

A tömegspektrometria alkalmazása fehérje alapú gyógyszerek szerkezetvizsgálatára és jellemzésére

HEVÉR Helga,¹ LUDÁNYI Krisztina,² DRAHOS László,³ és VÉKEY Károly^{3,*}

¹ Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Nyrt., Szerkezetkutatási Osztály; 1103 Budapest, Gyömrői út 19-21.

² Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézet; 1092 Budapest, Högyes Endre u. 7.

³ MTA Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet; 1025 Budapest, Pusztaszeri út 59-67.

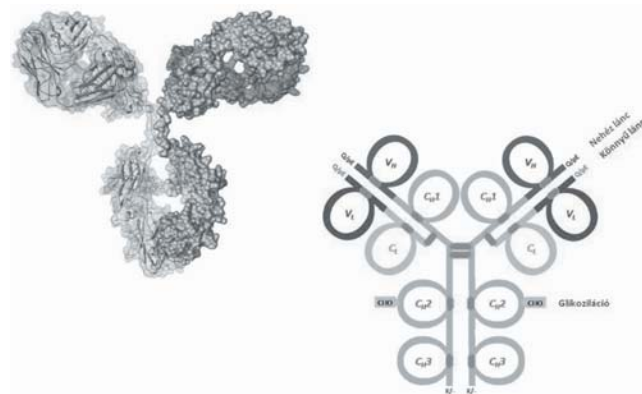
Bevezetés

A gyógyszerek új generációját képviselik a rekombináns technológiával előállított, fehérje alapú készítmények, melyek évről évre a gyógyszerforgalom egyre növekvő hányadát teszik ki világszinten.¹ Ezeket biológiai gyógyszerkészítményeknek, biologikumoknak nevezzük. Hatóanyaguk genetikusok és biomérnökök által tervezett; baktériumok, emlőssejtek vagy más élő organizmusok által, szigorúan szabályozott bioreaktorokban kifejezett komplex fehérjék. A jelenleg engedélyezett és forgalomban lévő biologikumok többségének hatóanyaga monoklonális antitest típusú fehérje (mAb). Ezek szerepére és fontosságára a 19. század végén figyeltek fel. Emil von Behring és Shibasaburo Kitasato² igazolták, hogy fertőzőes megbetegedésekből felépült betegek véréből nyert szérummal azonos betegségben szenvedő páciensek kezelhetők. Ezzel a készítménnyel, prevenció céljából, egészséges emberek szervezetét is immunizálni lehetett.

A fehérjealapú gyógyszerek tulajdonságai, ezek jellemzése, valamint a jellemzésükre szolgáló módszerek jelentősen eltérnek attól, mint amelyeket a gyógyszeriparban általában szintetikus eredetű kismolekulák esetén alkalmaznak. Jelen kontextusban „kismolekulának” nevezzük a 2000 Da-nál (de legtöbbször 500 Da-nál is) kisebb tömegű molekulákat. A kisméretű (hagyományos) gyógyszer-molekulák esetén a vegyület szerkezete, polimorf módosulata(i), esetleges szennyezői, természetes metabolitjai, és ezek farmakokinetikája jól ismertek. Jellemzésük elsősorban kémiai-analitikai módszereken alapul; ezen eszközök tárháza rendkívül széles.³ A szerkezetjellemezés talán legfontosabb eszköze a mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR); e mellett a tömegspektrometria (MS) és az optikai spektroszkópiás módszerek is jelentősek. A szennyezők, metabolitok kimutatásának alapeszköze a kromatográfia és a tömegspektrometria; ezek egyre inkább integrált műszeregyüttest alkotnak (GC-MS, HPLC-MS). Fehérjealapú gyógyszerek esetén a helyzet jelentősen bonyolultabb. Sokszor már a fehérje szerkezete sem egyértelmű, a gyógyszer nagyszámú homológ keveréke; jellemzésük sokkal bonyolultabb.

Tágabb értelemben biologikumnak nevezünk minden készítményt, melynek aktív hatóanyagát egy élő organizmus állítja elő.⁴ Ide sorolhatóak tehát a vakcinák, a vérkészítmények, és a rekombináns úton előállított fehérjéket tartalmazó gyógyszerek egyaránt. Egy élő szervezet működésének és termeltetésének szabályozása rendkívül komplex folyamat, mind a mai napig kiemelt

kutatási terület, sok megválaszolatlan kérdéssel. Mint minden élő szervezet, ezek az expressziós rendszerek is érzékenyen reagálnak minden változásra, olykor drasztikus eltéréseket/mutációkat eredményezve ezzel a kifejezett fehérje szerkezetében. Szerkezetkutatási szempontból megvizsgálva a biologikumokat, összevetve a kismolekulás hatóanyagokkal, az első szembetűnő különbség a hatóanyag-molekula mérete és „homogenitása”. Egy monoklonális antitest elsődleges szerkezete több mint 1300 aminosavból, közel 25 000 atomból épül fel, melyek két „nehéz” és két „könnyű” láncba rendeződve alakítják ki az antitestekre jellemző Y formát a köztük létrejövő diszulfid hidak segítségével (1. ábra). Ha a fehérje expressziója során spontán lejátszódó pontmutációkkal nem is számolunk, még akkor is jelentős heterogenitást adnak a kifejezett fehérjemolekulák szerkezetének az egyes aminosavakon a translációt követően kialakuló módosítások (ko-transzlációs [CTM] és poszt-transzlációs módosítások [PTM]). Az antitestek három jellegzetes módosítása a nehéz lánc glikozilációja, a láncok N-terminálisának piroglutaminációja, valamint a nehéz lánc C-terminálisán található lizinek jelenléte vagy hiánya. Minden lehetőséget figyelembe véve a potenciális heterogén formák száma megközelítőleg 10^8 nagyságrendű, melyek minden egyes gyártási tételben jelen vannak/lehetnek.



