

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NUŠA SLABAJNA

**RAZVOJ KROMATOGRFSKE METODE ZA KVANTITATIVNO DOLOČANJE
DEAMIDACIJE V TERAPEVTSKIH MONOKLONSKIH PROTITELESIH**

**DEVELOPMENT OF A CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR
QUANTIFICATION OF DEAMIDATION IN THERAPEUTIC MONOCLONAL
ANTIBODIES**

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala v podjetju Lek, d.d. (Biofarmacevtika, oddelek Razvojna analitika) pod mentorstvomizr. prof. dr. Matjaža Jerasa in somentorstvom dr. Roka Sekirnika.

Zahvala

Zahvaljujem se vsem, ki so mi pomagali pri nastanku in pisanju magistrske naloge. Predvsem bi se rada zahvalila dr. Roku Sekirniku za vso pomoč, nasvete in znanje, ki mi ga je predal, ter mentorjuizr. prof. dr. Matjažu Jerasu za pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Zahvalila bi se tudi dr. Tilnu Praperju za nasvete pri izvedbi študije, ter dr. Nini Pirher in Luki Smoletu, ki sta izvedla meritve z masno spektrometrijo. Zahvala gre tudi fantu, družini in prijateljem, ki so mi stali ob strani in me spodbujali.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorjaizr. prof. dr. Matjaža Jerasa in somentorstvom dr. Roka Sekirnika.

VSEBINA

| | | |
|-----------|--|----|
| 1 | UVOD | 1 |
| 1.1 | BIOLOŠKA ZDRAVILA | 1 |
| 1.2 | PROTITELESA | 2 |
| 1.2.1 | Protitelesa razreda IgG | 3 |
| 1.3 | TERAPEVTSKA MONOKLONSKA PROTITELESA..... | 5 |
| 1.4 | POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE (PTM)..... | 6 |
| 1.4.1 | PTM povezane s stabilnostjo terapevtskega produkta | 8 |
| 1.4.1.1 | Oksidacija | 8 |
| 1.4.1.2 | Deamidacija | 9 |
| 1.4.1.2.1 | Deamidacija peptida PENNYK | 10 |
| 1.5 | ANALITIKA PTM..... | 11 |
| 1.5.1.1 | Reverzno-fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (RP-HPLC) 11 | |
| 1.5.1.2 | Peptidno kartiranje | 12 |
| 2 | NAMEN DELA | 14 |
| 3 | MATERIALI IN METODE..... | 15 |
| 3.1 | MATERIALI..... | 15 |
| 3.1.1 | Kemikalije | 15 |
| 3.1.2 | Voda | 15 |
| 3.1.3 | Pufri in raztopine | 15 |
| 3.1.4 | Vzorci | 16 |
| 3.1.5 | Referenčni peptidi | 16 |
| 3.2 | OPREMA | 16 |
| 3.2.1 | Naprave in laboratorijski pribor | 16 |
| 3.2.2 | Program za obdelavo podatkov | 17 |
| 3.3 | EKSPERIMENTALNO DELO..... | 17 |
| 3.3.1 | Priprava denaturacijske raztopine | 17 |
| 3.3.2 | Priprava delovne raztopine natrijevega citrata | 18 |
| 3.3.3 | Priprava 0,5 M raztopine ditiotreitola (DTT)..... | 18 |
| 3.3.4 | Priprava 1 M raztopine jodacetamida (IAA)..... | 18 |
| 3.3.5 | Priprava vzorcev | 18 |
| 3.3.6 | Priprava slepega vzorca..... | 19 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.3.7 | Priprava raztopine encima LysC | 19 |
| 3.3.8 | Priprava raztopin referenčnih peptidov | 19 |
| 3.3.9 | Priprava mobilnih faz | 19 |
| 3.3.9.1 | Mobilna faza A (MFA): 0,08% raztopina TFA v vodi Milli-Q..... | 20 |
| 3.3.9.2 | Mobilna faza B (MFB): 0,075% raztopina TFA v ACN | 20 |
| 3.3.9.3 | Mobilna faza A (MFA): 0,1% raztopina PFPA v vodi Milli-Q..... | 20 |
| 3.3.9.4 | Mobilna faza B (MFB): 0,1% raztopina PFPA v ACN | 20 |
| 3.3.10 | Kromatografski pogoji | 20 |
| 3.3.11 | Izmenjava pufra v delovno raztopino..... | 20 |
| 3.3.12 | Relativna kvantifikacija deamidacije modificiranih peptidov LH27 | 21 |
| 4 | REZULTATI IN RAZPRAVA..... | 22 |
| 4.1 | RAZVOJ METODE..... | 22 |
| 4.1.1 | Sprememba organskega modifikatorja v mobilnih fazah..... | 22 |
| 4.1.2 | Optimizacija gradienta mobilne faze s PFPA..... | 23 |
| 4.1.3 | Optimizacija detekcije..... | 26 |
| 4.1.4 | Optimizacija gradienta za skrajšanje časa metode | 29 |
| 4.2 | PREVERJANJE USTREZNOSTI RAZVITE KROMATOGRAFSKE METODE | 37 |
| 4.2.1 | Retencijski časi in elucijski profili sintetičnih peptidov | 37 |
| 4.2.2 | Določitev LOQ..... | 40 |
| 4.2.2.1 | Linearnost in točnost..... | 40 |
| 4.2.2.2 | Ponovljivost injiciranja (6 neodvisnih priprav vzorca LOQ)..... | 42 |
| 4.2.3 | Preverjanje neželenega prenašanja vzorcev (carry-over)..... | 43 |
| 4.2.4 | Stabilnost vzorcev pri zamrzovanju | 44 |
| 4.2.5 | Stabilnost vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku | 45 |
| 4.2.6 | Stabilnost reagentov | 45 |
| 4.3 | UPORABNOST METODE..... | 46 |
| 4.3.1 | Uporaba metode za študij kinetike deamidacije..... | 46 |
| 4.3.1.1 | Kinetika deamidacije sintetičnih variant peptida LH27..... | 52 |
| 4.3.2 | Generičnost nove metode | 55 |
| 5 | SKLEPI..... | 57 |
| 6 | LITERATURA | 59 |

SEZNAM PREGLEDNIC

| | |
|--|----|
| Preglednica I: Lastnosti podrazredov človeških protiteles IgG..... | 5 |
| Preglednica II: Uporabljene kemikalije..... | 15 |
| Preglednica III: Raztopine, uporabljene za pripravo vzorcev. | 16 |
| Preglednica IV: AK zaporedja in druge lastnosti uporabljenih referenčnih peptidov. | 16 |
| Preglednica V: Seznam uporabljenih naprav. | 17 |
| Preglednica VI: Seznam uporabljenega laboratorijskega pribora. | 17 |
| Preglednica VII: Gradient referenčne metode peptidnega kartiranja. | 23 |
| Preglednica VIII: Elucijski gradienti 85-, 111- in 98-minutne metode..... | 24 |
| Preglednica IX: Primerjava relativnih površin vrhov peptida LH27 v IgG1 s standardnim dodatkom..... | 25 |
| Preglednica X: Primerjava resolucij med vrhoma LH27_N391D in LH27 pri treh testiranih metodah. | 26 |
| Preglednica XI: Površina vrhov LH27 pri 1% in 100% nominalnem nanosu. | 27 |
| Preglednica XII: Primerjava občutljivosti metode pri uporabi dveh vrst detekcije. | 28 |
| Preglednica XIII: Elucijski gradienti za 111-, 75- in 50- minutno metodo..... | 30 |
| Preglednica XIV: Relativne površine vrhov peptida LH27_N391D in resolucije vrhov LH27/LH27_N391D, določene pri 50-, 75- in 111-minutni metodi..... | 31 |
| Preglednica XV: Vrednosti s/n pri 0,2% nominalnem nanosu vzorcev za 50-, 75- in 111-minutno metodo..... | 31 |
| Preglednica XVI: Elucijski gradienti metod s trajanjem 35 min in 22 min 31 | 31 |
| Preglednica XVII: Elucijski gradienti, ki smo jih uporabili za optimizacijo naklona elucije pri 22-minutnih metodah. | 33 |
| Preglednica XVIII: Primerjava rezultatov 22-minutnih metod z gradienti 1 – 4..... | 34 |
| Preglednica XIX: Gradient optimizirane različice 22-minutne metode (Gradient 4_v02). | 34 |
| Preglednica XX: Gradient metode Gradient 4_v04 35 | 35 |
| Preglednica XXI: Gradienti 30- in 35-min metode za prenos na kvartarni sistem HPLC. | 36 |
| Preglednica XXII: Retencijski časi in relativne resolucije med variantami peptida LH27..... | 39 |

| | |
|---|----|
| Preglednica XXIII: Nakloni linearnih funkcij za posamezne vrhove variant peptida LH27, ki smo jih uporabili za določitev relativnih faktorjev odzivnosti (RRF). | 41 |
| Preglednica XXIV: Relativni faktorji odzivnosti (RRF) za variante peptida LH27. | 41 |
| Preglednica XXV: Površina vrha LH27 pri 100% skaliranem nominalnem nanosu. | 42 |
| Preglednica XXVI: Rezultati analize 6 neodvisno pripravljenih vzorcev LOQ pri 0,2 in 0,5% nominalnem nanosu..... | 43 |
| Preglednica XXVII: Rezultati preverjanja stabilnosti vzorcev, shranjenih 3 tedne na -20 °C.44 | 44 |
| Preglednica XXVIII: Rezultati preverjanja stabilnosti vzorcev, shranjenih do 84 ur v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 – 8 °C. | 45 |
| Preglednica XXIX: Rezultati preverjanja stabilnosti reagentov. | 46 |
| Preglednica XXX: Shema priprave vzorcev za študij kinetike deamidacije v IgG1 vzorcu.... | 47 |
| Preglednica XXXI: Površine vrha LH27 pri testiranju generičnosti nove kromatografske metode | 56 |

SEZNAM SLIK

| | |
|---|----|
| Slika 1: Zgradba protitelesa razreda IgG..... | 4 |
| Slika 2: PTM so lahko povezane s proizvodnjo ali s stabilnostjo produkta..... | 8 |
| Slika 3: Reakcija deamidacije. | 10 |
| Slika 4: Skica priprave vzorcev za peptidno kartiranje..... | 13 |
| Slika 5: Primerjava kemijskih struktur TFA in PFPA..... | 23 |
| Slika 6: Primerjava kromatografskih ločb peptidov v prisotnosti TFA in PFPA..... | 23 |
| Slika 7: Ločbe vzorcev mAb IgG1 z 85-, 111- in 98-minutno metodo | 24 |
| Slika 8: Nečistota, opažena v kromatogramu, dobljenem s 85-minutno metodo..... | 25 |
| Slika 9: LC-MS/MS potrditev identitete peptida LH27, ločenega s 111-minutno metodo..... | 26 |
| Slika 10: Absorpcijski spekter TFA | 27 |
| Slika 11: Kromatogram, ki prikazuje primerjavo bazne linije z meritvijo redčitve na 1% nominalnega nanosa. | 27 |
| Slika 12: Kromatograma, ki prikazujeta primerjavo detekcije z UV 280 in FLD | 29 |

| | |
|--|----|
| Slika 13: Kromatogrami vzorcev, analiziranih z 111-, 75- in 50-minutno metodo. | 30 |
| Slika 14: Primerjava kromatogramov, pridobljenih z: a) 35-minutno metodo, b) različico A 22-minutne in c) različici B 22-minutne metode. | 32 |
| Slika 15: Prikaz optimizacije naklona elucijskega gradienta 22-minutne metode..... | 33 |
| Slika 16: Kromatogram optimizirane 22-minutne metode Gradient 4_v02..... | 35 |
| Slika 17: Kromatogram 25-minutne metode Gradient 4_v0, izvedene na kvartarnem sistemu HPLC..... | 35 |
| Slika 18: Kromatograma 30- in 35-minutne metode na kvartarnem sistemu HPLC. | 36 |
| Slika 19: Z MS potrjena identiteta vrha peptida LH27, ločenega s 30-minutno metodo..... | 37 |
| Slika 20: Retencijski čas sintetičnega peptida LH27_N386iD v kromatogramu, pridobljenem s 30-minutno metodo. | 38 |
| Slika 21: Retencijski čas sintetičnega peptida LH27 v kromatogramu, pridobljenem s 30-minutno metodo..... | 38 |
| Slika 22: Retencijski čas sintetičnega peptida LH27_N391D v kromatogramu, pridobljenemu s 30-minutno metodo..... | 38 |
| Slika 23: Retencijski čas sintetičnega peptida LH27_N386D v kromatogramu, pridobljenemu s 30-minutno metodo..... | 39 |
| Slika 24: Ločba in retencijski časi sintetičnih peptidov LH27_N386iD, LH27, LH27_N391D in LH27_N386 (SST) v kromatogramu, pridobljenem s 30-minutno metodo analize vzorca, ki je vseboval njihovo mešanico. | 39 |
| Slika 25: Kromatograma vzorca mAb IgG1 brez in z dodatkom sintetičnih peptidov LH27_N386iD, LH27_N391D in LH27_N386D. | 40 |
| Slika 26: Linearna odvisnost med površinami vrhov variant LH27 in % nominalnega nanosa vzorca. | 41 |
| Slika 27: Površine vrhov LH27, določene po 14 zaporednih injiciranjih vzorca | 44 |
| Slika 28: Izsledki analiz skupine vzorcev, ki je vsebovala pravilno zvit protein IgG1 | 48 |
| Slika 29: Izsledki analiz skupine vzorcev proteina IgG1, pripravljenih do alkilacije..... | 49 |
| Slika 30: Izsledki analiz skupine vzorcev proteina IgG1, pripravljenih do cepitve z encimom | 50 |

| | |
|--|----|
| Slika 31: Masni spekter neznanega vrha, ki se je pojavil po inkubaciji denaturiranih in proteolitsko razgrajenih vzorcih proteina IgG1 (37 °C, pH = 8,0) | 52 |
| Slika 32: Rezultati spremljanja kinetike deamidacije sintetičnih variant peptida LH27. | 53 |
| Slika 33: Kromatogrami, ki prikazujejo vrhove glavnih razgradnih produktov vsakega od štirih sintetičnih peptidov variant peptida LH27 po 2 in 144 urah inkubacije na 37 °C..... | 54 |
| Slika 34: Rezultati testiranja nove kromatografske metode na mAb podrazredov IgG1, IgG2 in IgG4 ter na fuzijskem proteinu | 55 |

SEZNAM ENAČB

| | |
|---|----|
| Enačba 1: Enačba za izračun volumna Milli-Q vode, v kateri smo raztopili zatehtano količino DTT. | 18 |
| Enačba 2: Enačba za izračun volumna Milli-Q vode, v kateri smo raztopili zatehtano količino IAA..... | 18 |
| Enačba 3: Izračun relativnega obsega deamidacije..... | 21 |
| Enačba 4: Izračun relativnega razmerja med izračunanim in povprečnim izmerjenim presečiščem premice z y-osjo..... | 42 |

POVZETEK

Monoklonska protitelesa danes predstavljajo pomembna terapevtska sredstva proti številnim boleznim. Odlikuje jih predvsem njihova visoka selektivnost in možnost rekombinantne proizvodnje v velikih količinah. Večinoma jih uporabljamo za zdravljenje rakavih in srčno-žilnih obolenj, okužb, avtoimunskih bolezni in stanj po presaditvah alogenskih organov in tkiv.

Molekule IgG na splošno veljajo za razmeroma stabilne, a so kljub temu lahko tarča številnih posttranslacijskih modifikacij, ki nastanejo bodisi med postopkom njihove proizvodnje ali med formulacijo in shranjevanjem učinkovine. Molekule IgG so še posebno nagnjene k deamidaciji in izomerizaciji asparagina, v manjši meri pa tudi glutamina, kar vpliva na naboj celotne molekule ter s tem na njeno učinkovitost. V vseh molekulah IgG človeškega izvora je mesto, ki je najbolj izpostavljeno reakciji deamidacije, ohranjeno aminokislinsko zaporedje PENNYK.

Za določanje obsega deamidacije v terapevtskih monoklonskih protitelesih najpogosteje uporabljamo masno spektrometrijo, ki za identifikacijo snovi izkorišča razlike v molekulskih masah. Kvantifikacija deamidacije s to metodo pa je zahtevna in zamudna, saj je razlika v molekulskih masah asparagina in njegovih deamidiranih variant zgolj 1 Da, in sicer na račun pretvorbe amidne skupine v karboksilno.

Cilj magistrskega dela je bil razviti hitro kromatografsko metodo peptidnega kartiranja za protitelesa vrste IgG1, s katero bi ustrezno ločili deamidirane variante peptida PENNYK in deamidacijo relativno kvantificirali s fluorescenčno detekcijo. Pri njenem razvoju smo izhajali iz referenčne metode peptidnega kartiranja za določanje identitete proteina, ki pa je bila časovno zamudna in z njo nismo mogli ločiti kromatografskega vrha, ki pripada peptidu PENNYK od sosednjega vrha peptida C, zato kot taka ni bila primerna za kvantifikacijo obsega deamidacije. Zato smo najprej izboljšali ločbo omenjenih vrhov s spremembo organskega modifikatorja v mobilnih fazah, nato pa optimizirali še gradient metode, vse do najkrajšega možnega časa, ki nam je še omogočal zanesljivo določanje obsega deamidacije v molekuli IgG. Obenem smo prilagodili tudi način detekcije, saj peptid PENNYK vsebuje aminokislinske ostanke z aromatskimi funkcionalnimi skupinami, zato ga lahko zaznamo s fluorescenčnim detektorjem. Na ta način smo zmanjšali vpliv absorpcije organskega modifikatorja v mobilnih fazah. Tako smo uspeli razviti 30-minutno analizno metodo, s katero uspešno ločimo in kvantificiramo deamidirane variante peptida PENNYK in jo lahko

uporabljam tako za rutinsko določevanje stabilnosti protiteles IgG1 v zgodnjem razvoju biofarmaceutskih učinkovin, kot tudi v stabilnostnih študijah za izbiro najustreznejše formulacije.

Ključne besede: monoklonska protitelesa IgG1; deamidacija; tekočinska kromatografija visoke ločljivosti; peptidno kartiranje

ABSTRACT

Monoclonal antibodies are important therapeutic agents used to treat a number of diseases, including cancer, cardiovascular and autoimmune diseases, infections, and can be used after allogeneic organ and tissue transplantation. They are highly selective and can be produced recombinantly in large quantities.

IgG molecules are generally considered to be relatively stable, but may nevertheless be a subject of a number of post-translational modifications that can occur either during manufacturing or formulation processes and storage. IgG molecules are especially prone to deamidation and isomerisation of asparagine, and to a lesser extent of glutamine, which affects their net charge and potentially also their efficacy. A conserved sequence of a peptide motif, generally called PENNYK, has been reported as the site of the highest exposure to deamidation. This sequence can therefore be used as a reporter sequence for deamidation of human IgGs.

Mass spectrometry is used most frequently to determine the extent of deamidation of therapeutic monoclonal antibodies. It exploits the ratio between different masses and charges for the identification of substances. However, this approach for quantification of deamidation in IgG molecules is challenging and time-consuming, because the difference in molecular weights of asparagine and its deamidated variants is only 1 Da, reflecting the conversion of an amide to a carboxylic group.

The aim of this master thesis was to develop a fast chromatographic method of peptide mapping for separation of deamidated variants of the PENNYK peptide and relative quantification of deamidation using fluorescence detection. Its development was based on the reference method of peptide mapping used for determining the identity of the IgG1 protein. However this procedure was time-consuming and could not separate the PENNYK peptide from the co-eluting »peptide C«, and was therefore not suitable for quantification of deamidation. First we improved the separation of these two peaks by using different organic

modifiers in the mobile phases and then optimized the gradient to achieve the shortest time possible that still allowed us to determine the extent of deamidation within the IgG molecule. We also adjusted the detection of the method, because PENNYK peptide contains amino acid residues with aromatic functional groups, which can be fluorescently detected. In this way, we successfully reduced the absorption effect of organic modifier from mobile phases, thus increasing the sensitivity of the method. In conclusion, we developed a short 30-minute analytical method which successfully separates and quantifies deamidation variants of the PENNYK peptide and can be used in early development of therapeutic recombinant IgG1 monoclonal antibodies, as well as in stability studies performed to find an optimal formulation.

Keywords: IgG monoclonal antibodies; deamidation; high performance liquid chromatography; peptide mapping

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|-------------|---|
| ACN | acetonitril |
| AK | aminokislina |
| AU | intenziteta absorbance (<i>angl.</i> absorbance unit) |
| CH | konstantna regija na težki verigi IgG protitelesa |
| CL | konstantna regija na lahki verigi IgG protitelesa |
| Da | Dalton |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina (<i>angl.</i> deoxyribonucleic acid) |
| DTT | ditiotreitrol |
| EDTA | dinatrijeva sol etilendiamintetraoetne kisline |
| Fab | variabilno področje IgG protitelesa, ki je odgovorno za vezavo antigena |
| Fc | konstantno področje IgG protitelesa, ki je odgovorno za efektorske funkcije |
| FLD | fluorescenčni detektor |
| HPLC | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>angl.</i> high performance liquid chromatography) |
| IAA | jodacetamid |
| Ig | imunoglobulin |
| LH27 | peptid PENNYK |
| LH27_N386 | peptid PENNYK z deamidacijo na mestu 386 |
| LH27_N386iD | peptid PENNYK s formacijo izoaspartata na mestu 386 |
| LH27_N391 | peptid PENNYK z deamidacijo na mestu 391 |
| LOQ | meja določljivosti (<i>angl.</i> limit of quantitation) |
| LU | intenziteta luminiscence (<i>angl.</i> luminiscent unit) |
| LysC | lizil endopeptidaza |
| mAb | monoklonsko protitelo (<i>angl.</i> monoclonal antibody) |
| MF | mobilna faza |

| | |
|---------|---|
| MFA | mobilna faza A |
| MFB | mobilna faza B |
| PepMap | peptidno kartiranje (<i>angl.</i> peptide mapping) |
| PFPA | pentafluoropropionska kislina (<i>angl.</i> pentafluoropropionic acid) |
| PTM | posttranslacijska modifikacija |
| RP-HPLC | reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti |
| rpm | obrti na minuto (<i>angl.</i> revolutions per minute) |
| RSD | relativni standardni odklon (<i>angl.</i> relative standard deviation) |
| RT | retencijski čas (<i>angl.</i> retention time) |
| s/n | razmerje med signalom in šumom |
| STDEV | standardni odklon (<i>angl.</i> standard deviation) |
| TFA | trifluoroocetna kislina (<i>angl.</i> trifluoroacetic acid) |
| UV | ultravijolična svetloba |
| VH | variabilno področje na težki verigi protitelesa IgG |
| VL | variabilno področje na lahki verigi protitelesa IgG |

SEZNAM OKRAJŠAV AMINOKISLIN

| | |
|----|-------------|
| A | alanin |
| C | cistein |
| D | aspartat |
| E | glutamin |
| F | fenilalanin |
| G | glicin |
| I | izolevcin |
| iD | izoaspartat |
| K | lizin |
| L | levcin |
| M | metionin |
| N | asparagin |
| P | prolin |
| Q | glutamin |
| S | serin |
| V | valin |
| W | triptofan |
| Y | tirozin |

1 UVOD

1.1 *BIOLOŠKA ZDRAVILA*

Biološka zdravila so drugačna od klasičnih farmacevtskih zdravil v obliki tablet, kapsul, praškov, itd. Učinkovina, ki jo vsebujejo namreč ni kemična, temveč biološka snov, za sintezo katere potrebujemo žive organizme oz. mikroorganizme. Postopek njihove izdelave je izjemno kompleksen in vključuje različne biološke in biotehnološke postopke, uporabo celičnih kultur in raznovrstnih tehnologij. Prav način proizvodnje bioloških zdravil je zelo pomemben, saj mora biti ponovljiv, obvladljiv in je podvržen strogemu nadzoru. Za nadzor razvoja bioloških zdravil imamo na voljo različne analitske metode, s katerimi preverjamo njihovo ustreznost in čistost. Produkt mora biti namreč maksimalno čist in obstojen, da med njegovo proizvodnjo, polnjenjem, transportom in shranjevanjem ne pride do zmanjšanja učinkovitosti ali varnosti.

Največkrat tovrstna zdravila pridobivamo s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA, zato je danes večina odobrenih bioloških zdravil rekombinantnih. Med te sodijo: eritropoetin, inzulin, interferoni, interleukini, rastni dejavniki, monoklonska protitelesa in encimi. Največ bioloških zdravil razvijajo na področju rakavih obolenj, temu pa sledi njihova uporaba za zdravljenje avtoimunskih boleznih in infekcijskih obolenjih, okužb s HIV, srčno-žilnih bolezni, nevroloških motenj, diabetesa, respiratornih, prebavnih, genetskih in krvnih motenj, obolenj oči, kožnih bolezni, imunskih stanj po presaditvah alogenskih organov in tkiv, itd. Spekter njihove uporabe pa se še širi, zato njihov razvoj naglo raste.

V nasprotju s klasičnimi, so biološka zdravila velike in heterogene molekule z visokimi molekulskimi masami ter zapletenimi tridimenzionalnimi strukturami. Prav struktura je ključna za njihovo delovanje, saj so učinkovita le v nativni obliki. Večino bioloških zdravil predstavljajo proteini, med katere spadajo tudi monoklonska protitelesa. Sestavljajo jih aminokisljine, na katere so največkrat pripete tudi sladkorne enote.

Njihova poglobitna prednost je specifičnost delovanja, saj praviloma učinkujejo samo na tarčna tkiva, ki imajo prave signalne molekule, medtem ko na druga, netarčna tkiva, ki uporabljajo drugačne signalne mehanizme, ne delujejo. Na drugi strani pa sta njihovi glavni slabosti potencialna imunogenost ter visoka cena zaradi zahtevnega načina razvoja in izdelave.

V nasprotju s klasičnimi zdravili, aplikacija bioloških ni nikoli peroralna, saj so ta večinoma beljakovine, ki bi se v črevesju, v prisotnosti prebavnih sokov in encimov, hitro razgradile. Poleg tega so to prevelike in preveč hidrofilne molekule, da bi lahko prehajale črevesno steno. Zato bolniki biološka zdravila največkrat prejemajo intravensko, subkotalno ali intramuskularno. Po vnosu v organizem delujejo različno. Če telesu primanjkuje lastnih beljakovin lahko nadomestijo njihov primanjkljaj, saj s specifično zgradbo posnemajo njihovo delovanje. Lahko pa uničijo škodljive, npr. rakave celice v organizmu. Na tak način delujejo monoklonska protitelesa, ki se specifično vežejo na rakavo celico in jo označijo, tako, da jo lahko napadejo in uničijo celice imunskega sistema.

Na področju bioloških zdravil ni generikov, ki vstopijo na trg po poteku patentne zaščite inovativnega oz. originalnega zdravila in vsebujejo enako zdravilno učinkovino z enako kakovostjo, jakostjo in učinkovitostjo kot originalno zdravilo. Zaradi kompleksnega načina proizvodnje bioloških zdravil je namreč skorajda nemogoče izdelati učinkovino, ki bo imela enako zgradbo kot tista v originalnem zdravilu, saj lahko že najmanjše spremembe v procesu proizvodnje privedejo do molekul z drugačno zgradbo. Zato v primeru bioloških zdravil govorimo izključno o podobnih bioloških zdravilih, ki se od originalnih lahko minimalno razlikujejo po zgradbi, kljub temu pa morajo dosegati enako kakovost, učinkovitost in varnost (1, 2).

