



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ GELİŞTİRİLEN TERAPÖTİK MONOKLONAL ANTİKORLARIN
FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN VE STRES
KOŞULLARINDAKİ DEĞİŞİKLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ
VE VALİDASYONU**

YİĞİT ERDEMGİL
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Muhittin A. Serdar

İSTANBUL-2022



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ GELİŞTİRİLEN TERAPÖTİK MONOKLONAL
ANTİKORLARIN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN VE
STRES KOŞULLARINDAKİ DEĞİŞİKLİKLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

YİĞİT ERDEMGİL
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Muhittin A. Serdar

İSTANBUL-2022

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyokimya
Program: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji
Tez Başlığı: Yeni Geliştirilen Terapötik Monoklonal
Antikorların Fizikokimyasal Özelliklerinin
Ve Stres Koşullarındaki Değişikliklerinin
Değerlendirilmesi ve Validasyonu
Öğrencinin Adı-Soyadı: Yiğit Erdemgil
Savunma Sınavı Tarihi: 09/06/2022

Bu tez çalışması jürimiz tarafından doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye (Tez Danışmanı) Prof. Dr., Muhittin A. Serdar
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar
Üniversitesi
Üye Prof. Dr., Özge Can
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar
Üniversitesi
Üye Doç. Dr., Cemaliye Akyerli Boylu
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar
Üniversitesi
Üye Prof. Dr., Gizem Dinler Doğanay
İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen
Edebiyat Fakültesi, Moleküler
Biyoloji ve Genetik Bölümü
Üye Dr. Öğr. Üyesi, Hüseyin Çimen
Yeditepe Üniversitesi,
Mühendislik Fakültesi, Genetik
ve Biyomühendislik Bölümü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tarih: 09.06.2022

Yiğit Erdemgil

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Biyoteknolojik ilaç alanında kendimi geliştirme imkanı sunan Sayın Kaya Turgut'a ve Turgut İlaçları bünyesinde yürüttüğümüz çalışmalara ve eğitimimize gösterdiği desteklerden dolayı Sayın Tunç Turgut'a en içten dileklerle teşekkür ederim. Turgut İlaç'taki çalışma arkadaşlarıma, doktora çalışmalarına devam etmemi destekledikleri, bu süreçte verdikleri emek ve destekleri için Ceren Pamukçu, Merve Çelik, Cansu Akın Levi, Zeynep Zülfiye Yıldırım Keleş, Dr. Ahmet Emin Atik ve Dr. Deniz Demirhan'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Danışmanım Prof. Dr. Muhittin A. Serdar tüm doktora sürecim boyunca karşısına getirdiğim bütün sorunları anlayışla karşıladığı ve desteğini esirgemediği için minnet duyuyorum. Kendisiyle doktora öğrencisi olarak çalışmak benim için bir onurdu. Prof. Dr. Özge Can'a, Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim boyunca gösterdiği tüm çabalar ve bana olan inancı için, üniversite dışında ise bir ağabey olarak her zaman yanımda olduğu için minnettirim. Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim boyunca verdiği desteklerden dolayı Doç Dr. Cemaliye Akyerli Boylu'ya teşekkür ederim.

Komite üyelerim Prof. Dr. Gizem Dinler Doğanay'a ve Dr. Hüseyin Çimen'e tüm destekleri ve emekleri için teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olup, her konuda beni destekleyen, her zaman arkamda olduklarını bilerek, geleceğe güvenle ilerlememi sağlayan sevgili annem Nüket Erdemgil ve sevgili babam Barbaros Erdemgil'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Son olarak, doktora çalışmalarım boyunca hep yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, birlikte sevinip birlikte üzüldüğüm Berna Üstüner'e teşekkür etmek istiyorum.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
TABLolar LİSTESİ	xiii
ÖZET	14
ABSTRACT.....	15
1 GİRİŞ VE AMAÇ	16
2 GENEL BİLGİLER.....	17
2.1 Biyobenzer İlaçlar	17
2.2 Biyofarmasötik İlaçlar ve İlaç Sektöründeki Yerleri.....	18
2.3 Monoklonal Antikorlar	21
2.3.1 Monoklonal antikor türleri ve yapıları	21
2.3.2 Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) inhibitörleri.....	22
2.4 Stres Çalışmaları ve Analiz Metotları	26
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1 Materyaller	34
3.2 Örnekler	35
3.3 Stres Koşulları ve Uygulamaları.....	35
3.3.1 Dondurma/çözme (D/Ç) döngüsü	35
3.3.2 Termal stres	35
3.3.3 Kimyasal oksidasyon.....	36
3.3.4 Asidik ve bazik pH stresi	36
3.4 Boyut Ayırma - Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (SE-UPLC)....	36
3.5 İngirgenmemiş (nr) ve İndirgenmiş (r) Kapiler Elektroferez – Sodyum Dodesil Sülfat (nrCE-SDS ve rCE-SDS).....	37
3.6 Görüntülemeli Kapiler İzoelektrik Fokuslama (icIEF).....	37
3.7 Peptit Haritalama Analizi.....	38
3.8 İstatistiksel Analiz	39
4 BULGULAR.....	40
4.1 Dondurma/Çözme Döngüsü	40
4.1.1 SE-UPLC sonuçları	41

4.1.2	nrCE-SDS sonuçları.....	42
4.1.3	rCE-SDS sonuçları	44
4.1.4	icIEF sonuçları.....	45
4.1.5	Peptit haritalama sonuçları	48
4.2	Termal Stres.....	49
4.2.1	SE-UPLC sonuçları	51
4.2.2	nrCE-SDS sonuçları	53
4.2.3	rCE-SDS sonuçları	55
4.2.4	icIEF sonuçları.....	58
4.2.5	Peptit haritalama sonuçları	62
4.3	Kimyasal Oksidasyon Stresi.....	64
4.3.1	SE-UPLC sonuçları	65
4.3.2	nrCE-SDS sonuçları.....	67
4.3.3	rCE-SDS sonuçları	69
4.3.4	icIEF sonuçları.....	71
4.3.5	Peptit haritalama sonuçları	74
4.4	Asidik (pH 3,5) Koşulda İnkübasyon	75
4.4.1	SE-UPLC sonuçları	76
4.4.2	nrCE-SDS sonuçları.....	78
4.4.3	rCE-SDS sonuçları	80
4.4.4	icIEF sonuçları.....	82
4.4.5	Peptit haritalama sonuçları	86
4.5	Bazik (pH 9) Koşulda İnkübasyon.....	87
4.5.1	SE-UPLC sonuçları	88
4.5.2	nrCE-SDS sonuçları.....	90
4.5.3	rCE-SDS sonuçları	91
4.5.4	icIEF sonuçları.....	93
4.5.5	Peptit haritalama sonuçları	97
5	TARTIŞMA	99
5.1	Dondurma/Çözme Stresi	99
5.2	Termal Stres.....	100
5.3	Kimyasal Oksidasyon Stresi.....	105
5.4	Asidik ve Bazik pH Stresi	109
6	SONUÇ.....	114
7	KAYNAKLAR	115
8	ÖZGEÇMİŞ.....	121

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

Ab	antikor
AB	Avrupa Birliği
ABD	Ameri Birleşik Devletleri
ACN	asetonitril
ADA	anti-ilaç antikoru
ADC	antikor-ilaç konjugatı
ADCC	antikor-bağımlı hücre tarafından yönlendirilen sitotoksisite
ADCP	antikor-bağımlı hücre tarafından yönlendirilen fagositoz
Arg	arjinin
Asn	asparajin
Asp	aspartik asit
BB	biyobenzer
BEH	etilen köprülü hibrit
CDC	komplement-bağlı sitotoksisite
CDR	komplement belirleyici bölge
CE-SDS	kapiler elektroforez-sodyum dodesil sülfat
CEX	katyon değişim kromatografisi
CH	ağır zincir sabit bölge
CHO	Çin hamster yumurtalık hücresi
cIEF	kapiler izoelektrik fokuslama
CL	hafif zincir sabit bölge
CQA	kritik kalite özellikleri
C-term K	karboksil terminali lizin
CV	varyasyon katsayısı
D/Ç	dondurma/çözme
DNA	deoksiribonükleik asit
DTT	ditiyotretiyol
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
ESI	elektrosprey iyonizasyon
Fab	IgG antijen-bağlayan bölge

Fc	IgG kristalize edilebilir bölge
Fc γR	Fc gamma reseptörü
FcRn	neonatal Fc reseptörü
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
HC	ağır zincir
HC:T	ağır zincir triptik peptitleri
HMWS	yüksek moleküler ağırlıklı
IAM	iyodoasetamid
ICH	Uluslararası Uyum Konseyi
icIEF	görüntülemeli kapiler izoelektrik fokuslama
IgG	immünoglobulin G
KK	kalite kontrol
LC	hafif zincir
LC:T	hafif zincir triptik peptitleri
LC-MS/MS	sıvı kromatografisi-sıralı kütle spektrometresi
LMW	düşük moleküler ağırlıklı
mAb	monoklonal antikor
Met	metiyonin
MS	kütle spektrometresi
NFκB	nükleer faktör kappa hafif zincir güçlendiricisi
nrCE-SDS	indirgenmemiş koşullarda kapiler elektroforez-sodyum dodesil sülfat
N-term pE	amino terminali piro-glutamik asit
OR	orijinatör
PK	farmakokinetik
ppm	milyonda bir parça
PTM	post-translasyonel modifikasyon
Q-TOF	kuadrupol-uçuş zamanı
rCE-SDS	indirgenmiş koşullarda kapiler elektroforez-sodyum dodesil sülfat
sa	saat
SD	standart sapma
SDS-PAGE	sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi
SE-UPLC	boyut ayırma-ultra performanslı ayırma kromatografisi

sTNF-α	çözünebilir tümör nekroz faktörü- α
TCA	zamana göre düzeltilmiş alan
TFA	trifloroasetik asit
TNFR	tümör nekroz faktörü reseptörü
TNF-α	tümör nekroz faktörü- α
Trp	triptofan
TRY	Türk Lirası
UPLC	ultra performanslı sıvı kromatografisi
USD	Amerika Birleşik Devletleri Doları
UV	mor ötesi
VH	ağır zincir değişken bölge
VL	hafif zincir değişken bölge
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. 2015-2020 yılları arasında Türkiye’de orijinatör (referans) ve biyobenzer biyofarmasötik ürün satışları	20
Şekil 2. Antikor yapısı	21
Şekil 3. TNF- α çalışma mekanizması	23
Şekil 4. D/Ç stresi, SE-UPLC analizi ile elde edilen monomer alanı % sonuçları...	41
Şekil 5. D/Ç stresi uygulanmış ve stress uygulanmamış örneklerin UV kromatogramlarının üst üste karşılaştırmaları	42
Şekil 6. D/Ç stresi, nrCE-SDS analizi ile elde edilen toplam IgG TCA % sonuçları.....	43
Şekil 7. D/Ç stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı nrCE-SDS PDA elektrogramları.....	43
Şekil 8. D/Ç stresi, rCE-SDS analizi ile elde edilen toplam LC&HC % sonuçları..	44
Şekil 9. D/Ç stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı rCE-SDS PDA elektrogramları.....	45
Şekil 10. D/Ç stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam ana yük varyantı % sonuçları	46
Şekil 11. D/Ç stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı icIEF UV elektrogramları.....	47
Şekil 12. D/Ç stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam asidik yük varyantı % sonuçları.....	47
Şekil 13. D/Ç stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam bazik yük varyantı % sonuçları.....	48
Şekil 14. Termal stres, SE-UPLC analizi ile elde edilen monomer alanı % sonuçları	52
Şekil 15. Termal stres uygulanan BB ve OR örneklerin karşılaştırmalı UV kromatogramları	53
Şekil 16. Termal stres, nrCE-SDS analizi ile elde edilen toplam IgG TCA % sonuçları.....	54
Şekil 17. Termal stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı nrCE-SDS PDA elektrogramları.....	55
Şekil 18. Termal stres, rCE-SDS analizi ile elde edilen toplam LC&HC % sonuçları	56
Şekil 19. Termal stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı rCE-SDS PDA elektrogramları.....	57
Şekil 20. Termal stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı icIEF UV elektrogramları.....	59
Şekil 21. Termal stres, icIEF analizi ile elde edilen toplam ana yük varyantı % sonuçları.....	60
Şekil 22. Termal stres, icIEF analizi ile elde edilen toplam asidik yük varyantı % sonuçları.....	60
Şekil 23. Termal stres, icIEF analizi ile elde edilen toplam bazik yük varyantı % sonuçları.....	61
Şekil 24. Oksidasyon stresi, SE-UPLC analizi ile elde edilen monomer alanı % sonuçları.....	66

Şekil 25. Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı UV kromatogramları	66
Şekil 26. Oksidasyon stresi, nrCE-SDS analizi ile elde edilen toplam IgG TCA % sonuçları.....	67
Şekil 27. Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı nrCE-SDS PDA elektrogramları.....	68
Şekil 28. Oksidasyon stresi, rCE-SDS analizi ile elde edilen toplam LC&HC % sonuçları.....	69
Şekil 29. Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı rCE-SDS PDA elektrogramları.....	70
Şekil 30. Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı icIEF UV elektrogramları.....	71
Şekil 31. icIEF analizi ile elde edilen toplam ana yük varyantı % sonuçları	72
Şekil 32. Oksidasyon stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam asidik yük varyantı % sonuçları	73
Şekil 33. Oksidasyon stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam bazik yük varyantı % sonuçları	74
Şekil 34. Asidik pH stresi, SE-UPLC analizi ile elde edilen monomer alanı % sonuçları.....	77
Şekil 35. Asidik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı UV kromatogramları ..	78
Şekil 36. Asidik pH stresi, nrCE-SDS analizi ile elde edilen toplam IgG TCA % sonuçları.....	79
Şekil 37. Asidik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı nrCE-SDS PDA elektrogramları.....	80
Şekil 38. Asidik pH stresi, rCE-SDS analizi ile elde edilen toplam LC&HC % sonuçları.....	81
Şekil 39. Bazik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı rCE-SDS PDA elektrogramları.....	82
Şekil 40. Asidik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı icIEF UV elektrogramları.....	83
Şekil 41. Asidik pH stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam ana yük varyantı % sonuçları.....	84
Şekil 42. Asidik pH stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam asidik yük varyantı % sonuçları.....	85
Şekil 43. Asidik pH stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam bazik yük varyantı % sonuçları.....	86
Şekil 44. Bazik pH stresi, SE-UPLC analizi ile elde edilen monomer alanı % sonuçları.....	89
Şekil 45. Bazik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı UV kromatogramları....	89
Şekil 46. Bazik pH stresi, nrCE-SDS analizi ile elde edilen toplam IgG TCA % sonuçları.....	90
Şekil 47. Bazik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı nrCE-SDS PDA elektrogramları.....	91
Şekil 48. Bazik pH stresi, rCE-SDS analizi ile elde edilen toplam LC&HC % sonuçları.....	92
Şekil 49. Bazik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı rCE-SDS PDA elektrogramları.....	93

Şekil 50. Bazik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı icIEF UV elektrogramları.....	94
Şekil 51. Bazik pH stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam ana yük varyantı % sonuçları.....	95
Şekil 52. Bazik pH stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam asidik yük varyantı % sonuçları.....	96
Şekil 53. icIEF analizi ile elde edilen toplam bazik yük varyantı % sonuçları	97



TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Konvansiyonel ilaçların ve biyolojik ilaçların temel özellikleri	19
Tablo 2. D/Ç döngüsü sonuçları	40
Tablo 3. D/Ç stresi kontrol ve stres örneklerinin PTM değerleri	49
Tablo 4. Termal stres 37°C’de 3 gün ve 7 gün inkübasyon sonuçları	50
Tablo 5. Termal stres 50°C 3 gün ve 7 gün inkübasyon sonuçları	50
Tablo 6. Termal stres (37°C) kontrol ve stres örneklerinin PTM değerleri.....	63
Tablo 7. Termal stres (50°C) kontrol ve stres örneklerinin PTM değerleri.....	63
Tablo 8. Kimyasal Oksidasyon stresi sonuçları.....	64
Tablo 9. Oksidasyon stresi kontrol ve stres örneklerinin PTM değerleri	75
Tablo 10. Asidik (pH 3,5) koşul stresi sonuçları	76
Tablo 11. Asidik pH stresi kontrol ve stres örneklerinin PTM değerleri	87
Tablo 12. Bazik (pH 9,0) koşul stresi sonuçları	87
Tablo 13. Bazik pH stresi kontrol ve stress örneklerinin PTM değerleri.	98

ÖZET

Yeni Geliştirilen Terapötik Monoklonal Antikorların Fizikokimyasal Özelliklerinin ve Stres Koşullarındaki Değişikliklerinin Değerlendirilmesi ve Validasyonu

Biyobenzerler ve orijinatörlere stres uygulanarak, klinik çalışmalardan önce önemli bilgiler elde edilebilmektedir. Bu çalışmada, dondurma/çözme döngüsü, termal, oksidasyon, ve asidik/bazik pH stresi uygulanan biyobenzer ve orijinatör tümör nekroz faktörü (TNF- α) örneklerinde degradasyon ürünlerinin değişimi, CE-SDS, SE-UPLC, icIEF ve UPLC-ESI-QToF-MS yöntemleri ile araştırılmıştır. Stres uygulanan örnekler, ANOVA ve Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak, stres uygulanmamış kontrol örnekleriyle karşılaştırılmıştır. Ayrıca, degradasyon oranını karşılaştırmak için, stres boyunca değişen mAb miktarı kullanılarak oluşturulan lineer eğrilerin eğimleri istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. Termal stres 50°C'de uygulandığında %monomer değişimleri, biyobenzer ve orijinatör arasında anlamlı farklılık ($p=0,32$) göstermemiştir. Termal stres ile asidik varyantlar, biyobenzer (%23,1) ve orijinator (%23,0) ürünlerinde anlamlı artış göstermişlerdir. Asidik varyant değişimlerinin Asn deamidasyonu ve N-terminal pE oluşumu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Kimyasal oksidasyon stresi uygulaması sonrasında ürünlerin parçalanma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Stres sonunda bütün IgG, biyobenzer ve orijinatör için, sırasıyla, %34 ve %41 oranında azalmıştır. IgG'lerin Fc bölgesindeki Met256 ve Met432 yüksek oranda (<%98) okside olurken, CDR bölgesinde bulunan Met34'te, iki üründe de, <%83 oranında oksidasyon görülmüştür. Asidik pH 3,0 koşulunda iki ürün de degrade olurken, Bazik pH 9,0 koşulunda iki üründe de yüksek oranda anlamlı asidik yük artışı (<%31) görülmüştür ($p=0,27$). Asidik yük artışının Asn deamidasyonuna bağlı olduğu ve çok etkilenen bölgenin HC:T35 olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, biyobenzer ürünün geliştirilmesinde kullanılabilecek, orijinatör ve biyobenzer ürünlerin degradasyon mekanizmaları hakkında değerli bilgiler elde edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Biyobenzer, mAb, stres çalışmaları, UPLC, kapiler elektroforez

ABSTRACT

Investigation of Physicochemical Behavior of Newly Developed Therapeutic Monoclonal Antibodies Under Stress Conditions and Validation of Results

Prior to clinical trials, stress treatment to biosimilars and originators might yield valuable information. In this study, the degradation product changes in freeze/thaw cycle, thermal, oxidation, and acidic/basic pH stress applied to biosimilar and originator tumor necrosis factor (TNF- α) samples were investigated by CE-SDS, SE-UPLC, icIEF, and UPLC-ESI-QToF-MS. Stressed treated samples were compared with unstressed control samples using ANOVA and Dunnett's Multiple Comparison test. Also, to compare the degradation rate, the slopes of the linear curves generated using the changing amount of mAb during the stress were compared statistically. The percent monomer changes between the biosimilar and the original were similar at 50°C ($p=0.32$). Thermal stress raised acidic variant levels in biosimilar (23.1%) and originator (23.1%) products. Acidic variant alterations were associated to Asn deamidation and *N*-terminal pE. After oxidation stress, intact IgG levels decreased by 34% and 41% for the biosimilar and the original, respectively. While Met256 and Met432 in the Fc region of IgGs were extensively oxidized (<98 %), Met34 in the CDR region of both products was oxidized at an <83 %. Both products were degraded excessively at acidic pH 3.0 conditions. Both products significantly increased the acidic content (<31%) in the basic pH 9.0 condition ($p=0.27$). The elevated acidic variants was determined to be caused by Asn deamidation, with HC:T35 being the most affected location. As a result of this study, valuable information has been obtained about the originator and degradation mechanisms of biosimilar products, which can be used in the development of biosimilar products.

Keywords: Biosimilar, MAb, stress studies, UPLC, capillary electrophoresis

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Monoklonal antikor (mAb) terapötiklerinin artan kullanımı nedeniyle, sağlık hizmeti sağlayıcıları, maliyetlerde önemli bir artış görmektedir. Otoritelerin biyobenzer tanımlarına göre biyobenzer ilaç, ruhsatlı referans biyoterapötik ürüne kalite, güvenilirlik ve etkinlik açısından benzer olan üründür. Biyobenzer ürünlerin pazara çıkması ile bu ürünlerin kalitesinin ve fiyatlarının pazarı şekillendireceği öngörülmektedir (1,2).

Biyobenzer alanındaki araştırmalar, orijinal üründen daha ucuz ve yüksek kaliteli olan ilaçlara tüketici erişimini arttırarak, daha geniş bir hasta popülasyonuna ulaşmayı amaçlamaktadırlar. Tüm lisanslı terapötik monoklonal antikorlar arasında en sık kullanılan immünoglobulin G1'dir (IgG1) (3,4). Terapötik IgG1'ler arasında en çok kullanılanlardan biri tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) inhibitörleridir.

Farmasötik ilaç geliştirme sürecinde gerçekleştirilen önemli çalışmalardan biri stres çalışmalarıdır. Bu çalışmalar moleküllerin davranışı, safsızlık düzeyleri, ve stabiliteleri hakkında önemli bilgiler vermektedirler (5,6). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) kurumunun yönergelerinde belirtildiği üzere, referans molekül ile biyobenzer ürünün stres koşulları altındaki davranışlarının, ürünlerin stabilitelerine etki ettiklerinden, karşılaştırılmaları gerekmektedir (7).

Biyofarmasötikler, konvansiyonel ilaçlara görece stres koşullarından daha fazla etkilendiklerinden, stabilitelerine ilişkin daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (6). Bu çalışmada uygulanan termal, asidik/bazik pH, dondurma-çözme döngüsü, kimyasal oksidasyon stres koşulları altında biyobenzer ve orijinatör TNF- α inhibitörünün nasıl davrandığı ve ne gibi farklılıklar gösterdiği hakkındaki bilgiler ürün geliştirme aşaması için oldukça önemlidir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Biyobenzer İlaçlar

Biyolojiklerin gelişimi, rekombinant teknoloji yoluyla, doğal olarak oluşan proteinleri, kompleks peptitleri, ve glikoproteinleri optimize etme hedefiyle 1980'lerde başlamıştır (8). Biyoteknolojinin gelişimi, yeni metodolojiler için yol sağlayarak monoklonal antikorlar (mAb'lar) gibi giderek daha karmaşık biyolojiklerin üretiminde, terapötik ve tanısal ajanların geliştirilmesinde önem kazanmıştır (8). Monoklonal antikorların 45 yıllık bir geçmişi olmasına rağmen, biyoteknolojik tekniklerdeki son gelişmeler ve önemlerinin anlaşılması ile oldukça hızlanarak, otoimmün hastalıklar, kanser, iltihaplanma, ve bulaşıcı hastalıklar için başarılı tedaviler haline gelmişlerdir (9).

Biyoteknoloji ve biyofarmasötik endüstrileri insan sağlığı sektöründe bir araya geldikçe, büyük ilaç şirketleri biyobenzerler yoluyla rekabet etmeye başlamıştır (8). Biyobenzerler, "Aktif bileşenin bir versiyonunu içeren biyolojik tıbbi ürünler" olarak tanımlanmaktadır (10). Örnek olarak enzimler, aşılarda, mAb'lar, insan büyüme hormonları, insülinler, interlökinler, ve doku plazminojen aktivatörleri biyobenzer geliştirmeleri için potansiyel adaylardır (10,11). Bu alandaki gelişmeler sadece yeni ilaçların keşfine yol açmakla kalmamakta, aynı zamanda mevcut ilaçların daha hızlı ve daha ekonomik üretilmesinin de yolunu açmaktadır. Değerli orijinatör biyofarmasötiklerin patent sürelerinin bitecek olmasına veya patentlerinin zaten süresi dolmasına bağlı olarak, biyobenzer ürün araştırmaları ve otoritelere başvurular önemli ölçüde artmıştır (8). Biyobenzerlerin önemi, çeşitli biyolojiklerin patent korumaları sona erdiğinde artmıştır. Halihazırda pazarlanan bazı değerli biyolojiklerin patent sürelerinin dolması, maliyet tasarrufu sağlama potansiyeliyle, biyobenzer araştırmaları ve onay için bir fırsat yaratmıştır (10,12,13). Avrupa İlaç Ajansı (EMA), Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) izlenecek yönergeler oluşturmuşlardır ve tüm biyobenzerler, bu kurumlar tarafından düzenleyici onay öncesinde bir inceleme prosedürüne tabi tutulurlar (12).

2.2 Biyofarmasötik İlaçlar ve İlaç Sektöründeki Yerleri

Dünyada biyoteknolojinin büyük bir hızla gelişmesi ve tıpta kullanılmaya başlanması ile hastalıkların tedavisinde devrim niteliğinde gelişmeler kaydedilmiştir. Bu gelişmeler, biyolojik sistemler ve canlı organizmalar kullanılarak, ilaç olarak kullanılacak protein yapısında karmaşık yapıları moleküllerin geliştirilmesini ve büyük miktarlarda üretilmesini mümkün kılmıştır. Biyolojik ürünler, DNA aşılari, kan ve kan bileşikleri, alerjenikler, somatik hücreler, gen terapötikleri, monoklonal antikorlar (mAb), füzyon proteinleri, dokular ve rekombinant terapötik proteinler gibi birçok ürün çeşidi içermektedirler (14). Biyolojik ürünler, canlı hücrelerden üretilerek, bu hücrelerden izole edilen büyük moleküllerdir. İnsan ve hayvansal hücre hatlarından veya mikroorganizmalardan biyoteknolojik metotlarla ya da diğer teknolojilerle üretilerek başka tedavi yöntemlerinin mevcut olmadığı birçok medikal durumun tedavisinde kullanılmaktadırlar. Biyoteknolojik ilaçlar, modern tıpta önemli kullanım alanı bulmuştur; kanser, bağışıklık sistemi hastalıkları, kalp-damar hastalıkları, romatizmal hastalıklar ve endokrin sistem hastalıkları gibi tedavi alanlarında kimyasal sentez ile üretilen ilaçlara karşı üstünlük sağlamışlardır (14).

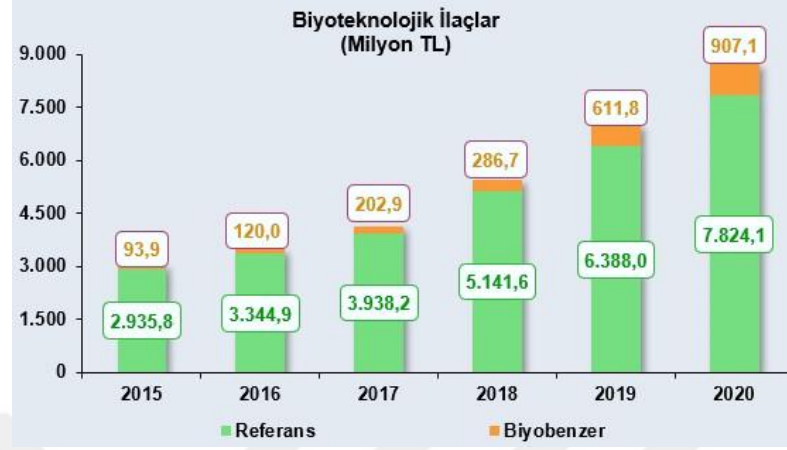
Biyoteknolojik yöntemler ile üretilmiş olan biyolojik ürünler, üretim ve kullanım şekillerine göre büyük hassaslık gösterirler. Bu yüzden, tanımlanmaları ve üretilmeleri küçük moleküllere göre çok daha karmaşıktır. Konvansiyonel ilaçlar ve biyolojik ilaçlar arasındaki temel farklar aşağıda özetlenmiştir (Tablo1).

Tablo 1. Konvansiyonel ilaçların ve biyolojik ilaçların temel özellikleri (14)

Konvansiyonel İlaçlar	Biyolojik İlaçlar
Kimyasal sentezle üretilirler.	Biyoteknolojik yöntemler ile üretilirler.
Düşük molekül ağırlığına sahiptirler.	Yüksek molekül ağırlığına sahiptirler.
Fizikokimyasal özellikleri tamamen karakterize edilebilir ve görece olarak daha kolaydır.	Kompleks fizikokimyasal özellikleri bulunmaktadır ve karakterize edilmeleri görece olarak zordur.
Oldukça stabildirler.	Isı ve çalkalama gibi fiziksel etkenlere duyarlıdır.
Saflık standartları mevcuttur.	Değişken spesifikasyonlar bulunmaktadır.
Farklı uygulama yollarına yönelik dozaj şekilleri hazırlanabilir.	Genellikle parenteral yol ile uygulanırlar.
Saflaştırılması kolay ve ucuzdur.	Saflaştırma prosesi uzun, karmaşık ve pahalıdır.
Kontaminasyondan riski düşüktür.	Kontaminasyon riski yüksektir.

Biyofarmasötik ilaçların 2016'daki dünya çapında satışı 228 milyar dolar olarak belirtilmiştir (15). Biyofarmasötiklerin 2000 yılındaki pazar payı %10 olarak belirtilirken, bu pazar payı 2014'te %20'ye yükselmiştir (14). Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, her geçen yıl birçok ilaç firması da biyoteknoloji alanına girmek için adım atmaktadır. Biofarmasötikler arasında bulunan mAb'ların, 2013'teki pazar payı yaklaşık olarak 75 milyar dolardır ve 2013'teki biyofarmasötik satışlarının yarısını mAb'lar oluşturmaktadır (2). Ülkemizde biyoteknolojik ilaçların tamamına yakınının ithal edildiği göz önüne alındığında, 2016 yılında yaklaşık 3,4 milyar dolar sermaye kaybı gerçekleşmiştir (16). 2016'da Türkiye'de yaklaşık %16,5 pazar payına sahip olan biyoteknolojik ilaçların, önümüzdeki dönemde kullanıma sunulacak yeni ürünlerle artması beklenmektedir (16). IEIS verileri, biyofarmasötiklerin Türkiye'de yazılan tüm reçetelerin %18,2'sini oluşturduğunu ve biyofarma sektörünün 2020 yılına kadar %22,5 büyüyerek 8,7 milyar Türk Lirası'na (TRY) ulaşmasını

öngörmüştür (17). 2020 yılı itibarıyla biyobenzer pazarı bir önceki yıla göre %48,3 artışla 907,1 milyon TL değerine ulaşmıştır (17).



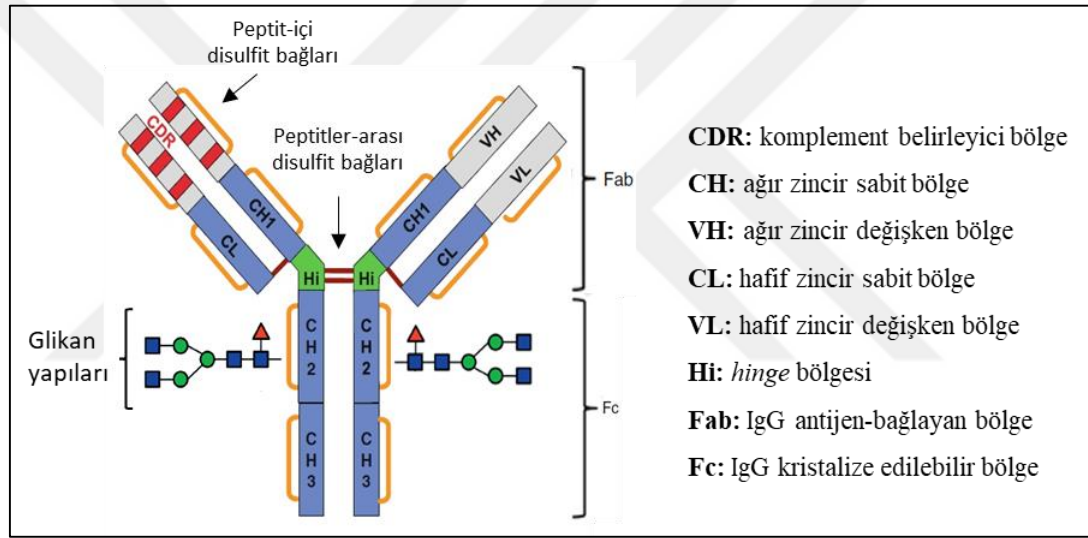
Şekil 1. 2015-2020 yılları arasında Türkiye’de orijinatör (referans) ve biyobenzer biyofarmasötik ürün satışları (18)

Biyobenzer ürün geliştirme ve geliştirilen ürünlerin değerlendirilmesi kritik öneme sahiptir, çünkü Türkiye pazarındaki biyofarmasötiklerin çoğu ithal edilmekte olup ülkenin sağlık sistemine büyük bir mali yük getirmektedir. Biyobenzer ürünlerinin geliştirme ve üretim aşamalarında büyük maliyet tasarrufu sağlanmaktadır. Bu sayede, biyobenzer olarak geliştirilen biyofarmasötikler daha geniş popülasyonlar tarafından kullanılabilirler. Bu faktörlerin bir sonucu olarak, biyobenzer ürün geliştirme ve bu ürünlerin kalitesinin değerlendirilmesi kritik öneme sahiptir. Yapılan bir çalışmaya göre, biyobenzer ürünlerin pazara girmesine bağlı olarak ABD’de biyolojik ürünlere yapılan harcama, 2017 ile 2026 arasında 54 milyar dolar azaltılabilir (19). Diğer bir araştırmada ise, beş Avrupa Birliği (AB) ülkesinde otoimmün hastalıkların tedavisi için biyobenzer infliximabın kullanıma sunulmasından elde edilen maliyet tasarrufunun (%10-30 daha uygun fiyatlı ürün senaryosuna göre 26-77 milyon € tasarruf), ek olarak yaklaşık 7500 hastanın tedavi edilmesine olanak sağlayabileceği belirtilmiştir (20). Mayıs 2018’in sonunda, FDA 11 biyobenzeri (içlerinden 7 tanesi mAb) ve EMA ise 39 biyobenzeri (içlerinden 12 tanesi mAb) piyasaya sürülmek üzere onaylamıştır (21).

2.3 Monoklonal Antikorlar

2.3.1 Monoklonal antikor türleri ve yapıları

Antikor üretimi, glikan yapılarının da eklenmesi ile endoplazmik retikulum (ER) içinde gerçekleşir. İnsan immüoglobulinleri, birbirinin aynı olan çiftler halinde, hafif zincir (LC) ve ağır zincirden (HC) oluşurlar (Şekil 2). İki LC ve HC arasında disülfid bağları oluşturularak bir heterodimer üretilir (22). IgG proteininin katlanması ve birleştirilmesi, ER mekanizmaları tarafından desteklenir ve yanlış katlananlar, ER kalite kontrol mekanizmaları tarafından elenirler (23–25).



Şekil 2. Antikor yapısı (26)

IgG'ler dört alt sınıfa ayrılır: IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4. Şu anda, tüm lisanslı mAb'lar ve bunların terapötik niteliklere sahip türevleri IgG1, IgG2 veya IgG4 kökenlidir (27). IgG3, istenmeyen farmakokinetik (PK) özelliklerinden dolayı çok kullanım alanı bulmamaktadır. IgG 1, 2, ve 4'ün terminal yarı ömrü yaklaşık 21 gün iken, IgG3'ün terminal yarı ömrü yedi gündür (27). IgG2, IgG3, ve IgG4 arasındaki ana farklılıklar, *hinge* bölgelerinin uzunluğundan, amino asit içeriklerinden, ve iki HC'yi birbirine bağlayan disülfid köprülerinin sayısından kaynaklanır (27). Bu farklılıkların, IgG'nin Fc reseptör (FcR) bağlanması, efektör fonksiyonları, ve ayrıca PK özellikleri üzerinde etkisi vardır (27).

IgG'lerin, antijen bağlayıcı (Fab) ve kristalize edilebilir (Fc) bölgeler olmak üzere iki ana bölgesi mevcuttur (22). Farklı işlevleri gerçekleştiren bu iki bölge, bağışıklık sisteminin iki ana mekanizması olan doğal ve adaptif bağışıklığı birbirine bağlar (28). Fab bölgesi, hedef antijenlere spesifik antikor bağlanmasıyla sorumluyken, Fc bölgesi, reseptör moleküllerine bağlanan antikor efektör fonksiyonundan sorumludur (22).

