

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ana GOLOB

**KINETIKA VEZAVE REKOMBINANTNIH  
MONOKLONSKIH PROTITELES NA RECEPTOR  
 $Fc\gamma RIIIa$**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ana GOLOB

**KINETIKA VEZAVE REKOMBINANTNIH MONOKLONSKIH  
PROTITELES NA RECEPTOR Fc $\gamma$ RIIIa**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

**BINDING KINETICS OF RECOMBINANT MONOCLONAL  
ANTIBODIES ON RECEPTOR Fc $\gamma$ RIIIa**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v farmacevtski družbi Lek d.d., v laboratoriju za razvoj bioprocесov in proteinski biofiziki in bioinformatiki, Biofarmacevtika, Mengeš.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je dne 28.11.2014 sprejela temo in za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Mojco Narat, za somentorja dr. Jaka Marušiča in za recenzetko prof. Vladko Čurin Šerbec.

Komisija za oceno in zagovor: 19.11.2015

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Mojca NARAT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Jaka MARUŠIČ  
Lek d.d., oddelek Proteinska biofizika in bioinformatika, Biofarmacevtika,  
Mengeš

Članica: prof. dr. Vladka ČURIN ŠERBEC  
Zavod RS za transfuzijsko medicino

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Ana Golob

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 57.083.3:591.111.8:602.64 (043.2)
KG	Celična linja CHO/rekombinantna monoklonska protitelesa/kinetika vezave/receptor Fc $\gamma$ RIIIa/genski inženiring OCTET/antigen
AV	GOLOB, Ana, dipl. bioteh. (UN)
SA	NARAT, Mojca (mentor)/MARUŠIČ, Jaka (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2015
IN	KINETIKA VEZAVE REKOMBINANTNIH MONOKLONSKIH PROTITELES NA RECEPTOR Fc $\gamma$ RIIIa
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XII, 66 str., 18 pregл., 39 sl. 1 pril., 36 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Farmacevtska industrija v zadnjem času vse več rekombinantnih monoklonskih protiteles (mAb) proizvaja v sesalskih celičnih linijah. Najpogosteje uporabljeni so celice ovarijev kitajskega hrčka (CHO). Ab so bistvenega pomena pri protitelesnem imunskejem odzivu. Preko variabilnega dela (Fab) se specifično vežejo na molekulo antiga (Ag), medtem ko se preko konstantnega dela (Fc), vežejo na receptor Fc $\gamma$ na efektorski celici. Prav ta vezava uravnava pomembne efektorske funkcije imunskega sistema, kot je od protiteles posredovana celična citotoksičnost (ADCC), izkorisčamo pa jo tudi v primerih, ko mAb proizvajamo kot zdravilne učinkovine. Na efektorske funkcije in funkcionalnost mAb vpliva tudi glikozilacija dela Fc, do katere pride pri sintezi mAb v celicah CHO. Namen raziskovalne naloge je razviti metodo, s katero bi lahko natančno določili parametre kinetike vezave mAb na receptor Fc $\gamma$ RIIIa. Kinetiko vezave smo merili na aparaturi Octet RED96, ki deluje po principu interferometrije. Izkazalo se je, da je mogoče iz parametrov vezave sklepati na aktivnost ADCC. Prav tako je mogoče iz kinetike sklepati o nekaterih glikozilacijskih strukturah (bGx(-F)) mAb. V raziskavo smo vključili tudi vzorce mAb z dodanim Ag. Izkazalo se je, da tudi dodatek Ag vpliva na kinetiko vezave.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	UDC 57.083.3:591.111.8:602.64 (043.2)
CX	CHO cell lines/recombinant monoclonal antybodies/kinetics binding/receptor Fc $\gamma$ RIIIa/gene engineering/OCTET/antigen
AU	GOLOB, Ana
AA	NARAT, Mojca (supervisor)/MARUŠIČ, Jaka (co-advisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study of Biotechnology
PY	2015
TI	KINETICS BINDING RECOMBINANT MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE RECEPTOR Fc $\gamma$ RIIIa
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO	XII, 66 p., 18 tab., 39 fig. 1 ann., 36 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Production of recombinant monoclonal antibodies (mAbs) is progressively shifting to mammalian cell lines. The most frequently used mammalian cells are Chinese hamster ovary (CHO) cells. mAbs play an essential role in the antibody immune response and can be structurally subdivided into two distinct functional units: i) the fragment of antigen binding (Fab), which enables antigen (Ag) binding and confers Ag specificity and ii) the constant fragment (Fc), which facilitates the interaction with IgG receptors (Fc $\gamma$ R $\text{I}_{\text{IIA}}$ s) on the effector cells. Binding to the effector cells can initiate and regulate important immune mechanisms, such as antibody-mediated cellular cytotoxicity (ADCC). This mechanism is also utilized when mAbs are used as therapeutic agents. Glycosylation of Fc, which occurs during the synthesis in CHO cells, affects quality and functionality of mAb binding, which can in turn also alter the ADCC activity. Our main aim was to assess how mAb – Fc $\gamma$ RIIIa binding kinetics relates with glycosylation profile and consequently with ADCC. To this end, we developed an accurate method to determine binding kinetics parameters of mAb–Fc $\gamma$ RIIIa binding. Measurements were obtained with Octet RED96 (forteBIO) interferometer. Our results indicate a positive correlation between glycosylation profiles and mAb's affinity for Fc $\gamma$ RIIIa. Similarly, there is also a positive correlation between glycosylation profiles and ADCC. Furthermore, we present strong evidence that Ag binding to mAb increases it's affinity for Fc $\gamma$ RIIIa.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG .....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XI
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....	1
1.2 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE.....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 CELIČNE LINIJE CHO.....	3
2.2 PROIZVODNA CELIČNA LINIJA .....	4
2.3 REKOMBINANTNA MONOKLONSKA PROTITELESA.....	6
<b>2.3.1 Zgradba protiteles .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3.2 Aktivnost ADCC in CDC .....</b>	<b>8</b>
2.4 Povišana proizvodnja rekombinantnega mAb.....	8
2.5 GLIKOZILACIJA .....	10
<b>2.5.1 N-vezana glikozilacija .....</b>	<b>11</b>
<b>2.5.2 O-vezana glikozilacija .....</b>	<b>14</b>
2.6 Fc $\gamma$ RIIIa.....	14
2.7 VPLIV GLIKOZILACIJE PROTITELES NA KINETIKO VEZAVE IN AKTIVNOST CDC TER ADCC .....	16
2.8 INTERFEROMETRIJA Z BIOLOŠKIMI Plastmi .....	17
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>20</b>
3.1 MATERIALI.....	20
<b>3.1.1 Celične linije in rekombinantna monoklonska protitelesa .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.2 Gojišča in hranila za gojenje celičnih linij .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.3 Kemikalije in ostali pripomočki .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.4 Laboratorijska oprema .....</b>	<b>21</b>
3.2 METODE .....	22
<b>3.2.1 Gojenje celic za produkcijo mAb .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.2 Priprava materiala za merjenje kinetike vezave in glikansko mapiranje .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.3 Glikansko mapiranje .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.4 Biotinilacija .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.5 Deglikozilacija .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.6 Vezava antigena na mAb .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.7 Merjenje kinetike vezave .....</b>	<b>31</b>

<b>3.2.8 Analiza podatkov .....</b>	33
<b>4 REZULTATI Z RAZPRAVO .....</b>	34
<b>4.1 GLIKOZILACIJSKI PROFIL.....</b>	34
<b>4.1.1 mAb A iz različnih klonov z različno vsebnostjo bG0(-F) .....</b>	34
<b>4.1.2 Uporaba encimov za deglikozilacijo .....</b>	38
<b>4.1.3 mAb D iz različnih zbirkov z različno vsebnostjo bG0(-F) .....</b>	45
<b>4.2 NAPOVEDOVANJE AKTIVNOSTI ADCC IZ PARAMETROV VEZAVE (K<sub>D</sub>) PROTITELESA IgG NA RECEPTOR Fc<math>\gamma</math>RIIIa .....</b>	50
<b>4.3 VPLIV VEZAVE ANTIGENA NA REKOMOBINANTNO MONOKLONSKO PROTTELO .....</b>	53
<b>4.3.1 Vezava na antigen Ag2 .....</b>	54
<b>4.3.2 Vezava na antigen Ag1 .....</b>	56
<b>5 SKLEPI .....</b>	59
<b>6 POVZETEK .....</b>	61
<b>7 VIRI .....</b>	63
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Tipi glikozilacije (A Thermo Fisher..., 2015) .....	11
Preglednica 2: Kemikalije in njihov namen .....	21
Preglednica 3: Laboratorijska oprema in njen namen .....	21
Preglednica 4: Uporabljeni encimi .....	28
Preglednica 5: Vzorci za deglikozilacijo .....	29
Preglednica 6: Pogoji reakcije za posamezne korake metode .....	33
Preglednica 7: Vzorci mAb A in njim pripradajoč % vsebnosti bG0(-F) .....	34
Preglednica 8: Vpliv glikozilacijskega profila na kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa za vzorce mAb A .....	36
Preglednica 9: Vsota glikanskih struktur, ki vsebujejo (-F) za vzorce mAb D .....	41
Preglednica 10: Vpliv glikozilacijskega profila na kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa za vzorce mAb D .....	43
Preglednica 11: Vpliv glikozilacijskega profila na kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa za vzorce mAb D .....	45
Preglednica 12: Napovedane vrednosti bG0(-F) za vzorce mAb D .....	49
Preglednica 13: Vzorci mAb A in njim pripadajoča vrednost aktivnosti ADCC .....	50
Preglednica 14: Vpliv glikozilacijskega profila na kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa za vzorce mAb A .....	51
Preglednica 15: Podatki bG0(-F) in aktivnosti ADCC za vzorce mAb A .....	52
Preglednica 16: Uporabljeni rekombinantni mAb in za njih specifični antigeni .....	53
Preglednica 17: Vpliv vezave Ag na mAb na kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ III za vzorce mAb B in mAb C .....	55
Preglednica 18: Vpliv vezave Ag na mAb na kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa za vzorce mAb A .....	57

## KAZALO SLIK

Slika 1: Genomska heterogenost pri celični liniji CHO (Wurm in Hacker, 2011).....	4
Slika 2: Razvoj celične linije CHO (Lai in sod., 2013).....	6
Slika 3: Zgradba molekule protitelesa IgG (Absolute antibody, 2015).....	7
Slika 4: Aktivnost ADCC in CDC (Jimenez in sod., 2012) .....	8
Slika 5: Sistem DHFR/MTX (Camire, 2000).....	9
Slika 6: Sistem GS/MSX (Camire, 2000).....	9
Slika 7: Tipi glikozilacije (A Thermo Fisher..., 2015) .....	11
Slika 8: Prekurzor N-vezanih glikanov (Glc <sub>3</sub> Man <sub>9</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> ) (A Thermo Fisher..., 2015) ....	12
Slika 9: Biosinteza prekurzorja N-vezanih glikanov na dolichol pirofosforil (Lodish in sod., 2000 ) .....	12
Slika 10: Prenos celotnega oligosaharida Glc <sub>3</sub> Man <sub>9</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> na asparaginski ostanek in začetna predelava N-vezanih glikanov v zrnatem endoplazemskem retikulumu (Lodish in sod., 2000).....	13
Slika 11: Obdelava proteinov v cis-, medialnih- in trans-Golgijevih predelih do kompleksnih N-vezanih glikanov (Lodish in sod., 2000) .....	13
Slika 12: Heterogenost N-vezanih glikanov na terminalni GlcNAc (Raju, 2003) .....	14
Slika 13: Fc $\gamma$ RIIIa in molekulski zasnova IgG Fc-Fc $\gamma$ R kompleksa. A: Sled alfa ogljikovega atoma v obliki konjske podkve Fc. Funkcionalne skupine ogljikovih hidratov so prikazane v sferah s kisikom, ki je obarvan rdeče; B: struktura človeškega Fc $\gamma$ RIII, prikazana v obliki trakov; C: Struktura v obliki trakov prikazuje Fc- Fc $\gamma$ RIII kompleks. Fc $\gamma$ RIII je rumene barve in Fc del IgG modre barve; D: Vmesna površina Fc- Fc $\gamma$ RIII kompleksa. Aminokisline, ki so vključene, so prikazane v obliki paličic. Barve so enake kot v primeru A do C (Siberil in sod., 2006) .....	15
Slika 14: Vezavno mesto N-vezanih glikanov (Niwa in sod., 2005) .....	16
Slika 15: Aparatura Octet in sestavni deli (Octet System Data..., 2011).....	18
Slika 16: BLI biosenzor (Tobias in Kumaraswamy, 2013).....	18
Slika 17: BLI je optična analitska metoda, ki analizira združene vzorce bele svetlobe, ki se odbijajo od dveh površin. Sprememba v številu molekul, vezanih na biosenzorju oziroma debelina sloja, ki ga formirajo vezane molekule, povzroči premik v združenem vzorcu, ki se meri v realnem času (Tobias in Kumaraswamy, 2013).....	19
Slika 18: Glikansko mapiranje (Fuller in sod., 2015).....	25
Slika 19: Specifična mesta rezanja encimov (Sigma-Aldrich, 2015 ).....	30
Slika 20: Potek merjenja kinetike vezave z FAB biosenzorji (Tobias in sod., 2014) .....	31
Slika 21: Potek merjanje kinetike vezave s SA biosenzorji (povzeto po Tobias in sod., 2014).....	32
Slika 22: Plošča s pripravljenimi vzorci in regeneracijskim reagentom. B označuje pufer, L imobilizacijo, R regeneracijo, N nevtralizacijo, roza polja označujejo vzorce .....	32
Slika 23: Glikanska mapa vzorcev mAb A pridobljenih iz različnih klonov .....	35

Slika 24: Krivulji asociacije in disociacije za vzorca mAb A z različno vsebnostjo bG0(-F) .....	37
Slika 25: Afinitetni graf $k_d$ v odvisnosti od $k_a$ za vzorce mAb A .....	37
Slika 26: Graf korelacije med bG0(-F) in $K_D$ za različne vzorce mAb A .....	38
Slika 27: Glikanska mapa vzorcev mAb D pridobljenih z deglikozilacij .....	40
Slika 28: Graf korelacije med bGx(-F) in $K_D$ za različne vzorce mAb D .....	44
Slika 29: Glikanska mapa vzorcev mAb D pridobljenih iz različnih zbirkov ter reference mAb D .....	46
Slika 30: Graf korelacije med bGx(-F) in $K_D$ za različne vzorce mAb D .....	47
Slika 31: Afinitetni graf $k_d$ v odvisnosti od $k_a$ za vzorce mAb D z različno vsebnostjo bGx(-F) .....	48
Slika 32: Graf za sestavljanje modela za napovedovanje bG0(-F) iz $K_D$ za mAb A .....	49
Slika 33: Graf korelacije med aktivnostjo ADCC in $K_D$ za vzorce mAb A .....	51
Slika 34: Povezava med korelacijama bG0(-F) in $K_D$ ter aktivnostjo ADCC in $K_D$ za vzorce mAb A .....	52
Slika 35: Graf za sestavljanje modela za napovedovanje bG0(-F) ali aktivnosti ADCC za vzorce mAb A .....	53
Slika 36: Neuspešna imobilizacija vzorca s predhodno dodanim Ag na FAB biosenzor .....	54
Slika 37: Krivulji asociacije in disociacije za vzorce mAb B in mAb C z in brez dodatka antigena .....	56
Slika 38: Afinitetni graf $k_d$ v odvisnosti od $k_a$ za mAb proti Ag2 .....	56
Slika 39: Afinitetni graf $k_d$ v odvisnosti od $k_a$ za mAb proti Ag1 .....	57

## KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Nomenklatura N-vezanih oligosaharidov

### OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADCC	Od protiteles posredovana celična citotoksičnost
Ag	Antigen
AK	Aminokislina
FAB biosenzorji	Biosenzorji proti variabilnemu delu protitelesa
Asn	Asparagin
BHK-21	Ledvične celice mladička hrčka
BLI	Interferometrija z biološkimi plastmi (ang. Bio-Layer Interferometry)
BSA	Goveji serumski albumin (ang. Bovine serum albumin)
CDC	Od komplementa odvisna citotoksična aktivnost
CDR	Komplementarnost determinirajoče regije
CHO	Celice jajčnikov kitajskega hrčka (ang. Chinese hamster ovary)
CH-1, CH-2, CH-3	Konstantna področja težke verige Ig
CL-1	Konstantno področje lahke verige Ig
C1q	Podenota molekule C1, ki se veže na vezavno mesto, ki se razkrije ob vezavi Ig na antigen. Molekula sodeluje pri aktivaciji komplementa
DHFR	Dihidrofolat reduktaza
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
DWP	Mikrotitrtska plošča z večjimi volumni (ang. deepwell plates)
ER	Endoplazemski retikulum
Fab	Variabilno področje Ig - regija za vezavo antigena
Fc	Konstantno področje Ig - regija za vezavo na druge elemente imunskega sistema
Fc $\gamma$ R	Rekombinantni humani protein CD16a, ki se veže na Fc del protitelesa
GA	Golgijev aparat
Glc	Glukoza
GlcNAc	N-acetilglukozamin
Gmap	Glikanska mapa
GS	Glutamin sintetaza
HCl	Klorovodikova kislina
HEK 293	Transformirana celična linija iz človeških embrionalnih ledvic
HILIC	Kromatografija, ki temelji na hidrofilni interakciji (ang. hydrophilic interaction chromatography)
Ig	Imunoglobulin
kDa	Kilodalton

$k_a$	Konstanta asociacije
$k_d$	Konstanta disociacije
$K_D$	Konstanta kinetike vezave
kPBS	Fosfatni pufer s soljo in dodanim kinetičnim reagentom
mAb	Monoklonsko protitelo
Man	Manoza
MBK	Mikrobiološka komora
MSX	Metionin sulfoksamin
MTX	Metotraksat
NaOH	Natrijev hidroksid
NH	Aminska funkcionalna skupina – predstavlja amine
NS0	Mišje mielomske celice
PBS	Fosfatni pufer s soljo (ang. phosphate buffered saline)
pH	Negativni dekadični logaritem koncentracije oksonijevih ionov v nevtrali raztopini
Phe	Fenilalanin
rpm	Število obratov na minuto
SA biosenzorji	Streptavidinski biosenzorji
Ser	Serin
SF	Plastična erlenmajerica za enkratno uporabo (ang. shake flask)
SOP	Standardni operativni postopek
SRP	Površinska plazmonska resonanca
Thr	Treonin
Val	Valin
VH	Variabilno področje težke verige Ig
VL	Variabilno področje lahke verige Ig

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Gojenje sesalskih celic, najpogosteje so to celice ovarijev kitajskega hrčka (CHO), je postal prevladujoč sistem za proizvodnjo rekombinantnih proteinov za klinično uporabo. Sesalske celice omogočajo pravilno sestavljanje proteinov in post-translacijske spremembe. Tako lahko dosežemo dobro kakovost in funkcionalnost proteina, kar je njihova glavna prednost pred drugimi ekspresijskimi sistemi, kot so bakterije, rastline in kvasovke. Kljub velikim prednostim, pa najdemo tudi nekaj slabosti sesalskih celic: so velike in počasi rastoče, zelo občutljive na strižne sile ter nizko produktivne. Tekom let so prišle mnoge izboljšave v sestavi gojišč ter nadzoru postopka gojenja. Še vedno pa obstajajo možnosti za nadaljnje izboljšave sistemov sesalskih celic, ki pa kljub temu ostajajo vodilni sistem za proizvodnjo rekombinantnih glikoproteinov oziroma bioloških zdravil (Wurm, 2004).

V celicah CHO se proizvajajo tudi monoklonska protitelesa (mAb). Med procesom sinteze mAb prihaja do post-translacijskih sprememb, ki so nujno potrebne za ustrezeno biološko aktivnost. Ena glavnih post-translacijskih sprememb je glikozilacija, katera poteka v zrnatem endoplazmatskem retikulumu (ER) in Golgijevem aparatu (GA). Glikozilacija poteka na konstantnem delu (Fc), natančneje med konstantnim področjem 2 (CH2) in konstantnim področjem 3 (CH3), kjer so glikani pritrjeni na asparagin 297 (Asn<sup>297</sup>). Glikozilacija je neodvisna od podrazreda imunoglobulina razreda G (IgG). Fc del Ab in rekombinantnih mAb je tudi del, s katerim se molekula veže na receptor Fc $\gamma$ RIIIa, afiniteta s katero se veže, pa je odvisna od več faktorjev. Eden izmed glavnih faktorjev je glikozilacijski profil Ab. Glikozilacija torej vpliva na kinetiko vezave Ab na receptorje Fc in posledično tudi na efektorske funkcije Ab (od protiteles posredovana celična citotoksičnost (aktivnost ADCC), nizko imunogenost, od komplementa odvisno citotoksično (aktivnost CDC)) ter primeren razpolovni čas Ab v telesu pacienta. Glikozilacijski profil IgG, ki nastajajo v okviru imunske obrambe *in vivo*, se pri ljudeh spreminja s starostjo, kar lahko predstavlja težavo, saj so določene bolezni, kot so revmatoidni artritis, psoriaza, osteoporiza, multipla skleroza in nekatere vrste rakavih obolenj povezane prav z glikansko strukturo (npr. zmanjšanje galaktozilacije N-glikanov v IgG) (Wührer in sod., 2007). Zato je pri *in vitro* gojenju celic, ki proizvajajo terapevtska mAb, zelo pomembno, da nadzorujemo pogoje v bioreaktorju tako, da imajo proizvedena mAb optimalne lastnosti oziroma efektorske funkcije, vključno z glikozilacijo in razpolovnim časom Ab v telesu. Biološki testi, s katerimi je mogoče meriti parametre, ki določajo efektorsko funkcijo mAb, so precej dolgotrajni in cenovno neugodi. Zaradi omenjenih pomanjkljivosti bioloških testov smo želeli razviti in preizkusiti novo metodo, s katero bi lahko posredno ovrednotili efektorske funkcije mAb.

Metodo bi lahko uporabili tudi za hitro vrednotenje efektorskih funkcij vzorcev mAb, pridobljenih med bioprosesom. S tem bi lahko učinkoviteje in hitreje optimirali proces proizvodnje mAb. Prav tako bi rešili problem, kako čim prej določiti, kateri izmed zbirkov (ang. »pool«) ali klonov izdeluje rekombinantna mAb z željenimi efektorskimi funkcijami.

## 1.2 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE

Glavni cilj raziskovalne naloge je razvoj in optimizacija metod za merjenje kinetike vezave IgG protiteles na receptor Fc $\gamma$ RIIIa. Optimizirana metoda bi omogočila hitro oceno efektorskih funkcij mAb, s katero bi prihranili na času, saj bi se izgonili pošiljanju vzorcev v tujino in analitskim metodam za merjenje glikanske mape ter aktivnosti ADCC.

## 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Iz parametrov vezave protiteles IgG na receptor Fc $\gamma$ RIIIa je mogoče sklepati na aktivnost ADCC protiteles.
- Vezava antigena spremeni kinetiko vezave protitelesa na receptor Fc $\gamma$ RIIIa.
- Vezava protiteles na receptor Fc $\gamma$ RIIIa je odvisna od glikozilacijskega profila.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 CELIČNE LINIJE CHO

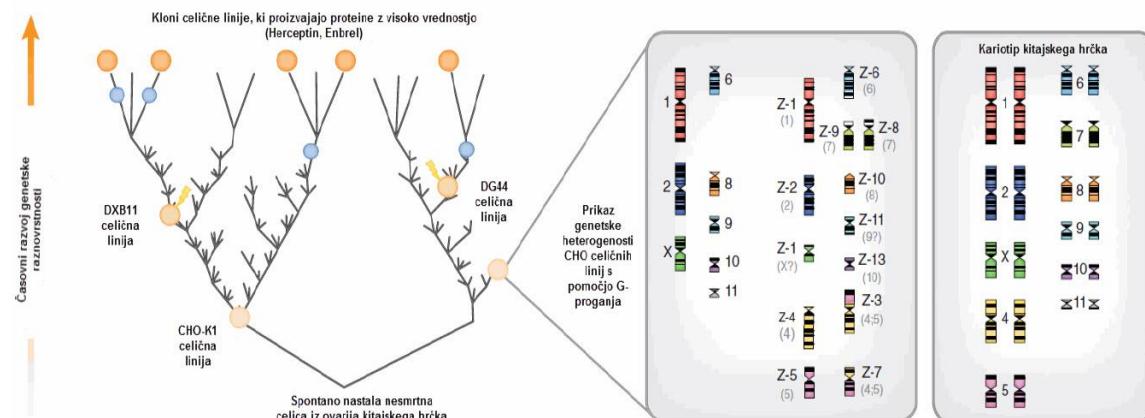
Celice ovarijev kitajskega hrčka so pridobljene z biopsijo ovarija kitajskega hrčka in se uporabljajo v bioloških ter medicinskih raziskavah za proizvodnjo rekombinantnih terapevtskih proteinov (Jayapal in sod., 2007).

Uporaba kitajskega hrčka in njegovih celic v raziskavah se je začela leta 1919, ko so jih uporabljali namesto miši za tipizacijo pnevmokokov. Leta 1948 so v Združenih državah Amerike uvedli vzrejo kitajskih hrčkov v raziskovalnih laboratorijih. Njihove lastnosti, metabolizem in način vzreje so postali tekom let in raziskav dobro poznani, kar je omogočilo, da so celice CHO postale dragoceno orodje za proizvodnjo rekombinantnih proteinov (Tjio in Puck, 1958). Od leta 1957 je celična linija CHO vodilna pri proizvodnji rekombinantnih proteinov zaradi dobre poznanosti, svoje hitre rasti in robustnosti, enostavnega vnosa tuje DNK, visokega donosa proteinov (3-10 g/L visoko kakovostnega produkta) in predvsem varnosti (Wurm in Hacker, 2011).

Ime CHO zajema veliko število zelo različnih celičnih linij. Nabrala se je občutna genomska heterogenost v času od prve izolacije teh celic leta 1956 do danes. Prvo celično linijo je pridobil Theodore Puck, in sicer s spontano populacijo fibroblastov iz gojenih celic CHO. Naslednja pridobljena celična linija je bila CHO-K1, katera izvira iz potomk izvorne celične linije, vendar vsebuje manjšo količino DNK, kot izvorna celična linija CHO. Pridobljena je bila s kloniranjem ene same celice celične linije CHO. Iz CHO-K1 so nato s pomočjo kemijske mutageneze pridobili celično linijo CHO-DXB11, za katero je značilno pomanjkanje dihidrofolat reduktazne (DHFR) aktivnosti. Te celice imajo delekcijo v enem izmed alelov DHFR in drugačnosmiselno mutacijo na drugem alelu. Kasneje so prolinsko odvisni sev CHO-pro3, drugi derivat orginalne celične linije CHO, s pomočjo mutageneze pretvorili v celično linijo CHO-DG44, za katero sta značilni delekciji v obeh alelih DHFR (Wurm in Hacker, 2011).

Genomska heterogenost (slika 1) se kaže med samimi celičnimi linijami, opazili pa so tudi razlike znotraj klonske populacije. S pomočjo proganja po Giemsi so dokazali, da imajo kitajski hrčki 22 kromosomov, medtem ko prednik celične linije CHO-K1 kaže drugačen kariotip. Pojavlja se le 8 kromosomov, ki so na pogled enaki kromosomom hrčka, ostalih 13 kromosomov pa predstavlja tako imenovane Z-kromosome, ki vsebujejo delekcije, translokacije ali prerazporeditve segmentov kromosoma. Večina celičnih linij vsebuje 20 kromosomov, pojavlja se tudi po 19, 21, 22 ali 44 kromosomov. Kariotip celične linije CHO-DG44 je pokazal, da ima večina celic 20 kromosomov, izmed katerih jih je 7 normalnih, 4 so Z-kromosomi, preostalih 9 je derivatov – kromosomi, ki so gensko

spremenjeni zaradi potreb industrije. Manj kot polovica klonov DG44 je ohranila omenjeni kariotip, pri ostalih pa je prišlo do prerazporeditev (Wurm in Hacker, 2011).



Slika 1: Genomska heterogenost pri celični liniji CHO (Wurm in Hacker, 2011)

S pomočjo citogenetskih študij so v zadnjih 40-ih letih dokazali, da gre za izjemno zapletenost in raznovrstnost genomov v rodu nesmrtnih celic. Vse celične linije so nenehno podvržene genetskim spremembam, za kar obstajajo dokazi, saj se spremembe odražajo v fenotipskih razlikah med linijami. Do razlik med fenotipi prihaja tudi zaradi izpostavljenosti različnim okoljskim pogojem med gojenje celic v bioreaktorju (Wurm in Hacker, 2011).

