tapasztalataink alapján szeretnénk egyrészt bemutatni, hogy a biotechnológiai fejlesztések során a gyógyszeriparban dolgozó NMR-spektroszkópus milyen változatos problémafelvetésekkel szembesül, másrészt, hogy e kérdések megválaszolására az NMR-eszköztár milyen széles palettája áll rendelkezésére.

A fenti célkitűzéssel összhangban, a részletek tárgyalása előtt fontos kiemelni azt a kontextust, ami a gyógyszeriparban a biológikumok jellemzésére alkalmazott NMR-spektroszkópiát a többnyire az akadémiai szférában művelt, felfedező jellegű kutatásokat célzó/támogató biomolekuláris NMR diszciplínájától lényegesen megkülönbözteti. Utóbbi több mint 30 éves hagyományokra tekint vissza, és módszertana, bár folyamatosan fejlődik, jól kiérleltnek tekinthető. Az ilyen NMR-kutatások zöménél a vizsgált biomolekulát igen speciális körülmények között mérjük: preparatív kromatográfiás módszerekkel tisztított formában, a spektroszkópiai méréseknek kedvező fizikokémiai körülmények között, melyek közül talán a leglényegesebb, hogy a molekulát az erre alkalmas biotechnológiai eszközök, ún. expressziós rendszerek segítségével „NMR-aktív”, vagyis mágneses momentummal rendelkező stabil izotópokkal (legfőképpen ^{15}N és/vagy ^{13}C) dúsított formában állítjuk elő. Erre azért van szükség, mert a mágneses magrezonancia jelensége csak az NMR-aktív atomokon „működik”, egy protein szerkezeti jellemzése szempontjából az NMR-spektroszkópia legfőbb ereje pedig éppen abban rejlik, hogy képes annak három legfőbb atomfajtája (H, C, N) közt a térbeli, illetve kötésekben át ható atomi kölcsönhatásokat feltérképezni. Míg azonban az NMR-aktív ^1H -izotóp természetes előfordulása 99,99%, a C és N domináns természetes izotópjai, vagyis a ^{12}C (98,93%) és ^{14}N (99,63%), nem NMR-aktív (illetve a ^{14}N esetében fizikai okokból nehezen vizsgálható) magok, addig az NMR-rel jól vizsgálható ^{13}C (1,07%) és ^{15}N (0,37%) izotópok természetes előfordulási aránya mellett sokszor irreálisan hosszú mérésekre lenne szükség. Amennyiben azonban a vizsgált molekulát e követelményeknek megfelelően sikerült preparálni, bonyolult többdimenziós NMR-mérési módszerek (ún. pulzusszekvenciák) száza állnak rendelkezésünkre, melyek alkalmasak arra, hogy atomi felbontású térszerkezeti és dinamikai (a molekulák belső mozgásait leíró) információt nyerjünk. [3, 4] Kis túlzással élve a jelenleg elérhető biotechnológiai és NMR-mérési technikai háttérrel csak a kutatásra szánt költség és idő kérdése, hogy adott (megfelelő méretű és megfelelő körülmények között vizsgált) biomolekula esetében felmerülő szerkezeti kérdést a megfelelő módszer kiválasztásával megválaszoljuk. Ezzel szemben gyógyszeripari körülmények között az alkalmazható NMR-módszerek tárháza drámaian lecsökken, mivel a terápiás fehérjéket stabilizáló segédanyagokat tartalmazó sokkomponensű pufferoldatban forgalmazzák, és a gyártási körülmények nem teszik lehetővé a fehérje-hatóanyagok izotópjelölt formában történő előállítását. További különbség, hogy a bioanalitika feladatköre nem merül ki a termék jellemzésében: a fejlesztésnek szinte minden lépése folyamatos analitikai támogatást igényel, például a fermentáció körülményeinek optimalizálása vagy a gyártásközi szennyezők azonosítása és jellemzése tekintetében. Ezért a biotechnológiai gyógyszeriparban dolgozó NMR-spektroszkópus számára az jelenti az egyik legnagyobb kihívást, hogy a komplex fejlesztési folyamat egészét átlátva felismerje az NMR-spektroszkópiával megoldható kérdéseket és az elérhető módszerek soka-

ságából kiválassza a megfelelőt. Ezt a tevékenységet tágabban értelmezve egy harmadik (az első kettőnél semmivel sem kisebb) kihívás is adódik, melyet a jelen összefoglaló is szolgál: az NMR-eredmények megfelelő interpretálása és a szakmai közeg felé több szinten történő kommunikálása. Ezt azért is fontos hangsúlyozni, mert minden biológikum kifejlesztése egy nagy létszámú multidiszciplináris csapat munkáján alapul, a csapatbeli együttműködés minősége pedig döntően fontos a sikerhez. Ebben az együttműködésben elengedhetetlen, hogy ne csak az NMR-spektroszkópusok értsék, mivel tudnak hozzájárulni a folyamathoz, hanem ez a csapat egésze számára is – legalább koncepcionális szinten – világos legyen. Ezekről a motivációktól vezérelve összegeztük a területen szerzett tapasztalatainkat és a legfrissebb szakirodalmat egy nemrég angolul megjelent összefoglaló formájában [5]. A jelen írás e korábbi cikk magyar nyelvű kivonata és egyben kiterjesztése is.

