

ПРОБЛЕМА АГРЕГАЦІЇ БІЛКОВИХ ПРЕПАРАТІВ ПРИ БІОФАРМАЦЕВТИЧНОМУ ВИРОБНИЦТВІ

Федорко А.М., Гринюк І.І.

КПІ ім. Ігоря Сікорського, fedorko.anna@iit.kpi.ua

Abstract

Different mechanisms of protein molecule aggregation were reviewed. Aggregation represents a significant challenge in the field of biopharmaceuticals. We examine the problem of protein molecule aggregation, existing methods for its analysis and control, and strategies for minimizing aggregation at different drug development and manufacturing stages.

Keywords: *protein aggregation, biopharmaceuticals, Quality by Design, Design of Experiments.*

Вступ. На сьогодні терапевтичні засоби на основі білків займають вагоме місце серед фармацевтичних препаратів. Складні тривимірні структури білкових препаратів здатні взаємодіяти із специфічними рецепторами в клітинах із високою селективністю. Вони мають конкретні мішені в організмі для лікування автоімунних захворювань, цукрового діабету, різних видів раку та ін. На даний час в Україні та світі вже виробляють багато білкових та пептидних препаратів, таких як глюкагон, інсулін, паратиреоїдний гормон людини, моноклональні антитіла, людський інтерферон, пролейкін та інші. Але багато з них ще знаходяться на стадії клінічних випробувань [1].

Лікування білковими препаратами має безліч переваг порівняно з традиційними низькомолекулярними ліками: вони мають високий ступінь афінності, високоефективні і більш селективні, але при цьому набагато менш токсичні і мають мінімальний перелік побічних ефектів [2].

Процеси розробки та виробництва терапевтичних засобів на основі білків мають проблеми, зокрема пов'язані із агрегацією білка. Агрегація може призвести як до зниження ефективності ліків, так і до підвищення імуногенності та негативного впливу на пацієнтів [3]. Окрім того агрегація білків впливає на вихід та витрати у біофармацевтичному виробництві. Цей процес може відбуватися на таких етапах виробництва, як розробка рецептури, очищення, фасування та зберігання продукту [4]. Ефективний контроль агрегації має вирішальне значення для підтримання клінічної ефективності та рентабельності білкових продуктів. Тому дослідження причин та механізмів процесу агрегації для пошуку шляхів подолання даної проблеми є актуальним.

Метою роботи було оцінити вплив фізичних факторів на агрегацію білкових молекул при виробництві біофармацевтичних препаратів.

Методи дослідження. Дослідження проводили шляхом аналізу наукової літератури з використанням міжнародних баз даних (*PubMed, ScienceDirect, Google Scholar* та ін.).

Результати та обговорення. *Фактори, що впливають на агрегацію білків.* На молекулярному рівні агрегація білків може відбуватися різними шляхами під впливом таких факторів, як фізико-хімічні властивості самих білкових молекул,

їх концентрація, іонна сила розчину, температура, рН, наявність домішок та хімічні модифікації [5].

Одним з найбільш важливих чинників, який може виникнути при фільтрації, перекачуванні та проходженні розчину білка через систему наповнення, а також при його перемішуванні є напруга зсуву. У турбулентному потоці додатковий механізм дифузії, який називається турбулентною дифузією, переносить імпульс рідини до межі розподілу фаз. Швидкі потоки в рідині передають імпульс вниз, урівноважуючи швидкості через середню площину зсуву. Згідно з другим законом Ньютона, це перенесення імпульсу проявляється у вигляді напруги зсуву, яка відображає дію реальних сил тертя між шарами рідини, коли рідина, що рухається швидше, прискорює повільнішу рідину внизу, а нижня рідина чинить сповільнюючу силу, спрямовану вгору. Підбір правильного режиму та параметрів перемішування та перекачування готового препарату, зокрема типу мішалки, швидкості та часу перемішування, типу насоса та ін., допоможе уникнути агрегації та суттєво вплинути на якість майбутнього продукту [6].

