



Bihari Zsolt – Bagdi Attila – Baginé Timári Sarolta – Háda Viktor

■ Richter Gedeon Nyrt., Biotechnológiai Analitikai Osztály

# Terápiás fehérjék karakterizálása: az elsődleges szerkezet vizsgálata tömegspektrometriával

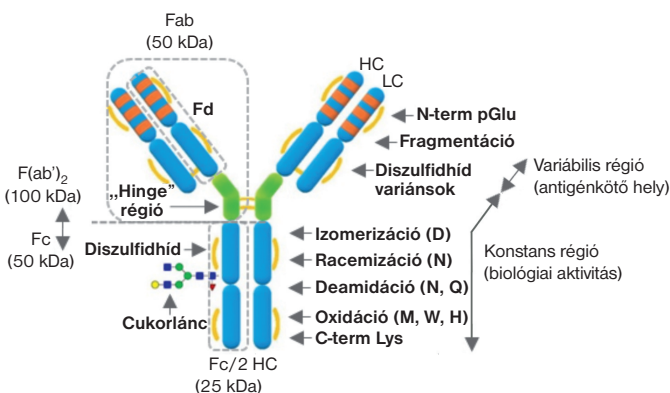
## Bevezetés – a terápiás fehérjék és analitikájuk

Egy évtizede a legnagyobb árbevételt elérő gyógyszerek még elsősorban hagyományos kismolekulás készítmények voltak. Néhány évvel ezelőtt azonban a biotechnológiai úton előállított hatóanyagok (biologikumok) kerültek előtérbe, melyekben makromolekulák – kisebb fehérjék, hormonok, fúziós fehérjék vagy monoklonális antitestek (1. ábra) – a hatóanyagok. Az első originális készítmények szabadalmi lejárata után, 2005-től kezdődően lehetőség nyílt e molekulák generikus változatai, az ún. bioszimiláris készítmények törzskönyvezésére. Az originátor készítményekhez képest a bioszimiláris gyógyszerek alacsonyabb ár-

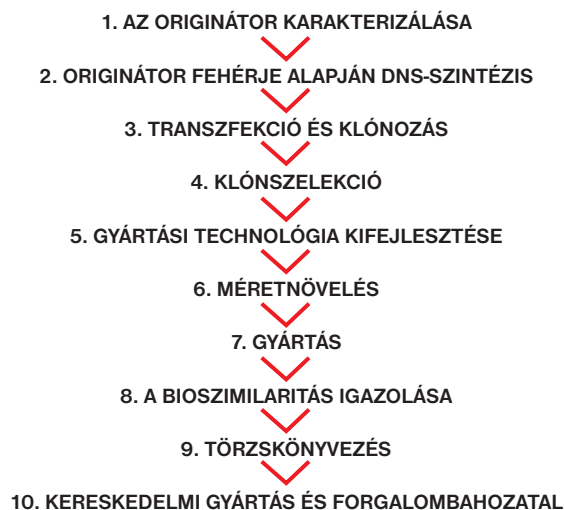
fekvésük révén a társadalom nagyobb hányada részére biztosíthatnak modern gyógyszeres terápiát súlyos kórok, így különböző daganatos megbetegedések esetén. Egyúttal ezek a készítmények a gyógyszergyártók számára hatalmas piacot kínálnak ezen a terápiás területeken.

A kismolekulás hatóanyagokhoz képest a biotechnológiai úton előállított fehérjealapú gyógyszerek számos kihívás elé állítják a gyógyszergyártókat. A hatóanyagot élő szervezetek, többnyire emlőssejtek vagy baktériumok állítják elő, és a gyártási folyamatok szabályozása lényegesen összetettebb technológiát igényel, mint a kismolekulák előállítására irányuló szintetikus kémiai reakciók kivitelezése. A fermentációs technológiák nem teszik le-

1. ábra. Monoklonális antitest felépítése és lehetséges módosulásai. A két nehéz (HC) és két könnyű láncból (LC) felépülő, egyetlen sejtklón által termelt monoklonális antitest jellegzetes „Y” szerkezettel rendelkezik, melyet diszulfidhidak kötnek össze. Az ún. kapocs („hinge”) régió köti össze az antigénkötésért felelős variábilis régiót tartalmazó Fab-fragmenst, és a cukorláncot tartalmazó Fc-fragmenst, mely az antitest biológiai aktivitásáért felelős



2. ábra. A bioszimiláris gyógyszerkészítmények fejlesztésének és forgalombahozatali engedélyezési eljárásának folyamata





hetővé egyféle hatóanyag gyártását, hanem a hatóanyag különböző változatait tudják előállítani. Ez a variabilitás, a makromolekulák hatalmas mérete és szerkezeti komplexitása lényegesen megnehezíti a karakterizálásukhoz szükséges analitikai mérések kivitelezését és az eredmények értékelését. Míg a kismolekulák kémiai szerkezete hagyományosan NMR- és MS-spektroszkópiai módszerekkel konstitúció és sztereokémia szempontjából is egzakt módon jellemezhető, a fehérjemolekulák szerkezeti karakterizálása más, komplexebb megközelítést igényel.