1. Ábra. IgG1 típusú monoklonális antitestek általános szerkezete (Az [5, 6]hivatkozások alapján).

A fehérjék méretéből és heterogenitásának mértékéből adódóan a kismolekulás szerkezetmeghatározási gyakorlattal összevetve az egyes nagyműszeres szerkezetkutatási technikák is teljesen új szerepkört nyernek. Jelenleg elképzelhetetlen, hogy egy intakt monoklonális antitest NMR-es vizsgálata alapján olyan részletesen és pontosan leírt szerkezetet lehessen megadni, mint egy kis szerves molekula

* email: vekey.karoly@ttk.mta.hu

esetében. Többdimenziós mérések alapján ~10 000 ¹H és ~3 500 ¹³C atom korrelációit feltérképezni kivitelezhetetlen feladat lenne még akkor is, ha csak tisztán egy adott típusú izomer lenne a kezünkben. Fehérjék szerkezetének, ezen belül is szekvenciájának és módosításainak jellemzése során ezért elsődleges szerkezetmeghatározási technikává lép elő a tömegspektrometria különböző elválasztástechnikai módszerekkel, elsősorban a HPLC-vel kapcsolva.

A jelenleg használt szerkezetvizsgálati és analitikai módszerek fejlesztése hosszú időn keresztül kismolekulák meghatározására specializálódott. A fehérjeanalitikai feladatok megjelenésével elsődleges feladattá vált „nagy molekula-kompatibilissé” fejleszteni a kismolekulás analitikai módszereket. Egy kis szerves molekula akár egyetlen infravörös spektrum (IR) alapján is azonosítható. A fehérjék elsődleges szerkezetének és módosításainak rutinszerű ellenőrzésére kidolgozott eljárás ennél sokkal bonyolultabb. Erre szolgál pl. a peptidterkép analízis, ahol egy ultraibolya (UV) kromatogram alapján eldönthető, hogy megfelel-e a vártak az előállított hatóanyag. Peptidterkép analízis során a kromatográfiás elválasztást egy összetett mintaelőkészítés előzi meg, melynek során a fehérjét „konzervatív” peptidokra hasítjuk, jellemzően proteolitikus úton (egy fehérjebontó enzim, ún. proteáz segítségével), majd a keletkezett „peptid-elegy” komponenseit kromatográfiásan elválasztjuk. Az így kapott UV kromatogram ujjlenyomatszerűen jellemző a fehérje elsődleges szerkezetére és módosításaira egyaránt. Ahhoz, hogy ez az UV kromatogram önmagában használható legyen a jellemzésre, mindenekelőtt teljes szerkezetmeghatározást kell végezni az adott fehérjére. Azonosítani kell, hogy az adott ujjlenyomat pontosan melyik fehérjéhez rendelhető; valamint elengedhetetlen a kromatográfiás elválasztás során eluálódó komponensek mindegyikének azonosítása. Ez elsődlegesen a kromatográfiához „on-line” kapcsolt tandem tömegspektrometriával történik (HPLC-MS/MS). A kromatográfiás csúcshoz aminosav szekvenciákat, poszt-transzlációs módosulásokat tudunk társítani, vagyis egzakt szerkezeti információt kapunk. A peptidterkép analízis példája jól szemlélteti, hogy a fehérjék karakterizálása során alkalmazott analitikai eljárások két csoportra oszthatóak. A módszerek egy része egyedi ujjlenyomatot képes készíteni a vizsgált fehérjéről, tehát jól jellemezhet egy adott gyártási terméket. Ilyen eljárás például a peptidterkép analízis, a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (CD), esetleg NMR spektroszkópia. Az analitikai módszerek másik csoportját alkotják azok a technikák, melyek konkrét szerkezeti információt nyújtanak a vizsgált fehérjéről. Ide sorolható a fehérjék területén jelenleg egyedülálló, meghatározó szerepet betöltő tömegspektrometria, de ide tartozik kisebb (tipikusan izotóppal jelölt) fehérjék NMR analízise is.

Ebben a kérdéskörben fontos megemlíteni a generikus, ill. „biohasonló” termékeket is. Generikus termék esetén (egyéb követelmények mellett) kémiai értelemben azonos szerkezetű molekulákról van szó. Fehérje alapú gyógyszerek esetén nem beszélhetünk szerkezet-azonosságról, csak nagyfokú hasonlóságról; részben azért, mert e termékeket (pl. a poszt-transzlációs módosulások miatt) nagyfokú szerkezeti heterogenitás jellemzi. Ezért fehérjealapú gyógyszerek esetén az eredeti termékkel azonos hatású, szerkezeti jellemzőit tekintve kis tolerancián belül azonosnak tekinthető termékeket biohasonlóknak, vagy

bioszimilárisoknak nevezzük. A másolatot elkészítéséhez elengedhetetlen az eredeti „originális” termék („molekula”) részletes ismerete. Kismolekulás gyógyszerekkel ellentétben fehérjealapú gyógyszerek esetén ezek szerkezete (ill. szerkezeti jellemzői) nem nyilvános; a szakirodalomban (pl. publikációban) megjelenő információk hiányosak, olykor félrevezetőek lehetnek.⁷ Ennek következtében az analitikus számára egy „bioszimiláris” termék analitikája gyakran egy eredeti termék kifejlesztésénél, jellemzésénél is nagyobb kihívást jelent.

