

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA LEVEC

RAZVOJ HITRE KROMATOGRAFSKE METODE ZA DOLOČANJE STOPNJE
OKSIDIRANOSTI TERAPEVTSKEGA MONOKLONSKEGA PROTITELESA

FAST CHROMATOGRAPHIC METHOD DEVELOPMENT FOR DETERMINATION
OF OXIDATION IN THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODY

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala v podjetju Lek d.d. pod mentorstvom izr. prof. dr Matjaža Jerasa in somentorice dr. Petre Kozjak. Vse meritve so bile izvedene v raziskovalnem laboratoriju Biofarmaceutike Mengeš. Na tem mestu bi se, poleg mentorju in somentorici, rada zahvalila tudi sodelavcema, ki sta me s svojim strokovnim znanjem usmerjala proti končnemu cilju, in sicer dr. Tilnu Praperju in dr. Matjažu Kračunu. Zahvaljujem se tudi dr. Nini Pirher, ki je izvedla identifikacije z masnim spektrometrom.

Izjava:

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja izr. prof. dr Matjaža Jerasa in somentorice dr. Petre Kozjak.

Ana Levec

Ljubljana, september 2016

Predsednik komisije: prof. dr. Janko Kos

Član komisije: doc. dr. Žiga Jakopin

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Biološka zdravila.....	1
1.1.1	<i>Podobna biološka zdravila.....</i>	2
1.1.2	<i>Zgradba protiteles.....</i>	4
1.2	Posttranslacijske modifikacije.....	8
1.2.1	<i>Nastanek PTM.....</i>	9
1.2.2	<i>Oksidacija protiteles.....</i>	10
1.2.3	<i>Oksidacija metioninskih ostankov.....</i>	11
1.2.4	<i>Vpliv oksidacije metioninskih ostankov na farmakokinetiko.....</i>	14
1.2.5	<i>Metode za detekcijo oksidacije metioninskih ostankov.....</i>	16
2	NAMEN DELA.....	21
3	MATERIALI IN METODE.....	23
3.1	Materiali.....	23
3.1.1	<i>Priprava delovnih standardov.....</i>	23
3.1.2	<i>Priprava vzorcev za analizo z ALC.....</i>	23
3.1.3	<i>Priprava vzorcev za peptidno kartiranje.....</i>	24
3.2	Metode.....	25
3.2.1	<i>Afinitetna kromatografija.....</i>	25
3.2.2	<i>Peptidno kartiranje.....</i>	27
4	REZULTATI.....	29
4.1	Začetne analize.....	29
4.1.1	<i>Peptidno kartiranje.....</i>	29
4.1.2	<i>Analiza ALC.....</i>	31

4.2	Razvoj hitre analizne metode ALC	33
4.2.1	<i>Gradient</i>	33
4.2.2	<i>Pretok skozi kolono</i>	41
4.2.3	<i>Temperatura kolone</i>	43
4.2.4	<i>Spreminjanje vrednosti pH mobilnih faz A in B</i>	44
4.2.5	<i>Razvoj nadaljnjih dveh novih metod</i>	47
4.2.6	<i>Preverjanje ustreznosti nove analizne metode za rutinsko uporabo</i>	49
5	RAZPRAVA.....	61
6	SKLEPI.....	67
7	LITERATURA	69
7.1	Reference za slike.....	72

POVZETEK

Biološko zdravilo je proizvod, ki ga z uporabo različnih biotehnoloških metod (npr. rekombinantna DNA) bodisi ekstrahiramo iz različnih bioloških virov, npr. ljudi, živali, mikroorganizmov ali pa ga v njih proizvedemo.

Sodobne medicine si dandanes brez uporabe bioloških zdravil ne moremo predstavljati. Uporabljajo se za zdravljenje raka, infektivnih bolezni, avtoimunskih bolezni (npr. revmatoidni artritis, psoriaza), kardiovaskularnih obolenj, bolezni krvi ter genskih in nevroloških motenj (npr. multipla skleroza).

Med novimi zdravili v razvoju delež bioloških zdravil vztrajno narašča, saj predstavljajo 20-40 % vseh, ki vstopijo na trg. Največji del med njimi predstavljajo monoklonska rekombinantna protitelesa, ki jih v različnih ekspresijskih sistemih (predvsem v CHO celicah) razvijamo s pomočjo rekombinantne tehnologije.

Med razvojem le-teh pa prihaja do nastanka post-translacijskih modifikacij, in sicer na različnih stopnjah razvoja končnega produkta: med proizvodnjo, čiščenjem, formulacijo in shranjevanjem. Med post-translacijske modifikacije, ki lahko vplivajo na strukturo končnega protitelesa in s tem na njegovo življenjsko dobo v serumu, imunogenost in biološko funkcijo, sodi tudi oksidacija. Ta lahko pomembno spremeni učinkovitost in varnost zdravila.

Za določanje oksidacije monoklonskih protiteles najpogosteje uporabljamo analitsko metodo peptidnega kartiranja. Čeprav je metoda občutljiva, točna in natančna, pa je tudi časovno zamudna in tehnično zahtevna.

Zaradi tega je bil cilj naše naloge razvoj hitrejše kromatografske metode, natančneje protein A afinitetne kromatografije. Med razvojem metode smo optimizirali več dejavnikov, in sicer: temperaturo kolone, pretok, gradient in pH elucijskega pufra. Uspešno smo razvili kratko (9-minutno) in enostavno metodo, s katero lahko učinkovito ločujemo oksidirana monoklonska protitelesa od neoksidiranih. V primerjavi z metodo peptidnega kartiranja je naša metoda hitrejša in tehnično enostavnejša, saj ne zahteva dodatne predhodne priprave vzorca (razgradnje, alkilacije, inkubacije). Z njo lahko zaznamo nizke stopnje oksidacije, ki so značilne za proteinski produkt v različnih fazah čiščenja in ostalih razvojnih fazah (npr. pri formulaciji) in jo zato lahko v rutinko prakso uvedemo kot presejalno metodo.

Ključne besede: monoklonsko protitelo, oksidacija metioninskih ostankov, peptidno kartiranje, afinitetna kromatografija.

SUMMARY

Biopharmaceuticals are biotechnological products extracted from or synthesized in various biological sources such as animals, microorganisms or humans.

They are crucial in contemporary medicine, as they are used to treat serious diseases such as cancer, infectious, autoimmune (e.g. rheumatoid arthritis, psoriasis) and cardiovascular diseases, as well as blood, genetic and neurological disorders (e.g. multiple sclerosis).

Among new drugs being developed the percentage of biopharmaceuticals is increasing. Actually, 20-40 % of new drugs entering the market are biopharmaceuticals. Monoclonal antibodies represent major part of all biopharmaceuticals on the market. They are produced by recombinant technology in different expression systems, most commonly by CHO cells.

Biopharmaceuticals are susceptible to various post-translational modifications which can occur during the production, purification, formulation or storage of therapeutic proteins. They can alter shelf-life and cause structural changes of monoclonal antibodies, thereby contributing to increased immunogenicity and changes of biological functions of therapeutic proteins. One of the frequent modifications is oxidation which can alter both the efficiency as well as safety of biological drug products.

The most widely used analytical method for determination of monoclonal antibody oxidation is peptide mapping. Although this method is sensitive, accurate and precise it requires a lot of time and technical expertise (time and labour intensive analytical method).

Therefore the aim of this study was to develop a faster method for determination of oxidation by chromatographic method based on protein A affinity chromatography. During the method development we have optimized several parameters such as: column temperature, gradient as well as flow and pH of elution buffer. We have successfully developed a short (9 min) and simple chromatographic method that allows us to differentiate between oxidized and un-oxidized monoclonal antibodies. In comparison to peptide mapping method it is faster and more user-friendly, as no additional sample preparation steps (such as digestion, alkylation, incubation) are needed and can thus be easily introduced into routine practice. Additionally, it allows us to detect low oxidation levels that occur during monoclonal antibody development and purification processes and can therefore be used as a screening method.

Key words: monoclonal antibody, methionine oxidation, peptide mapping, affinity chromatography.

SEZNAM OKRAJŠAV

Ag: antigen

ALC: afinitetna tekočinska kromatografija

AU: absorbanca

C_H: konstantna domena težke verige

C_L: konstantna domena lahke verige

DPBS: fosfatni pufer s soljo oz. Duplecco fosfatni pufer s soljo

EMA: Evropska agencija za zdravila

Fab: variabilni del protitelesa, ki prepozna in veže specifičen antigen

Fc: kristalizajoči del protitelesa, ki je odgovoren za efektorske funkcije

FcRn: neonatalni receptor

Ig: imunoglobulin

LC-MS: tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektroskopijo

mAb: monoklonsko protitelo; mAb_{ox}: oksidirano monoklonsko protitelo

MF: mobilna faza; MFA: mobilna faza A; MFB: mobilna faza B

MS: masna spektrometrija

Met: metionin; MetOx: oksidacija metioninov

PepMap: peptidno kartiranje

PTM: post-translacijska modifikacija

QCS: vzorec, s katerim zagotovimo, da je sekvenca veljavna in rezultati zanesljivi

ROS: reaktivne kisikove zvrsti

RT: retencijski čas

V_H: variabilna domena težke verige

V_L: variabilna domena lahke verige

SEZNAM SLIK

Slika 1: Razdelitev bioloških zdravil glede na način njihovega pridobivanja; prirejeno po (1).	1
Slika 2: Svetovni trg bioloških zdravil (v milijardah USD); povzeto po (2).....	2
Slika 3: Rast trga podobnih bioloških zdravil v milijonih USD (v statistiko so bili vključeni le produkti, ki ustrezajo regulatornim zahtevam, ki jih je za biološko podobna zdravila vzpostavila EMA); povzeto po (3).	3
Slika 4: Primerjava velikosti in kompleksnosti strukture male molekule in molekule protitelesa; povzeto po (4).	4
Slika 5: Struktura protitelesa; povzeto po (referenci 4 navedeni pod Literaturo in referenci 5 navedeni pod Referencami za slike).	5
Slika 6: Shematski prikaz različnih mehanizmov delovanja protiteles, povzeto po (6).....	6
Slika 7: Štiri osnovne vrste terapevtskih monoklonskih protiteles; povzeto po (7).	7
Slika 8: Nastanek/proizvodnja himernega terapevtskega mAb; povzeto po (8).	8
Slika 9: Vpliv posttranslacijskih modifikacij na lastnosti mAb, prirejeno po (9).	9
Slika 10: Prikaz potencialnih mest na molekuli protitelesa, ki so dovzetna za nastanek PTM, povzeto po (10).	10
Slika 11: Vrste kisikovih zvrsti (ROS), ki delujejo kot oksidanti, prirejeno po (11).	11
Slika 12: Osidacije metioninskih ostankov; povzeto po (12).	12
Slika 13: Peptidna veriga (sekundarna struktura) strukturnega dela Fc molekule človeškega IgG1; povzeto po (13).	12
Slika 14: Shematski prikaz interakcije predela Fc z FcRn; povzeto po (14).....	15
Slika 15: Rezultati afinitetne kromatografije za mAb, ki so bila 3 leta shranjena pri različnih pogojih; povzeto po (15).	16
Slika 16: Interakcija fragmenta B proteina A s področjem Fc molekule IgG; povzeto po (16).	17
Slika 17: Shematski prikaz poteka afinitetne tekočinske kromatografije, povzeto po (17).18	

Slika 18: Kromatogram ALC (a) in histogram rezultatov, pridobljenih s PepMap-MS (b); povzeto po (18).....	20
Slika 19: Prikaz načina integracije za vzorec QCS.	27
Slika 20: Kromatograma PepMap oksidiranega (moder) in neoksidiranega (črn) vzorca monoklonskega protitelesa podrazreda IgG1.	30
Slika 21: Kromatograma MS oksidiranega (moder) in neoksidiranega (rdeč) vzorca monoklonskega protitelesa podrazreda IgG1.	30
Slika 22: Kromatogram detekcije obsega oksidacije molekule IgG2 s klasično daljšo ALC metodo.	32
Slika 23: Kromatogram ALC, L-metionin, metoda B, IgG2.....	33
Slika 24 Kromatogram ALC, DPBS pufer, metoda A, IgG2.	33
Slika 25: Kromatogram ALC pridobljen z metodo C.....	35
Slika 26: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo Č.....	36
Slika 27: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo D.....	36
Slika 28: Kromatogram ALC, sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo E.	38
Slika 29: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo F.	38
Slika 30: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo G.....	39
Slika 31: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo H.....	40
Slika 32: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I.	40
Slika 33: Kromatogram ALC, sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I pri, pretoku 2,5 mL/min.	41
Slika 34: Kromatogram ALC, sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I, pri pretoku 1 mL/min.	41
Slika 35: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I, pri pretoku 0,7 mL/min.	42
Slika 36: Kromatogram ALC, sestavljena vzorca, 1mL/min, podaljšan čas.....	43

Slika 37: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I, pri temperaturi kolone 37 °C.	44
Slika 38: Primerjava kromatografskih ločb istih sestavljenih vzorcev pri 25 in 37 °C.	44
Slika 39: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I pri vrednosti pH MFB = 2.	45
Slika 40: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I, pri vrednosti pH = 2,6.	45
Slika 41: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I pri vrednostih pH MFB = 3.	46
Slika 42: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I in vrednostjo pH MFA = 6,2.	47
Slika 43: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo J.	48
Slika 44: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo K.	48
Slika 45: Kromatogram vzorcev uporabljenih za ugotavljanje linearnosti odzivov.	51
Slika 46: Graf, ki prikazuje razmerje med izmerjenimi površinami oksidiranih vrhov in teoretičnimi vsebnostmi oksidiranih oblik mAb v testiranih vzorcih.	51
Slika 47: Prikaz prekrivanja kromatogramov, pridobljenih pri poskusu ugotavljanja ponovljivosti priprave vzorcev.	52
Slika 48: Primerjava rezultatov meritev vzorcev peptida LH30 z metodama PepMap in ALC.	53
Slika 49: Primerjava rezultatov meritev vzorcev peptida LH15 z metodama PepMap in ALC.	54
Slika 50: Primerjava rezultatov meritev vzorcev peptida LH15 z manjšimi deleži oksidiranih oblik, z metodama ALC in PepMap.	54
Slika 51: Prikaz prekrivanja kromatogramov pri ugotavljanju puščanja sledi ob uporabi ALC.	55
Slika 52: Kromatogrami različnih nanosov vzorcev na kolono.	59

SEZNAM TABEL

Tabela I: Elucijski gradient hitre metode ALC.	26
Tabela II: Gradient, ki smo ga uporabili za izvedbo peptidnega kartiranja.	28
Tabela III: Gradient, ki smo ga uporabili za izvedbo metode A.	31
Tabela IV: Gradient metode B, ALC.....	32
Tabela V: Priprava sestavljenih vzorcev.	34
Tabela VI: Uporabljeni gradient za metodo C, ALC.....	35
Tabela VII: Uporabljeni gradient za metodo Č, ALC.	35
Tabela VIII: Uporabljeni gradient za metodo D, ALC.....	36
Tabela IX: Uporabljeni gradient za metodo E, ALC.....	37
Tabela X: Uporabljeni gradient za metodo F, ALC.	37
Tabela XI: Uporabljeni gradient za metodo G; ALC.	39
Tabela XII: Uporabljeni gradient za metodo H, ALC.	39
Tabela XIII: Uporabljeni gradient za metodo I, ALC.	40
Tabela XIV: Korelacija med teoretičnim % oksidirane oblike mAb na kromatogramu, pridobljenim z metodo I.	40
Tabela XV: Podaljšan čas gradienta MFB pri metodi I, ALC.....	42
Tabela XVI: Korelacija med teoretičnim % oksidirane oblike mAb na kromatogramu, pridobljenim z metodo I, pretok 1mL/min z ohranjenim gradientom.....	43
Tabela XVII: Uporabljeni gradient za metodo J, ALC.	47
Tabela XVIII: Uporabljeni gradient za metodo K, ALC.....	47
Tabela XIX: Korelacija med teoretičnim % oksidirane oblike mAb na kromatogramu, pridobljenem z metodo J. .	49
Tabela XX: Priprava vzorcev za preverjanje linearnosti odziva.	50

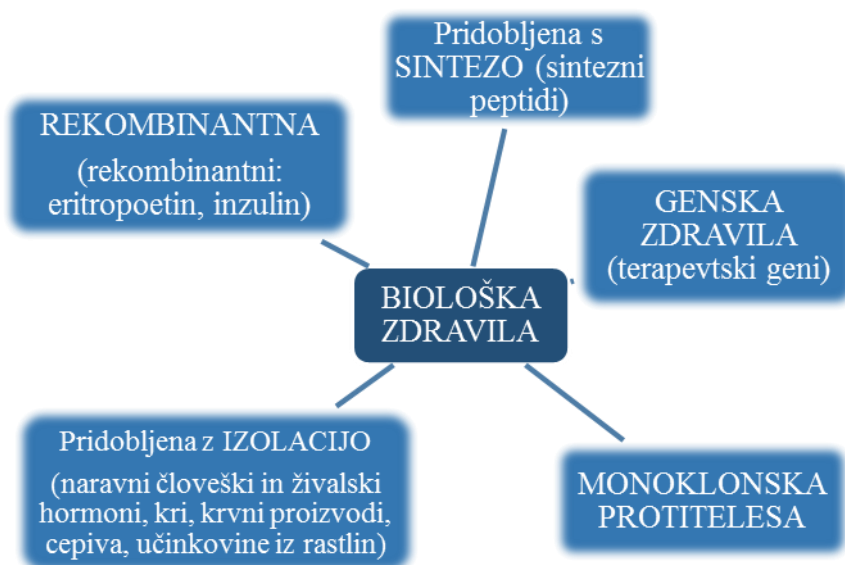
Tabela XXI: Ponovljivost priprave vzorca pripravljenega z dvema neodvisnima pripravama, prikazana v obliki izračunanih % površin vrhov neoksidiranih oblik mAb.....	52
Tabela XXII: Rezultati 24 urne stabilnosti vzorcev.	56
Tabela XXIII: Rezultati preverjanja stabilnosti na -80 °C zamrznjenih vzorcev, hranjenih 4 mesece.	56
Tabela XXIV: Vzorci za določanje nanosa na kolono	57

1 UVOD

1.1 Biološka zdravila

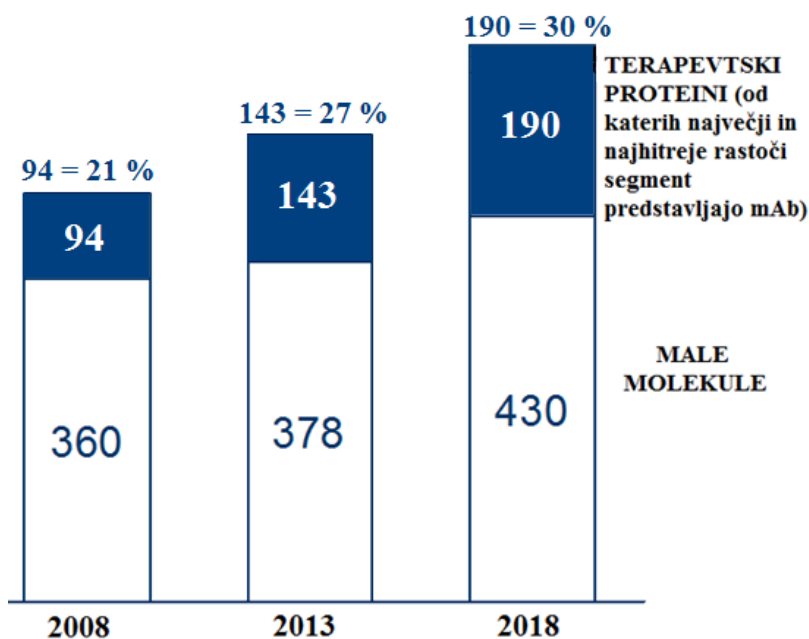
Biološka zdravila sestavljajo sladkorji, proteini in nukleinske kisline, mednje pa štejemo tudi žive celice oziroma tkiva (1, 2).

Poleg tega, da jih uporabljamo za zdravljenje različnih bolezni, predvsem težkih, pa so uporabna tudi v preventivi in diagnostiki (3, 4, 5). Slika 1 predstavlja razdelitev bioloških zdravil glede na različne načine njihovega pridobivanja.



Slika 1: Razdelitev bioloških zdravil glede na način njihovega pridobivanja; prirejeno po (1).

Med novimi zdravili, ki so v razvoju, delež bioloških zdravil vztrajno narašča (6). Slika 2 prikazuje obseg prodaje bioloških zdravil in malih molekul na svetovnem trgu. V naslednjih nekaj letih bodo po sedanjih ocenah terapevtski proteini dosegli 30 % delež svetovne prodaje.



Slika 2: Svetovni trg bioloških zdravil (v milijardah USD); povzeto po (2).

Med biološkimi zdravili, ki dobijo dovoljenje za vstop na trg, je kar ena tretjina terapevtskih monoklonskih protiteles (mAb) (1). Proizvodnja rekombinantnih terapevtskih protiteles, še posebej mAb in fuzijskih proteinov, predstavlja enega najhitreje rastočih sektorjev biotehnologije in farmacevtske industrije (7, 8).

V nadaljevanju se bomo posvetili biološko podobnim zdravilom, še posebej biološko podobnim mAb, saj sta bili obe testni mAb, ki smo ju preučevali, biološko podobni zdravili v razvoju.

1.1.1 Podobna biološka zdravila

Biološko podobno zdravilo je biološko-medicinski proizvod, podoben referenčnemu, ki ga proizvaja generično podjetje in lahko po poteku patenta referenčnega pridobi dovoljenje za proizvodnjo (9). Biološka zdravila so visoko učinkovita, a je njihova cena zaradi dolgega razvoja in proizvodnje izredno visoka. Zato se zdravstveni sistemi po vsem svetu srečujejo z izzivom, kako tovrstno zdravljenje plačati čim več bolnikom. Pogosto so to terapije kroničnih stanj. Medtem ko ocenjeno povprečno dnevno zdravljenje z malo molekulo stane 1 ameriški dolar, pa je za zdravljenje z biološkim zdravilom potrebno odšteti kar 22 dolarjev. Tako znaša enoletni strošek zdravljenja rakavega bolnika z zdravilom Trastuzumab (Herceptin®) 37.000 ameriških dolarjev, cena za zdravljenje revmatoidnega artritisisa in Chronove bolezni z zdravilom Humira® pa 50.000 ameriških dolarjev. Zaradi visokih

stroškov zdravstveni sistemi omogočajo zdravljenje z biološkimi zdravili le bolnikom z najbolj napredovanimi stadiji bolezni, čeprav bi v zgodnjih stadijih z njimi razvoj bolezni lahko preprečili ali vsaj upočasnili (1).

Biološko podobna zdravila so cenejša zato, ker zanje ni potrebno izvajati obsežnih kliničnih študij. Zaradi nižje cene so seveda dostopnejša (1). Po ocenah naj bi do leta 2024 v ZDA na račun podobnih bioških zdravil privarčevali do 250 milijard amerških dolarjev. V EU pa so izračunali, da znaša prihranek zaradi uporabe biološko podobnega epoetina alfa, 35 %. Kljub nižji končni ceni pa razvoj biološko podobnega zdravila v primerjavi z razvojem referenčnega terja kar 2-krat več časa (3). Cena razvoja podobnega biološkega zdravila na reguliranem trgu se giblje med 75 in 250 milijonov dolarjev (1). Slika 3 prikazuje rast trga podobnih bioloških zdravil s finančnega vidika.



Slika 3: Rast trga podobnih bioloških zdravil v milijonih USD (v statistiko so bili vključeni le produkti, ki ustrezajo regulatornim zahtevam, ki jih je za biološko podobna zdravila vzpostavila EMA); povzeto po (3).