A bioszimilárisok fejlesztése az originátori termék karakterizálásával indul (**2. ábra**), így már a kezdeti szakaszban fontos szerepe van az analitikának, különös tekintettel az aminosavszekvencia meghatározására. Ezt követően a hatóanyag-fehérje aminosavjait megfelelő sorrendben kódoló DNS-szakaszt állítjuk elő, ezt különféle gazdasejtekbe klónozzuk, amelyek így előállítják a kívánt fehérjét. Kiválasztjuk a legmegfelelőbb gazdasejtet és laboratóriumi méretben kidolgozzuk a gyártástechnológiát. A technológiát ipari léptékre ültetjük át, és legyártjuk a készítményt. Analitikai és klinikai vizsgálatokat végzünk, melyekkel igazoljuk, hogy a készítményünk hasonló az originátorhoz mind minőségét, mind pedig hatásosságát és biztonságosságát tekintve. Végül összeállítjuk a törzskönyvi dokumentációt, mely adminisztratív, minőségi, nem-klinikai és klinikai fejezetekből áll. A bioszimiláris gyógyszer dokumentációjának értékelését az Európai Gyógyszerügynökség emberi felhasználásra szánt gyógyszerek bizottsága végzi (Committee for Human Medicinal Products). A bizottság véleményét az Európai Bizottság határozatba foglalja, és ezzel az Európai Unió teljes területére érvényes engedélyt ad ki. Az analitikai vizsgálatok az egész fejlesztési folyamaton átívelnek, az originátor karakterizálásától kezdve a technológia fejlesztésén keresztül egészen a készítmény vizsgálatáig. A törzskönyvi engedély megszerzése után a termék életciklusát követve (pl. gyártóhely-áthelyezés) folyamatosan analitikai vizsgálatokkal kell bizonyítani a termék minőségét.

A gyógyszerhatóságok jogszabályokat és irányelveket tesznek közzé, melyeket követni kell [1, 2]. A fejlesztő cégek feladata adott analitikai adatsomag összeállítása, amellyel bizonyítani tudják, hogy a bioszimiláris termék szerkezete a lehető legnagyobb mértékig hasonlít az originátor termékéhez, különös tekintettel a biológiai hatást befolyásoló kritikus minőségi jellemzőkre (CQA: Critical Quality Attributes). Mivel a bioszimiláris gyógyszereket élő organizmusok felhasználásával állítják elő, szerkezetüket tekintve kismértékben eltérhetnek a referenciakészítménytől. Ezek a kisebb eltérések azonban klinikai szempontból nem jelentősek. A természetes variabilitás a biológiai gyógyszerek jellemző sajátja, a szigorú minőség-ellenőrzés azonban biztosítja, hogy ez a változékonyság nem befolyásolja a készítmény hatásosságát és biztonságosságát. A biohasonló gyógyszerek fejlesztésének kulcseleme a biohasonlóság igazolása, azaz a kémiai szerkezet, a biológiai hatás és a hatékonyság, a biztonságosság, valamint az immunogenitási profil tekintetében igazolt nagyfokú hasonlóság dokumentálása.

Ahhoz, hogy ennek a hatósági elvárásnak megfelelhessünk, széles analitikai eszköztár alkalmazására van szükség, hiszen az egyes technikák önmagukban nem képesek a hatóanyag-molekula teljes szerkezetét és különböző változatait karakterizálni. Emiatt holisztikus megközelítést kell alkalmaznunk úgy, hogy a különböző mérési módszerekkel a lehető legtöbb analitikai információt nyerjük a vizsgált molekuláról. A terápiás fehérjék karakterizálására számos analitikai technikát használnak a mindennapi gyakorlatban. A különböző folyadékkromatográfiai tech-

nikák, mint például a méretkizárásos (SE), a fordított fázisú (RP), a hidofil interakciós (HILIC) és az ioncserés (IEX) nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) a fehérjék egyes tulajdonságainak (például méret, töltés, hidrofobicitás) különbözőségét kihasználva választják el egymástól a vizsgált minták komponenseit. Ugyancsak eredményesen használhatók fehérjék elválasztásra a kapilláris elektroforézis (CE) és a poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) is. A folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrometria (LC-MS), a mátrix által segített lézerező ionizációs tömegspektrometria (MALDI-MS), a mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR), a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (CD) és az infravörös spektroszkópia (IR) a fehérjék szerkezetvizsgálatára alkalmazhatóak. Az enzimmel kötött immunoszorbens (ELISA) módszer és a felületi plazmonrezonancia (SPR) a biológiai aktivitás vizsgálatának elengedhetetlen módszerei.

Az elmúlt 2–3 évtizedben tapasztalható rendkívül nagy mértékű technikai fejlődésnek köszönhetően a fentiekben felsorolt mérési módszerek közül a tömegspektrometriának (MS) kitüntetett és egyre nagyobb szerepe van [3–6]. A nagyméretű fehérjemolekulák szerkezeti karakterizálásában az új ionizációs és fragmentációs technikákkal rendelkező és egyre nagyobb érzékenységgű készülékek (Orbitrap-analizátor [7]) megjelenése mérföldkő volt. A gyakorlatban Q-TOF- (Quadrupole Time-of-Flight) és hibrid FTMS- (Fourier Transform Mass Spectrometry) készülékeket alkalmazunk ilyen célra. Az FTMS-készülékek esetében az új generációs Orbitrap-készülékek mára szinte teljesen háttérbe szorították az FT-ICR- (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) tömegspektrométerek alkalmazását, melyek fenntartása rendkívül költséges. A legújabb Orbitrap-készülékekre, a már klasszikusnak tekinthető ütközésaktivált disszociációs technikák (CID: Collision Induced Dissociation, HCD: Higher-energy Collisional Dissociation) mellett olyan új fragmentációs technikát (ETD: Electron Transfer Dissociation [8]) fejlesztettek ki, amely komplementer alkalmazásával (ETD-CID és ETD-HCD) a fehérjék aminosav-szekvenciája pontosabban meghatározható. A peptidok fragmentálása után kapott MS-MS-spektrumokban nemcsak egyszeri hasadással keletkező N- és C-terminális fragmensek detektálhatók, hanem ezek víz- vagy ammóniavesztett fragmensei, sőt internális fragmensek is keletkeznek, amelyek értelmezéséhez megbízható, pontos tömegadatokra van szükségünk.

