

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Top-down, middle-up a bottom-up RPLC
analýzy biofarmaceutik pomocí jedné kolony**

Bc. Ondřej Hývnar

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové.....

Podpis.....

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu mé diplomové práce PharmDr. Juraji Lenčovi, Ph.D. za ochotu, odborné rady, konzultace, trpělivost a podporu při zpracování mé práce. Rád bych také poděkoval všem pracovníkům katedry analytické chemie za pomoc a vstřícné jednání.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Ondřej Hývnar

Školitel: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D.

Název diplomové práce: Top-down, middle-up a bottom-up RPLC analýzy biofarmaceutik pomocí jedné kolony

V současné době jsou pro top-down, middle-up i bottom-up analýzy biofarmaceutik pomocí kapalinové chromatografie potřeba různé kolony. Hlavním cílem této práce bylo zjistit, jestli je možné použít na všechny tyto typy analýz novou kolonu BioResolve RP mAb Polyphenyl firmy Waters, určenou primárně k top-down a middle-up analýzám. Analyzovány byly biofarmaceutika trastuzumab, bevacizumab, panitumumab a aflibercept a to jako intaktní pro top-down analýzy, redukované, štěpené proteázou IdeS, štěpené proteázou IdeS a redukované pro middle-up analýzy a štěpené endopeptidázou Lys-C a trypsinem pro bottom-up analýzy. Top-down a middle-up analýzy byly provedeny na kapalinovou chromatografií s UV detekcí. Ověřovali jsme při nich schopnost kolony analyzovat takto připravené biofarmaceutika v našich podmínkách. Zjistili jsme, že přestože si kolona dokáže poradit i s intaktními biofarmaceutiky, tak lepší výsledky podává při middle-up analýzách. Bottom-up analýzy byly provedeny kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií a zde byla kolona BioResolve porovnávána s kolonou Acquity UPLC CSH C₁₈, která byla vyvinuta pro bottom-up analýzy proteinů. Přestože kolona Acquity podávala lepší výsledky, můžeme z výsledků říct, že kolona BioResolve je vhodná i pro bottom-up analýzy. V poslední části práce jsme se pokoušeli sjednotit mobilní fáze tak, aby bylo možné provádět top-down, middle-up a bottom-up analýzy s jedním systémem mobilních fází. Zjistili jsme, že přidáním 10 % 1-butanolu do složky B mobilní fáze okyselené 0,1% FA získáme systém mobilních fází vhodný pro top-down, middle-up i bottom-up analýzy kompatibilní s MS.

Klíčová slova: Proteomická analýza, biofarmaceutika, peptidy, LC-UV, LC-MS, reverzní fáze

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Ondřej Hývnar

Supervisor: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D.

Title of diploma thesis: Top-down, middle-up and bottom-up RPLC analyses of biopharmaceuticals using a single column

Nowadays, different columns are needed for top-down, middle-up and bottom-up analyses of biopharmaceuticals using liquid chromatography. The aim of this thesis was to determine whether it is possible to use for all these types analyses a new column BioResolve RP mAb Polyphenyl of the company Waters, intended mainly for top-down and middle-up analyses. The biopharmaceuticals trastuzumab, bevacizumab, panitumumab and aflibercept were analyzed as intact for top-down analysis, reduced, cleaved by IdeS protease, cleaved by IdeS protease and reduced for middle-up analysis and cleaved by endopeptidase Lys-C and trypsin for bottom-up analysis. Top-down and middle-up analyses were performed using liquid chromatography with UV detection. We verified the ability of the column to analyze biopharmaceuticals prepared this way in our conditions. We found that although the column can handle intact biopharmaceuticals, it gives better results in middle-up analyses. Bottom-up analyzes were performed using liquid chromatography coupled with mass spectrometry, where the BioResolve column was compared to Acquity UPLC CSH C₁₈ column developed for bottom-up analyses of proteins. Although the Acquity column gave better results, we can conclude from the results that the BioResolve column is also suitable for bottom-up analyzes. In the last part of this thesis, we tried to unify the mobile phases so that it is possible to perform top-down, middle-up and bottom-up analyses with one system of mobile phases. We found that by adding 10% 1-butanol to component B of the mobile phase acidified with 0.1% FA, we obtain a mobile phase system suitable for top-down, middle-up and bottom-up analyzes compatible with MS.

Keywords: Proteomic analysis, biopharmaceuticals, peptides, LC-UV, LC-MS, reverse phase

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. CÍL PRÁCE.....	10
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
3.1 Proteiny a peptidy.....	11
3.1.1 Struktura proteinů.....	11
3.1.2 Posttranslační modifikace	15
3.2 Monoklonální protilátky.....	17
3.2.1 Stavba protilátek	17
3.2.2 Výroba monoklonálních protilátek	18
3.2.3 Monoklonální protilátky schválené pro léčbu onkologických onemocnění....	20
3.3 Metody analýzy terapeutických monoklonálních protilátek	23
3.3.1 Chromatografie na reverzní fázi.....	23
3.3.2 Hydrofilní interakční chromatografie.....	24
3.3.3 Iontově-výměnná chromatografie	24
3.3.4 Vylučovací chromatografie	25
3.3.5 Detektory	26
3.3.6 RPLC-MS analýza monoklonálních protilátek.....	28
3.4 Hmotnostní spektrometrie	29
3.4.1 Ionizační techniky.....	29
3.4.2 Hmotnostní analyzátoary	30
4. PPRAKTICKÁ ČÁST.....	33
4.1 Materiál.....	33
4.1.1 Chemikálie.....	33
4.1.2 Přístroje	33
4.1.3 Kolony.....	34
4.2 Experimentální část.....	34
4.2.1 Příprava mobilních fází.....	34
4.2.2 Příprava vzorků.....	35
4.2.3 Parametry LC analýzy na systému Dionex UltiMate RSLC 3000.....	36
4.2.4 Parametry LC-MS analýzy.....	37

4.2.5	Softwarová analýza LC-MS dat.....	39
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	40
5.1	Ověření účinnosti kolony BioResolve při top-down a middle-up analýzách.....	40
5.1.1	Top-down analýza biofarmaceutik.....	40
5.1.2	Middle-up analýza biofarmaceutik	42
5.2	Ověření schopností kolony při bottom-up analýzách	46
5.2.1	LC-MS analýza biofarmaceutik štěpených endopeptidázou Lys-C.....	46
5.2.2	LC-MS analýza biofarmaceutik štěpených trypsinem	50
5.3	Top-down a middle-up analýzy s mobilními fázemi bez TFA.....	54
5.3.1	Top-down analýzy biofarmaceutik.....	55
5.3.2	Middle-up analýza biofarmaceutik	56
6.	ZÁVĚR	62
7.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	63
8.	SEZNAM TABULEK	65
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ	66
10.	POUŽITÁ LETERATURA.....	68

1. ÚVOD

Díky jejich vysoké terapeutické účinnosti a malým vedlejším účinkům jsou terapeutické monoklonální protilátky dnes již široce přijímány jako cenné možnosti léčby pro onkologické, hematologické, dermatologické a revmatologické [1][2]. V současné době je schváleno Food and Drug Administration v USA a Evropskou agenturou pro léčivé přípravky v EU více než 80 terapeutických monoklonálních protilátek. Terapeutické mAb jsou velmi heterogenní skupinou léčiv, protože jsou produkovány biologicky z kultivovaných buněk. Během procesu výroby se analyzuje jejich heterogenita, produkce agregátů a multimerů. Analýza terapeutických monoklonálních protilátek je nezbytná pro předklinický farmakokinetický výzkum a toxikokinetickou analýzu při vývoji léků. Tyto analýzy představují výzvu, jelikož pro každý proteomický přístup (top-down, middle-up nebo bottom-up) je potřeba jiné kolony, aby separace měla dostatečné rozlišení.

V této diplomové práci ověřujeme, zdali je možné provést všechny analýzy na jedné koloně. Jedná se o kolonu BioResolve RP mAb Polyphenyl firmy Waters, která je určena především na analýzu intaktních monoklonálních protilátek a jejich řetězců. Kolona obsahuje povrchově porézní částice o velikosti 2,7 μm . Na rozdíl od jiných kolon určených pro separaci na reverzní fázi využívajících nejčastěji stacionární fáze s C18, využívá kolona BioResolve částice oxidu křemičitého funkcionalizované patentovaným procesem polyfenylové vazby. V předchozích studiích bylo prokázáno, že tato kolona poskytuje lepší výsledky než klasické C18 kolony pro top-down a middle-up analýzy.

Tuto kolonu testujeme pomocí čtyř biofarmaceutik, z nichž tři jsou protilátkové a jedno je Fc-fúzní protein. Trastuzumab je humanizovaná monoklonální protilátka používaná při léčbě HER2-pozitivního karcinomu prsu a žaludku. Bevacizumab je také humanizovaná monoklonální protilátka používaná při léčbě karcinomu plic, děložního čípku, prsu a ledvin. Panitumumab je lidská monoklonální protilátka používaná k léčbě karcinomu tlustého střeva a konečníku, pokud v nádoru není přítomna mutace genu RAS. Aflibercept je Fc-fúzní protein vytvořený spojením Fc domény lidské protilátky s VEGF receptorem. Používá se při léčbě karcinomu tlustého střeva a konečníku [3].

V této práci se zaměřujeme na bottom-up analýzy těchto biofarmaceutik na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl a srovnání výsledků s kolonou Acquity CSH C18 vyvinutou právě pro tyto analýzy.

2. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, jestli se na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm, 2,1 × 150 mm vyvinuté pro separace v rámci top-down a middle-up analýz biofarmaceutik dají provádět také bottom-up analýzy. Schopnosti kolony při top-down a middle-up analýzách jsou již dostatečně popsány. Zbývalo tedy tyto schopnosti ověřit v našich podmínkách a případně zjistit jaké má kolona limity. Dalším úkolem bylo samotné ověření, jestli se tato kolona dá použít pro bottom-up LC-MS analýzy biofarmaceutika. Posledním úkolem bylo zjistit, zdali lze sjednotit mobilní fáze tak, aby bylo možné provádět všechny typy analýz, tj. top-down, middle-up a bottom-up analýzy na jedné koloně s jedním systémem mobilních fází.

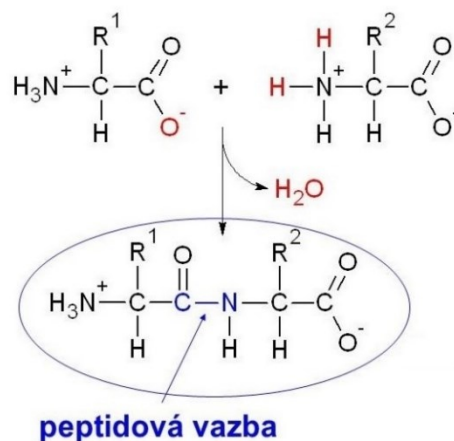
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 *Proteiny a peptidy*

Proteiny a peptidy jsou nezbytnou součástí živé hmoty, součástí většiny buněk, kde plní různé úlohy a jsou s nimi spojeny veškeré životní procesy organismu. Soubor proteinů kódovaných genomem se nazývá proteom. Věda zabývající se proteomem, proteomika, dále studuje proteinové izoformy, posttranslační modifikace, interakce mezi nimi, jejich strukturální popis a téměř vše ostatní „postgenomické“. Na rozdíl od organické chemie, kde se mezi proteinem a peptidem rozlišuje podle délky jejich molekuly, je v proteomice za peptid považován řetězec aminokyselin vzniklý štěpením proteinu bez ohledu na její délku [4].

3.1.1 **Struktura proteinů**

Základními stavebními prvky molekul peptidů a proteinů jsou aminokyseliny. Ty jsou z chemického hlediska substituční deriváty karboxylové kyseliny, přesněji aminokarboxylové sloučeniny. Jak název napovídá, aminokyselina je charakterizována karboxylovou skupinou a jednou nebo více aminovými skupinami. Pokud jsou obě skupiny připojeny k prvnímu uhlíku, jsou to α -aminokyseliny. Reakce karboxylové skupiny jedné aminokyseliny s aminovou skupinou jiné aminokyseliny vede k peptidové vazbě podle obrázku 1, což je základní princip syntézy proteinů. V přírodě existuje více než 300 aminokyselin, ale pouze 20 z nich je vázaných v proteinech prokaryotních i eukaryotních organismů. Takové aminokyseliny se označují jako kódované. Strukturně se jedná o L- α -aminokyseliny. Každá kódovaná aminokyselina má svoji mezinárodní třípísmennou a jednopísmennou zkratku. Všechny kódované aminokyseliny kromě glycinu mají v molekule chirální α -uhlík. V proteinech se vyskytují pouze L-enantiomery [5–7].

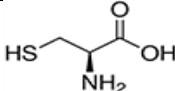
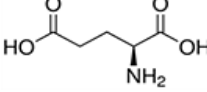
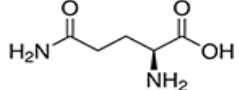
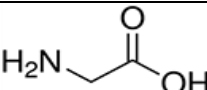
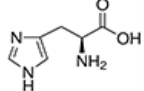
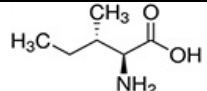
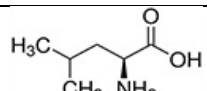
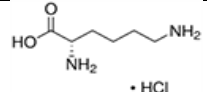
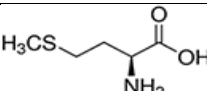
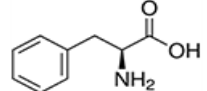
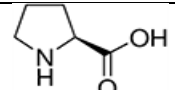
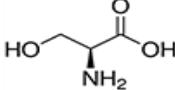
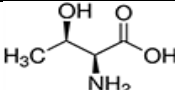
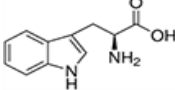
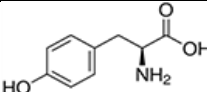
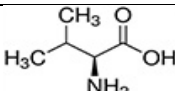


Obrázek 1: Vznik peptidové vazby (převzato z [8]).

Aminokyseliny lze dělit podle různých hledisek. Podle polaritě postranního řetězce jsou rozděleny na polární a nepolární. Nepolární aminokyseliny mají pouze uhlík a vodík v postranním řetězci, jsou hydrofobní. Naproti tomu polární aminokyseliny jsou hydrofilní a obsahují atomy kyslíku, síry nebo dusíku v postranním řetězci. Dle počtu aminoskupin a karboxylových skupin se dělí na neutrální, zásadité a kyselé. Podle produktů jejich katabolismu se dělí na ketogenní, glukogenní a smíšené. Dalším aspektem, kterým se aminokyseliny rozlišují je to, zda mohou být syntetizovány organismem či nikoli, a to na esenciální a neesenciální. Neesenciální látky mohou být syntetizovány v těle z metabolických meziproductů, takže lidské tělo nezávisí na jejich příjmu potravy, jako je tomu u esenciálních aminokyselin. Mezi esenciální aminokyseliny patří aminokyseliny s rozvětveným řetězcem. V tabulce 1 je přehledné srovnání aminokyselin, jejich kódů a struktur [5–7][9].

Tabulka 1: Přehled aminokyselin (přepřacováno dle [10]).

Název	Kód	Mw [Da]	Charakteristika	Struktura
Alanin	Ala (A)	89,10	Nepolární	
Arginin	Arg (R)	174,20	Polární, zásaditá	
Asparagin	Asn (N)	132,12	Polární	
Kys. asparagová	Asp (D)	133,11	Polární, kyselá	

Cystein	Cys (C)	121,12	Polární	
Kys. glutamová	Glu (E)	147,13	Polární, kyselá	
Glutamin	Gln (Q)	146,15	Polární	
Glycin	Gly (G)	75,07	Nepolární	
Histidin	His (H)	155,16	Polární, zásaditá	
Izoleucin	Ile (I)	131,18	Nepolární	
Leucin	Leu (L)	131,18	Nepolární	
Lysin	Lys (K)	146,19	Polární, zásaditá	
Methionin	Met (M)	149,21	Nepolární	
Fenylalanin	Phe (F)	165,19	Nepolární	
Prolin	Pro (P)	115,13	Nepolární	
Serin	Ser (S)	105,09	Polární	
Threonin	Thr (T)	119,12	Polární	
Tryptofan	Trp (W)	204,23	Nepolární	
Tyrosin	Tyr (Y)	181,19	Polární	
Valin	Val (V)	117,15	Nepolární	

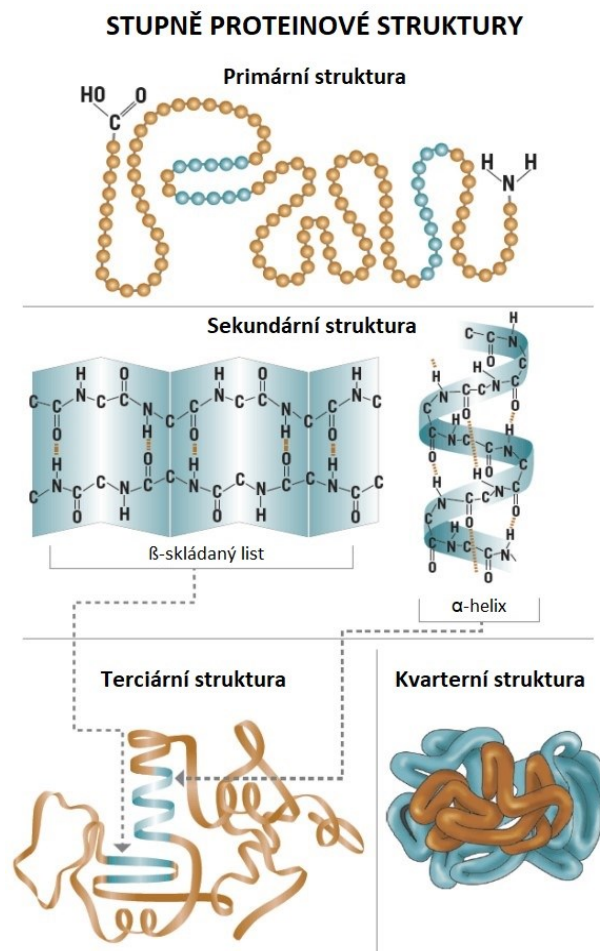
Sekvence aminokyselin v proteinu je kódována v DNA. Proteiny jsou produkovány tak, že nejprve transkripcí za použití DNA dojde k vytvoření mRNA. Ta se při translaci na ribozomech použije jako templát pro vedení syntézy řetězce aminokyselin, který tvoří protein. Zatímco aminokyselinová sekvence tvoří primární strukturu proteinu a definuje chemicko-fyzikální vlastnosti proteinu, biologické vlastnosti proteinu závisí především na sekundární a terciární struktuře [11][12].

Úseky proteinů nebo peptidů mají odlišné, charakteristické lokální strukturní konformace nebo sekundární strukturu závislé na vodíkových vazbách. Dva hlavní typy sekundární struktury jsou α -helix a β -skládaný list. α -helix je vinutý pravotočivý pramen. Substituenty postranního řetězce aminokyselinových skupin v α -helixu sahají ven. Vodíkové vazby se tvoří mezi kyslíkem každé vazby C=O ve vlákně a vodíkem každé N-H skupiny čtyři aminokyseliny pod ním ve šroubovici. Díky vodíkovým vazbám je tato struktura obzvláště stabilní. Vodíkové vazby v β -skládaném listu jsou spíše mezi řetězci než uvnitř řetězců. Listová konformace se skládá z párů řetězců ležících vedle sebe. Karbonylové kyslíky v jednom řetězci se váží s amino vodíky sousedního řetězce. Tyto dva řetězce mohou být buď paralelní nebo antiparalelní v závislosti na tom, zda jsou směry vláken (N-konec k C-konci) stejné nebo opačné. Antiparalelní β -skládaný list je stabilnější díky lépe vyrovnaným vodíkovým vazbám [11][12].

Celkový trojrozměrný tvar molekuly proteinu se nazývá terciární struktura. Molekula proteinu seposkládá tak, aby bylo dosaženo maximální stability nebo stavu s nejnižší energií. Trojrozměrný tvar proteinu je vytvářen mnoha stabilizačními silami v důsledku vazebných interakcí mezi skupinami postranních řetězců aminokyselin. Za fyziologických podmínek mají hydrofobní postranní řetězce neutrálních nepolárních aminokyselin, jako je fenylalanin nebo isoleucin, tendenci být ukryté uvnitř molekuly proteinu, čímž je chráněno před vodným prostředím. Alkylové skupiny alaninu, valinu, leucinu a isoleucinu často vytvářejí mezi sebou hydrofobní interakce, zatímco aromatické skupiny, jako jsou fenylalanin a tyrosin, se často skládají dohromady. Tvorba disulfidových můstků oxidací thiolových skupin na cysteinu je důležitým aspektem stabilizace terciární struktury proteinu, což umožňuje kovalentně držet pohromadě různé části proteinového řetězce. Kromě toho se mohou tvořit vodíkové vazby mezi různými skupinami postranních řetězců. Stejně jako u disulfidových můstků mohou tyto vodíkové vazby spojit dvě části

řetězce, které jsou v určité vzdálenosti od sebe, pokud jde o sekvenci. Solné můstky a iontové interakce mezi pozitivně a negativně nabitými místy na aminokyselinových postranních řetězcích také pomáhají stabilizovat terciární strukturu proteinu [11][12].

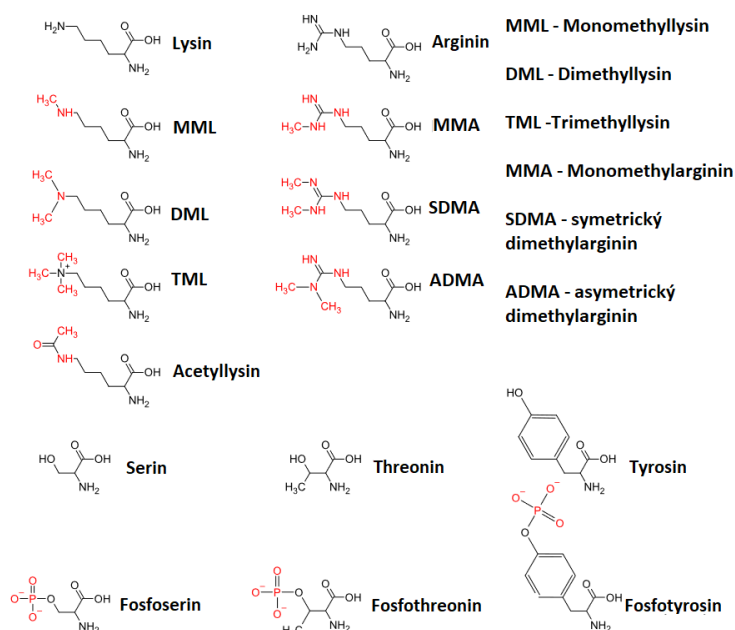
Mnoho proteinů je tvořeno několika polypeptidovými řetězci, často označovanými jako proteinové podjednotky. Tyto podjednotky mohou být stejné (homodimery), nebo odlišné (heterodimery). Kvarterní struktura odkazuje na to, jak tyto proteinové podjednotky interagují navzájem a uspořádávají se tak, aby vytvořily větší agregovaný proteinový komplex. Konečný tvar proteinového komplexu je opět stabilizován různými interakcemi, včetně vodíkových vazeb, disulfidových můstků a solných můstků. Všechny stupně proteinové struktury jsou zobrazeny v obrázku 2 [11][12].