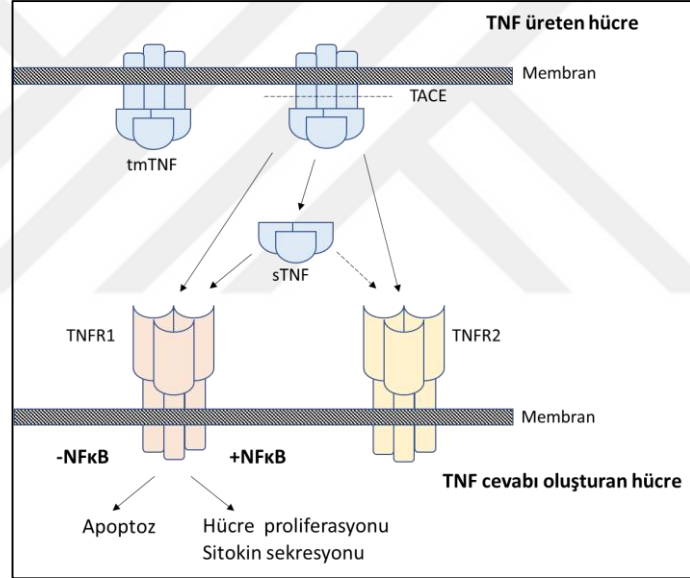
IgG Fc reseptör ailesi, üç aktive edici (farelerde Fc γ RI, Fc γ RIII, Fc γ RIV; insanlarda Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa) ve bir inhibitör (Fc γ RIIb) reseptörü içerir (29). İnsanlarda IgG'ler için dört çeşit Fc reseptörü vardır: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32a,b,c), Fc γ RIII (CD16a,b,c), ve neonatal Fc (FcRn). FcRn bağlama bölgesi, CH2-CH3 alanındaki protein A bağlama bölgesi ile örtüşür. IgG Fc alanlarının glikozilasyon konumu genellikle CH2-CH3 alanında gömülüdür; bu da glikan bağlayıcı reseptörlerle sterik etkileşimleri zorlaştırır (22). Fc γ R'nin bir IgG'nin Fc bölgesi ile etkileşimi, hücre bazlı inflamatuvar reaksiyonları ADCC, CDC, ADCP'yi tetikler (22). Fc γ RI yüksek afiniteli monomerik IgG reseptörü iken, Fc γ RII ve Fc γ RIII düşük afinitelidir (27). Yalnızca Fc γ RI ailesi, monomerik IgG'yi *in vivo* olarak bağlar (30). İnsan IgG'sinin insan Fc reseptörü hFc γ R'ye yönelik afinitesi, monomerik mi yoksa immün kompleksi formunda mı olduğuna bağlıdır (27). ADCC, doğal öldürücü hücrelerin, Fc γ RIIIa üzerinden, hedef hücreye bağlı antikora bağlandığında oluşur ve bu aynı zamanda bir tümör ölümü efektör işlevidir (31). Terapötik bir mAb'ın ADCC aktivitesi, terapötik faydalar sağlamak için Fc γ RIIIa'ya endojen IgG'den daha büyük bir afinite gerektirir (32).

2.3.2 Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) inhibitörleri

Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), sistemik inflamasyonda immün yanıtını düzenleyen başlıca sitokinlerden biridir. Şekil 2'de gösterildiği gibi, TNF- α hem trimerik çözünür forma hem de membrana bağlı transmembran forma sahiptir (33). Çözünür form, TNF- α dönüştürücü enzim tarafından membran formundan ayrılır (33). Çözünür TNF- α konsantrasyonu vücut sıvılarında çoğunlukla saptanamaz, ancak otoimmün hastalık indüksiyonu veya bağışıklık sistemindeki herhangi bir uyarı, TNF- α konsantrasyonlarını artırabilir (33). Transmembran TNF- α seviyeleri,

çözünür TNF- α 'nın bölünmesi nedeniyle iltihaplanma durumunda bile her zaman düşüktür (33).

TNF- α aktivitesindeki herhangi bir düzensizlik ayrıca patojenik etkilere aracılık edebilir ve otoimmün hastalık başlatma ve sürdürmede rol oynayabilir. Bu çözünür faktörün aşırı ekspresyonu, pro-inflamatuar sitokinlerin ek artışına, T hücresi sağkalımının artmasına ve düzenleyici makrofajların baskılanmasına, endotelial hücre işlev bozukluğuna ve doku yıkımına neden olabilir (Şekil 2). TNF- α inhibitörleri, sTNF- α 'nın neden olduğu proinflamatuvar mekanizmaların nötralizasyonu yoluyla etki eder (33–35). Sistemik TNF- α aşırı ekspresyonu, hastalık sırasında gözlenen TNF- α ile indüklenen proinflamatuvar aktivitelere neden olur.



Şekil 3. TNF- α çalışma mekanizması (33)

sTNF- α 'nın lokal aşırı ekspresyonu, otoimmün inflamatuvar artrit (romatoid artrit, psoriatik artrit, ankilozan spondilit ve juvenil idiyopatik artrit) gibi belirli otoimmün hastalıkların seyrinde yaygın olarak karşılaşılan bir durumdur. Sinovyumda sTNF- α 'nın aşırı ekspresyonu başlıca NF κ B- bağımlı sinyalleşmeyi aktive eder ve bu durum, lokal inflamasyona, kemik yıkımına, kıkırdak bozulmasına ve sinovyal fibroblast proliferasyonuna neden olur (35). Bilimsel literatürden ve otoimmün hastalıkta çeşitli TNF inhibitörleriyle yapılan klinik çalışmalardan elde edilen birikmiş bilgiler,

otoimmün inflamatuvar artrit ve sTNF- α ile aktive olan sinyal yollarının ortak moleküler mekanizmaları paylaştığını ve böylece eklemdeki bu patolojik sonuçların TNF- α inhibitörleri tarafından nötralize edildiğini göstermektedir (33–37).

İki farklı hücre yüzeyi TNF- α reseptörü vardır. Yaygın olarak ifade edilen TNFR1, çözünür TNF- α (33) için birincil sinyal reseptörüdür. Çözünür TNF- α reseptörü aktive ettiğinde, TNFR1 pro-inflamatuvar gen ekspresyonuna, apoptoz ve hücresele proliferasyona aracılık eder. Çözünür TNF- α sinyalinin sonucu, yanıt veren hücrenin aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kapa hafif zincir güçlendiricisi (NF κ B) sinyalleşmesine bağlıdır (36,37). NF κ B aktif olmadığında, TNF- α sinyali apoptoza veya diğer hücre ölümüne yol açmaktadır. Aktif olduğunda sinyalleşme, proinflamatuvar yanıtları, proliferasyonu ve sitokin salgılanmasını artıracak olan anti-apoptotik proteinlerin indüklenmesine yol açmaktadır (36,37).

Diğer yandan; TNFR2, transmembran TNF- α için birincil reseptördür ve çoğunlukla T ve endotelial hücrelerde eksprese edilir (34). Ancak kesin mekanizma tam olarak anlaşılammıştır. Transmembran TNF- α 'nın ayrıca, tam olarak anlaşılmayan ek inflamatuvar ve anti-inflamatuvar yanıtları da indükleyebilen ters sinyalleşmeye dahil olduğu bildirilmiştir (34,38).

TNF- α , TNFR1 ve TNFR2 reseptörleri aracılığıyla etkileştiği hücrelerde sıkı kontrollü hücresele yolları başlatır ve bu etkileşimler çeşitli hücresele cevaplarla sonuçlanır. Çözünür TNF- α 'ya verilen bu hücresele tepkilerden biri aktif NF κ B'nin artmasıdır ve bu durum, toplu olarak proinflamatuvar sinyal olarak adlandırılan çoklu sitokin ve kemokinlerin indüksiyonu, proliferasyon, adezyon moleküllerinde artışı, doku hasarı ve anjiyogenez ile sonuçlanır (33–37). Diğer bir cevap ise NF κ B inaktif olduğunda ve anti-apoptotik proteinlerin seviyesi düşük olduğunda apoptozun başlamasıdır. Pro-inflamatuvar ve apoptotik sinyal kaskadları, TNF- α sinyaline verilen ana tepkilerdir ve bu kaskadlar, TNF- α inhibitörlerinin etkili olduğu otoimmün hastalıklarda yaygın olarak aktive edilir (36,37).

Dendritik hücre göçü ve aktivasyonu gibi proinflamatuvar aktivitelerin neden olduğu plak sedef hastalığı gibi inflamatuvar dermatolojik hastalık, esas olarak

keratinosit proliferasyonunun bir sonucu olarak düzenleyici T hücre aktivitesinin azalmasıdır (39,40). TNF- α inhibitörlerinin ana etki mekanizması olan çözümlü TNF- α nötralizasyonu yoluyla inflammatuar dermatolojik hastalıkta karşılaşılan proinflammatuar NF κ B'ye bağlı sinyalleşme inhibe edilebilmektedir.

İnflammatuar bağırsak hastalıklarında (ülseratif kolit ve Crohn hastalığı), çözümlü TNF- α bağırsak iltihabına yol açar ve bağırsağın bariyer fonksiyonunun kaybı nedeniyle bağırsak lümenindeki bakterilere ek bağışıklık tepkisi oluşur (41). Crohn hastalığında gözlenen T hücre apoptoz bozukluğu, TNF- α inhibitörleri ile tedavi edilebilir (42). Crohn hastalarında transmembran TNF- α pozitif makrofajların ve T hücrelerinin arttığı gösterilmiştir (43). TNF- α inhibitörü tedavisine yanıt veren hastalarda, TNF- α inhibitörüne yanıt vermeyen hastalarla karşılaştırıldığında, tedaviden önce transmembran TNF- α eksprese eden hücreler artmıştır. Bu sonuçlar, transmembran TNF- α eksprese eden hücrelerin azalmasının TNF- α inhibitörünün başka bir etki mekanizması olduğunu göstermektedir. Bu etki mekanizmalarının yanı sıra, TNF- α 'ya bağımlı bir mekanizma olan düzenleyici makrofaj fonksiyonunun *in vitro* olarak TNF- α inhibitörü tarafından başlatıldığı ve bu mekanizmanın mikst lenfosit reaksiyonu ile gösterildiği gösterilmiştir (44). Bu, klinik etkinlikle ilişkili dokulardaki inflammatuar hücreleri azaltabilir.

Ek olarak, TNF- α inhibitörlerinin transmembran TNF- α eksprese eden hücrelerin antikor-bağılı hücre-yönlendirmeli sitotoksiste (ADCC) ve komplement-bağılı sitotoksiste (CDC)'sini *in vitro* etkilediği gösterilmiştir ve bu, transmembran TNF- α eksprese eden hücrelerin sayısını azaltmak için başka bir etki mekanizması sağlar (45). Bu çalışmalar, hücre tükenmesi (ADCC ve CDC) ve hücre proliferasyonunun inhibisyonu (yüksek düzenleyici makrofaj fonksiyonu) yoluyla TNF- α inhibitörlerinin etkinliğine katkıda bulunan etki mekanizmalarına ek kanıtlar sağlamaktadır.

Sonuç olarak, TNF- α inhibitörleri esas olarak iki mekanizma ile etki etmektedir. İlk mekanizmada, antikor proinflammatuar aktiviteyi bloke eder ve bu nedenle çözümlü TNF- α 'yı nötrale ederek inflammatuar yanıtı inhibe eder. Bu mekanizma, tüm onaylanmış TNF- α inhibitörlerinin endikasyonlarında etkinlik için esastır. İkinci

mekanizma, inflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanılabilen transmembran TNF- α -pozitif hücre seviyelerini azaltmaktadır.

2.4 Stres Çalışmaları ve Analiz Metotları

Biyofarmasötikler başlıca kalite, güvenlik, saflık ve etki gücü (potency) açısından değerlendirilmektedirler ve bu alanlar birbirleri ile iç içe geçmiş kavramlardır; bunun için çeşitli analitik yöntemlerden faydalanılmaktadır (46). Biyofarmasötiklerin belirtilen kriterlere uygunluğu değerlendirilirken immünojenite en önemli konulardan biridir, çünkü immünojenite ürünün saflığı ile doğrudan ilişkilidir (47–50). Bu yüzden FDA, EMA, WHO gibi birçok otorite ürünün saflığının incelenmesi gerektiğini belirtmektedir. Bir biyobenzerin onayı, orijinal ilacın onaylanmasından çok daha fazla analitik inceleme ve derinlemesine işlevsel karakterizasyon gerektirir, çünkü bu bilgiler klinikte eşdeğer güvenlik ve etkinlik performansının göstergeleridir (20). Orijinal ürünü üretmek için kullanılanlardan tipik olarak daha kapsamlı ve çeşitli olan biyobenzerleri karakterize etmek için gelişmiş ortogonal analitik araçların kullanımı, biyobenzerlere güven oluşturmak için kritik öneme sahiptir. Ürün kalitesine odaklanmalarının sonucu olarak, AB'de birkaç yıldır erişilebilir olan ve ticari olarak pazarlanan biyobenzerler, referans ilaçlarla karşılaştırılabilir etkinlik ve güvenlik profillerine sahiptirler (20).

Hem fiziksel hem de kimyasal özellikler açısından stabilite, biyofarmasötiklerin kritik bir özelliğidir. Fiziksel kararsızlıklar, yüksek dereceli yapılardaki moleküler varyasyonları karakterize etmek için kullanılır ve molekül içinde tanımlanan konformasyonel değişiklikleri içerirler. Proteinlerdeki stres kaynaklı konformasyonel değişiklikler, doğal hallerinde buldukları üç boyutlu yapılarındaki değişikliklerle ilişkilidir. Ayrışma, adsorpsiyon, açılma, agregasyon, çökme ve denatürasyon dahil olmak üzere çok sayıda degradasyon mekanizması, proteinin ikincil ve üçüncül yapılarında fiziksel kararsızlığa neden olarak konformasyonel değişikliklere neden olabilir (6,51). Bu, geri dönüşü olmayan protein agregasyonu oluşumuna ve biyolojik aktivitenin azalmasına neden olabilir (6).

Mab'lar gibi çeşitli fonksiyonel gruplara sahip büyük ve karmaşık moleküller, çeşitli çevresel değişikliklere ve dış uyaranlara maruz kalma nedeniyle bozulmaya karşı hassastırlar (6). Kritik kalite özellikleri (CQA), ürün geliştirme ve kalite kontrol sırasında kullanılan ürün özellikleridir. Biyobenzer ve orijinatör ürünleri arasındaki CQA karşılaştırmaları, biyobenzer geliştirmede kritik bir aşamadır. Karşılaştırmanın sonuçları, klinik deneylerden önce ürünün güvenliğine ilişkin kritik bilgiler sağlar (51). Farklı hücre hattı kullanımı, üretim süreçleri, farklı tesislerde üretilmeleri, ve kullanılan başlangıç malzemelerinin farklı olması biyobenzer ile orijinatör ürün arasında farklılıklara neden olmaktadır (52). Moleküllerin davranışlarını stabilite ve stres testleri ile karşılaştırmak, biyobenzer geliştirmede kritik bir noktadır ve veriler kalite kontrol değerlendirmeleri için kullanılabilir (6,51,53,54). Terapötik proteinler üretim, doldurma ve bitirme, nakliye, depolama ve son uygulama boyunca bir dizi strese maruz kaldıklarından, dış stres faktörlerine nasıl tepki verdiklerini araştırmak hayati önem taşır (55). Hızlandırılmış stabilite ve stres çalışmaları, stabilite gösteren deneylerin geliştirilmesine ve doğrulanmasına yardımcı olmak için yüksek seviyede ilaç degradasyon ürünü (%5-30) sağlayabilirken, gerçek zamanlı stabilite çalışmalarının tamamlanması birkaç yıl alabilir (56).

Boyut, agregasyon, ve yük heterojenliği, mAb'ların moleküler yapılarını tanımlarken kullanılan ana faktörlerdir (57). Enzimatik ve enzimatik olmayan kırılmanın yanı sıra uyumsuz veya eksik disülfid bağ oluşumu, boyut değişiklikleriyle bağlantılıdır (58). Kırılmalar ve farklı disülfid bağ oluşumları antikörlerin boyut çeşitliliğine neden olurlar ve boyut varyantları ürünün etkililiği ve güvenliği için izlenmesi gerekir (58). Saflaştırılmış ürünler genellikle bir dereceye kadar heterojenlik içerdiğinden, bu yönleri de dikkate almak oldukça önemlidir (58). Agregasyon, insan popülasyonlarında çoğunlukla immünojenik olan temel bir heterojenliktir (59). Antikor agregasyon tipleri, kovalent ve kovalent olmayan etkileşimler, çözünürlük, tersinirlik, ve monomer denatürasyon derecesi gibi çeşitli parametrelere bağlıdır (60,61). Protein agregatları ve dimerler (yüksek molekül ağırlıklı varyantlar, HMW), görünmez parçacıklar ve hatta görünür parçacıklardan oluşabilir ve immün sistem tarafından proteinin doğal formuna kıyasla daha kolay tanımlandıkları düşünülmektedir (62). Canlı hücrelerde mAb sentezi sırasında

proteinlerin katlanması ve disülfit bağı eşleşmesi her zaman doğru şekilde gerçekleşmeyebilir. Ayrıca, kültür ortamının veya sıcaklık, pH gibi değişkenlerin neden olduğu stres daha fazla heterojenliğe yol açabilir (26). Üretim, depolama, nakliye, hasta teslimi sırasında gelişebilirler ve bu işlemler sırasında maruz kaldıkları çeşitli stres faktörleri (sıcaklık dalgalanmaları, ışık, sallama, yüzeyler, pH değişiklikleri, donme/çözünme vb.) tarafından indüklenebilirler (62). Protein agregatlarını incelemenin zorluğu, agregatların bilinmeyen doğasından ve onların büyük boyut aralığında (birkaç nm'den birkaç milimetreye kadar) görülebilmelerinden kaynaklanmaktadır (62). Antikor yapısındaki değişiklikler, ancak altta yatan süreçler iyi anlaşılırsa tam olarak anlaşılabilir.

Post-translasyonel modifikasyonların (PTM) biyolojik fonksiyon, verimli sekresyon, farmakolojik etkinlik, ve terapötik antikorlardaki stabilitesi üzerinde etkisi olabilir (63). Hücre içinde gerçekleşen PTM'lerden biri olan glikozilasyon immunoglobulinlerin etki mekanizması ve immünojenisitesi açısından oldukça önemlidir (22). Çok düşük miktarlarda sialilasyon içeren, fukozile, terminal β -galaktozilasyonu olan veya olmayan glikan yapıları bulunduran mAb'ların oligosakkarit yapıları oldukça stabildir ve bu nedenle, stres çalışmaları sırasında bu yapılar önemli bir faktör olarak değerlendirilmemektedir (5). Bununla birlikte, önemli düzeyde sialilasyona sahip mAb'ler için stres çalışmaları sırasında, oligosakkarit yapılarının degradasyonu değerlendirilmelidir (5). Oksidasyon, deamidasyon ve izomerizasyon etkileri, modifikasyonun konumu ile yakından ilişkilidir. Bir antikorun komplement belirleme bölgesinde (CDR) oluşan modifikasyonlar, hedef antijenlere bağlanma üzerinde negatif bir etkiye sahip olabilir, ancak Fc'nin sabit alanlarındaki değişikliklerin minimum etkisi vardır (64). Özellikle metiyonin (Met) ve triptofan (Trp) yan zincirlerinin oksidasyonunun, antikor yapısını (64–66) değiştirdiği, antikorun Fc reseptörlerine (64,67,68) ve antijenlere (64,69) bağlanmasını etkilediği, ve mAb stabilitesini ve yarı ömrünü etkilediği bilinmektedir (64,66,70). Ek olarak, modifikasyona daha açık Met gruplarının oksidasyonu, immünojenisiteyi artırabilir (64,71). Asparajinin (Asn) deamidasyonunun ve aspartik asit (Asp) izomerizasyonunun CDR bölgesinde oluşması, antikor bağlanma afinitesinde bir azalma ile sonuçlandığı gösterilmiştir (64,72–75).

Orijinatör ürünün ileri yöntemler ile karakterizasyonu sayesinde fizikokimyasal yapısı, biyolojik aktivitesi ve safsızlık özellikleri belirlenebilmektedir (48–50,76,77). Safsızlık seviyelerini gözleme ve kalite parametrelerinin değerlendirilmesi çalışmalarında, boyut ayırma kromatografisi (SEC), kapiler elektroforez-sodyum dodesil sülfat (CE-SDS) ve kapiler izoelektrik odaklama (cIEF) literatürde ve endüstride en çok kullanılan metotlardandır (48–50,53,76–80).

Protein agregatları veya protein parçacıklarının (ve genel olarak parçacıkların) analizi için birçok teknik bulunmaktadır. Bu teknikler, farklı deteksiyon yöntemlerinin yanı sıra farklı ayırmaya yöntemlerine dayanmaktadır (62). Görsel veya mikroskopik inceleme gibi nispeten temel tekniklerden, analitik ultrasantrifüj veya kütle spektrometrisi gibi yüksek teknolojiye kadar farklılık göstermektedir (62)

Yüksek performanslı boyut dışlama kromatografisinin (SEC) temel prensibi, solüsyon içindeki moleküller, gözenekli boncuklar içeren bir kolondan geçirilir. Küçük moleküller boncukların gözeneklerine girerken daha büyük moleküller veya agregatlar giremez; bu sebeple, küçük moleküller kolonda daha uzun bir yol alırlar ve daha uzun sürede detektöre ulaşırlar. Moleküller boyutlarına göre kolondaki gözeneklere girerler, bu nedenle analit molekülünün küresel olduğu varsayılırsa, moleküler ağırlığı tahmin etmek için elüsyon zamanı (moleküler ağırlık standartlarına göre) kullanılabilir (62,78,81). Bununla birlikte, çoğu molekül küresel olmama eğiliminde olduğundan ve aslında moleküler ağırlıktan ziyade hidrodinamik yarıçap ölçüldüğünden, moleküllerin ağırlıkları hakkında yaklaşık bir değer elde edilmektedir(62,78,81).

SEC yöntemi, biyofarmasötik endüstrisinde nispeten büyük kolonlarla rutin olarak 30-40 dakikalık analiz süresi ile gerçekleştirilmektedir. Ultra performanslı SEC kolonlarının kullanılması çalışma süresini yaklaşık 5 kat azaltmakta ve yöntemin ayırıştırma gücünü önemli ölçüde arttırmaktadır (78). SEC'de, zorlu mAb'lar veya antikor-ilaç konjugatları (ADC) ile silika bazlı durağan faz arasındaki spesifik olmayan kimyasal etkileşimler, kromatografik pik kuyruklanma ve/veya adsorpsiyona neden olarak HMW miktarının olduğundan az ölçülmesine yol açabilir

(78,82). Bu nedenle, zorlu hidrofobik numuneler (ADC'ler gibi) veya nispeten temel mAb'ler analiz edilirken mobil fazın optimizasyonunun dikkatli yapılması gereklidir. NaCl veya KCl ile kombinasyon halinde fosfat tamponları içeren uçucu olmayan mobil fazlar, SEC'de doğal koşullar altında proteinlerin analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür koşullar, analiz edilen proteinler ve SEC durağan faz arasındaki spesifik olmayan kimyasal etkileşimleri sınırlamak için tercih edilmektedir (78,82).

SEC yöntemi ile ölçülebilen agregat boyutunun bir üst sınırı vardır, çünkü daha büyük agregatlar sistemdeki fritler veya kolonun kendisi tarafından filtrelenebilir. Kaçırılacak başka bir agregat türü, çok düşük afiniteli moleküller arası birleşme sonucu oluşurlardır. Bu agregatlar, örneğin kromatografi sırasında değişen koşullardaki nedeniyle monomerlere ayrışabilir (62,78,81).

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE), uygun bir kantitatif boyama ve jel tarama yöntemi kullanıldığında, uygulanması kolay ve yaklaşık moleküler ağırlık ve miktar hakkında bilgi sağlayabilen yaygın olarak kullanılan, oldukça sağlam bir yöntemdir (62). SDS'nin varlığı, kovalent olmayan agregatların bozulmasını sağlar, bu nedenle yöntem sadece kovalent bağlı agregatları tespit etmektedir. İndirgeme koşulları kullanılırsa, SDS-PAGE, disülfid bağları tarafından bir arada tutulan agregatlar ile indirgenemez kovalent bağlar tarafından bir arada tutulan agregatlar arasında ayırım yapabilir (62). Günümüzde kantifikasyona daha uygun olması nedeniyle, kapiler elektroforez-sodyum dodesil sülfat (CE-SDS), SDS-PAGE'in yerine almaktadır. CE-SDS ile örnek analizinin otomasyonu ve boya yerine UV absorpsiyonu ile miktar tayini yapılabilmesi önemli avantajlar sağlamaktadır (62). SEC ile SDS-PAGE ve/veya CE-SDS'nin bir kombinasyonu genellikle kalite kontrol (KK) analizlerinin bir parçasıdır.

Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi'nin (USP) 129 numaralı monografına göre SEC, doğal koşullarda yüksek moleküler ağırlıklı türlerin (HMWS) belirlenmesi için sağlam bir yöntem olarak kabul edilirken, CE-SDS denatüre edici koşullarda düşük moleküler ağırlıklı türlerin (LMW) miktar tayini için daha güvenilirdir (83,84). CE-SDS'in örnekteki HMW miktarını belirleme gücü, denatüre etme işlemi gibi

örnek ön işlemleri sırasında ortaya çıkabilecek potansiyel artefaktlar nedeniyle genellikle SEC'inkinden daha düşüktür. MAb, SEC'de doğal koşullar altında test edildiğinden, monomer ve HMW'ler hakkında daha iyi bilgi sağlayabilir (84). CE-SDS, biyofarmasötik şirketleri ve düzenleyici makamlar, antikörlerin ve ilgili ürünlerin boyut varyantlarının analizi için kilit bir Kalite Kontrol (KK) yöntemi olduğunu belirtmektedirler. CE-SDS yöntemini önemli bir özelliği, Fc ve Fd fragmanlarının ayrımı açısından SEC'e kıyasla ek bilgi sağlamasıdır (83).

MAb saflığı ve safsızlıklarının analizi için yaygın bir yaklaşım olan kapiler elektroforez-sodyum dodesil sülfat (CE-SDS), biyofarmasötik endüstrisinde mAb ürün salımı testi, stabilite çalışması ve kalite özellikleri analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır. CE-SDS'de, mAb'lar ilk olarak negatif yükü iyi dağılmış bir protein-SDS kompleksi oluşturmak için yüksek sıcaklık altında SDS ile denatüre edilir. Daha sonra, protein-SDS komplekslerinin, moleküler elek olarak çalışan ve her bileşeni moleküler ağırlığına göre ayıran SDS jeli aracılığıyla belirli bir elektroforetik alan altında ayrımı gerçekleştirilir (84).

İndirgenmemiş CE-SDS (nrCE-SDS), bozulmamış türlerin miktarını (ana pik) ve parçalanma ürünlerinin kısmi indirgenmesinden kaynaklanan (örneğin Lys-Pro motifleri) LMW'leri değerlendirmek için kullanılır (83). Örnek hazırlamanın olumsuz etkisini en aza indirmek adına, serbest tiyolleri bloke etmek ve karıştırılmış disülfid bağlarının oluşumunu önlemek için genellikle alkilasyon reaktifi olarak genellikle iyodoasetamid (IAM) eklenmektedir (84). Ayrıca, CE-SDS ayrımını antikör zincirleri seviyesinde gerçekleştirmek için örnek jel tamponuna indirgeyici ajan eklenebilir. İndirgeyici koşullarda örnek, zincir-içi ve zincirler arası disülfid bağlarını parçalamak için indirgeyici reaktif olarak genellikle β -merkaptoetanol ile inkübe edilir. İndirgenmiş CE-SDS (rCE-SDS) yaygın olarak, hafif ve ağır zincirlerin nispi miktarlarını (beklenen yaklaşık %33 ve %67) ve ayrıca olası glikozile edilmemiş ağır zincirin (NG-HC) belirlenmesi için kullanılmaktadır (83).

Proteinlerin yük varyant analizlerinde tercihen katyon değişim kromatografisi (CEX), kapiler alan elektroforezi (CZE) ve kapiler izoelektrik odaklama (cIEF) yöntemleri kullanılmaktadır. Rekombinant proteinlerin, hemoglobin varyantlarının

ve mAb'ların yük varyantlarının analizi için cIEF, günümüzde endüstride yaygın olarak kullanılan katyon değişim kromatografisine (CEX) alternatif oluşturmaktadır (85). CEX'in aksine, cIEF daha basit bir şekilde optimize edilebilir, düşük hacimli ayırma ortamı ve numune tüketimi gösterir, ve durağan faz ile etkileşimi minimum düzeye indirir (85). Ayrıca, cIEF tüm kapiler elektroforez yöntemleri arasında en yüksek seçiciliği sunar. Bunun nedeni, analitlerin bir pH gradienti içinde spesifik pI'larına göre ayrılmasıdır (85,86). Görüntülemeli cIEF (icIEF), tekrarlanabilirliği, hızlı yöntem geliştirmesi, kısa ayırma süreleri, kullanım kolaylığı ve platform yöntemleri geliştirme olasılığı nedeniyle biyolojik ürünlerin yük heterojenliği analizi için en iyi yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir (86). Stres koşulları sırasında aminoasitlerin fonksiyonel gruplarında meydana gelen asidik veya bazik değişikliklerin toplu etkisini izlemek için en çok tercih edilen yöntemlerden biri cIEF'dir (53,78–80).

Tercih edilen stres koşullarını ve stres çalışmaları sırasında sonuçları değerlendirmek için kullanılan yöntemleri belirlemek için 12 ilaç firması ile yakın zamanda yapılan bir ankette, termal stres koşulu uygulamasının neden olduğu bozulma yolları nedeniyle formülasyon, raf ömrü, depolama, ve stabiliteyi belirlemek için en çok uygulanan stres koşulu olarak belirlenmiştir (51). Aynı ankette, SEC, CE-SDS ve cIEF, stres kaynaklı bozulma, ve bu yöntemlerle modifikasyonların izlenmesinin doğruluğu nedeniyle stres çalışmaları için en çok tercih edilen yöntemlerdir (51). Deamidasyon, amino-terminali piro-glutamik asit (*N*-term pE) oluşumu, oksidasyon ve karboksil-terminali lizin (*C*-term K) kesilmesi gibi peptit modifikasyonları, asidik ve bazik yük varyantlarına katkıda bulunan ana modifikasyonlardır. Ayrıca, bu modifikasyonların mAb'lerin yapısı ve stabilitesi üzerinde farklı etkileri vardır (54,87,88). Hücre hattı, üretim ve depolama koşullarındaki farklılıklar nedeniyle biyobenzer ve orijinatör arasında yapısal değişiklikler meydana gelebilir. Proses değişiklikleri minimum olduğunda bile, referans ürün ile önerilen biyobenzer ürün arasındaki yapısal ve fonksiyonel farklılıklara katkıda bulunabilen PTM'lerde sıklıkla görülmektedir (89).

Proteinlerde sekansa veya amino asitlere özgü PTM'leri saptamanın ve ölçmenin en etkili yöntemlerinden biri aşağıdan-yukarıya sıvı kromatografisi-sıralı kütle

spektrometresidir (LC-MS/MS). Proteinler, guanidin-HCl veya üre içinde denatüre edilir veya ditiyotritol (DTT) gibi indirgeme ajanları ile indirgenir, ardından peptitlerin alkilasyonu ve/veya tampon değişimi yapılır (64). Bu işlemlerden sonra, proteinleri sindirmek için tripsin veya diğer proteazlar kullanılır ve elde edilen peptitler ters faz kromatografi ile ayrılarak analiz için kütle spektrometresine gönderilir (64). Terapötik antikorlar geliştirilirken, farklı mAb modifikasyonlarını eşzamanlı tanımlayabilen bir yöntem kullanmak gerekmektedir ve bunun için ideal yöntem, yüksek tespit edebilme hassasiyeti ve seçiciliği nedeniyle aşağıdan yukarıya LC-MS/MS'dir (48,64). Bu çalışmada da SE-UPLC, CE-SDS, ve icIEF çalışmalarını desteklemek ve stres koşullarının hangi amino asitlerde hangi kimyasal modifikasyonlara yol açtığını araştırmak için LC-MS/MS yönteminden yararlanılmıştır.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

Oluşan değişimlerin gözlenmesinde SE-UPLC, CE-SDS, icIEF ve peptit haritalama yöntemlerinden yararlanılmıştır.

Bu aşamadan itibaren yazım sadeliği için biyobenzer örneği “BB”, orijinatör örneği “OR” olarak ifade edilmiştir. Stres uygulaması sonucunda örneklerde oluşan değişimlerin gözlenmesi için OR ürünün karakterizasyonu ve BB ürününün geliştirilmesi sırasında kullanılan analitik yöntemlerden yararlanılmıştır. Bu yöntemler, stres örneklerinin analizinden önce valide edilmiş yöntemlerdir.

3.1 Materyaller

SE-UPLC analizi için sodyum fosfat (Sigma Aldrich, Almanya), 188 mM sodyum klorür (Merck, Almanya), sodyum azid (Sigma Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. CE analizi için iyodoasetamid (Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır. icIEF analizi için geniş aralıklı ve dar aralıklı amfolitler (Pharmalyte, GE, ABD), pI belirteçleri 7,9 ve 10,0 (Protein Simple, ABD) kullanılmıştır. UPLC-ESI-QTOF-MS ile peptit haritalaması sırasında peptit sindirimi için Guanidin-HCl (Sigma Aldrich, Almanya) ve tripsin (Promega, ABD), indirgeme için DTT (Sigma Aldrich, Almanya) ve alkilasyon için iyodoasetamid (Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Kullanılan kimyasalların ve reaktiflerin tümü analitik derecededir.

Kimyasal oksidasyon ve asidik/bazik pH stres uygulamaları için H₂O₂ (Merck, Almanya), Sitrik asit monohidrat (Sigma Aldrich, Almanya), NaOH (Merck, Almanya), sodyum bikarbonat (Sigma Aldrich, Almanya) malzemeleri kullanılmıştır.

Kromatogramlar ve elektroferogramlar Empower 3 (Waters, Milford, ABD) yazılımı ile işlenmiştir.

3.2 Örnekler

Stres uygulamaları için, Çin hamster yumurtalık (CHO) hücreleri kullanılarak üretilen, standart kromatografik yöntemler kullanılarak saflaştırılan üç farklı biyobenzer TNF- α inhibitörü kullanılmıştır. Orijinatör TNF- α inhibitörü serileri yerel farmasötik ürün tedarikçisinden temin edilmiştir. Stres koşulları bütün örneklerle eş zamanlı olarak uygulanmıştır.

Orijinatör örnek miktarlarının kısıtlı olması nedeniyle, sadece termal stres koşulu üç farklı orijinatör serisine uygulanmıştır. Diğer stres koşulları bir orijinatör serisine uygulanmıştır.

3.3 Stres Koşulları ve Uygulamaları

Farklı stres koşulları BB ve OR örneklerine uygulanmıştır ve oluşan değişimler gözlenmiştir. Uygulanan stres koşulları Dondurma/Çözme (D/Ç) döngüsü, termal stres, kimyasal oksidasyon stresi ve farklı pH değerlerinde inkübasyon olarak sıralanabilir.

3.3.1 Dondurma/çözme (D/Ç) döngüsü

BB ve OR örneklerine, beş döngü D/Ç adımı uygulanmıştır. Formülasyon tamponuna da aynı stres koşulları uygulanmıştır. Dondurma $<-65^{\circ}\text{C}$ 'de minimum 30 dakika, çözdürme ise oda sıcaklığında ($20-25^{\circ}\text{C}$) en az 30 dakika ve statik bir şekilde çözülene kadar uygulanmıştır. Daha sonra strese uygulanan örnekler mikrotüplere porsiyonlanarak analize kadar $<-65^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

3.3.2 Termal stres

BB ve OR serileri, 7 gün boyunca Thermomixer (Eppendorf, Fransa) içinde herhangi bir çalkalama olmaksızın 37°C ve 50°C 'de inkübe edilmiştir. Formülasyon tamponuna da aynı stres koşulları uygulanmıştır. İlk örnekleme 3. günde ve ikinci örnekleme 7. günde gerçekleştirilmiştir. Termal stres koşulları formülasyon

tamponuna da uygulanmıştır. Stres uygulamasından sonra numuneler analize kadar $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

3.3.3 Kimyasal oksidasyon

BB ve OR örnekleri, iki farklı H_2O_2 seviyesinde 24 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek kimyasal oksidasyon stresi uygulanmıştır. Örnekler, 1:1 oranında, %1,0 ve %3,0 H_2O_2 içeren solüsyonlar ile karıştırılarak son H_2O_2 miktarı %0,5 ve %1,5 olacak şekilde inkübe edilmişlerdir. Negatif kontrol olarak formülasyon tamponuna aynı işlemler uygulanmıştır. İnkübasyon sırasında örnekler karanlık ortamda ve oda sıcaklığında ($20-25^{\circ}\text{C}$) muhafaza edilmişlerdir. Stres uygulaması sonunda örnekler bekletilmeden analiz edilmişlerdir.

3.3.4 Asidik ve bazik pH stresi

BB ve OR örnekleri, 1:1 (hacim:hacim) oranında asidik çözelti (100 mM Sitrik Asit pH 3,0) ve 100 μL bazik çözelti (200mM Sodyum Bikarbonat pH 9,0) ile karıştırılarak inkübe edilmiştir. Örnekler asidik ve bazik çözeltiler ile karıştırıldıktan sonra 37°C 'de 24 saat ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Asidik ve bazik stres koşulları formülasyon tamponuna da uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler analiz edilene kadar $< -65^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

Asidik pH stresi sonunda, hem BB hem de OR ürünleri tamamen degrade olmuşlardır; bu nedenle değişimler sayısal olarak gözlenememiştir. Buna bağlı olarak, hem BB hem de OR ürünü, daha hafif bir stres koşulu hazırlamak amacıyla, 100 mM sitrik asit pH 3,5 solüsyonu ile 1:1 (v:v) oranında karıştırılarak 3 saat ve 6 saat inkübe edilmiş, ve inkübasyon sonunda ölçümleri yapılmıştır. Bu örnekler ile peptit haritalama analizleri yapılmamıştır.

3.4 Boyut Ayırma - Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (SE-UPLC)

SE-UPLC analizi ile örneklerdeki monomer, agregat (veya HMW) ve fragment düzeyleri incelenmiştir. Çalışma, Acquity H-Class Bio (Waters, ABD) sisteminde,

BEH SEC200 (Waters, ABD) kolonu (200 Å, 1,7 µm, 4,6 mm x 300 mm) kullanılarak titanyum akış hücresi bulunduran UV dedektörü ile gerçekleştirilmiştir. pH 7,4'te 20 mM sodyum fosfat ile 188 mM sodyum klorürden oluşan mobil fazın izokratik akışı ayırma için kullanılmıştır. Örnek, formülasyon tamponu ile 2,5 mg/mL'ye seyreltilerek kolona 2,5 µL miktarda enjekte edilmiştir. UV tespiti, 20 dakikalık çalışma süresi boyunca 280 nm'de uygulanmıştır.