Tömegspektrometriával meghatározhatjuk a biológiai gyógyszerhatóanyagok pontos molekulatömegét, az enzimátikus és kémiai poszttranszlációs módosulásokat, a glikozilációs mintázatot és a fehérje harmadlagos szerkezetét stabilizáló kénhidak helyét, valamint a HDX-MS (Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry) technika révén már a fehérjék magasabb rendű szerkezetét is jellemezhetjük. Mindezek mellett azonban a tömegspektrometriának a fehérjék aminosav-szekvenciája meghatározásában és az ezekhez kapcsolódó analitikai feladatokban van különösen nagy szerepe.

A Richter Gedeon Nyrt.-ben közel egy évtizede folynak bioszimiláris fejlesztések, és az előállított fehérjék karakterizálására rutinszerűen alkalmazunk tömegspektrometriai méréseket. Munkánk során több esetben is feladatunk a fehérjék aminosav-szekvenciájának meghatározása, valamint enzimátikus és kémiai poszttranszlációs módosulások vizsgálata. A bioszimiláris fejlesztés különböző szakaszaiban (**2. ábra**) más-más kérdésekre keressük a választ, amit már a kísérleti munka megtervezése során figyelembe kell vennünk. Minden esetben meg kell vizsgálnunk azt, hogy milyen minta-előkészítési stratégiát célszerű vá-



lasztani egy adott feladat megoldásához, milyen mérési módszert alkalmazzunk, milyen szoftverrel és hogyan értékeljük ki a kapott eredményeket. Közleményünkben a napi munkánk során gyűjtött tapasztalataink felhasználásával szeretnénk általános képet adni az aminosav-szekvenca meghatározásának – nézőpontunk szerint – legfontosabb aspektusairól. Az egyes fejezeteket a teljesség igénye nélkül állítottuk össze, de bízunk abban, hogy közelebb hozzuk az olvasókhhoz a terápiás fehérjék elsődleges szerkezetének tömegspektrometria-alapú vizsgálatát.

## Az aminosav-szekvenca meghatározásának jelentősége

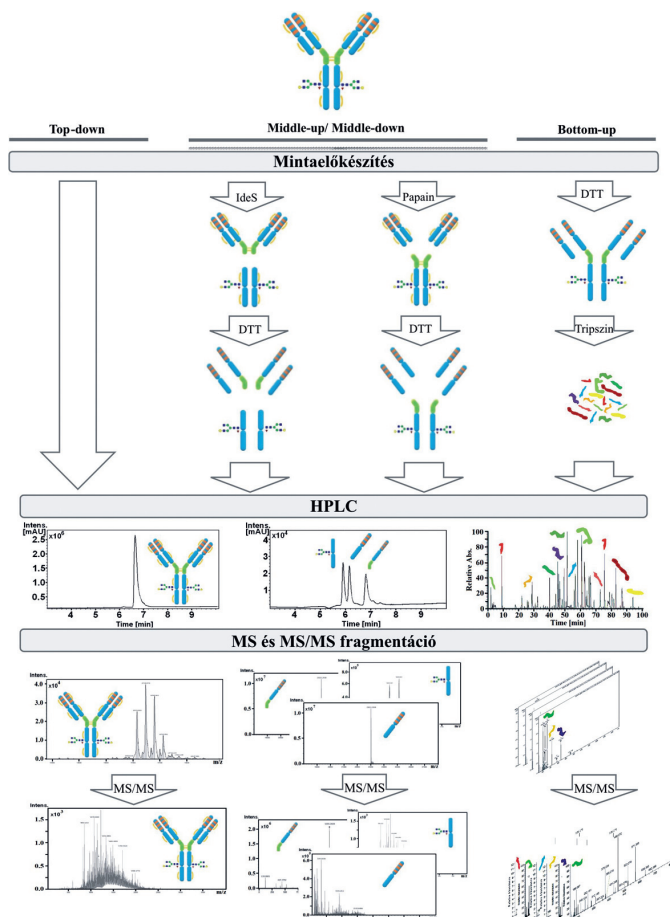
A bioszimiláris termékek aminosav-szekvenciáját – elsődleges szerkezetét – illetően egyértelmű és határozott hatásági elvárás áll rendelkezésünkre: a bioszimiláris és az originátor fehérjék aminosav-szekvenciájának teljesen azonosnak kell lennie, ideértve az izobár (azonos tömegű) leucin és izoleucin aminosavakat is [1, 2]. Kis mennyiségű szekvenzáriánsok ugyan jelen lehetnek a termékben, de ezek szerkezetazonosítására is szükség van.

Az originátor készítmény aminosav-szekvenciája többnyire megszerezhető nyilvános forrásokból, tehát internetes adatbázisokból, szabadalmakból vagy tudományos publikációkból. Azonban figyelembe kell vennünk, hogy ezek az adatok tartalmazhatnak emberi vagy kísérleti hibát [9], sőt akár olyan tudatosan beépített hibát is, amely a versenytárs megtévesztésére irányul. Mindezek miatt az aminosav-szekvenca már a bioszimiláris fejlesztés kezdetén kritikus analitikai információ (2. ábra). Rendkívül kockázatos lehet egy bioszimiláris projekt klónozási fázisát kizárólag adatbázisokból nyert információval elindítani. Ahhoz, hogy nagy biztonsággal az originátor termék aminosavláncát kódoló DNS-szekvenciát klónozzuk be a termelő sejtvonalba és így azzal megegyező aminosav-szekvenciájú bioszimiláris terméket fejlesszünk, be kell szereznünk az originátor termékét, majd azt szekvenálnunk szükséges. Hibásan meghatározott aminosav-szekvenca akár a fejlesztési projekt bukásához is vezethet, mivel a terméket bioszimilárisként nem lehet törzskönyveztetni.

