Вибір технології для визначення термостабільності при розробці біотерапевтичних препаратів

Посібник з автоматизованого аналізу стабільності біологічних препаратів для забезпечення якості продукції та підтримки регуляторних дозволів

Waters™ | TA™ Instruments

Зміст

Вступ	3
Огляд методів визначення термічної стабільності	3
Який DSC підходить для вашої ситуації?	4
DSC протягом усього біотерапевтичного процесу	5
Який DSC підходить для вашого застосування?	5
• Оптимізація рецептур →RS-DSC	5
• Оптимізація буферів та допоміжних речовин →RS-DSC	6
• Мутаційний аналіз білків→RS-DSC / Підбір кандидатів →RS DSC	7
• Концентраційна залежність→RS-DSC	7
• Ліофілізація → Термічний DSC	8
• Генна терапія аденоасоційованих вірусів (AAV) → Nano DSC	8
• Чутливі вимірювання малих змін у структурі біомолекул →Nano DSC	9
Бібліотека ресурсів	10

Вступ

Біопрепарати, або біотерапевтичні препарати, лікарські засоби, отримані з живих організмів, змінюють способи лікування хвороб та боротьби з інфекціями, пропонуючи більшу специфічність та ефективність, ніж традиційні низькомолекулярні фармацевтичні препарати. Різноманітні біологічні препарати, такі як вакцини, вже широко використовуються, а моноклональні антитіла (mAbs) стрімко розвиваються завдяки своїй універсальності та здатності дезактивувати мішень або викликати імунну відповідь.[1] Однак з більшими можливостями приходить і більша складність: біотерапевтичні препарати мають складнішу структуру і вимагають складних процесів визначення характеристик і виробництва.

Випробування термостабільності є обов'язковим етапом біотерапевтичної розробки. Нормативні документи вимагають проведення досліджень стабільності, щоб довести безпеку та ефективність біотерапевтичних препаратів протягом запропонованого терміну придатності. Термічна стабільність також вимірює ймовірність агрегації терапевтичного засобу. Загалом, термічні дані мають важливе значення для вибору препарату-кандидата і визначення ідеальної рецептури та умов зберігання.

У цьому посібнику розглядаються різні методи аналізу термостабільності, доступні для розробки біопрепаратів.

Огляд методів випробування термічної стабільності

Короткострокові випробування на термостабільність виявляють стійкість біопрепаратів до термічного впливу, прогнозують термін придатності та гарантують якість. Інформація, отримана в результаті експериментів з термостабільності, дозволяє вченим створювати найкращі рецептури, а також відстежувати зміни в їхньому продукті з плином часу.

На сьогоднішній день існує дві широко використовувані технології аналізу термічної стабільності:

Диференціальна сканувальна калориметрія (DSC) вимірює тепло, що поглинається або виділяється під час теплових переходів, таких як розгортання білка або плавлення нуклеїнової кислоти.

Нано-диференційна сканувальна флуориметрія (DSF) - це флуоресцентний аналіз стабільності білків, який вимірює згортання білка за зміною флуоресценції в залежності від температури.

Ці технології забезпечують аналіз термостабільності, але зі значними компромісами. Традиційна DSC забезпечує високу точність і якість даних, але вимагає більшої кількості зразків для випробування і працює повільніше. DSF забезпечує високу пропускну здатність аналізу, але з нижчою якістю даних, і дані не такі інформаційно насичені, як дані DSC. Для користувачів, які шукають якість даних DSC з ефективністю DSF, ідеальним рішенням є нова DSC зі швидким скринінгом, описана в наступному розділі.

1 Johnson D. E. (2018). Biotherapeutics: Challenges and Opportunities for Predictive Toxicology of Monoclonal Antibodies. International journal of molecular sciences,19(11), 3685.

Який DSC підходить для вашої ситуації?

DSC вважається золотим стандартом для оцінки термічної стабільності біомолекул завдяки високій точності та якості даних. Зараз розробники біопрепаратів мають вибір між трьома видами диференціальних сканувальних калориметрів (DSC): традиційним термічним DSC, Nano DSC та DSC швидкого скринінгу (RS-DSC).

Термічні DSC, такі як Discovery DSC, ідеально підходять для визначення характеристик малих молекул, включаючи термічну стабільність, наявність поліморфів і чистоту. Розробники біопрепаратів в основному використовують термічні DSC для аналізу твердих речовин і оптимізації ліофілізації.