3.5 İngirgenmemiş (nr) ve İndirgenmiş (r) Kapiler Elektroforez – Sodyum Dodesil Sülfat (nrCE-SDS ve rCE-SDS)

CE-SDS analizi ile indirgenmemiş ve indirgenmiş koşullarda numunelerin saflık/safsızlık düzeylerini değerlendirilmektedir. Hem nrCE-SDS hem de rCE-SDS analizi, foto diyot dizisi (PDA) dedektörlü Sciex PA 800 Plus sisteminde gerçekleştirilmiştir. 100x200 µm açıklık ve SDS-MW jel tamponu (Sciex, ABD) ile 50 µm iç çap x 20 cm dedektör uzunluğu olan modifiye edilmemiş silika kapiler (Sciex, ABD) ayırma için kullanılmıştır. İndirgenmemiş numuneler 250 mM iyodoasetamid ve SDS-MW numune tamponu (Sciex, ABD) ile hazırlanmıştır. İndirgenmiş numuneler, β-merkaptoetanol (Merck, Almanya) ve aynı SDS-MW numune tamponu yardımıyla hazırlanmıştır. Örneklerdeki toplam protein miktarı 50 µg olacak şekilde dilüsyonlar yapılmıştır. Örnekler, 20 saniye boyunca ters polaritede 5 kV'da kapilere enjekte edilmiştir. Hem indirgenmemiş hem de indirgenmiş numuneler için 15 kV'da 40 dakika ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Veriler, referans kanalı 350±10 nm'ye ayarlanarak 220 nm'de toplanmıştır. İndirgenmiş ve indirgenmemiş koşullarda gözlemlenen bileşenlerin elektroferogramları 32 Karat (Sciex, ABD) programı ile kaydedilmiş ve zaman düzeltilmiş % alanları (TCA) Empower 3 programı ile işlenmiştir.

3.6 Görüntülemeli Kapiler İzoelektrik Fokuslama (icIEF)

Örneklerin yük varyasyonları icIEF metodu ile gözlenmiştir. Florokarbon kaplı kapiler (100 µm iç çap × 50 m) kullanılarak iCE3 (Protein Simple, ABD) kapiler elektroforez cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Geniş aralıkta 3-10 amfolit ve dar aralıkta 7-9 amfolit (GE, ABD), 1:3 oranında (v/v) kullanılarak pH gradienti oluşturulmuştur.

Ön odaklama 1,5 kV ile 1 dakika, odaklama 3 kV ile 6 dakika boyunca uygulanmıştır. Elektroferogramlar 280 nm'de UV dedektörü kullanılarak iCE CFR (Protein Simple, ABD) yazılımı ile toplanmıştır. Örnekler, proteinlerin C-terminal ucundaki Lys ve Arg kalıntılarını seçici olarak ayıran karboksipeptidaz B (Cp β) ile işlenmiştir. Tüm adımlar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir ve örnek ekipman içinde 10°C'de saklanmıştır. Veriler Empower 3 yazılımı (Waters, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Karboksil terminalinde (C-term) lizin (Lys) ve arjinin (Arg) aminoasitlerini bulunduran varyantların yüksek olduğu örneklerde, bu aminoasitler, diğer bazik varyantları maskelendiğinden dolayı, değişimler iyi görülemeyebilir (90). Bu nedenle, örnekler analiz öncesinde C-term bulunan Lys ve Arg aminoasitlerini seçici olarak kesen karboksipeptidaz- β (Cp β) ile (1:20, protein:enzim oranında, w/w) 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Örneklerin % alanları Empower 3 programı ile işlenmiştir.

3.7 Peptit Haritalama Analizi

Stres koşulları nedeniyle oluşan post-translasyonel modifikasyonları (PTM) gözlemek için peptit haritalama analizinden yararlanılmıştır. BB ve OR örneklerinde stres sonrası oluşan modifikasyonları daha detaylı görmek amacıyla birer enjeksiyon yapılmıştır.

Peptit haritalama analizleri Xevo G2-XS QToF kütle spektrometresine (Waters, Milford, MA, ABD) bağlı bir UPLC (Acquity H-Class Bio, Waters) ekipmanında gerçekleştirilmiştir. Cihaz, 1 s tarama hızı ile m/z 50 – 2000 kütle aralığında pozitif iyon modunda çalışan bir elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı ile donatılmıştır. UPLC-ESI-QTOF-MS sisteminin kontrolü ve elde edilen verilerin işlenmesi, UNIFI™ Bilimsel Bilgi Sistemi (v1.9.4) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Örnekler, 100 μ g mAb bulunduracak şekilde seyreltilip guanidin hidroklorür ile denatüre edildikten sonra, sırasıyla 30 dakika boyunca indirgeme (DTT ile) ve alkilasyon (iyodoasetamid ile) aşamaları takip edilmiştir. Tampon amonyum bikarbonata değiştirildikten sonra, son miktar %0,1 olacak şekilde RapiGest™ sürfaktan eklenerek, 30 dakika boyunca 37°C'de bir tripsin sindirimi (enzim: substrat

oranı 1:25 w/w) uygulanmıştır. Enzimatik aktivite trifloroasetik asit (TFA) eklenerek durdurulmuştur. Peptitler, 90 dakikalık gradyan programı ile BEH C18 kolonu (100 x 2,1 mm, 1,7 µm, 300 Å, Waters) kullanılarak uygulanan ters faz kromatografisi ile ayrılmıştır. A, B ve C adlı mobil fazları, sırasıyla, %100 su, %100 asetonitril, ve %1 sulu TFA'dan oluşmaktadır. Akış hızı 0,25 mL/dk'ya, kolon sıcaklığı 40 °C'ye ayarlanmıştır. UV dedektörü ile 214 nm dalgaboyunda, tüm veri toplama adımlarında referans kilit kütlesi olarak Leu-enkephalin (m/z 556.2766) kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Analizler pozitif iyon duyarlılığı modunda gerçekleştirilmiştir. Kapiler ve koni voltajları sırasıyla 1 kV ve 25 V olarak ayarlanmıştır. Kaynak ve desolvasyon sıcaklıkları sırasıyla 100°C ve 350°C'ye ayarlanmıştır. Örneklem konisi ve desolvasyon gazı akışları sırasıyla 50 L/saat ve 800 L/saat olacak şekilde ayarlanmıştır.

Peptit modifikasyonlarının yanlış tespitini ortadan kaldırmak için veri filtresi kullanılmıştır. 70 dakikadan daha yüksek alıkonma süresine ve > 8 ppm kütle hatasına sahip olan peptitler hariç tutulmuştur. PTM seviyeleri, metionin (Met) / triptofan (Trp) oksidasyonu, asparagin (Asn) deamidasyonu, *N*-terminal piroglutamik asit (*N*-term pE) oluşumu, ve *C*-terminal lizin (*C*-term K) kesilmesi için taranmıştır.

3.8 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için Graphpad Prism 9.1.3 (San Diego, ABD) programı kullanılmıştır. Biyobenzer ve orijinatör örnek gruplarının strese verdiği tepkileri karşılaştırmak için iki istatistiksel analiz uygulanmıştır. Stres uygulanmış örnekler, %95 güven düzeyi ile 2 yönlü ANOVA ve Dunnett'in Çoklu Karşılaştırma testi kullanılarak, stres uygulanmamış kontrol örnekleriyle karşılaştırılmıştır. Degradasyon oranını karşılaştırmak için ANCOVA analizinin ilk basamağı kullanılarak biyobenzer ve orijinatör örnek gruplarından oluşturulan lineer eğrilerin eğimleri karşılaştırılmıştır (91,92).

4 BULGULAR

Beş farklı stres koşulu uygulanan BB ve OR serilerinin analizleri sonrası elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir. Stres uygulanmış örnekler ile kontrol örneklerinden elde edilen sonuçlar BB ve OR gruplarının kendi içinde karşılaştırılmışlardır. Karşılaştırma için ANOVA ve Dunnett'in çoklu karşılaştırma yöntemi kullanılmıştır.

4.1 Dondurma/Çözme Döngüsü

D/Ç döngüsü beş kez uygulandıktan sonra SE-UPLC, nr-CE-SDS, r-CES-SDS, icIEF, ve peptid haritalama analizleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen analizlerin özeti Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. D/Ç döngüsü sonuçları. Yüzde değerleri ortalama \pm SD olarak verilmiştir.

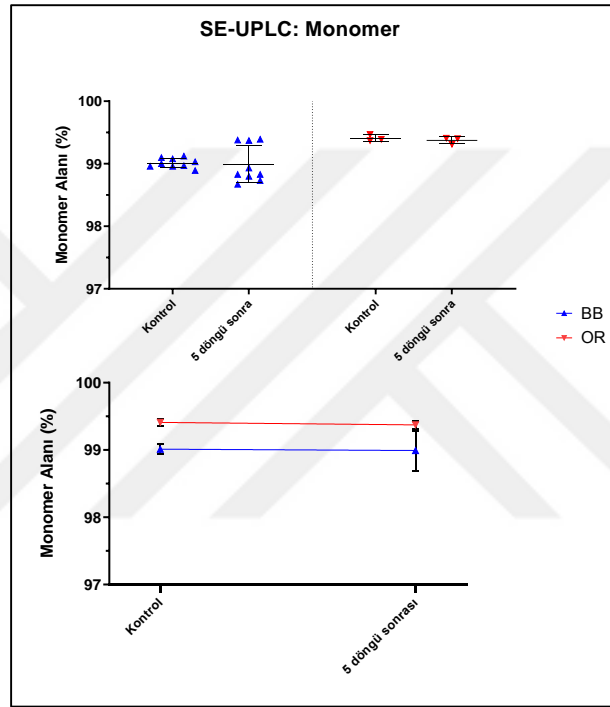
		OR			BB		
		Kontrol	5 D/Ç döngüsü	P değeri	Kontrol	5 D/Ç döngüsü	P değeri
SEC	Monomer	99,41 \pm 0,53	99,37 \pm 0,06	>0,9999	99,01 \pm 0,08	98,99 \pm 0,30	>0,9999
	IgG	96,64 \pm 0,16	97,42 \pm 0,02	0,0254*	95,74 \pm 0,53	96,43 \pm 0,23	0,0020*
CE-SDS	LC + HC	99,08 \pm 0,01	99,07 \pm 0,05	>0,9999	99,66 \pm 0,11	99,67 \pm 0,03	>0,9999
	Ana Yük Varyantı	80,71 \pm 1,25	80,48 \pm 0,57	0,9661	74,98 \pm 1,65	75,67 \pm 0,50	0,4374
iCE	Toplam Asidik Varyantlar	15,86 \pm 1,17	15,81 \pm 0,21	0,9993	22,52 \pm 2,23	21,35 \pm 0,46	0,3814
	Toplam Bazik Varyantlar	3,44 \pm 0,08	3,72 \pm 0,36	0,8424	2,25 \pm 0,62	2,98 \pm 0,30	0,0943

*istatistiksel anlamlı fark

Tablo 2'de karşılaştırma sonucunda anlamlı fark sadece nrCE-SDS analizinde gözlenmiştir. Bu analiz sonucunda nrCE-SDS elde edilen parçalanmamış IgG miktarları karşılaştırmalarından elde edilen P değerleri OR grubu için 0,0254, BB grubu için 0,002 olarak hesaplanmıştır.

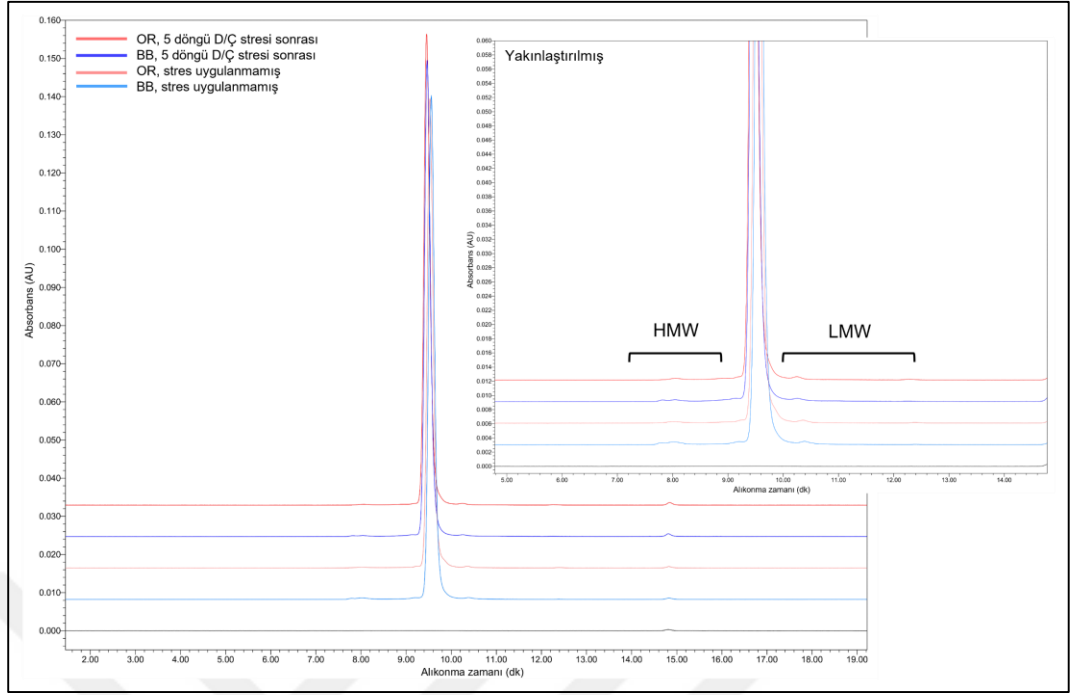
4.1.1 SE-UPLC sonuçları

Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. D/Ç stresi uygulanmış BB (n=9) ve OR (n=3) örneklerinin ortalamalarının kontrol ortalamasından farkları sırasıyla, %0,02 ve %0,04 olarak belirlenmiştir. Eğimler arasında anlamlı fark bulunmadığı (p=0,93) belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. D/Ç stresi, SE-UPLC analizi ile elde edilen monomer alanı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.

Stres uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin kromatogramları Şekil 5'te verilmiştir. HMW ve LMW miktarlarında görünür bir artış olmadığı gözlenmiştir.

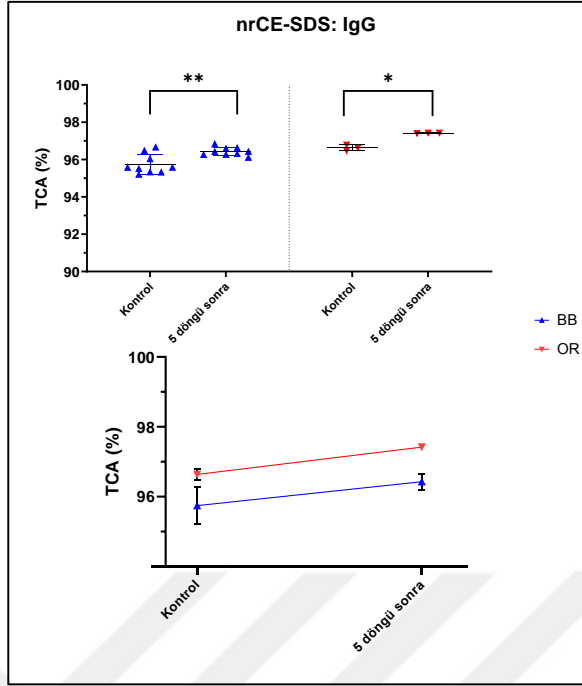


Şekil 5. D/Ç stresi uygulanmış ve stres uygulanmamış örneklerin UV kromatogramlarının üst üste karşılaştırmaları

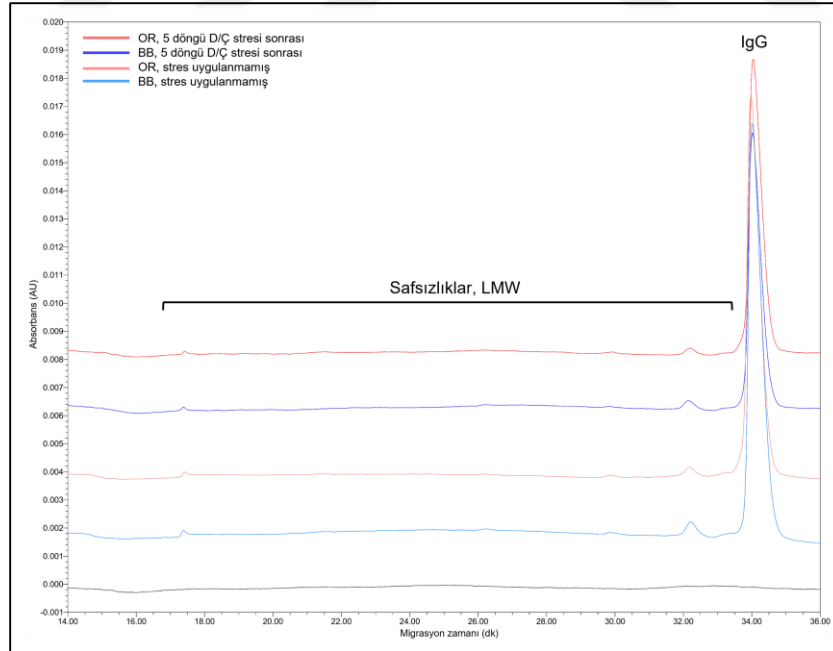
4.1.2 nrCE-SDS sonuçları

Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. D/Ç stresi uygulanmış BB (n=9) ve OR (n=3) örneklerinin ortalamalarının kontrol ortalamasından farkları sırasıyla, %0,69 ve %0,78 olarak belirlenmiştir. Elde edilen lineer eğri eğimlerinin karşılaştırılması sonucunda, eğimler arasında anlamlı fark bulunmadığı ($p=0,77$) belirlenmiştir (Şekil 6). Ancak, BB ve OR örneklerinin grup içindeki kontrol örnekleri ile yapılan karşılaştırmalarında anlamlı fark olduğu görülmüştür (Tablo 2).

D/Ç stresi uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin nrCE-SDS elektrogramları Şekil 7’de verilmiştir. Beş döngü sonunda LMW miktarlarında artış gözlenmemiştir.



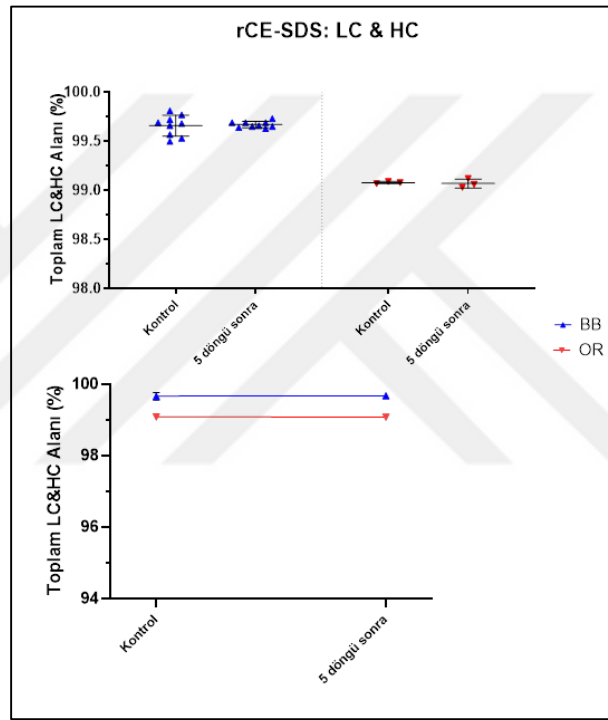
Şekil 6. D/Ç stresi, nrCE-SDS analizi ile elde edilen toplam IgG %TCA sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.



Şekil 7. D/Ç stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı nrCE-SDS PDA elektrogramları

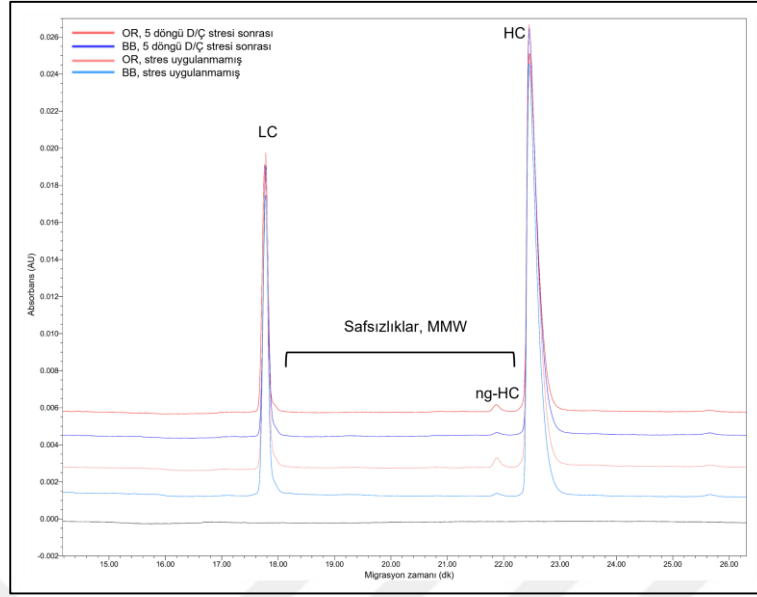
4.1.3 rCE-SDS sonuçları

Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. D/Ç stresi uygulanmış BB (n=9) ve OR (n=3) örneklerinin ortalamalarının kontrol ortalamasından farkları sırasıyla, %0,01 ve %0,01 olarak belirlenmiştir. Elde edilen lineer eğri eğimlerinin karşılaştırılması sonucunda, eğimler arasında anlamlı fark bulunmadığı (p=0,76) belirlenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. D/Ç stresi, rCE-SDS analizi ile elde edilen toplam LC&HC % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.

D/Ç stresi uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin rCE-SDS elektrogramları Şekil 9’da verilmiştir. Beş döngü sonunda LMW veya orta moleküler ağırlık (MMW) piki gözlenmemiştir. Ayrıca, glikozile olmamış ağır zincir (ng-HC) pikinde artış görülmemiştir.



Şekil 9. D/Ç stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı rCE-SDS PDA elektrogramları

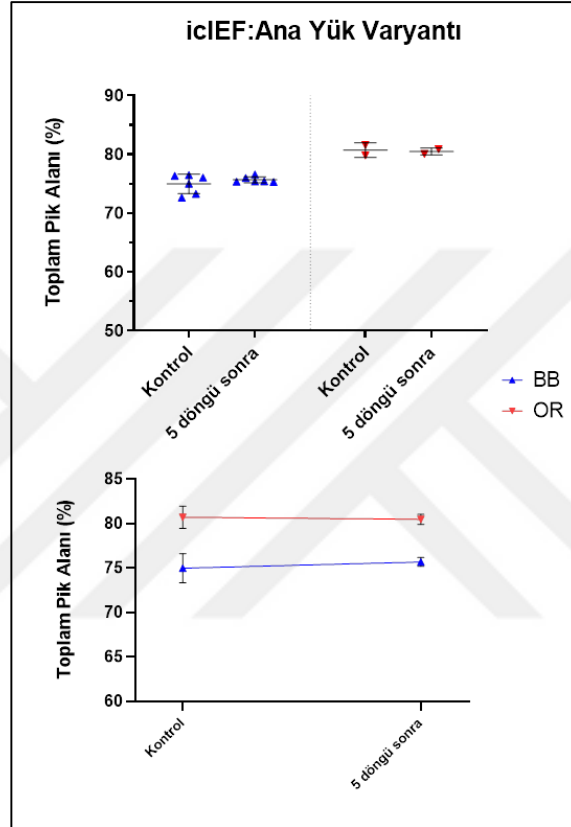
4.1.4 icIEF sonuçları

Üç farklı BB serisinin iki tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin iki tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. D/Ç stresi uygulanmış BB (n=6) ve OR (n=2) örneklerinin ana yük varyantı ortalamalarının kontrol örneklerinin ortalamasından farkları sırasıyla, %0,70 ve %0,23 olarak belirlenmiştir. Elde edilen lineer eğri eğimlerinin karşılaştırması sonucunda, eğimler arasında anlamlı fark bulunmadığı (p=0,51) belirlenmiştir (Şekil 10).

Oksidasyon stresi uygulanan BB ve OR örneklerinin, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin icIEF elektrogramları Şekil 9'da verilmiştir. D/Ç stresi sonrasında, BB ve OR örneklerinin yük varyantlarında bir değişim gözlenmemiştir.

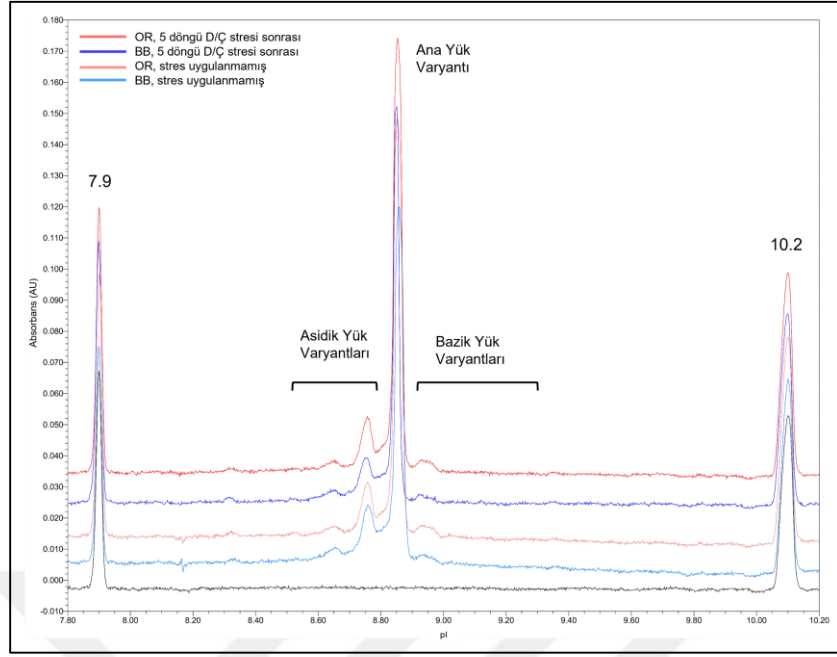
D/Ç stresi uygulanan BB ve OR örneklerinin, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin icIEF elektrogramları Şekil 11'de verilmiştir. BB ve OR örneklerinde, D/Ç stresi sonucunda yük varyantlarında değişim gözlenmemiştir.

D/Ç stresi uygulanmış BB (n=6) ve OR (n=2) örneklerinin asidik yük varyantı ortalamalarının kontrol örneklerinin ortalamasından farkları sırasıyla, %1,16 ve %0,05 olarak belirlenmiştir. Elde edilen lineer eğri eğimlerinin karşılaştırması sonucunda, eğimler arasında anlamlı fark bulunmadığı (p=0,53) belirlenmiştir (Şekil 12).

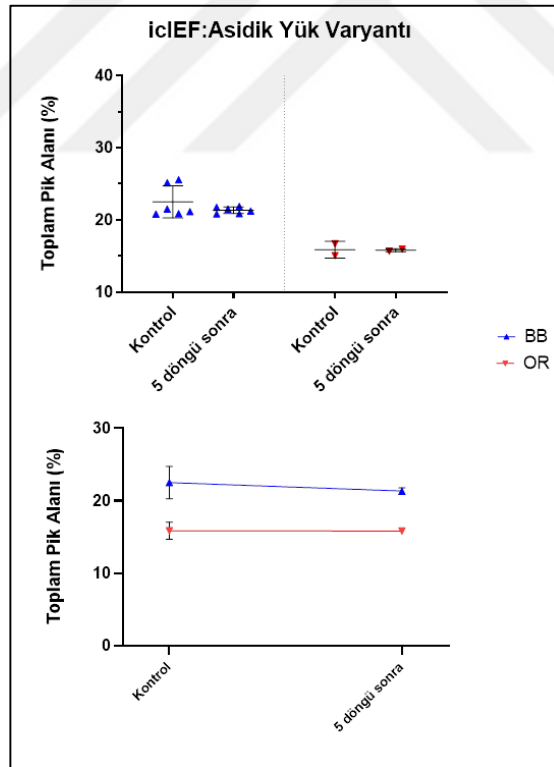


Şekil 10. D/Ç stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam ana yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.

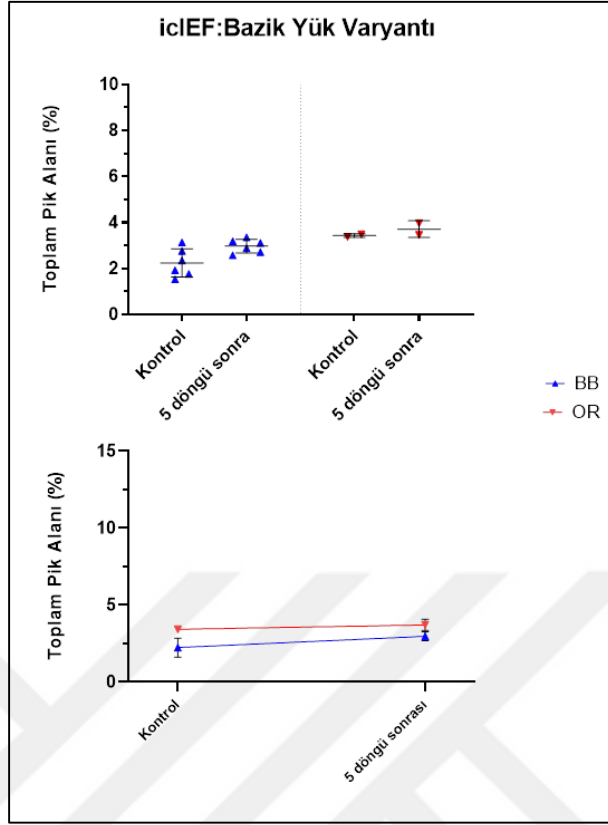
D/Ç stresi uygulanmış BB (n=6) ve OR (n=2) örneklerinin bazik yük varyantı ortalamalarının kontrol örneklerinin ortalamasından farkları sırasıyla, %0,73 ve %0,28 olarak belirlenmiştir. Elde edilen lineer eğri eğimlerinin karşılaştırılması sonucunda, eğimler arasında anlamlı fark bulunmadığı (p=0,41) belirlenmiştir (Şekil 13).



Şekil 11. D/Ç stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı icIEF UV elektrogramları



Şekil 12. D/Ç stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam asidik yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt)



Şekil 13. D/Ç stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam bazik yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt)

4.1.5 Peptit haritalama sonuçları

BB ve OR serilerinin tek enjeksiyon ile yapılan sonuçları Tablo 3'te verilmiştir. D/Ç stresi uygulanmış BB ve OR örneklerinin kontrol ve stres PTM seviyeleri karşılaştırıldığında, en büyük değişim BB örneğinin ağır zincir:triptik peptit 8'in (HC:T8) deamidasyon seviyesinin %0,22 artarak, yaklaşık 2 katına çıkması olarak gözlenmiştir. OR örneğinin kontrol örneğinde, HC:T3 ve HC:T39 peptitlerinin oksidasyon miktarları, sırasıyla, %1,28 ve %1,07 ölçülmüşken, stres sonrası örneğinde bu peptitler gözlenmemiştir. OR örneği için en yüksek değişim, HC:T19 peptidindeki oksidasyon miktarının %0,17 artışı olarak gözlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. D/Ç stresi kontrol ve stres örneklerinin PTM değerleri (%)

Modifikasyon	Zincir:Peptit Numarası	Peptit Sekansı	Pozisyon	BB		OR	
				Kontrol	D/Ç	Kontrol	D/Ç
N-term pE	HC:T1	EVQLVESGGGLVQPGR	1	0,94	0,97	1,56	1,6
C-term K	HC:T40	SLSLSPGK	451	14,68	14,6	17,09	16,7
Oksidasyon	LC:T1	DIQMTQSPSSLSASVGDR	4	0,67	0,6	0,27	0,29
	HC:T3	LSCAASGFTFDYAMHWVR	34	1,38	1,51	1,28	ND
	HC:T8	NSLYLQMNSLR	83	1,11	1,09	0,4	0,41
	HC:T19	DTLMISR	256	4,17	4,65	3,53	3,7
	HC:T39	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	432	2,06	2,29	1,07	ND
Deamidasyon	LC:T13	SGTASVVCLLNIFYPR	137/138	0,27	0,23	0,3	0,26
	HC:T8	NSLYLQMNSLR	77/84	0,24	0,46	0,4	0,32
	HC:T24	VVSVLTVLHQDWLNGK	319	0,37	0,35	0,67	0,66
	HC:T35	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	388/393/394	2,1	2,73	3,64	3,31

4.2 Termal Stres

Termal stres inkübasyonu hem 37°C hem de 50°C'de 7 gün sürmüştür. Termal stres 50°C koşulu uygulanmadan önce 60°C koşulu denenmiştir. Ancak bu sıcaklıkta inkübasyon sonucunda, örneklerde jelleşme gözlenmiştir ve analiz edilemez hale gelmişlerdir. Bu nedenle yüksek sıcaklık derecesi olarak 50°C uygulanmıştır. Bu süre zarfında, 3. günde iki farklı sıcaklıkta inkübe edilen örneklerden birer porsiyon alınarak <-65°C'ye kaldırılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tüm örnekler analize kadar <-65°C'de saklanmıştır. Termal stres örnekleri ile SE-UPLC, nr-CE-SDS, r-CES-SDS, icIEF, ve peptit haritalama analizleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen analizlerin sonuçlarının özeti 37°C'de inkübe edilen örnekler için Tablo 4'te, 50°C'de inkübe edilen örnekler için Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 4. Termal stres 37°C’de 3 gün ve 7 gün inkübasyon sonuçları. Yüzde değerleri ortalama ± SD olarak verilmiştir.

		OR					BB				
		Kontrol	3 gün	P değeri	7 gün	P değeri	Kontrol	3 gün	P değeri	7 gün	P değeri
SEC	Monomer	99,18±0,06	98,85±0,10	0,0003*	98,59±0,11	<0,0001*	99,01±0,08	98,70±0,16	0,0048*	98,31±0,16	<0,0001*
CE-SDS	IgG	97,12±0,12	97,06±0,41	0,9108	96,36±0,25	0,0003*	95,74±0,53	95,50±0,37	0,2408	95,19±0,56	0,0409*
	LC + HC	99,02±0,14	98,87±0,14	0,0004*	98,85±0,14	0,0011*	99,66±0,11	99,56±0,05	0,1048	99,42±0,05	0,0005*
	Ana Yük Varyantı	79,60±1,13	74,88±0,57	0,0012*	72,78±0,48	0,0002*	76,27±0,74	74,90±0,47	0,0025*	70,59±1,68	0,0024*
iCE	Toplam Asidik Varyantlar	16,62±0,83	20,86±0,54	0,0003*	22,63±0,37	<0,0001*	22,52±2,23	22,29±0,33	0,959	25,68±1,41	0,001*
	Toplam Bazik Varyantlar	3,78±0,49	4,26±0,29	0,1807	4,59±0,23	0,0425*	2,25±0,62	2,82±0,30	0,0345*	3,73±0,41	0,0155*

*istatistiksel anlamlı fark

Tablo 5. Termal stres 50°C 3 gün ve 7 gün inkübasyon sonuçları. Yüzde değerleri ortalama ± SD olarak verilmiştir.

		OR					BB				
		Kontrol	3 gün	P değeri	7 gün	P değeri	Kontrol	3 gün	P değeri	7 gün	P değeri
SEC	Monomer	99,18±0,06	97,84±0,15	<0,0001*	96,33±0,24	<0,0001*	99,01±0,08	97,83±0,15	<0,0001*	96,53±0,30	<0,0001*
CE-SDS	IgG	97,12±0,11	95,10±0,41	<0,0001*	93,84±0,39	<0,0001*	95,74±0,53	94,08±0,54	<0,0001*	91,44±0,61	<0,0001*
	LC + HC	99,02±0,14	98,36±0,13	<0,0001*	98,06±0,09	<0,0001*	99,66±0,11	99,39±0,06	0,0012*	98,53±0,06	<0,0001*
	Ana Yük Varyantı	79,60±1,13	64,54±0,39	<0,0001*	53,04±1,06	<0,0001*	74,98±1,65	62,60±2,92	0,0009*	48,56±1,66	<0,0001*
iCE	Toplam Asidik Varyantlar	16,62±0,83	29,17±0,24	<0,0001*	39,78±0,97	<0,0001*	22,52±2,23	30,54±0,19	0,0004*	45,62±1,58	<0,0001*
	Toplam Bazik Varyantlar	3,78±0,49	6,28±0,28	<0,0001*	7,18±0,29	0,0002*	2,25±0,62	5,14±0,33	0,0003*	5,82±0,53	<0,0001*

*istatistiksel anlamlı fark

OR örneklerine 3 gün 37°C’de uygulanan stres inkübasyonu sonunda, kontrol örneğine göre anlamlı farklar gözlenmemiştir (Tablo 4). BB örneklerine 3 gün 37°C’de uygulanan stres inkübasyonu sonunda, parçalanmamış IgG (p=0,24) ve toplam asidik varyantlar (p=0,96) dışındaki sonuçlarda anlamlı farklar gözlenmiştir (Tablo 4). OR örneklerine 7 gün 37°C’de uygulanan stres inkübasyonu sonunda, kontrol örneğine göre anlamlı fark sadece toplam bazik varyant sonucunda gözlenmemiştir (p=0,18); diğer sonuçların kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olduğu gözlenmiştir (Tablo 4). BB örneklerine 3 gün 37°C’de uygulanan stres inkübasyonu sonunda, parçalanmamış IgG (p=0,24) ve toplam asidik varyantlar (p=0,24) dışındaki sonuçlarda anlamlı farklar gözlenmiştir (Tablo 4). BB örneklerine 7 gün 37°C’de uygulanan stres inkübasyonu sonunda, kontrol örneğine göre anlamlı

fark sadece % LC&HC sonucunda gözlenmemiştir ($p=0,11$); diğer sonuçların kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olduğu gözlenmiştir (Tablo 4).

BB ve OR örneklerine 3 gün ve 7 gün 50°C 'de uygulanan stres inkübasyonu sonunda, kontrol örneğine göre anlamlı farklar gözlenmiştir (Tablo 5). Sadece OR örneğinin toplam bazik varyant seviyesinde, 7 gün 50°C 'de uygulanan stres sonucu anlamlı olarak farklı çıkmamıştır ($p=0,07$).