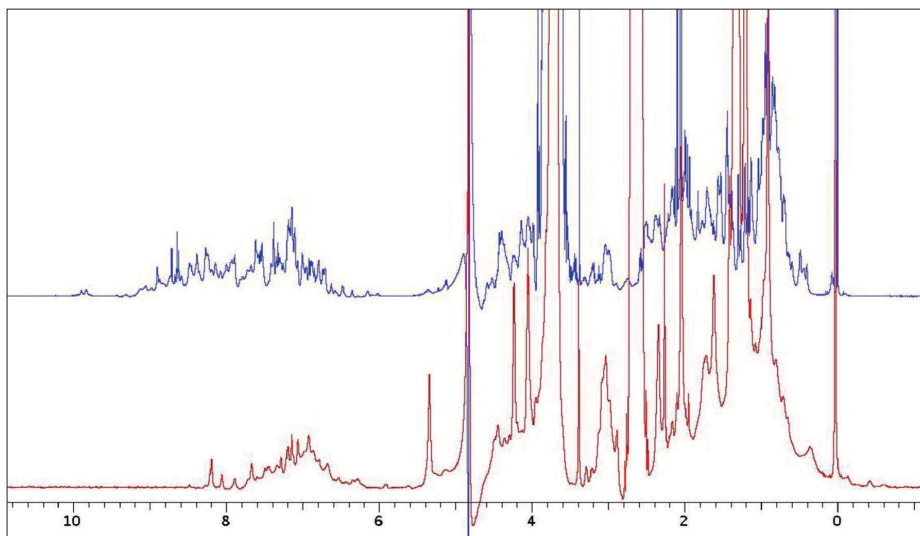
Terápiás fehérjék szerkezetvizsgálata

Biohasznos termékek szerkezetének jellemzése a hatósági elvárások tükrében

A kismolekulás gyógyszerek jellemzésében is általánosan elfogadott megközelítés, hogy egy molekuláról szerzett tudásunkat annál részletesebbnek és teljesebbnek tekintjük, minél többféle (egymástól eltérő fizikai elven működő) analitikai mérésnek vetjük alá. A biomolekulákra ez fokozottan érvényes, hiszen szerkezetük (többek közt méretükből adódóan) nem csak jóval összetettebb, de már egy-egy gyártási sarzsón belül is heterogenitások fedezhetők fel, azaz nem feltétlenül beszélhetünk a hatóanyag-molekula homogén oldataról, hanem egymáshoz nagymértékben hasonlító, de egyedileg kis különbségeket mutató molekulák sokaságáról. Ezért az analitikai mérések során e változó tulajdonságok átlagát vizsgáljuk, és a módszerek jelentősen eltérnek abban, hogy milyen jellegű különbségekre érzékenyek. A fenti okok miatt a biohasznos hatóanyagok szerkezetére vonatkozó minőségi kritériumok is nehezen megfogalmazhatók.

A fehérjék biológiai funkcióját a primer és magasabb rendű szerkezet (higher order structure, HOS), továbbá az ún. poszt-transzlációs módosítások (lásd alább) együttesen határozzák meg. Ezért a biohasznosság demonstrálásában hatósági elvárás az, hogy az originátor hatóanyagával való összehasonlítás olyan analitikai módszerek minél kiterjedtebb alkalmazásán alapuljon, amelyek külön-külön lehető leginkább alkalmasak ezeknek a szerkezeti aspektusoknak a robusztus és érzékeny monitorozására. Fontos igazolni, hogy az egyes sarzsok közötti, illetve a bioszimiláris és az originátor hatóanyaga közötti eltérések az egyes analitikai adatokban egy meghatározott elfogadási határon belül vannak, továbbá értelmezni kell az eltérések szerkezeti okát és tisztázni kell azok biológiai relevanciáját.

A terápiás fehérjék magasabb rendű szerkezetének vizsgálata a bioanalitika egyik legnehezebb feladata. Habár más technikák is, mint például a Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (FT-IR) vagy a cirkuláris dikroizmus (CD) többé-kevésbé érzékenyek a magasabb rendű szerkezet változásaira, nem adnak lehetőséget az eltérések lokalizálására a fehérjén belül. A proton-deutérium csere tömegspektrometria (HDX-MS) ugyan nyújthat lokális információt a fehérjék konformációjáról vagy konformációs dinamikájának változásairól, azonban a minta-előkészítés rendkívül idő- és munkaigényes, és csak megfelelő szintű automatizáltság mellett ad reprodukálható eredményt. A folyadékfázisú NMR-spektroszkópia a vízdékony fehérjék natív közegben



1. ábra. Egy közepes méretű (17 kDa) rekombináns fehérjét tartalmazó készítmény (felül), valamint egy közel hétszer több ^1H -atommal rendelkező monoklonális antitestet (150 kDa) tartalmazó készítmény 1D ^1H NMR-spektruma (alul). Utóbbi a molekula méretéből adódó zsúfoltság és jelszélesedés miatt jóval kevesebb értékelhető jelet tartalmaz

történő magasabb rendű szerkezetvizsgálatának leghatékonyabb eszköze. A biológikumok jelentős része olyan méretű fehérjék vizes oldata, amely lehetővé teszi NMR-spektroszkópiás vizsgálatukat.

A fentebb említett „NMR-barát” minta-előkészítési lépések híján, a biológiai hatóanyagok NMR-vizsgálatakor első közelítésben a legkézenfekvőbb megoldást a jól detektálható egydimenziós (1D) ^1H NMR-spektrumok elkészítése jelentheti. Egy 1D ^1H NMR-spektrumban (például a CD-spektrumokkal ellentétben) minden egyes jel egyedi H-atomokhoz rendelhető, a jelek kémiai eltolódása pedig információt hordoz a hidrogénatomok kémiai környezetéről, az aminosavak konfigurációjáról, konstitúciójáról és konformációjáról.