1.2 PROTITELESA

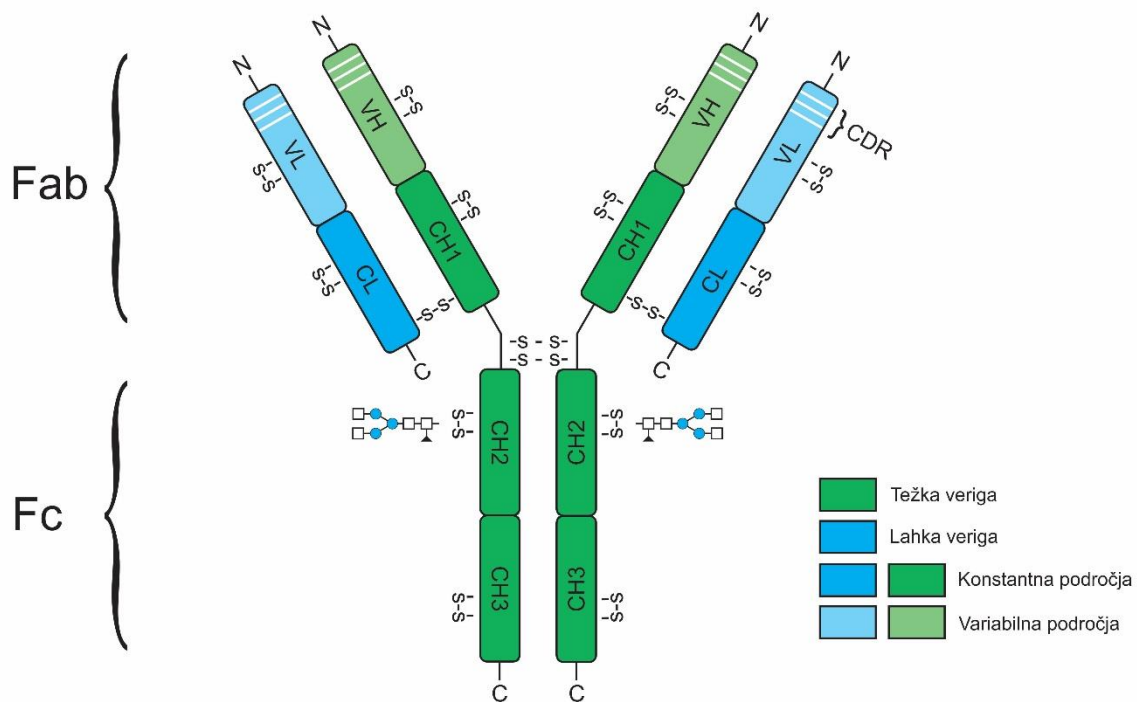
Protitelesa so topni glikoproteini, ki jih telo proizvede tekom imunskega odziva na prisotnost telesu tujih molekul, t.i. antigenov, ki bi lahko škodovali organizmu. Proizvajajo jih limfociti B, ki pri sesalcih dozorevajo v kostnem mozgu. Limfociti B izražajo transmembranske molekule imunoglobulinov IgM in IgD, ki so antigeni receptorji (IgM). Reakcija antigena z B-celičnim antigenim receptorjem (BCR) sproži aktivacijo limfocitov B, ki se s pomočjo celic T pomagalk pretvorijo v plazmatke, v katerih poteka proizvodnja antigeno specifičnih protiteles. Vezava nastalih protiteles na epitop antigena poteka preko specifičnega področja, ki ga imenujemo paratop. Vse molekule protiteles, sintetizirane v eni celici, imajo v paratopu enako aminokislinsko zaporedje, zato se vežejo na isti epitop. Večina antigenov (proteini, virusi, bakterije, itd.) pa izraža na stotine, če ne na tisoče različnih epitopov. V organizmu, ki je prišel v stik z večepitopnim antigenom, se aktivira veliko klonov limfocitov B, ki nato proizvajajo protitelesa proti različnim epitopom, kar omogoča učinkovit imunski odziv proti tujkom v telesu (1, 3, 4).

Za protitelesa je značilno, da se z visoko afiniteto vežejo samo na tiste antigene, proti katerim so bila ustvarjena, kar pomeni, da so visoko specifična. Prisotna so v krvi, tkivnih tekočinah in telesnih izločkih. Razvrščamo jih v več razredov, ki jih označujemo z IgG, IgM, IgA, IgD in IgE, ti pa se med seboj razlikujejo po velikosti, zgradbi in funkcijah, ki jih imajo v imunskem sistemu. Protitelesa so sestavljena iz dveh težkih in dveh lahkih polipeptidnih verig, ki nastanejo in se sestavijo v imunoglobulinske molekule v endoplazmatskem retikulumu, v Golgijevem aparatu pa nato pride do glikozilacije in drugih posttranslacijskih sprememb, ki pomembno vplivajo na njihovo biološko aktivnost oz. učinkovitost. Težke in lahke polipeptidne verige so med seboj povezane s kovalentnimi disulfidnimi vezmi in nekovalentnimi interakcijami, kot so ionske in vodikove vezi ter hidrofobne interakcije (1).

1.2.1 Protitelesa razreda IgG

Večina terapevtskih protiteles je razreda IgG. Lahka veriga protitelesa IgG je sestavljena iz enega konstantnega (CL) in enega variabilnega področja (VL). Težka veriga pa je zgrajena iz treh konstantnih (CH1, CH2 in CH3) in ene variabilne regije (VH). Največja variabilnost aminokislin je v treh kratkih odsekih na lahkih (segment VL) in težkih (segment VH) verigah, ki določajo komplementarnost in jih imenujemo hipervariabilna področja ali CDR (3).

Poimenovanje posameznih strukturnih delov molekule IgG temelji na produktih njene proteolitske cepitve z encimom papainom, ki jo razgradi na tri enote: dva enaka fragmenta Fab in en fragment Fc. Vsak fragment Fab sestavljata področji VL in CL težke, ter področji VH in CH1 lahke verige. Fragment Fc pa sestavljajo preostala konstantna področja obeh težkih verig (1). Približno v sredini težke verige sta oba fragmenta Fab pritrjena na fragment Fc. To mesto je gibljivo in omogoča, da lahko tridimenzionalna zgradba molekule IgG zavzame obliko črke T ali črke Y. Tako se lahko posamezna molekula IgG sočasno veže na dva enaka epitopa na isti molekuli antigena, v kolikor sta si dovolj blizu skupaj, ali pa se pritrđi na enake epitope na različnih antigenskih molekulah (3). Večina protiteles razreda IgG vsebuje v konstantnem področju CH2 na fragmentu Fc glikozilacijsko mesto, ki ključno vpliva na njihovo farmakokinetiko, farmakodinamiko in efektorske funkcije, ter s tem tudi na njihovo varnost in učinkovitost (5, 6).



Slika 1: Zgradba protitelesa razreda IgG; prirejeno po (1).

Protitelesa IgG imajo pomembne biološke funkcije. Poleg tega, da aktivirajo komplement po klasični poti, so idealno prilagojena tudi za nevtralizacijo toksinov in za opsonizacijo, ki pospešuje fagocitozo, ki jo izvajajo makrofagi in granulociti (predvsem nevtrofilci), pri čemer omogočajo pritrjevanje fagocitnih celic na tujo molekulo. Slednje imajo namreč na svojih površinah izražene receptorje za področja Fc molekul IgG, t.i. receptorje Fc γ . Molekula IgG se tako z ene strani pritrdi na receptor Fc γ , s paratopskimi vezišči na Fab pa se veže na antigenske epitopske determinante na površini antigena, npr. tuje celice, ter tako deluje kot nekakšen povezovalni člen, ki pospeši fagocitozo (3).

Poznamo štiri podrazrede protiteles IgG, ki so jih poimenovali glede na njihovo pogostost, in sicer v padajočem vrstnem redu: IgG1, IgG2, IgG3 in IgG4 (7). Med seboj jih razlikujemo glede na: število disulfidnih vezi v gibljivem zglobov molekule, način vezave na antigen, tvorbo v okviru imunskega sistema, sposobnost aktivacije komplementa in razpolovno dobo (1, 7). Strukturne in funkcijske razlike med podrazredi protiteles IgG so navedene v Preglednici 1. Kot terapevtsko učinkovino največkrat uporabljamo molekule podrazreda IgG1, ki so glede na biološko učinkovitost v človeškem organizmu najprimernejše, saj imajo v organizmu dokaj ugodno razpolovno dobo, poleg tega pa v primerjavi z ostalimi podrazredi njihova konstantna področja učinkoviteje aktivirajo komplement po klasični poti in se dobro

vežejo na receptorje Fc, izražene na površinah imunskih celic (1). Protitelesa podrazreda IgG3 se uporabljajo najmanj, saj imajo krajšo razpolovno dobo in dolgo gibljivo regijo, ki je lahko dostopna za encime in zato precej dovzetna za razgradnjo (4, 7).

Preglednica I: Lastnosti podrazredov človeških protiteles IgG (7).

| | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Molekulska masa (kDa) | 146 | 146 | 170 | 146 |
| Število AK v gibljivem področju | 15 | 12 | 62 | 12 |
| Povprečna serumska vrednost (odrasli ljudje; g/L) | 7,0 | 3,8 | 0,5 | 0,6 |
| Relativna pogostost (%) | 60 | 32 | 4 | 4 |
| Razpolovna doba (dnevi) | 21 | 21 | 7-21 | 21 |

1.3 TERAPEVTSKA MONOKLONSKA PROTITELESA

Terapevtska monoklonska protitelesa so zaradi svoje specifičnosti in varnosti pri uporabi najpomembnejši predstavniki bioloških zdravil. Njihov razvoj je trenutno v naglem vzponu (8). Repertoar do danes odobrenih terapevtskih monoklonskih protiteles je že zelo širok, obenem pa jih je na stotine še v predkliničnih in kliničnih fazah razvoja (5). Uporabljamo jih v diagnostične namene, za pripravo cepiv ter kot terapevtska sredstva v onkologiji, pri kroničnih vnetjih, boleznih srca in ožilja, alogenskih presaditvah in infekcijskih boleznih (1, 8). Njihove vezave na tarče so močne in specifične, s čimer lahko spremenijo potek bolezni (1).

Na trgu je največ monoklonskih protiteles, ki so strukturno celovita, saj so v tej obliki najprimernejša za terapijo, nekaj pa je tudi takih bioloških zdravil, ki vsebujejo samo fragmente Fab (5, 9). Slednji so sicer manjši in lažje prehajajo biološke pregrade, vendar pa imajo neokrnjene molekule protiteles daljšo razpolovno dobo v serumu, predvsem pa boljše efektorske funkcije. Poleg tega so zmožne tudi učinkovitejše nevtralizacije antigenov (5). Glavna pomanjkljivost terapevtskih monoklonskih protiteles je, da so tarčno omejene na molekule, ki so prisotne v krvnem obtoku, ali pa na tiste, ki so izražene na površinah celic. Ker zdravljenje z njimi zahteva visoke odmerke, so takšna zdravila tudi zelo draga (8).

Specifična monoklonska protitelesa lahko pridobivamo *in vitro* v velikih količinah s tehniko celične hibridizacije. Ta metoda temelji na izolaciji limfocitov B, ki so vir zelenih protiteles, ter njihovem zlitju z mielomskimi celicami, ki se kot tumorske celice neomejeno delijo.

Rezultat so hibridomi, ki ohranijo nesmrtno značilnost mielomskih celic, hkrati pa proizvajajo velike količine protiteles želene specifičnosti. Take hibridomske celice so dolgoročen, učinkovit in praktično neizčrpen vir specifičnih monoklonskih protiteles (1, 3, 4).

Ko določimo aminokislinsko zaporedje zelenega specifičnega protitelesa, ga lahko proizvajamo v velikih količinah v sesalskih celicah z rekombinantnimi tehnikami. Metoda temelji na izolaciji odseka DNA, ki kodira tarčni protein, ter na njegovem prenosu v gostiteljsko celico s pomočjo vektorja, pri čemer dobimo rekombinantno DNA. Kot gostiteljske celice se najpogosteje uporabljajo ovarijske celice kitajskega hrčka (CHO, *angl.* chinese hamster ovary). Celice z rekombinantno DNA, ki proizvajajo zeleni protein, nato namnožimo in prenesemo v bioreaktor, kjer poteka fermentacija. Nazadnje produkt očistimo s pomočjo različnih kromatografskih metod in pripravimo ustrezno formulacijo (1).

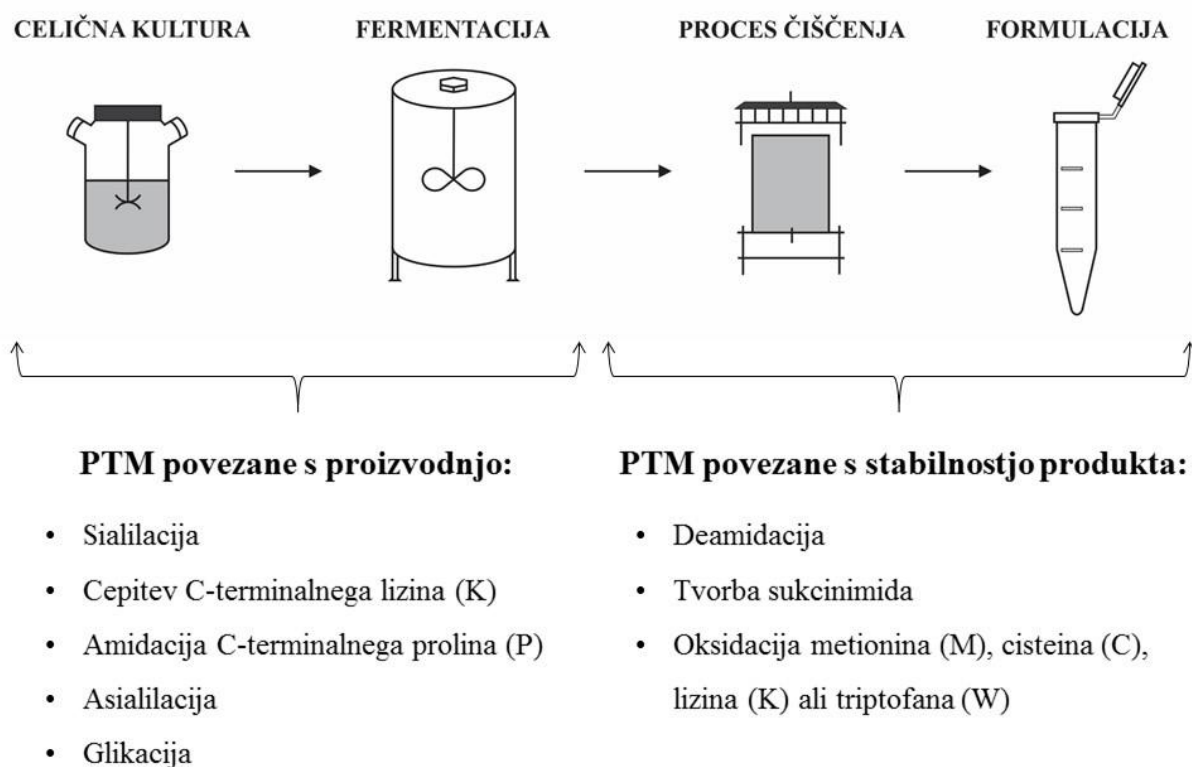
Prva generacija terapevtskih monoklonskih protiteles so bila mišja protitelesa, katerih razvoj je omogočila prej omenjena tehnika celične hibridizacije. Klinična testiranja tovrstnih monoklonskih protiteles pa so pokazala, da se človeški organizem po njihovi aplikaciji odzove z nastankom človeških protiteles proti mišjim proteinom (protitelesni ali humoralni imunski odziv). Njihova imunogenost je tako visoka zaradi razlik v aminokislinski sestavi med mišjimi in človeškimi proteini. Z uspešnim zlitjem mišjih variabilnih področij, ki so odgovorna za vezavo molekul IgG na antigen, s konstantnimi področji človeških IgG, pa se je razvila nova generacija rekombinantnih oblik terapevtskih monoklonskih protiteles. Prva so se na trgu pojavila himerna protitelesa, ki so imela 70% aminokislinskega zaporedja človeškega, 30% pa mišjega. Ker je bil njihov del Fc popolnoma človeški, je bila njihova imunogenost znatno zmanjšana, poleg tega pa je to omogočalo tudi njihove interakcije s človeškimi efektorskimi celicami in aktivacijo komplemента. Nagel razvoj inženirskih tehnik, namenjenih proizvodnji protiteles, je omogočil še dodatno zmanjšanje mišjih predelov v molekulah mAb. Tako so razvili humanizirana protitelesa, ki so z 80 - 95% človeškega aminokislinskega zaporedja še manj imunogena od himernih. Najmanjšo stopnjo imunogenosti pa so uspeli zagotoviti z izdelavo popolnoma človeških monoklonskih protiteles (9). Danes je večina na trgu prisotnih terapevtskih monoklonskih protiteles humaniziranih ali pa so popolnoma človeškega izvora (5).

1.4 POSTTRANSLACIJSKE MODIFIKACIJE (PTM)

Posttranslacijske modifikacije so kemijske spremembe proteinov, do katerih pride po njihovi biosintezi. Večina proteinov namreč takoj po nastanku še ni v biološko aktivni obliki (nativni

konformaciji), zato morajo skozi več stopenj strukturnega zvijanja in biokemijskih sprememb, preden lahko ustrezno opravljajo svoje funkcije. Tekom teh procesov pa so možne različne modifikacije, ki določajo aktivnosti proteinov, njihove strukturne oblike (konformacije) in vloge v biokemijskih procesih. Po drugi strani pa je lahko posledica posttranslacijskih modifikacij tudi porušenje oz. sprememba nativnih oblik proteinov, zaradi česar pride do sprememb v njihovih funkcijah. Tako lahko PTM povzročijo kemijsko razgradnjo proteinov, molekulske nestabilnosti in pojav nečistot (1, 10). Poleg tega lahko vplivajo tudi na naboj oz. izoelektrično točko proteina (pI) in s tem na njegovo biološko funkcijo, strukturo, življenjsko dobo v serumu ter imunogenost (1, 11, 12, 13, 14, 15).

Posttranslacijske modifikacije so lahko bodisi posledica značilnosti izraženega proteina, lahko izhajajo iz ekspresijskega sistema (gostiteljskih celic) ali iz procesa proizvodnje, lahko pa so povezane tudi s stabilnostjo končnega produkta. Kadar protein v ekspresijskem sistemu ne nastaja pravilno, lahko dobimo mešanico različnih produktov, ki se razlikujejo na N- ali C-koncih. Ko se nato v ekspresijskem sistemu tvorijo konformacijski izomeri, dimeri ali prihaja do drugih sprememb endogenih proteinov, to lahko vodi v spremenjeno specifično aktivnost tarčnega proteina. Neustrezna konformacija proteina zaradi večje izpostavljenosti določenih aminokislin lahko povzroči njihovo povečano občutljivost na proteaze in različne kemijske spremembe (1). Poleg izpostavljenosti konformacijskim spremembam so torej proteini lahko tudi tarča kemijskih modifikacij kot sta deamidacija in oksidacija. Protitelesa razreda IgG sicer veljajo za razmeroma stabilne molekule, vendar so kljub temu lahko tarča različnih degradacijskih reakcij med postopki izdelave, oblikovanja formulacij in njihovega shranjevanja (16). Slika 2 prikazuje najpogostejše vrste modifikacij ter njihove izvore in učinke.



Slika 2: PTM so lahko povezane s proizvodnjo ali s stabilnostjo produkta; povzeto po (1, 12, 13, 14, 15).

1.4.1 PTM povezane s stabilnostjo terapevtskega produkta

1.4.1.1 Oksidacija

Oksidacija proteinov je kovalentna modifikacija aminokislin, ki jo navadno povzroči prisotnost reaktivnega kisika. Največkrat je to posledica stresnih razmer ali kontaminacije. Pojavi se lahko na metioninskih, cisteinskih, triptofanskih in lizinskih ostankih (17). Najbolj dovzetni zanj so metioninski aminokislinski ostanki, ki se lahko oksidirajo v metionin sulfokside ali celo v metionin sulfone. Med njimi sta še posebej izpostavljena metionina na aminokislinskih mestih 428 (M428) in 252 (M252) v regiji Fc mAb razreda IgG (14, 17). M252 se nahaja na domeni CH₂, znotraj kratke α -vijačnice, M428 pa na domeni CH₃, v β -lasnici protitelesa IgG. V kristalni 3D strukturi protitelesa IgG sta stranski skupini M252 in M428 obrnjeni druga proti drugi, zato lahko prisotnost dodatne molekule kisika, ki je rezultat oksidacije omenjenih metioninskih ostankov, ustvari neugodno odbojno interakcijo med M252 in M428, to pa ima negativen vpliv na specifične hidrofobne interakcije in vodikove vezi, ki so ključne za stabilnost proteina. Na ta način se lahko torej poruši nativna konformacija molekule IgG. Oksidacija metioninov vpliva tudi na termično stabilnost področja Fc, predvsem domene CH₃, zaradi česar lahko prav tako pride do strukturnih

sprememb in posledično do fizikalne in kemijske nestabilnosti imunoglobulinske molekule (18).

Bolj kot so metioninski ostanki površinsko izpostavljeni, večji bo obseg oksidacije. Z zagotovitvijo ustreznih pogojev, npr. uporabo ustreznega medija v celični kulturi, oblikovanjem primerne formulacije ter ustreznim shranjevanjem, lahko proteine do določene mere zaščitimo pred oksidacijo (14). Ker imata metionina v področju Fc (M252 in M428) pomembno vlogo pri vzdrževanju strukture, aktivnosti in biološke funkcije ter vplivata na imunogenost protiteles IgG, je spremljanje obsega njune oksidacije med proizvodnjo terapevtskih mAb ključnega pomena (18).

1.4.1.2 Deamidacija

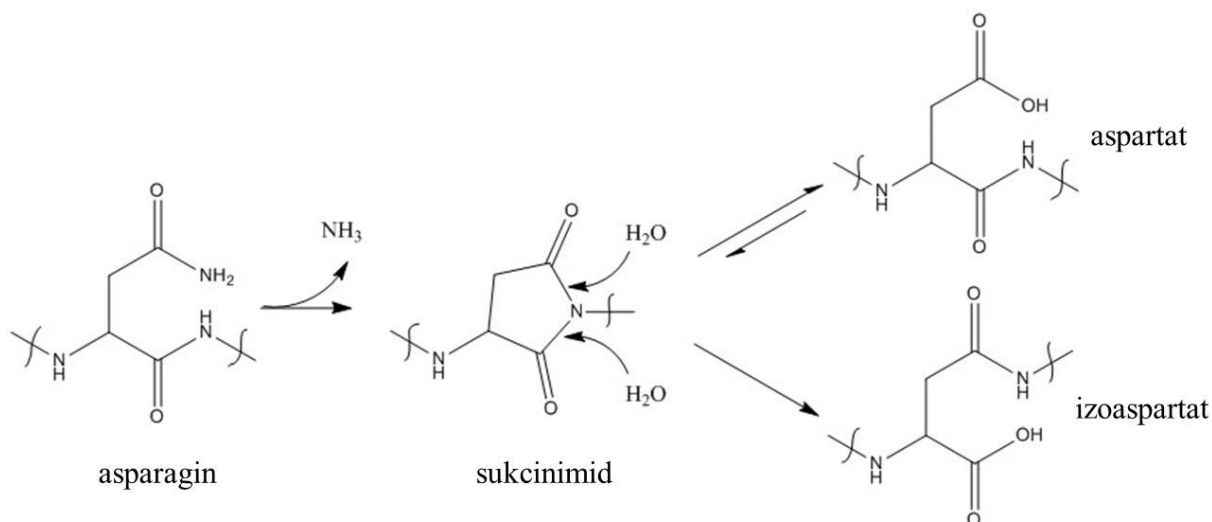
Najpogostejša oblika kemijske razgradnje terapevtskih monoklonskih protiteles je deamidacija, ki povzroča biološko pomembne spremembe v strukturah proteinov in peptidov, s čimer lahko pomembno vpliva na njihovo življenjsko dobo, če protein ni shranjen v primerni formulaciji (19, 20). Aminokislini, ki sta največkrat podvrženi deamidaciji, sta asparagin (N) in glutamin (E), pri čemer je asparagin reaktivnejši (19, 21).

Reakcija deamidacije, ki se lahko pojavlja tako *in vitro* kot *in vivo*, je odvisna od: i) primarne sekvence proteina (22), ii) lokalne dvo- in tridimenzionalne zgradbe proteina (1, 16, 23, 24), iii) vrednosti pH (1, 22, 23), iv) temperature (19), ter v) ionske jakosti in drugih lastnosti raztopine (16).

Reakcija deamidacije lahko vpliva na življenjsko dobo in stabilnost terapevtskih mAb. Njihovo biološko aktivnost namreč lahko zmanjša tudi za do 70%, zato je ugotavljanje njenega obsega pogosto v središču stabilnostnih študij, ki jih izvajajo tekom razvoja terapevtskih protiteles. Deamidacijo asparagina v molekulah protiteles navadno kvantificiramo z analizo na ravni peptidov. Danes lahko z metodami, kot sta masna spektrometrija in peptidno kartiranje, identificiramo in določimo deleže razgradnih produktov deamidacije, in sicer aspartata (D), izoaspartata (iD) in sukcinimida, pri čemer pa je zaradi majhne masne razlike med aspartatom in asparaginom (1 Da) ter običajno slabe ločljivosti modificiranih peptidov, to še vedno precejšen izziv (16).

Mehanizem deamidacije vključuje nukleofilni napad dušikovega atoma na karboksilni strani aminokislinskega ostanka na stranski verigi asparagina. Intermediat te reakcije je petčlenski sukcinimidni obroč. Ta je nato podvržen razmeroma hitri reakciji hidrolize, ki lahko poteče na

obeh straneh dušika v sukcinimidnem obroču, pri čemer lahko nastane eden od dveh možnih produktov, aspartat ali izoaspartat (Slika 3). Deamidacija pa lahko poteče tudi preko neposredne interakcije stranskih verig asparaginskih ostankov z molekulami vode, pri čemer nastane izključno aspartat (25, 26).



Slika 3: Reakcija deamidacije; povzeto po (16).

1.4.1.2.1 Deamidacija peptida PENNYK

Tipično terapevtsko mAb razreda IgG ima v svojem aminokislinskem zaporedju 25 asparaginov in s tem torej prav toliko potencialnih mest za kemijsko razgradnjo v obliki deamidacije. Raziskave so pokazale, da so med temi 25 le štirje aminokislinski motivi dovzetni za deamidacijo, in sicer SNG, ENN, LNG in LNN, saj med ostalimi deamidacije niso zaznali (16). Izmed štirih potencialnih mest za deamidacijo v tipičnem terapevtskem proteinu IgG se kar dve nahajata v peptidu z aminokislinskim zaporedjem **GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK** (ime je v literaturi ter v tej nalogi okrajšano na »PENNYK«), ki predstavlja razgradni produkt IgG po delovanju proteaz tripsina in lizil endopeptidaze (LysC). Kinetika deamidacije PENNYK je v tipični molekuli IgG1 hitrejša kot na ostalih deamidacijskih mestih, najverjetneje zato, ker se ta nahajajo na vmesni površini med molekulo protitelesa in topila, zato so lahko dostopna za interakcije z molekulami vode (16). Ohranjeno aminokislinsko zaporedje PENNYK se nahaja v področju CH3 na fragmentu Fc težke verige vseh človeških protiteles IgG, zato predstavlja reprezentativen peptid za ugotavljanje stabilnosti terapevtskih mAb (16, 19, 21).

1.5 ANALITIKA PTM

Za zagotavljanje stabilnosti in kvalitete v proizvodnji, terapevtska mAb že med samim razvojem izpostavimo različnim stresnim pogojem, s čimer ugotavljamo stabilnost učinkovine. Za določanje stabilnosti uporabljamo več različnih analiznih metod, s katerimi ugotavljamo prisotnost možnih nečistot in razgradnih produktov terapevtskih proteinov. Na ta način lahko zaznamo spremembe, s katerimi ovrednotimo stabilnost imunoglobulinskih molekul in tako preprečimo morebitne neželene učinke (1).