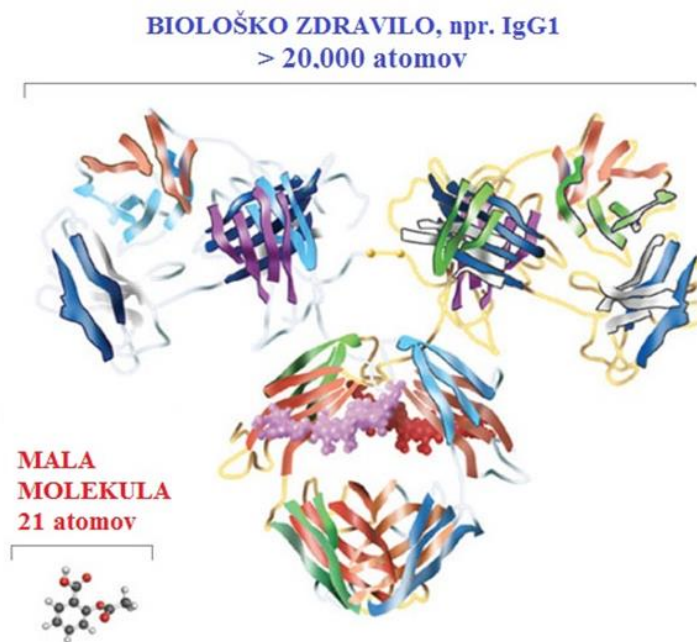
Za vstop podobnega biološkega zdravila na evropski trg je potrebna odobritev Evropske agencije za zdravila (EMA), za vstop na ameriški trg pa dovoljenje *angl. Food and Drug Administration* (FDA). Odobritev temelji na dokazovanju podobnosti z referenčnim zdravilom. Prvo biološko podobno zdravilo Omnitrope® (somatropin) je EMA odobrila leta 2006, prvo biološko podobno mAb infliximab (Remicade®) pa leta 2013. V ZDA je prvo biološko podobno zdravilo Zarxio™ (Filgrastim-sndz) agencija odobrila leta 2015 (1, 3, 10).

Proizvajalec mora zagotoviti ustrezno kakovost, čistost, učinkovitost in varnost zdravila (1). Za njegovo odobritev pa je potrebno izvesti študije analitične, funkcionalne in klinične podobnosti z referenčnim zdravilom (10). Biološko podobno zdravilo mora biti podobno referenčnemu, kar pomeni, da med njima ni klinično pomembnih razlik:

- v strukturi,
- v funkciji,
- v farmakokinetičnih in farmakodinamskih parametrih,
- v izkazovanju enake/podobne moči (3).

1.1.2 Zgradba protiteles

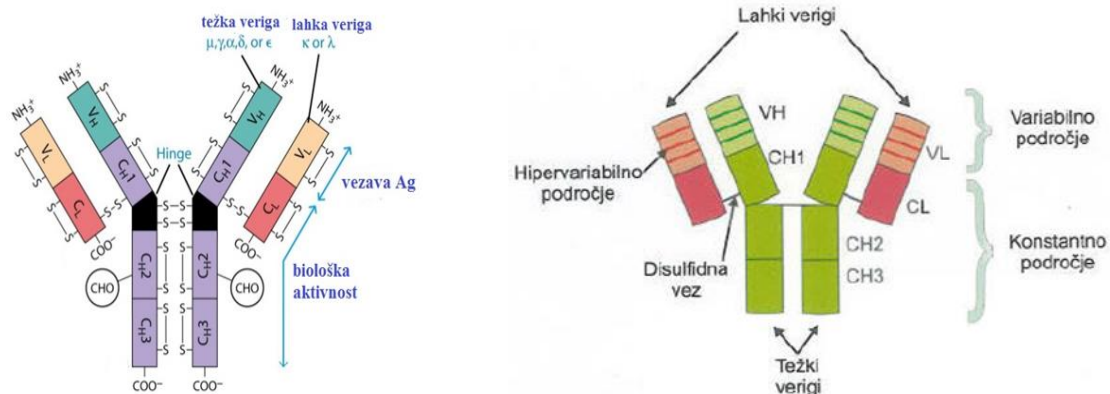
Za razliko od kemijsko sintetiziranih učinkovin, oziroma malih molekul (npr. acetilsalicilne kisline), katerih struktura je točno določena, so biološka zdravila strukturno bistveno kompleksnejša in 200-1000-krat večja (Slika 4). Bioloških zdravil ne moremo pridobivati s postopkom kemijske sinteze. V nadaljevanju se bomo osredotočili le na monoklonska protitelesa.



Slika 4: Primerjava velikosti in kompleksnosti strukture male molekule in molekule protitelesa; povzeto po (4).

Imunoglobulini (Ig) ali protitelesa so del humoralnega imunskega sistema sesalcev. So topni glikoproteini, ki jih v odzive na izpostavljenost tujemu antigenu (Ag) proizvajajo aktivirani limfociti B. Nahajajo se v krvi, tkivnih tekočinah in telesnih izločkih (5). Ker smo za poskuse

v nalogi uporabljali molekuli razreda IgG, bomo v nadaljevanju malo več besed posvetili opisu le-teh, slika 5 pa predstavlja njihovo strukturo.



Slika 5: Struktura protitelesa; povzeto po (referenci 4 navedeni pod Literaturo in referenci 5 navedeni pod Referencami za slike).

Molekule protiteles so sestavljene iz dveh težkih in dveh lahkih polipeptidnih verig, ki so med seboj povezane z disulfidnimi vezmi (Slika 5) (5, 11). Težki verigi sta med seboj povezani z 2-4 disulfidnimi vezmi, odvisno od vrste protitelesa (7, 11). Glede na vrsto težke verige delimo protitelesa v več razredov: IgG, IgM, IgA, IgD in IgE. Molekule IgG, glede na strukturne razlike v težki verigi, nadalje delimo v 4, IgA pa v 2 podrazreda. Razlikujejo se v zgradbi, lastnostih in vlogi pri zaščiti organizma (5).

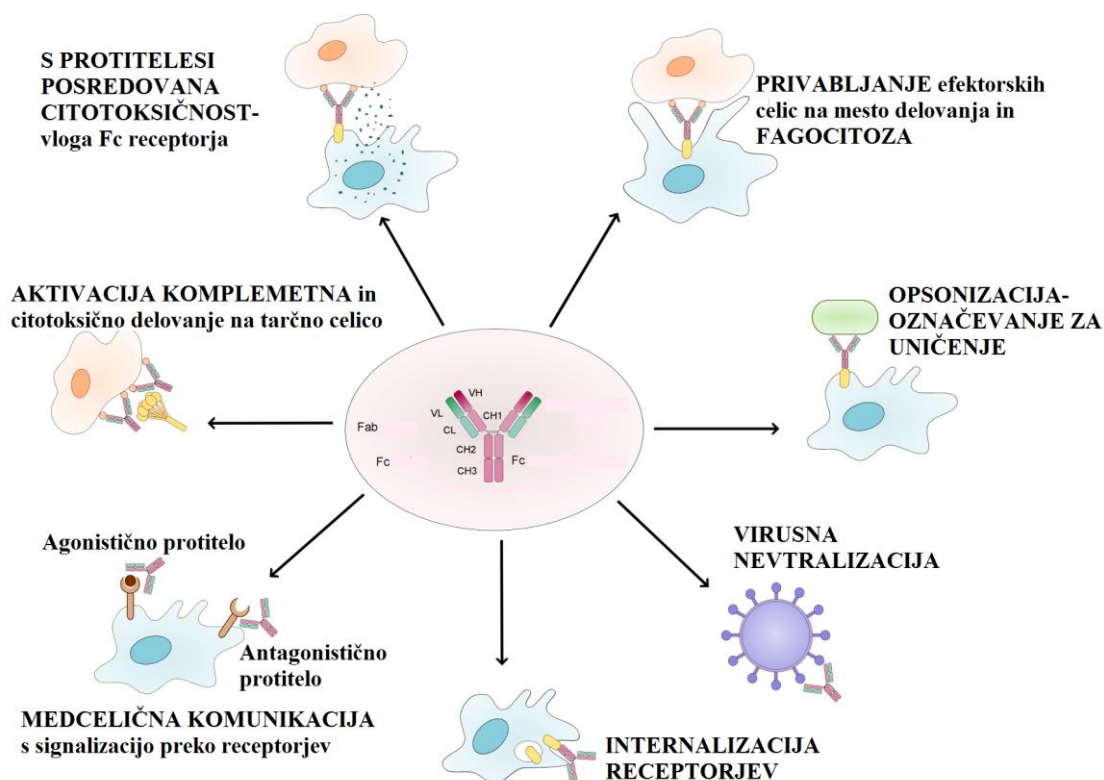
Težka in lahka veriga molekule IgG sta zgrajeni iz konstantnih in variabilnih strukturnih področij. Vsako lahko verigo sestavljata po ena variabilna (V_L) in ena konstantna (C_L) domena, vsako težko verigo pa po ena variabilna (V_H) in 3 konstantne (C_{H1}, C_{H2} in C_{H3}) domene. Vsaka domena pa vsebuje eno medveržno disulfidno vez (7, 11, 12, 13). Variabilna področja na domenah CL in C_{H1} tvorijo paratop, ki je odgovoren za prepoznavo specifičnega antigena. Ta del molekule označujemo s kratico Fab. Strukturni del Fc molekule IgG pa je odgovoren za efektorske funkcije protitelesa, npr. za vezavo na receptorje Fcγ in ga sestavljata domeni C_{H2} in C_{H3} (12, 13, 14). Na podlagi razlik v predelu Fc razlikujemo različne podrazrede protiteles (15).

Vsako variabilno področje je sestavljeno iz treh hipervariabilnih regij, ki imajo ključno vlogo pri prepoznavi Ag in vezavi protitelesa na specifičen antigeni epitop. Mesto na molekuli IgG, kamor se veže Ag, imenujemo antigen vezavno mesto ali paratop (15). Razvejitevno

področje molekule (*angl. hinge region*) pa je polimorfna aminokislinska regija, bogata s cisteinskimi in prolinskimi ostanki, ki se nahaja med težkima verigama molekul podrazredov IgG in IgA in z disulfidnimi vezmi povezuje težki verigi (Slika 5).

Mehanizem delovanja mAb je lahko monoklonski ali poliklonski. Različni kloni linij limfocitov B namreč proizvajajo protitelesa, ki prepoznajo različne epitope na Ag. Heterogena mešanica teh protiteles zagotavlja poliklonski odziv in je ključna za uspešen obrambni odziv organizma na tuj Ag (5).

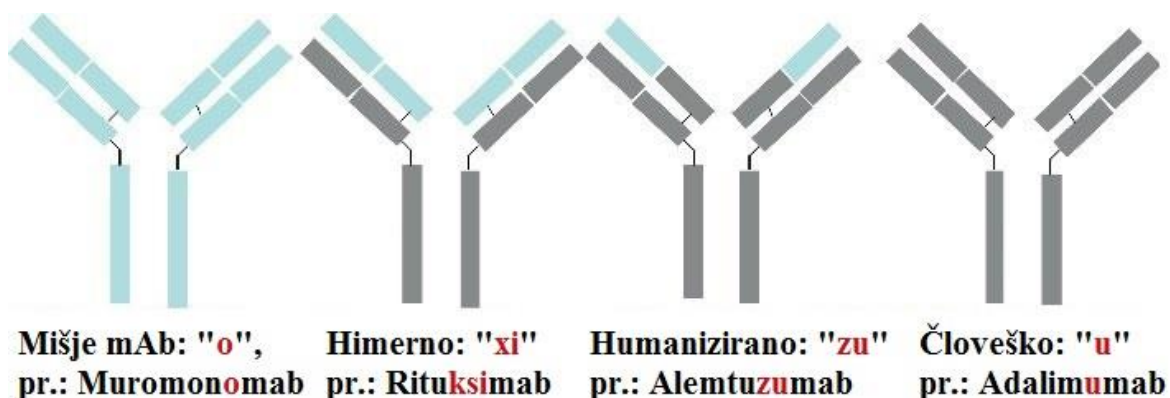
Poznamo več mehanizmov delovanja mAb (Slika 6):



Slika 6: Shematski prikaz različnih mehanizmov delovanja protiteles, povzeto po (6).

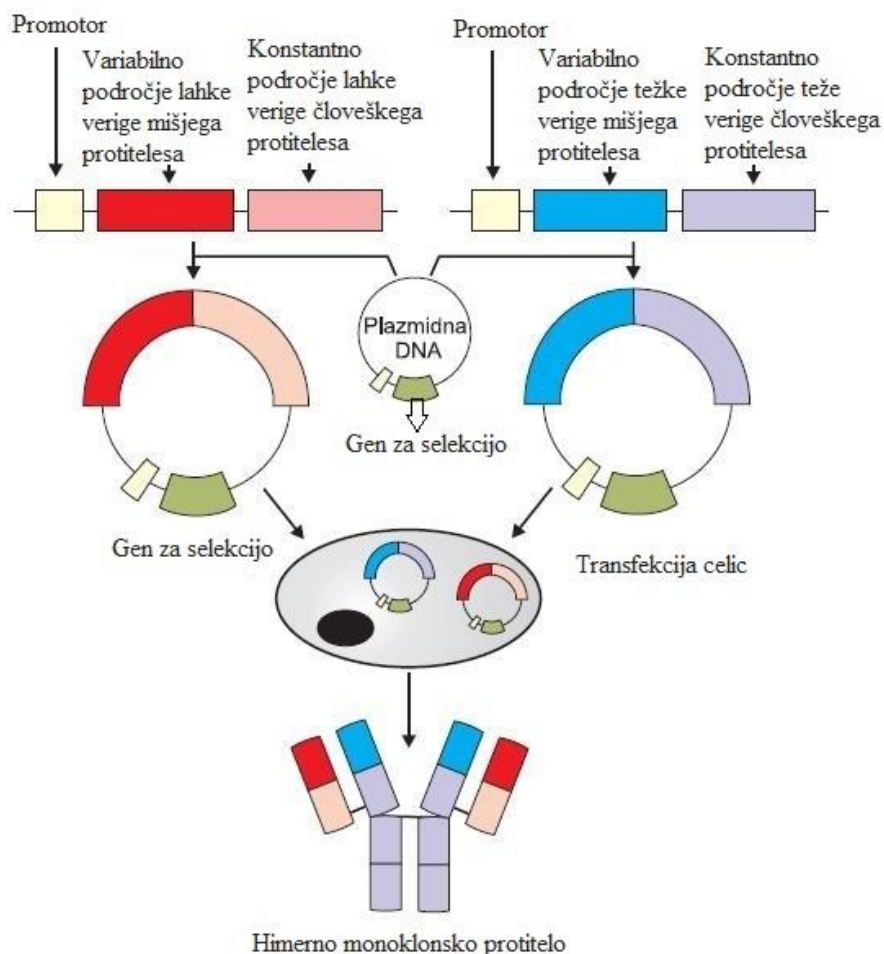
V terapevtske in diagnostične namene pa v glavnem uporabljamo mAb. Monoklonsko protitelo je specifično za en epitop določenega Ag in je proizvod enega klona limfocitov B. To specifičnost izkoriščamo za ciljano zdravljenje. Monoklonska protitelesa lahko uporabljamo tudi kot prenašalce efektorskih molekul, kot so: Ag, encimi, toksini, DNA in citokini. Tovrstne komplekse protiteleso-efektorska molekula lahko usmerimo do tarčnih celic (npr. rakastih), kjer nato efektorske molekule izvedejo svoj učinek (5). Prednosti uporabe mAb so številne, npr. visoka učinkovitost, specifičnost, široko terapevtsko območje, malo

stranskih/neželenih učinkov ter izjemna kemična in biološka raznolikosti (6). Poznamo štiri vrste terapevtskih monoklonskih protiteles (Slika 7):



Slika 7: Štiri osnovne vrste terapevtskih monoklonskih protiteles; povzeto po (7).

V himernih protitelesih je med 60-70 % primarne zgradbe proteina enake človeškim IgG, saj so konstantna področja mišjih IgG zamenjana s človeškimi. V humaniziranih pa ta delež doseže 90-95 %. V človeških mAb pa so vse aminokisliline človeškega izvora. Večina mAb v trenutnih raziskavah ali z dovoljenjem za promet je človeških ali humaniziranih in spadajo v podrazrede IgG1, IgG2 ali IgG3. Razlog verjetno leži v njihovih lastnostih, saj so molekule IgG najstabilnejše, imajo daljši razpolovni čas, večjo afiniteto/avidnost in visoko biološko učinkovitost (saj so to imunoglobulini sekundarnega imunskega odziva). Kot bomo spoznali v nadaljevanju je razpolovna doba in posledično biološka učinkovitost protiteles odvisna od zgradbe dela Fc molekule (5, 15, 16). Protitelesa podrazreda IgG1 so najučinkovitejša pri aktivaciji komplementa po klasični poti in aktivaciji s protitelesi posredovane citotoksičnosti (Slika 6) (5). Obe mAb, za analitiko katerih smo razvili hitro kromatografsko metodo, sta bili človeški protitelesi razreda IgG, in sicer IgG1 in IgG2. Slika 8 prikazuje proizvodnjo himernih terapevtskih mAb.



Slika 8: Nastanek/proizvodnja himernega terapevtskega mAb; povzeto po (8).

1.2 Posttranslacijske modifikacije

Za nativne proteine so značilne posttranslacijske modifikacije (PTM) dveh vrst (13):

- tiste, ki potekajo med sintezo proteinov na ribosomih ali kotranslacijske modifikacije,
- tiste, ki potekajo po omenjeni sintezi in jih imenujemo posttranslacijske modifikacije.

Monoklonska protitelesa so proteini, pridobljeni z rekombinanto tehnologijo v živih celicah, zato so prav tako podvrženi posttranslacijskim modifikacijam (13). Molekulska masa molekule IgG1 je približno 150 kD, sestavlja pa jo več kot 1300 aminokislinskih ostankov, zato je na voljo velik nabor mest, kjer lahko pride do PTM (12). Te spremembe nas zanimajo zato, ker vplivajo na več pomembnih parametrov (Slika 9).



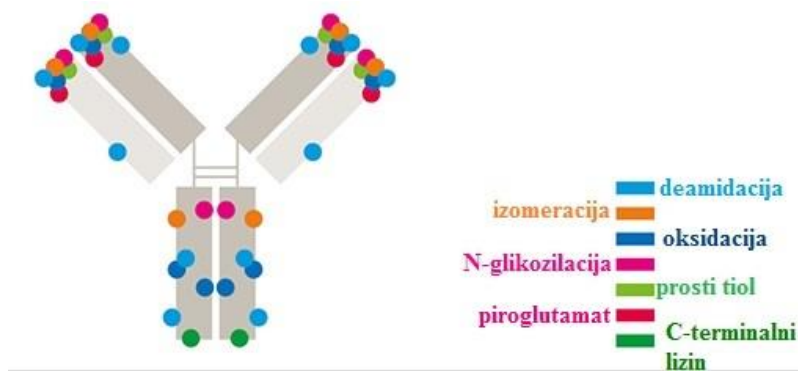
Slika 9: Vpliv posttranslacijskih modifikacij na lastnosti mAb, prirejeno po (9).

Po sprostitvi biološko podobnega zdravila na trg moramo med proizvodnjo dokazovati konsistentnosti v profilu PTM. Ker je varnost bolnikov vedno na prvem mestu, ne sme prihajati do nekontroliranih sprememb v lastnostih zdravila (8, 17).

1.2.1 Nastanek PTM

Do PTM lahko prihaja med proizvodnjo, čiščenjem, formulacijo in shranjevanjem (7, 8, 9, 11, 17). Zaradi pleomorfnosti, to je pojavnosti več kot ene oblike proteina v naravi, je težko napovedati vplive različnih PTM. Vplivajo lahko na strukturo, funkcijo in biološko aktivnost produkta (8, 17). Ovrednotimo jih s karakterizacijo proteina in s kliničnimi študijami, zato moramo za vsako mAb v razvoju karakterizirati posamezne PTM (7, 8, 12, 17).

Najpogostejše PTM, ki potekajo med izdelavo terapevtskih proteinov so: karboksilacija, hidroksilacija, amidacija, sulfatacija, tvorba disulfidnih vezi, proteolitsko procesiranje, glikozilacija, beta-oksidacija, agregacija, oksidacija metioninov, deamidacija, izomerizacija in ciklizacija (7, 8, 11, 12, 13, 17). Slika 10 prikazuje potencialna mesta na molekuli IgG, ki so dovzetna za nastanek različnih PTM.



Slika 10: Prikaz potencialnih mest na molekuli protitelesa, ki so dovzetna za nastanek PTM, povzeto po (10).

Najbolj razširjena in kompleksna PTM je glikozilacija, njeni vplivi na proteinski proizvod pa so: olajšano zvijanje proteina, olajšana prepoznavna in vezava liganda, povečana stabilnost proteina, spremenjena razpolovna doba v serumu, vzdrževanje biološke aktivnosti in povečana imunogenost (8, 18).

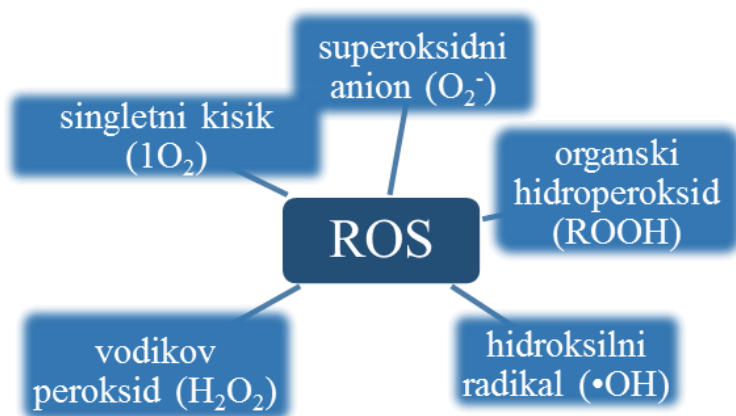
1.2.2 Oksidacija protiteles

Ena izmed PTM, ki ji bomo posvetili več pozornosti, je oksidacija. Gre za interakcijo biološke molekule z molekulskim kisikom (19).

Oksidanti, ki povzročijo oksidacijo v celici, so reaktivne kisikove zvrsti (ROS) (Slika 11). Temu procesu so najbolj podvrženi površinsko izpostavljeni aminokislinski ostanki, med katerimi so najdovzетnejši metioninski ostanki (19).

Oksidacija vpliva na;

- kemijske lastnosti aminokislinskih ostankov, kar vodi v konformacijske spremembe,
- funkcijske spremembe, npr. inhibicijo encimske in/ali vezavne sposobnosti proteina,
- spremembe vezave področja Fc na receptor Fc γ , komponento komplemента C1q in neonatalni receptor (FcRn),
- povečanje deleža agregatov, kar lahko vodi v imunogenost, navzkrižno reaktivnost in avtoimunost, ter
- spremembe v farmakodinamskem in farmakokinetsem profilu (18, 19, 20, 21).

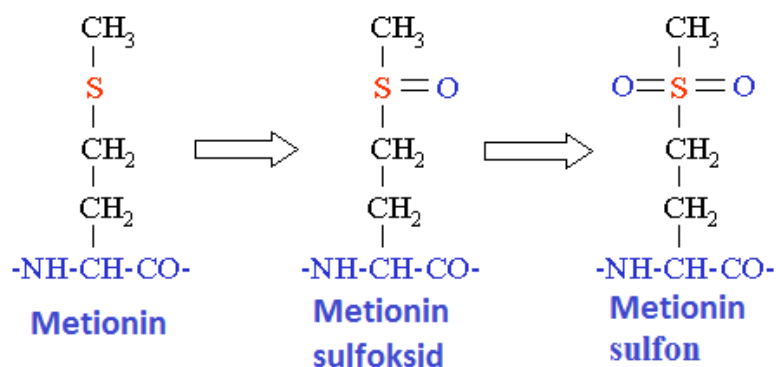


Slika 11: Vrste kisikovih zvrsti (ROS), ki delujejo kot oksidanti, prirejeno po (11).

Oksidacija lahko poteka med fermentacijo, čiščenjem, formulacijo, shranjevanjem in proizvodnjo proteinskih učinkovin in prispeva k njihovi nestabilnosti (21, 22). V nadaljevanju se bomo posvetili oksidaciji ohranjenih metioninskih ostankov v področju Fc molekule IgG in njenim posledicam, med katere spada tudi spremenjena vezavna sposobnost teh protiteles na protein A, ki ga uporabljamo pri afinitetni kromatografiji.