Obrázek 2: Stupně proteinové struktury (převzato z [13]).

3.1.2 Posttranslační modifikace

Posttranslační modifikace (PTM z angl. Post-translational Modifications) proteinů zahrnují kovalentní modifikaci postranních řetězců aminokyselin nebo N- a C- konců proteinu. Existují dva hlavní typy PTM. První zahrnuje enzymatické kovalentní přidání malých molekul (např. fosfátové skupiny při fosforylaci) nebo polypeptidu (např. ubikvitinu při ubikvitinaci) k aminokyselinám, zatímco druhá zahrnuje proteolytické štěpení polypeptidového řetězce. Mezi nejběžnější typy přidávání PTM patří fosforylace, acetylace, methylace, ubikvitinace a glykosylace (obrázek 3) z více než 450 různých typů PTM dokumentovaných v databázi Uniprot [14].



Obrázek 3: Chemické struktury částých PTM (převzato z [15]).

Existuje mnoho biologických funkcí posttranslačních modifikací. Jedním ze způsobů, kterým přidání PTM reguluje aktivitu proteinu je změna konformace cílového proteinu. Tato funkce je dobře zdokumentovaná pro fosforylaci. Další posttranslační modifikace působí jako subcelulární lokalizační signál (např. fosforylace, methylace, ubikvitinace), zatímco modifikace mastných kyselin lze použít k ukotvení proteinu k membránám. Modifikace mohou také ovlivnit poločas rozpadu proteinu. Například polyubikvitinace proteinu jej může označit pro degradaci cestou ubikvitin-proteazom, zatímco N-terminální modifikace jsou dobře známy pro regulaci stability proteinu. Přítomnost PTM může také ovlivnit skládání a rozpustnost proteinu [16–20].

3.2 Monoklonální protilátky

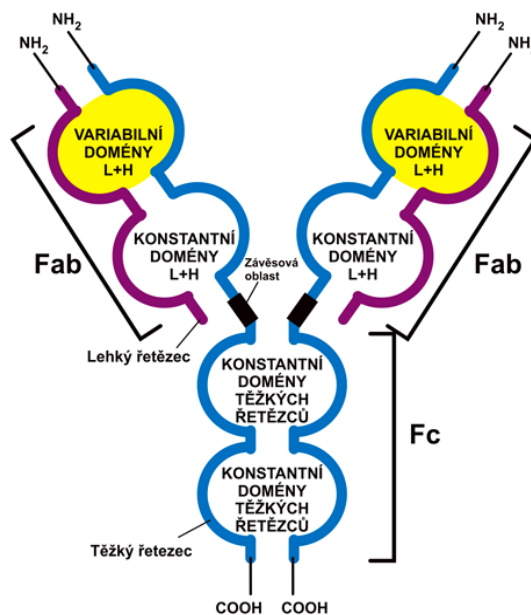
Monoklonální protilátky jsou produkovány B buňkami. Technika hybridomů zavedená Köhlerem a Milsteinem v roce 1975 umožnila získat čisté mAb (z angl. Monoclonal Antibody) ve velkém množství, což značně zvýšilo základní výzkum a potenciál pro jejich klinické použití. Další vědecký a technologický pokrok umožnil také úspěšný přenos mAb na terapii. Je zřejmý rostoucí význam terapeutických mAb, protože mAb se za posledních 25 let staly převládající modalitou léčby různých onemocnění. Během této doby díky zásadnímu technologickému pokroku byl objev a vývoj terapeutických mAb rychlejší a efektivnější. Od roku 2008 bylo schváleno 48 nových mAb, což na konci roku 2017 podle americké FDA (z angl. Food and Drug Administration) přispívá k celkovému celosvětovému trhu 61 mAb v klinickém použití [21].

3.2.1 Stavba protilátek

Lidské imunoglobuliny jsou proteiny ve tvaru „Y“ složené ze dvou identických lehkých řetězců a dvou identických těžkých řetězců. V přirozených systémech se spárovaný jeden lehký řetězec s jedním těžkým řetězcem spojuje s jiným identickým heterodimerem za vzniku intaktního imunoglobulinu. Lehký a těžký řetězec heterodimeru a dva těžké řetězce heterodimeru jsou spojeny disulfidickými můstky. Lidské lehké řetězce mohou být jednou ze dvou funkčně podobných tříd, κ nebo λ . Obě třídy lehkého řetězce mají dvě domény, konstantní doménu a variabilní doménu. Ve srovnání těžké řetězce lidské protilátky mohou být jedním z pěti izotypů, IgA, IgD, IgE, IgG a IgM, z nichž každý má nezávislou roli v adaptivním imunitním systému. IgA, IgD a IgG mají tři konstantní a jednu variabilní doménu. IgE a IgM mají jednu variabilní a čtyři konstantní domény. Izotypy IgA a IgM mají navíc další J-řetězec, který umožňuje tvorbu dimerů a pentamerů. Ostatní izotypy jsou monomerní [22].

Intaktní molekula protilátky ukázaná na obrázku 4 má tři funkční složky. Dva Fab-fragments a Fc-fragment, přičemž dva Fab jsou spojeny s Fc závěsovou oblastí, která umožňuje Fab velký stupeň konformační flexibility vzhledem k Fc. Oba Fab mají identická vazebná místa pro vazbu na specifický cílový antigen. Dvojice Fab se skládá z dvojice variabilních domén lehkého a těžkého řetězce. Naproti tomu glykosylovaná Fc oblast se váže na různé receptorové molekuly a poskytuje profil efektorové funkce, který

určuje, jak protilátka interaguje s jinými složkami adaptivního a humorálního imunitního systému [23].



Obrázek 4: Struktura molekuly imunoglobulinu (převzato z [24]).

3.2.2 Výroba monoklonálních protilátek

Milstein a Köhler vyvinuli první techniku pro stabilní produkci monoklonálních protilátek v roce 1975. Tato technika spočívá ve vytvoření hybridomu, stabilní hybridní buňky schopné produkovat jeden typ protilátky proti specifickému epitopu přítomnému v antigenu. Tato technika spočívá v odebrání skupiny aktivovaných B lymfocytů z imunizované myši sleziny a jejich kombinaci s imortalizovanými myelomovými buňkami, které nejsou schopné produkovat enzym hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferázu (HGPRT z angl. hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase), důležitý enzym přítomný v záchranné cestě, což je jedna z odpovědných cest pro výrobu nukleotidů. Pro selekci hybridomových buněk se soubor buněk vzniklých fúzí (směs hybridomových buněk a nefúzovaných B lymfocytů a myelomových buněk) kultivuje v selektivním médiu obsahujícím aminopterin, který inhibuje syntézu nukleotidů *de novo*. Myelomové buňky postrádají záchrannou cestu pro produkci nukleotidů. Když jsou vystaveny aminopterinu přítomnému v selektivním médiu, je blokována také syntéza *de novo* a ve výsledku nejsou myelomové buňky dlouhodobě aktivní. Naproti tomu nefúzované aktivované B lymfocyty mohou přežít,

protože jejich záchranná cesta funguje perfektně a mohou pokračovat v produkci nukleotidů, i když je *de novo* cesta blokována aminopterinem. Tyto buňky však nejsou zvětšeny a mohou se replikovat jen omezeně které nakonec zemřou. S ohledem na tuto skutečnost mohou pouze buňky schopné neomezené replikace a syntézy nukleotidů záchrannou cestou přežít prostřednictvím podmínek výběru a tyto buňky jsou hybridomy. Takto vyrobené monoklonální protilátky ale po několika aplikacích spustí lidskou protimyšší protilátkovou odpověď [25][26].

Velké zlepšení produkce monoklonálních protilátek přišlo s vývojem knihoven fágových displejů. Tato metodika pomáhá zkoumat interakce mezi molekulami (protein-protein, protein-peptid a protein-DNA) a v zásadě spočívá v klonování genů kódujících oblast Fab amplifikovaných z B lymfocytů do bakteriofágových plazmidových vektorů. Pak může být bakterie transformována s těmito vektory, čímž dojde k expresi heterologních genů z virové kapsidy. Tato kapsida obsahuje virové proteiny a proteiny kódované sekvencí Fab přijatou touto konkrétní buňkou. Jakmile je knihovna úplná, může být afinita mezi proteiny produkovanými z různých Fab oblastí testována proti požadovanému antigenu a buňka transformovaná plazmidem obsahující tyto geny, může být snadno sekvenována. Výhody této metodiky jsou následující: stejná knihovna má potenciál generovat velké množství nových protilátek, jedná se o proces *in vitro*, takže nevyžaduje kroky imunizace zvířat, a proto lze testovat toxické antigeny. Lze také testovat větší rozmanitost antigenů a rychle získat molekuly protilátek [27][28].

Při výrobě monoklonálních protilátek, ať už extrakcí z tkáně živočichů nebo technikami rekombinantní DNA, vzniká vysoká variabilita konečného produktu. Aby bylo možno mezi nimi rozlišovat, první verze takto vyrobeného léčiva je určena jako referenční. Následující verze jsou označovány anglickým slovem „biosimilars“ a mohou se lišit posttranslačními modifikacemi nebo výrobním procesem. Další výraz používaný v souvislosti s monoklonálními protilátkami je „biobetter“. Označuje molekuly modifikované tak, aby měly lepší farmakologické účinky jako například vyšší aktivitu, lepší stabilitu, méně vedlejších účinků nebo nižší imunogenicitu [29][30].

3.2.3 Monoklonální protilátky schválené pro léčbu onkologických onemocnění

K roku 2020 bylo americkou FDA schváleno 35 monoklonálních protilátek indikovaných k léčbě hematologických, kožních nebo solidních nádorových malignit. U schválených monoklonálních protilátek používaných při léčbě onkologických onemocnění byla prokázána nebo navržena kombinace různých způsobů působení. Molekulární mechanismy, kterých se to týká, jsou zejména: přímý cytotoxický účinek proti rakovinovým buňkám, inhibiční účinek na promotogenní signální dráhy a imunomodulační účinky vedoucí k nepřímé destrukci rakovinných buněk. V tabulce 2 je přehled monoklonálních protilátek schválených FDA pro léčbu onkologických onemocnění, jejich cílový antigen a indikace. [31]

Tabulka 2: Přehled schválených monoklonálních protilátek pro léčbu onkologických onemocnění k roku 2020 (převzato z [32]).

Název protilátky	Cílový antigen	Indikace
Atezolizumab	PD-L1	Rakovina močového měchýře, nemalobuněčný karcinom plic, triple negativní karcinom prsu
Avelumab	PD-L1	Uroteliální karcinom, karcinom z Merkelových buněk
Bevacizumab	VEGF	Kolorektální, rektální, ovariální karcinomy, glioblastom
Cemiplimab	PD-1	Kožní spinocelulární karcinom
Cetuximab	EGFR	Kolorektální karcinom, kožní spinocelulární karcinom hlavy a krku
Daratumumab	CD38	Mnohočetný myelom
Dinutuximab	GD2	Neuroblastom
Durvalumab	PD-L1	Rakovina močového měchýře
Elotuzumab	SLAMF7	Mnohočetný myelom
Ipilimumab	CTLA-4	Mnohočetný myelom, karcinom ledviny
Isatuximab	CD38	Mnohočetný myelom
Mogamulizumab	CCR4	Kožní T-lymfomy
Necitumumab	EGFR	Nemalobuněčný karcinom plic
Nivolumab	PD-1	Melanom, rakovina plic a ledvin
Obinutuzumab	CD20	Chronická lymfatická leukemie
Ofatumumab	CD20	Chronická lymfatická leukemie
Olaratumab	PDGFR	Sarkom
Panitumumab	EGFR	Kolorektální karcinom
Pembrolizumab	PD-1	Melanom
Pertuzumab	HER2	Rakovina prsu

Ramucirumab	VEGFR2	Rakovina žaludku
Rituximab	CD20	B-lymfom
Trastuzumab	HER2	Rakovina prsu
Gemtuzumab ozogamicin	CD33	Akutní myeloidní leukemie
Brentuximab vedotin	CD30	Hodkinův lymfom, anaplastický velkobuněčný lymfom
Trastuzumab emtansine	HER2	Rakovina prsu
Inotuzumab ozogamicin	CD22	Akutní lymfoblastická leukemie
Polatuzumab vedotin	CD79B	B-lymfom
Enfortumab vedotin	Nectin-4	Rakovina močového měchýře
Trastuzumab deruxtecan	HER2	Rakovina prsu
Sacituzumab govitecan	TROP2	Triple negativní rakovina prsu
Moxetumomab pasudotox	CD22	Vlasatobuněčná leukemie
Ibritumomab tiuxetan	CD20	Nehodgkinský lymfom
Iodine tositumomab	CD20	Nehodgkinský lymfom
Blinatumomab	CD19, CD3	Akutní lymfoblastická leukemie

Podle názvu jednoduše rozeznáme cílový antigen či cílové onemocnění a původ terapeutických monoklonálních protilátek. První slabikou je unikátní předpona identifikující konkrétní produkt. Následující slabika charakterizuje protilátku podle jejího cílového antigenu či onemocnění a slabika následující identifikuje její původ. Podle přípony -mab můžeme rozeznat protilátky od jiných léčiv. Přehled nomenklatury pro protilátky proti onkologickým onemocněním je v tabulce 3. V roce 2017 byla vydána nová nomenklatura vypouštějící slabiku identifikující původ. Přehled nové nomenklatury je v tabulce 4 [33].

Tabulka 3: Přehled původní nomenklatury pro terapeutické protilátky proti onkologickým onemocněním (převzato z [33]).

Cílové onemocnění		Původ	
-me(l)-	Melanom	-o-	Myš
-pr(o)-	Prostata	-a-	Potkan
-tu(m)-	Různé tumory	-axo-	Hybrid myši a potkana
-co(l)-	Tlusté střevo	-e-	Křeček
-go(t)-	Varlata	-i-	Primát
go(v)-	Vaječníky	-zu-	Humanizované
-ma(r)-	Prsa	-u-	Lidské
		-xi-	Chimerické

Tabulka 4: Přehled nové nomenklatury terapeutických monoklonálních protilátek (převzato z [33]).

Cílové onemocnění	
-ami-	Amyloidóza
-ba-	Bakteriální
-ci-	Kardiovaskulární
-de-	Metabolické a endokrinní cesty a cíle
-fung-	Plísňové
-gros-	Růstové faktory a receptory kosterního svalstva
-ki-	Interleukin
-li-	Imunomodulující
-ne-	Nervové
-os-	Kosti
-ta-	Tumory
-toxin-	Toxin
-vet-	Pro veterinární užití
-vi-	Virus

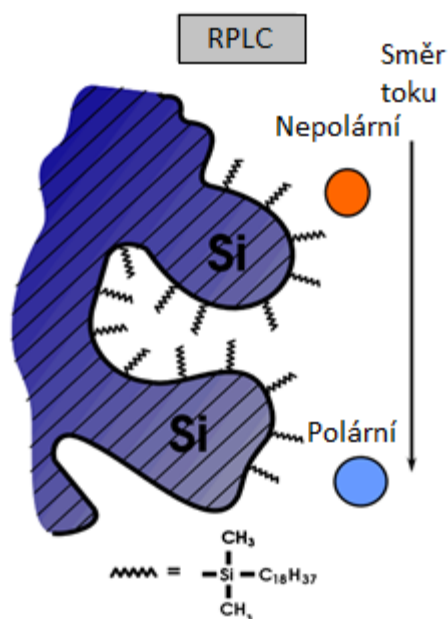
3.3 Metody analýzy terapeutických monoklonálních protilátek

Mezi nejdůležitější metody analýzy monoklonálních protilátek patří kapalinová chromatografie. Jedná se o separační techniku prováděnou mezi dvěma fázemi – pevnou fází a kapalnou fází. Vzorek je rozdělen na základní složky interakcemi (např. rozdělením, adsorpcí) mezi analytem unášeným mobilní fází (tekoucí kapalina) a pevnou stacionární fází (sorbenty uvnitř kolony). Mobilní fází může být například organické rozpouštědlo, jako je hexan. Stacionární fází mohou být porézní částice oxidu křemičitého naplněné do kolony. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC z angl. High Performance Liquid Chromatography) je moderní forma kapalinové chromatografie (LC z angl. Liquid Chromatography), která používá kolony s malými částicemi (3–5 μm), kterými je mobilní fáze čerpána pod vysokým tlakem. Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC z angl. Ultra-high Performance Liquid chromatography) využívá kolony naplněné ještě menšími částicemi (<2 μm) a je schopna provádět separace rychleji a vyšším rozlišením. Nevýhodou UHPLC je velmi vysoký zpětný tlak, kvůli kterému je potřeba specializovaného UHPLC systému [34].

3.3.1 Chromatografie na reverzní fází

Separace v tomto módu je založena na rozdělovacích koeficientech analytů mezi polární mobilní fází a hydrofobní (nepolární) stacionární fází. První stacionární fáze byly pevné částice potažené nepolárními kapalinami. Ty byly rychle nahrazeny trvale kovalentně vázanými hydrofobními skupinami, jako jsou oktadecylové (C18) skupiny vázané na nosiči oxidu křemičitého. Zjednodušený schematický pohled na chromatografii na reverzní fází (RPLC z angl. Reverse Phase Liquid Chromatography) je znázorněn na obrázku 6, kde polární analyty eluují jako první, zatímco nepolární analyty eluují později díky silnější interakci s hydrofobními skupinami C18, které tvoří vrstvu „kapaliny“ kolem opory oxidu křemičitého. RPLC typicky používá směs methanolu nebo acetonitrilu s vodou. Mechanismus separace se připisuje hlavně hydrofobní interakci. RPLC je nejoblíbenější režim HPLC a používá se ve více než 70 % všech analýz HPLC. Je vhodný pro analýzu polárních, středně polárních a některých nepolárních analytů. RPLC se často používá při analýzách čistoty nebo v testech indikujících stabilitu, protože slabé disperzní

síly odpovědné za zadržování analytů dávají jistotu, že všechny složky vzorku jsou eluovány z kolony [34][35][37][38].



Obrázek 5: Schéma separace v módu RPLC (převzato z [34]).

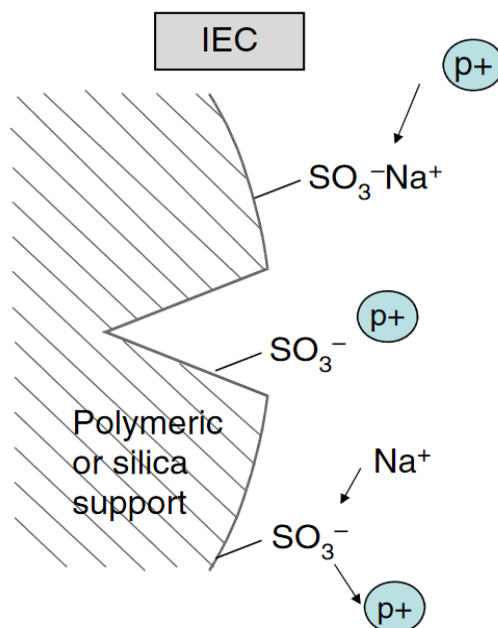
3.3.2 Hydrofilní interakční chromatografie

Základní charakteristikou separací HILIC (z angl. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) jsou vlastnosti rozdělení, adsorpce a případně elektrostatické interakce, přičemž poslední dvě závisí na zvolené stacionární fázi. Stacionární fáze HILIC jsou materiály s velmi polárními povrchy (např. klasické částice oxidu křemičitého) nebo s chemicky vázanými polárními funkčními skupinami. Společným znakem všech stacionárních fází je schopnost tvořit vrstvu vody na povrchu částic pomocí adsorpce. Hydrofilní složky se poté zadržují na HILIC fázích především proto, že se přednostně hromadí ve vytvořené vodní vrstvě. Hydrofobnější analyty k tomu nejsou nuceny, takže se eluují dříve. V této vodní vrstvě mohou analyty vytvářet polární nekovalentní interakce s funkčními skupinami povrchu částic [39].

3.3.3 Ionově-výměnná chromatografie

V ionově-výměnné chromatografii (IEC z angl. Ion Exchange Chromatography) je separační princip založen na výměně iontových analytů s protiionty skupin připojených k pevnému nosiči (obrázek 7). Typickými stacionárními fázemi jsou kationtové výměnné

(sulfonátové) nebo aniontové výměnné (kvartérní amoniové) skupiny vázané na polymerní nebo silikové materiály (Polymeric or silica support v obrázku 7). Mobilní fáze se skládají z pufrů, často se zvyšující se iontovou silou (např. koncentrované NaCl), aby se vynutila migrace analytů. Běžnými aplikacemi jsou analýzy iontových a biologických složek, jako jsou aminokyseliny, proteiny/peptidy a polynukleotidy [34][36].

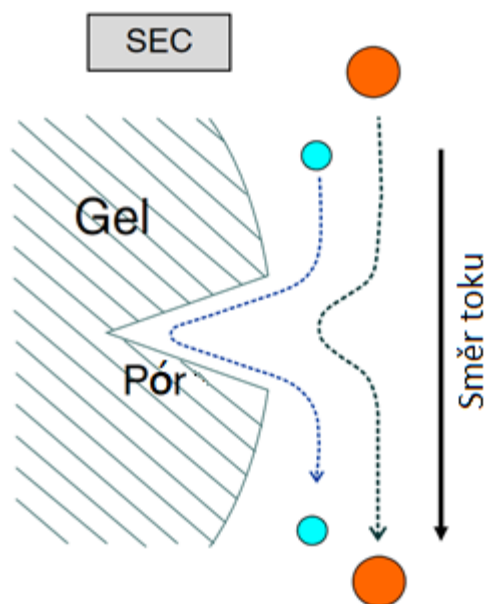


Obrázek 6: Schéma separace v módu IEC (převzato z [34]).