A fejlesztés kezdeti szakaszában történő részletes aminosav-szekvenca-meghatározás mellett a fejlesztés későbbi fázisaiban is monitoroznunk kell, hogy megfelelő-e a hatóanyagunk aminosavsorrendje. Ekkor a vizsgálati megközelítés már különböző lehet; beszélhetünk teljes aminosavszekvenca-meghatározásról vagy összehasonlító jellegű vizsgálatokról, amikor az originátor termékhez történő hasonlítást végezzük el gyorsabb, kevésbé részletes kiértékelést igénylő módszerekkel. Ahhoz, hogy vizsgálni tudjuk az aminosav-szekvenciát, minden esetben kiválasztjuk a céljainknak leginkább megfelelő minta-előkészítési stratégiát a szakirodalomban is leggyakrabban alkalmazott megközelítések közül.

## Az aminosav-szekvenca meghatározásának minta-előkészítési megközelítései: bottom-up, top-down vagy middle-up/middle-down

Az aminosav-szekvenca meghatározására hagyományosan és rutinszerűen alkalmazott technika a bottom-up (vagyis „alulról felfelé”) megközelítés, amely során a fehérjét egy proteolitikus enzimmal (pl. tripszin, Asp-N, Lys-C, Glu-C) emésztjük, redukáljuk (DTT, ditiotreitoll) és a keletkező peptidszakaszokat folyadékkromatográfiával vagy kapilláris elektroforézissel történő elválasztás után MS- és MS/MS-mérésekkel vizsgáljuk (3. ábra). A cél min-



3. ábra. Aminosav-szekvenca meghatározásának minta-előkészítési megközelítései egy monoklonális antitestben bemutatva

dig az, hogy a mérés során sikertüljön az enzimátikus emésztés-kor keletkező peptidok közül annyit detektálni, hogy azok a fehérje egészét lefedjék, azaz 100%-os aminosav-szekvenca lefedettséget kapjunk.

A middle-up (vagyis „középről felfelé”) megközelítés során korlátozott proteolízissel és kénhid-redukcióval nagyobb méretű alegységek, fragmensek állíthatók elő. Az alegységek előállítására leggyakrabban az IdeS vagy papain enzimet használjuk, melyek specifikusan hasítanak a monoklonális antitest „hinge” régiójában. A hasítást követő kémiai redukcióval (DTT) ~25 kDa tömegű alegységek nyerhetők, melyek tömegspektrometriai analízise során az antitest egyes régióiról (pl. Fc, Fd’) kaphatunk információt (3. ábra). Az alegységek fragmentálása, azaz MS/MS-alapú vizsgálata az ún. middle-down (vagyis „középről lefelé”) megközelítés.

A fehérje emésztése nélküli top-down (vagyis „felülről lefelé”) megközelítéssel is nyerhető szekvenciainformáció a vizsgált fehérjéről. Ebben az esetben az intakt (azaz emésztetlen) fehérjét juttatjuk a tömegspektrométerbe, és ott megfelelő technikával fragmentáljuk. Bár a bottom-up megközelítés során kisebb peptidok vizsgálata révén részletesebb szerkezeti információ nyerhető, az elmúlt években számos biztató eredmény született monoklonális antitestek top-down [10, 11] és middle-down [12] analízisében Orbitrap- és Q-TOF-analizátorokat alkalmazva. Bár ezek a megközelítések még nem biztosítanak teljes szekvencialefedettséget, a szekvencaadatok, mint kiegészítő eredmények, felhasználhatók a bottom-up analízis mellett. Mivel aminosavszekvenca-meghatározásra rutinszerűen a bottom-up megközelítés



alkalmazható, a következő fejezetben ezt mutatjuk be részletebben.

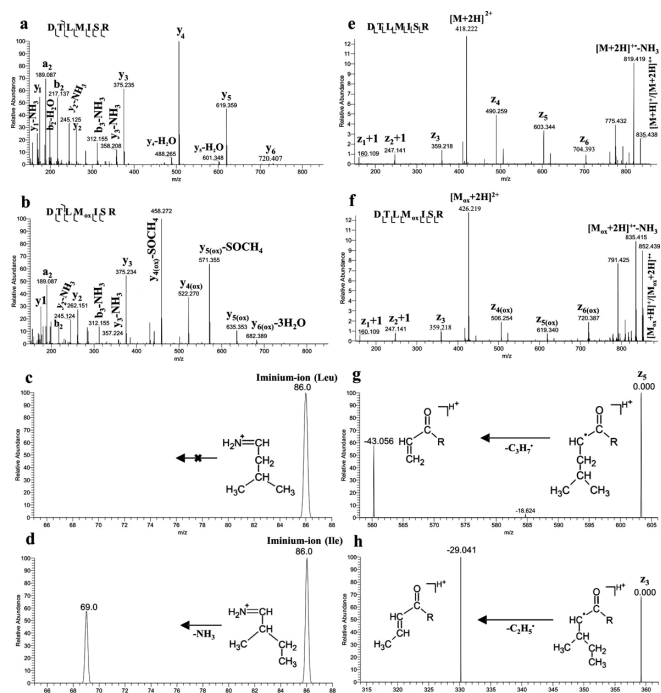
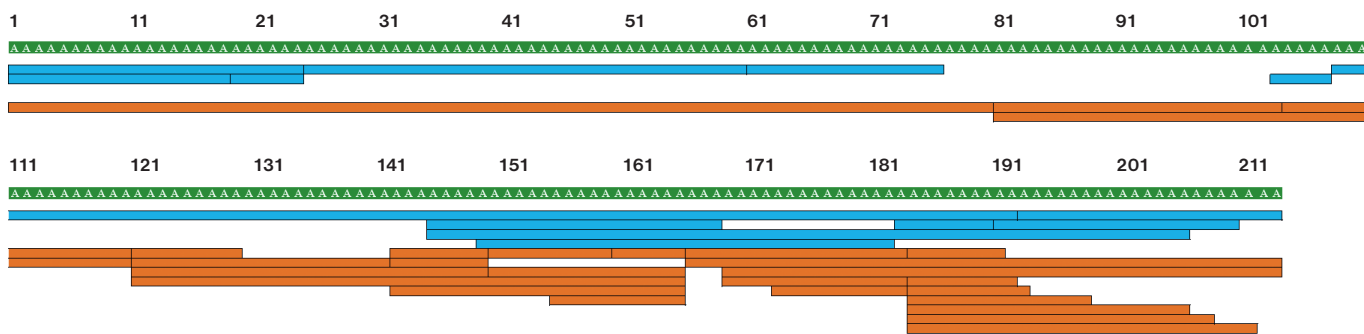
**Bottom-up megközelítés – LC–MS/MS-peptid térkép**