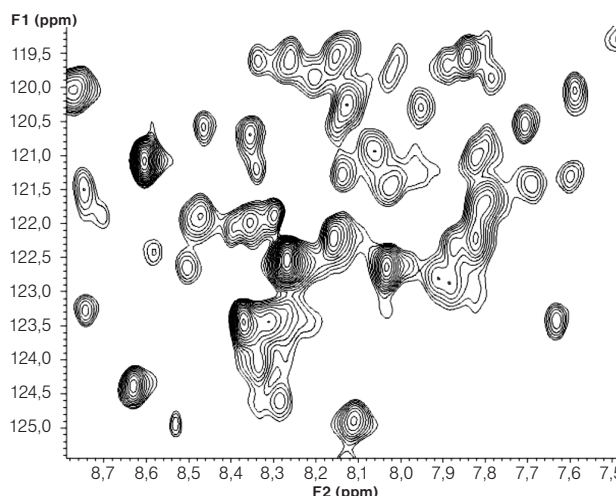
Kisméretű fehérjék esetében (kevesebb, mint 30 aminosav) gyakran az 1D ^1H NMR-spektrumban minden egyes H-atom jele különálló jelet ad és így a fehérje szerkezete atomi szinten jellemezhető. A fehérje méretének növekedésével a jelek kiszélesednek és a spektrumok zsúfolttá válnak (1. ábra).

Rituximab- és filgrastimminták esetében sikerrel alkalmazták az 1D ^1H NMR-spektrumokat szerkezeti összehasonlításra [6, 7]. A spektrumok értékelését nehezíti, hogy a fehérjék mellett jelentős mennyiségben hozzáadott segédanyagok ugyancsak jelet adnak, ezzel elfedve a fehérje jeleinek jelentős részét. Az ilyen zavaró jelek kiküszöbölésére lehetséges megoldás a teljes puffercsere. Ez a módszer azonban felvetheti a kérdést, hogy a puffercsere során a fehérje szerkezete nem változhatott-e meg, ami például a hatóságok szemszögéből aggályos lehet és nemkívánatos vitára adhat okot. Az NMR-spektroszkópia fizikájának sokrétűsége, hatalmas módszertani tárháza, továbbá az NMR-spektroszkópikus kreativitása azonban számos lehetőséget nyújt a probléma megoldására. Például Poppe és munkatársai [8] a kismolekulák és fehérjék NMR-rel is jól detektálható eltérő diffúziós tulajdonságait használva csökkentették (különböző módszertani megoldásokkal) a segédanyagok jeleinek intenzitását a spektrumokban. A módszerük hatékonyságát különböző monoklonális antitesteket tartalmazó készítmények mintáin igazolták. Franks és munkatársai [9] a molekulák eltérő relaxációs tulajdonságait használták ki hasonló céllal.

A növekvő molekulamérettel az 1D ^1H NMR-spektrumokban a jelek száma és szélessége is nő, így egy adott mérethatár fölött (kb. 35 kDa) a spektrumok kezelhetetlenül zsúfolttá válnak. Ez a probléma kétdimenziós (2D) NMR-spektrumok felvételével hatékonyan kezelhető, amelynek számos formája létezik, azonban el-

készítésük meglehetősen időigényes. A 2D NMR-spektrumok két egymásra merőleges 1D spektrum jelei között ún. keresztcsúcsok formájában jelenítik meg a téren vagy kötéseken át közvetített atomi kölcsönhatásokat. Például az ún. 2D ^1H - ^1H NOESY- (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) spektrum keresztcsúcsai azt mutatják meg, hogy a fehérje mely H-atompárjai vannak térben egymáshoz kb. 5 Å távolságnál közelebb. Freedberg és munkatársai [10] 2D ^1H - ^1H NOESY-spektrumokat használtak rituximab- és filgrastimminták vizsgálatára. Ugyanakkor pl. a 2D ^1H - ^{15}N HSQC- (Heteronuclear Single Quantum Correlation) és 2D ^1H - ^{15}N HMQC- (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) spektrumokban a keresztcsúcsokból az olvasható ki, hogy a fehérje mely H-atomja kötődik közvetlenül, vagy több kovalens kötésen át, a fehérje valamely N-atomjához. A ^1H - ^{15}N HSQC- és HMQC-spektrumok egyszerre nyújtanak megoldást a zsúfoltság és a segédanyagok intenzív jelei okozta problémák kiküszöbölésére (2. ábra). Egyrészt, mivel az amidcsoportok közvetlenül a fehérje gerincében helyezkednek el, kémiai eltolódásukat a fehérjegerinc konformációjának változása jelentősen befolyásolja. Éppen ezért egy adott fehérje minden egyes konformációjához a 2D spektrumokban egy specifikus keresztcsúcsmintázat tartozik, vagyis a spektrumok amolyan kétdimenziós „ujlenyomatként” használhatók.

2. ábra. Egy ~20 kDa molekulatömegű rekombináns fehérje természetes izotóp-előfordulás mellett felvett ^1H - ^{15}N HSQC-spektruma. Minden egyes keresztcsúcs a spektrumban egy N-H-kötéshez rendelhető





Másrészt, míg a fehérje egyes aminosavai egy, esetleg két N-H-kötést tartalmaznak, a segédanyagokban nincs ilyen egység, ezért a spektrumok jelentősen egyszerűsödnek és a segédanyagok sem adnak jelet. Ugyanakkor a mérésekhez szükséges időt jelentős mértékben megnöveli, hogy a spektrumokat szükségszerűen természetes izotóp-előfordulás mellett (^{13}C és ^{15}N természetes előfordulása 1,07, illetve 0,37%) kell felvenni. 2D ^1H - ^{15}N HSQC-spektrumok alkalmazásával sikeresen vizsgálták például inzulin [11] és interferon-alpha [12] készítmény hatóanyagának szerkezetét.

Aubin és munkatársai [13] izotópjelölt fehérjék vizsgálatával igazolták, hogy akár egy aszparagin-oldallánc deamidációja ($\text{NH}_2 \rightarrow \text{OH}$ csere) is jól detektálható változást okoz a fehérje ^1H - ^{15}N HSQC-spektrumában. Ugyanakkor arra is rámutattak, hogy az oldatkörülmények (pH, ionerősség) kismértékű eltérései is jelentős hatással vannak az amidcsoportok kémiai eltolódására.

