

MASTEROPPGAVE

KARAKTERISERING AV
MODIFISERTE ANTISTOFFER
INNEN RADIOIMMUNOTERAPI

Tonje Tobiassen



Institutt for farmasi, Det helsevitenskapelige fakultet

Universitetet i Tromsø

Vår 2011

Forord

Denne masteroppgaven er et samarbeid mellom universitetet i Tromsø og Algeta ASA. Arbeidet ble utført på Algeta fra oktober 2010 til mai 2011. Intern veileder var Einar Jensen fra Universitetet i Tromsø og ekstern veileder Åsmund Larsen fra Algeta.

Takk til Einar for at du skaffet meg denne oppgaven. Det har vært utrolig spennende å jobbe med den.

En kjempestor takk til Åsmund for at du har vært så hjelpsom, engasjert og tålmodig, og at du alltid har tatt deg tid til å diskutere og svare på mine spørsmål. En bedre veileder enn deg tror jeg neppe eksisterer. Videre vil jeg takke alle i Algeta for å ha tatt så godt imot meg, jeg har hatt det helt supert sammen med dere. En spesiell takk til dere i FoU, som har inkludert meg i arbeidet deres og tatt meg med i ”gjengen”, dere har fått meg til å trives veldig godt.

Takk til Hanne for korrekturlesing, gode idèer og psykisk støtte.

Takk til Gisle, som jeg deler kontor med, for å ha overlevd med en til tider meget stresset versjon av meg selv.

Tusen, tusen takk til min veldig forståelsesfulle samboer Ronny, som har motivert meg og lagt alt til rette for at jeg skulle kunne jobbe med oppgaven min.

Sist, men ikke minst, tusen takk til mine søte små barn, Oda og Theo, som er mine solstråler i hverdagen og gjør at jeg er glad og lykkelig ☺

INNHOOLD

FORORD	2
1. SAMMENDRAG	5
2. FORKORTELSER	7
3. INNLEDNING OG TEORI	9
3.1 Mål med oppgaven	9
3.2 Kreftsykdom	9
3.2.1 Vanlige former for behandling	10
3.2.2 Radioimmunoterapi	11
3.3 Immunoterapi	13
3.3.1 Antistoffer	13
3.3.2 Trastuzumab	15
3.4 Kjelatorer	17
3.5 Væskekromatografi	19
3.5.1 Stasjonærfase	19
3.5.2 Mobilfase	20
3.6 Massespektrometri	21
3.6.1 Elektrospray ionisering	21
3.6.2 Time-of-flight masseanalysator	22
3.7 Prøveopparbeiding	24
3.7.1 Deglykosylering	24
3.7.2 Reduksjon av proteiner og antistoffer	25

4	EKSPERIMENTELT	26
	4.1 Materialer og utstyrslister	26
	4.2 Endelige prosedyrer	29
	4.2.1 Konjugering av DOTA-NCS til Trastuzumab	29
	4.2.2 Deglykosylering	31
	4.2.3 Enzymatisk reduksjon + deglykosylering av konjugat	32
	4.2.4 Beregning av kjelator-antistoff-ratio (DAR)	33
	4.2.5 LC/MS metoder	34
5	RESULTATER OG DISKUSJON	36
	5.1 Innledende forsøk	36
	5.1.1 MaxEnt	36
	5.1.2 Ionekildeoptimalisering	37
	5.1.3 Omvendt-fase-LC/MS	39
	5.2 Partiell validering	44
	5.2.1 Deglykosylering	44
	5.2.2 Injeksjonsvolum	50
	5.2.3 Reduksjon av konjugater	52
	5.2.4 Kolonner og mobilfaser	55
	5.2.5 Analyse av ulike konjugat-batcher	59
	5.2.6 Presisjon	64
	5.2.7 Alternative metoder	65
6	KONKLUSJON	66
7	REFERANSELISTE	68
	VEDLEGG 1	72
	VEDLEGG 2	81
	VEDLEGG 3	94
	VEDLEGG 4	95

1. SAMMENDRAG

Den prekliniske forskningen i farmasiselskapet Algeta har fokus på utvikling av nye behandlingsmetoder mot kreft ved bruk av målrettet alfa-terapi. I denne problemstillingen inngår bruk av modifiserte antistoffer merket med alfa-emitteren Thorium-227.

Modifiseringen innebærer at en kjelator konjugeres til aminosyrene til antistoffet. Dette vil resultere i en heterogen fordeling av antall kjelatorer pr. antistoff. Denne fordelingen og det støkiometriske forholdet mellom kjelator og antistoff må karakteriseres i forbindelse med prekliniske forsøk.

Masteroppgaven omhandler utvikling av en metode for å kunne karakterisere de modifiserte antistoffene. Målet med oppgaven er å utvikle en metode som skal kunne brukes til å bestemme kjelator-til-antistoff ratio (Drug to Antibody Ratio, DAR) for ulike syntesebatcher med varierende støkiometriske forhold. Delere av metoden bør kunne automatiseres og presisjonen bør være bedre enn 10%.

I denne sammenhengen ble det utviklet en LC/MS basert metode for å måle konjugering av kjelatoren DOTA-NCS til antistoffet Trastuzumab ved bruk av gelkromatografi-massespektrometri. Metoden er basert på at konjugatene deglykosyleres med enzymet PNGase F og reduseres til heavy chain og light chain. DAR-verdien ble bestemt for både intakt -og redusert konjugat basert på nominelle støkiometrier fra 1:1 til 15:1. Modifiserte biologiske makromolekyler gir ofte opphav til svært komplekse massespektre på grunn av makromolekylens størrelse samt ladningsfordelingen som følge av elektroprayonisering. Hovedutfordringen i arbeidet har vært å utvikle en metode som gir massespektre med en kvalitet som gjør det mulig å bestemme DAR-verdier etter dataprosessering. Kvaliteten av råspekterne ble funnet å være en funksjon av signalstyrke og kompleksitet. Kompleksiteten av massespekterne til de reduserte konjugatene er mindre sammenlignet med massespekterne av intakte konjugater, noe som bidrar til sikrere bestemmelse av DAR-verdier for konjugater med nominell støkiometri over 5:1. I gelkromatografi-metoden som ble utviklet ble det brukt en kolonne med kolonnedimensjon på 2.0 millimeter indre diameter. Denne kolonnen ga ca. 5.9 ganger større signal for samme injiserte prøvemengde enn ved bruk av tradisjonell kolonnedimensjon på 4.6 millimeter indre diameter. Denne metodeforbedringen sammen med optimalisering av deglykosyleringsprosedyren og ionekildeparametere gjorde det mulig å bestemme DAR-verdier for DOTA-Trastuzumab konjugatene. Presisjonen ble gjennom

partiell validering funnet til å være bedre enn 7% for alle støkiometriske forhold. Det ble vurdert at metoden er egnet til å måle antall DOTA konjugert til Trastuzumab med en nominell støkiometri fra 1:1 til 15:1 i henhold til målsettingen. Analyse av syntesebatcher med ulik støkiometri viste en tilnærmet lineær sammenheng mellom nominell DAR og funnet DAR med et reaksjonsutbytte på gjennomsnittlig 54% for intakte konjugater og 52% for reduserte konjugater (for 4 ulike støkiometrisk forhold). Dette reaksjonsutbyttet er i samme størrelsesorden som tidligere beskrevet i litteraturen. Det ble innledningsvis forsøkt utviklet omvendt fase HPLC-MS og UPLC-MS metoder, men disse ga ikke råspektre med god nok kvalitet til å kunne bestemme antall kjelatorer pr. antistoff. Alternative metoder beskrevet i litteraturen innebærer blandt annet transkjelatering fra Pb (II) arsenazo, radiometrisk titrering med Kobolt-57 eller merking av ligander med Karbon-14. Sammenlignet med disse alternativene er den utviklede LC/MS metoden relativt lite tidkrevende, ikke-radioaktiv og mer generell. I tidlig utviklingsfase innen radioimmunoterapi er det verdifullt å benytte karakteriseringsmetoder som er mer generelle fordi det åpner for mulighet til å bestemme DAR-verdier for konjugater med andre kjelatorer og eventuelt andre antistoffer.

2. FORKORTELSER

α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
λ	Lamda
κ	Kappa
C _n	Hydrokarbonkjede med n karbonatomer
Da	Dalton, molekylvektenhet
DAR	Drug antibody ratio
DOTA	1,4,7,10-Tetraaza(cyclododecane)-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid
DTT	Dithiothreitol
ESI	Electrospray ionization (elektrospray ionisering)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FA	Formic acid (maursyre)
Gy	Grey
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HPLC	High Performance Liquid-Chromatography (væskekromatografi)
ID	Indre diameter
Ig	Immunoglobulin
IgG	Immunoglobulin gruppe G
LC	Liquid Chromatography (væske-kromatografi)
MEA	Monoetanolamin
<i>m/z</i>	Forholdet masse/ladning
mAb	Monoclonal Antibody (monoklonalt antistoff)
MFW	Metallfritt vann
Oac	Acetyl
MPA	Mobilfase A
MS	Massespektrometri
PNGase	Peptid-N-Glykosidase
Rnase B	Ribonuklease B
RP	Reverse phase (omvendt fase)
RSD	Relative standard division (relativt standardavvik)

SEC	Size Exclusion Chromatography (Gel kromatografi)
TFA	Trifluoroacetic acid (trifluoreddiksyre)
T-CEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TOF	Time of flight
U	Units (PNGase enhet)
UPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolet (ultrafiolett)
Q-TOF	Quadrupole Time-of-flight

3. INNLEDNING OG TEORI

3.1 Mål med oppgaven

Thorium-227-DOTA-Trastuzumab har vist lovende prekliniske resultater i musestudier (1;2). Målet med denne oppgaven er å utvikle en LC/MS-metode for å måle graden og fordelingen av DOTA konjugert til Trastuzumab. Dette gjøres med tanke på at modifisering av antistoffer med kjelator kan ha betydning for blandt annet biodistribusjon, og det er behov for en metode som kan måle dette direkte.

En slik metode må ha en presisjon som gjør den egnet til f.eks. sammenlikning av ulike produksjonsbatcher av konjugat. I praksis betyr det at metodepresisjonen for bestemmelse av gjennomsnittlig antall kjelator/antistoff bør være bedre enn ca. 10%.

Nøyaktighet i denne sammenhengen ville innebære å sammenlikne med en alternativ metode, for eksempel en metode basert på ^{14}C merking av kjelatoren, men denne problemstillingen er utenfor omfanget av denne masteroppgaven.

Videre er det en fordel at deler av metoden kan automatiseres fordi det ved slike problemstillinger analyseres relativt mange prøver. Metoden vil være et viktig verktøy for å kunne optimalisere radioimmunokonjugater for prekliniske forsøk.

3.2 Kreftsykdom

Kreft er den største dødsårsaken i den vestlige verden, og 19% av alle dødsfall i Europa skyldes ulike former for kreft (3). Risikoen for å få kreft øker med alder, og på grunn av en stadig økende levealder er insidensen for å få kreft økende. Andre faktorer som bidrar til økende antall registrerte kreft-tilfeller er tidligere diagnostisering og økte screening muligheter (3). De vanligste kreftformene i den vestlige verden er lungekreft, brystkreft, hudkreft, magekreft og prostatakreft (3).

Kreft er definert som uregulert celledeling. De tre vanligste behandlingsformene ved kreftsykdom er kirurgi, strålebehandling og cytostatikabehandling. Behandlingsformene

brukes svært ofte i kombinasjon med hverandre. Dersom en kreftbehandling blir brukt i tillegg til en annen, kalles det adjuvant kreftbehandling. For eksempel vil stråling brukt i tillegg til annen behandling, for å unngå tilbakefall, kalles for adjuvant strålebehandling (4). Alle former for kreftbehandling innebærer stor risiko, og det er behov for grupper av ulike spesialister for å skreddersy behandlinger som er best mulig tilpasset hver pasient.

3.2.1 Vanlige former for behandling

Hvis en tumor blir oppdaget tidlig, og den ikke har spredt seg, kan den ofte fjernes helt eller delvis ved kirurgi. Hvis tumoren derimot har spredt seg, eller ikke er fast, vil ikke kirurgi alene være tilstrekkelig behandling, og må kombineres med cellegift og/eller stråling (5).

Det brukes ca. 50 ulike cellegifttyper i Norge i dag (4), og kurene skreddersys den enkelte pasientens behov. De fleste cellegifter angriper cellens DNA. Kreftcellene deler seg raskere enn kroppens friske celler, og blir derfor mest skadet av cellegiften.

Den viktigste ikke-kirurgiske behandlingsformen ved kreftsykdom er stråling. Den vanligste formen for strålebehandling er høy-energetisk ekstern røntgenstråling (5). Denne formen for stråling brukes på ca. 50 % av pasientene med ondartet kreft (5). Røntgenstrålingen fører til dannelse av høy-energetiske elektroner og frie radikaler som skader kreftcellenes DNA. Dette påvirker cellenes evne til å dele seg (5). Som ved andre typer kreftbehandling vil friske celler også her påvirkes, spesielt celler med rask celledeling, som hudceller eller celler i gastrointestinal-trakten (5).

Kreftvev kan bestråles fra utsiden eller innsiden. Indre strålebehandling kalles brakyterapi (5). Ved brakyterapi kan en radioaktiv kilde føres inn til tumoren. Et eksempel på dette er gammaemitteren Jod-125 som kan settes inn som et permanent implantat ved prostatakreft. Det finnes også betaemittere som brukes i behandling, for eksempel strontium-90 som brukes mot øyekreft (5).

3.2.2 Radioimmunoterapi

Antistoffer er en integrert del av vårt immunsystem. De fester seg til tumorceller eller andre patogener og merker dem slik at flere deler av immunsystemet oppfatter trusselen og kan bidra til å utøve cytotoxisk effekt (6).

Ukonjugerte antistoffer kan brukes som kreft-terapi alene, men det vil ofte være nødvendig med andre terapityper i tillegg, fordi antistoffer alene ikke er spesielt effektive. Antistoffer kan også konjugeres til cytotoxiske komponenter som radioaktive isotoper eller toksiner for å øke toksisiteten (7).

Ved radioimmunoterapi blir antistoffer eller fragmenter av antistoffer konjugert og merket med radioaktive nuklider. Slike har en fordel ved at de i motsetning til cellegift-konjugater ikke må binde fysisk til cellen, eller internaliseres i cellen, for at de skal ha cytotoxisk effekt. Dette er på grunn av lenger rekkevidde (se Tabell 1). Ved radioimmunoterapi er at det hovedsakelig det syke vevet som blir bestrålt og det blir minst mulig skade til friskt vev (7).

Nukleærmedisin nevnes ofte i forbindelse med radioimmunoterapi. Dette er en samlebetegnelse på bruk av radioaktive forbindelser til diagnostisering, studier av sykdommer og til terapi (8). Det finnes mange ulike diagnostiske prosedyrer som kan gi informasjon om mange organsystemer i kroppen (8).

Radioaktive nuklider som brukes diagnostisk sender ut gammastråling som måles med gamma-kameraer, for eksempel Tc-99m. Tc-99m utgjør 80% av antall administrerte doser av radioaktive stoffer per år (7). Jod-125, Jod-123 og Jod-131 er de nuklidene som brukes mest etter Tc-99m (8).

Enkelte radioaktive nuklider virker målsøkende i seg selv, og finner dermed veien frem til kreft-vevet uten å konjugeres til antistoffer. Radioaktivt jod-131 er en slik målsøkende nuklide, som brukes til behandling av overaktivitet eller kreft i skjoldbruskkjertelen (9).

Legemiddelfirmaet Algeta gjennomfører nå en fase III-studie av Alpharadin basert på alfastråling fra den målsøkende nukliden Radium-223 med indikasjon mot benmetastaser i forbindelse med prostatakreft. Alfastråling er svært energirik, og har potensiale til å drepe kreft-cellene mer effektivt enn betastråling, men har også kortere rekkevidde i vev enn betastråling.

Det finnes bare ett terapeutisk radiofarmaka med markedsføringstillatelse i Norge. Dette legemidlet heter Zevalin og inneholder Y-90 (yttrium), som er en betaemitter. Indikasjonen for dette legemidlet er folikulært lymfom (10).

Det er flere radioimmunokonjugater under utvikling, både med alfa og beta emittere (1;2;11). Farmasiselskapet Algeta har et alfaemitterende konjugat med Thorium-227-Trastuzumab under utprøving (1).

Betastrålingen (elektroner) kan ødelegge fra noen få cellediameterer til flere millimeter i vev (12). Alfa stråling består av høyenergetiske heliumkjerner som har mulighet til mer omfattende ødeleggelse i vevet som blir bestrålt. Den cytotoksiske effekten av alfaemittere krever stor grad av målrettet akkumulering i kreftvev (12).

Den ideelle radionukliden for bruk i antistoff-basert kreftbehandling er lite ødeleggende på friskt vev, har passende halveringstid både med tanke på produksjon, distribusjon og bruk, den forblir konjugert til antistoffet i kroppen, og skilles enkelt og fort ut av kroppen sammen med antistoffet. (12;13). Man kan se for seg at det i fremtiden vil utvikles flere produkter der alfa-emittere er konjugert til antistoffer for en mer effektiv og spesifikk cytotoksisk effekt på tumorvev. De radioaktive nuklidene som brukes i nukleærmedisin er enten dannet i en kjernereaktor eller fremstilt ved rensing av fisjonsmateriale (nuklide som ”produserer” radioaktive isotoper) (8).

Tabell 1: Eksempler på radionuklider som kan brukes i målrettet radioterapi, deres halveringstid og rekkevidde i vev (5;5).

Radionuklide	Halveringstid	Emittert partikkel	Rekkevidde i vev
Y-90	2.7 dager	β	5 mm
I-131	8 dager	β	0,8 mm
Cu-67	2.5 dager	β	0,6 mm
Au-199	3.1 dager	β	0,3 mm
Ra-223	10.4 dager	α	50-100 μ m
Th-227	18.7 dager	α	50-100 μ m

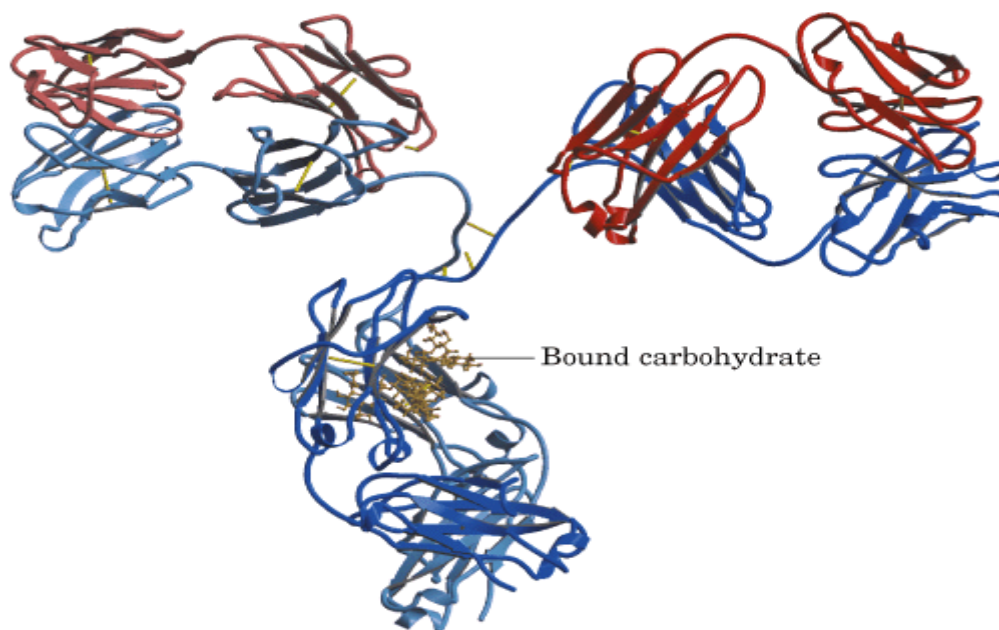
3.3 Immunoterapi

3.3.1 Antistoffer

Antistoffer finnes som en del av immunsystemet i kroppen vår, og blir også kalt immunoglobuliner (7). De blir syntetisert av B-lymfocytter, eller plasmaceller, i respons på tilstedeværelsen av ukjente substanser. Antistoffene kan ha mange ulike funksjoner; de kan blant annet nøytralisere toksiner og immobilisere mikroorganismer (14). Antistoffene kan også samarbeide med andre deler av kroppens immunforsvar ved å merke antigener, slik at antigenene kan ødelegges ved for eksempel fagocytose (6;7).

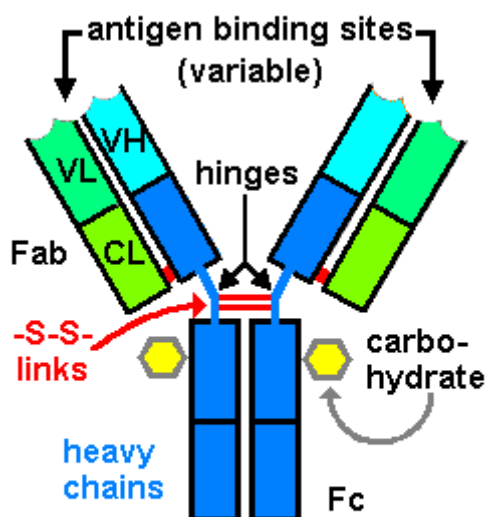
Et antistoff består av to identiske heavy chains, og to identiske light chains. I antistoffet holdes light chains og heavy chains sammen av disulfidbroer. I tillegg inneholder antistoffer intrakjede disulfidbroer, det vil si disulfidbroer på overflaten av antistoffet (7). Etter variasjon i heavy chain er antistoffene delt inn i 5 klasser, eller isotyper: IgA, IgD, IgE, IgG og IgM. IgG er den isotypen som forekommer hyppigst i blod og lymfe (7). Trastuzumab som det jobbes med i denne oppgaven er et IgG-antistoff. Et IgG antistoff inneholder til sammen 16 disulfidbroer (15).

3D strukturen til IgG er vist i Figur 1.



Figur 1: Generell 3D struktur av IgG. Det blå representerer heavy chain, det røde er light chain, og det gule er karbohydratkjeder (16).

Antall og lokalisering av inter-disulfidbroer og lengden av hinge-regionen (den fleksible delen av heavy chain, se Figur 2) er faktorer som bidrar til forskjeller mellom de ulike klassene av antistoff (17). Light chain og heavy chain deles inn i flere ulike undergrupper, og sammensetningen varierer mellom ulike antistoffer. Innen et antistoff molekyl er derimot alltid de to heavy chains identiske, og de to light chains identiske (6).



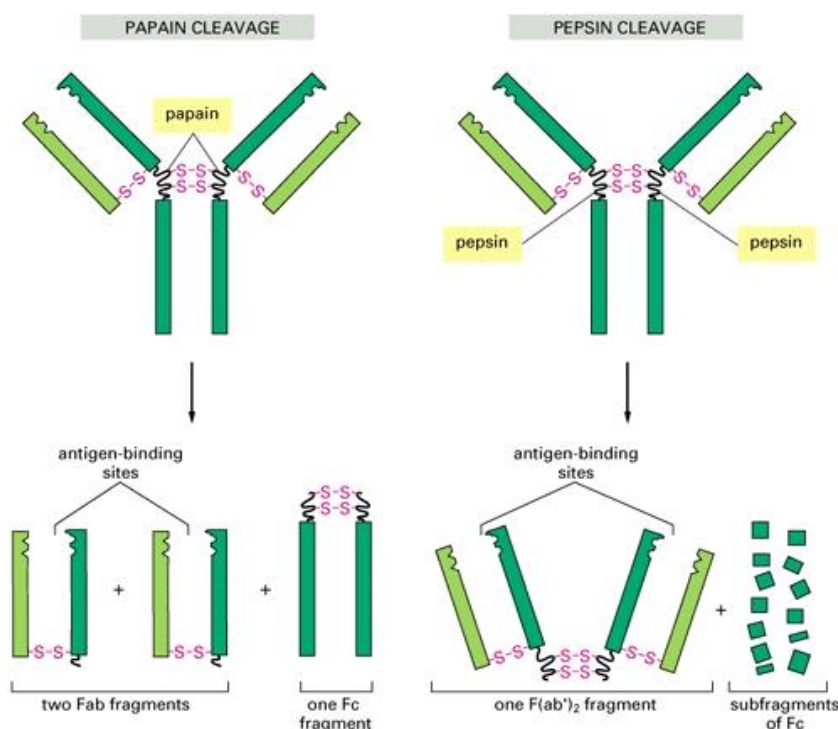
Immunoglobulin G (IgG)

Figur 2: IGg Antistoffets ulike deler; her vises også disulfidbroer, hingeregion, antigen bindingssetet og glykosyleringen (18).

De fleste antistoffer er glykosylerte, som regel på en asparaginsekvens på FC-domenet nederst på heavy chain (se Figur 2) (15). De variable områdene ytterst på light og heavy chain, definerer antigenspesifisiteten og utgjør antigenbindingssetet (6).

Det kan lages derivater av antistoffer som fremdeles er funksjonelle og har antigenbindingssete. Enzymatisk degradering med enzymet papain gir to fragmenter som hver inneholder antigen-bindingsseter (kalles Fab fragmenter), og et stort fragment som inneholder de to heavy chains (kalles Fc for fragment crystallizable), se Figur 2 (6). Fc fragmentet vil ikke lenger være funksjonelt etter en slik spalting.

Spesifikk spalting av disulfid-bindingene i hinge-regionen med pepsin gir et $f(ab')_2$ fragment som inneholder to antigenbindingssteder og flere ufunksjonelle subfragmenter av Fc (6)



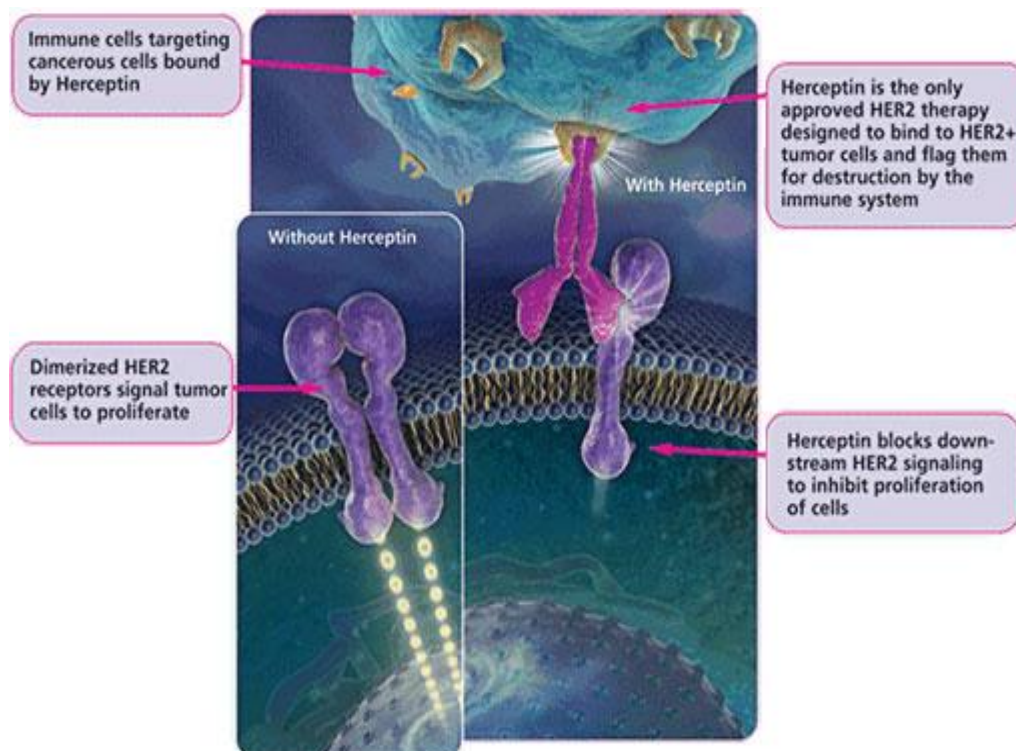
Figur 3: Antistoff fragmenter som blir dannet ved spalting av disulfidbroer med papain og pepsin (19).

3.3.2 Trastuzumab (Herceptin®)

Trastuzumab er et mye brukt humanisert monoklonalt antistoff mot blant annet brystkreft (20), produseres i eggstokkcellene til kinesiske hamstere (15). At et antistoff er humanisert vil si at deler av antistoffet fra dyr er byttet ut med antistoff fra menneske. Humanisering av antistoff kan være nødvendig fordi proteiner fra andre dyrearter kan gi problemer når de skal benyttes i mennesker. Eksempelvis kan mennesker starte å produsere antistoffer mot antistoffene fra mus. Antistoffene fra mennesket vil da binde seg til antistoffene fra musen, noe som fører til at immunforsvaret kvitter seg med dem (7).

Trastuzumab binder til HER2-reseptoren som er amplifisert på celleoverflaten til kreftcellene i 25% av brystkrefttilfellene (15). At en reseptor er amplifisert vil si at det er flere reseptorer uttrykt enn det vanligvis ville vært. En amplifisering av HER2-reseptoren indikerer en mer aggressiv form for brystkreft enn i de tilfellene der det ikke er amplifisering av reseptoren (5). Trastuzumab er indikert for HER2-positiv brystkreft og ventrikkelkreft (20).

Ved binding av agonist til HER2 sendes et signal inn i cella via en kaskade-reaksjon, se Figur 4. Signalene stimulerer celledeling (5). Ved binding av Trastuzumab til HER2-reseptoren blokkeres disse signalene og fører til inhibert cellevekst (5). Trastuzumab binder til det ekstracellulære området av HER2 reseptoren. I tillegg til å hindre celledeling setter Trastuzumab igang en immunrespons som hjelper til med å bekjempe kreftcellene (6).



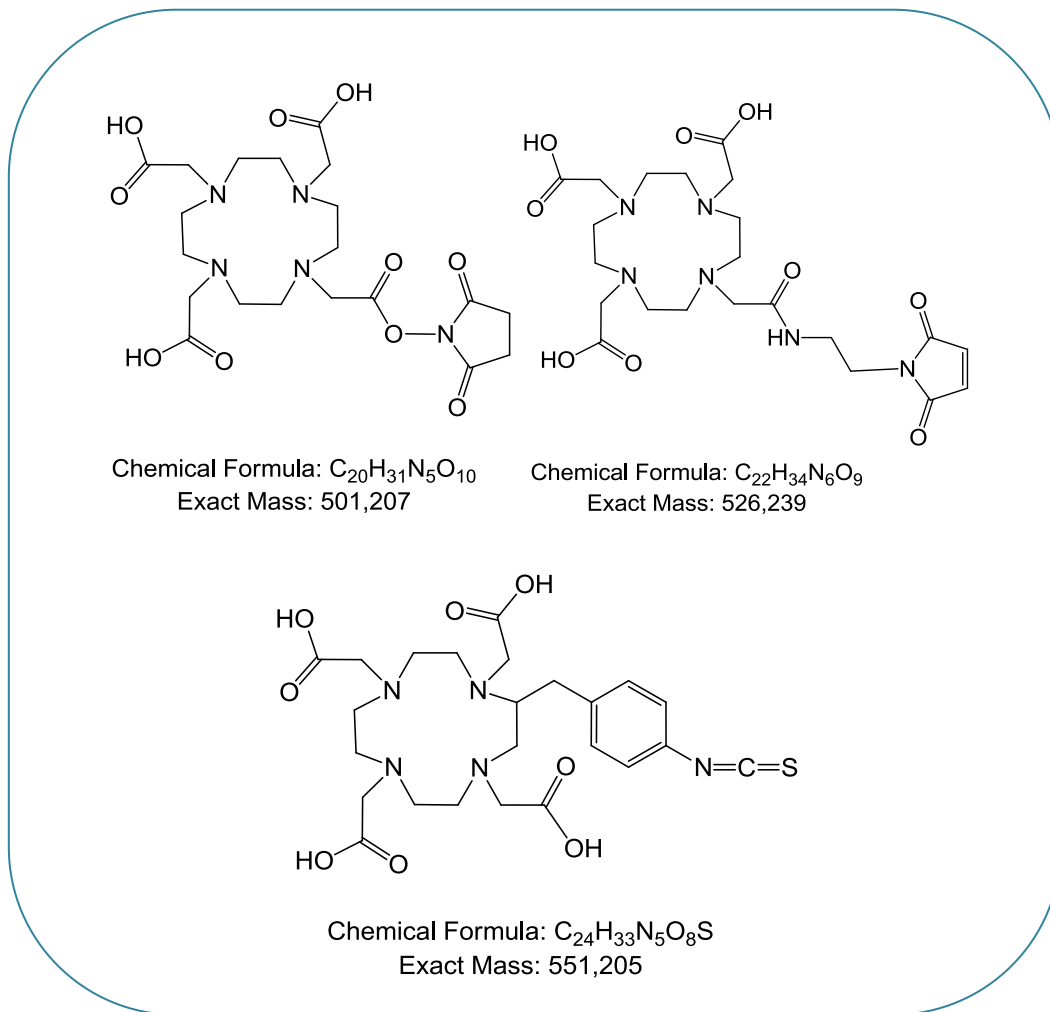
Figur 4: Virkningsmekanisme for Trastuzumab. Trastuzumab binder ekstracellulært på HER2 reseptoren og inhiberer en kaskadereaksjon. I tillegg rekrutteres immunceller (21).

