



**PROTEİN ESASLI BİYOTERAPÖTİK İLAÇLARIN İYON  
HAREKETLİLİĞİ KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE  
KARAKTERİZASYONLARI**

**CHARACTERIZATION OF PROTEIN BASED  
BIOTHERAPEUTIC DRUGS BY ION MOBILITY MASS  
SPECTROMETRY**

**İZZET AVCI**

**PROF. DR BEKİR SALİH**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.







*Ailem'e*











# ÖZET

## PROTEİN ESASLI BİYOTERAPÖTİK İLAÇLARIN İYON HAREKETLİLİĞİ KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE KARATERİZASYONLARI

İzzet AVCI

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bekir SALİH

Ocak 2022, 114 sayfa

Son yıllarda protein temelli tedavi edici ilaçların önemi ciddi oranda artmıştır. Bu ilaçlar hücre kültürü ortamlarından veya belirli canlılar üzerinden üretilerek elde edilmesi bu tarz ilaçların kimyasal olarak sentezlenmiş ilaçlardan ayırmaktadır. Bu ilaçlar kanser, diyabet gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan tedavi edici özelliğe sahip ilaçlardır. Bu ilaçların hastalıklara karşı efektif bir şekilde tedavi edici rol oynaması için yapısının hastalığa etki edecek şekilde özgün olması gerekmektedir. Bu ilaçlar üretim ve onaylanması sırasında birçok önemli aşamadan geçmektedir. Bu tarz ilaçlar protein esaslı oldukları için üretimleri ve üretim sonrasındaki aşamalarında meydana gelen enzimatik ve kimyasal modifikasyonlar bu ilaçların işlevlerinde ve yapılarında çeşitlilik gösterebilmektedir. Yapılarında meydana gelen bu tarz modifikasyonlara Post-Translasyonel Modifikasyon adı verilir. Bu modifikasyonlar arasında glikozilasyon en önemlilerinden bir tanesidir.

Kütle Spektrometrisi protein esaslı tedavi edici özelliğe sahip ilaçların dizilim, bileşim, yapı, konformasyon ve kütle gibi birçok özelliğinin aydınlatılmasında kullanılan güçlü bir analitik yöntemdir. Kütle Spektrometrisi protein esaslı

biyoterapötik ilaçların analizlerinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Fakat bu analitik teknikler özellikle aynı kütle/yük oranına sahip farklı konformasyonel özellikleri taşıyan formlarda analizlerde genellikle ayırım sağlayamamaktadır. Yumuşak iyonlaştırma tekniğine sahip İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi özellikle aynı kütle/yük oranına sahip farklı konformasyonel özellikleri olan türlerin analizlerinde önemli rol oynamaktadır. Yumuşak iyonlaştırma tekniği sayesinde iyonlar hareketlilik tünelinin içine girerek şekil, boyut ve yük gibi özelliklerine göre ayrımları sağlanıp konformasyonel özellikleri hakkında bilgi elde edilebilir. Bu tez kapsamında insan serumunda yer alan immunglobulin g (IgG) ve ilaç olarak kullanılan, trastuzumab ve bevacizumab monoklonal antikorların N-glikan profillerinin konformasyonel düzeyde analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde iyon hareketliliği kütle spektrometrik yöntemlerden olan tuzaklamalı iyon hareketliliği kütle spektrometrisi kullanılmıştır. Glikan analizleri için kütle spektrometrik cihazlarda iyonlaşmadaki avantajı sebebiyle prokainamid etiketi kullanılmıştır. Bu analizlerde eş zamanlı olarak hidrofilik etkileşim kromatografisi temelli floresans ve iyon hareketliliği kütle spektrometrik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde IgG ve mAb'ların glikan formları elde edilmiş ve konformasyonel açıdan glikan yapıları tespit edilmiştir. Yapılardaki her bir glikan formunun etkin çarpışma kesiti hesaplanıp birbirleriyle karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Özellikle glikan formlarının CCS değerlerinin, esas olarak yapılarındaki galaktoz ve fukoz birimlerinin varlığı ve bağlanma durumlarındaki farklılıklara göre değişiklik gösterdikleri tespit edilmiştir.. Bu tez çalışmasında tuzaklamalı iyon hareketliliği kütle spektrometrisi cihazı ile ilk kez IgG ve monoklonal antikorların glikan formlarının konformasyonları hakkında bilgi elde edilmiş olup ve eş zamanlı olarak floresans dedektör kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Literatüre güçlü bir analitik yöntem kazandırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler: Monoklonal Antikor, Kütle Spektrometrisi, Glikozilasyon, N-glikan, Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometresi**

## **ABSTRACT**

### **CHARACTERIZATION OF PROTEIN BASED BIOTHERAPEUTIC DRUGS BY ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY**

**İzzet AVCI**

**Master of Science, Department of CHEMISTRY**

**Supervisor: Prof. Dr. Bekir SALİH**

**January 2022, 114 pages**

In recent years, the importance of protein-based therapeutic drugs has increased significantly. The fact that these drugs are produced from cell culture media or certain living things distinguishes these drugs from chemically synthesized drugs. These are drugs with therapeutic properties used to treat diseases such as cancer and diabetes. The structure must be unique for these drugs to play an effective therapeutic role against diseases. These drugs go through many critical stages during production and approval. Since such drugs are protein-based, the enzymatic and chemical modifications that occur during their production and post-production stages can vary in the functions and structures of these drugs. Such modifications that arise in their structures following protein synthesis are called post-translational modifications. Among these modifications, glycosylation is one of the most important ones. Mass spectrometry is a powerful analytical method used to elucidate many properties of protein-based therapeutic drugs

such as sequence, composition, structure, conformation, and mass. Mass spectrometry is intensely used in the analysis of protein-based biotherapeutic drugs. However, these analytical techniques cannot discriminate species in analysis, especially in forms with the same mass/charge ratio and different conformational features. Ion mobility-mass spectrometry with soft ionization techniques plays an essential role in analyzing species with different conformational properties, especially with the same mass/charge ratio. Due to the soft ionization technique, ions can enter the mobility tunnel separated according to their shape, size, and charge characteristics. Thus, information about their conformational properties can be obtained. In this thesis, conformational N-glycan profile analyses of immunoglobulin G (IgG) in human serum, trastuzumab, and bevacizumab monoclonal antibodies (mAbs) were performed. In these analyses, the trapped ion mobility spectrometry (TIMS) technique was used as one of the ion mobility techniques highly compatible with mass spectrometers. The procainamide label was chosen for glycan analysis due to its advantage in ionization in mass spectrometric devices. In these analyzes, hydrophilic interaction chromatography was carried out with fluorescence and ion mobility-mass spectrometry detection techniques simultaneously. In the analyzes, glycan forms of mAbs were obtained and their conformational glycan structures were determined. The collision cross-section (CCS) values of each glycan form in the structures were calculated and compared. Especially, it was determined that the variation of CCS values of the glycan forms mainly arises due to the presence and binding formations of galactose and fucose units in their structures. In this thesis, information about the conformation of the glycan forms of mAbs was obtained using a TIMS device and a fluorescence detector simultaneously for the first time. A robust analytical method has been introduced to the literature.

**Keywords: Monoclonal Antibody, Mass Spectrometry, Glycosylation, N-Glycan, Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry**

## TEŞEKKÜR

Bana laboratuvarının kapılarını açıp kütle spektrometresi alanıyla tanıştıran, engin bilgi birikimini ve deneyimlerini benimle paylaşarak her alanda kendimi geliştirmeme yardımcı olan ve daha fazlasını yapabileceğime inandıran, kendisiyle çalışmaktan onur ve gurur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Bekir Salih'e bugüne kadar bana verdiği değeri ve her türlü desteği için minnettarım.

Kendisini olur olmadık zamanlarda arasam da, bazen anlamsız sorular sorsam da, bana güvenen, sabreden lisansüstü eğitimim boyunca bana her türlü desteği veren, bana öğrettikleri, ilgisi ve alakası için değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Hacı Mehmet Kayılı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda veya laboratuvar dışında hem hoca olarak öneri, fikir, destek verip çalışmalarım da daha iyi konuma gelmeme yardımcı olmaya çalışan, hem de abi ve abla olarak sevinçli ve hüzünlü anlarımda her zaman yanımda olup bana destek veren, değerli hocamlarım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Atakay ve Dr. Ülkü Güler'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvarda geçirdiğimiz zamanlarda keyif aldığım, SAREG grubunun üyeleri çok değerli çalışma arkadaşlarım bana her anlamda vermiş olduğunuz destek ve yardımlarınız için çok teşekkür ederim.

Fikirlerini her zaman dikkate aldığım, hedeflerine ulaşacağına inandığım, hayat mücalesinde birbirimize destek olduğumuz, değerli dostum, kader arkadaşım Serhat Öztürk'e bugüne kadar bana vermiş olduğu her türlü desteği, her zaman her anımda yanımda olduğu için teşekkürü borç bilirim.