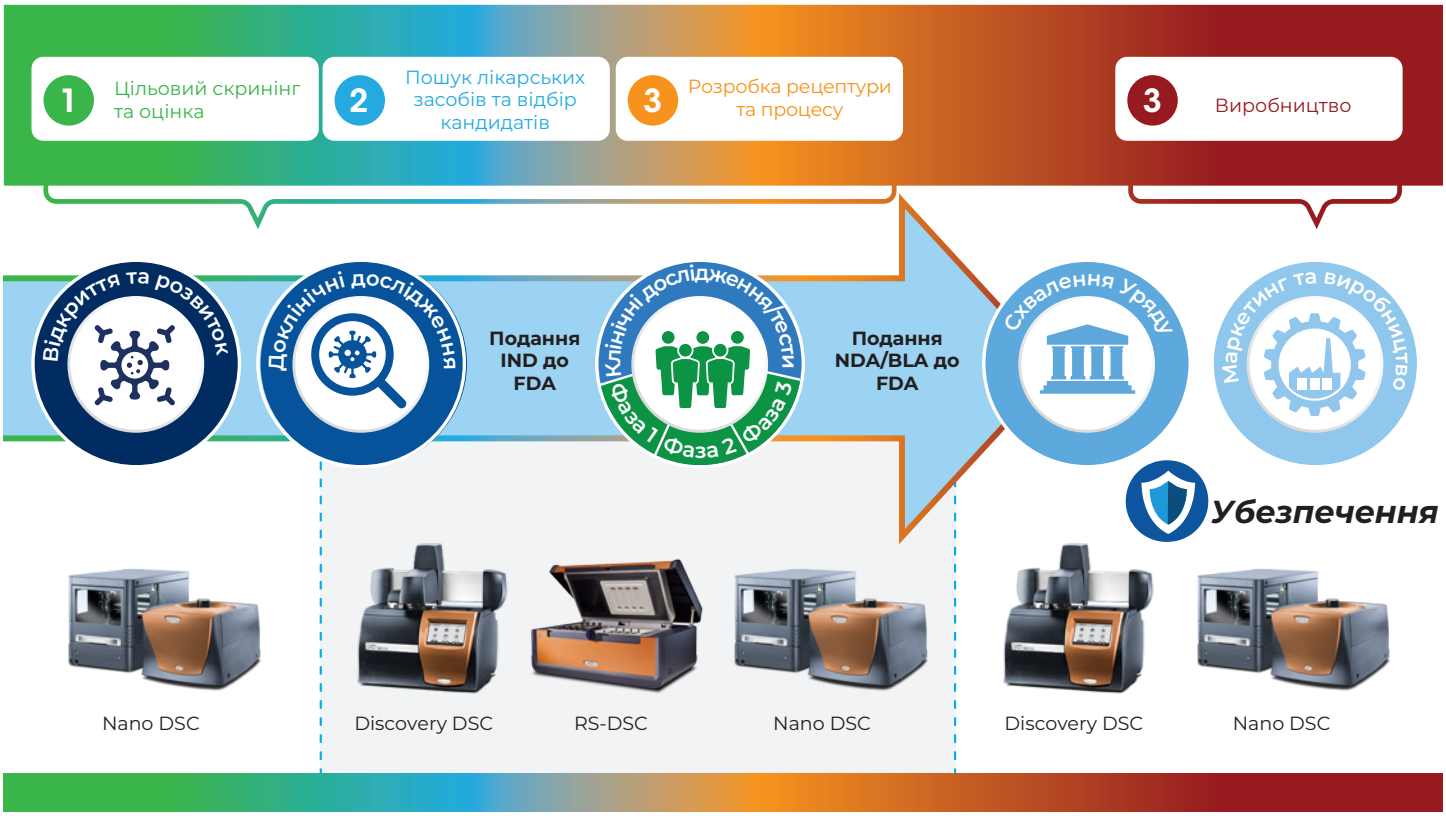
Nano DSC - це високоточний аналіз термостабільності макромолекул для фундаментальних досліджень і розробки лікарських засобів. Nano DSC аналізує рідкі зразки, вимірюючи теплоту реакції третинних і вторинних змін у структурі, які відбуваються при розгортанні біомолекули (білку) або при плавленні у випадку нуклеїнових кислот і ліпідів.

DSC швидкого скринінгу (RS-DSC) - це нова запатентована технологія від TA Instruments, яка пропонує переваги високоякісних даних DSC в поєднанні з високою пропускною здатністю і аналізом без розведення. RS-DSC має унікальну здатність аналізувати концентрації, що впливають на силу препарату, пропонуючи при цьому повне профілювання термостабільності біологічних препаратів.