Hele aminosyresekvensen til Trastuzumab er oppgitt på internett (22;23). Utfra denne sekvensen har Trastuzumab en molekylvekt på 145531.5 Da. Produsenten av Trastuzumab, Genentech, oppgir derimot ikke den fulle sekvensen. De beskriver i tillegg muligheten til i en viss grad å endre på aminosyresekvensen innenfor markedsføringstillatelsen av Trastuzumab, noe som fører til at den eksakte molekylvekten til antistoffet vil kunne variere (24).

3.4 Kjelatorer

Antistoff-konjugater spiller en stadig økende rolle i terapi mot kreft og andre sykdommer (13). Antistoffene har flere funksjonelle grupper som er passende for modifisering og konjugering. Vanligvis blir antistoffene modifisert på primær-aminet på sidekjeden til lysin, som det finnes 88 stykker av på Trastuzumab (25). Primær-aminet finnes som oftest på overflaten av antistoffet og er dermed lett tilgjengelig (26). Både degradering med papain og trypsin gir eksponerte sulfhydryl-grupper som kan konjugeres.

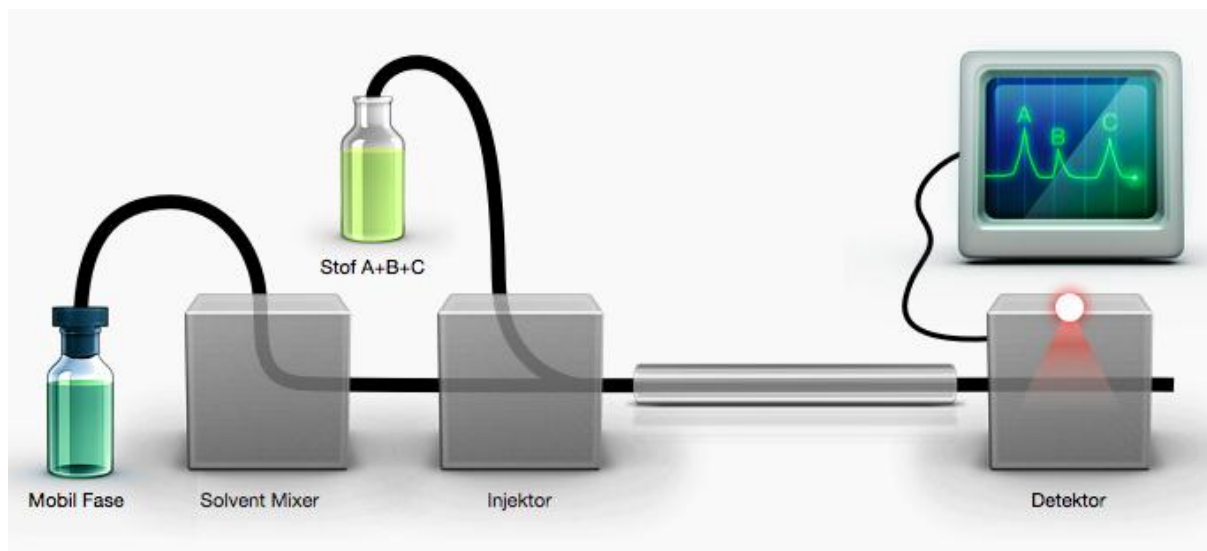
Mange nuklider kan kun bindes til antistoffer ved hjelp av en kjelator. En slik kjelator er 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA), Figur 5. DOTA kan blant annet koordinere enkelte radioaktive nuklider og danne forholdsvis stabile komplekser. DOTA kan funksjonaliseres med flere ulike koblingsgrupper, noen av de vanligste er en reaktiv NHS-ester (DOTA-NHS), DOTA med en maleimid gruppe og DOTA med en aromatisk isotiocyanatgruppe (DOTA-NCS), se Figur 5. DOTA-NCS og DOTA-NHS konjugeres til aminosyren lysin, og DOTA-Maleimid konjugeres til cystein (26). I denne oppgaven er DOTA-NCS brukt for konjugering til Trastuzumab.



Figur 5: Molekylstrukturer av DOTA-NHS, DOTA-maleimid og DOTA-NCS. Molekylvektene er oppgitt under strukturene.

3.5 Væskekromatografi

HPLC står for High Performance Liquid Chromatography. For bestemmelse av legemidler i farmasøytiske preparater og i biologisk materiale er væskekromatografi den mest brukte metoden (27). Komponenter i en prøve separeres fra hverandre, og får ulike retensjonstider som er karakteristisk for de ulike komponentene. Selv om retensjonstiden sterkt indikerer en viss komponent, kan andre komponenter ha samme retensjonstid. Dersom man bruker et massespektrometer som detektor har man større mulighet til spesifikk deteksjon og identifikasjon av molekyler.



Figur 6: Skisse av væskekromatografi-systemet. Mobilfasene pumpes gjennom solvent mikseren til injektor. Analyttmolekylene injiseres via injektoren inn i væskestrømmen. Analyttmolekylene separeres i kolonnen og detekteres (28).

3.5.1 Stasjonærfase

Stasjonærfasen består vanligvis av modifiserte silikapartikler på 3-10 μm for HPLC (27;29). En av de vanligste modifiseringene i omvendt-fase-HPLC er å feste en kjede med 18 karbonatomer til silikapartiklene. Ved gelfiltrering separeres stoffer etter størrelse, og det brukes en stasjonærfase som ikke interagerer med stoffene som skal separeres. Det er mest

vanlig å bruke omvendt-fase kromatografi i forbindelse med LC/MS. Ultra performance liquid chromatography (UPLC) er en videreutvikling av HPLC der det brukes mindre partikler i kolonnene. Mindre partikkelstørrelse gir bedre separasjon enn de tradisjonelle HPLC-kolonnene. I tillegg tåler UPLC-kolonner høyere trykk. Det kan dermed benyttes en høyere flow, og analysetiden blir kortere enn ved bruk av en tilsvarende HPLC-kolonne.

3.5.2 Mobilfase

For at en væske skal kunne brukes som mobilfase i LC-MS må den oppfylle visse kriterier (27) :

- Den må være transparent i det masseområdet som skal benyttes, altså må den ikke gi forstyrrende signal i massespektrometeret ved samme masse-til-ladnings ratio (m/z) som analytt molekylene.
- Den må løse analyttmolekylene.
- Den må ha HPLC-kvalitet.
- Den må ha lav viskositet slik at det ikke blir for høyt trykk når den pumpes gjennom kolonnen.
- Den bør være lite toksisk, lite brennbar, ikke reaktiv og lett å destruere etter bruk.

Mobilfasene tilpasses analyttmolekylene og det brukes ofte en blanding av ulike løsningsmidler. Mobilfasen kan pumpes gjennom kolonna med en konstant sammensetning, kalt isokratisk eluering. Hvis sammensetningen av mobilfaser varieres under analysen kalles dette gradienteluering. Gradienteluering kan være spesielt nyttig dersom man skal separere molekyler med svært ulik retensjonstid. For eksempel kan elueringsstyrken på mobilfasen økes mot slutten av analysen for å få ut de mer lipofile molekylene.

De vanligste detektorene som benyttes i legemiddelanalyse er UV-detektor, fluorescensdetektor, elektrokjemisk detektor, brytningsindeksdetektor og massespektrometer (27).

Eksempler på vanlige mobilfaser benyttet innen væskechromatografi er aceton, acetonitril, etanol, metanol og vann (27)

3.6 Massespektrometri

Massespektrometeret kan benyttes som detektor i forbindelse med HPLC. Når prøven føres inn i massespektrometeret blir analyttmolekylene ionisert, enten til positive eller negative ioner. Molekylioner kan være ustabile og fragmentere i ionekilden (27) Massen til ionene bestemmes ved at de akselereres inn i en masseanalysator hvor ionene separeres i et magnetisk eller elektrostatisk felt etter forholdet mellom masse (m) og ladning (z). Deretter registreres mengden av ioner som dannes i en detektor.

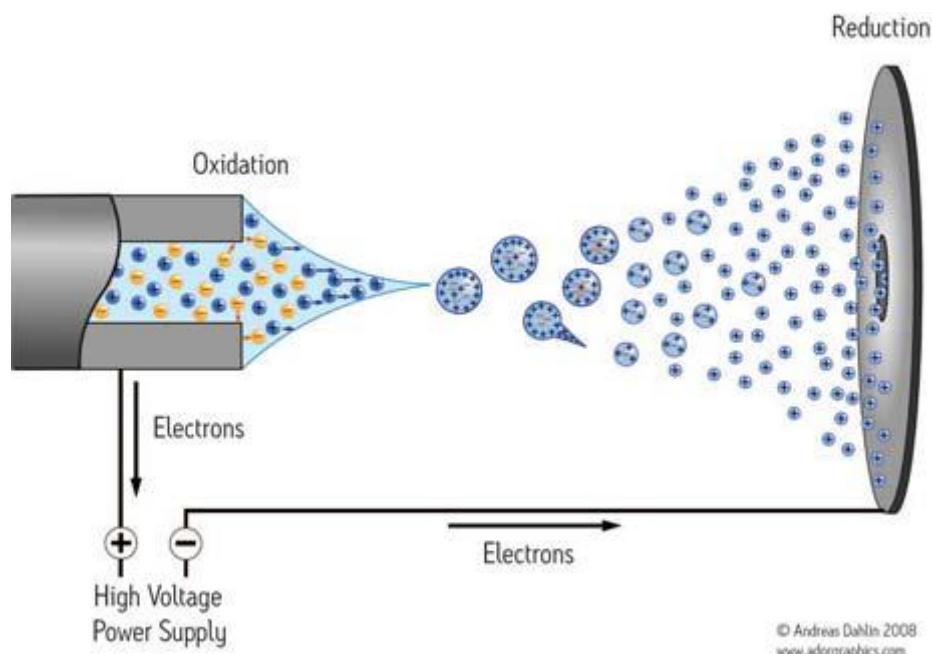
Massespektrene kan benyttes kvantitativt og til å identifisere forbindelser.

Massespektrometeret utfyller LC ved at detektoren kan skille mellom stoffer med lik retensjonstid, men ulik m/z , forutsatt at man ikke har ioneundertrykkelse. Ioneundertrykkelse kan forekomme ved co-eluering av to analytter. Da kan det ene analyttmolekylet ta ladningen fra det andre, og kun det ladede molekylet vil vises i massespektret.

3.6.1 Elektrosprayionisering

Elektrosprayionisering (ESI) er en ioniseringsteknikk innen massespektrometri. Den anses for å være en ”myk” ioniseringsteknikk fordi det stort sett dannes molekylioner og addukt-ioner. Ved ESI blir prøven introdusert til massespektrometeret i væskestrømmen fra HPLC-kolonnen via et kapillærrør. Ved enden av kapillærrøret forstøves væsken ved hjelp av høy spenning og nitrogengass og det dannes en aerosol av ladede analytt-ioner. Mellom kapillærrøret og en elektrode er det pålagt et potensial som vanligvis er på 2-5 kV. Analyttmolekylene vil forbli ladet, og ionene trekkes inn i masseanalysatoren. I masseanalysatoren måles m/z , se Figur 7 (27).

Ioner fra samme analyttmolekyl kan få ulike antall ladninger i ionekilden, i råspekteret fra massespektrometeret vil alle ladningsfordelingene bli vist (13).



Figur 7: Prinsipp for elektrosprayionisering. Væskestrømmen fra HPLC kolonnen forstøves til en aerosol av ladete partikler, og ionene i gassfase trekkes videre inn i masseanalysatoren ved hjelp av et elektrisk felt (30).

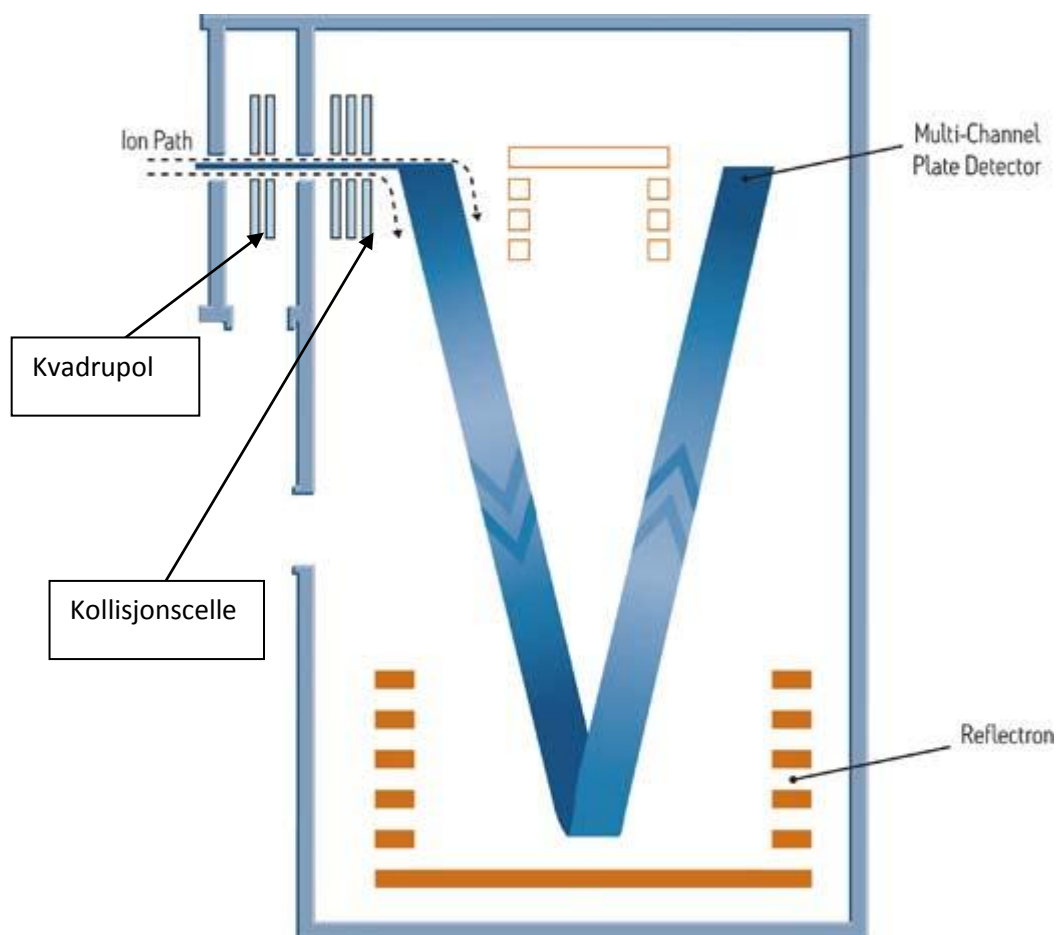
3.6.2 Time-of-flight masseanalysator

I time-of-flight (TOF) masseanalysatoren akselereres ionene i et vakuum-rør. Hastigheten til ionene er avhengig av m/z , det vil si at tyngre ioner vil bevege seg saktere enn lette ioner, slik at de lette ionene vil nå detektoren først. Under vises et forenklet uttrykk for sammenhengen mellom m/z og flyvetiden i TOF-MS (31):

$$m/z = 2Vt^2/D^2$$

der m = massen til ionet, t = tiden det tar fra ionet er akselerert til det når detektoren, V =hastigheten til ionet og D =lengden av flyverøret.

Detektoren sitter i den andre enden av flyverøret og massen til ionene bestemmes av flyvetiden. kvadrupolen (se Figur 8) kan benyttes i MS/MS som et massefilter ved at det selekterer ut ioner av interesse. I kollisjonscellen (se Figur 8) kan ionene fragmenteres til mindre ioner hvis man er interessert i fragmenteringsmønsteret. Fordelene med TOF-MS er at den kan måle ioner i et meget stort masseområde, at scantiden er kort, og at instrumentet under visse forutsetninger, som lengre flyverør, kan benyttes med relativt høy oppløsning.



Figur 8: Skisse av time-of-flight masseanalysator med reflekteringsrør. Analyttmolekylene kommer inn som ioner og akselereres til samme kinetiske energi. De tyngste ionene beveger seg saktere enn de lette. Massen til ionene bestemmes av flyvetiden. Kvadrupolen kan benyttes til MS/MS hvis man ønsker å isolere en bestemt m/z . I kollisjonscellen kan ionene fragmenteres og gi strukturinformasjon.(32).

3.7 Prøveopparbeiding

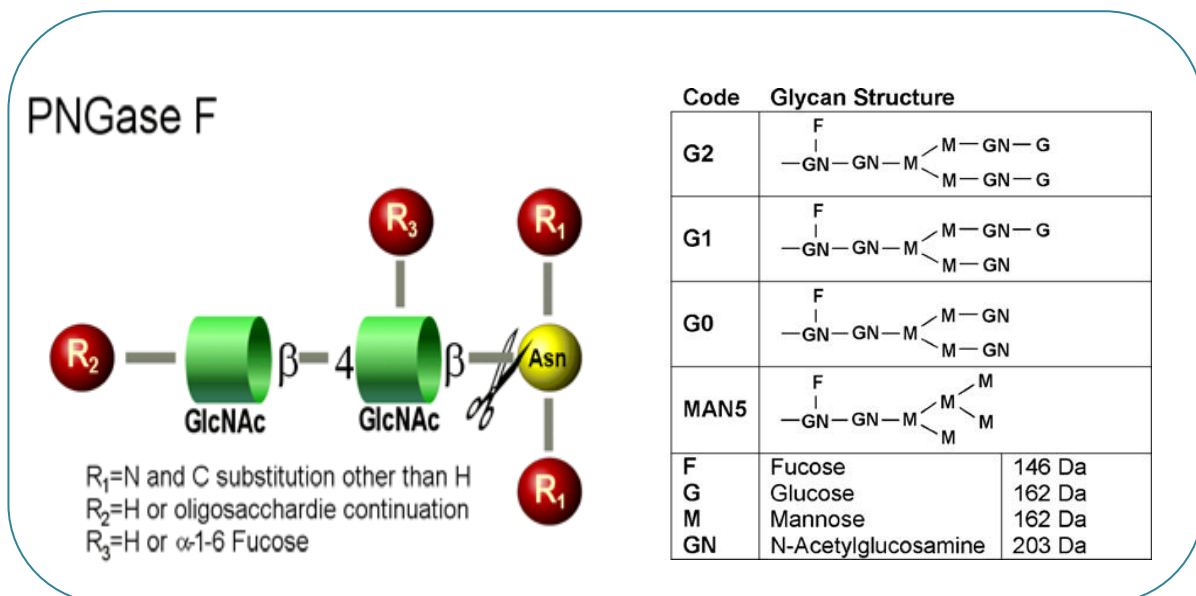
3.7.1 Deglykosylering

Antistoffer er vanligvis glykosylerte. Hvor mange glykaner et antistoff inneholder vil variere, og er opphav til heterogenitet i molekylvekten (15).

For å studere strukturen og funksjonen til et antistoff, kan det være gunstig å fjerne glykanene. Massespektrene med de glykosylerte antistoff-konjugatene er ofte svært komplekse fordi de heterogene glykankjedene fører til flere m/z i massespekteret. På IgG-antistoffer er glykankjedene linket via en amidbinding på aminosyren asparagin (14;15). Ved fjerning av N-linkede glykaner reduseres heterogeniteten ved TOF-MS analyser (14).

Trastuzumab er glykosylert på heavy chain. De vanligste glykanene er vist i Figur 9.

Flere metoder kan benyttes for deglykosylering av antistoffer. En av disse metodene er kjemisk basert, men en slik metode kan skade proteinet (14). Enzymatiske metoder er mildere og gjør det mulig å fjerne bestemte klasser av glykaner samtidig som man hindrer både protein- og glykan-degradering. Peptid N-glykosidase F (PNGase F) er et av de mest brukte enzymene for deglykosylering av N-linkede glykaner fra glykoproteiner (33). Ved deglykosylering deamineres glykosylert asparagin til asparaginsyre.



Figur 9: PNGase F (34). Enzymet klipper karbohydratkjedene ved aminosyren asparagin. De vanligste glykanstrukturene er beskrevet (20).

3.7.2 Reduksjon av proteiner og antistoffer

Det kan ved flere anledninger være ønskelig å redusere konjugater. For eksempel, dersom man har komplekse spektre kan disse bli forenklet ved reduksjon av konjugatene. I tillegg er det gunstig å redusere dersom det er av interesse å finne fordelingen av kjelatorer på light og heavy chain.

Disulfidbroene som holder antistoffet sammen kan spaltes og gi to identiske heavy chain, og to identiske light chain. Dette kan gjøres med reduksjonsmidler som monoetanolamin (MEA), dithiothreitol (DTT) eller tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP). Antistoffreduksjon gjøres som oftest i nærvær av etylendiamintetraacetic acid (EDTA) for å forhindre metallkatalysert reoksidering av sulfhydrylgrupper og for å hindre eventuelle kjelatorer i å binde metaller under prøveopparbeiding av antistoff-konjugatene.

4. EKSPERIMENTELT

4.1 Materialer og utstyr brukt i oppgaven

Tabell 2: Antistoff brukt i oppgaven.

Antistoff	Handelsnavn	Leverandør
Trastuzumab	Herceptin ®	Roche

Tabell 3: Utstyr brukt under arbeidet med oppgaven

LC-MS	Type	Leverandør	Part nr.
LC	Acquity UPLC	Waters	-
Detektor	XEVO Q-TOF MS	Waters	-
Software	Masslynx	Waters	-
Kolonner	TSK Gel Super SW 3000, 4.6 x 300 mm, SEC, 4 µm partikler	Tosoh Bioscience	S35W350TRM
	TSK Gel Super SW 3000, 2.0 x300 mm, SEC, 4 µm partikler	Tosoh Bioscience	S0005
	Acquity UPLC BEH 200, C4, 2.1 x 100 mm, 1.7 µm partikler	Waters	186004496
	Massprep micro desalting column 2.1 x 5 mm	Waters	186004032

Tabell 4: Kjemikalier brukt under arbeidet med oppgaven

Kjemikalie	Kvalitet	Leverandør	Part nr.
Maursyre, HCOOH	LC-MS	Fischer	A117-50
Vann	LC-MS	Fischer	W/0112/17
Acetonitril (ACN)	LC-MS	Fischer	A/0638/17
Trifluoreddiksyre (TFA)	Spectro grade	Sigma	302031
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	-	BDH Biochemical	4438826
<i>tris</i> (2-carboxyethyl)Phosphine (T-CEP)	-	Sigma-Aldrich	C4706-2G
”Reaksjonsbuffer”	20 mM ammonium bicarbonat i MFW	Sigma	PP0202 (deglykosylerings kit)
Peptide-N-glycosidase F (PNGase F)	50 U	Sigma	P7367
	300 U	Sigma	P7367
Natriumklorid, NaCl	0.9% NaCl i MFW	Sigma-Aldrich	S9625
Boratbuffer	0.07 mM borax i MFW	Sigma	B-3545
1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N,N'',N'''-tetraacetic acid-NCS (DOTA-NCS)	-	Macrocyclics	B-205
Metallfritt vann	-	Fluka	95305

Tabell 5: Annet utstyr brukt under arbeidet med oppgaven

Utstyr	Type	Leverandør	Part nr.
Vialer	12 x 32 mm	Waters	186000307C
	300 µl	Chromacol	03-PPSV
Lokk til vialer		Chromacol	8-SC
Inserts	6 x 29 mm, 300 µl	Waters	WAT094170
Vortex mikser	MS1 Minishaker	IKA	
Pipettespisser	10 µl, 200 µl, 1 ml, 5 ml	Finntipp, ART Molecular Bioproducts	-
Automatpipetter	0.5-10 µl, 20-200µl, 200-1000µl, 0,5-5ml	Finnpipette	-
Vekt	AG 135	Mettler Toledo	-
Sentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf	-
Amicon ultra-4 sentrifuge filtre	Cutoff 30 kDa	Millipore	UFC803096
Thermomixer	Thermomixer confort	Eppendorf	-
Gel-filter kolonner	10-DG	Biorad	732-2010

4.2 Endelige prosedyrer

4.2.1 Konjugering av DOTA-NCS til Trastuzumab

I oppgaven ble det valgt å jobbe med fire ulike inngående støkiometrier av DOTA-Trastuzumab: 15:1, 10:1, 5:1 og 1:1. Grunnen til at disse støkiometriene ble valgt er fordi dette støkiometriske området har vist å være relevant og kan ha betydning for biodistribusjon (11).

Konjugering ble utført i henhold til litteraturprosedyre og tilpasset (35).

- 0,9% NaCl løsning ble sterilfiltrert
- Gelfiltreringskolonnene 10-DG ble kondisjonert med sterilfiltrert NaCl løsning.
- Deretter ble det tilsatt 6 ml av antistoff med kons 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ fordelt på 3 10-DG kolonner (2 ml i hver). Deretter ble det tilsatt 1 ml 0.9% NaCl løsning, til waste.
- Det ble eluert med 3 ml 0.9% NaCl løsning og 3ml protein fraksjon ble samlet opp. Kolonnen har en recovery på ca. 95% i henhold til leverandøren, og inneholdt nå ca. 6,3 mg/ml filtrert antistoff.
- De 9 ml ble så splittet i 4 x 2ml, for 4 ulike støkiometrier
- Hvert av de 4 rørene inneholdt da 12.6 mg Trastuzumab
- Deretter ble det tilsatt ca. 1:1 (v/v) med borat buffer (borax), 70 mM, for å nå en pH på ca. 9.
- DOTA-NCS ble veid ut og løst i MFW til en konsentrasjon på 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- Følgende mengde DOTA-NCS ble tilsatt i 4 ulike 5 ml rør (se Tabell 6):

Tabell 6: Oversikt over tilsetning ved konjugering. Inkuberes over natt ved 37 °C.

Reagens	Volum	Vekt	Molare mengder
Trastuzumab	2 ml	12,6 mg	0,084 nmol
Boratbuffer	2 ml		0,07 M
DOTA:			
15:1	86,4 µl	864 µg	1,26 µmol
10:1	57,6 µl	576 µg	0,84 µmol
5:1	28,8 µl	288 µg	0,42 µmol
1:1	5,8 µl	58 µg	0,085 µmol

Molekylvekt for DOTA er 686 g/mol (med salter).

- De 4 reaksjonsblandningene ble inkubert over natt ved 37°C
- Etter ca. 20 timer ble overskudd av ureagert ligand fjernet med Amicon Ultra-4 sentrifuge filter. Reaksjonsløsningen ble spunnet ned og det ble gjort et 2 x 4ml buffer skifte til sterilfiltrert 0,9% NaCl. Retentatet ble fortynnet til 10 µg/µl og fordelt i eppendorfrør med 1mg konjugat (100µl). Dette ga 12 rør av hver støkiometri.
- Konjugatene ble oppbevart ved -18°C.

4.2.2 Deglykosylering

Det ble brukt et deglykosyleringskit fra Sigma som inneholdt følgende: PNGase F (50 eller 300 Units), ribonuklease B (Rnase B, en glykoprotein standard), 10 x Reaksjons buffer (20 Mm ammonium bikarbonate buffer, pH 8.5), Octyl β -D-glucopyranoside (100 mg) og 2-Mercaptoethanol (0,90 ml)

Reagenser brukt til deglykosyleringen:

- DOTA-NCS-Trastuzumab 100 μ g (10 μ g/ μ l)
- Reaksjonsbuffer (10x) ble fortynnet med metallfritt vann til 1x reaksjonsbuffer
- PNGase F (50U eller 300U)
Ble tilsatt metallfritt vann til en konsentrasjon på 500 mU/ μ l og whirlmikset.
- EDTA 5 μ g/ μ l: 5mg EDTA ble løst i 1ml metallfritt vann

Deglykosyleringsprosedyre:

1. 90 μ l 1x reaksjonsbuffer (ammoniumbikarbonat-buffer pH 8.5)
2. 5 μ l EDTA (ca. 100 ganger molart overskudd i forhold til antistoff)
3. 10 μ l av DOTA-Trastuzumab konjugat 10 μ g/ μ l (100 μ g)
4. 10 μ l av PNGase F 500 mU/ μ l (5 U)

Inkuberes ved 37°C i 3 timer

Tabell 7: Deglykosyleringsprosedyre for intakt konjugat. Inkuberes ved 37 °C i 3 timer.

Reagens	Konsentrasjon	Mengde, μ l
Reaksjonsbuffer	20 mM NH_4HCO_3	90
EDTA	25 μ g (0,067 mol)	5
Konjugat	100 μ g (0,67 mol)	10
PNGase F	5 units	10
Totalt		115

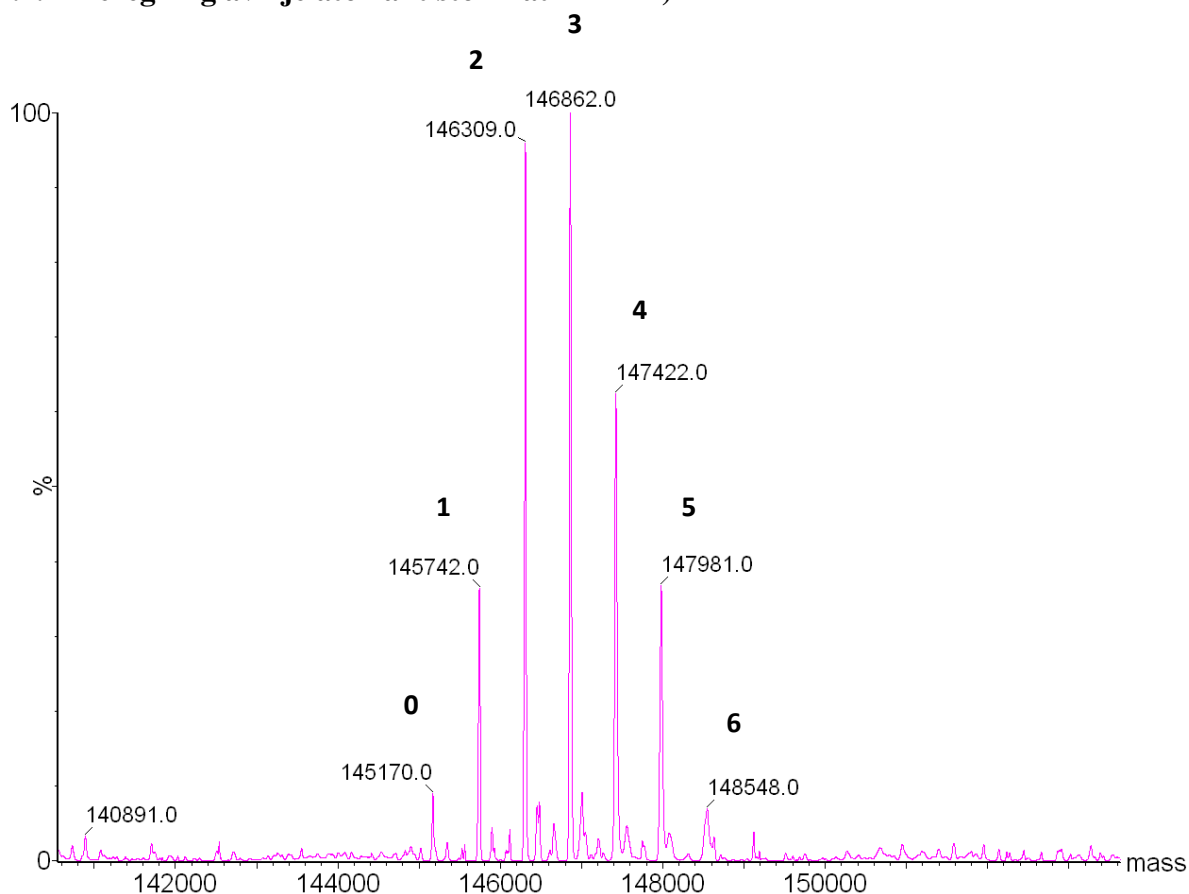
4.2.3 Enzymatisk reduksjon + deglykosylering av konjugat

Reduseringsprosedyre med T-CEP ble valgt i denne oppgaven. Prosedyren ble videreutviklet til også å omfatte deglykosylering. 10 µl 0,5M Na-acetat, pH 5,5 ble tilsatt 100 µg konjugat (i 10 µl 0,9% NaCl). Deretter ble det tilsatt 1,9 µl av 10 µg/µl T-CEP løsning (ca. 100 ganger molart overskudd i forhold til antistoff).

Tabell 8: Redusering og deglykosyleringsprosedyre

Redusering av antistoffer		
Substans	Konsentrasjon	Mengde (µl)
Konjugat	10 µg/µl	10
NaOAc	0,5 M	10
T-CEP	10 µg/µl	1,9
EDTA	10 µg/µl	2,5
Total		24,4
Inkuberes i 30 min. ved romtemperatur		
+ Deglykosylering:		
Reaksjonsbuffer x 1	20 mM	80
PNGase F	0,5 U/µl	10
Inkuberes ved 37 °C i 3 timer		

4.2.4 Beregning av kjelator-antistoff-ratio (DAR)



Figur 10: Eksempel på deglykosylert DOTA-Trastuzumab 5:1. Her representerer m/z -signalene konjugat med 0-6 DOTA-ligander.

DAR verdien er et uttrykk for hvor mange kjelatorer som i gjennomsnitt er konjugert til antistoffet.

Drug antibody ratio (DAR) kan regnes ut fra følgende formel:

$$\text{DAR} = \frac{\text{Sum}(n \cdot A_n)}{\text{Sum } A_n}$$

Her er n lik antall kjelatorer og A_n er lik intensitet av antistoff-konjugat-topp tilsvarende n kjelatorer (13).