3.3.4 Vylučovací chromatografie

Vylučovací chromatografie (SEC z angl. Size Exclusion Chromatography) je separační režim založený pouze na molekulární velikosti analytu. Obrázek 8 ukazuje, že velká molekula je vyloučena z pórů a rychle migruje, zatímco malá molekula může pronikat všemi vnitřními póry a migrovat pomaleji po koloně. Při stanovení molekulových hmotností organických polymerů se touto módou říká gelová permeační chromatografie (GPC z angl. Gel Permeation Chromatography) a gelová filtrační chromatografie (GFC z angl. Gel Filtration Chromatography), pokud se používá při separaci ve vodě rozpustných biologických sloučenin. V GPC módu je kolona naplněna zesítěnými polystyrenovými kuličkami s kontrolovanou velikostí pórů a eluována mobilními fázemi, jako je toluen nebo tetrahydrofuran. Typická je detekce pomocí indexu lomu nebo UV detektoru. SEC je technika s nízkým rozlišením, při které by měly

být vyloučeny všechny interakce mezi analytem a stacionární fází kromě vyloučení velikosti [40].



Obrázek 7: Schéma separace v módu SEC (převzato z [34]).

3.3.5 Detektory

Detektory u HPLC měří koncentraci eluujících analytů sledováním jedné z jejich inherentních fyzikálně-chemických vlastností, jako je absorpance v UV (z angl. Ultraviolet) oblasti elektromagnetického záření. Detektor může být univerzální a reagovat na všechny analyty nebo specifický pro konkrétní třídy analytů. Nejčastější detektory a jejich atributy jsou uvedeny v tabulce 3. První HPLC detektory byly spektrometry vybavené malými průtokovými celami, zatímco moderní UV detektory jsou navrženy přímo pro HPLC [36][41][44].

Tabulka 5: Přehled HPLC detektorů (převzato z [34]).

Detektor	Vlastnosti	Senzitivita
UV/Vis	Specifický: Sloučeniny s UV chromofory	ng–pg
PDA	Specifický: Stejný jako UV/Vis detektor, navíc poskytuje UV spektra	ng–pg
FLD	Velmi specifický: Sloučeniny s nativní fluorescencí nebo s fluorescenčním značením	fg–pg
RID	Univerzální: polymery, sacharidy, triacylglyceridy, organické kyseliny; nekompatibilní s gradientovou analýzou	0,1–10 µg
CAD	Univerzální: netěkavé nebo částečně těkavé sloučeniny	ng
MS	Univerzální i specifické, poskytuje strukturální identifikaci	ng–pg
MS/MS	Vysoce senzitivní a specifické	pg–fg

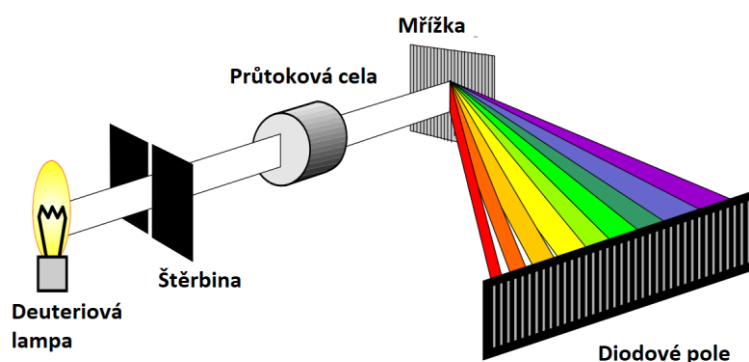
Detektor UV/Vis (z angl. Ultraviolet/Visible) býval nejběžnějším detektorem HPLC, nyní je nahrazován detektorem PDA (z angl. Photodiode-Array). Principem absorpce u UV/Vis detektoru je Lambert-Beerův zákon, kde

$$\text{Absorbance (A)} = \text{molární absorpční koeficient } (\varepsilon) \times \text{tloušťka vrstvy (d)} \times \text{koncentrace (c)}$$

Detektor UV/Vis absorbance sleduje absorpci UV nebo viditelného světla v eluentu HPLC měřením energetického poměru paprsku vzorku k paprsku referenčního paprsku. Jedná se o velmi běžný detektor, protože mnoho analytů, které nás zajímají (např. léčiva), obsahuje jednu nebo více chromoforických skupin. Detektor se skládá z deuteriové lampy, monochromátoru a malé průtokové cely. Monochromátor se skládá z mřížky, kterou lze otočit a zvolit tak konkrétní vlnovou délku. Světelný zdroj je rozdělen na paprsek pro vzorek a referenční paprsek a intenzita každého paprsku je monitorována samostatnou fotodiodou, která transformuje světelnou energii na elektronický signál. Průtokovou celou prochází pouze paprsek vzorku. Cella má typické objemy 2–10 µl a délku dráhy 10 mm s čočkami nebo okénky na obou koncích průtokové cely [34][35].

Detektor PDA známý také jako detektor diodového pole (DAD z angl. Diode-Array Detection), poskytuje UV spektra eluovaných píků a zároveň funguje jako detektor UV/Vis více vlnových délek. Díky své schopnosti zaznamenávat UV-spektra za běhu usnadňuje identifikaci píku a je preferovaným detektorem pro metody HPLC. Citlivost PDA detektoru bývala v dřívějších modelech výrazně nižší než u detektorů UV/Vis s jednou vlnovou délkou, ale v posledních letech se výrazně zlepšila. Stal se standardním

detektorem ve většině laboratoří využívajících HPLC. Obrázek 9 ukazuje schéma PDA detektoru, kde celé spektrum deuteriové lampy prochází průtokovou celou a je rozptýleno pevnou mřížkou na diodové pole, které měří intenzitu světla při každé vlnové délce. Většina PDA používá pole diod s vazbou na náboj s 512–1024 diodami, které jsou schopné spektrálního rozlišení přibližně 1 nm. Software pro spektrální vyhodnocení umožňuje zobrazit jak chromatografická, tak spektrální data všech píků ve vzorku [34][35].



Obrázek 8: Schéma PDA detektoru (převzato z [34]).

3.3.6 RPLC-MS analýza monoklonálních protilátek

RPLC analýza mAb má mnoho aplikací napříč všemi strukturálními úrovněmi, od top-down, přes middle-up k bottom-up analýzám. Výhodou je také možnost analýzy některých posttranslačních modifikací jako je například oxidace methioninu. Top-down analýza poskytuje pouze omezené informace. Redukcí a štěpením monoklonálních protilátek při middle-up RPLC-MS je možné získat velké množství informací o posttranslačních modifikacích díky změnám m/z ve spektru. Velkou výhodou middle-up analýz je kombinace relativně jednoduché přípravy vzorku s množstvím získaných dat a jednodušší interpretací těchto dat. Mezi nejčastěji používané enzymy pro tento přístup patří papain, pepsin, IdeZ a IdeS. Při bottom-up analýzách se analyzované monoklonální protilátky enzymaticky štěpí na peptidy o molekulové hmotnosti 500–5000 Da. Hlavním přínosem bottom-up analýz je ověření aminokyselinové sekvence a cílené hodnocení posttranslačních modifikací. Nevýhodou bottom-up analýz je náročnější příprava vzorku a riziko ztráty některých posttranslačních modifikací. Nejpoužívanějšími enzymy při bottom-up analýzách jsou trypsin štěpící C-konec lysinu a argininu, a endopeptidáza Lys-C štěpící C-konec lysinu [42][43].

3.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr se skládá ze zdroje iontů, hmotnostního analyzátoru a detektoru, které pracují za podmínek vysokého vakua. Základním principem hmotnostní spektrometrie (MS z angl. Mass Spectrometry) je generovat ionty ze sloučenin vhodnou metodou, separovat tyto ionty poměrem hmotnosti k náboji (m/z) a kvalitativně a kvantitativně je detekovat pomocí jejich m/z a počtu. Analyt může být ionizován např. tepelně, elektrickými poli, nárazem na energetické elektrony, ionty nebo fotony. Ionty mohou být jednotlivé ionizované atomy, shluky, molekuly nebo jejich fragmenty. Separace se provádí statickým nebo dynamickým elektrickým, magnetickým polem, nebo v případě analyzátoru doby letu, i v oblastech bez pole. [45]

3.4.1 Ionizační techniky

Hmotnostní spektrometry jsou navrženy tak, aby vytvářely ionty z neutrálních molekul, aby bylo možné je urychlit a přinutit je do řízeného pohybu s cílem dosáhnout m/z analýzy těchto iontů. Analyzátor hmotnosti jakéhokoli hmotnostního spektrometru zpracovává pouze nabitě částice, tj. ionty, které byly vytvořeny z atomů nebo molekul, příležitostně také z radikálů nebo zwitterionů. Úkolem iontového zdroje je provést tento zásadní krok a k dosažení tohoto cíle pro celou řadu analytů se používá široká škála ionizačních metod [45].

Klasickým zástupcem ionizačních technik pro analýzu velkých molekul je ionizace elektrosprejem (ESI z angl. Electrospray Ionization). ESI je technika měkké ionizace prováděné za atmosférického tlaku, která umožňuje přenos iontů z roztoku do plynné fáze. Tato technika je mimořádně užitečná pro analýzu velkých netěkavých molekul schopných nést náboj, jako jsou proteiny a polymery nukleových kyselin. Roztok analytu je veden v kovové kapiláře, na které je udržován elektrický potenciál několika kV. Roztok na konci kapiláry tvoří Taylorův kužel, který emituje jemnou mlhovinu kapiček. Tento proces je obvykle podporován koaxiálním tokem nebulizačního plynu. Počáteční kapičky mají poloměry v rozsahu mikrometrů. Kapičky emitované z Taylorova kužele podléhají rychlému odpařování rozpouštědla, často za pomoci sušícího plynu. Hustota náboje na zmenšujících se kapičkách narůstá, dokud není vyrovnáno povrchové napětí Coulombickým odpuzováním. Jakmile kapky dosáhnou tzv. Rayleighova limitu, dojde

k jejich rozpadu na menší kapičky s rozdělením jejich původních nábojů. Opakováním tohoto procesu mohou vznikat až kvazimolekulární ionty [45][46].

Dalším zástupcem ionizačních technik důležitých při analýze velkých molekul je MALDI (z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization). MALDI využívá absorpci laserového světla vrstvou pevné látky. Příjem energie při laserovém ozáření pak způsobí desorpci, a nakonec ionizaci vzorku. Pulz laserového světla je zaměřen na malé místo, které má obvykle průměr 0,05–0,2 mm. Nejčastěji používanými lasery jsou dusíkové lasery s vlnovou délkou 337 nm. Velmi důležitý je zde výběr matrice. Vybraná matrice by měla mít podobnou rozpustnost jako vzorek, silnou absorpci vlnové délky laseru a schopnost přenosu protonu. Dále nesmí reagovat se vzorkem a musí s analytem tvořit směsné krystaly o co nejmenší velikosti. Nejčastěji používaná matrice v analýze proteinů a peptidů je kyselina α -kyano-4-hydroxybenzoátová [45][47].

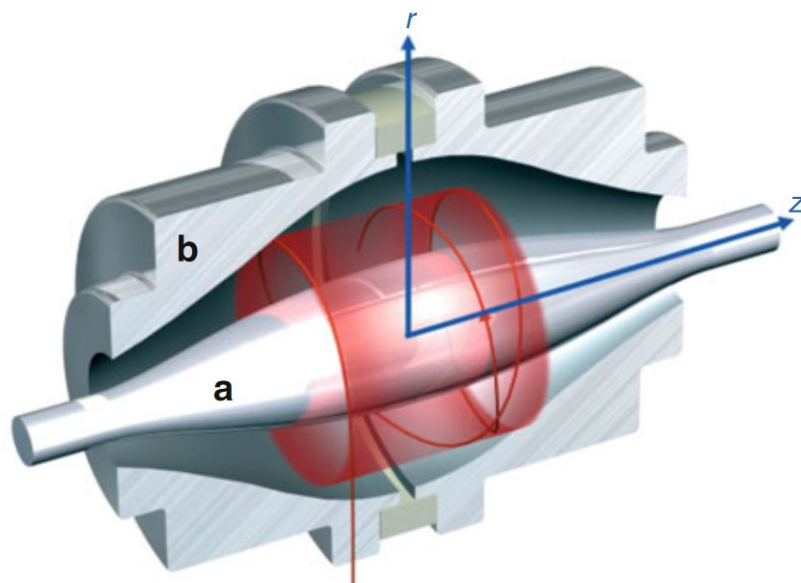
3.4.2 Hmotnostní analyzátory

Prvním hmotnostním analyzátorem je analyzátor doby letu (TOF z angl. Time-of-flight). Princip TOF je poměrně jednoduchý: ionty o různých m/z se během svého letu rozptýlí v čase po dráze známé délky. Pokud všechny ionty zahájí svou cestu současně, lehčí ionty dorazí dříve k detekci než těžší. To vyžaduje, aby vycházely ze zdroje pulzních iontů, který lze realizovat buď pulzním iontovým svazkem z kontinuálního paprsku, nebo výhodněji použitím skutečné metody pulzní ionizace (např. MALDI). Pro zvýšení rozlišovací schopnosti TOF lze použít reflektoru. Ten se skládá z řady prstencovitých elektrod se zvyšujícím se elektrickým potenciálem. Reflexní napětí je nastaveno na přibližně 1,1násobek akceleračního napětí, aby se zajistilo, že všechny ionty budou odráženy v homogenní části elektrického pole zařízení. Ionty pronikají do reflektoru, dokud nedosáhnou nulové kinetické energie a poté jsou vypuzeny z reflektoru v opačném směru. Kinetická energie opouštějících iontů zůstává nedotčena, avšak jejich letové dráhy se liší podle jejich rozdílů v kinetické energii. Ionty nesoucí více kinetické energie vletí hlouběji do reflexního pole, a tak stráví více času v reflektoru než méně energetické ionty. Reflektor tak dosahuje korekce doby letu, která podstatně zlepšuje rozlišovací schopnost analyzátoru TOF. Kromě toho reflektor poskytuje zaostření

s ohledem na úhlové šíření iontů opouštějících zdroj a koriguje jejich prostorové rozložení [48–50].

Dalším hmotnostním analyzátozem je kvadrupól. Skládá se ze čtyř hyperbolicky nebo válcovitě tvarovaných tyčových elektrod ve čtvercové konfiguraci. Dvojice protilehlých tyčí je udržována na stejném potenciálu, který se skládá ze stejnosměrné a střídavé složky. Jakmile iont vstoupí do kvadrupólové sestavy, působí na něj přitažlivá síla jedné z tyčí s opačným nábojem. Pokud je napětí na tyčích periodické, přitažlivost a odpudivost v obou směrech se budou časem střídat, protože znaménko elektrické síly se také periodicky mění v čase. Každé m/z má určitou hodnotu stejnosměrného a střídavého napětí o určité frekvenci, která zajistí stabilní trajektorii iontu kvadrupólem na detektor. Nejčastěji se kvadrupólový hmotnostní spektrometr využívá jako trojitý kvadrupól. Jde o spojení dvou kvadrupólů, mezi které je vložen hexapól nebo oktapól fungující jako kolizní cela. V tomto tandemovém uspořádání lze provádět i MS/MS analýzy [51].

Jedním ze zástupců pastových hmotnostních analyzátozů je orbitrap. Orbitrap se skládá ze tří elektrod, jak je znázorněno na obrázku 9. Vnější elektrody (b) mají tvar kalíšků obrácených k sobě které jsou elektricky izolovány tenkou mezerou zajištěnou středovým prstencem z dielektrika. Vřetenová centrální (a) elektroda drží past pohromadě a vyrovnává ji pomocí dielektrických koncových rozpěr. Když je napětí aplikováno mezi vnější a vnitřní elektrody, výsledné elektrické pole je striktně lineární podél osy, a tak oscilace v tomto směru budou čistě harmonické. Radiální složka pole současně silně přitahuje ionty k centrální elektrodě. Ionty jsou vpraveny do objemu mezi vnější a vnitřní elektrodu podél tečny prostřednictvím speciální štěrbiny s kompenzační elektrodou v jedné z vnějších elektrod. Napětím vniklé radiální elektrické pole mezi vnější a vnitřní elektrodou ohýbá trajektorii iontů směrem k vnitřní elektrodě, zatímco tangenciální rychlost vytváří protilehlou odstředivou sílu. Se správnou volbou parametrů zůstávají ionty na téměř kruhové spirále uvnitř pasti. Současně axiální elektrické pole způsobené zvláštním kónickým tvarem elektrod tlačí ionty směrem k nejširší části pasti, která iniciuje harmonické osové oscilace. Vnější elektrody se poté používají jako přijímací desky pro detekci indukovaného proudu. Hmotnostní spektrum se poté získá Fourierovou transformací signálu [53].



Obrázek 9: Schéma orbitrapu (převzato z [45]).

4. PPRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

2-chloracetamid – $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, USA)

Acetonitril – HPLC, LC-MS grade (Honeywell, USA)

Aflibercept – Zaltrap (Sanofi, Francie)

Bevacizumab – Avastin® (Roche, Švýcarsko)

Bikarbonát triethylamonný – 1M, pH 8,5 (Sigma-Aldrich, USA)

Dithiotreitol – $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, USA)

Endopeptidáza Lys-c – MS grade, (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japonsko)

FabRICATOR – IgG-degradující enzym *Streptococcus pyogenes* (GENOVIS, Švédsko)

Guanidin-hydrochlorid – 8M, pH 8,5 (Sigma-Aldrich, USA)

Pamitimumab – Vectibix (Amgen Europe B.V., Nizozemí)

Sequencing grade modified trypsin – porcine (Promega, USA)

Trastuzumab – Herceptin (Roche, Švýcarsko)

Trifluoroctová kyselina – LC-MS grade (Honeywell, USA)

TRIS HCl – molecular biology grade, pH 7,5, 1M (SERVA, Německo)

Voda – LC-MS grade (Sigma-Aldrich, USA)

4.1.2 Přístroje

UHPLC systém s DAD detektorem Dionex UltiMate RSLC 3000 – Thermo Fisher Scientific (USA).

Ze systému byly v rámci diplomové práce použity tyto moduly:

UltiMate 3000 RS Pump

UltiMate 3000 RS Autosampler

UltiMate 3000 RS Column Compartment

UltiMate 3000 RS Pump (externí pumpa)

UltiMate 3000 RS Diode Array Detector

Ovládací software: Chromeleon console

UHPLC systém Vanquish Horizon spojený s hmotnostním spektrometrem Q Exactive HF-X – Thermo Fisher Scientific (USA).

4.1.3 Kolony

Kolona s povrchově porézními částicemi:

BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm, 2,1 × 150 mm – Waters (USA)

Kolona s plně porézními částicemi:

Acquity UPLC CSH C₁₈ 130 Å, 1,7 µm, 2,1 × 150 mm – Waters (USA)

4.2 Experimentální část

4.2.1 Příprava mobilních fází

- Mobilní fáze A: H₂O + 0,1 %FA (0,1% TFA)

K přípravě 500 mL 0,1% roztoku kyseliny mravenčí (pro LC-MS) a kyseliny trifluorctové (pro LC-UV) bylo v odměrném válci odměřeno 500 mL vody a poté bylo přidáno 500 µL kyseliny mravenčí nebo trifluorctové.

- Mobilní fáze B: ACN + 0,1% FA (0,1% TFA)

K přípravě 250 mL 0,1% roztoku kyseliny mravenčí (pro LC-MS) a kyseliny trifluorctové (pro LC-UV) bylo v odměrném válci odměřeno 250 mL acetonitrilu a poté bylo přidáno 250 µL kyseliny mravenčí nebo trifluorctové.

- Mobilní fáze B: ACN + 10% butanol + 0,1% FA

K přípravě 250 mL 0,1% roztoku kyseliny mravenčí bylo v odměrném válci odměřeno 225 mL acetonitrilu, 25 mL butanolu a poté bylo přidáno 250 µL kyseliny mravenčí.

4.2.2 Příprava vzorků

4.2.2.1 Příprava intaktních protilátek

2,5 μL protilátky o koncentraci 20 mg/mL bylo smícháno se 7,5 μL 8M guanidinhydrochloridu v mikrozkuhavce. Dále byly vzorky promíchány, stočeny v centrifuze a inkubovány 10 minut při pokojové teplotě. Konečná koncentrace biofarmaceutik byla 5 mg/mL.

4.2.2.2 Příprava redukovaných protilátek

2,5 μL protilátky o koncentraci 20 mg/mL bylo smícháno se 7,5 μL 8M guanidinhydrochloridu v mikrozkuhavce. Dále byly vzorky promíchány, stočeny v centrifuze a inkubovány 10 minut při pokojové teplotě. Poté bylo naváženo 10,6 mg dithiotreitolu a rozpuštěno v 344 μL deionizované vody na koncentraci 200 mM. Ke vzorkům bylo přidáno 1,111 μL dithiotreitolu na koncentraci 20 mM a byly inkubovány 60 minut při 37 °C. Konečná koncentrace protilátek byla 4,5 mg/ml.

4.2.2.3 Příprava protilátek štěpených IdeS proteázou

5 μL protilátky o koncentraci 20 mg/mL bylo smícháno se 45 μL 50mM TRIS HCl v mikrozkuhavce. Tímto byla rekonstituována IdeS proteáza lyofilizovaná v mikrozkuhavce a inkubováno 2 hodiny při 37 °C. Konečná koncentrace byla 2 mg/mL.

4.2.2.4 Příprava protilátek štěpených IdeS proteázou a redukovaných

Z předchozí přípravy vzorku bylo odebráno 25 μL a přidáno k 75 μL 8M guanidinhydrochloridu. Dále byly vzorky promíchány, stočeny v centrifuze a inkubovány 10 minut při pokojové teplotě. Poté bylo ke vzorkům přidáno 11,111 μL 200 mM dithiotreitolu na koncentraci 20 mM a vzorky byly inkubovány 60 minut při 37 °C. Konečná koncentrace byla 0,45 mg/mL.