Термічні DSC	Nano DSC	DSC швидкого скринінгу
В основному тверді речовини	Тільки рідина	Тільки рідина
Концентрація 2 мг+	Концентрація - від 0,01 до 20 мг/мл	Концентрація - від 5,0 до < 300+ мг/мл (залежить від молекули)
<100 мкл; -120 до 400 °C	490 мкл (Авто); від -10 до 130 °C	5-11 мкл; 20-100 °C
Широкий діапазон температур	Висока чутливість	Висока пропускна здатність

© 2024 TA Instruments. A division of Waters Corporation. All rights reserved.

DSC протягом усього процесу розробки біотерапевтичного препарату



Який DSC підходить для вашого застосування?

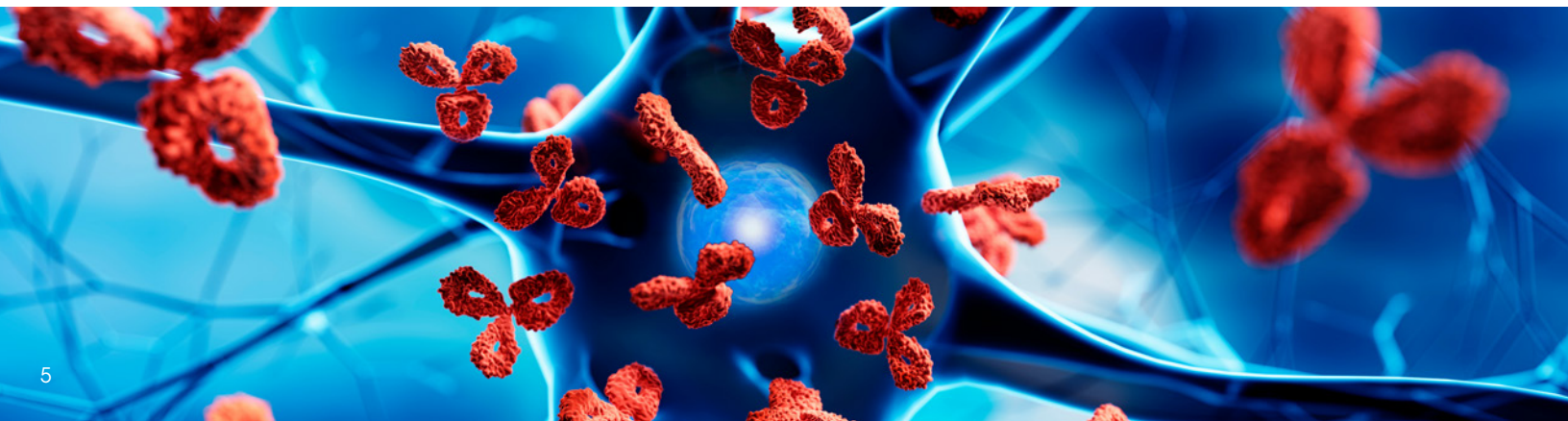
Оптимізація рецептур → RS-DSC

Дослідники оцінюють можливість розробки антитіл, порівнюючи їх конформаційну стабільність, виміряну за допомогою T_{onset} і T_M, з DSC. Кандидати з найвищою конформаційною стабільністю мають найбільший потенціал для майбутнього використання в медицині. В ідеалі, кандидат повинен мати початок T >55 °C і T_M для Fab-домену >65 °C. На цьому етапі також важливо почати аналіз на більш високих концентраціях, які будуть імітувати концентрації дозування, оскільки на конформаційну стабільність може впливати концентрація препарату антитіл.

RS-DSC має унікальну здатність точно вимірювати T_{onset} і T_M з:

- Одночасним аналізом до 24 зразків
- Меншим необхідним об'ємом зразка (11 мкл)
- Додатковим випробування на силу рецептури (20-300+ мг/мл)

RS-DSC допомагає вченим прискорити вибір та оптимізацію рецептур за допомогою найефективнішого з доступних методів аналізу конформаційної стабільності.