I dette tilfellet ser man fra 0-6 kjelatorer per antistoff, n er derfor fra 0-6.

Ved utregning av DAR-verdier summeres intensitetene på alle m/z -signalene som representerer antistoff og kjelator. Intensiteten av hver enkelt m/z -signal deles på denne

summen og multipliseres med antall kjelatorer for det aktuelle m/z -signalene. For å få et mål på reaksjonutbyttet for konjugeringen beregnes også DAR funnet/DAR nominell.

4.2.5 LC/MS metoder

Det ble utviklet en metode som kan benyttes for å bestemme antall kjelatorer på intakt og redusert konjugat.

Tabell 9: Kromatografiske parametre for intakt og redusert konjugat ved bruk av gelfiltrerings-kolonner

Parametre	
Mobilfase A	H ₂ O + 0.1 % TFA
Mobilfase B	ACN + 0.1 % TFA
Kolonne	TSK Gel Super SW 3000, 2.0 mm x 3000 mm, SEC, 4 µm partikler
Kolonne temperatur	Rom-temperatur
Injeksjonsvolum (µl)	10-15
Flow (ml/min)	0,050-0,075
Total run tid	14 min.

Ved analyse av reduserte konjugater ble det brukt en flow på 50 µl/min og et injeksjonsvolum på 15 µl. Ved analyse av intakte konjugater ble det brukt en flow på 75 µl/min og et injeksjonsvolum på 10 µl.

Tabell 10: MS metode

Opptakstid	3-10 minutter (waste 0-3 min. og 10-14 min.)
Masseområde (Da)	1000-4000
Ionisering	ESI+
Scan tid (sek.)	1
Cone spenning (V)	55
Massekalibrering (1000-4000 Da)	NaI, bedre enn 3 mDa

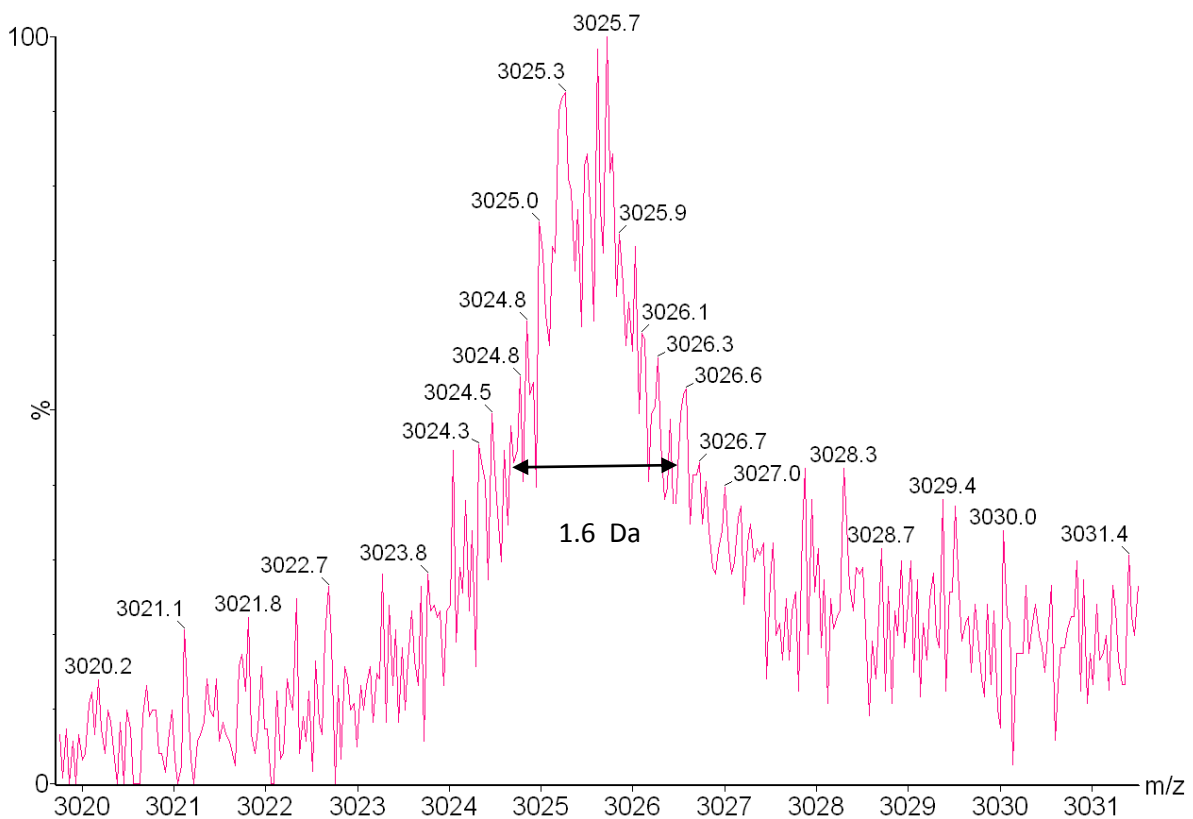
Det ble benyttet forstøvergass (nitrogengass) flow på 800L/time, 100°C i ionekilden og en desolveringstemperatur på 400°C.

5. RESULTATER OG DISKUSJON

5.1 Innledende forsøk

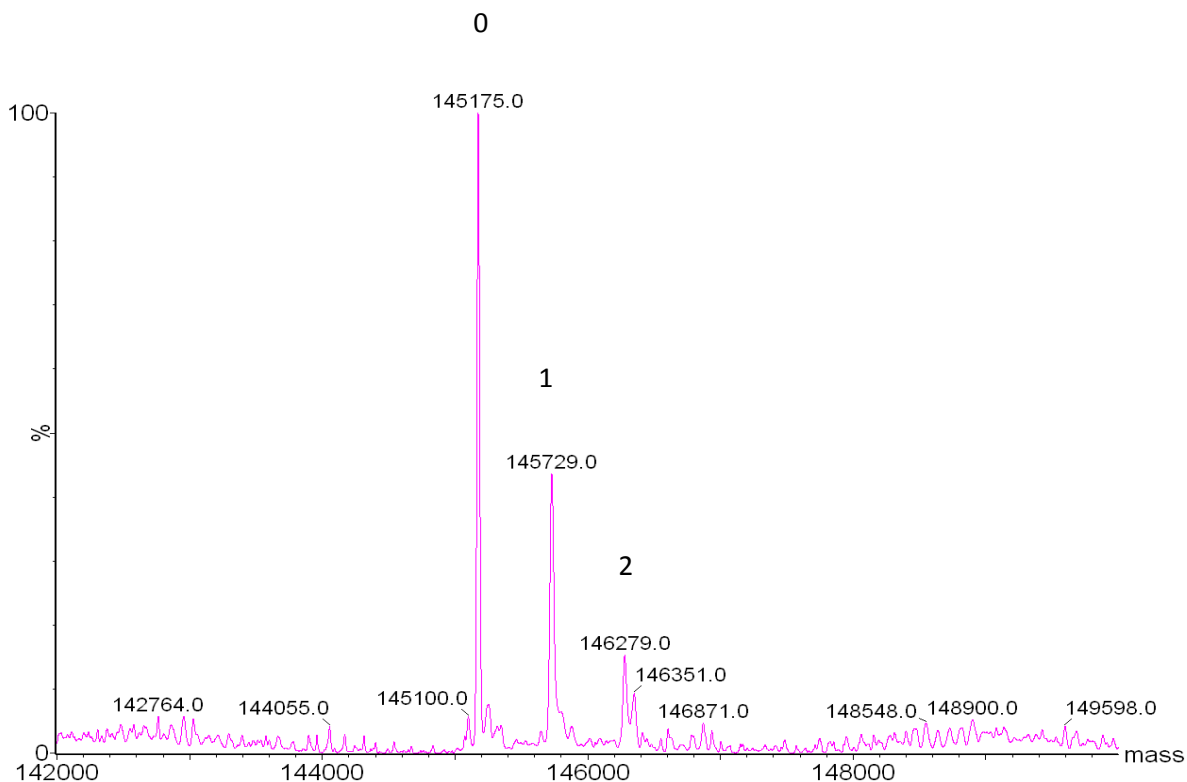
5.1.1 MaxEnt

MaxEnt er en integrert del av Masslynx programvare til HPLC og benyttes til å konvertere et massespekter med flere ladninger til én ladning ($z=1$). Det fylles inn to parametre, den ene er ”resolution Da/channel”. Her er det i denne oppgaven alltid brukt en verdi på 1, som foreslått av leverandøren av Masslynx (Waters). Det ble også forsøkt verdier fra 0,2-5 uten at det ble observert synelige forskjeller på spekterne. Den viktigste parameteren er ”uniform gaussian width at half hight”. Her måles bredden av toppen ved halve høyden på det aktuelle råspekteret slik veiledningen til programmet beskriver og som vist i Figur 11.



Figur 11: Detaljer i massespekteret til deglykosylert DOTA-Trastuzumab 1:1. Toppbredden ved halve høyden måles her til 1,6 Da.

Figur 12 viser dekonvolvert spekter for den målte bredden ved halve topphøyden.



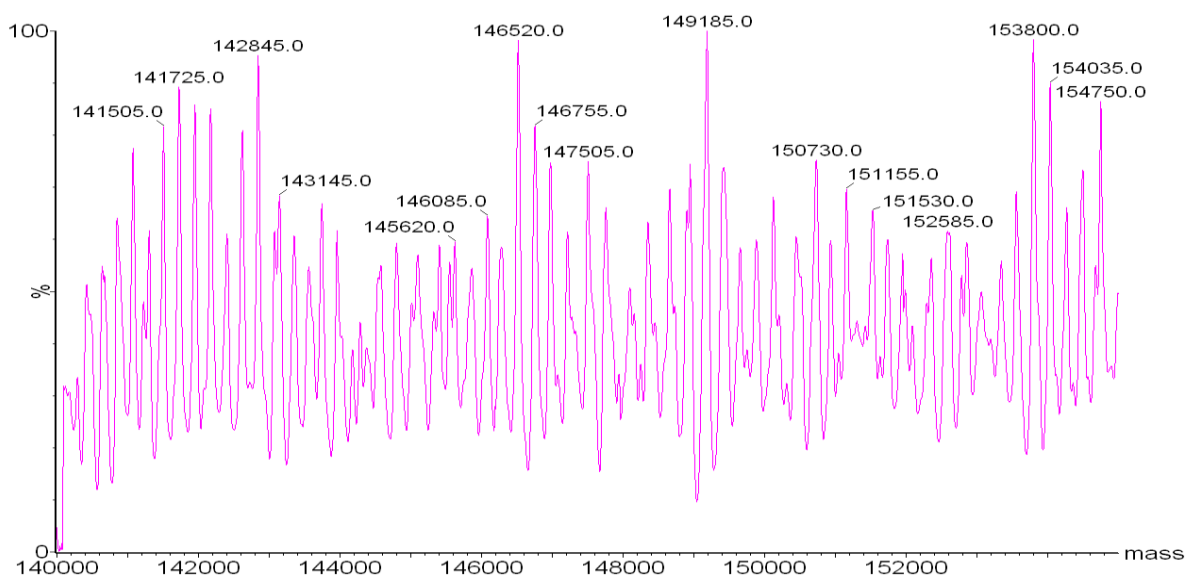
Figur 12: Dekonvolert spekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 1:1. MaxEnt-parametre 1:1,6. Signalene representerer antistoff + 1-2 DOTA.

5.1.2 Ionekildeoptimalisering

Det ble gjort optimalisering av conespenningen for analyse av antistoff-konjugater. Det ble observert at høyere conespenning ga bedre signal og bedre spekterkvalitet. Optimal conespenning i metoden ble funnet til 55 V. Høyere conespenning førte til fragmentering og lavere signal. Conespenningen ble testet i området 35-80V.

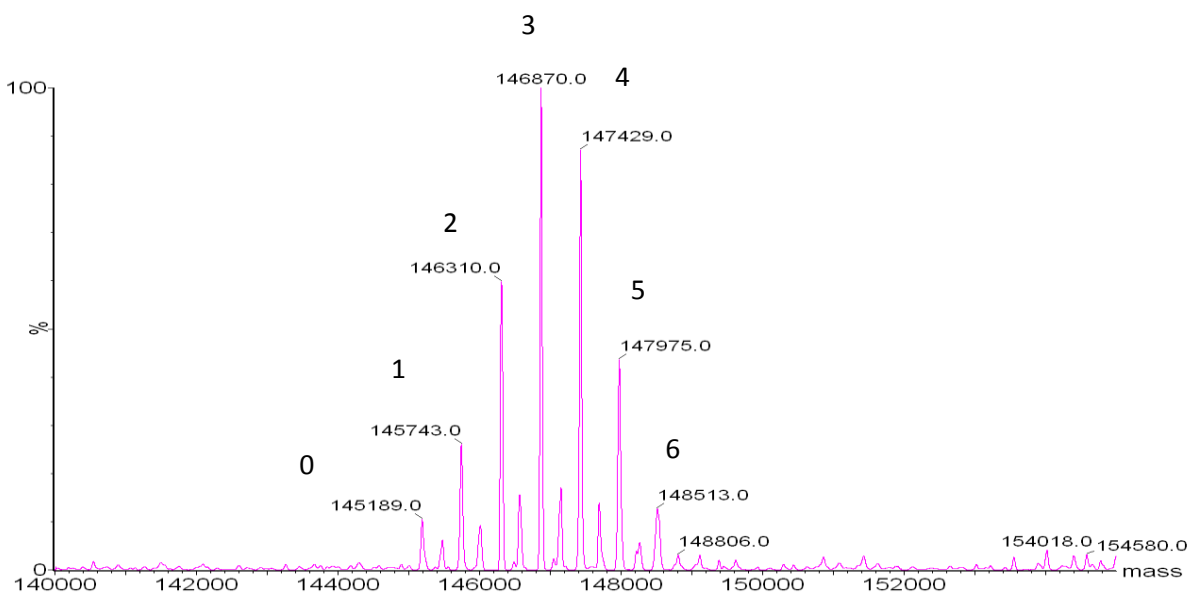
Det ble også testet med kapillærspenning fra 2,5-4 kV. Det ble ikke observert at dette hadde noen stor betydning for resultatene.

Av Figur 13 ser man at dekonvolert spekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 5:1 ikke gir noe informasjon med en conespenning på 40V.



Figur 13: Dekonvolert spekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 5:1 med conespenning på 40 V.

Figur 14 viser samme prøve analysert med en conespenning på 55V.



Figur 14: Dekonvolert spekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 5:1 med conespenning på 55 V. Signalene representerer antistoff + 1-6 DOTA

5.1.3 Omvendt fase LC/MS

Det ble forsøkt utviklet en metode for omvendt-fase-kromatografi på både intakte og reduserte konjugater.

Tabell 11-14 viser LC/MS parametre brukt under forsøkene med omvendt-fase-kolonnene.

Tabell 11: Kromatografiske parametre for intakt og redusert konjugat ved bruk av omvendt-fase-kolonne

Kolonner	UPLC BEH C4 1.7 μ m 2.1 x 100 mm	Massprep micro desalting column 2.1 x 5 mm
Mobilfase A	H ₂ O + 0.1 % FA	H ₂ O + 0.1 % FA
Mobilfase B	ACN + 0.1 % FA	ACN + 0.1 % FA
Kolonne temperatur	80 °C	80 °C
Injeksjonsvolum	10 μ l	15 μ l
Flow	0,6 ml/min	0,2-0,5 ml/min

Tabell 12: LC-gradient for intakt og redusert konjugat ved bruk av C4 omvendt-fase-kolonne. Gradienten er utviklet under arbeidet med oppgaven.

Tid (min)	Flow (ml/min)	A%	B%
0	0,6	80	20
5,5	0,6	73	27
7,0	0,6	50	50
7,5	0,6	50	50
8,0	0,6	80	20
9,0	0,6	80	20

Tabell 13: LC-Gradient for intakt og redusert konjugat ved bruk av desalting omvendt-fase-kolonne. Gradienten er hentet fra Water`s hjemmeside (32).

Tid (min)	Flow (ml/min)	A%	B%
0,0	0,5	90	10
0,5	0,5	90	10
0,51	0,2	90	10
2,0	0,2	0	100
2,5	0,5	0	100
2,6	0,5	90	10
3,1	0,5	0	100
3,2	0,5	90	10
3,7	0,5	0	100
3,8	0,5	90	10
5,0	0,5	90	10

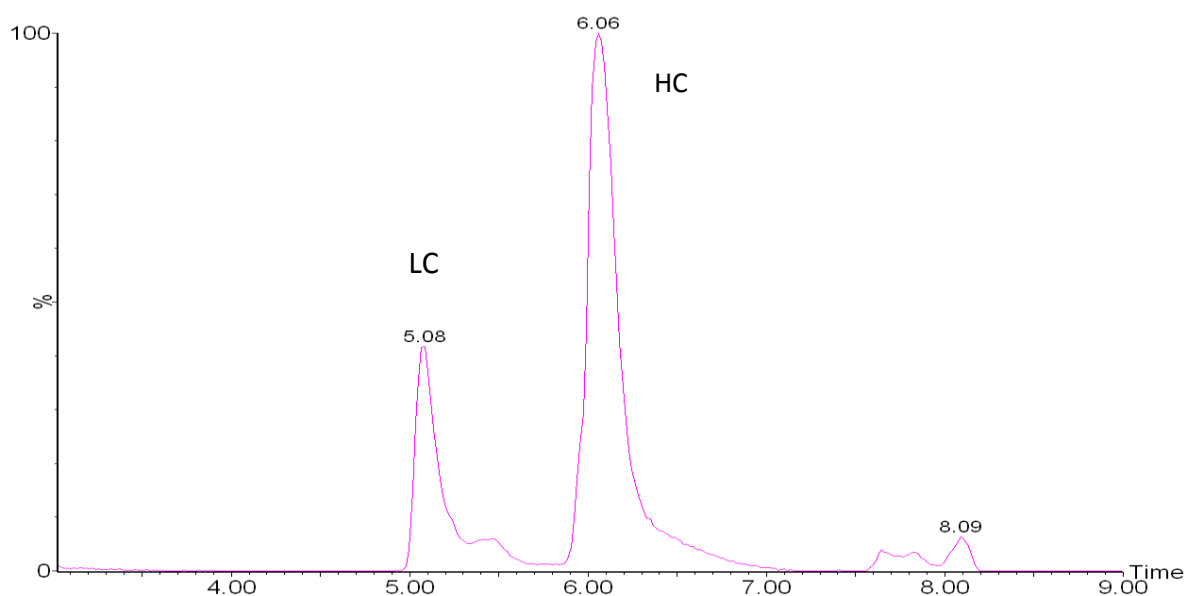
Tabell 14: MS-metode for intakt og redusert konjugat ved bruk av omvendt-fase-kolonne

Kolonne	UPLC BEH C4 1.7 μ m 2.1 x 100 mm	Massprep micro desalting column 2.1 x 5 mm
Run tid (min)	7,5	5
Masse område (Da)	1000-4000	1000-4000
Ionization mode	ESI+	ESI+
Scan tid (sek)	1	1
Cone spenning(V)	55	55
Masse kalibrering (1000-4000 Da)	NaI, bedre enn 3 mDa	NaI, bedre enn 3 mDa

Det ble brukt en forstøvergass (nitrogengass) flow på 800L/time, 100°C i ionekilden og en desolveringstemperatur på 400°C.

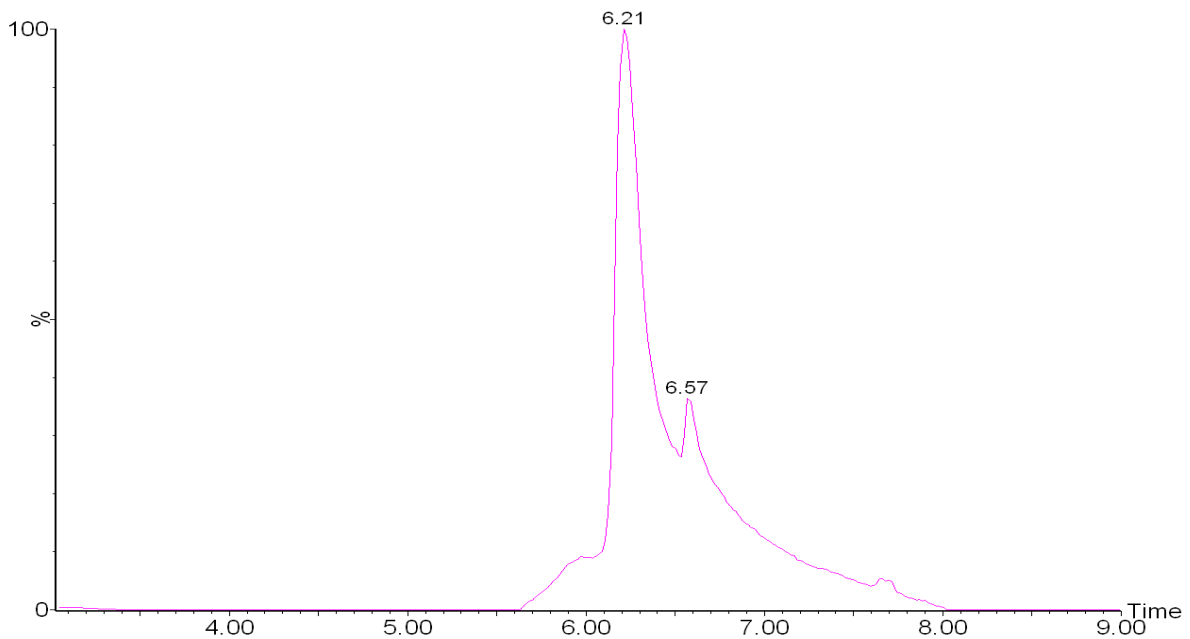
Analyse av intakt antistoff-konjugat på C4 omvendt-fase-kolonnen ga symetriske kromatografiske topper, men spekterkvaliteten ble dårlig.

Ved analyse av redusert antistoff uten kjelator på C4 kolonnen oppnås separasjon av light og heavy chain, se Figur 15.



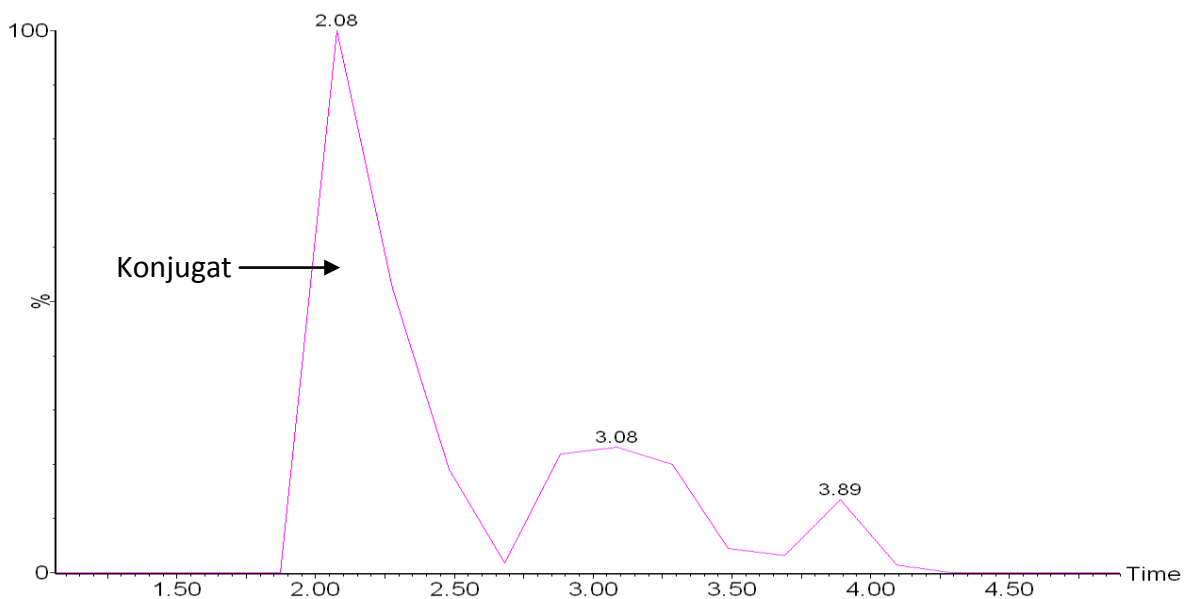
Figur 15: Kromatogram av redusert Trastuzumab på C4 omvendt-fase-kolonne. Light chain=5.08 min, heavy chain=6.06 min.

Ved analyse av redusert DOTA-Trastuzumab 15:1 på C4 omvendt fase kolonne sklir toppene for light og heavy chain sammen, se Figur 16, og det oppnås ikke separasjon. Det samme gjelder for de andre støkiometriene av konjugat.

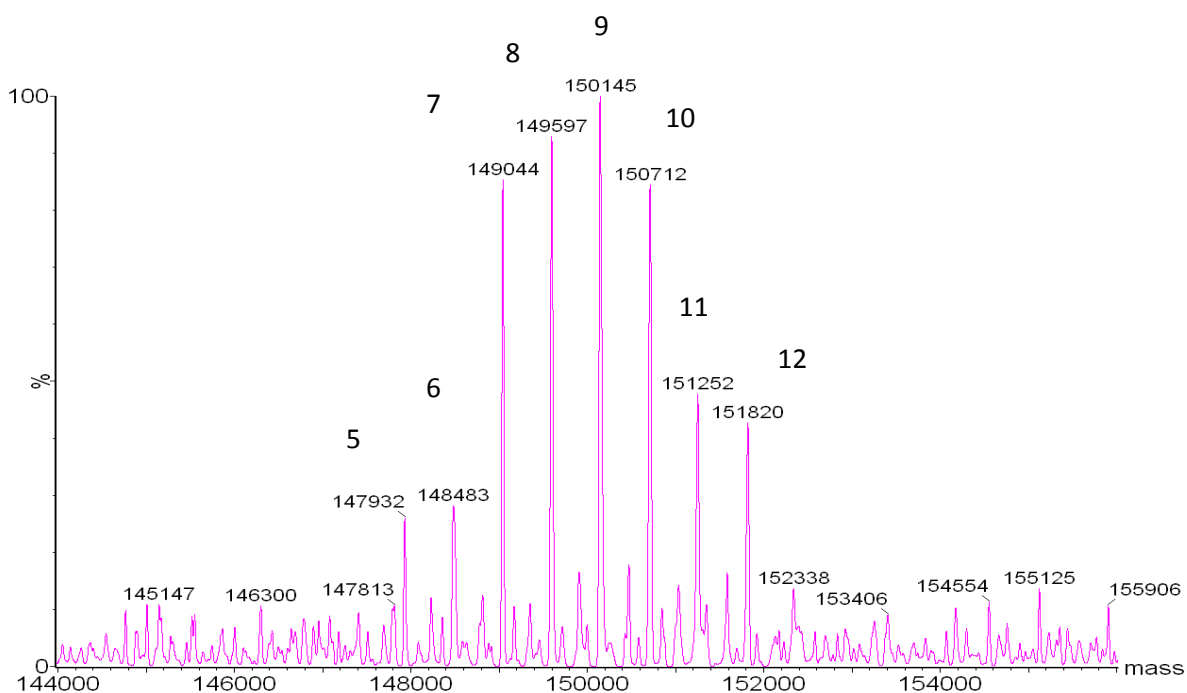


Figur 16: Kromatogram av redusert deglykosylert DOTA-Trastuzumab 15:1 på C4 omvendt-fase-kolonne. Det oppnås ikke separasjon av light og heavy chain.

På grunn av utilfredsstillende resultater både på intakt og redusert konjugat på C4-kolonnen, ble det valgt å teste en desalting-kolonne, som også er en omvendt-fase-kolonne. Heller ikke denne kolonnen ga separasjon av light og heavy chain ved analyse av reduserte konjugater, men ga relativt gode dekonvulerte spektre ved analyse av intakt antistoff-konjugat, se Figur 18. På desalting-kolonnen ble det brukt en annen gradient enn for C4 kolonnen, se Tabell 13.



Figur 17: Kromatogram av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 15:1 på desalting omvendt-fase-kolonne. Den første toppen på 2.08 min. inneholder konjugatet, de andre toppene inneholder forurensinger og/eller systemtopper fra gradienten.



Figur 18: Dekonvolvert spekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 15:1 på desalting omvendt-fase-kolonne. Toppene representerer antistoff + 5-12 DOTA.

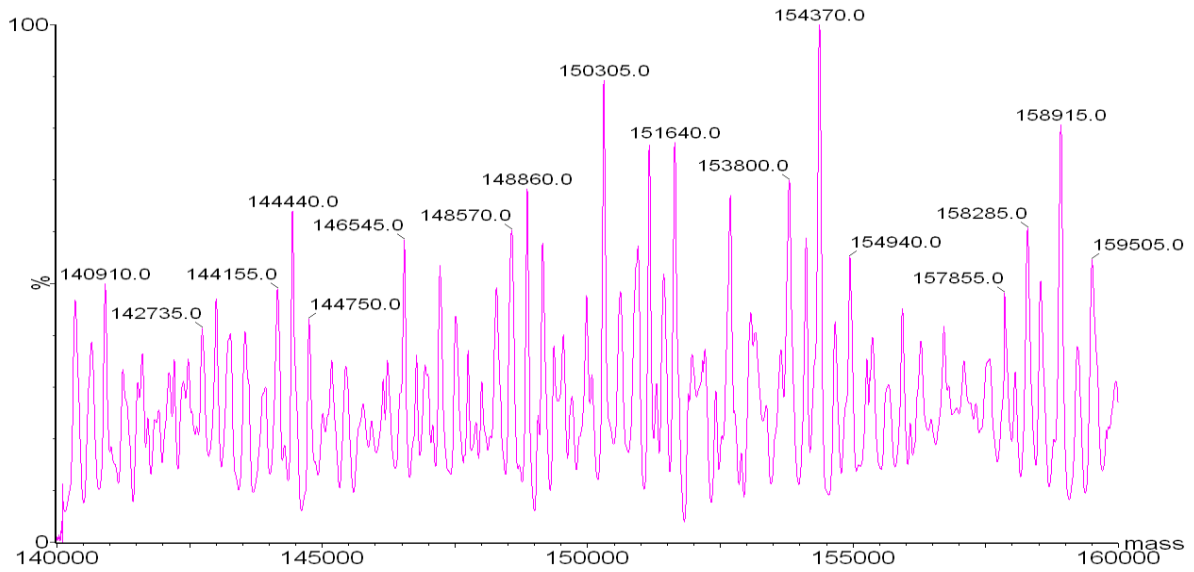
Fordeler ved bruk av omvendt-fase-metoden er at den er rask, og at mobilfasen med maursyre er mer kompatibel med massespektrometeret enn trifluoreddiksyre, som brukes ved gel-kromatografi. Trifluoreddiksyre er kjent for å kunne gi ionesuppresjon i MSen.

Heller ikke metoden for analyse av antistoffer ved bruk av desalting-omvendt-fase kolonne kan ses på som tilfredstillende. Metoden kan ikke brukes på reduserte antistoffer, og de dekonvulerte spektrene av intakt antistoff er preget av støy og antydninger til satellittopper mellom antistoff-konjugat toppene, se Figur 18. Av kromatografien (se Figur 17) kan det virke som det er problemer med å få alt konjugat ut av kolonnen, noe som potensielt kan føre til problemer med carryover. Problemet med satellitt-topper og carryover er observert i tidligere publiserte studier med omvendt-fase-kromatografi av antistoff-konjugater (13).

5.2 Partiell validering

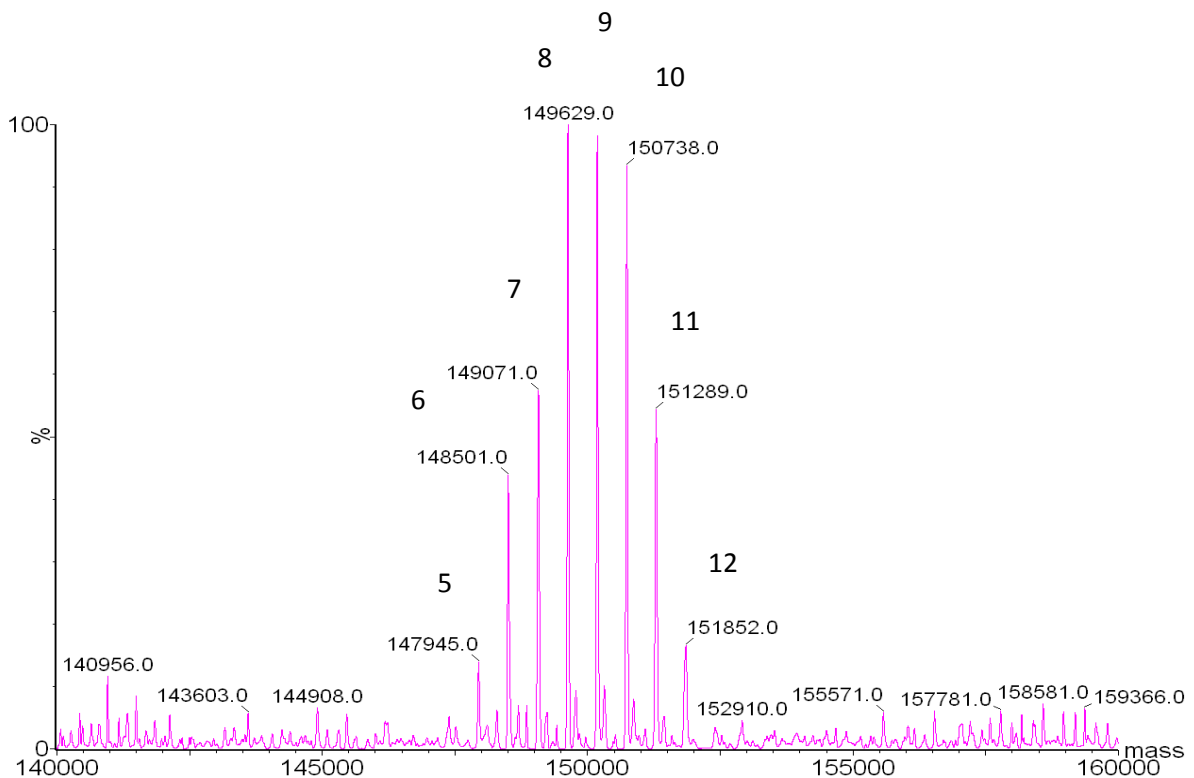
5.2.1 Deglykosylering

De første antistoff-konjugatene ble analysert uten deglykosylering. Råspektrene fra disse prøvene var svært komplekse og de dekonvulerte spektrene ga ingen informasjon, se Figur 19. Glykanenes heterogenitet fører til komplekse råspektre når antistoffet er konjugert. Det ble derfor utviklet en metode for å fjerne disse enzymatisk ved hjelp av PNGase F.