Za identifikacijo in karakterizacijo bioloških zdravil najpogosteje uporabljamo kromatografske separacijske metode, ki temeljijo na potovanju molekul vzorca v mobilni fazi skozi stacionarno fazo. Interakcije med analiti in stacionarno fazo bolj ali manj upočasnijo njihovo potovanje. Kolone so običajno napolnjene s stacionarno fazo, ki je z ustreznimi funkcionalnimi skupinami pritrjena na primeren matriks, mobilna faza pa teče skozi kolono pod visokim pritiskom. Glede na obliko mobilne faze ločimo tekočinsko in plinsko kromatografijo. V laboratorijskem in industrijskem merilu je najbolj razširjena tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), ki temelji na adsorpciji sestavin analiziranega vzorca na površino stacionarne faze (1, 27). V nadaljevanju se bomo posvetili reverzno-fazni tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti (RP-HPLC) in njeni podvrsti, peptidnemu kartiranju (PepMap), ki smo ga uporabljali tekom našega eksperimentalnega dela.

1.5.1.1 Reverzno-fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (RP-HPLC)

Reverzno-fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (RP-HPLC) izkorišča spremembe v hidrofobnosti, ki jih povzročajo modifikacije proteinov. Te lahko merimo bodisi na ravni celih proteinov ali pa na ravni nadzorovano razgrajenih peptidov (28). RP-HPLC je metoda, pri kateri je stacionarna faza manj polarna od mobilne. Stacionarna faza pri RP-HPLC je porozni organosiloksan, v katerem so silanolne skupine silikagelnih delcev zaetrene z organoklorosilani. Za mobilno fazo pa uporabljamo mešanico vode in organskega topila, največkrat acetonitrila. Sestavine vzorca se ločujejo na podlagi polarnosti, pri čemer se polarnije molekule zadržijo na koloni manj časa in se zato eluirajo prej, manj polarne pa se intenzivno porazdeljujejo med stacionarno fazo, zato je njihov retencijski čas daljši (1). Pri metodi RP-HPLC prevladuje gradientni način elucije, kar pomeni, da tekom analize povečujemo delež organskega topila v mobilni fazi in s tem spreminjamo njeno sestavo. Na ta način skrajšamo čas analize in omogočimo boljšo ločbo. Retencijski časi in ločba vrhov, ki jih dobimo pri RP-HPLC, so močno odvisni od sestave topila, zato lahko že majhna sprememba količine organskega modifikatorja, npr. trifluoroocetne kisline (TFA), ki ga navadno dodamo

mobilni fazi, povzroči izrazito spremembo v ločevanju sestavin vzorca. Pomemben dejavnik je tudi temperatura, pri kateri poteka ločba. Višja temperatura namreč poveča difuzijski koeficient in zmanjša ionske interakcije. Glavna prednost uporabe RP-HPLC v analitiki proteinov pa je ta, da je združljiva z masno spektrometrijo, s katero še dodatno izboljšamo ločbo in detekcijo proteinov na podlagi razmerja med maso in nabojem (m/z) (28).

1.5.1.2 Peptidno kartiranje

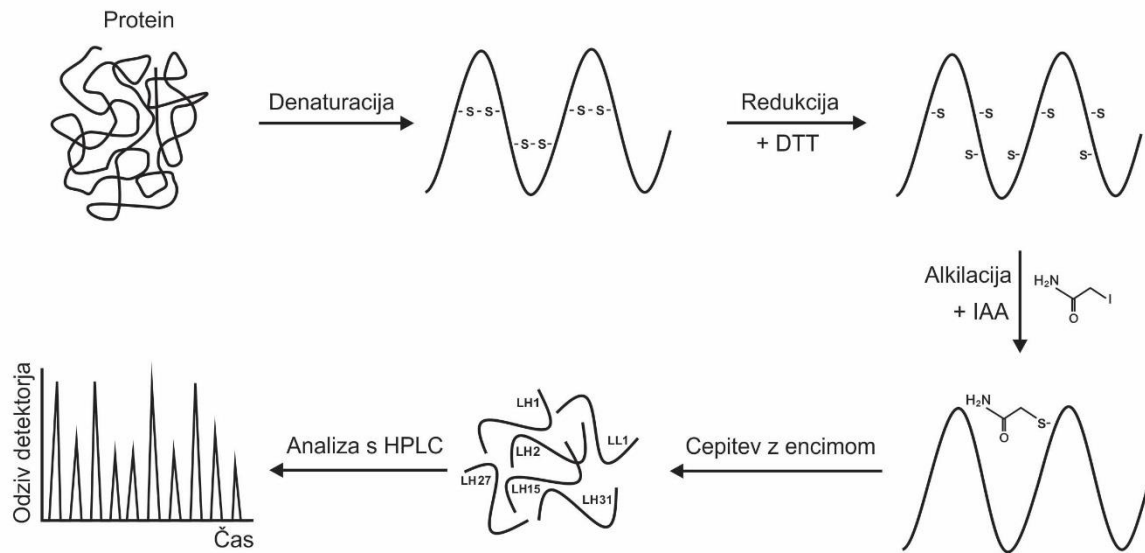
Peptidno kartiranje je podvrsta RP-HPLC, ki omogoča detekcijo in spremljanje posameznih posttranslacijskih modifikacij, kot sta deamidacija in oksidacija ter detekcijo ostalih razgradnih produktov oz. drugih sprememb v primarnih aminokislinskih zaporedjih mAb. Z izdelavo peptidne karte dobimo specifičen vzorec kromatografskih vrhov, ki je značilen za vsak protein, zato predstavlja neke vrste prstni odtis in ga zato lahko uporabimo za določanje identitete proteinov (1, 29).

Peptidno kartiranje temelji na nadzorovani encimski ali kemijski cepitvi peptidnih vezi v proteinu, s čimer dobimo krajše peptidne fragmente, ki jih nato analiziramo. Izbira cepitvenega reagenta določa uspešnost metode. Odvisna je od vrste analiziranega proteina in predstavlja pomemben korak v celotnem analiznem procesu (1, 29). Največkrat uporabljana encima, ki katalizirata hidrolizo peptidnih vezi na točno določenih mestih, sta lizil endopeptidaza (LysC) in tripsin. Oba sta iz družine serinskih peptidaz in specifično cepita polipeptidno verigo na C-koncu bazične aminokisliline lizin, tripsin pa dodatno specifično cepi peptidno vez tudi za argininom (29).

Priprava vzorcev je kompleksna in vključuje štiri glavne korake (Slika 4): denaturacijo, s katero dosežemo razvitje proteina; redukcijo, ki prekine disulfidne vezi; alkilacijo, s katero preprečimo nadaljne reakcije reduciranih cisteinov; ter selektivno cepitev peptidnih vezi z izbrano proteazo (30). Sledi kromatografska ločba dobljenih peptidnih fragmentov na osnovi RP-HPLC, pogosto v kombinaciji z masno spektrometrijo, ki nam omogoča analizo in asignacijo celotnega aminokislinskega zaporedja proteina. Peptidno kartiranje je primerjalna metoda, zato rezultate vedno primerjamo z rezultati referenčnega proteina. Vzorce in referenčni material vedno pripravimo in analiziramo v dvojniku (1, 29).

Kljub temu, da nam peptidno kartiranje omogoča detekcijo PTM, ima kar nekaj omejitev. Poleg že omenjene dolgotrajne in zahtevne priprave vzorcev moramo kromatografsko ločbo optimizirati za vsak protein posebej, pri čemer pa še vedno obstaja velika možnost ko-elucije posameznih peptidnih vrhov, ki so si med seboj podobni bodisi po strukturi bodisi po

hidrofobnosti. Zato pogosto potrebujemo dodatno identifikacijo in kvantifikacijo vrhov z masno spektrometrijo. Pri analizi s slednjo pa je še posebej problematična kvantifikacija deamidacije, saj se masi asparagina in produkta njegove deamidacije razlikujeta zgolj za 1 Da, kar za analitiko predstavlja še posebno zahteven izziv (31, 32).



Slika 4: Skica priprave vzorcev za peptidno kartiranje.

2 NAMEN DELA

V okviru razvojnega projekta izdelave podobnega biološkega zdravila iz družine monoklonskih protiteles podrazreda IgG1 je bila razvita metoda peptidnega kartiranja za določanje identitete tarčnega proteina. Metodo peptidnega kartiranja uporabljamo za določanje identitete primarnega aminokislinskega zaporedja mAb, za primerjalne in stabilnostne študije, ter za detekcijo produktov razgradnih reakcij, med katere spada tudi deamidacija.

Ker je bila izvedba referenčne metode peptidnega kartiranja časovno zamudna, poleg tega pa zaradi ko-elucije peptidov PENNYK (LH27) in »peptida C« ni bila primerna za določanje deamidacije v molekuli IgG1, smo si za cilj magistrskega dela postavili razvoj kratkotrajnejše kromatografske metode peptidnega kartiranja, s katero bi lahko kvantitativno določali relativne deleže deamidacije v terapevtskem mAb. Novo metodo bomo testirali tudi na drugih mAb podrazredov IgG1, IgG2 in IgG4, ter na fuzijskem protitelesu, z namenom njene platformske uporabe.

Tekom razvoja analizne metode bomo testirali različne parametre pri pripravi mobilnih faz ter instrumentalne nastavitve za določitev pogojev, s katerimi bomo dobili najboljšo ločbo vrhov peptidov LH27 in C. To nam bo omogočilo kvantitativno spremljanje deamidacije v terapevtskem mAb vrste IgG1. Preverili bomo tudi, ali je nova metoda ustrezna, dovolj robustna ter ali z njo lahko spremljamo kinetiko deamidacije.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Vse kemikalije analizne čistosti, ki mo jih uporabljali v eksperimentalnem delu naloge so navedene v preglednici II.

Preglednica II: Uporabljene kemikalije

| Kemikalija | Proizvajalec | Kataloška številka |
|---|---------------------|---------------------------|
| Ditiotreitol (DTT) | Sigma | D9163 |
| Jodacetamid (IAA) | Sigma | I1149 |
| 8 M gvanidin hidrokloridna raztopina | Sigma | G9284 |
| 1 M tris hidrokloridna raztopina pH 8,0 | Sigma | T2694 |
| 0,5 M raztopina EDTA | Sigma | E7889 |
| Acetonitril (ACN) | J. T. Baker | 8143 |
| Pentafluoropropionska kislina (PFPA), 97% | Sigma | 245917 |
| Trifluoroocetna kislina (TFA) | Merck | 1.8262 |
| Lizil endopeptidaza (LysC) | Wako | 125-05061 |
| Trinatrijev citrat dihidrat | Sigma | C3434 |
| 1 M klorovodikova kislina (HCl) | Merck | 1.09057 |
| Voda (Milli-Q) | | |

3.1.2 Voda

Za pripravo raztopin in pufrov smo uporabljali prečiščeno vodo Milli-Q, pridobljeno s sistemom Milli-Q Advantage (Millipore) za pripravo ultra čiste vode.

3.1.3 Pufri in raztopine

Preglednica III prikazuje sestave v eksperimentalnem delu uporabljenih raztopin. Vse topljence smo raztopili v vodi Milli-Q.

Preglednica III: Raztopine, uporabljene za pripravo vzorcev.

| Pripravljene raztopine | Sestava raztopin |
|---|---|
| Denaturacijska raztopina | 8,0 M raztopina gvanidin hidroklorida, 1 M raztopina tris hidroklorida s pH = 8,0; 0,5 M raztopina EDTA |
| Delovna raztopina (50 mM natrijev citrat) | Trinatrijev citrat dihidrat, 1 M HCl |
| 0,5 M raztopina DTT | |
| 1 M raztopina IAA | |
| Raztopina LysC (0,5 mg/mL) | |

3.1.4 Vzorci

Za pripravo vzorcev smo uporabili terapevtsko mAb vrste IgG1, v koncentraciji ≥ 30 mg/mL, pridobljeno iz celic jajčnika kitajskega hrčka, s pomočjo rekombinantne tehnologije DNA.

3.1.5 Referenčni peptidi

Za potrditev elucijskih časov variant LH27 in resolucije kolone smo uporabili sintetične peptide proizvajalca Bachem (Švica), ki so ustrezali nespremenjenemu peptidu LH27 (LH27), peptidu z deamidacijo na položaju 386 (LH27_N386D), poziciji 391 (LH27_N391D), ter z izoaspartatom na položaju 386 (LH27_iD).

Preglednica IV: Aminokislinska zaporedja in druge lastnosti uporabljenih referenčnih peptidov.

| Interna oznaka | Aminokislinsko zaporedje | Čistost | Vsebnost |
|-----------------------|---------------------------------|----------------|-----------------|
| LH27 | GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK | 95,3% | 88,0% |
| LH27_N386D | GFYPSDIAVEWESDGQPENNYK | 92,2% | 77,6% |
| LH27_N386iD | GFYPSDIAVEWESiDGQPENNYK | 98,3% | |
| LH27_N391D | GFYPSDIAVEWESNGQPEDNYK | 94,2% | |

3.2 OPREMA

3.2.1 Naprave in laboratorijski pribor

V Preglednici V smo navedli naprave, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu, Preglednica VI pa vsebuje podatke o uporabljenem laboratorijskem priboru.

Preglednica V: Seznam uporabljenih naprav.

| Naprava | Proizvajalec in tip |
|-------------------------------|--------------------------------|
| HPLC sistem | Agilent 1260 |
| Analitska tehnica | Mettler toledo |
| Termoblok z možnostjo mešanja | Eppendorf, Thermomixer Compact |
| Mešalna plošča | Tehtnica, Rotamix 545 MM |
| Centrifuga | Eppendorf 5415R |
| Vortex | Biosan Biovortex |
| pH meter | Metrohm 780 pH meter |

Preglednica VI: Seznam uporabljenega laboratorijskega pribora.

| Laboratorijski Pribor | Proizvajalec | Kataloška številka |
|---|------------------------|---|
| Polipropilenske centrifugirke (0,5 in 1,5 mL) | Eppendorf | 0030120.086, 003120.094 |
| Viale in pokrovčki za HPLC | Agilent | 9301-0978, 5184-3550, 5182-0721, 5182-0541 |
| Pipete in nastavki | Biohit eLINE | |
| Injekcijska brizga (1 mL) | Hamilton | 81365 |
| Epruvete (15 mL) | Corning | 430790 |
| Centrifugalni filtri 30 kDa (0,5 mL) | Amicon Ultra, Milipore | UFC5030BK |

3.2.2 Program za obdelavo podatkov

Kromatograme smo ovrednotili s programsko opremo Empower[®] 3 (Waters, ZDA).

3.3 EKSPERIMENTALNO DELO

3.3.1 Priprava denaturacijske raztopine

Denaturacijsko raztopino smo pripravili tako, da smo zmešali 6,0 mL 8 M raztopine gvanidin hidroklorida, 400 µL 1 M raztopine tris hidroklorida s pH = 8,0, 80 µL 0,5 M raztopine EDTA in 1.520 µL vode Milli-Q.

3.3.2 Priprava delovne raztopine natrijevega citrata

Delovno raztopino 50 mM natrijevega citrata smo pripravili tako, da smo v merilni bučki v približno 40 mL vode Milli-Q raztopili 735 mg trinatrijevega citrata dihidrata. Nato smo z dodajanjem 1 M HCl umerili vrednost pH raztopine na 7,0 in jo na koncu dopolnili do 50 mL z vodo Milli-Q.

3.3.3 Priprava 0,5 M raztopine ditiotreitola (DTT)

Raztopino reducenta smo pripravili tako, da smo zatehtano količino DTT raztopili v ustrezni količini vode Milli-Q, ki smo jo izračunali z naslednjo enačbo:

Enačba 1: Enačba za izračun volumna vode Milli-Q, v kateri smo raztopili zatehtano količino DTT.

$$\text{volumen vode Milli-Q [mL]} = \frac{\text{DTT [mg]} * 1.000}{500 \text{ mM} * 154,22 \text{ mg/mmol}}$$

3.3.4 Priprava 1 M raztopine jodacetamida (IAA)

Raztopino alkilanta smo pripravili tako, da smo zatehtano količino IAA raztopili v ustrezni količini vode Milli-Q, ki smo jo izračunali z naslednjo enačbo:

Enačba 2: Enačba za izračun volumna Milli-Q vode, v kateri smo raztopili zatehtano količino IAA

$$\text{volumen vode Milli-Q [mL]} = \frac{\text{IAA [mg]} * 1.000}{1.000 \text{ mM} * 184,96 \text{ mg/mmol}}$$

3.3.5 Priprava vzorcev

Vzorci smo pripravili tako kot za referenčno metodo peptidnega kartiranja in postopka tekom razvoja metode nismo spreminjali. Postopek njihove priprave je potekal v naslednjih štirih korakih: denaturacija, redukcija, alkilacija in cepitve peptidnih vezi z encimom.

Najprej smo 480 µg proteina (16 µL raztopine terapevtskega mAb IgG1 s koncentracijo 30 mg/mL) dodali v 150 µL denaturacijske raztopine v 1,5 mL polipropilenski centrifugirki. Mešanici smo nato dodali 5 µL 0,5 M raztopine DTT, vsebino vorteksirali in centrifugirali. Vzorec smo 15 minut inkubirali v termomikserju na 37 °C in pri 350 rpm, ga vzeli iz termomikserja in ohladili na sobno temperaturo (približno 5 min).

Dodali smo mu 5 µL 1 M raztopine IAA ter ga vorteksirali in centrifugirali. V nadaljevanju smo ga 1 uro inkubirali v termomikserju, pokritem z aluminijasto folijo, da smo vzorec zaščitili pred svetlobo, in sicer na 25 °C in pri 350 rpm.

Po inkubaciji smo vzorcu dodali 740 μL delovne raztopine 50 mM natrijevega citrata ter ga vorteksirali in centrifugirali. Nato smo 460 μL te reakcijske mešanice odpipetirali v novo 1,5 ml polipropilensko centrifugirko in ji dodali 10 μL raztopine encima LysC (0,5 mg/ml). Vzorec smo ponovno vorteksirali, ga centrifugirali in 1 uro inkubirali v termomikserju na 37 °C in pri 350 rpm. Po končani inkubaciji smo v reakcijsko mešanico ponovno dodali 10 μL raztopine LysC (0,5 mg/ml), jo vorteksirali, centrifugirali ter tokrat 3 ure inkubirali v termomikserju, na 37 °C in pri 350 rpm. Nato smo reakcijo ustavili z dodatkom 2,5 μL TFA, vzorec vorteksirali in ga po 3 min centrifugiranja na 12.000 rpm odpipetirali v vialo za HPLC.

3.3.6 Priprava slepega vzorca

Slepi vzorec smo pripravili enako kot vzorce (poglavje 3.3.5), le da smo v tem primeru namesto raztopine mAb v reakcijsko mešanico odpipetirali enak volumen (16 μL) vode Milli-Q.

3.3.7 Priprava raztopine encima LysC

V vsako vialo s po 20 μg liofiliziranega encima LysC smo dodali 40 μl vode Milli-Q tako, da smo z njo omočili dno in stene vial ter na ta način zagotovili, da se je raztopila celotna vsebina. V primerih, ko smo analizirali več vzorcev, smo uporabili več vial z LysC. Potrebno skupno količino vode Milli-Q smo najprej dodali v prvo vialo, raztopili vsebino, nato pa raztopino prenesli v naslednjo vialo. Postopek smo ponavljali vse dokler nismo raztopili vsebine zadnje vialo.

3.3.8 Priprava raztopin referenčnih peptidov

Liofilizirane referenčne peptide (LH27, LH27_386iD, LH27_N386 in LH27_N391) smo raztopili v vodi Milli-Q do koncentracije 1 mg/ml, pri čemer smo upoštevali čistost in vsebnost vsakega od njih. Vsakega od peptidov (≤ 5 mg) smo v originalni embalaži raztopili do primerne koncentracije (npr. 5 mg/mL), nato pa jih razredčili do koncentracije 1 mg/mL. Primer: peptidu (5 mg) s čistoto 96,5% in vsebnostjo 93,7% smo najprej dodali 904 μL vode Milli-Q, nato pa 200 μL raztopine s koncentracijo 5 mg peptida/mL razredčili do koncentracije 1 mg/mL tako, da smo ji dodali 800 μL vode Milli-Q; na koncu smo k 100 μL raztopine peptida s koncentracijo 1 mg/mL dodali 900 μl vode Milli-Q, da smo dobili koncentracijo 0,1 mg/mL. Raztopine peptidov smo alikvotirali in hranili na -20 °C.

3.3.9 Priprava mobilnih faz

Za izvedbo referenčne metode peptidnega kartiranja, iz katere smo izhajali, smo uporabili naslednji mobilni fazi:

3.3.9.1 Mobilna faza A (MFA): 0,08% raztopina TFA v vodi Milli-Q

V stekleni bučki smo odmerili 1.000 mL vode Milli-Q in jo prenesli v 1.000 mL steklenico. S stekleno injekcijsko brizgo smo ji dodali 800 μ L TFA ter tako dobljeno mobilno fazo v zaprti steklenici temeljito premešali na mešalni plošči.

3.3.9.2 Mobilna faza B (MFB): 0,075% raztopina TFA v ACN

V stekleni bučki smo odmerili 1.000 mL vode Milli-Q in jo prenesli v 1.000 mL steklenico. S stekleno injekcijsko brizgo smo ji dodali 750 μ L TFA ter mobilno fazo v zaprti steklenici temeljito premešali na mešalni plošči.

Za izvedbo kromatografske metode za določanje deamidacije pa smo pripravili naslednji mobilni fazi:

3.3.9.3 Mobilna faza A (MFA): 0,1% raztopina PFPA v vodi Milli-Q

V stekleni bučki smo odmerili 1.000 mL vode Milli-Q in jo prenesli v 1.000 mL steklenico. S stekleno injekcijsko brizgo smo ji dodali 1.000 μ L PFPA ter mobilno fazo v zaprti steklenici temeljito premešali na mešalni plošči.

3.3.9.4 Mobilna faza B (MFB): 0,1% raztopina PFPA v ACN

V stekleni bučki smo odmerili 1.000 mL ACN in vsebino prenesli v 1.000 mL steklenico. S stekleno injekcijsko brizgo smo ji dodali 1.000 μ L PFPA ter mobilno fazo v zaprti steklenici temeljito premešali na mešalni plošči.

3.3.10 Kromatografski pogoji

Peptide smo kromatografsko ločili na koloni Kinetex XB-C18; 2,1 x 150 mm, 2,6 μ m, proizvajalca Phenomenex (ZDA). Uporabili smo mobilne faze, pripravo katerih smo opisali v prejšnjem podpoglavju (3.3.9). Uporabljeni gradienti in detekcije kromatografskih vrhov so opisani v nadaljevanju. Temperatura avtomatskega vzorčevalnika je bila 4 – 8 $^{\circ}$ C, pretok skozi kolono 0,4 mL/min, volumen injiciranja vzorcev pa 50 μ L. Uporabili smo UV detekcijsko celico s standardnim pretokom in dolžino poti 10 mm ter 14 μ L zanko.

3.3.11 Izmenjava pufru v delovno raztopino

Za vzorce terapevtskega mAb IgG1, ki smo jih uporabili za študij kinetike deamidacije (podpoglavje 4.3.1) smo izvedli izmenjavo pufru v delovno 50 mM raztopino Tris-HCl s pH = 8,0 (proteinske vzorce smo pred tem hranili v pufru s pH = 6,0). Najprej smo centrifugalne filtre (30 kDa) omočili tako, da smo vanje odpipetirali po 500 μ L vode Milli-Q in jih centrifugirali 5 min pri 14.000 rpm. Nato smo jih obrnili na glavo in iz njih odstranili

preostalo tekočino z 2- minutnim centrifugiranjem pri 2.000 rpm. V omočene centrifugalne filtre smo odpipetirali po 500 μ L 50 mM delovne raztopine Tris-HCl s pH = 8,0 in ji dodali po 528 μ g proteinskih vzorcev. Filtre smo ponovno centrifugirali pri 14.000 rpm, in sicer tokrat 15 minut, nato pa vanje ponovno odpipetirali po 500 μ L 50 mM delovne raztopine Tris-HCl s pH = 8,0. Ta postopek smo ponovili trikrat. Po tretjem centrifugiranju smo filtre obrnili na glavo in, jih 2 minuti centrifugirali pri 2.000 rpm. Tako smo dobili retentate vseh vzorcev, katerih volumni so bili približno 30 μ L.

3.3.12 Relativna kvantifikacija deamidacije modificiranih peptidov LH27

Relativne količine modificiranih peptidov LH27 smo izračunali v obliki razmerja med površinami posameznih vrhov, ki so ustrezali deamidiranim peptidnim variantam in vsoto površin vrhov, ki so ustrezali modificiranim in nemodificiranim peptidom LH27. Za določitev relativnih količin spremenjenih peptidov LH27 smo uporabili naslednjo enačbo:

Enačba 3: Izračun relativnega obsega deamidacije.

% modificiranega peptida LH27

$$= \frac{\textit{površina vrha modificiranega peptida}}{\textit{površina vrha nativnega peptida} + \Sigma \textit{površin vrhov vseh modificiranih peptidov}} * 100\%$$

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 RAZVOJ METODE

4.1.1 Sprememba organskega modifikatorja v mobilnih fazah

Pri razvoju kromatografske metode za določanje deamidacije v molekulah terapevtskega mAb smo izhajali iz referenčne metode peptidnega kartiranja za določanje identitete proteina. Pri tem smo uporabili mobilni fazi MFA in MFB, z dodatkom TFA kot organskega modifikatorja. Pripravi obeh mobilnih faz sta opisani v podpoglavjih 3.3.9.1 in 3.3.9.2. Ker je bila obstoječa kromatografska metoda časovno zamudna in z njo ni bilo mogoče ločiti vrhov, ki pripadata peptidoma LH27 in »peptidu C«, na ta način nismo mogli določiti obsega deamidacije v analiziranem proteinu (Slika 6a).

Pred pričetkom magistrskega dela so bile že opravljene določene aktivnosti povezane z razvojem nove metode, in sicer testiranje temperature, naklona gradienta ter koncentracij TFA v mobilnih fazah, pri čemer pa ni bilo bistvenih izboljšav v ločbi LH27/peptid C. Ker literaturni podatki navajajo, da lahko ločbo, širino in retencijske čase vrhov izboljšamo oz. prilagodimo s spremembo organskega modifikatorja v mobilnih fazah, ki določi pH topila in omogoči interakcije z analiti, smo naše poskuse začeli s testiranjem alternativnih modifikatorjev (28, 33). Peptidi vsebujejo ionizirajoče skupine na stranskih verigah aminokislin ter na svojih N- in C-terminalnih koncih. Mednje sodijo bazične skupine na stranskih verigah lizina, arginina in histidina, ter kisle skupine na stranskih verigah glutamina, aspartata in cisteina. Na naboj stranske verige vplivajo njena vrednost pKa, pH raztopine in njeno okolje. Za analizo proteinov so zelo pomembne tudi njihove izoelektrične točke. Izoelektrična točka je vrednost pH, pri kateri je celokupni naboj proteina enak nič. Pod to točko je naboj proteina pozitiven, nad njo pa negativen. V izoelektrični točki so medmolekulske odbojne sile najmanjše, prevladujejo privlačne hidrofobne interakcije, topnost proteina pa je v teh pogojih minimalna (27, 28, 33).

Fekete in Shibue navajata, da se za analizo peptidov in proteinov kot organski modifikator v mobilnih fazah običajno uporablja TFA, in sicer v koncentracijah od 0,05 do 0,1%, kar zagotavlja boljšo solubilizacijo (povečano topnost in hitrost raztapljanja) analitov ter zavira širjenje in popačenje kromatografskih vrhov (*angl.* peak tailing) (28, 33). Še boljši učinek pa lahko dosežemo z negativno nabitimi pentafluoropropanoati ($PFPA^-$), ki so zaradi dodatne difluorometilenske funkcionalne skupine bolj hidrofobni kot TFA, poleg tega pa nevtralizirajo

pozitivno nabite stranske skupine in zmanjšajo hidrofilnost peptidov ter tako povečajo njihovo afiniteto za hidrofobne stacionarne faze RP-HPLC (33).