## 2.2 PROIZVODNA CELIČNA LINIJA

Leta 1986 smo dobili prvi rekombinantni terapevtski protein iz sesalskih celic, medtem ko je danes okoli 60 – 70% vseh rekombinantnih proteinov proizvedenih v sesalskih celicah (Wurm, 2004). A kljub razpoložljivosti številnim drugim sesalskim celičnim linijam, kot so ledvične celice mladička hrčka (BHK-21), mišje mielomske celice NS0 in transformirana celična linija iz človeških embrionalnih ledvic HEK 293, se danes kar 70 % vseh rekombinantnih terapevtskih proteinov proizvede v celicah CHO (Kim in sod., 2011).

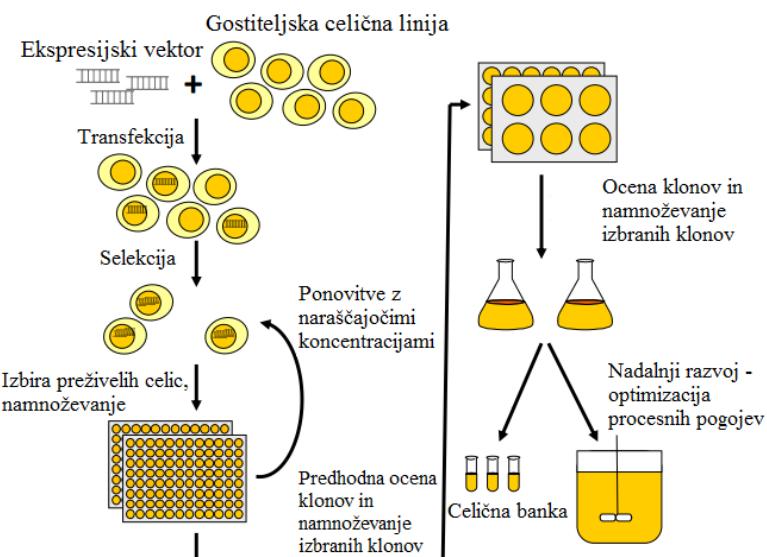
Razvoj proizvodne celične linije za produkcijo rekombinantnih mAb zahteva velik vložek časa, denarja in ostalih virov. Ne samo to, izbira gostiteljskih celic za izražanje proteinov ima velik vpliv na lastnosti produkta in na doseganje donosa. Prav tako je potrebno upoštevati varnostni vidik pri izbiri gostiteljskih celic (Jayapal in sod., 2007).

K razvoju stabilne proizvodne celične linije je doprineslo tudi znanje, poznavanje in povezovanje »omik«, med katerimi so ključne genomika, proteomika, metabolomika in transkriptomika (Lai in sod., 2013).

Proizvodnja rekombinantnih proteinov temelji na gojenju gensko spremenjenih gostiteljskih celic, ki imajo umečno vstavljeni gene, ki nosijo zapise za želene proteine. Do sedaj so imeli pomembno vlogo pri proizvodnji rekombinantnih mAb mikrobnih sistemov, predvsem bakterija *Escherichia coli*, vendar vse večji pomen pridobivajo sesalske celice zaradi svojih številnih prednosti. Sesalske celice zaradi svoje prilagodljivosti omogočajo rast v suspenzijski kulturi, kar je idealno za proizvodnjo v večjih volumnih. So varne in predstavljajo manjše tveganje za prenos virusov, rastejo v serumu in v kemično definiranih medijih, kar zagotavlja ponovljivost med serijami ter omogočajo post-translacijske spremembe. Kar je tudi zelo pomembno, obstaja veliko sistemov pomnoževanja rekombinatnih genov. Ti sistemi so dobro razviti in temeljijo prav na genomske nestabilnosti celic CHO. Večje število genov za rekombinatni protein omogoča večji donos le tega. Pomembna je zmožnost pristne N- in O-vezane glikozilacije (Lai in sod., 2013). Da dobimo aktivne proteine, jih moramo pridobiti v biološko aktivni obliki, kar zahteva pravilno zvijanje proteinov in post-translacijske spremembe. Oboje narekuje farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti produkta in s tem njihovo topnost, stabilnost, biološko aktivnost in razpolovni čas v človeku (Jayapal in sod., 2007). Ne smemo pozabiti tudi na nekatere pomanjkljivosti, kot so dolgotrajnost procesa od izbire celične linije CHO do same proizvodnje želenih mAb, saj le-ta traja okoli 7 do 8 mesecov. Gre za zelo intenziven proces in sesalske celice so zelo občutljive na mehanski stres. Rast celic je počasnejša od mikrobnih celic in zaradi nizkega izkoristka ter visokih stroškov procesa, je potreben velik vložek kapitala (Lai in sod., 2013).

Razvoj produkcijske celične linije CHO poteka v več korakih, ki so prikazani na sliki 2Slika 2. Običajno se uporablja strategija, ki omogoča visoko produkcijo celične linije CHO, pridobljeno iz starševskih linij, ki uporabljajo sistem DHFR. Gre za dolgotrajno in težavno proizvodnjo, čeprav je dobro uveljavljena. Prvi korak je vnos rekombinantne DNK v jedro gostiteljske celice in integracija v kromosom. Obstaja več metod vnosa: precipitacija s kalcijevim fosfatom, elektroporacija, lipofekcija in naključno vključevanje vektorja. Po uspešnem vnosu DNK, se naredi zbirk celic, ki stabilno izražajo ko-transfeciran encim DHFR, katerega zapis se nahaja na vektorju. Selekcija poteka s pomočjo nizkih koncentracij metotraksata (MTX) ob tem, ko jih gojimo ob odsotnosti glicina, hipoksantina in timidina. Lahko se uporablja tudi druge selekcijske agense, kot so antibiotiki, le če so ustrezni označevalci odpornosti vključeni v vektor. Na tej stopnji večina celic, ki nimajo uspešno vgrajene vektorske DNK, že propade. Sledi pomnoževanje, kar pomeni, da se preživele celice izpostavi visoki koncentraciji MTX, kar drastično poveča selekcijski pritisk. Da bi celice preživele, običajno opravijo genomsko preureditev in pomnožijo lokus vgrajene DNK. Naslednji korak je korak izolacije zbirke celic za pridobitev klonov z visoko specifično produktivnostjo. Ta zbirk je zelo heterogen, vsebuje celice z različnimi mestni integracijami DNK, z različnim številom kopij in z različnimi specifičnimi produktivnostmi. Potrebno je izolirati posamezne klone z najvišjo možno produktivnostjo in stopnjo rasti ter najboljšimi efektorskimi funkcijami proizvoda.

To se doseže z nizom limitnih redčitev v več vdolbinah na mikrotitrskih ploščah, tako da lahko izoliramo posamezno kolonijo z enotno celično populacijo. Izbrane klone se razširi preko več pasaž in vsak klon se oceni na manjši bioreaktorski skali pod pogojih, s katerimi se bo kasneje srečal v proizvodnih obratih. Po oceni ključnih parametrov je nato izbrana ena sama proizvodna celična linija CHO, ki se shrani v posamezne viale. Viale se zamrznejo in prenesejo v celično banko do naslednje uporabe (Jayapal in sod., 2007).



Slika 2: Razvoj celične linije CHO (Lai in sod., 2013)

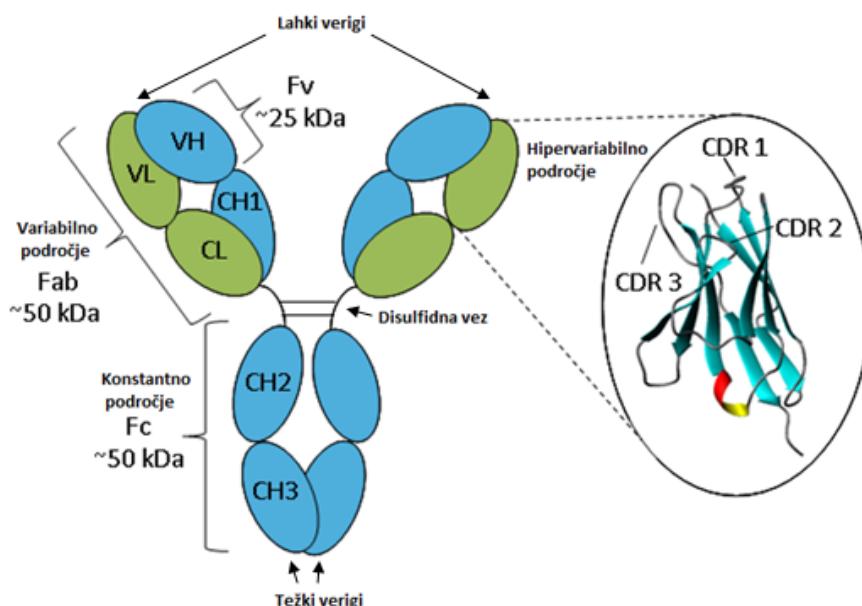
### 2.3 REKOMBINANTNA MONOKLONSKA PROTITELESA

Biotehnologija je v zadnjem desetletju nedvomno ena najhitreje razvijajočih se področij. Največji razcvet sodobne biotehnologije je doživelja farmacevtska biotehnologija z razvojem tehnologije rekombinantne DNA in s proizvodnjo mAb. Monoklonska protitelesa so eden od petih večjih razredov bioloških zdravil, kamor spadajo še biološka zdravila pridobljena z izolacijo, biološka zdravila pridobljena s sintezo, genska zdravila in rekombinantna biološka zdravila (biotehnološka zdravila) (Štrukelj in Kos, 2007).

#### 2.3.1 Zgradba protiteles

Protitelesa (Ab) ali imunoglobulini so del protitelesnega imunskega sistema sesalcev. So glikozilirani globularni proteini iz naddružine imonoglobulinov z molekulsko maso, večjo od 150 kDa. Prisotni so v krvi, tkivnih tekočinah in telesnih izločkih, kot so sluz, solze, slina, urin ali mleko doječe matere. Molekule protiteles se razlikujejo po zgradbi, lastnostih in zaščitni vlogi pri obrambi organizma. Imajo simetrično strukturo in so sestavljene iz dveh enakih težkih polipeptidnih verig, označenih z grškimi črkami  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , ter dveh enakih lahkih polipeptidnih verig  $\kappa$  in  $\lambda$ , povezanih z disulfidnimi vezmi, kar je prikazano

na sliki 3. Protiteesa glede na vrsto težke verige razdelimo na pet razredov: G, M, A, D in E, ki se glede na strukturne razlike v težki verigi dodatno delijo na podrazrede. Pri ljudeh poznamo štiri podrazrede IgG (IgG1, IgG2, IgG3 in IgG4) in dva podrazreda IgA (IgA1 in IgA2). Težke in lahke polipeptidne verige se sintetizirajo in sestavijo v molekule protiteles v ER. V GA pride do glikozilacije in drugih post-translacijskih sprememb protiteles, ki vplivajo na njihovo biološko aktivnost in s tem tudi na učinkovitost nekaterih terapevtskih protiteles. Zrela protiteesa se izločajo iz aktiviranih limfocitov B (Štrukelj in Kos, 2007).



Slika 3: Zgradba molekule protitelesa IgG (Absolute antibody, 2015)

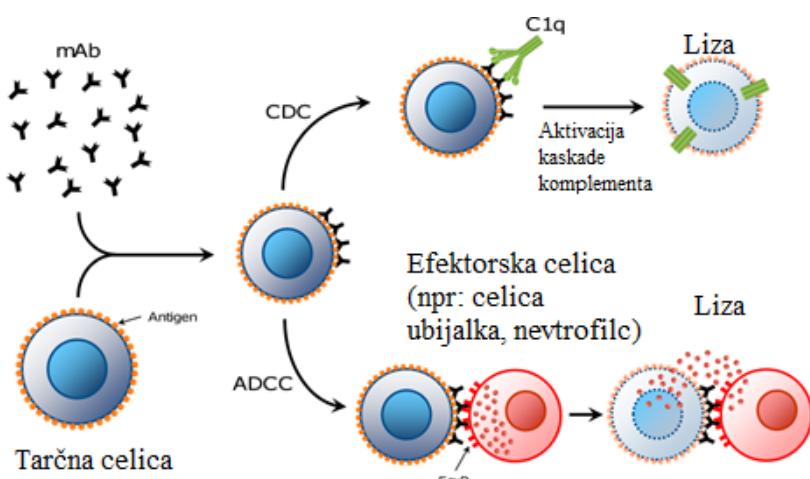
Težko in lahko polipeptidno verigo sestavlja konstantna in variabilna področja, ki se razlikujejo v stopnji ohranjenosti aminokislinske sestave med različnimi protitelesi iste vrste. Konstantna področja imajo podobno aminokislinsko sestavo, razlike pa določata razred in podrazred protiteles. Pri IgG lahko verigo sestavlja eno konstantno področje (CL1), težko pa tri (CH1, CH2 in CH3). Konstantna področja težkih verig, predvsem CH2 in CH3, tvorijo regijo Fc, ki je pomembna za interakcije protiteles z ostalimi elementi imunskega sistema, kot sta aktivacija komplementarnega sistema in vezava receptorjev na membrani obrambnih celic, s katerimi omogočajo eliminacijo antigena (Ag) in druge efektorske funkcije (CDC ali ADCC). Večja raznolikost aminokislinskega zaporedja je v variabilnem področju protiteles na N-koncu lahke verige (VL) in težke (VH) polipeptidne verige, ki določa specifičnost protitelesa za antigen. Strukturno skladnost z epitopi na antigenu določa šest krajših segmentov variabilnega področja, po trije v težki in lahki verigi (slika 3). Ta hipervariabilna področja ali komplementarnost določajoča področja (CDR) imajo največjo idiotipsko variabilnost med protitelesi, ki je osnova imunskega odziva (Štrukelj in Kos, 2007).

### 2.3.2 Aktivnost ADCC in CDC

Glavni mehanizmi delovanja terapevtskih mAb so sterično oviranje in blokada delovanja tarčnega antigena (Ag), citotoksično delovanje na tarčno celico z izraženim tarčnim Ag zaradi aktivacije komplementa, aktivacije citotoksičnega delovanja obrambnih celic ali spremenjenega prenosa znotrajceličnih signalov ali ciljanje drugih efektorskih molekul na mesta delovanja. Protitelesa, vezana na tarčni Ag, lahko odstranijo tarče z aktiviranjem telesu lastnih efektorskih mehanizmov, kot je aktivacija komplementa s CDC, ter drugimi z receptorjem Fc posredovanimi odzivi, kot je ADCC (slika 4) (Štrukelj in Kos, 2007).

Pri testu ADCC se Ab preko variabilnega dela (Fab) veže na Ag na tarčni celici in preko dela Fc na receptor Fc $\gamma$  na efektorski celici (npr. celici ubijalki ali nevtrofilcu). Zaradi te interakcije pride do lize celic in efektorska celica sprosti citokine in citotoksične granule, ki napadejo tarčno celico in povzročijo njen apoptozo (Jimenez in sod., 2012).

Po testu CDC lahko delujejo samo nekateri razredi in podrazredi Ab, in sicer tisti, ki s svojim delom Fc lahko vežejo komponente komplementa. Pri tem mehanizmu gre za vezavo Ab preko Fab na Ag na tarčni celici, z Fc delom pa se veže na komponento komplementa C1q, kar sproži celo kaskado komplementa. Končni rezultat kaskade je oblikovanje litičnega kompleksa MAC (ang. »membrane attack complex«), ki poškoduje tarčno celico tako, da nastanejo v membrani pore, s časoma lahko pride do popolnega razpada membrane tarčne celice (Jimenez in sod., 2012).



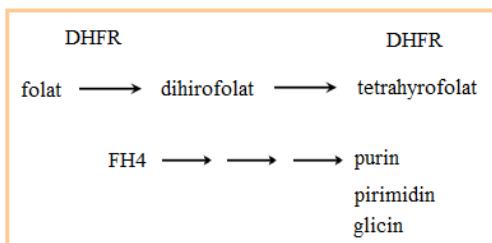
Slika 4: Aktivnost ADCC in CDC (Jimenez in sod., 2012)

### 2.4 POVIŠANA PROIZVODNJA REKOMBINANTNEGA mAb

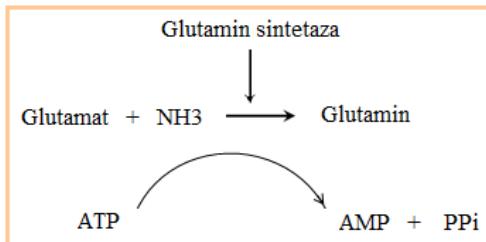
Za razvoj postopka izdelave rekombinantnih proteinov v sesalskih celicah je potrebna izdelava dobre proizvodne sheme (Wurm, 2004). Pomembno je, da so vse stopnje razvoja natančno kvalitativno in kvantitativno nadzorovane s predpisanimi standardnimi

operacijskimi postopki (SOP), vsi parametri, od tehnik, aparatur, sistemov in proizvodnega okolja pa morajo biti natančno validirani (Štrukelj in Kos, 2007). Ko je proizvodna shema izpopolnjena, sledi vprašanje, kako povečati raven proizvodnje rekombinantnih proteinov. Poznamo dva načina, in sicer s povečanjem specifične produktivnosti ter s povečanjem izkoristka celic v procesu.

Prvi način je s povečanjem specifične produktivnosti, kar dosežemo z združevanjem gena s selekcijskim genom. Najbolj poznana selekcijska gena sta dihidrofolat reduktaza (DHFR) in glutamin sintetaza (GS). V obeh primerih se pojavi selekcija v odsotnosti ustreznega metabolita, ki preprečuje rast netransformirane celice. Pri sistemu DHFR je ta metabolit hipoksantin ali timidin, medtem ko je pri sistemu GS to glutamin. S sistemom DHFR/MTX, ki je prikazan na sliki 5, lahko izražanje rekombinantnega proteina dopolnjujemo z izpostavljivijo celic MTX-u, ki je substanca, ki zavira aktivnost DHFR. Po dveh do treh tednih izpostavljenosti, večina celic propade, le majhno število celic, ki proizvaja več DHFR pa ta selekcijski pritisk preživi. S tem pride do povišanja koncentracije produkta in tako do izboljšane specifične produktivnosti od 10 do 20 krat. Sistem GS/MSX je podoben sistemu DHFR/MTX, vendar encim GS katalizira produkcijo glutamina iz glutamata in amonijaka, kar nam kaže slika 6. Metionin sulfoksamin (MSX) veže encim GS in tako prepreči nastajanje glutamina. Pomnoževanje genov se zgodi, ko so celice izpostavljene povečani koncentraciji MSX-a (Camire, 2000).



Slika 5: Sistem DHFR/MTX (Camire, 2000)



Slika 6: Sistem GS/MSX (Camire, 2000)

Drugi način za povečano produkcijo rekombinantnih proteinov pa je, povečanje izkoristka celic v procesu. To je moč doseči z razvojem procesa in razvojem gojišča. Če uspemo povečati število celic na volumen na dan, se lahko proizvaja več izdelka (Camire, 2000).

Pogoji gojenja sesalskih celic so odvisni od vrste celic. Rast celic CHO navadno poteka pri temperaturi 37 °C in pri 5 % CO<sub>2</sub>. Gojišča se razlikujejo v vrednosti pH, koncentraciji glukoze in drugih hranil. Zaradi možnosti kontaminacije bioloških zdravil z virusi in prioni se razvijajo gojišča z zmanjšano vsebnostjo oziroma odsotnostjo seruma. Ko imamo izbrano proizvodno linijo, sledi optimizacija gojišča in dohranjevanja na majhni skali. Ob uspešnem zaključku se proces prenese na večjo skalo, to so bioreaktorji od 3,5 L – 10 L. Osnovne zahteve pri oblikovanju bioreaktorjev za gojenje celic CHO so: visoka stopnja sterilnosti bioprosesa, temperaturna regulacija in prenos kisika ter nizko strižno polje ob mešanju. Osnovna načina gojenja sta šaržno gojenje in šaržno gojenje z napajanjem substrata. Ko se pogoji vzpostavijo se proces prenese na pilotni nivo, kjer preverijo ustreznost bioprosesa. Šele nato sledijo predklinične študije in sam prenos na industrijski nivo (Štrukelj in Kos, 2007).

## 2.5 GLIKOZILACIJA

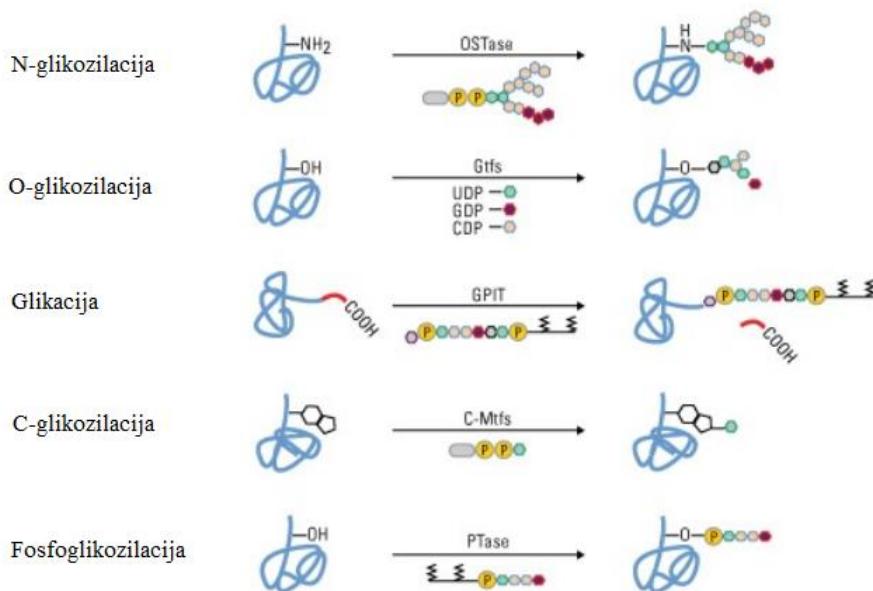
Glikozilacija je ena najpomembnejših in zato tudi bolj proučevanih oblik post-translacijskih sprememb. Gre za zelo raznolike post-translacijske spremembe, ki jih je možno najti v skoraj vseh živih organizmih, od bakterij do evkariontov. Med načini glikozilacije se pojavljajo podobnosti, prav tako pa je opaziti tudi določene razlike (Easton, 2011). Glavni proces med glikozilacijo je dodajanje sladkorjev na proteine oziroma na točno določene aminokisline (AK). Do sedaj poznamo številne različne povezave med ogljikovimi hidrati in proteini, ob čemer protein postane glikoprotein. Pri povezavi sodeluje 13 ogljikovih hidratov in 8 aminokislin, tako da obstaja vsaj 31 kombinacij vezav sladkor-aminokislina. Če so znane tudi anomerne konfiguracije glikozidne vezi, število kombinacij naraste na najmanj 37 (Spiro, 2002). Približno polovica vseh proteinov, izraženih v celici, je post-translacijsko spremenjenih, kar vključuje kovalentno dodajanje sladkornih ostankov na specifične aminokisline (A Thermo Fisher..., 2015).

Pri rekombinantnih mAb je glikozilacija ključna za terapevtsko učinkovitost in varnost. Glikozilacija rekombinantnih IgG se razlikuje od serije do serije v proizvodnih sistemih, te spremembe pa pogosto prizadenejo biološko aktivnost terapevtskih Ab (Raju, 2003). Glikozilacija delov Fc vpliva na vezavo komplementa, glikozilacija v bližini mesta vezave Ag ima velik vpliv na afiniteto; zaradi nepravilne glikozilacije pa je lahko terapevtska učinkovina tudi imunogena (Štrukelj in Kos, 2007).

Vrste glikozilacije so razvrščene glede na atom AK, ki se veže na verigo ogljikovega hidrata. Poznamo N-, O- in C-vezano glikozilacijo ter glikacijo in fosfoglikozilacijo, ki so na kratko predstavljene v preglednici 1 in prikazene na sliki 7. N-vezana glikozilacija je napogostejša vrsta glikozilacije, kar 90 % vseh glikoproteinov je N-vezanih. Sledi O-vezana glikozilacija, ostali trije tipi pa so prisotni v nekoliko manjšem številu (A Thermo Fisher..., 2015).

Preglednica 1: Tipi glikozilacije (A Thermo Fisher ..., 2015)

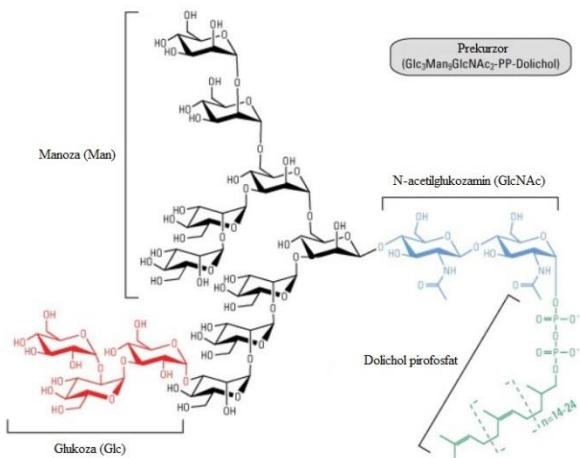
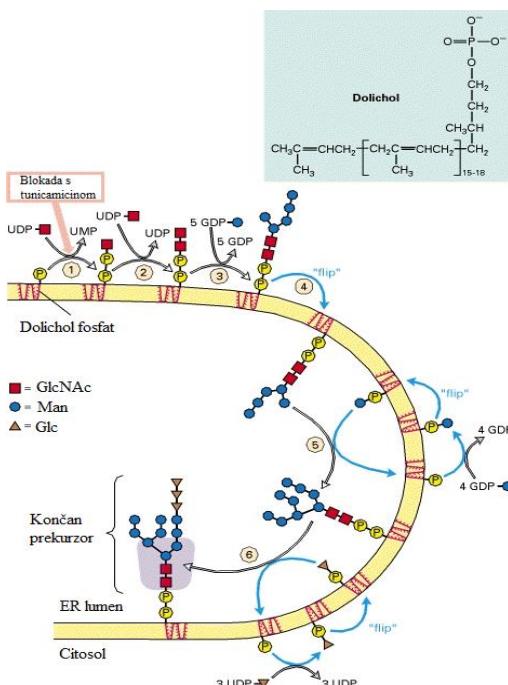
Tip	Opis
N-vezana	Glikani se vežejo na amino skupino asparagina v ER
O-vezana	Glikani se vežejo na hidroksilne skupine serina ali treonina v ER, GA in v jedru
C-vezana	Manoza se veže na indolni obroč triptofana
Glikacija	Glikansko jedro povezuje fosfolipid in protein na celični membrani
Fosfoglikozilacija	Glikan se veže na serin preko fosfodiesterske vezi



Slika 7: Tipi glikozilacije (A Thermo Fisher ..., 2015)

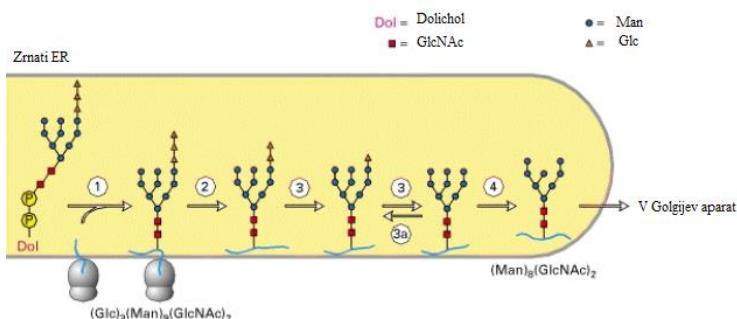
### 2.5.1 N-vezana glikozilacija

N-vezana glikozilacija se nanaša na povezanost oligosaharidov, natančneje N-acetilglukozamina (GlcNAc), z dušikovim atomom iz aminokisline, ponavadi je to NH ostanek asparagina. Pojavlji se pri izloženih in membransko vezanih proteinih, predvsem pri evkariontih in arhejah, večina bakterij te spremembe ne izvaja (A Thermo Fisher..., 2015). Biosinteza se začne v zrnatem ER z dodatkom predoblikovanega razvejanega glikana (slika 8), ki vsebuje 14 sladkornih ostankov: 3 glukoze (Glc), 2 GlcNAc in 9 manoz (Man). Molekulo lahko zapišemo kot Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>. Struktura tega prekurzorja je enaka v rastlinah, živalih in enoceličnih evkariontih. Prekurzor je povezan z ostankom pirofosforila na dolichol, ki je dolga veriga (75 – 95 C-atomov) iz večinoma nenasičenih organskih spojin, ki so sestavljeni iz izoprenskih enot in je trdno zasidran v ER membrano ter deluje kot nosilec za glikane. Dolichol pirofosforil glikan se oblikuje na ER membrano v kompleksnem nizu reakcij, kataliziranih z encimi, ki so prisotni v citosolu in lumnu zrnatega ER. Končni dolichol pirofosforil glikan je orientiran tako, da glikanski del gleda v notranjost ER lumna, kar lahko vidimo na sliki 9 (Lodish in sod., 2000).