1.2.3 Oksidacija metioninskih ostankov

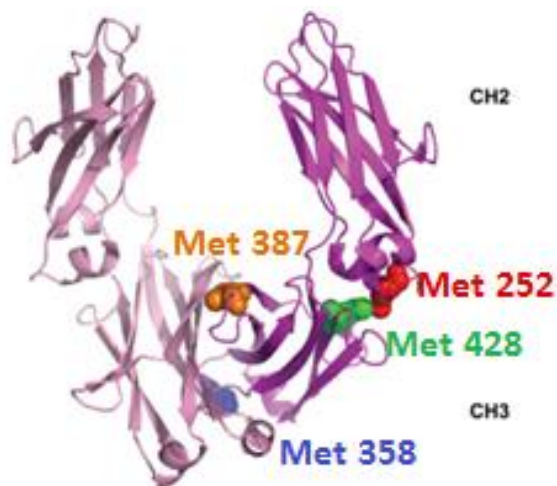
Metionin (Met) se oksidira v Met-sulfoksid (Slika 12) (19). S specifičnimi encimi, in sicer Met-sulfoksid reduktazami, se lahko Met-sulfoksid reducira nazaj do Met, in sicer *in vivo* s pomočjo tioredoksina, *in vitro* pa v prisotnosti ditionitrola (18, 19). Molekula IgG vsebuje več ohranjenih metioninskih ostankov, in sicer tako na Fc kot tudi na Fab delu mAb. S stališča za varnost in učinkovitost proteinskega proizvoda pomembnih oksidativnih sprememb, nas v primeru strukturnega področja Fc zanimajo oksidacije Met252 in Met428, pa tudi Met360 (23).



Slika 12: Osidacije metioninskih ostankov; povzeto po (12).

Met-sulfoksid je večja, bolj polarna in hidrofobna spojina z manj fleksibilno stransko verigo in večjo kapaciteto za tvorbo vodikovih vezi (24).

Strukturno področje Fc je homodimer s po dvema metioninskima ostankoma, Met252 in Met428, ki sta prisotna na vseh podrazredih protiteles IgG (25). Področji človeških molekul Fc IgG1 in IgG2 sta skoraj identični (23). Met252 se nahaja na domeni C_H2 in skupaj z domeno C_H3 tvori elektrostatske in hidrofobne interakcije, v katere je vključen tudi Met428. Stranski skupini obeh Met ostankov sta v medsebojnem stiku (Slika 13). Pri oksidaciji stranska skupina vsakega od teh ostankov dobi dodaten kisikov atom, zaradi česar pride do odbijajoče interakcije in destabilizacije konformacije native oblike proteina (22).



Slika 13: Peptidna veriga (sekundarna struktura) strukturnega dela Fc molekule človeškega IgG1; povzeto po (13).

Met252 se oksidira dvakrat hitreje kot Met428, saj je izpostavljen na sami površini molekule, poleg tega pa Met428 stabilizira rigidna anti-paralelna beta ploskev (26, 27).

Kljub temu ima oksidacija Met428 večji destabilizacijski učinek, predvsem na domeno C_{H2}, saj leži v notranjosti strukture in je vpleten v interakcije med domenama (22).

V literaturi navajajo, da na stopnjo oksidacije pri shranjevanju učinkovin vplivajo tudi pomožne snovi, ki jih uporabljamo v končni formulaciji zdravila (npr. PEG). Pomožne snovi lahko oksidirajo in tvorijo perokside, ti pa lahko reagirajo s kovinskimi ioni in tvorijo radikale. Tudi zaradi izpostavljenosti svetlobi in njene absorpcije lahko pride do nastanka vzbujenih kisikovih zvrsti, ki tvorijo radikale ali pa reagirajo s kisikom, pri čemer nastane singletni kisik (Slika 12) (27).

Na hitrost oksidacije vpliva več dejavnikov:

- pufer in njegova sestava (pomožne snovi v pufru),
- formulacijski pH in
- pogoji shranjevanja: svetloba, temperatura in čas (27).

Oksidacijo metioninskih ostankov lahko nadzorujemo z uporabo antioksidantov, vendar pa se temu raje izogibamo zaradi morebitne toksičnosti in nekompatibilnosti s proteinsko učinkovino in ostalimi pomožnimi snovmi (27).

Ker oksidacija vpliva na stabilnost in varnost učinkovine, je pomembno, da znamo določiti delež njenih oksidiranih oblik, ki že lahko povzročijo klinično pomembne spremembe. Obseg oksidacije mAb lahko določamo z različnimi analitskimi metodami, ki so lahko kvalitativne in/ali kvantitativne. Mednje sodijo:

- peptidno kartiranje (PepMap) ali kapilarna elektroforeza, skopljena z masno spektrometrijo (MS), s katero detektiramo stopnjo oksidacije Met ostankov in identificiramo oksidacijska mesta (22, 28);
- afinitetna tekočinska kromatografija (ALC), ki temelji na vezavi dela Fc protitelesa na proteinsko domeno proteina A ali G, vezanega na kolono (21);
- metoda FTIR (*angl. fourier transform infrared spectroscopy*), ki je namenjena detekciji specifičnih kemičnih sprememb mAb (Met sulfoksid), ki vplivajo na njihovo sekundarno strukturo (25);
- kromatografija HIC (*angl. hydrophobic interaction*) s katero odkrivamo spremembe v hidrofobnosti mAb, ki so posledica oksidacije (11, 29);

- metode, s katerimi posredno ocenjujemo: delež oksidacije (SDS-PAGE), degradacijske produkte (gelska izključitvena kromatografija; *angl. SEC*) in konformacijske spremembe (nuklearna magnetno resonančna spektroskopija proteinov, ^1H - ^{15}N HSQC) (26) in
- kationsko izmenjevalna kromatografija, ki so jo uporabili v študiji spremljanja enoletne stabilnosti IgG1 in z njo dokazali, da je za oksidacijo Met dovezetno le področje Fc, saj se metioninski ostanki v predelu Fab niso oksidirali in da oksidacija metioninskih ostankov v področju Fc poteka naključno (11, 24).

V literaturi so navedli, da lahko do oksidacije metioninskih ostankov pride tudi med pripravo vzorcev za analizo peptidnega kartiranja (11).

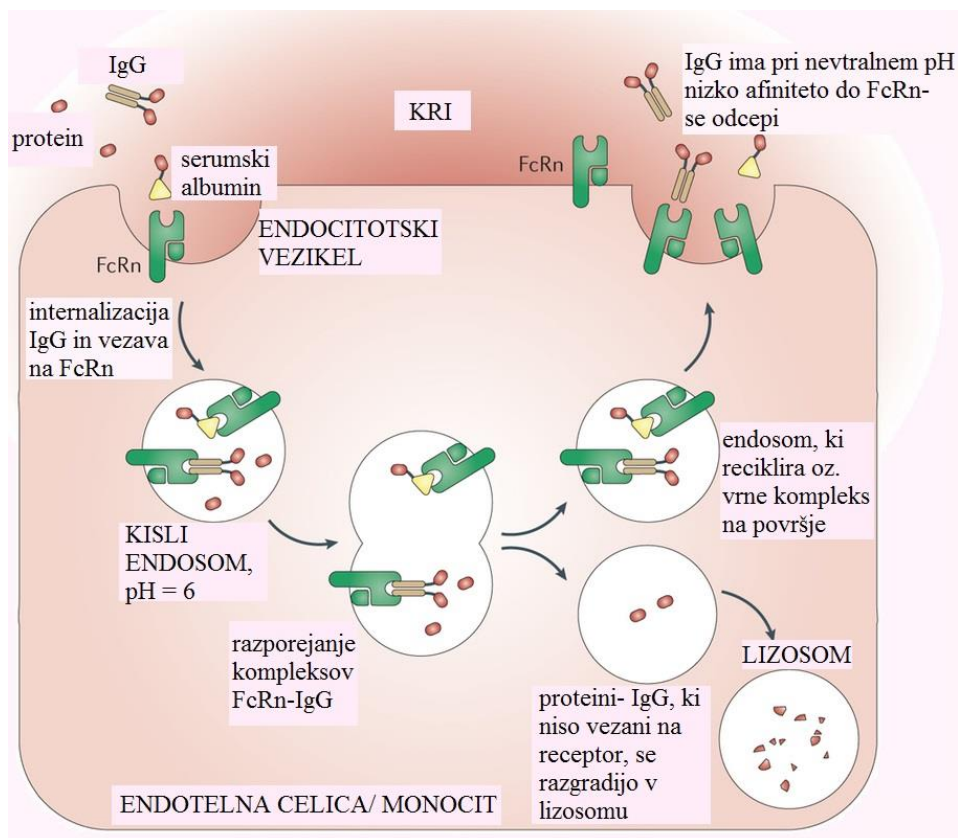
1.2.4 Vpliv oksidacije metioninskih ostankov na farmakokinetiko

V študiji, ki so jo izvedli Lui in sodelavci, so z različnimi biofizikalnimi analitskimi metodami preučevali vpliv oksidacije predela Fc na strukturo in termično stabilnost molekule IgG1 (22). Ugotovili so, da oksidacija metioninov vpliva na spremembo sekundarne in terciarne strukture, predvsem domen $\text{C}_{\text{H}2}$ in $\text{C}_{\text{H}3}$. Oksidacija metioninov je povečala tudi termično nestabilnost domene $\text{C}_{\text{H}2}$, termična nestabilnost domene $\text{C}_{\text{H}3}$ pa je bila manj izrazita. Podobno se je v primeru oksidiranega proteina s povečano temperaturo povečala tudi stopnja agregacije, na domeni $\text{C}_{\text{H}2}$ pa se je povečala tudi deamidacija dveh asparaginskih ostankov. Zaključili so, da oksidacija metioninov pomembno vpliva na fizikalno in kemijsko (kovalentno) stabilnost področja Fc, predvsem domene $\text{C}_{\text{H}2}$. Poleg tega so ugotovili, da ima oksidacija glikoziliranega področja Fc manjši vpliv na razpolovno dobo in stabilnost mAb kot pa oksidacija neglikoziliranega. Prvi je značilen za proteine, ki jih pridobivamo iz celic CHO.

V nadaljevanju se bomo posvetili neonatalnemu receptorju, ki preko placente prenaša materina protitelesa IgG, s čimer novorojenčku zagotovi humoralno imunost proti antigenom matere. Poleg tega ščiti endogene molekule IgG pred razgradnjo v kislih lizosomih (Slika 14). Pri miših, ki nimajo FcRn, se razpolovna doba protiteles v serumu zmanjša s 5 na 1 dan. Zaradi zaščitne vloge FcRn imajo torej protitelesa dolgo razpolovno dobo, kar s pridom izkoriščamo pri odmerjanju bioloških in biološko podobnih zdravilnih učinkovin (23).

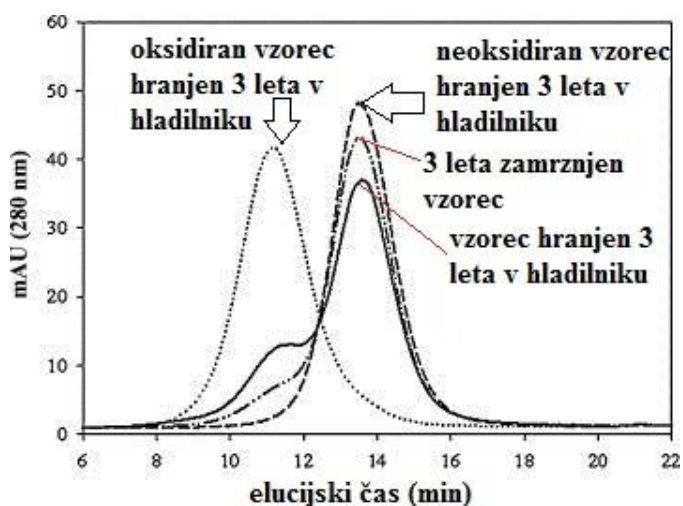
V vezavnem mestu FcRn in Fc obstajata 2 ohranjena metioninska ostanka, in sicer Met252 in Met428 (23, 26). Interakcija med področjem Fc mAb in FcRn je odvisna od vrednosti pH

(Slika 14). Oksidacija aminokislinskih ostankov, med katerimi se najhitreje oksidirata omenjena metioninska ostanka v vezavnem mestu področja Fc, vpliva na afiniteto interakcije med Fc in FcRn (27). Oksidacija Met252 in Met428 povzroči spremembe v skeletu proteina in tako zniža afiniteto področja Fc do FcRn, kar ima lahko negativen vpliv na farmakokinetiko mAb (26, 30).



Slika 14: Shematski prikaz interakcije predela Fc z FcRn; povzeto po (14).

Wand in sodelavci so v zamrznjenih ali hlajenih vzorcih protiteles preučevali vpliv oksidacije na njihovo razpolovno dobo v serumu (26). Ugotovili so, da se protitelesa oksidirajo tudi med shranjevanjem v hladilniku, saj je imel v hladilniku hranjen oksidiran vzorec kar za 28 % nižjo razpolovno dobo v serumu kot neoksidiran. Krajša razpolovna doba v serumu korelira z obsegom oksidacije Met v področju Fc in s spremembami v afiniteti vezave Fc na FcRn. Slika 15 prikazuje rezultate afinitetne kromatografije za omenjene vzorce. Kratica AU predstavlja enote absorbance. Opazimo, da je imel v primerjavi z neoksidiranim, oksidiran vzorec nižjo afiniteto do proteina A, saj se je iz kolone izločil približno 3 minute prej. Pri vzorcu, ki je bil 3 leta zamrznjen, pa v področju izločanja okidiranega proteina opazimo manjšo ramo, ki nakazuje na nižjo stopnjo oksidacije.



Slika 15: Rezultati afinitetne kromatografije za mAb, ki so bila 3 leta shranjena pri različnih pogojih; povzeto po (15).

Pan in sodelavci so preučevali vpliv oksidacije na znižano raven vezave Fc na FcRn receptor. Za vezavo na receptor FcRn so ključne hidrofobne interakcije, v katere sta vključena tudi aminokislinska ostanka Leu251 in Ile253. Z oksidacijo Met252 nastanejo strukturne spremembe, ki te interakcije prekinejo. Čeprav Met428 ni neposredno vključen vanje, pa vstopa v interakcijo s His435, enim od dveh histidinskih ostankov, vključenih v pH odvisno vezavo, ki jo oksidacija podre (23).

1.2.5 Metode za detekcijo oksidacije metioninskih ostankov

Sledi kratek opis dveh analitskih metod, ki smo ju uporabili pri razvoju hitre kromatografske metode za določanje stopnje oksidiranosti testnih mAb podrazredov IgG1 in IgG2.

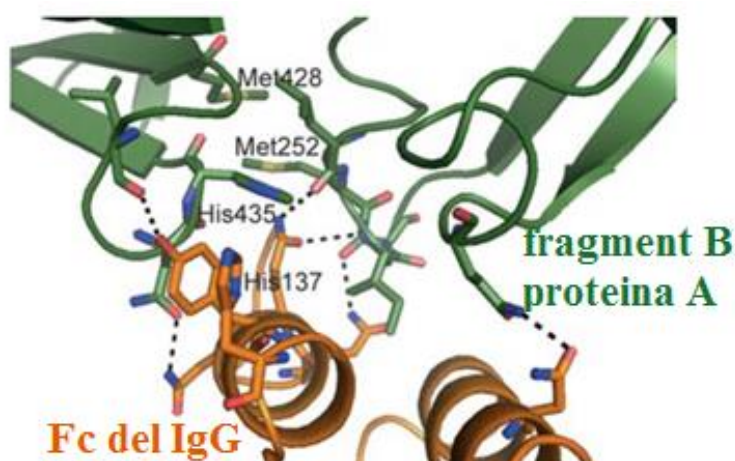
PepMap - referenčna metoda za detekcijo oksidacije

Metodo peptidnega kartiranja uporabljamo za določanje identitete primarne aminokislinske sekvence mAb, za primerjalne in stabilnostne študije, ter za detekcijo razgradnih produktov, k čemur spada tudi oksidacija. Metoda je časovno zamudna in zahteva kompleksno pripravo vzorcev (31).

Najprej s proteazo (Lys-C ali tripsin) razcepimo protein na posamezne peptide, ki jih nato med seboj ločimo s tekočinsko kromatografijo z UV detekcijo ali z masno spektrometrijo (31). Alternativno peptidnemu kartiranju, ki je trenutno referenčna metoda za določanje stopnje oksidacije mAb, predstavlja afinitetna kromatografija (21, 32).

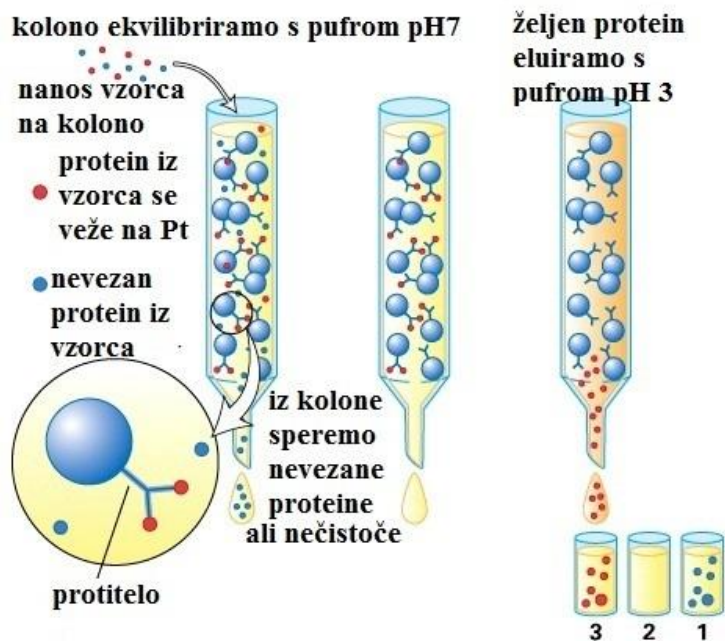
Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija je široko uporabna, hitra, enostavna in natančna metoda za določanje vsebnosti proteinov. Temelji na vezavi področja Fc molekule IgG na domeno B proteina A, vezanega na kromatografsko kolono (21, 32). Protein A je 42 kDa velik membranski protein, ki je sestavni del celične stene bakterije *Staphylococcus aureus*. Del polipeptidne verige proteina A predstavlja niz petih skoraj homolognih domen (E, D, A, B in C), od katerih je vsaka sposobna vezave Fc dela IgG različnih podvrst (16). Slika 16 prikazuje aminokislinske ostanke področja Fc molekule IgG, ki se povežejo z aminokislinskimi ostanki fragmenta B proteina A, Slika 17 pa predstavlja potek postopka ALC.



Slika 16: Interakcija fragmenta B proteina A s področjem Fc molekule IgG; povzeto po (16).

Vezava protein A-Fc mAb poteka v območju nevtralnega pH in je odvisna od naslednjih dejavnikov: komplementarnosti oblike protein A-Fc, naboja, hidrofobnosti, Van der Waalsovih sil in vodikovih interakcij (15, 16, 32).



V našem primeru je na kolono vezan protein A, vzorec pa predstavlja mAb, vendar je princip enak.

Slika 17: Shematski prikaz poteka afinitetne tekočinske kromatografije, povzeto po (17).

Pomembne spremenljivke, ki pri kromatografiji vplivajo na vezavo IgG molekule in proteina A in na katere lahko vplivamo, so:

- sestava pufra in/ali mobilne faze, ki vpliva na spreminjanje asociacijske konstante in
- vrednost pH mobilne faze (MF), kar vpliva na hidrofobnost, saj so histidinski ostanki na molekuli IgG in proteinu A pri nevtralnem in alkalnem pH nenabiti, pri nizkem pa pozitivno nabiti, zaradi česar se med seboj odbijajo, to pa vodi do zmanjšanja hidrofobne stične površine (15, 16, 32).

Z metodo ALC lahko določimo stopnjo oksidacije proteina, pri čemer naslednji dejavniki pomembno vplivajo na ločevanje oksidiranih in neoksidiranih molekul:

- pretok skozi kolono in njena temperatura,
- način elucije: gradientna ali izokratska, ki ju uporabljamo za doseganje različnih vrednosti pH ter
- način spiranja analita s kolone npr. s kompetitivnimi analogi, z denaturacijskimi reagenti ali z variabilnimi dejavniki, kot so: pH, polarnost in ionska jakost (15, 16, 32).

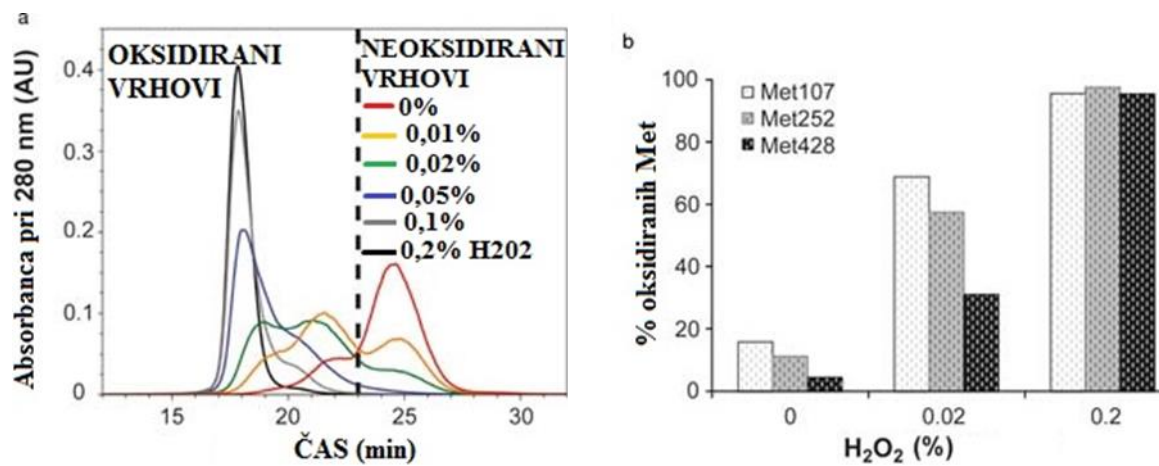
Različna mAb se iz kolone ne eluirajo pri enakih vrednostih pH, čeprav pripadajo istemu razredu in vsebujejo enaka področja Fc (npr. IgG1 in IgG2). Do razlik prihaja zaradi obstoja alternativnih vezavnih mest za protein A na nekaterih protitelesih (človeška genska družina V_H3, v katero sodi skoraj polovica zarodnih genov V_H) (16). Med razvojem analitskih metod moramo zato elucijske vrednosti pH pogosto prilagajati posamezni molekuli mAb.

Strukturne spremembe zaradi oksidacije nastanejo predvsem na Met252 in Met428, ki se nahajata blizu vezavnega mesta za protein A (Slika 16) (21). Pri oksidaciji se na žveplov atom na Met252 veže dodaten kisikov atom, posledično večja polarnost pa zmanjša možnost vezave. Tudi na Met428 se veže dodaten kisikov atom, ki povzroči elektrostatski odboj, ta pa oslabi hidrofobne interakcije med področjem Fc in proteinom A (23). Posledica je nižja afiniteta vezave, zaradi česar se oksidirana molekula IgG hitreje izloči iz kromatografske kolone. Krajši retencijski čas (RT) nam tako nakazuje, katero protitelo ima oksidiran vsaj en metioninski ostanek. Z metodo ALC lahko torej razlikujemo med različnimi stopnjami oksidacije protiteles (21).

Razlog za nižjo afiniteto vezave področja Fc na protein A lahko torej pripišemo več različnim dejavnikom:

- strukturnim spremembam v vezavnem delu kompleksa Fc-protein A,
- spremenjeni strukturi proteina v bližini ostankov, ki so neposredno vpleteni v vezavo in
- spremenjeni globalni strukturi molekule IgG v okolici vezavnega mesta (21).

Slika 18a prikazuje kromatogram proteinov z različnimi deleži neoksidiranih in oksidiranih metioninov, določenimi z metodo ALC. Vzorci so bili pripravljene z oksidacijo v prisotnosti različnih odstotkov vodikovega peroksida (H₂O₂), delež oksidiranih oblik mAb pa so določili z metodama PepMap in ALC. Na sliki 18b je prikazana korelacija med dodano količino H₂O₂ in deležem oksidiranih oblik, določenim z analizo PepMap.



Slika 18: Kromatogram ALC (a) in histogram rezultatov, pridobljenih s PepMap-MS (b); povzeto po (18).