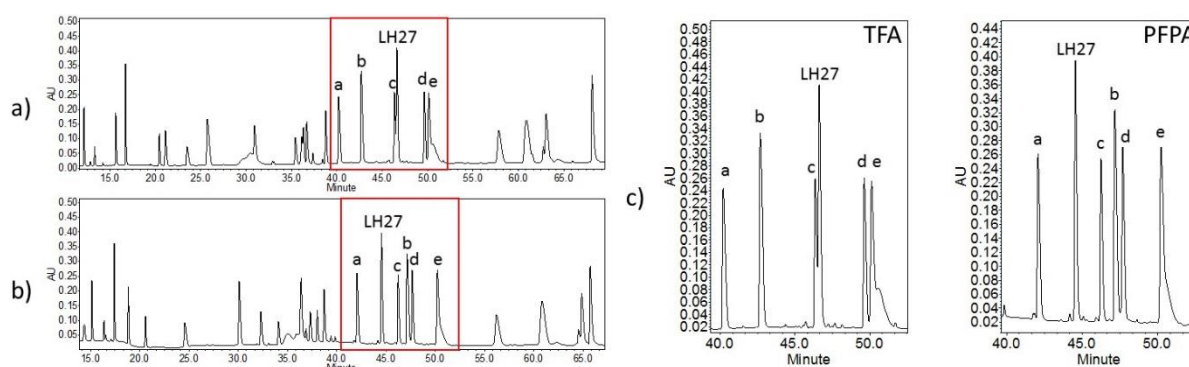
Slika 5: Primerjava kemijskih struktur a) TFA in b) PFPA.

Za osnovno primerjavo organskih modifikatorjev mobilnih faz, TFA in PFPA, smo preskusili kromatografsko metodo, ki je bila enaka referenčni. Njen gradient je prikazan v Preglednici VII. PFPA smo uporabili v koncentraciji 0,1%, ki jo navajata Fekete in Shibue (28, 33). Pripravi obeh mobilnih faz z dodatkom 0,1% PFPA pa smo opisali v podpoglavjih 3.3.9.3 in 3.3.9.4.

Preglednica VII: Gradient referenčne metode peptidnega kartiranja.

| Čas (min) | 0 | 2 | 15 | 21 | 47 | 52 | 68 | 69 | 74 | 75 | 85 |
|-----------|---|---|----|----|----|----|----|----|-----|-----|----|
| % MFB | 2 | 2 | 16 | 16 | 28 | 28 | 34 | 34 | 100 | 100 | 2 |

S PFPA kot organskim modifikatorjem smo izboljšali ločbo tekom celotnega kromatograma, predvsem pa v elucijskem oknu peptidov LH27 in C (Slika 6c). Obenem pa smo opazili tudi negativen vpliv PFPA na bazno linijo, kar je poslabšalo občutljivost metode. Sklepali smo, da je to posledica absorpcije PFPA pri 206 nm.



Slika 6: Primerjava kromatografskih ločb peptidnih fragmentov v prisotnosti TFA in PFPA: a) kromatografija s TFA, b) kromatografija s PFPA in c) povečana dela, z rdečima pravokotnikoma zamejenih kromatogramov a) (TFA) in b) (PFPA).

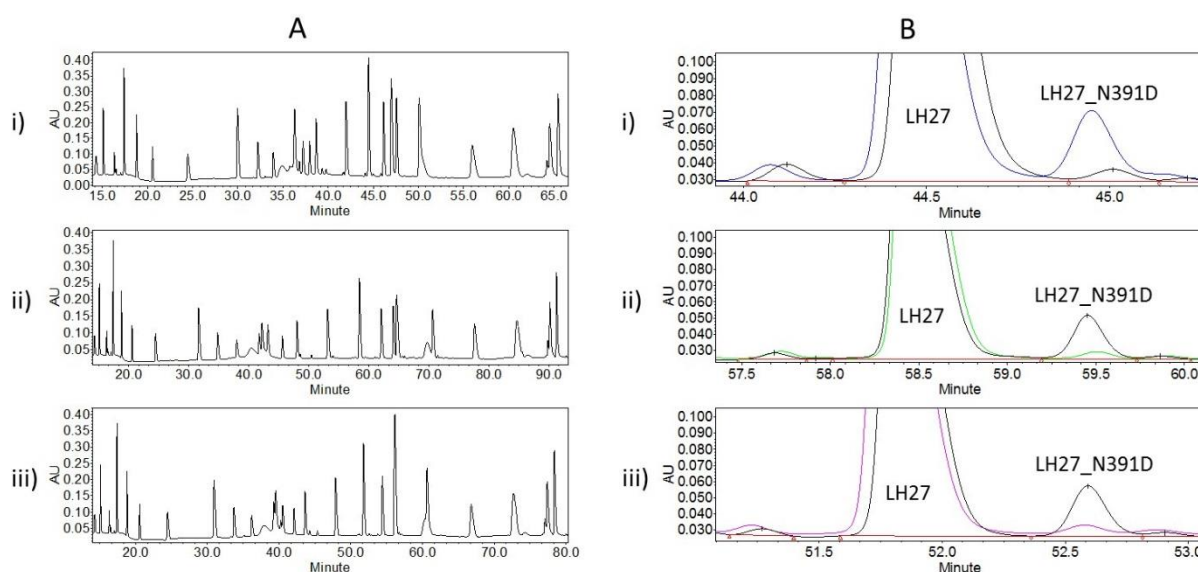
4.1.2 Optimizacija gradienta mobilne faze s PFPA

Ker smo s 85 minutno metodo že dosegli izboljšanje ločbe LH27/peptid C, smo nadaljevali z nadaljnjo optimizacijo gradienta, s katero bi omogočili ločbo vseh vrhov v okolici LH27, do

bazne linije. Iz izhodiščnega gradienta (85-minutni), ki je imel v elucijskem oknu LH27 naklon 0.46% MFB/min, smo razvili dva položnejša gradienta: i) 111-minutnega, z naklonom 0.23% MFB/min, ki je bil 2x položnejši od izhodiščnega, in ii) 98-minutnega z naklonom 0.31% MFB/min, 1.5x položnejšega od izhodiščnega (Preglednica VIII). Za boljšo primerjavo gradientov in določanje retencijskih časov peptida LH27 ter njegovih deamidiranih variant smo preiskovani vzorec primerjali z tistim, ki smo mu dodali 0,1 mg/mL referenčnega sintetičnega peptida LH27_N391D. Rezultate prikazuje Slika 7.

Preglednica VIII: Elucijski gradienti 85-, 111- in 98-minutne metode.

| | | | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------|---|---|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| 85 min | Čas (min) | 0 | 2 | 15 | 21 | 47 | 52 | 68 | 69 | 74 | 75 | 85 |
| | % MFB | 2 | 2 | 16 | 16 | 28 | 28 | 34 | 100 | 100 | 2 | 2 |
| 111 min | Čas (min) | 0 | 2 | 15 | 21 | 73 | 78 | 94 | 95 | 100 | 101 | 111 |
| | % MFB | 2 | 2 | 16 | 16 | 28 | 28 | 34 | 100 | 100 | 2 | 2 |
| 98 min | Čas (min) | 0 | 2 | 15 | 21 | 60 | 65 | 81 | 82 | 87 | 88 | 98 |
| | % MFB | 2 | 2 | 16 | 16 | 28 | 28 | 34 | 100 | 100 | 2 | 2 |

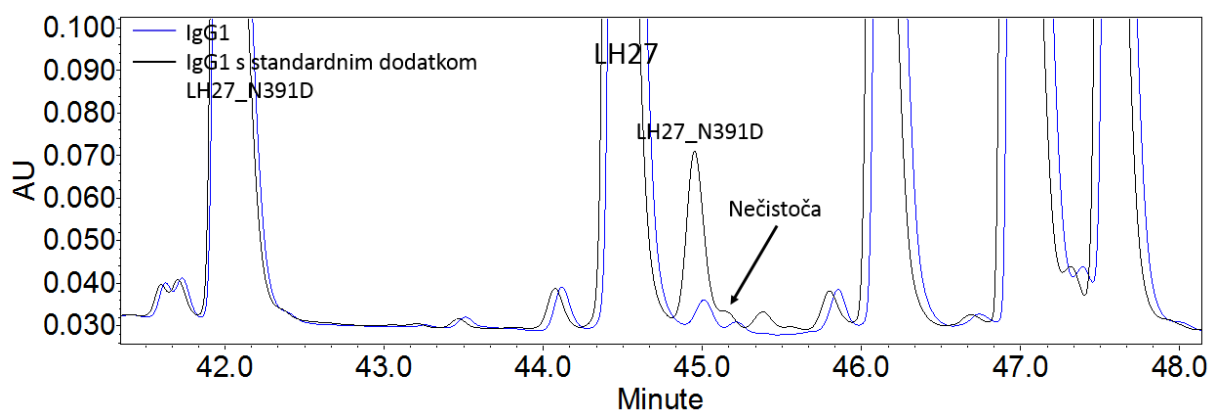


Slika 7: A: ločbe vzorcev mAb IgG1 z i) 85-minutno, ii) 111-minutno in iii) 98-minutno metodo. B: povečava elucijskih oken peptida LH27 ter primerjava meritev vzorca IgG1 in vzorca IgG1z dodanim referenčnim sintetičnim peptidom LH27_N391D, izvedenih z i) 85-minutno, ii) 111-minutno in iii) 98-minutno metodo.

Z vsemi tremi metodami smo uspeli ločiti vrhova peptidov LH27 ter C, in to s primerljivimi deleži površin za vrh LH27_N391D (RSD < 5%) (Preglednica IX). Pri vseh treh metodah pa smo opazili nestabilno bazno linijo.

| | Relativna površina vrha LH27_N391D v vzorcu mAb IgG1, z dodatkom sintetičnega peptida LH27_N391D | Relativna površina LH27_N391D v vzorcu mAb IgG1 |
|------------------|---|---|
| 85 min | 10,9 | 0,8 |
| 111 min | 11,7 | 0,9 |
| 98 min | 11,6 | 0,9 |
| Povprečje | 11,4 | 0,9 |
| STDEV | 0,45 | 0,04 |
| RSD (%) | 3,9 | 4,0 |

Med podrobnejšo primerjavo kromatogramov vzorca IgG1 in kromatogramov vzorca IgG1 z dodatkom sintetičnega peptida LH27_N391D, smo pri 85-minutni metodi opazili, da se je v bližini vrha LH27_N391D eluirala nečistota, ki bi lahko potencialno vplivala na določanje obsega deamidacije (Slika 8), poleg tega pa je bila resolucija vrhov LH27/LH27_N391D pri tej metodi najnižja (Preglednica X).

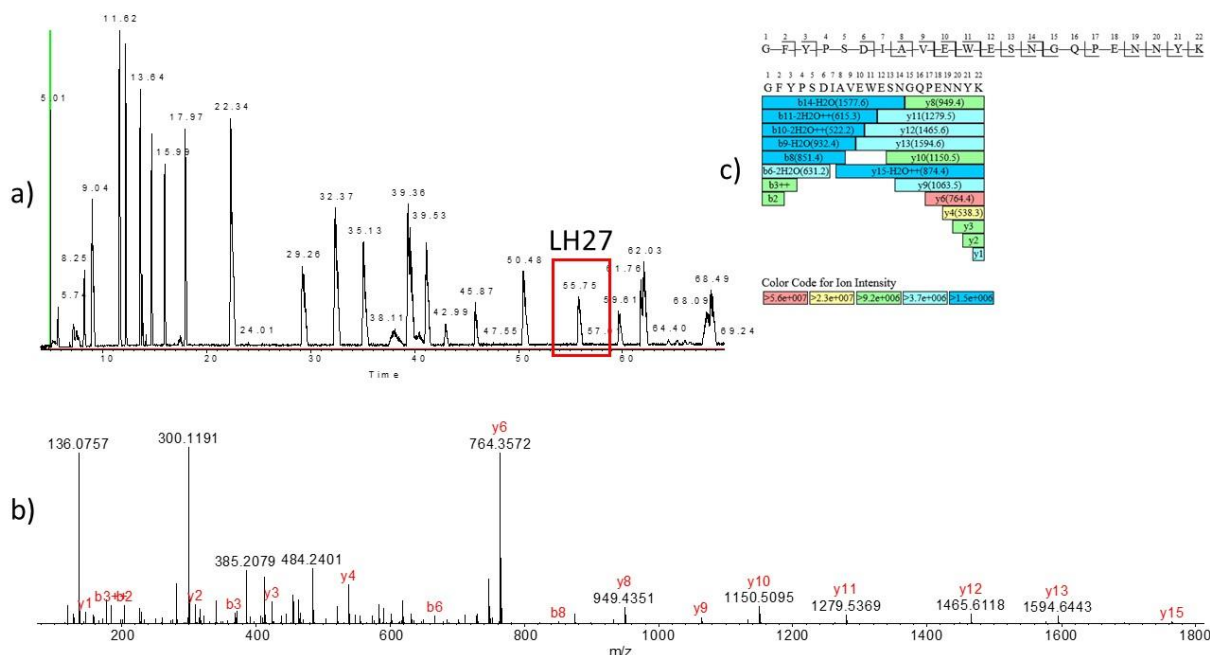


Slika 8: Nečistota, ki smo jo opazili v kromatogramu, dobljenem s 85-minutno metodo.

Ugotovili smo, da smo s položnim gradientom 111-minutne metode dosegli najboljšo kromatografsko ločbo tako peptidov LH27 in LH27_N391D (Preglednica X) kot tudi peptida LH27 in sosednje nečistote, zato smo ta gradient izbrali za nadaljevanje optimizacije.

| Metoda | 85 min | 111 min | 98 min |
|----------------------------|--------|---------|--------|
| Resolucija LH27_N391D/LH27 | 2,1 | 2,7 | 2,5 |

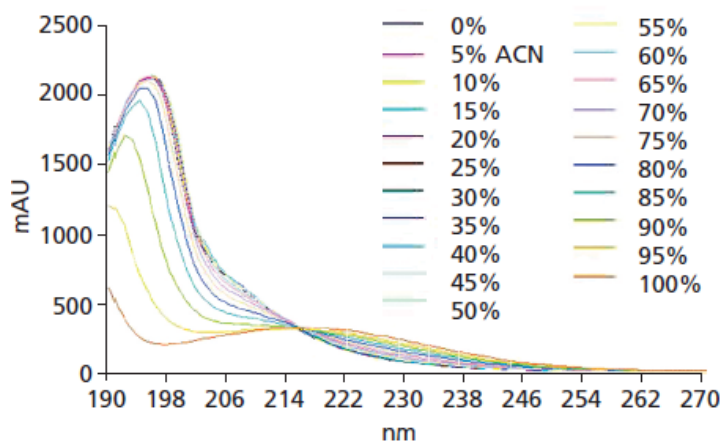
Na tej točki razvoja metode smo identiteto vrha LH27, ločenega s 111-minutno metodo, potrdili z masno spektrometrijo (Slika 9).



Slika 9: LC-MS/MS potrditev identitete peptida LH27, ločenega s 111-minutno metodo: a) TIC kromatogram, retencijski čas LH27 označen z rdečim kvadratom (RT = 55,75 min); b) MS/MS spekter vrha pri RT 55,75 min; c) pokritost sekvence LH27 z MS/MS spektrom za vrh pri RT 55,75 min.

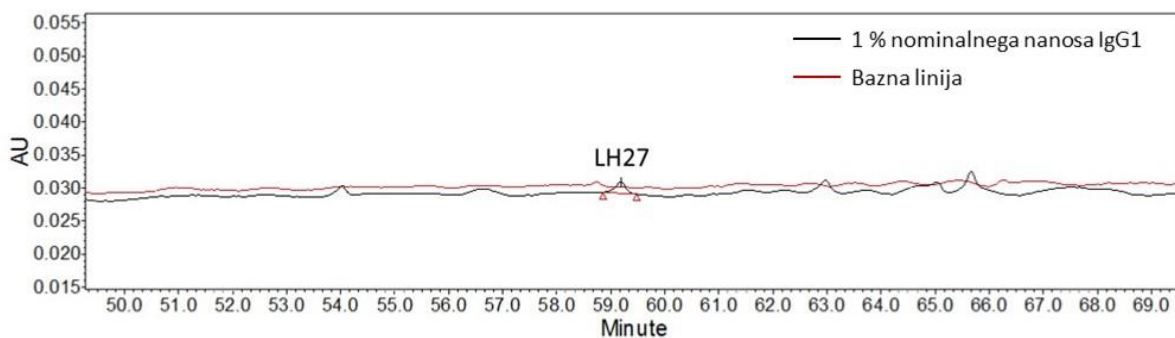
4.1.3 Optimizacija detekcije

Detekcijska valovna dolžina, ki jo uporabljamo pri peptidnem kartiranju je običajno nastavljena v območju nizke UV valovne dolžine. Navadno je to okrog 210 nm, saj peptidne vezi ter aminokislinski ostanki nimajo močne UV absorpcije pri valovnih dolžinah nad 230 nm. Vendar pa moramo upoštevati, da imata pri 210 nm oba organska modifikatorja (TFA, PFPA), prisotna v mobilnih fazah, močan UV absorpcijski pas (Slika 10). To lahko privede do nihanj bazne linije, kar ima za posledico interference z analiznimi meritvami visoke občutljivosti (34).



Slika 10: Absorpcijski spekter TFA; povzeto po (34).

Pri izhodiščni metodi peptidnega kartiranja smo uporabljali detekcijsko valovno dolžino 206 nm, pri kateri absorbirajo peptidne vezi. Po zamenjavi organskega modifikatorja v mobilnih fazah smo z detekcijo najprej poskusili pri izhodiščni valovni dolžini (206 nm). Testirali smo občutljivost metode detekcije pri 1% nominalnem nanosu (injicirali smo 5 µL 10x redčenega vzorca). Ugotovili smo, da je bila v tem primeru, zaradi visokega šuma v bazni liniji, limita kvantifikacije (LOQ) $s/n > 10$ (Slika 11 in Preglednica XI).



Slika 11: Kromatogram, ki prikazuje primerjavo bazne linije z meritvijo redčitve na 1% nominalnega nanosa.

Preglednica XI: Površina vrhov LH27 pri 1% in 100% nominalnem nanosu.

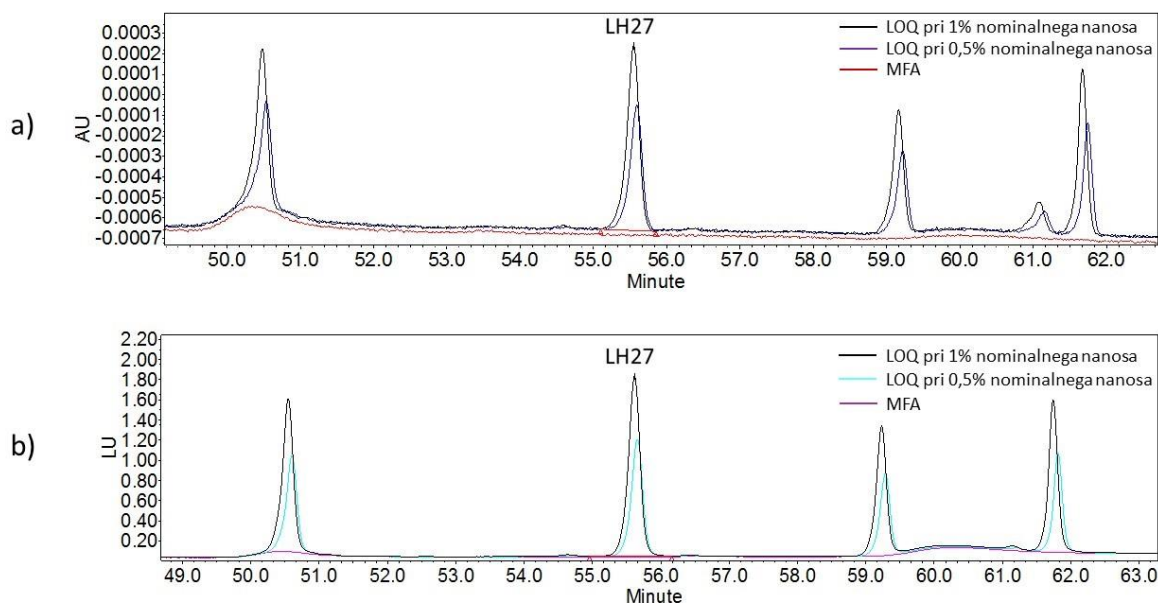
| Nominalni nanos (%) | Površina vrha LH27 | |
|---------------------|--------------------|-------|
| | (uV*sec) | s/n |
| 1 | 23.404 | 10,1 |
| 100 | 3.745.368 | 992,0 |

Da bi zmanjšali absorpcijo PFPA, smo preizkusili: i) detekcijsko valovno dolžino 280 nm in ii) fluorescenčno detekcijo (FLD). V obeh primerih namreč absorbirajo le aminokislinski ostanki z aromatskimi funkcionalnimi skupinami, PFPA pa ne. V peptidu LH27 so prisotne vse tri vrste aromatskih aminokislin, in sicer 1 fenilalanin (F), 1 triptofan (W) in 2 tirozina (Y). Do pojava fluorescence pride, ko molekule absorbirajo svetlobo pri določeni valovni dolžini, kar jih vzbudi v višje energijsko stanje (ekscitacija), ob prehodu nazaj v nižje energetske stanje (relaksacija) pa sprostijo absorbirano energijo v obliki elektromagnetnega valovanja pri višji valovni dolžini (35). Najmočnejša je fluorescenca triptofana, ki absorbira z maksimumom pri 280 nm in emitira z maksimumom pri 300-350 nm, zato smo za fluorescenčno detekcijo uporabili ekscitacijsko valovno dolžino 280 nm ter emisijsko valovno dolžino 348 nm (36).

Občutljivost naše kromatografske metode smo primerjali z uporabo obeh načinov detekcije. Bistveno višjo intenziteto signala smo dosegli s fluorescenčno detekcijo (Slika 12 in Preglednica XII). Vrednosti s/n so bile pri uporabi detektorja FLD 10x višje v primerjavi z UV detekcijo pri 280 nm, kar torej pomeni 10x večjo občutljivost. Glede na izhodiščno metodo smo občutljivost našega analiznega testa z omenjenimi optimizacijami zvišali za približno 100x.

Preglednica XII: Primerjava občutljivosti kromatografske metode pri uporabi dveh vrst detekcije.

| Nominalni nanos (%) | Površina vrhov LH27 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$) | | s/n | |
|---------------------|---|------------|-----------|---------|
| | UV 280 nm | FLD | UV 280 nm | FLD |
| 0,5 | 7.125 | 14.331.833 | 76,5 | 821,7 |
| 1 | 10.697 | 22.414.947 | 113,1 | 1.333,7 |



Slika 12: Kromatograma, ki prikazujeta rezultate obeh vrst detekcije: a) UV 280 nm in b) FLD.

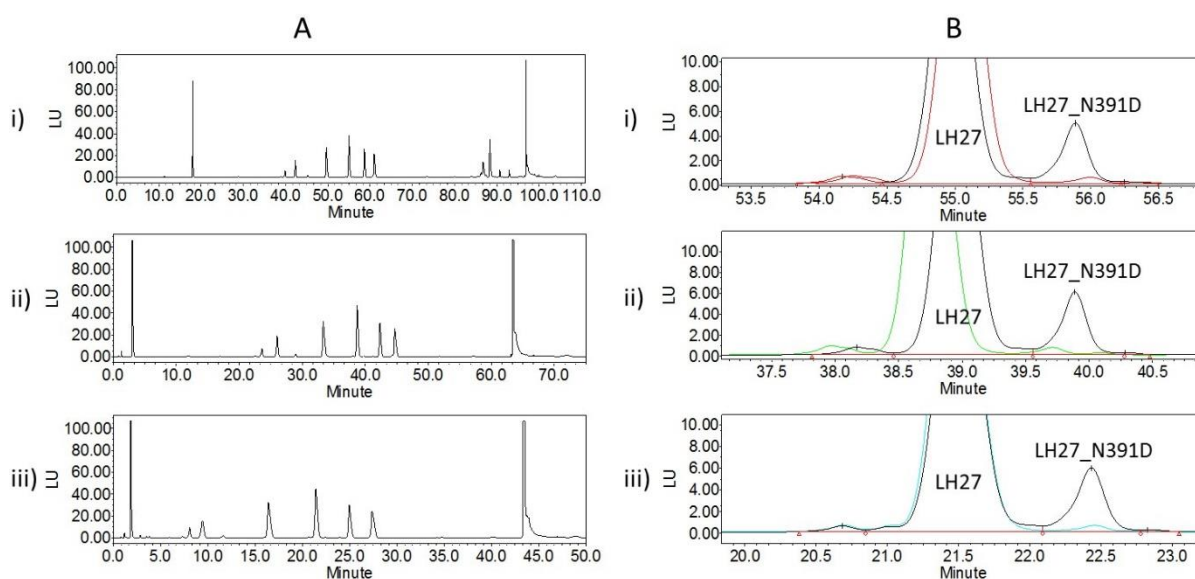
4.1.4 Optimizacija gradienta za skrajšanje časa metode

Kromatografsko metodo smo razvijali in optimizirali tako, da bi z njo lahko zanesljivo zaznali in kvantificirali deamidacijo peptida LH27, kar nam je uspelo v času 111 minut. Ker pa je to glede na potrebe predolgo, je bil naš naslednji cilj skrajšanje trajanja analize na najkrajši možni čas, ki bi nam še omogočal dobro ločbo LH27 od ostalih peptidov. Zato smo, izhajajoč iz 111-minutne metode, izpeljali krajše gradiente tako, da smo ocenili elucijsko okno LH27, glede na % MFB in v testiranih različicah metode elucijo začeli pri višjem % MFB, nato pa po eluciji analita zvišali % MFB, do pogoja čiščenja kolone.

Z analizo kromatograma 111-minutne metode smo ugotovili, da se je peptid LH27 eluiral med 22 - 26% MFB (Slika 13). V prvem krogu optimizacije metode smo zato testirali 75-minutno metodo, z začetno koncentracijo 16% MFB, končno koncentracijo 28% MFB in z naklonom izhodiščne metode (0,23% MFB/min). Hkrati smo testirali tudi 50-minutno metodo, z začetno koncentracijo 20% MFB, končno koncentracijo 28% MFB in z enakim naklonom. Gradienti MFB preizkušenih metod so prikazani v Preglednici XIII. Vsa testiranja smo izvedli z vzorci mAb IgG1, in sicer z in brez standardnih dodatkov sintetičnega peptida LH27_N391D.

Preglednica XIII: Elucijski gradienti za 111-, 75- in 50- minutno metodo.

| | | | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------|----|----|----|----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| 111 min | Čas (min) | 0 | 2 | 15 | 21 | 73 | 78 | 94 | 95 | 100 | 101 | 111 |
| | % MFB | 2 | 2 | 16 | 16 | 28 | 28 | 34 | 100 | 100 | 2 | 2 |
| 75 min | Čas (min) | 0 | 5 | 57 | 60 | 62 | 67 | 70 | 75 | | | |
| | % MFB | 16 | 16 | 28 | 28 | 100 | 100 | 16 | 16 | | | |
| 50 min | Čas (min) | 0 | 5 | 39 | 42 | 45 | 46 | 50 | | | | |
| | % MFB | 20 | 20 | 28 | 98 | 98 | 20 | 20 | | | | |



Slika 13: A: kromatogrami vzorcev, analiziranih z i) 111-minutno, ii) 75-minutno in iii) 50-minutno metodo. B: povečava elucijskih oken peptida LH27 in primerjave ločb vzorcev brez in z dodatkom sintetičnega peptida LH27_N391D: i) 111-minutna, ii) 75-minutna in iii) 50-minutna metoda.