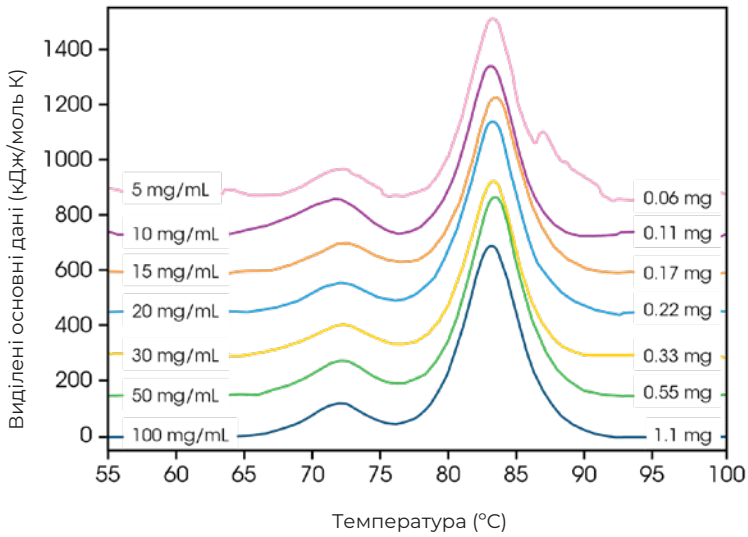


Приклад експерименту

Щоб зрозуміти вимоги до концентрації мультиперехідного білка, антитіло герцептин трастузумаб було скориговано до різних концентрацій у PBS і оцінено в трьох експериментах зі швидкістю сканування 2 °C/хв (Рисунок праворуч).

При концентрації 100 мг/мл чітко видно два переходи, що корелюють з розгортанням C_H2 домену при середній $T_{max,1}$ 71,85 °C, та комбінованого Fab і C_H3 домену при середній $T_{max,2}$ 83,01 °C [2]. Зі зміною концентрації білка не спостерігається значної зміни стабільності, що виключає концентраційні ефекти при досліджуваних концентраціях. Крім того, спостерігається відмінна відтворюваність між калориметрами.

Межа визначення трастузумабу



Додаткові ресурси

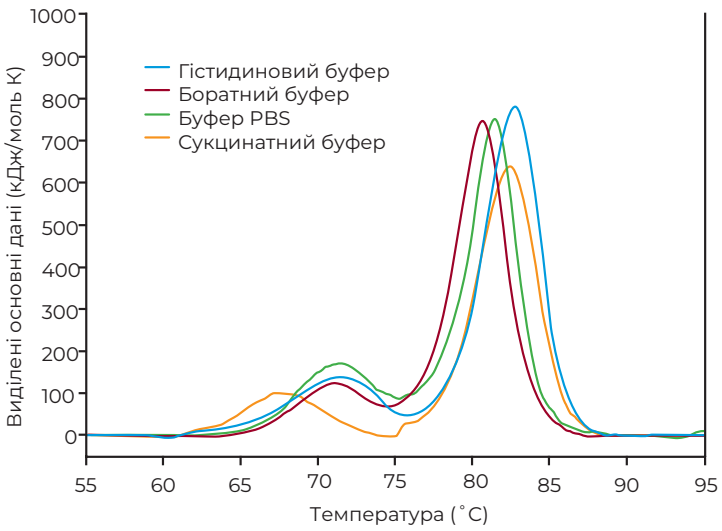
Примітка щодо застосування: Швидкий скринінг термічної стабільності висококонцентрованих біологічних препаратів

Оптимізація буферів та допоміжних речовин → RS-DSC

Вплив буферів і допоміжних речовин на стабільність білка може проявлятися в невеликих змінах T_{max} або в змінах температури до десятків градусів.

Приклад експерименту

Наприклад, антитіло трастузумаб аналізували в чотирьох поширених буферних середовищах, як показано нижче. На першу подію розгортання суттєво впливає лише сукцинатний буфер, який дестабілізує C_H2 домен, що призводить до зниження початку розгортання і $T_{max,1}$ приблизно на 3 °C. Що стосується основного переходу, який відображає події розгортання Fab і C_H3, то гістидиновий і сукцинатний буфери є найбільш стабілізуючими, з $T_{max,2}$ 82,66 °C. Найменш стабільний основний перехід у боратному буфері з $T_{max,2}$ 80,69 °C. Не дивно, що найбільш стабілізуючим буферним розчином для трастузумабу в цьому наборі зразків є гістидиновий буфер, який використовується для остаточного рецепту затвердженого лікарського засобу.