A gyógyszeriparban dolgozó fehérjeanalitikus számára a kritériumokat mindig az aktuális hatóságok fogalmazzák meg (OGYI, EMA, FDA, stb.), azonban ez sohasem olyan egyértelmű, mint ahogy azt egy felhasználó szeretné. A hatósági irányelveknek megfelelően a fehérjék jellemzését a lehető legnagyobb részletességgel („to the extent possible”) és a legkorszerűbb „state of the art” analitikai technikákkal kell megvalósítani. Ez egyaránt igaz a biológikumokat és a biohasonlókat gyártók számára.

A tömegspektrometria alkalmazása fehérjék (fehérje alapú gyógyszerek) vizsgálatára

A tömegspektrometria, különösen korszerű elválasztástechnikával kapcsolva, az egyik legszélesebb körben alkalmazott és leghatékonyabb analitikai módszer. Gyógyszeranalitikai alkalmazása széleskörű, a kutatásban, a készítményfejlesztésben és a minőségbiztosításban egyaránt nélkülözhetetlen. A 20. század végére a hagyományos gyógyszerkutatáson túlmenően bioanalitikai célokra is kulcsfontosságú technikává nőtte ki magát. Ezen fejlődésnek köszönhetően a fehérjekutatás (és ezen a belül fehérjealapú gyógyszerek fejlesztése) napjainkban elképzelhetetlen tömegspektrometria nélkül. A proteomika az élő szervezetben előforduló fehérjék szerkezetének, biológiai funkciójának, a fehérjék mennyiségi előfordulásának és ezek térbeli és időbeli változásának feltérképezése. Ennek kulcsfontosságú analitikai eszköze a tömegspektrometria, mely különböző elválasztástechnikai eszközökkel kapcsolva teremt lehetőséget komplex biológiai minták kvalitatív és kvantitatív analízisére. Rutinszerű alkalmazását két új ionizációs eljárás kidolgozása tette lehetővé: a „Matrixszal segített Lézer Deszorpciós Ionizáció” (MALDI) és az elektroporlasztásos ionizáció (ESI). A készülékek és az adatfeldolgozás (speciális szoftverek) területén az utóbbi évtizedben robbanásszerű technikai fejlődés következett be.

A gyógyszeriparban megjelenő fehérjeanalitikai feladatok megoldására a proteomikában kidolgozott eszközrendszer szolgál alapul, de a két kutatási terület célkitűzéseinek fókuszpontja jelentős mértékben különbözik. Míg a klasszikus proteomikai kutatásban a feladat nehézségét a biológiai mátrix komplexitása és a meghatározandó fehérjék rendkívül kis mennyisége jelenti, ezek a problémák nem jelennek meg a rekombináns úton, nagy tételben előállított és tisztított fehérje alapú hatóanyagok esetében. Klasszikus proteomikai publikációkban elfogadott, hogy a vizsgált mintában azonosítottak tekinthető egy fehérje, ha MS és tandem MS (MS/MS) spektrumok alapján megfelelő számú, „jellegzetes” peptid igazolja szekvenciáját. Tipikus esetben a fehérje szekvenciájának 30-50%-a határozható meg, de minor komponensek azonosítására 1-2 peptid azonosítása is

elegendő lehet. Ezzel szemben a gyógyszeripari feladatok esetén nem a fehérje kimutatása, jelenlétének igazolása a cél, hanem lehető legteljesebb karakterizálása: a vizsgált fehérje (1) teljes aminosav szekvenciájának igazolása terminálistól terminálisig, aminosavról aminosavra történő meghatározása; (2) az aminosav szekvenciájában megjelenő összes módosítás (CTM, PTM) típusának és helyének meghatározása; (3) egy adott aminosavon megjelenő módosítás esetén (pl. glikoziláció esetén) az egyes homológ szerkezetek arányának meghatározása; (4) a molekulatömeg meghatározása; (5) a térszerkezet kialakításában résztvevő diszulfid hidak meghatározása, stb.

A tömegspektrometria (tandem-tömegspektrometria) segítségével nyert információkat, függetlenül a vizsgált molekula méretétől és egyéb fizikai-kémiai tulajdonságaitól, két csoportra oszthatjuk. Az MS spektrum alapján a vizsgált molekula molekulatömege határozható meg, míg fragmentációs, vagyis MS/MS spektruma(i) alapján szerkezeti információt nyerhetünk róla a keletkezett fragmens ionok molekulatömege alapján. A fragmentáció elősegítésére legelterjedtebben alkalmazott módszer, kis és nagymolekulák esetén egyaránt, az ütköztetési aktiválás (CID). Ebben az esetben az ütköztetési cellában inert gázzal (pl. N₂, He, Ar) ütköztetjük az ionokat).^{8,9} Lehetőség van infravörös lézerrel is gerjeszteni az ionokat (IRMPD, Infrared Multiphoton Dissociation),¹⁰ de ez a technika kevésbé elterjedt. Több szempontból is komplementer technikáknak tekinthetők az elektronbefogás indukálta disszociáció (ECD) és az elektron transzferrel indukált disszociáció (ETD), melyek kifejezetten fehérjék, peptidok vizsgálatára fejlesztett fragmentáció eljárások. Ebben az esetben az ionok disszociációját a többszörös töltésű ionok - kis energiájú elektronok, vagy gyökionok segítségével indukált - töltésszámának csökkenése váltja ki. Egyik legnagyobb előnyük a CID technikával szemben, hogy a fragmentáció során a módosítások nem fragmentálódnak, ezzel lehetőséget teremtve pontos pozíciójuk lokalizálására (pl.: glikoziláció, foszforiláció). Mind a kismolekulákat, mind a nagymolekulákat jól definiált fragmentáció jellemzi. Proteinek MS/MS spektrumának értékelése napjainkban különböző algoritmusok alapján működő szoftverek segítségével történik. Ezek nagyrészt automatikus, esetenként félautomatikus értékelést tesznek lehetővé. Proteinek teljes aminosav-sorrendjének meghatározása nem tipikus proteomikai feladat, de biológikumok és bioszimiláris készítmények esetén alapvető jelentőségű. Az értékelés manuális feladat, bár gyakran szoftver segíti (lásd később).