Figur 19: Eksempel på dekonvolert spekter av intakt DOTA-Trastuzumab 15:1 på gelfiltreringskolonne

Etter deglykosylering ble det en helt annen kvalitet på spekterne, se Figur 20.



Figur 20: Eksempel på dekonvolert spekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 15:1 på gelfiltreringskolonne, fordeling av ligander fra 5-12 DOTA

I starten av arbeidet med denne oppgaven ble prøvene deglykosylert over natt i henhold til produsentens prosedyre med varierende mengde PNGase tilsatt. Dette ble ikke sett på som optimalt. Derfor ble det gjort en serie med forsøk der målet var å finne ut hvilke mengder PNGase som var nødvendig for komplett deglykosylering og hvor lang tid deglykosyleringsreaksjonen tok.

Deglykosyleringsprosedyren som ble brukt var den samme som beskrevet under endelige prosedyrer (kapittel 4.2.2), bortsett fra ulike mengder PNGase. Det ble laget 6x5 prøver med DOTA-Trastuzumab 15:1 og 6x5 prøver Trastuzumab som ble deglykosylert med følgende mengder PNGase: 50 mU, 500mU, 1U, 2U og 5U. Reaksjonene ble stoppet ved tilsetning av 10 µl 3.8M NaOAc. PNGasen har et pH-optimum ved 8.6, og vil ikke fungere ved pH 3.8 (33). Reaksjonene ble stoppet ved 6 ulike tidspunkter

Tabell 15 viser en oversikt over resultatene fra deglykosyleringsforsøkene.

Tabell 15: Oversikt over deglykosylering med ulike mengder PNGase F og ulike inkubasjonstider . -= intakte glykaner, /=delvis deglykosylert og X=fullstendig deglykosylert.

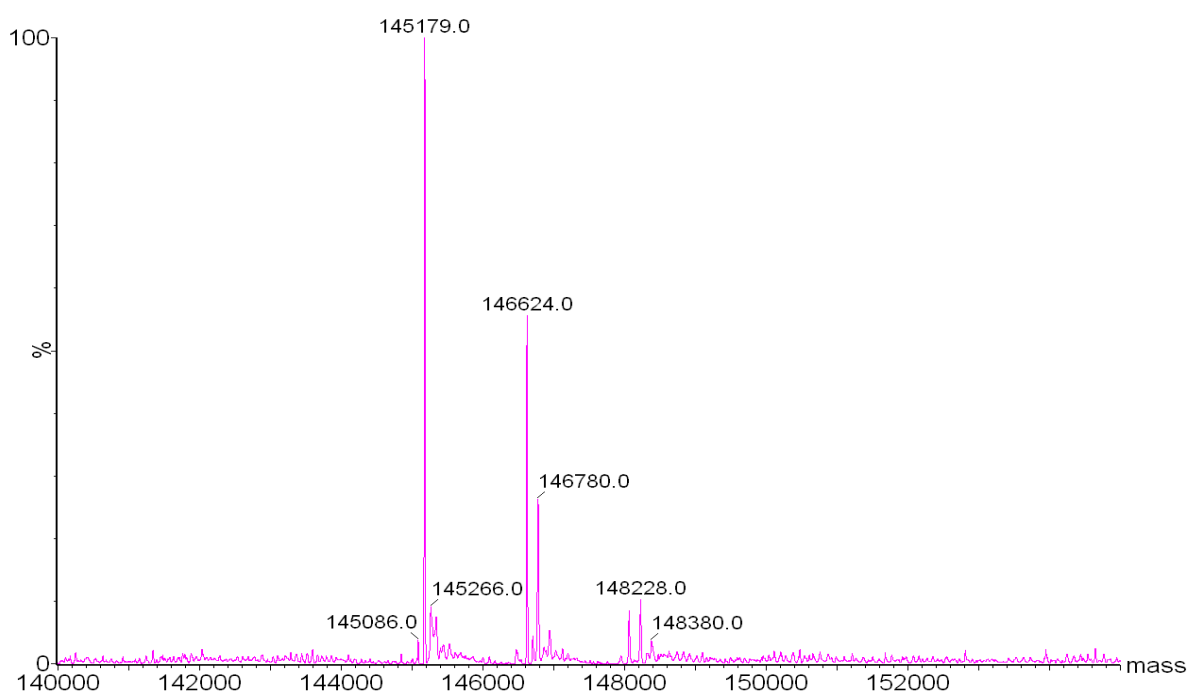
Konsentrasjon	50 mU	500 mU	1U	2U	5U
Tid					
15 min.	-	-	-	-	-
30 min.	-	-	-	-	-
1 time	-	-	-	-	-
2 timer	-	-	-	/	/
3 timer	-	-	-	/	X
5 timer	-	-	/	/	X

Av Tabell 15 kan man se at konjugatene er fullstendig deglykosylert ved bruk av 5U PNGase i 3 timer. Konjugatene kan være tilstrekkelig deglykosylert også ved feltene merket med delvis deglykosylering. Etter dette forsøket ble det konkludert med at det var ønskelig å bruke 5U PNGase ved 37°C i 3 timer i den endelige prosedyren, fordi det ved bruk av såpass høy konsentrasjon av PNGase vil med stor sikkerhet gi tilstrekkelig deglykosylerte konjugater

selv om PNGasen skulle miste litt av sin enzymatiske virkning. PNGasen har en holdbarhet på ca. 3 uker i kjøleskap i henhold til produsent (33). Mot slutten av denne holdbarhetstiden ble det observert en avtagende effekt av PNGasens aktivitet. For å være sikker på at dette ikke påvirker deglykosyleringsresultatene ble det valgt en relativt høy konsentrasjon av PNGase for å sikre at det oppnås tilstrekkelig deglykosylering samtidig som tidsforbruket (3 timer) er akseptabelt.

Figur 21 viser delvis deglykosylering av Trastuzumab med 2U PNGase etter 3 timer.

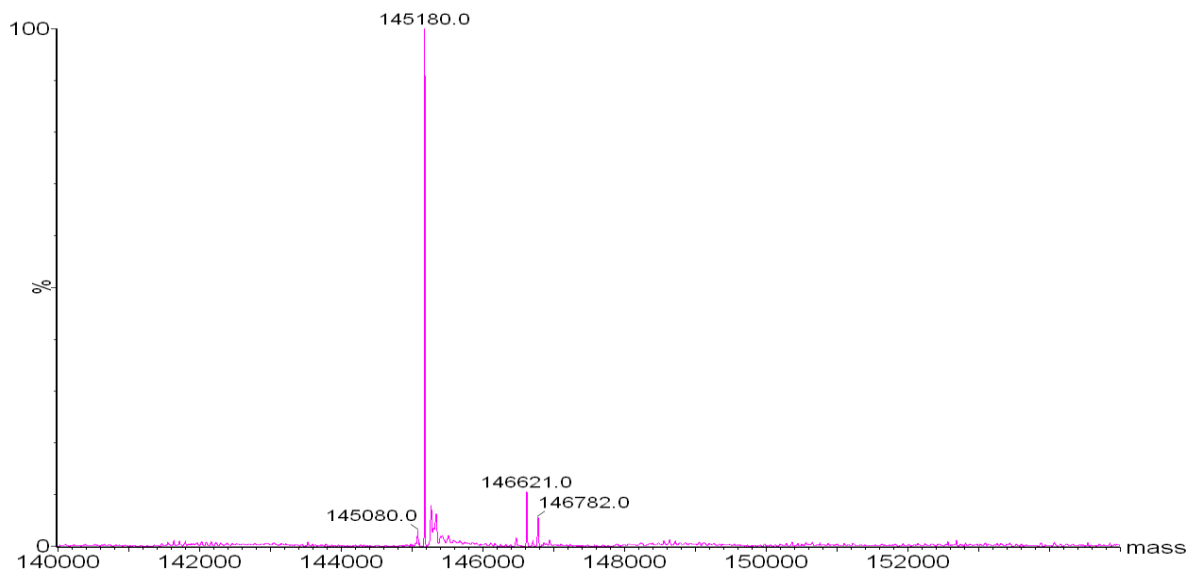
Massespekteret viser heterogeniteten av glykankjedene.



Figur 21: Delvis deglykosylering av Trastuzumab med 2U PNGase i 3 timer.

Signal med masse 146624 Da indikerer ufullstendig deglykosylering og tilsvarer Trastuzumab med en glykankjede. Signal med masse 148228 Da representerer konjugat med begge glykankjedene.

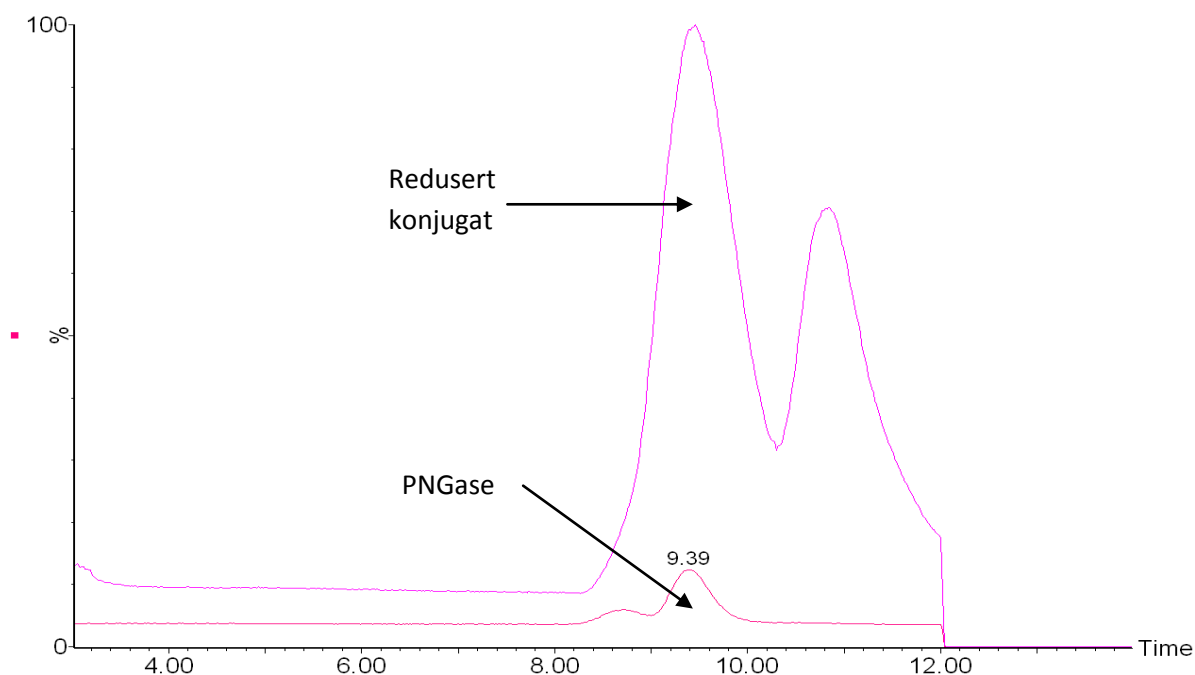
På Figur 22 er signalet som representerer delvis deglykosylering mindre enn 10%. Dette ses på som tilstrekkelig deglykosylering og er definert som fullstendig deglykosylering i Tabell 15.



Figur 22: Trastuzumab deglykosylert med 5U PNGase i 3 timer. Signal med masse 145180 Da representerer deglykosylert antistoff. Signal med masse 146621 Da er rester av delvis deglykosylert antistoff.

PNGase har en molekylvekt på ca. 36 kDa i henhold til produsent (33). Ved analyse av reduserte konjugater med gelfiltreringskolonne eluerer PNGasen i samme topp som heavy chain, se Figur 23. Arealet under toppen til PNGasen tilsvarer ca. 5% av arealet under toppen til heavy chain og vil sannsynligvis ikke påvirke massespekteret til heavy chain.

Konsentrasjonen av PNGasen er 0,5U/ μ l som beskrevet i den endelige prosedyren (5U).



Figur 23: Overlay av kromatogram for redusert deglykosylert DOTA-Trastuzumab 10:1 og PNGase tilsvarende 5U/100 µg konjugat.

Det ble tilsatt økende mengder PNGase, helt opp til 20U, for å se om dette påvirket spekterkvaliteten, men den virket ikke å ha forstyrrende effekt.

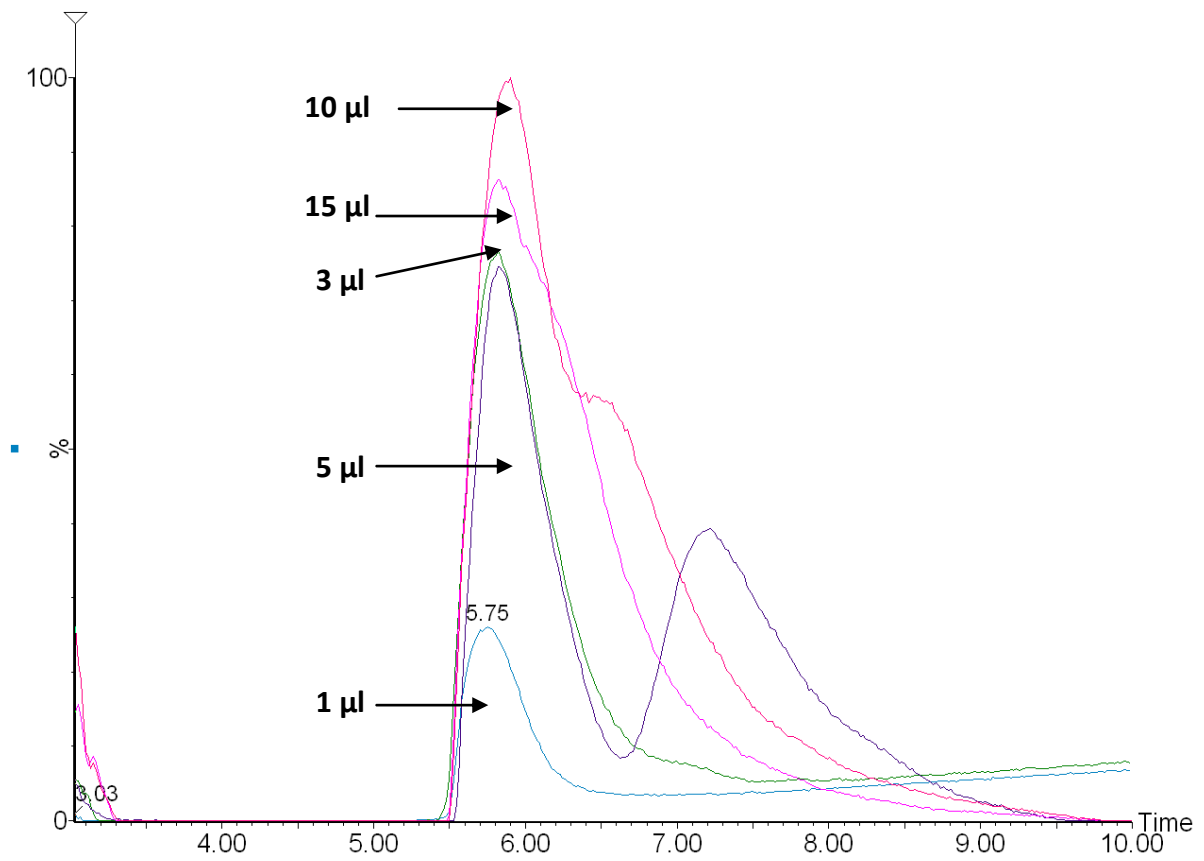
Når det gjelder analyse av intakte konjugater har antistoffet og PNGasen ulik retensjonstid på gelfiltreringskolonne, og vil ikke påvirke hverandre. Antistoffet har en retensjonstid på ca. 5.8 min mens PNGasen har en retensjonstid på ca. 6.4 min.

5.2.2 Injeksjonsvolum

Ulike injeksjonsvolum ble testet ut på gelfiltreringskolonne med indre diamter på 2.0 mm for å se hvordan dette påvirket arealet under toppene i kromatogrammet. Ved bruk av økende injeksjonsvolum får man størst signal, men med 15 µl injeksjoner med intakte konjugater ble toppen i kromatogrammet svært usymmetrisk. Ved 10 µl ble toppen mer intens og symmetrisk. Ved lavere injeksjonsvolum ble signalene betydelig mindre, og kvaliteten på massespektrene ble for dårlig til å kunne bestemme antall kjelatorer konjugert til antistoffet. Det ble derfor konkludert med at et injeksjonsvolum på 10 µl var optimalt for intakte konjugater, se Tabell 16 og Figur 24.

Tabell 16: Oversikt over ulike injeksjonsvolum og arealer med gelfiltreringskolonne med indre diameter på 2.0 mm.

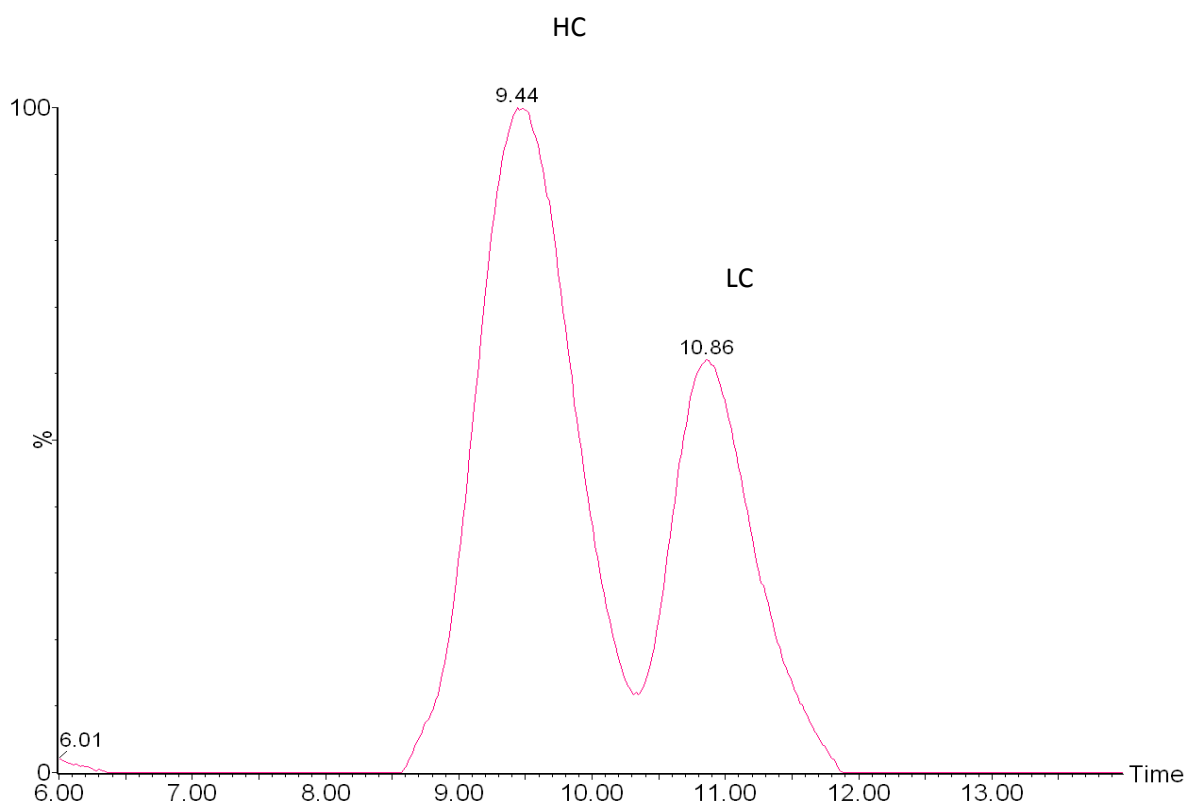
Injeksjonsvolum (µl)	Areal under toppen (counts)
15	341 889
10	264 907
5	111 297
3	146 427
1	39 349



Figur 24: Overlay av kromatografien av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 1:1 ved 5 ulike injeksjonsvolum på gelfiltreringskolonne med indre diameter 2.0 mm.

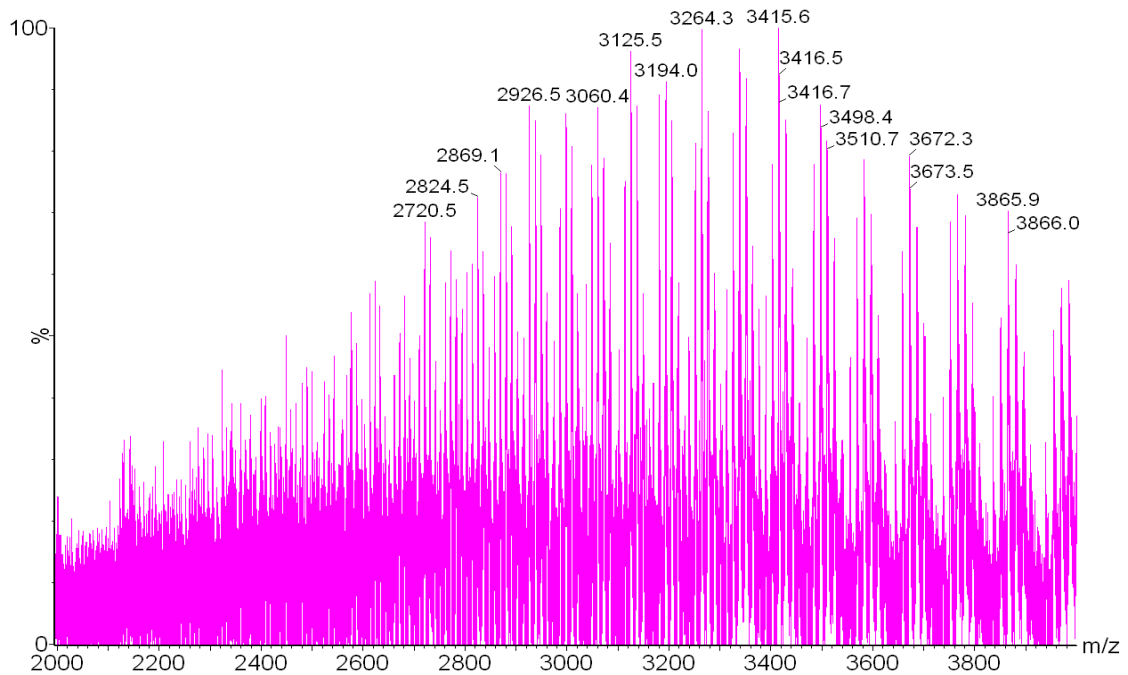
5.2.3 Reduksjon av konjugater

For reduserte konjugater ble det valgt et injeksjonsvolum på 15 µl, da dette både ga symmetriske topper og massespektre med god kvalitet.

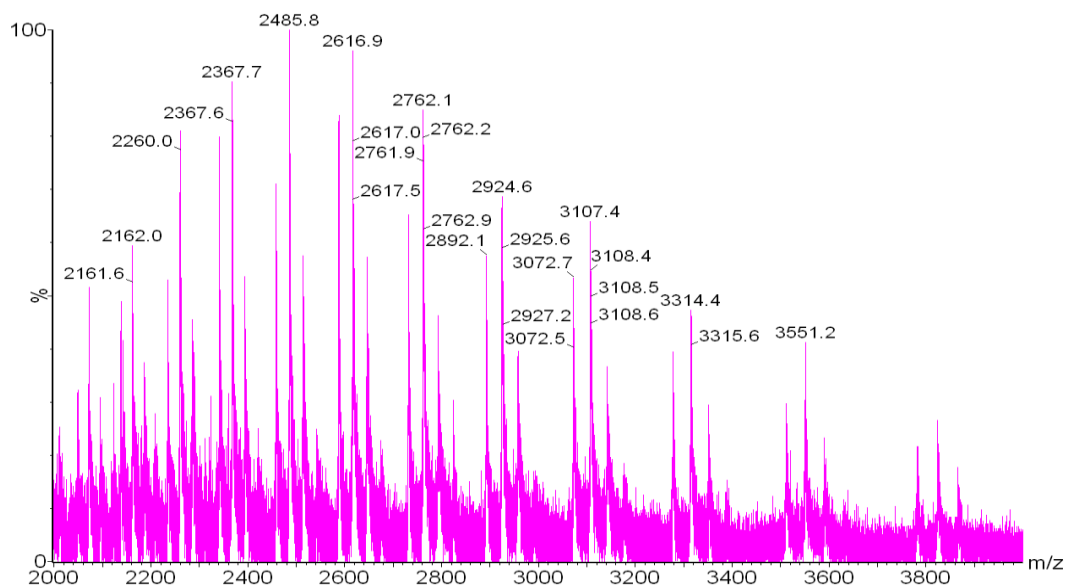


Figur 25: Kromatogram av redusert og deglykosylert DOTA-Trastuzumab 5:1 på gelfiltrerings-kolonnes med I.D. 2 mm.

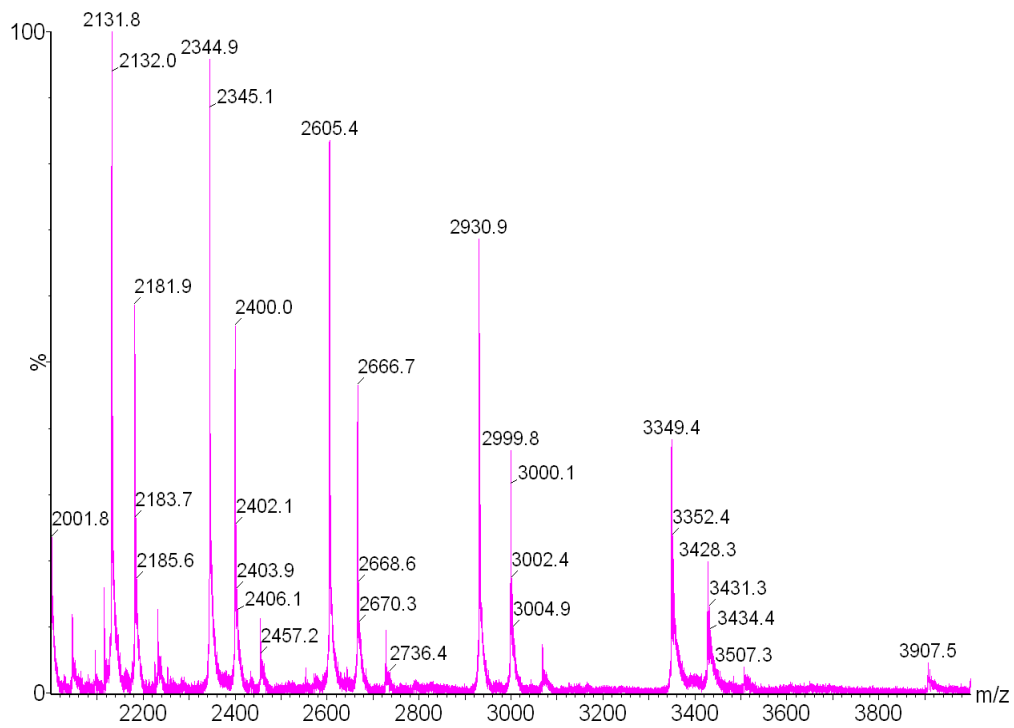
Figur 26-28 illustrerer kvalitetsforbedring på råspekter ved reduksjon til heavy og light chain sammenliknet med intakt konjugat. Spektrene for light chain og heavy chain er mindre komplekse enn for intakt konjugat.



Figur 26: Råspekter av intakt deglykosylert DOTA-Trastuzumab 5:1 på gelfiltreringskolonne med I.D. 2 mm.



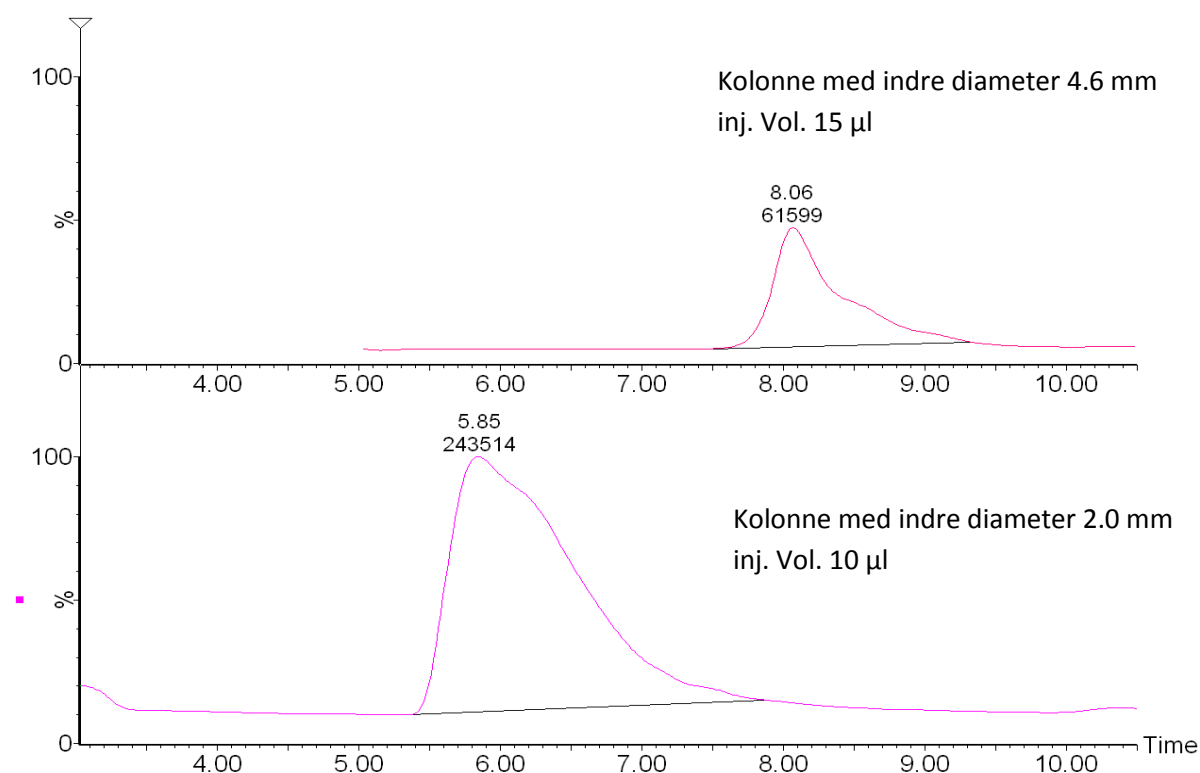
Figur 27: Råspekter av deglykosylert og redusert DOTA-Trastuzumab 5:1, Heavy chain, på gelfiltreringskolonne I.D. 2 mm.