4.2.2.5 Příprava protilátek štěpených endopeptidázou Lys-C

5 μL protilátky o koncentraci 20 mg/mL bylo smícháno s 15 μL 8M guanidinhydrochloridu v mikrozkuhavce. Dále byly vzorky promíchány, stočeny v centrifuze

a inkubovány 10 minut při pokojové teplotě. Poté bylo ke vzorkům přidáno 2,222 µL 200 mM dithiotreitolu na koncentraci 20 mM a vzorky byly inkubovány 60 minut při 37 °C. Dále bylo naváženo 9,61 mg 2-chloracetamidu a rozpuštěno v 206 µL deionizované vody na koncentraci 500 mM, ke vzorkům bylo přidáno 2,469 µL na koncentraci 50 mM. Vzorky byly inkubovány 30 minut v temnu při pokojové teplotě. 1M bikarbonát triethylamonný byl naředěn na 50 mM přidáním 950 µL vody a bylo přidáno 95,039 µL tohoto pufu ke vzorkům tak, aby množství guanidin-hydrochloridu bylo 1 M. Nakonec bylo přidáno 10 µL endopeptidázy Lys-C o koncentraci 0,2 mg/mL a inkubováno přes noc v temnu při 37 °C. Konečná koncentrace biofarmaceutik byla 0,769 mg/mL.

4.2.2.6 Příprava protilátek štěpených trypsinem

5 µL protilátky o koncentraci 20 mg/mL bylo smícháno s 15 µL 8M guanidin-hydrochloridu v mikrozkuhavce. Dále byly vzorky promíchány, stočeny v centrifuze a inkubovány 10 minut při pokojové teplotě. Poté bylo ke vzorkům přidáno 2,222 µL 200 mM dithiotreitolu na koncentraci 20 mM a vzorky byly inkubovány 60 minut při 37 °C. Dále bylo naváženo 9,61 mg 2-chloracetamidu a rozpuštěno v 206 µL deionizované vody na koncentraci 500 mM, ke vzorkům bylo přidáno 2,469 µL na koncentraci 50 mM. Vzorky byly inkubovány 30 minut v temnu při pokojové teplotě. Bikarbonát triethylamonný byl naředěn na 50 mM přidáním 950 µL vody a bylo přidáno 34,6 µL tohoto pufu ke vzorkům tak, aby množství guanidin-hydrochloridu bylo 2 M. Dále bylo přidáno 10 µL endopeptidázy Lys-C o koncentraci 0,2 mg/mL a inkubováno 4 hodiny v temnu při 37 °C. Nakonec bylo přidáno 10 µL trypsinu o koncentraci 0,2 mg/mL a inkubováno v temnu přes noc při 37 °C. Konečná koncentrace biofarmaceutik byla 1,26 mg/mL.

4.2.3 Parametry LC analýzy na systému Dionex UltiMate RSLC 3000

Před samotným začátkem analýzy bylo provedeno promytí pump mobilní fází v poměru A (50 %): B (50 %) s průtokem 8 mL/min po dobu 120 s. Tok za pumpami byl odkloněn do odpadu, aby nedošlo překročení tlakového limitu na koloně a tím k jejímu poškození. Promytí bylo provedeno, aby se pumpy pročistily od mobilní fáze z předchozích analýz a aby se odstranily případné bubliny vzniklé při výměně mobilní fáze. Dále byl nastaven

program gradientové eluce podle tabulky 6. Následovala ekvibrace kolony pomocí mobilní fáze v poměru A (50 %): B (50 %) s průtokem 0,300 mL/min po dobu 5 min a následným nastavením průtoku na počáteční stav metody.

Tabulka 6: Program gradientové eluce pro LC-UV analýzu.

Čas (min)	Průtok (mL/min)	%A	%B
0	0,300	85	15
14	0,300	45	55
14,5	0,300	20	80
15,5	0,300	20	80
16	0,300	85	15
26	0,300	85	15

Tato metoda má 14minutové eluční okno, po kterém následuje promytí systému 80% organickou fází. Celková délka metody je 26 minut. Teplota na koloně byla nastavena na 80 °C. UV detekce probíhala při 214 nm.

4.2.4 Parametry LC-MS analýzy

Protilátky štěpené endoproteinázou Lys-C a trypsinem byly analyzovány na LC-MS přístroji v módu datově závislém sběru dat. Z důvodu vysoké koncentrace guanidin hydrochloridu ve vzorku byl použit systém rozdělující tok, který zamezil jeho přístupu do MS analyzátoru. Systém rozdělující tok byl nastaven podle tabulky 7. Pozice 1–6 znamená, že eluát z HPLC jde do odpadu. U pozice 1–2 jde eluát do MS analyzátoru.

Tabulka 7: Nastavení systému rozdělující tok.

Pozice	BioResolve mAb	Acquity UPLC CSH
1–6	0–1,5 min	0–1 min
1–2	1,5–38 min	1–38 min
1–6	38–42 min	38–42 min

Dále byl nastaven program gradientové eluce podle tabulek 8 a 9. Metody mají 30minutové eluční okno, po kterém následuje promytí systému 80% organickou fází. Celková délka obou metod byla 42 minut. Teplota kolony byla nastavena na 60 °C.

Tabulka 8: Program gradientové eluce pro LC-MS analýzu protilátek štěpených endopeptidázou Lys-C.

Čas (min)	Průtok (mL/min)	%A	%B
0	0,300	99	1
30	0,300	61	39
31	0,300	20	80
34	0,300	20	80
35,5	0,300	99	1
42	0,300	99	1

Tabulka 9: Program gradientové eluce pro LC-MS analýzu protilátek štěpených trypsinem

Čas (min)	Průtok (mL/min)	%A	%B
0	0,300	99	1
30	0,300	67	33
31	0,300	20	80
34	0,300	20	80
35,5	0,300	99	1
42	0,300	99	1

Následně byly nastaveny parametry pro hmotnostní analýzu v módu datově závislém sběru dat. Na iontovém zdroji HESI-II bylo nastavené napětí +3,5 kV. K odpařování mobilní fáze byl použit zmlžovací plyn o průtoku 25 arbitrárních jednotek a sušící plyn ohřátý na 325 °C o průtoku 10 arbitrárních jednotek. Pro oba plyny byl použit dusík. Vstupní kapilára byla vyhřáta na 275 °C.

MS spektra byla měřena v rozmezí m/z 300–2000 pro peptidy štěpené endopeptidázou LysC a m/z 300–1600 pro peptidy štěpené trypsinem s rozlišením 60 000. Maximální počet nábojů zachycených v orbitrapu byl 10 milionů a maximální čas pro dosažení tohoto množství nábojů byl 60 ms. Z těchto spekter byly izolovány prekurzory s nábojovým stavem 2^+ až 6^+ a s intenzitou přesahující 100 000, které byly podrobeny kolizně navozené fragmentaci. Izolace byla provedena pomocí kvadrupólu s izolačním oknem $2 m/z$ a posunem izolačního okna $0,3 m/z$. K fragmentaci byla použita normalizovaná kolizní energie 27 a dusík jako kolizní plyn. Fragmentační spektra byla zaznamenávána s rozlišením 15 000. Maximální počet nábojů v orbitrapu byl 200 000 a maximální čas pro dosažení tohoto počtu byl 100 ms. Prekurzory byly vyloučeny z opakované fragmentace po dobu 5 s pro peptidy štěpené endopeptidázou Lys-C a 10 s pro peptidy štěpené trypsinem.

4.2.5 Softwarová analýza LC-MS dat

Primární hodnocení získaných LC-MS dat prováděl Dr. Lenčo, tak jak je uvedeno v článku Dr. Khalikové [52]. Takto byla získána informace o sekvenčním pokrytí biofarmaceutik. Datové soubory s primárními výsledky byly následně importovány do softwaru Skyline. Pomocí nich byly vytvořeny knihovny pro jednotlivé biofarmaceutika štěpená endopeptidázou Lys-C a trypsinem. Pro obě štěpení bylo nastaveno maximálně jedno vynechané štěpné místo a fixní modifikace byla zvolena karbamidometylace cysteinu. Díky těmto knihovnám se k chromatogramům přiřadily sekvence peptidů. Dále byla vygenerovány šířky píků pro jednotlivé peptidy, aby mohly být porovnány kolony.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem diplomové práce bylo ověřit potenciál kolony BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm jako kolony univerzálně použitelné pro víceúrovňové analýzy biofarmaceutik. Za tímto účelem bylo provedeno šest různých příprav čtyř různých biofarmaceutik, mezi kterými byly tři protilátková léčiva (trastuzumab, panitumumab a bevacizumab) a jeden fúzní protein (aflibercept). Pro top-down analýzy byla připravena intaktní biofarmaceutika. Pro middle-up analýzy byla připravena redukováná biofarmaceutika, biofarmaceutika štěpená IdeS proteázou a biofarmaceutika štěpená IdeS proteázou s následnou redukcí. Pro bottom-up analýzy byla štěpena redukováná biofarmaceutika pomocí Lys-C proteázy nebo trypsinem. Podle úrovně přípravy a cílů analýz byly připravené vzorky analyzovány buď LC-UV nebo LC-MS metodami. Po potvrzení univerzálnosti kolony BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm následně probíhaly experimenty za účelem sjednotit mobilní fáze.

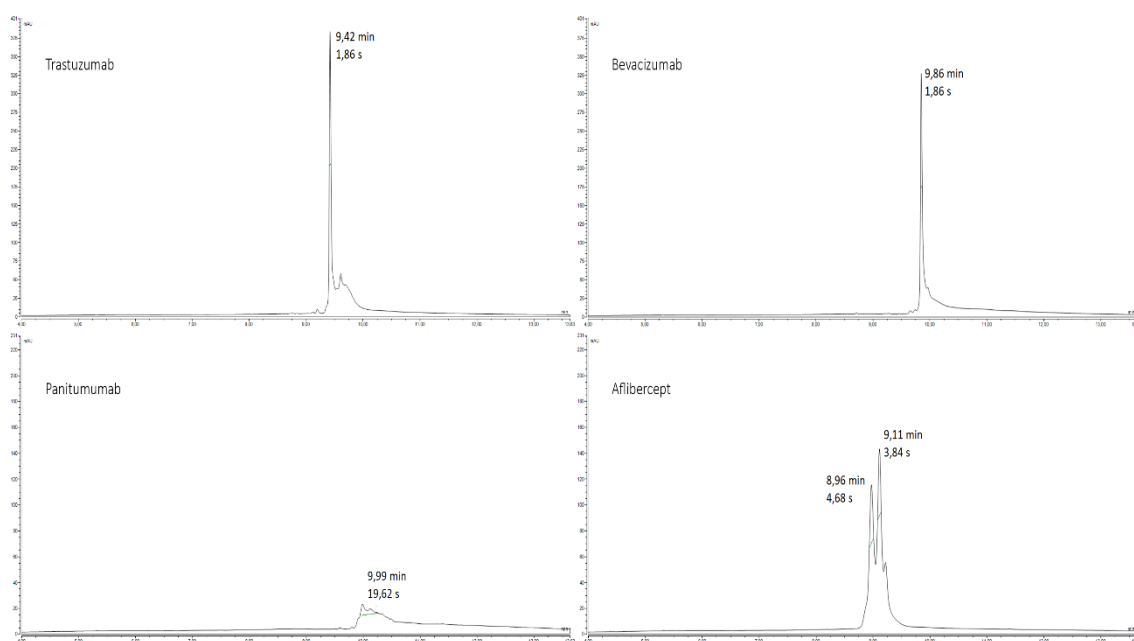
5.1 Ověření účinnosti kolony BioResolve při top-down a middle-up analýzách

Pro top-down a middle-up LC-UV analýzy byla použita mobilní fáze okyselená 0,1% TFA. TFA je silná kyselina (pKa 0,3) s výraznými iontově-párovými vlastnostmi a velice nízkou absorpční vlnou v oblasti UV záření, která se využívá pro detekci peptidů při 214 nm a proteinů při 280 nm. Kvůli těmto vlastnostem je upřednostňována zejména při LC-UV analýzách velkých proteinů.

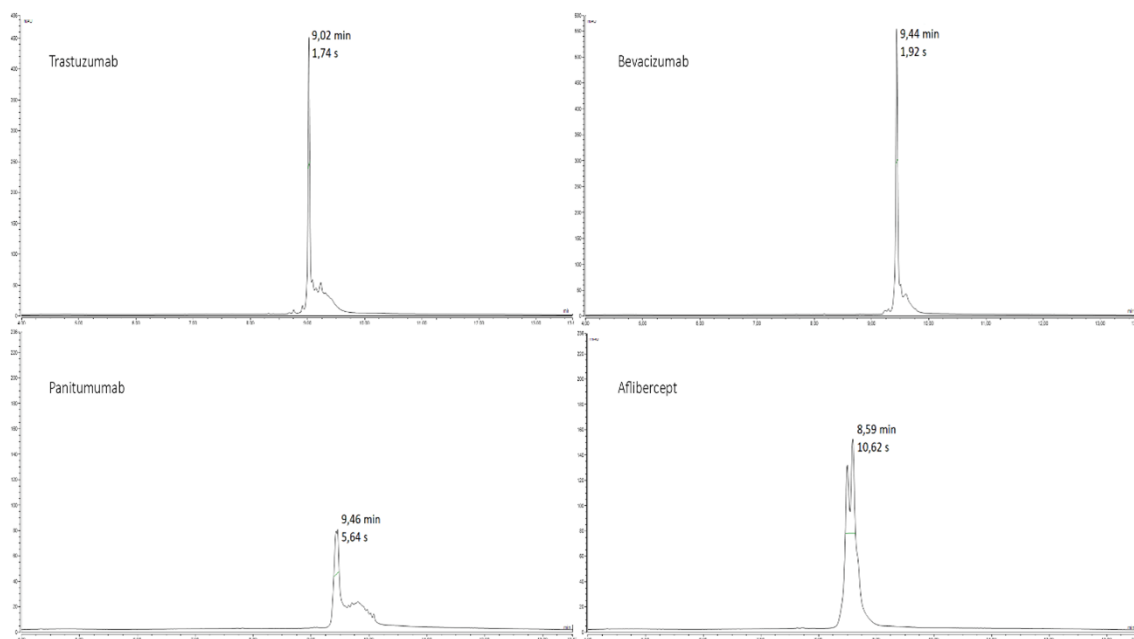
5.1.1 Top-down analýza biofarmaceutik

Nejprve byla intaktní biofarmaceutika analyzována pomocí chromatografu Dionex UltiMate RSLC 3000 na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm, v kombinaci s mobilní fází okyselenou 0,1% TFA. Byla použita 26minutová gradientová metoda při teplotě kolony 60 °C. Na kolonu byl nanesen 1 µg protilátky. Jak je vidět z chromatogramu na obrázku 10, trastuzumab a bevacizumab mají při této teplotě dostatečně rozlišené píky, ale aflibercept a především panitumumab nikoliv. Proto byla analýza zopakována za použití stejné metody, ale při 80 °C. Při 80 °C se šířka píku trastuzumabu ještě zlepšila, zato u bevacizumabu je tomu naopak. To může být

způsobeno tím, že při zvýšení teploty zde také roste riziko vzniku artefaktů. Šířky píků panitumumabu a afliberceptu se zlepšily, stále se ale nedají rovnat s výsledky předchozích dvou biofarmaceutik (obrázek 11). Autoři Bobály *et al.* [54] analyzovali panitumumab při 60–90 °C na stejné koloně za použití stejných mobilních fází. Detekce probíhala při 280 nm oproti naší při 214 nm. Již při 75 °C dosáhli výrazně užších píků než u 60 °C. Autoři Peréz-Robles *et al.* [55] zase analyzovali aflibercept pomocí CEX chromatografie (z angl. Cation Exclusion) s výsledkem více definovaného píku bez zdvojení. Stojí zde za úvahu, jestli pro analýzu intaktního afliberceptu není vhodnější tahle metoda separace než námi použitá RPLC.



Obrázek 10: Srovnání chromatogramů s vyznačenými retenčními časy (v minutách) a šířkami píků (v sekundách) biofarmaceutik na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl při 60 °C.



Obrázek 11: Srovnání chromatogramů s vyznačenými retenčními časy (v minutách) a šířkami píků (v sekundách) biofarmaceutik na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl při 80 °C

Celkově jde tedy říct, že přestože si kolona dokáže poradit i s intaktními biofarmaceutiky, je výhodné zvýšit teplotu kolony na 80 °C. Bylo by také vhodné zopakovat analýzu panitumumabu s detekcí při 280 nm pro ověření výsledků autorů Bobály *et al.* [54].

5.1.2 Middle-up analýza biofarmaceutik

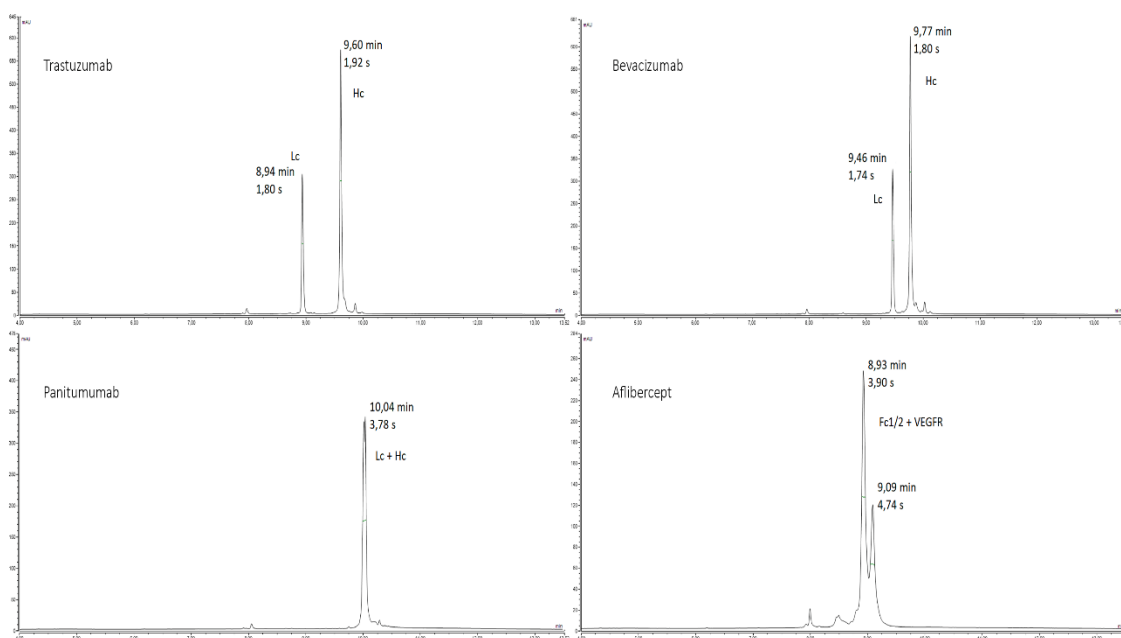
Chromatografie intaktních proteinů nebyla zcela ideální. Provedli jsme proto middle-up analýzy za účelem zjistit, jak si kolona poradí s menšími částmi biofarmaceutik. Intaktní biofarmaceutika mají molekulovou hmotnost kolem 150 kDa, kdežto řetězce a podjednotky mají podle způsobu přípravy molekulovou hmotnost kolem 25, 50 a 100 kDa.

5.1.2.1 Analýza redukovaných biofarmaceutik

Biofarmaceutika byla redukována pomocí DTT, který štěpí disulfidické můstky mezi aminokyselinami proteinu a uvolňuje tak lehké (≈ 25 kDa) a těžké (≈ 50 kDa) řetězce. Na chromatogramu bychom tak měli vidět dva píky pro trastuzumab, bevacizumab a panitumumab. Afíbercept je Fc-fúzní protein složený z receptoru vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR z angl. receptors for vascular endothelial growth factor) připojeného k Fc regionu protilátky. Lze tedy předpokládat, že po redukc

pomocí dithiotreitolu dojde k rozštěpení na dvě stejné části a na chromatogramu budeme pozorovat jeden pík.

Na obrázku 12 můžeme vidět, že trastuzumab a bevacizumab se opravdu separovaly na dva píky. První pík odpovídá lehkým řetězcům a druhý pík odpovídá těžkým řetězcům [56]. Lehké a těžké řetězce u panitumumabu nebyly separovány vůbec. Toto by možná šlo vyřešit zvýšením teploty na koloně na 90 °C i přes riziko tvorby artefaktů, nebo optimalizací mobilní fáze, či úpravou gradientu podle autorů Fekete *et al.* [57]. U afliberceptu překvapivě vidíme dva píky. Ty mohou být způsobeny buďto variabilitou ve velikosti fragmentů [58] nebo degradací z důvodu vysoké teploty na koloně. Pro přesnější vysvětlení tohoto pozorování by byla potřeba provést frakcionaci píků a MS analýzu.



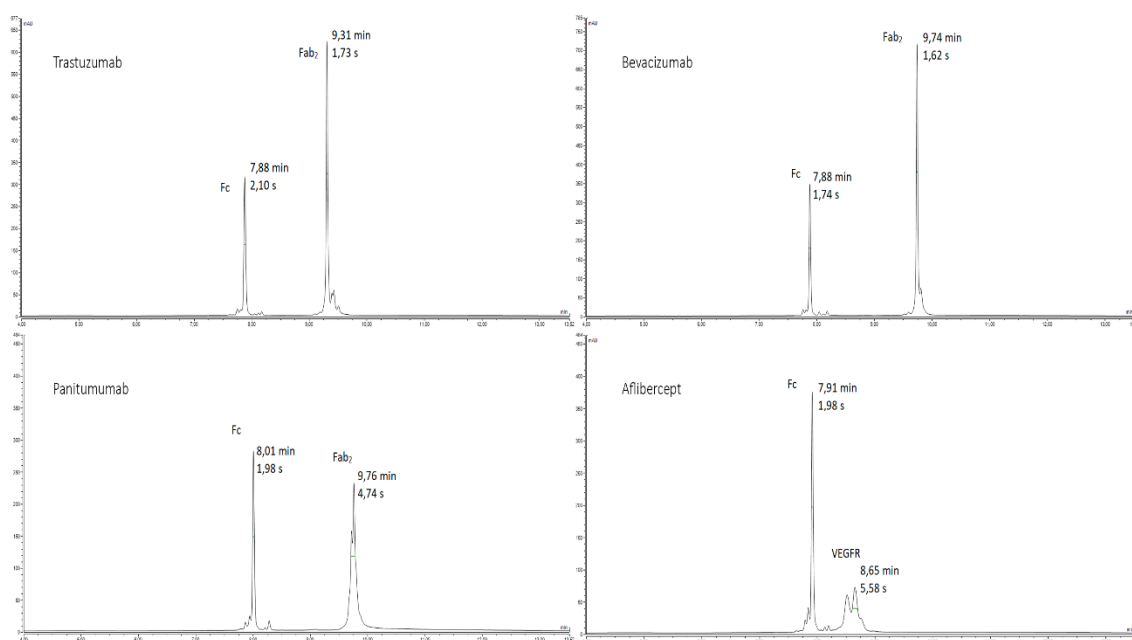
Obrázek 12: Srovnání chromatogramů s vyznačenými retenčními časy (v minutách) a šířkami píků (v sekundách) redukovaných biofarmaceutik na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl.