A fehérjék MS alapú szerkezetmeghatározása alapvetően kétféleképpen valósítható meg.¹¹ Egyik lehetőség az ún. „top-down” szekvenálási stratégia, amikor a tömegspektrométerrel a teljes fehérjemolekulát vizsgáljuk. Ebben az esetben az MS spektrum alapján meghatározható a fehérje/polipeptid mérete (molekulatömege), fragmentációja alapján pedig az aminosav sorrend és az esetleges poszt-transztlációs módosulások típusa és helye. Ez az eljárás a technikai nehézségek miatt napjainkban még nem tekinthető rutineljárásnak, kisebb fehérjék, polipeptidok jellemzésére alkalmas.

A fehérjék leggyakrabban használt szerkezetmeghatározási módszere az ún. „bottom-up” eljárás, melynek során a

tömegspektrometriás analízist több lépcsős mintaelőkészítés előzi meg. A fehérjét optimális esetben 8-14 aminosavat tartalmazó peptidre hasítjuk jellemzően nagy specificitású fehérjebontó enzimekkel, úgynevezett proteázokkal. A proteomikában legelterjedtebben használt enzim a tripszin, mely két bázikus aminosav, a lizin és az arginin C-terminálisánál hasítja az összekapcsolódó aminosavakat. A természetben megtalálható fehérjékben gyakori a lizin és az arginin előfordulása, amely a fehérjeanalízis szempontjából kedvező. A tripszines emésztés további előnye, hogy (specifikus működése esetén) minden kihalított peptid C-terminálisán egy bázikus aminosav marad, biztosítva ezzel a peptid megfelelő protonálhatóságát a tömegspektrometriás analízishez. A teljes fehérjeszekvencia meghatározásához a tripszines emésztés sokszor nem elegendő, ezért a fehérjék emésztéséhez gyakran más proteázokat (pl. Glu-C, stb) is alkalmazunk. Ezeket az enzimeket párhuzamos kísérletekben, vagy egy lépésben alkalmazzuk (enzimkeverékként). Az így kapott peptid keveréket kromatográfiás elválasztást követően, lehetőség szerint a peptidokat izolálva juttatjuk a tömegspektrométerbe. Az egyes komponensek MS/MS spektrumának értékelésével meghatározzuk a peptidok szerkezetét, a teljes aminosav sorrendet (szekvenciáját), amely a fehérje elsődleges szerkezete. Egy fehérje tömegspektrometriás analízise során sok ezer spektrumot (ill. tandem tömegspektrumot) veszünk fel, melyek értékelése elképzelhetetlen speciálisan erre a célra fejlesztett szoftver nélkül. Ez azonban gyógyszeripari feladatok esetén csak háttértámogatást nyújt, mivel minden egyes peptid, szekvencia, módosítás azonosítása kizárólag a spektrumok manuális értékelését követően tekinthető megoldottnak.

Napjainkban a technológia rohamos fejlődésének köszönhetően a „bottom-up” és „top-down” stratégiák közötti átmenet is egyre népszerűbb, melyet „middle-down” vagy „middle-up” eljárásnak nevezünk. Ez esetben a fehérjét csak néhány helyen hasítjuk, és az így kapott, még mindig nagy (3-10,000 Da molekulatömegű) polipeptid láncokat szekvenáljuk.

A fent ismertetett módszerek fehérjék módosításainak azonosítására és helyspecifikus analízisére is használhatók. Szerencsés esetben már az enzimatis emésztést követő HPLC-MS/MS analízis során azonosítható, és egy peptidre lokalizálható a módosítás. Egyes módosítások, mint például a glikoziláció feltérképezése azonban igen bonyolult feladat, több tömegspektrometriás technika, speciális mintaelőkészítés, különleges kromatográfiás módszerek együttes alkalmazását igényli.