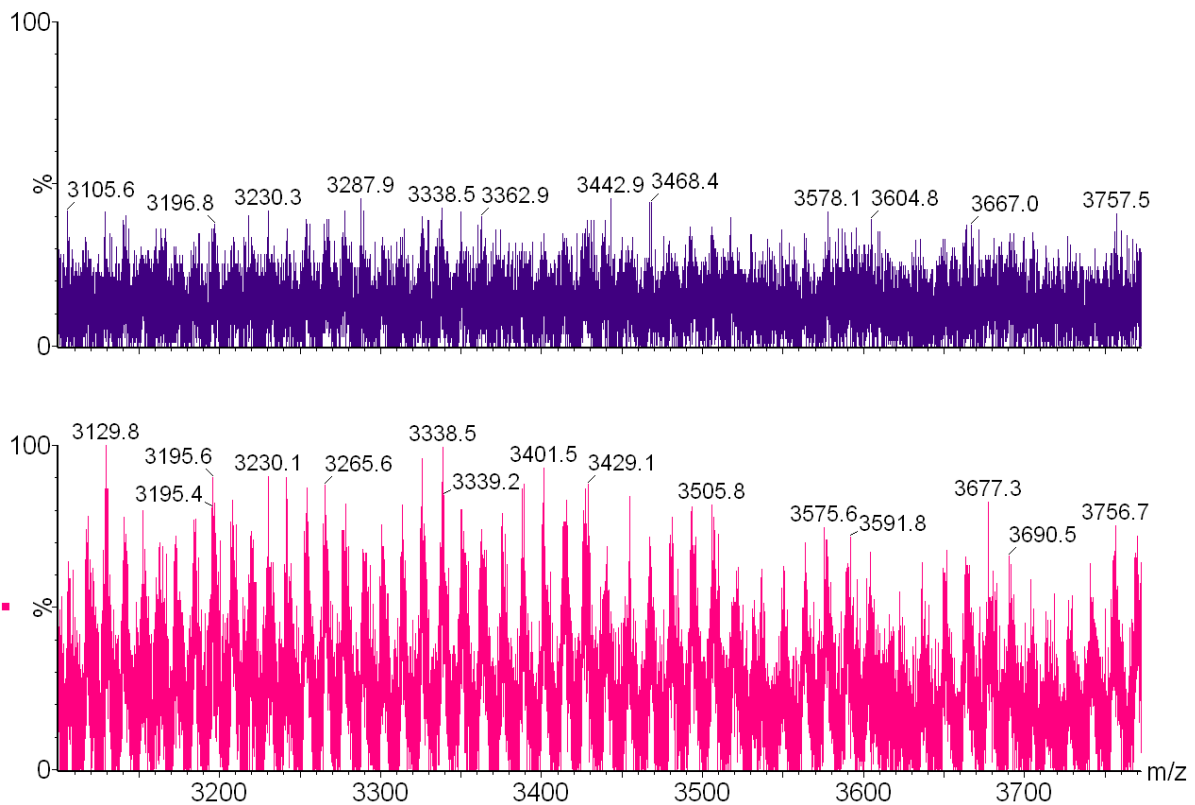
Figur 28: Råspekter av deglykosylert og redusert DOTA-Trastuzumab 5:1, light chain, på gelfiltreringskolonne I.D. 2 mm.

5.2.4 Kolonner og mobilfaser

Det ble testet to ulike gelkromatografi (SEC) kolonner, en på 30 cm med indre diameter 4.6 mm og en på 30 cm med indre diameter 2.0 mm. Kromatografien fra de to kolonnene vises i Figur 29. Råspektrene til de to kolonnene vises i Figur 30. På grunn av bedre signal med kolonnen med indre diameter på 2.0 mm ble denne valgt å bruke i den endelige LC/MS-metoden.



Figur 29: Kromatogram av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 15:1 på kolonne med indre diameter 4.6 mm (øverst), og kolonne med indre diameter 2.0 mm (nederst).



Figur 30: Sammenlikning av råspekter for deglykosylert DOTA-Trastuzumab 15:1 for kolonne med indre diameter 4.6 mm, injeksjonsvolum 15 µl (øverst) og kolonne med indre diameter 2.0 mm, injeksjonsvolum 10 µl (nederst).

Mindre indre diameter skal teoretisk gi større signaler og bedre spekterkvalitet for samme injiserte mengde. Teoretisk responsfaktor beregnes ut fra likningen;

$$R=(D1/D2)^2$$

Der R=responsfaktoren, D1=kolonnediameter på kolonne1 og D2=kolonnediameter på kolonne 2. I dette tilfellet blir R=5.3. Det vil si at det forventes en 5.3 ganger høyere respons for kolonnen med indre diameter på 2.0 mm enn for kolonnen med indre diameter på 4.6 mm.

Av Figur 29 ser man forskjell i signal i kromatogrammet. Dette er ingen direkte sammenlikning, fordi det er brukt ulike injeksjonsvolum. Omregnet til samme injeksjonsvolum på 10 µl tilsvarer signaløkningen fra kolonnen med indre diameter 2.0 mm 5.9 ganger høyere signal enn for kolonnen med indre diameter 4.6 mm. Dette er i samme

størrelsesorden som den teoretisk forventede signaløkningen på 5.3. Figur 30 viser forskjell i signal i råspekteret for de to kolonnene.

Sammenliknet med en tilsvarende publisert LC/MS metode (13) brukes det i denne oppgaven en kolonne med indre diameter på 2.0 mm, mens det i den tilsvarende metoden brukes kolonne med indre diameter 4.6 mm. Dette er en kolonne med samme indre diameter som innledningsvis ble testet ut i denne oppgaven, men forkastet på grunn av for dårlig signal.

For den utviklede metoden injiseres 10 µg konjugat, mens det i tidligere publiserte metode injiseres 10-80 µg. Dette viser at metoden som er utviklet gir gode data sammenliknet med tidligere publisert metode (13).

Ved den utviklede LC/MS-metoden blir toppene i kromatogrammet relativt brede, se eksempel i Figur 25. Det kunne vært ønskelig med smalere topper, men i dette tilfellet er målet med metoden å bestemme graden av konjugering på antistoffene. Selv om kolonneeffektiviteten kunne vært høyere kan metoden benyttes til det som var målet med oppgaven.

I metoden for gelfiltreringskromatografi brukes 0,1% trifluoreddiksyre i mobilfasen. Trifluoeddiksyre er kjent for å kunne blokkere for signaler i massespektrometeret. Det brukes ved analyser lite mobilfase, 50-75 µl/min, noe som er relativt skånsomt for ionekilden i sammenliknet med kolonnen med indre diameter 4.6 mm der det brukes en flow på 0.4 ml/min.

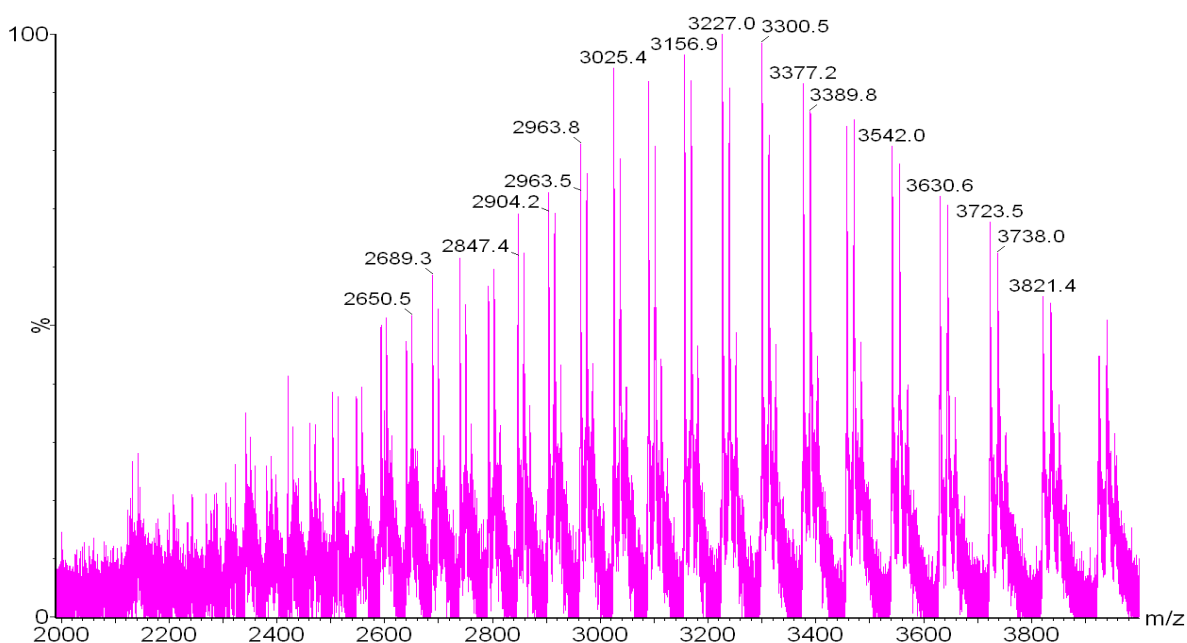
Det ble brukt isokratisk eluering, med forblandet 50% ACN + 0,1% TFA. Valg av mobilfase ble gjort på bakgrunn av tidligere publiserte tilsvarende analyser (13). Det ble også testet ut en mobilfase bestående av 50% ACN + 1% FA og 0,02% TFA som har gitt bedre resultater i andre forsøk (13), men massespekterne ved bruk av denne mobilfasen ble svært dårlige sammenliknet med 50% ACN i 0.1% TFA til tross for mindre mengde TFA.

Dekonvolerte spektere av intakt Trastuzumab på gelfiltreringskolonne viser en gjennomsnittelig molekylvekt på 148059 Da (n=6, se Tabell 3.1 i vedlegg 3, og Figur 1.11 i vedlegg 1). Dette stemmer med molekylvekt for Trastuzumab som er funnet i litteraturen (15). Dekonvolerte spekter av Trastuzumab heavy og light chain ga molekylvekter på henholdsvis 49158 Da og 23439 Da (n=6, se Tabell 3.1 i vedlegg 3). Dette stemmer godt

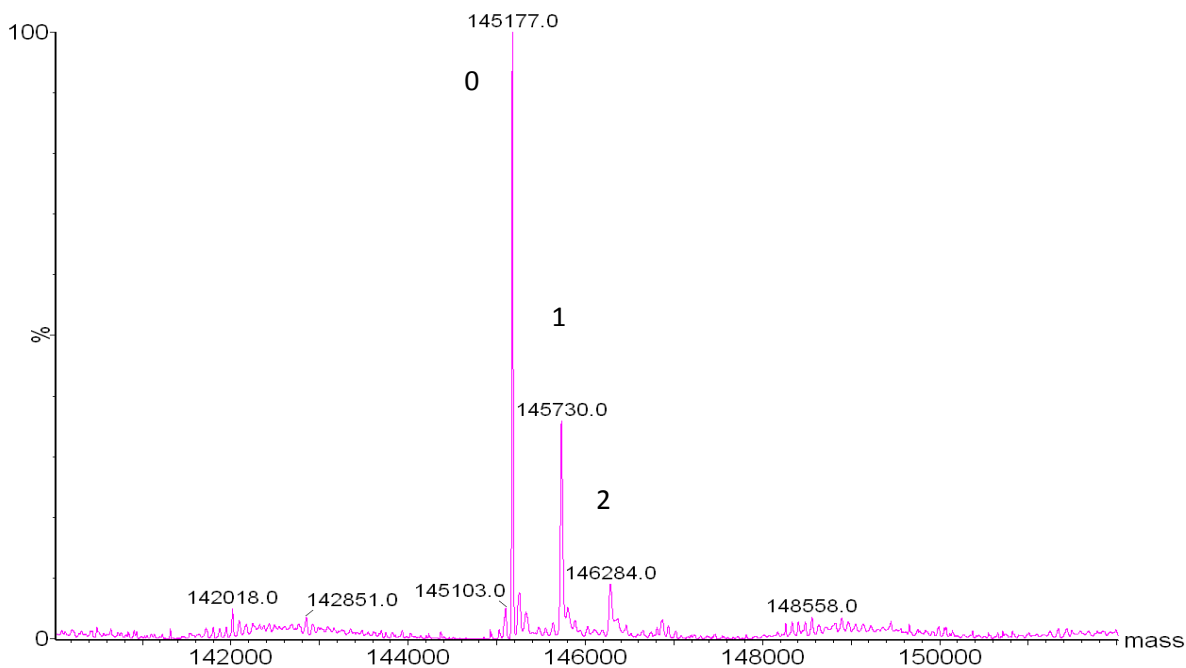
overens med data fra andre kilder (14) noe som indikerer at metoden har god massenøyaktighet.

Kompleksiteten i råspekterne til konjugatene ved de ulike støkiometriene varierer som forventet relativt mye. Råspekterne av konjugat med høy støkiometri (15:1 og 10:1) er mer komplekse enn råspekterne av konjugat med lav støkiometri (5:1 og 1:1), og råspekter for intakte konjugater er mer komplekse enn for reduserte konjugater. Ved analyser av konjugater med høye støkiometrier kan det derfor være gunstig å gjøre en reduksjon, mens det for analyse av konjugat med lave støkiometrier vil være enklest å analysere på intakte konjugater. Analyse av reduserte antistoffer vil være noe mer arbeidskrevende på grunn av reduksjonsreaksjonen.

Sammenlikning av råspekter for intakt og redusert antistoff er vist i Figur 26-28. Figur 31 viser råspekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 1:1. Råspekteret har god kvalitet og er mindre kompleks enn deglykosylert DOTA-Trastuzumab 15:1 som er vist i Figur 26. Råspekter med god kvalitet gir gode dekonvolverte spektrere. (Se dekonvolvert spekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 1:1 i Figur 32.)



Figur 31: Råspekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 1:1



Figur 32: Dekonvolert spekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 1:1. De tre signalene tilsvarer deglykosylert antistoff og antistoff pluss en og to kjelatorer.

En oversikt over Figurer og Tabeller ved alle undersøkte støkiometrier er vist i vedlegg 1 og 2.

5.2.5 Analyse av ulike konjugat batcher

Det ble syntetisert 4 ulike støkiometrier med Trastuzumab-DOTA-konjugat; 15:1, 10:1, 5:1 og 1:1.

Metoden som er utviklet kan benyttes på konjugater ved alle nevnte nominelle DAR-verdier enten i intakt eller redusert form.

I metoden er det benyttet en gelfiltreringskolonne med indre diameter på 2.0 mm, og en mobilfase av 50% ACN i 0.1% TFA.

I Tabell 17-19 vises en oversikt over funnet DAR-verdi, standardavvik, $\Delta m/z$ og utbyttet ved de ulike nominelle DAR-verdiene. Utbyttet ($D_f/D_n \cdot 100\%$) regnes ut ved å dele funnet DAR-verdi på nominell DAR-verdi og multiplisere dette med 100%.

Av Tabell 17 kan man se at standardavviket er større ved lave støkiometrier enn ved høye. Ved lavere DAR-verdier er råspektrene mer detaljerte, og inneholder mindre støy. På grunn av smalere m/z -signaler velges lavere verdi på MaxEnt parameter. Dette gir mer detaljerte dekonvolerte spektre. Generelt vil bruk av lave MaxEnt verdier potensielt kunne føre til større variasjoner i det dekonvolerte spekteret. Det er derfor naturlig å tro at dette kan ha en sammenheng med de høyere standardavvikene som observeres ved lave støkiometrier.

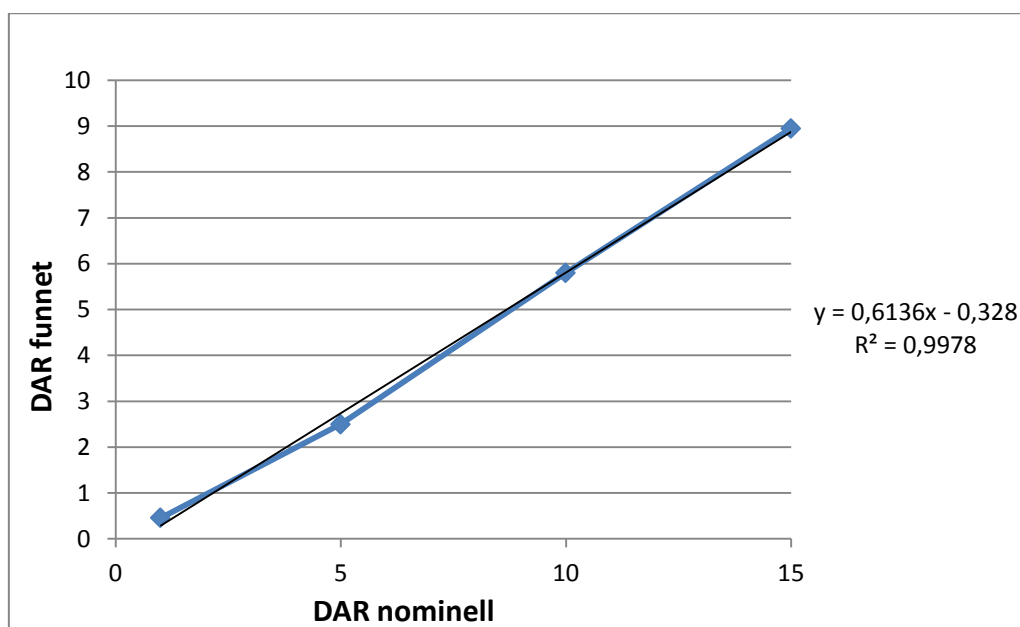
Ved høye nominelle DAR, 15:1 og 10:1, er støygrensen høyere enn ved lavere nominelle DAR. Dette fører til at mindre topper kan tas med i DAR beregninger enn for lave støkiometrier. De små toppene kan ofte variere mer enn de større, noe som kan føre til variasjon i funnet DAR-verdi og videre til høyere standardavvik. Det kunne vært satt en grense for hvor små topper som skulle tas med i beregningen av funnet DAR, for å begrense standardavviket.

Tabell 17 viser DAR funnet, %RSD, Df/Dn og $\Delta m/z$.

Tabell 17: Oversikt over DAR-verdier, %RSD, utbytter og masseforskjell ved alle støkiometriene for intakte antistoffer. Df=DAR funnet Dn=DAR nominell.

DAR nominell	Analyse paralleller	DAR funnet	RSD (%)	Df/Dn* 100%	Avg. $\Delta m/z$ (Da)
15:1	4	9,0	1,8	59,5	557,7
10:1	4	5,8	1,3	58,0	556,8
5:1	4	2,5	4,7	49,4	556,9
1:1	4	0,5	4,2	50,0	555,3
Gjennomsnitt				54,2	556,7
% RSD				9,7	0,2

Figur 33 viser sammenheng mellom funnet DAR og nominell DAR. At det er et tilnærmet lineært forhold mellom disse gjør det enklere å syntetisere konjugat med ønsket DAR-verdi til for eksempel et biodistribusjonsforsøk.



Figur 33: Sammenheng mellom nominell DAR og funnet DAR for intakte antistoffer.

Dekonvulert spekter av reduserte konjugater viser at DOTA er fordelt på både light chain og heavy chain (se Figurer i vedlegg 2). Ved beregning av DAR for reduserte antistoffer ble DAR regnet ut separat for light og heavy chain og deretter lagt sammen.

Tabell 20 viser DAR-verdier, %RSD og utbytter for reduserte konjugater.

Tabell 18: Oversikt over funnet DAR verdier, %RSD og utbytter ved ulike nominelle DAR verdier for reduserte konjugater.

DAR nominell	Analyse paralleller	DAR funnet	RSD (%)	Df/Dn* 100%
15:1	4	8,1	2,3	53,7
10:1	4	5,2	6,5	51,7
5:1	4	2,4	3,6	48,4
1:1	4	0,5	6,4	53,5
Gjennomsnitt			4,7	51,9
%RSD				

Ved å sammenlikne Tabell 17 og 18 ser man at DAR-verdiene og utbyttene for redusert og intakt konjugat varierer mer ved nominell DAR 15:1 og 10:1 enn ved nominell DAR 5:1 og 1:1. Råspekterne ved de lave støkiometriene for intakt antistoff og generelt for reduserte antistoff er av god kvalitet. Det blir dermed tatt utgangspunkt i at beregningene fra spektrene med best kvalitet vil være de mest riktige. Det blir derfor bestemt at det bør gjøres en reduksjon ved analyse av konjugater med støkiometrier over 5:1.

Analyse av redusert konjugat kan selvsagt også benyttes ved lave støkiometrier, men det er enklere og raskere å analysere på intakt konjugat. Det spares tid både ved å slippe reduksjonstrinnet, og ved at det er enklere å behandle data fra analyse av intakt antistoff.

Analyse av intakt konjugat er det som er mest aktuelt, da det ofte jobbes med lave støkiometriske antistoff-kjelator forhold i forbindelse med biodistribusjonsstudier (11;36). Det er vist at konjugater med mange kjelatorer kan gi økt leveropptak (11). Det er derfor mest aktuelt å optimalisere konjugater med nominell DAR lavere enn 5 ved å analysere intakte konjugater.

Av Tabell 17 og 18 ser man videre at utbyttene for konjugeringsreaksjonen er funnet til 54.2% for intakt konjugat og 51.9% for reduserte konjugat, dette er i samme størrelsesorden som tidligere er funnet i andre publiserte data (35).

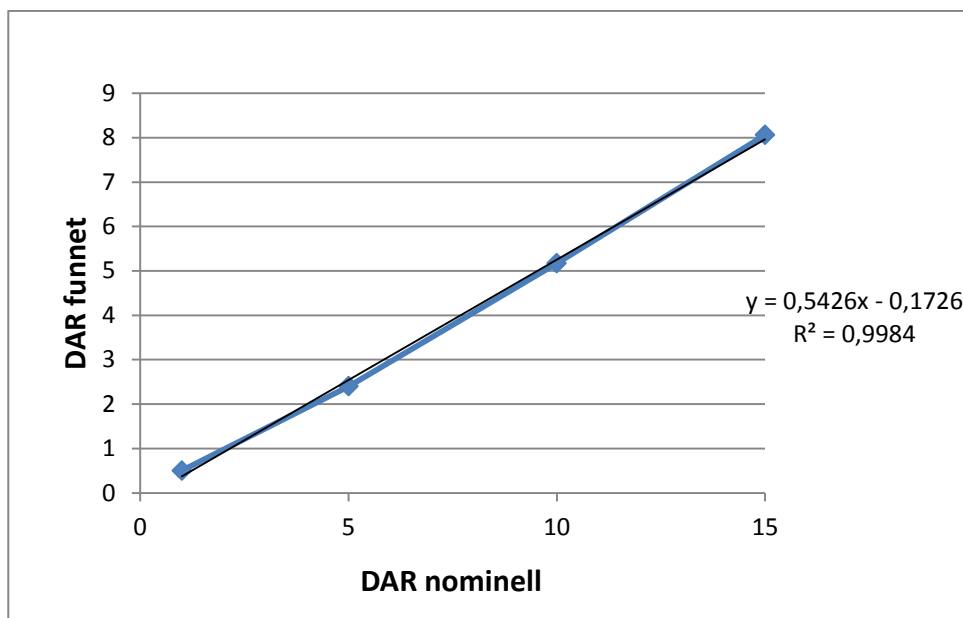
Sammenlikning av Tabell 19 og 21 viser at metoden for redusert konjugat generelt gir mer nøyaktig masseforskjell mellom DOTA-konjugatene enn metoden for intakt konjugat. Dette har sannsynligvis sammenheng med bedre spekterkvalitet på redusert konjugat.

Masseforskjellen mellom hvert konjugat skal i teorien være 550.2-551.2 Da, avhengig av om aminet på lysin er protonert eller ikke. Av Tabell 17 og 19 kan man se at denne masseforskjellen totalt sett stemmer bra, tatt i betraktning den høye molekylvekten for konjugatene.

Tabell 19: Oversikt over retensjonstid og målt masseforskjell mellom DOTA-molekyler for light og heavy chain ved ulike nominelle DAR-verdier.

Analyse- paralleler	DAR nominell	Avg. $\Delta m/z$	Retensjons	Avg. $\Delta m/z$	Retensjons
		(Da) Heavy chain	tid heavy chain (min)	(Da) Light chain	tid light chain (min)
4	15:1	554,2	9,5	551,7	10,8
4	10:1	552,8	9,4	551,6	10,8
4	5:1	551,1	9,4	551,5	10,8
4	1:1	549,8	9,4	551,3	10,8
Avg.		552,0	9,4	551,5	10,8
RSD (%)		0,35	0,53	0,03	0,00

Tilnærmet lineære forhold observeres også for nominell DAR sammenliknet med funnet DAR for reduserte antistoffer, se Figur 34.



Figur 34: Sammenheng mellom nominell DAR og funnet DAR for reduserte antistoffer.

Figurer og tabeller over reduserte konjugater til hver støkiometri er vist i vedlegg 2.

5.2.6 Presisjon

Metoden som er utviklet kan benyttes til måling både på intakte og reduserte konjugater. Når det gjelder masseforskjellen mellom DOTA-konjugatene ga reduserte konjugater mer nøyaktige resultater (se Tabell 17 og 19). Når det gjelder funnede DAR-verdier er disse relativt like ved sammenlikning av intakte og reduserte antistoffer ved lave støkiometrier, 1:1 og 5:1.

Målet med oppgaven skisserer at presisjonen bør være bedre enn 10%. Prosent relativt standardavvik (%RSD) for funnet DAR-verdi blant intakte antistoffer varierer fra 1.3-4.7. For funnet DAR verdi for reduserte antistoffer varierer % RSD fra 2.3-6.5, se Tabell 17 og 18. I begge tilfeller er %RSD innenfor kravet til presisjon.

Ved analyse av konjugater med høye støkiometrier (15:1 og 10:1) ses en forskjell i funnet DAR-verdi hos intakte og reduserte antistoffer på ca. 10%. Spekterkompleksiteten er mindre for reduserte konjugater og for intakte konjugater med nominell DAR under 10:1 (se Figurer i vedlegg 1 og 2). Det er derfor naturlig å anta at DAR-verdiene som er beregnet fra disse råspektrene er de mest riktige. Det kan derfor være gunstig å redusere ved analyse av konjugater med nominell DAR over 5:1.

5.2.7 Alternative metoder

Det er i litteraturen beskrevet tre andre metoder for bestemmelse av kjelator konjugert til antistoff. Den ene metoden benytter Pb(II) tilsatt arzenaso (37). Arzenaso-bly-komplekset er blåfarget. Ved å titrere med antistoff-DOTA-konjugat vil det skje en transkjelatering fra arzenaso til DOTA. Det observeres da en gradvis reduksjon i fargeintensiteten, noe som ved hjelp av UV-spektroskopi kan relateres til konsentrasjon av DOTA. Ut fra konsentrasjonen kan det regnes ut hvor mange kjelatorer som er konjugert til hvert antistoff. Dette er en indirekte og arbeidskrevende metode. Den må i tillegg optimaliseres for hver kjelator.

En annen metode for å måle grad av konjugering er basert på radiometrisk titrering med kobolt-57-klorid (38). Her måles graden av konjugering ved å måle radioaktiviteten til kobolt med en gammateller, og sammenliknes med en standardløsning av kobolt-57-klorid. En slik metode er også indirekte. Dette er en kjelatorspesifikk metode, noe som gjør metoden lite universell. En annen ulempe er at denne metoden innebærer håndtering av radioaktive isotoper.

En tredje metode er å bruke karbon-14 merkede kjelatorer (35). Dette kan i prinsippet gi et godt estimat for antall kjelatorer per antistoff, men er svært arbeidskrevende å syntetisere og kostbar og utføre. Spesielt dersom man ønsker å teste egenskapene til flere kjelatorer, noe som er vanlig i tidlige faser i utvikling av radioimmunokonjugater.

6 KONKLUSJON

Det har blitt utviklet en metode for å måle antall kjelatorer (DOTA-NCS) konjugert til antistoff (Trastuzumab) ved bruk av gelkromatografi-massespektrometri. Metoden er basert på at konjugatene deglykosyleres med enzymet PNGase F. Det kan bestemmes antall kjelatorer både på intakt og redusert konjugat. Metoden benyttes til å bestemme Drug-to-Antibody (DAR) ratioer basert på nominelle støkiometrier fra 1:1 til 15:1.

DOTA-NCS-konjugering fører til heterogen fordeling av DOTA pr. antistoff. Modifiserte biologiske makromolekyler gir ofte opphav til svært komplekse massespektre på grunn av makromolekylens størrelse samt ladningsfordelingen som følge av elektrosprayionisering. Hovedutfordringen i arbeidet har vært å oppnå massespektre med en kvalitet som gjør det mulig å bestemme DAR-verdier etter dataprosessering. Kvaliteten av råspekterne ble funnet å være en funksjon av signalstyrke og kompleksitet. Kompleksiteten av massespekterne til de reduserte konjugatene er mindre sammenlignet med massespekterne av intakte konjugater, noe som bidrar til sikrere bestemmelse av DAR-verdier for konjugater med nominell støkiometri over 5:1. I gelkromatografi-metoden som ble utviklet ble det brukt en kolonne med kolonnedimensjon på 2.0 millimeter indre diameter. Denne kolonnen ga ca. 5.9 ganger større signal for samme injiserte prøvemengde enn ved bruk av tradisjonell kolonnedimensjon på 4.6 millimeter indre diameter. Denne metodeforbedringen sammen med optimalisering av ionekildeparametere gjorde det mulig å bestemme DAR-verdier for DOTA-Trastuzumab-konjugatene. Presisjonen ble gjennom partiell validering funnet til å være bedre enn 7% for alle støkiometriske forhold. Det ble vurdert at metoden er egnet til å måle graden av DOTA-konjugering til Trastuzumab med en nominell støkiometri fra 1:1 til 15:1.

Det ble innledningsvis forsøkt utviklet omvendt-fase HPLC-MS og UPLC-MS metoder, men disse ga ikke råspektre med god nok kvalitet til å kunne bestemme antall kjelatorer pr. antistoff. Alternative metoder beskrevet i litteraturen innebærer blandt annet transkjelatering fra Pb (II) arsenazo, radiometrisk titrering med Kobolt-57 eller merking av ligander med Karbon-14. Sammenlignet med disse alternativene er den utviklede LC/MS metoden relativt lite tidkrevende, ikke-radioaktiv og mer generell. I tidlig utviklingsfase innen radioimmunoterapi er det verdifullt å benytte karakteriseringsmetoder som er mer generelle

fordi det åpner for mulighet til å bestemme DAR-verdier for konjugater med andre kjelatorer og eventuelt andre antistoffer.

7 REFERANSELISTE

1. Dahle, J., Borrebaek, J., Jonasdottir, T. J., Hjelmerud, A. K., Melhus, K. B., Bruland, O. S., Press, O. W., and Larsen, R. H. (2007) Targeted cancer therapy with a novel low dose rate alpha-emitting radioimmunoconjugate, *Blood* **110**, 2049-2056.
2. Dahle, J. and Larsen, R. H. (2008) Targeted alpha-particle therapy with ²²⁷Th-labeled antibodies, *Current Radiopharmaceuticals* **1**.
3. Tobias, J. S., Hochhauser, D., and Souhami, R. L. (2010) *Cancer and its management* Wiley-Blackwell, Chichester. s. 1-24
4. (2011) <http://www.kreftforeningen.no/>.
5. Cassidy, J. (2010) *Oxford handbook of oncology* Oxford University Press, Oxford. s. 35-115, 202-203, 722-725
6. Coico, R. and Sunshine, G. (2009) *Immunology a short course* Wiley-Blackwell, Hoboken, N.J. s. 41-58, 299-311
7. Parham, P. and Janeway, C. A. (2009) *The immune system* Garland Science, London. s. 96-122
8. Rootwelt, K. (2005) *Nukleærmedisin* Gyldendal akademisk, Oslo. s. 14-26
9. Hermanson, G. T. (2008) *Bioconjugate techniques* Elsevier, Amsterdam.
10. (2011) *Felleskatalogen 2011*.
11. Knogler, K., Grunberg, J., Novak-Hofer, I., Zimmermann, K., and Schubiger, P. A. (2006) Evaluation of ¹⁷⁷Lu-DOTA-labeled aglycosylated monoclonal anti-L1-CAM antibody chCE7: influence of the number of chelators on the in vitro and in vivo properties, *Nucl. Med Biol.* **33**, 883-889.
12. Eary, J. F. and Brenner, W. (2007) *Nuclear medicine therapy* Informa Healthcare, New York. s. 1-20
13. Lazar, A. C., Wang, L., Blattler, W. A., Amphlett, G., Lambert, J. M., and Zhang, W. (2005) Analysis of the composition of immunoconjugates using size-exclusion chromatography coupled to mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 1806-1814.