A bottom-up megközelítést terápiás fehérjék azonosságvizsgálata esetén peptid térkép-vizsgálatnak nevezzük [13]. Az enzimatis emésztés előtt a fehérjéket denaturálni szükséges, a minta-előkészítés során a kénhidakat redukáljuk és alkiláljuk. Ez utóbira azért van szükség, hogy megakadályozzuk a redukció eredményeképpen kapott tiolszoportok összekapcsolódását, azaz a kénhidak újbóli kialakulását. Az emésztés eredményeképpen kapott peptideket kromatográfiásan elválasztjuk, majd tandem MS-mérések során fragmentáljuk. Kézenfekvő, hogy kisebb peptid-egységeket vizsgálva részletesebb szerkezeti információt nyerhetünk, mint az intakt fehérje vizsgálata során.

A fehérjék aminosav-szekvenciájának meghatározásában atomi szintű szerkezetmeghatározásra nincs szükség, mivel a fehérjéket az ismert  $\alpha$ -aminosavak építik fel. A fehérjéket felépítő aminosavak nagy száma viszont olyan mértékű variabilitást okoz, amely komoly analitikai kihívást jelent, amikor egy nagyobb méretű fehérje esetén az N-terminálisról a C-terminális részig az összes aminosavat azonosítani szükséges. A nagyméretű biomolekulák bottom-up analízise során a különböző enzimatis emésztmények azonosított peptidjeivel tudjuk lefedni a teljes aminosav-szekvenciát (4. ábra).

Az egyes peptidszakaszok molekulatömegeik és jellemző tömegspektrometriai fragmenseik alapján azonosíthatók. A szomszédos aminosavak közötti hasadással keletkező N- vagy C-terminális fragmensek közötti pontos tömegérték-különbségek alapján az adott pozíciókban található aminosavakat egyértelműen azonosíthatjuk (5.a,b,e,f ábra). Előfordulhat azonban, hogy a kiértékelés során nem vesszük figyelembe kihagyott hasadásokat, a hasonló vagy azonos pontos tömegadattal rendelkező, ugyanakkor különböző aminosavakat nem vesszük számításba. A Gly-Gly (114,043 Da) között kihagyott hasítás révén a két aminosav Asn aminosavként (114,043 Da) is azonosítható. A Gln aminosav (128,059 Da) Lys aminosavként (128,095 Da) is azonosítható a nagyon hasonló pontos tömegadat miatt, ugyanígy a Lys aminosav is azonosítható Gln aminosavként nem megfelelő pontos tömegadat esetén, vagy a műszerre jellemző tömegpontosság nem megfelelő figyelembevételével. Nagyobb méretű peptidek fragmentációja esetén többnyire részleges szekvencia-lefedettséget kapunk, azonban komplementer fragmentációs technika alkalmazása mellett kiegészítő szekvenciainformációt is nyerhetünk.

4. ábra. Egy monoklonális antitest 213 aminosavból álló fehérjeláncának kétenzimes (eltérő színnel jelölve) emésztésével azonosított peptidszakaszok



5. ábra. Egy monoklonális antitest DTLMISR szekvenciájú peptidszakaszának HCD (a) és ETD (e) MS<sup>2</sup> spektruma; a DTLM(ox)ISR oxidált peptidszakasz HCD (b) és ETD (f) MS<sup>2</sup> spektruma, valamint a leucin/izoleucin meghatározására irányuló HCD MS<sup>4</sup> (c/d) és ETD-HCD MS<sup>3</sup> (g/h) spektruma

Módosítások vizsgálata során is figyelembe vesszük a lehetséges buktatókat (hasonló tömegadatok miatti hibás azonosítás), így összetett analitikai megközelítést alkalmazunk azért, hogy megbízható minőségű adatokat nyerjünk. A glikozilációs módosítások vizsgálata esetében például nagy szerep jut a különböző kromatográfiás technikáknak, amíg a nem-enzimatis poszttranszlációs módosítások jellemző tömegkülönbségeket eredményeznek adott aminosavak esetén, így ezek a módosítások meghatározhatók a fragmensek közötti tömegkülönbségek detektálásával.

**Nem-enzimatis poszttranszlációs módosítások meghatározása: „hotspot”-analízis**

Az említett nem-enzimatis poszttranszlációs módosítások a terápiás fehérjekészítmények tárolása során vagy stresszhatásra keletkező, különböző bomlástermékeket foglalják magukba. Ezek a



bomlástermékek leggyakrabban a fehérje oxidált és deamidált formái, de a fragmensek és az izomer aminosavat tartalmazó származékok is ebbe a csoportba tartoznak. A szakmai zsargonban a fehérje érintett részeit „hotspot”-oknak hívjuk (1. ábra). Mivel a natív fehérjéhez képest ezek a bomlástermékek eltérő biológiai aktivitással rendelkezhetnek [14], azonosításuk és azt követő mennyiségi analízisük kritikus eleme a termék karakterizálásának.