Slika 8: Prekurzor N-vezanih glikanov ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ ) (A Thermo Fisher..., 2015)

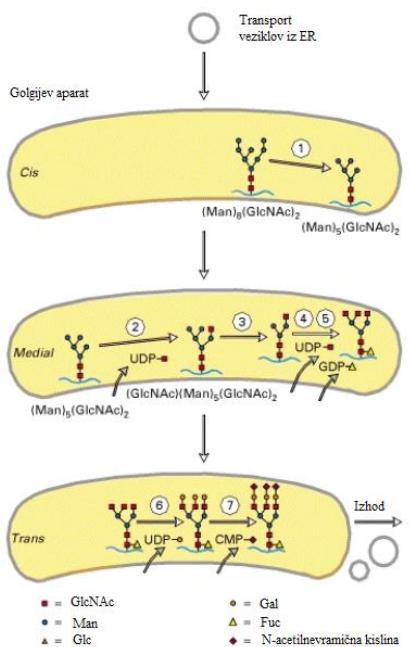
Slika 9: Biosinteza prekurzorja N-vezanih glikanov na dolichol pirofosforil (Lodish in sod., 2000 )

Celotni glikan  $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$  se prenese v enem kosu iz dolichol nosilca do asparaginskega ostanka na nastajajočem polipeptidu. Reakcijo prenosa katalizira oligosaharid-proteinska transferaza. Substrat za to transferazo so samo asparaginski ostanki v tripeptidnem zaporedju Asn-X-Ser ali Asn-X-Thr, kjer je X katera koli AA razen prolina. Takoj ko je glikan prenesen na nastajajoč polipeptid, se postopoma s pomočjo različnih encimov odcepijo vsi trije glukozni ostanki in eden manozni, kar prikazuje slika 10. V lumnu ER so prisotne tudi glukoziltransferaze, ki delujejo ravno obratno, in sicer dodajo nazaj en glukozni ostanek na protein  $\text{Man}_{7-9}(\text{GlcNAc})_2$ . Sledi prenos novo izdelanega proteina v GA (Lodish in sod., 2000).



Slika 10: Prenos celotnega oligosaharida  $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$  na asparaginski ostanek in začetna predelava N-vezanih glikanov v zrnatem endoplazemskem retikulumu (Lodish in sod., 2000)

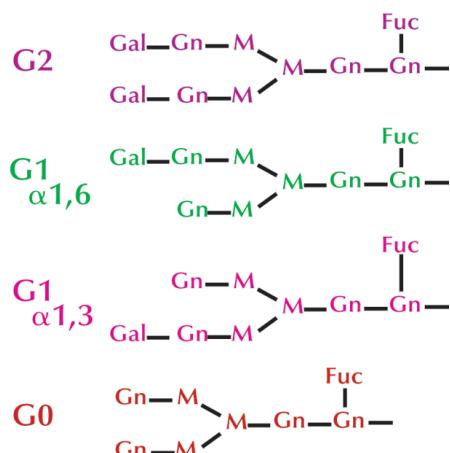
GA je sestavljen iz treh delov, in sicer membranskih veziklov, ki oblikujejo cis, medialni in trans predel. Vsak predel vsebuje različne sklope encimov, ki uvajajo različne spremembe izloženih in membransko vezanih proteinov. Po tem opisu, bi lahko rekli, da vsak predel deluje kot poseben organel, čeprav v biologiji obravnavajo GA kot enoten organel. Na poti skozi vse predele proti zunanjosti celice (trans regija) potekajo zaporedne reakcije dodajanja in odstranjevanja specifičnih slatkornih ostankov, kar omogoči nastanek tipičnega N-vezanega kompleksnega glikana. Vse reakcije v GA so shematsko prikazane na sliki 11 (Lodish in sod., 2000).



Slika 11: Obdelava proteinov v cis-, medialnih- in trans-Golgijevih predelih do kompleksnih N-vezanih glikanov (Lodish in sod., 2000)

Razlike v strukturah N-vezanih glikanov se pojavijo kot posledica razlik v pridelavi glikanov v ER in GA. V nekaterih primerih lahko pride do nepopolne reakcije, na primer, da se reakcija 1 in 2 iz slike 11 ne izvršita, ker ni dostopnih potrebnih encimov, zato se tudi

vse nadaljnje reakcije ne bodo zgodile, ker ne bo dostopnega substrata za naslednji encim. Tako se bodo izločali glikani  $\text{Man}_8(\text{GlcNAc})_2$  ali  $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$ , namesto kompleksnih glikanov (Lodish in sod., 2000). N-vezani glikani so zelo heterogeni, razlike med posameznimi IgG vključujejo pritrditev galaktoze in/ali sialične kisline na eni ali obeh terminalnih GlcNAc, kot je razvidno iz slike 12. Možna je tudi vezava tretje GlcNAc ročice (Niwa in sod., 2005). Ta heterogenost človeškega IgG domnevno vpliva na biološke oziroma efektorske funkcije, kot sta aktivnost ADCC in CDC (Raju, 2003).



Slika 12: Heterogenost N-vezanih glikanov na terminalni GlcNAc (Raju, 2003)

### 2.5.2 O-vezana glikozilacija

O-vezana glikozilacija membransko vezanih proteinov je post-translacijska spremembra, ki poteka v cis-Golgijevem predelu po N-glikozilaciji in zvijanju proteinov. Nanaša se na povezavo glikanov s hidroksilno skupino na serin (Ser) in treonin (Thr), v manjši meri pa tudi na hidroksiprolin ter hidroksilizin preko N-acetilgalaktozamina (GlaNAc). Pojavi pa se tudi GlcNAc- $\beta$ -Ser/Thr vez, ki je široko razširjena med evkarionti, od praživali do višjih sesalcev. Pri ostalih živalih pa se pojavljajo še druge vezi preko galaktoze, manoze, fukoze in glukoze (UniProt, 2015).

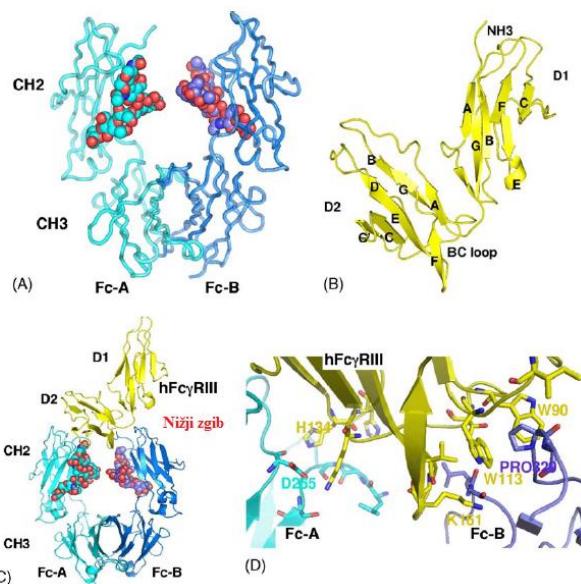
O-vezani oligosaharidi so v glavnem kratki, vsebujejo 1-4 sladkorne ostanke, ki so dodani zaporedno in vsak prenos sladkorja je kataliziran z različno glikoziltransferazo (Lodish in sod., 2000). Kljub temu, da je N-glikozilacija najpomembnejša oblika, imajo O-vezani glikani pomembno vlogo pri lokalizaciji in topnosti proteinov, antigenosti ter pri interakcijah med celicami (UniProt, 2015).

## 2.6 Fc $\gamma$ RIIIa

Efektorske celice, kot so trombociti, monociti, granulociti, makrofagi, naravne celice ubijalke in še nekatere druge, imajo na svoji površini pripete receptorje za Fc del

imunoglobulinskih molekul. Gre za membranske glikoproteine z molekulske maso 50 kDa, ki prispevajo k zaščitni vlogi imunskega sistema oziroma zagotavljajo povezavo med protitelesnim in celičnim imunskim odzivom. Njihova imena izhajajo iz njihove specifične vezave na Fc del Ab, ki je pritrjen na Ag na tarčni celici (Allhorn in sod., 2008). Vezava kompleksa Ag-Ab na Fc $\gamma$ R aktivira efektorske celice, kar sproži kaskado signalov in privede do aktivnosti ADCC in CDC, fagocitoze, endocitoze ali sproščanja citokinov (Radaev in Sun, 2001). Poznamo številne receptorje Fc, ki se razlikujejo po tem, katere razrede Ig vežejo (v imenu receptorja je tip težke verige) in kakšne učinke ima vezava na receptor.

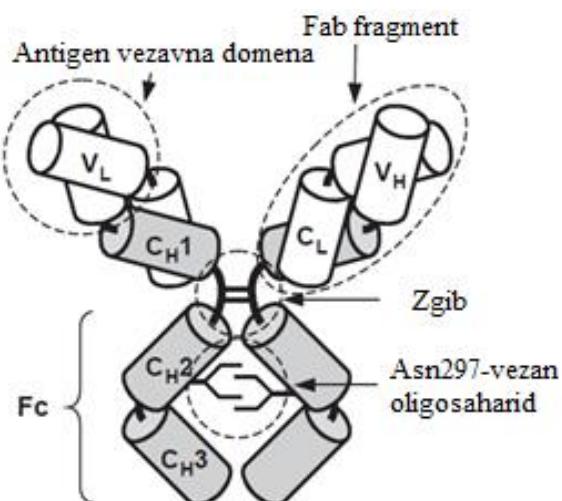
Receptorji Fc $\gamma$  pripadajo superdružini Ig in so najpomembnejši receptorji Fc za indukcijo fagocitoze. Poznamo tri družine teh receptorjev, ki se med seboj razlikujejo v strukturi, funkciji in specifičnem prepoznavnem mestu v regiji CH2. Družine receptorjev so: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) in Fc $\gamma$ RIII (CD16). Člani družine Fc $\gamma$ RI vežejo IgG z veliko afiniteto, medtem ko člani družine Fc $\gamma$ RII in Fc $\gamma$ RIII z manjšo afiniteto. Družine Fc $\gamma$ R lahko delimo tudi na aktivacijske receptorje, med katere spada Fc $\gamma$ RIIIa, ki je prikazan na sliki 13 in na zaviralne receptorje. Znotraj Fc $\gamma$ R obstaja pomembna heterogenost, ki izhaja iz polimorfizmov v celični domeni. Poznamo dve polimorfn varianti receptorja Fc $\gamma$ RIIIa, s fenilaninskim (Phe) ali valinskim (Val) ostankom v zunajcelični regiji na mestu 158 (Phe158 / Val158). Varianto Phe158 povezujejo z avtoimunskimi boleznimi, kot sta lupus in revmatoidni artritis (Hayes in sod., 2014).



Slika 13: Fc $\gamma$ RIIIa in molekulska zasnova IgG Fc-Fc $\gamma$ R kompleksa. A: Sled alfa ogljikovega atoma v obliki konjske podkve Fc. Funkcionalne skupine ogljikovih hidratov so prikazane v sferah s kisikom, ki je obarvan rdeče; B: struktura človeškega Fc $\gamma$ RIII, prikazana v obliki trakov; C: Struktura v obliki trakov prikazuje Fc-Fc $\gamma$ RIII kompleks. Fc $\gamma$ RIII je rumene barve in Fc del IgG modre barve; D: Vmesna površina Fc- Fc $\gamma$ RIII kompleksa. Aminokisline, ki so vključene, so prikazane v obliki paličic. Barve so enake kot v primeru A do C (Siberil in sod., 2006)

## 2.7 VPLIV GLIKOZILACIJE PROTITELES NA KINETIKO VEZAVE IN AKTIVNOST CDC TER ADCC

Interakcija med receptorji Fc $\gamma$  in domeno Fc IgG je odvisna od glikozilacijskega profila IgG (Allhorn in sod., 2008), kar pomeni, da je glikozilacija tista, ki ima vpliv na kinetiko vezave (Hayes in sod., 2014). N-vezani glikani, izraženi v Fc domeni na mestu Asn<sup>297</sup> (slika 14), so biantenarne oblike z mikroheterogenostjo in imajo pomemben učinek na efektorske funkcije IgG. Zato odstranitev N-vezanih glikanov na Asn<sup>297</sup> v težki verigi IgG povzroči izgubo strukturne celovitosti in tako zmanjša zmožnost vezave z receptorji Fc $\gamma$ . Ni potrebna odstranitev celotnega N-vezanega glikana, saj ima učinek na kinetiko vezave že sama odstranitev določenih slatkornih ostankov. Med slatkornimi ostanki ima največji vpliv odstranitev fukoze (Mizushima in sod., 2011).



Slika 14: Vezavno mesto N-vezanih glikanov (Niwa in sod., 2005)

S pomočjo gliko-modifikacij Ab, lahko manipuliramo z njihovim karbohidratnim delom v Fc domeni (Ferrara in sod., 2006). Fukoza je z  $\alpha$ -1,6-vezjo pritrjena na prvi GlcNAc tik ob Asn<sup>297</sup> in ima največji vpliv na kinetiko vezave (Ferrara in sod., 2011). Za potrditev te hipoteze so Niwa R. in sod. (2005) ustvarili zbirko himernih Ab, ki imajo ujemajoči set podrazredov človeških težkih verig, z različnim deležem fukoze v njihovih glikanih. To so izvedli z uporabo celic CHO, ki so jim izbili gen za fukoziltransferazo, kar jim omogoča trajno proizvajanje nefukoziliranih Ab. Primerjava med izvornim Ab, ki vsebuje osnovne glikane in Ab brez fukoze, je pokazala v kinetiki vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa velike razlike. Študija je potrdila, da odstranitev fukoze iz glikana do 50x zviša afiniteto vezave Ab na receptor Fc $\gamma$ RIIIa. Višja afiniteta vezave do receptorja se kaže v spremenjenih efektorskih funkcijah, kot je aktivnost ADCC (Niwa in sod., 2005). Povišano afiniteto IgG na receptor Fc $\gamma$ RIIIa je pokazal tudi že prej omenjeni alelni polimorfizem. Nadomestitev AK fenilalanina z valinom, poveča zmožnost vezave IgG na receptor (Siberil in sod., 2006).

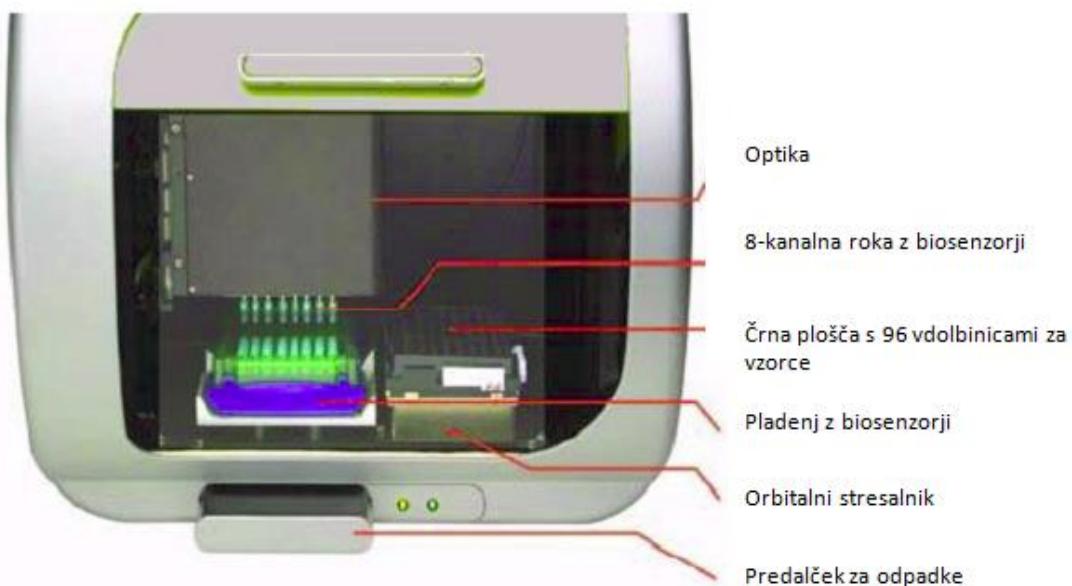
Popolna N-deglikozilacija IgG privede do otežene vezave IgG na receptor Fc $\gamma$ RIIIa, kar kaže na to, da so glikani vključeni v vezavo IgG na receptorje (Okazaki in sod., 2004). Glikanske verige Fc dela mAb vplivajo na razmik in orientacijo obeh domen CH2 in s tem stabilizirajo odprto konformacijo molekule. Torej deglikozilacija povzroči konformacijsko spremembo dela Fc in tako prehod iz odprte v zaprto konformacijo, kar prepreči oziroma zmanjša vezavo IgG na receptor Fc $\gamma$ RIIIa. To se kaže kot sprememba v efektorskih funkcijah Ab (Siberil in sod., 2006).

Tekom raziskav so ugotovili, da je vpliv glikozilacije na kinetiko vezave Ab na receptor Fc $\gamma$ RIIIa tesno povezan z aktivnostjo ADCC. Torej med glikozilacijo, natančneje med vsebnostjo glikanske strukture bG0(-F) in aktivnostjo ADCC obstaja korelacija. Nefukozilirani IgG se z višjo afiniteto vežejo na receptor Fc $\gamma$ RIIIa in imajo tudi višjo aktivnost ADCC. Nefukozilirani IgG, ki posredujejo višjo aktivnost ADCC in obdržijo druge značilne lastnosti vsakega podrazreda, širijo terapevtske možnosti rekombinantnih mAb (Niwa in sod., 2005).

Pomemben je še eden efektorski mehanizem, in sicer aktivnost CDC. Vezava Ab na C1q je prvi korak v klasični poti aktivacije komplementa. Narava ogljikovih hidratov v IgG vpliva na njegovo interakcijo s C1q. Vendar pomanjkanje fukoze ne vpliva na zmožnost interakcije med IgG in C1q (Shields in sod., 2002). C1q vezava vsakega podrazreda IgG je pokazala, da sovpada z aktivnostjo ADCC. To pomeni, da je vezava C1q z IgG1 in IgG3 mnogo močnejša, kot z IgG2 in IgG4, prav tako kot je z vezavo na receptor Fc $\gamma$ RIIIa (Niwa in sod., 2005).

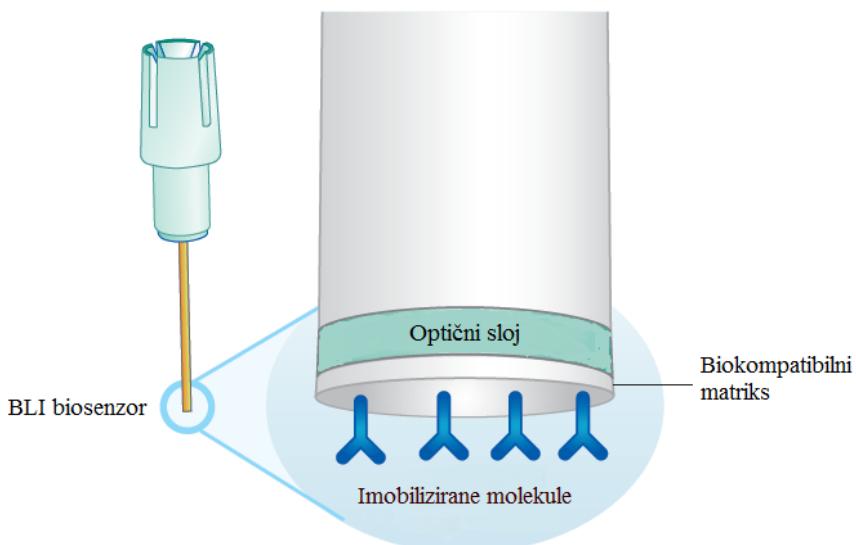
## 2.8 INTERFEROMETRIJA Z BIOLOŠKIMI PLASTMI

Družina instrumentov Octet (slika 15) temelji na interferometriji z biološkimi plastmi (ang. »Bio-Layer Interferometry«, BLI), ki meri vezavo molekul vzorca na površino biosenzorja v realnem času brez predhodnega označevanja molekul. BLI omogoča visoko zmogljivost, specifičnost, fleksibilnost in enostavno uporabo. Je hitra metoda, ki porabi minimalno količino vzorca (Tobias in sod., 2014).



Slika 15: Aparatura Octet in sestavni deli ( Octet System Data ..., 2011)

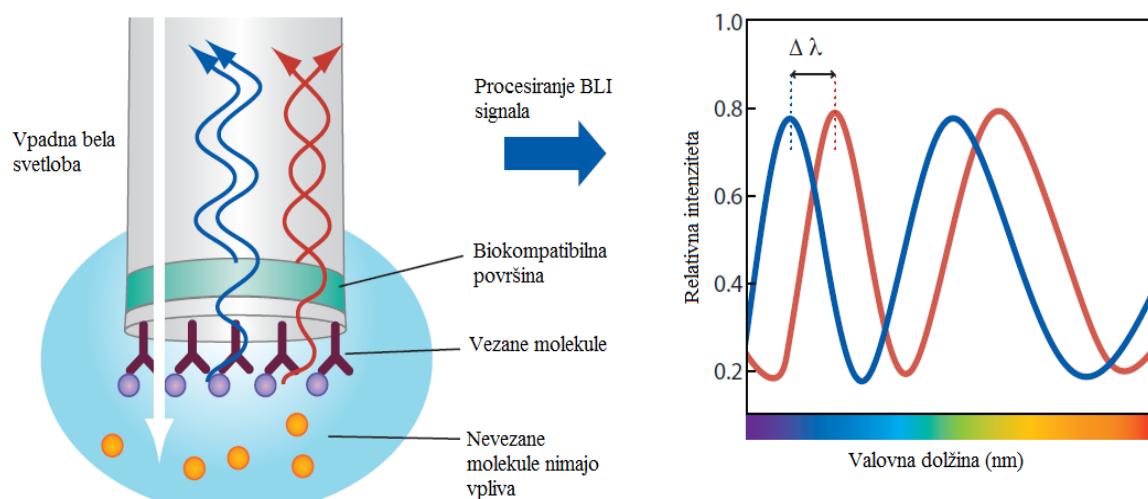
BLI je optična analitska metoda, ki meri interferenco vzorcev med valovi svetlobe. Bela svetloba je usmerjena navzdol po optičnih vlaknih biosenzorja. Na biosenzorski konici je biokompatibilni sloj (imobiliziran protein), znotraj pa je referenčna plast, kar lahko vidimo na sliki16 (Tobias in Kumaraswamy, 2013).



Slika 16: BLI biosenzor (Tobias in Kumaraswamy, 2013)

Ko konico biosenzorja pomočimo v vzorec, se ciljne molekule vežejo na 2-dimenzionalno površino. Ob vezavi ciljnih molekul na površino biosenzorja, se povečuje njegova debelina. Ko se debelina poveča, se tudi efektivna razdalja med obema slojema poveča in ustvari se premik ( $\Delta\lambda$ ) v združenem vzorcu odbite svetlobe (slika 17). Premik je

neposredno merilo za spremembo debeline biološkega sloja. Spektralni vzorci odbite svetlobe se spremenijo v odvisnosti od optične debeline molekularne plasti (število molekul vezanih na površino biosenzorja). Ta spektralni premik spremi detektor in dobimo senzogram – spremembu valovne dolžine (nm), ki se odraža kot odziv. Spremljanje združenega vzorca v realnem času zagotavlja kinetične parametre o molekularnih interakcijah ( $K_D$ ,  $k_a$  in  $k_d$ ) (Tobias in Kumaraswamy, 2013).



Slika 17: BLI je optična analitska metoda, ki analizira združene vzorce bele svetlobe, ki se odbijajo od dveh površin. Sprememba v številu molekul, vezanih na biosenzorju oziroma debelina sloja, ki ga formirajo vezane molekule, povzroči premik v združenem vzorcu, ki se meri v realnem času (Tobias in Kumaraswamy, 2013)

$k_a$  je odvisna od frekvence trkov med proteinimi in se lahko izboljša z vključitvijo ostankov v bližini vezavnega vmesnika. Medtem ko je  $k_d$  odvisna od nastanka molekulskeih interakcij kratkega dosega v vezavi vmesnika.  $K_D$  je razmerje med  $k_d$  in  $k_a$ , katerega kaže tudi enačba 1 (Tobias in sod., 2014).

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} [M] \quad \dots (1)$$

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Celične linije in rekombinantna monoklonska protitelesa

Za produkcijo rekombinantnih monoklonskih protiteles smo uporabili različne celične linije CHO, katere imajo različne starševske celične linije. Vsaka od celičnih linij CHO proizvaja svoje rekombinantno mAb, ki je prav tako kot same celične linije, last farmacevtske družbe Lek d.d.. Zaradi tega jih bomo v magistrski nalogi poimenovali zgolj s črkami, in sicer A, B, C in D.

##### 3.1.2 Gojišča in hranila za gojenje celičnih linij

Vsaka celična linija ima svoje zahteve glede gojišča in dodatkov. Za namnoževanje celične kulture do želene koncentracije smo uporabili specifična rastna gojišča, katerih receptura je poslovna tajnost, saj gre za last farmacevtske družbe Lek d.d. Gojišča smo pripravili v steklenih čašah na magnetnih mešalnikih s trikrat destilirano vodo. Vse zahtevane kemikalije in dodatke smo zatehtali po recepturi na predhodno skalibrirani tehtnici, izpise smo ustrezno shranili. Ustreznost gojišča smo nato preverili s pH metrom in osmomatom, katerih izpise rezultatov smo prav tako shranili. Ko je bilo gojišče dobro premešano in sta pomerjena pH ter osmolarnost ustrezala, smo ga s pomočjo vakuumskih črpalk prefiltrirali skozi 0,22 µm filter ter pripravljeno gojišče prenesli v hladilnik na 4 °C do uporabe. Rok uporabnosti gojišča je omejen na tri mesece, zato je potrebno pred samo uporabo biti pozoren na uporabnost gojišča.

Če želimo povečati produktivnost želenega mAb, se v nadaljevanju poskusa oziroma tekom bioprosesa z dohranjevanjem celice prenese v produkcijsko gojišče, ki je prav tako specifično za vsako celično linijo. Produkcijsko gojišče se pripravi na enak način kot rastno, prav tako tudi specifična hranila, ki jih dodajamo za rast celic med bioprosesom z dohranjevanjem.

##### 3.1.3 Kemikalije in ostali pripomočki

Za razvoj metode smo potrebovali določene kemikalije, ki so nujno potrebne za izvedbo meritve. Določene kemikalije je bilo predhodno potrebno pripraviti, kar je potekalo v skladu s proizvajalčevimi navodili. Same kemikalije in njihovi namen so predstavljene v preglednici 2.

Preglednica 2: Kemikalije in njihov namen

Kemikalija	Proizvajalec	Kataloška številka	Namen kemikalije
$\alpha$ -L-fukozidaza	Sigma Aldrich	F5884	Encim za deglikozilacijo
$\alpha$ - manozidaza	Sigma Aldrich	M7257	Encim za deglikozilacijo
$\beta$ -N-acetylglukozaminidaza	Sigma Aldrich	A2264	Encim za deglikozilacijo
$\beta$ (1-4)-galaktozidaza	Roche	10 105 031 001	Encim za deglikozilacijo
Biotin	Thermo scientific	21327	Za biotinilacijo receptorja Fc $\gamma$ RIIIa pri uporabi SA biosenzorjev
BSA	Sigma Aldrich	A7906	Dodatek PBS pufru
Endoglikozidaza F2	Sigma Aldrich	E0639	Encim za deglikozilacijo
Fc $\gamma$ RIIIa	MyBioSource	MBS553215	Receptor na katerega se veže mAb preko dela Fc
Glicin	Merck	1.04201	Za regeneracijo biosenzorjev
HCl	Merck	1.00312	Uravnavanje pH pri pripravi glicina
Kinetični reagent	ForteBio	18-5032	Reagent, ki ga dodamo pufru PBS za minimiziranje nespecifičnih reakcij
Nevraminidaza	New England BioLabs	#P0720L	Encim za deglikozilacijo
PBS	Gibco	21600-069	Za bazno linijo, disociacijo, redčenje proteina in receptorja, namakanje biosenzorjev

Poleg kemikalij smo potrebovali še različne biosenzorje (streptavidinske (SA) in biosenzorje proti variabilnemu delu mAb (FAB)), katere smo kupili pri Fortebio, ki je tudi proizvajalec naprave Octet RED96.