5.1.2.2 Analýza biofarmaceutik štěpených IdeS proteázou

IdeS proteáza velmi specificky štěpí protilátky hned pod závěsovou oblastí. V chromatogramu tedy očekáváme dva píky pro podjednotky nesoucí Fab₂ (≈100 kDa) a Fc regiony (≈50 kDa) pro trastuzumab, bevacizumab a panitumumab a dimer VEGF receptor a Fc region pro aflibercept. Analýza probíhala pomocí chromatografu Dionex

UltiMate RSLC 3000 na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm, v kombinaci s mobilní fází okyselenou 0,1% TFA při 80 °C.

Na obrázku 13 se opět potvrzuje, že tato kolona je velmi dobrá pro analýzu trastuzumabu a bevacizumabu. Také podjednotky panitumumabu se separovaly velmi dobře v porovnání s předchozími analýzami. Objevuje se zde ale mírné zdvojení u druhého píku, který by měl odpovídat Fab₂ podjednotce protilátky. Ještě výraznější zdvojení pozorujeme u druhého píku afliberceptu odpovídajícímu dimeru VEGF receptoru. Oba tyto jevy se dají vysvětlit inherentní heterogenitou ve velikosti biofarmaceutik [59]. Pro přesnější informace k tomuto jevu by byla potřeba provést MS analýzu.

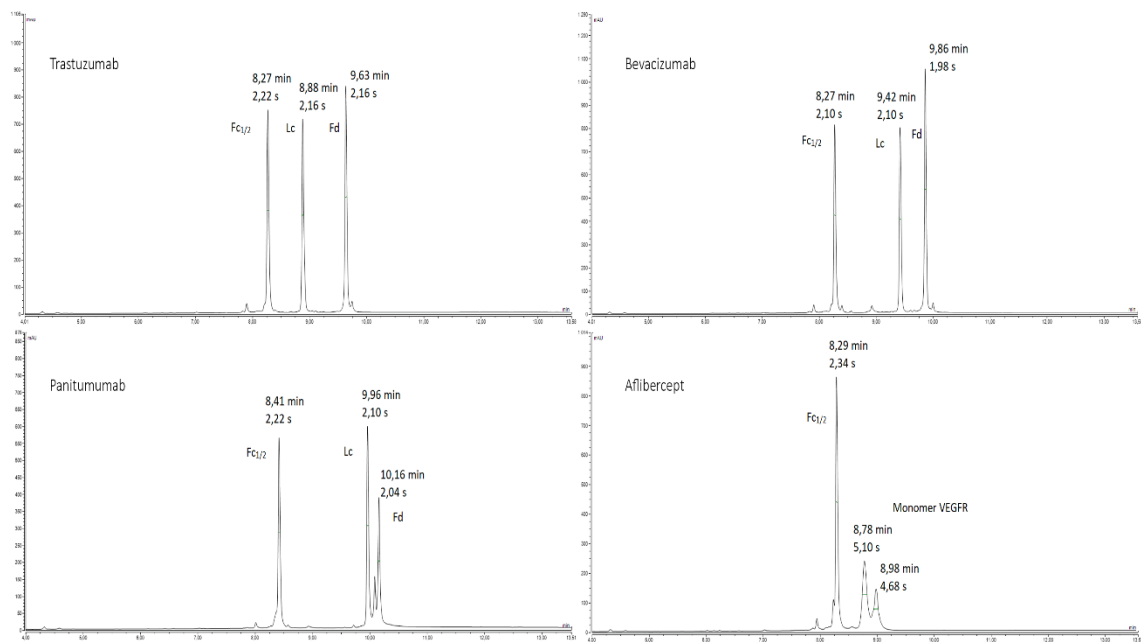


Obrázek 13: Srovnání chromatogramů s vyznačenými retenčními časy (v minutách) a šířkami píků (v sekundách) biofarmaceutik štěpených IdeS proteázou a redukovaných na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl.

5.1.2.3 Analýza biofarmaceutik štěpených proteázou IdeS a redukovaných

Při redukci protilátek štěpených IdeS proteázou vznikají dva stejné lehké řetězce (≈25 kDa), dva stejné Fd regiony (≈25 kDa) a dva stejné fragmenty Fc1/2 (≈25 kDa). V chromatogramu tedy očekáváme tři píky. Aflibercept jako Fc-fúzní protein by se měl štěpit na dva stejné Fc1/2 fragmenty a dva stejné monomery VEGF receptoru. V chromatogramu by se tedy měly objevit dva píky.

Na obrázku 14 vidíme, že kolona separovala trastuzumab a bevacizumab velmi dobře, ale před hlavními píky se objevují také minoritní píky. Jedná se pravděpodobně o fragmenty jednotlivých podjednotek způsobené teplotní degradací biofarmaceutik. Analyty z panitumumabu a afliberceptu jakožto nejproblémovějších biofarmaceutik se separovaly relativně dobře. Z toho plyne, že kolona si dokáže lépe poradit s menšími podjednotkami (≈ 25 kDa) některých biofarmaceutik než s intaktními nebo jen redukovánými. U panitumumabu se zde také objevil pík před píkem Fd regionu. Podobný pík se také objevil u NIST protilátky ve článku autorů Bobály *et al.* [54]. Autoři jeho původ ale neobjasnili. Přestože u afliberceptu byly očekávány dva píky, objevují se zde tři. Autoři Khallali *et al.* [59] separovali stejně štěpený aflibercept pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. V místě, kde očekávali monomer receptoru VEGF, se objevil zdvojený band, který autoři vysvětlili heterogenitou v glykosylaci. RPLC metoda ale není vhodná pro separaci glykosylačních variant, tudíž by pro potvrzení této hypotézy byla potřeba buďto MS analýza nebo separace pomocí metody HILIC.



Obrázek 14: Srovnání chromatogramů s vyznačenými retenčními časy (v minutách) a šířkami píků (v sekundách) biofarmaceutik štěpených IdeS proteázou na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl.

Z těchto poznatků tedy můžeme říct, že kolona dokáže separovat biofarmaceutika lépe při middle-up analýzách. Bylo by také vhodné analyzovat aflibercept pomocí LC-MS pro zjištění důvodu zdvojení píků.

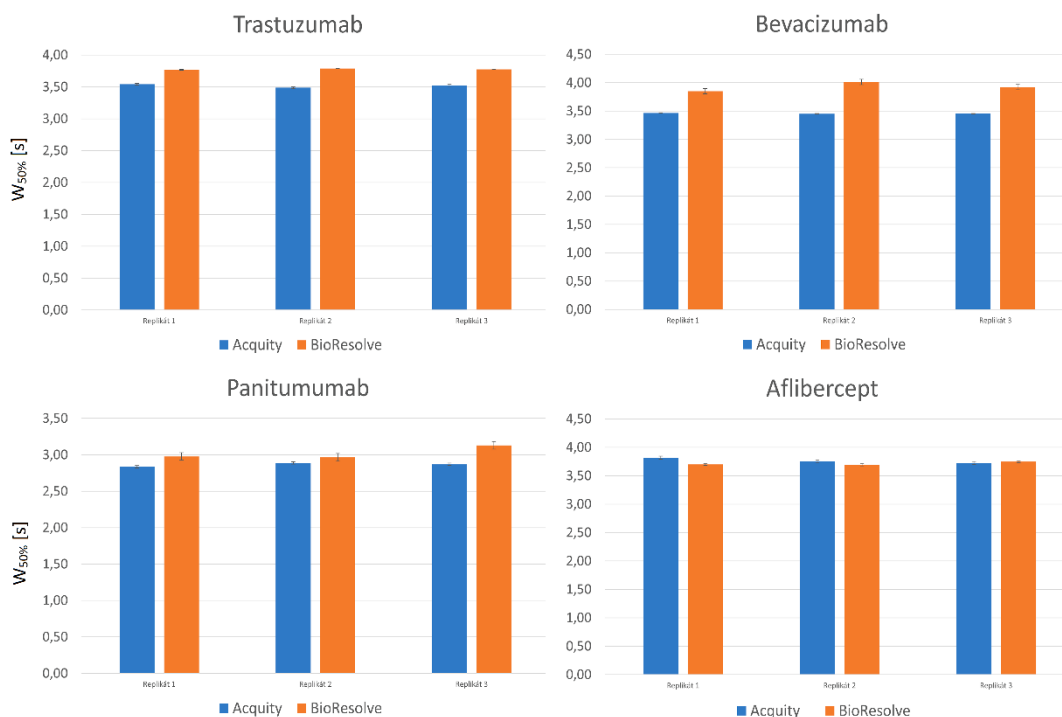
5.2 Ověření schopností kolony při bottom-up analýzách

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit, jestli je možné na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm, 2,1 × 150 mm provádět také bottom-up analýzy. Za tímto účelem byla provedena dvě různá štěpení, která poskytla dostatek potřebných dat. Právě z tohoto důvodu byly tyto analýzy provedeny pomocí LC-MS instrumentace namísto LC-UV přístroje použitého v předchozích analýzách. Kvůli výraznému potlačování ionizace analytů byla TFA, používaná v předchozích analýzách, vyměněna za kyselinu mravenčí. Data byla porovnávána s výsledky získanými na koloně Acquity UPLC CSH C₁₈ 130 Å, 1,7 µm o stejných rozměrech, která byla pro bottom-up analýzy přímo vyvinuta [60].

5.2.1 LC-MS analýza biofarmaceutik štěpených endopeptidázou Lys-C

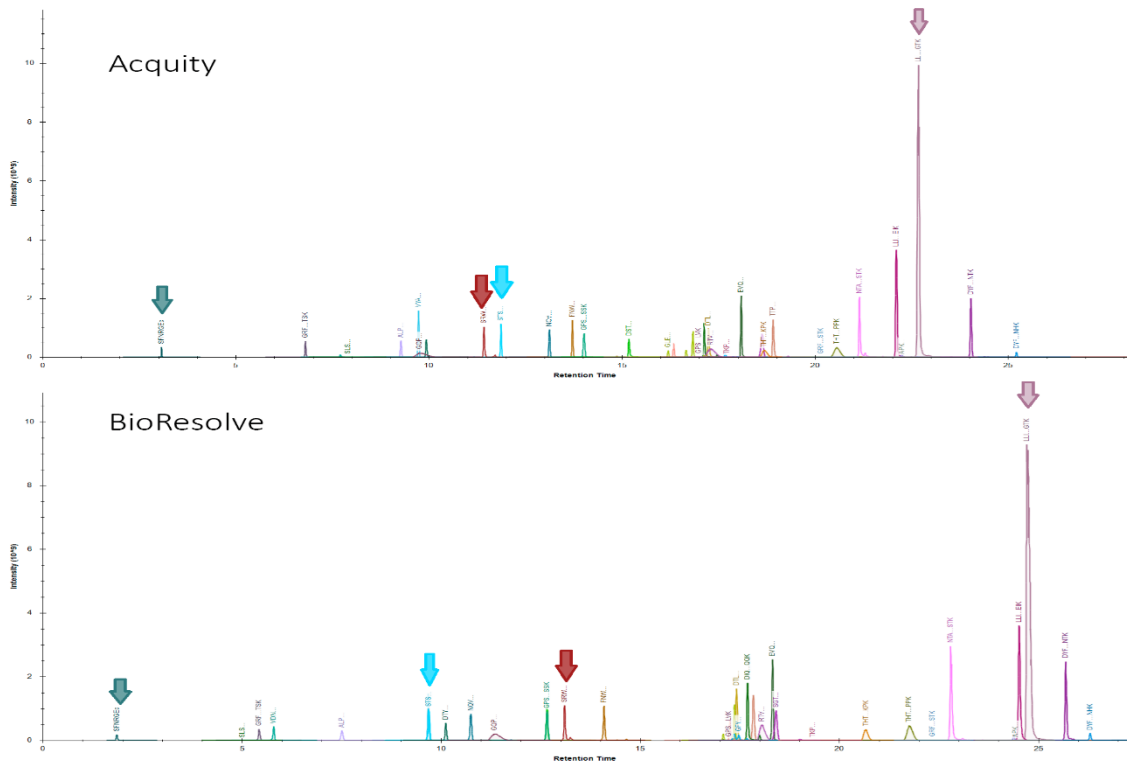
Analýzy probíhaly na přístroji Vanquish Horizon UHPLC spojeným s hmotnostním spektrometrem Q Exactive HF-X. Výsledky z kolony s povrchově porézními částicemi BioResolve RP mAb Polyphenyl byly srovnávány s kolonou s plně porézními částicemi Acquity UPLC CSH C₁₈. Sledovanými parametry byly šířka píku v polovině jeho výšky, pořadí píků při eluci a sekvenční pokrytí peptidů.

Na obrázku 15 můžeme vidět srovnání průměrných šířek píků všech peptidů měřených ve třech replikátech na obou kolonách. Je zde vidět že kolona Acquity poskytuje výrazně lepší šířky píků u většiny biofarmaceutik než kolona BioResolve. Je zde vidět, že kolona Acquity poskytuje jen nepatrně lepší šířky píků u většiny biofarmaceutik než kolona BioResolve. Výjimkou je analýza afliberceptu, kde u dvou ze tří replikátů poskytuje nepatrně užší píky kolona BioResolve.

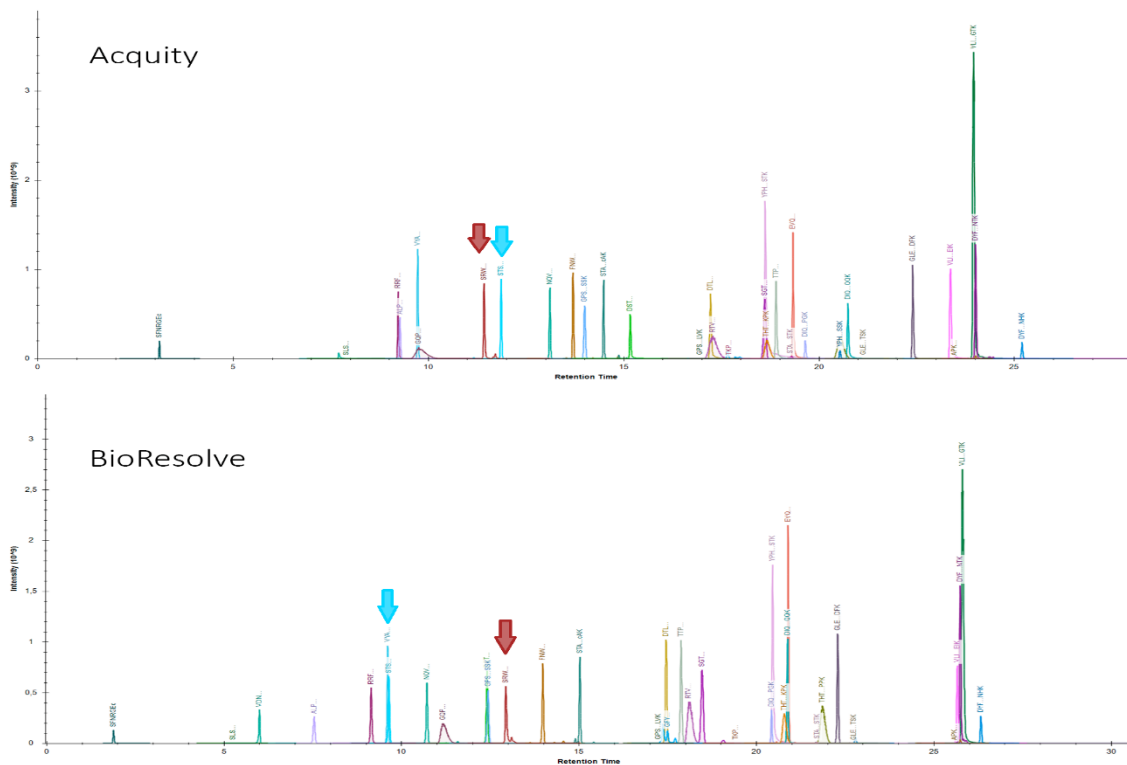


Obrázek 15: Srovnání šířek píků v polovině jejich výšky na kolonách Acquity UPLC CSH C₁₈ 130 Å, 1,7 μm, a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 μm.

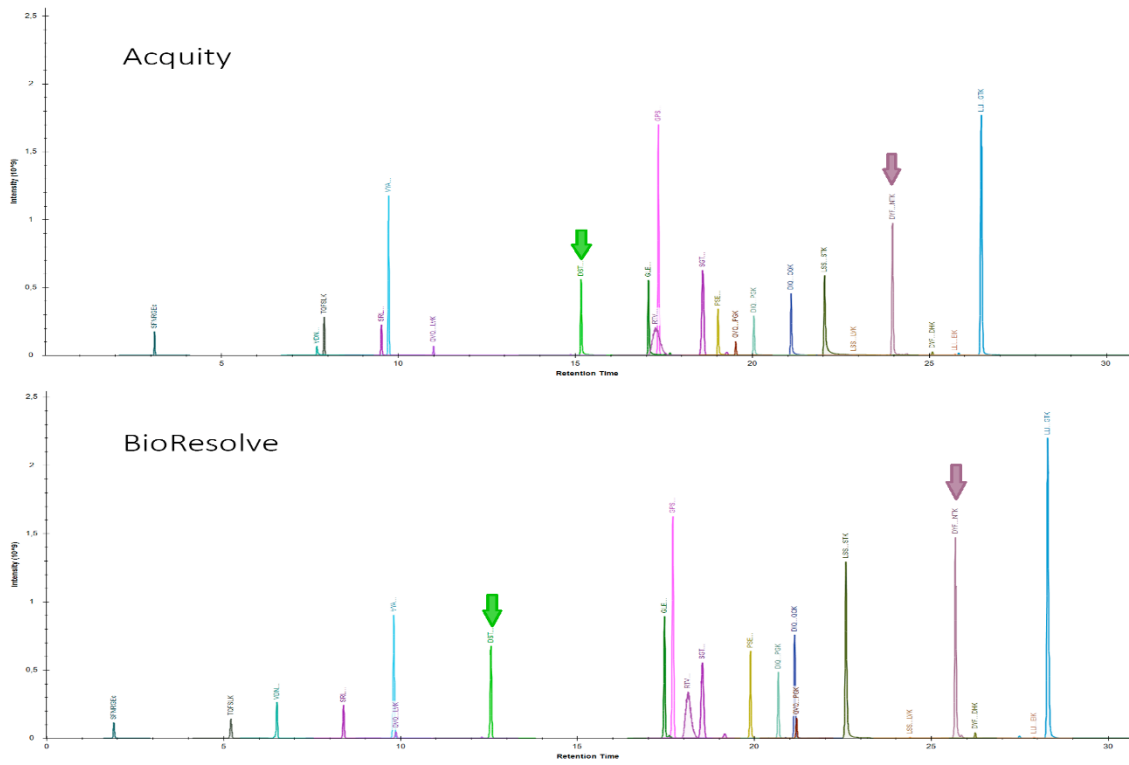
Na obrázcích 16–19 můžeme vidět srovnání pořadí píků mezi kolonami. Kolona BioResolve poskytuje kratší retenční časy pro kratší peptidy, ale u většiny delších peptidů jsou retenční časy stejné nebo delší. Některé z těchto píků jsou označeny šipkami. To je pravděpodobně způsobené rozdílnou velikostí pórů na stacionárních fázích a rychlejším převodem hmoty u povrchově porézních částic na stacionární fázi kolony BioResolve [61]. To ale mělo také za následek ztrátu několika peptidů s retenčními časy <1,6 minuty, z důvodu nastavení systému rozdělující tok.



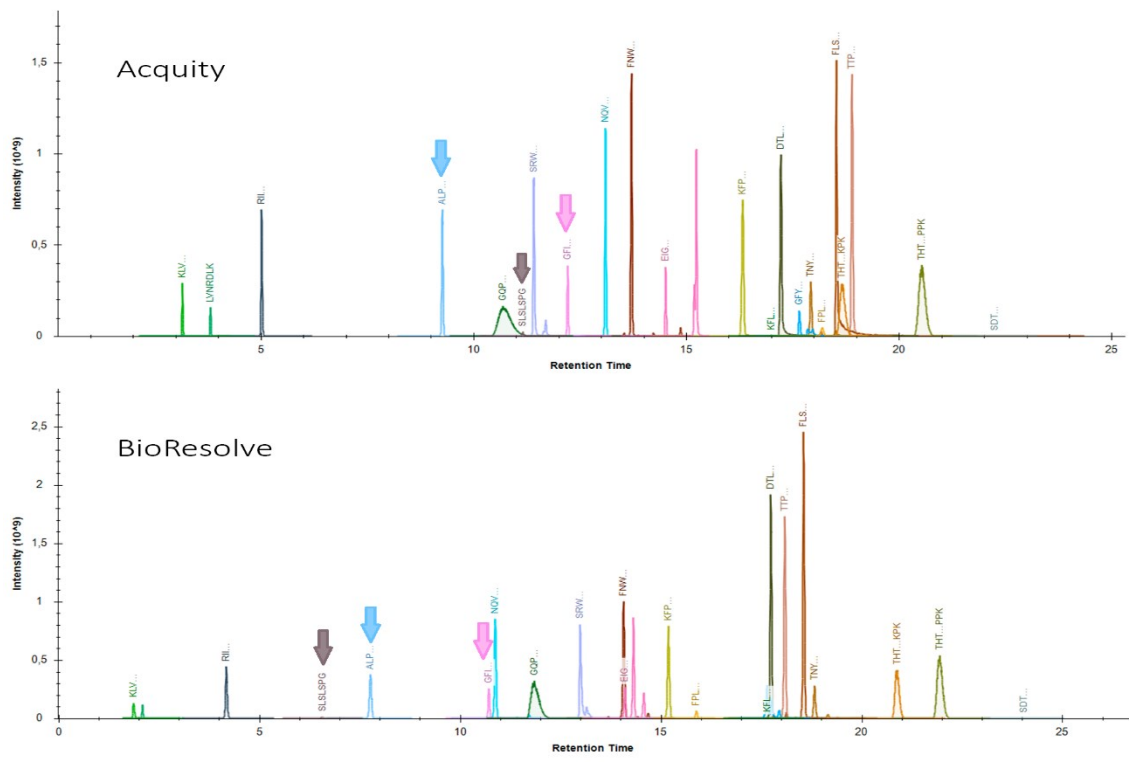
Obrázek 16: Srovnání retenčních časů a pořadí píků trastuzumabu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.