2 NAMEN DELA

Namen našega dela je bil razviti hitro kromatografsko metodo za določanje stopnje oksidiranosti mAb. Z metodo smo želeli detektirati posledice sprememb, ki na molekuli mAb nastanejo zaradi oksidacije metioninskih ostankov. Ker je referenčna metoda peptidnega kartiranja časovno zamudna in tehnično zahtevna, smo želeli razviti kratko in enostavno presejalno analitsko metodo, s katero bi lahko kvantitativno določali delež oksidacije tudi med procesom razvoja biološko podobnih mAb. Hitro dosegljivi rezultati bi nam med razvojnim procesom zdravila namreč omogočali hitro prilagajanje parametrov. Kot osnovo za razvoj hitrejše analitske metode smo izbrali 60-minutno afinitetno kromatografijo, ki je sicer dodobra opisana v strokovni literaturi (25, 26). Novo metodo smo razvijali ciljano, za določanje deleža oksidiranih oblik molekul IgG1 in IgG2.

Oksidacija metioninskih ostankov v Fc regiji mAb ima podoben učinek na vezavno afiniteto Fc-protein A in Fc-FcRn, saj so aminokislinski ostanki proteina A, ki vstopajo v interakcijo z Fc skoraj identični tistim na molekuli FcRn. Ker je vezava Fc-protein A podobna vezavi Fc-FcRn, lahko iz prve sklepamo tudi na afiniteto vezave področja Fc na FcRn, ki nas zanima zato, ker določa razpolovno dobo v serumu. Stopnjo afinitete vezave predela Fc na protein A bi zato lahko uporabili kot enostaven in dostopen parameter za vrednotenje vezave Fc-FcRn, pri čemer bi ugotovitve ekstrapolirali na farmakokinetiko našega proteinskega proizvoda in vrednotili njegovo učinkovitost (23).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Priprava delovnih standardov

Za razvoj metode ALC smo pripravili delovne standarde preučevanih mAb tako, da smo jih oksidirali z različnimi koncentracijami vodikovega peroksida ter tako dobili mAb z različnimi stopnjami oksidiranosti, ki smo jih poimenovali vzorci. Iste delovne standarde smo uporabili tudi za PepMap. Pripravili smo tudi neoksidiran in 100 % oksidiran delovni standard IgG in ju dodali v vsako analizo. V nadaljevanju ju bomo imenovali s skupnim imenom standard.

Za pripravo delovnega standarda smo uporabili dve rekombinantni monoklonski protitelesi. Prvo je bilo vrste IgG1. Njegova težka veriga vsebuje 448 aminokislin, med katerimi je 5 metioninskih ostankov (eden v hipervariabilnem področju), lahka veriga pa 214 aminokislin, med katerimi je 1 metioninski ostanek. Metionin 254 se nahaja v peptidu LH15, Met430 v LH30 in Met360 v LH25, vsi trije so na težki verigi. Začetna koncentracija delovnega standarda je bila 30 mg/mL. Drugo preučevano mAb spada v podrazred IgG2. Njegovo lahko verigo sestavlja 215 aminokislin, težko pa 447, med njimi pa je 14 metioninskih ostankov. Začetna koncentracija delovnega standarda v tem primeru pa je bila 10 mg/mL. Med razvojem nove analitske metode smo opazovali in vrednotili predvsem spremembe, ki so se pojavile po oksidaciji Met254 in Met430.

3.1.2 Priprava vzorcev za analizo z ALC

Vzorci smo oksidirali z dodatkom H₂O₂ (Merck, ZDA) in jih zaščitene pred svetlobo na sobni temperaturi inkubirali 18 ur. Uporabili smo različne končne koncentracije H₂O₂, in sicer med 0,0001 in 10 %. Z mešanjem neoksidiranega in popolnoma oksidiranega standarda smo pripravili tudi različne sestavljene vzorce: med 1 in 50 %. Oksidacijo smo ustavili z dodatkom 335 mM raztopine L-metionina (v razmerju 1:1) (Merck, ZDA) ali pa z zamenjavo pufru za oksidacijo z mobilno fazo A (MFA; opisana v poglavju 3.2.1.1.). Puffer za oksidacijo je vseboval 10 mM Tris (Merck, ZDA) s pH 8,5, ki smo ga umerili z 2 M očetno kislino (Merck, ZDA).

Primer priprave vzorca z 0,05 % H₂O₂ v končni raztopini: predpostavimo, da je začetna koncentracija proteina 30 mg/mL, končna 2,5 mg/mL ter končni volumen vzorca 100 µL.

Pomešamo 5 μL 1 % raztopine H_2O_2 , 8,3 μL delovnega standarda in 86,7 μL oksidacijskega pufru. Na enak način smo pripravili vse vzorce, oksidirane z različnimi koncentracijami H_2O_2 .

Primer priprave sestavljenega vzorca, 5 % oksidirane vzorca: predpostavimo, da pripravimo neoksidiran in 100 % oksidiran standard, ki ima koncentracijo H_2O_2 v končni raztopini $> 0,5$ %. Končna koncentracija proteina v sestavljenem vzorcu je 2,5 mg/mL, končni volumen pa 100 μL . Premešamo 5 μL 100 % oksidirane in 95 μL neoksidiranega standarda, pri čemer neoksidirani vsebuje končno koncentracijo 2,5 mg/mL mAb v MFA, popolnoma oksidirani pa je pripravljen po postopku, opisanem v prejšnjem odstavku.

Zaustavitev oksidacije

Preskusili smo dva načina zaustavitve oksidacije, in sicer z uporabo fosfatnega pufru s soljo (DPBS; *angl. Phosphate-buffered saline*), ki smo ga uporabljali kot MFA in s katerim smo zamenjali pufer za oksidacijo ali pa z dodatkom raztopine L-metionina:

- Pufer DPBS (MFA): 100 mL pufru DPBS (Gibco by Life Technologies, ZDA) in 900 mL prečiščene vode MilliQ;
- Raztopina L-metionina: 250 mg L-metionina (Merck, ZDA) raztopimo v 5 mL pufru za oksidacijo.

Za negativno kontrolo smo uporabili neoksidiran standard, tako da smo izhodno koncentracijo mAb redčili bodisi z oksidacijskim pufrom ali pa s pufrom DPBS do končne koncentracije, ki je bila enaka tisti v oksidiranem vzorcu.

3.1.3 Priprava vzorcev za peptidno kartiranje

Za peptidno kartiranje smo uporabljali le rekombinantno mAb razreda IgG1. Oksidirane vzorce le-tega smo pripravili na način, ki smo ga opisali v poglavju 3.1.2, le da smo oksidacijo ustavili z dodatkom raztopine L-metionina (v razmerju 1:1) ali pa z izmenjavo oksidacijskega pufru z reakcijskim pufrom za razgradnjo (50 mM natrijev citrat; pH 7,5), ki smo ga pripravili iz 1M raztopine natrijevega citrata (Merck, ZDA), pH do 7,5 pa umerili z dodajanjem 1 M HCl (Merck, ZDA).

Sledijo natančnejši opisi raztopin, ki smo jih uporabili za pripravo vzorcev za PepMap:

- Preiskovani protein smo po oksidaciji denaturirali in reducirali z 0,5 M raztopino ditionitroreitol (Sigma Aldrich, ZDA) v denaturacijski raztopini, ki je vsebovala: 6 M gvanidinijev klorid (Merck, ZDA), 50 mM Tris HCl (Sigma Aldrich, ZDA) in 5 mM EDTA (Sigma Aldrich, ZDA). Postopek smo izvedli tako, da smo 20 µL vzorca dodali 150 µL denaturacijske raztopine in 5 µL raztopine ditionitroreitol, mešanico pa nato 15 minut stresali na 350 obratih (rpm) pri 37 °C.
- Nato smo vzorec z dodatkom 5 µL raztopine jodacetamida (Sigma Aldrich, ZDA) alkilirali in ga zaščitene pred svetlobo 1 uro stresali na 350 obratih, pri 25 °C.
- Po končani alkilaciji smo vzorcu dodali encim Lys-C (Wako, ZDA) (0,44 mg/mL v reakcijskem pufru) in ga 4 ure inkubirali pri 37 °C, s čimer smo protein razcepili na peptide.
- Po končani inkubaciji smo reakcijo razgradnje ustavili z dodatkom 2,5 µL trifluoroocetne kisline (Merck, ZDA).

3.2 Metode

3.2.1 Afinitetna kromatografija

Priprava raztopin

Za kromatografijo ALC smo uporabili dve mobilni fazi, s katerima smo ustvarili ustrezen gradient za kromatografsko ločbo, in sicer MFA in mobilno fazo B (MFB). Gradient smo vedno začeli s 100 % deležem MFA, saj smo ta pufer s pH = 7,5 uporabili za nanos vzorca na kolono. Njegov pH namreč omogoča vezavo mAb na protein A. Vrednost pH MFB pa je nižja in omogoča elucijo mAb iz kolone, zato s povečevanjem njenega deleža ustvarimo ustrezen elucijski gradient. Sestava mobilnih faz:

- MFA: 10 mM NaH₂PO₄ (Merck, ZDA) in 150 mM NaCl (Merck, ZDA), pH 7,5; uporabimo pa lahko tudi DPBS pufer (Gibco Life Technologies, ZDA) in
- MFB: 100 mM AcOH (Merck, ZDA) in 150 mM NaCl (Merck, ZDA), pH 2.8.

Kromatografski pogoji

Za kromatografijo smo uporabili kolono TSKgel Boronate-5PW, dimenzij 7,5 mm ID x 7,5 cm (L), proizvajalca Tosoh Bioscience (Japonska), v kateri je protein A kovalentno vezan na površino hidrofилnega medija POROS. Med analizo smo avtomatski vzorčevalnik ohranjali na 4 °C. Za delovni pretok smo določili 1 mL/min. Na kolono smo nanosili 125 µg

testiranega mAb, kar smo dosegli z injiciranjem 50 µL vzorca s koncentracijo 2.5 µg/mL. Naknadno pa smo ugotovili, da je metoda uporabna v širokem koncentracijskem območju. Za nominalni nanos smo izbrali 100 µg, ki ga lahko dosežemo s prilagajanjem volumna injiciranja in koncentracije glede na vzorce iz procesov čiščenja. Elucijski gradient smo ustvarili z mešanjem MFA in MFB, pri čemer smo odstotek slednje postopno povečevali do 35 % (Tabela I). Kolono smo na koncu ekvilibrirali z MFA. Kromatografske vrhove smo detektirali z ultravijolično absorbcijo pri 280 nm.

Tabela I: Elucijski gradient hitre metode ALC.

Čas (min)	2	2,1	3,4	3,65	6	7	8	9
% MFB	0	25	35	100	100	0	0	0

Določitev deleža oksidacije

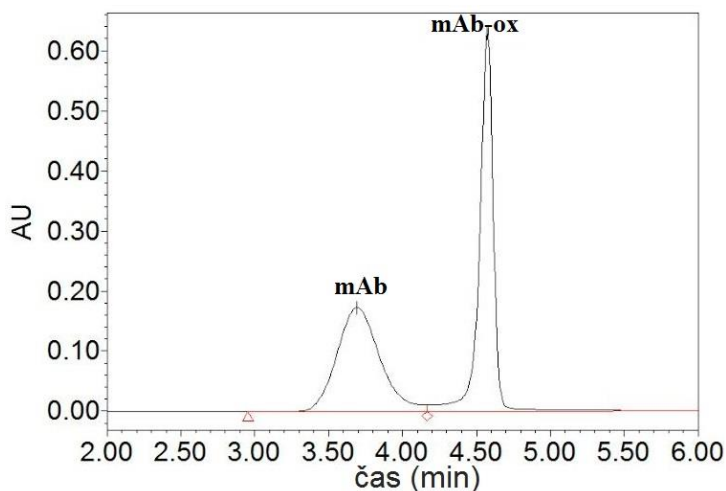
Poleg vzorcev smo v vsakem koraku analizirali tudi neoksidiran standard, popolnoma oksidiran standard, v nekaterih analizah tudi vzorec QCS, ki smo ga pripravili z mešanjem popolnoma oksidiranega in neoksidiranega standarda v razmerju 1:1 (vzorec s 50 % oksidiranih in 50 % neoksidiranih oblik testiranega mAb). QCS vzorec je vzorec, s katerim zagotovimo, da je sekvenca veljavna in rezultati zanesljivi (*angl. Quality control standard*).

Ustreznost integracije različno oksidiranih vzorcev smo ugotavljali s primerjavo kromatogramov vzorcev s kromatografskimi profili neoksidiranega standarda, popolnoma oksidiranega standarda in vzorca QCS. Pri pregledu kromatogramov standardov smo določili elucijski čas neoksidiranega in oksidiranega vrha. Izbrani način integracije, ki je bil najbolj reprezentativen in ponovljiv, je prikazan na Sliki 19. Oksidirani vrh smo od neoksidiranega ločili z izrisom navpične črte do bazne linije. Na prikazanih kromatogramih smo oksidirane vrhove označili z mAb_ox, neoksidirane pa z mAb. Ker je bila dolina med oksidiranim in neoksidiranim vrhom pri vzorcih z nižjo stopnjo oksidacije manj jasno izražena, smo za določitev razmejnitve raje uporabili vzorec QCS, pri katerem je bila le-ta jasno vidna in smo zato lahko določili retencijski čas omenjene razmejnitve. Stopnjo oksidacije v tem vzorcu smo izračunali kot odstotek površine oksidiranega vrha glede na celotno površino oksidiranega in neoksidiranega vrha skupaj, in sicer kot sledi:

$$\text{Površina oksidiranega vzorca (\%)} = AT \times 100 / AP$$

Legenda: AP = je skupna površina obeh vrhov v kromatogramu, AT = površina oksidiranega vrha.

Kromatograme smo integrirali z računalniškim sistemom Empower 3 (Waters, ZDA) in z njegovo pomočjo določili tudi relativne površine oksidiranih in neoksidiranih vrhov.



Slika 19: Prikaz načina integracije za vzorec QCS.

3.2.2 Peptidno kartiranje

Priprava raztopin in vzorcev

Pripravo vzorcev in raztopin smo natančneje opisali v poglavju 3.1.3. Protein smo z oksidacijskim pufrom redčili na končno koncentracijo 21 mg/mL, proces oksidacije pa ustavili z izmenjavo omenjenega pufra s pufrom za razgradnjo ali z dodatkom raztopine L-metionina. Nato smo odvzeli 20 μ L vzorca in nadaljevali s postopkom njegove priprave za PepMap.

Kromatografski pogoji

Za kromatografijo smo uporabili kolono Aeris Peptide 3,6u XB-C18, velikosti 150 x 2,10 mm, proizvajalca Phenomenex (ZDA). Temperaturo avtomatskega vzorčevalnika smo vzdrževali pri 4 °C, pretok nastavili na 0,45 mL/min, volumen injiciranja pa je bil 100 μ L. Uporabili smo dve mobilni fazi, s katerima smo ustvarili gradient za kromatografsko ločbo, in sicer MFA (prečiščena voda MilliQ z 0,08 % trifluoroocete kisline (Merck, ZDA)) in MFB (acetonitril (Merck, ZDA) z 0,075 % trifluoroocetne kisline). Gradient obeh MF je predstavljen v Tabeli II. Kromatografske vrhove smo detektirali pri 206 nm z detektorjema

MWD ali VWD (UV detekcija). Referenčna valovna dolžina je bila 245 nm, uporabili pa smo standardno pretočno detektorsko celico, z dolžino poti 10 mm in 13 μ L zanko.

Tabela II: Gradient, ki smo ga uporabili za izvedbo peptidnega kartiranja.

Čas (min)	0	2	15	21	47	58	74	76	80	83	90
% MFB	2	2	15	15	25	25	40	95	95	2	2

Pri nekaterih analizah smo imeli sistem za pretočno kromatografijo povezan z masnim detektorjem za identifikacijo peptidov, na katerih so se nahajali oksidirani metioninski ostanki. Uporabljali smo masni detektor Thermo QExactive Plus (Thermo Scientific, ZDA).

Določitev deleža oksidacije mAb

Rezultate masne spektrometrije, pridobljene z analizo PepMap na sistemu tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC), sklopljenim z masnim spektrometrom, smo obdelali z računalniškim programom PepFinder (Thermo Scientific, ZDA).

Ustreznost integracije različno oksidiranih vzorcev smo ugotavljali s primerjavo le-teh z neoksidiranim in popolnoma oksidiranim standardom, ki smo ju analizirali v vsaki kromatografski sekvenci.

4 REZULTATI

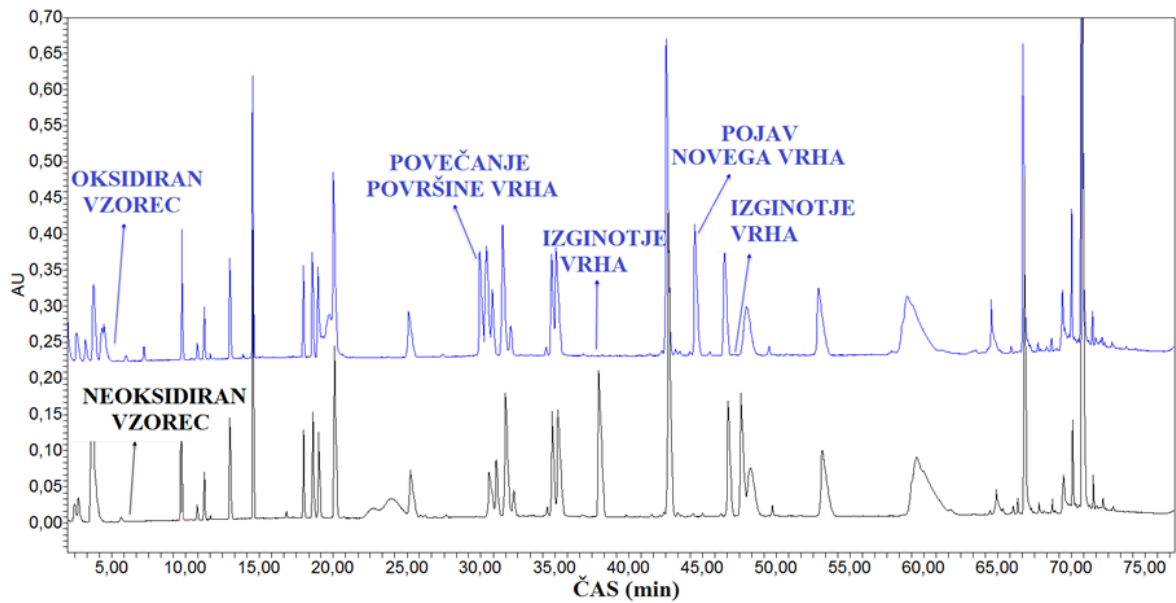
4.1 Začetne analize

Pripravo vzorcev, raztopin in kromatografskega sistema ter izvedbo analiz PepMap in ALC smo opisali v poglavjih: 3.1 in 3.2. V tem poglavju pa bomo po ključnih točkah predstavili postopke in rezultate razvoja krajše metode ALC. Pripravo vzorcev in raztopin ter kromatografskih pogojev, ki smo jih med razvojem testa spreminjali, bomo v nadaljevanju sistematsko predstavili za vsak parameter posebej.

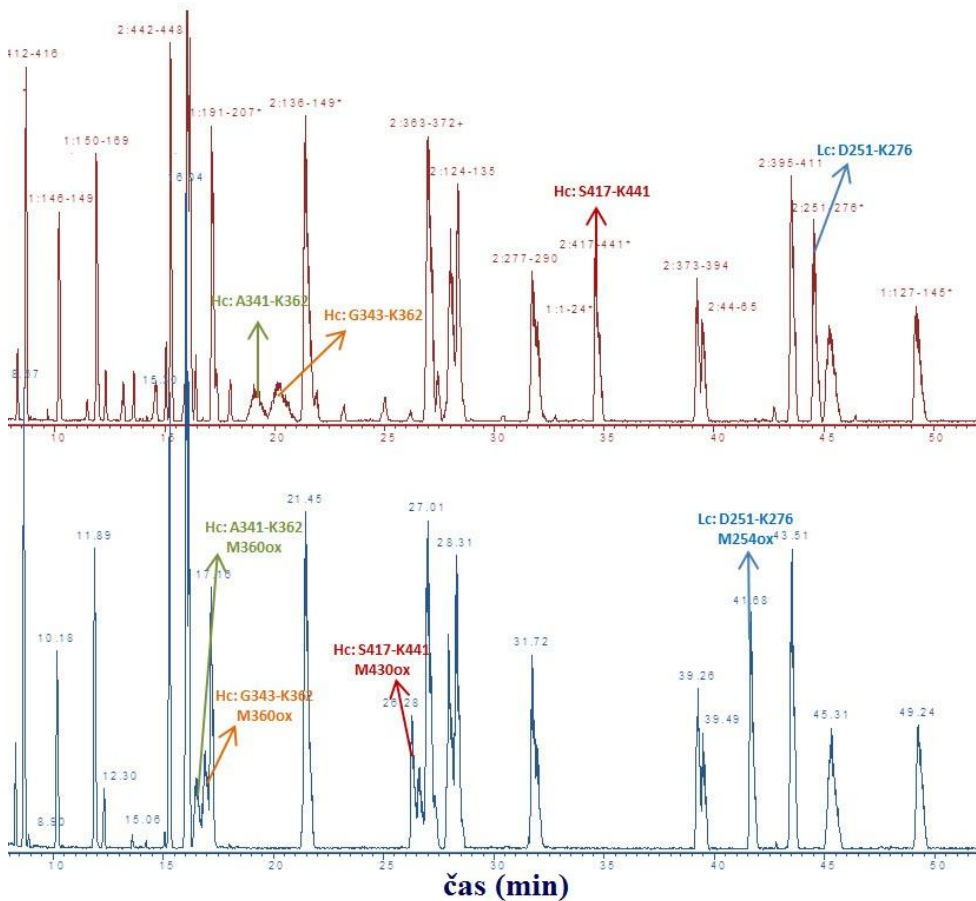
4.1.1 Peptidno kartiranje

Referenčno metodo peptidnega kartiranja smo uporabili na začetku razvoja novega analitskega postopka, da bi identificirali peptide mAb, na katerih so metionini, ki se oksidirajo. Zaradi njihove lažje identifikacije, smo pripravili vzorce, ki smo jim dodali različne koncentracije H₂O₂, in sicer: 0,01; 0,03; 0,05; 0,07; 0,09; 0,1; 0,2; 0,3; in 0,5 % (v/v) ter spremljali deleže peptidov v odvisnosti od stopnje oksidacije mAb.

Za določanje sprememb v deležih vrhov posameznih peptidov smo primerjali kromatograma oksidiranega in neoksidiranega standarda mAb IgG1. Kot vidimo na Sliki 20 je pri oksidiranem vzorcu prišlo do izginotja dveh kromatografskih vrhov in pojava oziroma povečanja dveh drugih. Prve spremembe na kromatogramu smo opazili že pri tretiranju vzorca z 0,01 % H₂O₂. Peptide, na katerih je potekala oksidacija, smo identificirali tako, da smo spremljali površino ustreznega vrha, ki se je zmanjševala v odvisnosti od koncentracije H₂O₂ v vzorcu, pri čemer se je povečevala površina vrha, ki ga pri netretiranem vzorcu nismo zaznali. Identifikacijo peptidov, na katerih se nahajajo metioninski ostanki, smo potrdili z masno spektrometrijo (Slika 21).



Slika 20: Kromatograma PepMap oksidiranega (moder) in neoksidiranega (črn) vzorca monoklonskega protitelesa podrazreda IgG1.



Slika 21: Kromatograma MS oksidiranega (moder) in neoksidiranega (rdeč) vzorca monoklonskega protitelesa podrazreda IgG1.

Legenda: kromatogram rdeče barve prikazuje neoksidiran vzorec, kromatogram modre barve pa oksidiran vzorec. Puščice enakih barv prikazujejo spremembe na enem metioninskem ostanku, ki jo je povzročila oksidacija s H₂O₂. (M360ox = Met360 v oksidiranem vzorcu, M430ox = Met430 v oksidiranem vzorcu, M254ox = Met254 v oksidiranem vzorcu). Hc: težka veriga, Lc: lahka veriga (Hc: A341-K362 in G343-K362 označujeta del aminokislinskega zaporedja težke verige preiskovanega mAb, v katerem se nahaja Met360, Hc: S4177-K441 označuje del aminokislinskega zaporedja težke verige preiskovanega mAb, v katerem se nahaja Met430 in Lc: D251-K27 označuje del aminokislinskega zaporedja lahke verige preiskovanega mAb, v katerem se nahaja Met254).