Частинки, що випадають з самих фільтрів та взаємодія молекул діючої речовини або розчинника з матеріалом фільтра також можуть сприяти агрегації, особливо під час перемішування, тому потрібно дуже ретельно підбирати тип фільтраційного матеріалу, вид самого фільтра та швидкість фільтрації [7].

Струшування флакона з розчином білка може спричинити утворення агрегатів та втрату гомогенності препарату за рахунок збільшення гідрофобних взаємодій між розгорнутими білками при утворенні розподілу фаз повітря-рідина [8].

Вирішальне значення при збереженні стабільності білка впродовж тривалого часу має підтримка оптимальної температури нижче точки денатурації Керування холодним ланцюгом, зберігання при сталій температурі та дотримання належних протоколів заморожування-розморожування забезпечує стабільність терапевтичних білків [1]. Важливим є також підтримання правильного рівня рН, яке суттєво впливає на структуру білка. Контроль рН запобігає небажаним хімічним реакціям та деградації. Рецептури з відповідними буферами, допоміжними речовинами і стабілізаторами необхідні для підтримки конформації і стабільності білка, що забезпечує терапевтичну ефективність протягом, усього життєвого циклу продукту [9].

Аналітичні методи для аналізу білкових частинок. Для вирішення проблеми агрегації терапевтичних білкових препаратів важливим є підбір аналітичних методів, здатних не тільки детектувати агрегати, але й характеризувати їх, даючи оцінку природі виникнення, типу агрегації та структурі.

Найбільш важливими для виявлення білкових агрегатів є такі методи, як динамічне розсіювання світла, візуалізація мікропотоків, ексклюзійна хроматографія і раманівська спектроскопія. Кожен з цих методів має різні типи детекції та принцип роботи [9 –11].

Проте, лише аналітичні методики не можуть бути вирішенням проблеми. Вкрай важливим є їх поєднання із заходами контролю якості на всіх етапах: від самого першого – розробка рецептури, і до моменту потрапляння препарату до пацієнта.

Сучасні підходи до вирішення проблеми агрегації терапевтичних білкових препаратів. Сучасним підходом до вирішення проблеми агрегації білкових терапевтичних препаратів є поєднання обчислювальних методів, (таких як моделювання молекулярної динаміки (МД)) та експериментальних підходів. Таке поєднання прискорює розробку та оптимізацію білкової терапії, пропонуючи цінну інформацію про структуру, динаміку, взаємодію та дизайн білка. Обчислювальні методи, Ці методи аналізують структури та послідовності білка, щоб визначити регіони, схильні до нестабільності. Крім того, вони можуть передбачити вплив мутацій або модифікацій на стабільність білка, полегшуючи дизайн більш стабільних варіантів білка.

Підхід «Якість шляхом розробки» (англ. Quality-by-design, QbD) фокусується на розумінні та надійності процесу. Цей підхід використовує такі інструменти, як планування експериментів (англ. Design of Experiments, DoE) та аналіз ризиків для виявлення, контролю та мінімізації критичних параметрів процесу, які сприяють агрегації. Принципи QbD є важливими для управління складними взаємодіями у біофармацевтичному виробництві, які можуть призвести до агрегації білків. QbD передбачає системний підхід до розробки продукту, що починається із заздалегідь визначених цілей і фокусується на глибокому розумінні як продукту, так і процесу [12].

Впровадження QbD допомагає контролювати виробничий процес для запобігання факторам, що можуть призвести до агрегації. Крім того, це сприяє швидшій розробці та виведенню продукції на ринок, забезпечуючи при цьому безпеку пацієнтів завдяки підтримці високих стандартів якості протягом усього життєвого циклу продукту. Така всебічна інтеграція наукових знань і передових аналітичних методів в рамках QbD підтримує постійні інновації та безперервне вдосконалення, що є критично важливими для виробництва високоякісних біофармацевтичних препаратів [13, 14].

Висновки. Таким чином, стійкість білків до агрегації є критично важливою якісною характеристикою при розробці та оптимізації процесу виробництва біофармацевтичних препаратів.