### 3.1.4 Laboratorijska oprema

Pri izvedbi magistrske naloge je bila uporabljena laboratorijska oprema, ki je predstavljena v preglednici 3.

Preglednica 3: Laboratorijska oprema in njen namen

Oprema	Proizvajalec	Namen opreme
Analitska tehtnica	Mettler Toledo	Tehtanje kemikalij za pripravo gojišč, priprava pufra
Avtomatska pipeta	Sartorius	Priprava vzorcev
Biofotometer	Eppendorf	Merjenje koncentracije
Bioprofile® 400	Nova Biomedical	Merjenje koncentracije metabolitov

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice 2: Laboratorijska oprema in njen namen«

Oprema	Proizvajalec	Namen opreme
Centrifuga	Eppendorf	Koncentriranje receptorja, menjava pufra
Stresalnik CO <sub>2</sub>	Kühner	Inkubacija celičnih kultur
Hladilnik	Angelatorri	Shranjevanje vzorcev, gojišča, pufrov in proteinov
Krioposoda	Custom BioGenic System	Shranjevanje celičnih kultur
HPLC sistem	GE Healthcare	Glikansko mapiranje
Mikrobiološka komora	Iskra PIO d.o.o.	Aseptično delo
Octet	ForteBio	Merjenje kinetike vezave mAb na receptor Fc $\gamma$ RIIIa in merjenje titrov
Osmometer	Gonotec	Merjenje osmolarnosti gojišča
pH meter 780	Metrohm	Merjenje pH gojišča
TECAN freedom Evo	TECAN	Čiščenje vzorca
Termomikser	Eppendorf	Inkubacija vzorcev
Vi-Cell XR	Beckmann Coulter	Merjenje koncentracije in deleža živih celic
Vakumska črpalka	Millipore	Priprava gojišč, pridobitev žetve
Vodna kopel	Kambič	Odmrzovanje celičnih kultur, gretje gojišč
Zmrzovalna skrinja – 80 °C	Angelatorri	Shranjevanje proteinov

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Gojenje celic za produkcijo mAb

#### 3.2.1.1 Direktno odmrzovanje

Za produkcijo rekombinantnih humanih mAb je potrebno celice gojiti v ustrezнем rastnem gojišču pri ustreznih pogojih. Celice je potrebno odmrzniti, saj se nahajajo v krioposodi v tekočem dušiku na -196 °C. Najprej smo iz hladilnika vzeli plastenko z rastnim gojiščem in jo postavili v predogreto vodno kopel (37 °C). Po pol ure ogrevanja na 37 °C je bilo gojišče ogreto. Prenesli smo ga v mikrobiološko komoro in v vsako 250 mL sterilno plastično erlenmajerico za enkratno uporabo (ang. »shake flask«; SF) (proizvajalec Corning) aseptično odpipetirali 59 mL ogretega rastnega gojišča. Nato smo iz krioposode vzeli 2 viali z zamrznjenimi sesalskimi celicami in jih prenesli v vodno kopel (37 °C). Posebej smo bili pozorni, da v vodo nismo potopili cele krioviale, ampak le do roba pokrovčka, da ne bi prišlo do okužbe. Krioviali smo ob rahlem kroženju in pogostem opazovanju namakali v vodni kopeli toliko časa, da se je stopila skoraj celotna vsebina viale in ju nato vzeli iz kopeli. Krioviali smo prebrisali s sterilnim 70 % izopropanolom in ju prenesli v mikrobiološko komoro. Ko se je izopropanol v celoti posušil smo odvili pokrovček krioviale in s 5 mL sterilno stripeto (proizvajalec Corning) aseptično prenesli

vso vsebino krioviale v SF s predogretim rastnim gojiščem. Iz nacepljene kulture smo odvzeli vzorec, da smo pomerili koncentracijo in viabilnost celic na napravi Vi-Cell. Nato smo SF zaprli in prenesli v CO<sub>2</sub> inkubator/stresalnik. Celice smo kultivirali v stresalniku na 37 °C, 10 % CO<sub>2</sub> in 200 rpm.

### 3.2.1.2 Pasaže

Ko celice porabijo hranila iz gojišča, je potrebno gojišče zamenjati. Po štirih dneh gojenja celic v prvi pasaži smo naredili drugo pasažo. Iz koncentracije celic in želenega končnega volumna, smo preračunali volumen vcepka, ki ga moramo dodati svežemu gojišču, da dobimo željeno koncentracijo celic za pasažo 2. Izračun za volumen nam poda enačba 2. Novo nacepljeni SF250 smo postavili nazaj v inkubator/stresalnik na iste pogoje za nadaljnje 3 dni.

$$\text{volumen vcepka (mL)} = \frac{\text{željena koncentracija živih celic } (\frac{\text{celic}}{\text{mL}}) \times \text{končni volumen celične kulture (mL)}}{\text{koncentracija živih celic } (\frac{\text{celic}}{\text{mL}})} \quad \dots (2)$$

Naredili smo tri pasaže. Med pasažami so si celice opomogle in njihov čas podvojevanja se je ustrezno skrajšal. Dosegli smo ustrezno koncentracijo celic, ki bo zadostovala za začetek bioprosesa z dohranjevanjem.

### 3.2.1.3 Bioproses z dohranjevanjem

Po štirih dneh pasaže 3 smo nacepili celice za bioproses z dohranjevanjem. Nacepili smo 12 SF500, kjer je delovni volumen 125 mL. Za začetek poskusa potrebujemo 0,4 x 10<sup>6</sup> celic/mL v produkcijskem gojišču. S pomočjo enačbe 2 smo izračunali potrebn volumen kulture in volumen gojišča, za začetek poskusa. Gre za 14 dni dolg bioproses, kjer kulturo dohranjujemo z različnimi hranili in med bioprosesom produkta ne odvajamo. Za dohranjevanje smo uporabili dve različni hranili, ki smo ju generično dodajali na različne dneve. Protokol za dohranjevanje je specifičen za vsako celično linijo, uporabili smo že vpeljan protokol. Koncentracijo celic smo ponovno spremljali na napravi Vi-Cell, metabolite gojišča pa smo preverjali na napravi Bioprofile 400 ter produktivnost celic z merjenjem titra na napravi Octet. Poskus smo vodili v dveh paralelkah, da bi v primeru okužbe imeli na voljo rezervno kulturo. Po 14 dneh oziroma po končanem poskusu smo pobrali žetve, kulturo pa ustrezno zavrgli. Sterilno zaprte žetve smo kasneje očistili s pomočjo robota TECAN Freedom Evo.

### 3.2.2 Priprava materiala za merjenje kinetike vezave in glikansko mapiranje

Sterilno zaprte žetve smo očistili (odstranili nečistoče, kot so proteini gostiteljskih celic, encimi, DNA, RNA, itd.) s pomočjo robota TECAN freedom Evo. Freedom Evo je robot za avtomatsko pipetiranje tekočin različnih volumnov, ki ga ženemo s programom Freedom EVOWare. S pomočjo računalniškega programa lahko določimo zelo natančne parametre, s katerimi lahko dosežemo uporabo širokega spektra različnih aplikacij.

Tekočinski sistem vsebuje sistemsko tekočino (običajno je to destilirana voda), ki se preko brizgalk, ki imajo potisno moč, prenaša po cevkah. Glavna komponenta aparata je roka, ki se imenuje LiHa (ang. »Liquid Handling Arm«). Sestavljena je iz sistema kanalov 8 plus 1, kar pomeni, da lahko pipetiramo iz enega kanala ali iz osmih hkrati. Delovna površina je razdeljena na 27 mest v smeri osi x in 3 mesta (A, B in C) v smeri osi y. Pred samouporabo preverimo ali sta material in oprema na delovni plošči postavljeni na ustrezna mesta.

Pred pipetiranjem vzorce nežno homogeniziramo in vizualno pregledamo. Vzorci morajo biti brez vidnih skupkov, pene ali kapljic ob steni vsebnika. V primeru vidnih delcev ali motnosti vzorca le-tega filtriramo skozi 0,22 µm filter. Za čiščenje vzorcev potrebujemo kolone s proteinom A, na katere se bo vezalo naše mAb, vse ostale komponente vzorca bodo šle skozi kolono. Z znižanjem vrednosti pH nato eluiramo tudi naše mAb in ga zbiramo v mikrotitrski plošči. Eluat na koncu popravimo pH na nevtralno območje, saj mAb pri nizkem pH-ju niso stabilna.

Del očiščenih vzorcev (mAb) smo dali na merjenje glikanskega profila, preostanek smo uporabili za merjenje titrov in kinetike vezave mAb na receptor.

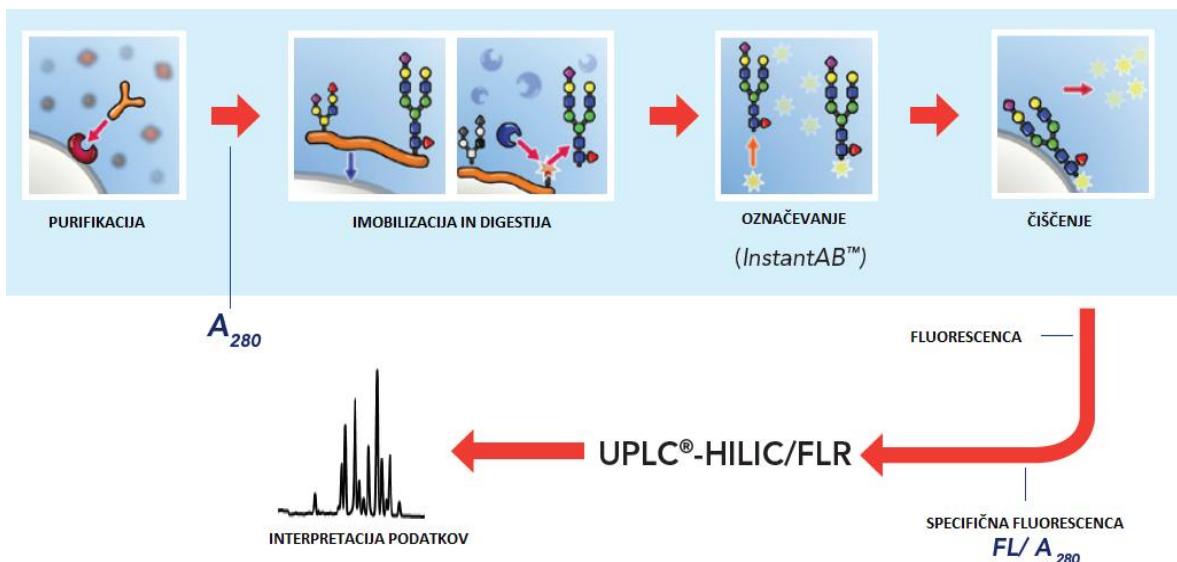
### 3.2.3 Glikansko mapiranje

#### 3.2.3.1 Priprava reagentov

Za izvedbo glikanske mape smo predhodno pripravili določene reagente, kot so digestijski pufer, encim N-glikanazo in 96% acetonitril. 25x digestijski pufer smo redčli z MQ vodo v razmerju 1:24. Volumen digestijskega pufera za 1 vzorec je 100 µL. Encim N-glikanazo smo mešali z digestijskim pufrom v razmerju 1:3. Volumen encima za en vzorec je 10 µL. 96% acetonitril smo pripravili iz 100% acetonitrila, ki smo ga redčili z MQ vodo, v razmerju 8:1. Volumen 96% acetonitrila za 1 vzorec je 200 µL.

### 3.2.3.2 Priprava vzorcev za deglikozilacijo

Sledila je priprava vzorcev za deglikozilacijo (slika 18). Sama priprava je zelo zamudna, porabimo približno 80 minut na vzorec. Zato je potrebno dobro organizirano in natančno delo, saj je priprava vzorca zelo pomembna.



Slika 18: Glikansko mapiranje (Fuller in sod., 2015)

- **Kondicioniranje RX kolon**

Prvi korak je kondicioniranje RX kolon. Gre za kromatografske kolone z nepolarno stacionarno fazo. Stacionarna faza je C18, kamor se vežejo vzoreci oziroma mAb. Odpipetirali smo  $50 \mu\text{L}$  100 % acetonitrila v vsako RX kolono in centrifugirali 3 minute pri 300 g ter sobni temperaturi ( $22^\circ\text{C}$ ). Nato smo odpipetirali  $150 \mu\text{L}$  denaturacijskega reagenta v vsako RX kolono, s katerim smo v naslednjem koraku denaturirali vzorce. Sledilo je ponovno centrifugiranje, vendar pri 1000 g na sobni temperaturi 2 minuti.

- **Nanos vzorcev na kolone**

Ko so bile kolone pripravljene, smo le-te prestavili v naslednjo vrsto luknjic na mikrotitrski plošči, saj permeata, ki je nastal med kondicioniranjem, ne potrebujemo. Po premiku kolon, smo nanje nanesli denaturirane vzorce mAb. Sledilo je centrifugiranje pri 200 g in sobni temperaturi, dokler celoten volumen vzorcev ni prešel skozi kolono (čas centrifugiranja je okoli 5 minut za volumne od 10 do  $50 \mu\text{L}$ , ali okoli 10 minut za volumne večje od  $100 \mu\text{L}$ ). Tudi po tem koraku smo permeat zavrgli in kolone z vezanimi mAb prestavili na naslednjo vrsto. V vsako RX kolono smo nanesli  $50 \mu\text{L}$  zaustavitvenega reagenta (»blocking reagenta«), ki blokira prosta vezna mesta v koloni. Centrifugirali smo 3 minute pri 300 g in sobni temperaturi.

- **Deglikozilacija**

Po uspešnem nanosu vzorcev na kolono, je sledila deglikozilacija, odstranjevanje sladkorjev. V vsako RX kolono smo prvo dodali 50  $\mu$ L digestijskega pufra in spet centrifugirali pri 300 g in sobni temperaturi 3 minute. S tem smo dosegli, da poteče vezava. Tukaj smo permeat obdržali, ker so se v njem nahajali glikani. Zato smo kolone pustili v istih luknjicah. V vsak vzorec smo dodali po 10  $\mu$ L encima in ponovno centrifugirali pri 300 g in sobni temperaturi 3 minute. Ta encim katalizira hidrolizo N(4)-(acetil-beta-D-glukozaminila) asparaginskega ostanka na N-acetil-beta-D-glukosaminilamin in peptid, ki vsebuje aspartatni ostanek (anion asparaginske kisline).

- **Inkubacija**

Sledila je inkubacija, in sicer na inkubacijskem bloku, ne več kot 60 minut, pri 50 °C.

- **Elucija glikanov**

Po inkubaciji smo vzorce vzeli iz inkubacijskega bloka in preverili ali se je nabralo kaj kondenzata. Če se je pojavil kondenzat, smo centrifugirali pri 300 g 3 minute, drugače ta korak ni bil potreben. Dodali smo 15  $\mu$ L zaključnega reagenta (»finishing reagenta«) v vsako RX kolono in centrifugirali pri 300 g in sobni temperaturi 3 minute. Zaključni reagent pomaga, da se sperejo glikani iz kolone. Kolone RX smo odstranili in zavrgli (eluirani glikani so v mikrotitrski plošči) in pokrito ploščo postavili na inkubacijski blok za 10 minut na 50°C.

- **Koncentriranje vzorcev**

Nato smo odkrito mikrotitrsko ploščo postavili v vakuumski koncentrator in koncentrirali vzorce pri 45 °C, približno 45 minut. Vmes smo pripravili inkubacijski blok na 70 °C za 60 minut in iz skrinje s strupenimi kemikalijami vzeli 2AB reagent ter reducirajoč raztopino, da se temperirata na sobno temperaturo. 2AB reagent je strupen, mutagen in občutljiv na svetlobo, zato je potrebno previdno rokovanje in zaščita pred svetlobo.

- **Označevanje glikanov z 2-aminobenzamidom**

Sledila je priprava 2AB reagenta, ki služi za označevanje glikanov z 2-aminobenzamidom. Glikane označimo zaradi uporabe flourescenčnega (FLR) detektorja. Za vsak vzorec smo potrebovali 2.5  $\mu$ L reducirajoče raztopine in 2.5  $\mu$ L 2AB raztopine ter 20 % presežka (npr. za 10 vzorcev rabimo 30  $\mu$ L 2AB raztopine in 30  $\mu$ L reducirajoče raztopine). Mešanico smo na hitro vorteksirali in centrifugirali. Nato smo dodali 5  $\mu$ L 2AB reagenta v vsak vzorec in ploščico pokrili z aluminijasto lepljivo folijo. Sledilo je centrifugiranje pri 1000 g in sobni temperaturi 1 minuto. Po centrifugiranju smo vzorce z 2AB reagentom 1 uro inkubirali v predhodno segretem inkubacijskem bloku na 70 °C. Po eni uri smo vzeli ploščico iz bloka in jo pustili na sobni temperaturi, da se je ohladila, nato pa smo centrifugirali pri 1000 g in sobni temperaturi 1 minuto.

- **Odstranjevanje odvečnega 2AB reagenta**

Po inkubaciji je potrebno odstranit odvečni 2AB reagent. V vsak označen vzorec smo dodali po 20  $\mu$ L vode ter 180  $\mu$ L 100 % acetonitrila. S tipsom smo na rahlo premešali vsak vzorec ter jih prestavili iz mikrotitrsko plošče v CU kolone (ang. »clean up«). Ponovno smo centrifugirali, in sicer pri 50 g in sobni temperaturi 10 minut. Permeat smo zavrgli. V vsako CU kolono smo dodali 200  $\mu$ L 96% acetonitrila, ki omogoči spiranje iz kolone ter centrifugirali pri 300 g in sobni temperaturi 3 minute. Permeat smo ponovno zavrgli. CU kolono smo prestavili na naslednjo stolpec luknjic in dodali 25  $\mu$ L vode v vsako CU kolono. Voda eluira glikane, ker so le-ti topni v vodi. Centrifugirali smo pri 300 g in sobni temperaturi 3 minute. CU kolone smo odstranili in zavrgli ter iz CU plošče (ang. »Cleanup Collection Plate«) vzorec prenesli v HPLC vialo.

### 3.2.3.3 HPLC sistem

Za meritev glikanskih struktur v vzorcih smo uporabili kromatografijo, ki temelji na hidrofilnih interakcijah (ang. »Hydrophilic interaction chromatography«, HILIC). Gre za normalno-fazno kromatografijo, ki vsebuje še nekaj korakov drugih kromatografij, kot sta ionsko-izmenjevalna ter reverzno-fazna kromatografija. HILIC uporablja polarno stacionarno fazo v kombinaciji z mobilno fazo, ki vsebuje predvidljivo količno vode, kombinirano z deležem manj polarnega topila. Za mobilno fazo se večinoma uporablja acetonitril. Elucijo smo izvedli z večanjem deleža pufra, ki je vseboval amonijev formiat. Princip separacije je posledica polarnosti. Majhne molekule se eluirajo prej kot velike. Po končani ločitvi smo vzorce prenesli v viale in jih shranili v hladni sobi, na 4 °C, do uporabe.

### 3.2.4 Biotinilacija

Vzorci, pridobljeni s prej opisano metodo čiščenja (poglavlje 3.2.2), so primerni za merjenje kinetike vezave. Če želimo meriti kinetiko vezave s SA biosenzorji, kjer pride do vezave biotina in streptavidina, je potrebna predhodna biotinilacija receptorja.

Biotinilacija je proces, pri katerem se molekula biotina, ki je vitamin z visoko afiniteto do streptavidina, kovalentno veže na tarčne molekule. V epici se je nahajal 1 mg Sulfo-NHS-LC-Biotin, kateremu smo dodali 180  $\mu$ L pufra PBS, kot narekujejo proizvajalčeva navodila. Mešali smo toliko časa, da se je biotin popolnoma raztopil. V drugo epico smo pripravili 300  $\mu$ L proteina oziroma receptorja Fc $\gamma$ RIIIa, katerega koncentracijo smo poznali. Želeli smo molsko razmerje 5:1 med biotinilacijskem reagentom in proteinom. Najprej smo izračunali molarnost (n) biotinilacijskega reagenta po enačbi 3 in nato še volumen (V) biotinilacijskega reagenta, ki ga moramo dodati proteinu, po enačbi 4.

$$n_{biotina} = mL \text{ protina} \times \frac{mg \text{ proteina}}{mL \text{ proteina}} \times \frac{mmol \text{ proteina}}{mg \text{ proteina}} \times \frac{5 \text{ mmol biotina}}{mmol \text{ proteina}} [mmol] \quad \dots (3)$$

$$V_{biotina} = mmol\ biotina \times \frac{1000000\ \mu L}{L} \times \frac{L}{10\ mmol}\ [\mu L] \quad \dots (4)$$

Po pripravi je potrebno biotiniliranemu receptorju pomeriti absorbanco, ki omogoča izračun koncentracije. V kiveto smo odpipetirali 100  $\mu L$  vzorca, pomerili absorbanco na biofotometru in izračunali koncentracijo po enačbi 5, kjer je  $c$  koncentracija, ki jo računamo,  $A$  prestavlja pomerjeno absorbanco vzorca,  $l$  je dolžina optične poti, ki jo opravi žarek in  $\epsilon$  je ekstinkcijski koeficient proteina v vzorcu.

$$c = \frac{A \times l}{\epsilon} [mol/L] \quad \dots (5)$$

### 3.2.5 Deglikozilacija

Deglikozilacija je proces odstranjevanja glikanov iz glikoproteinov, v našem primeru v delu Fc mAb. Za izvedbo deglikozilacije se lahko uporabi ali kemijsko ali encimsko metodo. Pri kemijski metodi, kot je  $\beta$ -eliminacija, lahko pride do nepopolne odstranitve glikanov in razgradnje proteina, zato smo se odločili za uporabo encimske metode. V preglednici 4 so zbrani encimi, ki smo jih uporabili.

Preglednica 4: Uporabljeni encimi

Ime	Proizvajalec	Kataloška številka
$\alpha$ -L-fukozidaza	SIGMA	F5884
Endoglikozidaza F2	SIGMA	E0639
Nevraminidaza	New England BioLabs	#P0720L
$\beta(1-4)$ galaktozidaza	Roche	10 105 031 001
$\beta$ -N-acetylglukozaminidaza	SIGMA	A2264
$\alpha$ -manozidaza	SIGMA	M7257

Glede na trditev, da na kinetiko vezave najbolj vpliva sladkor fukoza, smo pripravili vzorce (R1 – R8), ki se razlikujejo v vsebnosti fukoze. Predstavljeni so v Preglednica 5. Vzorci so pripravljeni v parih, in sicer enemu od para smo dodali encim fukozidazo (R1, R3, R5 in R7), drugemu pa ne (R2, R4, R6 in R8). Najprej smo v 5 mL viale odpipetirali preračunan volumen pufra, da bo končni volumen vseh vzorcev enak, in sicer 50 mM natrijev acetat s pH=5,5. Nato smo dodali ustrezne količine različnih encimov in na koncu še v vsako vialo enak volumen (200  $\mu L$ ) vzorca mAb D. Vzorcu smo predhodno pomerili absorbanco, s pomočjo katere smo izračunali koncentracijo mAb, kot narekuje enačba 4. Vzorce smo dobro premešali in inkubirali na termomikserju 66 ur na 37 °C in pri 350 rpm.

Golob A. Kinetika vezave rekombinantnih monoklonskih protiteles na receptor Fc $\gamma$ RIIIa.

Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2015

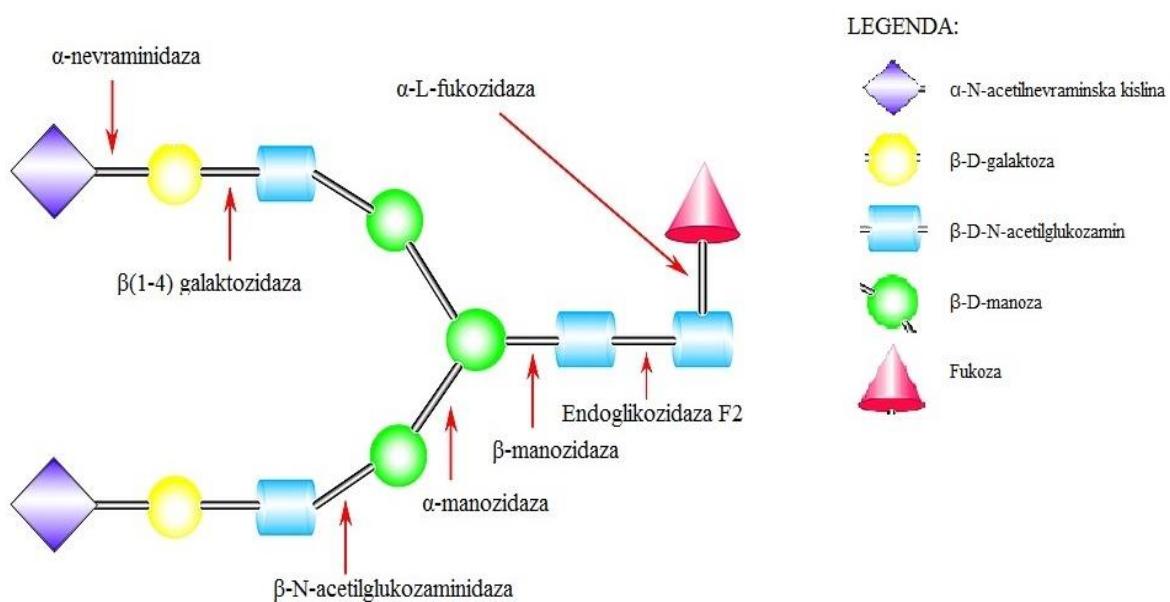
Preglednica 5: Vzorci za deglikozilacijo

R številka	Encimi	Količina ( $\mu$ L)	Dodatek pufra ( $\mu$ L)
<b>R1</b>	$\alpha$ -L-fukozidaza	40	4740
	Endoglikozidaza F2	20	
<b>R3</b>	$\alpha$ -L-fukozidaza	40	4430
	Nevraminidaza	30	
	$\beta$ (1-4) galaktozidaza	300	
<b>R5</b>	$\alpha$ -L-fukozidaza	40	4360
	Nevraminidaza	30	
	$\beta$ (1-4) galaktozidaza	300	
	$\beta$ -N-acetilglukozaminidaza	70	
<b>R7</b>	$\alpha$ -L-fukozidaza	40	4060
	Nevraminidaza	30	
	$\beta$ (1-4) galaktozidaza	300	
	$\beta$ -N-acetilglukozaminidaza	70	
	$\alpha$ -manozidaza	300	

R številka	Encimi	Količina ( $\mu$ L)	Dodatek pufra ( $\mu$ L)
<b>R2</b>		20	4780
	Endoglikozidaza F2		
<b>R4</b>		30	4470
	Nevraminidaza		
	$\beta$ (1-4) galaktozidaza		
<b>R6</b>		70	4400
	Nevraminidaza		
	$\beta$ (1-4) galaktozidaza		
	$\beta$ -N-acetilglukozaminidaza		
<b>R8</b>		30	4100
	Nevraminidaza		
	$\beta$ (1-4) galaktozidaza		
	$\beta$ -N-acetilglukozaminidaza		
	$\alpha$ -manozidaza		

### 3.2.5.1 Encimi

Encimi so proteini, ki katalizirajo biokemične reakcije oziroma uravnavajo hitrost in smer reakcij, sami pa se pri tem ne porabljajo in ne spremenijo. So specifični, kar pomeni, da vsak od prej naštetih encimov deluje le na določen substrat oziroma specifično cepi določeno vez. Na sliki 19 so predstavljena mesta, kjer cepijo izbrani encimi.



Slika 19: Specifična mesta rezanja encimov (Sigma-Aldrich, 2015 )

### 3.2.6 Vezava antigena na mAb

Ker nas je pri 2. hipotezi zanimalo, ali predhodna vezava antigena na mAb vpliva na kinetiko vezave, smo pred meritvijo kinetike vezave na mAb vezali ustrezni antigen. Potrebna je pravilna izbira Ag, saj se mAb specifično veže le na določen Ag. Vzeli smo trikratni prebitek antigena, ker smo želeli, da se zapolnijo vsa vezavna mesta za antigen. Za različne proteine smo uporabili različne Ag, in sicer pri mAb A smo uporabili Ag1, medtem ko pri mAb B in C pa Ag2. Vzporedno smo pripravili še vzorce mAb brez dodanega Ag, ki služijo kot negativna kontrola.