V okviru našega dela smo se osredotočili na spremembe, nastale zaradi oksidacije dveh Met ostankov, in sicer Met254 in Met430. Kvantificirali smo tudi spremembe, ki so bile posledice oksidacije Met360, vendar pa teh rezultatov nismo prikazali.

4.1.2 Analiza ALC

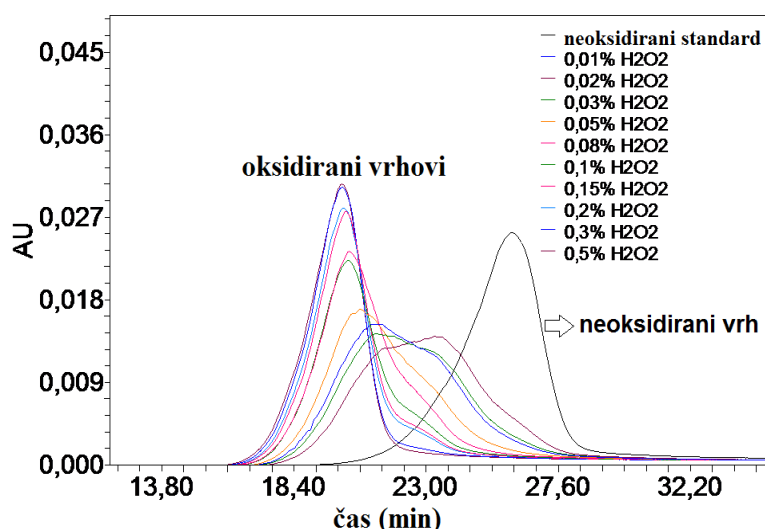
Izvedli smo analizo ALC, kot je opisana v strokovni literaturi (21, 23 in 25). V ta namen smo pripravili vzorce različno oksidiranega proteina IgG1, in sicer z uporabo H₂O₂ v končnih koncentracijah: 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,08; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 in 0,5 % (v/v). Oksidacijo smo ustavili z izmenjavo oksidacijskega pufra z MFA, nato pa opazovali spremembe v kromatografskih profilih vzorcev. To metodo smo poimenovali metoda A, uporabljeni gradient pa je prikazan v Tabeli III.

Tabela III: Gradient, ki smo ga uporabili za izvedbo metode A.

Čas (min)	0	10	41	41,1	51,1	61
% MFB	0	0	60	100	0	0

Pri analizi kromatograma smo opazili premik RT glede na stopnjo oksidiranosti mAb. Najbolj oksidirane oblike so se v povprečju eluirale približno 4-6 minut prej kot neoksidirani standard, za katerega je bil značilen le en neoksidiran vrh. Pri vzorcih, ki smo jim dodali različne končne koncentracije H₂O₂, torej pri vzorcih z različnimi deleži oksidiranih oblik proteina, smo opazili različne vrednosti RT. Večja kot je bila koncentracija H₂O₂, večji je bil premik oksidiranega vrha v levo. Samo pri končni 0,3 % koncentraciji H₂O₂ ali več smo detektirali le oksidiran vrh, pri ostalih koncentracijah pa sta bila prisotna dva, in sicer oksidiran in neoksidiran. Pri končnih koncentracijah H₂O₂, ki so bile < 0,3 %, smo opazili

pojav rame pri neoksidiranem vrhu, kar lahko pojasnimo z majhnim deležem prisotnih oksidiranih oblik mAb, ki se v danih pogojih niso ločile od glavnega vrha. Skladno z rezultati tega poskusa smo zaključili, da nam izmerjene razlike v RT omogočajo tako ločevanje oksidiranih od neoksidiranih proteinov, kot tudi kvalitativno določanje deleža oksidacije. Zato smo se odločili razviti hitrejšo metodo, ki bo temeljila na ločevanju oksidiranih od neoksidiranih proteinov na osnovi razlik v retencijskem času.



Slika 22: Kromatogram detekcije obsega oksidacije molekule IgG2 s klasično daljšo ALC metodo.

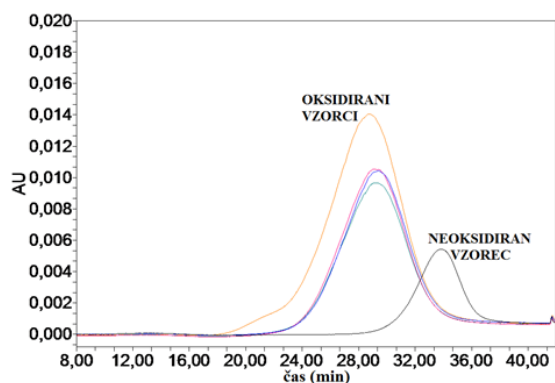
Da bi vzorce pripravili čim hitreje, smo jih po oksidaciji stabilizirali z DBPS ali L-metioninom. Vzorce protitelesa IgG2 smo analizirali z metodama A (Tabela III) in B (Tabela IV), ki sta opisani v strokovni literaturi. Protitelo IgG2 smo uporabili le pri tej analizi, pri vseh nadaljnjih pa smo analizirali mAb podrazreda IgG1.

Tabela IV: Gradient metode B, ALC.

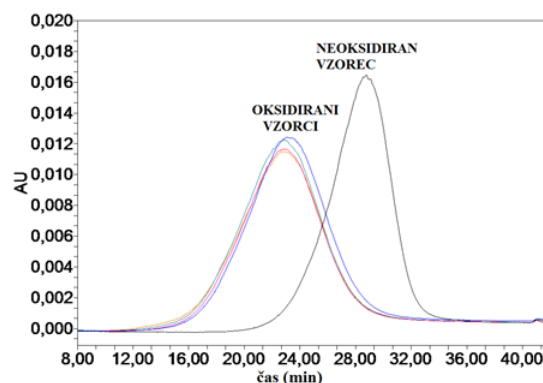
Čas (min)	0	40	41	51	51,1	62
% MFB	0	60	100	100	0	0

Pri izvedbi analize smo ugotovili, da način zaustavitve oksidacije ne vpliva na določitev razlik v RT med oksidiranim in neoksidiranim IgG2, kar prikazujeta Sliki 23 in 24. Razlika v RT oksidiranega in neoksidiranega vzorca je bila med 5-6 minut.

Ker razlik, ki bi bile posledica različnega načina zaustavitve oksidacije nismo zaznali, smo se odločili, da bomo zaradi enostavnosti za nadaljnje poskuse uporabljali L-metionin.



Slika 23: Kromatogram ALC, L-metionin, metoda B, IgG2.



Slika 24 Kromatogram ALC, DPBS pufer, metoda A, IgG2.

4.2 Razvoj hitre analizne metode ALC

Pri razvoju hitre kromatografske metode ALC smo spreminjali gradient, pretok, temperaturo kolone in sestavo mobilnih faz.

4.2.1 Gradient

Pripravili smo 100 % oksidiran standard mAb IgG1. Na osnovi rezultatov predhodno opisanih analiz (Slika 22) smo ugotovili, da je imel take lastnosti vzorec z dodatkom 0,5 % H_2O_2 . Ob pregledu kromatogramov smo namreč le pri tem vzorcu zaznali izključno oksidirano obliko mAb, pri ostalih koncentracijah pa sta bili prisotni tako oksidirana, kot neoksidirana oblika. Od sedaj naprej bomo ta vzorec imenovali 100 % oksidirani oziroma popolnoma oksidirani standard. Z mešanjem neoksidiranega in popolnoma oksidiranega standarda pa smo pripravili sestavljene vzorce, ki so nam omogočili razvoj krajše metode ALC. Z dodatno analizo (rezultati niso prikazani), s katero smo želeli preveriti, s katero koncentracijo H_2O_2 v končni raztopini smo dejansko pridobili 100 % oksidiran standard, smo ugotovili, da smo z uporabo končnih koncentracij H_2O_2 , ki so bile okoli 0,3 % in več dobili 100 % oksidiran vzorec.

Oba standarda smo pripravili po že opisanem postopku (poglavje 3.1.2), pripravo sestavljenih vzorcev pa prikazuje Tabela V.

Tabela V: Priprava sestavljenih vzorcev.

Ime vzorca	% popolnoma oksidirane standarda IgG1	% neoksidiranega standarda IgG1
1 % oksidiran	1	99
3 % oksidiran	3	97
5 % oksidiran	5	95
6 % oksidiran	6	94
9 % oksidiran	9	91
10 % oksidiran	10	90

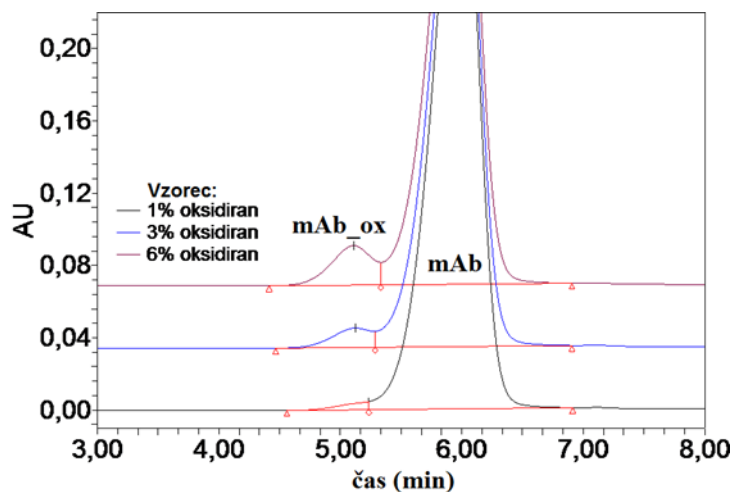
Za razvoj hitre kromatografske metode ALC smo s spreminjanjem gradienta testirali različne analitske pogoje, da bi dosegli ustrežbo ločbo oksidiranih in neoksidiranih oblik mAb. Testirali smo kar 10 različnih metod, pri katerih smo v pričakovanem elucijskem času spreminjali delež MFB, v odvisnosti od časa. Pri vseh testiranih metodah smo kolono na začetku 2 minuti kondicionirali s spiranjem z MFA, na koncu pa smo jo sprali s 100 % MFB in ponovno kondicionirali s 100 % MFA. Pri vseh metodah smo uporabili enak pretok (2 mL/min) in enako temperaturo kolone (25 °C).

Metoda C: 0-60 % MFB v času 6 min

Slika 25 prikazuje kromatograme sestavljenih vzorcev, ki so vsebovali 1 %, 3 % in 6 % oksidiranih oblik. S pomočjo tabele uporabljenih gradientov (Tabela VI) in RT na kromatogramih smo lahko določili, pri katerih odstotkih mobilne faze B smo lahko ločili oksidirane od neoksidiranih oblik mAb. Pri metodi C so se oksidirane oblike iz kolone izločile pri < 60 % MFB. Pri podajanju % MFB nismo upoštevali mrtvega volumna sistema in dolžine kolone, zato so navedeni podatki teoretični, kar velja tudi za vse nadaljnje analize. Vrhova oksidiranih in neoksidiranih oblik sta dobro ločena, z izjemo vzorca z najmanjšim deležem oksidirane standarda (1 %). S tem poskusom smo dokazali, da lahko tudi s hitro metodo ločimo oksidirane od neoksidiranih oblik mAb.

Tabela VI: Uporabljeni gradient za metodo C, ALC.

Čas (min)	2	2,1	6	6,1	8	8,1	10
% MFB	0	0	60	100	100	0	0



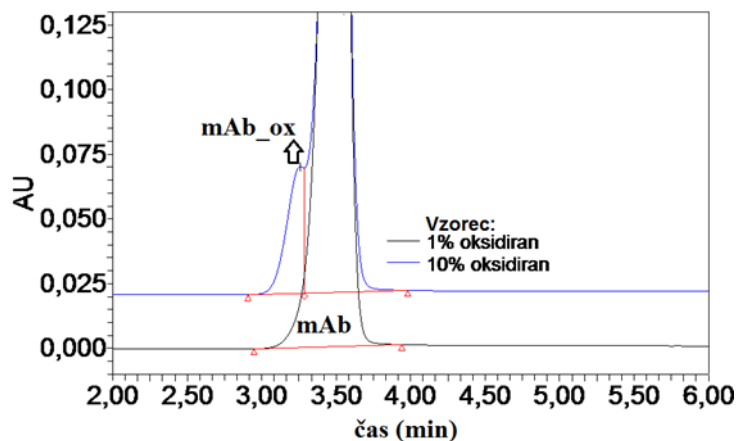
Slika 25: Kromatogram ALC pridobljen z metodo C.

Metoda Č: 100 % MFB v čas 4 minute

Z naslednjim poskusom smo preverili, kakšno ločbo dobimo, če odstotek MFB zvišujemo hitreje in tako povečujemo naklon gradienta (Tabela VII). Pri analizi vzorcev, ki so vsebovali 1 % in 10 % oksidiranih mAb, smo ugotovili (Slika 26), da zaradi prehitrega povečevanja % MFB pri 1 % mAb_{ox} ne moremo ločiti oksidiranih od neoksidiranih oblik mAb. Tudi v vzorcu, ki je vseboval 10 % oksidiranih oblik mAb, smo detektirali le ramo glavnega, neoksidiranega vrha, oksidiranih oblik pa nismo mogli ločiti do bazne linije kot pri uporabi metode C.

Tabela VII: Uporabljeni gradient za metodo Č, ALC.

Čas (min)	2	4	6	7	9
% MFB	0	100	100	0	0



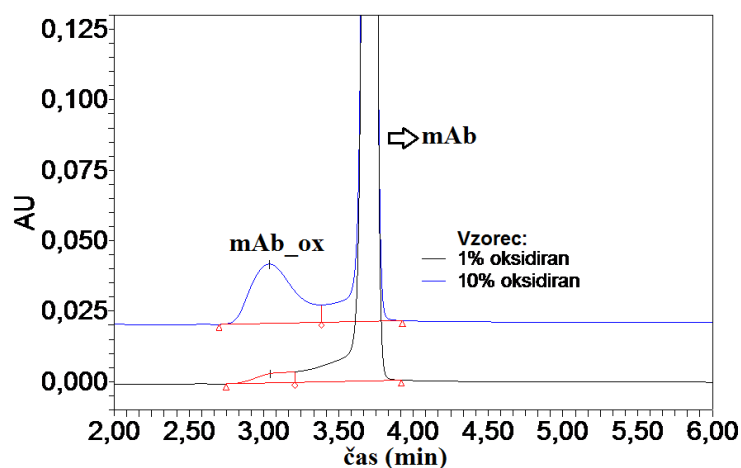
Slika 26: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo Č.

Pri nadaljnjem razvoju smo gradient optimizirali, tako da smo uporabili nižji začetni odstotek MFB, in sicer od 25 do 30 % (namesto od 0 do 100 ali 60 %) in ga postopno povečevali do 100 % (metoda D, Tabela VIII).

Metoda D: 25-30 % MFB v 1 minuti

Tabela VIII: Uporabljeni gradient za metodo D, ALC.

Čas (min)	2	2,1	3,1	3,2	4,1	5	6
% MFB	0	25	30	100	100	100	0



Slika 27: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo D.

Iz kromatograma na Sliki 27 je razvidno, da se oksidirane oblike mAb eluirajo pri > 30 % MFB. V primerjavi z metodo Č, kjer smo uporabili strm gradient, smo z metodo D dosegli boljšo ločbo oksidiranih in neoksidiranih oblik, vendar pa se vrhova nista ločila na bazni liniji. Pri 1% oksidiranem vzorcu smo opazili 'prednjenje', kar pomeni, da oksidirani vrh ni bil jasno ločen od neoksidiranega oziroma je vanj prehajal.

Metoda E: 20-35 % MFB in Metoda F: 35 % MFB (izokratska metoda)

V naslednji analizi smo želeli izboljšati simetrijo neoksidiranega vrha in doseči ločevanje oksidiranih in neoksidiranih vrhov, za kar smo uporabili metodo E. V tem primeru smo območje postopne elucije izvedli s povečanjem deleža MFB od 20 do 35 % (Tabela IX). Hkrati smo želeli preveriti tudi način elucije pri MFB < 35 %. Ugotovili smo že, da se je oksidirani vrh izločil še preden smo dosegli 35 % MFB, kar smo nato tudi potrdili z naslednjo metodo F, pri kateri smo uporabili izokratski gradient s 35 % MFB (Tabela X).

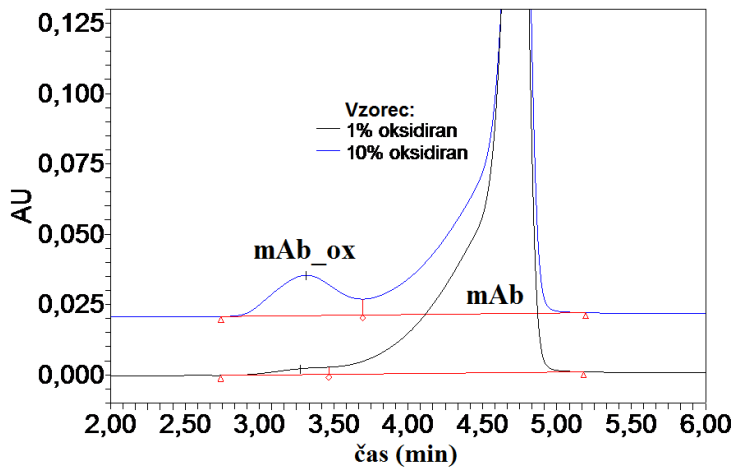
Tabela IX: Uporabljeni gradient za metodo E, ALC.

Čas (min)	2	2,1	4	5,1	6,1	7,1	8,1
% MFB	0	20	35	100	100	0	0

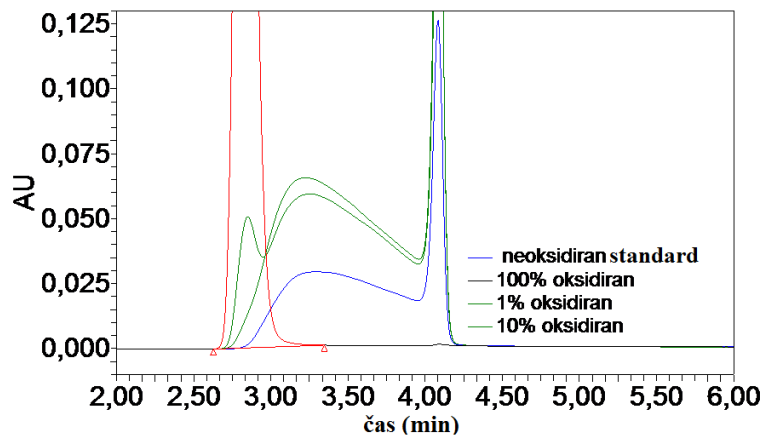
Tabela X: Uporabljeni gradient za metodo F, ALC.

Čas (min)	2	2,1	3,5	3,6	5	6	7
% MFB	0	35	35	100	100	0	0

Z metodo E smo detektirali ostrejši oksidiran vrh (Slika 28), vendar pa tudi večje prednjenje neoksidiranega vrha, zato smo se odločili, da metoda ni ustrezna. Z metodo F pa je elucija oksidiranega proteina iz kolone potekala predolgo, saj je prišlo do izrazitega prednjenja neoksidiranega vrha (Slika 29).



Slika 28: Kromatogram ALC, sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo E.



Slika 29: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo F.

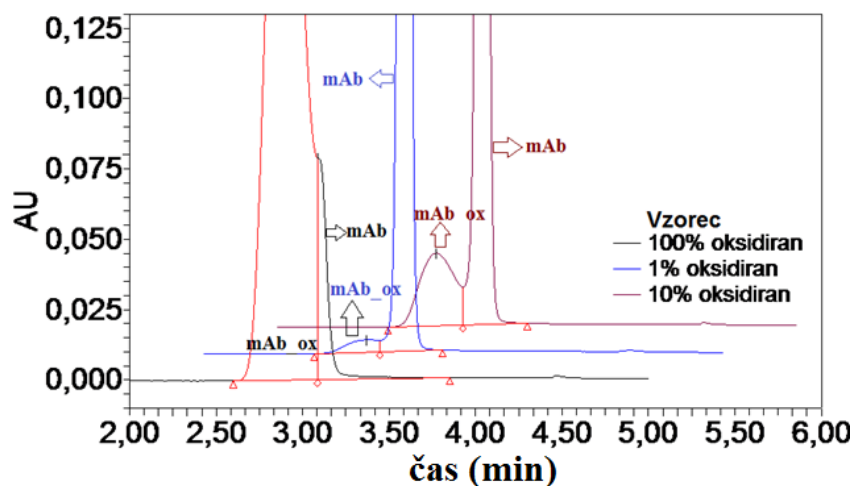
Metoda G: 28 % MFB

Zaradi neustreznosti metod E in F smo v nadaljevanju preizkusili še izokratsko metodo z manjšim, in sicer 28 % deležem MFB (Tabela XI).

Pri analizi popolnoma oksidirane standarda smo na repu oksidirane vrha opazili ramo, ki je glede na RT najverjetneje predstavlja neoksidiran del vzorca. Smo pa s to metodo v primerjavi s prejšnjimi (od A do F) opazili boljšo ločbo med oksidiranimi in neoksidiranimi oblikami mAb (Slika 30). Vendar zaradi rame metode ne bomo razvijali naprej.

Tabela XI: Uporabljeni gradient za metodo G; ALC.

Čas (min)	2	2,01	2,6	2,61	3,65	3,66	5
% MFB	0	28	28	100	100	0	0



Slika 30: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo G.

Metoda H: 25-35% MFB in, Metoda I: 20-35% MFB

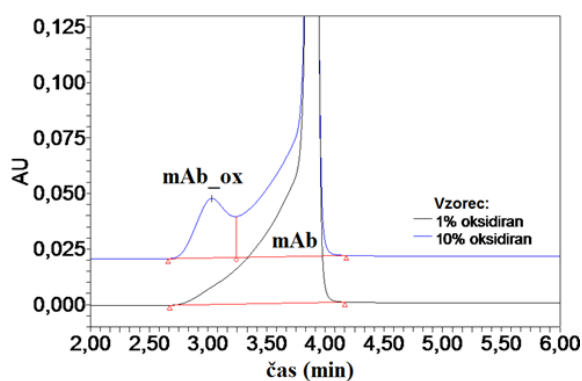
Pri pregledu kromatogramov pridobljenih z obema metodama, smo opazili prednjenje (Sliki 31 in 32), poleg tega pa pri 1 % oksidiranem vzorcu nismo mogli zanesljivo ločiti oksidiranega vrha od neoksidiranega. Korelacija med odstotkom AU oksidiranega vrha v kromatogramu in teoretičnim odstotkom popolnoma oksidiranega standarda v vzorcu je bila pri metodi I dobra (Tabela XIV), zato smo jo razvijali naprej, tako da smo spreminjali še ostale pogoje kromatografske ločbe (da bi dosegli ostrejše vrhove oksidiranih oblik mAb in še jasnejšo ločbo med oksidiranimi in neoksidiranimi proteini). Gradienta obeh metod sta predstavljena v Tabelah XII in XIII.

Tabela XII: Uporabljeni gradient za metodo H, ALC.

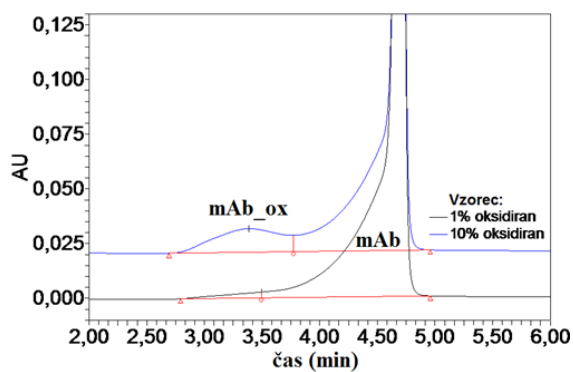
Čas (min)	2	2,1	3,3	3,4	5,4	6,4	7,5
% MFB	0	25	35	100	100	0	0

Tabela XIII: Uporabljeni gradient za metodo I, ALC.