Her kahve içtiğimizde tez çalışmalarımı anlattığımda usanmadan, sıkılmadan dinleyip bana katlandığı için, beraber üzüldüğümüz değerli dostum Barış Gökbel'e çok teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca bana finansal olarak destek sağlayan Cumhurbaşkanlığı Strateji ve Bütçe Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Beni her koşulda destekleyen, her verdiğim kararın arkasında koşulsuz destek olan, bu hayatta herşeyden çok sevdiğim ve değer verdiğim aileme tüm emekleri için çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Biyoteknolojik ilaçlar .....	4
2.1.1. Monoklonal Antikorlar .....	8
2.2. Post Translasyonel Modifikasyonlar .....	14
2.3. Protein Glikozilasyonu .....	15
2.3.1. Glikomik .....	18
2.3.2. Proteinlerin N-glikan Yapıları .....	19
2.4. N-glikanların Kütle Spektrometrik Teknikler ile Analize Hazırlanması .....	20
2.4.1. Glikoproteinlerden N-glikanların Salınımı (Deglikozilasyon) .....	21
2.4.2. N-glikanların Türevlendirilmesi .....	21
2.4.3. N-glikanların Ayrılması ve Zenginleştirilmesi .....	22
2.5. Kütle Spektrometrisi .....	23
2.5.1. İyon Hareketliliği- Kütle Spektrometrisi (IM-MS) .....	25



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	33
3.1 Kullanılan Kimyasallar .....	33
3.2 IgG ve Monoklonal Antikor'ların Deglikozilasyon işlemi .....	33
3.3 Prokainamid ile N-Glikanların Etiketlenmesi.....	34
3.4 Etiketlenmiş N-glikanların Saflaştırılması .....	34
3.5 LC-HILIC-FLD-IM-MS Analizleri .....	35
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	36
4.1 İnsan İmmunoglobulin G proteininden elde edilen N-glikanların analizler.	43
4.2 Trastuzumab örneğinden elde edilen N-glikanların analizleri .....	51
4.3 Bevacizumab örneğinden elde edilen N-glikanların analizleri .....	57
4.4 IgG, Trastuzumab ve Bevacizumab proteinlerinden elde edilen benzer glikanların konformasyonel özelliklerinin kıyaslanması .....	60
4.5 IgG ve Trastuzumab proteinlerinden elde edilen glikanların konformasyonel özelliklerinin kıyaslanması.....	63
4.6 IgG ve Trastuzumab proteinlerinden elde edilen glikanlardaki şeker birimlerinin glikan konformasyonları üzerindeki etkilerinin incelenmesi .....	66
5.YORUMLAR.....	71
6. KAYNAKLAR.....	73
EKLER.....	85
Tez Çalışması Orjinallik Raporu .....	85
ÖZGEÇMİŞ.....	86

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> Aspirin ve Monoklonal Antikor yapısının şematik gösterimi[12].....	5
<b>Şekil 2.2.</b> İnsan vücudunda yer alan İmmunoglobulinlerin şematik gösterimi[20] .....	9
<b>Şekil 2.3.</b> Monoklonal antikorların sınıflandırılmış şematik gösterimi[34] .....	11
<b>Şekil 2.4.</b> Monoklonal Antikor yapısının şematik gösterimi.....	13
<b>Şekil 2.5.</b> Bazı Post-Translasyonel Modifikasyonların şematik gösterimi.....	15
<b>Şekil 2.6.</b> Proteinlerin N- ve O- Glikozilasyon birimlerinin şematik gösterimi [44] .....	16
<b>Şekil 2.7.</b> Sırasıyla Kompleks, Yüksek MannoZlu ve Hibrid N-glikan yapılarının şematik gösterimi .....	19
<b>Şekil 2.8.</b> Proteinlerin N-glikan Yapılarının Biyosentezinin Şematik Gösterimi	20
<b>Şekil 2.9.</b> Kütle Spektrometresinin temel bileşenlerinin şematik gösterimi .....	24
<b>Şekil 2.10.</b> İyon Hareketliliği Spektrometresi tekniklerinin çalışma prensiplerinin şematik gösterimi [88].....	28
<b>Şekil 2.11.</b> TIMS (Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Spektrometresi) çalışma prensibinin şematik gösterimi[94] .....	29
<b>Şekil 3.1</b> Prokainamid ajanı ile etiketlenen glikan gösterimi.....	34
<b>Şekil 4.1</b> Tez çalışmasında uygulanan analitik yöntemlerin şematik gösterimi	36
<b>Şekil 4.2</b> Tez Çalışmasında İncelenen N-glikan Formları .....	41
<b>Şekil 4.3</b> N-glikanları oluşturan monosakkarit birimlerinin şekilsel gösterimi....	41
<b>Şekil 4.4</b> IgG Proteininden Elde Edilen H3N4F1 N-Glikan Formunun A) Isı Haritası, B) Kütle Spektrumu, C) İyon Hareketlilik Spektrumu, D) Etkin Çarpışma Kesiti'nin şekilsel gösterimi. ....	42
<b>Şekil 4.5</b> IgG proteinine ait A) Floresans ve B) Temel Pik kromatogramları .....	44
<b>Şekil 4.6</b> İnsan IgG proteininden elde edilen N-glikanların yapıları ve etkin çarpışma kesiti grafikleri .....	46
<b>Şekil 4.7</b> Trastuzumaba ait A) Floresans ve B) Temel Pik kromatogramları ....	52
<b>Şekil 4.8</b> Trastuzumab örneğinden elde edilen N-glikanların yapıları ve etkin çarpışma kesiti grafikleri .....	53
<b>Şekil 4.9</b> Bevacizumaba ait A) Floresans ve B) Temel Pik kromatogramları ...	57

<b>Şekil 4.10</b> Bevacizumab örneğinden elde edilen N-glikanların yapıları ve etkin çarpışma kesiti grafikleri.....	58
<b>Şekil 4.11</b> A) IgG, B) Trastuzumab ve C) Bevacizumab proteininden elde edilen H3N4 glikan formunun etkin çarpışma kesiti grafikleri .....	60
<b>Şekil 4.12</b> A) IgG, B) Trastuzumab ve C) Bevacizumab proteininden elde edilen H3N4F1 glikan formunun etkin çarpışma kesiti grafikleri .....	61
<b>Şekil 4.13</b> A) IgG, B) Trastuzumab ve C) Bevacizumab proteininden elde edilen H4N4F1(a) glikan formunun etkin çarpışma kesiti grafikleri.....	61
<b>Şekil 4.14</b> A) IgG, B) Trastuzumab ve C) Bevacizumab proteininden elde edilen H4N4F1(b) glikan formunun etkin çarpışma kesiti grafikleri .....	62
<b>Şekil 4.15</b> A) IgG, B) Trastuzumab ve C) Bevacizumab proteininden elde edilen H5N4F1 glikan formunun etkin çarpışma kesiti grafikleri .....	62
<b>Şekil 4.16</b> A) IgG (RT:25.0), B) IgG (RT:25.8) ve C) Trastuzumab proteininden elde edilen H4N4F1S1 glikan formunun etkin çarpışma kesiti grafikleri....	64
<b>Şekil 4.17</b> A) IgG ve B) Trastuzumab proteininden elde edilen H5N4F1S1 glikan formunun etkin çarpışma kesiti grafikleri.....	65
<b>Şekil 4.18</b> IgG ve Trastuzumab proteinlerinden elde edilen glikanların etkin çarpışma kesiti (CCS) değerlerinin karşılaştırılmasının şematik gösterimi	67
<b>Şekil 4.19</b> IgG proteininden elde edilen G0, G1 ve G2 glikanları arasındaki galaktoz birimi farklılıklarına göre CCS değerindeki değişimin grafiksel gösterimi .....	68

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1</b> Bazı onay almış biyofarmasotik ilaçların çizelgesel gösterimi[17] ..	7
<b>Çizelge 4.3</b> Trastuzumab'dan elde edilen N-glikanların yük, m/z, alıkonma zamanları ve etkin çarpışma kesiti değerleri.....	56
<b>Çizelge 4.4</b> Bevacizumab'dan elde edilen N-glikanların yük, m/z, alıkonma zamanı ve etkin çarpışma kesiti değerleri.....	59
<b>Çizelge 4.5</b> IgG, Trastuzumab ve Bevacizumab glikoproteinlerinden elde edilen glikanların etkin çarpışma kesiti (CCS) değerleri.....	63
<b>Çizelge 4.6</b> IgG ve Trastuzumab glikoproteinlerinden elde edilen siyalik asit içeren glikanların etkin çarpışma kesiti (CCS) değerleri .....	66

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

<b>M</b>	Kütle
<b>z</b>	Yük sayısı
<b>mg</b>	Miligram
<b><math>\mu</math>L</b>	Mikrolitre
<b>mM</b>	Milimolar
<b><math>\mu</math>g</b>	Mikrogram
<b>Å</b>	Angstrom
<b>E</b>	Elektriksel Alan Şiddeti
<b>a</b>	Alfa
<b>K</b>	İyon Hareketlilik Sabiti
<b>K<sub>0</sub></b>	İndirgenmiş İyon Hareketlilik Sabiti
<b>k<sub>b</sub></b>	Boltzmann Sabiti
<b>N</b>	Sürükleyici Gaz Yoğunluğu, hacim başına düşen molekül sayısı
<b>P</b>	Basınç
<b>P<sub>0</sub></b>	Standart Basınç
<b>T</b>	Sıcaklık
<b>T<sub>0</sub></b>	Standart Sıcaklık
<b>V<sub>d</sub></b>	Sürüklenme Hızı
<b>Hz</b>	Hertz

## Kısaltmalar

<b>ACN</b>	Asetonitril
<b>Asn</b>	Asparajin
<b>BPC</b>	Temel Pik Kromatogramı
<b>CCS</b>	Etkin Çarpışma Kesiti
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>DTIMS</b>	Sürüklenme tüpü iyon hareketliliği spektrometrisi
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EMA</b>	Avrupa İlaç Ajansı
<b>ER</b>	Endoplazmik Retikulum
<b>ESI</b>	Elektrosprey İyonlaştırma
<b>FAIMS</b>	Alan asimetrikiyon hareketliliği spektrometrisi
<b>FDA</b>	Amerikan İlaç ve Gıda İdaresi
<b>FLD</b>	Floresans Dedektörü
<b>Gal</b>	Galaktoz
<b>GalNAc</b>	N-asetil Galaktozamin
<b>GALNT</b>	N-asetil Galaktozaminil Transferaz
<b>GlcNAc</b>	N-asetil Glikozamin
<b>Hex</b>	Heksoz
<b>HexNAc</b>	N-asetil Heksoz Amin
<b>HILIC</b>	Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi
<b>HPLC</b>	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>IgG</b>	İmmunoglobulin G
<b>IM</b>	İyon Hareketliliği
<b>kDa</b>	Kilodalton

<b>LC</b>	Sıvı Kromatografisi
<b>mAb</b>	Monoklonal Antikor
<b>MALDI</b>	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırılmalı
<b>MS</b>	Kütle Spektrometrisi
<b>NeuAc</b>	N-Asetil Nöraminik Asit
<b>PNGase F</b>	N-Glikozidaz F
<b>Proc</b>	Prokainamid
<b>PTM</b>	Post-Translasyonel Modifikasyonlar
<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>Ser</b>	Serin
<b>TFA</b>	Trifloroasetik Asit
<b>Thr</b>	Threonin
<b>TIMS</b>	Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi
<b>TWIMS</b>	Kaydırmalı Dalga İyon Hareketliliği







kullanılmıştır. Sonrasında ise birçok ilaç firması kendilerine hedef olarak belirledikleri hastalık veya hastalıklara karşı kendi üretim teknikleriyle monoklonal antikor bazlı ilaçlarını geliştirmeye başlamışlardır.