Koncentracijo biotiniliranega receptorja poznamo. Da smo dobili želeno koncentracijo receptorja, ki smo ga uporabili kot ligand, smo morali izračunati, kakšen volumen receptorja potrebujemo in koliko mu moramo dodati pufra. Pri izračunu tega volumna, nam pomagata enačbi 6 in 7. Receptor smo uporabili isti za vzorce brez dodanega in z dodanim Ag. Vzorcem smo naprej pomerili absorbanco, nato smo s pomočjo enačbe 4 izračunali ustrezno koncentracijo proteina. Nato smo z uporabo enačbe 6 in 7 izračunali volumen vzorca in volumen pufer, da smo dosegli želeno koncentracijo.

$$\text{Redčitveni faktor (RF)} = \frac{c_{\text{dejanska}}}{c_{\text{želen}}} \quad \dots (6)$$

$$V_{\text{proteina}} = \frac{V_{\text{želen}}}{RF} [\text{mL}] \quad \dots (7)$$

Pri vzorcih z dodanim Ag smo morali biti pozorni na 3 kratni pribitek Ag. Najprej smo po enačbi 8 izračunali kakšna je molarnost (M1) proteina, kjer smo morali poznati koncentracijo in molsko maso (M). Ker želimo 3 kratni pribitek Ag, smo M1 pomnožili s 3, kar smo nato uporabili pri izračunu volumna, kot kažeta enačbi 10 in 11. Enačbi sta izpeljani iz enačbe 9, kjer V<sub>1</sub> predstavlja volumen, ki ga računamo.

$$M1 = \frac{c_{\text{želen}}}{M_{\text{vzorca}}} [\text{mol/L}] \quad \dots (8)$$

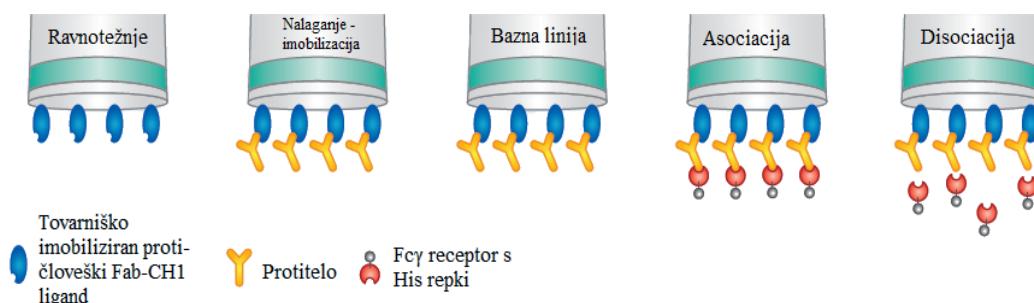
$$M1_{\text{vzorca}} \times V_{\text{želen}} = c_{\text{vzorca}} \times V_1 \quad \dots (9)$$

$$V_{\text{proteina}} = \frac{M1(\text{proteina}) \times V(\text{želeni})}{c(\text{proteina})} [\text{mL}] \quad \dots (10)$$

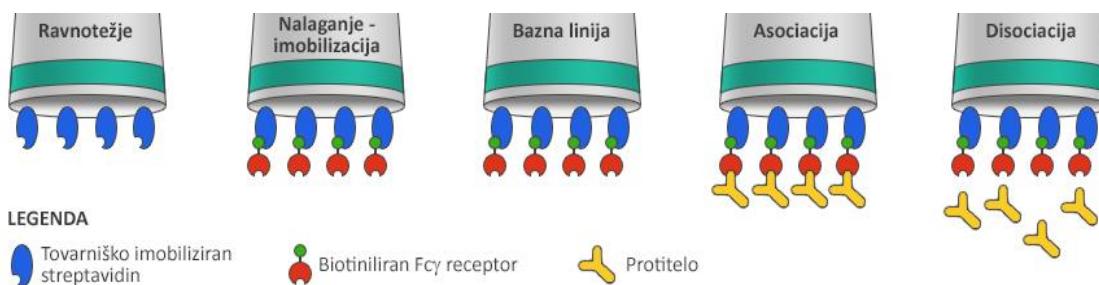
$$V_{\text{antigena}} = \frac{M1(\text{antigena}) \times V(\text{želeni})}{c(\text{antigena})} [\text{mL}] \quad \dots (11)$$

### 3.2.7 Merjenje kinetike vezave

Merjenje kinetike vezave je potekalo na aparaturi Octet RED96 krmiljenim s programom Octet Data Acquisition. Merjenje je sestavljeno iz dveh delov, prvi del je imobilizacija liganda na biosenzor, v drugem delu pa poteče vezava proteina na ligand. V primeru SA biosenzorjev smo kot ligand uporabili receptor FcγRIIIa, ki smo ga predhodno biotinilirali. Biotin omogoča vezavo receptorja preko streptavidina na biosenzor. Medtem kot pri uporabi FAB biosenzorjev kot ligand služi mAb, ki se preko variabilnega dela veža na biosenzor. Ko je na biosenzor imobilizirana zadostna količina liganda, se začne drugi del metode, kjer ob vezavi proteina na ligand steče reakcija asociacije in nato še disociacije, kot je prikazano na sliki 20 in sliki 21.



Slika 20: Potek merjenja kinetike vezave z FAB biosenzorji (Tobias in sod., 2014)



Slika 21: Potek merjanje kinetike vezave s SA biosenzorji (povzeto po Tobias in sod., 2014)

Za merjenje smo pripravili dve mikrotitrski plošči s 96 luknjami, delovni volumen posamezne luknje znaša 200  $\mu$ L. Na eni plošči smo napolnili ustrezno število lukenj s puferom PBS, ki smo ga predhodno pripravili po proizvajalčevih navodilih in mu nato dodali še kinetični reagent (kPBS). Ta plošča služi za rehidracijo biosenzorjev, ki smo jih namakali vsaj 10 minut pred začetkom reakcije. Pufer kPBS smo uporabili tudi za redčenje in pripravo vzorcev, ki smo jih pripravili na drugi mikrotitrski plošči. Pripravili smo tudi pufer in regeneracijski reagent. Primer pripravljenih plošč za enega od poskusov je prikazan na sliki 22.



Slika 22: Plošča s pripravljenimi vzorci in regeneracijskim reagentom. B označuje pufer, L immobilizacijo, R regeneracijo, N neutralizacijo, roza polja označujejo vzorce

### 3.2.7.1 Imobilizacija liganda na biosenzor

Imobilizacija je prvi del metode za merjenje kinetike vezave liganda na protein. Sprva potopimo biosenzorje v pufer kPBS (stolpec 1) in spremljamo potek bazne linije. Sledi imobilizacija liganda na biosenzor (stolpec 2). Ko dosežemo želeno število vezanih molekul na biosenzorju, ponovno posnamemo bazno linijo v svežem pufru (stolpec 3). Po uspešni imobilizaciji liganda na biosenzor nadaljujemo z drugim delom metode, kjer vežemo protein na immobiliziran ligand.

### 3.2.7.2 Merjenje kinetike vezave mAb na receptor Fc $\gamma$ RIIIa

Vzorce smo prehodno pripravili v epice in jih nato po 200  $\mu$ L prenesli na mikrotitrsko ploščo. Pred vezavo proteina na ligand, sledi snemanje bazne linije v svežem pufru, kjer iz biosenzorja odstranimo vse nevezane ligande. Pomembno je, da se vzpostavi stabilna in uravnotežena bazna linija z minimalnim šumom. Ko biosenzorje namočimo v vzorce, poteče reakcija vezave, asociacija. Biosenzorji se pomaknejo v luknje s svežim puferom, kjer poteče disociacija molekul receptorja s površine biosenzorja. Vzporedno z vzorci, merimo tudi odziv biosenzorja v slepem vzorcu, ki je brez proteina, vsebuje zgolj pufer. Odziv biosenzorja v slepem vzorcu pred analizo odštejemo od odziva ostalih biosenzorjev.

Meritve smo izvajali pri 25 °C, kjer je vpliv izhlapevanja vzorcev zanemarljiv. Ostali pogoji reakcije za posamezne korake so predstavljeni v preglednici 6. Podatki za pogoje so bili izbrani na podlagi več predhodnih poskusov, s katerimi smo poskušali najti optimalne pogoje. Ti pogoji držijo zgolj za razvoj naše metode.

Preglednica 6: Pogoji reakcije za posamezne korake metode

Korak	Čas [s]	Stresanje [rpm]
Bazna linija_imobilizacija	120	1000
Nalaganje	300	1000
Bazna linija	90	1000
Asociacija	30	1000
Disociacija	30	1000
Regeneracija	120	1000

### 3.2.8 Analiza podatkov

Analiza podatkov poteka s pomočjo programa Data Analysis. Ob zagonu programa smo uvozili želene surove podatke ter označili referenčne biosenzorje. V prvem koraku smo vezavne krivulje poravnali po bazni liniji, nakar je sledila analiza na osnovi 1:1 modela vezave. Rezultat analize sta konstanti kinetike asociacije ( $k_a$ ) in disociacije ( $k_d$ ). Razmerje kinetičnih konstant vezave ( $k_d/k_a$ ) predstavlja ravnotežno konstanto disociacije  $K_D$ , ki je mera za jakost vezave (afiniteto).

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 GLIKOZILACIJSKI PROFIL

V prvem delu raziskovalne naloge smo se osredotočili na dobro poznano temo, glikozilacijo. O glikozilaciji vemo ogromno, saj je ena izmed glavnih post-translacijskih sprememb. Pri hipotezi 3 nas je zanimalo ali ima glikozilacija vpliv na kinetiko vezave mAb na receptor Fc $\gamma$ RIIIa. Za preverjanje hipoteze, smo izvedli tri različne poskuse, za katere smo uporabili dvoje različnih mAb (A in D). Uporabili smo 2 različna mAb A, ki sta vsak produkt različnega klena, referenca mAb D ter tri mAb D, ki so produkt treh različnih zbirkov. Za merjenje smo uporabili FAB biosenzorje, kjer smo kot ligand vezali mAb in nato je sledila vezava mAb na receptor Fc $\gamma$ RIIIa (slika 20).

#### 4.1.1 mAb A iz različnih klonov z različno vsebnostjo bG0(-F)

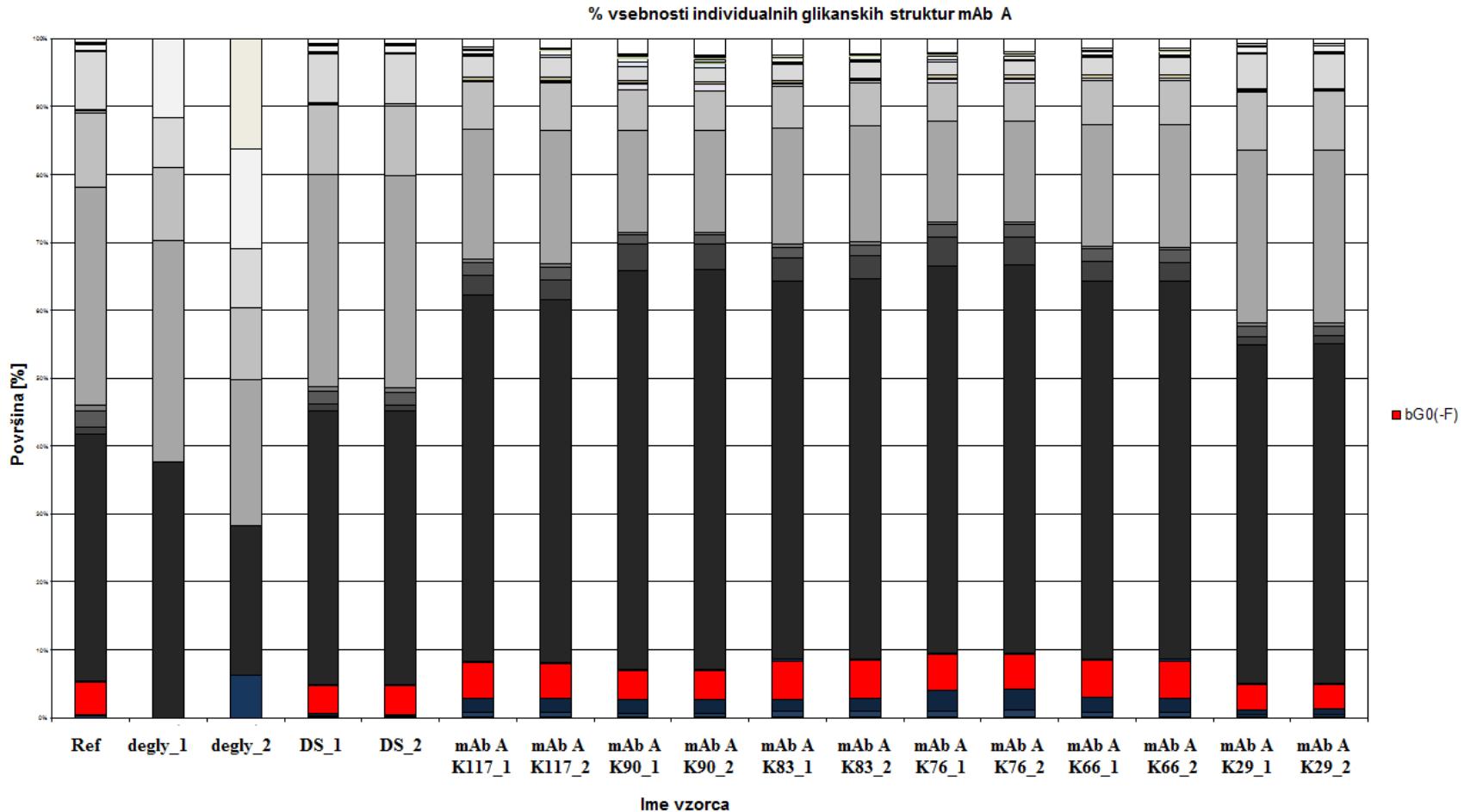
Za prvi poskus smo namnožili različne klone iste starševske celične linije CHO. Po končanem bioprocесu z dohranjevanjem se je protein (mAb) nahajal v žetvi. Žetev smo očistili s pomočjo robota TECAN freedom Evo in tako pridobili čisti protein v pufru. Pomerili smo koncentracijo proteina in pripravili vzorce za merjenje glikanske mape. Analiza glikanske mape nam poda odstotek posameznih glikanskih struktur v proteinu, ki so prikazane na sliki 23. Želeli smo pridobiti mAb A iz različnih klonov, ki bi se razlikovala v glikozilacijskem profilu. Predvsem smo želeli razlike v % vsebnosti bG0(-F). Siberil in sod. (2006) so zapisali, da ogljikovi hidrati oziroma natančneje sladkor fukoza vpliva na kot med CH2 in CH3 regijo v Fc delu mAb. Glede na to dejstvo smo predvidevali, da je njegova prisotnost ali odsotnost bistvenega pomena za kinetiko vezave na receptor. Izmed vseh struktur, predstavljenih na sliki 23, bi lahko bila struktura bG0(-F) tista, ki najbolj vplivala na kinetiko vezave.

Med vsemi vzorci mAb A smo izbrali tista dva, ki sta imela med seboj največji razpon v % vsebnosti bG0(-F). Vzorci in njim pripadajoč % vsebnosti bG0(-F), so predstavljeni v preglednici 7.

Preglednica 7: Vzorci mAb A in njim pripradajoč % vsebnosti bG0(-F)

Ime vzorca	bG0(-F) (%)
<b>mAb A K29</b>	<b>3,70</b>
mAb A K66	5,45
mAb A K76	5,12
<b>mAb A K83</b>	<b>5,68</b>
mAb A K90	4,31
mAb A K117	5,22

Golob A. Kinetika vezave rekombinantnih monoklonskih protiteles na receptor Fc $\gamma$ RIIIa.  
 Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2015



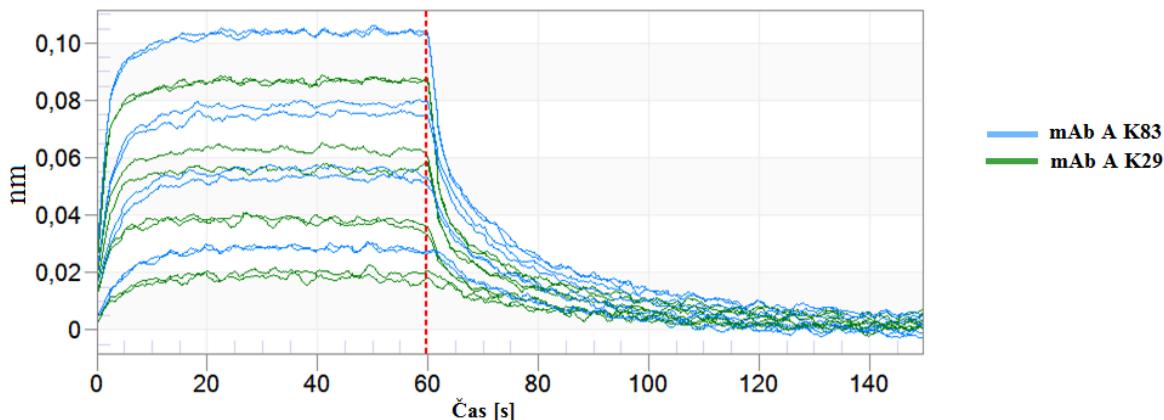
Slika 23: Glikanska mapa vzorcev mAb A pridobljenih iz različnih klonov

Za merjenje kinetike vezave smo pripravili vzorce v istih koncentracijah (0,2 g/L) ter receptor Fc $\gamma$ IIIa v treh različnih koncentracijah (1600 nM, 800 nM in 400 nM). Meritve smo izvajali v dveh ponovitvah. Želeli smo poiskati povezavo med  $K_D$  in vsebnostjo bG0(-F) ter preveriti ponovljivost metode. Po končani meritvi smo dobljene krivulje analizirali po postopku opisanem v poglavju 3.2.8. Rezultati meritve so predstavljeni v preglednici 8. V preglednici imamo poleg konstant kinetike vezave podan še podatek o odzivu ter število ponovitev. Bistven podatek oziroma podatki, s katerimi upravljamo pri analizi, pa so  $K_D$ ,  $k_a$  in  $k_d$ . Z modro barvo sta označeni dve ponovitvi meritve vezave vzorca mAb A, pridobljenega iz klena z oznako K83 in z zeleno barvo dve ponovitvi vezave mAb A iz klena K29. Kot eno ponovitev smo pri globalnem prileganju šteli meritve enega klena pri vseh pomerjenih koncentracijah receptorja.

Preglednica 8: Vpliv glikozilacijskega profila na kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ IIIa za vzorce mAb A

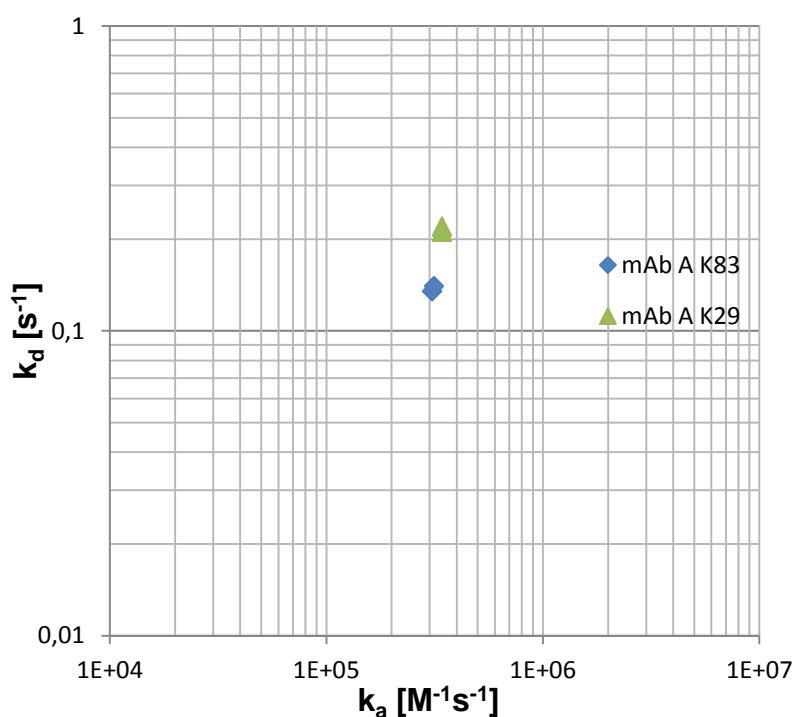
Ponovitev	Ime vzorca	Odziv (nM)	$K_D$ (M)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	bG0(-F) (%)
1	mAb A <b>K83</b>	0,1040	<b>4,37E-07</b>	3,08E+05	1,35E-01	5,68
2	mAb A <b>K83</b>	0,1041	<b>4,44E-07</b>	3,15E+05	1,40E-01	5,68
1	mAb A <b>K29</b>	0,0870	<b>6,39E-07</b>	3,43E+05	2,19E-01	3,70
2	mAb A <b>K29</b>	0,0872	<b>6,15E-07</b>	3,43E+05	2,11E-01	3,70

Izris krivulj med samim merjenjem kinetike vezave mAb na receptor nam pokaže bistvene razlike med obema klonoma. Do razlik prihaja tako v odzivu (višina krivulj) kot tudi v  $K_D$  (oblika krivulj). Iz slike 24 je moč razbrati, da ima vzorec mAb A K83 z višjo vsebnostjo bG0(-F), bistveno višji odziv pri vseh treh merjenih koncentracijah receptorja, kot mAb A K29. To potrjujejo tudi podatki o odzivu v preglednici 8. Prav tako prihaja do razlik v konstanti vezave, ki so težje vidne iz grafa, temu v prid pa govorijo podatki o  $K_D$ , ki so razvidni iz preglednice 8. Večinski vpliv na  $K_D$  ima disociacija oziroma konstanta disocacije, kar pomeni, da do razlik prihaja pri disociranju receptorja iz mAb, saj je jakost vezave različna.



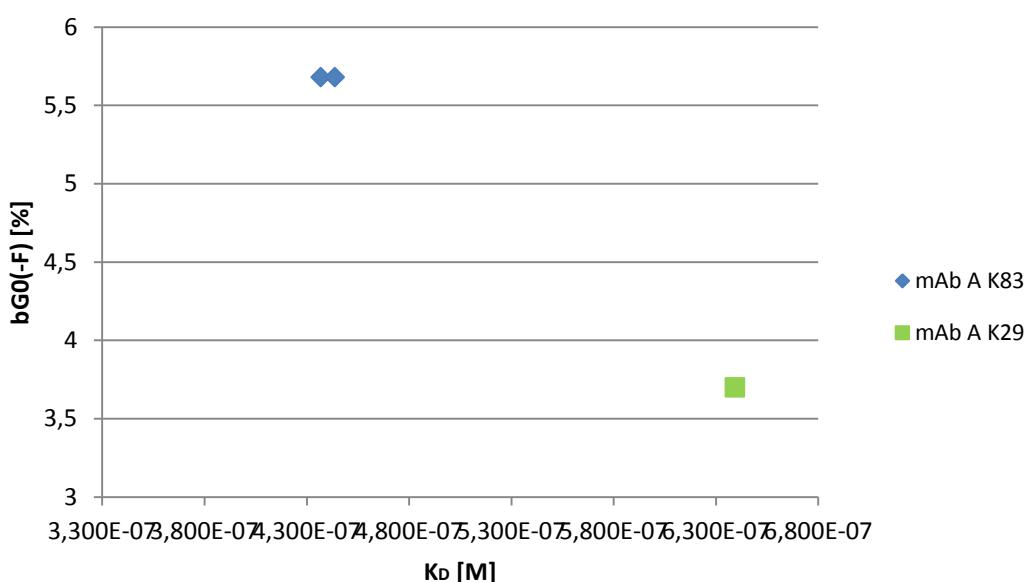
Slika 24: Krivulji asocijacije in disocijacije za vzorca mAb A z različno vsebnostjo bG0(-F)

Za lažjo razlago, kje prihaja do razlik v kinetiki vezave med vzorcema, smo izrisali afinitetni graf (slika 25). Graf prikazuje  $k_d$  v odvisnosti od  $k_a$ . Iz grafa je zelo lepo razvidno, da prihaja do razlik pri disociaciji. Pri mAb A K83 je  $k_d$  manjša, kar pomeni, da je disociacija receptorja iz proteina počasnejša, sej je bila jakost vezave nanj močnejša (Niwa in sod., 2005), kot pri mAb A K29.

Slika 25: Afinitetni graf  $k_d$  v odvisnosti od  $k_a$  za vzorce mAb A

Ker nas je zanimala povezava med glikansko strukturo bG0(-F) in  $K_D$ , smo zbrane podatke iz preglednice 8 prenesli na graf, ki prikazuje  $K_D$  v odvisnosti od % vsebnosti bG0(-F) (slika 26). Točke paralelk se med seboj v celoti ne prekrivajo, kar lahko pripišemo napaki meritve ali pa napaki pri pripravi vzorcev. Razlike med ponovitvami so majhne, znotraj 2

%, kar pomeni, da lahko metodo označimo kot zelo dobro ponovljivo. Kot so poročali že Ferrera in sod. (2011), naj bi imel vzorec z največjo vsebnost bG0(-F) najnižji  $K_D$ , kar pomeni, da je njegova vezava na receptor najmočnejša. Pri nas se je to lepo pokazalo, vzorec mAb A K83, ki ima najvišjo vrednost bG0(-F) (5,68 %) ima tudi najnižji  $K_D$ . Če podatke ubesedimo, lahko rečemo, da prisotnost fukoze v Fc delu mAb vpliva na kinetiko vezave na receptor. Manj kot je prisotne fukoze, torej višji kot je % vsebnosti bG0(-F), močnejša je vezave mAb na receptor Fc $\gamma$ RIIIa.



Slika 26: Graf korelacije med bG0(-F) in  $K_D$  za različne vzorce mAb A

#### 4.1.2 Uporaba encimov za deglikozilacijo

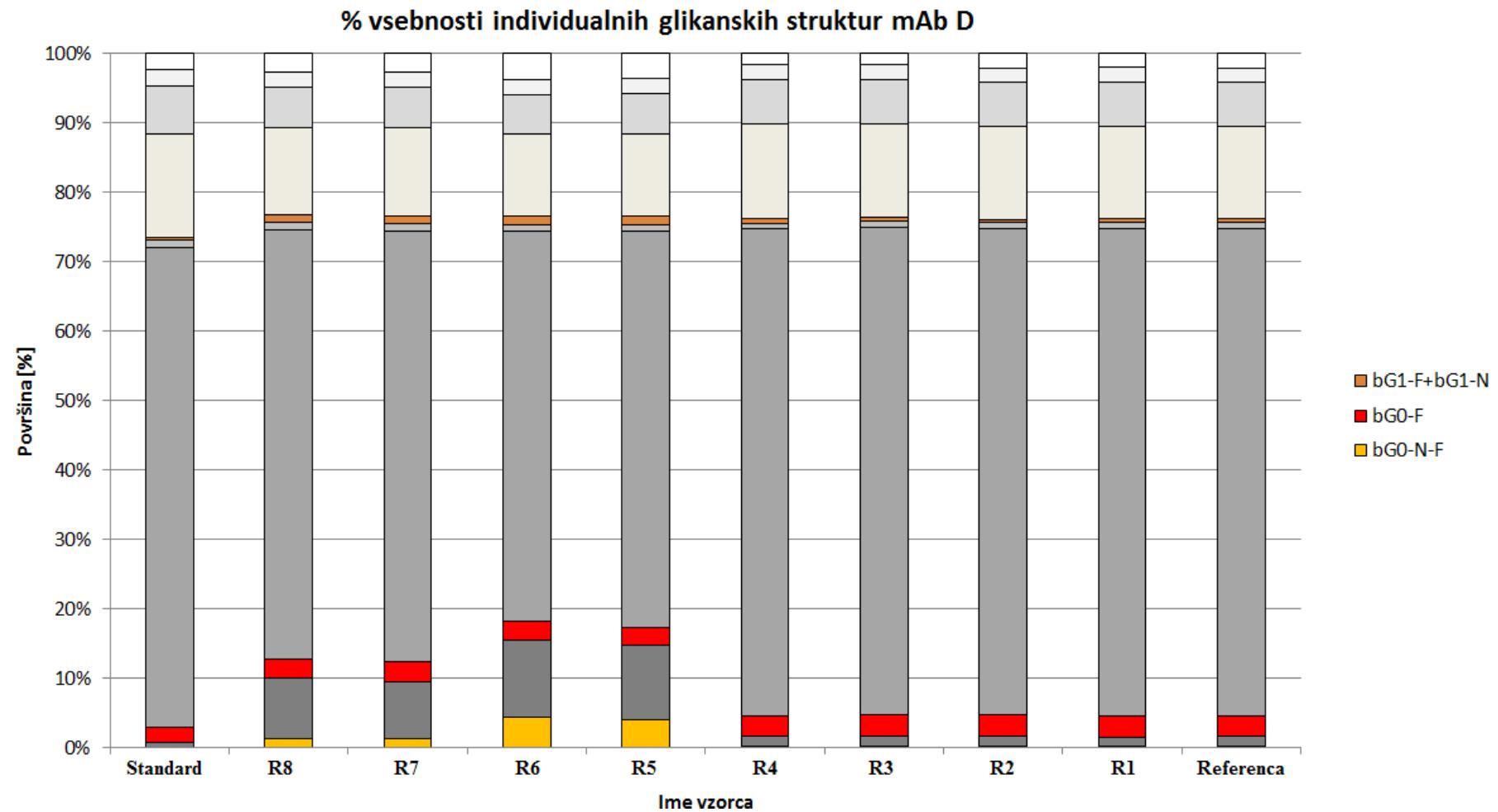
Glikani so prisotni v Fc delu mAb in so pritrjeni na Asn<sup>297</sup>, ki se nahaja v regiji CH2. V osnovi lahko s pomočjo tehnologije rekombinantne DNK pridobimo vzorce iz klonov z različnimi glikanskimi profili, kot so ugotovili že Niwa in sod. (2005). Sami pa smo želeli preizkusiti alternativni način priprave vzorcev z različnimi vsebnostmi posameznih glikanskih struktur.