Ahhoz, hogy azonosítani tudjuk a fehérje „hotspot”-jait, a natív fehérje vizsgálata mellett érdemes stresszvizsgálatokat is végeznünk. Így lehetőségünk nyílik arra, hogy tanulmányozzuk, mely aminosavak hajlamosak oxidációra, deamidációra, izomerizációra. Az oxidáció jellemzően és legnagyobb mértékben a metionin aminosavat érinti, annak kénatomja szulfoxiddá alakul át 16 Da tömegkülönbséget eredményezve a fehérjében (5. ábra). Ezt a változást már az intakt fehérje mérése során is detektálhatjuk, az oxidáció lejtátszódását akár top-down analízis segítségével is igazolhatjuk. Azonban, ha az oxidáció pontos helyét szeretnénk meghatározni, a többnyire alkalmaznunk kell a bottom-up megközelítést és a fragmentációs tömegspektrum elemzésével kaphatunk egyértelmű választ. Deamidáció vizsgálata során is hasonló módon járunk el; az Asn aminosav deamidálódás révén Asp és isoAsp izomer aminosavakká alakul át. A tömegkülönbség a natív és deamidált formák között csupán 1 Da, amely nagyobb méretű fehérjék esetén csak peptidszinten határozható meg. Az Asp és isoAsp izobár aminosavak között a hagyományos ütközésaktivált disszociációs technikával ráadásul nem tudunk különbséget tenni, viszont ETD-fragmentációval egyértelműen azonosíthatók [15]. A „hotspot” helyek MS-alapú azonosítása után már lehetőségünk nyílik arra, hogy egy olyan UV-alapú kromatográfiás módszert fejlesszünk a bomlástermékek mennyiségi monitorozására, amely gyors, robusztus és tömegspektrometria detektálás nélkül is megbízható információt szolgáltat [16]. Egy ilyen módszer különösen összehasonlító tanulmányokban lehet hasznos, ha az originátor és a bioszimiláris termék számos különböző sarzsát kell karakterizálnunk. Emellett alkalmas lehet arra, hogy a terápiás fehérjekészítmény tárolása során kövessük a bomlástermékek mennyiségének változását.

A gyógyszerhatóssághoz beújítandó bioszimilitási tanulmány részét képezik olyan stresszvizsgálatok is, amelyek során az originátor és a bioszimiláris termék viselkedését tanulmányozzuk különböző stresszelések hatására. A stresszvizsgálatok során időben több pontot monitorozunk. A keletkező bomlástermékek hasonló kinetikai görbéje részben igazolhatja azt, hogy nincs különbség a vizsgált fehérjék magasabb rendű szerkezetében. Ugyanis esetlegesen eltérő magasabb rendű szerkezet következtében adott aminosavak hozzáférhetősége eltérő lehet, így egy bomlástermék keletkezésének mértékében eltérés tapasztalható. Tehát a „hotspot”-ok analízise révén elsőrendű szerkezeti információból kiindulva következtethetünk hasonló vagy eltérő magasabb rendű szerkezetre is.

### Izobár leucin és izoleucin aminosavak tömegspektrometria-alapú meghatározása

Amíg az előzőekben bemutatott nem-enzimikus poszttranszlációs módosítások jellemző tömegkülönbségeket eredményeznek, addig az azonos tömegű (izobár) leucin és izoleucin aminosavak azonosítása eltérő megközelítéssel valósítható meg. Habár a leucin és izoleucin aminosavak elemi összetétele azonos, és az oldalláncban mutatkozó izomeria minor szerkezeti különbségnek

tűnhet egy monoklonális antitest méretéhez képest, ez a különbség nem hagyható figyelmen kívül. Ennek egyik oka a szigorú hatósági szabályozáson túl az, hogy egy leucin-izoleucin „csere” az originátor és bioszimiláris termék között akár jelentős különbséget is okozhat a biológiai aktivitásban [17]. Hagyományosan Edman-szekvenálási technikával különböztethetjük meg egyértelműen a Leu/Ile aminosavakat. Egy nagyméretű fehérje szekvenciájában bárhol előforduló izobár aminosavak meghatározása céljából a fehérjét enzimatis emésztésnek vetjük alá, majd az MS-mérések alapján azonosított, a kérdéses aminosavakat tartalmazó peptideket izoláljuk, esetleg dúsítjuk. Ezt követően Edman-szekvenálással az adott peptidszakasz izobár aminosavait egyértelműen azonosítjuk. Mivel egy monoklonális antitest enzimatis emésztménye rendkívül nagy számú peptidet tartalmaz, ezért ez a megközelítés nagyon időigényes munkafolyamat. Az adott izobár aminosavakat tartalmazó peptidek elválasztása és legyűjtése komoly kihívást jelenthet, többnyire kromatográfiás módszer fejlesztését is szükségessé teszi.

A klasszikusnak számító Edman-szekvenálási technika mellett mára több olyan MS-alapú módszer fejlesztettek ki, amellyel ezek az aminosavak egyértelműen megkülönböztethetők. Ezen módszerek közé tartozik a HCD MS<sup>n</sup> (n = 3–5) technika [18]. Míg a HCD MS<sup>2</sup> alapján nem lehet megkülönböztetni az izobár aminosavakat, addig további fragmentáció alkalmazásával (HCD MS<sup>3–5</sup>) a Leu/Ile aminosavak megkülönböztethetőek (5.a–d ábra). Ez az ún. *iminium-ion* módszer, ahol az izobár aminosav iminium-ionjának (m/z 86,1) fragmentálásával a Leu esetében nincs vagy igen kis intenzitású az ammóniavesztés. Ezzel szemben az izoleucinnál nagy intenzitással jelenik meg a spektrumban az m/z 69 fragmens. Az izobár aminosavak megkülönböztetésére szolgáló másik MS-megközelítés az ETD–HCD MS<sup>3</sup> módszer [19], amelyben a *w-satellit* módszert használjuk, azaz a tömegspektrumban a leucin esetében C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> (–43 Da), míg az izoleucinnál C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (–29 Da) és/vagy C<sub>4</sub>H<sub>8</sub> (–56 Da) vesztés figyelhető meg (5.e–h ábra). Az MS technikákkal történő izobár aminosav megkülönböztetésnek azonban vannak korlátai. A kis ionintenzitások mellett számolnunk kell a hidrogéntranszfer jelenséggel [20], az ún. prolineffektussal, valamint a kiválasztandó fragmens-ionok tömegtartománya is korlátozott [18].