Monoklonal antikorlar protein yapısında olan ilaçlardır. Bu tarz ilaçların yapılarının tamamen aydınlatılması, etkileşimlerinin incelenmesi çok önemlidir. Üretim saflarından gerçekleşebilecek bir farklılık potansiyel ilaç adayının yapısının tamamen değişmesine ve ilacın etki mekanizmasında istenilmeyen sonuçlara neden olabilmektedir. Proteinler sentezleri boyunca veya sentezleri sonrasında post translasyonel modifikasyon adı verilen etkileşimlere maruz kalarak hücre içerisinde aktif hale gelmektedirler. Bu post translasyonel modifikasyonların en önemlilerinden bir tanesi de glikozilasyondur.

Monoklonal antikorlar protein yapısında oldukları için post translasyonel modifikasyonlara uğramaktadırlar. Monoklonal antikorlar yapılarında şeker grubunu içerdikleri için glikozilasyona uğramaktadırlar. Monoklonal antikor yapısında Fc bölgesi adı verilen bölge de 1 adet glikozilasyon bölgesi yer almaktadır. Bu yapılarda genellikle N-glikozilasyon gerçekleşmektedir. Her monoklonal antikor glikozilasyon bölgesi içerdiği için ayrıca glikoproteindir. Bu yapılarda ki glikanların analizleri çok önemlidir. Glikozilasyonda ki heterojenitenin fazla olmasından dolayı yapıya farklı glikan grupları da bağlanabilmektedir. Bu da potansiyel ilaç adayı olan monoklonal antikorların yapısındaki glikan formlarının tamamen değişmesine neden olabilmektedir. Bu tarz yapısal farklılıkların üretimde veya üretim sonrasındaki yapılan çalışmalarda tespit edilmesi çok önemlidir. Kütle spektrometrik tekniklerden olan iyon hareketliliği kütle spektrometresi özellikle bir molekülün konformasyonel açıdan farklılıklarını, şekli, boyutu hakkında ciddi bir bilgi sağlayan analitik tekniktir. Bu teknikte iyonlar iyonlar aynı kütle/yük oranına sahip olsalar bile, inert gaz ortamında büyüklük ve şekillerine göre ayrımlarını gerçekleştirilerek aralarındaki farklılıklar net bir şekilde tespit edilebilmektedir. Bu tekniklerden arasında son yıllarda kullanımı artan Tuzaklamalı İyon Hareketliliği tekniği ise kendisinden önce çıkan tekniklere

nazaran farklı çalışma prensibi ile yüksek hassasiyet, ayrımı güçlü ve hızlı analiz sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında, monoklonal antikor bazlı ilaçlar olan Trastuzumab ve Bevacizumab, referans olarak da insan plazma immunoglobulin g kullanılmıştır. Bu biyomoleküllerin N-glikanlarının konformasyonel açıdan analizlerinin gerçekleştirilerek, konformasyonun da özellikle monoklonal antikor bazlı ilacın onay alma sürecinde etkinliğinin hızlı bir şekilde gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada mAb ve IgG lerden N-glikanlar elde edilmiştir. Elde edilen glikanlar kütle spektrometrik tekniklerde ki avantajı sebebiyle prokainamid etiketi ile türevlendirilerek analize uygun hale getirilmiştir. Bu analizlerde çevrimiçi bir şekilde floresans ve kütle dedektörleri birbirine bağlanmış yapısal özelliklerine göre karşılaştırmalar yapılmıştır. Her molekülde ortak olan glikan yapılarının etkin çarpışma kesitleri bulunmuş ve birbirleriyle karşılaştırmaları yapılmıştır. Ayrıca yapılar özgü olan glikanların da etkin çarpışma kesitleri bulunarak yapıdaki bir fukoz veya bir galaktoz bağlanması sonucu değişen farklılıklar gösterilmiştir.

Bu çalışma sonucunda N-glikan içerikleri farklı terapötik ilaç türleri için ayrıntılı olarak iyon hareketliliği kütle spektrometresi ile hem kütleleri, hem iyon hareketlilikleri hem de etkin çarpışma kesitleri ayrıntılı bir şekilde ölçülerek ilaçların birbirlerinden ayırt edilmesi ve ayrıca aynı ilacın değişik üretim işlemlerinden farklılıklarının gelip gelmemesi ve dolayısı ile ilacın etkin üretilip üretilmediği ve bağlı olarakta aktivitelerinin varlığı hızlı ve detaylı bir şekilde tespit edilebilecekleri gösterilmiştir.

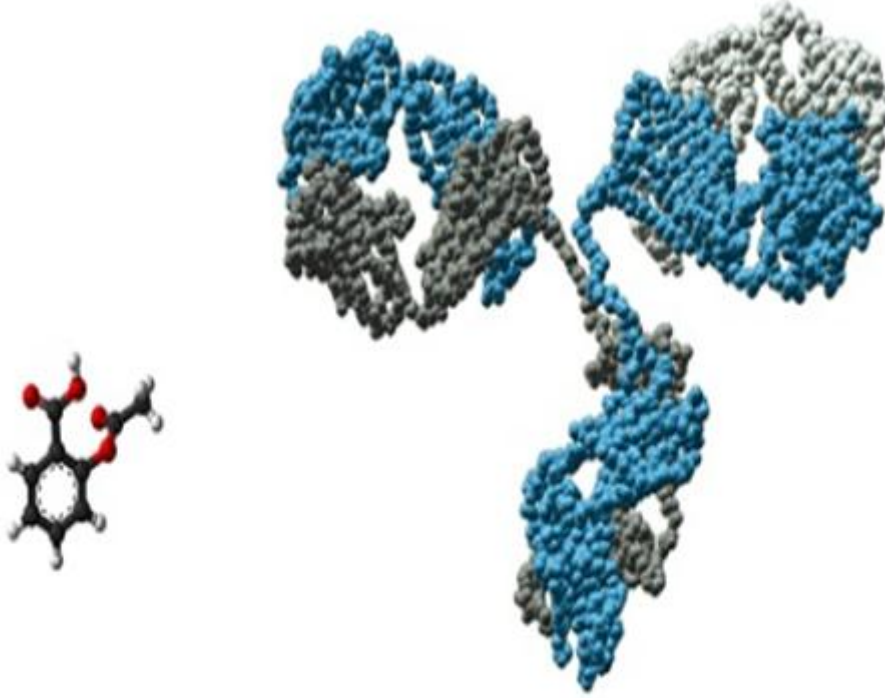
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Biyoteknolojik ilaçlar

1928 yılında Alexander Fleming tarafından penisilinin üretilmesi ile ilaç sektöründeki ilk biyoteknolojik üretim başlamıştır[1].1982 yılında ise Eli Lilly ve Genentech firmaları tarafından rekombinant DNA teknolojisi ile diyabet hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere Humulin piyasa adıyla insan insülini üretilmiş, Amerikan İlaç ve Gıda İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır[2,3]. Bu gelişmeler ışığında, birçok firma kendi üretim teknikleriyle tedavi edici etkiye sahip ilaçlarını üretmiştir, üretmeye de devam etmektedir. Amerikan ilaç ve Gıda İdaresi (FDA) tarafından 2020 yılında 53 adet biyoteknolojik ürüne onay verilmiştir[4]. Avrupa ilaç ajansı (EMA) tarafından 97 adet biyoteknolojik ürüne onay verilmiştir. EMA tarafından 2020 yılında onay verilen ilaçlar arasında 39 tanesinde ise daha önce onayı verilmemiş aktif maddeler içeren ilaçlar da yer almaktadır[5]. 2020 yılında dünya çapında satılan biyofarmasötik ilaçlar arasında AbbVie's firması tarafından üretilen, piyasa ismi Humira olan Adalimumab adlı ilacın yaklaşık satış değeri 20 milyar doları aşmıştır. Bu ilaç romatoid artrit, crohn hastalığı, sedef hastalığı, ankilozan spondilit, gibi hastalıkların tedavisinde kullanılması amacıyla onay alan bir ilaçtır. 2020 yılında en fazla satılan biyofarmasötik ilaçlar arasında ilk 10 ilacın satış rakamı yaklaşık 102.2 milyar dolar olarak belirtilmiştir. Bu da biyofarmasötik alanda yapılan çalışmaların ne kadar önemli ve ciddi boyutta olduğuna bir göstergedir[6].

Biyofarmasötik ilaç, rekombinant dna teknolojisi veya yeni biyoteknolojik yöntemler ile üretilen, insan hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlara denir[7]. Biyofarmasötik alanda üretilen ilaçlar genellikle peptit[8] veya protein[9] temelli oldukları için, konvansiyonel ilaçlara kıyasla daha büyük ve karmaşık bir yapıya sahiptir. Konvansiyonel ilaçlar laboratuvar ortamında kimyasal yolla üretilmektedirler. Bu ilaçlar genellikle düşük molekül ağırlığına (Aspirin 180 Da) sahip ilaçlardır. Biyofarmasötik ilaçlar ise yüksek molekül ağırlığına (İnterferon 18 kDa, Monoklonal Antikor 150 kDa) sahip, büyük bir bölümü canlı formlarında üretilen ilaçlardır. Bu tarz ilaçlar konvansiyonel ilaçlar ile karşılaştırıldığında birçok avantaja sahiptir. Bu avantajlar arasında tek bir moleküle özgü üretilmeleri,

yan etkilerinin çok az olması, aktivite ve yüksek hassasiyet gibi özelliklere sahip olması bu avantajlar arasında sayılmaktadır[10, 11].



**Aspirin**

**Monoklonal Antikor**

**Şekil 2.1.** Aspirin ve Monoklonal Antikor yapısının şematik gösterimi[12]

Biyofarmasotik ilaçların üretimi sırasında birçok ökaryotik ve prokaryotik sistem kullanılır. Bu sistemler arasında, *Escherichia Coli*, Çin hamsteri yumurtalık hücreleri, bir maya türü olan *Saccharomyces cerevisiae*, bebek hamster karaciğeri, memeli hücre hatları, murine myeloma teknolojisinden türetilmiş NS0 ve SP2/0 hücre hatları yer almaktadır[11],[13–15].