Pripravili smo različne vzorce, kjer naj bi eden od para imel prisotno fukozo, drugi od para pa ne (dodatek  $\alpha$ -L-fukozidaze). Vzorci so predstavljeni v preglednici 5 v poglavju 3.2.5.1. Encimi imajo specifično mesto delovanja, kjer pride do cepitve vezi in s tem povzročijo odstranitev točno določenega sladkornega ostanka. Želeli smo preveriti, ali dodatek encima k vzorcu res povzroči odcepitev sladkornih ostankov, kar naj bi se odražalo v spremenjeni kinetiki vezave. Ker vemo, da na kinetiku vezave mAb na receptor najbolj vpliva fukoza, je bil glavni encim  $\alpha$ -L-fukozidaza. Znano je tudi, da je fukoza možno odstraniti le, če predhodno postopoma odstranimo vse ostale sladkorne ostanke iz glikana (Gates in sod.,

2004). Poleg  $\alpha$ -L-fukozidaze smo uporabili še druge encime (preglednica 4), ki naj bi nam omogočili dostop do fukoze. Ker vemo, da popolna N-deglikozilacija IgG privede do otežene vezave mAb na receptor, kar trdijo Okazaki in sod. (2004), smo želeli doseči le določeno stopnjo deglikozilacije. Preveriti smo hoteli, ali je to možno doseči z uporabo različnih encimov.

Proteinu v pufru smo dodali encime, kot je predstavljeno v preglednici 5 in nato vzorce inkubirali. Po končani inkubaciji smo pomerili glikansko mapo (slika 27).

Golob A. Kinetika vezave rekombinantnih monoklonskih protiteles na receptor Fc $\gamma$ RIIIa.  
Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2015



Slika 27: Glikanska mapa vzorcev mAb D pridobljenih z deglikozilacij

#### 4.1.2.1 $\alpha$ -L-fukozidaza

Rezultati glikanske mape so nepričakovani. V osnovi nas je zanimal % vsebnosti bG0(-F). Če se osredotočimo samo na to glikansko strukturo, bi ob pogledu na rezultate lahko rekli, da encim  $\alpha$ -L-fukozidaza ni deloval oziroma ni prišlo do odcepitve fukoze. Vidimo, da je % vsebnosti bG0(-F) v vseh vzorcih enak kot pri referenci. Zato smo naredili pregled nad vsemi glikanskimi strukturami, ki vsebujejo (-F), torej bGx(-F), in jih med seboj sešteli. Rezultat je predstavljen v preglednici 9.

Preglednica 9: Vsota glikanskih struktur, ki vsebujejo (-F) za vzorce mAb D

Ime vzorca	bG0 -N-F	bG0 -F	bG1-F + bG1-N	Vsota bGx(-F) (%)
Delovni Standard	0,1	2,1	0,5	2,7
R8	1,4	2,8	1,1	5,3
R7	1,3	2,8	1,1	5,2
R6	4,5	2,7	1,3	8,5
R5	4,0	2,7	1,3	8,0
R4	0,1	3,0	0,7	3,8
R3	0,1	3,1	0,6	3,8
R2	0,1	3,1	0,5	3,7
R1	0,1	2,9	0,5	3,5
Referenca	0,1	2,9	0,5	3,5

Na tem nivoju pa so vidne razlike med vzorci, ki bi lahko povzročile razlike v  $K_D$ . Vendar do razlik ne prihaja med sodimi in lihimi vzorci R, kjer bi razlike pričakovali, temveč med vzorci, ki imajo dodane različne encime. Torej razlike v bGx(-F) niso posledica delovanja encima  $\alpha$ -L-fukozidaze, temveč postopnega dodajanja različnih encimov (Gates in sod., 2004), ki povzročijo nastajanje teh glikanskih struktur. Razlag za neučinkovitost encima je lahko več, na primer prekratek inkubacijski čas, nedelujoč encim ali pa nedostopnost fukoze.

#### 4.1.2.2 R1 in R2

Kljub dejству, da pride do odcepitve fukoze zgolj ob postopnem rezanju sladkornih ostankov, kot so poročali že Gates in sod. (2004), smo pripravili dva vzorca, R1 in R2, kjer smo dodali le encim endoglikozidazo F2 (vzorcu R1 tudi  $\alpha$ -L-fukozidazo). Odcepil naj bi celoten glikan, razen zadnjega  $\beta$ -D-N-acetylglukozamina, ki je vezan na Asn<sup>297</sup> in na katerem je pritrjena fuka. Ob pogledu na rezultate lahko trdimo, da encim ni deloval, saj je struktura popolnoma enaka kot pri referenci. Kljub temu, da gre za endoglikozidazo, je bila cepitev glikozidne vezi med dvema  $\beta$ -D-N-acetylglukozaminoma neuspešna. Pri

ostalih vzorcih v nadaljevanju smo postopoma dodajali še ostale encime in preverili njihovo delovanje.

#### 4.1.2.3 R3 in R4

Encim  $\alpha$ -nevraminidaza odcepi  $\alpha$ -L-acetylnevraminsko kislino, ki je končni sladkorni ostanek. O delovanju ali nedelovanju encima ne moremo popolnoma trditi, saj že v osnovi nimamo pomerjenih glikanskih struktur, ki vsebujejo  $\alpha$ -L-acetylnevraminsko kislino. Iz glikanskih map ostalih mAb sklepamo, da teh struktur ni veliko, saj je prisotnost  $\alpha$ -L-acetylnevraminske kisline majhna, okoli 1 %. Četudi bi encim deloval, bi bile razlike zelo majhne, mogoče jih ne bi niti zaznali. Da pa lahko delujejo drugi encimi, ki so eksoglikozidaze, mora biti delovanje  $\alpha$ -nevraminidaze uspešno.

Sledi odcepitev naslednjega sladkornega ostanka iz glikana, in sicer  $\beta$ -D-galaktoze s pomočjo  $\beta(1,4)$ -galaktozidaze. Struktura bG2 (priloga A) predstavlja glikan s prisotno galaktozo, kot zadnjim sladkornim ostankom. Če encim deluje, bi se moral delež bG2 zmanjšati in na ta račun bi se moral povečati delež struktur brez prisotne galaktoze (bG1 in bG0). Ob pogledu na rezultate v preglednici 9, vidimo, da temu ni tako. Rečemo lahko, da je bilo strukture bG2 v osnovi premalo, komaj okoli 2 %, da bi lahko sklepali na delovanje encima. Ker gre za eksoglikozidazo, bi morala biti galaktoza zadnji sladkor v verigi, kar pa ne vemo, saj nismo prepričani v delovanje  $\alpha$ -nevraminidaza. Delovanja encima ne moremo niti potrditi niti ovreči.

Dodatek teh dveh encimov imajo vzorci od R3 do R8. Vzorca, ki vsebujeta zgolj ta encima, sta R3 in R4, prvemu od obeh smo dodali tudi  $\alpha$ -L-fukozidazo. Iz rezultatov vidimo, da ni prišlo do nobenih razlik med vzorcema, niti v primerjavi z vzorcem reference.

#### 4.1.2.4 R5 in R6

Kljub neuspešnim rezultatom iz prejšnjih reakcij, smo nadaljevali z analizo ostalih vzorcev. Iz glikanske mape lahko vidimo, da referenca izmed vseh struktur, vsebuje največ bG0 (priloga A). Ob dodatku encimov  $\alpha$ -nevraminidaze in  $\beta(1,4)$ -galaktozidaze se delež bG0 ne zmanjša. Vzorcema R5 in R6 pa smo dodali še dodaten encim, in sicer  $\beta$ -N-acetylglukozaminidazo, ki odcepi  $\beta$ -D-N-acetylglukozamin. Tudi če oba encima,  $\alpha$ -nevraminidaza in  $\beta(1,4)$ -galaktozidaza ne delujeta, kot bi lahko sklepali iz vzorcev R3 in R4, bi se moral pokazati učinek  $\beta$ -N-acetylglukozaminidaze, saj gre za endoglikozidazo. To pomeni, da bi encim razcepil vez med  $\beta$ -D-N-acetylglukozaminom in manozo, kljub temu, da je vez nekje v sredini strukture glikana. Ker v osnovi referenca vsebuje večinski delež bG0, bi se moral ob morebitnem delovanju  $\beta$ -N-acetylglukozaminidaze ta delež bistveno zmanjšat in ob tem bi se moral povečat delež struktur, z enim ali nobenim  $\beta$ -D-N-

acetilglukozaminom vezanim na manozo. Žal iz glikanske mape ne moremo razbrati deleža strukture M3 (priloga A), lahko pa zagotovo povemo in je tudi razvidno iz preglednice 9, da se je delež bG0 zmanjšal ter da sta se deleža bG0(-N) in bG0(-N-F) povišala. To potrdi delovanje encima  $\beta$ -N-acetilglukozaminidaze.

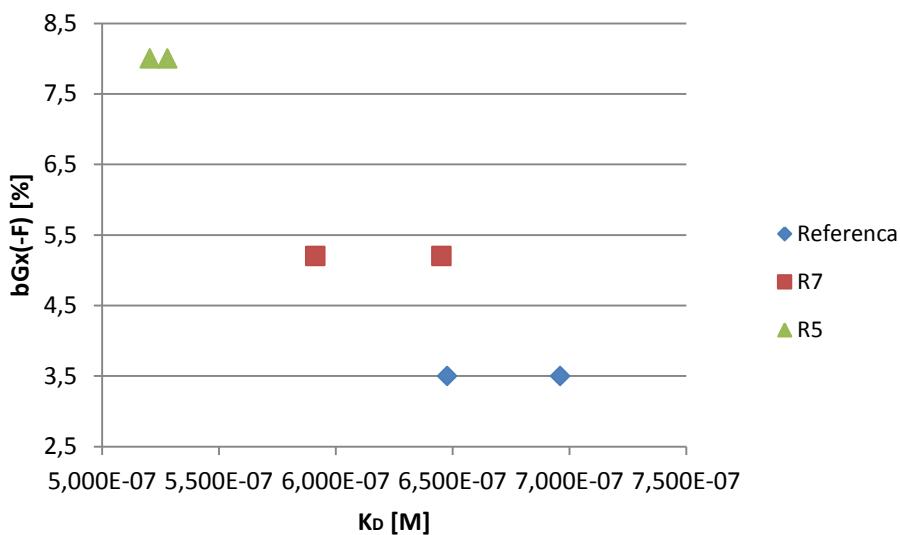
#### 4.1.2.5 R7 in R8

Zadnjima vzorcema pa smo poleg vseh do sedaj omenjenih encimov dodali tudi  $\alpha$ -manozidazo, katera odcepi iz glikana sladkor manozo, kot je prikazano na sliki 19. Ob dodatku vseh štirih encimov oziroma petih, če štejemo še  $\alpha$ -L-fukozidazo, bi morali na koncu pridobiti strukturo M3-2M-F (priloga A), ki pa je prav tako kot M3 nimamo pomerjene. Zaradi tega ne moremo potrditi delovanje ali nedelovanje encima, vendar pa ob pogledu na rezultate lahko trdimo, da do nekaterih sprememb kljub temu pride. Ponovno se poveča delež bG0 in zmanjšata se deleža bG0(-N) in bG0(-N-F). Encim je aktiven, vendar ne moremo zagotoviti, da se poveča število struktur M3-2M-F, katere bi morale nastati.

Ne glede na slabe rezultate delovanja encimov, smo se odločili pomeriti kinetiko vezave vzorcev mAb D in referenca mAb D na receptor Fc $\gamma$ RIIIa. Pripravili smo vzorce v koncentraciji 0,2 mg/mL ter receptor v istih koncentracijah kot pri prejšnjem poskusu (1600 nM, 800 nM in 400 nM). Za meritev smo uporabili zgolj tri vzorce, in sicer z največjim razponom v vsebnosti bGx(-F). Uporabili smo vzorce R5, R7 in referenco mAb D. Naredili smo dve ponovitvi za vsak vzorec, in sicer pri vseh treh koncentracijah receptorja. Analiza smo izvedli skladno s postopkom, opisanem v poglavju 3.2.8. Rezultati analize so predstavljeni v preglednici 10 in prikazani na sliki 28.

Preglednica 10: Vpliv glikozilacijskega profila na kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa za vzorce mAb D

<b>Ponovitev</b>	<b>Ime vzorca</b>	<b>Odziv (nM)</b>	<b>K<sub>D</sub> (M)</b>	<b>k<sub>a</sub>(1/Ms)</b>	<b>k<sub>d</sub>(1/s)</b>	<b>bGx(-F) (%)</b>
1	Referenca <b>mAb D</b>	0,1176	<b>6,48E-07</b>	4,41E+05	2,85E-01	3,5
2	Referenca <b>mAb D</b>	0,1164	<b>6,96E-07</b>	4,29E+05	2,99E-01	3,5
1	<b>R7</b>	0,1059	<b>6,45E-07</b>	4,68E+05	3,02E-01	5,2
2	<b>R7</b>	0,0999	<b>5,91E-07</b>	4,83E+05	2,86E-01	5,2
1	<b>R5</b>	0,1006	<b>5,28E-07</b>	5,68E+05	3,00E-01	8,0
2	<b>R5</b>	0,1037	<b>5,20E-07</b>	5,57E+05	2,90E-01	8,0



Slika 28: Graf korelacije med  $bGx(-F)$  in  $K_D$  za različne vzorce mAb D

Vzorci, ki smo jih izbrali in jim pomerili kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ IIIa, kažejo isto korelacijo med  $bG0(-F)$  oziroma  $bGx(-F)$  in  $K_D$ , kot jo kažejo tudi vzorci mAb A. Ponovljivost je nekoliko slabša, vendar še vedno znotraj 5 %, kar kaže na dobro delovanje metode. Vzorec R5, ki ima najvišjo vsebnost  $bGx(-F)$ , ima tudi najnižji  $K_D$ , kar pomeni, da je njegova vezave najmočnejša (Ferrera in sod., 2011).

Deglikozilacija je bila le delno uspešna, saj sta prva dva para vzorcev identična referenci. Nedosežen cilj je mogoče posledica nepopolne slike glikanske mape, saj nismo razvijali posebne metode merjenja glikanske mape, ki bi bila prilagojena prav za to mAb. Uporabili smo metodo, ki je bila razvita za drugo mAb. Tako smo dobili podatke za samo določene strukture, s katerimi ne moremo natančno opredeliti delovanja naših encimov. Poskus bi morali ponoviti in razviti metodo za merjenje glikanske mape, prilagojene za mAb D ter nato na podlagi teh rezultatov preveriti uspešnost poskusa. Če bi metoda delovala, kot je potrebno, bi to bilo idealno za razvoj mAb z željenim glikanskim profilom, saj ne bi bilo potrebno posegati v protein že v zgodnji fazи s tehnologijo rekombinantne DNK.

Poskus smo poenostavili in tako uporabili metodo za drug protein. To se je izkazalo za neuspešno, vendar bi za razvoj nove metode morali vložiti ogromno časa in denarja, kar pa bi bilo v okviru magistrske naloge preveč in prezahtevno. Razmišljanje je bilo dobro, vendar na podlagi poskusa in rezultatov ne moremo metode označiti ne kot dobre ne kot slabe oziroma neuspešne.

#### 4.1.3 mAb D iz različnih zbirkov z različno vsebnostjo bG0(-F)

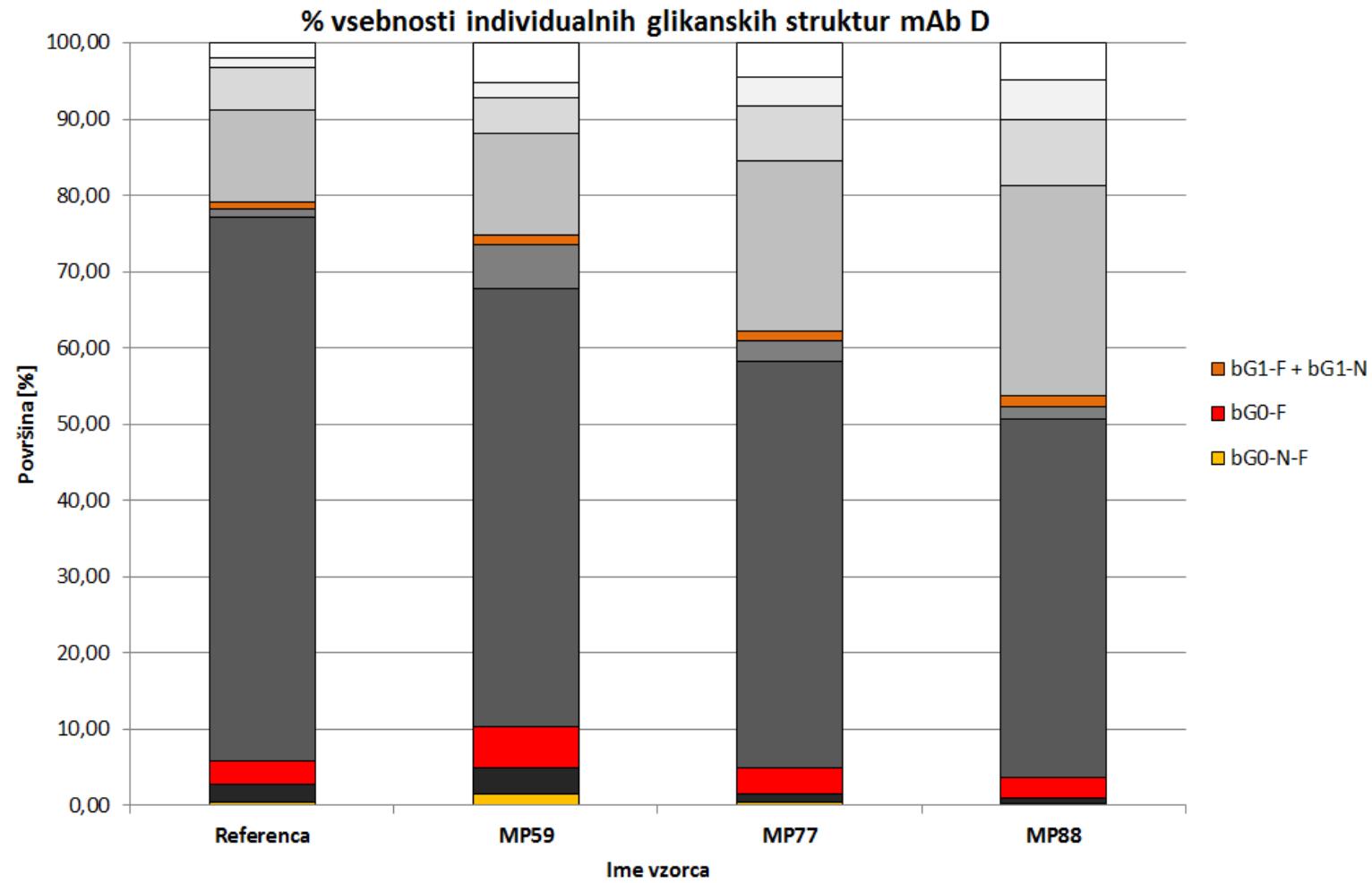
Zbirek je genski sklad oziroma genski nabor, ki kaže obsežno gensko raznovrstnost. Znotraj zbirke se nahaja ogromno število klonov. Ker smo že na klonih dokazali korelacijo med glikozilacijskim profilom in kinetiko vezave na receptor, smo se odločili, da metodo preizkusimo že korak prej. Po vstavitvi vektorja za transfekcijo in po sami transfekciji (Lai in sod., 2013) sledi selekcija zbirkov (ang. »pool selection«). Pri proizvodnji biološko podobnih zdravil želimo izbrati zbirke, ki je po lastnostih in tudi po kinetiki vezave na receptor najbolj podoben referenci. Če bi se metoda izkazala kot uspešna, bi jo lahko uporabili v nadalnjih tekočih projektih družbe Lek d.d., pri izboru zbirke in kasneje klona.

Za naš poskus to ni bistvenega pomena, saj želimo zgolj dokazati vpliv glikanskih struktur na kinetiko vezave za različne vzorce mAb D. Vzorci so bili pridobljeni iz različnih zbirkov. Iz množice teh zbirkov oziroma vzorcev mAb D smo izbrali 4 tiste, ki imajo največji razpon v glikanski strukturi bGx(-F). Glikanska mapa vsakega vzorca je bila pomerjena v eni ponovitvi in je prikazana na sliki 29. Meritve in analizo smo opravili kot je bilo to opisano že v prejšnjih poglavjih (poglavje 4.1.1 in 4.1.2). Rezultati kinetike vezave na receptor so predstavljeni v preglednici 11.

Preglednica 11: Vpliv glikozilacijskega profila na kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa za vzorce mAb D

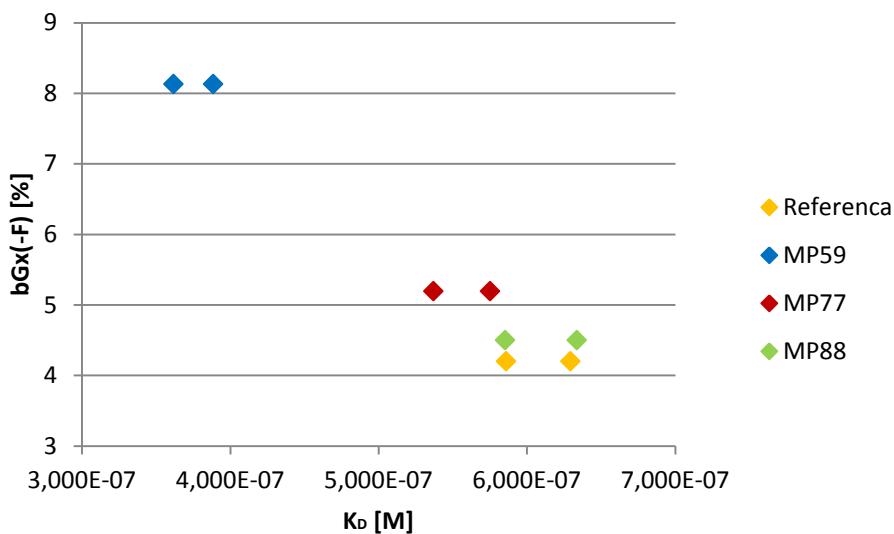
Ponovitev	Ime vzorca	Odziv (nM)	K <sub>D</sub> (M)	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>d</sub> (1/s)	bGx(-F) (%)
1	Referenca <b>mAb D</b>	0,0628	<b>6,30E-07</b>	4,48E+05	2,82E-01	4,20
2	Referenca <b>mAb D</b>	0,1172	<b>5,86E-07</b>	4,08E+05	2,39E-01	4,20
1	mAb D <b>MP59</b>	0,1140	<b>3,89E-07</b>	3,53E+05	1,37E-01	8,13
2	mAb D <b>MP59</b>	0,1689	<b>3,62E-07</b>	3,39E+05	1,23E-01	8,13
1	mAb D <b>MP77</b>	0,0907	<b>5,37E-07</b>	4,01E+05	2,15E-01	5,19
2	mAb D <b>MP77</b>	0,1446	<b>5,75E-07</b>	3,29E+05	1,89E-01	5,19
1	mAb D <b>MP88</b>	0,0787	<b>5,85E-07</b>	3,99E+05	2,33E-01	4,50
2	mAb D <b>MP88</b>	0,1438	<b>6,34E-07</b>	3,22E+05	2,04E-01	4,50

Golob A. Kinetika vezave rekombinantnih monoklonskih protiteles na receptor Fc $\gamma$ RIIIa.  
 Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2015



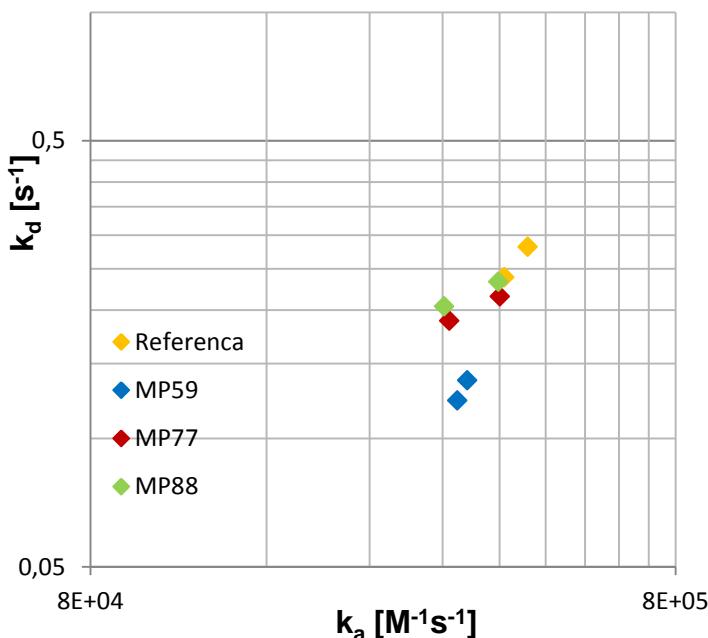
Slika 29: Glikanska mapa vzorcev mAb D pridobljenih iz različnih zbirkov ter reference mAb D

Uporabili smo isto metodo, ko pri prejšnjih dveh poskusih. Kljub majhnim razlikam v vsebnosti bGx(-F) med vzorci dobimo vidne razlike v kinetiki vezave na receptor. Vsakega od vzorcev smo pomerili dvakrat, pri treh različnih koncentracijah receptorja (1600 nM, 800 nM in 400 nM), nato smo pri analizi izbrali globalno prileganje. Tako smo dobili vrednosti, ki so zabeležene v preglednici 11. Pridobljene rezultate smo prenesli na graf, ki je prikazan na sliki 30.



Slika 30: Graf korelacije med bGx(-F) in K<sub>D</sub> za različne vzorce mAb D

Izkazalo se je, da lahko metodo uporabimo tudi pri merjenju kinetike vezave na vzorcih pridobljenih iz zbirkov in ne samo pri vzorcih klonov. Ponovljivost metode je dobra, relativne napake v K<sub>D</sub> med vzorci so manjše kot 7 %. Korelacija med vsebnostjo bGx(-F) in K<sub>D</sub> je pričakovana, vzorec z najvišjo vrednostjo bGx(-F) ima najnižji K<sub>D</sub>, torej se najmočneje veže na receptor (Ferrera in sod., 2011). Razlike se pojavijo pri disociaciji receptorja iz biosenzorja. Vzorec z najnižjim K<sub>D</sub>, ki se najmočneje veže na receptor, ima najpočasnejšo disociacijo (najnižji k<sub>d</sub>), kar prikazuje afinitetni graf na sliki 31.