Obrázek 17: Srovnání retenčních časů a pořadí píků bevacizumabu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.

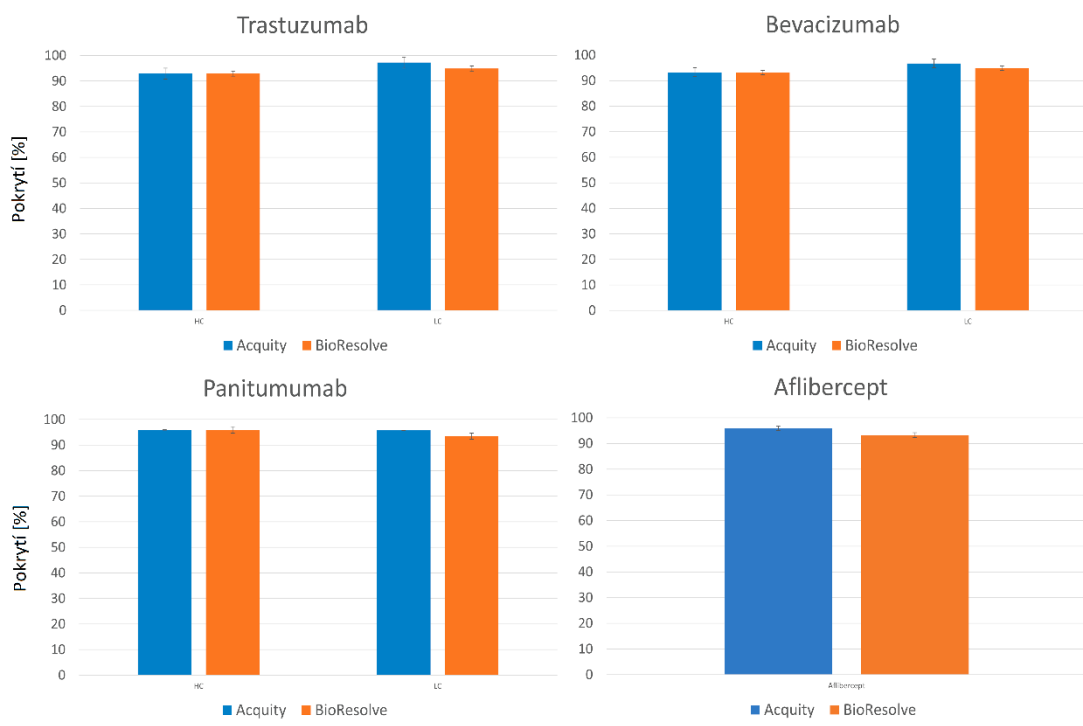


Obrázek 18: Srovnání retenčních časů a pořadí píků panitumumabu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.



Obrázek 19: Srovnání retenčních časů a pořadí píků afliberceptu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.

Sekvenční pokrytí proteinu bylo u obou kolon velmi podobné, jak můžeme vidět na obrázku 20.

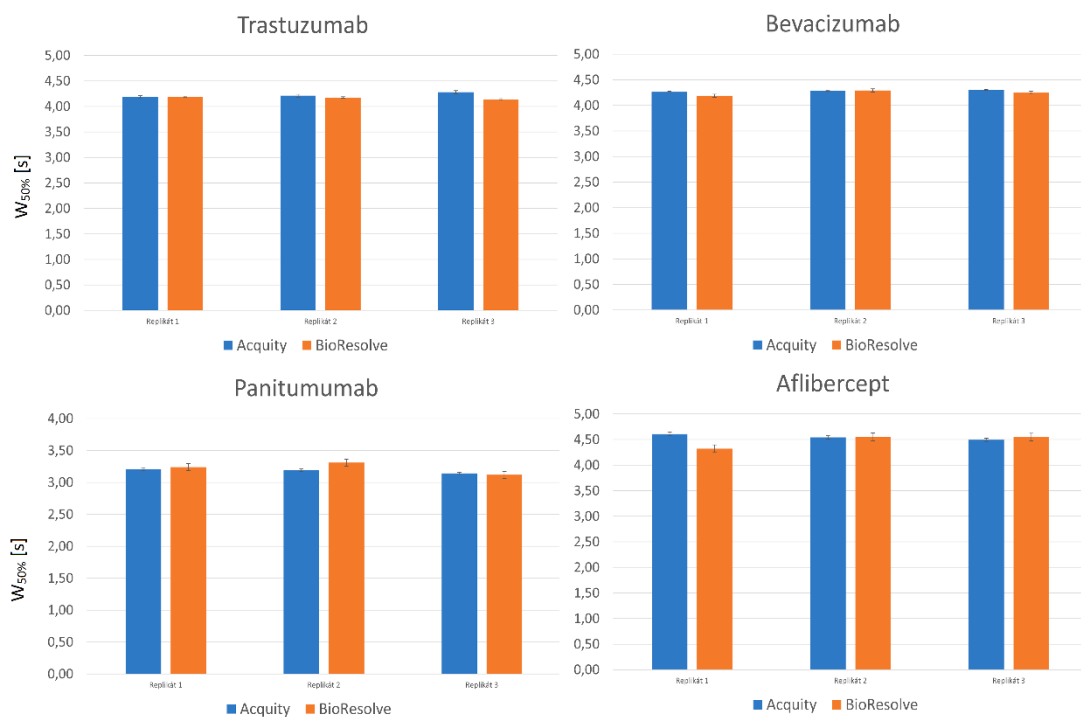


Obrázek 20: Srovnání sekvenčního pokrytí proteinů na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.

5.2.2 LC-MS analýza biofarmaceutik štěpených trypsinem

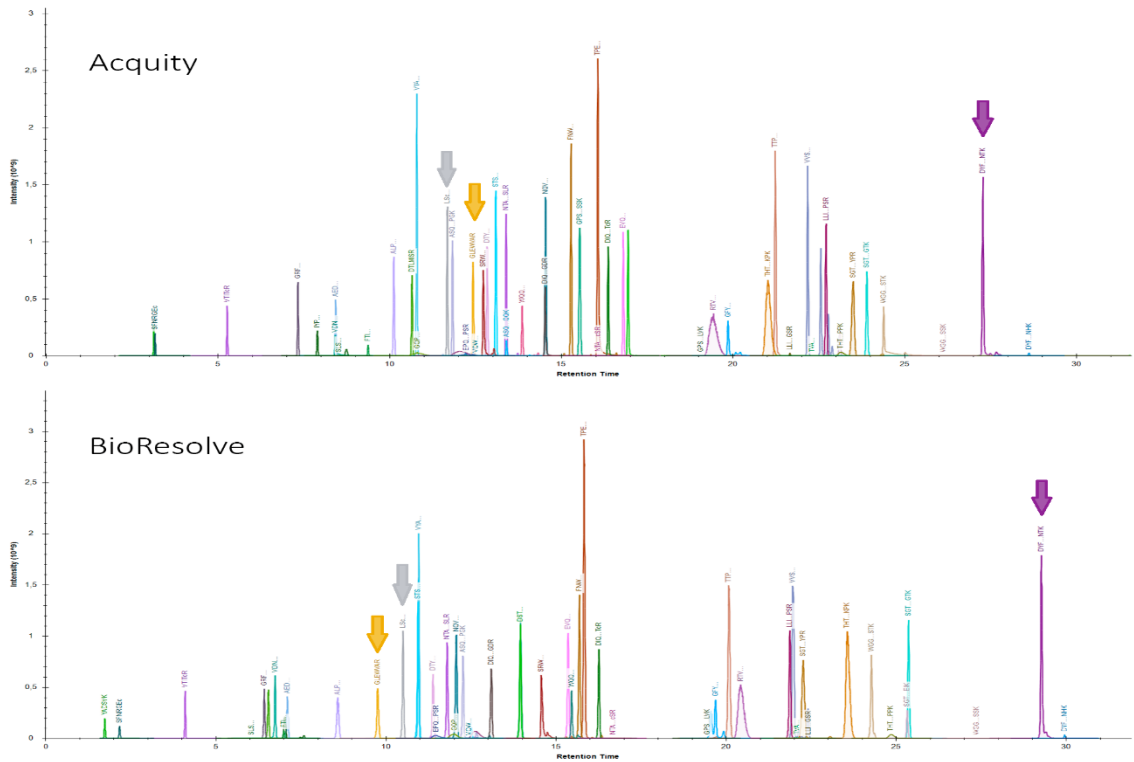
Analýzy probíhaly na přístroji Vanquish Horizon UHPLC spojeným s hmotnostním spektrometrem Q Exactive HF-X. Kolona s povrchově porézními částicemi BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm zde byla srovnávána s kolonou s plně porézními částicemi Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm. Sledovanými parametry byly šířka píku v polovině jeho výšky, pořadí píků a sekvenční pokrytí peptidů.

Na obrázku 21 můžeme vidět, že na rozdíl od předchozích analýz kolona BioResolve poskytuje velmi podobné a v některých případech dokonce lepší šířky píků než kolona Acquity. Z toho plyne, že čím jsou peptidy menší, tím lépe je dokáže kolona BioResolve separovat.

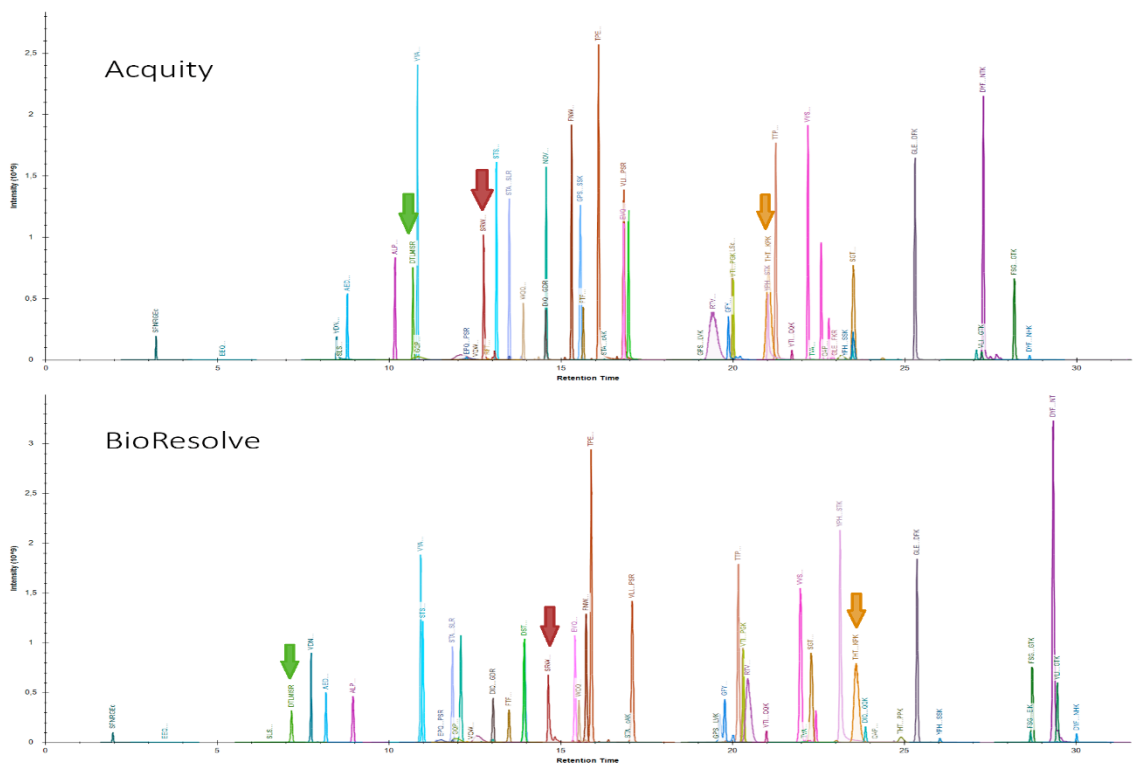


Obrázek 21: Srovnání šířek píků v polovině jejich výšky na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.

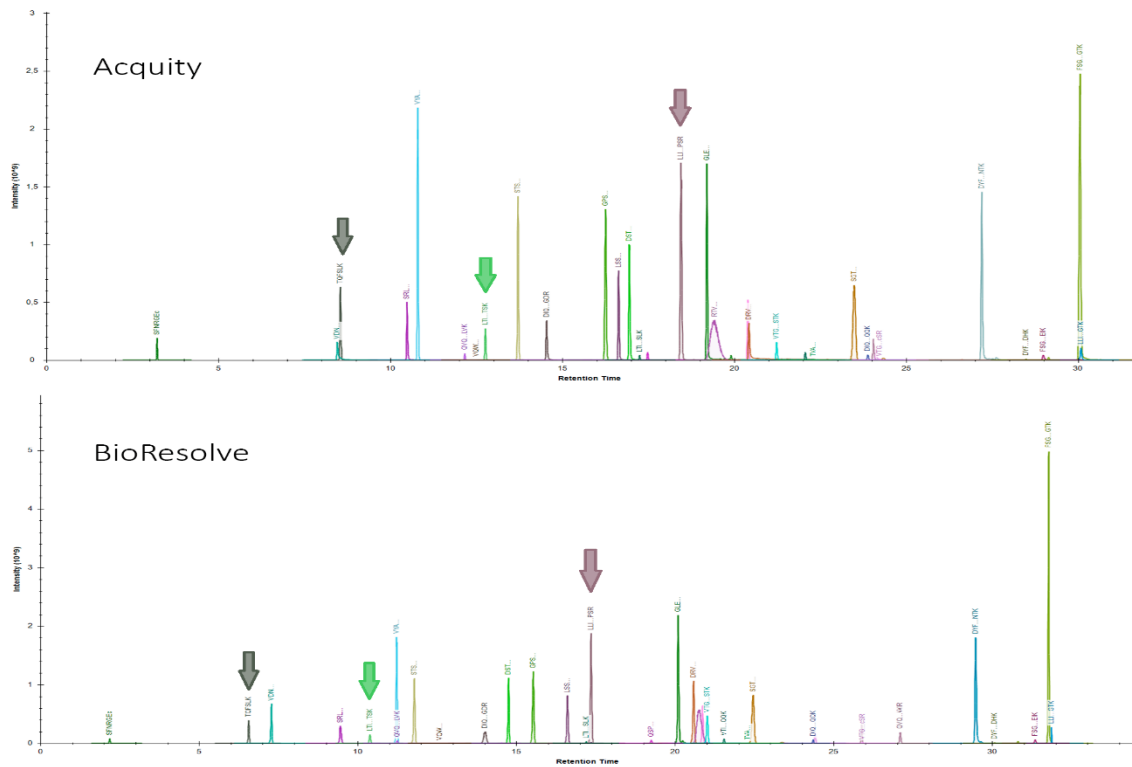
Na obrázcích 22–25 vidíme srovnání pořadí píků. Kolona BioResolve stejně jako u přechodících analýz vykazuje kratší retenční časy pro kratší peptidy a podobné, nebo delší retenční časy pro peptidy delší. Některé z těchto píků jsou označeny šipkami.



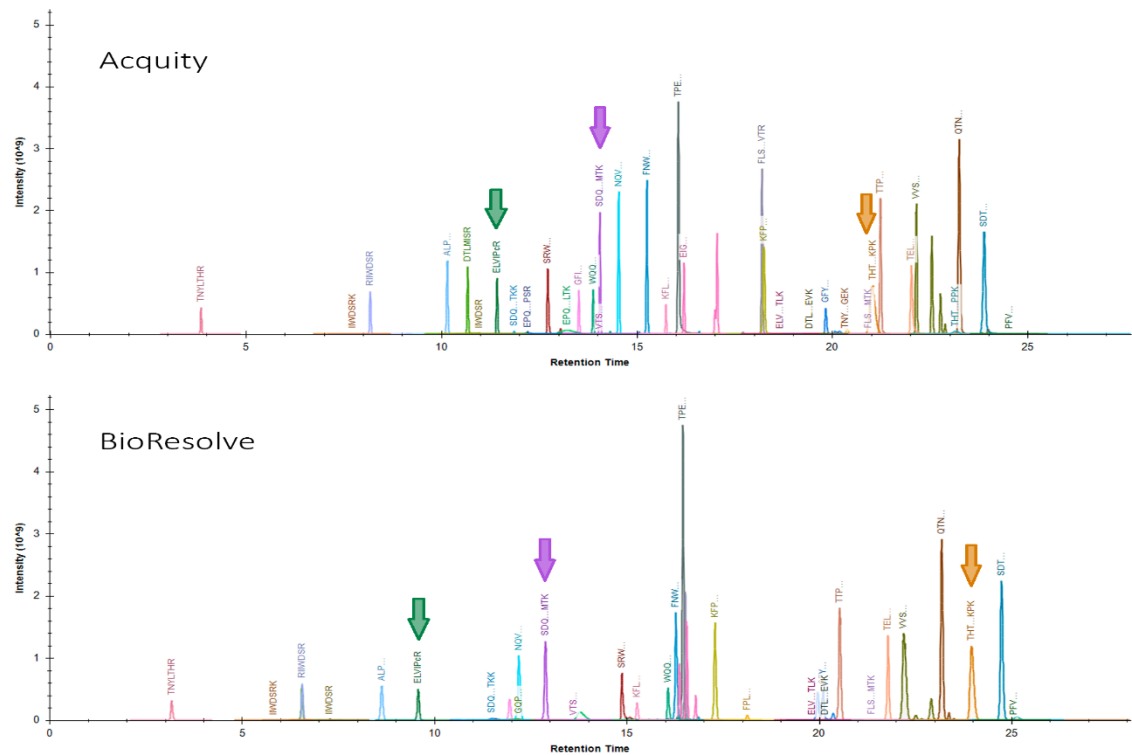
Obrázek 22: Srovnání retenčních časů a pořadí píků trastuzumabu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.



Obrázek 23: Srovnání retenčních časů a pořadí píků bevacizumabu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.

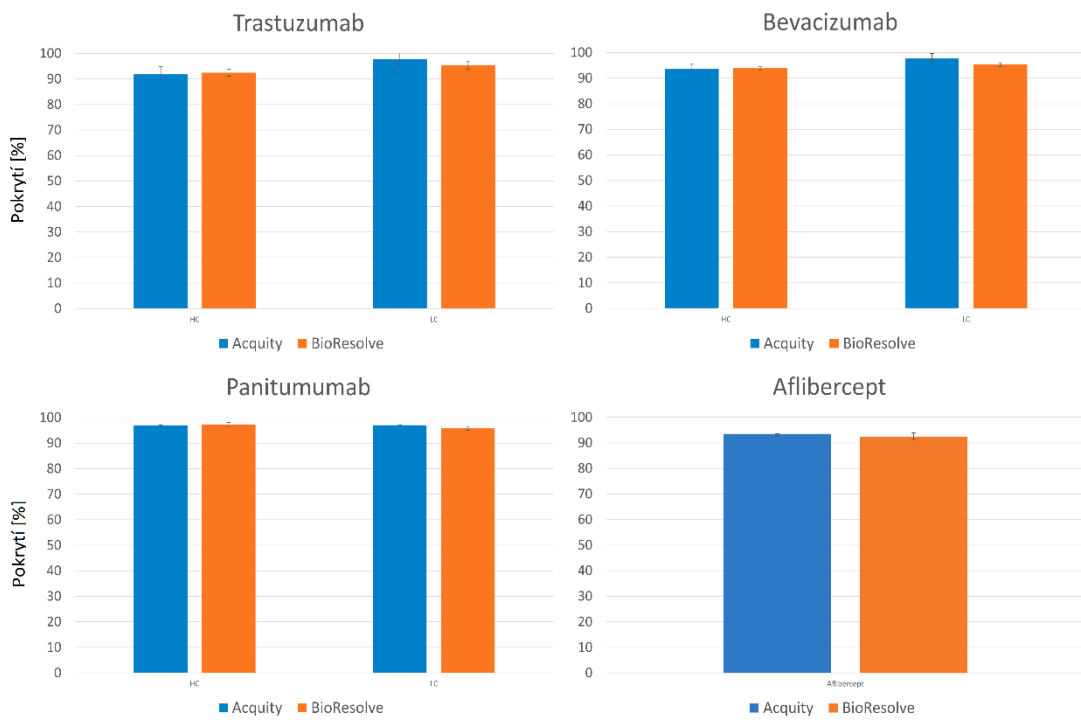


Obrázek 24: Srovnání retenčních časů a pořadí píků panitumumabu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.



Obrázek 25: Srovnání retenčních časů a pořadí píků afliberceptu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.

Sekvenční pokrytí proteinů je stejně jako u předchozích analýz velmi podobné u obou kolon (obrázek 26).



Obrázek 26: Srovnání sekvenčního pokrytí proteinů na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.

I přes určité rozdíly kolona BioResolve zvládá separovat biofarmaceutika štěpená endopeptidázou Lys-C i trypsinem velmi dobře. Můžeme tedy potvrdit naši hypotézu, že kolona BioResolve je vhodná i pro bottom-up analýzu biofarmaceutik.