4.2.1 SE-UPLC sonuçları

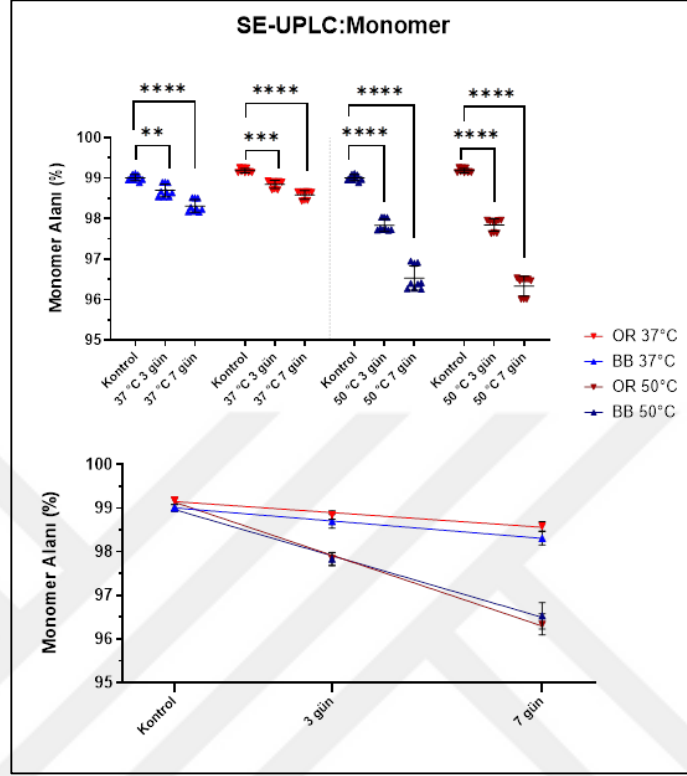
Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki sıcaklık koşulu ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 14'te gösterilmiştir.

3 gün boyunca 37°C termal stres uygulanmış BB ($n=9$) ve OR ($n=9$) örneklerinin monomer % değerlerinin ortalamalarının kontrol monomer % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %0,32 ve %0,34 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 37°C 'de 7 gün inkübasyonu sonunda monomer % değeri farkı BB için %0,70, OR için %0,60 olduğu gözlenmiştir. 3 gün boyunca 50°C termal stres uygulanmış BB ($n=9$) ve OR ($n=9$) örneklerinin monomer % değerlerinin ortalamalarının kontrol monomer % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %1,18 ve %1,34 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 50°C 'de 7 gün inkübasyonu sonunda monomer % değeri farkı BB için %2,48, OR için %2,85 olduğu gözlenmiştir.

BB ve OR örneklerinin, 37°C 'de 7 gün termal stres inkübasyonu sonrasında HMW miktarındaki değişim, sırayla, %0,36 ve %0,19 olarak gözlenmiştir. BB ve OR örneklerinin, 50°C 'de 7 gün termal stres inkübasyonu sonrasında HMW miktarındaki değişim sırayla, %0,75 ve %0,52 olarak gözlenmiştir.

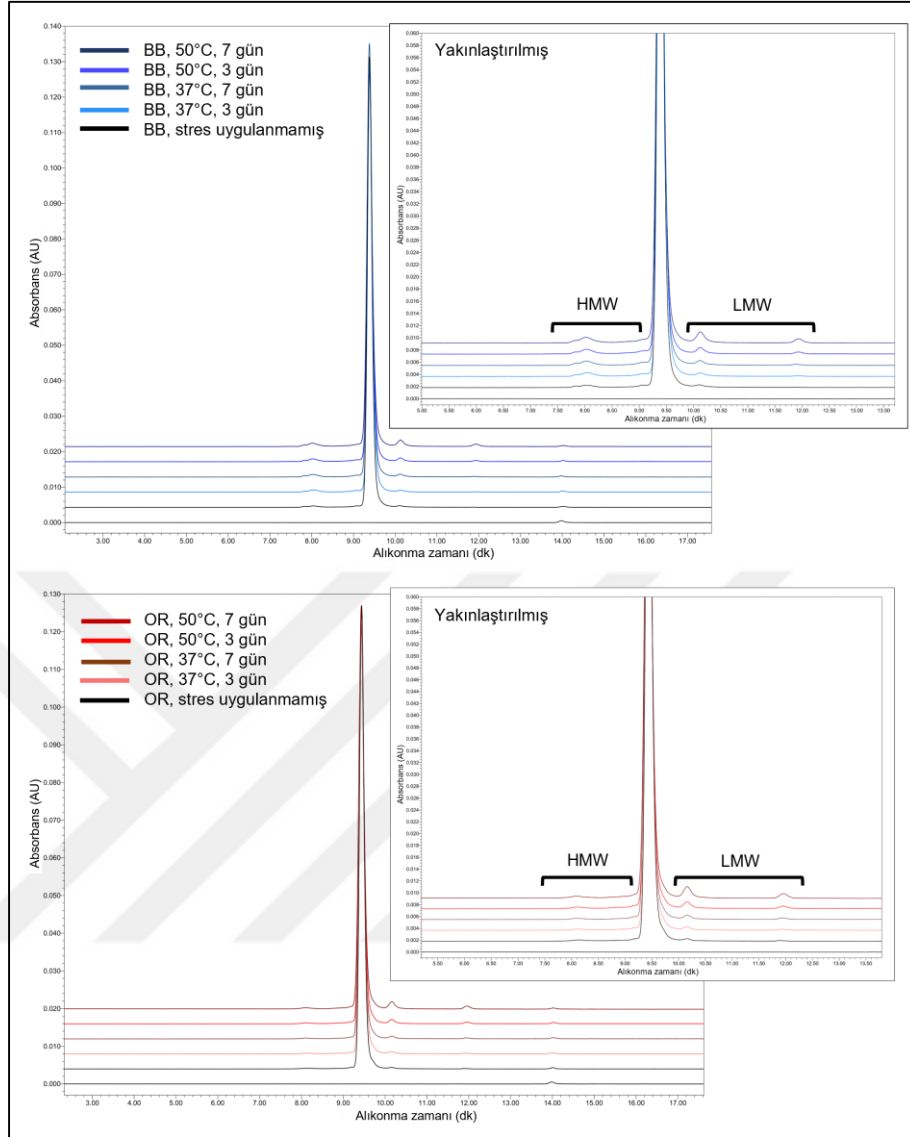
Termal stres uygulanan örneklerin % monomer değerlerinin iki sıcaklık değeri için ayrı ayrı zamana karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. 37°C koşulu için lineer eğriler birbirinden farklılık göstermemiştir ($p=0,36$). Degradasyonun daha belirgin olduğu

50°C koşulu için lineer eğriler arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (p=0,19). Eğriler Şekil 14'te verilmiştir.



Şekil 14. Termal stres, SE-UPLC analizi ile elde edilen monomer alanı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.

Termal stres uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin kromatogramları Şekil 15'de verilmiştir. BB ve OR örneklerinde, termal stres uygulama sıcaklığı ve süresi ile doğru orantılı olarak HMW ve LMW miktarlarının arttığı gözlenmektedir.



Şekil 15. Termal stres uygulanan BB ve OR örneklerin karşılaştırmalı UV kromatogramları

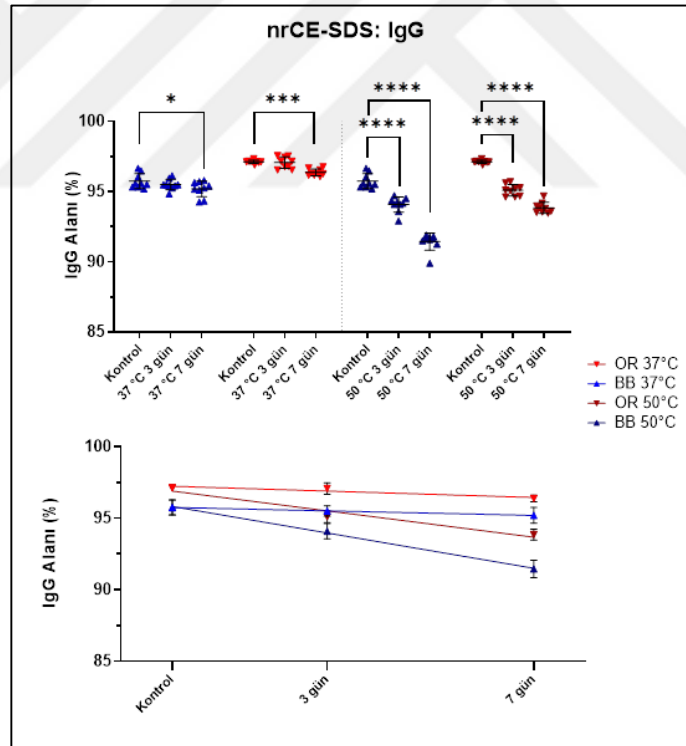
4.2.2 nrCE-SDS sonuçları

Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki sıcaklık koşulu ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 16'da gösterilmiştir.

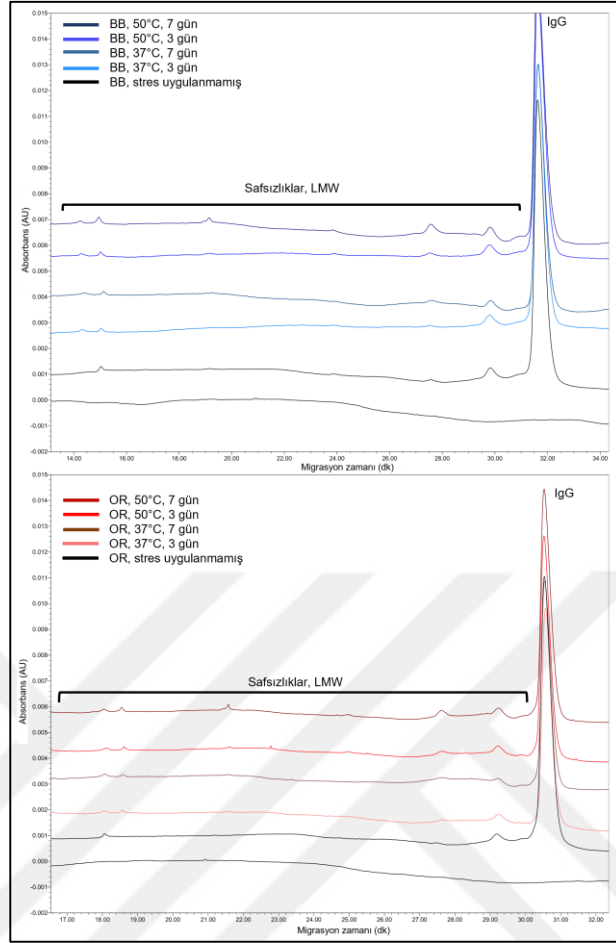
3 gün boyunca 37°C termal stres uygulanmış BB (n=9) ve OR (n=9) örneklerinin IgG % değerlerinin ortalamalarının kontrol IgG % değeri ortalamasından farkları

sırasıyla, %0,25 ve %0,06 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 37°C’de 7 gün inkübasyonu sonunda IgG % değeri farkı BB için %0,56, OR için %0,76 olduğu gözlenmiştir. 3 gün boyunca 50°C termal stres uygulanmış BB (n=9) ve OR (n=9) örneklerinin IgG % değerlerinin ortalamalarının kontrol IgG % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %1,67 ve %2,02 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 50°C’de 7 gün inkübasyonu sonunda IgG % değeri farkı BB için %4,30, OR için %3,28 olduğu gözlenmiştir.

Termal stres uygulanan örneklerin % IgG seviyelerinin, iki sıcaklık koşulu için ayrı ayrı zamana karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. 37°C koşulu için lineer eğriler birbirinden farklılık göstermemiştir (p=0,40). 50°C koşulu için lineer eğriler birbirinden farklılık göstermemiştir (p=0,28). Eğriler Şekil 16’da verilmiştir.



Şekil 16. Termal stres, nrCE-SDS analizi ile elde edilen toplam IgG TCA % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.



Şekil 17. Termal stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı nrCE-SDS PDA elektrogramları

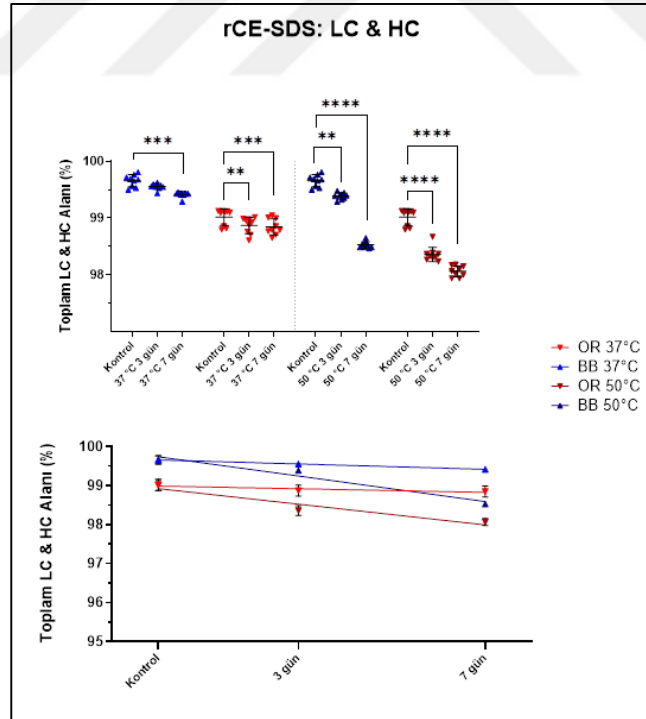
Termal stres uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin nrCE-SDS elektrogramları Şekil 17’de verilmiştir. BB ve OR örneklerinin nrCE-SDS elektrogramlarında, sıcaklık ve inkübasyon süresi ile doğru orantılı şekilde LMW miktarlarının arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, 37 °C koşulunda görülmeyen ağır zincir LMW piki, 50 °C’de 7 gün inkübasyon sonunda gözlenmiştir.

4.2.3 nrCE-SDS sonuçları

Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki sıcaklık koşulu ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 18’de gösterilmiştir.

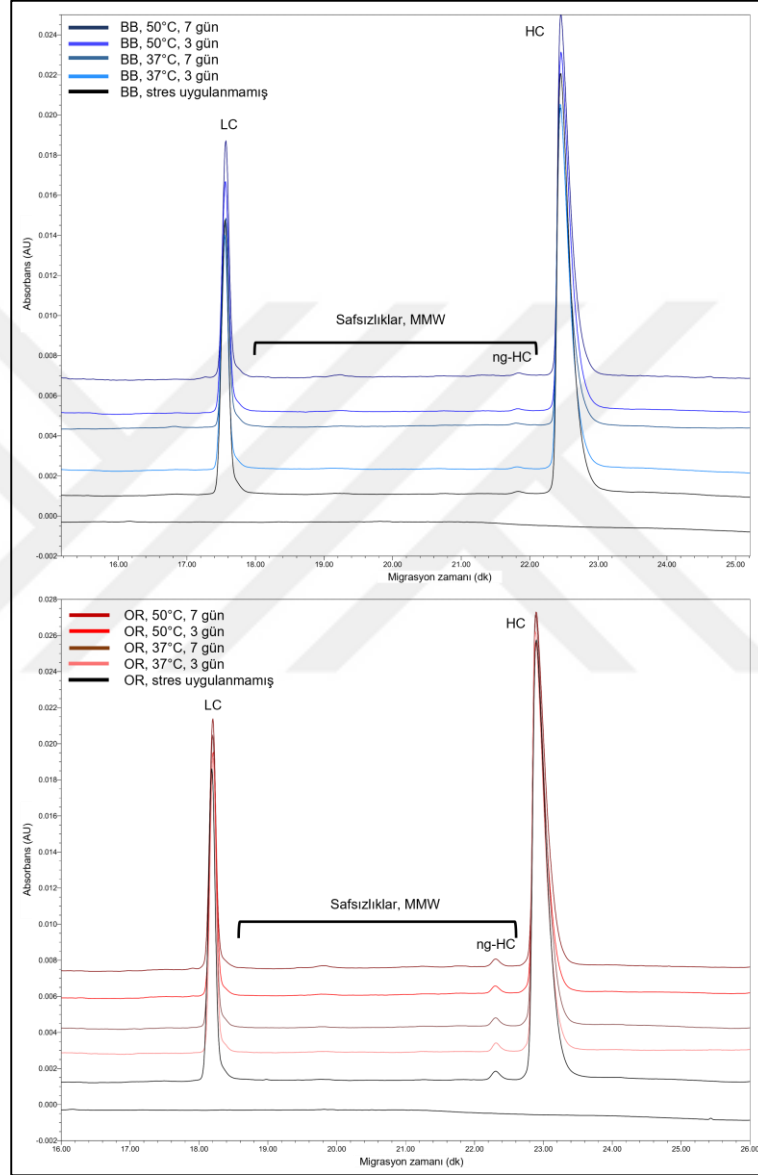
Üç gün boyunca 37°C termal stres uygulanmış BB (n=9) ve OR (n=9) örneklerinin LC&HC % değerlerinin ortalamalarının kontrol LC&HC % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %0,10 ve %0,15 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 37°C'de 7 gün inkübasyonu sonunda LC&HC % değeri farkı BB için %0,24, OR için %0,17 olduğu gözlenmiştir. Üç gün boyunca 50°C termal stres uygulanmış BB (n=9) ve OR (n=9) örneklerinin LC&HC % değerlerinin ortalamalarının kontrol LC&HC % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %0,27 ve %0,66 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 50°C'de 7 gün inkübasyonu sonunda LC&HC % değeri farkı BB için %1,13, OR için %0,95 olduğu gözlenmiştir.

Termal stres uygulanan örneklerin % LC&HC seviyelerinin, iki sıcaklık koşulu için ayrı ayrı zamana karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. 37°C koşulu için lineer eğriler birbirinden farklılık göstermemiştir (p=0,31). 50°C koşulu için lineer eğriler birbirinden farklılık göstermemiştir (p=0,62). Eğriler Şekil 18'de verilmiştir.



Şekil 18. Termal stres, rCE-SDS analizi ile elde edilen toplam LC&HC % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.

Termal stres uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin rCE-SDS elektrogramları Şekil 19’da verilmiştir. BB ve OR örneklerinin rCE-SDS elektrogramlarında, MMW miktarlarının arttığı sadece 50 °C’de 7 gün inkübasyon sonunda gözlenmiştir.



Şekil 19. Termal stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı rCE-SDS PDA elektrogramları

4.2.4 icIEF sonuçları

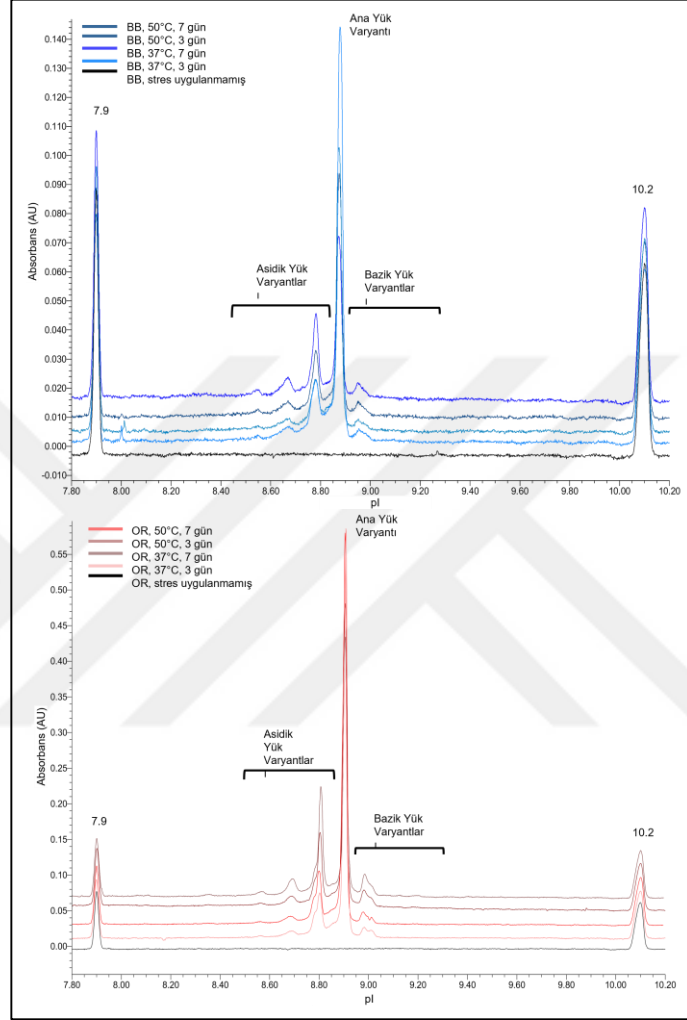
Üç farklı BB serisinin iki tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin iki tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. 3 gün boyunca 37°C termal stres uygulanmış BB (n=6) ve OR (n=6) örneklerinin ana yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol ana yük varyantı % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %1,37 ve %4,72 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun, 37°C'de 7 gün inkübasyonu sonunda ana yük varyantı % değeri farkı BB için %5,68, OR için %6,82 olduğu gözlenmiştir. 3 gün boyunca 50°C termal stres uygulanmış BB (n=6) ve OR (n=6) örneklerinin ana yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol ana yük varyantı % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %12,38 ve %15,06 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 50°C'de 7 gün inkübasyonu sonunda ana yük varyantı % değeri farkı BB için %26,41, OR için %26,57 olduğu gözlenmiştir.

Termal stres uygulanan örneklerin % ana yük varyantı seviyelerinin, iki sıcaklık koşulu için ayrı ayrı zamana karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. 37°C koşulu için lineer eğriler birbirinden farklılık göstermemiştir ($p=0,37$). 50°C koşulu için lineer eğriler birbirinden farklılık göstermemiştir ($p=0,96$). Eğriler Şekil 21'de verilmiştir.

Termal stres uygulanan BB ve OR örneklerinin, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin icIEF elektrogramları Şekil 20'de verilmiştir. BB ve OR örneklerinde, termal stres sonucunda sıcaklık ve inkübasyon süresi ile doğru orantılı olarak asidik piklerde artış olduğu gözlenmiştir. En yüksek artışın pI 8,7-8,8 arasında bulunan asidik pikte olduğu gözlenmiştir.

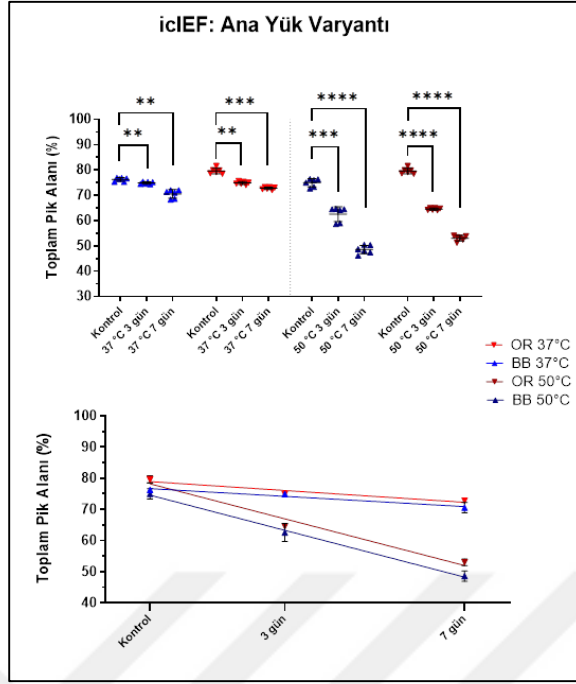
Üç gün boyunca 37°C termal stres uygulanmış BB (n=6) ve OR (n=6) örneklerinin asidik yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol asidik yük varyantı % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %0,23 ve %4,25 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 37°C'de 7 gün inkübasyonu sonunda asidik yük varyantı % değeri farkı BB için %3,16, OR için %6,01 olduğu gözlenmiştir. Üç gün boyunca 50°C termal stres uygulanmış BB (n=6) ve OR (n=6) örneklerinin asidik yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol asidik yük varyantı % değeri

ortalamasından farkları sırasıyla, %8,02 ve %12,55 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 50°C’de 7 gün inkübasyonu sonunda asidik yük varyantı % değeri farkı BB için %23,10, OR için %23,17 olduğu gözlenmiştir.

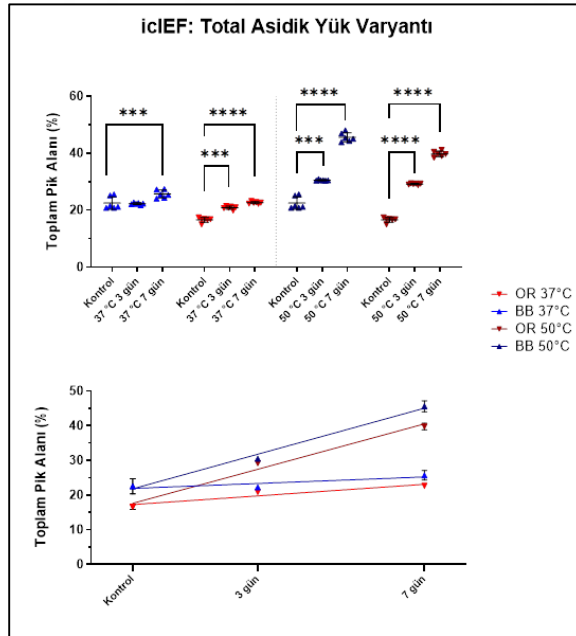


Şekil 20. Termal stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı icIEF UV elektrogramları

Termal stres uygulanan örneklerin % asidik yük varyantı seviyelerinin, iki sıcaklık koşulu için ayrı ayrı zamana karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. 37°C koşulu için lineer eğriler birbirinden farklılık göstermiştir ($p=0,032$). 50°C koşulu için lineer eğriler birbirinden farklılık göstermemiştir ($p=0,93$). Eğriler Şekil 22’de verilmiştir.



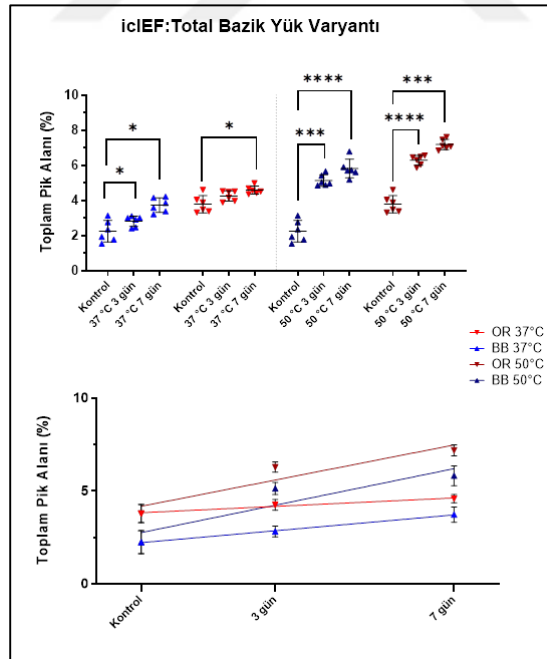
Şekil 21. Termal stres, icIEF analizi ile elde edilen toplam ana yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.



Şekil 22. Termal stres, icIEF analizi ile elde edilen toplam asidik yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt)

Üç gün boyunca 37°C termal stres uygulanmış BB (n=6) ve OR (n=6) örneklerinin bazik yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol bazik yük varyantı % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %0,57 ve %0,47 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 37°C’de 7 gün inkübasyonu sonunda bazik yük varyantı % değeri farkı BB için %1,49, OR için %0,81 olduğu gözlenmiştir. Üç gün boyunca 50°C termal stres uygulanmış BB (n=6) ve OR (n=6) örneklerinin bazik yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol bazik yük varyantı % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %2,88 ve %2,50 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 50°C’de 7 gün inkübasyonu sonunda bazik yük varyantı % değeri farkı BB için %3,57, OR için %3,40 olduğu gözlenmiştir.

Termal stres uygulanan örneklerin % bazik yük varyantı seviyelerinin, iki sıcaklık koşulu için ayrı ayrı zamana karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. 37°C koşulu için lineer eğriler birbirinden farklılık göstermiştir (p=0,041). 50°C koşulu için lineer eğriler birbirinden farklılık göstermemiştir (p=0,82). Eğriler Şekil 23’te verilmiştir.



Şekil 23. Termal stres, icIEF analizi ile elde edilen toplam bazik yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt)

4.2.5 Peptit haritalama sonuçları

Termal stres uygulamasının ardından, BB ve OR örneklerinde, *N*-term pE, *C*-term K, oksidasyon ve deamidasyon seviyelerinde değişimler gözlenmiştir.

Termal stresin 37°C'de 7 gün uygulaması sonrasında, BB ve OR örneklerinin *N*-term pE değişimlerinde sırasıyla, %0,42 ve %0,48 artış gözlenmiştir. 50°C'de 7 gün inkübasyon sonrasında, BB ve OR örneklerinin *N*-term pE değişiminde sırasıyla, %3,32 ve %2,29 artış gözlenmiştir. Örneklerin, iki sıcaklık koşulunda *C*-term K miktarı benzer oranda değişim göstermiştir. BB ve OR örneklerinin *C*-term K miktarı, 50°C'de 7 gün inkübasyon sonrasında, sırasıyla, %0,46 ve %0,39 azalmıştır (Tablo 6 ve 7).

BB örneğinde, termal stres uygulaması sonrasında en yüksek oksidasyon artışı, 37 °C'de HC:T3 peptidinin oksidasyonunda görülmüştür. Kontrol örneğiyle, 3 gün 37 °C'de inkübe edilen örnek arasında %3,80, 7 gün inkübasyon sonrası örneği arasında ise %4,17 fark görülmüştür. OR ürününde HC:T3 peptidinde 37°C'de aynı seviyede bir oksidasyon artışı gözlemlenmemiştir. Ayrıca, 50°C'de bu peptit tespit edilmemiştir (Tablo 7). BB ve OR örneklerinin 50 °C'de 7 gün inkübasyonu sonucunda en yüksek oksidasyon artışı HC:T19 peptidinde görülmüştür. Oksidasyon artışları, sırasıyla, %1,99 ve %0,72 olarak ölçülmüştür. En yüksek deamidasyon artışı HC:T35 üzerinde gözlenmiştir (Tablo 6 ve 7).

BB ve OR örneklerinin 37 °C'de 7 gün inkübasyonu sonunda Asn bulunan peptitlerdeki ortalama deamidasyon artışı sırasıyla, %0,50 ve %0,12 olarak ölçülmüştür. Ancak, OR örneğinin 3 gün inkübasyon sonunda Asn deamidasyonu ortalaması %0,35 seviyesindedir ve 7 gün inkübasyon sonunda HC:T35 peptidi tespit edilmemiştir (Tablo 6). BB ve OR örneklerinin 50 °C'de 7 gün inkübasyonu sonunda Asn bulunan peptitlerdeki ortalama deamidasyon artışı sırasıyla, %0,43 ve %0,51 olarak ölçülmüştür. BB için en yüksek deamidasyon %1,20 artış ile HC:T39, OR için en yüksek deamidasyon %1,27 artış ile HC:T35 peptidinde gözlenmiştir (Tablo 6 ve 7).

Tablo 6. Termal stres (37°C) kontrol ve stres örneklerinin PTM değerleri (%) verilmiştir.

Modifikasyon	Zincir:Peptit Numarası	Peptit Sekansı	Pozisyon	BB			OR		
				Kontrol	3 gün	7 gün	Kontrol	3 gün	7 gün
N-term pE	HC:T1	EVQLVESGGGLVQPGR	1	0,94	1,16	1,36	1,56	1,64	2,04
C-term K	HC:T40	SLSLSPGK	451	14,68	14,42	14,28	17,09	17,01	16,7
Oksidasyon	LC:T1	DIQMTQSPSSLSASVGDR	4	0,67	0,71	0,68	0,27	0,18	0,28
	HC:T3	LSCAASGFTFDDYAMHW VR	34	1,38	5,18	5,55	1,28	0,65	0,89
	HC:T8	NSLYLQMNSLR	83	1,11	1,3	1,22	0,4	0,29	0,51
	HC:T19	DTLMISR	256	4,17	4,93	5,29	3,53	2,4	4
	HC:T39	WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQK	432	2,06	1,95	2,01	1,07	1,01	1,02
Deamidasyon	LC:T13	SGTASVVCLLNIFYPR	137/138	0,27	0,3	0,89	0,3	0,28	0,28
	HC:T8	NSLYLQMNSLR	77/84	0,24	0,31	0,76	0,4	0,44	0,78
	HC:T24	VVSVLTVLHQDWLNGK	319	0,37	0,47	0,82	0,67	0,79	0,68
	HC:T35	GFYPSDIAVEWESNGQPE NNYK	388/393/394	2,1	2,47	2,71	3,64	4,91	ND
	HC:T39	WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQK	425/438	ND	0,23	0,29	ND	ND	ND

Tablo 7. Termal stres (50°C) kontrol ve stres örneklerinin PTM değerleri (%) verilmiştir.

Modifikasyon	Zincir:Peptit Numarası	Peptit Sekansı	Pozisyon	BB			OR		
				Kontrol	3 gün	7 gün	Kontrol	3 gün	7 gün
N-term pE	HC:T1	EVQLVESGGGLVQPGR	1	0,94	2,31	4,26	1,56	2,45	3,85
C-term K	HC:T40	SLSLSPGK	451	14,68	13,7	14,22	17,09	16,74	16,7
Oksidasyon	LC:T1	DIQMTQSPSSLSASVGDR	4	0,67	0,47	0,43	0,27	0,17	0,2
	HC:T3	LSCAASGFTFDDYAMHW VR	34	1,38	2,97	2,51	1,28	ND	ND
	HC:T8	NSLYLQMNSLR	83	1,11	0,85	0,73	0,4	0,3	0,29
	HC:T19	DTLMISR	256	4,17	5,77	6,16	3,53	4,14	4,25
	HC:T39	WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQK	432	2,06	2,39	2,32	1,07	1,34	1,47
Deamidasyon	LC:T13	SGTASVVCLLNIFYPR	137/138	0,27	0,23	0,91	ND	ND	0,45
	HC:T8	NSLYLQMNSLR	77/84	0,24	0,31	0,9	0,4	0,28	0,81
	HC:T24	VVSVLTVLHQDWLNGK	319	0,37	0,5	1,04	0,67	0,65	0,77
	HC:T35	GFYPSDIAVEWESNGQPE NNYK	388/393/394	2,1	2,04	1,06	3,64	3,43	4,91
	HC:T39	WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQK	425/438	ND	0,23	1,2	ND	ND	0,31

4.3 Kimyasal Oksidasyon Stresi

Kimyasal oksidasyon stresi, örneklere son miktarı %0,5 ve %1,5 H₂O₂ olacak şekilde H₂O₂ eklenip 24 saat boyunca inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tüm örnekler bekletilmeden analiz edilmiştir. Oksidasyon örnekleri ile SE-UPLC, nr-CE-SDS, r-CES-SDS, icIEF, ve peptit haritalama analizleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen analizlerin sonuçlarının özeti Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Kimyasal Oksidasyon stresi sonuçları. Yüzde değerleri ortalama ± SD olarak verilmiştir.

		OR					BB				
		Kontrol	0,5% H ₂ O ₂	P değeri	1,5% H ₂ O ₂	P değeri	Kontrol	0,5% H ₂ O ₂	P değeri	1,5% H ₂ O ₂	P değeri
SEC	Monomer	99,27±0,06	97,29±0,03	0,0003*	93,56±0,07	<0,0001*	98,85±0,04	97,84±0,31	<0,0001*	96,10±0,72	<0,0001*
	IgG	96,64±0,16	80,21±0,47	0,0085*	55,74±0,21	0,0058*	95,74±0,53	82,02±0,50	<0,0001*	61,65±1,33	<0,0001*
CE-SDS	LC + HC	99,08±0,01	96,50±0,07	0,0141*	94,05±0,04	0,0056*	99,66±0,11	97,50±0,12	<0,0001*	95,54±0,35	<0,0001*
	Ana Yük Varyantı	78,69±0,76	63,37±1,22	0,0792	41,24±0,50	0,0046*	76,27±0,74	64,25±1,74	<0,0001*	46,32±1,61	<0,0001*
iCE	Toplam Asidik Varyantlar	17,06±0,71	32,21±1,41	0,0855	56,25±0,33	0,0058*	21,12±0,44	32,70±1,53	<0,0001*	51,26±1,31	<0,0001*
	Toplam Bazik Varyantlar	4,26±0,49	4,43±0,21	0,4869	2,52±0,18	0,0449*	2,75±0,42	3,05±0,30	0,04112	2,42±0,44	0,3063

*istatistiksel anlamlı fark

OR örneklerine uygulanan oksidasyon stresi sonunda, icIEF analizi dışında anlamlı farklar gözlenmiştir (Tablo 8). OR örneğinin, 0,5% H₂O₂ ile inkübasyonu sonrası icIEF analizi sonuçları, kontrol örneğine göre farklılık göstermemiştir. BB örneğinin, 0,5% H₂O₂ ile inkübasyonu sonrası icIEF analizi sonuçları, kontrol örneğine göre farklılık göstermiştir (Tablo 8). OR ve BB örneklerinin, 1,5% H₂O₂ ile inkübasyonları sonrası icIEF analizi sonuçları, kontrol örneğine göre farklılık göstermiştir. Bu sonuçlar arasında sadece stres uygulanmış BB örneğinin toplam bazik varyantlarının, kontrol örneğine göre toplam bazik varyant seviyesinde anlamlı fark görülmemiştir (p=0,82).

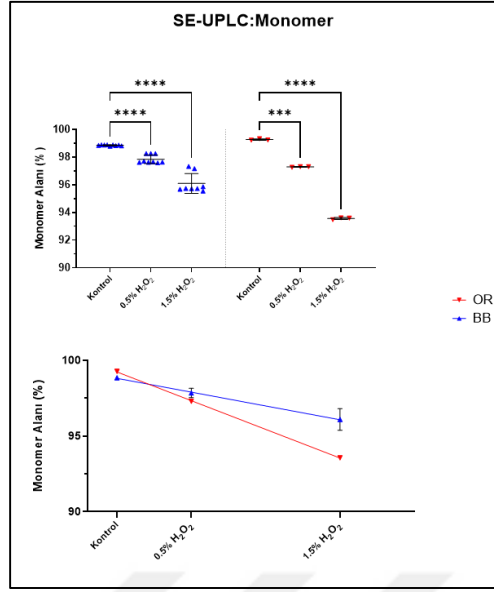
4.3.1 SE-UPLC sonuçları

Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki H₂O₂ seviyesi ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 24’de gösterilmiştir.