Fehérjék glikozilációja és ennek meghatározása

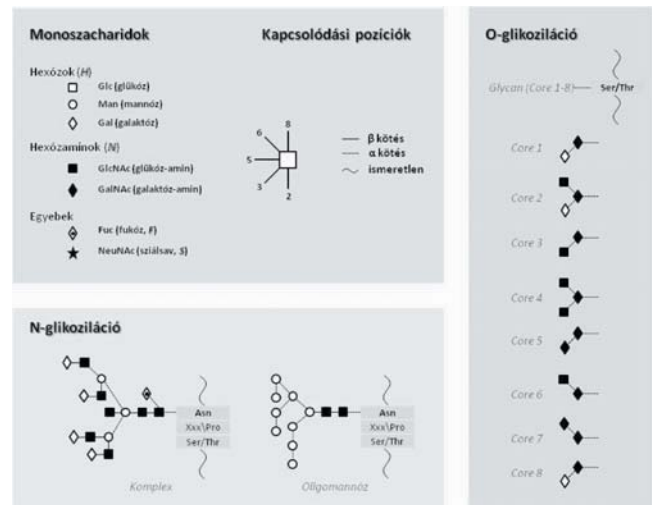
A fehérjeanalitika, ill. fehérje alapú gyógyszerkészítmények jellemzésének egyik legnagyobb kihívása a glikoziláció meghatározása. A glikoziláció a fehérjék leggyakoribb, transztlációt követően kialakuló enzimatis módosítása (CTM vagy PTM), mely széles körben képes befolyásolni a fehérje hatását, biológiai aktivitását, valamint a sejtek közötti kommunikáció és immunválasz egyik fő eszköze. A cukorláncok szerkezete és funkciója közötti összefüggések feltárása, a glikozilációs mintázat monitorozása betegségek előrejelzésében, diagnosztikájában vagy korfejlődésének

követésében kiemelkedő fontosságú kutatási területek. A felsorolt célok megvalósításához rendkívül precíz és érzékeny analitikai háttér szükséges, mely a mai korszerű műszerezettség mellett is nagy kihívást jelent a cukormintázat rendkívüli összetettsége miatt. A cukorlancok komplexitását építőköveinek, a különböző monoszacharid egységek fajtájának változatossága, illetve ezek kapcsolódási rendjének és kötéstípusainak sokszínűsége adja. A glikozilációs típusok két leggyakoribb fajtája az N- és O-glikoziláció.

N-glikoziláció során a cukorlanc valamely láncközi aszparagin (Asn/N) láncközi amid csoportjának nitrogén atomjához kapcsolódik. A fehérje elsődleges szerkezetében egy aminosav-hármas, úgynevezett konszenzus szekvencia jelzi az N-glikoziláció lehetőségét, melynek mintázata: N-X-S/T, ahol X bármely aminosav lehet a prolin (Pro/P) kivételével, S szerint, a T treonint jelent. Az aszparagin oldalláncára az endoplazmás retikulumban, enzimatisz uton épül rá egy nagyobb cukor egység. Többlépéses folyamatban jön létre a glikoproteinek jellemző N-cukorszerkezetek valamelyike: komplex; oligomannóz (2. ábra); vagy a két típus keveréke, a hibrid cukorlanc.

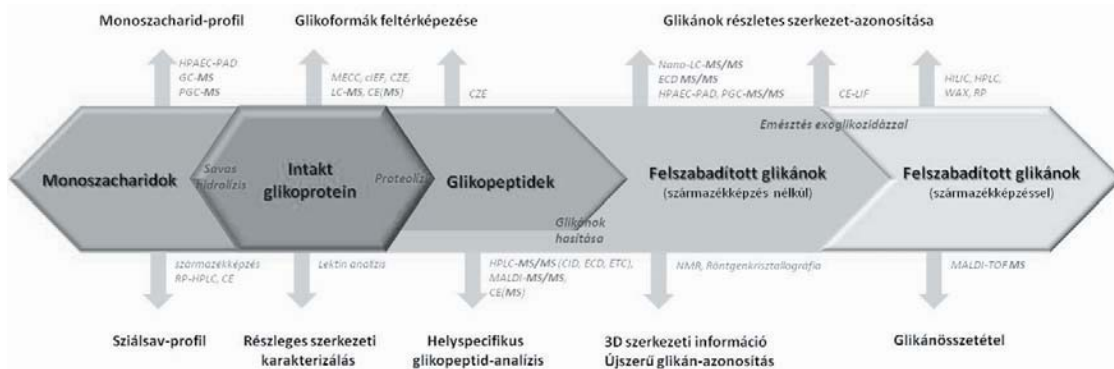
O-glikoziláció az oldalláncukban hidroxil csoportot tartalmazó aminosavak alakulhat ki, melyek közül a szerin és a treonin a leggyakoribbak. Az O-glikánok

szerkezetét tekintve nyolc alaptípust különböztetünk meg, melyek mindegyikére jellemző, hogy a fehérje lánchoz egy N-acetilhexozaminon keresztül kapcsolódik a cukorlanc.



2. Ábra. Az N- és O-glikoziláció jellemző cukorszerkezetei (A [3] hivatkozás 2. ábrája alapján).

Rekombináns monoklonális antitestek esetében, tipikusan egyetlen N-glikozilációs módosítás épül be a fehérje nehéz láncának konstans régiójába, általában a 297-es pozícióban



3. Ábra. A glikozilációs mintázat meghatározásának lehetőségei ([12] hivatkozás 1. ábrája és a [13] hivatkozás 2.2.59.-1. ábrája alapján).

Rövidítések magyarázata (amelyek eddig nem szerepeltek a cikkben): HPAEC-PAD: nagy hatékonyságú anioncserés kromatográfia pulzáló amperometriás detektálás, PGC: porózus grafit-kromatográfia, MECC: micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfia, cIEF: kapilláris izoelektromos fókuszálás, CE: kapilláris zónaelektroforézis, CE-LIF: kapilláris elektroforézis lézer indukált fluoreszcencia detektálással, HILIC: hidrofíl kölcsönhatáson alapuló folyadék kromatográfia, WAX: gyenge anion cserélő, RP-HPLC: fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia, TOF: repülési idő analízator.

található aszparaginra. A monoklonális antitestek előállítása tipikusan emlősejtes expressziós rendszerben történik (pl.: kínai hörcsög petefészek sejtes [CHO]). Bakteriális expressziós rendszerek épp azért nem használhatók, mivel ezek nem képesek (megfelelően) glikozilálni a kifejezett fehérjét. A rekombináns monoklonális antitestek glikozilációs mintázatát főtömegében négy fő glikoforma, úgynevezett komplex típusú cukorlanc alkotja. Ezek mellett kisebb mennyiségben számos más, úgynevezett minor glikoforma is jelen van.