Arbogast [14] metilcsoportokra szelektív ^1H - ^{13}C HMQC-spektrumok alkalmazását javasolta az eltérő oldatkörülményekből adódó anomáliák kiküszöbölésére. A hidrofób metilcsoportok kémiai eltolódását ugyanis kevésbé befolyásolja a pH, mint a vízzel cserélfolyamatban lévő amidcsoportokét.

Adott fehérje-méretehatár fölött, például monoklonális antitestek esetében, a 2D spektrumok is túlságosan zsúfoltá válhatnak. Arbogast és munkatársai [15] enzimatiskus emésztéssel az ilyen molekulákat kettévágták, ezzel jobb minőségű HSQC-spektrumok felvételére nyílt módjuk. Igazolták, hogy a hasítás érdemben nem befolyásolta a fehérje szerkezetét.

A bioszimiláris hatóanyagok jellemzése, ún. összehasonlító vizsgálatok (*comparability studies*) keretében történik, ahol a bioszimiláris és az originátor termékek különböző fizikokémiai paramétereit páronként vetik össze. Az, hogy ez az összevetés pontosan milyen módszerrel történjék meg, jelenleg intenzíven fejlesztett és egyúttal vitatott terület: elvi szinten természetesen az lenne kívánatos, ha az összehasonlítandó analitikai adatok között a hasonlóság mértékét valamilyen kemometria módszerrel számszerűsíteni lehetne, és így egyértelmű megfelelőségi kritériumokat lehetne definiálni, a gyakorlatban azonban ez számos nehézséget vet fel. Az NMR-spektrumok összehasonlításának leg egyszerűbb módja a vizuális összevetés, ami nem mentes a szubjektív elemektől és a hasonlóság mértékének számszerűsítését sem teszi lehetővé, azonban a módszer előnye, hogy több spektrum összevetésére ad módot és a „szakértői szem” jó eséllyel azonnal értelmezni tudja az eltérések szerkezeti okát, biológiai relevanciáját. A kemometria módszerek növelik az objektivitást, azonban eltérések esetén továbbra is szükséges a vizuális értékelés. A kemometria értékelés során alkalmazandó matematikai módszerek kiválasztása függ a spektrumok minőségétől és számától. Kevésbé zsúfolt, jó felbontású spektrumok esetében lehetőség van az úgynevezett peak-to-peak (csúcsról csúcsra) analízisre, ahol a jelek kémiai eltolódását és jelintenzitását a vizsgált minták spektrumaiban egyenként vethetjük össze. [13] Nagyméretű fehérjék esetében, ahol a spektrumok gyakran zsúfoltak és jelátfedésekkel terheltek, célravezető lehet a spektrumok kis részletekre való osztásán alapuló ún. bucketing vagy binning alapú feldolgozás. [16] Az így kapott adatsorokat más-más statisztikai eszközökkel dolgozhatjuk fel attól függően, hogy két vagy nagyszámú adatsort kívánunk összevetni. [17]

Posztttranszlációs módosítások vizsgálata

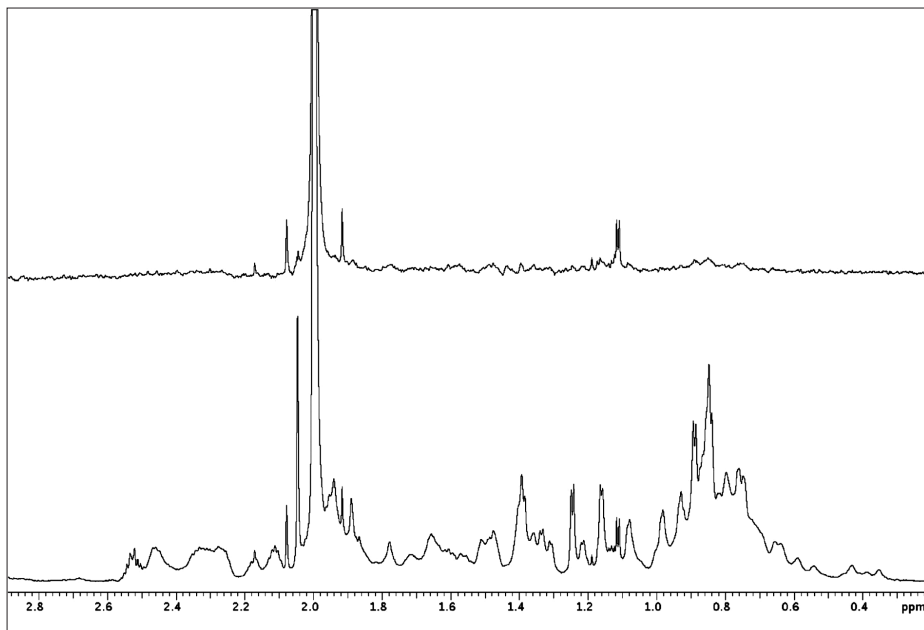
A fehérjék bioszintézisének azt a szakaszát, mely során egy összetett biokémiai láncolatot keresztül a nukleinsavakban kódolt genetikai kódnak megfelelő polipeptidlánc kialakul, transzláció-

nak nevezzük (utalva ezzel egyik „nyelvről” vagy kódolási mód-ról egy másikra történő lefordításra). Ezen nevezéktan mentén az olyan változásokat, melyek a fehérjék szerkezetében a transzláció után történnek, poszttranszlációs módosításoknak nevezzük. Az ilyen módosítások közé soroljuk például a fehérjemolekulán belül bizonyos ciszteinpárok közötti kénhidak kialakulását, a bizonyos aminosav-oldalláncokhoz kovalensen kötött összetett szerkezetű oligoszacharidok kapcsolását, a deamidációt, de tágabb értelemben például a fehérje-polietilén-glikol (röviden PEG) konjugátumok mesterséges létrehozását („pegilációt”) is. Az ilyen változtatások a fehérje magasabb rendű szerkezetének kialakításában és biológiai szerepének betöltésében is kulcsfontosságú szerepet töltenek be, ezért analitikai vizsgálatuk is a hatóanyag jellemzésének kritikus eleme.