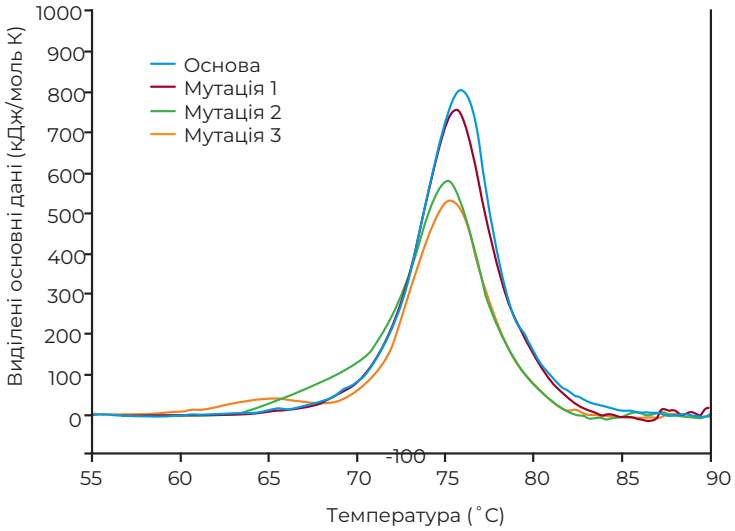
Додаткові ресурси

Повний текст експерименту та аналізу дивіться тут: Скринінг буферних розчинів рецептур

© 2024 TA Instruments. A division of Waters Corporation. All rights reserved.

Мутаційний аналіз білків → RS-DSC / Відбір кандидатів → RS DSC

Мутації білків є поширеною стратегією оптимізації структури та функцій білків, і навіть модифікації однієї амінокислоти можуть мати помітний вплив на загальну стабільність білка. DSC це необхідний метод для розуміння структурного впливу мутацій на білки, що є важливим фактором у прийнятті рішень щодо розробки біологічних препаратів.



Приклад експерименту

Наприклад, невелику групу сконструйованих білків було перевірено на зміну термостійкості внаслідок мутацій однієї амінокислоти в білковій послідовності. Мутація однієї амінокислоти (мутація 1) не мала значного впливу на короткострокову термостабільність; однак альтернативні мутації однієї амінокислоти мають значний вплив на стабільність білка (Мутація 2 та Мутація 3).

Як показано на прикладі значної дестабілізації в Мутації 3, ефекти модифікації залежать як від місця модифікації, так і від фізико-хімічних властивостей нової амінокислоти. Оптимізація бажаних функціональних переваг модифікації послідовності зі структурною стабільністю білка в цілому допомагає зрозуміти взаємозв'язок між структурою та функцією і може сприяти розробці передових терапевтичних засобів.

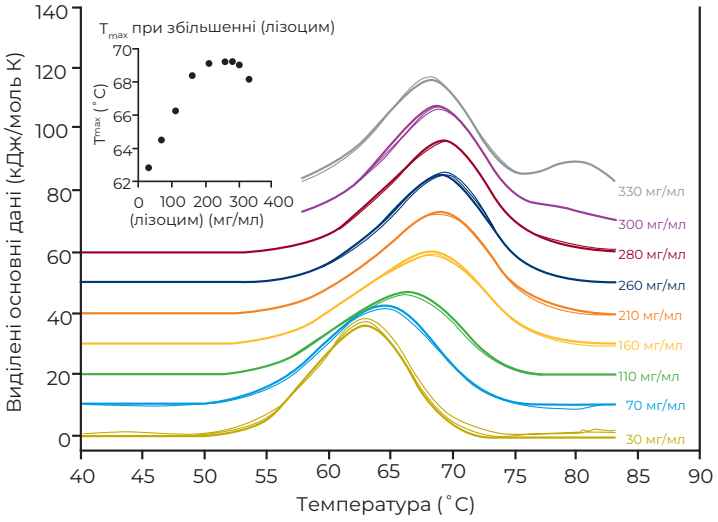
Додаткові ресурси

Повний текст експерименту та аналізу дивіться тут: Мутаційний аналіз білків

Примітка щодо застосування: Швидкий скринінг термічної стабільності та відбір лікарських препаратів на основі моноклональних антитіл

Концентраційна залежність → RS-DSC

Зі зростанням успіху терапії антитілами фармацевтична промисловість підвищила інтерес до висококонцентрованих лікарських форм, які забезпечують підшкірну та очну доставку ліків. Як такі, препарати з концентрацією антитіл від 50 до 150 мг/мл є поширеними і можуть досягати 200+ мг/мл. Рецептура білків у високих концентраціях може підвищити сприйнятливість до фізичної нестабільності. І навпаки, деякі тематичні дослідження показали підвищення термічної стабільності при збільшенні концентрації. Таким чином, розуміння термічного розкладання і реакції на середовище розчину при концентрації, що цікавить нас, є критично важливим показником для зменшення відповідальності за лікарський засіб.