A terápiás glikoproteinek biológiai aktivitását befolyásoló tényezők egyike a glikozilációs mintázat. A természetben előforduló glikoproteineken található cukorlancok pontos funkciója sok esetben még mai napig sem tisztázott, azonban számos glikoziláció – hatás összefüggést tártak már

fel biológiai vizsgálatok segítségével. Továbbá a cukorlanc befolyásolja a fehérje konformációját, stabilizálhatja térszerkezetét, antitestek esetében befolyásolja a fehérjék aktivitását (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity és Complement Dependent Cytotoxicity), stb.

Humán gyógyászati felhasználásra előállított glikoproteinek esetében feltétlenül szükséges (és a hatóságok által megkívánt) a glikozilációs mintázat lehető legteljesebb karakterizálása. Ez többek között magában foglalja a glikoziláció helyének azonosítását (mely különösen O-glikoziláció esetében nehéz), az adott helyen található minor és major glikoformák azonosítását és kvantifikálását, a cukorlancokat felépítő monoszacharid egységek kapcsolódási rendjének feltérképezését és a fehérje egészére jellemző monoszacharid összetétel meghatározását. Különösen fontos a glikoproteint jellemző számos glikoforma relatív

mennyiségi jellemzése; ill. egy adott termék esetén ennek az eloszlásnak (a glikozilációs mintázatnak) az állandósága (kis variabilitás a mennyiségi arányokban). A glikoziláció analitikai jellemzése igen bonyolult, számos módszer együttes alkalmazását igényli. A teljes munkafolyamatot a 3. ábra szemlélteti.

Fehérjék N-glikozilációs mintázatának meghatározása – esettanulmány

A glikozilációs mintázat meghatározása a glikoziláció vizsgálatának egyik legfontosabb (de önmagában nem elegendő) lépése, amelyre több alternatív megoldás létezik, ezek mindegyike komplex munkamódszert igényel. A feladat illusztrálására egy ilyen munkafolyamatot mutatunk be a következőkben. Alapelemei:¹⁴

- 1) A glikoprotein proteolitikus (általában triptikus) emésztése;
- 2) A peptid-glikopeptid keverék UHPLC-MS és UHPLC-MS/MS analízise
- 3) Az eredmények értékelése speciális, a glikozilációs mintázat meghatározására szolgáló szoftver segítségével.

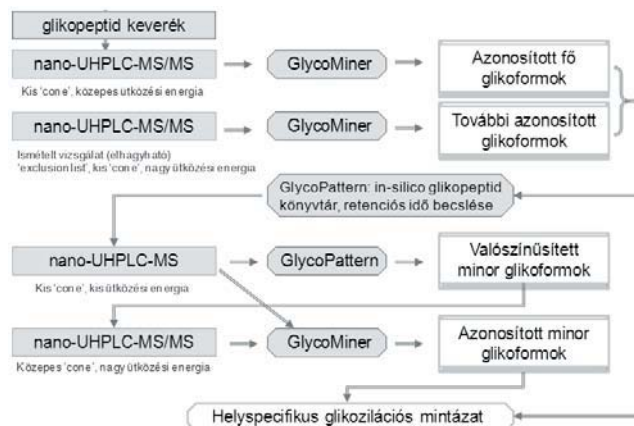
A vizsgálat stratégiai szempontból fontos eleme, hogy glikopeptid (és nem oligoszaccharid) fragmensek analízisét végezzük el. Ennek során a peptid molekulatömege (és szükség esetén szekvenciája is) meghatározható, amely azonosítja, hogy az adott glikopeptid mely proteintól származik, ill. azt, hogy a glikoziláció a fehérjelánc mely helyén történt. A módszer előnye, hogy a szennyezett minták ill. glikoprotein keverékek analízise úgy végezhető el, hogy a szennyezés jelenléte az eredményeket nem befolyásolja.

A vizsgálat másik eleme a peptid/glikopeptid keverék analitikai és szerkezetvizsgálati jellemzése. Ez kromatográfiával „on-line” kapcsolt tömegspektrometriai vizsgálat során történik; amely a modern analitikai kémia egyik legnagyobb teljesítőképességű módszere. A sikeres analízis érdekében a tömegspektrometriás méréseket a „szokásos” proteomikai módszerekhez képest jelentősen eltérő körülmények között kell elvégezni (lásd lentebb).

A vizsgálat harmadik kulcskérdése az eredmények értékelése. Ennek során meg kell határozni, hogy egy kromatográfiás futás alatt felvett sok ezer tömegspektrum (és tandem tömegspektrum) közül melyik felel meg a glikopeptidnek. Miután azonosítottuk a glikopeptidek jelenlétét, tandem tömegspektrumuk alapján meghatározzuk ezek szerkezetét (aminosav és monoszaccharid összetételét), majd az azonosított glikopeptidek relatív mennyiségét. Mindezen lépések manuális értékelése a gyakorlatban nehezen megvalósítható – ez a glikoprotein analízis egyik szűk keresztmetszete –, ezért a probléma megoldásához két szoftvert („GlycoMiner” és „GlycoPattern”-t) fejlesztettünk ki.^{14, 15}

A fenti eljárás folyamatát a 4. ábra mutatja be. A glikoprotein enzimatis emésztését követően több, kromatográfiás szempontból megegyező mérés kerül lefuttatásra, melyek a tömegspektrometriás beállításokban, ionizációs és fragmentációs paraméterek tekintetében különböznek egymástól.