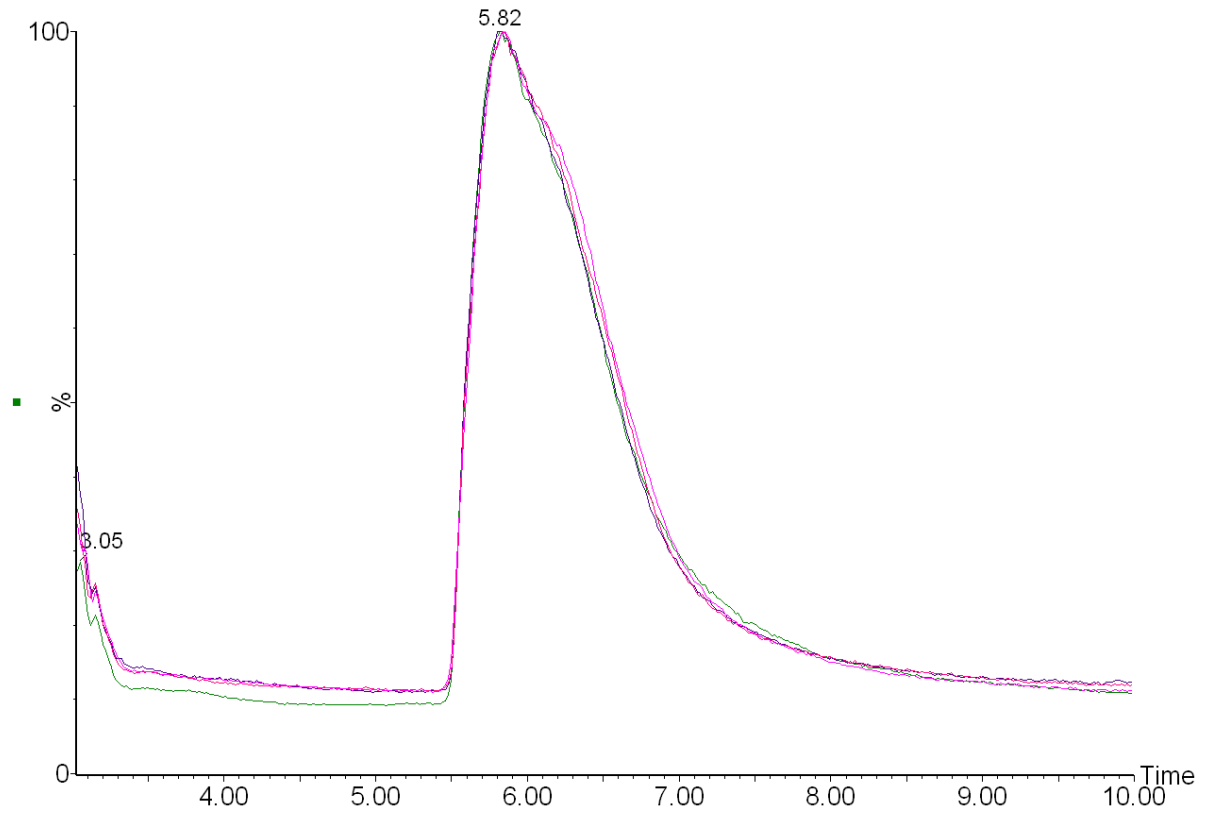
14. David P. Arnott, Jennie Lill, Wendy N. Sandoval, and Richard L. Vandlen (2007) Microwave assisted deglycosylation of proteins for molecular weight determination by mass spectrometry, *11/741,490 ed.*
15. Damen, C. W., Chen, W., Chakraborty, A. B., van, O. M., Mazzeo, J. R., Gebler, J. C., Schellens, J. H., Rosing, H., and Beijnen, J. H. (2009) Electrospray ionization quadrupole ion-mobility time-of-flight mass spectrometry as a tool to distinguish the lot-to-lot heterogeneity in N-glycosylation profile of the therapeutic monoclonal antibody trastuzumab, *J Am. Soc Mass Spectrom.* **20**, 2021-2033.
16. <http://www.biochem.arizona.edu/>.
17. Kukrer, B., Filipe, V., van, D. E., Kasper, P. T., Vreeken, R. J., Heck, A. J., and Jiskoot, W. (2010) Mass spectrometric analysis of intact human monoclonal antibody aggregates fractionated by size-exclusion chromatography, *Pharm. Res* **27**, 2197-2204.
18. <http://www.bmb.leeds.ac.uk/teaching/icu3/selfdir/immunol/index.htm>.
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28311/>.
20. Damen, C. W. N., Rosing, H., Schellens, J. H. M., and Beijnen, J. H. (2008) Quantitative aspects of the analysis of the monoclonal antibody trastuzumab using high-performance liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **46**, 449-455.
21. <http://www.gene.com/gene/products/information/oncology/herceptin/images/moa.jpg>.
22. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00072#>.
23. <http://www.druglib.com/activeingredient/trastuzumab/chembio/>.
24. Gerstner, R. B., Carter, P., and Lowman, H. B. (2002) Sequence plasticity in the antigen-binding site of a therapeutic anti-HER2 antibody, *J Mol. Biol.* **321**, 851-862.
25. Wakankar, A. A., Feeney, M. B., Rivera, J., Chen, Y., Kim, M., Sharma, V. K., and Wang, Y. J. (2010) Physicochemical stability of the antibody-drug conjugate Trastuzumab-DM1: changes due to modification and conjugation processes, *Bioconjug. Chem* **21**, 1588-1595.
26. De Leon-Rodriguez, L. M. and Kovacs, Z. (2008) The synthesis and chelation chemistry of DOTA-peptide conjugates, *Bioconjug. Chem* **19**, 391-402.
27. Pedersen-Bjergaard, S. and Rasmussen, K. E. (2010) *Legemiddelanalyse Fagbokforl*, Bergen. s. 162-189, 246-275

28. http://www.biotechacademy.dk/upload/institutter/bio/ba/svampe/figurer_finals2.002.png.
29. Ardrey, R. E. (2003) *Liquid chromatography - mass spectrometry an introduction* Wiley, Chichester. s. 7-105
30. http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/images/ionization_esi.jpg.
31. O.David Sparkman (2000) *Mass spectrometry desk reference*. s. 48
32. www.waters.com.
33. Product information from Sigma, P7367.
34. PNGnase-F specifications, protocol.
35. Mirzadeh, S., Brechbiel, M. W., Atcher, R. W., and Gansow, O. A. (1990) Radiometal labeling of immunoproteins: covalent linkage of 2-(4-isothiocyanatobenzyl)diethylenetriaminepentaacetic acid ligands to immunoglobulin, *Bioconjug. Chem* 1, 59-65.
36. Xu, K. (411) Characterization of intact antibody-drug conjugatesw from plasma/serum in vivo by affinity capture capillary liquid chromatography-mass spectrometry, 412 ed., pp 56-66.
37. Dadachova, E., Chappell, L. L., and Brechbiel, M. W. (1999) Spectrophotometric method for determination of bifunctional macrocyclic ligands in macrocyclic ligand-protein conjugates, *Nucl. Med Biol.* 26, 977-982.
38. Hok, S., Natarajan, A., Balhorn, R., DeNardo, S. J., DeNardo, G. L., and Perkins, J. (2007) Synthesis and radiolabeling of selective high-affinity ligands designed to target non-Hodgkin's lymphoma and leukemia, *Bioconjug. Chem* 18, 912-921.

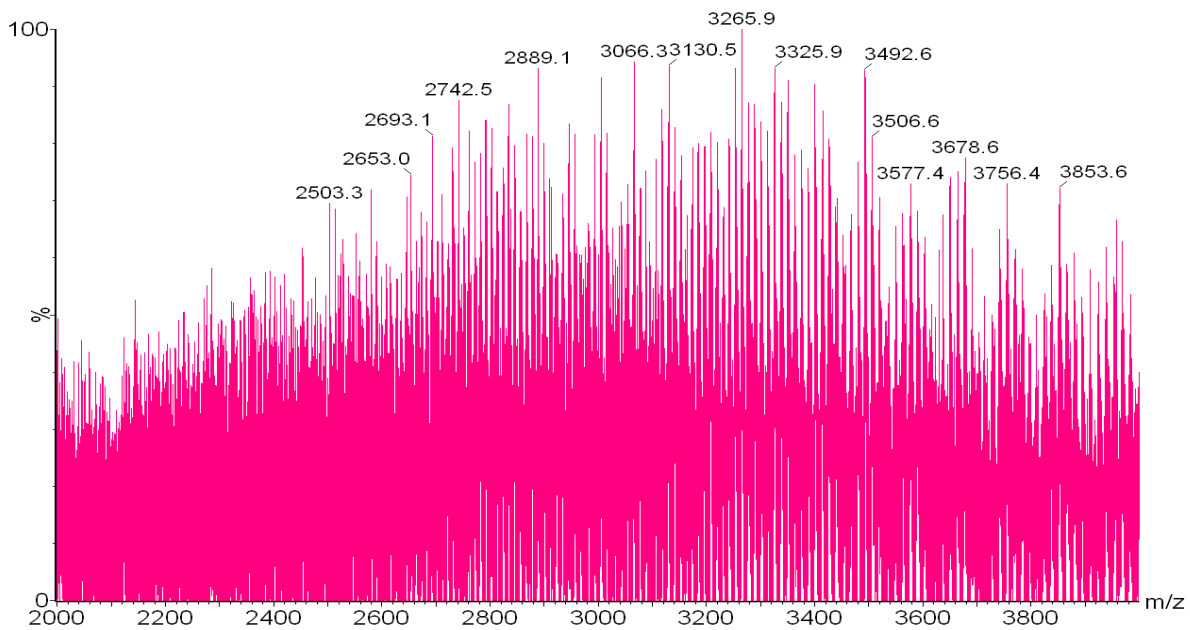
VEDLEGG

1. Tabeller og Figurer over ulike DOTA-Trastuzumab støkiometrier for intakt antistoff.
2. Tabeller og Figurer over ulike DOTA-Trastuzumab støkiometrier for redusert antistoff.
3. Tabell over molekylvekter for intakt, deglykosylert og redusert Trastuzumab.
4. Figur over sammenheng mellom funnet DAR nominell for reduserte og intakte antistoffer

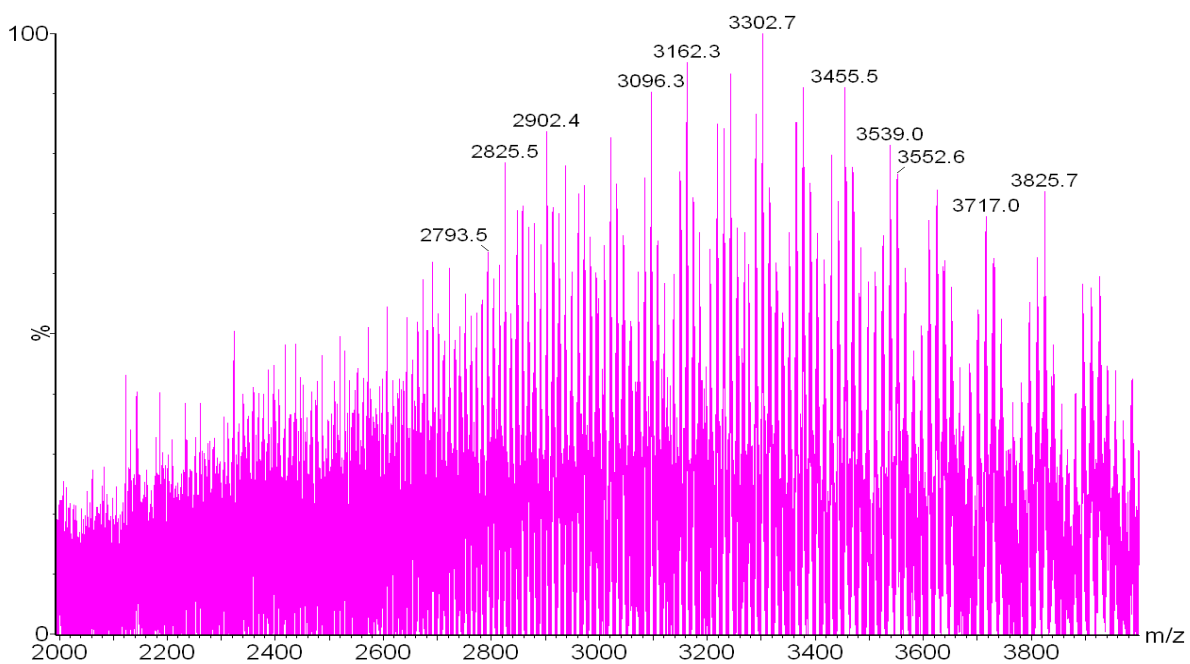
Vedlegg 1: Tabeller og Figurer over ulike DOTA-Trastuzumab støkiometrier for intakte antistoff.



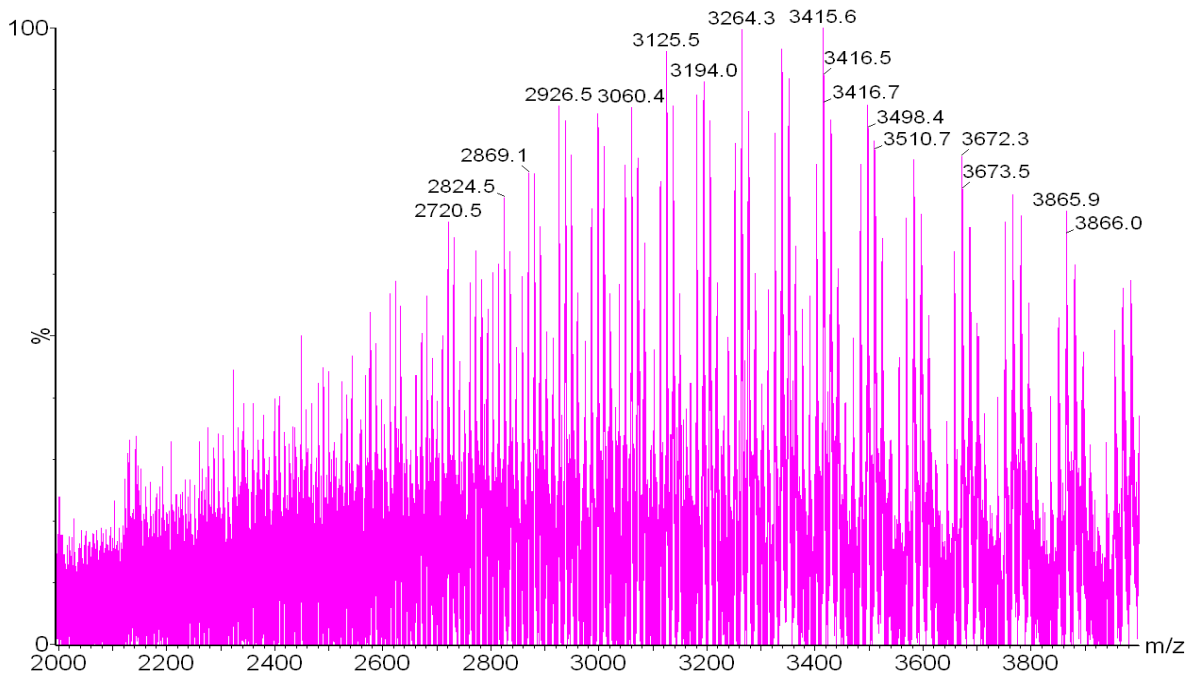
Figur 1.1: Overlay av kromatogrammer av DOTA-Trastuzumab, støkiometrier 1:1, 5:1, 10:1 og 15:1. n=4.



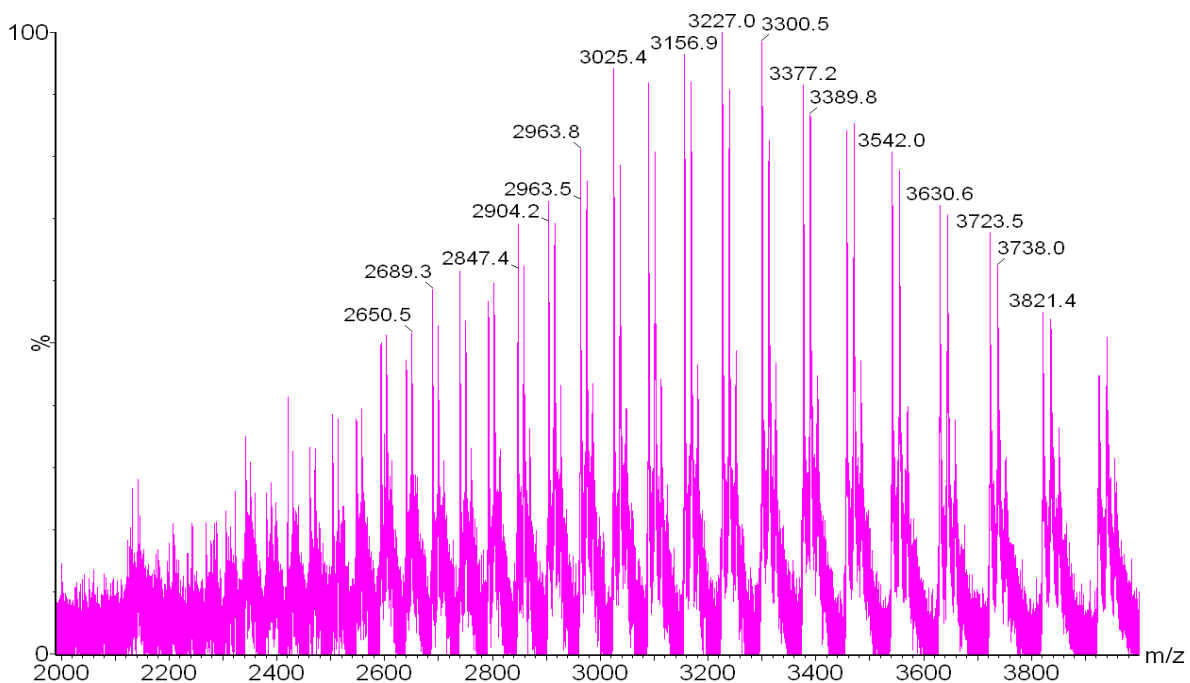
Figur 1.2: Råspekter av deglykosylert DOTA Trastuzumab 15:1



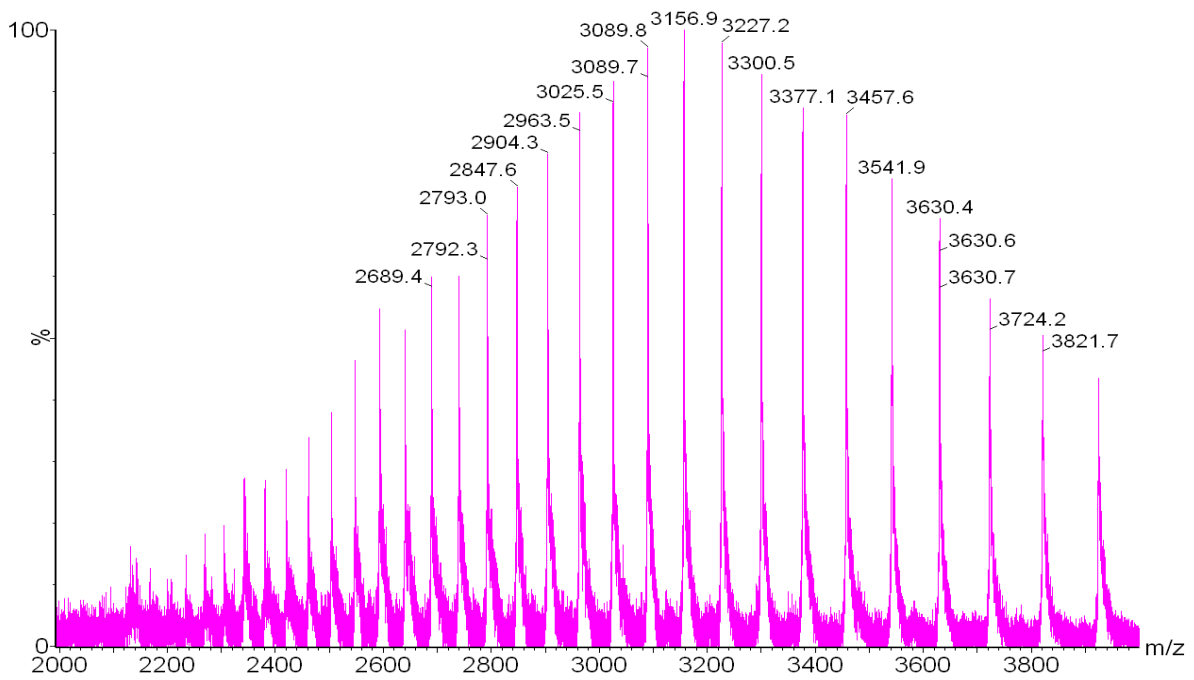
Figur 1.3: Råspekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 10:1



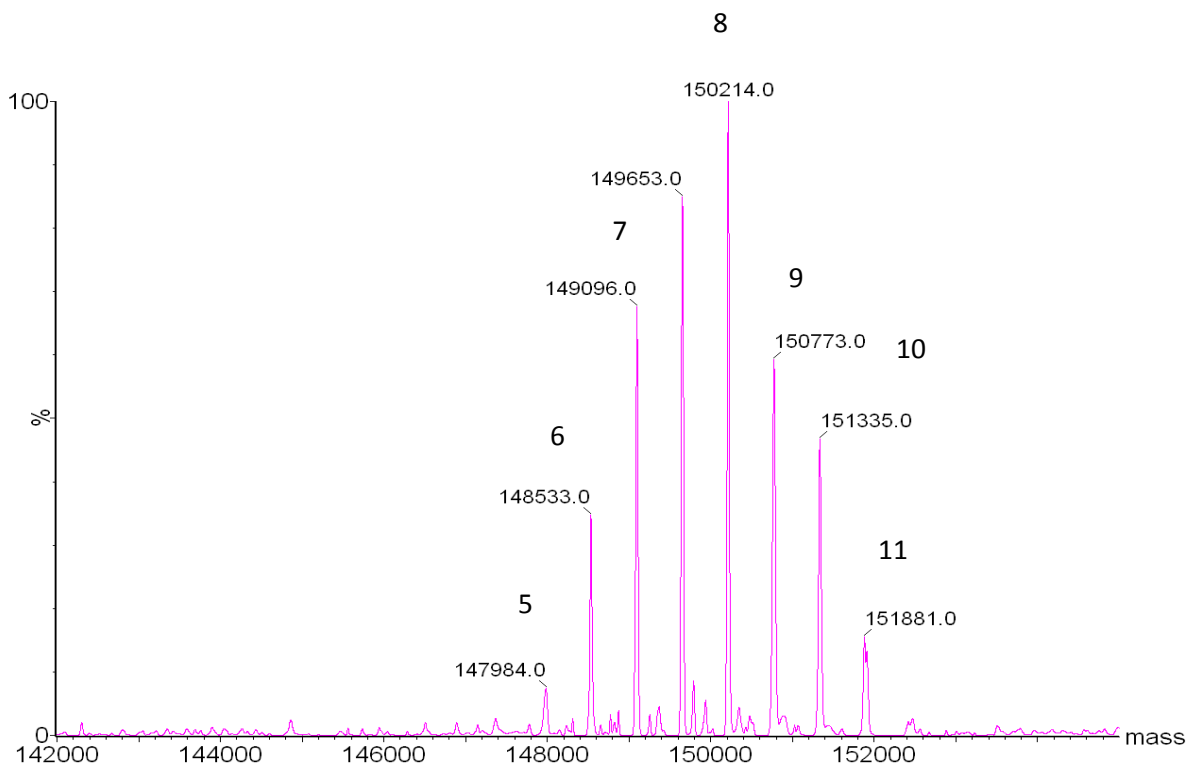
Figur 1.4: Råspekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 5:1



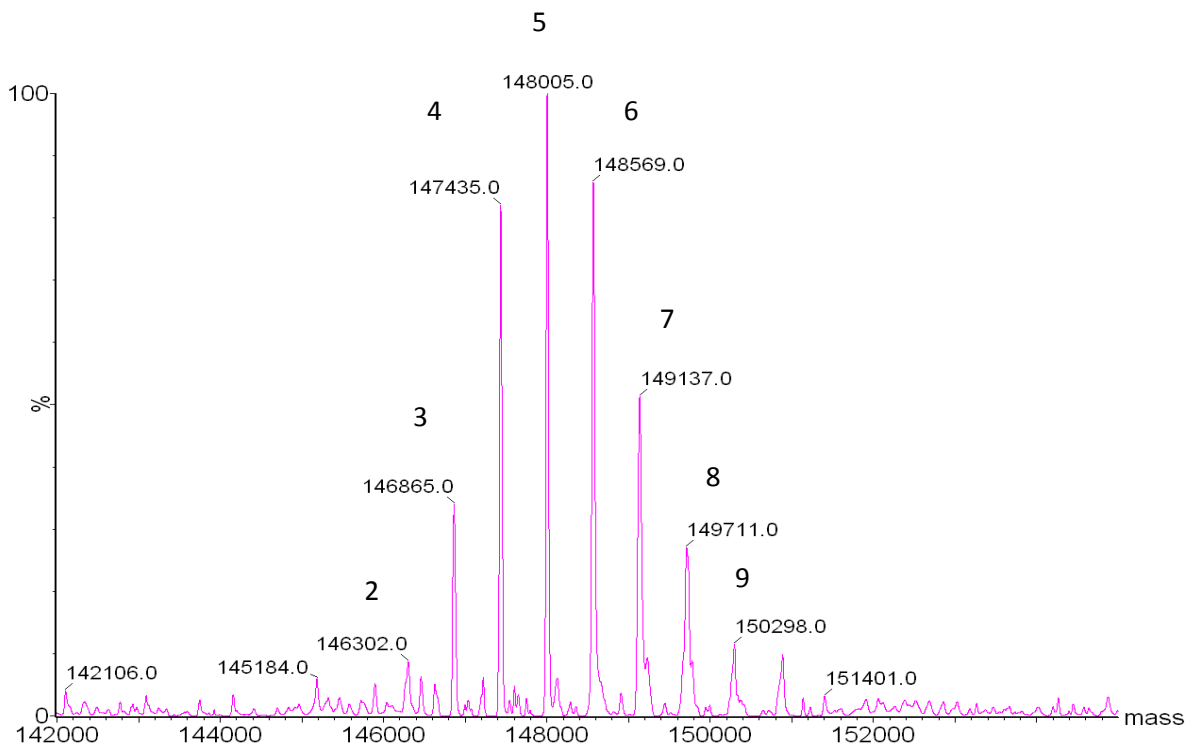
Figur 1.5: Råspekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 1:1



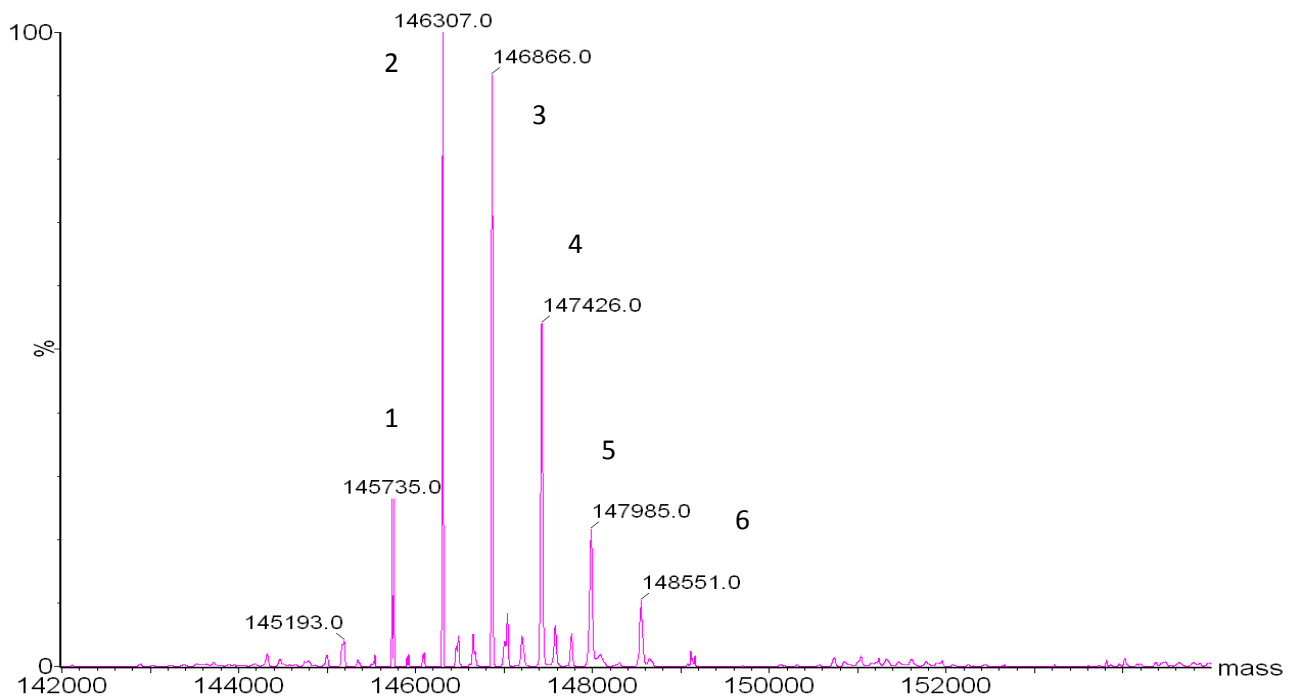
Figur 1.6: Råspekter av deglykosylert-Trastuzumab



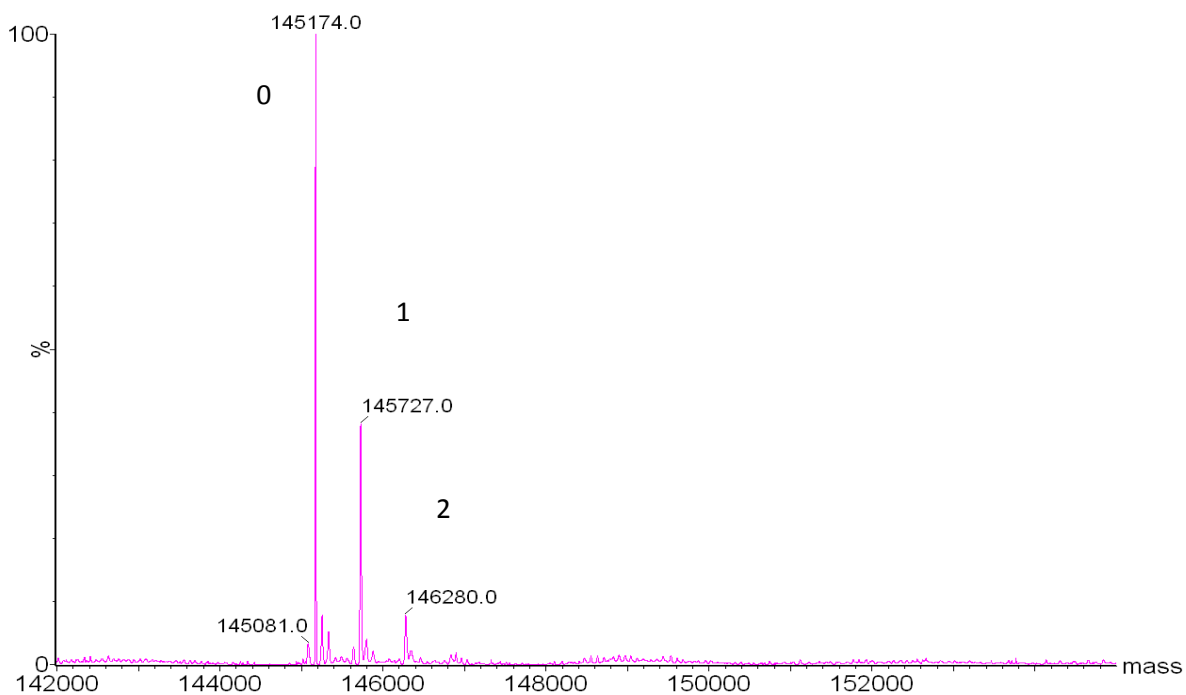
Figur 1.7: Dekonvolert spekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 15:1



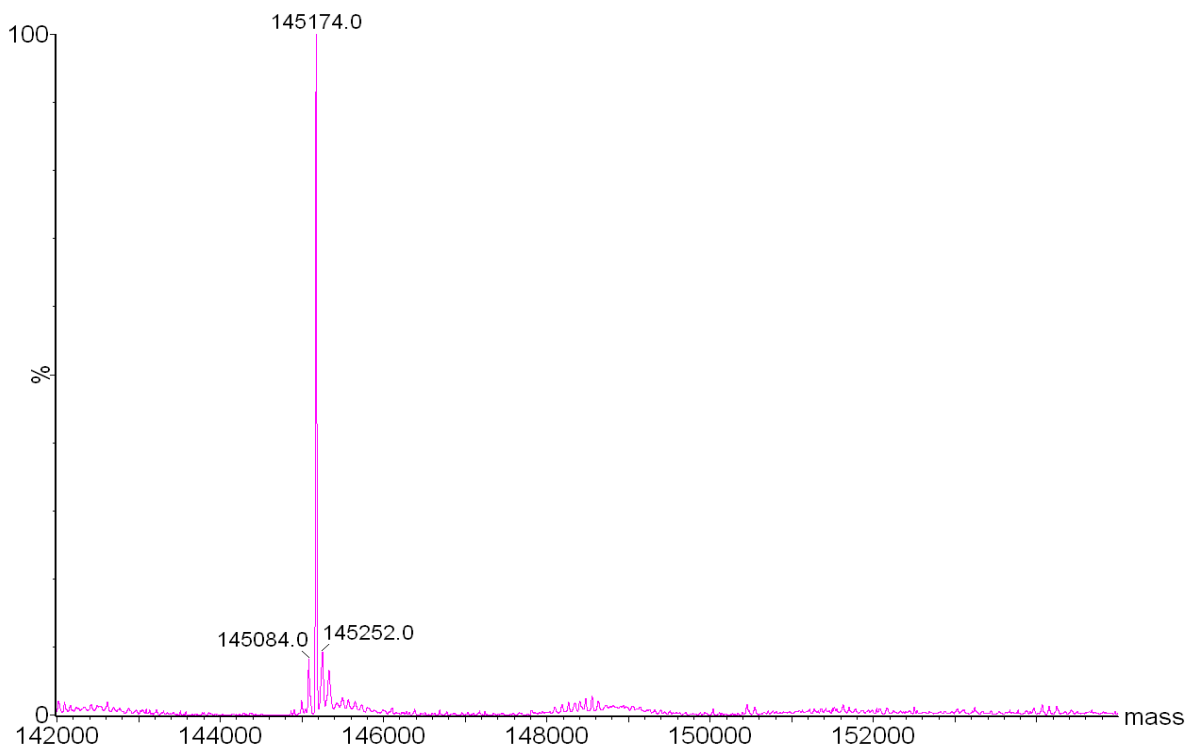
Figur 1.8: Dekonvolert spekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 10:1



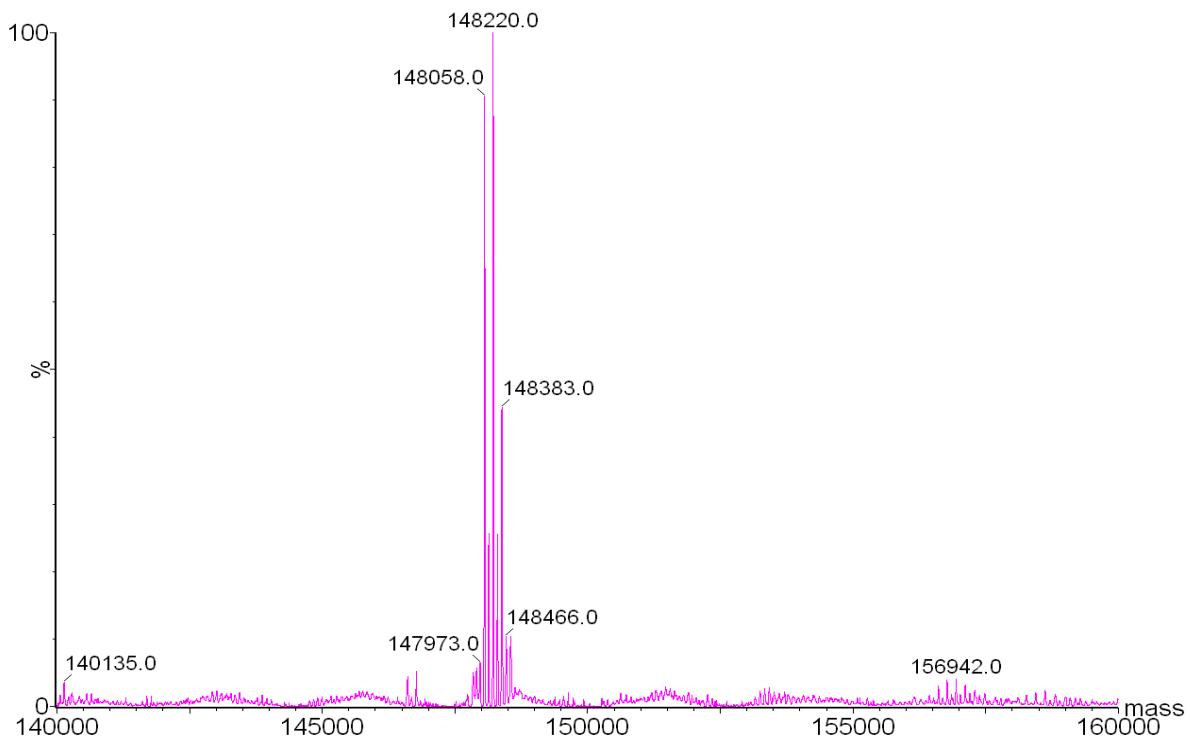
Figur 1.9: Dekonvolert spekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 5:



Figur 1.10: Dekonvolert spekter av deglykosylert DOTA-Trastuzumab 1:1



Figur 1.11: Dekonvolert spekter av deglykosylert Trastuzumab



Figur 1.12: Dekonvolvert spekter av Trastuzumab. Heterogeniteten til glykanene vises i spekteret.