Üretici firma, kullandıkları teknolojilere göre bir konak hücre sine üret tirmek amacıyla hedef hastalığa karşı etki etmesi beklenen protein genetik materyalini ekler. Eklenen bu genetik materyali konak hücre kendi proteinlerini ürettiği gibi üretir. Bu proteinleri üreten hücreler çoğaltıldıktan sonra kaynak olarak kullanılır. Konak hücreler tarafından ürettirilen bu proteinler hücre hatlarından ayrıştırıldıktan sonra kromatografik yöntemlerle saflaştırılır. Saflaştırma işleminden sonra karakterizasyon, stabilite, kalite kontrol testleri yapılır. Bu testlerden sonra ilaç formülize edilir, biyobenzerlik ve toksikoloji çalışmaları yapılır. Bu çalışmalardan sonra ise onay alması gereken yetkili kurumlara (FDA veya EMA) bütün sonuçlar sunulur[16]. Onay alınan ilaçlar seri üretim ile başlanıp piyasaya sürülür. Üretici firma, yetkili kurumlardan onay aldıktan sonra ürettiği biyofarmasotik ilacın tek başına belirli bir yıl patentine sahip olmaktadır. Patent süresi dolara kadar bu ürünü tek başına üretmektedir. Patent süresi dolduktan sonra ise diğer firmalar genetik kodu ortaya çıkmış, ürün hakkında bütün bilgiler paylaşıldıktan sonra ilk üretilen ürüne çok yakın olarak kendi ürünlerini üretebilmektedir. Patenti alınmış piyasada hedefe özgü üretilmiş ilk ilaca biyoteknolojik referans ilaç denir. Tedavi edici etkiye sahip ilaçlara ise biyoterapötik ilaç adı verilir. Referans ilaç baz alınarak üretilen ürünlere ise biyobenzer adı verilmektedir. Biyobenzer ürünlerin onay sürecinde, etki maddesi aynı biyolojik madde içermesine rağmen, referans ilaca yakın olacak şekilde risk, fayda, kalite, etkinlik, güvenilirlik gibi özelliklerine yakın olması gerekmektedir.

Biyoterapötik proteinler Leader ve ark. tarafından farmokolojik etkilerine göre bir sınıflandırma önermiştir. Bu sınıflandırmaya göre; protein aşılı, hedefe özgü protein terapötikleri, düzenleyici ve enzimatik etkiye sahip protein terapötikleri ve protein teşhisi adı altında 4 grup oluşturmuşlardır[9].

Biyofarmasotik ilaçlar arasında hormonlar, aşılı, büyüme faktörleri, monoklonal antikolar, enzimler ve sitokinler yer almaktadır[7]. Yetkili kurumlardan onay almış bazı biyofarmasotik ilaçların listesine aşağıda yer verilmiştir.

**Çizelge 2.1** Bazı onay almış biyofarmasotik ilaçların çizelgesel gösterimi[17]

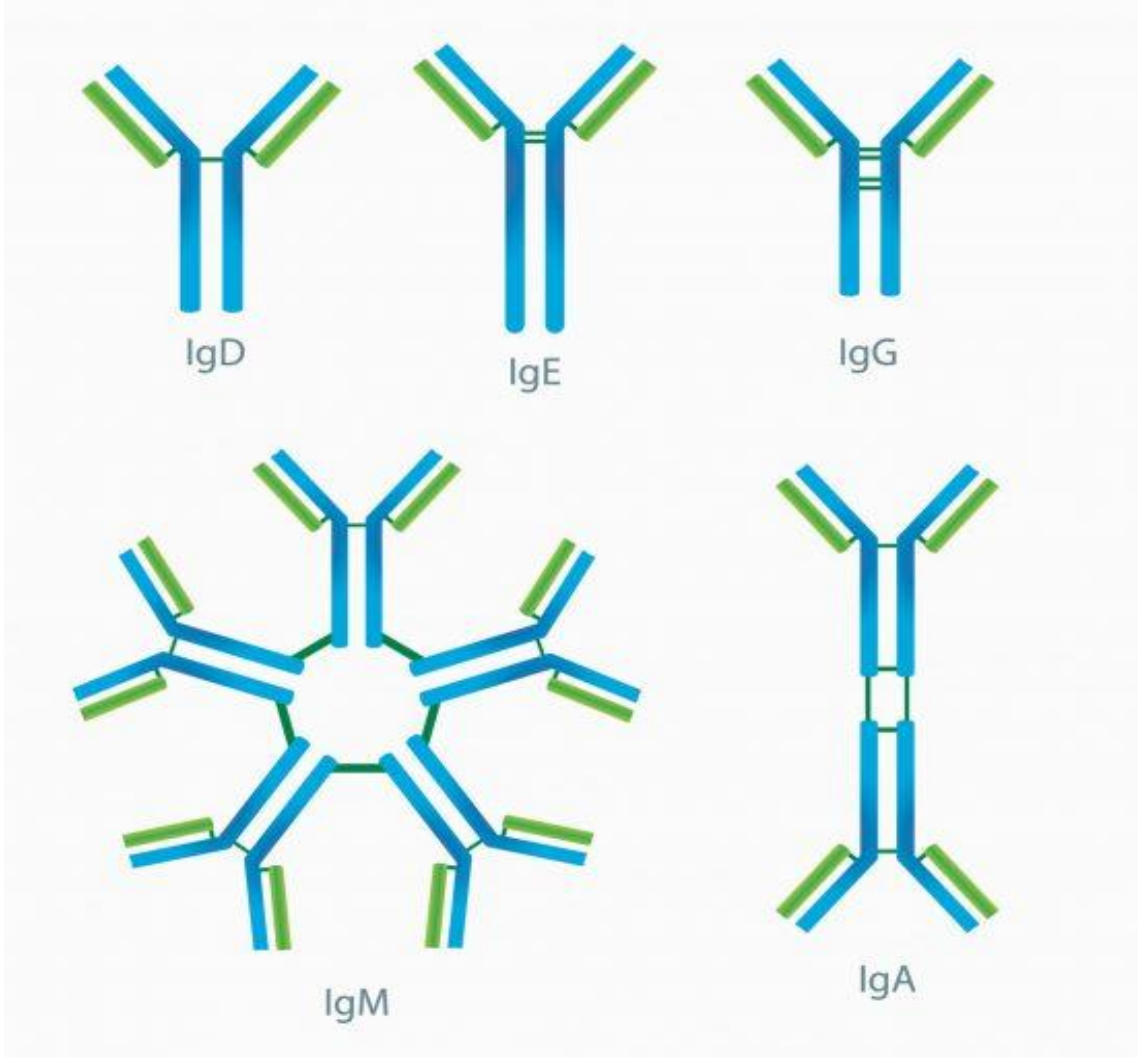
<b>Kategori</b>	<b>Biyofarmasotik ilaç</b>	<b>Üretildiği Sistem</b>	<b>Etki ettiği Hastalık</b>	<b>Onay Tarihi</b>
<b>Hormon</b>	İnsan İnsülini	E.coli	Diyabet	1982 (ABD)
	Tirotropi-alfa	CHO hücreleri	Tiroid kanseri teşhis ve tedavi	1998 (ABD) 2000 (Avrupa)
<b>Aşı</b>	HBsAg (HBVAXPRO)	S. cerevisiae	Hepatit B	2001 (Avrupa)
	İnfluenza suşları	Embriyo yumurtaları	İnfluenza ( H5N1)	2016 (Avrupa)
<b>Enzim</b>	Alglukozidaz Alfa	CHO hücreleri	Pompe Hastalığı	2006 (Avrupa) 2008 (ABD)
	İmigluseraz	CHO hücreleri	Gaucher Hastalığı	1994 (ABD) 1997 (Avrupa)
<b>Büyüme Faktörleri</b>	Epoetin - Alfa	CHO hücreleri	Anemiye bağlı kronik böbrek yetmezliği	2007 (Avrupa)
	Filgrastim	E.coli	Nötropeni	2008 (Avrupa)

<b>Monoklonal antikorlar</b>	Golimumab	Sp2/0 Hücreleri	Romatoid Artrit	2009 (Avrupa) 2009 (ABD)
	Belimumab	NS0 hücreleri	Kelebek Hastalığı	2011 (Avrupa) 2011 (ABD)
<b>Sitokinler</b>	İnterferon beta-1b	E.coli	Çoklu Skleroz (MS)	2008 (Avrupa) 2009 (ABD)
	Aldesleukin	E.coli	Böbrek Hastalığı	1992 (ABD)

### 2.1.1. Monoklonal Antikorlar

Antikorlar veya diğer adıyla immunoglobulinler vücudumuzda B lenfosit hücreleri tarafından üretilen, hücreler tarafından antijen olarak tanımlanan yabancı virüs, bakteri vb yapılara karşı üretilen ve bu yapılara karşı korunmayı sağlayan biyomoleküllerdir. Her bir antikorun kendisi ile uyum sağlayan bir antijeni olup, tek bir antijen için vücudumuz tarafından tek bir antikor üretilmektedir. Vücudumuzda farklı antijenlere karşı üretilen 5 çeşit immunoglobulin yer almaktadır. Bu immunoglobulinler; IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM olarak adlandırılmıştır. Her bir immunoglobulin vücuda giren veya girdikten sonra etki oluşturan antijenlere karşı üretilir[18]. Her bir immunoglobulinin kendine özgü görevi vardır. Örneğin; IgE vücutta alerjik yanıt oluşturur iken, IgM ise antijenle ile karşılaşıldığında hızlıca üretilip bağışıklık yanıtının oluşmasını sağlamaktadır[19]. Bu immunoglobulinler arasında en çok bulunan ise İmmunoglobulin G (IgG) dir. İmmunoglobulin G ler insan serumunun yaklaşık %70-%75 ini oluşturan yapılardır. Hastalıklara karşı kalıcı bağışıklık sağlayan antikorlardır.