### Az adatbázisok és a szoftveres kiértékelés alkalmazásának szükségessége és buktatói

A fehérje-emésztmények tömegspektrometriai analízise során hatalmas adatmennyiség keletkezik, amely manuálisan nem kezelhető, egyértelműen szoftveres adatfeldolgozásra és kiértékelésre van szükség. Az azonosítás során az alkalmazott szoftver a mért tömegspektrometriai fragmenseket adatbázisban (pl. Mascot) található szekvenciák alapján számolt elméleti értékeknek felelteti meg [21, 22]. A szoftvereket alkalmazhatjuk *de novo* szekvenálásra (olyan szekvenálási folyamat, amely során az aminosavsorrendet mindenféle előzetes információ nélkül határozzuk meg) is olyan peptidszakaszokra, amelyek nem azonosíthatók adatbázis alapján. *De novo* szekvenálásra és adatbázis-keresésre is alkalmas szoftver a PEAKS [23]. Biotechnológiai készítmények fehérje-hatóanyagainak karakterizálása során azokat nem azonosítanunk kell, hanem szerkezeti szempontból a lehető legteljesebb mértékben jellemezni, így aminosav-szekvencia szempontjából a várt szekvenciát kell igazolnunk. Ekkor a teljes szekvenciára kiterjedő részletes analízis esetén már nem beszélhetünk valószínűleg *de novo* szekvenciameghatározásról. Ennek ellenére egy



monoklonális antitest teljes szekvenciájának igazolása rendkívül időigényes és szisztematikus munkafolyamatot igénylő feladat.

A terápiás fehérje-hatóanyagok mellett nemcsak azok variánsai, hanem technológiai eredetű szennyezők is jelen lehetnek, ilyenek többek között a gazdasejt fehérjék (HCP – Host Cell Protein), amelyek azonosítása a potenciális immunogenitás miatt különösen fontos. A rutinszerűen alkalmazott ELISA módszer mellett ezen szennyező fehérjék minőségi azonosítása HPLC-MS/MS technika alkalmazásával valósítható meg. Adatbázisok alkalmazása szükséges ahhoz, hogy a szennyező fehérjéket azonosítani tudjuk a termékben. Ilyen esetekben is tulajdonképpen szekvenálunk, azonban nincs szükség a teljes szekvencia meghatározására, részleges szekvenciafedettség elegendő az egyértelmű azonosításhoz. A szoftveres kiértékelés hátránya a mért tömegspektrometriai fragmensek azonosításának megbízhatósága. Előfordulhat, hogy a szoftverek nem valódi fragmenseket, hanem zajcsúcsokat azonosítanak MS-fragmenseként, valamint többszörösen töltött ionok átfedő izotópkötegeit gyakran nem megfelelően értelmezik. A nyers adatok manuális ellenőrzésével a szoftveres kiértékelés buktatói kiküszöbölhetők vagy legalábbis ezek előfordulása minimalizálható.

### Automatizált, összehasonlító jellegű vizsgálatok az aminosav-szekvencia igazolására

Miközben egy bioszimiláris készítmény fejlesztésének kezdetén szükség van az originátor termék teljes szekvenciájának meghatározására, addig nem kivitelezhető és nem is indokolt ugyanezt a részletes vizsgálatot elvégezni a fejlesztés későbbi fázisaiban vagy a termelés során vizsgálandó gyártási sarzsok esetében. Mindazonáltal ekkor is igazolnunk kell a szekvencia azonosságát az originátor termékhez hasonlítva, sokszor igen nagyszámú mintán. Ezt a feladatot szintén peptidterkép-összehasonlítással, bottom-up megközelítéssel végezzük, bizonyítva, hogy ugyanazok a peptidszakaszok keletkeznek az originátor és a bioszimiláris termék enzimatis emésztése során. Ekkor a hatékonyság növelése érdekében – a nagy mintaszám miatt – célszerű a peptidterkép-adatok kiértékelésének bonyolult és hosszadalmas munkafolyamatát automatizálva vagy részben automatizálva végezni. Ehhez nagy számításigényű, költséges szoftverekre van szükség. Az MS-készülékek gyártói a bioszimiláris ipar felfutásával párhuzamosan olyan „biopharma” célszoftvereket dobtak a piacra, amelyek erre alkalmasak (Bruker, BioPharma Compass; Thermo Fisher Scientific, BioPharma Finder; Waters, BioPharmaLynx; Sciex, BioPharmaView). Emellett számos gyártófüggetlen szoftvert is találhatunk a piacon (Genedata Expressionist, ProteinMetrics, PEAKS), amelyek bármely típusú készülék adatait képesek kezelni és a készülékgyártók szoftvereinél sok tekintetben rugalmasabb, a gyógyszeripari környezethez jobban illeszkedő megoldást kínálnak. A szoftverek kiválasztásánál rendkívül fontos, hogy a kiértékelő munkafolyamatok validálhatóak legyenek és a gyógyszeripari minőségbiztosítással összhangban működjenek.