A molekulán belül létrejövő diszulfidhidak megléte és kapcsolódási sorrendje esszenciális a fehérjék magasabb rendű szerkezetének kialakításában és stabilizálásában. A diszulfidhidak mintázatának meghatározása a biomolekuláris NMR-területen sem mondható triviális kérdésnek, ugyanis amennyiben a fehérje adott pontossággal meghatározott térszerkezetéből a geometriai és távolság jellegű kritériumok alapján az nem következik egyértelműen, csupán két megközelítést kínálkozik: az összetartozó ciszteinpárok β -hidrogénjei közötti távolságmérés NOESY módszerekkel, vagy a ciszteinegységek szelenociszteinre való cseréje, és az így keletkező diszelenid hidak Se-atomjai közötti direkt csatolások mérése. [18] Ezek a megközelítések egyrészt biotechnológiai és NMR-méréstechnikai szempontból is számos nehézségbe ütközhetnek, másrészt a fent már részletezett okokból (pl. a készítmény izotópos dúsításának problematikája) gyógyszeripari körülmények között nem kivitelezhetők. Viszont miután a diszulfidhidak mintázata meghatározza a harmadlagos és negyedleges szerkezetet, az originális és bioszimiláris hatóanyagok NMR-spektrumainak összehasonlításával közvetett módon mégis egyértelmű információt nyerhetünk a diszulfidhidak hasonlóságáról vagy az esetleges eltérésekről.

A pegiláció során a fehérje adott NH-csoportjához (vagy csoportjaihoz) kovalensen polietilén-glikol-láncot kapcsolnak, ezzel javítva a terápiás fehérjék farmakodinamikai és farmakokinetikai tulajdonságait. Bioszimiláris fehérjék esetében kiemelten fontos azt igazolni, hogy ez a kapcsolódási pont az originátor termékével megegyezik. Ennek meghatározását leggyakrabban a fehérje enzimatiskus emésztését követően az emésztmény LC-MS-analízisével végzik, ami az MS-módszer sajátosságai miatt elsősorban közvetett információt ad a PEG-lánc kapcsolódási pontjára. Az MS- és NMR-módszerek az ilyen kérdésekben egymást kiegészítő információt szolgáltathatnak, amire jó példa Wang és munkatársai munkája [19], melyben pegilált interferon alfa-2b fehérje enzimatiskus emésztését, majd a keletkező peptidek kromatográfiás elválasztását követően, 1D, illetve 2D NMR-spektrumok segítségével – ilyen módon a „nagymolekulás” kérdést „kismolekulás” kérdéssé alakítva – klasszikus NMR módszerekkel közvetlenül is igazolták a PEG kapcsolódásának helyét.

A glikoproteinek esetében – mely csoportba például a terápiás monoklonális antitestek is tartoznak – a polipeptidhez kapcsolódó oligoszacharidok szerkezete és a különböző glikoformák eloszlása jelentős mértékben befolyásolhatja a fehérje biológiai aktivitását és immunológiai tulajdonságait. A glikánláncok vizsgálata komplexitásuk és heterogenitásuk miatt komoly kihívás elé állítja az analitikát. Mivel az emberi immunrendszer által idegenként felismert cukorformák már kis mennyiségben való előfordulás esetén is nemkívánatos immunreakciót válthatnak ki, a



3. ábra. A megfelelő NMR-mérési módszer alkalmazásával a nagy molekulatömegű összetevők jelei kiszűrhetők a spektrumból anélkül, hogy az egyes komponenseket fizikailag elválasztanánk. [21] Az alsó ábrán egy fehérjekészítmény ^1H NMR-spektrumának részlete, még a felsőn ugyan-ezen minta „relaxációs szűrt” ^1H NMR-spektrumának részlete látható. Míg az alsó spektrumon a fehérje jelei zsúfolttá teszik a spektrumot, a felső spektrumban jól azonosítható egy pufferkomponens (~ 2 ppm) és egy kioldódó szennyező jele (1,17 ppm)

glikánmintázat jellemzése az esetek többségében összetett enzim-es emésztéssel kombinált, nagy érzékenyséű LC–MS-módszerekkel történik. Az NMR-spektroszkópia glikoformák vizsgálatában betöltött szerepe olyan esetekben kerül előtérbe, amikor az MS módszerekkel nem megkülönböztethető (ún. izobár) cukoregységek elkülönítése vagy a kapcsolódó cukoregységek kapcsolódásának pontjai vagy anomer-konfigurációjának meghatározása a cél. Ilyen esetekben célravezető lehet az NMR- és LC–MS-módszerek együttes használata, melyre szép példát láthatunk Wiegandt és munkatársai publikációjában [20], melyben a cetuximab nevű terápiás antitest glikánmintázatát vizsgálták NMR- és LC–MS-módszerek kombinációjával és rámutattak, hogy ezzel a megközelítéssel el lehet különíteni az akár 15 pmol koncentrációban előforduló izobár N-glikán szerkezeteket is, ami fontos lehet az immunogén struktúrák jelenlétének kizárásában.

Alapanyagok minőségellenőrzése és technológiai eredetű szennyezők azonosítása

A biotechnológiai fejlesztések során az NMR szerepe messze túlmutat a hatóanyagok szerkezetvizsgálatán. A fejlesztés egymásra épülő, sokszor egymással párhuzamosan futó és igen összetett folyamatai során gyakran adódik olyan analitikai kérdés, melynek megoldásában az NMR kulcsfontosságú szerephez juthat, és módszertanilag a fent leírtaktól eltérő megközelítést követel. Az alábbiakban az ilyen jellegű analitikai kihívások és lehetséges megoldásaik közül sorolunk fel néhány példát.