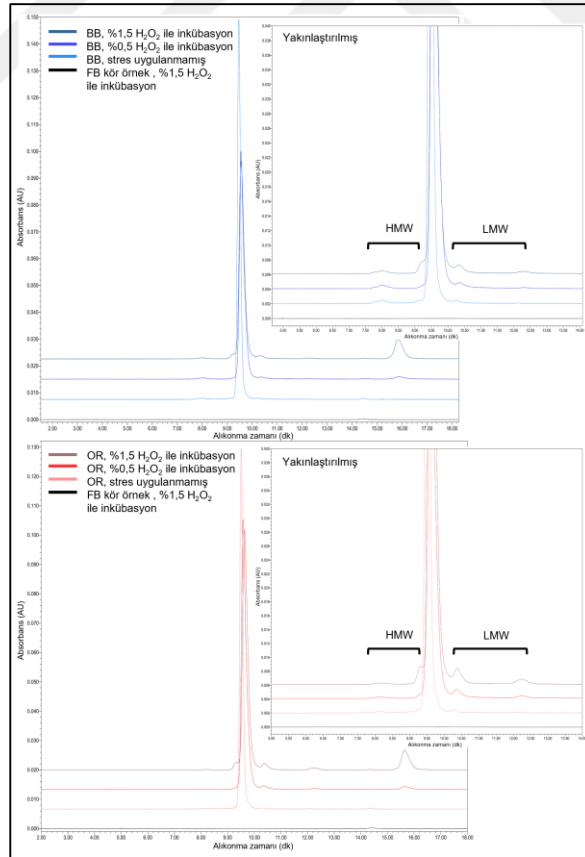
Oksidasyon stresi olarak %0,5 H₂O₂ ile inkübe edilen BB (n=9) ve OR (n=3) örneklerinin monomer % değerlerinin ortalamalarının kontrol monomer % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %1,01 ve %1,97 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun %1,5 H₂O₂ ile inkübasyonu sonunda monomer % değeri farkı BB için %2,76, OR için %5,70 olduğu gözlenmiştir. HMW miktarı, %0,5 H₂O₂ ile inkübe edilen koşulda, BB örneği için %0,06 ve OR örneği için %0,04 oranında artmıştır; %1,5 H₂O₂ ile inkübe edilen koşulda, BB örneği için %0,16, OR örneği için %0,11 oranında artmıştır.

Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin % monomer değerleri ile H₂O₂ seviyesine karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermiştir (p=0,0019). Elde edilen eğri, Şekil 24’te verilmiştir.

Oksidasyon stresi uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin kromatogramları Şekil 25’te verilmiştir. BB ve OR örneklerinde, H₂O₂ yüzdesi ile doğru orantılı olarak özellikle LMW miktarının arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, BB ve OR örneklerinin ikisinde de monomer pikinde omuz oluşumu gözlenmiştir.



Şekil 24. Oksidasyon stresi, SE-UPLC analizi ile elde edilen monomer alanı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve linear eğrileri (alt) olarak verilmiştir.



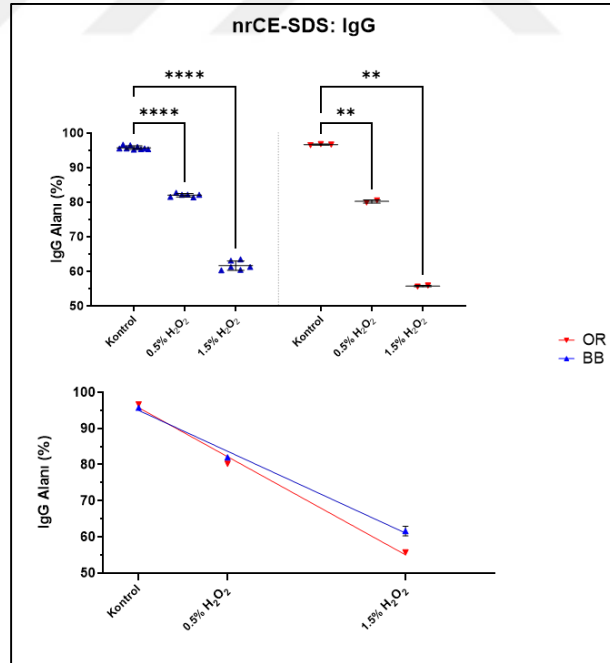
Şekil 25. Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı UV kromatogramları

4.3.2 nrCE-SDS sonuçları

Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki H₂O₂ seviyesi ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 26'da gösterilmiştir.

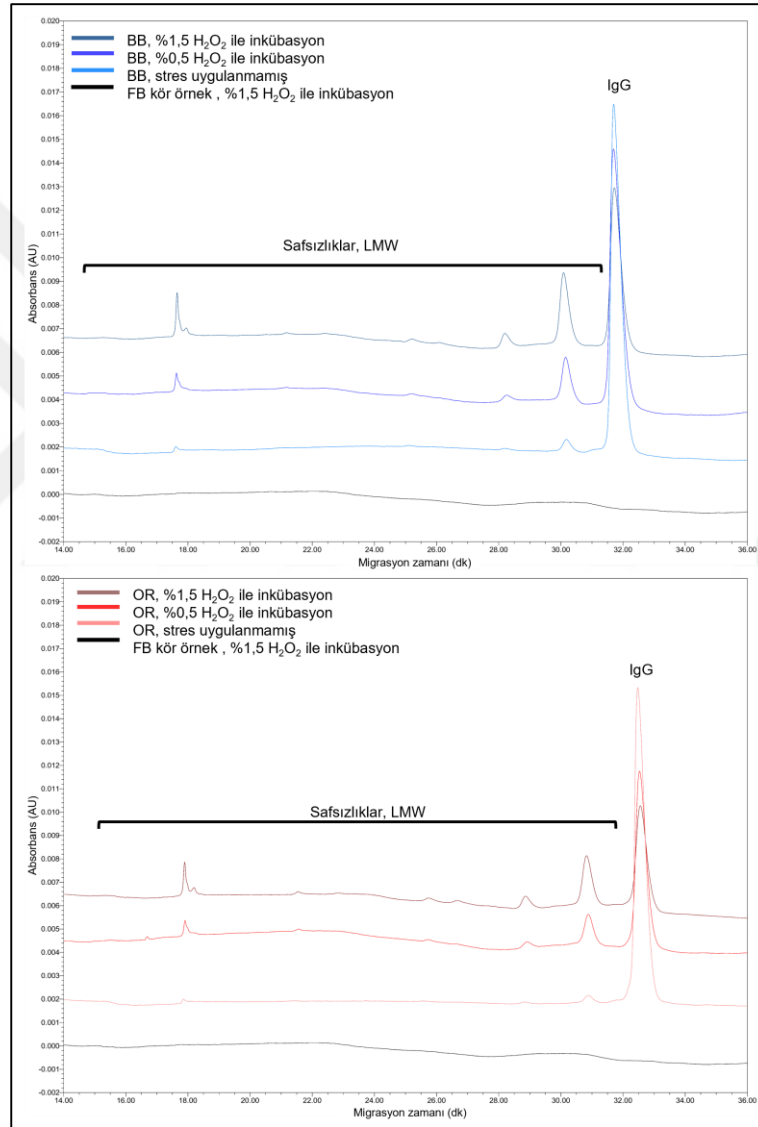
Oksidasyon stresi olarak %0,5 H₂O₂ ile inkübe edilen BB (n=9) ve OR (n=3) örneklerinin IgG % değerlerinin ortalamalarını kontrol IgG % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %14 ve %16 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun %1,5 H₂O₂ ile inkübasyonu sonunda monomer % değeri farkı BB için %34, OR için %41 olduğu gözlenmiştir.

Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin % monomer değerleri ile H₂O₂ seviyesine karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermiştir (p=0,0001). Elde edilen eğri Şekil 26'da verilmiştir.



Şekil 26. Oksidasyon stresi, nrCE-SDS analizi ile elde edilen toplam IgG TCA % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama ± SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.

Oksidasyon stresi uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin nrCE-SDS elektrogramları Şekil 27’de verilmiştir. BB ve OR örneklerinin nrCE-SDS elektrogramlarında, H₂O₂ miktarı ile doğru orantılı şekilde LMW miktarlarının belirgin artışı gözlenmiştir. Hafif zincirin (LC) koparak, ağır-ağır-hafif zincir (HHL), ağır-ağır (HH) ve LC başta olmak üzere LMW türlerinin arttığı gözlenmiştir.



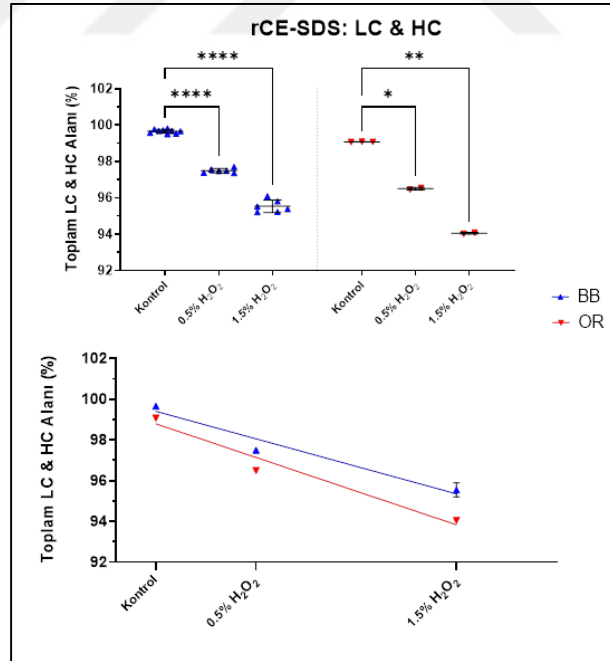
Şekil 27. Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı nrCE-SDS PDA elektrogramları

4.3.3 rCE-SDS sonuçları

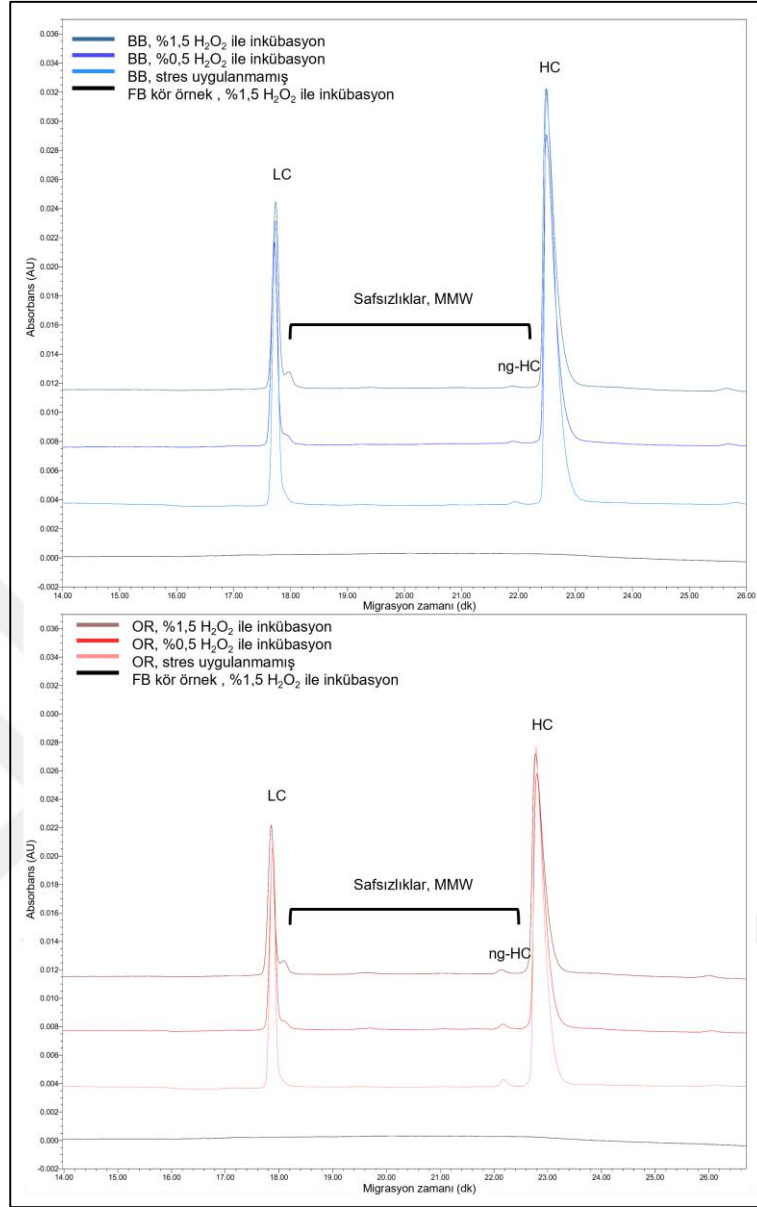
Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki H₂O₂ seviyesi ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 28’de gösterilmiştir.

Oksidasyon stresi olarak %0,5 H₂O₂ ile inkübe edilen BB (n=9) ve OR (n=3) örneklerinin LC&HC % değerlerinin ortalamalarının kontrol LC&HC % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %2,16 ve %2,58 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun %1,5 H₂O₂ ile inkübasyonu sonunda LC&HC % değeri farkı BB için %4,11, OR için %5,03 olduğu gözlenmiştir.

Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin % LC&HC değerleri ile H₂O₂ seviyesine karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermemiştir (p=0,0609). Elde edilen eğri Şekil 28’de verilmiştir.



Şekil 28. Oksidasyon stresi, rCE-SDS analizi ile elde edilen toplam LC&HC % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama ± SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.



Şekil 29. Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı rCE-SDS PDA elektrogramları

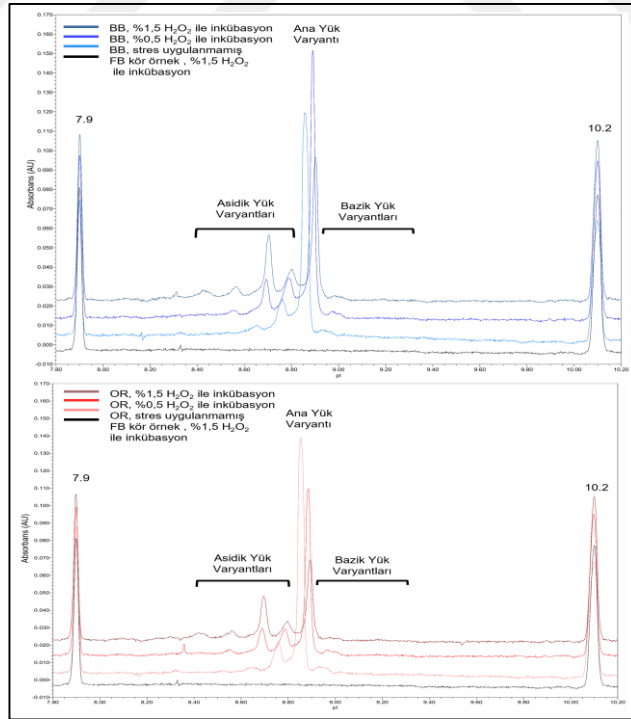
Oksidasyon stresi uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin rCE-SDS elektrogramları Şekil 29’da verilmiştir. BB ve OR örneklerinin rCE-SDS elektrogramlarında, MMW türleri gözlenmemiştir. Ancak, iki örnekte de, LC pikinin H₂O₂ ile doğru orantılı olarak omuz oluşturduğu gözlenmiştir.

4.3.4 icIEF sonuçları

Üç farklı BB serisinin iki tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki H₂O₂ seviyesi ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 31’de gösterilmiştir.

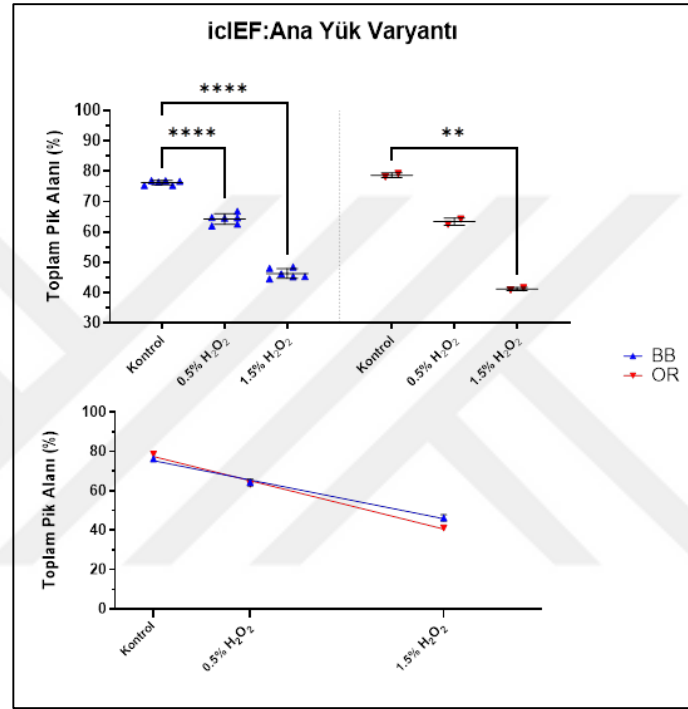
Oksidasyon stresi olarak %0,5 H₂O₂ ile inkübe edilen BB (n=6) ve OR (n=2) örneklerinin ana yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol ana yük varyantı % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %12,01 ve %15,32 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun %1,5 H₂O₂ ile inkübasyonu sonunda ana yük varyantı % değeri farkı BB için %29,95, OR için %37,46 olduğu gözlenmiştir.

Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin % ana yük varyantı değerleri ile H₂O₂ seviyesine karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermiştir (p=0,0013). Elde edilen eğri Şekil 31’de verilmiştir.



Şekil 30. Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin karşılaştırmalı icIEF UV elektrogramları

Oksidasyon stresi uygulanan BB ve OR örneklerinin, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin icIEF elektrogramları Şekil 30'da verilmiştir. BB ve OR örneklerinde oksidasyon stresi sonucunda H₂O₂ miktarı ile doğru orantılı olarak asidik yük varyantlarının arttığı gözlenmiştir. Artan asidik yük varyantlarının pI aralığı 8,4-8,8 arasında değişmektedir.



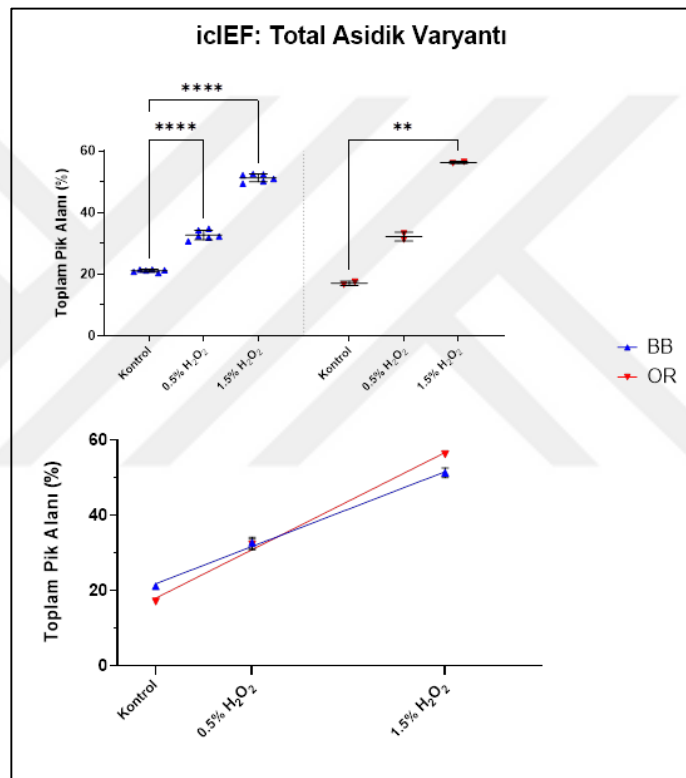
Şekil 31. icIEF analizi ile elde edilen toplam ana yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.

Oksidasyon stresi olarak %0,5 H₂O₂ ile inkübe edilen BB (n=6) ve OR (n=2) örneklerinin asidik yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol asidik yük varyantı % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %11,58 ve %15,15 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun %1,5 H₂O₂ ile inkübasyonu sonunda asidik yük varyantı % değeri farkı BB için %30,14, OR için %39,19 olduğu gözlenmiştir.

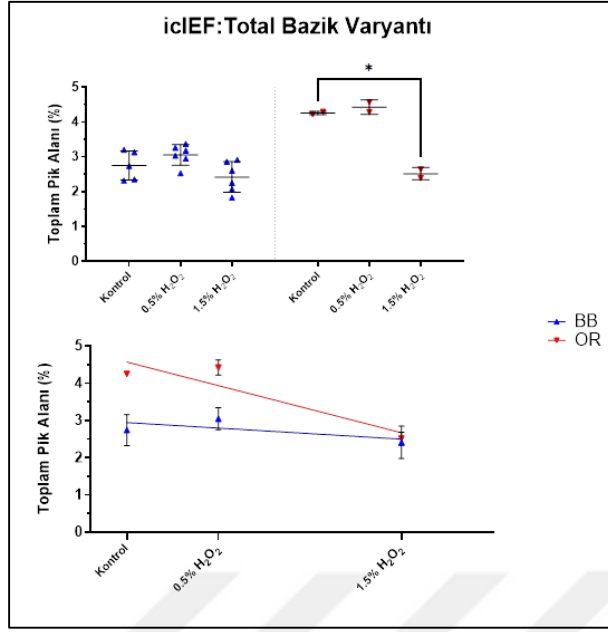
Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin % asidik yük varyantı değerleri ile H₂O₂ seviyesine karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer

eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermiştir ($p < 0,0001$). Elde edilen eğri Şekil 32’de verilmiştir.

Oksidasyon stresi olarak %0,5 H_2O_2 ile inkübe edilen BB ($n=6$) ve OR ($n=2$) örneklerinin bazik yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol bazik yük varyantı % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %0,31 ve %0,17 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun %1,5 H_2O_2 ile inkübasyonu sonunda bazik yük varyantı % değeri farkı BB için %0,33, OR için %1,74 olduğu gözlenmiştir.



Şekil 32. Oksidasyon stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam asidik yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt)



Şekil 33. Oksidasyon stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam bazik yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt)

Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin % bazik yük varyantı değerleri ile H₂O₂ seviyesine karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermiştir ($p=0,0082$). Elde edilen eğri Şekil 33'te verilmiştir.

4.3.5 Peptit haritalama sonuçları

BB ve OR örneklerinin kimyasal oksidasyon stresi sonrasında *N*-term pE ve *C*-term K seviyelerinde büyük bir değişiklik gözlenmemiştir.

BB ve OR örneklerinin her iki seviyede uygulanan oksidasyon stresinde, triptik peptitlerde bulunan Met aminoasidindeki oksidasyon miktarları Tablo 9'da verilmiştir. BB örneğinin 24 saat %1,5 H₂O₂ inkübasyonu sonunda, LC:T1, HC:T3, HC:T8, HC:T19, ve HC:T39 peptitlerinde oksidasyon artışları sırasıyla, %22,18, %82,34, %27,70, %95,83, ve %97,00 olarak ölçülmüştür. OR örneğinin 24 saat %1,5 H₂O₂ inkübasyonu sonunda, LC:T1, HC:T3, HC:T8, HC:T19, ve HC:T39

peptitlerinde oksidasyon artışları sırasıyla, %17,92, %82,24, %20,39, %96,47, ve %97,38 olarak ölçülmüştür (Tablo 9). BB ve OR örneklerinin HC:T19 ve HC:T39 peptitlerinde oksitlenme seviyeleri %0,5 H₂O₂ ile inkübasyonu sonunda doygunluğa ulaşarak, %1,5 H₂O₂ ile inkübasyonu sonunda ölçülen seviyeler ile farklılık göstermemişlerdir (Tablo 9).

Tablo 9. Oksidasyon stresi kontrol ve stres örneklerinin PTM değerleri (%) verilmiştir.

Modifikasyon	Zincir:Peptit Numarası	Peptit Sekansı	Pozisyon	BB			OR		
				Kontrol	% 0,5	% 1,5	Kontrol	% 0,5	% 1,5
N-term pE	HC:T1	EVQLVESGGGLVQPGR	1	0,94	0,9	1,09	1,56	1,32	1,51
C-term K	HC:T40	SLSLSPGK	451	14,68	13,22	14,87	17,09	15,12	19,27
Oksidasyon	LC:T1	DIQMTQSPSSLSASVGDR	4	0,67	10,29	22,85	0,27	15,65	18,19
	HC:T3	LSCAASGFTFDDYAMH WVR	34	1,38	72,67	83,72	1,28	74,21	83,48
	HC:T8	NSLYLQMNSLR	83	1,11	15,28	28,81	0,4	20,80	20,79
	HC:T19	DTLMISR	256	4,17	100	100	3,53	100,00	100,00
	HC:T39	WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQK	432	2,06	98,57	99,06	1,07	98,43	98,45
Deamidasyon	LC:T13	SGTASVVCLLNMFYPR	137/138	0,27	0,25	0,77	0,3	0,59	0,47
	HC:T8	NSLYLQMNSLR	77/84	0,24	0,25	0,3	0,4	0,60	0,61
	HC:T24	VVSVLTVLHQDWLNGK	319	0,37	0,34	0,71	0,67	0,47	0,65
	HC:T35	GFYPSDIA VEWESNGQPE NNYK	388/393/394	2,1	2,09	2,91	3,64	3,87	4,31

4.4 Asidik (pH 3,5) Koşulda İnkübasyon

Asidik pH stresi, örneklere 1:1 oranında 100mM sitrik asit pH 3,0 solüsyonu eklenip 24 saat ve 72 saat boyunca inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tüm örnekler bekletilmeden analiz edilmiştir. Peptit haritalama dışındaki analizlerde % değişim hesaplanamayacak kadar degradasyon görülmüştür. Peptit haritalama sonuçlarında ise yüksek oranda modifikasyonlar ve tespit edilemeyen peptitler mevcuttur. Bu nedenle, örneklere 1:1 oranında 100mM sitrik asit pH 3,5 solüsyonu eklenip 3 saat ve 6 saat boyunca inkübe edilmişlerdir (5). Örneklerin bekletilmeden SE-UPLC, nr-CE-SDS, r-CES-SDS, icIEF analizleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen analizlerin sonuçlarının özeti Tablo 10'de verilmiştir.

Tablo 10. Asidik (pH 3,5) koşul stresi sonuçları. Yüzde değerleri ortalama \pm SD olarak verilmiştir.

		OR					BB				
		Kontrol	3 saat	P değeri	6 saat	P değeri	Kontrol	3 saat	P değeri	6 saat	P değeri
SEC	Monomer	98,96 \pm 0,01	98,85 \pm 0,01	0,0013*	98,78 \pm 0,02	0,0064*	99,47 \pm 0,14	99,48 \pm 0,09	0,0075*	99,46 \pm 0,06	0,0033*
CE-SDS	IgG	97,04 \pm 0,13	96,57 \pm 0,05	0,0523	96,42 \pm 0,06	0,0321*	95,66 \pm 0,43	95,49 \pm 0,36	0,2625	95,35 \pm 0,09	0,1954
	LC + HC	98,83 \pm 0,03	98,75 \pm 0,02	0,1110	98,77 \pm 0,02	0,2150	99,66 \pm 0,11	99,42 \pm 0,05	0,9801	99,56 \pm 0,05	0,9435
	Ana Yük Varyantı	80,71 \pm 1,25	77,77 \pm 0,05	0,2531	76,36 \pm 0,08	0,1845	76,27 \pm 0,74	76,77 \pm 1,04	0,6539	74,09 \pm 0,84	0,0223*
iCE	Toplam Asidik Varyantlar	15,86 \pm 1,17	17,64 \pm 0,21	0,3142	19,33 \pm 0,02	0,2001	21,12 \pm 0,44	19,65 \pm 0,93	0,0447*	22,38 \pm 0,78	0,0453*
	Toplam Bazık Varyantlar	3,44 \pm 0,08	4,59 \pm 0,21	0,1177	4,32 \pm 0,09	0,1524	2,62 \pm 0,49	3,53 \pm 0,36	0,0567	3,58 \pm 0,14	0,0135*

*istatistiksel anlamlı fark

BB ve OR örneklerine uygulanan asidik pH (pH 3,5) stresi sonunda, iki örneğin % monomer sonuçlarında kontrollerine göre anlamlı farklar gözlenmiştir (Tablo 10). Bunun dışında, OR örneğinin 6 saat inkübasyondan sonra % IgG sonucu kontrole göre anlamlı olarak farklı çıkmıştır (p=0,0321). BB örneğinin, icIEF analizi ile ölçülen % ana yük varyantı 6 saat inkübasyondan (p=0,0223), ve % bazık yük varyantı 3 saat inkübasyondan sonra (p=0,0135) anlamlı ölçüde farklı sonuç vermiştir (Tablo 10).

OR örneğinin, 0,5% H₂O₂ ile inkübasyonu sonrası icIEF analizi sonuçları, kontrol örneğine göre farklılık göstermemiştir. BB örneğinin, 0,5% H₂O₂ ile inkübasyonu sonrası icIEF analizi sonuçları, kontrol örneğine göre farklılık göstermiştir (Tablo 8). OR ve BB örneklerinin, 1,5% H₂O₂ ile inkübasyonları sonrası icIEF analizi sonuçları, kontrol örneğine göre farklılık göstermiştir. Bu sonuçlar arasında sadece stres uygulanmış BB örneğinin toplam bazık varyantlarının, kontrol örneğine göre toplam bazık varyant seviyesinde anlamlı fark görülmemiştir (p=0,82).

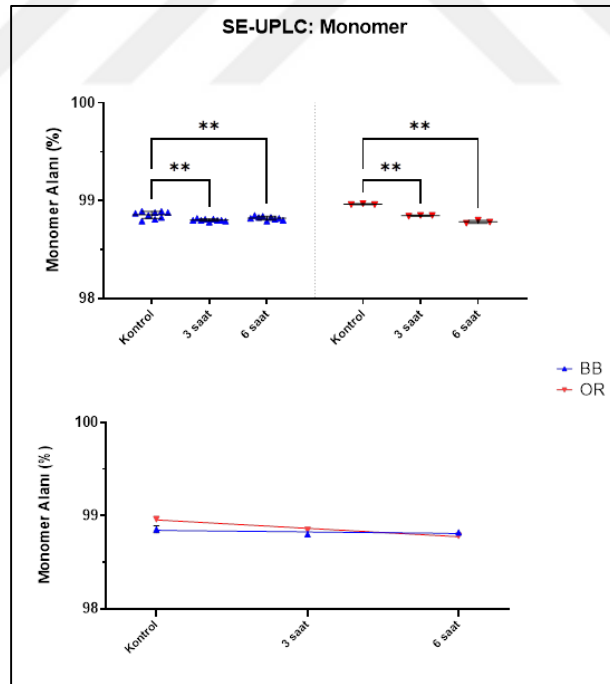
4.4.1 SE-UPLC sonuçları

Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki farklı inkübasyon grubu ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 34'te gösterilmiştir.

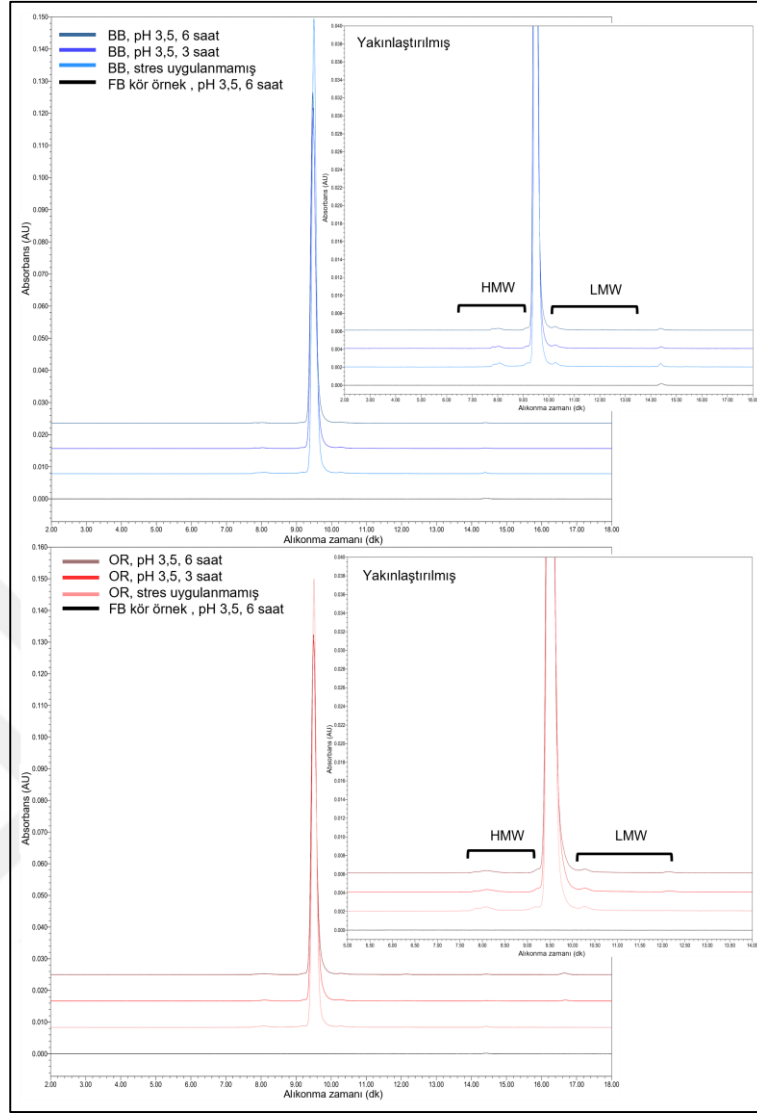
Asidik pH (pH 3,5) koşulunda 3 saat inkübe edilen BB (n=9) ve OR (n=3) örneklerinin monomer % değerlerinin ortalamalarının kontrol monomer % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %0,05 ve %0,12 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 6 saat inkübasyonu sonunda monomer % değeri farkı BB için %0,03, OR için %0,18 olduğu gözlenmiştir.

Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin % monomer değerleri ile inkübasyon zamanına karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermemiştir (p=0,11). Elde edilen eğri Şekil 34'te verilmiştir.

Asidik pH stresi uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin kromatogramları Şekil 35'te verilmiştir. BB ve OR örneklerinin kromatogramlarında, 3 saatlik ve 6 saatlik asidik pH inkübasyonu sonunda gözle görülür bir farklılık tespit edilmemiştir.



Şekil 34. Asidik pH stresi, SE-UPLC analizi ile elde edilen monomer alanı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.



Şekil 35. Asidik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı UV kromatogramları

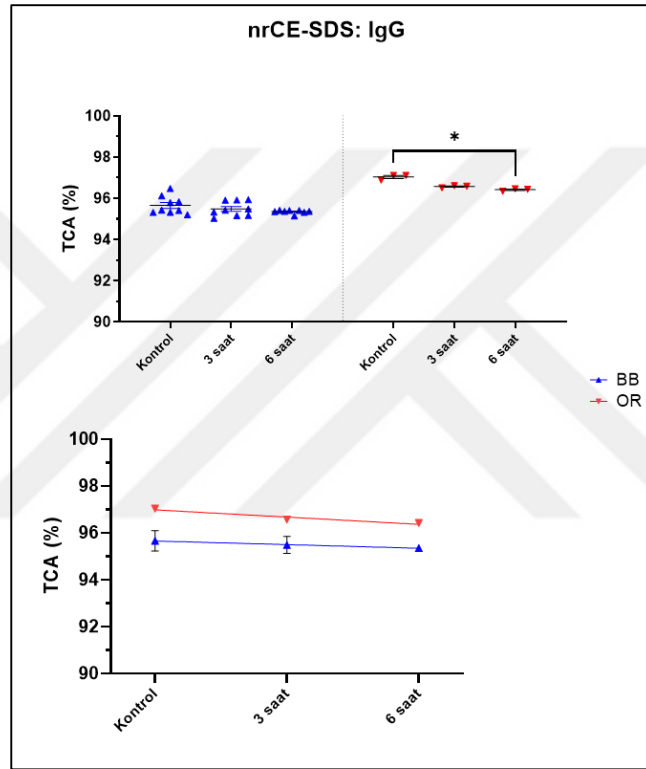
4.4.2 nrCE-SDS sonuçları

Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki farklı inkübasyon grubu ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 36'da gösterilmiştir.

Asidik pH (pH 3,5) koşulunda 3 saat inkübe edilen BB (n=9) ve OR (n=3) örneklerinin IgG % değerlerinin ortalamalarının kontrol IgG % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %0,17 ve %0,47 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 6 saat

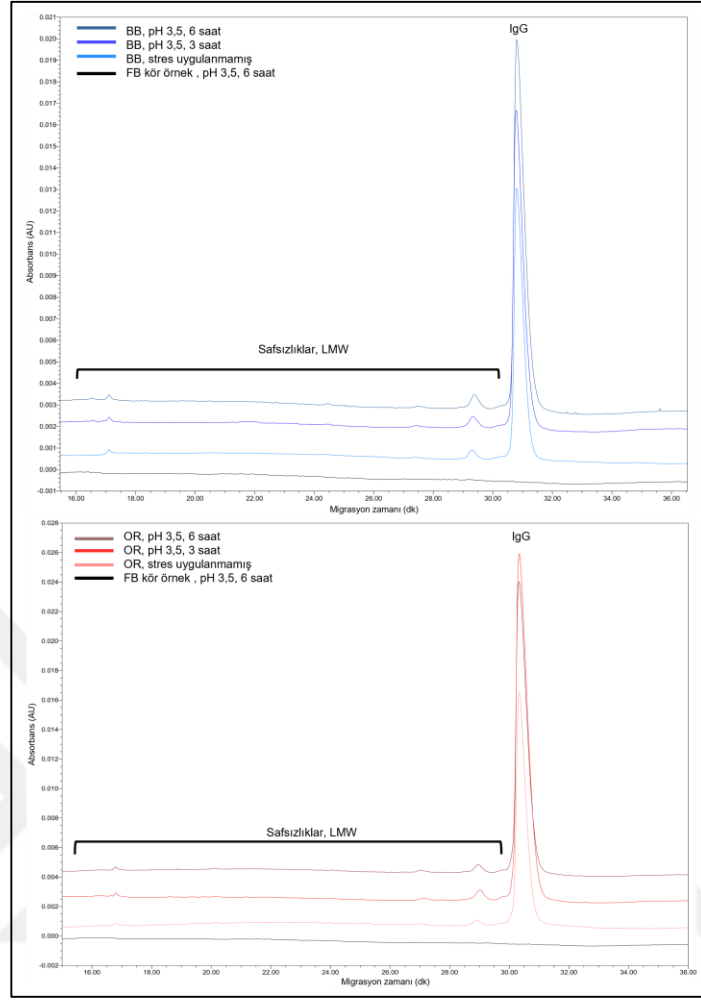
inkübasyonu sonunda IgG % değeri farkı BB için %0,31, OR için %0,62 olduğu gözlenmiştir.

Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin % IgG değerleri ile inkübasyon zamanına karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermemiştir (p=0,27). Elde edilen eğri Şekil 36'da verilmiştir.



Şekil 36. Asidik pH stresi, nrCE-SDS analizi ile elde edilen toplam IgG TCA % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.

Asidik pH stresi uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin nrCE-SDS elektrogramları Şekil 37'de verilmiştir. BB ve OR örneklerinin nrCE-SDS elektrogramlarında, LMW piklerinde artış gözlenmemiştir.



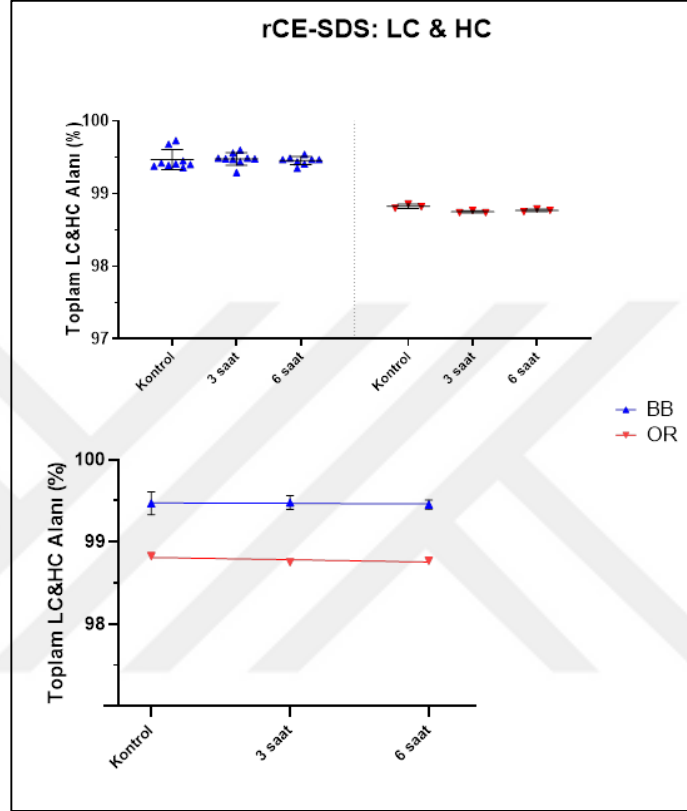
Şekil 37. Asidik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı nrCE-SDS PDA elektrogramları

4.4.3 rCE-SDS sonuçları

Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki farklı inkübasyon grubu ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 38’de gösterilmiştir.

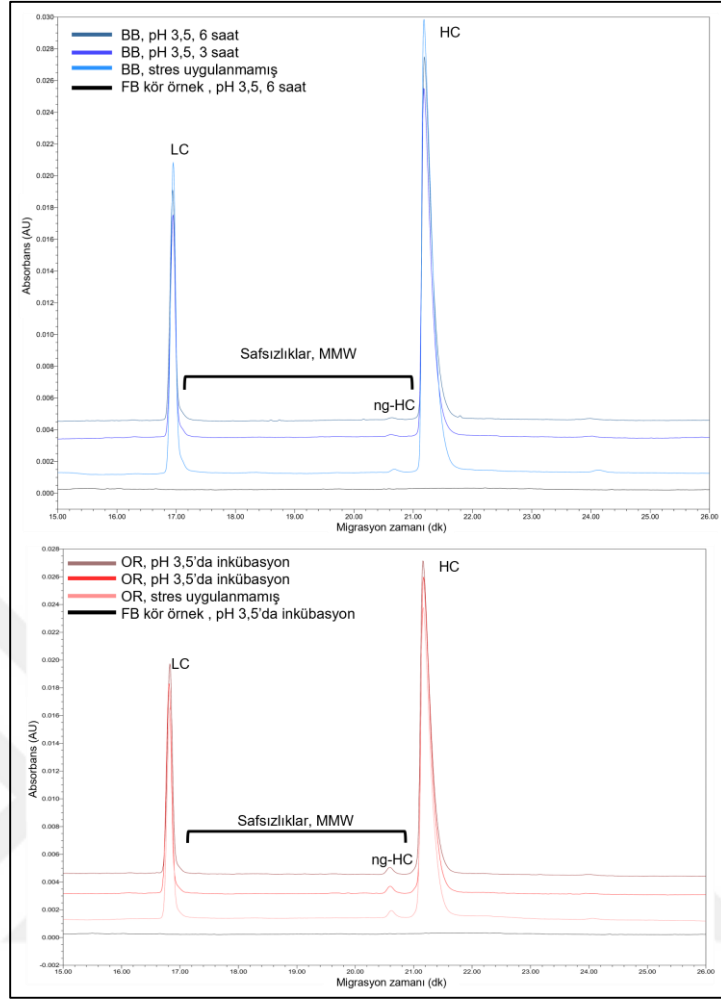
Asidik pH (pH 3,5) koşulunda 3 saat inkübe edilen BB (n=9) ve OR (n=3) örneklerinin LC&HC% değerlerinin ortalamalarının kontrol LC&HC % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %0,01 ve %0,08 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 6 saat ile inkübasyonu sonunda LC&HC % değeri farkı BB için %0,01, OR için %0,06 olduğu gözlenmiştir.

Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin % LC&HC değerleri ile inkübasyon zamanına karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermemiştir (p=0,61). Elde edilen eğri Şekil 38’de verilmiştir.



Şekil 38. Asidik pH stresi, rCE-SDS analizi ile elde edilen toplam LC&HC % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.

Asidik pH stresi uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin rCE-SDS elektrogramları Şekil 39’da verilmiştir. BB ve OR örneklerinin rCE-SDS elektrogramlarında, MMW oluşumu veya ng-HC pikinde artış gözlenmemiştir.



Şekil 39. Bazik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı rCE-SDS PDA elektrogramları

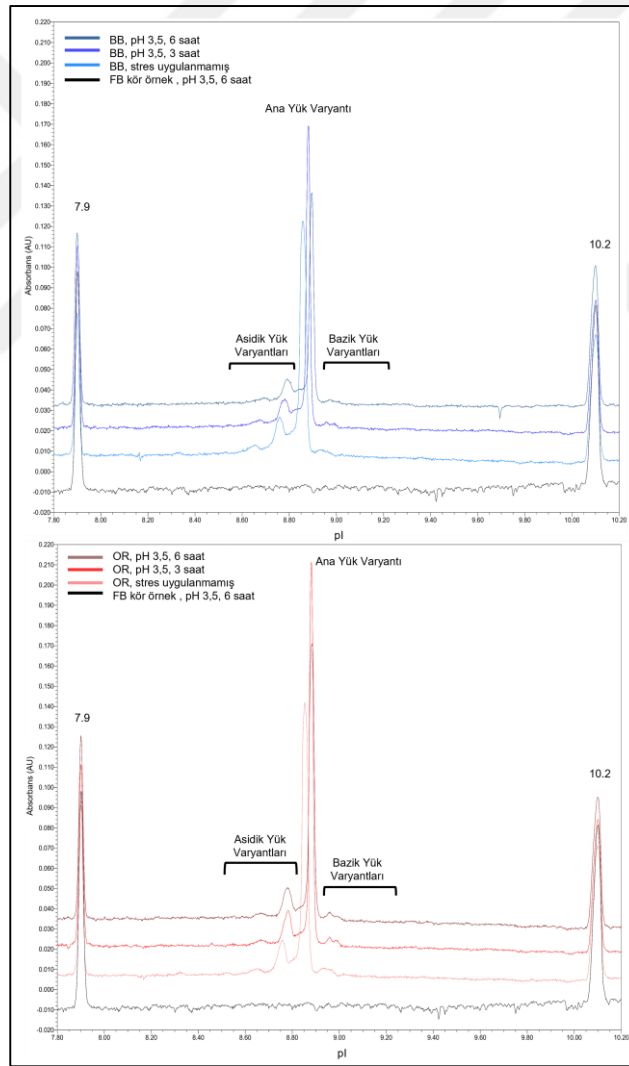
4.4.4 icIEF sonuçları

Üç farklı BB serisinin iki tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin iki tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki farklı inkübasyon grubu ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 41’de gösterilmiştir.

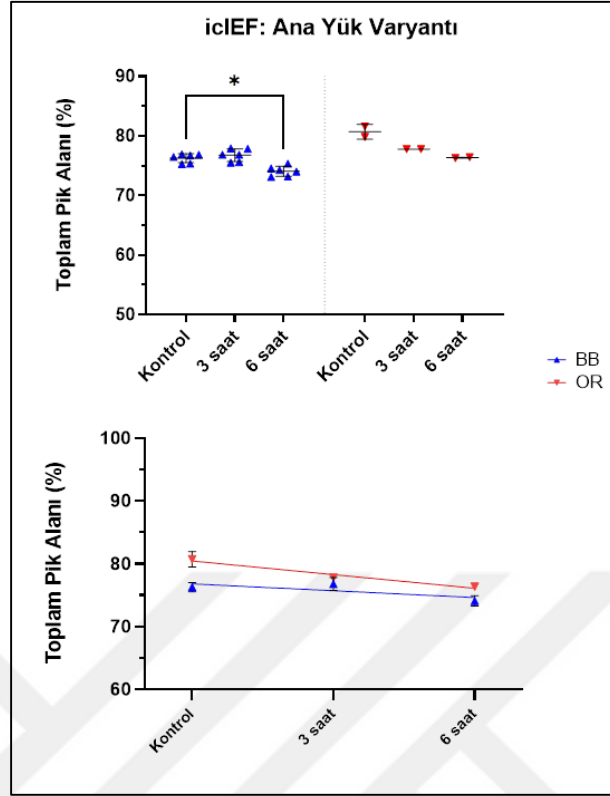
Asidik pH (pH 3,5) koşulunda 3 saat inkübe edilen BB (n=6) ve OR (n=2) örneklerinin ana yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol ana yük varyantı % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %0,50 ve %2,94 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 6 saat inkübasyonu sonunda ana yük varyantı % değeri farkı BB için %2,18, OR için %4,35 olduğu gözlenmiştir.

Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin % ana yük varyantı değerleri ile inkübasyon zamanına karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermemiştir ($p=0,10$). Elde edilen eğri Şekil 41’de verilmiştir.

Asidik pH stresi uygulanan BB ve OR örneklerinin, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin icIEF elektrogramları Şekil 40’de verilmiştir. BB ve OR örneklerinde, asidik pH inkübasyonu sonucunda ana yük pikinde az miktarda pI kayması gözlenmiştir. Belirgin şekilde asidik veya bazik pik artışı gözlenmemiştir.



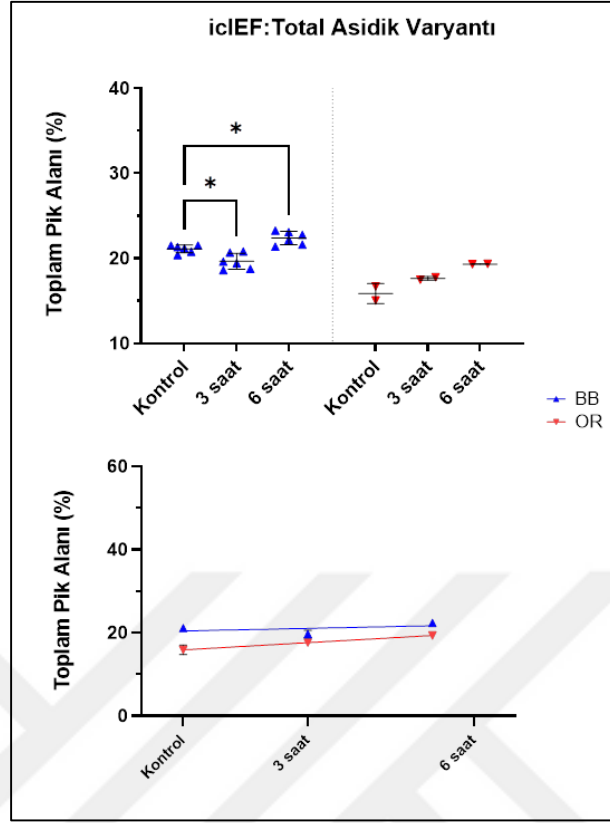
Şekil 40. Asidik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı icIEF UV elektrogramları



Şekil 41. Asidik pH stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam ana yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.

Asidik pH (pH 3,5) koşulunda 3 saat inkübe edilen BB (n=6) ve OR (n=2) örneklerinin asidik yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol asidik yük varyantı % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %1,46 ve %1,78 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 6 saat inkübasyonu sonunda ana yük varyantı % değeri farkı BB için %1,27, OR için %3,47 olduğu gözlenmiştir.

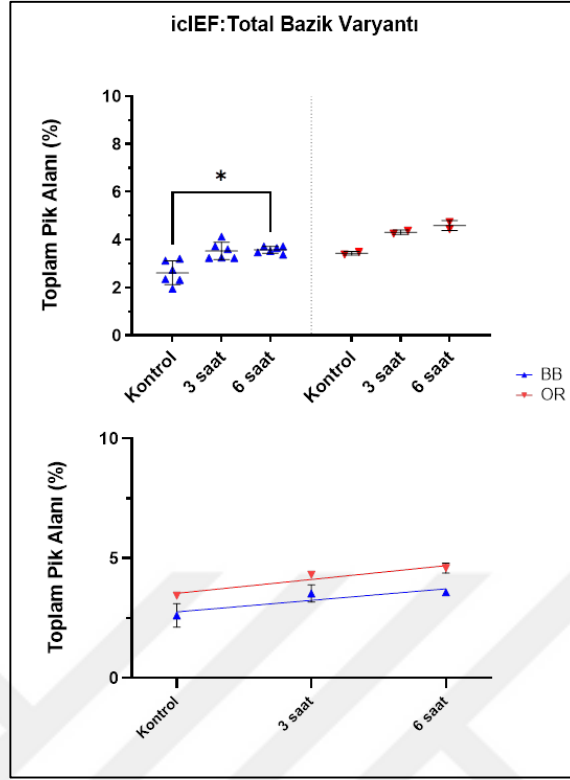
Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin ana %yük varyantı değerleri ile inkübasyon zamanına karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermemiştir (p=0,12). Elde edilen eğri Şekil 42’de verilmiştir.



Şekil 42. Asidik pH stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam asidik yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt)

Asidik pH (pH 3,5) stresi olarak 3 saat inkübe edilen BB (n=6) ve OR (n=2) örneklerinin bazik yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol bazik yük varyantı % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %0,92 ve %0,88 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 6 saat inkübasyonu sonunda bazik yük varyantı % değeri farkı BB için %0,96, OR için %1,16 olduğu gözlenmiştir.

Asidik pH (pH 3,5) stresi uygulanan örneklerin % bazik yük varyantı değerleri ile inkübasyon zamanına karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermemiştir (p=0,67). Elde edilen eğri Şekil 43'de verilmiştir.



Şekil 43. Asidik pH stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam bazik yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt)

4.4.5 Peptit haritalama sonuçları

Asidik pH stresi uygulaması sonrasında BB ve OR örneklerinde C-term K seviyelerinde azalma ve pE seviyelerinde artış tespit edilmiştir. BB ve OR örneklerinin pH 3,0 koşulunda 3 gün inkübasyonu sonunda N-term pE artışı, sırasıyla, %1,93 ve %2,09 olarak ölçülmüştür. BB ve OR örneklerinin, 1 günlük inkübasyon sonunda C-term K seviyesindeki azalma sırasıyla, %2,73 ve %2,87 olarak ölçülmüştür. İnkübasyonun 3 gün uygulandığı koşulda C-term K seviyelerinin BB için %1,56 oranında, OR için %4,55 oranında azaldığı gözlenmiştir (Tablo 12).

Asidik koşullar altındaki inkübasyon sonunda, BB ve OR örneklerinin oksidasyon seviyelerinde azalma olduğu görülmüştür. Sadece HC:T19 peptidi, BB örneğinde 1 günlük inkübasyon sonunda %3,63 ve 3 günlük inkübasyon sonunda %2,66 artış göstermiştir; OR örneğinde bu peptit tespit edilmemiştir (Tablo 12).

Asidik stres inkübasyonunun 3. gününde, BB ve OR örneklerinde deamidasyon seviyelerinin arttığı peptitler gözlenmiştir. En yüksek deamidasyon artışları sırasıyla, BB örneği için LC:T13 peptidinde %0,98 oranında, OR örneğinin HC:T35 peptidinde ise %5,87 olarak ölçülmüştür (Tablo 12).

Tablo 11. Asidik pH stresi kontrol ve stres örneklerinin PTM değerleri (%) verilmiştir.

Modifikasyon	Zincir:Peptit Numarası	Peptit Sekansı	Pozisyon	BB			OR		
				Kontrol	24 sa	72 sa	Kontrol	24 sa	72 sa
N-term pE	HC:T1	EVQLVESGGGLVQPGR	1	0,94	1,6	2,87	1,56	2,51	3,65
C-term K	HC:T40	SLSLSPGK	451	14,68	11,95	13,12	17,09	14,22	12,54
Oksidasyon	LC:T1	DIQMTQSPSSLSASVGDR	4	0,67	0,47	0,47	0,27	0,13	0,26
	HC:T3	LSCAASGFTFDDYAMHWV R	34	1,38	1,02	1,46	1,28	ND	ND
	HC:T8	NSLYLQMNSLR	83	1,11	0,58	0,77	0,4	0,32	0,45
	HC:T19	DTLMISR	256	4,17	7,8	6,83	3,53	ND	ND
	HC:T39	WQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQK	432	2,06	0,85	0,98	1,07	ND	ND
Deamidasyon	LC:T13	SGTASVVCLLNNFYPR	137/138	0,27	ND	1,25	0,3	ND	0,55
	HC:T8	NSLYLQMNSLR	77/84	0,24	0,47	0,67	0,4	0,5	0,95
	HC:T24	VVSVLTVLHQDWLNGK	319	0,37	0,5	0,8	0,67	ND	ND
	HC:T35	GFYPSDIAVEVESNGQPENN YK	388/393/394	2,1	1,81	1,51	3,64	8,43	9,51

4.5 Bazik (pH 9) Koşulda İnkübasyon

Bazik pH stresi, örneklere 1:1 oranında 100mM sodyum bikarbonat pH 9,0 solüsyonu eklenip 24 saat ve 72 saat boyunca inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tüm örnekler bekletilmeden analiz edilmiştir. Örneklerin bekletilmeden SE-UPLC, nrCE-SDS, rCES-SDS, icIEF analizleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen analizlerin sonuçlarının özeti Tablo 13'te verilmiştir.

BB ve OR örneklerine uygulanan bazik pH (pH 9,0) stresi sonunda, iki örneğin 72 saatlik inkübasyon sonunda yapılan analizlerinin sonucu, kontrol örneği sonucuna göre anlamlı olarak farklı çıkmıştır (Tablo 12). Bunun yanı sıra, BB ve OR örneklerinin 24 saatlik inkübasyonu sonunda, %IgG sonucu dışında elde edilen sonuçlarının kontrol örneği ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak farklı çıktığı görülmüştür (Tablo 12).

Tablo 12. Bazik (pH 9,0) koşul stresi sonuçları. Yüzde değerleri ortalama \pm SD olarak verilmiştir.

		OR					BB				
		Kontrol	1 gün	P değeri	3 gün	P değeri	Kontrol	1 gün	P değeri	3 gün	P değeri
SEC	Monomer	99,27 \pm 0,06	98,52 \pm 0,05	0,0076*	97,85 \pm 0,04	0,0019*	98,85 \pm 0,04	97,32 \pm 0,15	<0,0001*	96,29 \pm 0,12	<0,0001*
	IgG	96,64 \pm 0,16	95,36 \pm 0,81	0,2218	94,72 \pm 0,15	<0,0001*	95,66 \pm 0,43	94,39 \pm 0,89	0,0501	94,23 \pm 0,23	<0,0001*
	LC + HC	99,08 \pm 0,01	98,48 \pm 0,19	0,0459*	96,86 \pm 0,03	0,0001*	99,44 \pm 0,11	99,08 \pm 0,07	<0,0001*	97,59 \pm 0,20	<0,0001*
	Ana Yük Varyantı	78,69 \pm 0,76	64,79 \pm 0,42	0,0150*	39,78 \pm 0,22	0,0152*	76,27 \pm 0,74	61,72 \pm 0,49	<0,0001*	37,65 \pm 1,40	<0,0001*
	Toplam Asidik Varyantlar	17,06 \pm 0,30	31,72 \pm 0,30	0,0169*	51,29 \pm 0,03	0,0122*	21,12 \pm 0,44	35,43 \pm 0,54	<0,0001*	52,93 \pm 1,22	<0,0001*
	Toplam Bazik Varyantlar	3,26 \pm 0,05	3,50 \pm 0,12	0,1781	9,72 \pm 0,25	0,0283*	2,45 \pm 0,32	2,85 \pm 0,21	0,0150*	9,42 \pm 0,60	<0,0001*

*istatistiksel anlamlı fark

4.5.1 SE-UPLC sonuçları

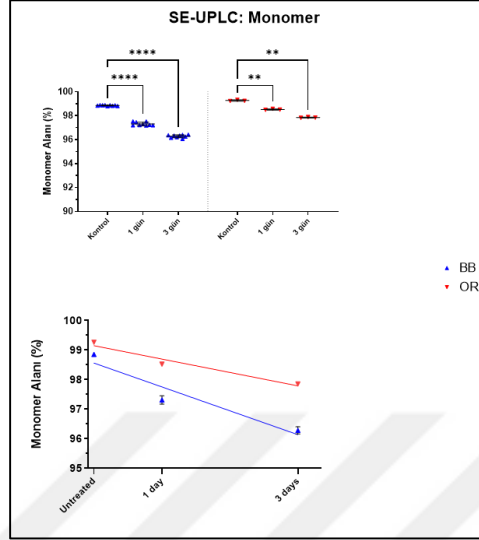
Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki farklı inkübasyon grubu ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 44'de gösterilmiştir.

Bazik pH 9,0 koşulunda 24 saat inkübe edilen BB (n=9) ve OR (n=3) örneklerinin monomer % değerlerinin ortalamalarının kontrol monomer % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %1,54 ve %0,74 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 72 saat inkübasyonu sonunda monomer % değeri farkı BB için %2,56, OR için %1,42 olduğu gözlenmiştir. Bazik pH 9,0 koşulunda 24 saat ve 72 saat inkübasyon sonunda, BB agregasyon artışı, sırasıyla, %1,13 ve 1,48 olarak ölçülmüştür. Aynı stres koşullarında OR örneği için agregasyon artışı 24 saat için %0,16 ve 72 saat için %0,41 olarak ölçülmüştür.

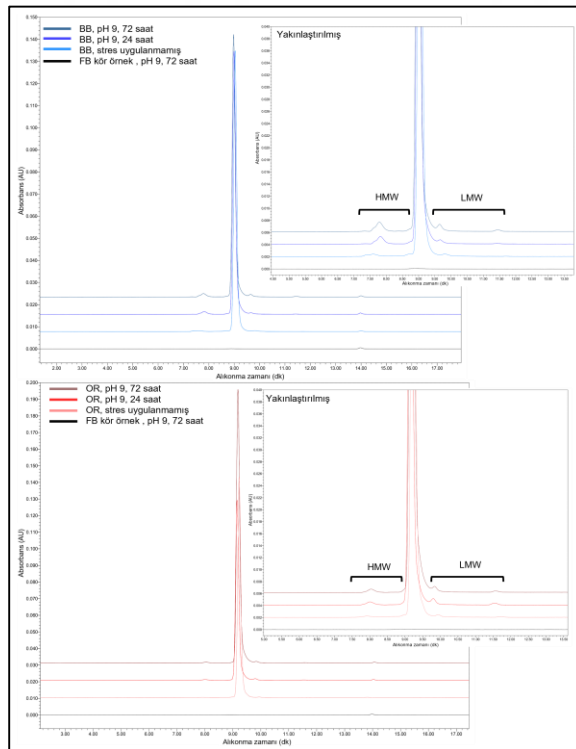
Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin % monomer değerleri ile inkübasyon zamanına karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermemiştir (p=0,32). Elde edilen eğri Şekil 44'de verilmiştir.

Bazik pH stresi uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin kromatogramları Şekil 45'te verilmiştir. BB ve OR örneklerinin kromatogramlarında, 24 saatlik ve 72 saatlik bazik

pH inkübasyonu sonunda HMW ve LMW miktarlarında, inkübasyon süresi ile doğru orantılı bir artış olduğu gözlenmiştir.



Şekil 44. Bazık pH stresi, SE-UPLC analizi ile elde edilen monomer alanı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.



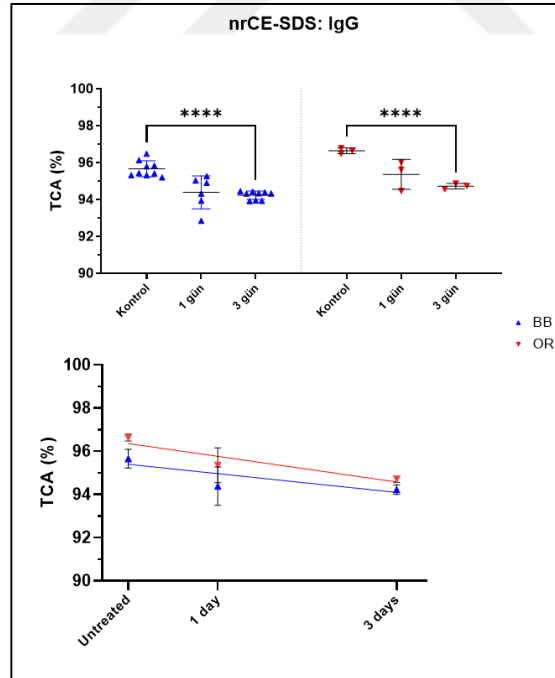
Şekil 45. Bazık stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı UV kromatogramları

4.5.2 nrCE-SDS sonuçları

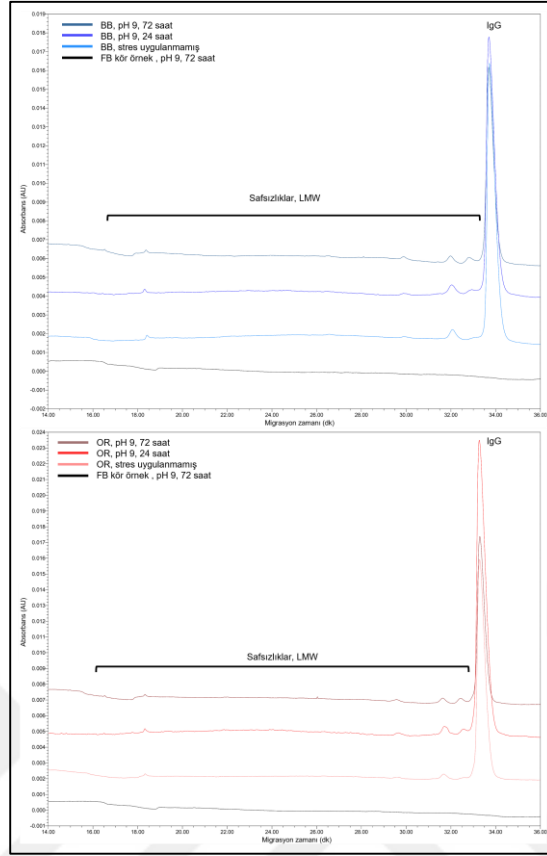
Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki farklı inkübasyon grubu ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 46'da gösterilmiştir.

Bazik pH (pH 9,0) koşulunda 24 saat inkübe edilen BB (n=9) ve OR (n=3) örneklerinin %IgG değerlerinin ortalamalarının, kontrol IgG % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %1,28 ve %1,28 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 72 saat inkübasyonu sonunda IgG % değeri farkı BB için %1,43, OR için %1,92 olduğu gözlenmiştir.

Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin % IgG değerleri ile inkübasyon zamanına karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermemiştir (p=0,41). Elde edilen eğri Şekil 46'da verilmiştir.



Şekil 46. Bazik pH stresi, nrCE-SDS analizi ile elde edilen toplam IgG TCA % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.



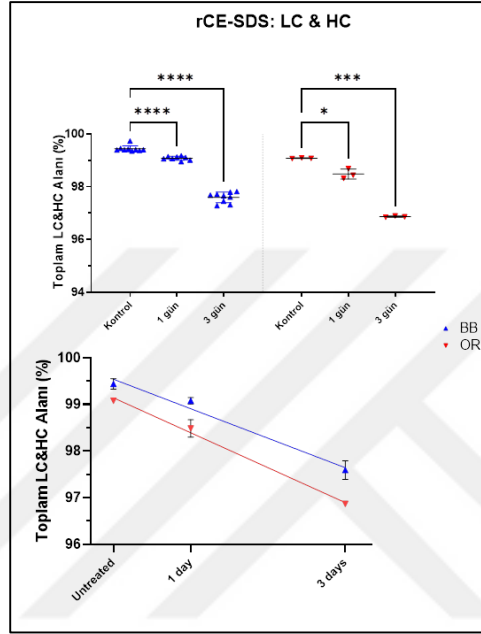
Şekil 47. Bazik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı nrCE-SDS PDA elektrogramları

Bazik pH stresi uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin nrCE-SDS elektrogramları Şekil 47’de verilmiştir. BB ve OR örneklerinin nrCE-SDS elektrogramlarında, bazik pH inkübasyon süresi ile doğru orantılı şekilde LMW miktarlarında artış gözlenmiştir. Özellikle glikolize olmamış IgG (ng-IgG) miktarında artış olduğu gözlenmiştir.

4.5.3 rCE-SDS sonuçları

Üç farklı BB serisinin üç tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin üç tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki farklı inkübasyon grubu ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 48’de gösterilmiştir.

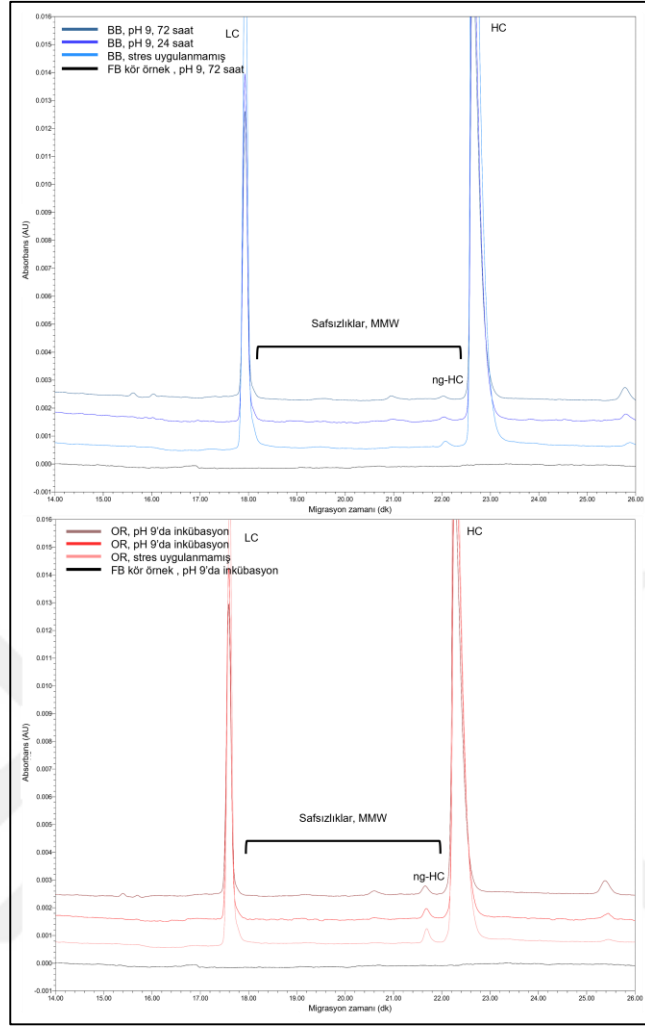
Bazik pH (pH 9,0) koşulunda 24 saat inkübe edilen BB (n=9) ve OR (n=3) örneklerinin LC&HC % değerlerinin ortalamalarının kontrol LC&HC % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %0,36 ve %0,60 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 72 saat inkübasyonu sonunda LC&HC % değeri farkı BB için %1,85, OR için %2,22 olduğu gözlenmiştir.



Şekil 48. Bazik pH stresi, rCE-SDS analizi ile elde edilen toplam LC&HC % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.

Oksidasyon stresi uygulanan örneklerin % LC&HC değerleri ile inkübasyon zamanına karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermiştir ($p=0,0367$). Elde edilen eğri Şekil 48’de verilmiştir.

Bazik pH stresi uygulanan BB ve OR örnekleri, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin rCE-SDS elektrogramları Şekil 49’da verilmiştir. BB ve OR örneklerinin rCE-SDS elektrogramlarında, bazik pH inkübasyon sonunda LMW ve MMW türlerinin oluştuğu gözlenmiştir.



Şekil 49. Bazik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı rCE-SDS PDA elektrogramları

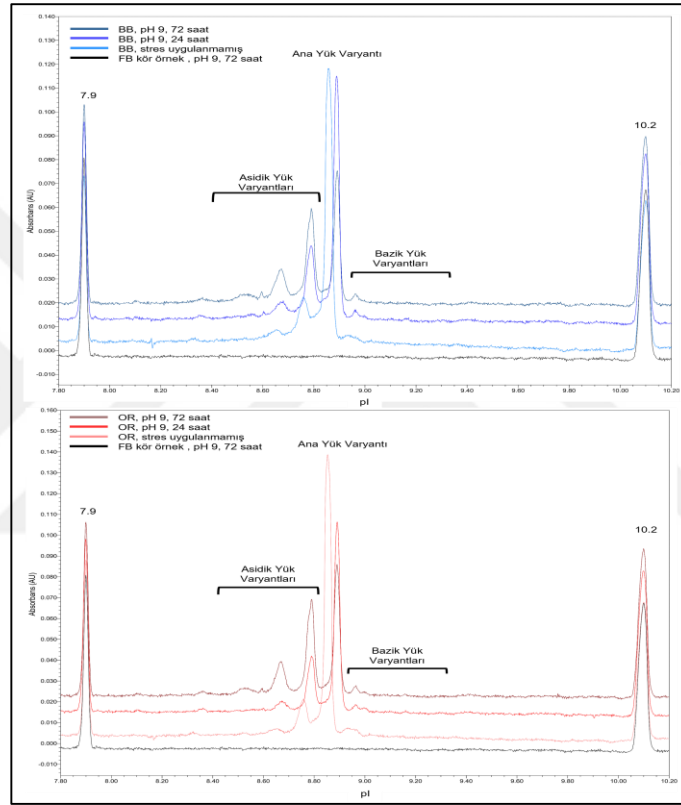
4.5.4 icIEF sonuçları

Üç farklı BB serisinin iki tekrarlı sonuçları gruplandırılarak OR örneğinin iki tekrarlı sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İki farklı inkübasyon grubu ayrı ayrı gruplandırılarak Şekil 51'de gösterilmiştir.

Bazik pH (pH 9,0) koşulunda 24 saat inkübe edilen BB (n=6) ve OR (n=2) örneklerinin ana yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol ana yük varyantı % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %14,55 ve %13,90 olarak belirlenmiştir.

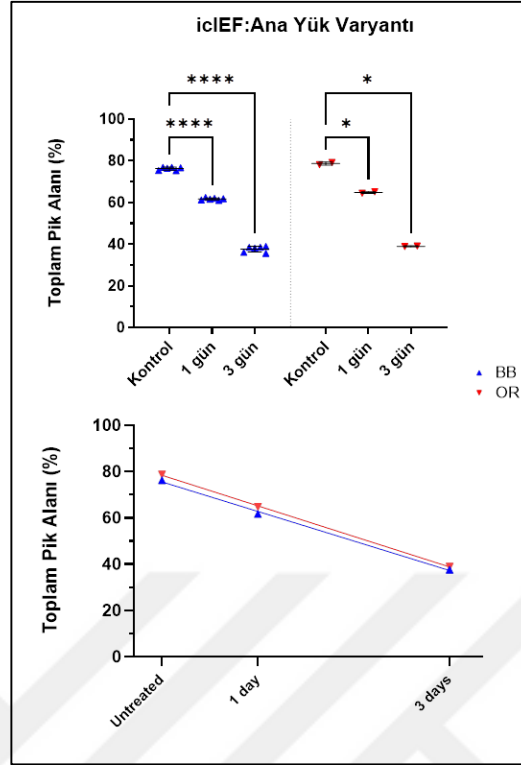
Aynı örnek grubunun 72 saat inkübasyonu sonunda ana yük varyantı % değeri farkı BB için %38,62, OR için %39,70 olduğu gözlenmiştir.

Bazik pH stresi uygulanan örneklerin % ana yük varyantı değerleri ile inkübasyon zamanına karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermemiştir ($p=0,33$). Elde edilen eğri Şekil 51’de verilmiştir.