Приклад експерименту

Щоб проілюструвати важливість аналізу за бажаної концентрації препарату, ми оцінювали лізоцим білка курячого яйця в діапазоні від 30 до 330 мг/мл у гліциновому буфері. Завдяки простій термограмі з одним переходом при низьких концентраціях (~1 мг/мл) лізоцим зазвичай використовують як еталонний випробувальний зразок для DSC. Оцінюючи концентрації білка до 100 разів вище, ми спостерігали концентраційну залежність стабільності лізоциму.

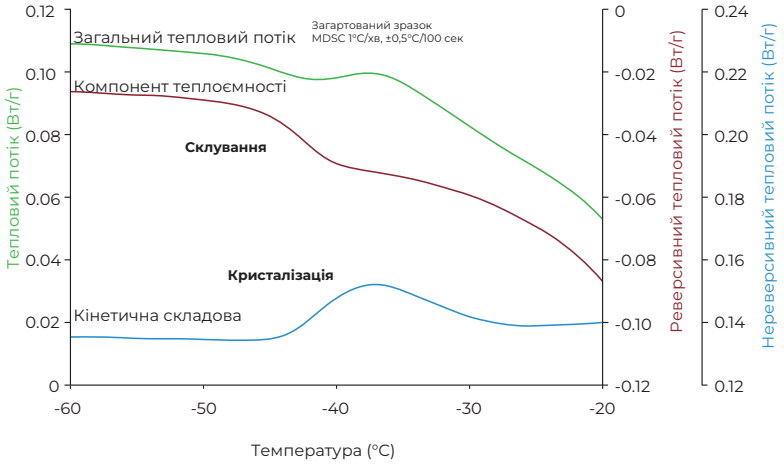
Додаткові ресурси

Повний текст експерименту та аналізу дивіться тут: Залежність від концентрації

Ліофілізація → Термічні DSC

Всебічна характеристика необхідна для оптимізації підготовки зразків, ліофілізації та доставки продукту. Дослідники повинні проводити термічний аналіз протягом усього процесу, щоб оцінити, як зміни температури впливають на властивості матеріалу.

Склування - це температура, при якій заморожений розчин лікарського засобу переходить зі склоподібного, жорсткого стану в більш в'язкий. Фаза заморожування ліофілізації є важливою характеристикою, оскільки вона повинна бути нижче температури склування, щоб запобігти руйнуванню або зміні структури продукту.



Нижче температури склування молекулярна рухливість також значно знижена, мінімізуючи реакції деградації для забезпечення довгострокової стабільності. Для дослідників дуже важливо визначити температуру склування, щоб оптимізувати температури, які використовуються на кожному етапі процесу ліофілізації.

Discovery DSC вимірює T_g з найкращою в галузі точністю, а також може проводити випробування, модулюючи температуру зразка за допомогою лінійного підвищення температури. Modulated DSC™ дозволяє вимірювати теплоємність зразка, а також загальний тепловий потік під час випробування.

Multi-Sample X3 DSC пропонує явну перевагу одночасного аналізу трьох зразків, забезпечуючи отримання великої кількості даних за більш короткий проміжок часу.

Додаткові ресурси

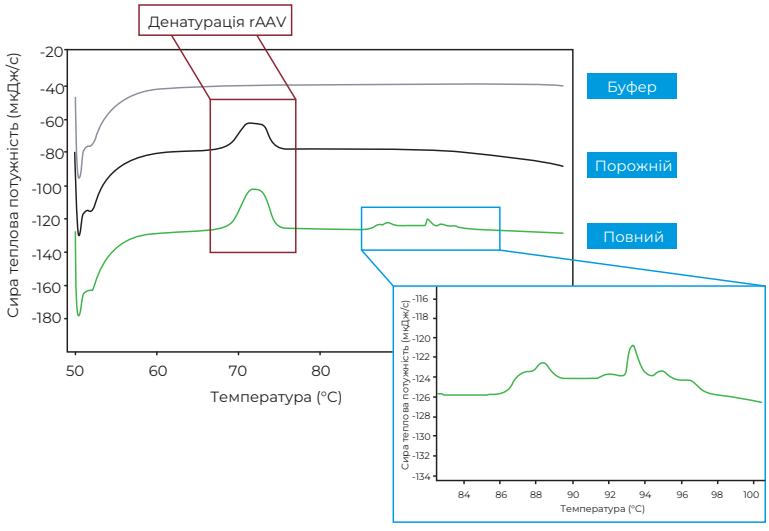
Блог: Як оптимізувати ліофілізацію за допомогою термічного аналізу

Примітка щодо застосування: Оптимізація процесу сублімаційного сушіння за допомогою модульованої диференціальної сканувальної калориметрії

Генна терапія за допомогою адено-асоційованих вірусів (AAV) → Nano DSC

У зв'язку зі зростаючою увагою до вірусних векторів для проведення життєво важливих методів генної терапії, аденоасоційовані віруси (AAV) стають провідною платформою для генної терапії. AAV - це білкова система доставки, яка здатна проникати через клітинні мембрани, забезпечуючи доставку, але з певними проблемами щодо ефективності інкапсуляції та контролю якості.