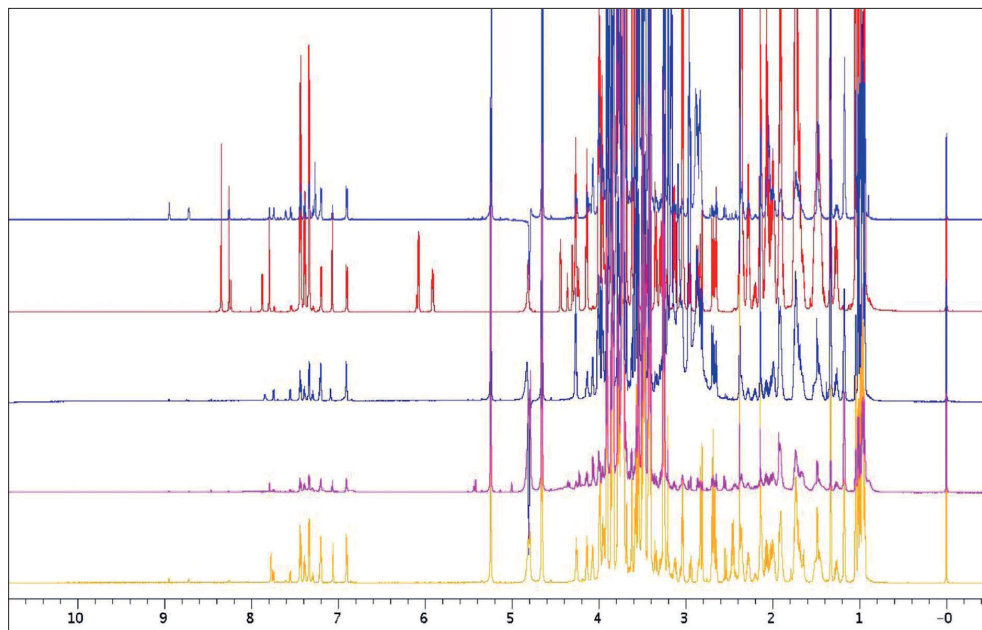
Kioldódó szennyezők vizsgálata

A biológiai készítmények gyártása során a tisztítási lépések hatékonyságának demonstrálása kiemelt szempont hatósági vizsgálatok során. A készítmények jellemzően olyan vizes oldatok, melyek a fehérje-hatóanyagokon kívül kismolekulás összetevőket, például stabilizátorokat és pufferkomponenseket tartalmazhatnak. Ezekben a komplex oldatokban az ismert összetevők mellett azonosítani kell azokat a kismolekulás szennyezőket, melyek lehetnek magához a gyártás folyamatához köthető molekulák, vagy a gyártás során alkalmazott eszközökből kioldható vagy kioldódó szennyezők (utóbbiakra az angol nyelvű irodalomban az extractable and leachable, röviden E&L kifejezés használatos). A

gyártási folyamathoz köthető szennyezők lehetnek például a termelő sejt kultúrából származó anyagok (pl. az ún. gazdasejtből származó DNS és fehérje), a fermentáció tápközegéből származó tápanyagok és metabolitjai vagy a hatóanyag tisztítási lépéseinek valamelyikéből származó anyagok. A szennyezők másik lehetséges forrása a gyártás során és a termék tárolása során használt – a biotechnológia-iparban egyre elterjedtebb – egyszer használatos, jellemzően műanyag eszközök, melyekből például lágyítók, stabilizátorok, valamint ezek bomlástermékei oldódhatnak be a készítménybe. A szennyezők detektálása és azonosítása a fehérje hatóanyaga és a segédanyagok mellett különösen nehéz feladat, és gyakran többféle analitikai módszer (VRK, HPLC–MS, GC) együttes alkalmazását igényli. Ezen a területen az NMR kiemelt szerephez juthat, mivel a többi technikához képest egyedülálló módon a kvázi-intakt mintáról módosítás vagy fizikai elválasztás nélkül egyszerre kaphatunk minőségi és mennyiségi információt az összes előforduló szennyezőről. Ezek az adatok egyrészt fontos kiindulási pontot vagy kiegészítő információt szolgáltatnak a többi módszerrel történő vizsgálatokhoz, másrészt olyan szennyezők is azonosíthatóvá válnak, melyek más analitikai módszerekkel, például a hozzájuk köthető minta-előkészítési lépések miatt, nem detektálhatók (3. ábra). Skidmore és munkatársai olyan NMR-mérési módszert dolgoztak ki, mely alkalmas a kis molekulatömegű molekulák vizsgálatára olyan oldatok esetében, melyek nagy koncentrációban fehérjét is tartalmaznak [21]. A módszer azt a jelenséget használja ki, hogy a gerjesztő pulzusokat követően a kismolekulák és a fehérjék H-atomjai jelentősen más sebességgel térnek vissza a termikus egyensúly állapotába, azaz más a relaxációs idejük. Ezt a különbséget kihasználva, egy speciális pulzusszekvencia segítségével, a fehérjétől származó jelek intenzitása nagymértékben csökkenthető (akár teljesen elnyomható), így a kismolekulás szennyezők minőségi és mennyiségi azonosítása egyetlen mérésben, elválasztás nélkül is megvalósítható.