### Összefoglalás

A biotechnológiai úton előállított terápiás fehérjék elsődleges szerkezetének, azaz aminosav-szekvenciájának meghatározása során lényegesen több analitikai adatra van szükségünk, mint egy fehérje azonosítása során, amelyben részleges szekvenciafedettség is elégséges ahhoz, hogy egy fehérjét azonosítottnak tekint-

sünk. A terápiás fehérjék teljes aminosav-szekvenciáját holisztikus megközelítéssel tudjuk meghatározni, különböző enzimatis emésztmények vizsgálata mellett egymást kiegészítő fragmentációs technikákat alkalmazunk úgy, hogy az izobár aminosavakat is egyértelműen azonosítsuk. Ezt az átfogó aminosav-szekvencia-analízist a bioszimilárisok fejlesztése elején az originátor termékre nézve célszerű elvégezni ahhoz, hogy megbízható szekvenciaadatokkal indítsuk a klónozást. A bioszimiláris fejlesztés különböző fázisaiból származó sarzsok aminosav-szekvenciáját is igazolni kell, amely peptidterkép-mérések adatainak automatizált összehasonlító vizsgálatával hatékonyan hajtható végre.

A tömegspektrometria területén tapasztalható biztató technikai fejlesztések, például az új, nagyobb felbontást, tömegpontosságot és érzékenységet nyújtó analizátorok, a kiegészítő szekvenciaadatokat szolgáltatató új fragmentációs technikák mind azt sugallják, hogy a jövőben az idő- és munkaigényes bottom-up megközelítés helyett (amely jelenleg a legszélesebb körben alkalmazott megközelítés), az analitikusok egyre inkább a middle-up/middle-down vagy esetleg a top-down megközelítést fogják alkalmazni a biotechnológiai eredetű fehérjegyógyszerek elsődrendű szerkezetének jellemzésében. Az adatok értékelésében várhatóan még nagyobb szerep jut majd a szoftvereknek, és a teljes adatértékelési munkafolyamatok automatizálásával lehetővé válik a gyógyszerhatóságok által igényelt, nagyszámú mintára kiterjedő összehasonlító tanulmányok hatékony kivitelezése. ●●●

### IRODALOM

- [1] CDER/CBER, FDA, Guid. Ind., 2015.
- [2] EMA, Biological guidelines, <http://www.ema.europa.eu>
- [3] M. K. Parr; O. Montacir; H. Montacir, J. Pharm. Biomed. Anal. (2016) 130, 366–389.
- [4] A. Beck; F. Debaene; H. Diemer; E. Wagner-Rousset; O. Colas; A. V. Dorsselaer; S. Cianféroni, J. Mass Spectrom. (2015) 50, 285–297.
- [5] K. Sandra; I. Vandenheede; P. Sandra, J. Chromatogr. A (2014) 1335, 81–103.
- [6] H. Zhang; W. Cui; M. L. Gross, FEBS Lett. (2014) 588, 308–317.
- [7] A. Makarov, Anal. Chem. (2000) 72, 1156–1162.
- [8] J. E. P. Syka; J. J. Coon; M. J. Schroeder; J. Shabanowitz; D. F. Hunt, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101, 9528–9533.
- [9] D. Ayoub; W. Jabs; A. Resemann; W. Evers; C. Evans; L. Main; C. Baessmann; E. Wagner-Rousset; D. Suckau; A. Beck, MABs (2013) 5, 699–710.
- [10] Y. O. Tsybin; L. Fornelli; C. Stoermer; M. Luebeck; J. Parra; S. Nallet; F. M. Wurm; R. Hartmer, Anal. Chem. (2011) 83, 8919–8927.
- [11] L. Fornelli; E. Damoc; P. M. Thomas; N. L. Kelleher; K. Aizikov; E. Denisov; A. Makarov; Y. O. Tsybin, Mol. Cell. Proteomics (2012) 1–39.
- [12] L. Fornelli; D. Ayoub; K. Aizikov; A. Beck; Y. O. Tsybin, Anal. Chem. (2014) 86, 3005–3012.
- [13] VIII. Magyar Gyógyszerkönyv – 2.2.55. fejezet (2010) 775–778.
- [14] T. Dashivets; J. Stracke; S. Deng; A. Knaupp; J. Pollmann; J. Buchner; T. Schlothauer, MABs (2016) 8, 1525–1535.
- [15] W. Y. K. Chan; T. W. D. Chan; P. B. O'Connor, J. Am. Soc. Mass Spectrom. (2010) 21, 1012–1015.
- [16] M. Cao; W. Mo; A. Shannon; Z. Wei; M. Washabaugh; P. Cash, PDA J. Pharm. Sci. Technol. (2016) 70, 490–507.
- [17] M. Sitbon; L. D'Auriol; H. Ellerbrok; C. André; J. Nishio; S. Perryman; F. Pozo; S. E. Hayes; K. Wehrly; P. Tambourin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1991) 88, 5932–6.
- [18] Y. Xiao; M. M. Vecchi; D. Wen, Anal. Chem. (2016) 88, 10757–10766.
- [19] D. Bagal; E. Kast; P. Cao, Anal. Chem. (2017) 89, 720–727.
- [20] K. O. Zhurov; L. Fornelli; M. D. Wodrich; Ü. A. Laskay; Y. O. Tsybin, Chem. Soc. Rev. (2013) 42, 5041–5030.
- [21] P. Hernandez; M. Muller; R. D. Appel, Mass Spectrom. Rev. (2006) 25, 235–254.
- [22] M. R. Hoopmann; R. L. Moritz, Curr. Opin. Biotechnol. (2013) 24, 31–38.
- [23] B. Ma; K. Zhang; C. Hendrie; C. Liang; M. Li; A. Doherty-Kirby; G. Lajoie, Rapid Commun. Mass Spectrom. (2003) 17, 2337–2342.