Tabell 1.1: Resultater fra deglykosylert DOTA-Trastuzumab 15:1

DAR nominell	DAR funnet	Df/Dn* 100%
15:1	8.92	59.5
	8.78	58.5
	9.17	61.1
	8.93	59.5
Gjennomsnitt	9,0	59,7
RSD (%)	1,8	1,8

Tabell 1.2: Resultater fra deglykosylert DOTA-Trastuzumab 10:1

DAR nominell	DAR funnet	Df/Dn* 100%
10:1	5.80	58.0
	5.88	58.8
	5.81	58.1
	5.70	57.0
	Gjennomsnitt	5.8
RSD (%)	1.3	1.3

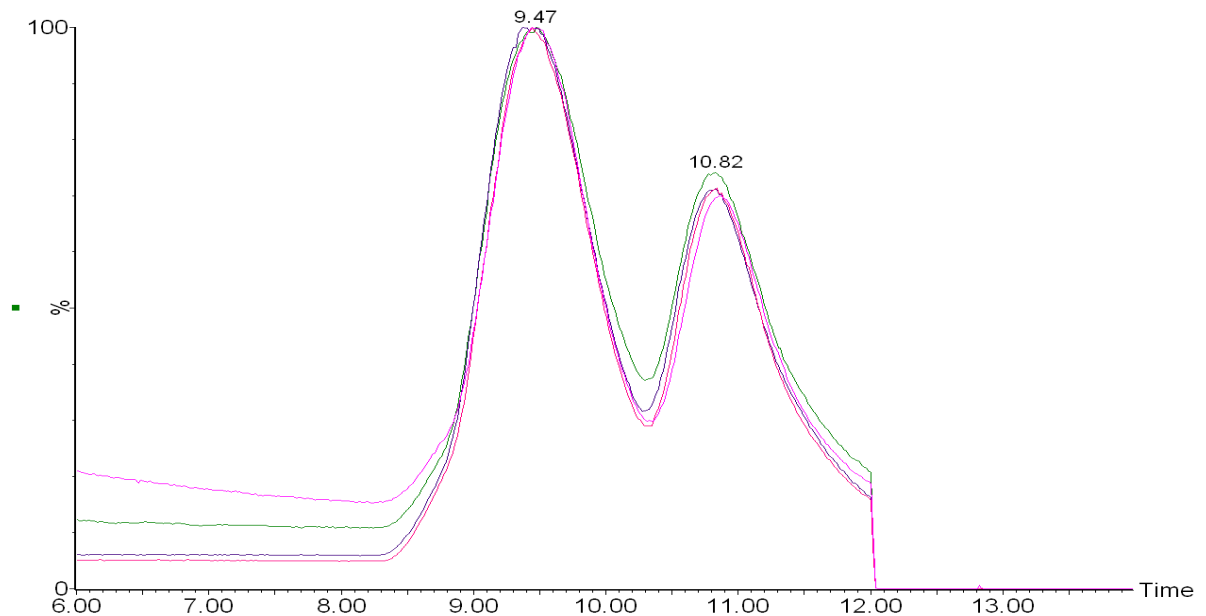
Tabell 1.3: Resultater fra deglykosylert DOTA-Trastuzumab 5:1

DAR nominell	DAR funnet	Df/Dn* 100%
5:1	2,83	56,6
	2,77	55,4
	3,01	60,2
	3,07	61,4
	Gjennomsnitt	2,9
RSD (%)	4,9	4,9

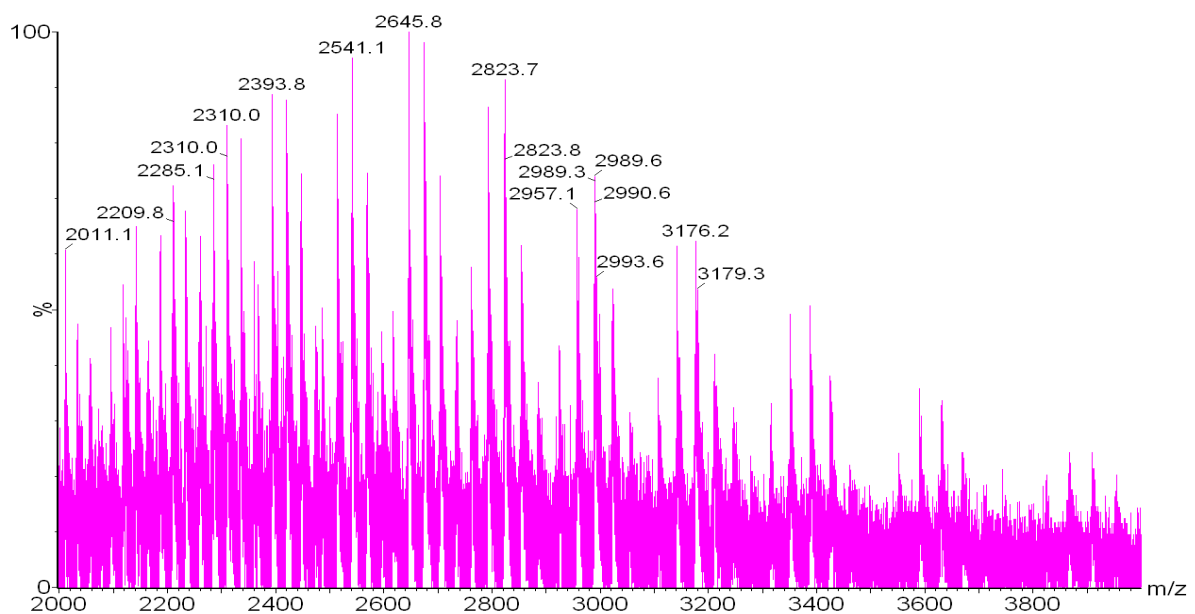
Tabell 1.4: Resultater fra deglykosylert DOTA-Trastuzumab 1:1

DAR nominell	DAR funnet	Df/Dn* 100%
1:1	0,48	48
	0,46	46
	0,44	44
	0,44	44
Gjennomsnitt	0,5	45,5
RSD (%)	4,2	4,2

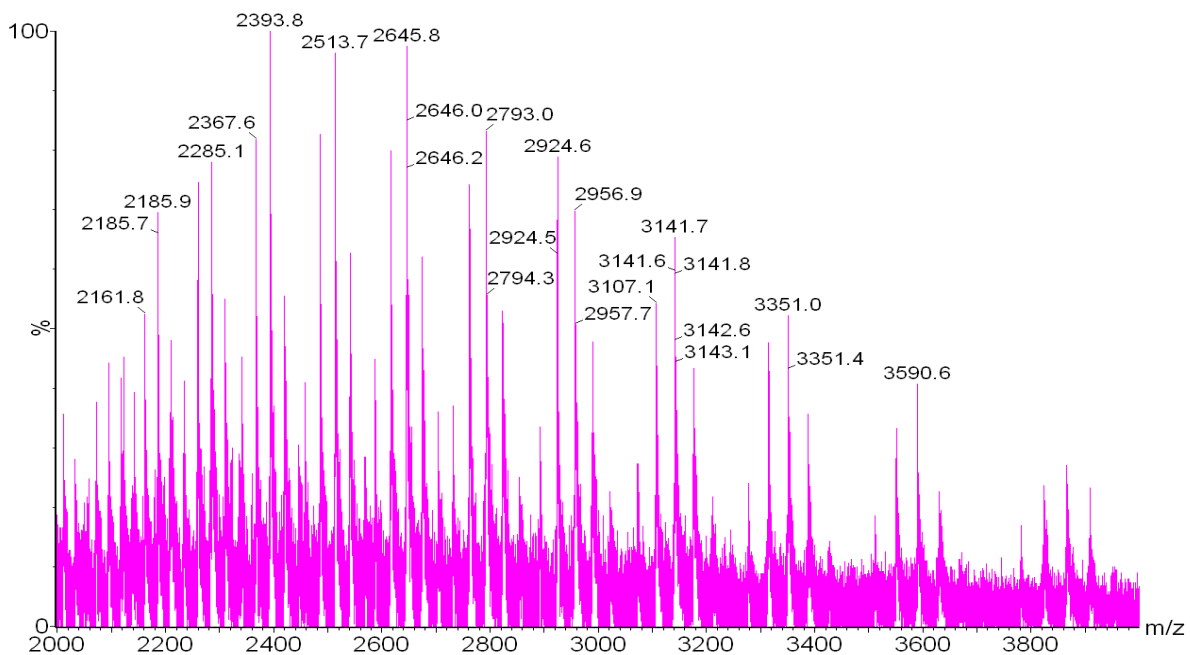
Vedlegg 2: Figurer og Tabeller av deglykosylerte reduserte antistoffer fra ulike støkiometrier



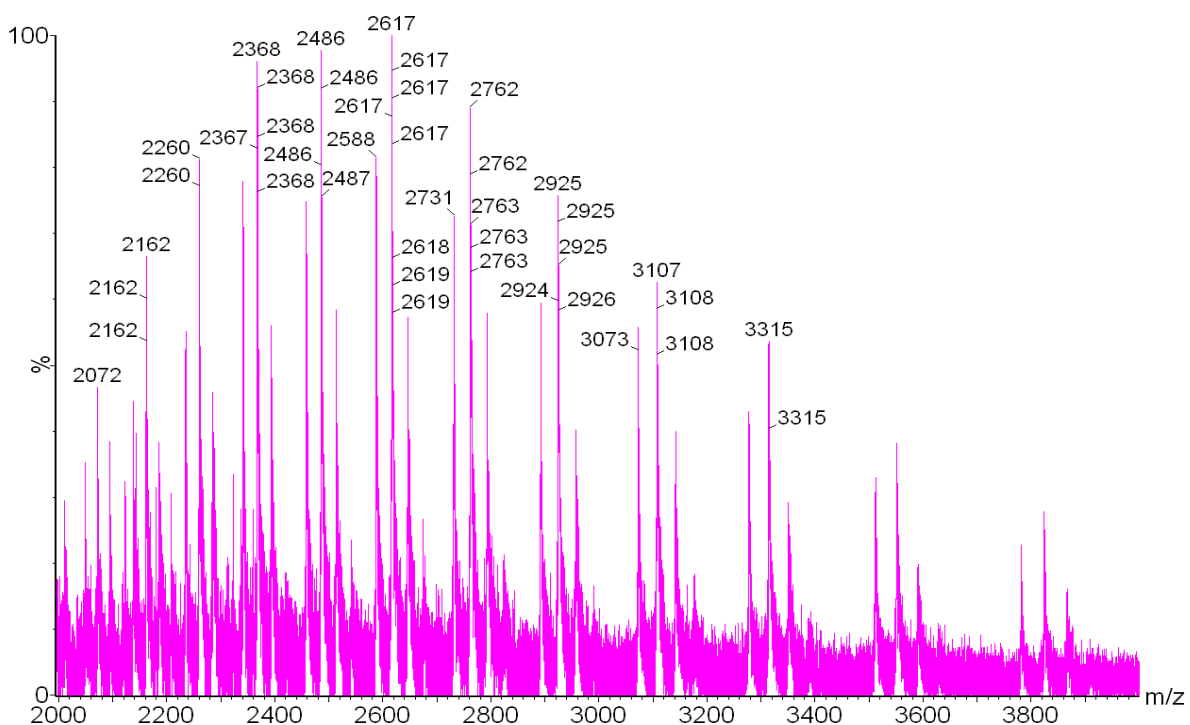
Figur 2.1: Overlay av kromatogrammer for redusert og deglykosylert DOTA-Trastuzumab, støkiometrier 1:1, 5:1, 10:1 og 15:1. n=4.



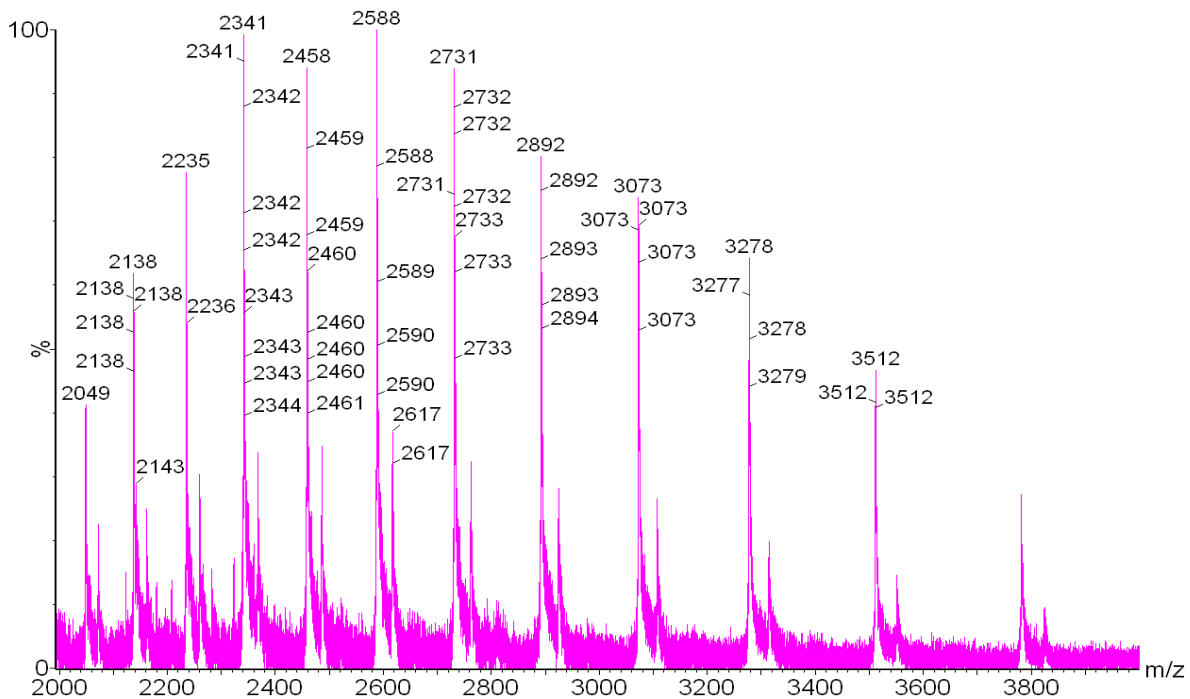
Figur 2.2: Råspekter av deglykosylert og redusert DOTA-Trastuzumab 15:1, heavy chain.



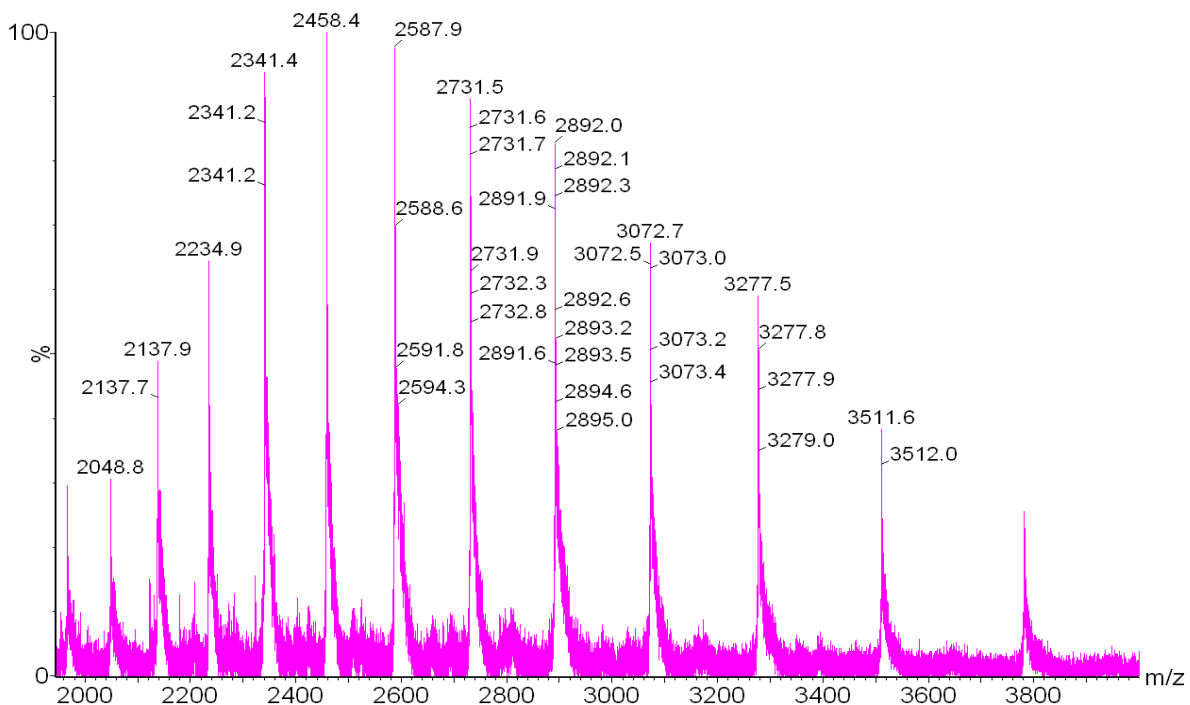
Figur 2.3: Råspekter av deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 10:1, heavy chain.



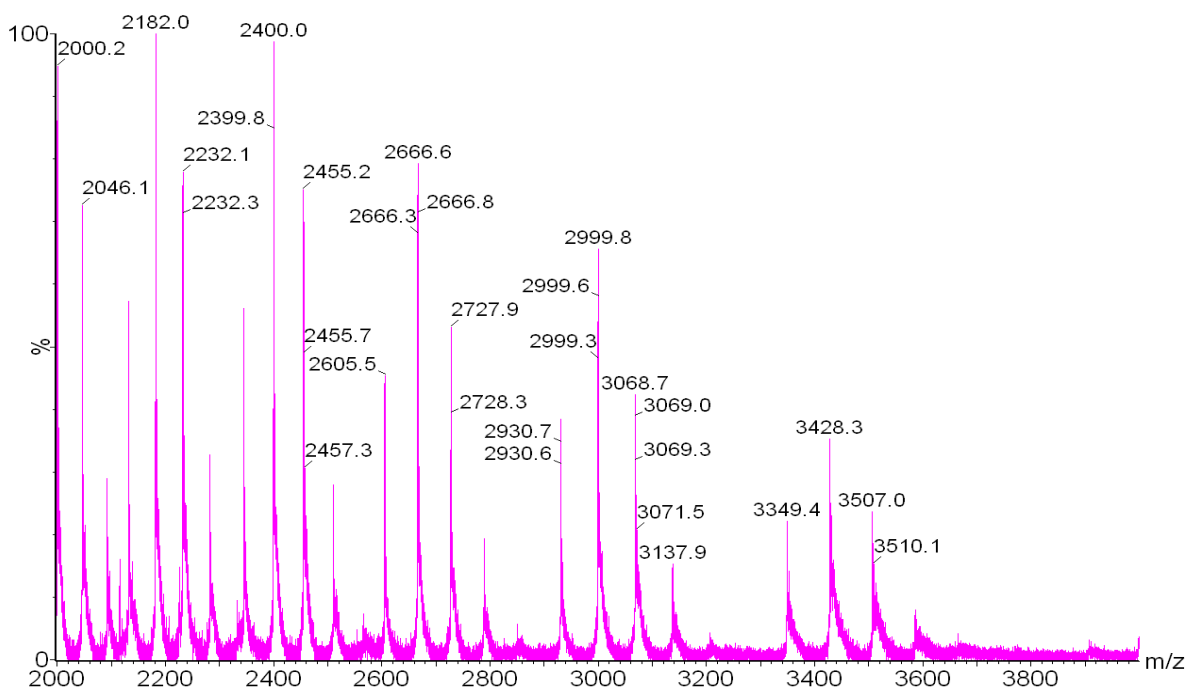
Figur 2.4: Råspekter av deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 5:1, heavy chain



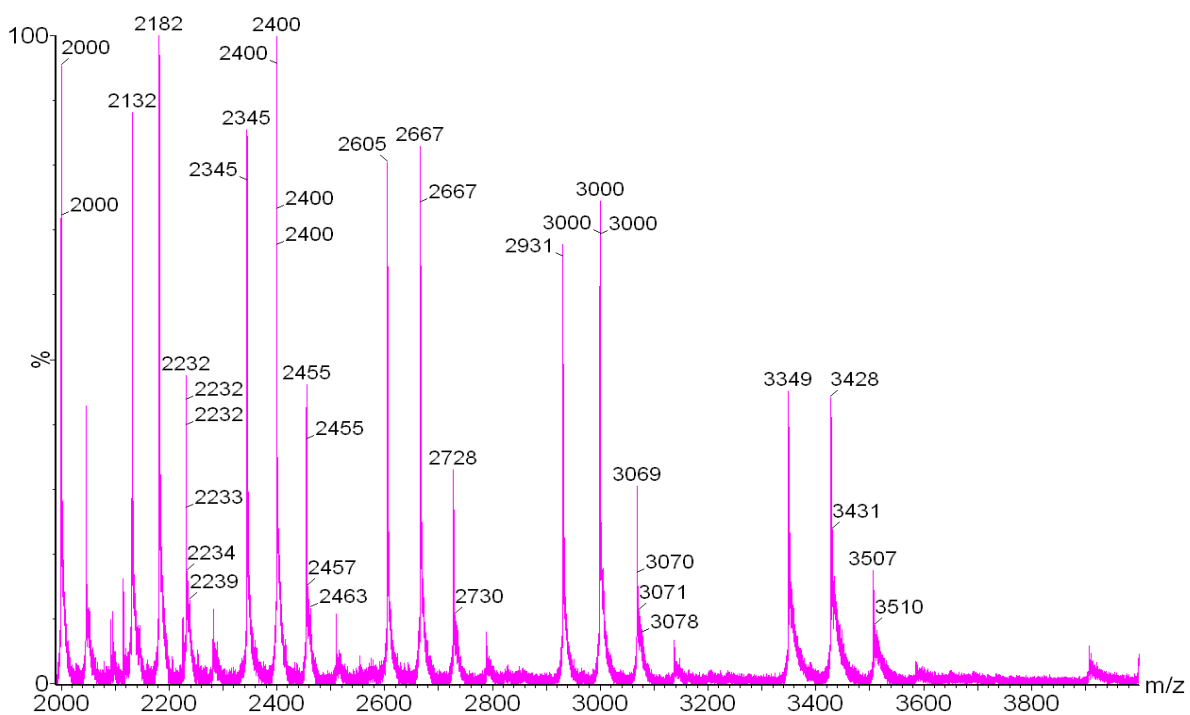
Figur 2.5: Råspekter av deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 1:1, heavy chain.



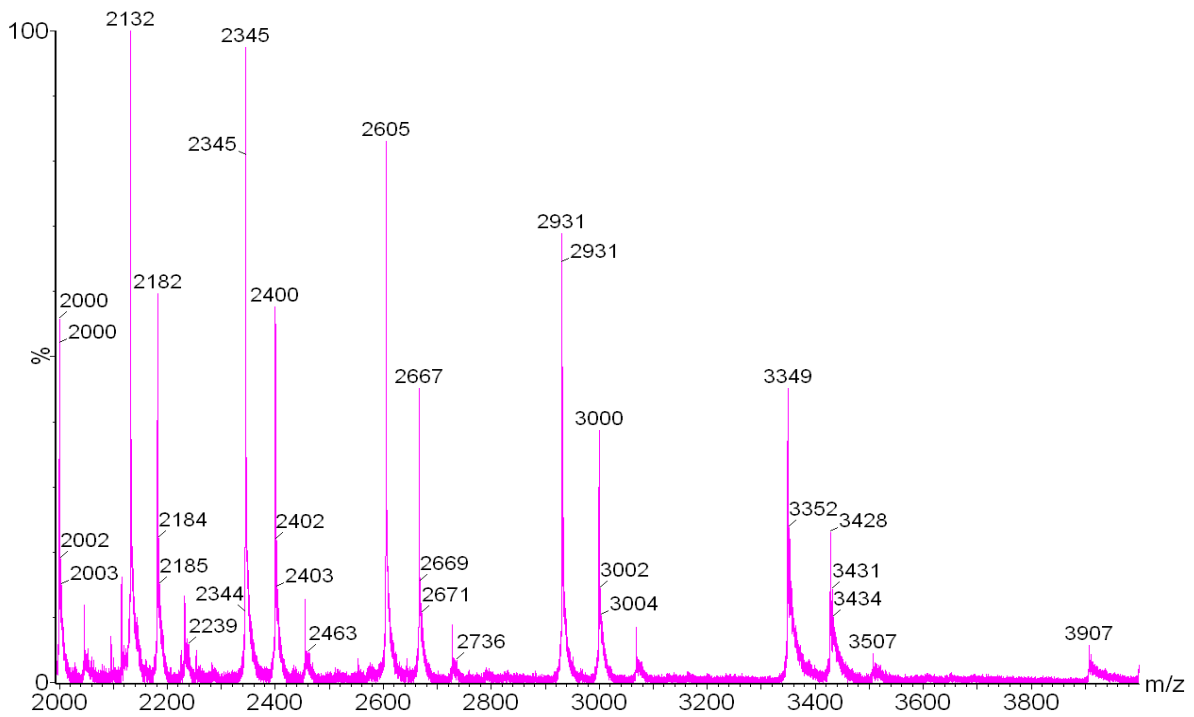
Figur 2.6: Råspekter av deglykosylert redusert Trastuzumab, heavy chain



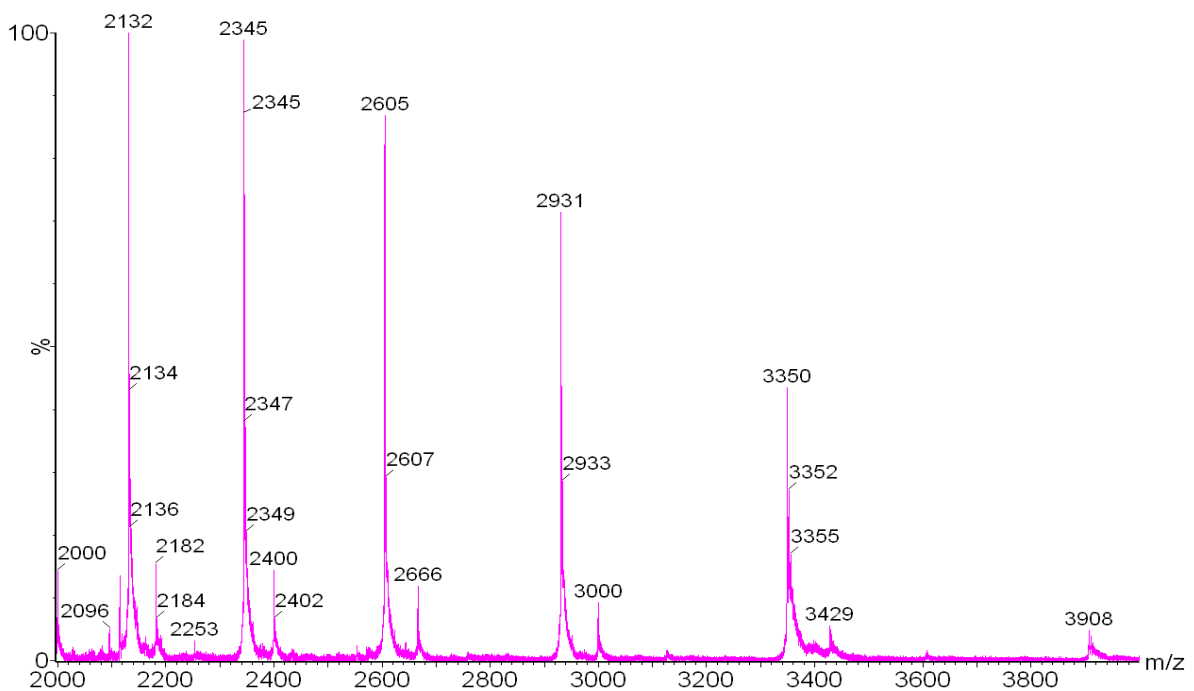
Figur 2.7: Råspekter av deglykosylert og redusert DOTA-Trastuzumab 15:1, light chain.



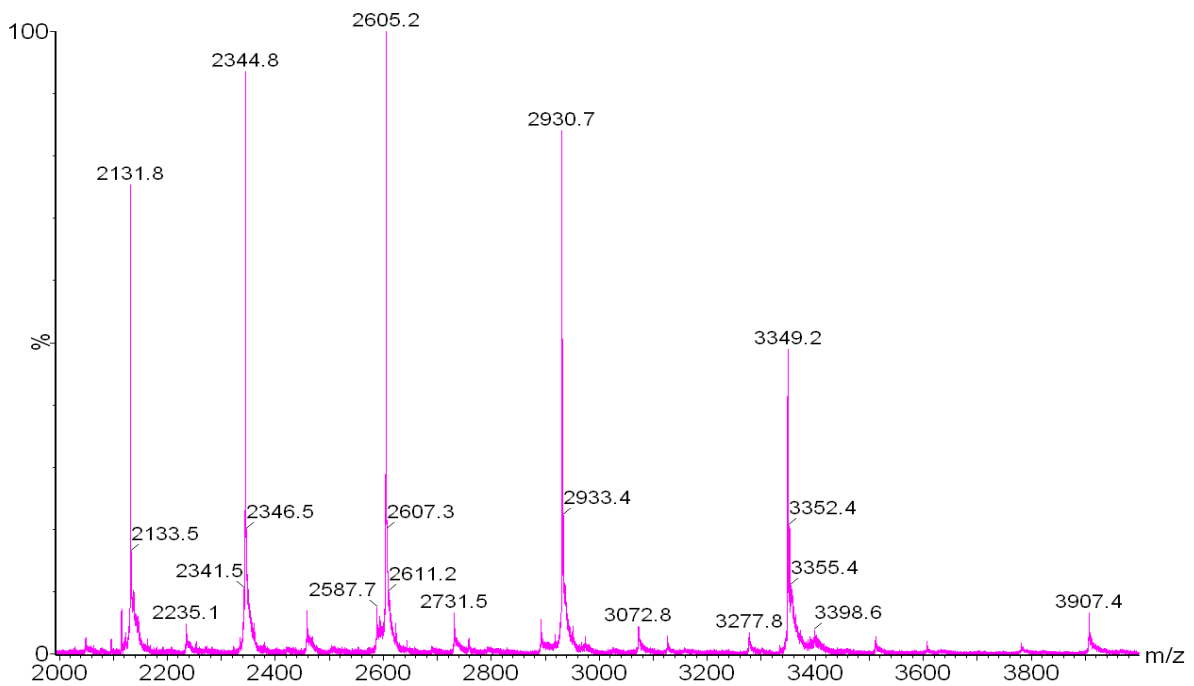
Figur 2.8: Råspekter av deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 10:1, light chain.