Стимулюють початок агрегації як стреси пов'язані з виробничими процесами, так і транспортування, і введення лікарського засоба. Процес розробки білкових препаратів потребує різних аналітичних методів залежно від етапу виробництва: на ранніх стадіях важлива економічність, висока пропускна здатність і можливості автоматизації, тоді як на пізніх стадіях виробництва акцент робиться на стабільності, надійності, статистичній значущості результатів і простоті використання. Використання динамічного розсіювання світла, ексклюзивної хроматографії, раманівської спектроскопії та мікропоточної візуалізації дає важливе розуміння аналізу частинок.

Застосування принципів QbD є цінною стратегією для зменшення ризиків, пов'язаних з агрегацією білків. Майбутні зусилля мають бути спрямовані на подальше вдосконалення цих аналітичних методів і розширення застосування принципів QbD. Це допоможе розробити більш надійні методи запобігання агрегації білків, що в кінцевому підсумку сприятиме виробництву більш ефективних і безпечних терапевтичних білків. Завдяки постійному вдосконаленню та інноваціям біофармацевтична промисловість може досягти більшого прогресу в доступності лікування та догляду за пацієнтами в усьому світі.

Список використаної літератури:

1. Stabilization challenges and aggregation in protein-based therapeutics in the pharmaceutical industry / M. Rahban та ін. *RSC Advances*. 2023. Т. 13, № 51. С. 35947–35963. URL: <https://doi.org/10.1039/d3ra06476j>.
2. Therapeutic proteins: developments, progress, challenges, and future perspectives / V. Kumar та ін. *3 Biotech*. 2024. Т. 14, № 4. URL: <https://doi.org/10.1007/s13205-024-03958-z>.
3. Wang W., Roberts C. J. Protein aggregation – Mechanisms, detection, and control. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018. Т. 550, № 1-2. С. 251–268. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.043>.
4. Arakawa T., Ejima D., Akuta T. Protein aggregation under high concentration/density state during chromatographic and ultrafiltration processes. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017. Т. 95. С. 1153–1158. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.005>.
5. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review / Y. Le Basle та ін. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020. Т. 109, № 1. С. 169–190. URL: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.08.009>.
6. Moino C., Artusio F., Pisano R. Shear stress as a driver of degradation for protein-based therapeutics: More accomplice than culprit. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023. С. 123679. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123679>.
7. Liu L., Randolph T. W., Carpenter J. F. Particles Shed from Syringe Filters and Their Effects on Agitation-Induced Protein Aggregation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012. Т. 101, № 8. С. 2952–2959. URL: <https://doi.org/10.1002/jps.23225>.
8. Combined Effect of Shaking Orbit and Vial Orientation on the Agitation-Induced Aggregation of Proteins / S. Dasnoy та ін. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.08.016>.
9. Akbarian M., Chen S.-H. Instability Challenges and Stabilization Strategies of Pharmaceutical Proteins. *Pharmaceutics*. 2022. Т. 14, № 11. С. 2533. URL: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112533>.
10. Aggregation of protein therapeutics enhances their immunogenicity: causes and mitigation strategies / M. L. E. Lundahl та ін. *RSC Chemical Biology*. 2021. Т. 2, № 4. С. 1004–1020. URL: <https://doi.org/10.1039/d1cb00067e>.
11. Structural studies of RNA-protein complexes: A hybrid approach involving hydrodynamics, scattering, and computational methods / T. R. Patel та ін. *Methods*. 2017. Т. 118-119. С. 146–162. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.12.002>.
12. International Conference on Harmonization, “ICH Q8 (R2): Pharmaceutical Development,” *Int. Conf. Harmon. Tech. Require. Regist. Pharm. Hum. Use*, vol. 8, no. August, p. 28, 2009. URL: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
13. Zhang L., Mao S. Application of quality by design in the current drug development. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. Т. 12, № 1. С. 1–8. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.07.006>.
14. Quality Risk Management (QRM) / A. B. Pazhayattil та ін. *AAPS Introductions in the Pharmaceutical Sciences*. Cham, 2023. С. 29–42. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-031-32192-4_3.