**Şekil 2.2.** İnsan vücudunda yer alan İmmunoglobulinlerin şematik gösterimi[20]

Cambridge Üniversitesinden Cesar Milstein, Niels Jähre ve Georges Köhler isimli bilim insanları, 1975 yılında fareler üzerinden tek bir epitopa spesifik olarak bol miktarda antikor üretmişlerdir. Bu tekniğin adına hibridoma teknolojisi verilmiştir. Bu üretim teknolojisi Köhler, Jähre ve Milstein'e 1984 yılında Nobel tıp-fizyoloji ödülünü kazandırmıştır[20-21]. Hibridoma teknolojisi yardımıyla üretilen monoklonal antikorlar tek bir antijne karşı spesifik olarak üretimi sağlanan yapılardır. Monoklonal antikorlar genellikle hibridoma teknolojisi veya farklı bir biyoteknolojik üretim vasıtasıyla üretilen, kanser, astım, sedef, Crohn hastalığı,

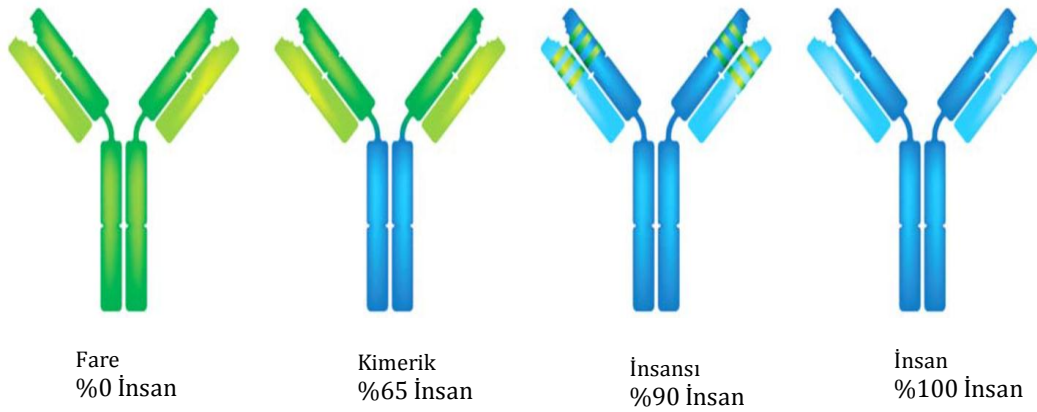
bulaşıcı hastalıklar, romatoid artrit gibi birçok insan hastalığının tedavisinde kullanılan protein temelli tedavici edici etkiye sahip yapılardır[17][23][24].

Hibridoma teknolojisinin bulunmasının ardından ilaç firmaları bu teknoloji ile yakından ilgilenmiş ve kendi monoklonal antikör bazlı ilaçlarını üretmek için çalışmalarına başlamışlardır. Bu çalışmalar büyük ilgi görmüştür. Bu çalışmalar sonucunda 1982 yılında ilk kez muromonab-CD3 isimli monoklonal antikör fareler üzerinden elde edilmiş ve hücre kültürü ortamında çoğaltılmıştır. Bu ilaç akut romatizmal ateş ve karaciğer yetmezliği gibi hastalıklara karşı etkinliği gösterilmiştir. Yapılan çalışmaları, kalite, etki, koruyuculuk gibi testlerin sonuçlarının Amerikan İlaç ve Gıda İdaresi (FDA) kurumuna sunulmasının ardından bu ilaç 1986 yılında ilk kez onay almıştır[25][26]. Bu ilaç dünyada o dönem monoklonal antikör temelli üretimi gerçekleştirilip onay alan ilk ilaç özelliğini de taşımaktadır. Şu anda dünyada 500 den fazla kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere monoklonal antikör temelli ilaçlar çeşitli klinik aşamalarda şirketler tarafından çalışılmaktadır[27]. 2020 yılı sonu itibariyle FDA ve EMA onaylı 79'dan fazla monoklonal antikör bulunmakta ve bunların 30 tanesi sadece kanser tedavisinde kullanılmaktadır[23][28]. Dünyada terapötik etkiye sahip monoklonal antikör pazarı 2018 yılında yaklaşık 115,2 milyar abd doları değerinde iken, 2019 yılında bunun 150 milyar doları ve 2025 e kadar ise 300 milyar doları bulması beklenmektedir[23].

Günümüze kadar onaylanan terapötik (tedavi edici) etkiye sahip monoklonal antikörler immunglobulin G ( IgG) temelli ilaçlardır. İmmunglobulin G lerde kendi içerisinde yapısına ve miktarına bağlı olarak İmmunglobulin G1 (IgG1), İmmunglobulin G2 (IgG2), İmmunglobulin G3 (IgG3) ve İmmunglobulin G4 ( IgG4) olarak adlandırılan 4 alt birimden oluşmaktadır. İmmunglobulin G'nin içeriğinde % 60-70 arası IgG1, %20-30 arası IgG2, %5-8 arası IgG3 ve sadece %5 oranında yer alan IgG4 bulunmaktadır[29][30]. Bu alt birimlerinde kendi içerisinde de alt birimleri vardır. Klinik çalışmalarda genellikle IgG1, IgG2 ve IgG4 temelli terapötik etkiye sahip ilaçlar kullanılmaktadır. IgG3 ise bu çalışmalarda yer

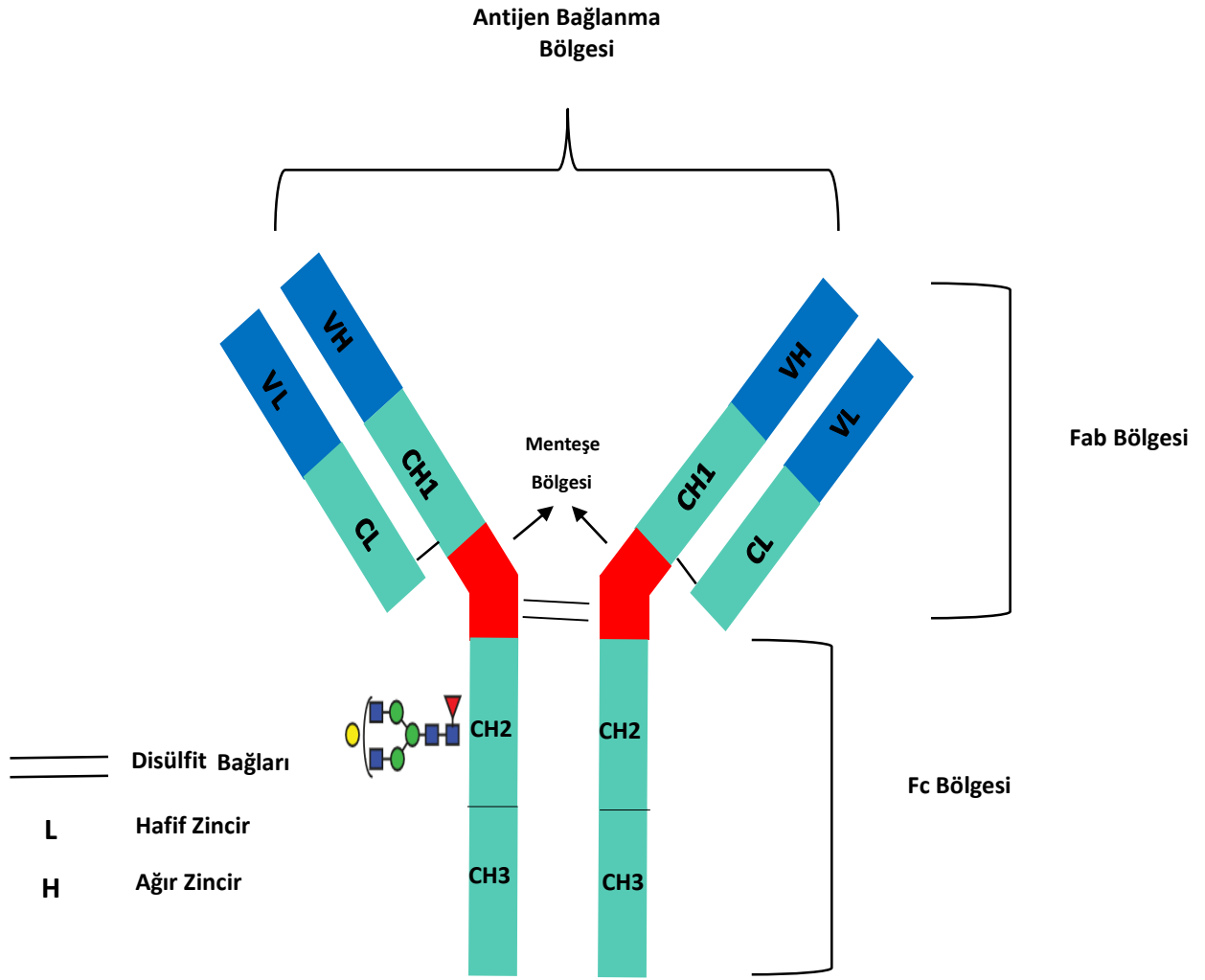
almamaktadır. IgG3'ün hızlı yarılanma ömrü nedeniyle bu çalışmalarda yer almamaktadır[31][32].

Monoklonal antikorlar üretim aşamalarına göre fareden üretilmiş, kimerik, insansılaştırılmış ve insansı olarak 4 gruba ayrılmaktadır. Bu alt gruplarda üretilen monoklonal antikorlar genellikle –mab ekiyle sona erer. Örneğin fare yapısındaki monoklonal antikorlar %0, kimerik yapıdaki monoklonal antikorlar %60, insansılaştırılmış yapıdaki monoklonal antikorlar %90, insansı monoklonal antikorlar ise %100 insan immunglobulin G yapısına benzemektedir. Üretim methoduna göre fare antikorlarından üretilenler –momab ekiyle, kimerik monoklonal antikor yapıdakiler –ximab ekiyle, insansılaştırılmış monoklonal antikorlar –zumab ekiyle, insansı monoklonal antikor yapıdakiler ise –umab ekiyle sonlanır. Bu 4 alt grubun yanı sıra Fab fragmenti grubu, Fc-füzyon proteinleri, bispesifik antikorlar, radyoimmunokonjugatkar, antikor-ilaç konjugatları gibi antikorlardan türetilmiş ilaçlar da yer almaktadır [31][33][34].