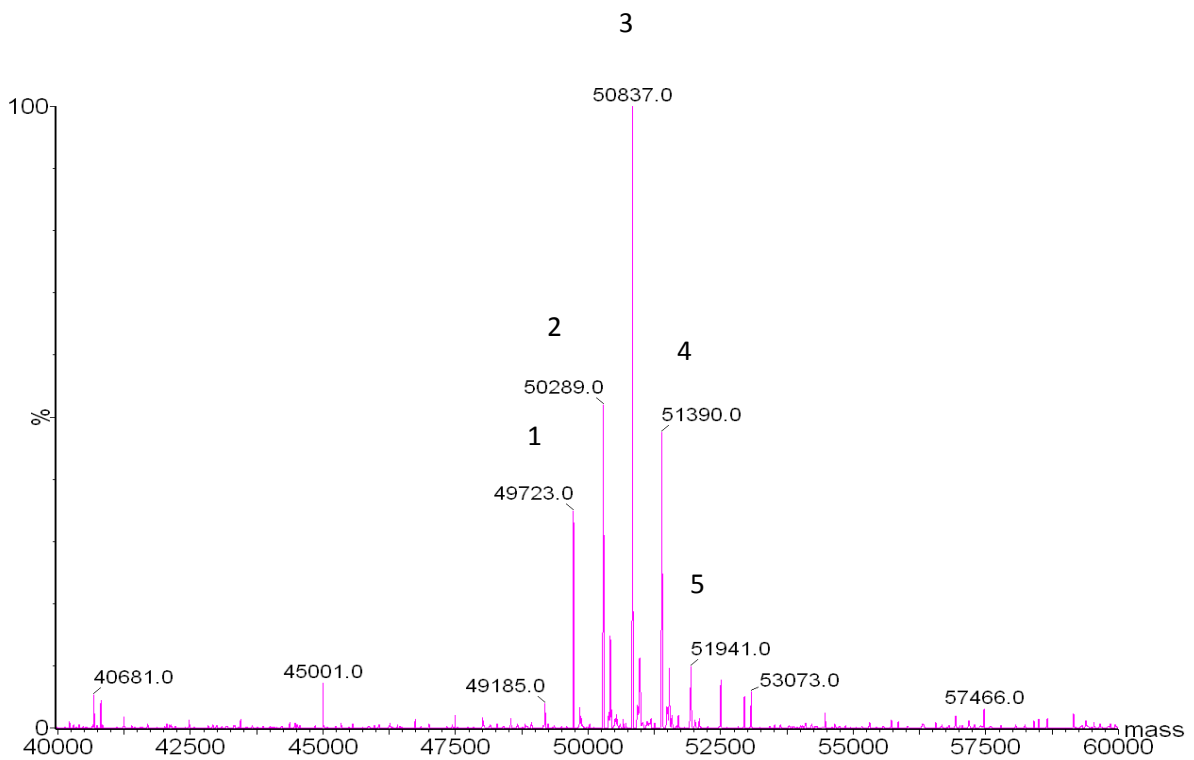
Figur 2.9: Råspekter av deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 5:1, light chain



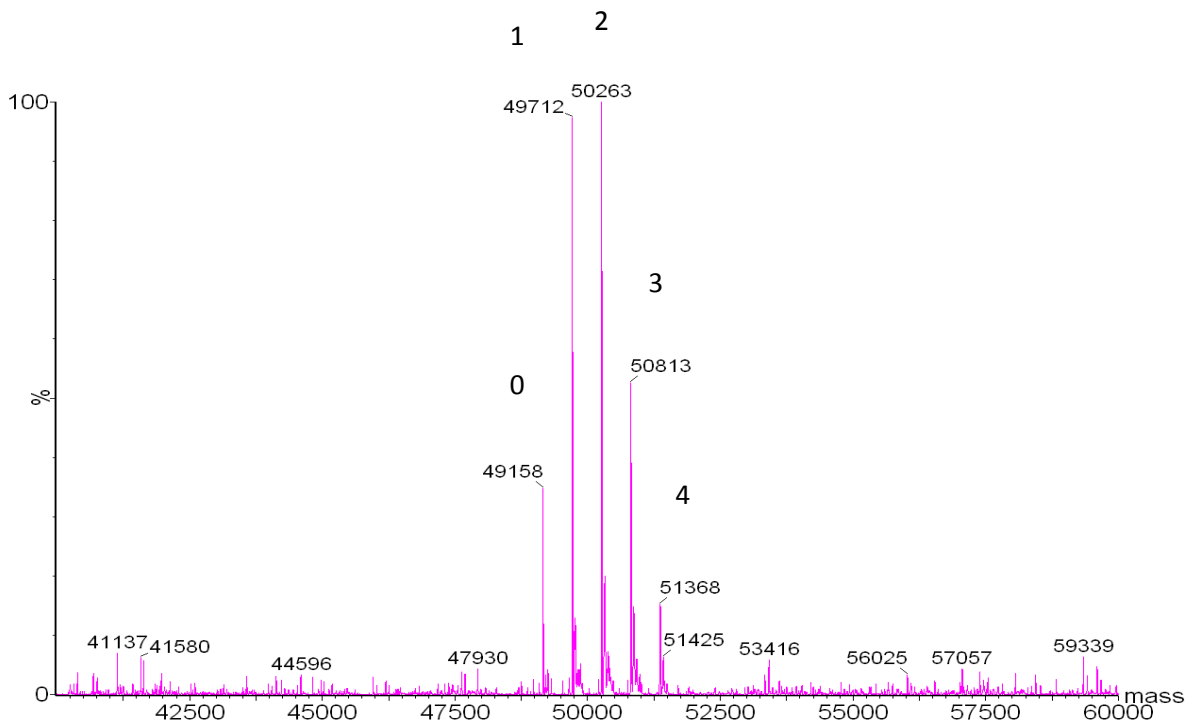
Figur 2.10: Råspekter av deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 1:1, light chain.



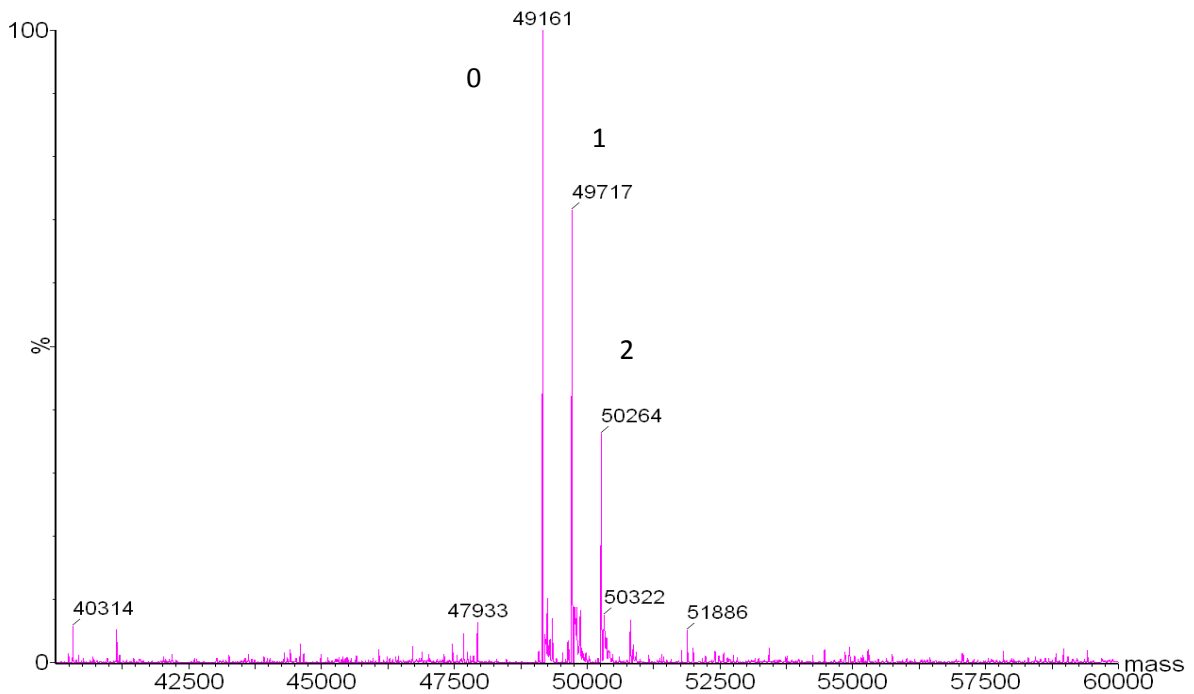
Figur 2.11: Råspekter av deglykosylert redusert Trastuzumab, light chain.



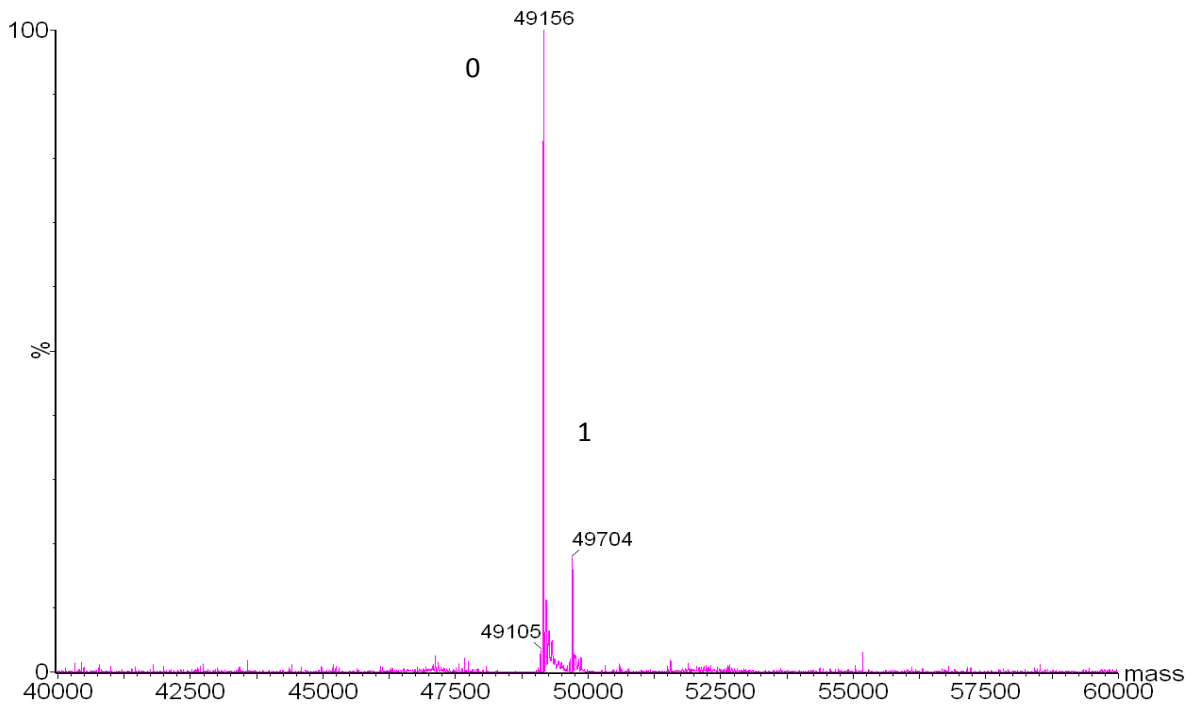
Figur 2.12: Dekonvolvert spekter av deglykosylert og redusert DOTA-Trastuzumab 15:1, heavy chain.



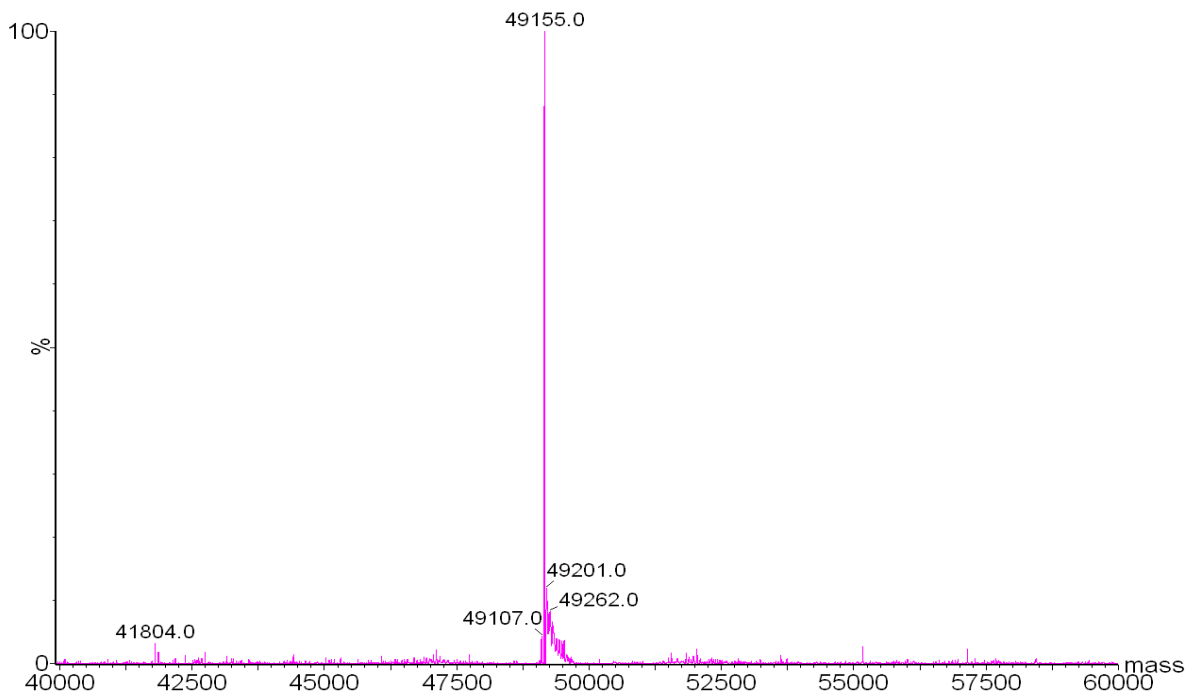
Figur 2.13: Dekonvolert spekter av deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 10:1, heavy chain.



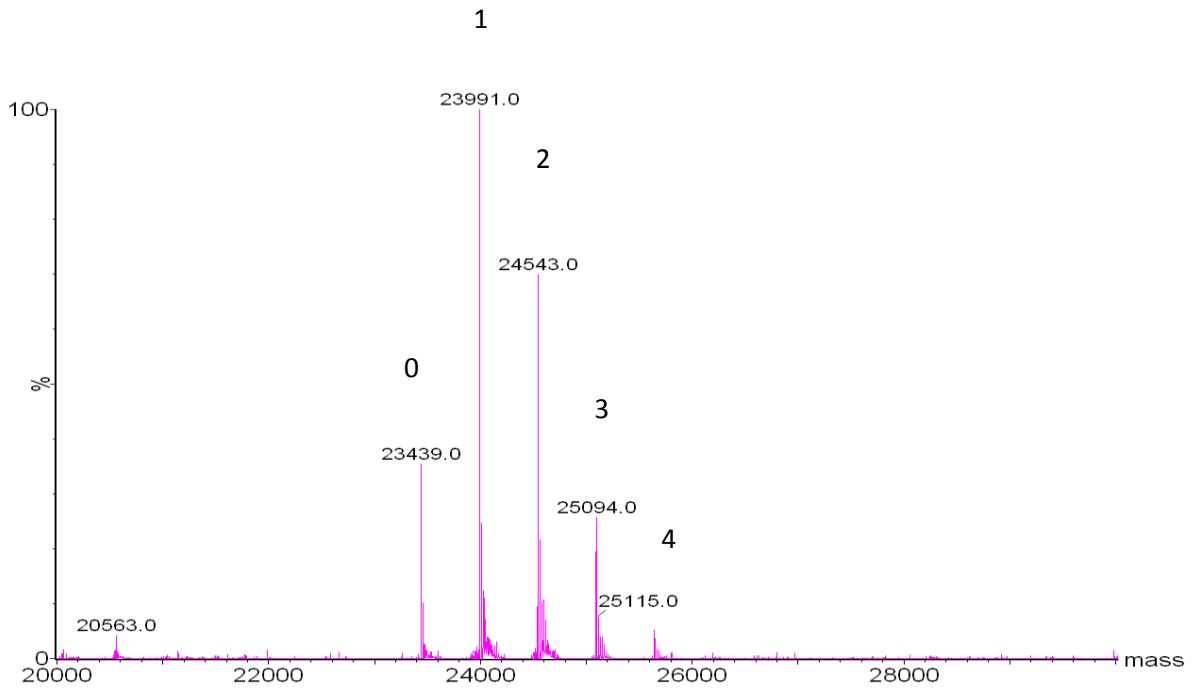
Figur 2.14: Dekonvolert spekter av deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 5:1, heavy chain



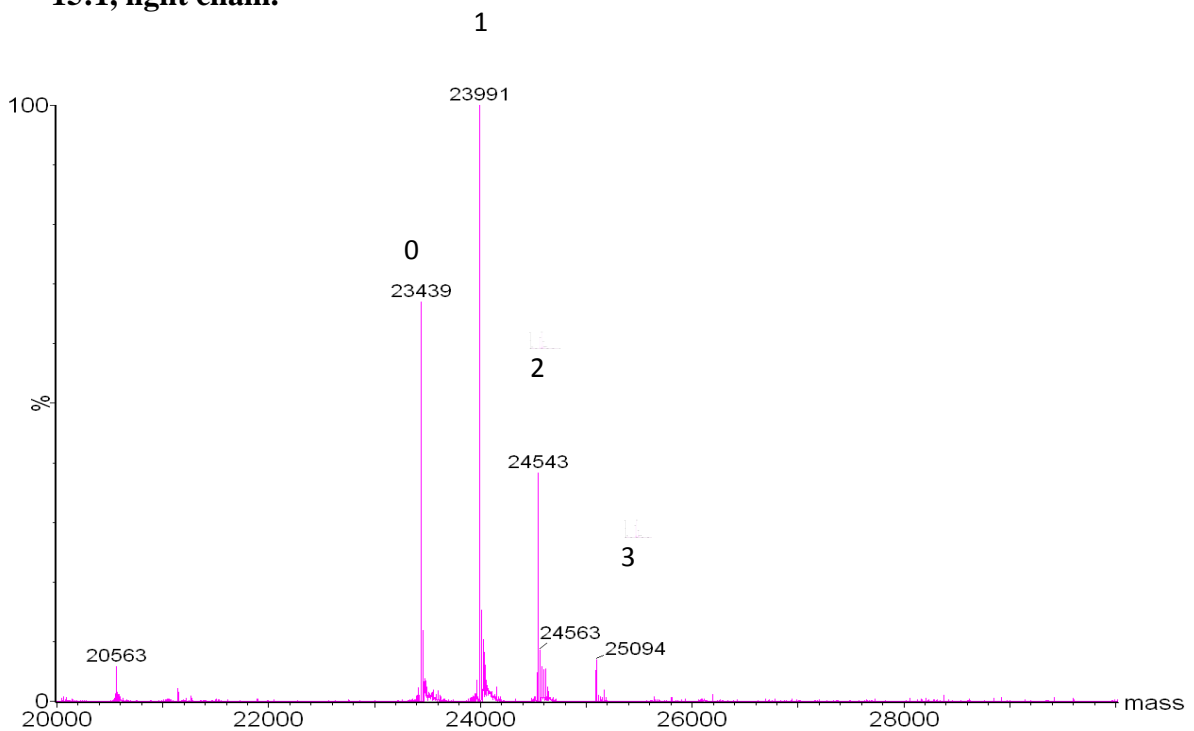
Figur 2.15: Dekonvulert spekter deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 1:1, heavy chain.



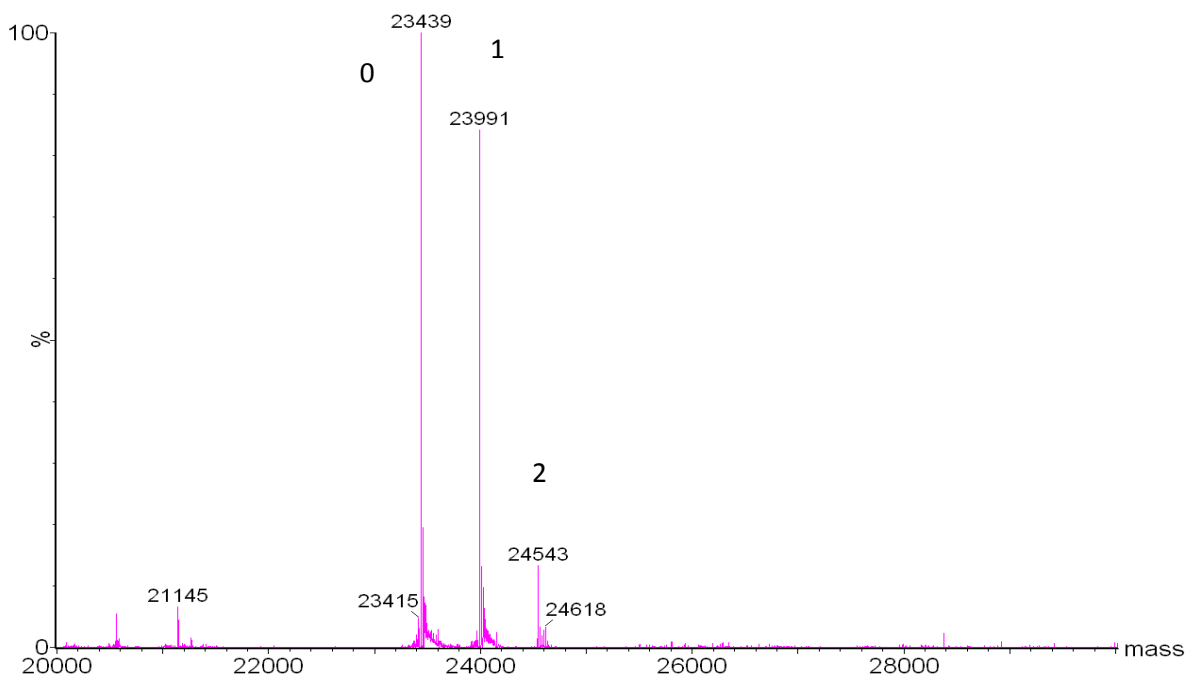
Figur 2.16: Dekonvulert spekter deglykosylert redusert Trastuzumab, heavy chain.



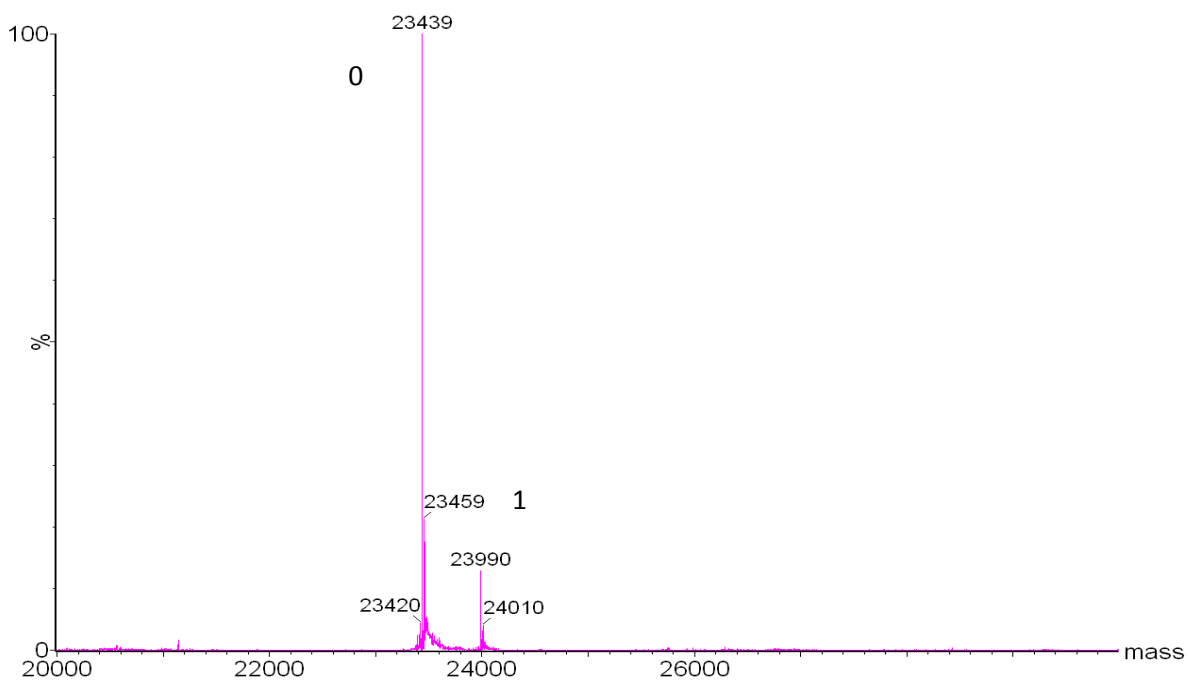
Figur 2.17: Dekonvulert spekter av deglykosylert og redusert DOTA-Trastuzumab 15:1, light chain.



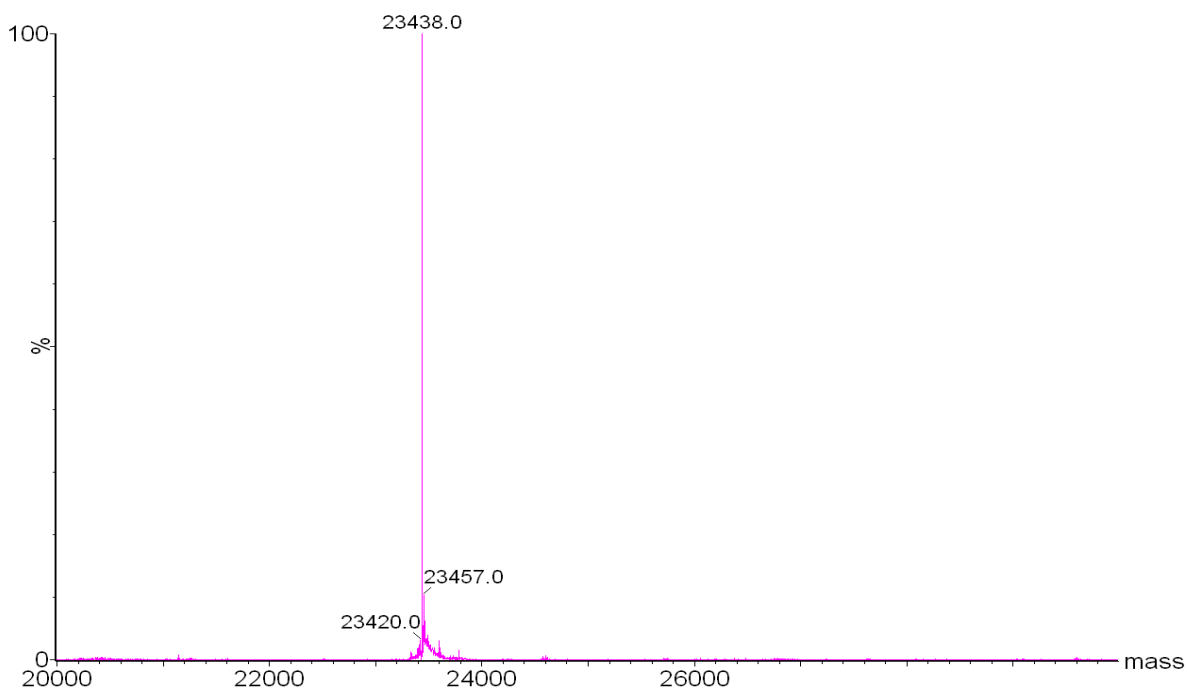
Figur 2.18: Dekonvulert spekter av deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 10:1, light chain.



Figur 2.19: Dekonvolert spekter av deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 5:1, light chain



Figur 2.20: Dekonvolert spekter deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 1:1, light chain.



Figur 2.21: Dekonvolvert spekter deglykosylert redusert Trastuzumab, light chain.

Tabell 2.1: Resultater over DAR og Df/Dn*100% for deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 15:1

DAR nominell	DAR funnet	Retensjonstid Heavy chain	DAR funnet Light chain	Retensjonstid Lightchain	DAR funnet Total	Df/Dn* 100%
15:1	2,63	9,44	1,36	10,86	7,98	53,2
	2,59	9,44	1,36	10,84	7,9	52,7
	2,79	9,49	1,39	10,82	8,32	55,5
	2,65	9,47	1,36	10,84	8,02	53,5
Gjennomsnitt	2,7	9,5	1,4	10,8	8,1	53,7
RSD (%)	3,3	0,3	1,1	0,2	2,3	2,3

Tabell 2.2: Tabell: Resultater over DAR og Df/Dn*100% for deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 10:1

DAR nominell	DAR funnet Heavy chain	Retensjonstid Heavy chain	DAR funnet Light chain	Retensjonstid Light chain	DAR funnet Total	Df/Dn* 100%
10:1	1,73	9,44	0,93	10,84	5,32	53,2
	1,8	9,42	0,82	10,81	5,24	52,4
	1,52	9,46	0,82	10,81	4,68	46,8
	1,64	9,46	1,08	10,82	5,44	54,4
Gjennomsnitt	1,7	9,4	0,9	10,8	5,2	51,7
RSD (%)	7,2	0,2	13,5	0,1	6,5	6,5

Tabell: Tabell 2.3: Tabell: Resultater over DAR og Df/Dn*100% for deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 5:1

DAR nominell	DAR funnet Heavy chain	Retensjonstid Heavy chain	DAR funnet Light chain	Retensjonstid Light chain	DAR funnet Total	Df/Dn* 100%
5:1	0,80	9,44	0,43	10,82	2,46	49,2
	0,80	9,44	0,43	10,81	2,46	49,2
	0,77	9,46	0,42	10,82	2,38	47,6
	0,72	9,37	0,42	10,82	2,28	45,6
Gjennomsnitt	0,8	9,4	0,4	10,8	2,4	48,4
RSD (%)	4,9	0,42	1,4	0,05	3,6	3,5

Tabell: Tabell 2.4: Tabell: Resultater over DAR, retensjonstid og Df/Dn*100% for deglykosylert redusert DOTA-Trastuzumab 1:1

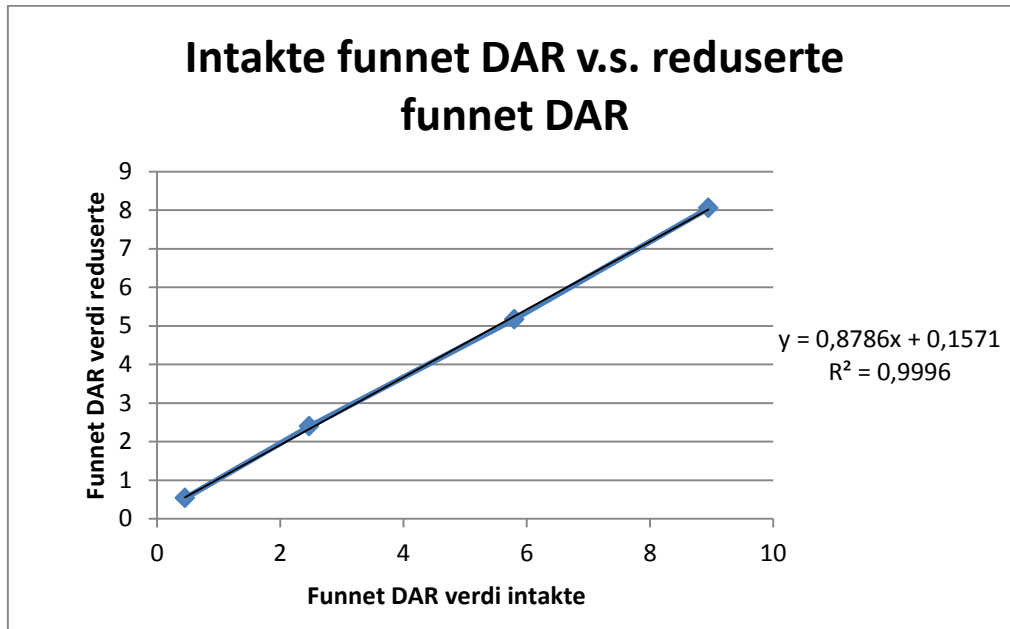
DAR nominell	DAR		DAR		DAR	Df/Dn* 100%
	funnet Heavy chain	Retensjonstid Heavy chain	funnet Light chain	Retensjonstid Light chain	funnet Total	
1:1	0,15	9,47	0,10	10,82	0,5	50
	0,17	9,37	0,09	10,74	0,52	52
	0,19	9,44	0,10	10,79	0,58	58
	0,18	9,46	0,09	10,84	0,54	54
Gjennomsnitt	0,2	9,4	0,1	10,8	0,5	53,5
RSD (%)	9,9	0,5	6,1	0,4	6,4	6,4

Vedlegg 3: Tabell over molekylvekter for intakt, deglykosylert og redusert Trastuzumab.

Tabell 3.1: Gjennomsnittelige molekylvekter for intakt og redusert Trastuzumab.

Parallell nummer	Molekylvekt intakt	Molekylvekt deglykosylert	Molekylvekt heavy chain	Molekylvekt light chain
1	148060	145184	49158	23439
2	148059	145181	49158	23439
3	148058	145180	49158	23439
4	148058	145180	49158	23439
5	148058	145182	49158	23439
6	148058	145179	49157	23439
Gjennomsnitt	148059	145181	49158	23439
RSD (%)	0,0006	0,0012	0,0008	0,0000

Vedlegg 4: Figur over sammenheng mellom funnet DAR nominell for reduserte og intakte antistoffer



Figur 4.1: Sammenheng mellom funnet DAR verdi for intakte og reduserte antistoffer