Az ionizációs paraméterek beállításától függően az ionizáció során keletkezett ionok az ionforrásban gyakran elbomlanak (fragmentálódnak). Ez olykor kívánatos (szerkezeti információt nyújt), glikopeptidek analízise esetén azonban célszerű elkerülni, ugyanis az eredményeket torzíthatja. Glikopeptidek egyik fontos tömegspektrometriás jellemzője, hogy a cukorláncot felépítő monoszaccharid egységek közötti kötések jóval könnyebben



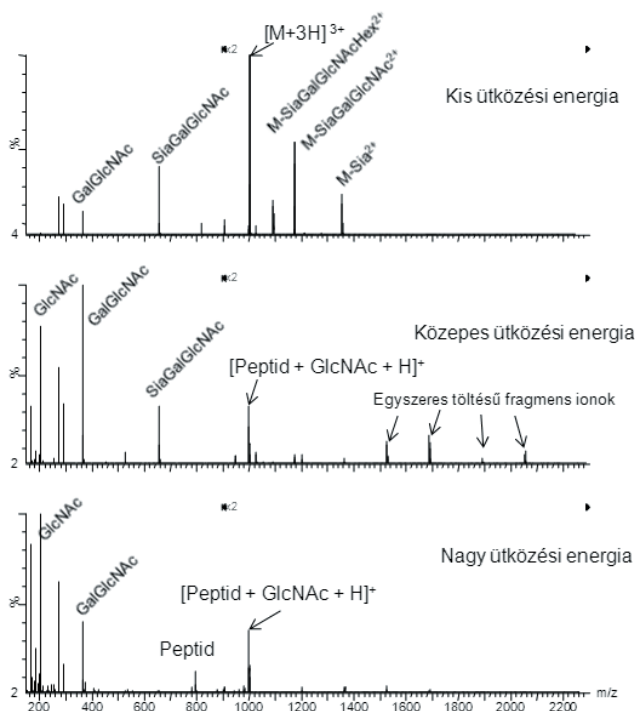
4. Ábra. Az N-glikozilációs mintázat meghatározásának folyamatábrája (A [14] hivatkozás alapján).

elhasadnak, mint a peptidrészt felépítő aminosavak közötti peptidkötések. Amennyiben már az ionizáció során fragmentáció következik be, ez olyan ionokat eredményez, melyek látszólag egy kisebb cukorláncot tartalmazó glikopeptid jelenlétére utalnak. Ezen tömegspektrumok értékelése a glikoprotein mintában jelenlévő glikoformák típusáról és azok relatív arányáról is félrevezető információt ad. A készülék beállítása szempontjából ezért fontos, hogy a glikopeptidek szerkezetének és mennyiségi arányának meghatározásához olyan kísérleti körülményeket válasszunk, mely esetén az ionforrásban fragmentáció nem történik.

Az előzőekkel szemben, az ionforrásban bekövetkező fragmentáció előnyt is jelenthet. Amennyiben az ionforrásban (az úgynevezett „cone” feszültség megnövelésével) jelentős mértékű fragmentációt idézünk elő, ez intenzív oxónium ionok kialakulásához vezet (pl.: 204 m/z HexNAc, m/z 306, Hex.HexNAc; m/z 657 Sia.Hex.HexNAc, stb). Ezen markerionok megjelenése glikopeptidek jelenlétét mutatja; így felhasználható ezek lokalizálására (retenciós idejük azonosítására). Tömegspektrometriás szempontból a módszerfejlesztés első lépése tehát a megfelelő ionizációs paraméterek optimalizálása. Glikopeptidek analízise esetén gyakran nem egy, hanem két különböző ionizációs körülményt állítunk be, az egyik a glikopeptidek jelenlétének és retenciós idejének azonosítására, a másik ezek szerkezetvizsgálatára és kvantitatív jellemzésére alkalmas.

A fragmentációs energia nemcsak az ionforrásban, hanem tandem tömegspektrometriás szerkezetvizsgálatok esetén is döntő fontosságú. Tandem tömegspektrometria esetén tipikusan ütközéses aktivációt végzünk, ez esetben az ütközési energia a legfontosabb paraméter. Ennek megfelelő beállításával ill. változtatásával különböző szerkezeti információkat gyűjthetünk a glikopeptidről, részben a

cukorlánc szerkezete is meghatározható (szekvenciája, elágazási helyei). Egy glikopeptid energiafüggő tandem spektrumait mutatja az 5. ábra. Elsődlegesen a cukorlánc fragmentációja figyelhető meg, ami lehetőséget nyújt a cukorlánc szerkezetének feltérképezésére. Nagy ütközési energia esetén a deglikozilált peptid ionja is megjelenik a spektrumban, mely a peptid tömegét azonosítja. Mivel a mintában lévő glikoprotein(ek) ismertek (ill. rutin HPLC-MS/MS alapú proteomikai módszerek alkalmazásával felderíthetők), a peptid tömege tipikusan ennek szerkezetét, így a glikoziláció helyét is azonosítja. Szükség esetén ECD segítségével a peptidszekvencia a tömegspektrumból közvetlenül is meghatározható.