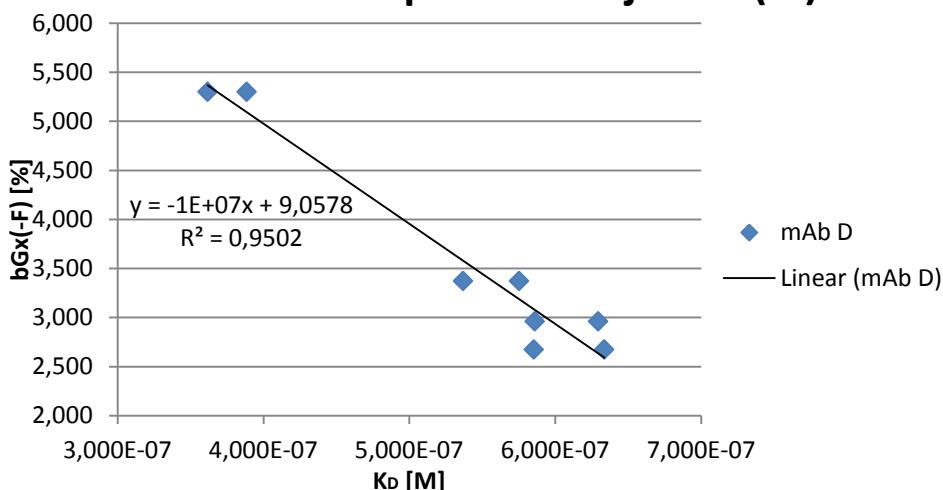
Slika 31: Afinitetni graf  $k_d$  v odvisnosti od  $k_a$  za vzorce mAb D z različno vsebnostjo bGx(-F)

Dokazali smo, da je metoda zanesljiva in da obstaja korelacija med glikozilacijskim profilom ter kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ IIIa. Vzorec, ki ima najvišjo vsebnost bGx(-F) ima tudi najmanjši  $K_D$ . To pomeni, da se vzorec z najmanjšim  $K_D$  najmočneje veže na receptor, kot so trdili že Ferrera in sod. (2011). Naši rezultati so skladni literaturnim podatkom, ki govorijo o velikem vplivu fukoze na kinetiko vezave. Manj kot je prisotne fukoze v glikanih, močnejša je vezava mAb na receptor.

#### 4.1.3.1 Model za napovedovanje bG0(-F)

S pomočjo podatkov iz glikanske mape in izmerjene vrednosti  $K_D$  iz poglavja 4.1.3, ki so predstavljeni v preglednici 11, smo sestavili model za napovedovanje vsebnosti bG0(-F) v mAb. Na ta način prihranimo čas in zmanjšamo stroške analize, saj ni potrebna izvedba meritev glikanske mape. Bolj ko ležijo točke na premici, večja je napovedna moč modela. Za izpeljavo modela moramo poznati spremenljivki  $k$  in  $n$ , ki nastopata v enačbi premice ( $y = kx + n$ ). To lahko naredimo s pomočjo izrisa grafa (slika 32) in vpeljave linearne regresijske premice, ali pa s programom excel, kjer uporabimo funkciji naklona (ang. »slope«) in začetne vrednosti (ang. »intercept«).

## Model za napovedovanje bG0(-F)



Slika 32: Graf za sestavljanje modela za napovedovanje bG0(-F) iz  $K_D$  za mAb A

Ko smo pridobili vse potrebne podatke ( $n = 9,06$ ,  $k = -10205218,63$ ), smo zapisali funkcijo modela (enačba 12). S pomočjo enačbe smo za dane štiri vzorce v dveh ponovitvah napovedali vrednosti bG0(-F) (preglednica 12) in jih primerjali z vrednostmi iz glikanske mape. Pojavijo se majhne razlike, ki jih v glavnem lahko zanemarimo, saj z modelom želimo pridobiti zgolj okvirne vrednosti. Razlike so lahko tudi napaka podatkov iz glikanske mape, napaka merjenja aparature Octet RED96 ali napaka pipetiranja in priprave vzorcev. Model drži zgolj za vzorce mAb D. S pomočjo modela lahko na osnovi vzorca (zbirka) mAb D napovemo % vsebnosti bG0(-F), ne da bi pomerili glikansko mapo.

$$bG_0(-F) \text{ napovedana} = n + (k \times KD) \quad \dots \\ (12)$$

Preglednica 12: Napovedane vrednosti bG0(-F) za vzorce mAb D

Ime vzorca	KD	bG0(-F) iz glikanske mape	bG0(-F) napovedana	Standardna deviacija (SD) [%]
Referenca mAb D	6,30E-07	2,96	<b>2,63</b>	0,23
Referenca mAb D	5,86E-07	2,96	<b>3,08</b>	0,08
<b>MP59</b>	3,89E-07	5,30	<b>5,09</b>	0,15
<b>MP59</b>	3,62E-07	5,30	<b>5,37</b>	0,05
<b>MP77</b>	5,37E-07	3,37	<b>3,58</b>	0,15
<b>MP77</b>	5,75E-07	3,37	<b>3,19</b>	0,13
<b>MP88</b>	5,85E-07	2,67	<b>3,08</b>	0,29
<b>MP88</b>	6,34E-07	2,67	<b>2,59</b>	0,06

Glede na uspešno opravljene poskuse lahko potrdimo 3. hipotezo, ki govori, da glikozilacijski profil mAb vpliva na kinetiko vezave mAb na receptor Fc $\gamma$ RIIIa. Razvili

smo metodo, s katero je mogoče zaznati že majhne razlike v glikozilacijskih profilih. S pomočjo metode oziroma podatka o kinetiki vezave lahko napovemo približni % vsebnosti glikanske strukture bG0(-F) v vsakem vzorcu posebej. Z metodo prihranimo ogromno časa in lahko pridobimo podatke že med bioprosesom, za meritve kinetike vezave namreč ne potrebujemo očiščenih vzorcev.

#### 4.2 NAPOVEDOVANJE AKTIVNOSTI ADCC IZ PARAMETROV VEZAVE ( $K_D$ ) PROTITELESA IgG NA RECEPTOR Fc $\gamma$ RIIIa

V naslednjem delu magistrske naloge smo proučevali povezavo med aktivnostjo ADCC in kinetičnim parametrom  $K_D$ . Aktivnost ADCC je efektorska funkcija, ki je izrednega pomena pri obrambi telesa, saj sodeluje pri protitelesnem imunskem odzivu. Le-ta privede do lize tarčne celice, ki je obdana z antigeni, na katera se vežejo protitelesa (slika 4). Začetek lize se začne, ko pride do vezave protiteles na receptorje, ki se nahajajo na efektorski celici. To privede do uničenja tarčne celice oziroma tujka v telesu (Jimenez in sod., 2012).

Pri izvedbi poskusa, smo uporabili vzorce mAb A, pridobljene iz različnih klonov, za katere smo imeli že podane vrednosti aktivnosti ADCC (preglednica 13). Vrednosti so bile izmerjene v okviru rednega projekta podjetja Lek d.d., ker gre za iste vzorce kot pri poskusu iz poglavja 4.1.1. Vzeli smo tudi iste podatke parametrov kinetike vezave na receptor (preglednica 14). Za poskus smo uporabili FAB biosenzorje.

Sklepali smo, da lahko aktivnost ADCC napovemo s pomočjo konstante kinetike vezave  $K_D$ . Vzorcem z neznano aktivnostjo ADCC bi pomerili kinetiko vezave na receptor in iz tega podatka napovedali aktivnost ADCC. Potrebno je bilo pripraviti vzorce istih koncentraciji (0,2 mg/mL) in jih nato imobilizirati na biosenzor. Nato smo biosenzorje pomagali v raztopine receptorja Fc $\gamma$ RIIIa v različnih koncentracijah (1600 nM, 800 nM in 400 nM) in analizirali rezultate. Predvidevali smo, da bo ob višji aktivnosti ADCC tudi vezava mAb na receptor močnejša, kar se odraža kot nižja  $K_D$ .

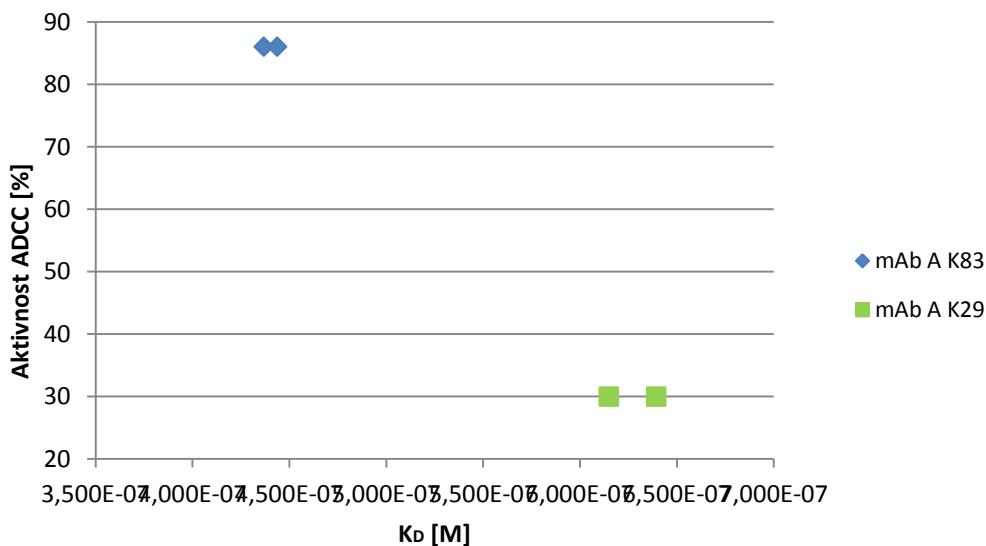
Preglednica 13: Vzorci mAb A in njim pripadajoča vrednost aktivnosti ADCC

Ime vzorca	Aktivnost ADCC [%]
<b>mAb A K29</b>	<b>30</b>
mAb A K66	73
mAb A K76	79
<b>mAb A K83</b>	<b>86</b>
mAb A K90	61
mAb A K117	56

Preglednica 14: Vpliv glikozilacijskega profila na kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa za vzorce mAb A

Ponovitev	Ime vzorca	Odziv (nM)	K <sub>D</sub> (M)	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>d</sub> (1/s)	Aktivnost ADCC (%)
1	mAb A K83	0,1040	<b>4,37E-07</b>	3,08E+05	1,35E-01	86
2	mAb A K83	0,1041	<b>4,44E-07</b>	3,15E+05	1,40E-01	86
1	mAb A K29	0,0870	<b>6,39E-07</b>	3,43E+05	2,19E-01	30
2	mAb A K29	0,0872	<b>6,15E-07</b>	3,43E+05	2,11E-01	30

Razlika v aktivnosti ADCC je med vzorcema velika, zato smo tudi pričakovali razliko v K<sub>D</sub>. Če pogledamo rezultate v preglednici 14, lahko vidimo, da so razlike res opazne. Prav tako kot vidimo korelacijo med glikozilacijskim profilom in K<sub>D</sub>, se pojavi tudi med aktivnostjo ADCC in K<sub>D</sub>. Višja kot je aktivnost ADCC, manjši je K<sub>D</sub>, torej drži trditev Niwe in sod. (2005), ki govori, da moč interakcije Ab z Fc $\gamma$ RIIIa korelira z aktivnostjo ADCC. To pomeni, da se vzorec z višjo aktivnostjo ADCC močneje veže na receptor Fc $\gamma$ RIIIa. Ponovljivost metode je zadovoljiva, saj so razlike med ponovitvami znotraj 2 %. Podatki so prikazani na grafu (slika 33). Kot pri ostalih poskusih tudi tukaj prihaja do razlik v K<sub>D</sub> zaradi disociacije, saj močneje vezan receptor počasneje disocira iz mAb. S tem smo potrdili tudi našo prvo hipotezo, ki govori, da lahko sklepamo na aktivnost ADCC, če imamo podane parametre vezave mAb na receptor Fc $\gamma$ RIIIa.

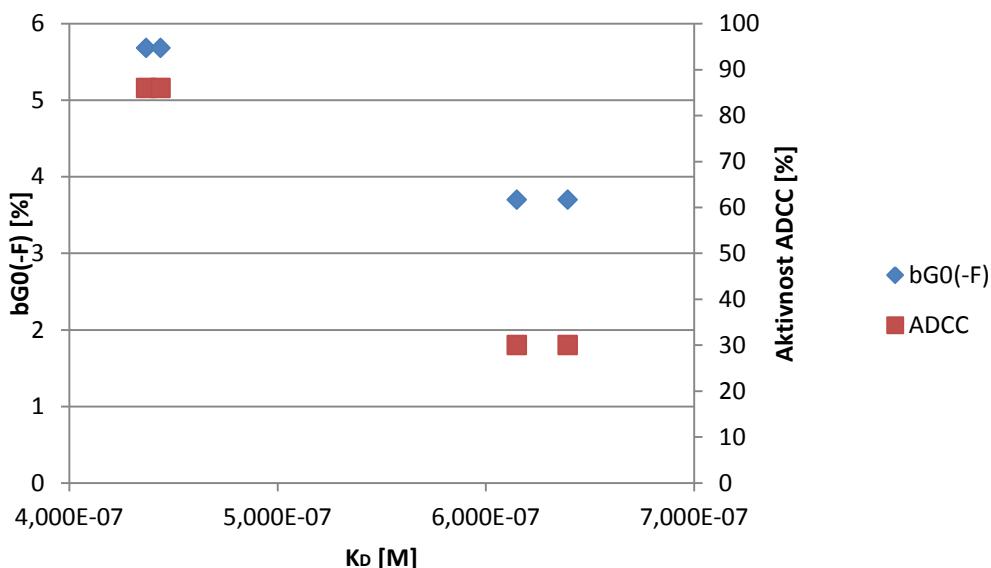
Slika 33: Graf korelacije med aktivnostjo ADCC in K<sub>D</sub> za vzorce mAb A

Že Ferrera in sod. (2011) so ugotovili, da med glikozilacijo in aktivnostjo ADCC obstaja korelacija. Torej med obema do sedaj potrjenima hipotezama, hipotezo 1 in 3, obstaja povezava (slika 34), saj lahko en parameter napovemo z drugim. Če imamo podatke o vsebnosti glikanske strukture bG0(-F) in pomerimo kinetiko vezave teh vzorcev, lahko s pomočjo K<sub>D</sub> napovemo, kakšno aktivnost ADCC bodo imeli ti vzorci (ali obratno). Seveda

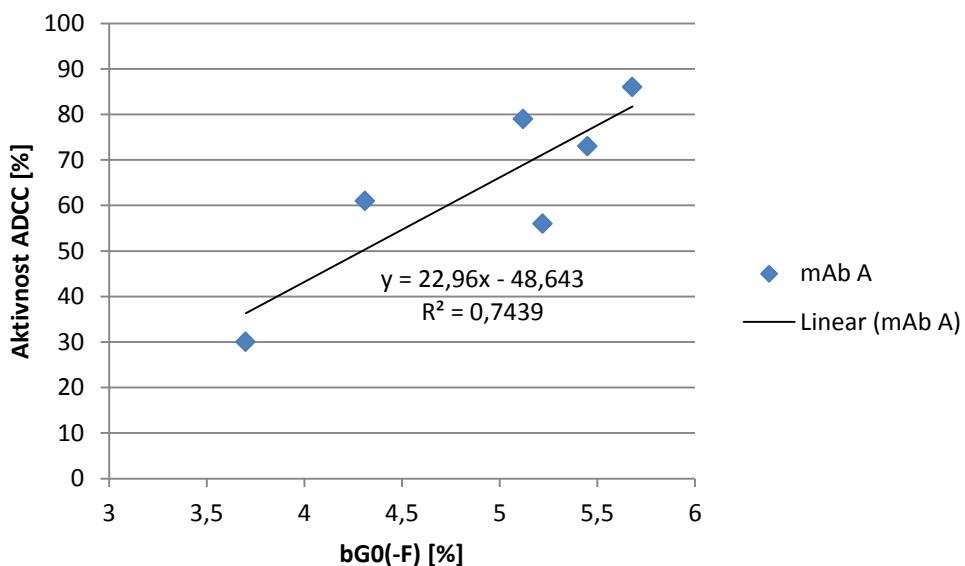
pa lahko oboje napovemo s pomočjo konstante kinetike vezave  $K_D$ . Za oceno korelacije smo uporabili podatke vseh šestih vzorcev mAb A, ki so predstavljeni v preglednici 15. Korelacija med obema je visoka (slika 35),  $R^2=0,74$ , kar pomeni, da je dejanska vrednost koren te vrednosti in znaša 0,86. Sklepamo lahko, da je moč napovedati vrednosti bG0(-F) iz aktivnosti ADCC ali obratno.

Preglednica 15: Podatki bG0(-F) in aktivnosti ADCC za vzorce mAb A

Ime vzorca	bG0(-F) [%]	Aktivnost ADCC [%]
mAb A K29	3,7	30
mAb A K66	5,45	73
mAb A K76	5,12	79
mAb A K83	5,68	86
mAb A K90	4,31	61
mAb A K117	5,22	56



Slika 34: Povezava med korelacijama bG0(-F) in  $K_D$  ter aktivnostjo ADCC in  $K_D$  za vzorce mAb A



Slika 35: Graf za sestavljanje modela za napovedovanje bG0(-F) ali aktivnosti ADCC za vzorce mAb A

#### 4.3 VPLIV VEZAVE ANTIGENA NA REKOMOBINANTNO MONOKLONSKO PROTITELO

V zadnjem sklopu naloge smo se osredotočili na 2. hipotezo, ki govori o vplivu vezave Ag na vezavo rekombinantnega mAb na receptor Fc. Imunski odziv sprožijo telesu tuje molekule, imenovane Ag, ki jih na svoji površini izražajo patogeni organizmi. Ab prepozna in se vežejo na Ag s Fab delom, medtem ko se s Fc delom vežejo na receptorje Fc, ki pa so izraženi na površini efektorskih celic, ki Ag (ozioroma kompleks Ag-Ab) odstranijo. Ob vstopu tujka v telo je pomembno, da pride do kar se da hitrega imunskega odziva in odstranitve Ag. Želeli smo preveriti, ali predhodna vezava Ag na mAb vpliva na kinetiko vezave mAb na receptor Fc $\gamma$ RIIIa.

Vsako rekombinantno mAb se specifično veže le na določen Ag ozioroma antigen determinanto (epitop). Izbrali smo eno mAb, ki se specifično veže na Ag1 in dve mAb, ki sta specifični za Ag2 (preglednica 16).

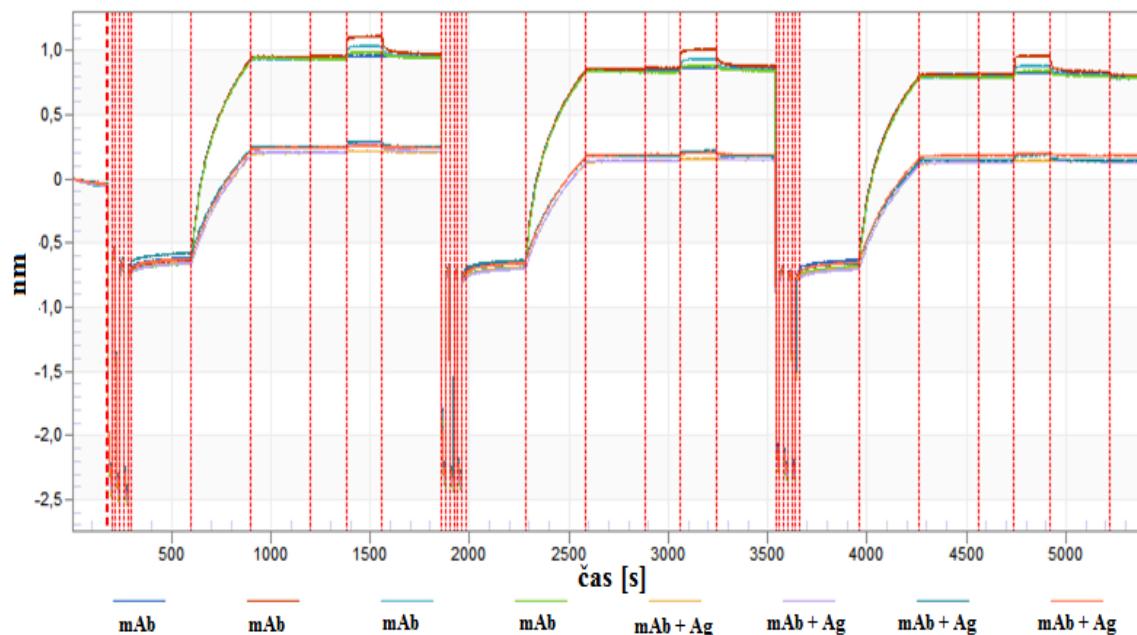
Preglednica 16: Uporabljeni rekombinantni mAb in za njih specifični antigeni

Rekombinantno monoklonsko protitel	Antigen
mAb B	Ag2
mAb C	Ag2
mAb A	Ag1

Da bi raziskali vpliv Ag pri kinetiki vezave mAb na receptor Fc $\gamma$ RIIIa, smo pripravili vzorce mAb in vzorce mAb, ki smo jim predhodno vezali za njih specifični Ag. Da smo zapolnili vsa za Ag vezavna mesta, smo le-tega dodali v 3x prebitku.

#### 4.3.1 Vezava na antigen Ag2

Uporabili smo dve različni mAb (mAb B in mAb C), ki se specifično vežeta na Ag2. Obema mAb (B in C) smo spektrofotometrično pomerili absorbanco in na podlagi absorbance in ekstinkcijskega koeficiente izračunali koncentracijo proteina (enačba 5). To nam je omogočilo pripravo vzorcev z enakimi koncentracijami (0,02 mg/mL). Za vsako mAb smo pripravili vzorce v parih, kjer smo na enega v paru vezali Ag, na drugega pa ne. Kot pri prejšnjih poskusih smo tudi tukaj uporabili FAB biosenzorje, kar pomeni, da je kot ligand služilo mAb oziroma kompleks Ag-mAb, ki smo ga immobilizirali na biosenzor. Po uspešni immobilizaciji je sledila vezava na receptor v treh koncentracijah (900 nM, 300 nM in 100 nM) preko Fc dela in nato še disociacija. Kljub temu, da smo pripravili vzorce z istimi koncentracijami, smo pri immobilizaciji vzorcev s predhodno dodanim Ag naleteli na težavo. V istem časovnem intervalu se je namreč na biosenzor immobiliziralo 3x manj proteina (mAb), kar je razvidno iz slike 36. Sklepali smo, da je predhodna vezava Ag na mAb zmanjšala sposobnost vezave mAb preko variabilnega dela na biosenzor. Mislimo, da se pri vezavi mAb na Ag nekoliko spremeni konformacija Fab dela, kar se kaže v spremenjeni hitrosti immobilizacije mAb na biosenzor.



Slika 36: Neuspešna immobilizacija vzorca s predhodno dodanim Ag na FAB biosenzor

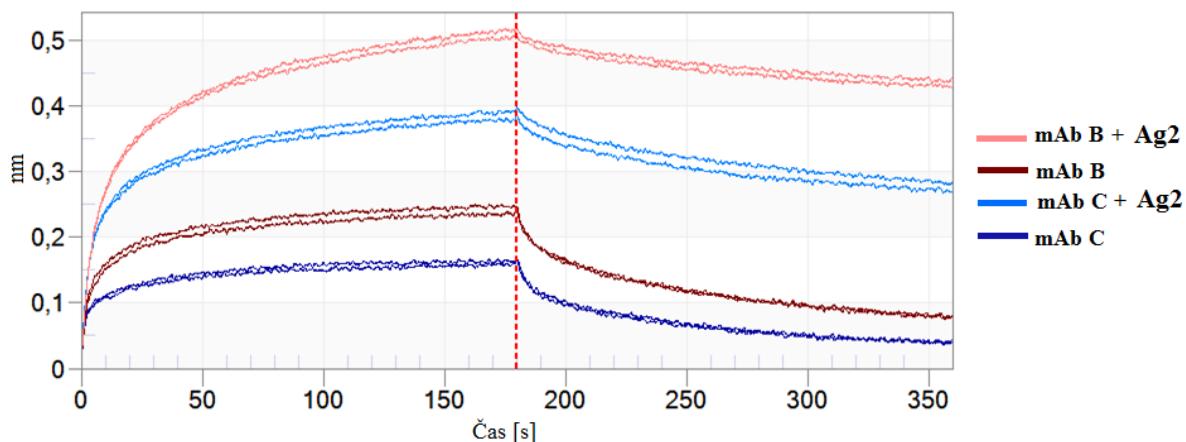
Poskus smo ponovili na SA biosenzorjih. Predhodno smo si pripravili biotiniliran receptor, ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca, kot je opisano v poglavju 3.2.4. Na SA

biosenzor smo najprej imobilizirali biotiniliran receptor Fc $\gamma$ RIIIa v koncentraciji 500 nM. Nato smo na receptor vezali mAb (900 nM) preko dela Fc. Na SA biosenzorjih je bila imobilizacija pri obeh vzorcih uspešna, saj smo na biosenzor vezali receptor, ki pa je pri vseh vzorcih enak in v enaki koncentraciji. Sledila je vezava vzorcev, kjer nas je zanimalo, ali bo zaradi dodatka Ag prišlo do razlik pri kinetiki vezave. Vezava Ag na mAb namreč spremeni konformacijo molekule mAb, ki vpliva na vezavo kompleksa na receptor Fc $\gamma$ RIIIa. Ta sprememba bi se morala odražati v  $k_a$  in  $k_d$ , posledično tudi v  $K_D$ , ki je razmerje med  $k_d$  in  $k_a$  (enačba 1). Po zaključeni reakciji, smo surove podatke odprli v programu Octet Data Acquisition in rezultate obdelali z 1:1 modelno analizo. Rezultati so predstavljeni v preglednici 17.

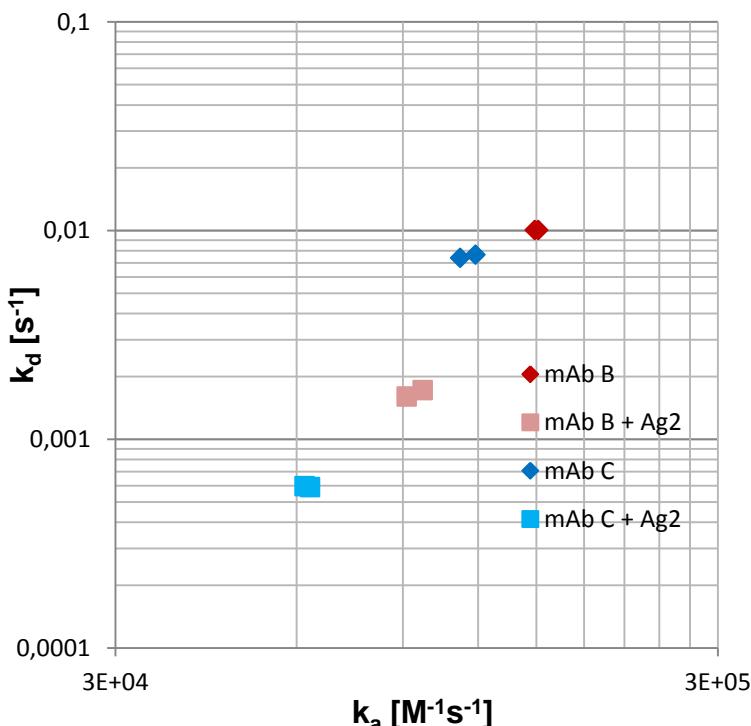
Preglednica 17: Vpliv vezave Ag na mAb na kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ III za vzorce mAb B in mAb C

Ime vzorca	Ponovitev	Odziv (nM)	$K_D$ (M)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)
<b>mAb B</b>	1	0,1631	<b>6,74E-08</b>	1,49E+05	1,01E-02
<b>mAb B</b>	2	0,1586	<b>6,65E-08</b>	1,51E+05	1,01E-02
<b>mAb B+Ag2</b>	1	0,3896	<b>1,75E-08</b>	9,14E+04	1,60E-03
<b>mAb B+Ag2</b>	2	0,3781	<b>1,77E-08</b>	9,72E+04	1,72E-03
<b>mAb C</b>	1	0,2469	<b>6,45E-08</b>	1,19E+05	7,67E-03
<b>mAb C</b>	2	0,2345	<b>6,60E-08</b>	1,12E+05	7,40E-03
<b>mAb C+Ag2</b>	1	0,5137	<b>9,65E-09</b>	6,19E+04	5,97E-04
<b>mAb C+Ag2</b>	2	0,5020	<b>9,34E-09</b>	6,31E+04	5,90E-04

Med poskusom smo spremljali razliko med različnimi mAb in razliko med mAb z in brez dodatka Ag. Spremljali smo razlike pri isti koncentraciji v dveh ponovitvah. Rezultati iz preglednice 17, kažejo na razlike med mAb B in mAb C, še večja razlika pa se je pojavila med posameznim mAb, v odvisnosti od dodatka Ag. Glede na podatke v preglednici 17 lahko zaključimo, da smo sklepali pravilno. Ob dodatku Ag se je povečal odziv. Prav tako pa se je spremenila kinetika vezave na receptor, kar se kaže v spremenjeni obliki krivulje (slika 37). Pri vzorcih z dodanim Ag je disociacija bistveno počasnejša kot pri vzorcih brez Ag. Pri vzorcih brez dodatka Ag disociacija pada na izhodiščno vrednost, medtem kot pri vzorcih z dodatkom Ag ne. To pomeni, da se kompleks Ab-Ag močneje veže preko Fc dela na receptor kot samo mAb. Na sliki 38 lahko iz afinitetnega grafa lepo vidimo razlike v disociaciji med vzorci mAb z in brez dodanega Ag. Poleg kinetike vezave nas je zanimala tudi ponovljivost metode. Metoda se je izkazala za izredno ponovljivo, saj so si ponovitve med seboj zelo podobne. Odstopanja so majhna (manjša kot 2 %), zato lahko metodo označimo kot dobro ponovljivo.