Z vsemi tremi primerjanimi metodami smo dobili zelo podobne kromatografske profile in rezultate, kar smo, zaradi uporabe enakih naklonov tudi pričakovali. Zaradi boljše ločenega predvrha s 75-minutno in 111-minutno, v primerjavi s 50-minutno kromatografsko metodo, kjer je bil ta zlit z vrhom LH27, smo s slednjo v kontrolnem vzorcu določili za 0,1% nižje relativne površine vrha LH27_N391D kot s 75- in 111-minutno kromatografsko metodo. Pri vseh treh primerjanih metodah se je vrh peptida LH27 eluiral med 22 in 26% MFB.

Preglednica XIV: Relativne površine vrhov peptida LH27_N391D in resolucije vrhov LH27/LH27_N391D, določene pri 50-, 75- in 111-minutni metodi.

| | Relativna površina vrha LH27_N391D | Resolucija LH27/LH27_N391D |
|----------------|---------------------------------------|----------------------------|
| 50 min | 1,2 | 2,4 |
| 75 min | 1,3 | 1,4 |
| 111 min | 1,3 | 2,4 |

Vrednosti s/n pri 0,2% nominalnega nanosa so bile za vse tri metode primerljive. Najvišjo vrednost s/n (266) pa smo, zaradi najbolj ravne bazne linije v elucijskem oknu LH27, zabeležili pri 75-minutni metodi (Preglednica XV).

Preglednica XV: Vrednosti s/n pri 0,2% nominalnem nanosu vzorcev za 50-, 75- in 111-minutno metodo.

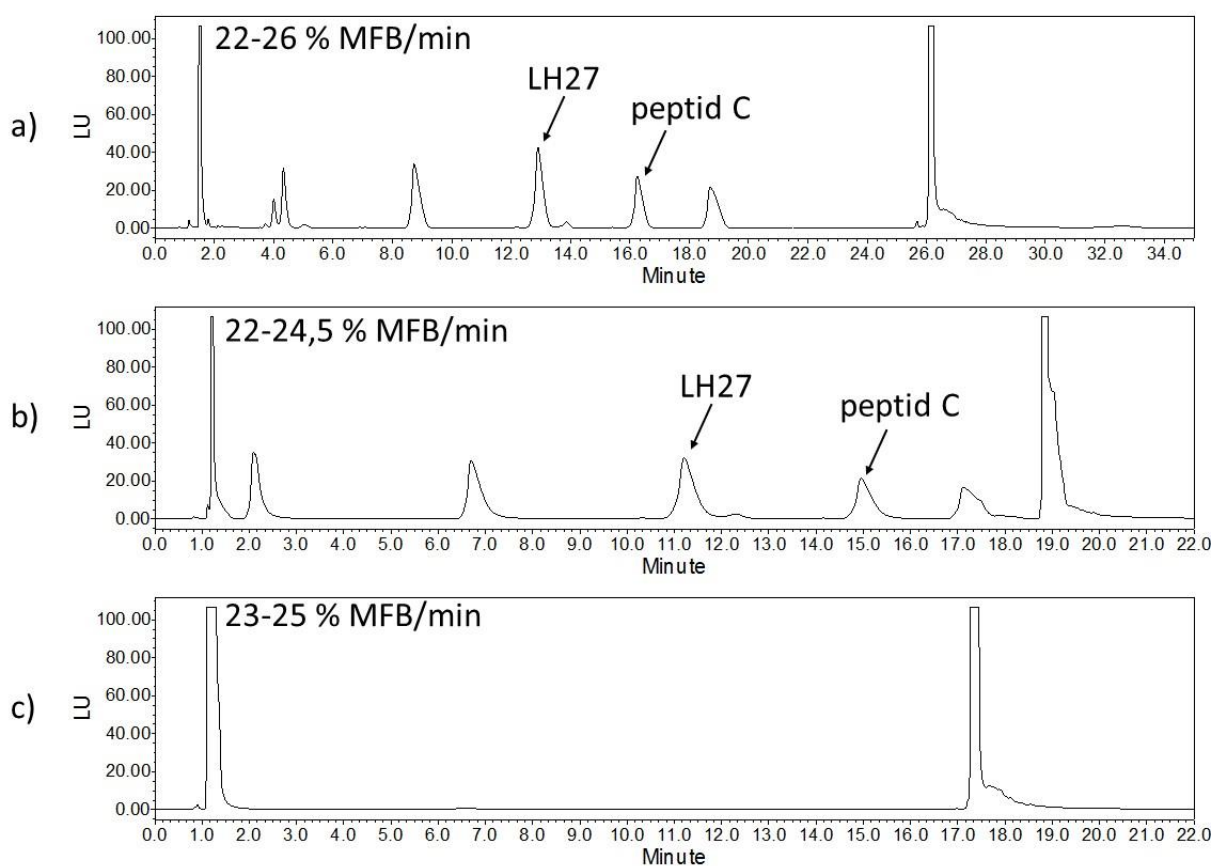
| Metoda | 50 min | 75 min | 111 min |
|------------|--------|--------|---------|
| s/n | 220 | 266 | 211 |

Ker so bili rezultati vseh treh metod primerljivi, smo zaradi najkrajšega časa analize za nadaljnjo optimizacijo izbrali 50-minutno metodo. Njen gradient smo dodatno skrajšali tako, da smo ob enakih vrednostih naklona gradienta (0,23% MFB/min) in pretoka skozi kolono (0,4 mL/min), preskusili začetni (22/23%) in končni (24,5/26%) % MFB. Tako smo razvili 35-minutno metodo, ter dve različici 22-minutne (A in B), ki sta se med seboj razlikovali v začetnih % MFB. Pri metodi A se je elucija začela pri 22% MFB, pri metodi B pa pri 23% MFB (Preglednica XVI).

Preglednica XVI: Elucijski gradienti primerjanih metod s trajanjem 35 min in 22 min (različici A in B).

| | | | | | | | | |
|-----------------|-----------|----|----|-------|------|-----|------|----|
| 35 min | Čas (min) | 0 | 5 | 22,5 | 25 | 28 | 30 | 35 |
| | % MFB | 22 | 22 | 26 | 100 | 100 | 22 | 22 |
| 22 min_A | Čas (min) | 0 | 5 | 16 | 16,5 | 19 | 19,5 | 22 |
| | % MFB | 22 | 22 | 24,5 | 100 | 100 | 22 | 22 |
| 22 min_B | Čas (min) | 0 | 5 | 13,75 | 16 | 19 | 20 | 22 |
| | % MFB | 23 | 23 | 25 | 100 | 100 | 23 | 23 |

Na Sliki 14 vidimo, da smo optimalno ločbo peptidov LH27 in C dosegli s 35-minutno metodo (Slika 14a), obenem pa smo lahko kvantitativno določili tudi obseg deamidacije LH27. Rezultati različice A 22-minutne metode (Slika 14b) so pokazali, da je z ohranjanjem naklona gradienta mogoče še dodatno skrajšati čas analize. Njena pomanjkljivost pa je bilo krnjenje kromatografskih vrhov po eluciji peptida LH27. Z različico B 22-minutne metode, pri kateri smo gradient začeli z višjim % MFB (23%), pa je prišlo do izpiranja vseh peptidov v stopnji ekvibracije kolone (Slika 14c), zato smo sklepali, da je bila začetna koncentracija MFB previsoka.



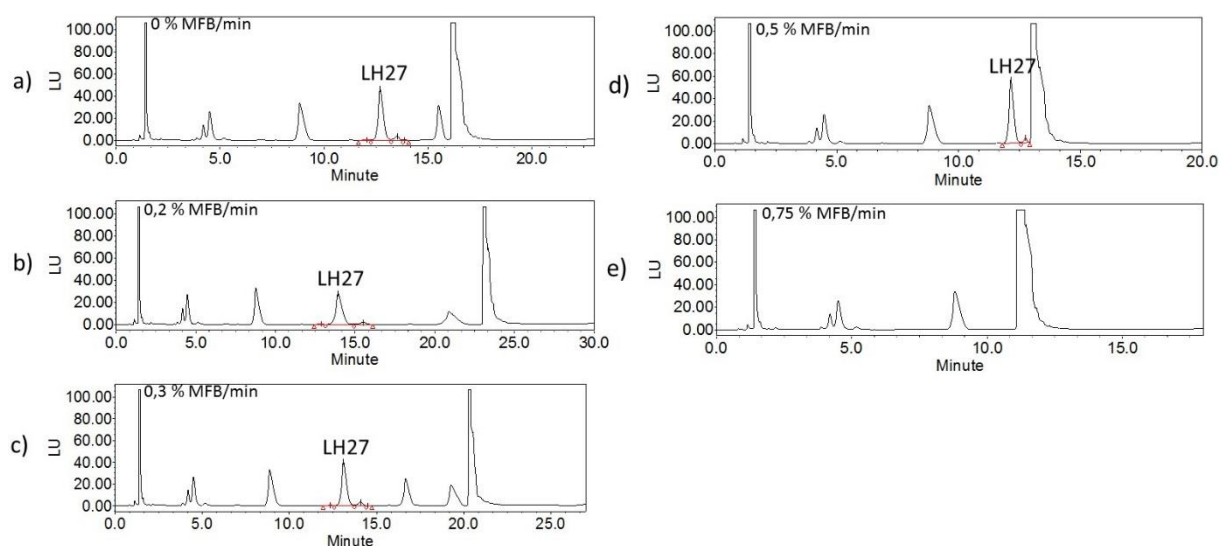
Slika 14: Primerjava kromatogramov, pridobljenih z: a) 35-minutno metodo, b) različico A 22-minutne in c) različici B 22-minutne metode.

Ker je rezultat analize z različico A 22-minutne metode pokazal, da lahko v 22 minutah uspešno ločimo peptid LH27 od drugih peptidov, smo poskušali ta gradient še dodatno optimizirati (boljša ločba in še krajši čas analize). Zato smo preskusili več 22-minutnih kromatografskih metod z različnimi nakloni gradienta, vključno z izokratsko elucijo pri 22% MFB. Pri izokratski ločbi se razmerje topil v mobilnih fazah med analizo ne spreminja, s čimer se izognemo potrebi po natančnem mešanju mobilnih faz v sistemu HPLC, pri čemer pa ne dosegamo primerljive resolucije vrhov, ki jo dosežemo z gradientno ločbo (33, 34).

Preverili smo pet kromatografskih metod z različnimi nakloni gradienta (Preglednica XVII). Pri vseh smo pretok nastavili na 0,4 mL/min, temperaturo kolone pa na 50 °C.

Preglednica XVII: Elucijski gradienti, ki smo jih uporabili za optimizacijo naklona elucije pri 22-minutnih metodah.

| Metoda | Naklon | | | | | | | | |
|-------------------|-------------|-----------|----|----|------|-----|-----|----|----|
| | (% MFB/min) | | | | | | | | |
| Gradient 1 | 0 | Čas (min) | 0 | 20 | 21 | 26 | 27 | 30 | |
| | | % MFB | 22 | 22 | 100 | 100 | 22 | 22 | |
| Gradient 2 | 0,2 | Čas (min) | 0 | 5 | 17,5 | 18 | 23 | 24 | 27 |
| | | % MFB | 22 | 22 | 24,5 | 100 | 100 | 22 | 22 |
| Gradient 3 | 0,3 | Čas (min) | 0 | 5 | 13,3 | 14 | 19 | 20 | 23 |
| | | % MFB | 22 | 22 | 24,5 | 100 | 100 | 22 | 22 |
| Gradient 4 | 0,5 | Čas (min) | 0 | 5 | 10 | 11 | 16 | 17 | 20 |
| | | % MFB | 22 | 22 | 25 | 100 | 100 | 22 | 22 |
| Gradient 5 | 0,75 | Čas (min) | 0 | 5 | 8,3 | 9 | 14 | 15 | 18 |
| | | % MFB | 22 | 22 | 24,5 | 100 | 100 | 22 | 22 |



Slika 15: Prikaz optimizacije naklona elucijskega gradienta 22-minutne metode: a) izokratska elucija, b) 0,2% MFB/min, c) 0,3% MFB/min, d) 0,5% MFB/min in e) 0,75% MFB/min.

Vidimo (Slika 15), da smo z gradienti 1 – 4 (Slike 15 a - d), uspešno ločili vrh peptida LH27 od ostalih peptidov, pri gradientu 5 (Slika 15e) pa se je peptid LH27 eluiral šele v koraku spiranja, zato ta ne bi bil primeren za določanje obsega deamidacije brez podaljšanja časa

analize. Z gradientom 1 (Slika 15a) oz. z izokratsko elucijo pri 22% MFB smo sicer ločili kromatografska vrhova LH27 in LH27_N391D vse do bazne linije, zato bi lahko bil primeren za določanje obsega deamidacije, vendar pa smo pri gradientih 2 - 4 z večanjem naklona gradienta izboljšali obliko vrhov. To pomeni, da so bili vrhovi peptida LH27 ožji in višji (Preglednica XVIII), kar je znak izboljšane občutljivosti metode (višje vrednost s/n pri isti površini vrha). Zato smo v nadaljevanju našega dela dali prednost gradientni eluciji.

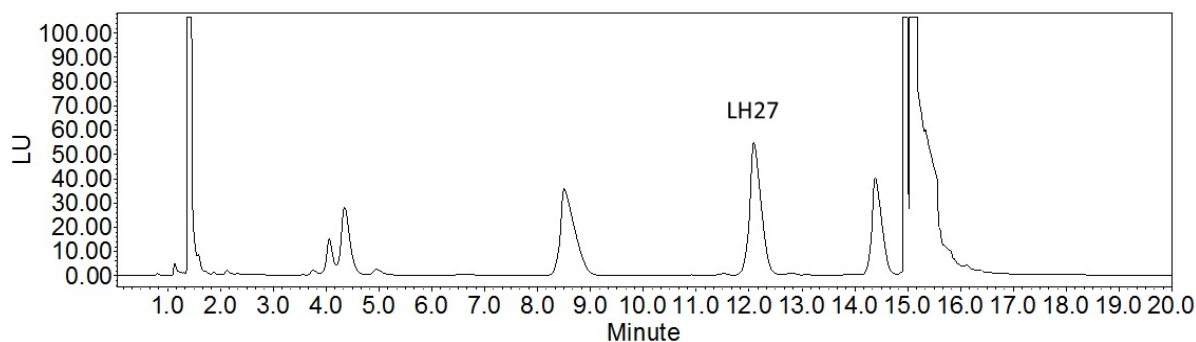
Preglednica XVIII: Primerjava rezultatov 22-minutnih kromatografskih metod z gradienti 1 – 4.

| | Gradient 1 | Gradient 2 | Gradient 3 | Gradient 4 |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| RT | 13,9 | 13,1 | 12,7 | 12,1 |
| Površina | 770.494.026 | 774.727.042 | 781.982.369 | 763.648.307 |
| Višina | 27.834.405 | 40.398.804 | 46.412.968 | 56.406.264 |
| Širina vrha na 4,4% višine | 1.1 | 0.7 | 0.6 | 0.5 |
| Resolucija USP | 2,3 | 2,1 | 2,0 | 2,0 |
| Relativna površina | 93,5 | 93,2 | 93,0 | 92,8 |

Najožji in najvišji vrh peptida LH27 smo dobili pri uporabi gradienta 4 (Preglednica XVIII), vendar pa smo ugotovili, da se je korak spiranja začel prezgodaj, saj sta se peptida LH27 in LH27_N391D eluirala preblizu temu koraku. Zato smo 22-minutno kromatografsko metodo z gradientom 4 nadgradili v različico Gradient 4_v02, pri kateri smo gradient pred spiranjem, z istim naklonom, podaljšali za 2 minuti (Preglednica XIX). Na ta način smo zamaknili korak spiranja in tako dosegli, da se je peptid LH27 popolnoma eluiral (Slika 16).

Preglednica XIX: Gradient optimizirane različice 22-minutne metode (Gradient 4_v02).

| | | | | | | | |
|------------------|----|----|----|-----|-----|----|----|
| Čas (min) | 0 | 5 | 12 | 13 | 17 | 18 | 20 |
| % MFB | 22 | 22 | 25 | 100 | 100 | 22 | 22 |



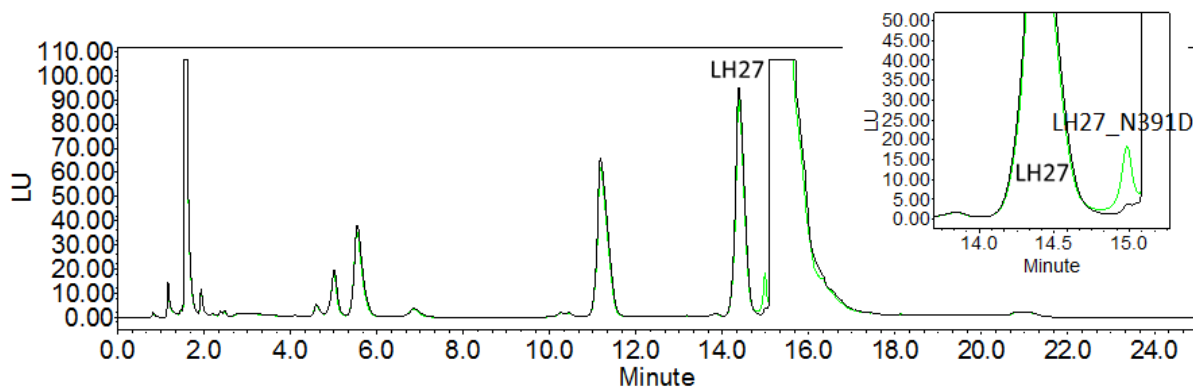
Slika 16: Kromatogram optimizirane 22-minutne metode Gradient 4_v02.

Po večkratnem injiciranju vzorca in ločbah, opravljenih z isto metodo, smo opazili spiranje peptidov s kolone že v fazi začetne ekvibracije. Sklepali smo, da je bil ekvibracijski volumen med injiciranji premajhen (primarno ekvibracija po spiranju kolone) in da se zato kolona pred ponovnim injiciranjem ni dobro ekvibrirala na gradient 22% MFB. Posledično smo korak spiranja podaljšali za 5 minut (25-minutna metoda Gradient 4_v04; Preglednica XX).

Preglednica XX: Gradient metode Gradient 4_v04

| Čas (min) | 0 | 5 | 12 | 13 | 17 | 18 | 25 |
|-----------|----|----|----|-----|-----|----|----|
| % MFB | 22 | 22 | 25 | 100 | 100 | 22 | 22 |

Ker so v razvojnih laboratorijih v rutinski uporabi tako binarni kot kvarterni sistemi HPLC, smo v nadaljevanju našo kromatografsko metodo z binarnega, na katerem smo jo razvijali, prenesli na kvarterni sistem, pri čemer se je pojavil 3-minutni zamik v retencijskih časih. Zato se je peptid LH27 eluiral preblizu koraka spiranja (Slika 17).

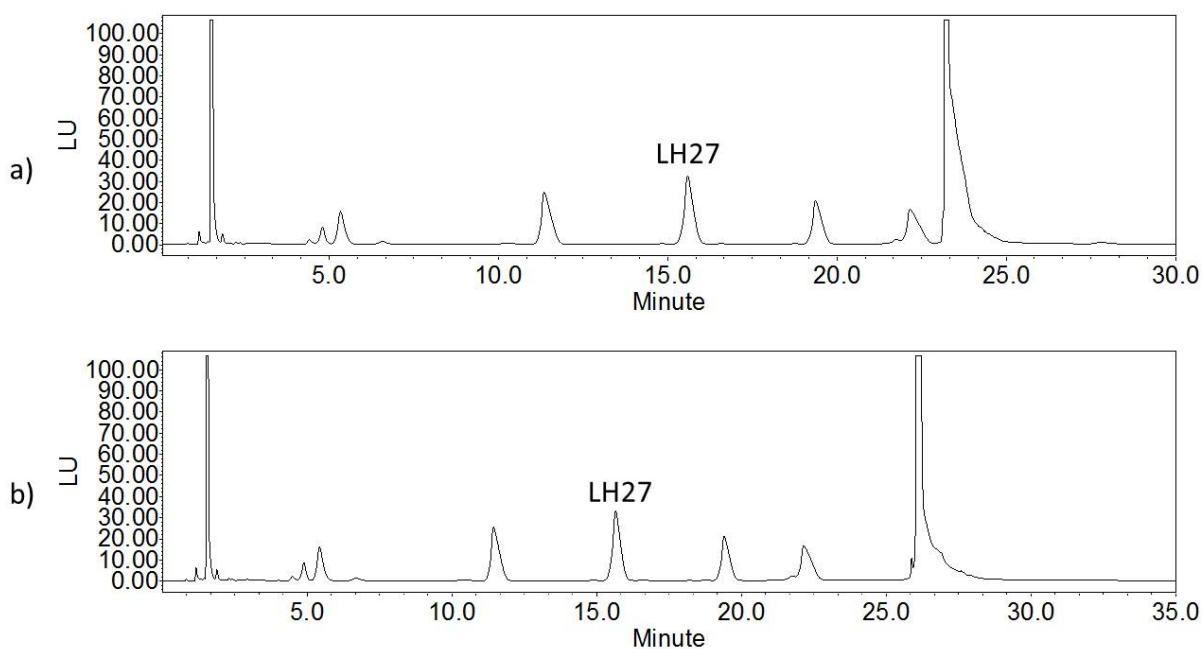


Slika 17: Kromatogram 25-minutne metode Gradient 4_v0, izvedene na kvarternem sistemu HPLC (Agilent 1260).

Ker smo želeli metodo optimizirati tako, da bi jo lahko izvajali tako na binarnih kot kvarternih sistemih HPLC, smo jo podaljšali; testirali smo 30- in 35-minutni kromatografski metodi (Preglednica XXI).

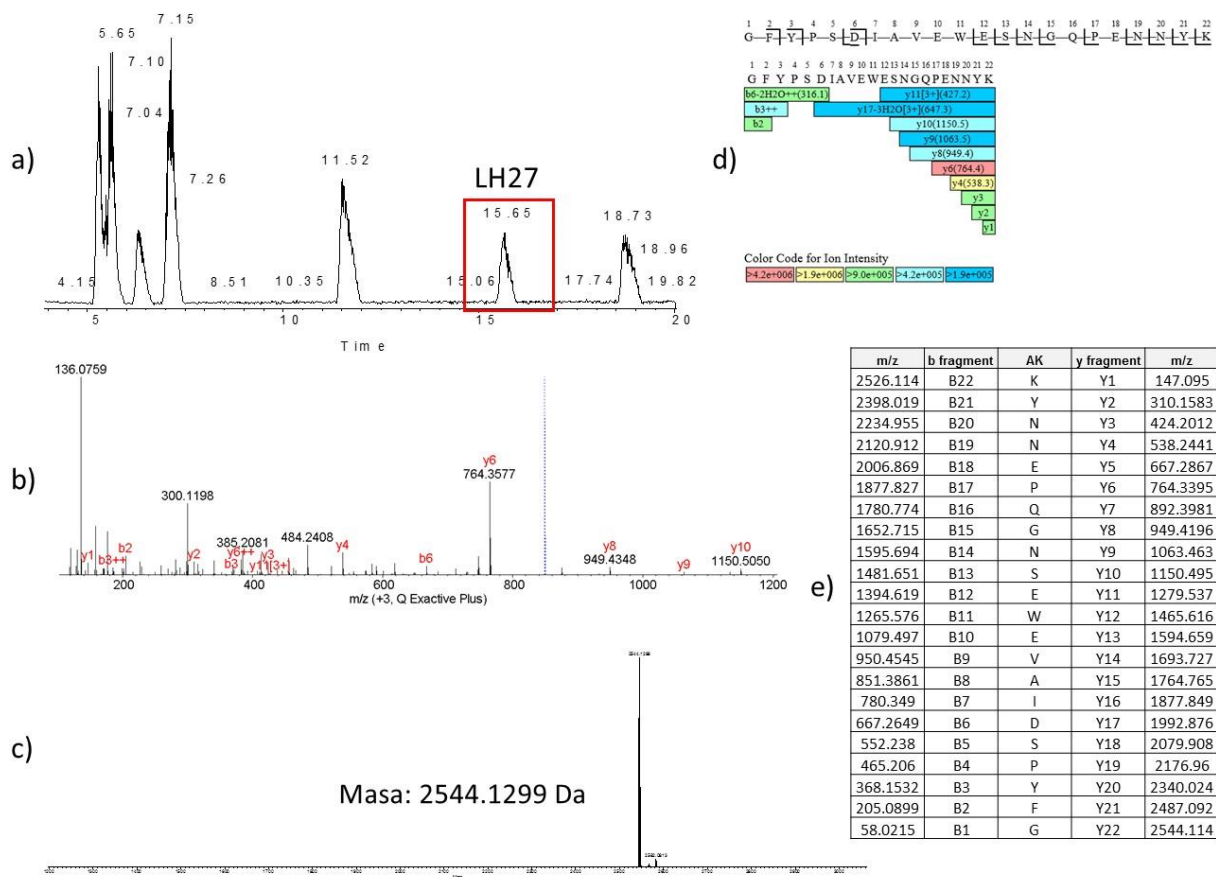
Preglednica XXI: Gradienti 30- in 35-minutne kromatografske metode za prenos na kvartarni sistem HPLC.

| | | | | | | | | |
|---------------|-----------|----|----|------|-----|-----|----|----|
| 30 min | Čas (min) | 0 | 5 | 20 | 21 | 24 | 25 | 30 |
| | % MFB | 22 | 22 | 25,5 | 100 | 100 | 22 | 22 |
| 35 min | Čas (min) | 0 | 5 | 22,5 | 25 | 28 | 30 | 35 |
| | % MFB | 22 | 22 | 26 | 100 | 100 | 22 | 22 |



Slika 18: Kromatograma 30-minutne (a) in 35-minutne (b) metode na kvartarnem sistemu HPLC.

Na Sliki 18 vidimo, da smo z obema kromatografskima metodama dobili primerljive rezultate, pri čemer pa smo seveda dali prednost krajši, 30-minutni (Slika 18a). Z njo smo namreč dobili primerljive rezultate tudi po tem, ko smo jo prenesli nazaj na binarni sistem. Zato smo jo izbrali kot najprimernejšo za kvantitativno določanje obsega deamidacije v molekuli IgG1 terapevtskega mAb. Za izbrano 30-minutno metodo smo potrdili tudi identiteto vrha peptida LH27 z masno spektrometrijo (Slika 19).

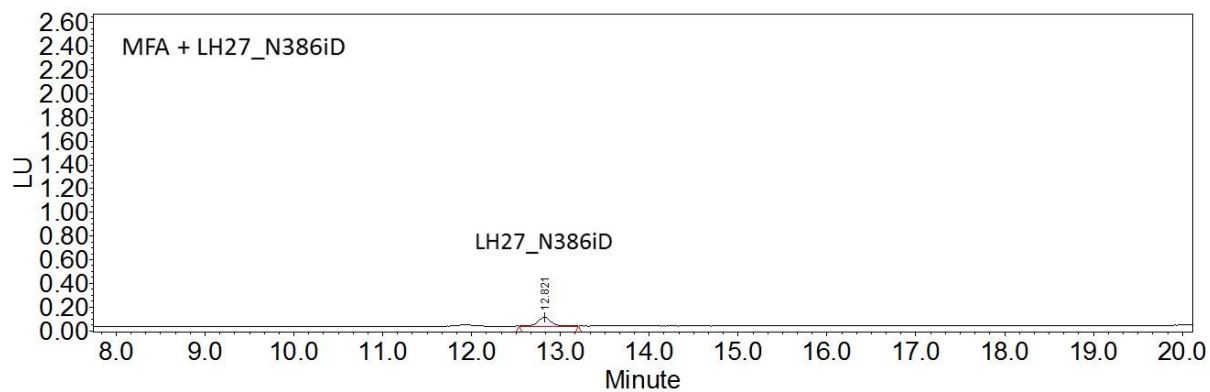


Slika 19: Z MS potrjena identiteta vrha peptida LH27, ločenega s 30-minutno kromatografsko metodo: a) TIC kromatogram, retencijski čas LH27 označen z rdečim kvadratom (RT = 15,65 min); b) MS/MS spekter vrha pri RT 15,65 min; c) masni spekter (m/z) za vrh pri 15,65 min; d) pokritost sekvence LH27 z MS/MS spektrom za vrh pri RT 15,65 min; e) teoretične mase CID fragmentov za peptid LH27.