Čas (min)	2	2,1	4	4,1	6,1	7,1	8,1	9
% MFB	0	20	35	100	100	0	0	0



Slika 31: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo H.



Slika 32: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I.

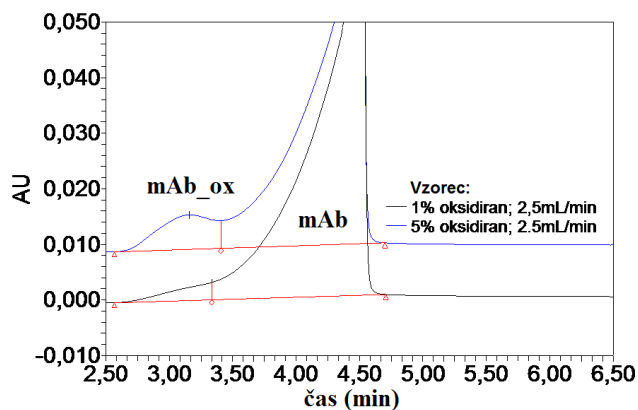
Tabela XIV: Korelacija med teoretičnim % oksidiranega standarda v vzorcu in % površine vrha oksidirane oblike mAb na kromatogramu, pridobljenim z metodo I.

Ime vzorca	Neoksidiran	1 % oksidiran	5 % oksidiran	10 % oksidiran	100 % oksidiran
% oksidirane oblike	0	0,75	3,99	8,87	99,46

4.2.2 Pretok skozi kolono

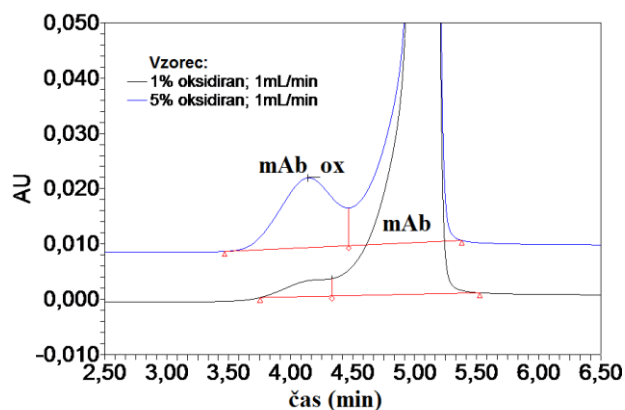
S spreminjanjem hitrosti pretoka skozi kolono smo želeli izboljšati ločbo med oksidiranimi in neoksidiranimi oblikami mAb. Pretok smo z 2 mL/min spremenili na 0,7 mL/min, 1 mL/min ter 2,5 mL/min in spremljali ločbo. Za določanje vpliva pretoka smo uporabili sestavljene vzorce, ki so vsebovali 1, 3, 5, 6 in 10 % oksidiranih oblik mAb. Za osnovo smo uporabili metodo I pri pretoku 2 mL/min.

Pri višjem pretoku (2,5 mL/min) smo ugotovili, da je bila ločba med oksidiranimi in neoksidiranimi oblikami mAb, v primerjavi z nižjim pretokom, zaradi izrazitejšega prednjenja slabša (Slika 33), zato smo se odločili, da bomo za izboljšanje ločbe obeh vrhov pretok znižali.



Slika 33: Kromatogram ALC, sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I pri, pretoku 2,5 mL/min.

Ko smo uporabili pretok 1 mL/min, sta se vrhova ločila skoraj do bazne linije brez izrazitejšega prednjenja (Slika 34).

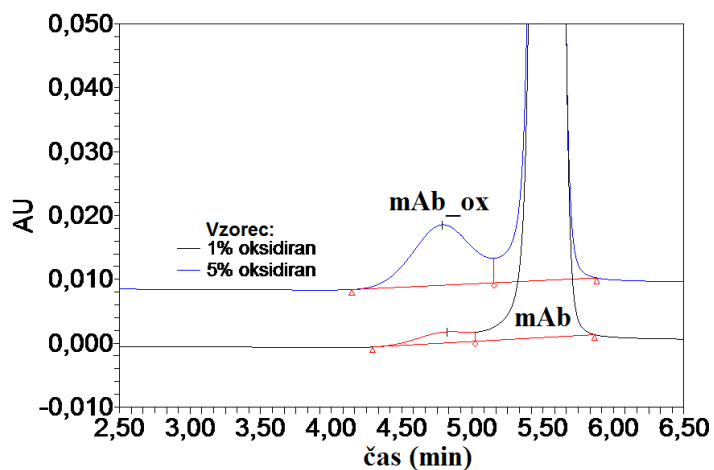


Slika 34: Kromatogram ALC, sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I, pri pretoku 1 mL/min.

Kljub temu pa se oksidirani vrh v 1 % oksidiranem vzorcu ni jasno ločil od neoksidiranega, zato smo to želeli izboljšati s spreminjanjem drugih parametrov.

Pretok: 0,7 mL/min

Ker smo želeli oksidirane vrhove od neoksidiranih ločiti bolje tudi v vzorcih z manjšim odstotkom oksidiranih oblik mAb, smo pretok znižali na 0,7 mL/min, s čimer pa tega nismo dosegli (Slika 35), zato smo razvoj metode nadaljevali pri izbranem pretoku 1 mL/min.



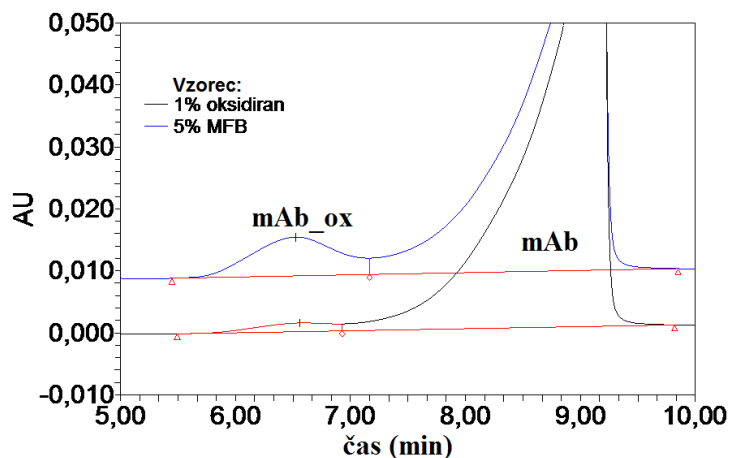
Slika 35: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I, pri pretoku 0,7 mL/min.

Tako smo v nadaljevanju spreminjali tudi čas gradienta. Pri pretoku 1 mL/min smo ga podaljšali za faktor 2 (Tabela XV).

Tabela XV: Podaljšan čas gradienta MFB pri metodi I, ALC.

Čas (min)	4	4,2	8	8,2	12,2	14,2	16,2	18
% MFB	0	20	35	100	100	0	0	0

S podaljšanjem časa gradienta pri pretoku 1 mL/min smo opazili prednjenje, tako kot pri višjem pretoku z nespremenjenim časom gradienta (Slika 36).



Slika 36: Kromatogram ALC, sestavljena vzorca, 1mL/min, podaljšan čas.

Korelacija med teoretičnim odstotkom oksidirane standarda v vzorcu in odstotkom izračunanim iz površine oksidirane vrha pri ohranjenem gradientu (Tabela XVI) je bila primerljiva s tisto, prikazano v Tabeli XIV, zato smo v nadaljnjih poskusih uporabljali nespremenjen čas gradienta, in sicer pri pretoku 1 mL/min.

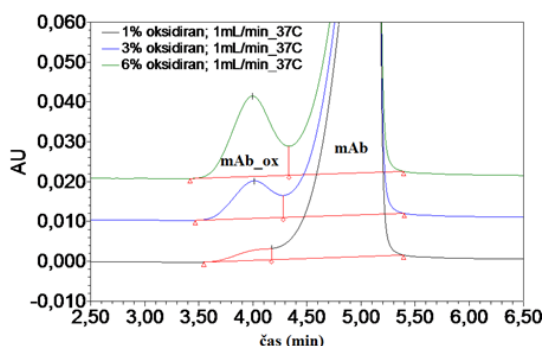
Tabela XVI: Korelacija med teoretičnim % oksidirane standarda v vzorcu in % izračunanim iz površine oksidirane vrha v kromatogramu, metoda I, pretok 1mL/min z ohranjenim gradientom.

Ime vzorca	neoksidiran	1 % oksidiran	5 % oksidiran	10 % oksidiran	100 % oksidiran
% oksidirane oblike	0	0,75	3,86	9,09	97,62

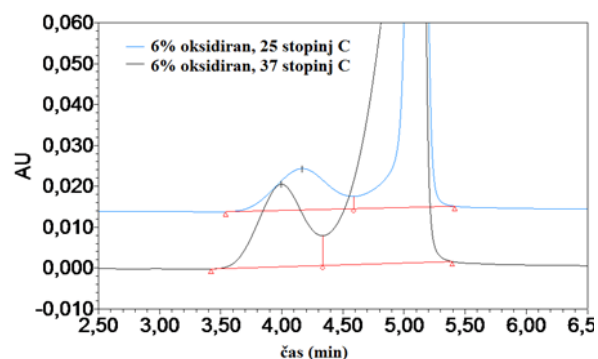
4.2.3 Temperatura kolone

S spreminjanjem temperature kolone smo želeli preveriti vpliv temperature na ločbo oksidiranih in neoksidiranih oblik mAb, saj je znano, da se molekule pri višji temperaturi zaradi drugačnih interakcij med proteinom A in molekulami IgG premikajo hitreje (10). Metodo I smo izvajali pri sobni temperaturi, v tem poskusu pa smo jo dvignili na 37 °C. Ločbo smo opazovali pri sestavljenih vzorcih, ki so vsebovali 0, 1, 3, 6 in 9 % oksidirane proteina.

Kot vidimo na Slikah 37 in 38, povišana temperatura kolone (37 °C) nima pomembnega vpliva na ločbo, zato smo se odločili da bomo v nadaljevanju vse analize izvajali pri sobni temperaturi kolone, tako kot to priporoča proizvajalec.



Slika 37: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I, pri temperaturi kolone 37 °C.



Slika 38: Primerjava kromatografskih ločb istih sestavljenih vzorcev pri 25 in 37 °C.

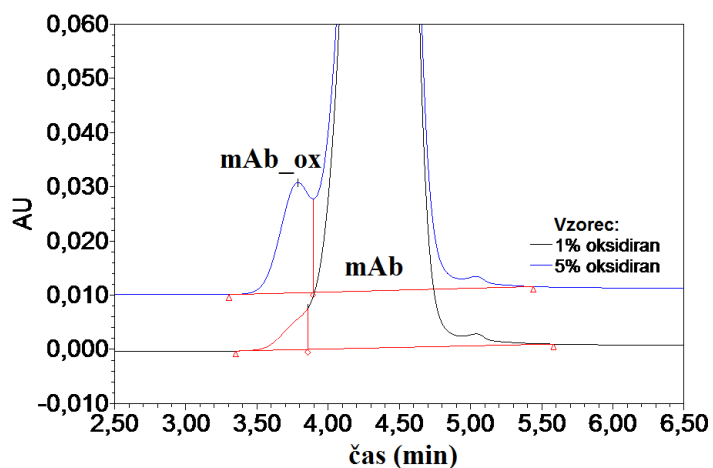
4.2.4 Spreminjanje vrednosti pH mobilnih faz A in B

S spreminjanjem vrednosti pH mobilnih faz smo preverili tovrstne vplive na ločbo oksidiranih in neoksidiranih oblik mAb. Pri MFB smo vrednost pH spreminjali z 2,8 na 2,6 in 3,0, kar smo dosegli z dodajanjem 1M raztopine NaOH (Merck, ZDA) ali 1M raztopine HCl (Merck, ZDA). Pri MFA pa smo pH zniževali z vrednosti 7,5 na 7,0 in 6,2, in sicer z dodajanjem 1M HCl (Merck, ZDA).

Za ugotavljanje vplivov različnih vrednosti pH MF smo analizirali 100 % oksidiran in neoksidiran standard ter sestavljene vzorce z naslednjimi deleži oksidiranih oblik: 1, 3, 5 in 6 %. Analize smo izvedli z metodo I pri pretoku 1 mL/min. Najprej smo ločeno spreminjali pH vrednosti MFB, nato pa še MFA in kasneje analizirali tudi interakcije različno spremenjenih pH vrednosti obeh mobilnih faz.

Vrednost pH MFB = 2

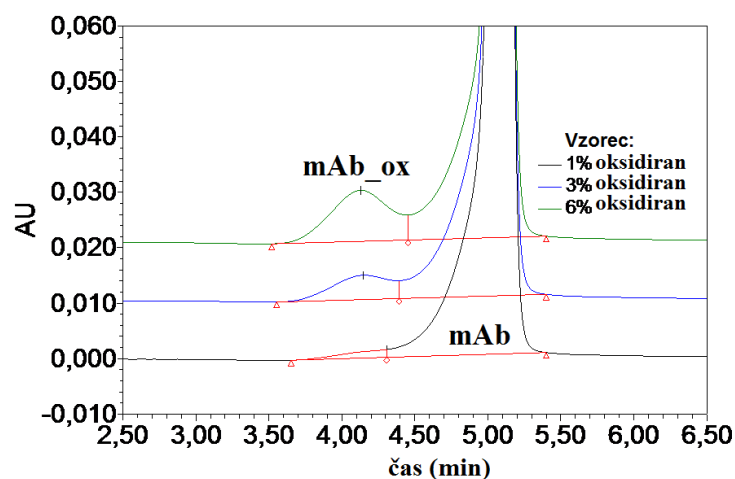
Vrednost pH MFB = 2 ločbe ni izboljšala, saj se vrhova nista ločila do bazne linije. Pri sestavljenem vzorcu z 1 % oksidiranih oblik mAb smo opazili le ramo neoksidiranega vrha (Slika 39).



Slika 39: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I pri vrednosti pH MFB = 2.

Vrednost pH MFB = 2,6

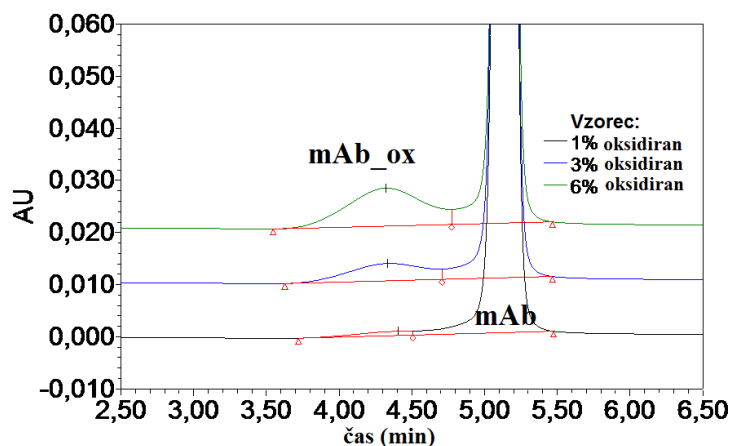
Pri vrednosti pH MFB = 2,6 so bili vrhovi oksidiranih oblik ostrejši, vendar pa ločba med oksidiranimi in neoksidiranimi oblikami pri manjši stopnji oksidacije (npr. 1 %) ni bila jasna (Slika 40), zato smo se odločili, da vrednosti MFB ne bomo več zmanjševali.



Slika 40: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I, pri vrednosti pH = 2,6.

Vrednost pH MFB= 3

Ko smo zviševali vrednost pH MFB na 3, smo sicer dobili jasnejše ločbe med vrhovi oksidiranih in neoksidiranih oblik, vendar ti niso bili ostri, ampak precej široki, kar je otežilo ločbo pri nižjih vrednostih oksidiranih oblik (Slika 41). Zato smo se odločili, da vrednosti pH MFB ne bomo zviševali in da bomo v nadaljevanju uporabljali MFB s pH = 2.8.



Slika 41: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I pri vrednostih pH MFB = 3.

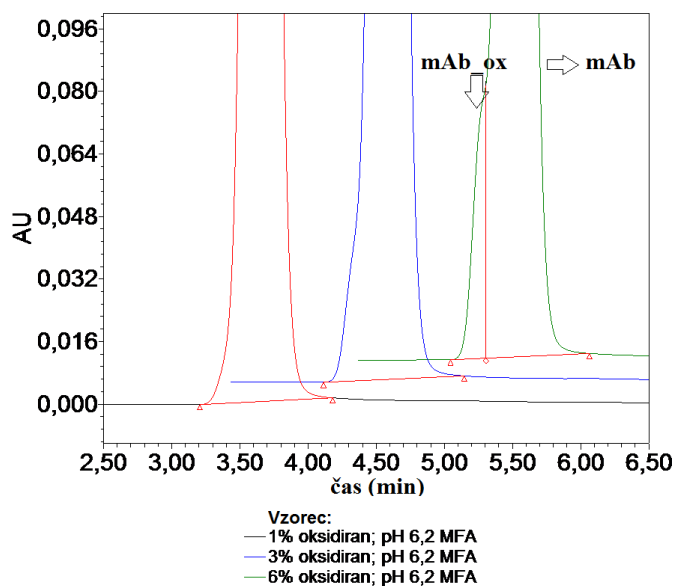
Kot smo že omenili smo preverili tudi vplive nižjih vrednosti pH MFA na kromatografsko ločbo. Tudi v tem primeru z zniževanjem vrednosti pH MFA s 7,5 na 7,0 in 6,2 nismo uspeli doseči boljše ločbe oksidiranih in neoksidiranih oblik mAb, niti pri tistih vzorcih, ki so vsebovali višje deleže oksidiranih oblik proteina (Slika 42).

Vrednost pH MFA = 6,2

Pri vrednosti pH = MFA 6,2 nismo detektirali oksidiranih vrhov, niti v obliki rame na glavnem, neoksidiranem vrhu (Slika 42).

Pri vrednosti pH MFA = 7 pa smo opazili prednjenje (kromatogram ni prikazan), zato smo sklenili, da pH MFA ne bomo več zniževali.

V poskusu, kjer smo sočasno znižali vrednost pH MFA s 7,5 na 7,0 in zvišali vrednost pH MFB z 2,8 na 3,0, ločbe prav tako nismo uspeli izboljšati (kromatogram ni prikazan).



Slika 42: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo I in vrednostjo pH MFA = 6,2.

4.2.5 Razvoj nadaljnjih dveh novih metod

Na podlagi navedenih ugotovitev glede vplivov sprememb gradienta, pretoka in različnih vrednosti pH MF na ločbo oksidiranih in neoksidiranih oblik mAb, smo izdelali še dve novi metodi in ju ovrednotili s primerjavo kromatogramov (Sliki 43, 44). Metodi smo označili s črkama J in K, njuna gradienta pa sta prikazana v Tabelah XVII in XVIII.

Tabela XVII: Uporabljeni gradient za metodo J, ALC.

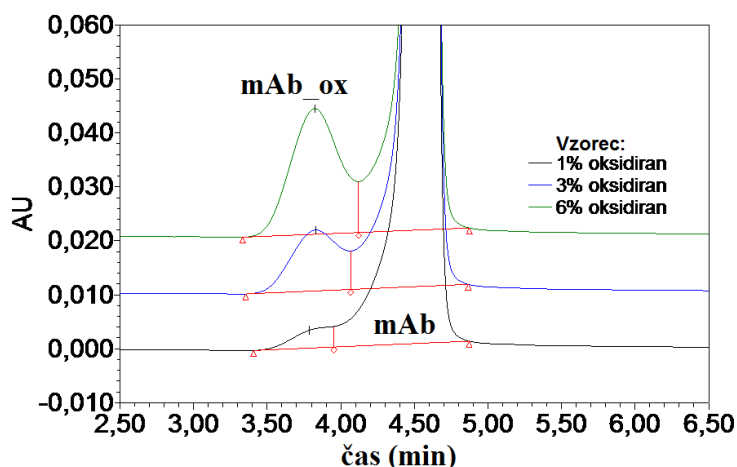
Čas (min)	2	2,1	3,4	3,65	6	7	8	9
% MFB	0	25	35	100	100	0	0	0

Tabela XVIII: Uporabljeni gradient za metodo K, ALC.

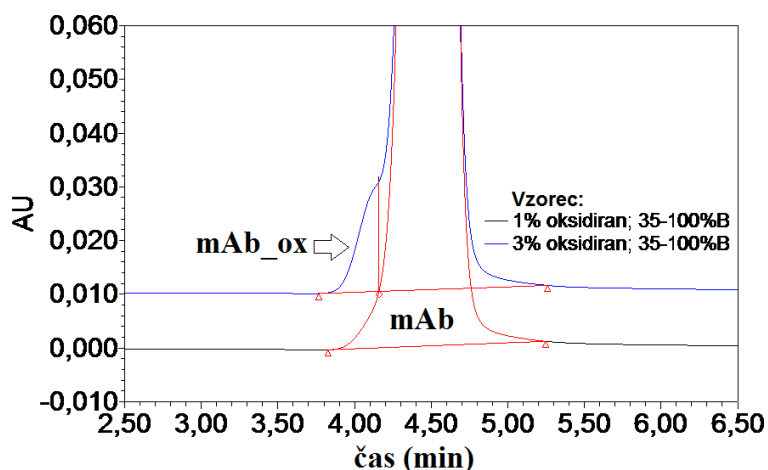
Čas (min)	2	3	5	7	8
% MFB	0	35	100	0	0

Vzorci so pripravili tako kot je opisano v poglavju 4.2.1.

Z metodo J smo lahko ločili oksidiran vrh od neoksidiranega tudi v vzorcih z nižjimi odstotki oksidiranih oblik (Slika 43). Nasprotno pa z metodo K zaradi prehitrega povečevanja deleža MFB, in sicer od 0 do 35 % v 3 minutah, nismo uspeli ustrezno ločiti obeh vrhov (Slika 44).



Slika 43: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo J.



Slika 44: Kromatogram ALC sestavljenih vzorcev, pridobljen z metodo K.

S primerjavo metod I in J smo ugotovili, da lahko z drugo metodo boljše (skoraj do bazne linije) ločimo oksidirane od neoksidiranih oblik mAb in zato dobimo tudi boljše korelacijo med deležem površine oksidirane vrha na kromatogramu in teoretičnim deležem oksidirane standarda v sestavljenem vzorcu (Tabela XIX). Zato smo metodo J izbrali za najprimernejšo za izvedbo afinitetne kromatografije namenjene detekciji oksidiranih metioninov v molekuli IgG1.

Tabela XIX: Korelacija med teoretičnim % oksidirane standarda v vzorcu in % izračunanim iz površine oksidirane oblike na kromatogramu, pridobljenem z metodo J.

Ime vzorca	neoksidiran	1 % oksidiran	3 % oksidiran	6 % oksidiran	9 % oksidiran	100 % oksidiran
% oksidirane oblike	0	0,70	2,85	6,02	8,72	98,83

Za primerjavo deležev oksidiranih oblik mAb določenih z metodo PepMap in z našo metodo ALC smo uporabili obe metodi, in sicer tako kot je opisano v poglavju 4.2.6.

4.2.6 Preverjanje ustreznosti nove analizne metode za rutinsko uporabo

Da bi ugotovili, ali je nova metoda primerna za rutinske analize, smo testirali več različnih parametrov, in sicer:

- določitev meje kvantifikacije ali LOQ (angl. *Limit of Quantitation*),
- preverjanje linearnosti meritev,
- preverjanje ponovljivosti priprave vzorca,
- primerjava rezultatov z referenčno metodo PepMap,
- preverjanje puščanja sledi oz. (prenosa proteina med injiciranjem na kolono (*angl. Carryover*)),
- določanje stabilnosti vzorcev in
- določanje optimalnega nanosa na kolono.

Določanje meje kvantifikacije (LOQ)

Najmanjši nanos vzorca na kolono, pri katerem še dobimo za detekcijo dovolj velik signal, smo dosegli z zniževanjem volumna injiciranja vzorca s koncentracijo 2,5 mg/mL. Pri tem vzorcu smo določili razmerje med singalom in šumom oksidirane vrha, ki je znašalo 50. Tako smo določili vrednost LOQ naše metode za oksidirano obliko mAb, ki je predstavljala 0,3 % površine nominalnega nanosa na kolono, ki je znašal 250 µg (pri injiciranju vzorca z največjim volumnom injiciranja).