Şekil 50. Bazik stres uygulanan örneklerin karşılaştırmalı icIEF UV elektrogramları

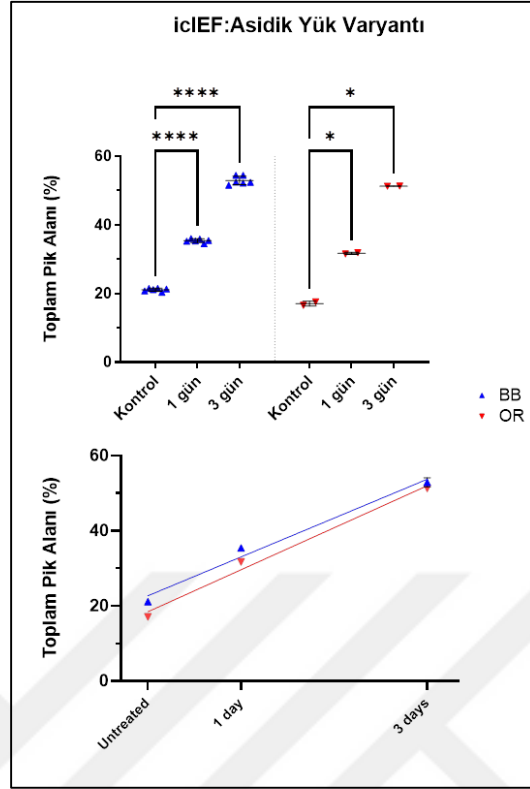
Bazik pH stresi uygulanan BB ve OR örneklerinin, stres uygulanmış formülasyon tamponu ve stres uygulanmamış BB ve OR örneklerinin icIEF elektrogramları Şekil 50’de verilmiştir. BB ve OR örneklerinde, bazik pH inkübasyonu süresi ile doğru orantılı olarak asidik piklerde artış gözlenmiştir. Artan asidik piklerin pI aralığı 8,6-8,8 arasındadır.



Şekil 51. Bazik pH stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam ana yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt) olarak verilmiştir.

Bazik pH (pH 9,0) koşulunda 24 saat inkübe edilen BB (n=6) ve OR (n=2) örneklerinin asidik yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol asidik yük varyantı % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %14,31 ve %14,66 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 72 saat inkübasyonu sonunda asidik yük varyantı % değeri farkı BB için %31,82, OR için %34,23 olduğu gözlenmiştir.

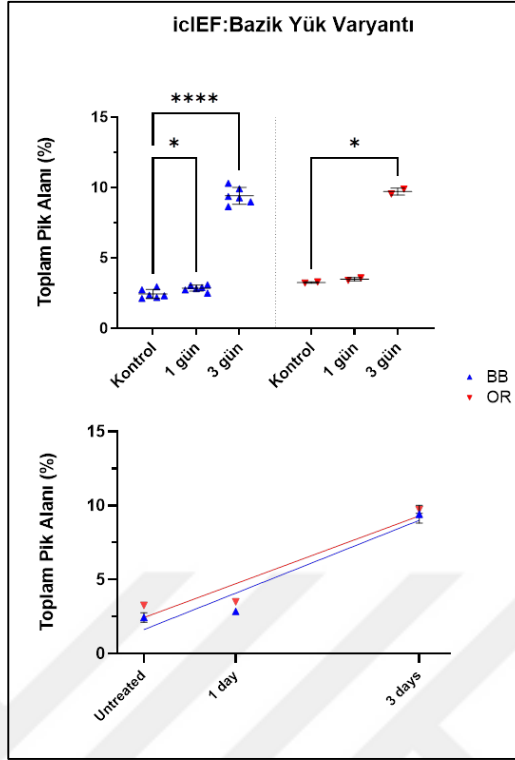
Bazik pH stresi uygulanan örneklerin % asidik yük varyantı değerleri ile inkübasyon zamanına karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermemiştir (p=0,27). Elde edilen eğri Şekil 52’de verilmiştir.



Şekil 52. Bazik pH stresi, icIEF analizi ile elde edilen toplam asidik yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt)

Bazik pH (pH 9,0) koşulunda 24 saat inkübe edilen BB (n=6) ve OR (n=2) örneklerinin bazik yük varyantı % değerlerinin ortalamalarının kontrol bazik yük varyantı % değeri ortalamasından farkları sırasıyla, %0,40 ve %0,24 olarak belirlenmiştir. Aynı örnek grubunun 72 saat inkübasyonu sonunda bazik yük varyantı % değeri farkı BB için %6,97, OR için %6,46 olduğu gözlenmiştir.

Bazik pH stresi uygulanan örneklerin % bazik yük varyantı değerleri ile inkübasyon zamanına karşı lineer eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen BB ve OR lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırılmıştır. BB ve OR için elde edilen eğriler farklılık göstermemiştir (p=0,67). Elde edilen eğri Şekil 53'de verilmiştir.



Şekil 53. icIEF analizi ile elde edilen toplam bazik yük varyantı % sonuçları. Sonuçlar gruplandırılarak ortalama \pm SD sonuçları (üst) ve lineer eğrileri (alt)

4.5.5 Peptit haritalama sonuçları

BB ve OR örneklerinin bazik pH koşulunda inkübasyonu sonrasında *N*-term pE seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bazik koşullarda 3 gün inkübasyon sonrasında, BB ve OR örneklerinin *N*-term pE artışı, sırasıyla, %1,69 ve %1,83 olarak gözlenmiştir (Tablo 14).

BB ve OR örneklerinin bazik pH koşulunda inkübasyonu sonrasında *C*-term K seviyelerinde düşüş gözlenmiştir. Bazik koşullarda 3 gün inkübasyon sonrasında, BB ve OR örneklerinin *C*-term K düşüşü, sırasıyla, %3,30 ve %1,57 olarak gözlenmiştir (Tablo 14).

BB ve OR örneklerindeki ortalama oksidasyon değişimi, inkübasyonun 1. gününün sonunda, sırasıyla, %0,47 ve %0,46 olarak ölçülmüştür; inkübasyonun 3. gününün sonunda oksidasyon seviyesindeki ortalama azalmalar sırasıyla, %0,41 ve

%0,46 olarak ölçülmüştür. BB örneğinin HC:T19 peptidinde, 3. günün sonunda oksidasyon %0,96 miktarında artış gözlemlenmiştir (Tablo 14).

Bazik pH koşullarında 3 günlük inkübasyonun sonunda, BB ve OR örneklerinin deamidasyon seviyelerindeki ortalama artışlar sırasıyla, %3,17 ve %3,55 olarak ölçülmüştür. En yüksek deamidasyon BB ve OR örnekleri için HC:T35 peptidinde gözlenmiştir; 3 günlük inkübasyon sonunda BB örneğinde %12,39, OR örneği için %14,29 miktarında artış gözlenmiştir (Tablo 14).

Tablo 13. Bazik pH stresi kontrol ve stres örneklerinin PTM değerleri (%) verilmiştir.

Modifikasyon	Zincir:Peptit Numarası	Peptit Sekansı	Pozisyon	BB			OR		
				Kontrol	24 sa	72 sa	Kontrol	24 sa	72 sa
N-term pE	HC:T1	EVQLVESGGGLVQPGR	1	0,94	1,44	2,63	1,56	2,03	3,39
C-term K	HC:T40	SLSLSPGK	451	14,68	11,2	11,38	17,09	16,61	15,52
Oksidasyon	LC:T1	DIQMTQSPSSLSASVGDR	4	0,67	0,15	0,14	0,27	ND	ND
	HC:T3	LSCAASGFTFDYAMHWVR	34	1,38	1,11	1,31	1,28	0,66	1,33
	HC:T8	NSLYLQMNSLR	83	1,11	0,17	0,18	0,4	ND	ND
	HC:T19	DTLMISR	256	4,17	3,64	5,13	3,53	2,49	2,24
	HC:T39	WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	432	2,06	1,96	1,94	1,07	1,12	0,7
Deamidasyon	LC:T13	SGTASVVCLLNIFYPR	137/138	0,27	0,51	0,55	0,3	0,45	0,49
	HC:T8	NSLYLQMNSLR	77/84	0,24	0,69	1,31	0,4	0,82	1,17
	HC:T24	VVSVLTVLHQDWLNGK	319	0,37	1,5	1,98	0,67	1,15	2,52
	HC:T35	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	388/393/394	2,1	7,36	14,49	3,64	8,72	17,93
	HC:T39	WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	425/438	ND	0,39	0,49	ND	0,34	0,63

5 TARTIŞMA

Stres uygulamaları sonucunda BB ve OR örneklerindeki değişimler SE-UPLC, nrCE-SDS, rCE-SDS, icIEF ve peptit haritalama analizleri ile tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kendi içinde ve literatürde daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

5.1 Dondurma/Çözme Stresi

Stres koşulları arasında donma/çözünme (D/Ç) stresi, ilk uygulanan streslerden biridir. D/Ç sırasında mAb bulunduran çözeltide aynı anda soğuk denatürasyonu, buz-solüsyon yüzeyinin oluşumu, çözücünün kristalleşmesi ve pH kayması gibi birçok etki birden devreye girer (93). Bu nedenle, D/Ç süreçleri incelenirken, hangi stres faktörlerinin gözlemlenen protein hasarına neden olduğunu belirlemek zordur. D/Ç stresinin beş döngü olarak uygulanması sonucunda, BB ve OR örneklerinin % monomer miktarları kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında, sırasıyla %0,02 ve %0,04 olmak üzere oldukça az oranda azalma gözlenmiştir (Tablo 2). Aynı koşullar altında, %HMW miktarlarının, BB için %0,08 oranında arttığı, OR için %0,2 oranında arttığı gözlenmiştir.

D/Ç stres örneklerinin nrCE-SDS analizi sonucunda %IgG seviyesindeki değişim, BB için %0,69, OR için %0,78 olarak ölçülmüştür (Tablo 2). Stres koşulları altında her iki numunenin degradasyon hızlarını karşılaştırmak için kullanılan yaklaşımlardan biri, stres koşulları uygulanmasının ardından elde edilen sonuçlar ile kontrol örnekleri arasındaki değişimi gösteren lineer eğriler oluşturup bunların BB ve OR arasında karşılaştırılmasıdır (56,91,92). Bu sonuçlardan elde edilen lineer eğri eğimlerinin karşılaştırması sonucunda anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,77$); buna bağlı olarak, degradasyon oranlarının benzer olduğu sonucuna varılmaktadır.

D/Ç stres örneklerinin rCE-SDS analizi sonucunda BB ve OR örneklerinin, %LC&HC seviyesinde kontrol örneklerine göre belirgin bir fark gözlenmemiştir (Tablo 2). Benzer durum, yük varyantları için de söylenebilir; iki örneğin yük varyant seviyelerinin, kontrol örnekleri ile karşılaştırmaları sonucunda anlamlı farklar

görülmemiştir (Tablo 2). Yapılan bir çalışmada, D/Ç etkisinin daha iyi gözlenmesi için otuz döngü uygulanmış, ayrıca guanidin-HCl denaturantı eklenerek değişiklikler gözlenmiştir. Bu işlemler sonucunda HC bölgesinde daha fazla modifikasyon görülmüştür (93).

BB ve OR örneklerinin PTM değişimlerinin oldukça düşük seviyelerde olduğu gözlenmiştir (Tablo 3). Gözlemlenen en yüksek değişimlerden biri, OR örneğinin C-term K seviyesinin %0,39 azalmasıdır. OR ve BB örneklerinde en yüksek oksidasyon artışı, HC:T19 peptidinde, sırasıyla %0,17 ve %0,48 olarak gözlenmiştir (Tablo 3). Deamidasyon BB örneğinde daha fazla gözlenmiştir. HC:T8 ve HC:T35 peptitlerinin deamidasyon seviyelerinde, sırasıyla, %0,22 ve %0,65 artış gözlenmiştir (Tablo 3). Bir çalışmada, infliximab örneğine, D/Ç'nin bir döngü uygulanması sonrasında büyük instabilite olduğu bildirilmiştir (94). Bu sonuç, BB geliştirmesi açısından önemlidir, çünkü ürünün dondurularak saklanması olası olduğunu ifade etmektedir.

5.2 Termal Stres

Termal stres koşullarından yüksek sıcaklık noktası olarak denenen ilk değer 60 °C'dir. Bu sıcaklık değerinde inkübasyon sonucunda örneklerin jelleştiği gözlenmiştir. TNF- α inhibitörü adalimumab biyobenzeri ve orijinatörü (AB ve ABD serilerinin) ile yapılan çalışmada, ilk erime sıcaklıklarının 63,1-64,9°C aralığında bulunduğu belirtilmiştir (95). Etanercept BB ve OR ürünü ile yapılan bir diğer çalışmada, ilk erime sıcaklığının 56,7-57,0°C aralığında olduğu belirtilmiştir (96). İlk denenen inkübasyon sıcaklığında jelleşmenin nedeni, ürünlerin erime sıcaklıklarına yakın seviyelerde inkübasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. DeFelippis ve diğerleri, erime sıcaklığına yakın sıcaklık seviyelerinde stres uygulanmasının moleküller üzerinde etkisinin fazla olduğundan stres uygulamasının bu değerlerden 10-20°C daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmesini önermiştir (5). Bu nedenle ikinci sıcaklık seviyesi olarak 50 °C'nin uygulanmıştır.

OR ve BB örneklerinde SE-UPLC monomer seviyelerinde, beklendiği üzere, 50°C'lik termal stres sonrasında daha fazla monomer düşüşü gözlenmiştir (37°C'de

7 gün). Inkübasyon sonrasında monomer seviyelerinin OR örneğinde %0,60 ve BB örneğinde %0,70 oranında düştüğü gözlenmiştir. Monomer seviyesi, 50°C’de 7 gün inkübasyon sonunda OR örneğinde %2,85 ve BB örneğinde %2,48 olarak gözlenmiştir (Tablo 4, Tablo 5). İki sıcaklık koşulunda ve iki inkübasyon süresi sonunda hem BB hem de OR örneklerinin monomer seviyeleri, kontrol örneklerine göre anlamlı olarak azalma göstermiştir. Monomer seviyelerinin azalma oranları lineer eğriler kullanılarak karşılaştırıldığında, 37°C’de oluşturulan eğriler arasında ($p=0,36$) ve 50°C’de oluşturulan eğriler arasında fark gözlenmemiştir ($p=0,19$). Önceki çalışmalarda gözlemlendiği gibi, monomerin degradasyonu ve HMW varyantlarının oluşumu, monomer seviyelerinde azalmaya yol açmaktadır (49,52,89). Yakın tarihli bir çalışmada, mAb'lara uygulanan, termal stres koşulu dahil, farklı stres uygulamaları sırasında gözlenen HMW’lerdeki artışın, mAb etkinliğinde önemli ölçüde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (97). Inkübasyon süresi 7 gün olan termal stres uygulamasının sonunda, 37°C’de agregasyon artışı BB örnekleri için %0,36 ve OR örnekleri için %0,19 olarak gözlenmiştir. Aynı süre boyunca 50°C’de inkübasyon sonucu HMW miktarlarındaki artış, BB örnekleri için %0,75, OR örnekleri için %0,52 olarak gözlenmiştir. Sıcaklık stresi uygulaması değerlendirildiğinde, bu stres, genellikle antikörlerin yapısındaki belirli alanların ardışık olarak açılmasıyla sonuçlanır ve bu kısmen katlanmamış ara ürünlerin birikmesi, kendi kendine agregasyonu veya degradasyonu başlatabilir (93). Yapılan termal stres koşulundaki (37°C) örneklerin kontrollerine kıyasla degradasyonlarında fazla artış gözlenmemiştir. Birçok farmasötik firmasının stres çalışmaları ile ilgili katıldığı bir ankette, termal stres için kullanılan koşulların, daha yüksek sıcaklıklar altında veya daha uzun sürelerde olduğu bildirilmiştir (51).

Termal stres uygulamasının ardından, 37°C’de inkübasyonun 3. gününde ölçülen IgG seviyeleri, kontrol örnek seviyeleri ile karşılaştırıldığında BB ve OR örnekleri için anlamlı fark gözlenmezken, 7. günün sonunda anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. IgG seviyelerindeki azalma oranları BB ve OR örnekleri için sırasıyla %0,56 ve %0,76 olarak belirlenmiştir (Tablo 4). Inkübasyonun (50°C) hem 3. gününde hem de 7. günün sonunda ölçülen IgG seviyeleri, kontrol örnek seviyeleri ile karşılaştırıldığında, BB ve OR örnekleri için anlamlı farklar gözlenmiştir. Ölçülen

IgG seviyelerinin inkübasyon zamanına karşı oluşturulan lineer eğrilerinin eğimleri karşılaştırıldığında, 37°C’de ($p=0,40$) ve 50°C’de ($p=0,28$) benzer degradasyon oranları gözlemlenmiştir (Şekil 16). Termal stres uygulaması HMW oranının en çok yükseldiği stres koşullarından bir tanesidir. Pisupati ve diğerleri tarafından yapılan, 40°C’de 4 hafta inkübe edilen infliximab BB ve OR örneklerinde yüksek oksidasyon ve deamidasyon seviyeleri görülmüştür. İnfliximab BB ve OR örneklerde yaklaşık %0,44/gün agregat artışı görüldüğü belirtilmiştir. Agregat artışının OR örneğinde %12,6, BB örneğinde ise %12,0 arttığı belirtilmiştir (92). Buna rağmen nrCE-SDS analizi sonucunda, IgG monomerinden daha yüksek molekül ağırlığına sahip varyantlar gözlenmemiştir. Bu durum oluşan HMW’lerin kovalent bağlı olmadıklarına işaret etmektedir. Termal stres örneklerinin rCE-SDS sonuçlarında da benzer durum gözlenmiştir; 37°C’de inkübasyonun 3. gününde ölçülen LC&HC seviyeleri, kontrol örnek seviyeleri ile karşılaştırıldığında BB örnekleri için anlamlı fark gözlenmezken, OR örneğinde anlamlı fark ($p=0,0004$) olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, BB ve OR LC&HC seviyelerinin 7. günün sonunda kontrol örneklerine göre anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (sırasıyla, $p=0,0005$ ve $p=0,0011$). BB ve OR örneklerinin, 50°C’de inkübasyonun 7. gününde %LC&HC seviyelerindeki değişimler sırasıyla %1,13 ve %0,95 olarak ölçülmüştür (Tablo 5). Hem 3. gün hem de 7. günün sonunda ölçülen değerler kontrol örnek seviyeleri ile karşılaştırıldığında, BB ve OR örnekleri için anlamlı değişimler olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, termal stres uygulanan mAb örneklerinde benzer sonuçlar elde edilmiştir (49,52,89).

İndirgenmemiş ve indirgenmiş CE-SDS çalışmalarının sonuçları, SE-UPLC analizi sırasında tespit edilen HMW varyantlarının, CE-SDS analizlerinde tespit edilemeyeşinden ötürü, kovalent olarak bağlı olmadığını göstermektedir. (98). Pisupati ve diğerlerinin çalışmasında, SEC analizinde detaylı görülemeyen fragment artışları nrCE-SDS ve rCE-SDS analizleri ile incelendiği belirtilmiştir (92). Termal stres uygulaması öncesi düşük olan, farklı boyutlardaki fragmentlerin (50, 100, 125 kDa) arttığı belirtilmiştir; rCE-SDS sonucunda HMW görülmediğinden yola çıkılarak disülfid bağ değişimleri olduğu öne sürülmüştür. SDS-PAGE analizinde fragment miktarının OR için %7,1 arttığı, BB için 0,4 arttığı bildirilmiştir. Ayrıca aynı

çalışmada, termal stres uygulanan infliximab BB ve OR örneklerinin, başlangıç koşullarında farklı safsızlık seviyelerinin olması, safsızlık artış oranını etkilemediği belirtilmiştir (92).

Termal stres altında degradasyonun ana mekanizmalarından biri, peptit bağı bölünmesi ile parçalanmadır ve mAb parçalanmasına çoğunlukla bu tür enzimatik olmayan işlemler aracılık eder (99). Kang ve diğerlerinin üç farklı mAb'ın BB ve OR örneklerini 4 hafta 40 °C'de 250 RPM'lik çalkalama ile inkübasyonu çalışmasında, SEC analizi agregat seviyelerinde önemli değişiklikler gözlemlenmezken, SDS-PAGE analizinde fragment seviyelerinde artışlar (<% 1) ve üç örnek çiftinde dimer olduğu bildirilmiştir. Rituximab OR ve BB arasında başlangıç agregasyon yüzdesinde farklılıklar gözlemlenmesine rağmen, monomer pikinin inkübasyon boyunca benzer seviyede kaldığı bildirilmiştir (89). Habegger ve diğerlerinin mAb örneğine 40°C'de 1 ay termal stres uyguladıkları çalışmalarında, monomer %0,8 oranında azalmıştır, ana yük varyantları %18,3 azalırken, asidik yük varyantları %30,6 oranında artmıştır. En yüksek PTM artışları arasında, LC-Asn-92 deamidasyonu %10,3, HC-Met-252 oksidasyonu %10,3 olarak bildirilmiştir (100).

Termal stres sonucu oluşan yük varyant değişimleri incelendiğinde, 37°C koşulu ile 50°C koşulu arasında büyük farklılık olduğu gözlenmiştir. BB ve OR örneklerinin ana yük varyantları, 37°C'de 7 gün inkübasyonun sonunda sırasıyla, %5,68 ve %6,82 miktarında azaldığı, 50°C'de 7 gün inkübasyonun sonunda ise sırasıyla, %26,41 ve %26,57 miktarında azaldığı gözlenmiştir (Tablo 4 ve Tablo 5). Ana yük varyantındaki azalmanın büyük bir kısmının asidik yük varyantlarındaki artış nedeniyle olduğu gözlenmiştir. BB ve OR örneklerinin asidik yük varyantlarının, 37°C'de 7 gün inkübasyonun sonunda sırasıyla, %3,16 ve %6,01 miktarında arttığı, 50°C'de 7 gün inkübasyonun sonunda ise sırasıyla, %23,10 ve %23,17 miktarında arttığı gözlenmiştir. BB ve OR örneklerinin bazik yük varyantlarının 37°C'de 7 gün inkübasyonun sonunda, sırasıyla, %1,49 ve %0,81 miktarında arttığı, 50°C'de 7 gün inkübasyonun sonunda, sırasıyla, %3,57 ve %3,40 miktarında arttığı gözlenmiştir. İnkübasyon sonundaki yük varyant seviyeleri kontrol örneklerinin seviyeleri ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu gözlenmektedir. Ancak, 37°C'de 3 gün inkübasyonun sonunda OR bazik varyantındaki ve BB asidik

varyantındaki değişim miktarları benzer olmasına rağmen değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4). Ana yük varyantları, asidik yük varyantları ve bazik yük varyantlarının değişimlerinden yola çıkılarak oluşturulan lineer eğrilerin eğimlerinin karşılaştırılması sonucunda, iki sıcaklık koşulunda da yük varyant değişim oranlarının istatistiksel olarak benzer olduğu görülmektedir (Şekil 21, 22 ve 23). Kang ve diğerlerinin üç farklı mAb'ın BB ve OR örnekleri ile yaptıkları termal stres çalışmasında, yük varyantı dağılımındaki en büyük değişiklikler üç OR örneğinde meydana gelmiştir, ancak yine de stres boyunca BB örneklerindeki asidik ve bazik yük dağılımları daha fazla olduğu bildirilmiştir (89). Rituximab, bevacizumab ve trastuzumab OR ürünleri için ana pik alanları, sırasıyla %14, %11 ve %29 azaldığı ve buna karşılık üç BS ürününün ana pik alanları sırasıyla %5, %1 ve %19 oranında azaldığı bildirilmiştir (89). Shabestari ve diğerlerinin BB ve OR örneklerine 40°C'de 7 gün termal stres uyguladığı çalışmada, agregat oranları BB için %3,3, OR için %3,0 oranında arttığı belirtilmiştir (101). BB ve OR'nin asidik yük oranları, sırasıyla %10,0 ve %8,0 arttığı ve bazik yük oranlarının, sırasıyla %1,3 ve %4,3 arttığı bildirilmiştir (101).

Termal stres peptit haritalama sonuçları, icIEF analizi sonucunda belirlenen asidik yük varyantlarındaki artışın nedenleri hakkında bilgi vermektedir. BB ve OR örneklerinde, *N*-term pE seviyelerinde artış gözlenirken, *C*-term K seviyelerinde azalma gözlenmiştir. *N*-term pE modifikasyonunun termal stresle arttığı ve asidik yük varyantlarına katkıda bulunan PTM'lerden biri olduğu bilinmektedir (99). *C*-term K varlığının ise bazik yük varyantlarına katkıda bulunan PTM'lerden biri olduğu, ve K'nin *C*-terminalinden kopması/kesilmesinin asidik yük varyantlarına etkisi bulunduğu belirtilmiştir (87,102). BB örneğindeki *N*-term pE miktarı, 37°C inkübasyon sonunda yaklaşık 1,5 katına, 37°C inkübasyon sonunda ise yaklaşık 3,5 katına kadar çıkmaktadır. OR örneğinde *N*-term pE miktarı, 37°C inkübasyon sonunda yaklaşık 1,3 katına, 37°C inkübasyon sonunda ise yaklaşık 2,5 katına kadar çıkmaktadır (Tablo 6). *N*-term pGlu oluşumu ve *C*-term K kesilmesi, farmakokinetik ve immünojenisite açısından etkili olmayan PTM'lerdir, ancak proses tutarlılığını kontrol etmek için izlenmelidirler (56,99,102,103). BB ve OR örneklerindeki deamidasyon seviyeleri, HC:T35 peptidi dışındaki peptitlerde, stres boyunca %1,5

seviyesinin üstüne çıkmamıştır. HC:T35 peptidinin en yüksek deamidasyon seviyeleri, BB örneğinin 37°C inkübasyonu sonunda %2,71, OR örneğinin 50°C inkübasyonu sonunda %4,91 olarak gözlenmiştir (Tablo 7). Termal stres altında, BB örneğinin oksidasyon seviyeleri artarken, OR örneğinin oksidasyon seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir. BB örneğinde, iki termal stres koşulunda da HC:T3 Met oksidasyonunun arttığı gözlenmiştir. Ancak, OR örneğinde, HC:T3 peptit oksidasyonunun azaldığı (37°C) ya da tespit edilemediği görülmektedir (Tablo 6 ve Tablo 7). BB örneğinde, 50°C inkübasyonu sonunda, OR örneğinin ise 37°C inkübasyonu sonunda, HC:T35 peptidinin düşük deamidasyon seviyelerinde gözlenmesinin, ayrıca OR örneğinin HC:T3 peptidinde Met oksidasyonunun azalması veya tespit edilememesinin nedeninin, bu modifikasyonlara sahip varyantların degradasyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir. Termal stres sonucu oksidasyon ve deamidasyon modifikasyonlarının gözlemlendiği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Pisupati ve diğerlerinin, dört hafta 40°C’de inkübe edilen infiximab BB ve OR örneklerinde deamidasyon seviyelerinin, HC’de daha fazla olmak üzere, %18’e kadar çıktığını belirtmişlerdir (92). Bu çalışmada araştırılan bölgelerden biri olan HC-Asn392 bölgesindeki deamidasyon, OR örneğinde %9,0 arttığı, BB örneğinde %10,7 arttığı belirtilmiştir. Termal stres sonrasında, TNF bağlanmalarında %81,8 ‘lik (OR) ve %77,2’lik (BB) düşüş gözlenmiştir; bunun nedeninin, HC-Asn57 deamidasyonu veya fonksiyonel IgG azalmasından kaynaklı olabileceği bildirilmiştir (92). Aynı çalışmada ayrıca, stres uygulamasında diğer bölgelere göre daha az deamidasyon görülen bölgelerin, daha uzun süre inkübe edildiklerinde, diğer bölgelerle birlikte, yüksek deamidasyon seviyelerine ulaştığı, belirtilmiştir. Bunun nedeninin, mAb’ların konformasyonel esnekliği ve deamidasyona uğrayabilecek bölgelerin erişilebilirliği ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (92). Leblanc ve diğerleri yaklaşık 9 yıl 2-8°C’de saklanan mAb ile yaptığı çalışmada, stres çalışmalarında belirlenen degradasyona neden olan bölge sayısı, mAb’lar 2-8°C gibi düşük sıcaklıklarda muhafaza edildiklerinde daha az olabileceğini belirtmişlerdir (104).

5.3 Kimyasal Oksidasyon Stresi

Oksidasyon stresi için, H₂O₂ eklenerek inkübasyon uygulandıktan sonra, BB ve OR örneklerinin oldukça fazla degradasyona uğradığı, ayrıca modifikasyonlara

uğradığı gözlenmiştir. İki farklı H₂O₂ seviyesinde uygulanan oksidasyon stresi sonucunda, %monomer seviyelerinin H₂O₂ miktarı ile doğru orantılı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. H₂O₂ miktarının %1,5 olduğu inkübasyon sonunda, %monomer ortalaması, BB örneğinde %2,75 oranında, OR örneğinde ise %5,7 oranında azalmıştır (Tablo 8). BB ve OR örneklerinde oksidasyon stresi sonucunda agregasyondan ziyade degradasyon gözlenmiştir. Bunun en iyi görüldüğü analiz, nrCE-SDS analizidir.

Oksidatif stresin %0,5 H₂O₂ ile uygulandığı koşulda, kontrol örneklerine göre BB örneklerindeki ortalama %IgG miktarı %14, OR örneklerinde %16 oranında azalmıştır (Tablo 8). IgG miktarındaki düşüş, %1,5 H₂O₂ ile uygulanan oksidasyon stresi sonucunda, BB örnekleri için %34, OR örnekleri için %41 olarak belirlenmiştir (Tablo 8). LC&HC oranlarında da azalma görülmüştür; %0,5 H₂O₂ uygulandığı koşulda, kontrol örneklerine göre BB örneklerindeki ortalama %LC&HC miktarı %2,16 oranında, OR örneklerinde ise %2,58 oranında azalmıştır (Tablo 8). Kontrol örnekleri ile kıyaslandığında, %LC&HC miktarları, %1,5 H₂O₂ uygulandığı koşulda, BB örneklerinde %4,12 oranında, OR örneklerinde %5,03 oranında azalmıştır (Tablo 8). BB ve OR örneklerinin iki düzeyde uygulanan oksidatif stres sonuçları, kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında monomer, IgG, ve LC&HC seviyeleri anlamlı olarak farklı çıkmıştır. Sonuçlar kullanılarak elde edilen lineer eğrilerin karşılaştırmasında ise, LC&HC sonucu (p=0,0609) dışında, eğimlerinin farklı olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, CHO hücrelerinde saflaştırılan insan IgG1 üretiminde, oksidasyon ile indüklenmiş parçalanma ürünleri olduğu, bu parçalanma ürünlerinin öncelikli olarak *hinge* bölgesinden parçalandığı belirlenmiştir (105). Ayrıca, aynı parçalanma ürünlerinin *in vitro* olarak H₂O₂ inkübasyonu ile oluştuğu gösterilmiştir (105). IgG'lerin esnek üst *hinge* bölgesinin, doğrudan hidroliz, β-eliminasyon, bakır-aracılı kopma veya serbest radikal ile kataliz gibi parçalanma mekanizmalarına çok duyarlı olduğu anlaşılmaktadır (104). Bu sonuçlar, oksidatif stresin BB ve OR örneklerinde agregasyon oluşumu yerine parçalanmaya neden olduğunu göstermektedir.

Yük varyantları incelendiğinde, BB ve OR örneklerinin oksidatif stres sonucunda asidik yük varyantlarının arttığı gözlenmiştir. Oksidatif stresin %0,5 H₂O₂ seviyesi kullanılarak uygulandığı durumda, BB ve OR örneklerindeki asidik yük varyantlarında sırasıyla, %11,58 ve %15,15 oranında artış gözlenmiştir; %1,5 H₂O₂ seviyesi kullanılarak uygulandığı durumda ise asidik yük varyantları, BB ve OR örneklerinde sırasıyla, %30,14 ve %39,19 seviyelerine çıkmıştır (Tablo 8). Kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında, BB örneklerinin ana yük ve asidik yük varyantlarının, iki oksidasyon koşulunda, anlamlı olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir. OR örneklerinin ana yük, asidik yük, ve bazik yük varyantlarında, %1,5 H₂O₂ uygulandığı durumda kontrole göre anlamlı farklar görülmüştür (Tablo 8). Yük varyantı seviyelerine karşı H₂O₂ için oluşturulan lineer eğrilerin eğimleri birbirinden farklı çıkmıştır (Şekil 31, 32 ve 33). Shabestari ve diğerlerinin BB ve OR örneklerine 25°C'de 1 gün %3,0 H₂O₂ ile oksidatif stres uyguladığı çalışmada, agregat oranları BB için %2,0, OR için %3,0 oranında arttığı belirtilmiştir. BB ve OR'nin asidik yük oranları, sırasıyla, %3,3 ve %4,3 azaldığı ve bazik yük oranlarının, sırasıyla, %55,3 ve %61,3 arttığı bildirilmiştir (101). Habegger ve diğerlerinin mAb örneğine 24 saat %0,02 H₂O₂ uyguladığı kimyasal oksidasyon stresi çalışmasında, monomer oranında azalma gözlemlenmemiş; asidik yük varyantları %9,6 oranında artmış, bazik yük varyantları %4,5 oranında azalmıştır. Oksidasyon stresinin 24 saat %0,2 H₂O₂ uyguladığı durumda, LC-Met-4'ün %47,9, HC-Met-252'nin %99,0, ve HC-Met-428'in %80,4 oranında okside olduğu bildirilmiştir (100).

Peptit haritalama analizleri ile oksidasyon stresi sonucu oluşan modifikasyonlar incelendiğinde, beklendiği üzere Met bulunduran peptitlerin yüksek oranda okside olduğu görülmüştür. İki örnek için %1,5 H₂O₂ seviyesinde inkübasyon sonrası, HC:T19 ve HC:T39 peptitlerinde %95 üzerinde, HC:T3 peptidinde ise %82 üzerinde oksidasyon görülmüştür (Tablo 9). HC N-term pE oluşumu ve C-term K miktarlarında, büyük değişimler gözlenmemiştir (Tablo 9). Deamidasyon oranlarında, %1,5 H₂O₂ seviyesinde inkübasyon sonrası, BB için ortalama deamidasyon artışı %0,43, OR için %0,26 olduğu belirlenmiştir (Tablo 9). Leblanc ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, Fc bölgesinde gerçekleşen oksidasyonların bazik varyant oluşumuna, F(ab')₂ bölgesinde oluşan oksidasyonların

ise asidik varyant oluşumlarına yol açtığı belirtilmiştir (104). Ponniah ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, asidik fraksiyon toplanıp peptit haritalama analizi yapıldığında, Met oksidasyonunun ana modifikasyon olduğunu belirlenmiş ve doğrulamak için ana yük varyantı fraksiyonu H₂O₂ ile inkübe edilip oluşan asidik pikler analiz edilmiştir. Asidik fraksiyonların peptit haritalama analizi sonucunda, F(ab')₂ fragmentlerinde Met oksidasyonu bulunduğu görülmüştür (106). Dyck ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, infliximab ve bevacizumab mAb'larının BB ve OR örneklerine H₂O₂ kullanarak oksidatif stres uyguladıklarında, bevacizumab örneklerinde en fazla 3 noktadan oksitlenmiş değişken HC fragmenti tespit edilmiş, infliximab örneklerinde en fazla ise 2 noktadan oksitlenmiş HC fragmenti tespit edilmiş (103). İki mAb arasında, infliximab LC(Met55)'sinin neredeyse tamamı bir oksitlenme gösterirken bevacizumab örneklerinin gözlenen LC(Met4)'lerinin neredeyse tamamı oksitlenmemiş halde olduğu gözlenmiştir. BB ve OR örneklerinin oksidasyon durumları açısından ufak farklılıklar gözlemlendiği bildirilmiştir. İncelenen iki mAb'da da BB örneklerinde yüksek oksidasyon noktası içeren fragmentler gözlenirken, OR örneklerinde bu oksidasyon türleri gözlenmemiştir. İki Met bölgesi, Met252 ve Met428, incelenen mAb'ların ikisinde de bulunmaktadır. Bu Met'lerin mAb yüzeyinde olduklarından dolayı oksidasyona daha açık oldukları belirtilmiştir (103). Folzer ve arkadaşlarının (2015) IgG1 örneğini %1 H₂O₂ ile 24 saatlik inkübe ettikleri diğer bir çalışmada, oksidasyon oranlarında LC-Met4'te %4,1, HC-Met34'te %6,7, HC-Met83'de %3,5, HC-Met258'de %95,2, ve HC-Met434'te %94,9 olduğu bildirilmiştir (107).

Kimyasal oksidasyon, termal stres ve asidik/bazik inkübasyondan sonra gözlemlenen diğer iki ana PTM, metionin (Met) oksidasyonu ve asparagin (Asn) kalıntılarının deamidasyonuydu. Met oksidasyonu ve Asn deamidasyonunun stres koşullarıyla ilişkisi iyi belgelenmiştir (54,87,88,99,100,107). Kalıntıların modifikasyonlara duyarlılığı, çözücüye maruz kalmalarına ve antikorun üç boyutlu yapısındaki konumlarına büyük ölçüde bağlıdır. Bu çalışmada, Met oksidasyonu veya Asn deamidasyonunun gözlemlendiği bölgeler esas olarak çözücüye maruz kalan bölgelerde yer almaktadır. Oksidasyon gözlemlenen bölgeler olarak Met256 (HC:T19) ve Met432 (HC:T39), deamidasyon gözlemlenen bölgeler olarak da

Asn388/393/394 (HC:T35) ve Asn425/438 (HC:T39), her iki ürünün Fc bölgesinde bulunmakta ve diğer bölgelere göre çözücüye daha fazla maruz kaldığı için daha korunmasız olan bölgededir. Dyck ve diğerlerinin çalışmasında, iki mAb'da da bulunan Met34 ve Met83 diğer bölgelere göre daha az okside oldukları bildirilmiştir (103). Bizim çalışmamızda, Fc bölgesinde bulunan Met'lerde yüzde yüze yakın oksitlenme görülürken Met34 ve Met83 bölgelerinde daha az oksitlenme gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, sekonder protein yapılarının, yerel yapının kısıtlı esnekliği nedeniyle, solvente maruz kalmayan bölgelerde Asn deamidasyonunu kısıtladığı gösterilmiştir. (108).