5.3 Top-down a middle-up analýzy s mobilními fázemi bez TFA

Na základě výsledků Dr. Khalikové ohledně použití kolony BioResolve RP mAb Polyphenyl s mobilními fázemi bez TFA, které jsou shrnuty v článku „Evaluation of strategies for overcoming trifluoroacetic acid ionization suppression resulted in single-column intact level, middle-up, and bottom-up reversed-phase LC-MS analyses of antibody biopharmaceuticals“ [52], byla kolona testována i pro analýzy, kde pozitivní roli 0,1% TFA převzal přídavek 1-butanolu do mobilní fáze. V analýzách v uvedeném článku byl 1-butanol v obou složkách mobilní fáze v koncentraci 3 %. Toto složení mělo pozitivní efekt na separaci intaktních biofarmaceutik a z nich připravených velkých analytů, avšak

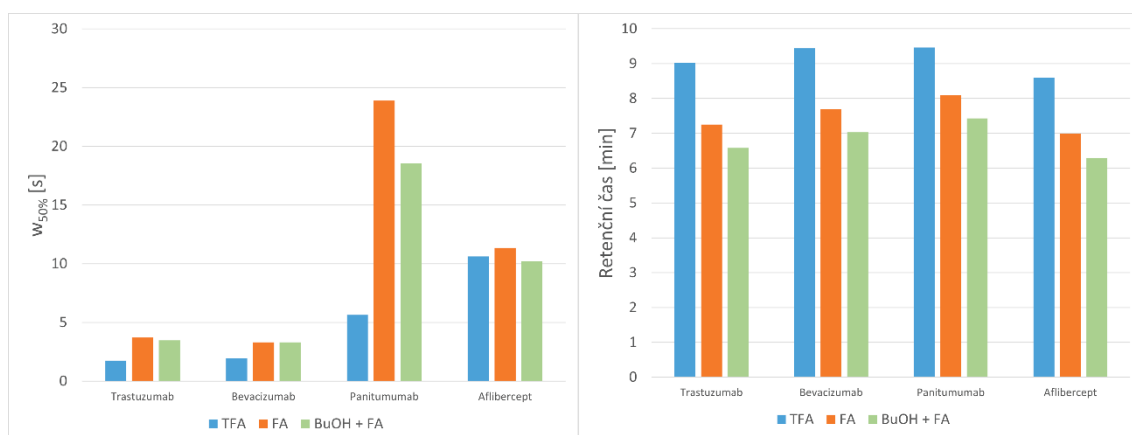
v bottom-up LC-MS analýzách vedla k úniku nejméně hydrofobních peptidů z kolony před zahájením gradientu.

Analýzy v této diplomové práci měly ověřit, zda se pozitivního efektu 1-butanolu pro separaci intaktních biofarmaceutik a jejich velkých částí nedá docílit také tím, že toto aditivum bude přidáno pouze do mobilní fáze B ve vyšší koncentraci. V retenčních časech, kdy eluují intaktní biofarmaceutika a jejich velké deriváty, by bylo dosaženo koncentrace 1-butanolu kolem 3 %, ale v rámci případných bottom-up LC-MS analýz bude koncentrace 1-butanolu na začátku gradientové eluce minimální.

Analýzy byly provedeny pomocí chromatografu Dionex UltiMate RSLC 3000 na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl při 80 °C. Použité mobilní fáze byly okyseleny 0,1% FA. Složka B mobilní fáze obsahovala přídavek 10 % 1-butanolu. Pro srovnání byly použity výsledky z předchozích top-down a middle-up analýz používajících mobilní fázi okyselenou 0,1% TFA. Sledovaným parametrem byla šířka píku v polovině jeho výšky a retenční časy.

5.3.1 Top-down analýzy biofarmaceutik

Pro intaktní biofarmaceutika měla nejnižší šířky píků mobilní fáze s 0,1 % TFA, následovaná mobilní fází s přídavkem 1-butanolu (obrázek 27). Šířky píků trastuzumabu, bevacizumabu a afliberceptu se mezi sebou zásadně neliší. Panitumumab se však opět ukazuje jako velmi problémový. Důvod proč kolona BioResolve podává takto špatné výsledky při analýze intaktního panitumumabu zůstává z nedostatku dostupných informací neznámý. Mobilní fáze s přídavkem 1-butanolu vykazuje také výrazně nižší retenční časy než mobilní fáze okyselené TFA i FA. Toto se dá vysvětlit vyšší eluční silou 1-butanolu v porovnání s acetonitrilem.



Obrázek 27: Srovnání šířek píků (vlevo) a retenčních časů (vpravo) intaktních biofarmaceutik pro jednotlivé mobilní fáze.

Skutečnou koncentraci 1-butanolu v době eluce pro intaktní biofarmaceutika můžeme vidět v tabulce 10. Skutečná koncentrace byla vypočtena odečtením zpoždění nástupu gradientu od retenčních časů biofarmaceutik a vynásobením přírůstkem koncentrace 1-butanolu za minutu. Poté byla přičtena počáteční koncentrace 1-butanolu při začátku gradientu.

Tabulka 10: Skutečná koncentrace 1-butanolu v době eluce intaktních biofarmaceutik.

Protilátka	Retenční čas	% BuOH
Trastuzumab	6,58	2,83
Bevacizumab	6,19	2,72
Panitumumab	7,43	3,08
Aflibercept	6,28	2,75

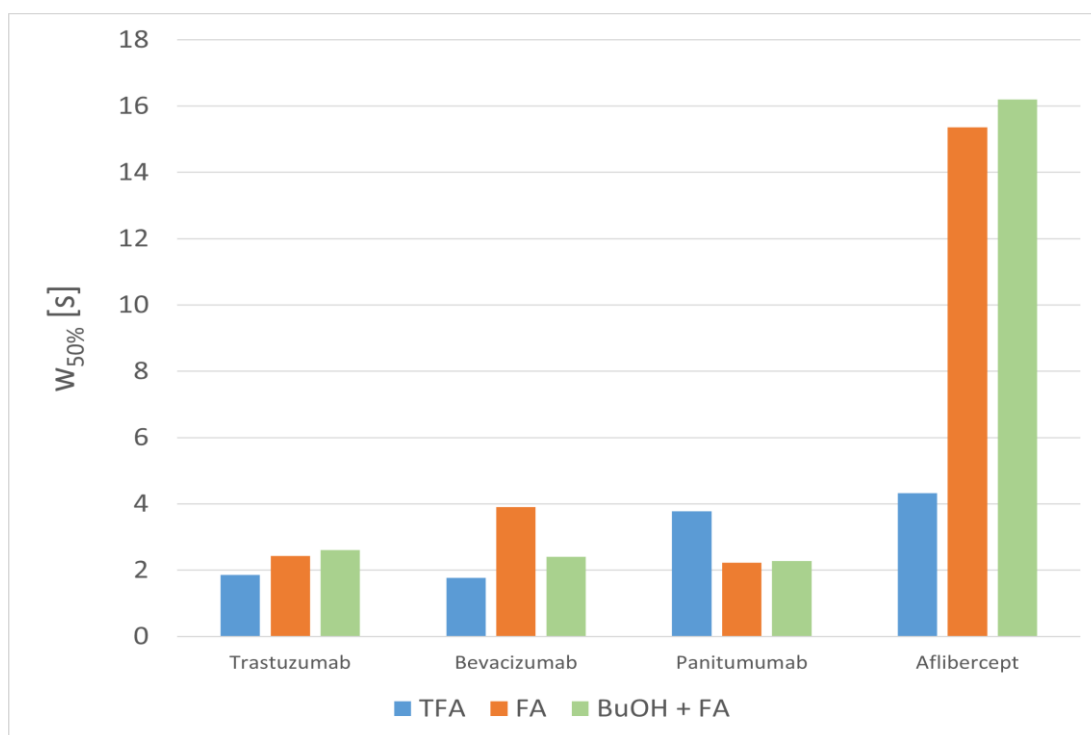
5.3.2 Middle-up analýza biofarmaceutik

Přestože výsledky analýzy intaktního trastuzumabu a bevacizumabu s mobilní fází s přidavkem 1-butanolu byly slibné, intaktní panitumumab vyšel mnohem hůře ve srovnání s mobilní fází okyselenou 0,1% TFA. V middle-up analýzách jsme se pokoušeli zjistit, jestli se tento problém dá vyřešit naštěpením biofarmaceutik na menší analyty.

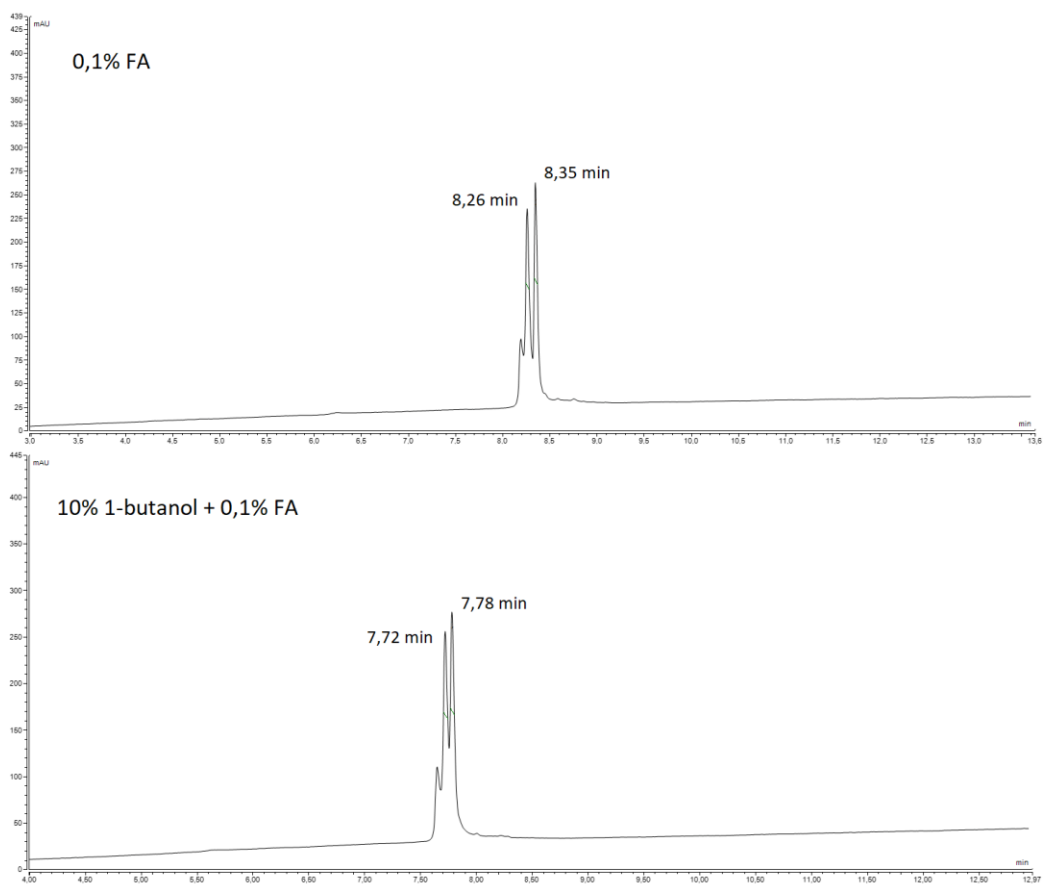
5.3.2.1 Analýza redukováných biofarmaceutik

Na obrázku 28 můžeme vidět srovnání průměrů šířek píků lehkých a těžkých řetězců. Šířka píků panitumumabu je u obou mobilních fází bez TFA mnohem lepší. Nesmíme také zapomínat, že mobilní fáze s TFA nezvládla odseparovat od sebe lehké a těžké řetězce

viz obrázek 13. Na obrázku 29 můžeme vidět, že toto neplatí pro obě mobilní fáze bez TFA. Vypadá to tedy, že pro analýzu redukovaného panitumumabu je výhodnější použití mobilní fáze okyselené 0,1% FA s přidavkem 10 % 1-butanolu než 0,1% TFA. U redukovaného afliberceptu očekáváme jeden pík. Ten, který zde vidíme, je ale příliš široký. Byly by potřeba další analýzy pro zjištění, jestli nedošlo např. k degradaci biofarmaceutika na koloně.



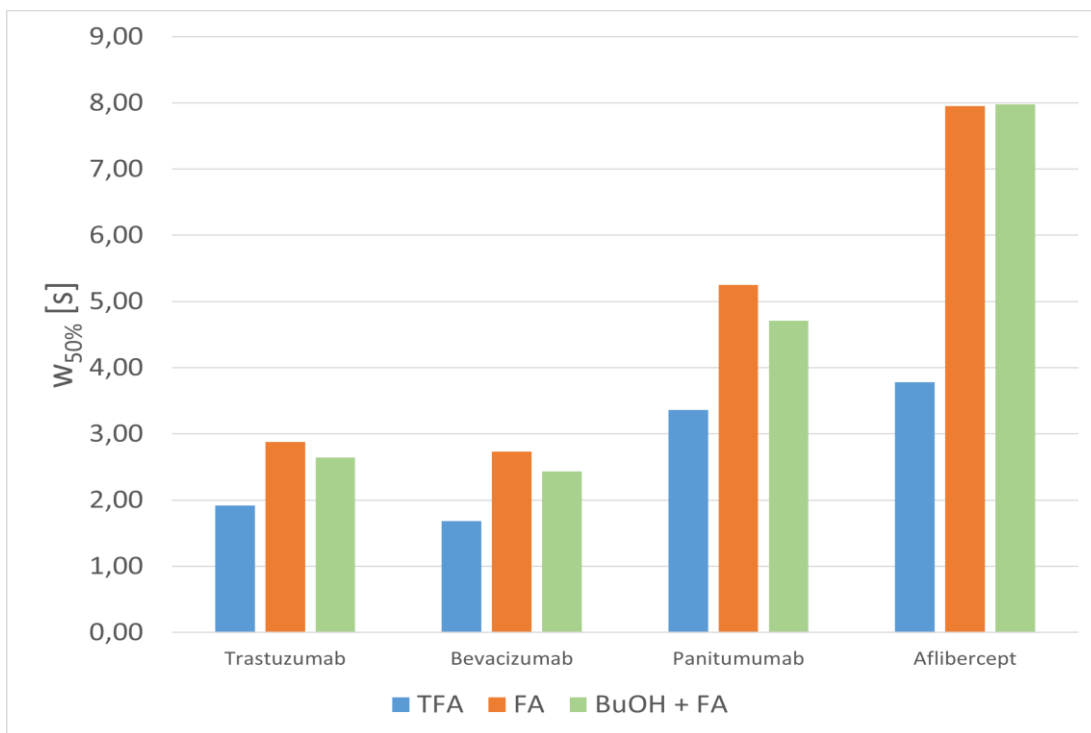
Obrázek 28: Srovnání šířek píků redukovaných biofarmaceutik pro jednotlivé mobilní fáze.



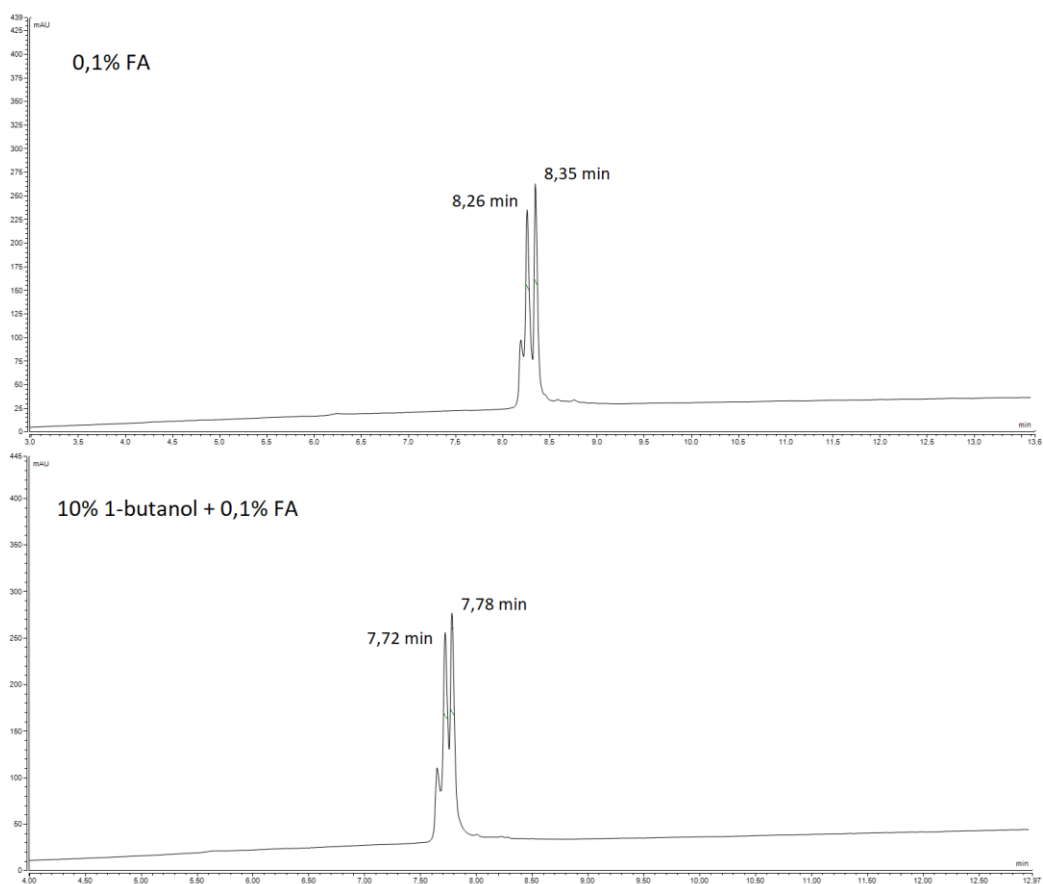
Obrázek 29: Chromatogramy ze separace redukovaného panitumumabu.

5.3.2.2 Analýza biofarmaceutik štěpených proteázou IdeS

Na obrázku 30 vidíme srovnání průměrných šířek píků Fab₂ a Fc regionů pro trastuzumab, bevacizumab a panitumumab, a dimer VEGF receptoru a Fc region pro aflibercept. Šířky píků trastuzumabu, bevacizumabu a dokonce i panitumumabu jsou velmi dobré. U panitumumabu se dokonce neprojevuje ani mírné zdvojení píku Fab₂ oblasti přítomné u analýzy s mobilní fází okyselené 0,1% TFA (obrázek 13). Zdvojení píku se neobjevuje ani u afliberceptu, projevuje se ovšem výrazným nárůstem šířky tohoto píku (obrázek 31). Mobilní fáze s TFA má očividně dostatečné vlastnosti na separaci těchto píků. Co toto zdvojení a nárůst šířky způsobuje ovšem LC-UV analýzou nezjistíme a byla by potřeba provést analýzu s použitím LC-MS.



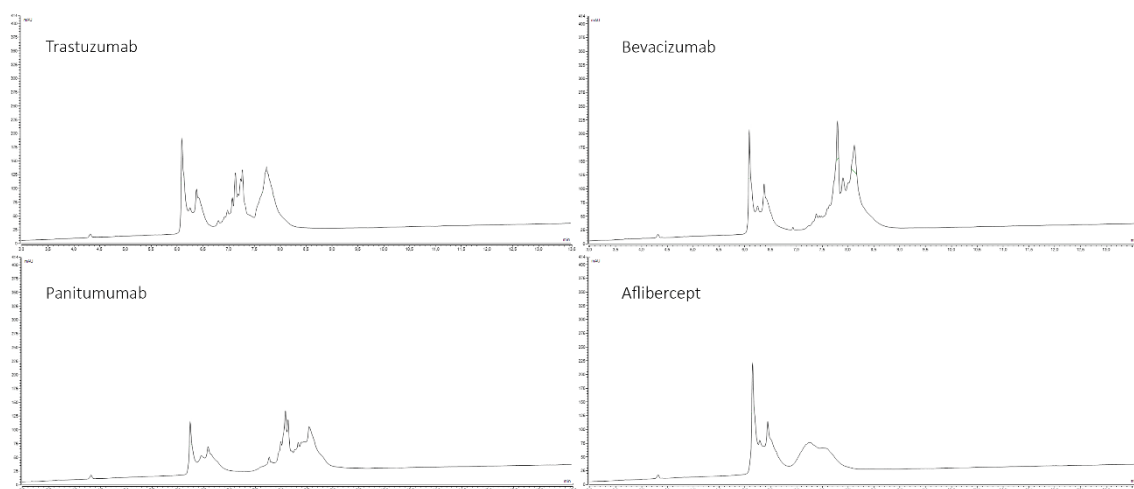
Obrázek 30: Obrázek 29: Srovnání šířek píků biofarmaceutik štěpených proteázou IdeS pro jednotlivé mobilní fáze.



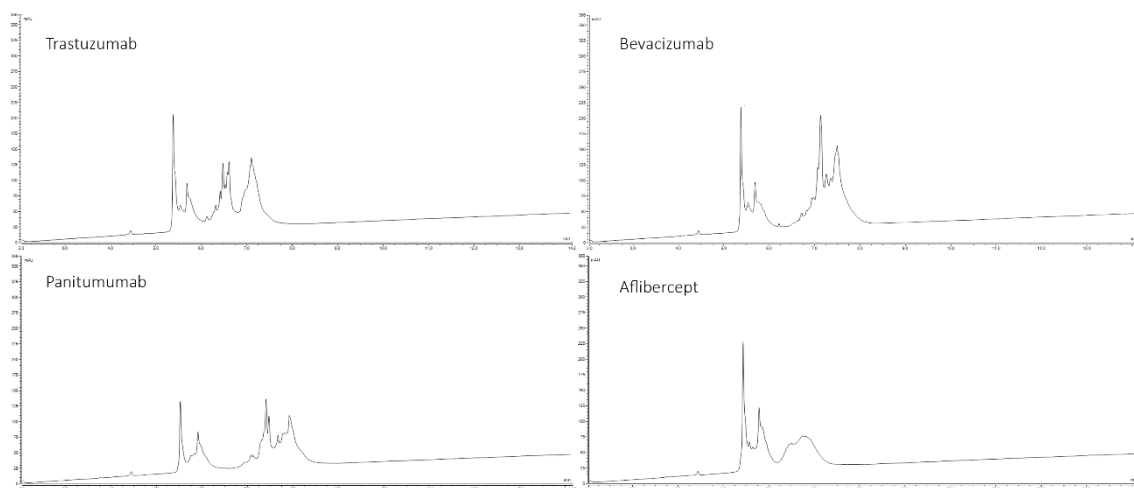
Obrázek 31: Chromatogramy ze separace afiberceptu štěpeného proteázou IdeS.

5.3.2.3 Analýza biofarmaceutik štěpených proteázou IdeS a redukovaných

Z důvodu velké časové prodlevy mezi analýzami a velkým počtem reagensů ve vzorku došlo s největší pravděpodobností k degradaci vzorků a výsledky jsou tak nehodnotitelné. Vidět to můžeme na obrázcích 32 a 33. Z časových a ekonomických důvodů nebylo možné přípravy vzorku a jejich analýzy zopakovat. Na druhou stranu analýzy redukovaných biofarmaceutik a biofarmaceutik štěpených IdeS proteázou přinesly dostatečně validní důkazy o tom, že tento systém mobilních fází je vhodný pro top-down i middle-up analýzy.