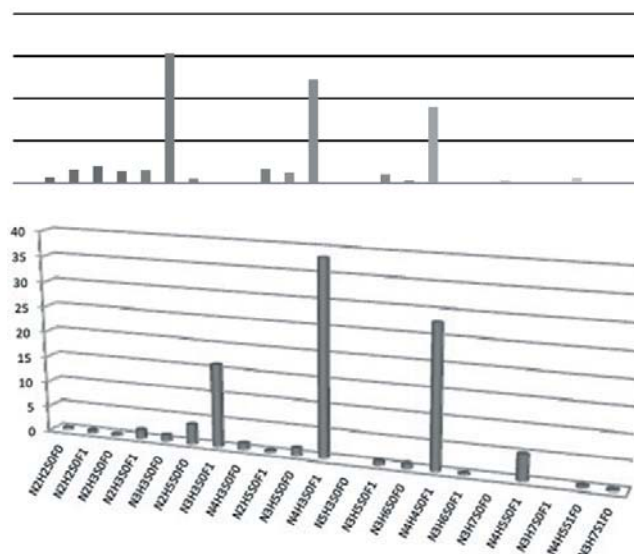


5. Ábra. A CID ütközési energia hatása egy glikopeptid fragmentációs mintázatára (A [14] hivatkozás alapján).

A bemutatott HPLC-MS(MS) mérésorozat alkalmazásával monoklonális antitestek is jól vizsgálhatók. Ennek segítségével meghatároztuk egy kereskedelmi forgalomban levő, humán gyógyászati felhasználásra gyártott monoklonális antitest, az Infliximab glikozilációs mintázatát (6. ábra). A bemutatott diagram jól szemlélteti a mAb-okra jellemző négy fő glikoforma (G0F: N4H3S0F1, G1F és G1F': N4H4S0F1, G2F: N4H5S0F1) meglétét. A vizsgálati módszer érzékenységét jelzi, hogy mindezek mellett számos más, igen kis (1%-nál kisebb) mennyiségben jelenlévő variánst (glikoformát) is azonosítottunk. A glikozilációs mintázat ilyen részletes feltérképezése nemcsak a kész hatóanyag jellemzése során elengedhetetlen, de hatalmas támogatás nyújthat a technológia követésében és fejlesztésében egyaránt.

Összefoglaló

A gyógyszerkutatás rendkívül fontos új irányzata a fehérje alapú gyógyszerkészítmények kifejlesztése. Ezek



6. Ábra. Egy humán gyógyászati felhasználásra előállított monoklonális antitest, az Infliximab glikozilációs mintázata.

szerkezetének jellemzése és analitikája nagy kihívás, a műszeres analízis oldaláról új megoldások kialakítását követeli meg. A kutatás egyik legfontosabb eszköze a tömegspektrometria (ill. a folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria), mely a fehérjék elsődleges szerkezetének és módosításainak meghatározására alkalmas (alap)eszköz. Monoklonális antitestek (és más proteinek) gyakori módosulata a glikoziláció, melynek szerkezeti jellemzése a fehérjeanalitika egyik legnehezebb feladata. A glikoziláció meghatározására leggyakrabban tömegspektrometriás módszereket alkalmaznak. A jelen cikk a tömegspektrometrián alapuló fehérjeanalitika legfontosabb jellemzőit foglalja össze, és egy példán keresztül szemlélteti a glikozilációs mintázat meghatározásának lehetőségeit.

Referenciák

1. Aggarwal, S. *Nat Biotech* **2011**, *29*, 1083-1089.
2. An, Z. *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, in: Wiley: New York, **2009**.
3. Harris, R.; Chin, E.; Macchi, F.; Keck, R.; Shyong, B.-J.; Ling, V.; Cordoba, A.; Marian, M.; Sinclair, D.; Battersby, J.; Jones, A.S. *Analytical Characterization of Monoclonal Antibodies: Linking Structure to Function*, in: S.J. Shire, W. Gombotz, K. Bechtold-Peters, J. Andya (Eds.) *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*, Springer: New York, **2010**, pp. 193-205.
4. *Questions and Answers on biosimilar medicines* (similar biological medicinal products), EMEA, London, 22 October **2008**, Doc. Ref. EMEA/74562/2006 Rev. 1 in.
5. Dillon, T.M.; Bondarenko, P.V.; Speed Ricci, M. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1053*, 299-305.
6. Zhang, Y.; Cui, W.; Zhang, H.; Dewald, H.D.; Chen, H. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 3838-3842.
7. *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: Quality issue*; EMEA, London, 22 February **2006**, EMEA/CHMP/BWP/49348/2005, in.
8. Cooks, R.G. *Collision Spectroscopy*, in: Plenum Press: New York, **1978**.
9. McLuckey, S.A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 599-614.

10. Thorne, L.R.; Beauchamp, J.L. in: M.T. Bowers (Ed.) *Gas Phase Ion Chemistry*, Academic: New York, **1984**, pp. 41.
11. Bogdanov, B.; Smith, R.D. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 168-200.
12. Marino, K.; Bones, J.; Kattla, J.J.; Rudd, P.M. *Nature Chemical Biology* **2010**, *6*, 713-723.
13. European Pharmacopoeia 7.0, *Glycan Analysis of Glycoproteins*, 01/2011:20259, in.
14. Ozohanics, O.; Turiak, L.; Puerta, A.; Vekey, K.; Drahos, L. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1259*, 200-212.
15. Ozohanics, O.; Krenyacz, J.; Ludanyi, K.; Pollreisz, F.; Vekey, K.; Drahos, L. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, *22*, 3245-3254.