Fehérjék mennyiségi meghatározása

Egy gyógyszerkészítményben a hatóanyag koncentrációjának meghatározása mind farmakokinetikai, mind a biohasonlóság szempontjából az egyik legkritikusabb analitikai feladat. Ugyanakkor ismert jelenség, hogy fehérjeknél és peptideknél a meny-



4. ábra. A terápiás fehérjék gyártásához használt alapanyagok ^1H NMR-spektrumainak összehasonlítása

nyiségi meghatározás klasszikus módszerei egyes esetekben eltérő eredményeket adhatnak [22]. Az NMR-spektroszkópia elvben nagyon is alkalmas lehet az oldatban lévő hatóanyag mennyiségi meghatározására, hiszen megfelelő mérési körülmények között az ^1H NMR-spektrumban az egyes jelek jel alatti területei (integráljai) egyenesen arányosak a jelet adó protonok számával, függetlenül attól, hogy a kérdéses protonok ugyanabból vagy más molekulából származnak. Ismert koncentrációjú referencia alkalmazásával ezért elméletileg megoldható a fehérjekoncentráció meghatározása. A vizsgált oldathoz adott belső referenciavegyület a fehérjéhez való kötődés veszélye és az ebből eredő esetleges jelintenzitás-torzulások miatt nem lenne előnyös, ezért erre a célra általában külső referenciát alkalmaznak. A két külön oldatban mért integrálértékek összehasonlíthatósága számos mérés technikai és adatfeldolgozási kérdést vet fel, amit Wider és munkatársai részleteiben tárgyaltak, és az eltérések korrekciójára általános képletet is javasoltak [23]. Munkájukban kiemelten foglalkoztak a megfelelő vízelnyomási módszer (miután a fehérjét többnyire vizes oldatban mérjük, az ^1H NMR-spektrumban a víz sokszor hatalmas zavaró jelet ad, ennek csökkentésére számos mérés technikai lehetőség létezik) kiválasztásával, és szisztematikusan vizsgálták a különféle vízelnyomási technikák jelintenzitást torzító hatásának mértékét. Az NMR-rel történő fehérjekoncentráció-meghatározáskor – különösen nagy fehérjék esetében – az okozza a legnagyobb nehézséget, hogy a zsúfolt ^1H -spektrumban olyan jelet találunk, melyről biztosan tudhatjuk, hogy kizárólag a fehérjétől származik, továbbá ismernünk kell (vagy jó közelítéssel meg kell tudni becsülni) a jelhez vagy jelekhez tartozó H-atomok számát. A spektrum ebből a célból történő egyszerűsítésére az egyik kézenfekvő megoldás a minta 100%-os nehésvízben történő feloldása, ami egyrészt felvehet hatásági szabályozási szempontokat, másrészt a minta fagyaszta szárítása szükséges hozzá, ami egyes fehérjékben drámai szerkezeti változásokat (pl. denaturációt) okoz. A másik megközelítés a fehérjétől származó jelek elkülönítésére a felbontás 2D módszerrel való növelése által. A jelenleg elérhető 2D NMR módszerek zöme azonban számos ismert mérés technikai ok miatt [24, 25] (melyeket itt nem részletezünk) nem tekinthető kvantitatív módszernek. Remélhetőleg a jelenleg is folyó új NMR-módszerfejlesztések révén a közeljövőben elérhetővé válnak olyan kvantita-

tív kétdimenziós pulzus-szekvenciák, melyek egyszerű, gyors és egzakt alternatív módszert kínálnak a fehérjék más komponensek jelenlétében történő mennyiségi meghatározására.

A hatóanyagot termelő sejt kultúrák metabolomikai vizsgálata

A sejt rendszerben előállított biológikumok fejlesztése és gyártása során a biotechnológus számára felbecsülhetetlen értékű információt jelent a fermentáció tápközeg-összetételének minél részletesebb ismerete [26, 27]. A kismolekulák komplex folyadékkeletyben történő parallel azonosítása és mennyiségi meghatározása módszertanilag azonos a metabolomikával (melynek nem meglepő módon szintén az MS és az NMR a két legjellemzőbb műszeres vizsgáló módszere). Bradley és munkatársai sikerrel alkalmaztak NMR-mérés technikákat terápiás fehérjék előállítására használt emlísejtes fermentációk tápközeg-összetételének elemzésére, és ezt a megközelítést összefoglaló néven fermentanomikának nevezték el [27]. A fermentációs közegből a gyártás különböző időpontjaiban mintát vettek, melyekről NOESY-spektrumokat gyűjtöttek belső referencia használatával. A mintákban található szerves komponensek koncentrációval arányos jeleinek analízisével olyan korábban nem detektált komponensek mennyiségi meghatározása is lehetségessé vált, mint például az ecetsav és hangyasav. Továbbá, bizonyos a sejtnövekedés és a fehérjetermeltetés szempontjából kritikus tápanyagok időbeli fogyása alapján való tápközeg-optimalizálással a hatóanyag-kihozatal növekedését érték el [28]. A mérések automatizálásával és az adatok többváltozós statisztikai módszerrel történő feldolgozásával módszerüket továbbfejlesztették [29]. Ezzel a megközelítéssel összefüggést találtak bizonyos fermentációs körülmények és a termék minőségi jellemzői (pl. a fehérje glikozilációs mintázata) között. A fermentanomikával megegyező módszertannal megközelíthető egy igen fontos, a hatóanyaggyártás során felmerülő minőségbiztosítási kérdés is: a fermentációhoz használt táptalajok összetételének sarzsról sarzsra való azonoságának igazolása. A gyártáshoz használt, részben készen kapható alapanyagok sokkomponensű vízben oldható porkeverékek, melyek vizes oldatai a fentiekben leírtakkal azonos módon jól vizsgálhatók, és az így kapott NMR-spektrumok kiválóan alkalmasak az adott táptalaj ujjlenyomat szerű azonosítására (4. ábra).