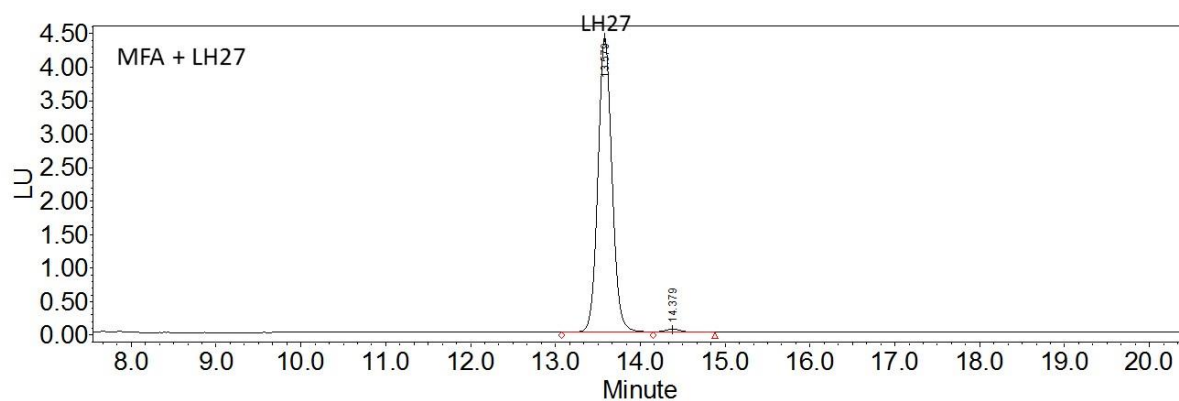
4.2 PREVERJANJE USTREZNOSTI RAZVITE KROMATOGRFSKE METODE

4.2.1 Retencijski časi in elucijski profili sintetičnih peptidov

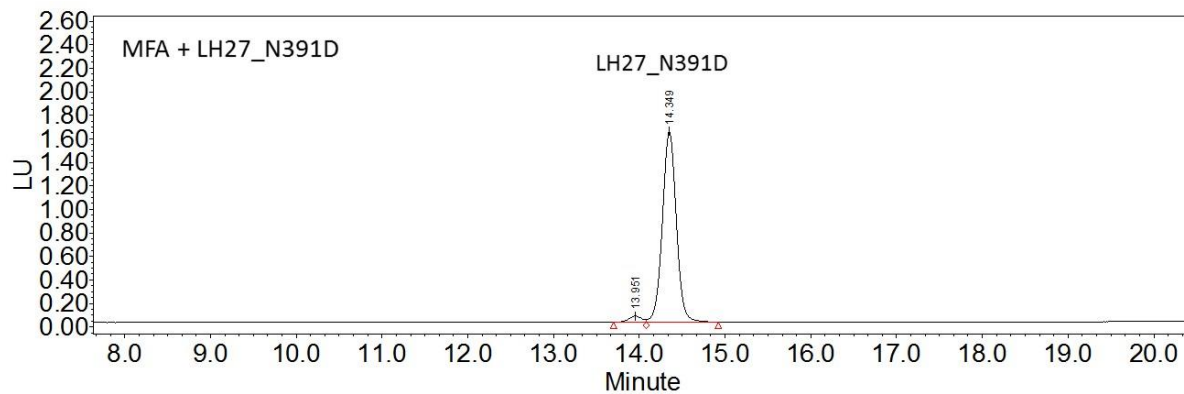
Da bi potrdili retencijske čase deamidiranih variant peptida LH27, in sicer tako sintetičnih kot tistih, prisotnih v testiranem vzorcu mAb IgG1, smo uporabili sintetične peptide, ki so ustrezali: nespremenjenemu peptidu LH27 (LH27), deamidaciji na mestih 386 (LH27_N386D) in 391 (LH27_N391D), ter tvorbi izoaspartata na mestu 386 (LH27_386iD). Po 5 μ L posameznega sintetičnega peptida s koncentracijo 0,1 mg/ml smo dodali k 145 μ L MFA in nato tako pripravljene vzorce analizirali z optimizirano 30-minutno kromatografsko metodo. Rezultati so prikazani na Slikah 20 - 24.



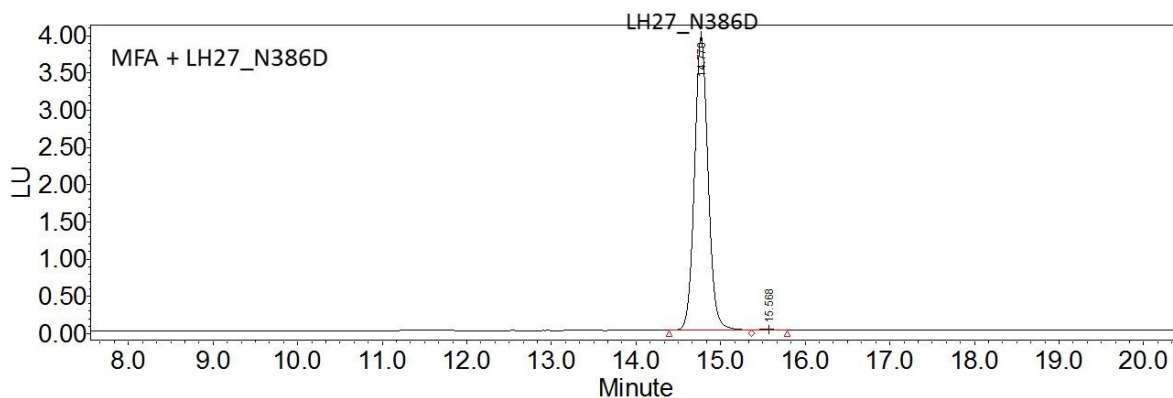
Slika 20: Retencijski čas sintetičnega peptida LH27_N386iD v kromatogramu, pridobljenem s 30-minutno metodo.



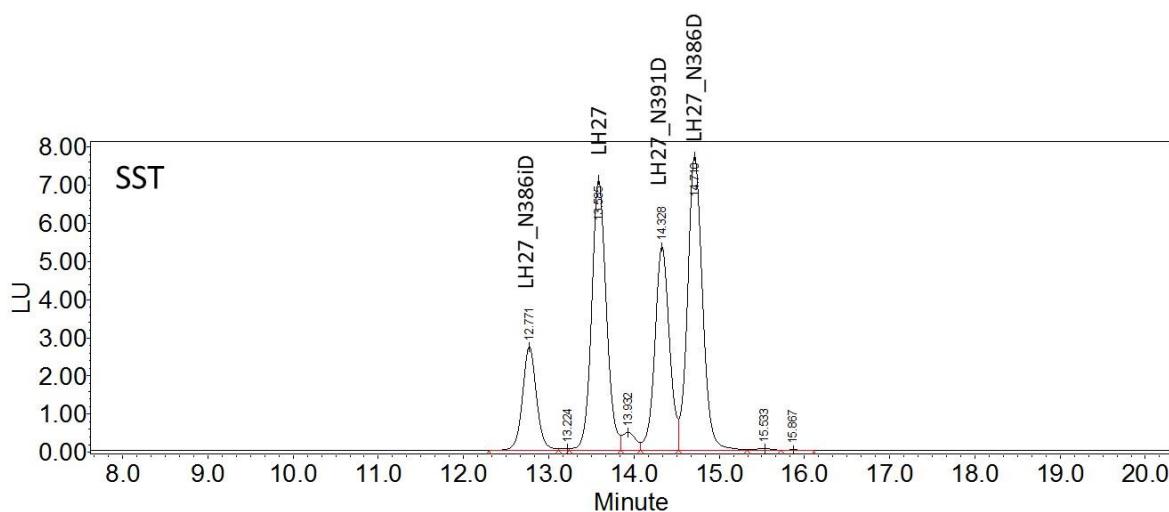
Slika 21: Retencijski čas sintetičnega peptida LH27 v kromatogramu, pridobljenem s 30-minutno metodo.



Slika 22: Retencijski čas sintetičnega peptida LH27_N391D v kromatogramu, pridobljenemu s 30-minutno metodo.



Slika 23: Retencijski čas sintetičnega peptida LH27_N386D v kromatogramu, pridobljenemu s 30-minutno metodo.

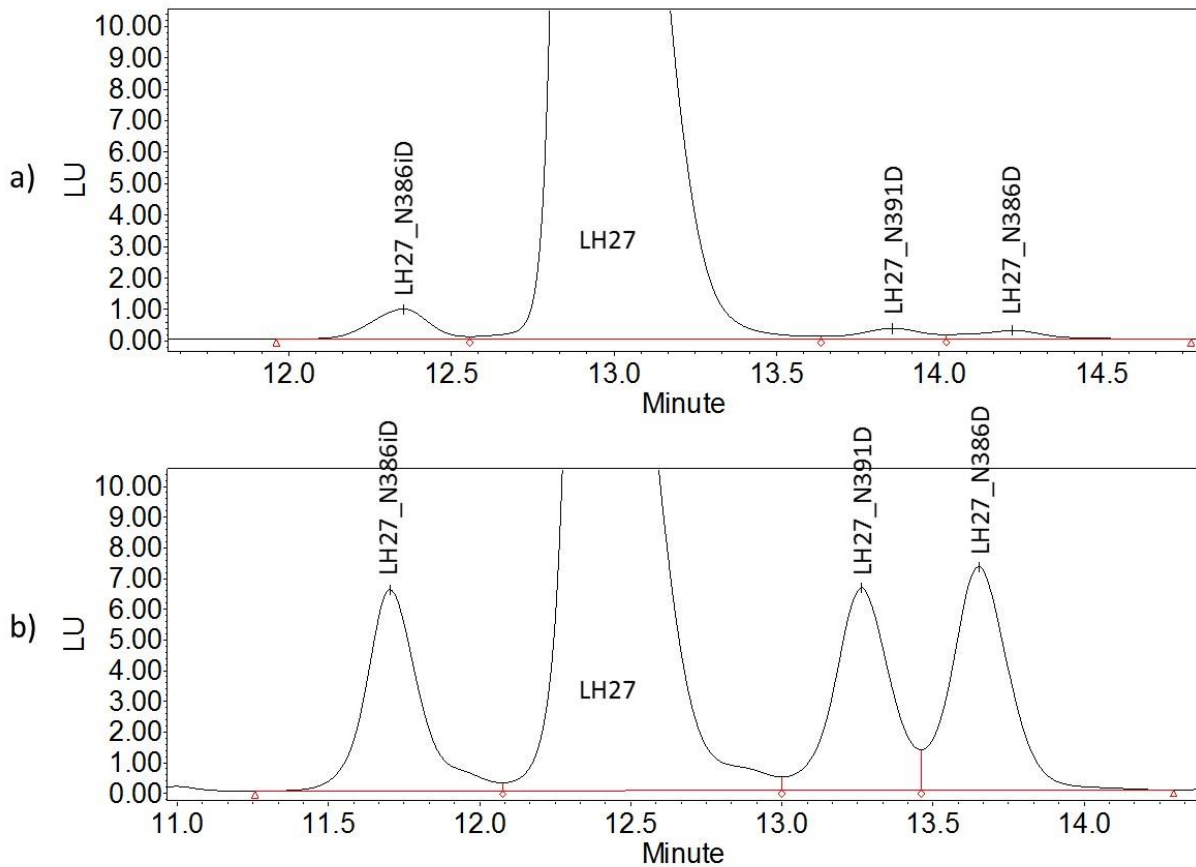


Slika 24: Ločba in retencijski časi sintetičnih peptidov LH27_N386iD, LH27, LH27_N391D in LH27_N386 (SST) v kromatogramu, pridobljenem s 30-minutno metodo analize vzorca, ki je vseboval njihovo mešanico.

S 30-min metodo smo uspešno ločili 4 glavne variante peptida LH27, in sicer 2 aspartatni in eno izoaspartatno od nemodificiranega vrha LH27 (Sliki 24 in 25). V kromatogramih smo opazili, da se v vzorcih uporabljenih sintetičnih peptidov pojavljajo tudi nečistote, npr. nečistota pri 13.9 min v sintetičnem peptidu LH27_N391D (Slika 22), ki se posledično pojavi tudi v mešanici štirih sintetičnih peptidov (Slika 24), zato smo za ugotavljanje resolucije med variantami uporabili relativno resolucijo med glavnimi vrhovi (Preglednica XXII).

Preglednica XXII: Retencijski časi in relativne resolucije med variantami peptida LH27.

| Peptid | Relativna resolucija | Retencijski čas (min) |
|------------|----------------------|-----------------------|
| LH27_iD | n.a. | 12,8 |
| LH27 | 2,7 | 13,6 |
| LH27_N391D | 2,4 | 14,3 |
| LH27_N386D | 1,2 | 14,8 |



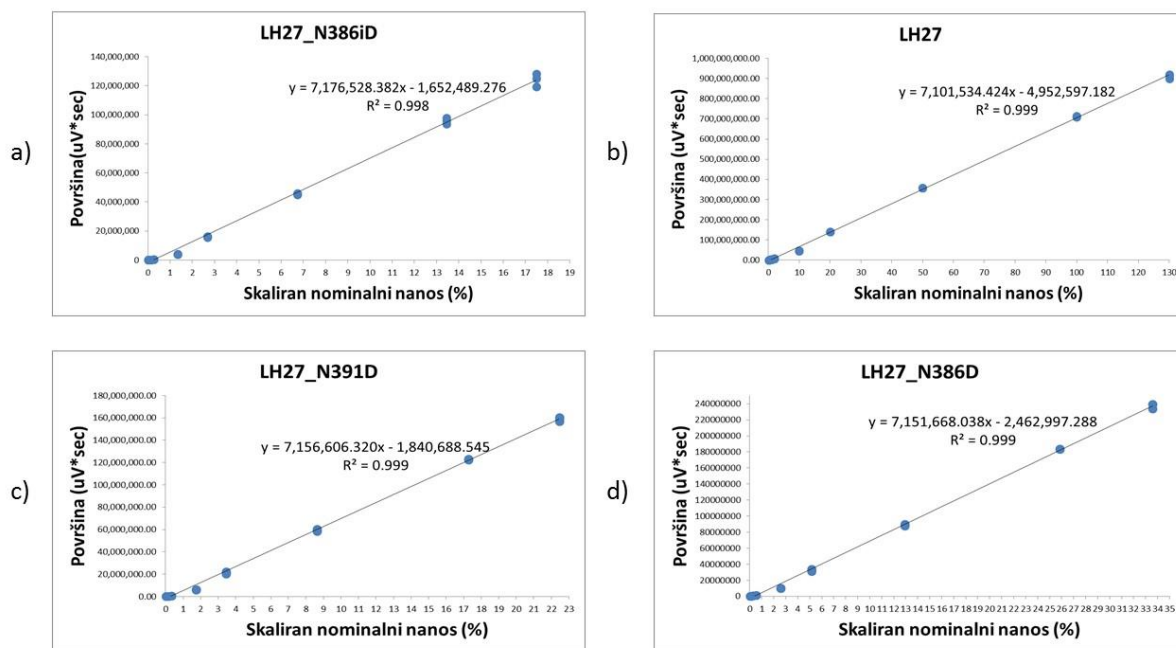
Slika 25: Kromatograma a) vzorca mAb IgG1 brez, in b) enakega vzorca z dodatkom sintetičnih peptidov LH27_N386iD, LH27_N391D in LH27_N386D. Vidimo, da se posamezni vrhovi v vzorcu povečajo, če mu dodamo posamezne sintetične peptide.

4.2.2 Določitev LOQ

4.2.2.1 Linearnost in točnost

Linearnost metode smo določili z dodajanjem sintetičnih peptidov LH27_N386iD, LH28_N391D in LH27_N386D v vzorce testiranega terapevtskega mAb IgG1. Za poenostavitev izračuna linearnosti smo upoštevali naslednji predpostavki: a) v našem vzorcu ni prisotnih variant LH27, ki bi interferirale z izračunom; b) določanje relativnih površin posameznih variant LH27 v mešanici sintetičnih peptidov in našega vzorca je najbolj natančno pri 100% nominalnega nanosa. Na podlagi tega smo najprej izračunali povprečno relativno površino za vsako posamezno varianto peptida LH27 pri 100% nominalnem nanosu našega vzorca (mAb IgG1), ki smo mu dodali sintetične peptide. Ker smo našemu vzorcu pri 100% nominalnem nanosu dodajali sintetične peptide, smo, glede na prej navedene predpostavke, skalirali relativno površino vsake posamezne variante, s faktorjem normalizacije LH27, in sicer tako da smo relativno površino peptida LH27 pri 100%

nominalnem nanosu našega vzorca z dodanimi sintetičnimi peptidi upoštevali kot 100%. Izmerjene vrednosti površin za vrhove posameznih peptidov smo nato izrisali v obliki linearne funkcije skalirane vrednosti nominalnega nanosa (*angl.* scaled nominal load) za posamezne peptide, da smo pridobili naklon premice, ki opisuje spremembe v površini posamezne variante peptida LH27, v odvisnosti od % nominalnega nanosa našega vzorca.



Slika 26: Linearna odvisnost med površinami vrhov variant LH27 in % nominalnega nanosa vzorca.

Za izračun relativnih faktorjev odzivnosti (*angl.* relative response factor, RRF) smo uporabili ustrezen naklon linearne funkcije za vsak vrh posamezne variante.

Preglednica XXIII: Nakloni linearnih funkcij za posamezne vrhove variant peptida LH27, ki smo jih uporabili za določitev relativnih faktorjev odzivnosti (RRF).

| Vrh | LH27_N386iD | LH27 | LH27_N391D | LH27_N386D |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Naklon | 7.176.528,4 | 7.101.534,4 | 7.156.606,3 | 7.151.668,0 |

Preglednica XXIV: Relativni faktorji odzivnosti (RRF) za posamezne variante peptida LH27.

| Pari vrhov → | LH27_N386iD/LH27 | LH27_N391D/LH27 | LH27_N386D/LH27 |
|--------------|------------------|-----------------|-----------------|
| RRF | 1,01 | 0,99 | 1,00 |

Kriteriji linearnosti zahtevajo vrednosti RRF med 0,95 in 1,05. Podatki, navedeni v Preglednici XXIV kažejo, da smo za vse tri pare vrhov variant LH27 izračunali vrednosti RRF v zahtevanem okviru, s čimer smo potrdili, da so imeli enake odzive na detektorju. To

pomeni, da lahko z našo metodo zanesljivo spremljamo relativne spremembe količin deamidiranih variant peptida LH27.

Za izračun točnosti metode smo določili presečišča linearnih funkcij z y-osjo, s čimer smo preverjali ali izračunana linearna funkcija odziva LH27 ustreza izmerjeni vrednosti. Presečišče z y-osjo pri 100% nominalnem nanosu smo izračunali s pomočjo enačbe premice linearne regresije ($y = kx + n$). Nato smo določili še relativno razmerje med izračunanim in povprečnim izmerjenim presečiščem premice z y-osjo, ki je znašalo 100,9%. Tako smo potrdili točnost metode, saj so naši rezultati ustrezali kriteriju, da mora biti vrednost razmerja med 99,0 in 101,0%.

Enačba 4: Izračun relativnega razmerja med izračunanim in povprečnim izmerjenim presečiščem premice z y-osjo.

$$\text{Razmerje} = \frac{\text{Izmerjeno presečišče z osjo } y}{\text{Izračunano presečišče z osjo } y} * 100\%$$

Preglednica XXV: Površina vrha LH27 pri 100% skaliranem nominalnem nanosu.

| Površina LH27 pri 100% skaliranem nominalnem nanosu | |
|--|---------------|
| Izračunana površina | 705.200.845,2 |
| Izmerjena površina (povprečje) | 711.533.352,7 |
| Razmerje med izmerjeno in izračunano površino (%) | 100,9 |

4.2.2.2 Ponovljivost injiciranja (6 neodvisnih priprav vzorca LOQ)

Na podlagi dokazane linearnosti smo ocenili, da lahko dosežemo vrednosti $s/n > 10$ pri 0,05% nominalnega nanosa. Zaradi boljše robustnosti metode smo zato kot vzorec LOQ, s katerim se sicer preverja odzivnost sistema, uporabili 0,2% in 0,5% nominalni nanos na kolono.

Najprej smo določili RSD površine vrha LH27 pri 0,2 in 0,5% nominalnega nanosa. V ta namen smo izvedli 6 neodvisnih priprav vzorca LOQ pri 0,2% nominalnega nanosa in enako število neodvisnih priprav vzorca LOQ pri 0,5% nominalnega nanosa. Vse vzorce smo pripravili tako, da smo 190 μL MFA dodali 10 μL predhodno pripravljenega vzorca mAb IgG1.

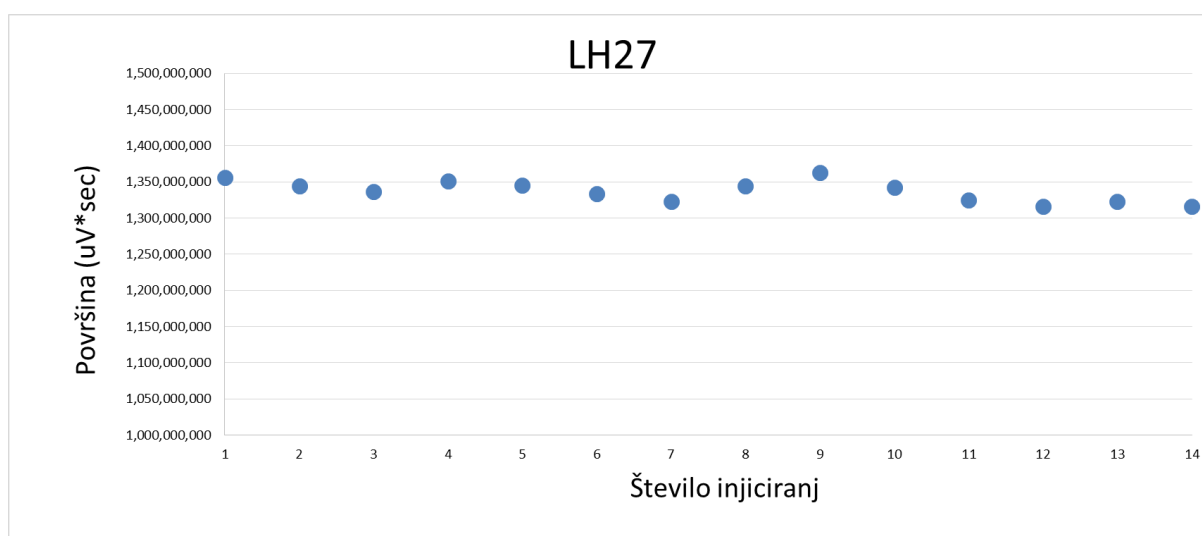
Preglednica XXVI: Rezultati analize 6 neodvisno pripravljenih vzorcev LOQ pri 0,2 in 0,5% nominalnem nanosu.

| Vzorec LOQ | 0,2% nominalnega nanosa | | 0,5% nominalnega nanosa | |
|------------------|-------------------------|----------|-------------------------|----------|
| | Površina LH27 | s/n LH27 | Površina LH27 | s/n LH27 |
| 1 | 422.119 | 108,9 | 1.496.993 | 381,7 |
| 2 | 418.434 | 105,8 | 1.388.781 | 343,9 |
| 3 | 395.688 | 99,8 | 1.539.288 | 393,6 |
| 4 | 51.596 | 127,5 | 1.473.991 | 368,1 |
| 5 | 409.911 | 103,5 | 1.410.889 | 367,9 |
| 6 | 382.709 | 96,4 | 1.398.094 | 361,7 |
| Povprečje | 424.137,7 | 107,0 | 1.451.339,3 | 369,5 |
| STDEV | 47.322,3 | 10,0 | 61.183,6 | 15,6 |
| RSD (%) | 11,2 | 9,4 | 4,2 | 4,2 |

Vrednost RSD pri 0,2% nominalnega nanosa je bila 11,2 % za površino vrha LH27 in 9,4% za s/n LH27. Obe redčitvi sta izpolnjevali kriterij ($RSD \leq 30\%$), kot LOQ metode pa smo potrdili nižji, 0,2% nominalni nanos.

4.2.3 Preverjanje neželenega prenašanja vzorcev (carry-over)

Z večkratnim injiciranjem vzorca proteina smo preverili, ali ta pušča sledi na koloni oz. ali se prenese iz enega injiciranja v drugo. Enak vzorec smo zato injicirali štirinajstkrat zapored in ugotovili, da se signal peptida LH27 pri 100% nominalnem nanosu med posameznimi injiciranjmi ni povečeval. Površine vrhov LH27 so bile konstantne (RSD 1,1% ; Slika 27). Po štirinajstih zaporednih injiciranjih vzorca smo injicirali še MFA in v kromatogramu nismo opazili vrhov, zato smo zaključili, da se vzorec med posameznimi injiciranjmi ne prenaša.



Slika 27: Površine vrhov LH27, določene po 14 zaporednih injiciranjih vzorca.

4.2.4 Stabilnost vzorcev pri zamrzovanju

Za rutinsko uporabo metode moramo potrditi, da so med pripravo, shranjevanjem in analizo tako vzorci kot reagenti stabilni in ne vplivajo na analizni rezultat. V fazi razvoja metode smo zato testirali pogoje, pod katerimi shranjujemo vzorce (z LysC-cepljen terapevtski protein). Vpliv zamrzovanja na stabilnost vzorcev smo preverili tako, da smo vzorec mAb IgG1 zamrznili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ga hranili 3 tedne. Nato smo ga odmrznili in analizirali skupaj s kontrolnim vzorcem mAb IgG1, ki smo ga pripravili na dan analize. Upoštevali smo naslednje kriterije ustreznosti: $\Delta\text{abs} = \leq 0,1\%$ za vrhove, ki so $\leq 0,5\%$; $\Delta\text{abs} = \leq 0,2\%$ za vrhove med 0,5 in 2,0%; $\Delta\text{rel} = \leq 10\%$ za vrhove z $\geq 2,0\%$ relativne površine ter $\Delta\text{abs} = \leq 1,5\%$ za glavni vrh. Ker je bila največja izmerjena vrednost Δabs med deleži posameznih vrhov 0,1 % (Preglednica XXVII), smo zaključili, da ni razlik med rezultati analiz sveže pripravljene vzorca in tistega, ki smo ga 3 tedne hranili zamrznjenega na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preglednica XXVII: Rezultati preverjanja stabilnosti vzorcev, shranjenih 3 tedne na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

| Varianta | Delež variante ob času 0 | Delež variante po 3 tednih na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ | Absolutna razlika med deleži (Δabs) |
|-------------|--------------------------|---|---|
| LH27_N386iD | 1,9 | 1,9 | 0,0 |
| LH27 | 96,5 | 96,6 | 0,1 |
| LH27_N391D | 1,3 | 1,2 | 0,1 |
| LH27_N386D | 0,3 | 0,3 | 0,0 |

4.2.5 Stabilnost vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku

Preverili smo tudi stabilnost vzorcev, ki so bili do 84 h v avtomatskem vzorčevalniku, hlajenem na 4 – 8 °C. Določili smo deleže variant peptida LH27 v njih in v sveže pripravljenem vzorcu (ob času 0). Največjo izmerjeno razliko $\Delta_{\text{abs}} = 0,3\%$ smo zabeležili v primeru glavnega vrha ne-deamidiranega peptida LH27 (Preglednica XXVIII), kar je ustrezalo kriterijem sprejemljivosti. Zato smo sklepali, da v 84 urah hranjenja vzorcev na 4 – 8 °C ni prišlo do neželenih učinkov deamidacije.