5.4 Asidik ve Bazik pH Stresi

Asidik pH 3,0'da inkübasyon sonrasında, BB ve OR örneklerinde oldukça fazla degradasyon gözlenmiştir. Bu derece degradasyon gözlendiği durumda, örneklerdeki değişimler sağlıklı bir şekilde değerlendirilemeyeceğinden dolayı, daha hafif asidik stres koşulları altında iki örneğe tekrardan stres uygulanmıştır. BB ürününün saflaştırma aşamalarında inilen en düşük pH değerine yakın olan pH 3,5 koşulunda, 3 saat ve 6 saat inkübasyon süresi daha hafif stres koşulu olarak belirlenmiştir (5,109). Asidik pH 3,5'da 3 saat ve 6 saat inkübasyon stres koşulları sonunda, BB ve OR örneklerinin monomer seviyelerinin, kontrol örnekleri ile karşılaştırması sonucunda anlamlı farklar olduğu gözlenmiştir; ancak, monomer değişimleri oldukça düşük seviyededir (Tablo 10). Asidik pH stresi sonuçları kullanılarak oluşturulan lineer eğrilerin eğimleri karşılaştırıldıklarında, anlamlı fark olmadığı görülmüştür ($p=0,1073$). Bazik pH 9,0'da 72 saat inkübasyon sonucunda, BB ve OR monomer seviyelerinin kontrol örneklerine göre değişimi sırasıyla, %2,57 ve %1,47 olarak ölçülmüştür; monomer seviyeleri, kontrol örneklerine göre, 2 inkübasyon süresinde de, anlamlı farklılık göstermiştir (Tablo 12). Bazik pH inkübasyonu sonunda BB ve OR örneklerinin monomer değerleri kullanılarak elde edilen lineer eğri eğimlerinin karşılaştırması sonucunda anlamlı fark gözlenmemiştir ($p=0,3229$). BB ve OR örneklerinin asidik ve bazik pH koşullarında inkübasyonu sonucunda monomer seviyelerinde benzer şekilde azalma görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, daha önce yapılan çalışmalar ile benzer sonuçlar vermiştir. Habegger ve diğerlerinin mAb örneğine 3 gün asidik (pH 8) ve bazik pH (pH 9) uygulayarak Asn deamidasyonlarını

araştırdıkları çalışmalarında, monomer asidik pH'da %0,2 oranında, bazik pH'da %0,6 oranında azalmıştır. Asidik pH'da asidik yük varyantları %9,5 artarken, bazik pH'da asidik yük varyantları %17,3 oranında artmıştır (100).

Asidik pH 3,5'te 6 saat inkübasyon stresi sonunda, BB ve OR örneklerinin ölçülen IgG seviyelerinin kontrol örneklerine göre değişimleri sırasıyla, %0,17 ve %0,09 olarak ölçülmüştür; LC&HC seviyeleri için bu değerlerin sırasıyla, %0,08 ve %0,06 olduğu görülmüştür (Tablo 10). Bu değişimler oldukça düşük seviyede olmasına rağmen, OR örneği %IgG seviyesi, kontrol örneğine göre anlamlı fark göstermiştir ($p=0,032$). Bazik pH 9,0'da 72 saat inkübasyon sonunda, BB ve OR örneklerinin IgG seviyelerindeki değişimler sırasıyla, %1,43 ve %1,91 olarak ölçülmüştür. Aynı koşullar altında, BB ve OR örneklerinin LC&HC seviyelerindeki değişimler sırasıyla, %1,84 ve %2,21 olarak ölçülmüştür (Tablo 12). Fonksiyonel grupların asidik veya bazik olması, çeşitli reaksiyon yollarına neden olmaktadır; bu nedenle pH değeri degradasyon reaksiyonları için önemli bir parametredir (110). Peptit bağlarının su aracılığıyla parçalanması ve *hinge* bölgesi modifikasyonları, asidik ve bazik koşullar altında hızlanmaktadır (111,112). Glisin-glisin motiflerinin bulunduğu *hinge* bölgesinde ve antikorların CH1 bölgelerinde gözlenmektedir (110). Sisteinin β -eliminasyon ile tiyoeter bağ yapması ve *hinge* bölgesinin kesilmesi özellikle bazik koşullar altında, C-term Asp kopması ise daha asidik koşullar altında gözlenmektedir; üstelik disülfid bağlı Fab fragmanlarının oluşmasına neden olmaktadır (113). Radikallerden kaynaklı *hinge* bölgesi kesilmesi ise oksidatif, termal, veya UV ışığı stresleri altında görülmektedir (114). IgG1 tipi mAb'lar için, bazik pH daha çok agregasyona neden olurken, asidik pH daha çok fragmentasyona neden olmaktadır (115). Asidik ve bazik pH stresi sonucunda, BB ve OR örneklerinin hem *hinge* bölgesi ve disülfid bağlarında, hem de LC ve HC peptit bağlarında fragmentasyonun arttığı söylenebilir (116).

Asidik pH 3,5 inkübasyonu sonunda, BB ve OR örneklerinde, ana yük varyantlarının azalıp, asidik ve bazik yük varyant miktarlarının arttığı gözlenmiştir (Tablo 10). Asidik pH 3,5 stresinin 6 saatlik inkübasyonu sonunda BB örneğinde ana yük varyantı %2,18 oranında azalırken, asidik yük varyantı %1,27 oranında artmıştır (Tablo 10). Aynı stres koşulunda OR örneğinde ana yük varyantı %4,35 oranında

azalırken, asidik yük varyantı %3,47 oranında artmıştır. Bu sonuçlardan, BB ve OR örneklerinde, ana yük varyantlarından asidik yük varyantlarına geçiş olduğu görülmektedir. Shabestari ve diğerlerinin BB ve OR örneklerine 25°C’de 3 gün 0,1M HCl ile asidik pH stresi uyguladığı çalışmada, agregat oranları BB için %75,3, OR için %84,3 oranında arttığı belirtilmiştir. BB ve OR’nin asidik yük oranları, sırasıyla, %6,0 ve %2,0 azaldığı ve bazik yük oranlarının, sırasıyla, %32,0 ve %38,0 arttığı bildirilmiştir (101).

Asidik pH stresi sonrası PTM seviyeleri incelendiğinde, *N*-term pE miktarının artışı, *C*-term K miktarının azalışı, deamidasyon seviyelerindeki artış, ve oksidasyon seviyelerindeki azalma iki örnek arasında benzer şekilde gerçekleşmiştir (Tablo 11). Sonuçlar da asidik yük varyantlarının artışı desteklemektedir (64). Başlıca farklılık görülen peptitler HC:T19 ve HC:T35 peptitleridir. Asidik stres inkübasyonu sonrası, HC:T19 peptidindeki oksidasyon, BB örneğinde %2,66 oranında artarken, OR örneğinde %3,53 oranında azalmıştır. HC:T35 peptidindeki deamidasyon, BB örneğinde %0,59 oranında azalırken, OR örneğinde %3,53 oranında artmıştır (Tablo 11).

Bazik pH 9,0 inkübasyonu sonunda, BB ve OR örneklerinde, ana yük varyantlarının azalıp, özellikle asidik yük varyant miktarının arttığı gözlenmiştir (Tablo 12). Bazik pH 9,0 stresinin 72 saatlik inkübasyonu sonunda BB örneğinde ana yük varyantı %38,62 oranında azalırken, asidik yük varyantı %31,82 oranında artmıştır (Tablo 12). Aynı stres koşulunda OR örneğinde ana yük varyantı %39,70 oranında azalırken, asidik yük varyantı %34,23 oranında artmıştır. Bu sonuçlardan, BB ve OR örneklerinde, ana yük varyantlarının büyük bir kısmının asidik yük varyantlarına geçtiği görülmektedir. Shabestari ve diğerlerinin BB ve OR örneklerine 25°C’de 3 gün 0,1M NaOH ile bazik pH stresi uyguladığı çalışmada, agregat oranları BB için %4,7, OR için %2,3 oranında arttığı belirtilmiştir. BB ve OR’nin asidik yük oranları iki örnekte de %4,7 arttığı ve bazik yük oranlarının, sırasıyla, %2,0 ve %0,3 azaldığı bildirilmiştir (101).

BB ve OR örneklerinin bazik pH stresi sonrası PTM seviyeleri kıyaslandığında *N*-term pE miktarının artışı, *C*-term K miktarının azalışı, deamidasyon

seviyelerindeki artış, ve oksidasyon seviyelerindeki azalma iki örnek arasında benzer şekilde gerçekleşmiştir (Tablo 13). Bazik pH inkübasyonu sonunda, HC:T35 (Asn-388, 393, 394) deamidasyonu BB örneğinde %12,39 ve OR örneğinde %14,29 artış ile en yüksek modifikasyon görülen peptit olmuştur (Tablo 13). Habegger ve diğerlerinin yaptığı çalışmada, bazik pH koşulunda LC-Asn-92 deamidasyonu %6,9, HC-Asn-384,389,390 deamidasyonu %7,8 olarak bildirilmiştir. En yüksek oksidasyon artışları bazik pH koşulunda, LC-Met-4'te %1,6 ve HC-Met-428'de %1,4 oranında gözlemlendiği bildirilmiştir (100).

Asidik ve bazik pH koşulları arasında direk bir karşılaştırma yapmak, stres koşulları arasındaki farklı inkübasyon süreleri nedeniyle doğru bir karşılaştırma olmayabilir. BB ve OR örneklerinin ana yük varyantlarının pI değerleri 8,7-8,8 arasında ölçülmüştür. Uygulanan asidik pH 3,0 stresi, örneklerin pI noktasından oldukça farklıdır ve bazik pH 9,0 stresi ile aynı inkübasyon süreleri uygulanmasına rağmen daha fazla degradasyona neden olmuştur. Bazı saflaştırma aşamalarında pH 3,5 gibi asidik pH seviyelerine inilebilmektedir (109). Ancak, asidik pH 3,5 stresi, inkübasyon süresinin daha kısa tutulmasına bağlı olarak, BB ve OR örneklerinde yüksek degradasyona neden olmamıştır. Bu sonuç, BB örneğinin saflaştırma aşamalarında inilen bu asidik pH seviyelerinde, 3 – 6 saat tutulması durumunda oluşabilecek degradasyon hakkında oldukça yararlı bilgiler vermektedir.

Uygulanan streslerde, oksidasyonun Met34'ün bulunduğu bölgede artmış olarak gözlenmesi, kısmen solventle erişilebilir olmasına veya stres nedeniyle açılmasına bağlı olarak bu bölgeyi oksidasyona karşı daha korumasız hale getirmesi sonucu olabilir. Mo ve diğerleri, Fc bölgesinde Met'in oksidasyonu ile FcRn bağlanmasının kaybı ile CDC aktivitesi arasındaki korelasyonları göstermiştir (117). Aynı çalışmada, özellikle Met34 oksidasyonu diğer streslere göre nispeten düşük bulunmuş ve Met34 oksidasyonu Fab bölgesinde yer aldığı için FcRn bağlanması ve CDC aktivitesi kaybı ile ilişkili bulunmamıştır (117). IgG1 ile yapılan bir başka çalışmada, Met34'ün aynı oksidasyon koşulları altında diğer kalıntılara göre çok daha düşük oksidasyon gösterdiği ve Fc alanında bulunan Met kalıntılarının oksidasyona daha yatkın olduğu belirtilmiştir. (118) .

Gelecekte yapılacak çalışmalar ile çalışmanın veri setinin genişletilmesi planlanmaktadır. Üretilen yeni BB serileri ve satın alınacak OR serileri ile stres çalışması tekrarlanarak elde edilen sonuçlar güçlendirilecektir. Bunun yanı sıra, inkübasyon süresinin uzatılması veya inkübasyon süresince örnekleme noktalarının arttırılması, stres koşullarının çeşitlendirilmesi gibi yaklaşımlarla veri noktaları arttırılarak BB ve OR örneklerinin daha geniş bir aralıkta karşılaştırılması planlanmaktadır.

BB ve OR örnekleri ile yapılan stabilite çalışması sonunda, stabilite süresi boyunca gözlenen değişimler, stres uygulaması sonucunda gözlenen değişimler ile karşılaştırılacaktır. Termal stres gibi koşullar aynı zamanda hızlandırılmış stabilite çalışması kapsamında da kullanılmaktadır. Hızlandırılmış stabilite sonuçlarının, uzun süre boyunca uygulanan stabilite çalışması ile uyumlu sonuçlar vermesi gelecekte yapılacak araştırmalar için önemli bilgiler sağlayacaktır.

Ayrıca, ışık stresi gibi mAb'larda oksidasyona neden olduğu bilinen farklı stres koşullarının uygulanması planlanmaktadır. Işık stresinin kontrollü ortamda ve stabil ışık şiddeti uygulanarak gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu koşulları sağlayacak ekipmanların bulunmaması nedeniyle bu çalışmada ışık stresi uygulanamamıştır. Ancak, gelecekte ışık stresi ve bunun gibi stres koşullarının uygulanabileceği ekipmanlar temin edilerek stres çalışmalarının kapsamının genişletilmesi planlanmaktadır.

6 SONUÇ

Bu çalışmada, BB ve OR ürünlerinin, dondurma/çözme döngüsü, termal, kimyasal oksidasyon, asidik ve bazik pH stresi koşulları altında nasıl davrandıkları araştırılmıştır. BB ürününün geliştirilmesi aşamasında değerlendirilmesi gereken dış stres unsurlarının, ürün üzerindeki etkileri hakkında oldukça önemli bilgiler elde edilmiştir. Biyofarmasötik endüstrisinde BB ürünlerin yaygınlaşmasıyla, OR ürünlerinden farklı olan özelliklerinin etkileri daha da iyi anlaşılmaktadır. Uygulanan beş farklı stres koşulunda, BB ve OR ürünlerinin gösterdikleri değişimlerin karşılaştırılması, ürünlerin fizikokimyasal özelliklerinin benzerliğini göstermektedir.

Bu çalışmanın diğer bir kazanımı, kullanılan analitik yöntemlerin üretim, stabilite ve çeşitli stres koşullarına maruz kalan BB ürününün kalite değerlendirmesinde kullanımının uygun olduğunun gösterilmesidir. Farklı stres koşullarında oluşan degradasyon ürünlerinin ve modifikasyonların, kullanılan yöntemler ile tespit edilebildiği, ayrıca kantitatif bir şekilde karşılaştırılabildiği gösterilmiştir.

Gelecekteki çalışmalarda, bu çalışmanın kapsamının genişletilmesi planlanmaktadır. Elde edilen sonuçların, daha fazla BB üretim ve OR serisi ile tekrarlanarak doğrulanması, veri setinin genişletilmesi ve ürünlerin daha fazla stres koşulu altında incelenmesi gelecekte başvurulacak klinik çalışma öncesinde önemli bilgiler sağlayacaktır.

7 KAYNAKLAR

1. Dal OH, Karadoğan M, Sezer AD. Biyobenzerler: Kavramlar ve Ruhsatlandırma Süreçleri. *MARMARA Pharm J* [Internet]. 2015 Apr 20;19(3):252–8.
2. Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. Vol. 7, mAbs. 2015.
3. Sousa F, Sarmiento B, Neves-Petersen MT. Biophysical study of bevacizumab structure and bioactivity under thermal and pH-stresses. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2017;105(March):127–36.
4. Elvin JG, Couston RG, Van Der Walle CF. Therapeutic antibodies: Market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm* [Internet]. 2013;440(1):83–98.
5. DeFelippis MR, Harmon BJ, Huang L, Sukumar M. Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation. In: Baertschi SW, editor. *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*. 2nd ed. 2011. p. 370–90.
6. Tamizi E, Jouyban A. Forced degradation studies of biopharmaceuticals: Selection of stress conditions. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2016 Jan;98:26–46.
7. FDA. Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity of a Therapeutic Protein Product to a Reference Product. Guidance for Industry. 2015.
8. Niosi J. Imitation and innovation new biologics, biosimilars and biobetters. *Technol Anal Strateg Manag* [Internet]. 2017;29(3):251–62.
9. Del Val IJ, Kontoravdi C, Nagy JM. Towards the implementation of quality by design to the production of therapeutic monoclonal antibodies with desired glycosylation patterns. *Biotechnol Prog*. 2010;26(6):1505–27.
10. Bonini S, Bonini M. Biosimilars and drug development in allergic and immunologic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 139(5):1461–4.
11. Ventola CL. Biosimilars: part 1: proposed regulatory criteria for FDA approval. *P T*. 38(5):270–87.
12. Declerck P, Danesi R, Petersel D, Jacobs I. The Language of Biosimilars: Clarification, Definitions, and Regulatory Aspects. *Drugs*. 77(6):671–7.
13. Derbyshire M. Patent expiry dates for best-selling biological. *Generics Biosimilars Initiat J*. 2015;4:178–9.
14. Dal, Karadoğan, Sezer - 2015 - Biyobenzerler Kavramlar ve Ruhsatlandırma Süreçleri.pdf.
15. Moorkens E, Meuwissen N, Huys I, Declerck P, Vulto AG, Simoons S. The market of biopharmaceutical medicines: A snapshot of a diverse industrial landscape. *Front Pharmacol*. 2017;8(JUN).
16. IEIS. Turkish Pharmaceutical Market 2016 [Internet]. 2017. Erişim: http://www.ieis.org.tr/ieis/assets/media/kls/TR_Pharma_Market_2016_.pdf
17. IEIS. Turkish Pharmaceutical Market: Key Indicators [Internet]. 2020. Erişim: www.ieis.org.tr/ieis/en/indicators/33/turkish-pharmaceutical-market
18. IEIS. Türkiye İlaç Pazarı [Internet]. 2021. Erişim: <http://www.ieis.org.tr/ieis/tr/indicators/33/turkiye-ilac-pazari>
19. Kim HU, Alten R, Avedano L, Dignass A, Gomollón F, Greveson K, et al. The Future of Biosimilars: Maximizing Benefits Across Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Drugs* [Internet]. 2020;80(2):99–113.
20. Magnenat L, Palmese A, Fremaux C, D'Amici F, Terlizese M, Rossi M, et al. Demonstration of physicochemical and functional similarity between the proposed biosimilar adalimumab MSB11022 and Humira®. *MAbs* [Internet]. 2017 Jan 2;9(1):127–39.
21. Xu Y, Xie L, Zhang E, Gao W, Wang L, Cao Y, et al. Physicochemical and functional assessments demonstrating analytical similarity between rituximab biosimilar HLX01 and the MabThera®. *MAbs*. 2019;11(3):606–20.
22. Chiu ML, Goulet DR, Teplyakov A, Gilliland GL. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies*. 2019;8(4):55.
23. Fagioli C, Mezghrani A, Sitia R. Reduction of Interchain Disulfide Bonds Precedes the Dislocation of Ig- μ Chains from the Endoplasmic Reticulum to the Cytosol for Proteasomal Degradation. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Nov;276(44):40962–7.
24. Kirk SJ, Cliff JM, Thomas JA, Ward TH. Biogenesis of secretory organelles during B cell

- differentiation. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2010 Feb;87(2):245–55.
25. Shaffer A., Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee A-H, Qian S-B, Zhao H, et al. XBP1, Downstream of Blimp-1, Expands the Secretory Apparatus and Other Organelles, and Increases Protein Synthesis in Plasma Cell Differentiation. *Immunity* [Internet]. 2004 Jul;21(1):81–93.
 26. Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianfèrani S. Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem*. 2013;85(2):715–36.
 27. Liu L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. Vol. 104, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015.
 28. Daëron M. Fc Receptors as Adaptive Immunoreceptors. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology* [Internet]. 2014. p. 131–64.
 29. Nimmerjahn F, Ravetch J V. Translating basic mechanisms of IgG effector activity into next generation cancer therapies. Vol. 12, *Cancer immunity*. p. 13.
 30. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* [Internet]. 2009 Apr 16;113(16):3716–25.
 31. Suzuki E, Niwa R, Saji S, Muta M, Hirose M, Iida S, et al. A nonfucosylated anti-HER2 antibody augments antibody-dependent cellular cytotoxicity in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007;13(6):1875–82.
 32. Iida S, Misaka H, Inoue M, Shibata M, Nakano R, Yamane-Ohnuki N, et al. Nonfucosylated therapeutic IgG1 antibody can evade the inhibitory effect of serum immunoglobulin G on antibody-dependent cellular cytotoxicity through its high binding to FcγRIIIa. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2006 May 1;12(9):2879–87.
 33. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 2008;117(2):244–79.
 34. Slevin SM, Egan LJ. New Insights into the Mechanisms of Action of Anti-Tumor Necrosis Factor-α Monoclonal Antibodies in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(12):2909–20.
 35. Romas E, Gillespie MT, Martin TJ. Involvement of receptor activator of NFκB ligand and tumor necrosis factor-α in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone*. 2002;30(2):340–6.
 36. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003;114(2):181–90.
 37. Pimentel-Muiños FX, Seed B. Regulated commitment of TNF receptor signaling: A molecular switch for death or activation. *Immunity*. 1999;11(6):783–93.
 38. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima SI, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-α: Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*. 2010;49(7):1215–28.
 39. Keijsers RRM, Joosten I, Hendriks AGM, Koenen HJPM, van Erp PEJ, van de Kerkhof PCM. Balance of Treg versus T-effector cells during systemic treatment with adalimumab and topical treatment with calcipotriol-betamethasone dipropionate ointment. *Exp Dermatol*. 2015;24(1):65–7.
 40. Victor FC, Gottlieb AB, Menter A. Changing paradigms in dermatology: Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) blockade in psoriasis and psoriatic arthritis. *Clin Dermatol*. 2003;21(5):392–7.
 41. Fischer A, Gluth M, Pape UF, Wiedenmann B, Theuring F, Baumgart DC. Adalimumab prevents barrier dysfunction and antagonizes distinct effects of TNF-α on tight junction proteins and signaling pathways in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2013;304(11):970–9.
 42. Peake STC, Bernardo D, Mann ER, Al-Hassi HO, Knight SC, Hart AL. Mechanisms of action of anti-tumor necrosis factor α agents in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(7):1546–55.
 43. Atreya R, Neumann H, Neufert C, Waldner MJ, Willma M, App C, et al. HHS Public Access. 2015;20(3):313–8.
 44. Vos ACW, Wildenberg ME, Duijvestein M, Verhaar AP, Van Den Brink GR, Hommes DW. AntiTumor necrosis factor-α antibodies induce regulatory macrophages in an Fc region-dependent manner. *Gastroenterology* [Internet]. 2011;140(1):221-230.e3.
 45. Arora T, Padaki R, Liu L, Hamburger AE, Ellison AR, Stevens SR, et al. Differences in binding

- and effector functions between classes of TNF antagonists. *Cytokine* [Internet]. 2009;45(2):124–31.
46. FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services. 2001. 34 p.
 47. Niazi SK, Swarbrick J. Handbook of Bioequivalence Testing [Internet]. 2007. 550 p.
 48. Houde DJ, Berkowitz SA. Biophysical Characterization and Its Role in the Biopharmaceutical Industry. In: *Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals* [Internet]. Elsevier; 2015. p. 23–47.
 49. Liu J, Eris T, Li C, Cao S, Kuhns S. Assessing Analytical Similarity of Proposed Amgen Biosimilar ABP 501 to Adalimumab. *BioDrugs*. 2016;30(4):321–38.
 50. Hamrang Z, Rattray NJW, Pluen A. Proteins behaving badly: emerging technologies in profiling biopharmaceutical aggregation. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2013 Aug;31(8):448–58.
 51. Halley J, Chou YR, Cicchino C, Huang M, Sharma V, Tan NC, et al. An Industry Perspective on Forced Degradation Studies of Biopharmaceuticals: Survey Outcome and Recommendations. *J Pharm Sci* [Internet]. 2020 Jan;109(1):6–21.
 52. Pisupati K, Benet A, Tian Y, Okbazghi S, Ford M, Saveliev S, et al. Biosimilarity under stress: A forced degradation study of Remicade® and Remsima™. *MAbs* [Internet]. 2017 Oct 3;9(7):1197–209.
 53. Rawat T, Pandey IP. Forced degradation studies for drug substances and drug products—scientific and regulatory considerations. *J Pharm Sci Res*. 2015;7(5):238–41.
 54. Singh SK, Kumar D, Malani H, Rathore AS. LC–MS based case-by-case analysis of the impact of acidic and basic charge variants of bevacizumab on stability and biological activity. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–15.
 55. Hawe A, Wiggenhorn M, van de Weert M, Garbe JHO, Mahler H, Jiskoot W. Forced Degradation of Therapeutic Proteins. *J Pharm Sci* [Internet]. 2012 Mar;101(3):895–913.
 56. Hassan LA, Al-Ghobashy MA, Abbas SS, Al-Ghobashy MA, Abbas SS. Evaluation of the pattern and kinetics of degradation of adalimumab using a stability- indicating orthogonal testing protocol. *Biomed Chromatogr* [Internet]. 2019 Dec;33(12).
 57. Rosati S, Yang Y, Barendregt A, Heck AJR. Detailed mass analysis of structural heterogeneity in monoclonal antibodies using native mass spectrometry. *Nat Protoc* [Internet]. 2014;9(4):967–76.
 58. Wang X, An Z, Luo W, Xia N, Zhao Q. Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development. *Protein Cell*. 2018;9(1):74–85.
 59. Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: An Immunologic perspective. *AAPS J*. 2006;8(3):501–7.
 60. Cromwell MEM, Hilario E, Jacobson F. Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS J* [Internet]. 2006;8(3):E572–9.
 61. Philo J, Arakawa T. Mechanisms of Protein Aggregation. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009;10(4):348–51.
 62. Den Engelsman J, Garidel P, Smulders R, Koll H, Smith B, Bassarab S, et al. Strategies for the assessment of protein aggregates in pharmaceutical biotech product development. *Pharm Res* [Internet]. 2011 Apr 23;28(4):920–33.
 63. Jenkins N, Murphy L, Tyther R. Post-translational modifications of recombinant proteins: Significance for biopharmaceuticals. *Mol Biotechnol*. 2008;39(2):113–8.
 64. Wang Y, Li X, Liu Y-H, Richardson D, Li H, Shameem M, et al. Simultaneous monitoring of oxidation, deamidation, isomerization, and glycosylation of monoclonal antibodies by liquid chromatography-mass spectrometry method with ultrafast tryptic digestion. *MAbs* [Internet]. 2016 Nov 16;8(8):1477–86.
 65. Liu D, Ren D, Huang H, Dankberg J, Rosenfeld R, Cocco MJ, et al. Structure and stability changes of human IgG1 Fc as a consequence of methionine oxidation. *Biochemistry*. 2008;47(18):5088–100.
 66. Liu H, Gaza-Bulsecu G, Xiang T, Chumsae C. Structural effect of deglycosylation and methionine oxidation on a recombinant monoclonal antibody. *Mol Immunol*. 2008;45(3):701–8.
 67. Bertolotti-Ciarlet A, Wang W, Lownes R, Pristatsky P, Fang Y, McKelvey T, et al. Impact of methionine oxidation on the binding of human IgG1 to FcRn and Fcγ receptors. *Mol Immunol*. 2009;46(8–9):1878–82.

68. Pan H, Chen K, Chu L, Kinderman F, Apostol I, Huang G. Methionine oxidation in human IgG2 Fc decreases binding affinities to protein A and FcRn. *Protein Sci.* 2009;18(2):424–33.
69. Wei Z, Feng J, Lin HY, Mullapudi S, Bishop E, Tous GI, et al. Identification of a single tryptophan residue as critical for binding activity in a humanized monoclonal antibody against respiratory syncytial virus. *Anal Chem.* 2007;79(7):2797–805.
70. Wang W, Vlasak J, Li Y, Pristatsky P, Fang Y, Pittman T, et al. Impact of methionine oxidation in human IgG1 Fc on serum half-life of monoclonal antibodies. *Mol Immunol [Internet].* 2011;48(6–7):860–6.
71. Hermeling S, Crommelin DJA, Schellekens H, Jiskoot W. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm Res.* 2004;21(6):897–903.
72. Yan B, Steen S, Hambly D, Valliere-Douglass J, Vanden Bos T, Smallwood S, et al. Succinimide formation at Asn 55 in the complementarity determining region of a recombinant monoclonal antibody IgG1 heavy chain. *J Pharm Sci.* 2009;98(10):3509–21.
73. Cacia J, Keck R, Presta LG, Frenz J. Isomerization of an aspartic acid residue in the complementarity-determining regions of a recombinant antibody to human IgE: Identification and effect on binding affinity. *Biochemistry.* 1996;35(6):1897–903.
74. Rehder DS, Chelius D, McAuley A, Dillon TM, Xiao G, Crouse-Zineddini J, et al. Isomerization of a single aspartyl residue of anti-epidermal growth factor receptor immunoglobulin γ 2 antibody highlights the role avidity plays in antibody activity. *Biochemistry.* 2008;47(8):2518–30.
75. Wakankar AA, Borchardt RT, Eigenbrot C, Shia S, Wang YJ, Shire SJ, et al. Aspartate isomerization in the complementarity-determining regions of two closely related monoclonal antibodies. *Biochemistry.* 2007;46(6):1534–44.
76. Gahoual R, Beck A, Leize-wagner E, Franc Y. Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products. 2016;1032:61–78.
77. Wagner-Rousset E, Fekete S, Morel-Chevillet L, Colas O, Corvaia N, Guillaume D, et al. Development of a fast workflow to screen the charge variants of therapeutic antibodies. *J Chromatogr A [Internet].* 2017 May;1498:147–54.
78. Goyon A, D'Atri V, Colas O, Fekete S, Beck A, Guillaume D. Characterization of 30 therapeutic antibodies and related products by size exclusion chromatography: Feasibility assessment for future mass spectrometry hyphenation. *J Chromatogr B [Internet].* 2017 Oct;1065–1066(August):35–43.
79. Goyon A, Excoffier M, Janin-Bussat M-C, Bobaly B, Fekete S, Guillaume D, et al. Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies. 2017;
80. Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *J Pharm Sci.* 2019;109:169–90.
81. Goyon A, Beck A, Colas O, Sandra K, Guillaume D, Fekete S. Evaluation of size exclusion chromatography columns packed with sub-3 μ m particles for the analysis of biopharmaceutical proteins. *J Chromatogr A.* 2017 May 19;1498:80–9.
82. Fekete S, Beck A, Veuthey J-L, Guillaume D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *J Pharm Biomed Anal [Internet].* 2014 Dec;101:161–73.
83. Wagner E, Colas O, Chenu S, Goyon A, Murisier A, Cianferani S, et al. Determination of size variants by CE-SDS for approved therapeutic antibodies: key implications of subclasses and light chain specificities. *J Pharm Biomed Anal [Internet].* 2020 Feb 10 [cited 2020 Feb 16];113166.
84. Zhang L, Fei M, Tian Y, Li S, Zhu X, Wang L, et al. Characterization and elimination of artificial non-covalent light chain dimers in reduced CE-SDS analysis of pertuzumab. *J Pharm Biomed Anal [Internet].* 2020 Oct 25;190:113527.
85. Schmailzl J, Vorage MW, Stutz H. Intact and middle-down CIEF of commercial therapeutic monoclonal antibody products under non-denaturing conditions. *Electrophoresis.* 2020;41(12):1109–17.
86. Wu G, Yu C, Wang W, Wang L. Interlaboratory method validation of icIEF methodology for analysis of monoclonal antibodies. *Electrophoresis.* 2018;39(16):2091–8.
87. Khawli LA, Goswami S, Hutchinson R, Kwong ZW, Yang J, Wang X, et al. Charge variants in IgG1. *MAbs [Internet].* 2010 Nov 27;2(6):613–24.
88. Du Y, Walsh A, Ehrick R, Xu W, May K, Liu H. Chromatographic analysis of the acidic and

- basic species of recombinant monoclonal antibodies. *MAbs* [Internet]. 2012 Sep 27;4(5):578–85.
89. Kang J, Halseth T, Vallejo D, Najafabadi ZI, Sen KI, Ford M, et al. Assessment of biosimilarity under native and heat-stressed conditions: rituximab, bevacizumab, and trastuzumab originators and biosimilars. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412(3):763–75.
 90. Apostol I, Miller KJ, Ratto J, Kelner DN. Comparison of different approaches for evaluation of the detection and quantitation limits of a purity method: A case study using a capillary isoelectrofocusing method for a monoclonal antibody. *Anal Biochem* [Internet]. 2009;385(1):101–6.
 91. European Biopharmaceutical Enterprises (EBE). *Concept Paper - Forced Degradation Studies for Therapeutic Proteins*. Brussels; 2015.
 92. Pisupati K, Benet A, Tian Y, Okbazghi S, Ford M, Saveliev S, et al. Biosimilarity under stress : A forced degradation study of Remicade[®] and Remsima[™]. 2017;0862.
 93. Zhang A, Singh SK, Shirts MR, Kumar S, Fernandez EJ. Distinct aggregation mechanisms of monoclonal antibody under thermal and freeze-thaw stresses revealed by hydrogen exchange. *Pharm Res*. 2012;29(1):236–50.
 94. Tokhadze N, Chennell P, Le Basle Y, Sautou V. Stability of infliximab solutions in different temperature and dilution conditions. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2018;150:386–95.
 95. Kim S, Lee N, Lee T, Park G, Song D, Baek S, et al. Evaluation of similar quality attribute characteristics in SB5 and reference product of adalimumab. *MAbs* [Internet]. 2018;11(1):129–44.
 96. Cho IH, Lee N, Song D, Jung SY, Bou-Assaf G, Sosic Z, et al. Evaluation of the structural, physicochemical, and biological characteristics of SB4, a biosimilar of etanercept. *MAbs* [Internet]. 2016 Aug 17;8(6):1136–55.
 97. Bansal R, Dash R, Rathore AS. Impact of mAb Aggregation on Its Biological Activity: Rituximab as a Case Study. *J Pharm Sci* [Internet]. 2020;109(9):2684–98.
 98. Maarschalkerweerd A van, Wolbink G-J, Stapel SO, Jiskoot W, Hawe A. Comparison of analytical methods to detect instability of etanercept during thermal stress testing. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2011;78(2):213–21.
 99. Nowak C, K. Cheung J, M. Dellatore S, Katiyar A, Bhat R, Sun J, et al. Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide. *MAbs* [Internet]. 2017 Nov 17;9(8):1217–30.
 100. Habegger M, Bomans K, Diepold K, Hook M, Gassner J, Schlothauer T, et al. Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies. *MAbs*. 2014;6(2):327–39.
 101. Shabestari AB, Mostafavi SM, Malekzadeh H. Force Degradation Comparative Study on Biosimilar Adalimumab and Humira. *Rev Latinoam Hipertens*. 2019;13(6):496–509.
 102. Dick LW, Qiu D, Mahon D, Adamo M, Cheng KC. C-terminal lysine variants in fully human monoclonal antibodies: Investigation of test methods and possible causes. *Biotechnol Bioeng*. 2008;100(6):1132–43.
 103. Dyck YFK, Rehm D, Joseph JF, Winkler K, Sandig V, Jabs W, et al. Forced Degradation Testing as Complementary Tool for Biosimilarity Assessment. *Bioengineering*. 2019;6(3):62.
 104. Leblanc Y, Ramon C, Bihoreau N, Chevreux G. Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: Case study after a long-term storage at +5 °C. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2017 Mar 24 [cited 2019 Dec 26];1048:130–9.
 105. Yan B, Yates Z, Balland A, Kleemann GR. Human IgG1 hinge fragmentation as the result of H₂O₂-mediated radical cleavage. *J Biol Chem*. 2009;284(51):35390–402.
 106. Ponniah G, Kita A, Nowak C, Neill A, Kori Y, Rajendran S, et al. Characterization of the Acidic Species of a Monoclonal Antibody Using Weak Cation Exchange Chromatography and LC-MS. *Anal Chem* [Internet]. 2015 Sep 1;87(17):9084–92.
 107. Folzer E, Diepold K, Bomans K, Finkler C, Schmidt R, Bulau P, et al. Selective Oxidation of Methionine and Tryptophan Residues in a Therapeutic IgG1 Molecule. *J Pharm Sci* [Internet]. 2015 Sep;104(9):2824–31.
 108. Luo Q, Joubert MK, Stevenson R, Ketchem RR, Narhi LO, Wypych J. Chemical Modifications in Therapeutic Protein Aggregates Generated under Different Stress Conditions. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Jul;286(28):25134–44.
 109. Skamris T, Tian X, Thorolfsson M, Karkov HS, Rasmussen HB, Langkilde AE, et al.

- Monoclonal Antibodies Follow Distinct Aggregation Pathways during Production-Relevant Acidic Incubation and Neutralization. *Pharm Res.* 2016;33(3):716–28.
110. Moritz B, Stracke JO. Assessment of disulfide and hinge modifications of monoclonal antibodies. *Electrophoresis* [Internet]. 2016;1–50.
 111. Zhang Q, Flynn GC. Cysteine racemization on IgG heavy and light chains. *J Biol Chem.* 2013;288(48):34325–35.
 112. Cohen SL, Price C, Vlasak J. b-Elimination & peptide amide hydrolysis [two distinct mech human IgG1 hinge fragmentation upon storage]. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2007;129(22):6976–7.
 113. Vlasak J, Ionescu R. Fragmentation of monoclonal antibodies. *MAbs.* 2011;3(3):253–63.
 114. Yan B, Boyd D. Breaking the light and heavy chain linkage of human immunoglobulin G1 (IgG1) by radical reactions. *J Biol Chem.* 2011;286(28):24674–84.
 115. Mason BD, Schöneich C, Kerwin BA. Effect of pH and light on aggregation and conformation of an IgG1 mAb. *Mol Pharm.* 2012;9(4):774–90.
 116. Dada OO, Rao R, Jones N, Jaya N, Salas-Solano O. Comparison of SEC and CE-SDS methods for monitoring hinge fragmentation in IgG1 monoclonal antibodies. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2017;145:91–7.
 117. Mo J, Yan Q, So CK, Soden T, Lewis MJ, Hu P. Understanding the Impact of Methionine Oxidation on the Biological Functions of IgG1 Antibodies Using Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Anal Chem* [Internet]. 2016 Oct 4;88(19):9495–502.
 118. Zhang A, Hu P, Macgregor P, Xue Y, Fan H, Suchecki P, et al. Understanding the conformational impact of chemical modifications on monoclonal antibodies with diverse sequence variation using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and structural modeling. *Anal Chem.* 2014;86(7):3468–75.

8 ÖZGEÇMİŞ