Összefoglalás

Napjainkban a biotechnológiai úton előállított gyógyszerek, különösen a bioszimiláris fehérje-hatóanyagok és -készítmények analitikai módszertana igen intenzíven fejlődő terület, amelyen belül a különböző műszeres technikák szerepköre és egymással való kapcsolata még nem tekinthető kiforrottnak. Ez különösen igaz az NMR-spektroszkópiára, amelynek lehetőségeit és korlátait ebben a biotechnológiai „milióban” több olyan „mítosz” is övezi, amik abból adódnak, hogy sokan hajlamosak az NMR-nek a kismolekulák, illetve a tisztított és izotópjelzett fehérjék szerkezetvizsgálatában betöltött, nagy hagyományokra visszatekintő, jól körülhatárolt és jól ismert szerepét a bioszimilárisok világára spontán „extrapolálni”. Mindez pedig könnyen e „drága és bonyolult” módszer túl- vagy alábecsüléséhez vezethet a biohasonlók analitikájában. A biohasonlók analitikai jellemzése igen komplex feladat, amelyben minden egyes analitikai technika szoros együttműködésére van szükség, amelyhez viszont elengedhetetlen, hogy az egyes szereplők jól lássák az egyéb módszerek lehetőségeit és korlátait. A jelen közleményben ehhez akartunk támogatást nyújtani azzal, hogy tapasztalataink és a legfrissebb szakirodalom alapján összefoglaltuk azokat az analitikai kihívásokat, melyek az NMR tekintetében a bioszimiláris fehérjék fejlesztése és gyártása során felmerülhetnek. Igyekeztünk rávilágítani az NMR-spektroszkópia ezen a területen sok tekintetben egyedülálló szerepére és sokrétű alkalmazásainak lehetőségeire, valamint korlátaira is.



Köszönetnyilvánítás. A jelen közleményben bemutatott ábrákat az 5-ös irodalmi hivatkozásnál megadott közleményünkből vettük át az Elsevier kiadó engedélyével.

IRODALOM

- [1] CDER/CBER, FDA, Guid. Ind., 2015.
- [2] European Medicines Agency (2014) 1–7.
- [3] Cavanagh, J., Protein NMR spectroscopy: principles and practice, 2007.
- [4] S. Rule, G. Hitchens, T. K., Fundamentals of Protein {NMR} Spectroscopy, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2006.
- [5] Kiss, R., Fizil, A., Szántay, C., J. Pharm. Biomed. Anal., 2017. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.004>)
- [6] Sorgel, E., Schwebig, A., Holzmann, J., Prassch, S., et al., BioDrugs (2015) 29, 123–131.
- [7] Visser, J., Feuerstein, L., Stangler, T., Schmiederer, T., et al., BioDrugs (2013) 27, 495–507.
- [8] Poppe, L., Jordan, J. B., Lawson, K., Jerums, M., et al., Anal. Chem. (2013) 85, 9623–9629.
- [9] Franks, J., Glushka, J. N., Jones, M. T., Live, D. H., et al., Anal. Chem. (2016) 88, 1320–1327.
- [10] Freedberg, D. I., Dev. Biol. (Basel). (2005) 122, 77–83.
- [11] Jin, X., Kang, S., Kwon, H., Park, S., Anal. Chem. (2014) 86, 2050–2056.
- [12] Panjwani, N., Hodgson, D. J., Sauvé, S., Aubin, Y., J. Pharm. Sci. (2010) 99, 3334–3342.
- [13] Aubin, Y., Hodgson, D. J., Thach, W. B., Gingras, G., et al., Pharm. Res. (2015) 32, 3365–3375.
- [14] Arbogast, L. W., Brinson, R. G., Marino, J. P., Anal. Chem. (2015) 87, 3556–3561.
- [15] Arbogast, L. W., Brinson, R. G., Formolo, T., Hoopes, J. T., et al., Pharm. Res. (2016) 33, 462–475.
- [16] Amezcua, C. A., Szabo, C. M., J. Pharm. Sci. (2013) 102, 1724–1733.
- [17] Japelj, B., Ilc, G., Marušič, J., Senčar, J., et al., Sci. Rep. (2016) 6, 32201.
- [18] Mobli, M., King, G.F., Toxicon (2010) 56, 849–854.
- [19] Wang, Y. S., Youngster, S., Bausch, J., Zhang, R., et al., Biochemistry (2000) 39, 10634–10640.
- [20] Wiegandt, A., Meyer, B., Anal. Chem. (2014) 86, 4807–4814.
- [21] Skidmore, K., Hewitt, D., Kao, Y. H., Biotechnol. Prog. (2012) 28, 1526–1533.
- [22] Conibear, A. C., Daly, N. L., Craik, D. J., Biopolymers (2012) 98, 518–24.
- [23] Wider, G., Dreier, L., J. Am. Chem. Soc. (2006) 2571–2576.
- [24] Fardus-Reid, E., Warren, J., Le Gresley, A., Anal. Methods (2016) 8, 2013–2019.
- [25] Giraudeau, P., Magn. Reson. Chem. (2014) 52, 259–272.
- [26] Gronemeyer, P., Ditz, R., Strube, J., (2014) 188–212.
- [27] Bradley, S. A., Ouyang, A., Purdie, J., Smitka, T. A., et al., J. Am. Chem. Soc. (2010) 132, 9531–9533.
- [28] Read, E. K., Bradley, S. A., Smitka, T. A., Agarabi, C. D., et al., Biotechnol. Prog. (2013) 29, 745–753.
- [29] Rathore, A. S., Kumar Singh, S., Pathak, M., Read, E. K., et al., Biotechnol. Prog. (2015) 31, 1586–1599.



Messe München
Connecting Global Competence



The World's No. 1

A világ legnagyobb labortechnikai kiállításán megtalálja az ipari és kutatólaboratóriumok termékeit és megoldásait. Tudományos kísérő rendezvénye az *analytica* konferencia, ahol a fő témák a világhíradások, termékműértetők, egyedülálló élő bemutatók, különbemutatók, fórumok és fókusznapok.

Információ: Münchener Väsärképyiselet, Promo Kft. Tel. 1/224-7764, messemunchen@promo.hu

April 10–13, 2018 | *analytica* exhibition
April 10–12, 2018 | *analytica* conference
 26th International Trade Fair for Laboratory Technology,
 Analysis, Biotechnology and *analytica* conference
www.analytica.de





analytica