**Şekil 2.3.** Monoklonal antikorların sınıflandırılmış şematik gösterimi[34]

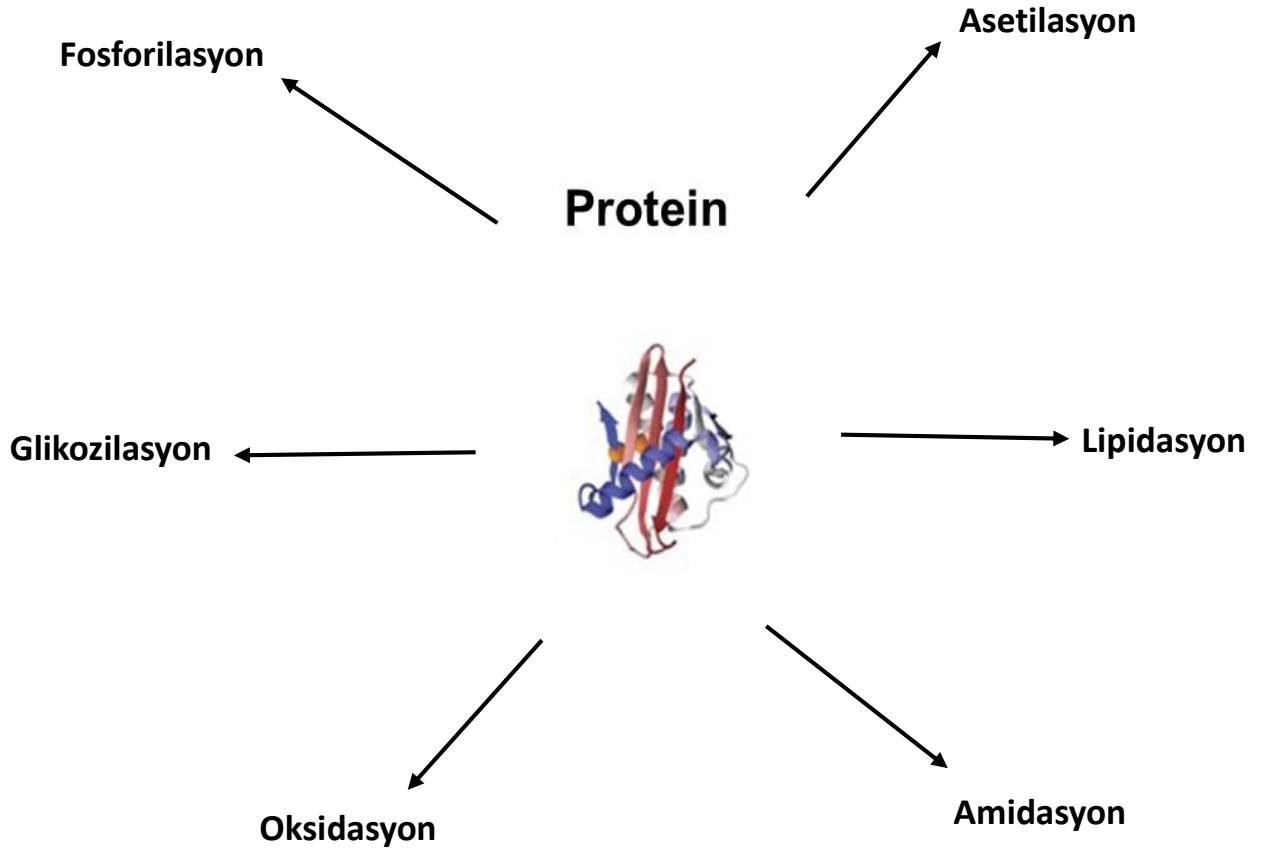
Monoklonal antikorlar yaklaşık olarak 150 kDA ağırlığında tetramerik yapıya sahip proteinlerdir. Monoklonal antikorlar 'Y' şekline sahip yapılardır. Monoklonal antikorlar yapılarında 2 adet 50 kDA ağırlığında hareket etme özelliği olmayan sabit ağır zincir ve 2 adet 25 kDA ağırlığında hareket özelliği olan hafif zincirden oluşur. Yapıdaki hafif ve ağır zincirler de farklı bölgelerden oluşmaktadır. Ağır zincir bölgeleri CH1, CH2, CH3 ve VH olarak isimlendirilirken, hafif zincir bölgeleri ise VL ve CL olarak isimlendirilmiştir. Burada V (variable) ile isimlendirilen bölgeler antijene bağlanan hareketli, C (constant) ile belirtilen bölgeler ise sabit bölgeler olarak tanımlanmıştır. Yapıdaki antijene bağlanma bölgeleri, VH ve VL olarak adlandırılan uç kısımdaki bölgelerin birbirleri içerisine geçmesi sonucu oluşmaktadır. Fab bölgesi olarak isimlendirilen bölge antijene bağlantıyı sağladıktan sonra, Fc bölgesi ise savunma sistemindeki hücreleri kendine çekerek antijenlere etki edilmesini sağlamaktadır. Her bir bölge kendi içerisinde birbirlerine tek bir disülfid bağı ile bağlanmıştır. Disülfid bağları IgG1 ve IgG4 yapılarında 16 iken, IgG2 de ise 18 tanedir. Ağır zincirler menteşe bölgesi adı verilen bölgede IgG1 ve IgG4 de 2 adet, IgG2 de ise 4 adet disülfid bağı ile birbirlerine bağlıdır. Yapılarındaki disülfid bağı sayısına göre monoklonal antikorun yapısı da, üretilmesi hedeflenen İmmunglobulin G nin alt birimine bağlı olarak değişir[31][32].



**Şekil 2.4.** Monoklonal Antikor yapısının şematik gösterimi

## 2.2. Post Translasyonel Modifikasyonlar

Yaşamlar faaliyetlerin düzenlenmesinde proteinler çok önemli rol oynamaktadırlar. Proteinlerin birçoğu fonksiyonlarını kazanabilmek için geçici veya kalıcı özelliklere sahip olmak zorundadırlar. Bu özelliklere sahip olmak için proteinler sentezi sırasında veya sentezi sonrasında yapılarındaki değişikliklere uğrarlar. Bu uğradıkları değişikliklere post-translasyonel modifikasyonlar (PTM) denir. Post-translasyonel modifikasyonlar, proteinin peptit zincirindeki kovalent bağlı bir grubun yapıdan ayrılması veya yapıya katılması sonucu gerçekleşmektedir. Post-translasyonel modifikasyonların bugüne kadar 300'den fazla olduğu belirtilmiştir[35]. Post-translasyonel modifikasyonlar proteinlerin hücre içindeki konumu, kendi aralarındaki etkileşimlerini, sinyal iletimi gibi birçok biyolojik işlemi kontrol etmektedir. Post-translasyonel modifikasyonlar geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olmak üzere iki gruba ayrılabilir[36]. Geri dönüşümlü olanlarda fosfat ve metil gibi küçük olan, karbonhidrat ve lipit gibi büyük olan yapıların enzimler aracılığı ile proteinin belirli aminoasitleri üzerinden yapıya bağlanması sonucu gerçekleşen modifikasyonlardır. Bu modifikasyonlar arasında glikozilasyon, fosforilasyon, oksidasyon, asetilasyon, lipidasyon, amidasyon, sülfasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar sayılabilir. Bir diğer post-translasyonel modifikasyon ise proteinlerin peptitlerinin arasındaki peptit bağlarının enzimler ya da otokataliz sonucu parçalanmasıdır. Bu post-translasyonel modifikasyon geri dönüşümsüzdür[36][37].



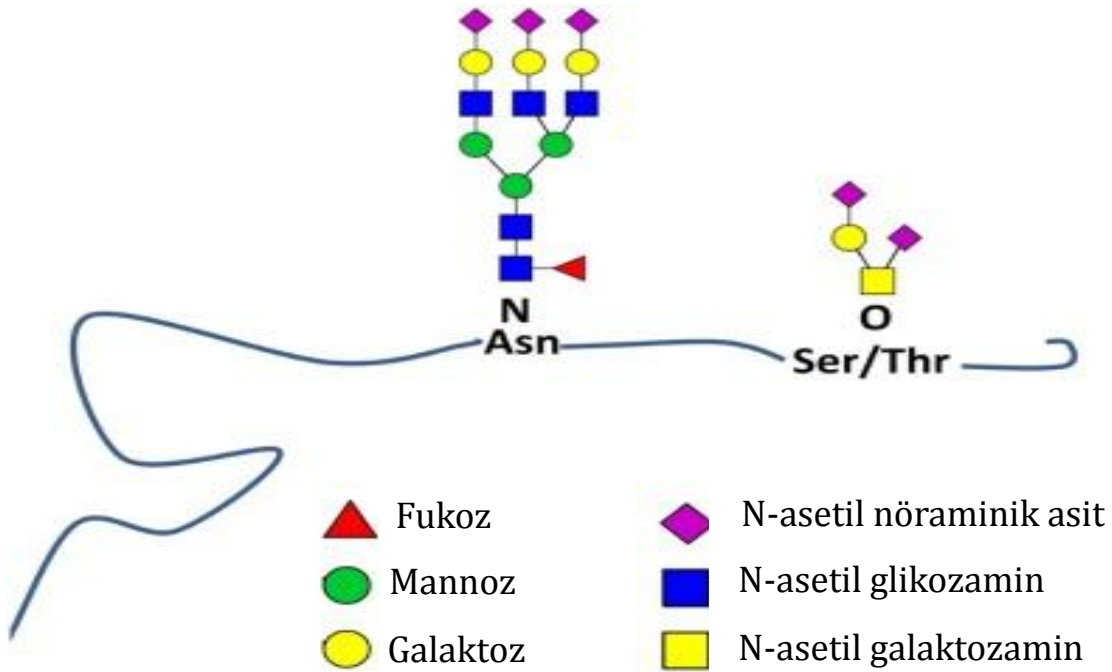
**Şekil 2.5.** Bazı Post-Translasyonel Modifikasyonların şematik gösterimi

Post-translasyonel modifikasyonların hücre içindeki organellerin çoğunda ve yüzlerce çeşidinin gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu modifikasyonlar aracılığıyla birçok hücrel fonksiyonda işlevsel hale gelmektedir. Memeli hücrelerinin büyük bir çoğunluğundaki proteinlerin Post-translasyonel modifikasyona uğradığı düşünülmektedir. Bu modifikasyonlar arasında en sık çalışılan ve görülenler arasında fosforilasyon ve glikozilasyon yer almaktadır [38].