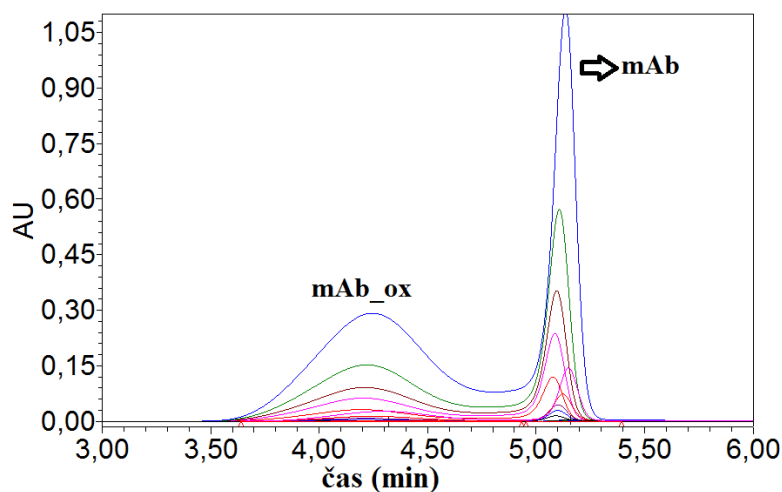
Linearnost

Linearnost odziva oksidiranih in neoksidiranih oblik mAb smo v kromatogramih ugotavljali z različnimi nominalnimi nanosi vzorca, ki je vseboval približno 50 % oksidiranih in 50 % neoksidiranih oblik proteina, v začetni koncentraciji 2,5 mg/mL. Nanose različnih količin proteina na kolono smo dosegli s spreminjanjem volumna injiciranja, kar je prikazano v Tabeli XX. Oksidiranih oblik mAb pri nanosih < 0,25 µg nismo več zaznali, zato jih tudi nismo uvrstili v tabelo. Sliki 45 in 46 prikazujeta prekrivanje kromatogramov vzorcev, s katerimi smo določali linearnost odziva in graf linearne odvisnosti s pripadajočo vrednostjo koeficienta regresije (R^2).

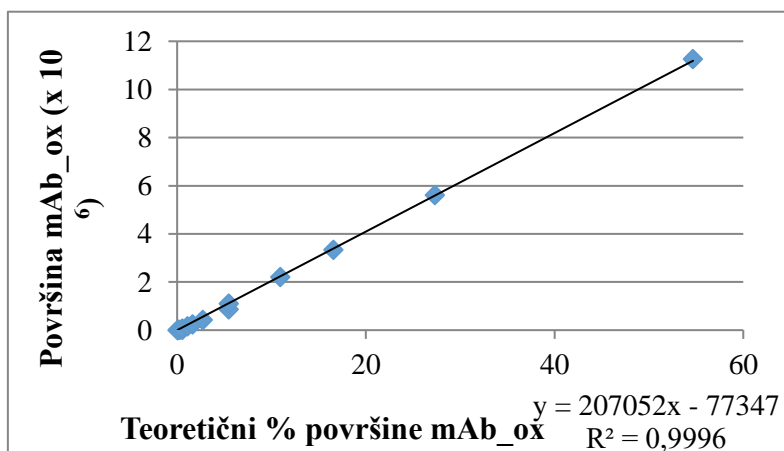
Tabela XX: Priprava vzorcev za preverjanje linearnosti odziva.

V injiciranja (µL)	Nanos na kolono (µg)	Teoretični delež površine oksidirane oblike (% mAb_Ox)	Absolutna površina oksidiranega vrha (AU)
10	0,25	0,05	1085
20	0,5	0,11	3741
30	0,75	0,17	5054
50	1,25	0,27	9847
100	2,5	0,55	15185
10	2,5	0,55	64016
20	5	1,09	150140
30	7,5	1,66	234144
50	12,5	2,73	424638
100	25	5,47	85926
10	25	5,47	1098655

V injiciranja (μL)	Nanos na kolono (μg)	Teoretični delež površine oksidirane oblike (% mAb_Ox)	Absolutna površina oksidirane vrha (AU)
20	50	10,94	2209277
30	75	16,57	3339383
50	125	27,34	5603367
100	250	54,68	11253100



Slika 45: Kromatogram vzorcev uporabljenih za ugotavljanje linearnosti odzivov.



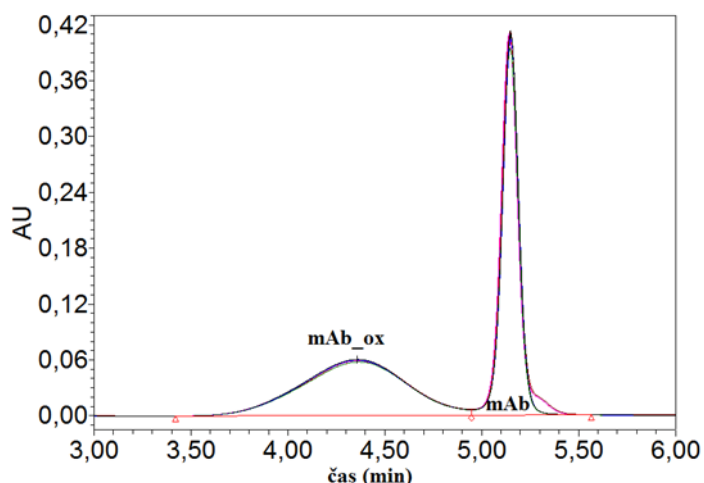
Slika 46: Graf, ki prikazuje razmerje med izmerjenimi površinami oksidiranih vrhov in teoretičnimi vsebnostmi oksidiranih oblik mAb v testiranih vzorcih.

Ponovljivost priprave vzorca

Pri ugotavljanju ponovljivosti priprave in določitvi odstotkov relativnih površin vrhov oksidiranih oblik mAb po trikratnem zaporednem injiciranju enakega nanosa (125 µg) vzorca, pripravljene v dveh neodvisnih pripravah, smo ugotovili, da je bil relativni standardni odklon (RSD) 1,8 %, kar kaže na ponovljivo pripravo vzorca (kot tudi na dobro ponovljivost injiciranja, kar sicer določamo pri kvalifikaciji sistemov za kromatografijo) (Tabela XXI).

Tabela XXI: Ponovljivost priprave vzorca pripravljene z dvema neodvisnima pripravama, prikazana v obliki izračunanih % površin vrhov neoksidiranih oblik mAb.

Št.zaporedne priprave enakega vzorca	Prva priprava			Druga priprava		
	1	2	3	1	2	3
Št.zaporednega injiciranja						
% površine neoksidirane oblike	47,47	47,60	47,53	45,97	46,04	45,99

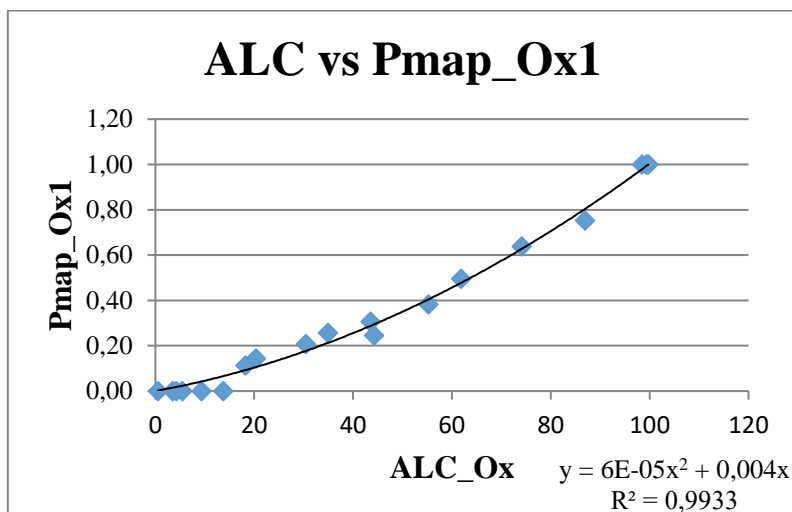


Slika 47: Prikaz prekrivanja kromatogramov, pridobljenih pri poskusu ugotavljanja ponovljivosti priprave vzorcev.

Primerjava rezultatov peptidnega kartiranja in nove metode ALC

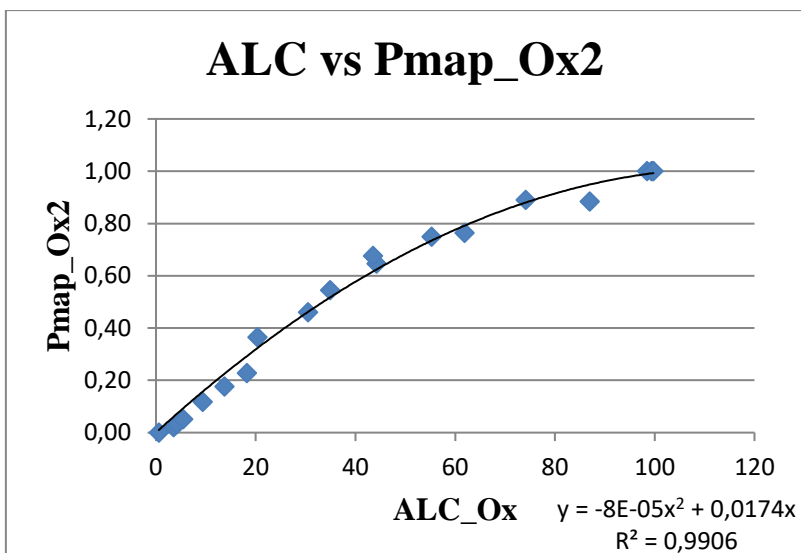
Vzorci smo analizirali z našo novo hitro metodo ALC in s standardno metodo PepMap in ugotavljali korelacijo med rezultati. Uporabljeni vzorci so vsebovali različne končne deleže

oksidiranih oblik mAb. Pripravili smo jih z dodatki različnih koncentracij H₂O₂ (v/v), in sicer: 0,0001; 0,0005; 0,001; 0,003; 0,005; 0,007; 0,01; 0,015; 0,025; 0,03; 0,04; 0,05; 0,07; 0,09; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 ter 1 %. Za določitev korelacije med rezultati peptidnega kartiranja in metode ALC smo uporabili dva peptida, in sicer LH30 (na slikah označen kot "Pmap Ox1"), ki vsebuje oksidiran Met430 ter peptid LH15 ("Pmap Ox2"), ki vsebuje oksidiran Met254, Slike 48-50. Korelacijo med metodama smo ugotavljali v različnih območjih oksidacije od 0 do 99,7 % in sicer v okviru različnih kromatografskih sekvenc.



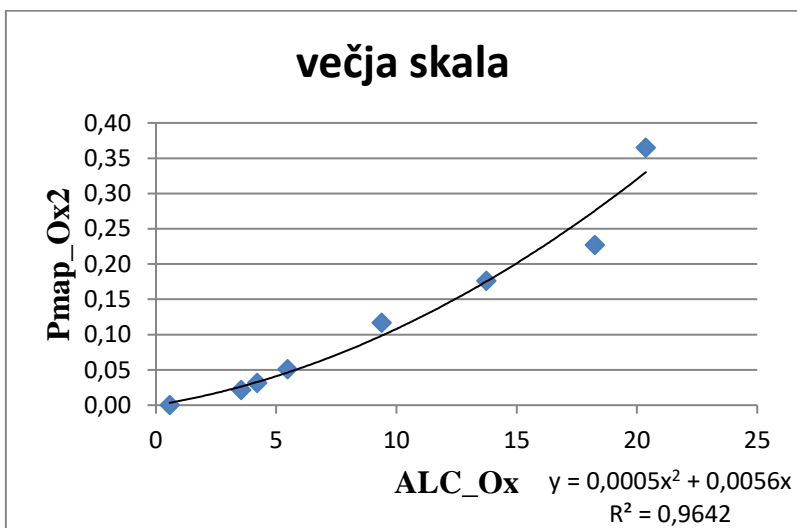
Slika 48: Primerjava rezultatov meritev vzorcev peptida LH30 z metodama PepMap in ALC.

Legenda: Pmap_Ox1 označuje vrh, ki se povečuje z večjim deležem oksidiranosti vzorca in ustreza Met430. Odstotek površine oksidiranega prvega vrha (Pmap_Ox1) na PepMap kromatogramu smo izračunali na sledeč način: sešteli smo površino vrha, ki se po oksidaciji Met430 povečuje in površino vrha, ki se po oksidaciji manjša. Nato smo površino nastajajočega vrha delili s skupno površino in tako dobili odstotek površine prvega vrha, ki nastane po oksidaciji peptida LH30 (Sliki 20 in 21).



Slika 49: Primerjava rezultatov meritev vzorcev peptida LH15 z metodama PepMap in ALC.

Legenda: Pmap_Ox2 označuje vrh, ki se povečuje z večjim deležem oksidiranosti vzorca in ustreza Met254. Odstotek površine oksidiranega drugega vrha na PepMap kromatogramu (Pmap Ox2) smo izračunali na način kot je opisan zgoraj, le da smo gledali peptid LH15 in oksidacijo Met254 ter pripadajoča vrhova, od katerih je eden nastajal v odvisnosti od stopnje oksidacije vzorca, drugi pa se zmanjševal.

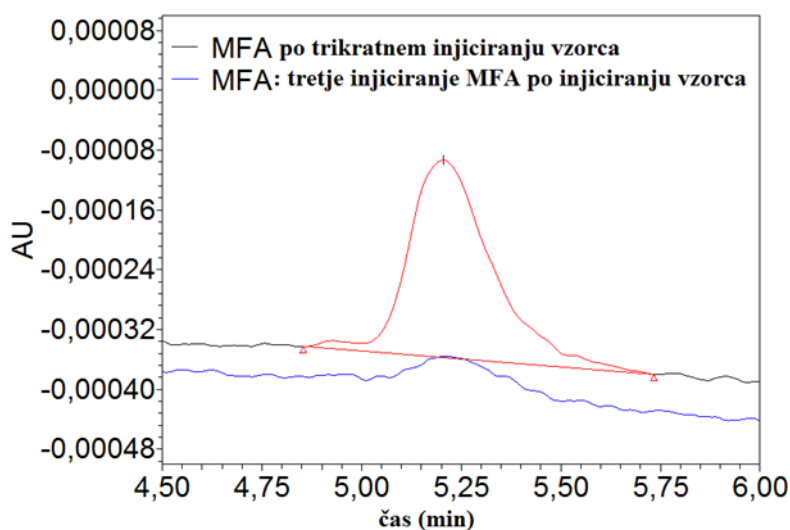


Slika 50: Primerjava rezultatov meritev vzorcev peptida LH15 z manjšimi deleži oksidiranih oblik, z metodama ALC in PepMap.

Pri primerjavi odstotkov oksidiranih oblik peptidov, ki smo jih v istih vzorcih določili z različnima metodama, smo ugotovili, da obstaja korelacija. Korelacija, kot smo pričakovali, ni linearna, veseeno pa se v območju nizkih odstotkov oksidacije vrednosti približujejo linearni korelaciji (Slika 50). Čeprav korelacija ni linearna, pa so vrednosti, ki smo jih določili z metodo ALC dovolj primerljive z vrednostmi, ki smo jih dobili z metodo PepMap, zato smo se odločili, da lahko novo metodo kot presejalno uvedemo v rutinsko prakso.

Preverjanje puščanja sledi- carryover

Morebiten prenos analiziranega proteina na koloni med posameznimi injiciranjmi smo preverili z večkratnim injiciranjem vzorca mAb, ki je vseboval približno 50 % oksidiranih in 50 % neoksidiranih oblik v začetni koncentraciji 2,5 mg/mL. Po trikratnem injiciranju (125 µg) tega vzorca v triplikatu smo v mobilni fazi (ki smo jo injicirali za trikratnim injiciranjem vzorca) na neoksidiranem vrhu opazili minimalno puščanje sledi, in sicer med 0,1 in 0,2 % površine glavnega vrha. Po trikratnem vmesnem injiciranju MFA pa prenosa vzorca na mestu elucije neoksidirane oblike nismo več zaznali (Slika 51).



Slika 51: Prikaz prekrivanja kromatogramov pri ugotavljanju puščanja sledi ob uporabi ALC.

Stabilnost vzorcev

Za preverjanje 24 urne stabilnosti vzorcev smo uporabili naslednje: neoksidiran standard, vzorec s 5 % oksidiranih oblik, vzorca z različnimi končnimi koncentracijami H₂O₂ (0,03 in 0,05 %) in popolnoma oksidiran standard (Tabela XXII). Stabilnost smo preverjali tako, da smo za vzorec iz posamezne viala izračunali relativno razliko v deležih oksidiranih oblik,

določenih v času 0 in po 24 urah. Relativno raziko smo izračunali tako, da smo od vrednosti za oksidirano obliko v času 0 odšteli vrednost za to obliko v času 24 in to razliko potem delili z vrednostjo oksidirane oblike v času 24 in rezultat pomnožili s 100. Med časom 24 ur so bili vzorci v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C. Največja izmerjena razlika je bila < 4%, zato smo sklepali, da v 24 urnem časovnem intervalu ne pride do neželene oksidacije mAb, kar pomeni, da je kromatografska sekvenca lahko dolga 24 h.

Tabela XXII: Rezultati 24 urne stabilnosti vzorcev.

Ime vzorca	mAb_ox (čas 0)	mAb_ox (po 24 h)	Relativna razlika v deležih mAb_ox
5% oksidiran sestavljen vzorec	4,92	5,00	1,6
vzorec z 0,03 % H ₂ O ₂	63,97	62,99	1,56
vzorec z 0,05 % H ₂ O ₂	79,26	76,38	3,77
100% oksidiran standard	99,05	99,08	0,03

Preverili smo tudi vpliv zamrzovanja na stabilnost vzorcev (Tabela XXIII). V ta namen smo jih 4 mesece hranili na -80 °C, jih odmrznili in nato ponovno analizirali. Relativna razlika deležev oksidiranih oblik pred in po zamrzovanju je bila < 0,1 %. Delež oksidiranega vrha je bil v predhodno zamrznjenih vzorcih in ponovno analiziranih večji, in sicer v vseh, z izjemo tistih, ki so vsebovali 0,5 in 1 % oksidiranih oblik. Vendar pa je bila ta razlika v mejah ponovljivosti meritev, ki je znašala 0,1 %. Možno je, da je do razlik prišlo tudi zaradi uporabe različnih kolon. S tem poskusom smo dokazali, da zamrzovanje na -80 °C za 4 mesece ne vpliva na oksidacijo.

Tabela XXIII: Rezultati preverjanja stabilnosti na -80 °C zamrznjenih vzorcev, hranjenih 4 mesece.

Ime vzorca	Analiza 1 (čas 0)	Analiza 2 (-80° C, 4 mesece)	Relativna razlika v deležih mAb_ox
0 % H ₂ O ₂	1,27	3,53	0,64
0,03 % H ₂ O ₂	54,17	62,32	0,13

0,05 % H ₂ O ₂	57,45	65,34	0,12
0,1 % H ₂ O ₂	91,30	94,19	0,03
0,5 % H ₂ O ₂	98,75	89,90	0,00
1 % H ₂ O ₂	98,96	99,20	0,00

Nanos na kolono

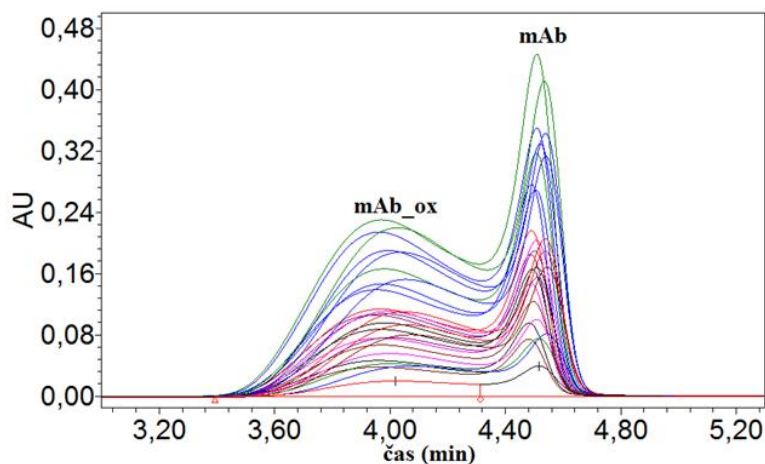
Da bi ugotovili, kako nanos na kolono, ki je odvisen od volumna injiciranja in koncentracije proteina v vzorcu, vpliva na jasno ločbo med vrhovoma, smo pripravili vzorce z različnimi končnimi koncentracijami proteina (Tabela XXIV) ter nato prilagajali volumne injiciranja, tako da smo dosegli različne vrednosti nanosa na kolono. Končna koncentracija H₂O₂ je bila v vseh vzorcih 0,1 %. Kromatograme z jasno vidno ločbo med oksidiranimi in neoksidiranimi oblikami mAb pri različnih nanosih vzorcev na kolono prikazuje Slika 52.

Tabela XXIV: Vzorci za določanje nanosa na kolono

Nanos na kolono (μg)	V injiciranja (μL)	Koncentracija ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	P/V1	P/V2
12,5	50	0,25	2,53	1,27
25	10	2,50	2,57	1,32
25	50	0,50	2,39	1,35
25	100	0,25	2,57	1,25
30	10	3,00	2,67	1,31
37,5	50	0,75	2,43	1,36
45	30	1,50	2,50	1,35
50	20	2,50	2,57	1,32
50	50	1,00	2,60	1,29

Nanos na kolono (μg)	V injiciranja (μL)	Koncentracija ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	P/V1	P/V2
50	100	0,50	2,65	1,26
60	30	2,00	2,52	1,33
62,5	50	1,25	2,41	1,37
68,75	25	2,75	2,41	1,38
70	40	1,75	2,41	1,37
75	30	2,50	2,52	1,32
75	50	1,50	2,46	1,34
75	100	0,75	2,44	1,31
90	30	3,00	2,63	1,32
100	50	2,00	2,49	1,35
100	100	1,00	2,59	1,26
112,5	50	2,25	2,53	1,32
122,5	70	1,75	2,40	1,39
125	100	1,25	2,41	1,32
137,5	50	2,75	2,33	1,43
150	50	3,00	2,59	1,34
150	100	1,50	2,57	1,28

Legenda: P/V1 (*angl. Peak to valley*): razmerje med vrhom oksidirane vrha in dolino med vrhovoma, P/V2: razmerje med vrhom neoksidiranega vrha in dolino med vrhovoma.



Slika 52: Kromatogrami različnih nanosov vzorcev na kolono.

Na podlagi predhodnih izkušenj smo se odločili, da sta za uspešno ločbo potrebni čimvečji vrednosti $P/V1$ (razmerje med vrhom oksidirane vrha in dolino med vrhovoma) in $P/V2$ (razmerje med vrhom neoksidiranega vrha in dolino med vrhovoma), vendar smo pri vseh dobljenih rezultatih in navedenih vrednostih teh dveh parametrov bili sposobni določiti dolino med vrhovoma in ju na ta način ločiti. Statistično smo ugotovili, da na uspešno ločbo vpliva predvsem koncentracija analita in zaključili, da nam metoda omogoča delovanje v širokem koncentracijskem območju. Pri realnih vzorcih pričakujemo nizke odstotke oksidacije, kar pomeni, da bo oksidiran vrh bistveno manjši (manjša površina) od prikazanega pri tem poskusu. V takšnem primeru izberemo čimvečji nanos na kolono (vendar pazimo, da s tem ne presežemo linearnega območja za neoksidiran vrh). V praksi pričakujemo vzorce s procesov čiščenja s koncentracijami med 0,5 in 5 mg/mL. Želeli smo se ogniti redčenju vzorcev, zato smo se odločili za nominalni nanos vzorca na kolono 100 μg . V prvem primeru (koncentracija = 0,5 mg/mL) bi injicirali 100 μL vzorca in na kolono nanесли 50 μg , v drugem pa bi injicirali 20 μL in s tem dosegli nominalen nanos na kolono. V primeru koncentracij višjih od 10 mg/mL, pa bi bilo vzorce potrebno redčiti in nanos na kolono prilagajati z volumnom injiciranja. Cilj razvoja metode je bila tudi enostavnost uporabe, zato bomo enostavnosti uporabe dali prednost pred upoštevanjem nominalnih vrednosti, saj je metoda uporabna pri širokem območju nanosa na kolono.