Nano DSC може виявляти зміни в міжмолекулярних взаємодіях, які можуть бути наслідком змін у структурі AAV під впливом температури, а також переходів, спричинених забрудненнями, умовами зберігання та буферизації, змінами у рецептурі та варіабельністю від партії до партії.



Завдяки широкому спектру експериментів, які він може проводити, Nano DSC може забезпечити робочі процеси на багатьох етапах розробки генної терапії, від модуляції характеристик вивільнення препарату з AAV до моніторингу варіабельності від партії до партії під час виробництва.

Додаткові ресурси

Примітка щодо застосування: Оцінка векторів генної терапії AAV за допомогою диференціальної сканувальної калориметрії

© 2024 TA Instruments. A division of Waters Corporation. All rights reserved.

Чутливі вимірювання малих змін у структурі біомолекул → Nano DSC

Біологічні молекули потребують стабілізації для аналізу in vitro, а також тривалого зберігання, виробництва та обробки. Зміни в їхній структурі можуть несподівано знизити або підвищити якість і безпеку лікарських засобів. Тому вчені потребують високочутливих вимірювань невеликих змін у структурі та стабільності біомолекул, щоб оптимізувати рецептури та відстежувати зміни в продуктах з плином часу.

Nano DSC пропонує новий рівень чутливості для вимірювання найдрібніших змін стабільності лікарських засобів. При використанні в рамках DOE (Design of Experiment - планування експерименту) Nano DSC може визначити ідеальні умови визначення рецепту, виявити зміни, що відбуваються у виробництві або зберіганні ліків. Nano DSC також пропонує значну простоту у використанні, оскільки зразки не потребують флуоресцентного маркування, тегування злиття або хімічного розкладання. При автоматизації Nano DSC є інструментом, що підвищує ефективність і забезпечує спокій при прийнятті рішень. Nano DSC має бути частиною кожного відкриття, визначення рецепту та аналітичної групи з аналізу досліджень і розробок.

Приклад експерименту

Допоміжні речовини, такі як сорбіт, гліцерин і гліколі, підвищують стабільність біомолекулярної структури за рахунок збільшення розчинності у водному середовищі [2]. Ступінь зміни стабільності біомолекулярної структури, що відбувається при зміні солюбілізатора, оцінювали для еталонного зразка лізоциму в діапазоні від 0 М до 1,5 М сорбіту. На відміну від відносно великих змін, виявлених при регулюванні pH, регулювання сорбіту в усьому діапазоні становило приблизно 3 °C (Рис. 2, вгорі). Графік залежності T_{max} від концентрації сорбіту також відображає пропорційну лінійну зміну температури стабільності (Рис. 2, внизу), як і графік залежності T_{max} від pH (Рис. 1, внизу). Стабільність структури, визначена за допомогою Nano DSC, змінюється лише на 0,2°C з відмінною відтворюваністю в трикратному повторенні (% середньоквадратичне відхилення ≤ 0,24°C, Таблиця 2).