Slika 37: Krivulji asocijacije in disocijacije za vzorce mAb B in mAb C z in brez dodatka antigena

Slika 38: Afinitetni graf  $k_d$  v odvisnosti od  $k_a$  za mAb proti Ag2

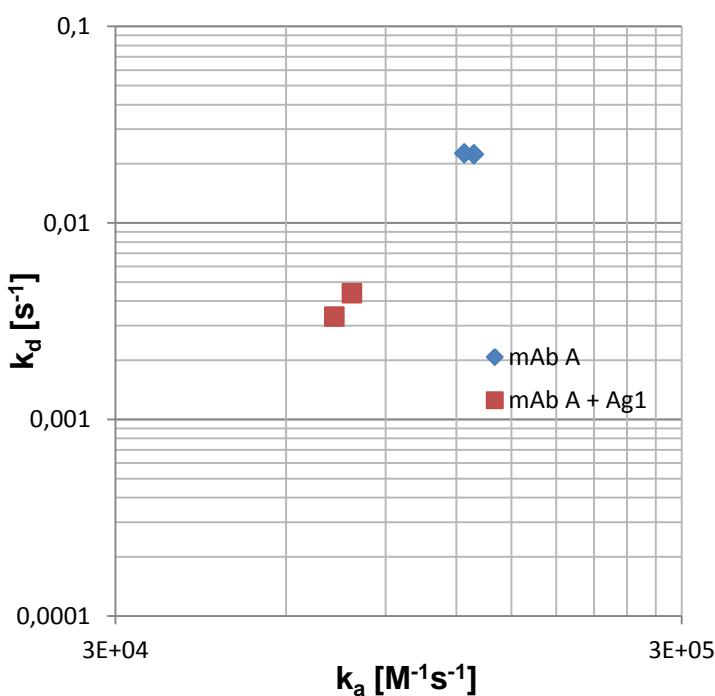
#### 4.3.2 Vezava na antigen Ag1

Drugi del poskusa za potrditev 2. hipoteze smo izvedli z mAb, ki se specifično veže na Ag1. Reakcijo smo izvedli na podoben način kot z mAb, specifičnima za Ag2. Vzorce mAb smo pripravili v treh različnih koncentracijah, in sicer 900 nM, 300 nM in 100 nM in na njih v enem primeru vezali Ag, v drugem primeru pa ne. Pri poskusu brez dodanega Ag smo uporabili receptor v koncentraciji 500 nM, pri poskusu z dodanim Ag pa 250 nM. Zaradi težav z FAB biosenzorji pri prejšnjem poskusu, smo tudi tukaj uporabili SA biosenzorje in biotiniliran receptor. Rezultati v preglednici 18 kažejo podobno kot podatki iz prejšnjega poskusa z drugim Ag.

Preglednica 18: Vpliv vezave Ag na mAb na kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa za vzorce mAb A

Ime vzorca	Ponovitev	Odziv (nM)	K <sub>D</sub> (M)	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>d</sub> (1/s)
mAb A	1	0,2086	<b>1,73E-07</b>	1,29E+05	2,23E-02
mAb A	2	0,1952	<b>1,81E-07</b>	1,24E+05	2,25E-02
<b>mAb A + Ag1</b>	1	0,2064	<b>4,56E-08</b>	7,31E+04	3,33E-03
<b>mAb A + Ag1</b>	2	0,1629	<b>5,59E-08</b>	7,85E+04	4,38E-03

Kinetika vezave na receptor pri vzorcih z dodatkom Ag se je spremenila v primerjavi z vzorci brez dodanega Ag. Pri vzorcih z dodatkom Ag je prišlo do povišane afinitete za receptor Fc $\gamma$ RIIIa, kar se kaže kot nižji K<sub>D</sub>. Nižji K<sub>D</sub> pa je posledica počasnejše disociacije, kar je razvidno iz slike 39. O povisanem odzivu tukaj ne moremo govoriti, saj smo uporabili različne koncentracije receptorja. Sklepamo pa lahko, da je prišlo do povisanega odziva pri vzorcih z dodanim Ag, saj je prišlo pri pol manjši koncentraciji receptorja do enakega odziva, kot pri vzorcih brez dodatka Ag. Ponovljivost metode je slabša kot pri vzorcih mAb B in mAb C, vendar so relativne napake med vzorci še vedno okoli 10 %. Kljub večji relativni napaki bi metodo še vedno lahko označili kot dobro ponovljivo. Najbolje bi bilo poskus ponoviti in uporabiti enake koncentracije receptorja ter tako še enkrat preverit ponovljivost metode. Ob morebitnem neuspehu bi bilo potrebno metodo ponovno optimizirati.

Slika 39: Afinitetni graf k<sub>d</sub> v odvisnosti od k<sub>a</sub> za mAb proti Ag1

S poskusi smo dokazali, da je vezava kompleksa mAb-Ag na receptor močnejša od vezave samega mAb. Zaradi povišane afinitete mAb v kompleksu mAb-Ag do receptorja je disociacija počasnejša in zato tukaj nastajajo razlike med vzorci z in brez dodatka Ag. S temi rezultati smo potrdili hipotezo 2, ki govori, da predhodna vezava antigena na protitelo spremeni kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa.

## 5 SKLEPI

V raziskovalni nalogi smo razvijali novo metodo za merjenje kinetike vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa, s katero bi prihranili veliko časa in denarja.

Testirali smo vpliv glikozilacijskega profila mAb na kinetiko vezave na receptor in ugotovili, da ima glikozilacija v Fc delu mAb velik vpliv na kinetiko vezave. Gre za glikanske strukture, ki so pritrjene na Asn<sup>297</sup>, ki se nahaja v CH2 regiji mAb. Prepričali smo se tudi, da je fukoza tisti sladkorni ostanek, ki ima največji vpliv od vseh sladkorjev. Povečana vsebnost strukture bG0(-F) oziroma bGx(-F) izboljša afiniteto mAb do receptorja. Kljub delno uspešenem poskusom deglikozilacije z encimi menimo, da bi bila to dobra metoda za odstranitev fukoze, saj ne bi bilo potrebno posegat v genom oziroma uporabiti tehnologije rekombinantne DNK.

Razlog za počasnejšo disociacijo oziroma višjo afiniteto mAb s povisano vsebnostjo nefukoziliranih struktur ne tiči samo v strukturi mAb, temveč tudi v strukturi receptorja. Receptor ima na mestu 162 (Asn<sup>162</sup>) prisoten gikan, kateri se ob vezavi na mAb zasidra ravno na mestu Asn<sup>297</sup>. Če je na tem mestu prisotna fukoza, se gikan iz receptorja ne more tako močno zasidrati, kar pomeni, da je vezava z mAb šibkejša. Kompleks ob spiranju prej razpade in tako se mAb hitreje spere iz receptorja. Če na gikanu na Asn<sup>297</sup> ni prisotne fukoze, se gikan iz receptorja lahko močneje zasidra, saj mu je omogočena boljša rotacija in lažje prileganje za močnejšo vezavo. To se nato kaže v počasnejši disociaciji.

Poleg glikozilacije smo spremljali tudi vpliv kinetike vezave na aktivnosti ADCC oziroma njuno medsebojno odvisnost. Žal sami nismo imeli možnosti merjenja aktivnosti ADCC, zato smo uporabili podatke iz starih projektov družbe Lek d.d.. Ugotovili smo, da je aktivnost ADCC odvisna od kinetike, saj smo dobili lepo korelacijo med aktivnostjo ADCC in K<sub>D</sub>. Glede na rezultate lahko zanesljivo trdimo, da je aktivnost ADCC odvisna od kinetike vezave mAb na Fc $\gamma$ RIIIa in zato lahko iz kinetike vezave med delom Fc mAb in receptorjem sklepamo na aktivnost ADCC.

Spoznali smo tudi povezavo med glikozilacijskim profilom in aktivnostjo ADCC. Gikan vpliva na strukturo dela Fc, kar vpliva na kinetiko vezave mAb na receptor Fc $\gamma$ RIIIa. Ta vezava pa vpliva na aktivnost ADCC. Iz aktivnosti ADCC lahko tako posredno ocenimo kinetiko vezave v odvisnosti od glikanskih struktur, natančneje bG0(-F). Poskus bi bilo zanimivo ponoviti še na drugi vrsti mAb, ki ima tudi aktivnost ADCC, vendar zaradi omejenih možnosti tega nismo izvedli. S to metodo bi torej prihranili čas, saj vzorcev ne bi bilo potrebno pošiljati v tujino in niti ne bi bilo potrebno meriti glikanske mape. Prihranili bi tudi denar, saj je analiza aktivnosti ADCC precej draga.

Potrdili smo tudi hipotezo 2. Vezava Ag na mAb spremeni kinetiko vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa. Kompleks Ag-Ab se veže na receptor z bistveno višjo afiniteto kot samo mAb.

Predvidevamo, da vezava Ag na mAb spremeni konformacijo dela Fc, kar vpliva na vezavo na receptor. To pomeni, da se ob vstopu tujka v telo, ki sproži nastanek Ab, prosta Ab ne bodo vezala na receptor oziroma se bodo vezala z nižjo afiniteto kot kompleks Ag-Ab. Zato samo kompleks Ag-Ab vodi v efektorsko funkcijo. Vezava prostih Ab na receptorje bi lahko pripeljala do neželenih učinkov in reakcij.

## 6 POVZETEK

Če v gostiteljsko celico vstavimo zapis za protein, ki je pod kontrolo promotorja, ki se v tej celici lahko prepisuje, se bo v gostiteljski celici izrazil rekombinantni protein. Tako danes pridobivamo kar več kot polovico vseh rekombinantnih mAb v sesalskih celicah. Najpogosteje uporabljen sesalski sistem so celice CHO, katere lahko spremenimo s pomočjo tehnologije rekombinantne DNK, npr. z vstavitvijo gena za selektivno proizvodnjo visokega nivoja rekombinantnih mAb. Kljub razvoju številnih orodij za manipulacijo DNA, ki omogočajo izboljšavo industrijskih celičnih linij in dobri poznanosti metabolizma celic, so še rezerve, ki bi pripomogle k optimizaciji proizvodnje rekombinantnih mAb.

Rekombinantna mAb so topne glikoproteinske molekule imunoglobulini. Ab razvrščamo v več razredov, med katerimi so najbolj zastopana protitelesa IgG. Znotraj IgG poznamo pri ljudeh še štiri podrazrede, ki se razlikujejo v disulfidnih vezeh. Vsi izotopi pa imajo N-vezane glikane, ki so prisotni v delu Fc in imajo velik vpliv na efektorske funkcije (aktivnost ADCC) in glikozilacijo. Največji vpliv se pojavlja pri IgG1, ostali trije izotopi imajo manj efektorskih funkcij. Kinetika vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa je odvisna od glikozilacije oziroma od prisotnosti N-vezanih glikanov. Le-ti so zelo heterogeni in se razlikujejo med ekspresijskimi sistemmi. Na heterogenost imajo velik vpliv pogoji v proizvodnjih sistemih. Glikozilacija je vrstno specifična in se razlikuje med celičnimi linijami ter od serije do serije. Te spremembe lahko vplivajo na biološko aktivnost terapevtskih mAb, kar lahko privede do sprememb v jakosti učinkovin. Ker je torej treba glikozilacijo nadzorovati, poteka intenziven razvoj ustreznih analitskih orodij. Dokazali smo, da glikozilacija oziroma prisotnost različnih N-vezanih glikanov vpliva na kinetiko vezave mAb na receptor Fc $\gamma$ RIIIa. Bistvenega pomena je prisotnost ali odsotnost sladkornega ostanka fukoze. Rekombinantna mAb, ki niso fukozilirana, kažejo veliko večjo afiniteto do receptorja Fc $\gamma$ RIIIa, kar vodi do izboljšanja od receptorja posredovane efektorske funkcije in izboljšane biološke aktivnosti. Aktivnost ADCC je odvisna od kinetike vezave na receptor, in sicer višja je afiniteta mAb do receptorja, večja je aktivnost ADCC. Potrdimo lahko tudi korelacijo med glikozilacijskim profilom in aktivnostjo ADCC.

Na afiniteto vezave oziroma kinetiku vezave na receptor Fc $\gamma$ RIIIa vpliva tudi prisotnost Ag. Ob vezavi kompleksa Ag-mAb na receptor pride do bistveno povišane afinitete kot če na receptor vežemo zgolj mAb. Ob vezavi Ag, pride do spremenjene konformacije mAb, katera vpliva na vezavo na receptor.

Za merjenje kinetike vezave raznih vzorcev smo uporabili metodo interferometrije z biološkimi plastmi (BLI), katero lahko označimo kot primerno. Optimizirana metoda omogoča dokazovanje razlik v kinetiki vezave med vzorci, ki se razlikujejo v

glikozilacijskem profilu in imajo zato različno aktivnost ADCC. Ne samo to, s pomočjo metode oziroma podatkov konstante kinetike vezave  $K_D$  lahko napovemo, kakšen glikozilacijski profil ima mAb oziroma kakšna je njegova aktivnost ADCC.

Metodo je možno uporabiti še za druga aplikativna področja, ki pa so preobširna za vključitev v to magistrsko nalogu. Ena izmed najbolj perspektivnih je spremeljanje efektorskih funkcij med samim bioprocесом in sprotno spreminjanje glikanskega profila. Prednost metode je, da ne potrebujemo očiščenih vzorcev in lahko analizo izvedemo na vzorcu žetve. Zaključimo lahko, da je metoda dobro optimizirana in primerna za širšo uporabo.

## 7 VIRI

Absolute antibody. Antibody structure. 2015.

<http://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/antibody-structure/>  
(avgust 2015)

A Thermo Fisher Scientific Brand, LifeTechnologies. Protein glycosylation. 2015.

<https://www.lifetechnologies.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/protein-glycosylation.html#/legacy=www.piercenet.com> (junij 2015)

Allhorn M., Olin A.I., Nimmerjahn F., Collin M. 2008. Human IgG/FccR interactions are modulated by streptococcal IgG glycan hydrolysis. PLoS ONE 3(1): e1413, doi:10.1371: 12 str.

Camire J. 2000. Chinese hamster ovary cells for the production of recombinant glycoproteins. Art to Science, 19: 150-151

Dayne D. 2012. BioLayer interferometry (BLI) - How does it work? ForteBio Interactions, 5, 1  
[http://www.fortebio.com/interactions/Spring\\_2012/page5.html](http://www.fortebio.com/interactions/Spring_2012/page5.html) (julij 2015)

Easton R. 2011. Glycosylation of proteins – structure, function and analysis. Life Science Technical Bulletin, 48: 1-5  
<http://www.sgs.com/~/media/Global/Documents/Technical%20Documents/SGS-Lab-Glycosylation-of-Proteins-EN-11.pdf> (julij 2015)

Ferrara C., Grau S., Jäger C., Sondermann P., Brünker P., Waldhauer I., Hennig M., Ruf A., Rufer A.C., Stihle M., Umana P., Benz J. 2011. Unique carbohydrate–carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fc $\gamma$ RIII and antibodies lacking core fucose. PNAS, 108: 12669-12674

Ferrara C., Stuart F., Sondermann P., Brünker P., Umana P. 2005. The Carbohydrate at FcRIIIa Asn-162, An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. Journal of Biological Chemistry, 281: 5032-5036

Fuller S., Haxo T., Hyche J., Kimzey M., Lockhart S., Szabo Z.S., Truong J., Wegstein J., Woolworth V. 2015. High-throughput Screening for a Biosimilar N-Glycan Profile. Prozyme Advancing Glycosciences  
[http://www.prozyme.com/GlykoPrep/High-Throughput\\_Screening\\_for\\_Biosimilar\\_N-Glycan\\_Profile.pdf](http://www.prozyme.com/GlykoPrep/High-Throughput_Screening_for_Biosimilar_N-Glycan_Profile.pdf) (avgust 2015)

Gates R., Rathbone E., Masterson L., Wright I., Electricwala A. 2004. Glycoprotein analysis: manual. 1<sup>st</sup> ed. St. Louis, Sigma Aldrich: 88 str.

Hayes J.M., Frostell A., Cosgrave E.F.J., Struwe W.B., Potter O., Davey G.P., Karlsson R., Anneren C., Rudd P.M. 2014. Fc Gamma receptor glycosylation modulates the binding of IgG glycoforms: A requirement for stable antibody interactions. *Journal of Proteome Research*, 13: 5471-5485

Hudis C.A. 2007. Trastuzumab – mechanism of action and use in clinical practice. *The New England Journal od Medicine*, 357: 39-51

Jayapal K.P., Wlaschin K.F., Hu W.S. 2007. Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*, 103: 40-47

Jimenez del Val I., Jedrzejewski M. P., Exley K., Sou S.N., Kyriakopoulos S., Polizzi K. M. and Kontoravdi C. 2012. Application of quality by design paradigm to the manufacture of protein therapeutics. V: Biochemistry, genetics and molecular biology. Petrescu S. (ed.). Rijeka, Intech: 353-396

Kim J.Y., Kim Y., Lee G.M. 2011. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93: 917-930

Lai T., Yang Y., Ng S.K. 2013. Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals*, 6: 579-603

Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. 2000. Molecular Cell Biology. 4<sup>th</sup> ed. New York, W.H. Freeman: 973 str.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21744/> (junij 2014)

Masuda K., Kubota T., Kaneko E., Iida S., Wakitani M., Natsume Y.K., Kubota A., Shitara K., Nakamura K. 2007. Enhanced binding affinity for FcRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Molecular Immunology*, 44: 3122-3131

Mizushima T., Yagi H., Takemoto E., Koyama M.S., Isoda Y., Iida S., Masuda K., Satoh M., Kato K. 2011. Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes to Cells*, 16: 1071-1080

Niwa R., Natsume A., Uehara A., Wakitani M., Iida S., Uchida K., Satoh M., Shitata K. 2005. IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn<sup>297</sup>-linked oligosaccharides. *Journal of Immunological Methods*, 306: 151-160

Octet System Data acquisition user guide, release 7.1. 2011. ForteBio A Division od Pall Life Sciences: 16 str.  
<http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2014/01/Data-Acquisition-Octet.pdf> (julij 2015)

Okazaki A., Hosaka E.S., Nakamura K., Wakitani M., Uchida K., Kakita S., Tsumoto K., Kumagai I., Shitata K. 2004. Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and FcgRIIIa. *Journal of Molecular Biology*, 336: 1239-1249

Radaev S., Sun P. 2001. Recognition of immunoglobulins by Fc $\gamma$  receptors. *Molecular Immunology*, 38: 1073-1083

Raju T.S. 2003. Glycosylation Variations with Expression Systems and Their Impact on Biological Activity of Therapeutic Immunoglobulins. *BioProcess International*, 4: 44-53

Shields R.L., Ali J., Keck R., O'Connell L.Y., Hong K., Meng Y.G., Weikert S.H.A., Presta L.G. 2002. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide Improves binding to human FcRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 26733-26740

Sibérial S., Duteratré C.A., Boix C., Bonnin E., Ménez R., Stura E., Jorieux S., Fridman W.H., Teillaud J.L. 2006. Molecular aspects of human FcR interactions with IgG: Functional and therapeutic consequences. *Immunology Letters*, 106: 111-118

Sigma-Aldrich. 2015. Endo and Exoglycosidases for antibody glycan analysis.  
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=111439202> (julij 2015)

Spiro R.G. 2002. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12: 43R-56R

Štrukelj B., Kos J. 2007. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. 1 izd. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 673 str.

Tjio J.H., Puck T.T. 1958. Genetics of somatic mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*, 108, 2: 259-268

Tobias R., Kumaraswamy S. 2013. Biomolecular binding kinetics assays on the octet platform; Application Note 14. ForteBio A Division od Pall Life Sciences.

Tobias R., Yao D., Kumaraswamy S. 2014. Analysis of Fc-gamma receptor-IgG interactions on the octet platform; Application Note 17. ForteBio A Division od Pall Life Sciences.

UniProt. 2015. Glycosylation.

<http://www.uniprot.org/help/carbohyd> (junij 2015)

Wuhrer M., Stam J.C., van de Geijn F.E., Koeleman C.A., Verrips C.T., Dolhain R.J., Hokke C.H., Deelder A.M. 2007. Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum. *Proteomics*, 7, 22: 4070-4081

Wurm F.M. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22, 11: 1393-1398

Wurm F.M., Hacker D. 2011. First CHO genome. *Nature Biotechnology*, 29, 8: 718-720

## ZAHVALA

Zahvaljujem se podjetju Lek d.d., ki mi je omogočilo izvedbo magistrske naloge, s čimer sem pridobila ogromno novega znanja in izkušenje. V pomoč mi je bil oddelek Proteinska biofizika in bioinformatika, še posebej pa se zahvaljujem somentorju in ob enem sodelavcu dr. Jaki Marušiču za vso strokovno pomoč, komentarje in spodbujanje pri raziskovanju. Poudarit moram tudi podporo iz strani vodje oddelka dr. Draga Kuzmana in ostalih sodelavcev.

Za pomoč pri izvedbi magistrske naloge se zahvaljujem tudi mentorici prof. dr. Mojci Narat, ki mi je nudila znanje in koristne napotke ter nasvete. Prav tako zahvala tudi recenzentki prof. dr. Vladki Čurin Šerbec za hiter in učinkovit pregled magistrske naloge.

Posebna zahvala gre družini, ki mi je tekom celotnega študija stala ob strani, me podpirala in tudi financirala na vseh področjih, zaradi česar sem hitro in uspešno zaključila študij Biotehnologije. Hvala za vaše razumevanja in zaupanje.

## PRILOGA A

### Nomenklatura N-vezanih oligosaharidov

Simboli za monosaharide:

F: Fukoza



G: Galaktoza



M: Manoza



N: N-acetil glukozamin



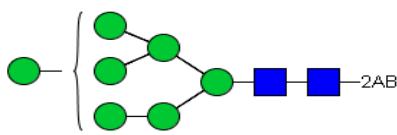
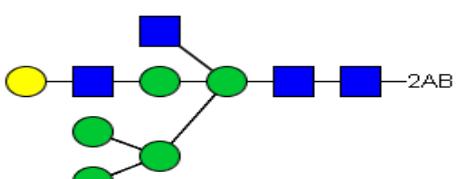
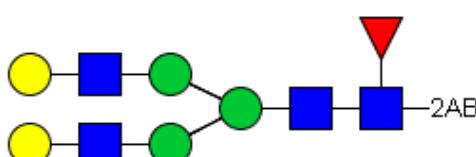
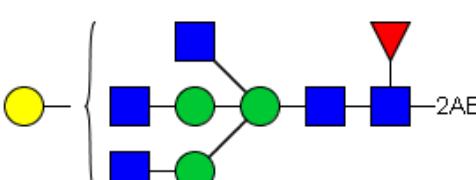
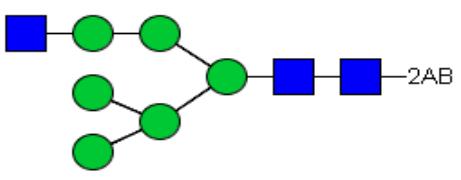
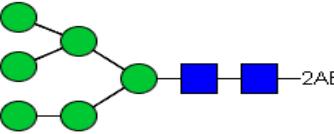
SA: N-acetil nevraminska kislina



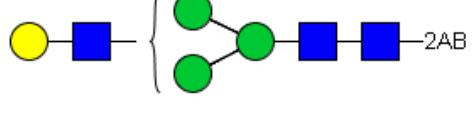
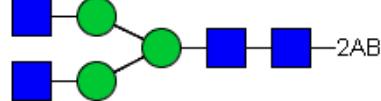
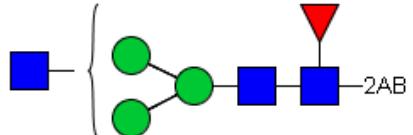
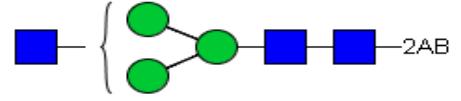
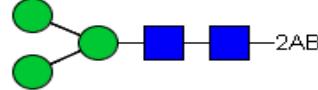
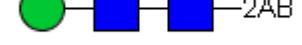
SG: N-glikozil nevraminska kislina



Oznaka	Struktura	Ime
M <sub>3</sub>		trimannosyl core, $\alpha(1,6)$ core-fucosylated
M8_1		Oligomannose 8
M8_2		Oligomannose 8
1,6 or 1,3 bG2S <sub>A</sub>		1,6 or 1,3 mono-N-acetylneuraminic acidylated, di- $\beta(1,4)$ galactosylated, biantennary, $\alpha(1,6)$ core-fucosylated

M7		Oligomannose 7
1,6 or 1,3 hG1M5(+F)		1,6 or 1,3 tri-mannosylated, mono- $\beta$ (1,2) galactosylated, mono- $\beta$ (1,2)N- 1,4acetylglucosaminylated, $\beta$ (1,4)bisecting, hybrid-type
bG2		asialo-, di- $\beta$ (1,4) galactosylated biantennary, $\alpha$ (1,6) core-fucosylated
1,6 or 1,3 bNG1		asialo-, 1,6 or 1,3 mono- $\beta$ (1,4) galactosylated, $\beta$ (1,4) bisecting, biantennary, $\alpha$ (1,6) core-fucosylated
1,6 or 1,3 hG0M6(-F)		1,6 or 1,3; 1,6 or 1,3 tetra- mannosylated, mono- $\beta$ (1,2) N-acetylglucosaminylated, hybrid-type
M6		Oligomannose 6

1,6 or 1,3 bG1		asialo-, 1,6 or 1,3 mono- $\beta$ (1,4) galactosylated, biantennary, $\alpha$ (1,6) core-fucosylated
1,6 or 1,3 hG0M5		1,6 or 1,3 tri-mannosylated, mono- $\beta$ (1,2) N-acetylglucosaminylated, hybrid-type
bNG0		asialo-, agalacto-, $\beta$ (1,4) bisecting, biantennary, $\alpha$ (1,6) core-fucosylated
1,6 or 1,3 bG1-N		asialo-, 1,6 or 1,3 mono- $\beta$ (1,4) galactosylated, mono- $\beta$ (1,2) N-acetylglucosaminylated biantennary, $\alpha$ (1,6) core-fucosylated
1,6 or 1,3 bG1-F		asialo-, 1,6 or 1,3 mono- $\beta$ (1,4) galactosylated, biantennary,
M5		Oligomannose 5
bG0		asialo-, agalacto-, biantennary, $\alpha$ (1,6) core-fucosylated

1,6 or 1,3 bG1-N-F		asialo-, 1,6 or 1,3 mono- $\beta$ (1,4) galactosylated, mono- $\beta$ (1,2) N-acetylglucosaminylated, biantennary
bG0-F		asialo-, agalacto-, biantennary
1,6 or 1,3 bG0-N		asialo-, agalacto-, 1,6 or 1,3 mono- $\beta$ (1,2) N-acetylglucosaminylated biantennary, $\alpha$ (1,6) core fucosylated
1,6 or 1,3 bG0-N-F		asialo-, agalacto-, 1,6 or 1,3 mono- $\beta$ (1,2) N-acetylglucosaminylated biantennary
M <sub>3</sub> -F		trimannosyl core
M3-2M-F		4'- $\beta$ -mannosyl chitobiose