5 RAZPRAVA

Novo metodo tekočinsko afinitetne kromatografije (ALC; *angl. Affinity Liquid Chromatography*) smo razvijali postopno, s spreminjanjem kromatografskih pogojev in načinov priprave vzorcev. Najprej smo delež oksidacije v vzorcih določali z referenčno metodo peptidnega kartiranja (PepMap). Oksidirane vrhove smo potrdili z masno spektrometrijo (MS) in dokazali, da prihaja do oksidacije metioninskih ostankov (Met) Met254, in Met430 in Met360. Za določanje stopnje oksidacije smo preskusili standardno 60-minutno afinitetno kromatografijo, ki je opisana v literaturi. Ko smo dobili ustrezne rezultate, ki so bili primerljivi opisanim, smo na osnovi te metode začeli razvijati hitrejšo. Za razvoj hitre metode ALC smo delovni standard protitelesa IgG1 oksidirali z različnimi koncentracijami H₂O₂ in tako pripravili vzorce z različnimi stopnjami oksidiranosti, ter jih analizirali z metodama PepMap in ALC.

Peptide, ki vsebujejo oksidirane metioninske ostanke smo identificirali s PepMap metodo tako, da smo spremljali površine vrhov, ki so se zmanjševale v odvisnosti od dodane količine H₂O₂, ob hkratnem povečevanju površin vrhov, ki jih pri netretiranih vzorcih nismo zaznali. Identifikacijo peptidov na katerih se nahajajo ustrezni metioninski ostanki, smo potrdili tudi z MS. Nato smo se osredotočili na spremembe, nastale zaradi oksidacije Met254 in Met430, ki se, sodeč po literaturi, najhitreje oksidirata ter vplivata na spremembe molekule.

Kot smo že omenili, smo razvoj hitre metode ALC začeli z analiziranjem vzorcev s 60 minutno ALC, opisano v strokovni literaturi. Pri tem smo ugotovili, da nam razlike v retencijskih časih (RT) omogočajo ločevanje oksidiranih od neoksidiranih oblik proteinov in kvalitativno določanje deleža oksidacije. Najbolj oksidirane oblike mAb smo v povprečju detektirali približno 4-6 minut prej kot neoksidirane. Večji delež oksidiranih se je izrazil v večji površini vrha in premikov v levo (krajši retencijski čas); večji delež oksidiranih smo pripravili z višjo koncentracijo H₂O₂.

Za pripravo vzorcev, ki smo jih potrebovali za razvoj hitre ALC metode, smo jih po oksidaciji s H₂O₂ stabilizirali z dodatkom DBPS ali raztopine L-metionina. Ugotovili smo, da način zaustavitve oksidacije ne vpliva na določitev razlik v količini oksidiranih in neoksidiranih oblik, zato smo se odločili, da bomo uporabljali L-metionin, saj je delo z njim enostavnejše. Tako smo razvili enostaven postopek priprave vzorcev.

Pri razvoju naše nove metode ALC smo spreminjali gradient mobilnih faz, pretok čez kolono, temperaturo kolone in sestavo mobilnih faz. Pri razvoju metodo smo uporabili sestavljene vzorce z znanim deležem oksidiranih oblik, ki smo jih pripravili z mešanjem popolnoma oksiranega in neoksidiranega vzorca.

S spreminjanjem gradienta smo testirali kromatografsko ločbo med oksidiranimi in neoksidiranimi oblikami mAb. V ta namen smo preskusili 10 različnih gradientov, ki smo jih ustvarjali z mešanjem dveh mobilnih faz; mobilne faze A in B (MFA: fosfatni pufer in NaCl, pH = 7,5). Če smo delež mobilne faze B (MFB; NaCl in očetna kislina v vodi, pH 2.8) prehitro povečevali, v vzorcih z nižjim odstotkom oksidiranih oblik nismo mogli ločiti oksidiranih od neoksidiranih oblik ločili. Ugotovili smo, da se oksidirane oblike eluirajo v območju gradienta pri MFB med 25 in 35 %. Ob koncu razvoja smo se odločili za gradient, v katerem smo delež MFB povečevali od 25 do 35 %, in sicer v 1,3 min, nato pa do 100 % v 0,25 min. Analizo smo na tem mestu podaljšali še za 1 min, saj smo želeli pustiti dovolj časa za spiranje oz. regeneracijo kolone, ker smo zmanjšali pretok z 2 na 1 mL/min. S spiranjem namreč preprečimo puščanje sledi (*angl. Carryover*) in dobimo lepšo bazno linijo.

Ker pa smo imeli še vedno težave s prednjenjem glavnega, neoksidiranega vrha, smo to skušali izboljšati s spreminjanjem pretoka, in sicer z 2 mL/min na: 0,7 mL/min, 1 mL/min in 2,5 mL/min, pri čemer smo spreminjali tudi čas gradienta. Pri najvišjem uporabljenem pretoku (2,5 mL/min) smo ugotovili, da je bila zaradi izrazitejšega prednjenja, ločba oksidiranih in neoksidiranih oblik mAb v primerjavi z nižjimi pretoki slabša, zato smo se odločili, da bomo pretok znižali. V nadaljnjih poskusih smo tako ob pretoku 1 mL/min uporabljali nespremenjen čas gradienta.

V nadaljevanju smo spreminjali temperaturo kolone, s čimer smo želeli preveriti, ali to vpliva na ločbo oksidiranih in neoksidiranih oblik. Znano je, da se molekule pri višjih temperaturah skozi kolono premikajo hitreje in da se interakcije med proteinom A in molekulami IgG v teh pogojih spremenijo. Glede na rezultate smo se odločili, da bomo analize izvajali pri sobni temperaturi kolone, kot to priporoča njen proizvajalec. Pri povišani temperaturi kolone (37 °C) namreč nismo zaznali pomembnega vpliva na ločbo.

Preverili smo tudi vplive spreminjanja vrednosti pH mobilnih faz na ločbo oksidiranih in neoksidiranih oblik mAb. Pri MFB smo vrednosti pH spreminjali z 2,8 na 2,6 in 3,0, pri MFA pa s 7,5 na 6,2 in 7,0. Pri vrednosti pH MFB < 2,8 so bili vrhovi oksidiranih oblik ostrejši, vendar ločba med neoksidiranimi in neoksidiranimi vrhovi (mAb in mAb_ox) pri

manj oksidiranih vzorcih ni bila jasna, zato smo se odločili, da pH MFB ne bomo zmanjševali. Potem ko smo vrednost pH MFB zvišali na 3, pa smo sicer opazili jasnejšo ločbo med vrhovi, vendar ti niso bili ostri, ampak širši, kar je otežilo ločbo pri vzorcih z nižjim deležem oksidiranih oblik mAb. Na koncu smo se odločili, da bomo uporabljali MFB s pH = 2.8. Pri uporabi MFA s pH = 6,2 nismo določili jasnih oksidiranih vrhov, niti rame na glavnem neoksidiranem vrhu. Ker smo pri pH = 7 MFA opazili precejšnje prednjenje, v nadaljevanju pH nismo zniževali, ampak smo razvoj nadaljevali s pH = 7,5.

Da bi ugotovili, ali je metoda primerna za rutinske analize, smo testirali več različnih parametrov in sicer: mejo kvantifikacije, linearnost odziva, ponovljivost priprave vzorcev, in puščanje sledi. Izvedli smo tudi primerjavo rezultatov dobljenih s PepMap in novo metodo ALC ter določili stabilnost vzorcev in njihov optimalni nanos na kolono.

Najmanjši nanos vzorcev na kolono smo dosegli z zniževanjem volumna injiciranja, pri čemer smo določali razmerje med signalom in šumom. Določili smo vrednost LOQ metode za oksidirano obliko mAb, ki je, pri nanosu 250 µg 50 % oksidirane proteina na kolono, predstavljala 0,3 % skupne površine pod krivuljo. LOQ smo določili na oksidirani obliki v vzorcu, v katerem sta bili v enakem razmerju prisotni obe obliki in ki smo mu nižali volumen injiciranja.

Linearni odziv smo potrdili s koeficientom regresije nad 0.99 ($R^2 = 0,9996$).

Ponovljivost priprave vzorca, smo potrdili z majno razliko v določitvi deleža oksidacije (relativni standardni odklon 1,8 %).

Pri primerjavi odstotkov oksidiranih oblik mAb, ki smo jih z našo metodo ALC in z metodo PepMap določili v istih vzorcih, smo ugotovili, da med njima obstaja korelacija. Sicer ni linearna, kar lahko pojasnimo s sočasno oksidacijo večih metioninskih ostankov na proteinu. Mi smo z analizo PepMap vrednotili le oksidacijo Met254 in Met430, vemo pa, da se osidira vsaj še Met360. Poleg tega tudi pri analizi ALC na spremembo konformacije lahko vplivajo tudi druge spremembe, ki so posledica oksidacije drugih aminokislinskih ostankov, ki jih pri vrednotenju rezultatov s PepMap nismo upoštevali. Zaradi dobre korelacije menimo, da so rezultati, ki smo jih pridobili z novo hitro metodo ALC primerljivi s tistimi, izmerjenimi z referenčno metodo PepMap, zato jo lahko uvedemo v rutinsko prakso za presejalno testiranje.

Prisotnost morebitnega prenosa analita na koloni med posameznimi injiciranjmi smo preverjali z večkratnim injiciranjem vzorca, ki je vseboval približno 50 % oksidiranih in 50 % neoksidiranih oblik proteina. Pri tem smo v mobilni fazi na neoksidiranem vrhu opazili minimalen prenos, ki je obsegal med 0,1 in 0,2 % površine omenjenega vrha. Po trikratnem vmesnem injiciranju MFA pa prenosa vzorca na mestu elucije neoksidirane oblike mAb nismo več zaznali. Če bomo v prihodnosti imeli težave s prenosom vzorcev, lahko dodatno spiramo kolono (spiranje kolone z MFA).

Stabilnost naših vzorcev smo preverili tako, da smo za vsak vzorec, ki je bil injiciran iz iste vial, izračunali relativno razliko v deležih oksidiranih oblik v času 0 in po 24 urah (vzorci smo v tem času hranili v avtomatskem vzorčevalniku na 4° C). Največja izmerjena razlika je bila < 0,1 %, zato sklepamo, da v 24 urnem časovnem intervalu ni prišlo do neželene oksidacije. Menimo torej, da je kromatografska sekvenca za analizo naših vzorcev mAb lahko dolga vsaj 24 h.

Preverili smo tudi vpliv zamrzovanja oksidiranih vzorcev na njihovo stabilnost. Vzorce smo zamrznili in 4 mesece hranili na -80 °C, nato pa jih odmrznili in ponovno analizirali. Relativne razlike v deležih oksidiranih in neoksidiranih oblik analita pred in po zamrzovanju so bile < 0,1 %, kar je v mejah ponovljivosti metode, ki znaša 0,1 %, lahko pa je tudi posledica uporabe različnih kolon. Tako smo dokazali, da zamrzovanje vzorcev mAb na -80 °C in njihovo 4 mesečno shranjevanje v teh pogojih ne vpliva na nastanek MetOx.

Z nanosi različnih količin mAb na kolono smo ugotovili, da je ločba med neoksidiranim in oksidiranim vrhom (mAb in mAb_ox) jasna v širokem koncentracijskem območju. Za nominalni nanos analita na kolono smo izbrali 100 µg nanos, ki ga dosežemo s prilagajanjem volumna injiciranja glede na koncentracije vzorcev (ki jih dobimo iz procesov čiščenja ter drugih procesnih vzorcev) oziroma prilagajanjem koncentracije z redčenjem vzorcev z MFA. Novo metodo smo razvili za analizo mAb podrazreda IgG1, uporabna pa je tudi za mAb podrazreda IgG2. Preskusili smo jo tudi na nekaterih drugih mAb (rezultati niso prikazani) in ugotovili, da bi za nekatere od njih morali prilagoditi elucijski gradient. Vezava predela Fc mAb na protein A je odvisna od več dejavnikov, med drugim tudi od komplementarnosti vezavnih delov kompleksa protein A-Fc, ki je specifična za vsako posamezno mAb. Različna mAb so raztopljena v različnih formulacijskih pufrih, ki vsebujejo različne koncentracije soli in imajo različne vrednosti pH, kar vpliva na omenjeno vezavo. Naša nova metoda je gradientna, kar pomeni, da s spreminjanjem gradienta ali pH elucijskega pufra vplivamo na

vodikove in ionske interakcije med strukturno domeno Fc in proteinom A. Poleg tega vsa mAb ne izkazujejo enakih interakcij s proteinom A, ker so lahko na nekaterih od njih prisotna (npr. protitelesa iz človeške genske družine VH3) alternativna vezavna mesta za protein A. Prav tako se metioninska ostanka oksidirata naključno. Zaradi vsega navedenega je potrebno kromatografske pogoje (npr. gradient, elucijski pH) prilagoditi različnim mAb, kar bi lahko bila tema nadaljnjih raziskav. V nadaljnjih poskusih bi se lahko osredinili na vrednotenje sprememb molekule mAb po oksidaciji Met360. V kolikor bi se metoda v rutinski praksi pri določanju stopnje oksidiranosti terapevtskega mAb izkazala za ustrezno, bi jo bilo smiselno validirati in nadomestiti za referenčno metodo PepMap.

6 SKLEPI

Razvili smo novo, hitro metodo ALC za detekcijo stopnje oksidiranosti terapevtskega monoklonskega protitelesa. Zanimala nas je oksidacija dveh aminokislinskih ostankov, in sicer Met254 in Met430, do katere prihaja med proizvodnjo in ima lahko negativne vplive na stabilnost in posledično varnost končnega produkta. Ugotovili smo, da so za uspešno ločevanje oksidiranih in neoksidiranih oblik mAb, ki temelji na spremenjenem retencijskem času, potrebni naslednji pogoji: pretok 1 mL/min, nanos na kolono 100 µg in gradient (Tabela XVII). Gradient ustvarimo z mešanjem mobilne faze A (PBS pufer) s pH 7,5 in mobilne faze B s pH 2,8 (poglavje 3.2.1.). Uporabili smo kolono, v kateri je protein A kovalentno vezan na površino hidrofilnega medija POROS (TSKgel Boronate-5PW, dimenzij 7,5 mm ID x 7,5 cm (L)). Vzorci so na 2-8 °C potrjeno stabilni 24h, lahko pa za analizo uporabimo tudi predhodno zamrznjene. Temperaturo kolone ohranjamo pri sobni temperaturi. Mobilna faza A (pH 7,4) služi za nanos vzorca na kolono, s kislomobilno fazo B (pH = 2,8) pa analit s kolone speremo. Pri integraciji rezultatov kromatogramov si pomagamo s standardi (neoksidiran in popolnoma oksidiran vzorec mAb) in QCS vzorcem, ki jih dodamo v vsako sekvenco. V primeru, da imamo protitelo drugega podrazreda (in ne IgG2), bo verjetno potrebna prilagoditev gradienta.

7 LITERATURA

1. Mark McCamish, Gillian Woollett: Worldwide experience with biosimilar development. *Landes Bioscience*, March/April 2011, *mAbs* 3:2, 209-217 (doi: 10.4161/mbs.3.2.15005);povezava:
<http://www.fda.gov/AboutFDA/Transparency/Basics/ucm194516.htm>
2. Mark McCamish Mark, Robin Foà, Karen Van Rassel: Why Biosimilars matter: An innovative solution to improve patient access; Summary of presentations from the Sandoz- supported satellite symposium held at the 20th Congress of the European Hmatology Association (EHA), Vienna, Austria, on 13th June 2015; citation: *EMJ Hea.2015;3(1):47-53*
3. povezava:
http://www.amgenbiotech.com/resources/TrendsInBiologicMedicineReport120613_CC.pdf
4. Kos Janko, Štrukelj Borut: *Biološka zdravila*. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007, 4-24; 532-543
5. Szabolcs Fekete, Jean-Luc Veuthey, Davy Guillarme: New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peprotiteloides and proteins: Theory and applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 69, 2012, 9–27
6. Hongcheng Liu, Georgeen Gaza-Bulsecu, Dinesh Faldu, Chris Chumsae, Joanne Sun: Heterogeneity of Monoclonal Antibodies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 97, No 7, July 2008, 2426-2447
7. Jenkins N, Murphy L, Tyther R: Post-translational Modifications of Recombinant Proteins: Significance for Biopharmaceuticals. *Mol Biotechnol*, Volume 39, No 2, June 2008; 113-118
8. 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 reverse-phase liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Volume 1164 (1-2), September 2007, 153-161
9. Nick C: The US Biosimilars Act: Challenges Facing Regulatory Approval. *Pharm Med*, Volume 26, No 3, 2012, 145–152

10. M M Camish, J Pakulski, C Satter, G Woollett; Toward Interchangeable Biologics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, Volume 97, No 3, March 2015, 215-217
11. Hongcheng Liu, Georgeen Gaza-Bulsecu, Dinesh Faldu, Chris Chumsae, Joanne Sun: Heterogeneity of Monoclonal Antibodies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 97, No 7, July 2008, 2426-2447
12. Damian Houde, Yucai Peng, Steven A. Berkowitz, John R. Engen: Post-translational Modifications Differentially Affect IgG1 Conformation and Receptor Binding. *Mol Cell Proteomics*, Volume 9, No 8, Aug 2010, 1716-1728
13. Walsh Gary: Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discovery Today*, Volume 15, September 2010; 17-18
14. Johann Deisenhofer: Crystallographic Refinement and Atomic Models of a Human Fc Fragment and Its Complex with Fragment B of Protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å Resolution. *Biochemistry*, Volume 20, No 9, 1981, 2370-2378
15. B. Vijayalakshmi Ayyar, Sushrut Arora, Caroline Murphy, Richard O'Kennedy: Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*, Volume 56, 2012, 116-129
16. Sanchayita Ghose, Martin Allen, Brian Hubbard, Clayton Brooks, Steven M Cramer: Antibody Variable Region Interactions with Protein A: Implications for Development of Generic Purification Processes. *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 92, No 6, December 2005, 665-673
17. Gary Walsh, Roy Jefferis: Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature Biotechnology*, Volume 24, October 2006; 1241-1252
18. T. Hoshi, S.H. Heinemann: Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *The Journal of Physiology*, Volume 15, 2001, 1-11
19. Zhang Xing-Hai: Regulation of Protein Function by Residue Oxidation. *Proteomics Insight*, Volume 3, 2010, 17-24
20. Shacter E: Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug metabolism Reviews*, Volume 32 (3-4), August 2000, 307-326
21. Georgeen Gaza-Bulsecu, Sagar Faldu, Karen Hurkmans, Chris Chumsae, Hongcheng Liu: Effect of methionine oxidation of a recombinant monoclonal antibody on the binding affinity to protein A and protein G. *Journal of Chromatography B*, Volume 870, 2008, 55-62

22. Dingjiang Lui, Da Ren, Holly Huang. Jane Dankberg, Robert Rosenfeld, Melanie J. Cocco, Luke Li, David N. Brems, Richard L. Remmele Jr.: Structure and Stability Changes of Human IgG1 Fc as a Consequence of Methionine Oxidation. *Biochemistry*, Volume 47, 2008, 5088-5100
23. Hai Pan, Kenneth Chen, liping Chu, Francis Kinderman, Izydor Apostol, Gang Huang: Methionine oxidation in human IgG2 Fc decreases binding affinities to protein A and FcRn. *Protein science*, Volume 18, February 2008, 424-433
24. Chris Chumsae, Georgen gaza-Bulesco, Joanne Sun, Hongcheng Liu: Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody. *Journal of Chromatography B*, Volume 850, 2007, 285-294
25. Caroline Loew, Constanze Knoblich, Juürgen Fichtl, Nadja Alt, Katharina Diepold, Patrick Bulau, Pierre Goldbach, Michael Adler, Hanns-Christian Mahler, Ulla Grauschopf: Analytical Protein A Chromatography as a Quantitative Tool for the Screening of Methionine Oxidation in Monoclonal Antibodies. *Journal of Pharmaceutical sciences*, Volume 101, No 11, November 2012, 4248-4257
26. Weiron Wang, Josef Vlasak, Yunsong Li, Pavlo Pristatsky, Yulin Fang, Tamara pittman, Jeanette Roman, Yang Wang, Thomayant Prueksaritanont, Roxana Ionescu et al: Impact of methionine oxidation in human IgG1 Fc on serum half-life of monoclonal antibodies. *Molecular Immunology*, Volume 48 (6-7), March 2011, 860-866
27. Xanthe M. Lamx, Janet Y. Yang, Jeffrey L. Cleland: Antioxidants for Prevention of Methionine Oxidation in Recombinant Monoclonal Antibody HER2. *Journal of Pharmaceutical Sciences* Volume 86, No 11, November 1997, 1250-1255
28. Roshni Hariharan, Suresh Babu CV, Ravindra Gudihal: Identification and Quantification of Oxidation Sites on Monoclonal Antibodies Using Capillary Electrophoresis and Quadropole Time-of-Flight Mas Spectrometry. Agilent Technologies, 2013: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-2728EN.pdf>
29. Julia Baek, Xiaodong Liu: Separation of Monoclonal Antibody (mAb) Oxidation Variants on a High-Resolution HIC Column, Application Note 21069; Dostopno na naslovu: <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/115434-AN-21069-LC-MAbPac-HIC-20-Oxidized-mAb-Separation-AN21069-EN.pdf>

30. Andrea Bertolotti-Ciarleta, Weirong Wangb, Rebecca Lownesa, Pavlo Pristatskya, Yulin Fangb, Troy McKelveyc, Yingzhe Lic, Yunsong Lia, James Drummondc, Thomayant Prueksaritanontb, Josef Vlasak.: Impact of methionine oxidation on the binding of human IgG1 to FcRn and FcY receptors. *Molecular immunology*, Volume 46 (8-9), May 2009, 1878-1882
31. Lawrence W. Dick Jr., David Mahon, Difei Qiu, Kuang-Chuan Cheng: Peptide mapping of therapeutic monoclonal antibodies: Improvements for increased speed and fewer artifacts. *Journal of Chromatography B*, Volume 877, January 2009, 230-236
32. David S. Hage, Jeanette A. Anguizola, Cong Bi, Rong Li, Ryan Matsuda, Efthimia Papastavros, Erika Pfaunmiller, John Vargas, Xiwei Zheng: Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 69, October 2012, 93-105

7.1 Reference za slike

1. Referenca 4
2. Evaluate Pharma, Feb 2013, Sandoz analysis (protitelo); <http://www.slideshare.net/fasiltaddese/antibodies-chprotitelo-4>
3. Povezava: <http://www.genengnews.com/gen-articles/biosimilar-market-posts-steady-gains/4137/>
4. Referenca 3
5. Referenca 4 in povezava: <http://flipper.diff.org/app/items/1892>
6. Ivana Spasevska: An outlook on bispecific antibodies: Methods of production and therapeutic benefits. *BioSciences Reviews*, Jan 2014: <http://biologie.ens-lyon.fr/ressources/bibliographies/m1-12-13-biosci-reviews-spasevska-i-1c-m.xml>
7. B. Casanova Estruch: Safety profile and practical considerations of monoclonal antibody treatment. *Neurologia*, Volume 28, No 3, 2013, 169-178
8. Referenca 4
9. Reference 8, 17 in 20
10. Povezava: <http://www.lonza.com/custom-manufacturing/development-technologies/protein-and-vaccine-development-services/developability-services/manufacturability-assessment.aspx>

11. Referenca 19
12. Povezava: <http://www.ionsource.com/Card/MetOx/metox.htm>
13. Referenca 23
14. Referenca 29 in Samir Mitragotri, Paul A. Burke, Robert Langer: Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. Nature Reviews Drug Discovery, Volume 13, 2014, 655-672
15. Referenca 26
16. Referenca 25
17. Povezava:
http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Chromatography%2C+Affinity&lang=1
18. Referenca 25
19. Slike od 19 do 52 niso povzete iz strokovne literature ampak so ustvarjene glede na rezultate