Preglednica XXVIII: Rezultati preverjanja stabilnosti vzorcev, shranjenih do 84 ur v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 – 8 °C.

| Varianta peptida | Delež variante ob času 0 | Delež variante po 84 urah pri 4 – 8 °C | Absolutna razlika med deleži (Δ_{abs}) |
|-------------------------|---------------------------------|---|--|
| LH27_N386iD | 1,8 | 1,6 | 0,2 |
| LH27 | 96,7 | 97,0 | 0,3 |
| LH27_N391D | 1,2 | 1,1 | 0,1 |
| LH27_N386D | 0,3 | 0,3 | 0,0 |

4.2.6 Stabilnost reagentov

Ker na rezultate lahko potencialno vpliva tudi nestabilnost uporabljenih reagentov, IAA, DTT, denaturacijske in delovne raztopine (50 mM natrijev citrat), smo njihovo stabilnost preverili tako, da smo analizirali in primerjali relativne površine posameznih variant peptida LH27 v vzorcu, ki smo ga pripravili s svežimi reagenti, ter v vzorcu, pripravljenim s starejšimi reagenti. V ta namen smo 0,5 M raztopino DTT in 1 M raztopino IAA hranili 2 meseca na - 80 °C, denaturacijsko raztopino in delovno raztopino (50 mM natrijev citrat) pa enak čas na 2-8 °C. Za kontrolo smo uporabili vzorec, ki smo ga pripravili s svežimi reagenti na dan analize vzorcev.

| Ime variante peptida | Delež variant v vzorcih, pripravljenimi s svežimi reagenti | Delež variant v vzorcih, pripravljenimi s starimi reagenti | Absolutna razlika med deleži (Δabs) |
|-----------------------------|---|---|--|
| LH27_N386iD | 1,9 | 1,9 | 0,0 |
| LH27 | 96,5 | 96,5 | 0,0 |
| LH27_N391D | 1,3 | 1,3 | 0,0 |
| LH27_N386D | 0,3 | 0,3 | 0,0 |

Δ abs za vse vrhove variant peptida LH27 so enake 0, zato smo zaključili, da ni razlik med sveže pripravljenimi in starejšimi, predhodno pripravljenimi in ustrezno shranjenimi reagenti. Tako smo potrdili 2-mesečno stabilnost 0,5 M raztopine DTT in 1 M raztopine IAA na 80 °C, ter 2-mesečno stabilnost denaturacijske in delovne raztopine na 2 – 8 °C.

4.3 UPORABNOST METODE

4.3.1 Uporaba metode za študij kinetike deamidacije

Kromatografska metoda, ki smo jo razvili, ima več prednosti pred trenutno uporabljanimi metodami, saj lahko z njo v najkrajšem času (30 min) ločimo vsaj 4 variante peptida PENNYK ter relativno kvantificiramo obseg deamidacije, brez uporabe masne spektrometrije. Prikaz uporabnosti naše metode za določanje kinetike deamidacije smo zasnovali na osnovi podatkov, ki so dostopni v strokovni literaturi.

Študijo kinetike deamidacije smo zasnovali na podlagi do sedaj najobširnejše objavljene študije Cheliusa in sodelavcev (16). Ti navajajo, da je deamidacija bistveno hitrejša za denaturiran protein in za proteolitsko razgrajene fragmente fragmente, v primerjavi s pravilno zvitim proteinom v originatorskem formulacijskem pufri, z vrednostjo pH = 6,0 (16). Na podlagi te študije smo izvedli poskus, s katerim smo želeli prikazati dovzetnost proteina IgG1 za deamidacijo na peptidu PENNYK, in sicer v: i) nativnem, ii) denaturiranem, ter iii) proteolitsko razgrajenem stanju, v odvisnosti od časa.

Najprej smo v vseh vzorcih terapevtskega mAb IgG1, ki smo jih uporabili za eksperiment, naredili izmenjavo pufra v delovno raztopino 50 mM Tris-HCl s pH = 8,0, da bi povečali hitrost deamidacije. Izmenjavo pufra smo natančneje opisali v podpoglavju 3.3.11. Nato smo

vzorke razdelili v tri skupine, glede na postopek njihove priprave za peptidno kartiranje. Postopek priprave namreč vsebuje naslednje stopnje: denaturacijo proteina, redukcijo, alkilacijo in nazadnje še cepitev z encimom. V prvi skupini smo testirali stabilnost proteina v pufri Tris-HCl s pH = 8,0, v drugi stabilnost proteina po denaturaciji, redukciji in alkilaciji, v tretji pa njegovo stabilnost po cepitvi z LysC. Vzorce smo inkubirali do vzorčnih točk v termobloku, pri 37 °C in 350 rpm. Časovni okvir, v katerem smo spremljali deamidacijo je bil 10 dni. Za vsak vzorec smo v določeni časovni točki zaključili inkubacijo in postopek njegove priprave za analizo nadaljevali do končne stopnje (Preglednica XXX). Nato smo vzorce zamrznili in shranili na - 80°C do analize s HPLC.

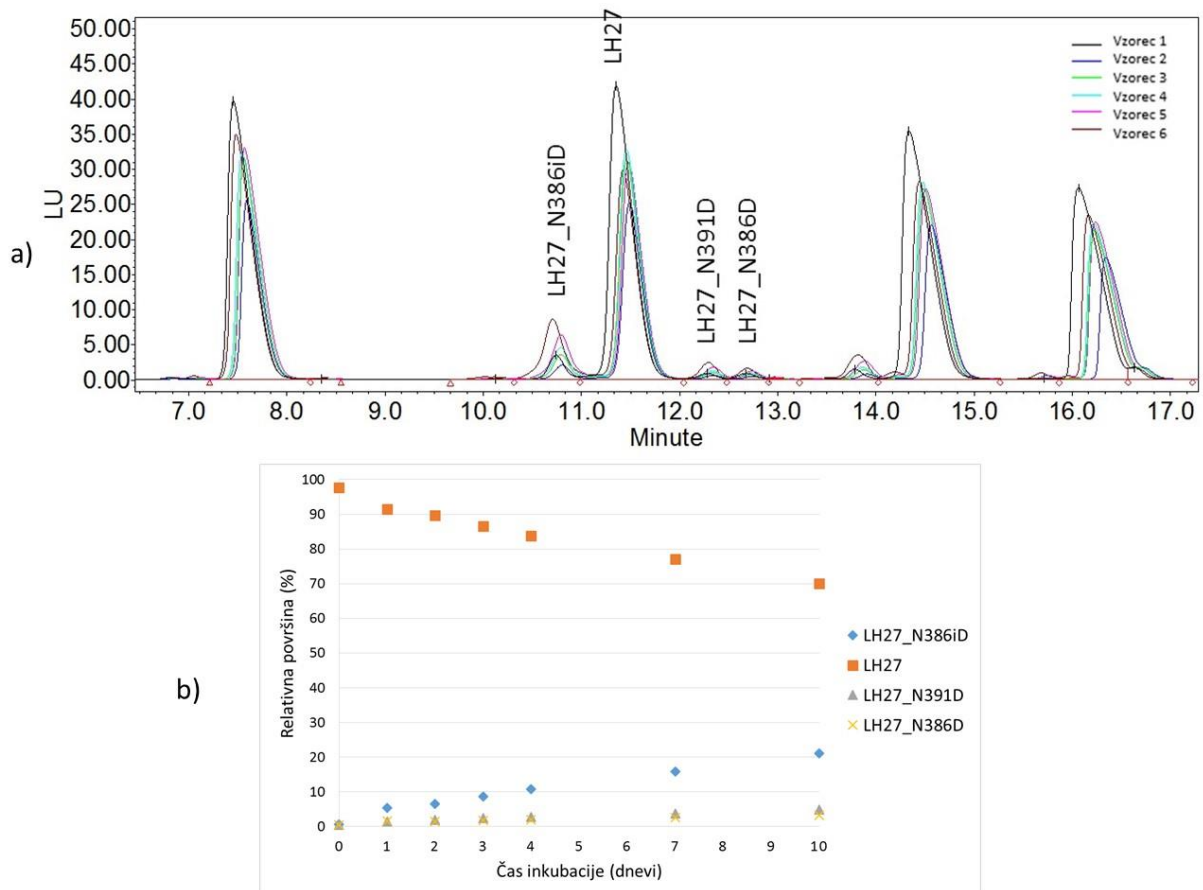
Preglednica XXX: Shema priprave vzorcev za študij kinetike deamidacije terapevtskega mAb IgG1.

| Način priprave vzorcev | | Čas inkubacije v dnevih | | | | | | | |
|--|--------|-------------------------|---|---|---|---|---|----|---|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 10 | |
| Nativni protein ↓ Inkubacija | Vzorci | 1 | x | ✓ | | | | | |
| | | 2 | x | | ✓ | | | | |
| | | 3 | x | | | ✓ | | | |
| | | 4 | x | | | | ✓ | | |
| | | 5 | x | | | | | ✓ | |
| | | 6 | x | | | | | | ✓ |
| Nativni protein ↓ Denaturacija ↓ Redukcija ↓ Alkilacija ↓ Inkubacija | | 7 | x | ✓ | | | | | |
| | | 8 | x | | ✓ | | | | |
| | | 9 | x | | | ✓ | | | |
| | | 10 | x | | | | ✓ | | |
| | | 11 | x | | | | | ✓ | |
| | | 12 | x | | | | | | ✓ |
| Nativni protein ↓ Denaturacija ↓ Redukcija ↓ Alkilacija ↓ Cepitev z encimom ↓ Inkubacija | | 13 | x | ✓ | | | | | |
| | | 14 | x | | ✓ | | | | |
| | | 15 | x | | | ✓ | | | |
| | | 16 | x | | | | ✓ | | |
| | | 17 | x | | | | | ✓ | |
| | | 18 | x | | | | | | ✓ |

x - začetek inkubacije

✓ - konec inkubacije

Povečana količina produktov deamidacije v prvi skupini vzorcev (vzorci 1-6), ki so vsebovali nativni in pravilno zvit protein, je pokazala, da lahko v njih, pod pogoji inkubacije pri povišani temperaturi, poteče reakcija deamidacije. Tekom 10 dni inkubacije vzorcev pri 37 °C se je razgradilo ~30% peptida LH27. Pri tem je nastalo največ variante iD na deamidacijskem mestu 386 (~20%) in manj variant D na deamidacijskih mestih 386 in 391 (~5%). Najhitrejšo razgradnjo variante LH27 smo opazili v prvih štirih dneh inkubacije (~18%), ta pa se je nato v nadaljnjih šestih dneh inkubacije povečala še za ~12% (Slika 28).

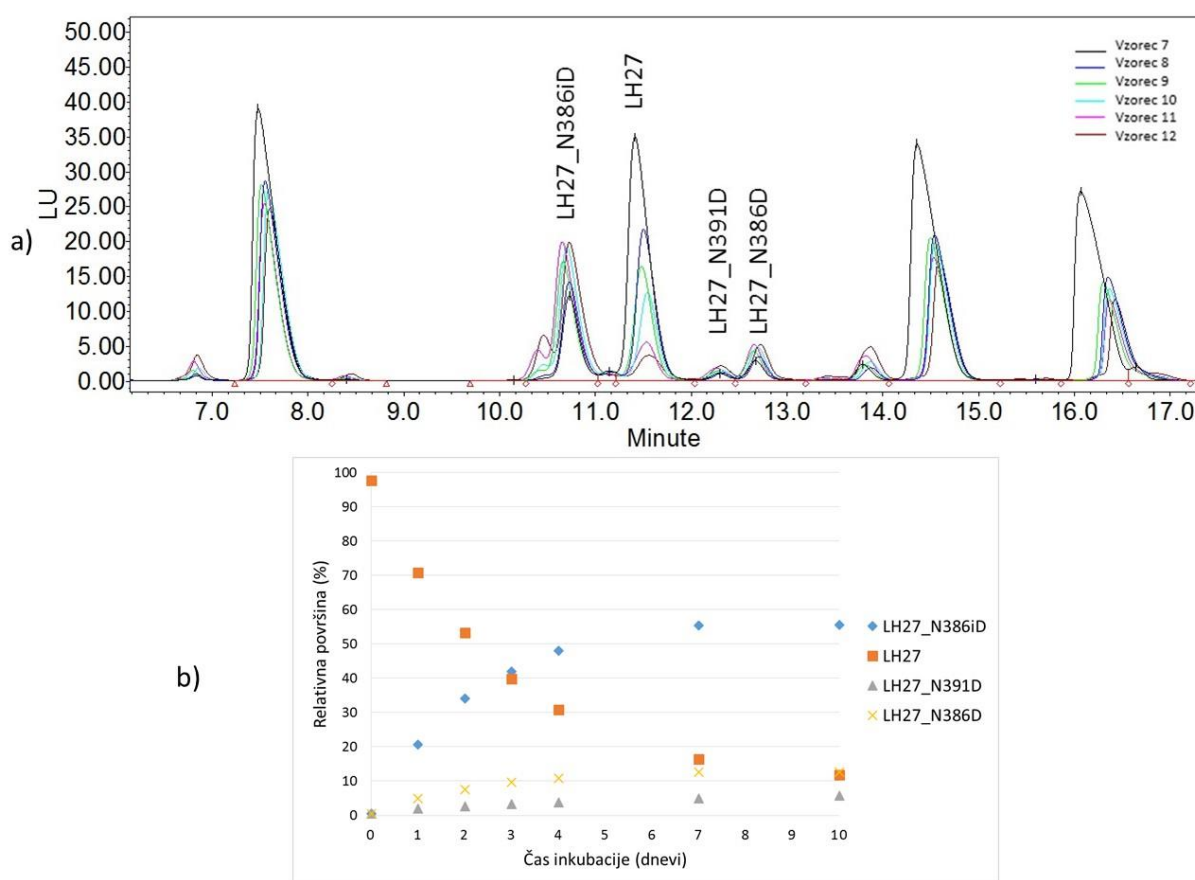


Slika 28: Izsledki analiz skupine vzorcev, ki je vsebovala pravilno zvit protein IgG1: a) kromatogrami, in b) grafični prikaz rezultatov.

Stopnje deamidacije vzorcev iz prve skupine smo primerjali s tistimi, ki smo jih določili v vzorcih z a) denaturiranim/alkiliranim, in b) proteolitsko razgrajenim proteinom.

V drugi skupini, v kateri so bili vzorci mAb IgG1, pripravljene do alkilacije (vzorci 7-12) smo ugotovili, da je bila pod stresnimi pogoji inkubacije pri 37 °C stopnja deamidacije veliko višja, saj se je v 10 dneh razgradilo ~90% peptida LH27. Krivulja razgradnje je bila eksponentna. Prav tako je eksponentno je naraščal tudi obseg tvorbe variante izoaspartata LH27_N386iD (~55% v 10 dneh), medtem ko smo zaznali manjši obseg nastajanja variant

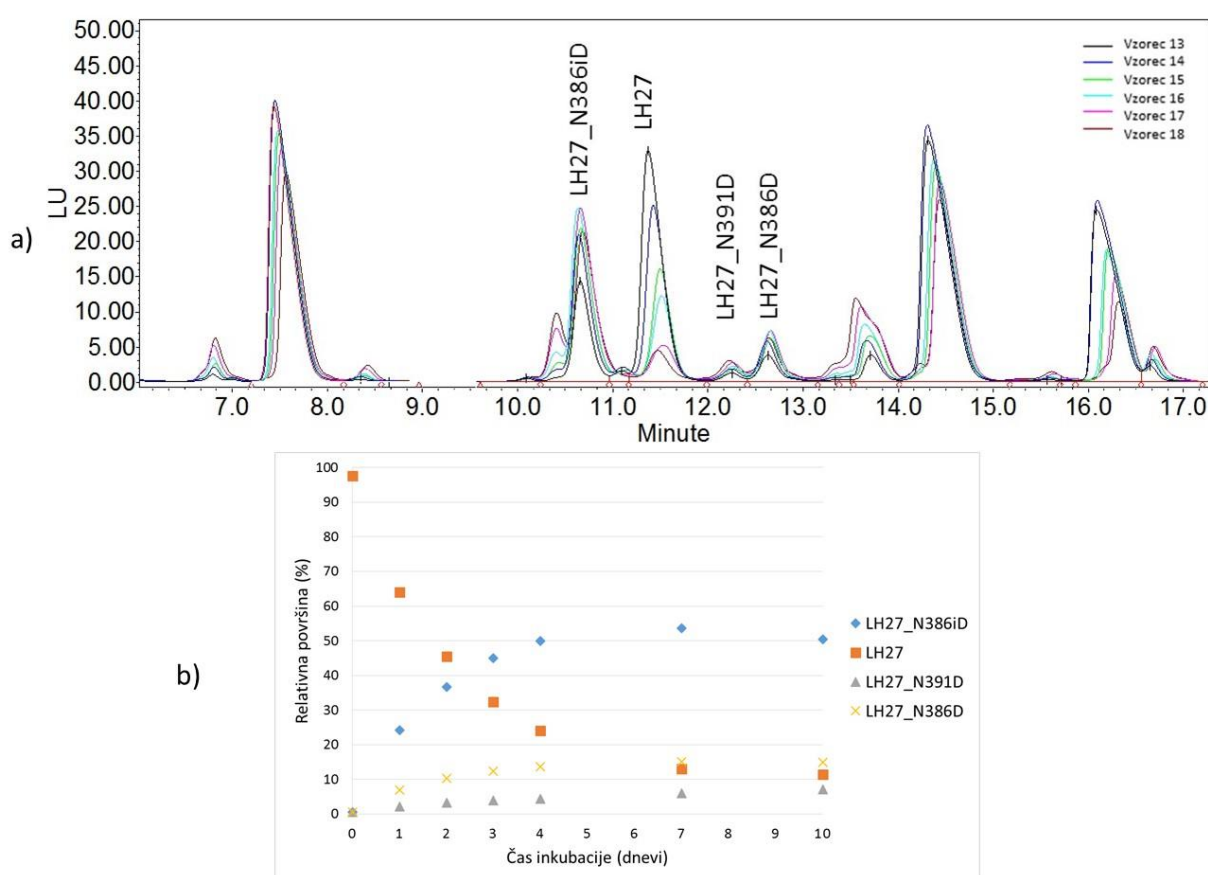
aspartata na deamidacijskih mestih 386 (~12%) in 391(~5%). Tvorba variant aspartata LH27_N386D in LH27_N391D pa se je v primerjavi z nativnim proteinom vseeno povečala. Opazili smo tudi pojav novega vrha (RT = 10,3 min) v kromatogramih vzorcev 9 - 12, ki ga pri analizi intaktnega proteina nismo zaznali. Tudi v tej skupini vzorcev smo najhitrejšo razgradnjo peptida PENNYK opazili tekom prvih štirih dni inkubacije (~70%). V nadaljnjih štirih dneh inkubacije pa se je ta varianta razgradila še za dodatnih 20%. Podoben trend smo opazili tudi pri tvorbi variante izoaspartata na deamidacijskem mestu 386 (LH27_N386iD), pri čemer jo je največ nastalo v krajšem časovnem okvirju, in sicer ~48% v prvih štirih dneh inkubacije (Slika 29).



Slika 29: Izsledki analiz skupine vzorcev proteina IgG1, pripravljenih do alkilacije: a) kromatogrami, in b) grafični prikaz rezultatov.

Stopnja deamidacije vzorcev terapevtskega mAb IgG1 po redukciji, alkilaciji in cepitvi proteina z encimom (tretja skupina) je bila podobna tisti, ki so smo jo pokazali v vzorcih po redukciji in alkilaciji IgG1. V 10 dneh se je tako razgradilo približno 90% peptida LH27, ponovno predvsem na račun tvorbe variante izoaspartata. Krivulja razgradnje peptida je bila eksponentna. Količina tvorjene variante izoaspartata na deamidacijskem mestu 386 (LH27_N386iD) pa je bila podobna tisti, ki smo jo izmerili v drugi skupini vzorcev (~50%).

Tudi v tretji skupini se je tvorilo manj aspartatnih variant peptida LH27 (Slika 30). Prav tako kot v skupini vzorcev, ki so vsebovali denaturiran/alkiliran protein, smo v kromatogramih opazili dodaten vrh pri RT = 10,3 min. Ta je izrazito narasel pri RT = 13,8 min, zaradi asimetričnega profila pa verjetno pripada več zvrstem, katerih količine naraščajo s časom (Slika 30). Glede na podobne kromatografske profile druge in tretje skupine lahko sklepamo, da ta vrh ne pripada modifikaciji peptida LH27, temveč spremembam v drugih delih molekule IgG1. Da bi ugotovili, ali vrh morda pripada modificiranemu peptidu LH27 ali kateremu drugemu peptidu, smo študijo kinetike razgradnje ponovili še na sintetičnem peptidu LH27. Rezultati so predstavljeni v naslednjem podpoglavju.



Slika 30: Izsledki analiz skupine vzorcev proteina IgG1, pripravljenih do cepitve z encimom: a) kromatogrami, in b) grafični prikaz rezultatov.

S poskusom smo prikazali uporabnost metode za stabilnostne študije deamidacije, ki lahko natančno in hitro podajo informacijo o kvaliteti in kvantiteti posameznih deamidacijskih produktov peptida PENNYK in posledično informacijo o kinetiki deamidacije IgG proteinov. Z našim poskusom smo tudi prispevali dodatna opažanja, da je deamidacija pravilno zvitega proteina počasnejša v primerjavi z denaturiranim ali proteolitsko razgrajenim proteinom, ki so v skladu s prejšnjimi študijami (16). Stopnja deamidacije na nivoju pravilno zvitega proteina

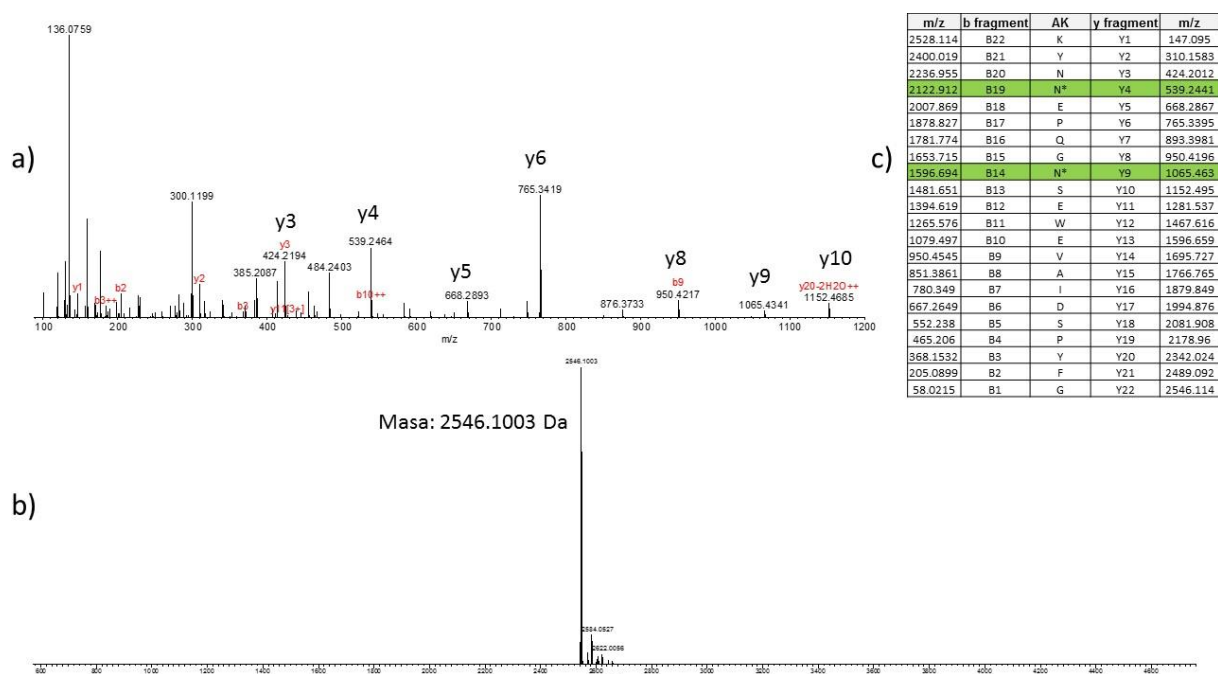
je manjša zaradi steričnega oviranja, saj na hitrost deamidacije vpliva njegova sekundarna struktura. Znano je, da α -vijačnice in β -lasnice stabilizirajo asparagin, zaradi česar je težje dostopen za interakcije z molekulami vode, ki so nujno potrebne za reakcijo deamidacije (1, 16, 23, 24).

Cepitev proteina z encimom do peptidov pospeši stopnjo deamidacije, saj so slednji dostopnejši za interakcije z molekulami vode kot nativni, pravilno zviti proteini. Tako smo že zgolj z inkubacijo preko noči izzvali 30% stopnjo deamidacije peptidov, medtem ko smo primerljiv obseg reakcije pri nativnem proteinu dosegli šele po 10-dnevni inkubaciji, kar je primerljivo z rezultati, o katerih so poročali Chelius in sod. (16).

Na stopnjo deamidacije, porazdelitev njenih produktov in nagnjenost peptidov k stranskim reakcijam, vpliva tudi primarno aminokislinsko zaporedje proteina, in sicer predvsem v nevtralnih in alkalnih pH-pogojih (22). Zaradi steričnega oviranja imajo na hitrost deamidacije največji vpliv sosednje aminokislinske. V nevtralnih in alkalnih razmerah reakcija poteka hitreje, če so na karboksilni strani asparagina prisotni manjši aminokislinski ostanki, še posebej glicinski, ki zaradi majhnega steričnega oviranja puščajo peptidno skupino odprto oz. dostopno za nukleofilni napad (1, 16, 23). Prav tako glicinski ostanki zaradi minimalnega steričnega vmešavanja še posebej hitro tvorijo sukcinimidni intermediat (22). Nasprotno pa se nastajanje sukcinimida in hitrost reakcije lahko zmanjša tudi za do 70-krat, kadar je aminokislina na karboksilni strani asparagina, za razliko od glicina, velika in razvejana. Za deamidacijsko najreaktivnejše zaporedje tako velja asparagin-glicin (1). Poleg steričnega oviranja, ki vpliva na hitrost tvorbe cikličnega sukcinimida, imajo tudi druge lastnosti aminokislin na C-terminalni strani precejšen vpliv na stopnjo deamidacije. Tako lahko npr. aminokislini histidin in serin, ki sta poleg glicina tudi zelo ugodni za tvorbo sukcinimida, stopnjo ciklične tvorbe imida povečata preko katalitičnih učinkov imidazolnega obroča in hidroksilnih skupin, ki jih vsebujeta (22). V nevtralnih in alkalnih pH-pogojih naj aminokislinski ostanki na amino terminalni strani asparagina na reakcijo ne bi imeli velikega vpliva (1). Prav tako naj v kislih pogojih tudi sama primarna sekvenca peptida ne bi imela vpliva na stopnjo deamidacije oz. na nastanek njenih produktov (22).

Razmerje obsegov nastanka deamidacijskih variant izoaspartata in aspartata na mestu 386 je bilo ~3:1, kar se ponovno sklada s podatki, ki jih v literaturi navajajo Chelius in sod. (16). Ugotovili smo, da se v vseh treh skupinah vzorcev to razmerje skozi celoten čas inkubacije ni spreminjalo.

Odkrili smo tudi razgradni produkt za peptid LH27, ki se pojavi samo v primeru pred inkubacijo denaturiranih in proteolitsko razgrajenih proteinov IgG1. Identiteto neznanega kromatografskega vrha smo preverili z masno spektrometrijo (Slika 31). Masa peptida, ki mu je vrh pripadal je bila za 2 Da večja od mase peptida PENNYK, zato sklepamo, da gre za produkt dvojne deamidacije, o katerem v svoji študiji poročajo tudi Sinha in sod. (24). Masni spekter se sklada z deamidacijo na položaju N386 in dodatno deamidacijo na mestu N391. Ker z metodo MS ne moremo razločiti med aspartatom in izoaspartatom, obstajajo 4 možne kombinacije dvojne deamidacije, in sicer: D/D, D/iD, iD/D, ali iD/iD. Glede na kinetiko nastajanja deamidiranih produktov (Slike 28 - 30 in Slika 32c) sklepamo, da gre za N386iD_N391D, kar pa bi morali potrditi z analizo ustreznega sintetičnega peptida.