Obrázek 32: Chromatogramy ze separace biofarmaceutik štěpených proteázou IdeS a redukovaných za použití mobilní fáze okyselené 0,1% FA.



Obrázek 33: Chromatogramy ze separace biofarmaceutik štěpených proteázou IdeS redukovaných za použití mobilní fáze okyselené 0,1% FA s přidavkem 10 % 1-butanolu.

Na základě těchto výsledků můžeme konstatovat, že přidáním 10 % 1-butanolu ke složce B mobilní fáze okyselené 0,1% FA lze dosáhnout eluce analytů v prostředí kolem 3 % 1-butanolu, který má pozitivní účinky na tvar těchto analytů v LC-MS [52].

6. ZÁVĚR

Při ověřování schopností kolony při top-down analýzách v našich podmínkách jsme zjistili, že přestože kolona dává velmi kvalitní chromatogramy, je výhodné zvýšit teplotu kolony na 80 °C. I přes zvýšenou teplotu se ale ne všechna intaktní biofarmaceutika separovala optimálně. Velmi problematický byl panitimumab. To se do značné míry vyřešilo při middle-up analýzách redukcí nebo štěpením biofarmaceutik IdeS proteázou. Plyne z toho tedy, že ačkoliv si kolona dokáže poradit i s intaktními biofarmaceutiky, čím jsou analyty menší, tím méně jsou problematické. Štěpením biofarmaceutik ale zase narůstá náročnost přípravy vzorku a samozřejmě také cena analýzy.

Pomocí protilátek štěpených endopeptidázou Lys-C a trypsinem jsme zjistili, že kolona BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm je opravdu vhodná pro bottom-up analýzy. Bottom-up analýzy na této koloně se samozřejmě neobejdou bez určitých kompromisů v celkovém tvaru píků a sekvenčním pokrytí. Kolona Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm je samozřejmě stále vhodnější pro bottom-up analýzu, nedají se však na ní provádět top-down ani middle-up analýzy. Na základě těchto prvotních výsledků byly provedeny analýzy, které se staly součástí článku Dr. Khalikové a kolektivu [52].

Chromatogramy a výpočty potvrdily, že analyty v rámci top-down a middle-up analýz skutečně eluují kolem 3 % 1-butanolu v mobilní fázi. Tento systém mobilních fází se tedy zdá být vhodný pro top-down, middle-up i bottom-up analýzy na jedné koloně. Předpokládaný potenciál této univerzální metody založené na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm a systému mobilních fází s 10% 1-butanolem v organické složce pro analýzu biofarmaceutik je ještě nutné ověřit v bottom-up LC-MS analýzách. Z kapacitních důvodů již nebylo možné tyto experimenty v rámci diplomové práce provést.

7. POUŽITÉ ZKRATKY

ACN	Acetonitril
CEX	Kationtová výměnná chromatografie (z angl. Cation Exchange)
DAD	Detektor s diodovým polem (z angl. Diod-Array Detector)
DTT	Dithiotreitol
ESI	Elektrosprejová ionizace (z angl. Electrospray Ionization)
FA	Kyselina mravenčí (z angl. Formic Acid)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. Food and Drug Administration)
GFC	Gelová filtrační chromatografie (GFC z angl. Gel Filtration Chromatography)
GPC	Gelová permeační chromatografie (GPC z angl. Gel Permeation Chromatography)
HGPTR	Hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferázu (HGPRT z angl. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase)
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie (z angl. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (z angl. High Performance Liquid Chromatography)
IEC	Iontově výměnná chromatografie (z angl. Ion Exchange Chromatography)

LC	Kapalinová chromatografie (z angl. Liquid Chromatography)
LC-MS	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrií (z angl. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
mAb	Monoklonální protilátky (z angl. Monoclonal Antibodies)
MALDI	Ionizace desorpce laserem za účasti matrice (z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
MS	Hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry)
PDA	Detektor s diodovým polem (z angl. Photodiode-Array)
PTM	Posttranslační modifikace (z angl. Post-translational Modifications)
RPLC	Chromatografie na reverzní fázi (z angl. Reverse Phase Liquid Chromatography)
SEC	Vylučovací chromatografie (z angl. Size exclusion chromatography)
TFA	Kyselina trifluoroctová (z angl. Trifluoroacetic Acid)
TOF	Analyzátor doby letu (z angl. Time-of-flight)
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. Ultra-high Performance Liquid Chromatography)
UV	Ultrafialové záření (z angl. Ultraviolet)
UV/Vis	Ultrafialové/Viditelné záření (z angl. Ultraviolet/Visible)

8. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled aminokyselin (přepřacováno dle [10]).	12
Tabulka 2: Přehled schválených monoklonálních protilátek pro léčbu onkologických onemocnění k roku 2020 (převzato z [32]).	20
Tabulka 3: Přehled původní nomenklatury pro terapeutické protilátky proti onkologickým onemocněním (převzato z [33]).	21
Tabulka 4: Přehled nové nomenklatury terapeutických monoklonálních protilátek (převzato z [33]).	22
Tabulka 5: Přehled HPLC detektorů (převzato z [34]).	27
Tabulka 6: Program gradientové eluce pro LC-UV analýzu.	38
Tabulka 7: Nastavení systému rozdělující tok.	38
Tabulka 8: Program gradientové eluce pro LC-MS analýzu protilátek štěpených endopeptidázou Lys-C.	39
Tabulka 9: Program gradientové eluce pro LC-MS analýzu protilátek štěpených trypsinem	39
Tabulka 10: Skutečná koncentrace 1-butanolu v době eluce intaktních biofarmaceutik.	57

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vznik peptidové vazby (převzato z [8]).	12
Obrázek 2: Stupně proteinové struktury (převzato z [13]).	15
Obrázek 3: Chemické struktury čistých PTM (převzato z [15]).	16
Obrázek 4: Struktura molekuly imunoglobulinu (převzato z [24]).	18
Obrázek 5: Schéma separace v módu RPC (převzato z [34]).	24
Obrázek 6: Schéma separace v módu IEC (převzato z [34]).	25
Obrázek 7: Schéma separace v módu SEC (převzato z [34]).	26
Obrázek 8: Schéma PDA detektoru (převzato z [34]).	28
Obrázek 9: Schéma orbitrapu (převzato z [45]).	33
Obrázek 10: Srovnání chromatogramů s vyznačenými retenčními časy (v minutách) a šířkami píků (v sekundách) biofarmaceutik na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl při 60 °C.	42
Obrázek 11: Srovnání chromatogramů s vyznačenými retenčními časy (v minutách) a šířkami píků (v sekundách) biofarmaceutik na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl při 80 °C.	43
Obrázek 12: Srovnání chromatogramů s vyznačenými retenčními časy (v minutách) a šířkami píků (v sekundách) redukováných biofarmaceutik na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl.	44
Obrázek 13: Srovnání chromatogramů s vyznačenými retenčními časy (v minutách) a šířkami píků (v sekundách) biofarmaceutik štěpených IdeS proteázou a redukováných na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl.	45
Obrázek 14: Srovnání chromatogramů s vyznačenými retenčními časy (v minutách) a šířkami píků (v sekundách) biofarmaceutik štěpených IdeS proteázou na koloně BioResolve RP mAb Polyphenyl.	46
Obrázek 15: Srovnání šířek píků v polovině jejich výšky na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm, a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.	48
Obrázek 16: Srovnání retenčních časů a pořadí píků trastuzumabu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.	49
Obrázek 17: Srovnání retenčních časů a pořadí píků bevacizumabu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.	49
Obrázek 18: Srovnání retenčních časů a pořadí píků panitumumabu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.	50
Obrázek 19: Srovnání retenčních časů a pořadí píků afliberceptu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.	50
Obrázek 20: Srovnání sekvenčního pokrytí proteinů na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.	51
Obrázek 21: Srovnání šířek píků v polovině jejich výšky na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.	52
Obrázek 22: Srovnání retenčních časů a pořadí píků trastuzumabu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.	53
Obrázek 23: Srovnání retenčních časů a pořadí píků bevacizumabu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.	53
Obrázek 24: Srovnání retenčních časů a pořadí píků panitumumabu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.	54
Obrázek 25: Srovnání retenčních časů a pořadí píků afliberceptu na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 µm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 µm.	54

Obrázek 26: Srovnání sekvenčního pokrytí proteinů na kolonách Acquity UPLC CSH C18 130 Å, 1,7 μm a BioResolve RP mAb Polyphenyl 450 Å, 2,7/0,4 μm.....	55
Obrázek 27: Srovnání šířek píků (vlevo) a retenčních časů (vpravo) intaktních biofarmaceutik pro jednotlivé mobilní fáze.	57
Obrázek 28: Srovnání šířek píků redukováných biofarmaceutik pro jednotlivé mobilní fáze. ...	58
Obrázek 29: Chromatogramy ze separace redukováného panitumumabu.....	59
Obrázek 30: Obrázek 29: Srovnání šířek píků biofarmaceutik štěpených proteázou IdeS pro jednotlivé mobilní fáze.....	60
Obrázek 31: Chromatogramy ze separace afliberceptu štěpeného proteázou IdeS.	60
Obrázek 32: Chromatogramy ze separace biofarmaceutik štěpených proteázou IdeS a redukováných za použití mobilní fáze okyselené 0,1% FA.	61
Obrázek 33: Chromatogramy ze separace biofarmaceutik štěpených proteázou IdeS redukováných za použití mobilní fáze okyselené 0,1% FA s přídatkem 10 % 1-butanolu.	61

10. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] NGUYEN, Jennifer M., *et al.* Designing a New Particle Technology for Reversed-Phase Separations of Proteins. *Waters Application Note, 720006168EN*. 9 [cit. 2021-5-10] Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006168en.pdf>
- [2] RANBADUGE, Nilini a *et al.* LC-MS Characterization of mAb Subunits Using a BioResolve RP mAb Column. *Waters Application Note, 720006199EN*. 3 [cit. 2021-5-10]. Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006199en.pdf>
- [3] Česká onkologická společnost ČLS JEP [online]. Linkos [cit. 2021-5-15]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/>
- [4] TYERS, Mike a Matthias MANN. From genomics to proteomics. *Nature* [online]. 2003, (422), 193-197 [cit. 2021-01-04]. doi:<https://doi.org/10.1038/nature01510>
- [5] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. Praha, 1998. Lange medical book. ISBN 80-857-8738-5.
- [6] ŠÍPAL, Zdeněk. *Biochemie*. Praha: SPN, 1992. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství). ISBN 80-042-1736-2.
- [7] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny: Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství)*. ISBN 978-802-4614-168.
- [8] URBAN, Daniel. Peptidová vazba. In: *SlidePlayer* [online]. 2009 [cit. 2021-01-04]. Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/2345693/>
- [9] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. 1. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.
- [10] *Amino Acids Reference Charts* [online]. Darmstadt, 2013 [cit. 2021-02-02]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/learning-center/amino-acid-reference-chart.html>
- [11] ANDERSON, Niels H. *Protein Structure, Stability, and Folding: Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press, 2001. ISBN 0-89603-682-0.

- [12] SHIRLEY, Bret A. *Protein Stability and Folding: Theory and Practice*. New Jersey: Humana Press, 1996. ISBN 978-1-59259-527-3.
- [13] *Protein Structure: Primary, Secondary, Tertiary, Quaternary Structures*. Health CDMO division [online]. Bethlehem (Pensylvánie), November 27 2019 [cit. 2021-02-02]. Dostupné z: <https://lubrizolcdmo.com/technical-briefs/protein-structure/>
- [14] BATEMAN, A. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*. 2016, **2017**(45), D158–D169. ISSN ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkw1099
- [15] PANG, Chi Ni a Marc R. WILIINS. Protein Post-Translational Modification Prediction. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. 2019. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.20265-3
- [16] COHEN, Philip. The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences*. 2000, **45**(12), 596-601. ISSN 0968-0004. Dostupné z: doi:10.1016/S0968-0004(00)01712-6.
- [17] SCOTT, John D. a Tony PAWSON. Cell Signaling in Space and Time: Where Proteins Come Together and When They're Apart. *Science*. 2009, **326**(5957). ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1126/science.1175668>
- [18] CIECHANOVER, Aaron. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*. 1994, **79**(1). ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90396-4).
- [19] VERHAVSKY, Alexander. The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein in science*. 2008, **20**(8). Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/pro.666>
- [20] TOKMANOV, Alexander A *et al.* Multiple post-translational modifications affect heterologous protein synthesis. *J Biol Chem*. 2012, **287**(32). Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M112.366351
- [21] LU, Ruei-Min, Yu-Chyi HWANG a *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science*. 2020, **27**(1). Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>

- [22] CHIU, Mark L., Dennis R. GOULET, Alexey TEPLYAKOV a Gary L. GILLILAND. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies*. 2019, **8**(4). ISSN 2073-4468. Dostupné z: doi:10.3390/antib8040055
- [23] HARRIS, LJ, KW HASEL a A MCPHERSON. Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry*. 1997, **36**(7). Dostupné z: doi:10.1021/bi962514+
- [24] Imunoglobulin. *Wikiskripta* [online]. 2010 [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:IMUNOGLOBULIN.png>
- [25] CHARTRAIN, Michel a Lily CHU. Development and Production of Commercial Therapeutic Monoclonal Antibodies in Mammalian Cell Expression Systems: An Overview of the Current Upstream Technologies. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2008, **9**(6), 447-467. ISSN 13892010. Dostupné z: doi:10.2174/138920108786786367
- [26] LIU, Justin K.H. The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of Medicine and Surgery*. 2014, **3**(4), 113-116. ISSN 20490801. Dostupné z: doi:10.1016/j.amsu.2014.09.001
- [27] TANG, Y.-J., R. OHASHI a J.-F.P. HAMEL. Perfusion Culture of Hybridoma Cells for Hyperproduction of IgG2a Monoclonal Antibody in a Wave Bioreactor-Perfusion Culture System. *Biotechnology Progress*. 2007, **23**(1), 255-264. ISSN 8756-7938. Dostupné z: doi:10.1021/bp060299a
- [28] CARVALHO, Lucas Silva, Otávio Bravim da SILVA, Gabriela Carneiro da ALMEIDA, Juliana Davies de OLIVEIRA, Nadia Skorupa PARACHIN a Talita Souza CARMO. Production Processes for Monoclonal Antibodies. *Fermentation Processes*. InTech, 2017, 2017-02-08. ISBN 978-953-51-2927-1. Dostupné z: doi:10.5772/64263
- [29] BECK, Alain. Biosimilar, biobetter and next generation therapeutic antibodies. *MAbs*. 2011, **2**(3), 67-102. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.4161/mabs.3.2.14785>

- [30] JOZALA, Angela Faustino a *et al.* Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016, **47**(1). Dostupné z: doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.007>
- [31] BALDO, Brian A. *Safety of Biologics Therapy: Monoclonal Antibodies, Cytokines, Fusion Proteins, Hormones, Enzymes, Coagulation Proteins, Vaccines, Botulinum Toxins*. Springer, 2016. ISBN 978-3-319-30472-4.
- [32] ZAHAVI, David a Louis WEINER. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies*. 2020, **9**(3). ISSN 2073-4468. Dostupné z: doi:[10.3390/antib9030034](https://doi.org/10.3390/antib9030034)
- [33] ROBERTSON, James S., Wai-Keung CHUI, Armando A. GENAZZANI, *et al.* The INN global nomenclature of biological medicines: A continuous challenge. *Biologicals*. 2019, **60**, 15-23. ISSN 10451056. Dostupné z: doi:[10.1016/j.biologicals.2019.05.006](https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.05.006)
- [34] DONG, M. W. *HPLC and UHPLC for practicing scientists*. Second edition. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2019. ISBN 978-1-119-31376-2.
- [35] VITHA, Mark F. *Chromatography: principles and instrumentation*. New Jersey: John Wiley, [2017]. ISBN 978-1-119-27088-1.
- [36] SNYDER, Lloyd R., Joseph J. KIRKLAND a John W. DOLAN. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. New York: Wiley, 2009. ISBN 978-0-470-16754-0.
- [37] HORVATH, Csaba. *High performance liquid chromatography: advances and perspectives*. 1. NY: Academic press, 1980.
- [38] CARR, Peter W., Daniel E. MARTIRE a Lloyd R. SNYDER. The Retention Process in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1993, **656**(1), 618.
- [39] KROMIDAS, Stavros, ed. *Gradient HPLC for Practitioners: RP, LC-MS, Ion Analytics, Biochromatography, SFC, HILIC*. Germany: Wiley-VCH. ISBN 978-3-527-34408-6.

- [40] STRIEGEL, André M. *Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography*. 2nd ed. Hoboken: Wiley, 2009. ISBN 9780470442876.
- [41] DONG, M. W. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. 1. Amsterdam: Elsevier Science, 2005. Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutical Science 1995 - 2006, 6. ISBN 978-012-0885-473.
- [42] D'ATRI, Valentina, Alexandre GOYON, Balazs BOBALY, Alain BECK, Szabolcs FEKETE a Davy GUILLARME. Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. III – Denaturing chromatographic techniques hyphenated to mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2018, **1096**, 95-106. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2018.08.013
- [43] BOBALY, Balazs, Valentina D'ATRI, Alexandre GOYON, Olivier COLAS, Alain BECK, Szabolcs FEKETE a Davy GUILLARME. Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. II – Enzymatic and chemical sample preparation. *Journal of Chromatography B*. 2017, **1060**, 325-335. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2017.06.036
- [44] FANALI, Salvatore, Paul R. HADDAD, Colin POOLE a David LLOYD, ed. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Amsterdam: Elsevier Science, 2013. ISBN 9780128093450.
- [45] GROSS, Jürgen H. *Mass Spectrometry: A Textbook*. 3rd ed. Cham: Springer International Publishing, 2017. ISBN 978-3-319-54398-7.
- [46] COVEY, Thomas R., Bruce A. THOMSON a Bradley B. SCHNEIDER. Atmospheric pressure ion sources. *Mass Spectrometry Reviews*. 2009, **28**(6), 870-897. ISSN 0277-7037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.20246
- [47] DREISEWERD, Klaus, Martin SCHÜRENBERG, Michael KARAS a Franz HILLENKAMP. Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 1995, **141**(2), 127-148. ISSN 01681176. Dostupné z: doi:10.1016/0168-1176(94)04108-J

- [48] GUILHAUS, Michael. Special feature: Tutorial. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. Physical and instrumental concepts. *Journal of Mass Spectrometry*. 1995, **30**(11), 1519-1532. ISSN 1076-5174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.1190301102
- [49] IOANOVICIU, Damaschin. Ion-Optical solutions in time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1995, **9**(11), 985-997. ISSN 0951-4198. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.1290091104
- [50] COTTER, Robert J. Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Structural Analysis of Biological Molecules. *Analytical Chemistry*. 1992, **64**(21), 1027A-1039A. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00045a726
- [51] THOMSON, Bruce A., D. J. DOUGLAS, Jay J. CORR, James W. HAGER a Charles L. JOLLIFFE. Improved Collisionally Activated Dissociation Efficiency and Mass Resolution on a Triple Quadrupole Mass Spectrometer System. *Analytical Chemistry*. 1995, **67**(10), 1696-1704. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00106a008
- [52] SCIGELOVA, Michaela a Alexander MAKAROV. Orbitrap Mass Analyzer – Overview and Applications in Proteomics. *PROTEOMICS*. 2006, **6**(S2), 16-21. ISSN 16159853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200600528
- [53] BOBÁLY, Balázs, Matthew LAUBER, Alain BECK, Davy GUILLARME a Szabolcs FEKETE. Utility of a high coverage phenyl-bonding and wide-pore superficially porous particle for the analysis of monoclonal antibodies and related products. *Journal of Chromatography A*. 2018, **1549**, 63-76. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2018.03.043
- [54] KHALIKOVA, Maria A., Laimonas SKARBALIUS, Denis K. NAPLEKOV, Siddharth JADEJA, František ŠVEC a Juraj LENČO. *Evaluation of strategies for overcoming trifluoroacetic acid ionization suppression resulted in single-column multilevel reversed-phase LC-MS analyses of therapeutic monoclonal antibodies*. Hradec Králové, 2021.
- [55] PÉREZ-ROBLES, Raquel, Luis CUADROS-RODRÍGUEZ, Antonio SALMERÓN-GARCÍA, José CABEZA-BARRERA a Natalia NAVAS. Intact

- charge variant analysis of ziv-aflibercept by cationic exchange liquid chromatography as a proof of concept: Comparison between volatile and non-volatile salts in the mobile phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020, **185**. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2020.113233
- [56] LIN, Shanhua, Nebojsa AVDALOVIC a Xiaodong LIU. Application Note 21200Fast Analysis of Therapeutic Monoclonal Antibody Fragments Using a Supermacroporous, Reversed-Phase Chromatography Column. In: *Application Note 21200* [online]. Thermo Fisher Scientific, s. 5 [cit. 2021-5-12]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-21200-LC-MAbPac-RP-mAb-Fragments-AN21200-EN.pdf>
- [57] FEKETE, Szabolcs, Serge RUDAZ, Jenő FEKETE a Davy GUILLARME. Analysis of recombinant monoclonal antibodies by RPLC: Toward a generic method development approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012, **70**, 158-168. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2012.06.021
- [58] DUIVELSHOF, Bastiaan L., Amarande MURISIER, Julien CAMPERI, Szabolcs FEKETE, Alain BECK, Davy GUILLARME a Valentina D'ATRI. Therapeutic Fc-fusion proteins: Current analytical strategies. *Journal of Separation Science*. 2021, **44**(1), 35-62. ISSN 1615-9306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.202000765
- [59] KHALILI, H., P. T. KHAW a S. BROCCINI. Fc-fusion mimetics. *Biomaterials Science*. 2016, **4**(6), 943-947. ISSN 2047-4830. Dostupné z: doi:10.1039/C6BM00077K
- [60] *ACQUITY UPLC and ACQUITY PREMIER Peptide CSH C18, 130 Å, 1.7 µm and XSelect XP and XSelect PREMIER 2.5 µm Columns: Care and use manual* [online]. USA: Waters, 2021 [cit. 2021-5-15]. Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720004544en.pdf>
- [61] FEKETE, Szabolcs, Erzsébet OLH a Jen FEKETE. Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles. *Journal of Chromatography A*. 2012, **1228**, 57-71. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.09.050