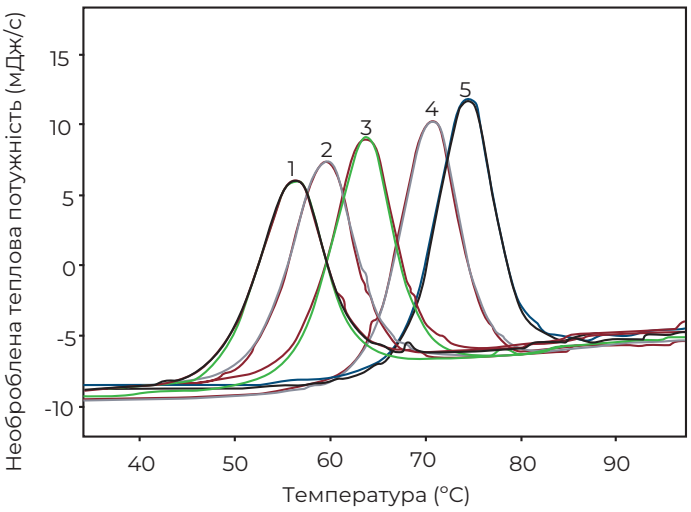


Рисунок 1

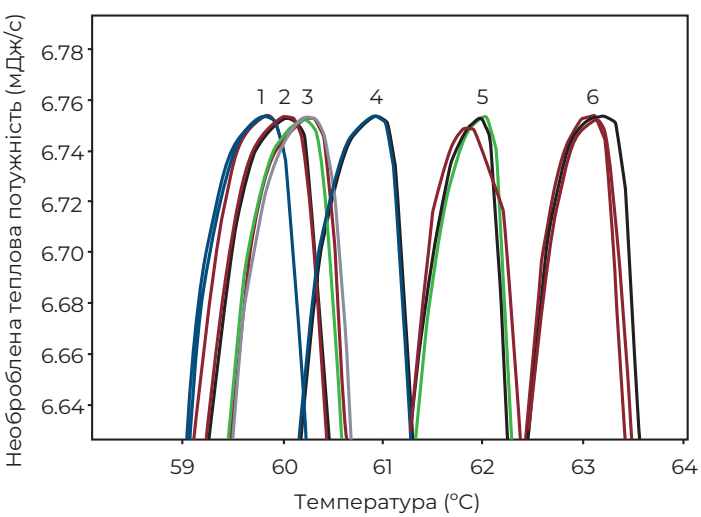


Рисунок 2

Додаткові ресурси

Примітка щодо застосування: Новий термодинамічний аналіз для прогнозування та моніторингу стабільності біомолекулярної структури

Бібліотека ресурсів

Калориметр швидкого скринінгу - диференціальний сканувальний калориметр

- Демонстраційне відео про продукт
- **Примітка щодо застосування:** Швидкий скринінг термічної стабільності висококонцентрованих біологічних препаратів
- **Примітка щодо застосування:** Швидкий скринінг термічної стабільності та відбір лікарських препаратів на основі моноклональних антитіл
- **Блог:** Як прискорити аналіз термостабільності висококонцентрованих лікарських засобів
- **Блог:** Чому DSC-аналіз є критично важливим етапом у розробці біоподібних лікарських засобів

Диференціальні сканувальні калориметри для виявлення біоподібних лікарських засобів

- **Вебінар:** Біофізична характеристика кон'югатів антитіл з лікарськими засобами за допомогою DSC
- **Вебінар:** Характеристика аморфних фармацевтичних препаратів за допомогою DSC-аналізу
- **Примітка щодо застосування:** Несумісність лікарського засобу і допоміжної речовини з Discovery X3
- **Блог:** Як оптимізувати ліофілізацію за допомогою термічного аналізу

Nano DSC

- **Примітка щодо застосування:** Оцінка векторів генної терапії AAV за допомогою диференціальної сканувальної калориметрії
- **Примітка щодо застосування:** Новий термодинамічний аналіз для прогнозування та моніторингу стабільності біомолекулярної структури
- **Примітка щодо застосування:** Характеристика структури та зв'язування вірусу
- **Блог:** Оцінка стабільності антитіл за допомогою нанодиференціальної сканувальної калориметрії

Брошура про мікрокалориметри

Ресурсний хаб з біотехнологій

Електронна книга: Необхідні знання аналітичних методів для біофармацевтичних розробників

Блог: Робочий процес та методи розробки лікарських засобів BioPharma

Блог: Мікрокалориметрія для біофізичної характеристики макромолекул

LEM UKRAINE – це колектив кваліфікованих спеціалістів з багаторічним досвідом роботи в сфері постачання та обслуговування обладнання для термічного аналізу, молекулярної та атомної спектроскопії, систем для визначення характеристик частинок, порошків та пористих матеріалів.

ТОВ «ЛЕМ УКРАЇНА»
вул. Рибальська, 2, оф. 302
Київ, 01011, Україна

тел.: +380 95 637 78 52
e-mail: info@lem-ukraine.com.ua
www.lem-ukraine.com.ua

Waters™ | TA™ Instruments

TA Instruments and Waters are trademarks of Waters Corporation.
All other trademarks are the property of their respective owners.

©2024 Waters Corporation. All rights reserved.
October 2024 BIO00001EN Rev. A

TA Instruments
159 Lukens Drive
New Castle, DE 19720 U.S.A.
T: 1 302 427 4000
F: 1 302 427 4041
www.tainstruments.com

Waters Corporation
34 Maple Street
Milford, MA 01757 U.S.A.
T: 1 508 478 2000
F: 1 508 872 1990
www.waters.com