### **2.3. Protein Glikozilasyonu**

Glikozilasyon, ökaryot ve prokaryot hücrelerde gerçekleşen post translasyonel modifikasyonlardan bir tanesidir [39]. Glikozilasyon, proteinin yapısına spesifik enzimler aracılığıyla karbonhidrat gruplarının bağlanması sonucu

gerçekleşmektedir. Glikozilasyon sonrasında karbonhidrat gruplarının bağlandığı protein yapılarına glikoprotein, bu karbonhidrat gruplarının da birbirleriyle birleşerek oluşturdukları yapılara ise glikan adı verilmektedir. Protein glikozilasyonu post translasyonel modifikasyonlar arasında en karmaşık ve çeşitli olan modifikasyon türlerinden biridir. Glikozilasyonun ökaryot hücrelerinin proteinlerinin % 50'sinden fazlasında gerçekleştiği düşünülmektedir[40]. Protein glikozilasyonunun moleküler tanımlama, inflamasyon düzenleme, proteinlerin dönüşümü, sinyal iletimi gibi hücresel faaliyetlerin birçoğunda rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra glikozilasyondaki değişimlerin kanser, inflamasyon hastalıkları, doğuştan gelen hastalıklar ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [41][42]. Ayrıca glikozilasyonun tüm ökaryotik hücrelerde sitoplazma, mitokondri, endoplazmik retikulum (ER), çekirdek ve golgi aygıtı gibi hücre içerisinde önemli görevleri olan yapılarda gerçekleştiği bilinmektedir [43].



**Şekil 2.6.** Proteinlerin N- ve O- Glikozilasyon birimlerinin şematik gösterimi [44]



Proteinler de glikozilasyon karbonhidratların bağlanma biçimlerine göre N-glikozilasyon ve O-glikozilasyon olarak ayrılmaktadır. N-glikozilasyon ER'de başlayıp golgi aygıtında sona eren bir dizi enzimatik süreçler sonunda gerçekleşmektedir. Başlangıçta ER'de 14 şeker grubuna sahip bir oligosakkaritin dolikol fosfat yapısına bağlanmasıyla başlar. Sonrasında yeni oluşmaya glikoproteine Asn-X-Ser/Thr aminoasit sekansını içeren, X pirolin hariç herhangi bir aminoasidi ifade eder, yapıya oligosakkarit birimi glikozidik bağı ile bağlanır. Golgi aygıtında glikozidaz ve glikotransferaz enzimleri sayesinde oligosakkarit biriminden bazı şeker birim birimleri ayrılır ve yenileri katılır. Bu süreç sonucunda yapısında farklı N-glikan birimler içeren glikoproteinler oluşur[45]. O-glikozilasyon ise N-asetil galaktozamin (GalNAc) monosakkaritinin proteine Ser veya Thr aminoasidi üzerinden bağlanması ile başlar. Bu bağlanma N-asetil galaktozaminil transferaz (GALNT) adı verilen enzimin katalizlemesi ile gerçekleşir. Protein yapısına GalNAc monosakkariti katıldıktan sonra spesifik enzimler yardımı ile galaktoz (Gal) veya N-asetil glukozamin (GlcNAc) bağlanır. Bu bağlanmalardan sonra, çeşitli enzimler yardımıyla GlcNAc üzerine farklı monosakkarit birimleri bağlanarak birçok O-glikozilasyona uğramış glikoprotein oluşur[46]. Glikozilasyondan sorumlu olan enzimlerin canlı organizmaların gelişiminde ve işlevlerinde önemli olduğu saptanmıştır.

Bir glikoproteinde tek bir N-glikozilasyona veya O-glikozilasyona uğramış ya da her ikisinde farklı pozisyonlarda bağlanabildiği birden fazla karbonhidrat birimi yer alabilmektedir. Her bağlantı bölgesinde farklı karbonhidrat birimlerinin bulunması da yapıda heterojeniteye neden olmaktadır. Bu bağlantı noktalarındaki çeşitlilik glikoproteinlerin farklı alt glikoformlarını ve kümelerini oluşturduğundan çeşitlilik sağlar ve mikroheterojenite oluşturur[47]. Glikozilasyon sırasında proteinlere farklı monosakkarit birimleri bağlanmaktadır. Bu monosakkaritler arasında; mannoz, galaktoz, fukoz, glikoz, N-asetil galaktozamin (GalNAc), N-asetil nöraminik asit (NeuAc), ve N-asetil glikozamin (GlcNAc) yer almaktadır. Bu monosakkarit birimlerinin yapıya katılma ve sıralanmaları arasındaki farklılıklar proteinin üzerinde çeşitli oligosakkarit birimlerinin oluşmasına olanak sağlar [48].

Glikozilasyon, önemli hücresel süreçlerde, hücre-hücre arası ve hücre-hücre dışı iletişim, hücresel metabolizma ve hücre-hücre yapışması gibi olaylarda rol oynamaktadır.

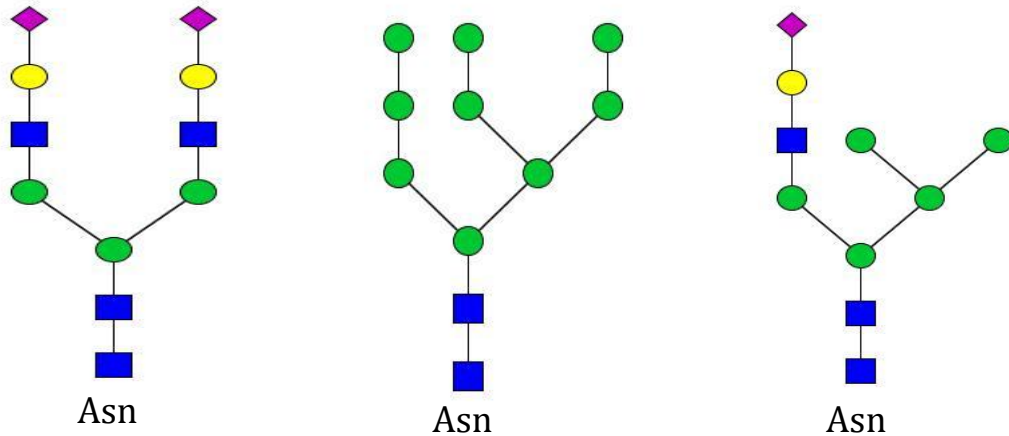
Glikozilasyon, protein temelli biyoterapötik ilaçlarda meydana gelen en önemli post translasyonel modifikasyonlar bir tanesidir. Glikozilasyon, biyolojik temelli ilaçlarda yaygın olarak görülen, ilacın çözünürlük, serum yarı ömrü, protein katlanması ve immunojeniklik gibi klinik güvenlik ve etki profillerini etkilediği belirtilmiştir. Protein temelli ilaçlarda iki temel glikozilasyon türü olan N-glikozilasyon ve O-glikozilasyon görülür. Immunoglobulin G temelli ilaçlarda (mAb) N-glikan yapısı reseptör afinitesini etkileyerek düzenlediği belirtilmiştir. O-glikozilasyonun eritropoetin gibi ilaçlarda etkisi O-glikan yapısının zorluklarında dolayı daha az araştırılmış olup, etkisinin ilaç kalitesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Glikozilasyon nedeniyle biyolojik ilaç üretimindeki başlıca engeller; Karmaşıklık, değişkenlik ve mikroheterojenite olarak belirtilmiştir [44].

### **2.3.1. Glikomik**

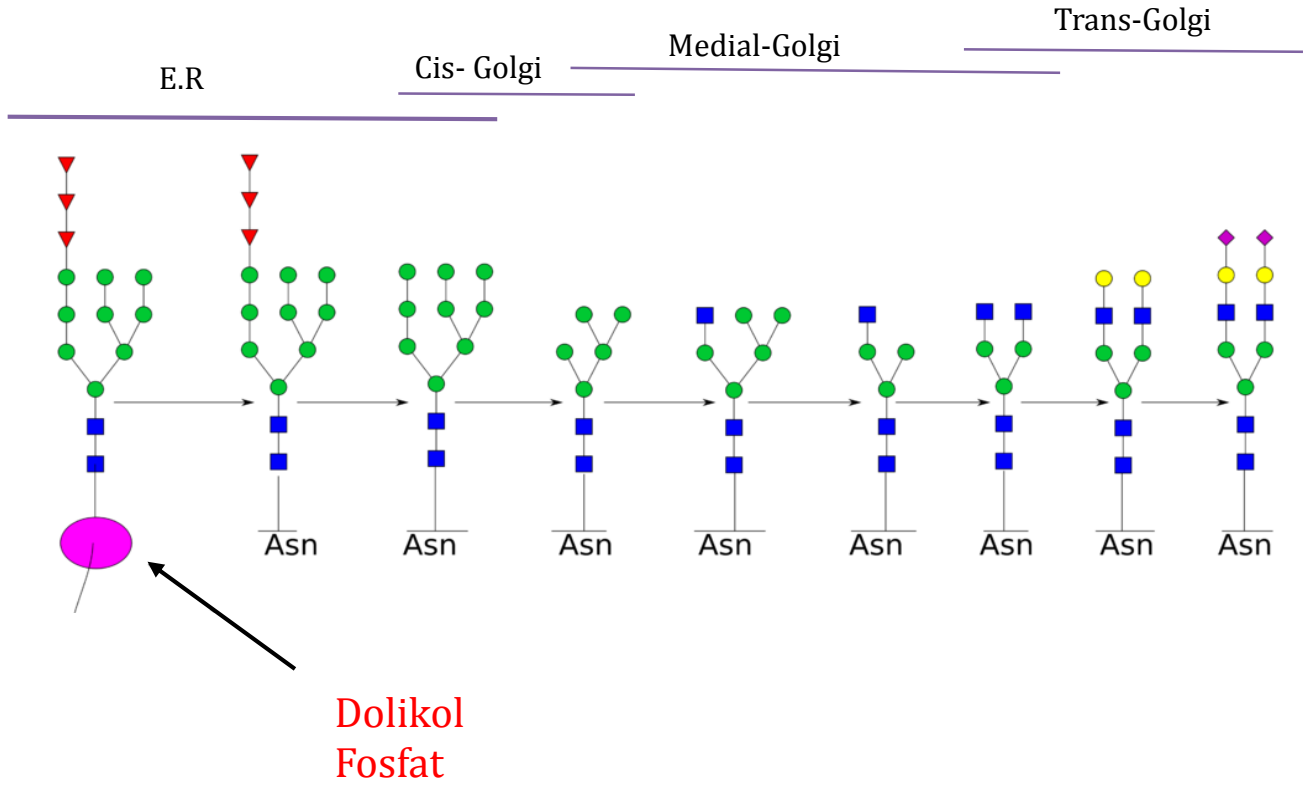
Glikanların klinik, biyolojik ve biyoteknolojik üretim çalışmalarındaki öneminin artması ve protein katlanması, konak-patojen etkileşimi ve sinyal taşınımı gibi birçok biyolojik süreçte rol oynaması glikan çalışmalarındaki önemi ciddi oranda arttırmıştır[49][50]. Glikan çalışmaları hücresel, moleküler, doku ve daha yüksek seviyelerde bilinmesine rağmen, birden çok bileşeni içerdiğinden eşi benzeri olmayan zorluklar sunmaktadır. Glikanların üç temel ve birbirleriyle alakalı olan yönü, bu alanda yapılan çalışmaları hem ilgi uyandıran hem de zorlayıcı kılmaktadır. Bu olayların birincisi; glikanların biyosentezinde çeşitli glikoziltransferazların koordineli bir biçimde herhangi bir şablona bağlı olmadan oluşturduğu sentez sürecidir. Bu biyosentez süreci glikan yapılarına karmaşıklık ve çeşitlilik sağlamaktadır. İkincisi glikanların kimyasal çeşitliliği ve heterojenitesinin de glikanların kimyasal yapılarının tanımlanması için analitik tekniklerin geliştirilmesine yol açmasıdır. Sonuncusu ise proteinlerin bağlanma bölgelerine çok sayıda temas eden glikan yapılarının glikan-protein etkileşimlerinin biyokimyasal olarak temelini anlaşılmasıdır[51]. Glikomik alanı glikozilasyon bölgelerine bakılmaksızın sadece glikan profillerinin analizi ile ilgilenmektedir [42].