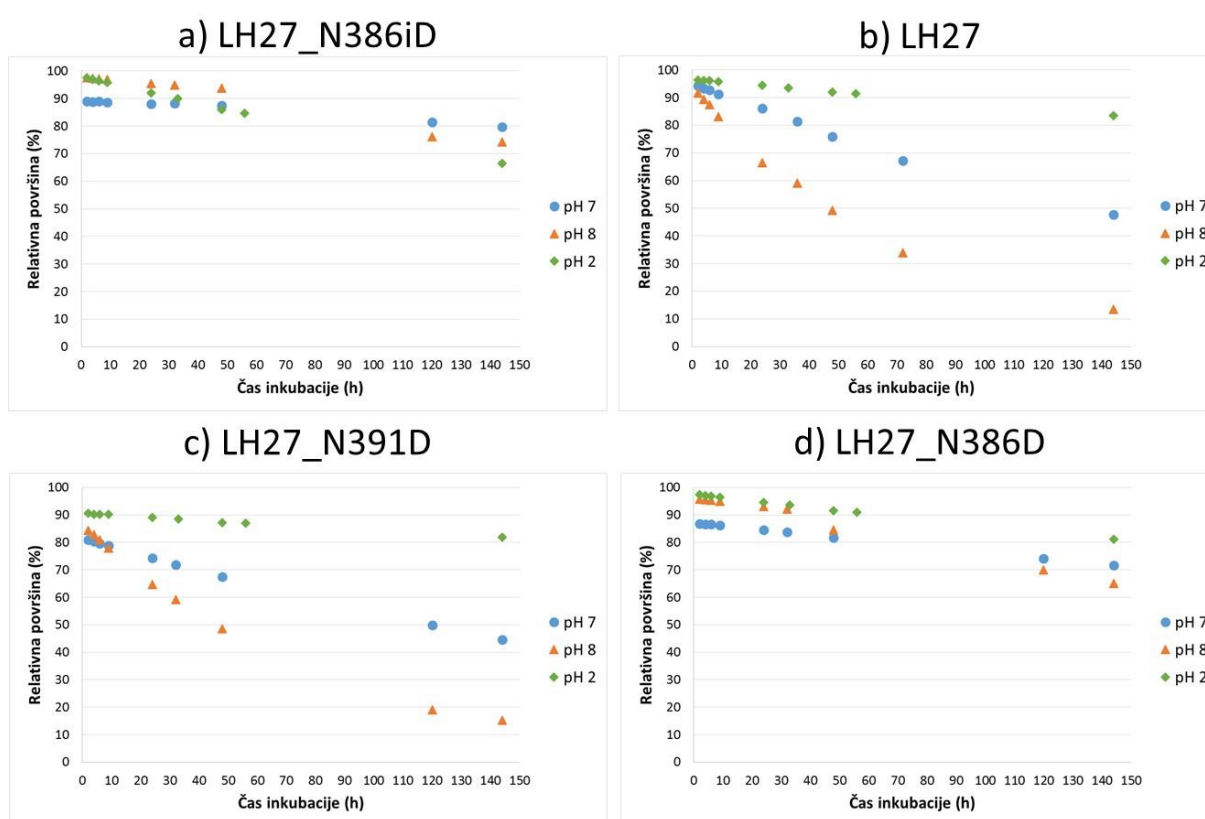
Slika 31: Masni spekter neznanega vrha, ki se je pojavil po inkubaciji denaturiranih in proteolitsko razgrajenih vzorcih proteina IgG1 (37 °C, pH = 8,0): a) MS/MS spekter vrh neznanega vrha; b) masni spekter (m/z) za neznan vrh; c) teoretične mase CID fragmentov za peptid LH27 z deamidacijo N386 in N391 (primerjaj s tabelo na Sliki 19e).

4.3.1.1 Kinetika deamidacije sintetičnih variant peptida LH27

Da bi potrdili identitete vrhov, ki izhajajo iz specifične razgradnje peptida LH27, ne pa drugih peptidov, smo v nadaljevanju spremljali kinetiko deamidacije z uporabo sintetičnih peptidov LH27, LH27_N386iD, LH27_N391 in LH27_N386D. Ob tem smo tudi preverjali, katera izmed variant peptida LH27 je najstabilnejša in katera najdovzetenjša za deamidacijo. Kinetiko deamidacije sintetičnih peptidov smo spremljali v krajših časovnih okvirjih kot v enakem poskusu z vzorci proteina IgG1. Glede na rezultate slednjega smo namreč sklepali, da

je peptid LH27 dovzetenjši za deamidacijo, in sicer predvsem v začetnih dneh inkubacije na 37 °C, saj smo največji obseg njegove razgradnje opazili v prvih štirih dneh.

Pripravili smo stresne vzorce variant peptidov LH27, LH27_N386iD, LH27_N391 in LH27_N386D pri treh vrednostih pH: pH = 2,0, pH = 7,0 in pH = 8,0. Iz raztopin posameznih peptidov s koncentracijami 1,3 mg/mL, smo pripravili raztopino, ki je vsebovala 290 µL delovne raztopine in 10 µL raztopine posameznega peptida. Za delovne raztopine smo uporabili 50 mM raztopino glicin-HCl s pH = 2,0, 50 mM raztopino natrijevega citrata s pH = 7,0 in 50 mM raztopino tris-HCl s pH = 8,0. Nato smo, v odvisnosti od časa, analizirali čistost posameznega vrha tako, da smo primerjali % relativnih površin posameznih vrhov.

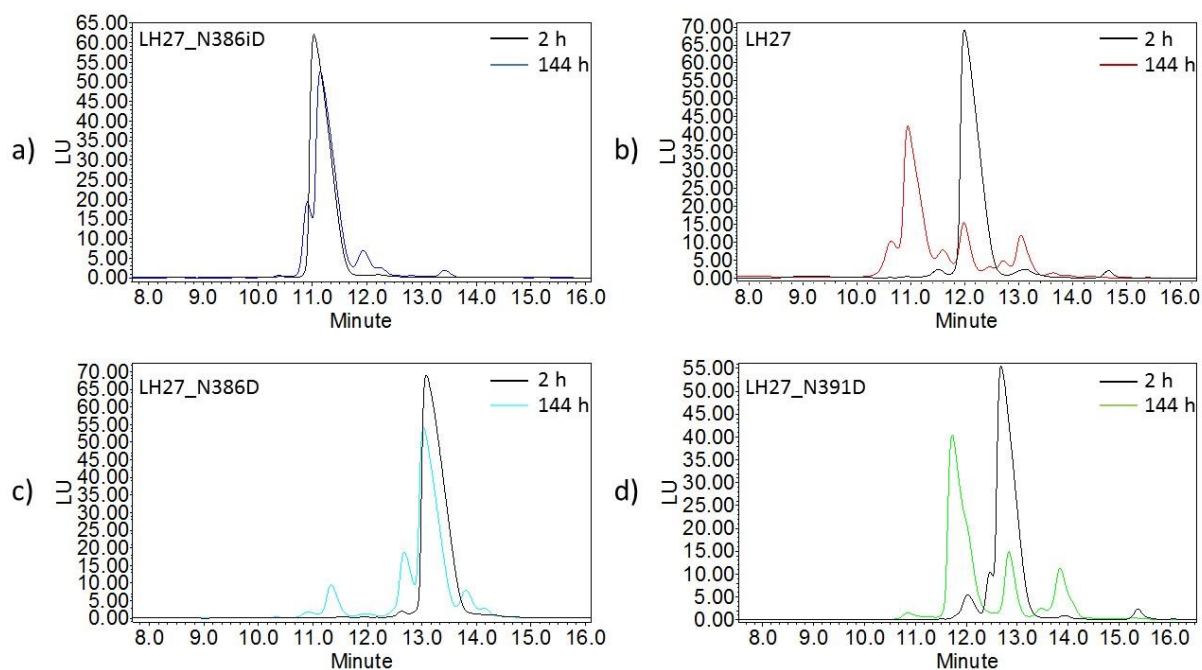


Slika 32: Rezultati spremljanja kinetike deamidacije sintetičnih variant peptida LH27.

Ugotovili smo, da je bila od vseh variant, ki smo jih preučevali v okviru kinetične študije najstabilnejša izoaspartatna oblika (LH27_N386iD). Kot najdovzetenjši za deamidacijo pa sta se izkazali varianti LH27 in LH27_N391D. V 144 urah inkubacije (37 °C) pri pH 8,0 se je razgradilo približno 85%, pri pH = 7,0 pa približno 45% peptida LH27. Kinetika deamidacije peptida LH27_N391D je bila podobna, saj se je v 144 urah inkubacije površina njegovega vrha zmanjšala za 85% pri pH = 8,0 in za 55% pri pH = 7,0. Varianti LH27_N386iD in

LH27_N386D sta bili bolj stabilni. Najobstojnejša je bila varianta LH27_N386iD, ki se je pri pH = 8,0 razgradila za 25%, pri pH = 7,0 pa za 20% (Slika 32).

Slika 33 prikazuje vrhove glavnih produktov deamidacije vsakega od preučevanih štirih sintetičnih peptidov, in sicer po 2 in 144 urah inkubacije na 37 °C.



Slika 33: Kromatogrami, ki prikazujejo vrhove glavnih razgradnih produktov vsakega od štirih sintetičnih peptidov variant peptida LH27 po 2 in 144 urah inkubacije na 37 °C.

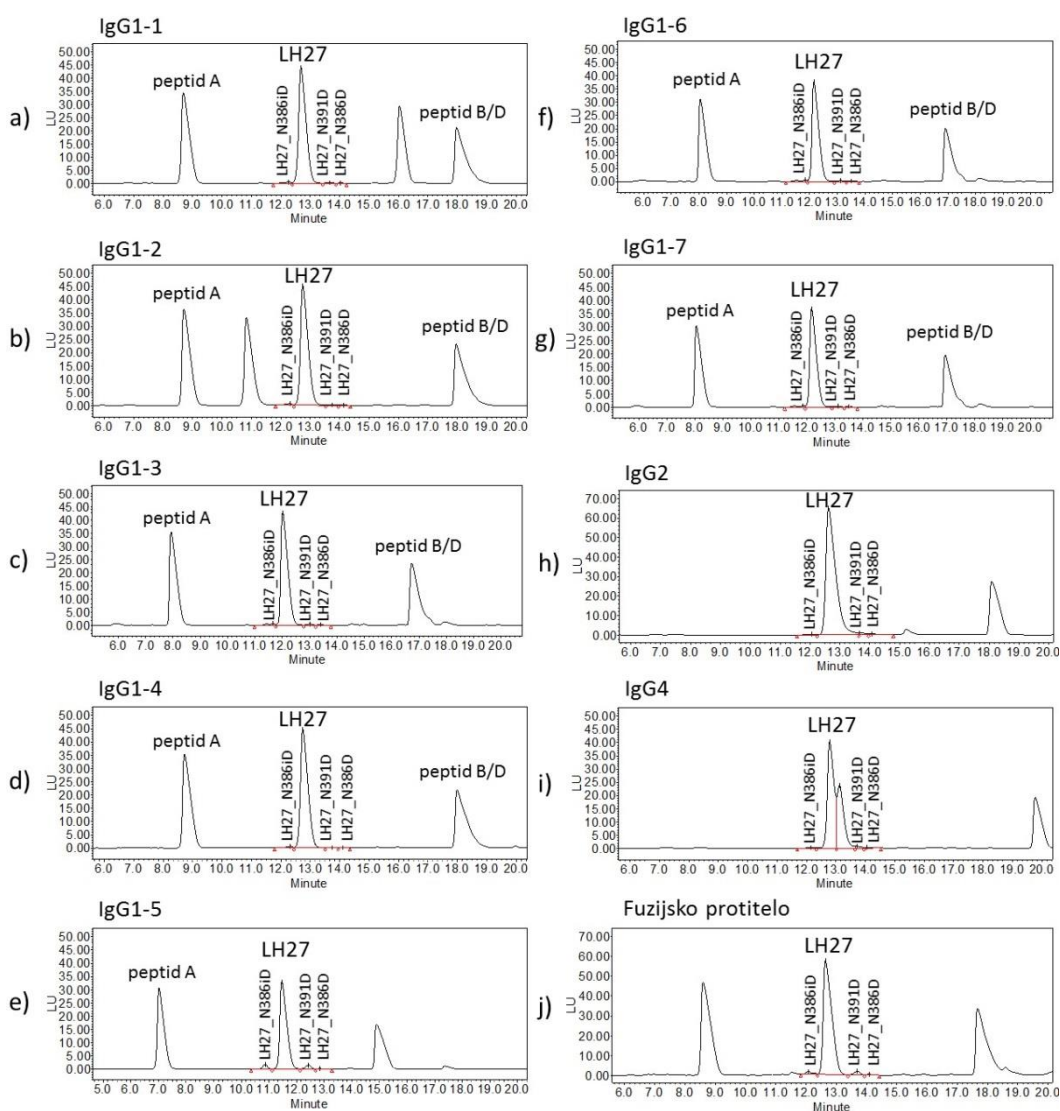
Vrednost pH torej vpliva na hitrost, mehanizem in lokacijo deamidacije. Pri zelo kislem pH (od 1,0 do 2,0) je deamidacija asparagina počasnejša in vključuje neposredno hidrolizo, zato ne poteka preko cikličnega imida (1, 22, 23). V območju pH od 2,0 do 5,0 je asparagin najbolj stabilen, v območju med pH = 5,0 in pH = 12,0, ki predstavlja najpogosteje uporabljene pogoje shranjevanja mAb IgG v formulacijskih pufrih, pa poteče hitrejša reakcija deamidacije preko cikličnega intermedijata sukcinimida. Deamidacija je katalizirana reakcija, zato se njena hitrost spreminja tudi zaradi različnih koncentracij in vrst uporabljenih pufrov, kar je lahko pomemben dejavnik pri načrtovanju farmacevtskih oblik (1). Stopnja deamidacije se občutno zmanjša v pufrih z nizko dielektrično močjo (16).

Z našimi poskusi smo uspeli prikazati uporabnost nove kromatografske metode za študije kinetike deamidacije modelnega proteina IgG1, in sicer tako na nivoju intaktnega proteina, kar je pomembno za stabilnostne študije (npr. študije formulacij), kot tudi na nivoju sintetičnih peptidov, kjer smo odkrili nov produkt reakcije deamidacije, ki v literaturi še ni bil opisan. Izsledki preliminarnih kinetičnih študij deamidacije, ki smo jih izvedli in opisali,

potrjujejo doslej znane izsledke, in sicer: a) da je deamidacija hitrejša na nivoju peptidov, b) da je tvorba izoaspartata 3x hitrejša od tvorbe aspartata, in c) da je deamidacija peptida PENNYK hitrejša pri višjih vrednostih pH.

4.3.2 Generičnost nove metode

Peptid LH27 se nahaja v vseh konstantnih področjih Fc mAb, zato smo novo metodo, z namenom platformske uporabe, testirali tudi na drugih mAb iz podrazredov IgG1 (7 primerov), IgG2 in IgG4, ter na fuzijskem protitelesu (Slika 34). Fuzijski protein je običajno zgrajen iz konstantnega, Fc predela protitelesa, ki je kovalentno vezan na drug protein. Zaradi sorodnega delovanja fuzijske proteine uvrščamo med mAb, zato smo pričakovali podobne kromatografske profile (1, 37).



Slika 34: Rezultati testiranja nove kromatografske metode na mAb podrazredov IgG1 (a - g), IgG2 (h) in IgG4 (i) ter na fuzijskem proteinu (j).

V vseh sedmih vzorcih različnih mAb IgG1 smo opazili vrh peptida LH27 s primerljivimi površinami, ter manjše vrhove, ki pripadajo deamidiranim variantam LH27 (Slika 34 a-g). Opazili smo, da je bil poleg vrha LH27, v analiziranih vzorcih vseh sedmih mAb IgG1 prisoten še vrh peptida A, ki je prav tako ohranjen v vseh molekulah IgG. Prav tako smo opazili prisotnost vrha peptida B/D v vseh vzorcih mAb IgG1, razen v IgG1-5. Površini vrhov peptida LH27 v vzorcu mAb IgG2 (Slika 34h) in vzorcu fuzijskega proteina (Slika 34j) sta bili približno 2x večji od tistih, ki smo jih določili v ostalih mAb (Preglednica XXXI), zato smo sklepali na morebitno ko-elucijo dodatnega peptida z LH27. Zaključili smo, da metoda ni uporabna za določanje obsega deamidacije v teh vrstah proteinov. V kromatogramu vzorca mAb IgG4 (Slika 34i) smo v elucijskem oknu peptida LH27 opazili dvojni vrh in zato sklepali, da se je peptid LH27 ko-eluiral z drugim peptidom, zato ta analizna metoda ni uporabna za določanje deamidacije v molekulah IgG4. Zaključimo lahko, da je nova metoda uporabna za določanje obsega deamidacije peptida LH27 v mAb tipa IgG1, ne pa tudi v ostalih podrazredih mAb IgG in v fuzijskih proteinih. Ker so mAb IgG1 najbolj razširjene molekule v terapevtski uporabi, menimo, da ima nova analizna metoda, ki smo jo razvili velik potencial za široko uporabo.

Preglednica XXXI: Površine vrha LH27 pri testiranju generičnosti nove kromatografske metode

| Vzorec mAb | Površina LH27 (uV*sec) | Vzorec mAb | Površina LH27 (uV*sec) |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| IgG1-1 | 768.220.569 | IgG1-6 | 605.689.464 |
| IgG1-2 | 804.918.269 | IgG1-7 | 630.614.342 |
| IgG1-3 | 749.232.088 | IgG2 | 1.475.326.539 |
| IgG1-4 | 782.478.815 | IgG4 | 631.682.729 |
| IgG1-5 | 575.104.162 | Fuzijsko protitelo | 1.140.479.452 |

5 SKLEPI

Razvili smo novo metodo peptidnega kartiranja za kvantitativno določanje deamidacije v terapevtskih mAb podrazreda IgG1. Ker se izmed štirih asparaginskih mest v tipičnem terapevtskem proteinu IgG, ki so potencialne tarče deamidacije, kar dve nahajata v peptidu PENNYK, smo se osredotočili prav na njegovo detekcijo, saj predstavlja reporterski peptid za obseg deamidacije v molekuli.

Ugotovili smo, da je za uspešno ločbo peptida PENNYK od ko-eluirajočega peptida C potrebna uporaba pentafluoropropionske kisline (PFPA) kot organskega modifikatorja, s katerim ju lahko uspešno kromatografsko ločimo in tako omogočimo kvantifikacijo deamidiranih peptidnih variant. Uporabiti smo morali gradient z naklonom 0,23% MFB/min, ki je bil 2x položnejši kot pri izhodiščni metodi peptidnega kartiranja (0,46% MFB/min), s čimer smo dosegli območje 22 - 26% MFB/min, v katerem se je eluiral peptid PENNYK. Najvišjo intenziteto signala smo dobili s fluorescenčno detekcijo. Na ta način smo lahko detektirali peptid PENNYK, ker vsebuje aromatske aminokislino. Za rutinsko uporabo metode je zelo pomembna ugotovitev, da so bili med pripravo, shranjevanjem in analizo HPLC, vzorci in reagenti stabilni in niso vplivali na analitske rezultate. Obenem smo dokazali tudi njeno ustreznost in robustnost. Pri vrednotenju rezultatov smo si pomagali z retencijskimi časi sintetičnih peptidov, katerih mešanico smo dodali v vsako sekvenco. Poleg tega, da smo jih uporabljali kot referenčne standarde, so nam služili tudi za kontrole.

Nestabilnost molekule IgG, ki je posledica deamidacije je pravzaprav normalen biološki proces, vendar pa je zelo pomembno, da jo spremljamo in nadzorujemo, saj vpliva na aktivnost in imunogenost terapevtskih mAb. Prav tako je zelo pomembno, da poznamo tudi kinetiko deamidacije, saj lahko na ta način ocenimo izpostavljenost bolnikov posttranslacijskim modifikacijam (PTM) rekombinantnih terapevtskih mAb in ustrezno izpostavimo kritičnost te okoliščine. Potrdili smo, da sta stopnja in hitrost deamidacije manjši v pravilno zvitem proteinu, v primerjavi z njegovo denaturirano ali proteolitsko razgrajeno obliko, kar je zelo pomembno z vidika same formulacije, pa tudi shranjevanja učinkovine.

Naša nova analizna metoda je selektivna za tarčno sekvenco peptida PENNYK in je visoko občutljiva za določanje njegovih deamidiranih variant v terapevtskih mAb vrste IgG1, poleg tega pa bistveno krajša od drugih, trenutno razpoložljivih metod. Zato predstavlja visoko zmogljivo analizno metodo za identifikacijo in karakterizacijo terapevtskih mAb. Primerna je torej za določanje obsega deamidacije v molekulah IgG1, ne pa tudi v molekulah drugih

podrazredov IgG in v fuzijskih proteinih, ki vsebujejo fragmente Fc IgG. Uporabna je tako pri razvoju novih terapevtskih molekul razreda IgG1, kot tudi pri sami formulaciji in shranjevanju učinkovine, poleg tega pa tudi pri rutinski kontroli kakovosti oz. nadzoru stabilnosti tovrstnih bioloških zdravil.

6 LITERATURA

1. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana 2007: 4-24, 114-132, 136-151, 189-192, 532-543
2. Dragoš M: O pravilni in varni uporabi zdravil: Biološka zdravila. In: Kaj so biološka zdravila in kako delujejo. Lekarniška zbornica Slovenije, Ljubljana 2013, 2-7
3. Vozelj M: Temelji imunologije. Državna založba Slovenije, Ljubljana 2000, 47-73
4. Walsh G: Biopharmaceuticals: Biochemistry and biotechnology. 2. izdaja, West Sussex: John Wiley, 2003, 409-412
5. Irani V, Guy AJ, Andrew D, Beeson JG, Ramsland PA, Richards JS: Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Molecular Immunology* 2015, 67, 171-182
6. Liu L: Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *J Pharm Sci* 2015, 104, 1866-1884
7. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T: IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 2014, 5, 520
8. Correlá I: Stability of IgG isotypes in serum. *Landes Bioscience* 2010, mAbs 2:3, 221-232
9. Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Batty D: Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol* 2009, 157, 220-233
10. Rodney B: Temelji Biokemije. Študentska založba, Ljubljana 2005, 320-325
11. Du Y, Walsh A, Ehrick R, Xu W, May K, Liu H: Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies. *mAbs* 2012, 4, 578-585
12. Khawli LA, Goswami S, Hutchinson R, Kwong ZW, Yang J, Wang X, Yao Z, Sreedhara A, Cano T, Tesar D, Nijem I, Allison DE, Wong PY, Kao Y, Quan C, Joshi A, Harris RJ, Motchnik P: Charge variants in IgG1. *mAbs* 2010, 2, 613-624
13. Walsh G, Jefferis R: Posttranslational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature Biotechnology* 2006, 24, 1241-1252

14. Jenkins N, Murphy L, Tyler R: Posttranslational Modifications of Recombinant Proteins: Significance for Biopharmaceuticals. *Mol Biotechnol* 2008, 39 (2), 113-118
15. Walsh G: Post-translational modifications of proteins biopharmaceuticals. *Drug discovery Today* 2010, 15 (17/18), 1359-6446
16. Chelius D, Rehder DS, Bondarenko PV: Identification and Characterization of Deamidation Sites in Conserved Regions of Human Immunoglobulin Gamma Antibodies. *Anal. Chem.* 2005, 77 (18), 6004-6011
17. Yan B, Valliere-Douglass J, Brady L, Steen S, Han M, Pace D, Elliot S, Yates Z, Han Y, Balland A, Wang W, Pettit D: Analysis of post-translational modifications in recombinant monoclonal antibody IgG1 by reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2007, 1164, 153–161
18. Liu D, Ren D, Huang H, Dankberg Jm Rosenfeld R, Cocco MJ, Li L, Brems DN, Remmele Jr RL: Structure Stability Changes of Human IgG1 Fc as a Consequence of Methionine Oxidation. *Biochemistry* 2008, 47 (18), 5088-5100
19. Pace AL, Wong RL, Zhang YT, Kao YH, Wang YJ: Asparagine Deamidation Dependence on Buffer Type, pH and Temperature. *J Pharm Sci* 2013, 102 (6), 1712-1723
20. Robinson NE, Robinson AB: Prediction of protein deamidation rates from primary and three-dimensional structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98 (8), 4367-4372
21. Carlson E, Kil Y, Becker C: Asparagine Deamidation Quantified by Byologic. Protein metrics inc. 2015. http://www.proteinmetrics.com/wp-content/uploads/2014/02/AppNote-PTM-Analysis_N-Deamidation-Quant.pdf (28.06.2017)
22. Patel K, Borchardt RT: Chemical Pathways of Peptide Degradation. II. Kinetics of Deamidation of an Asparaginylyl Residue in a Model Hexapeptide. *Pharmaceutical Research* 1990, 7 (7), 703-711
23. Patel K, Borchardt RT: Chemical Pathways of peptide degradation. III. Effect of Primary Sequence on the Pathways of deamidation of Asparaginylyl Residues in Hexapeptides. *Pharmaceutical Research* 1990, 7 (8), 787-793

24. Sinha S, Zhang L, Duan S, Williams TD, Vlasak J, Ionescu R, Topp EM: Effect of protein structure on deamidation rate in the Fc fragment of an IgG1 monoclonal antibody. *Protein science* 2009, 18 (8), 1573-1584
25. Capasso S: Estimation of the deamidation rate of asparagine side chains. *J. Peptide Res.* 2000, 55 (3), 224-229
26. Oliyai C, Borchardt RT: Chemical pathways of peptide degradation. IV. Pathways, kinetics, and mechanism of degradation of an aspartyl residue in a model hexapeptide. *Pharmaceutical Research* 1993, 10 (1), 95– 102
27. Kuhelj R: *Biokemija v praksi: načela in tehnike*. 3. izdaja, Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2003, 38-50
28. Fekete S, Veuthey JL, Guillarme D: New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: Theory and applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2012, 69, 9-27
29. Swartz M, Krull I: *Validation and Peptide Mapping*. LCGC North America 2007, 25 (5), 468-475
30. Dick Jr. LW, Mahon D, Qiu D, Cheng KC: Peptide mapping of therapeutic monoclonal antibodies: Improvements for increased speed and fewer artifacts. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009, 877 (3), 230-236
31. Terashima I, Koga A, Nagai H: Identification of deamidation and isomerization sites on pharmaceutical recombinant antibody using H218O. *Analytical Biochemistry* 2007, 368 (1), 49-60
32. Gaza-Bulsecu G, Li B, Bulsecu A, Liu H: Method to Differentiate Asn Deamidation That Occurred Prior to and during Sample Preparation of a Monoclonal Antibody. *Analytical Chemistry* 2008, 80 (24), 9491-9498
33. Shibue M, Mant CT, Hodges RS: Effect of anionic ion-pairing reagent hydrophobicity on selectivity of peptide separations by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2005, 1080 (1), 68-75
34. Choikhet K, Glatz B, Rozing G: *The Physicochemical Causes of Baseline Disturbances in HPLC, Part I – TFA-Containing Eluents*. LG GC Europe, februar 2003

35. http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/ec00494d-f2e4-4243-92b1-4450653ac623/article-45019.pdf (28.06.2017)
36. Teale FWJ, Weber G: Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acids. *Biochemical Journal* 1957, 65 (3), 476–482
37. Czajkowsky DM, Hu J, Shao Z, Pleass RJ: Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives. *EMBO Molecular Medicine* 2012, 4 (19), 1015-1028