### 2.3.2. Proteinlerin N-glikan Yapıları

N-glikanların sentezi ER'de dolikol fosfata bağlı yapısında 9 mannoz birimini bulunduran 14 şeker birimli bir öncü oligosakkarit ile başlar. Bu öncü oligosakkaritten endoplazmik retikulumda enzimatik süreçler sonucunda 1 mannoz ve 3 glukoz birimi ayrılır. Ayrılmalar gerçekleştikten sonra yeni oluşmakta olan, Asn-X-Ser/Thr tri-peptit sekansını içeren aminoasit zincirine N-glikan yapısı bağlanarak golgi aygıtında olgunlaşmaya başlar. Olgunlaşmaya devam eden yapıda enzimler aracılığıyla farklı N-glikanlar türleri oluşturulur. N-glikan türlerinin hepsinde çekirdek yapısı olarak üç mannoz ve iki N-asetil glikozamin bulunur. Bu 5 şeker birimini içeren çekirdek yapısına bağlanan monosakkarit birimlerine göre N-glikanlar kendi içerisinde ayrılmaktadır. Bu N-glikan türleri yüksek mannozlu, hibrit ve kompleks olarak 3 adlandırılmıştır. Yüksek mannozlu N-glikanlar çekirdek yapısı hariç mannoz birimlerini içermektedirler. Bu mannoz birimleri birden fazla dallanma gerçekleştirerek yapıya bağlanmaktadır. Kompleks N-glikanlar çekirdek yapısı hariç genellikle GlcNAc, Glc ve siyalik asit monosakkarit birimlerini içermektedirler. Kompleks N-glikanlar dallanmaların sayısına göre iki, üç ve dört antenli olarak isimlendirilmişlerdir. Hibrit N-glikan türleri ise çekirdek yapısı hariç bir bölgesinde yüksek mannoz yapısında diğer bölgesinde ise kompleks glikan yapısında dallanmış glikanları bölgelerini içermektedir[52][53].



**Şekil 2.7.** Sırasıyla Kompleks, Yüksek Mannozlu ve Hibrit N-glikan yapılarının şemantik gösterimi



**Şekil 2.8.** Proteinlerin N-glikan Yapılarının Biyosentezinin Şematik Gösterimi

Glikanların yapısal olarak heterojeniteliği, golgideki herhangi bir şablona bağlı kalmadan sentez sonucudur ve glikanların biyosentez yolu boyunca proteine ilk transferindeki verimsizliği belirtir. Bu olay, glikoform adı verilen glikozilasyona uğramış varyantların karışımını üretmektedir. Memelilerde tam çeşitlilikte glikan üretmek için 700 protein ve 7000'den fazla farklı yapıya ihtiyacın olduğu tahmin edilmektedir[48].

#### 2.4. N-glikanların Kütle Spektrometrik Teknikler ile Analize Hazırlanması

Glikoprotein analizlerinin son yıllarda artması yeni teknik ve stratejilerin geliştirilmesine yol açmıştır. Kütle Spektrometrisi, glikoproteinlerin karakterizasyonunda çok önemli bir teknik haline gelmiştir. Glikoproteinler kütle spektrometrik teknikler kullanılarak genellikle glikopeptit ve glikan düzeyinde incelenmektedir. Glikopeptit düzeyinde glikoproteinin spesifik olmayan herhangi bir enzim tarafından glikopeptit birimlerine parçalanması ve bu ayrılan parçaların analizleri şeklinde gerçekleştirilmektedir. Glikan düzeyinde ise spesifik enzimler aracılığıyla glikoprotein yapısından glikanların ayrılması ve ayrılan glikanların

kütle spektrometrik teknikler ile analizi için hazır hale getirilmesine dayanmaktadır. Glikanlar eşsiz bağlanma, izomerizm, bolluğu az ve yapısal anlamda karmaşık olan karakterizasyonu zor olan moleküllerdir. Glikan yapıları yaş, hastalık, kan grubu, cinsiyet ve beslenme gibi birçok etkene bağlıdır. Glikanların kütle spektrometrik teknikler ile analize hazır duruma gelmesi için bazı ön işlemlerden geçmesi gerekmektedir. Bu işlemler sırasıyla glikoprotein yapısından glikanların salınımı, kütle spektrometrik teknikler ile analizlerde görünürlüğünün artması için türevlendirme, bolluğu az olduğu için ve zayıf iyonlaşma veriminden dolayı zenginleştirme çalışmaları yapılmaktadır.

#### **2.4.1. Glikoproteinlerden N-glikanların Salınımı (Deglikozilasyon)**

Glikoproteinlerden glikanların salınımı için kimyasal veya enzimatik teknikler tercih edilmektedir. Her iki yöntemin de kendi çalışma prensibine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Enzimatik salınımında, glikoprotein üzerinden glikanlar parçalanmamış bir biçimde ayrılmaktadır. Fakat enzim substrat ilişkisine bağlı tüm glikan türleri salınmamaktadır[54]. Kimyasal salınımında ise protein ile N-glikanlar arasındaki bağlantı kesildiği için örnekleri yok edebilir ve bu sebepten dolayı glikozilasyon bölgesindeki bilgiler kaybolabilmektedir[55].

N-glikanların proteinlerden uzaklaştırılmasında birçok enzim kullanılmaktadır. Bu enzimler arasında PNGase F (35kDa) adı verilen enzim en sık kullanılmakta olanıdır. Bu enzim glikoproteinde asparajin aminoasidi ile N-glikanların çekirdek yapısında yer alan N-asetil glikozamin arasındaki bağı spesifik olarak kesmesi sebebiyle tercih edilmektedir. Bu süreçte N-glikan yapısının çekirdek hali parçalanmamış bir şekilde korunmaktadır[56][57].

#### **2.4.2. N-glikanların Türevlendirilmesi**

Kütle spektrometrik teknikler ile analizlerin öncesinde glikanlar salınım gerçekleştirildikten sonra analiz hassasiyetini arttırmak ve saptanmasını daha kolay hale getirmek için türevlendirme işlemi yapılmaktadır. Doğal glikanlar kromofor özelliğe sahip olmadıkları için floresans veya UV teknikler ile analizlerinde direkt tespit edilemezler. Glikanların kütle spektrometrik teknikler ile

analizlerinde hassasiyeti, iyonizasyon verimliliğini arttırmak, yapı analizini kolaylaştırmak, kararsız olan siyalik asit gruplarının kaybını önlemek ve floresans ile UV belirlemede etkinleştirmek için çeşitli etiketleme çalışmaları yapılmaktadır[49][58]. Glikanların farklı etiket ajanları ile etiketlendiği birçok çalışmada belirtilmiştir[49][50][59]. İndirgeyici aminasyon bu etiketleme çalışmalarında en çok kullanılan yöntemdir. Bu teknikte genellikle kullanılan floresans ajanları; 2-aminobenzoik asit (2-AA), 2-amino benzamid (2-AB), 1-aminopirin-3,6,8-trisülfonik asit (APTS), 2-aminoakridon (2-AP), 2-aminopiridin (PA), 2-aminonaftelin trisülfonic asit (ANTS) ve 4-amino-N- [2-(dietilamino) etil] benzamid (prokainamid, proA, proc) yer almaktadır.[ref] 2-AA ve 2-AB glikan türevlendirme çalışmalarında sıklıkla kullanılan iyi türevlendirme ajanıdır[54][60][61]. Prokainamid MALDI ve ESI çalışmalarında iyonlaşma verimliliğini ciddi ölçüde arttırdığı gözlenilmiştir[61][62]. Aynı indirgeyici aminasyon mekanizmasına sahip prokainamid ve 2-AB karşılaştırıldığında prokainamidin 10-50 kat arası daha etkin olduğu belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında da pozitif mod çalışma kapasitesi ve floresans etkinliği göz önünde bulundurularak prokainamid ajanı glikan türevlendirme çalışmalarında kullanılmıştır[61][63].

#### **2.4.3. N-glikanların Ayrılması ve Zenginleştirilmesi**

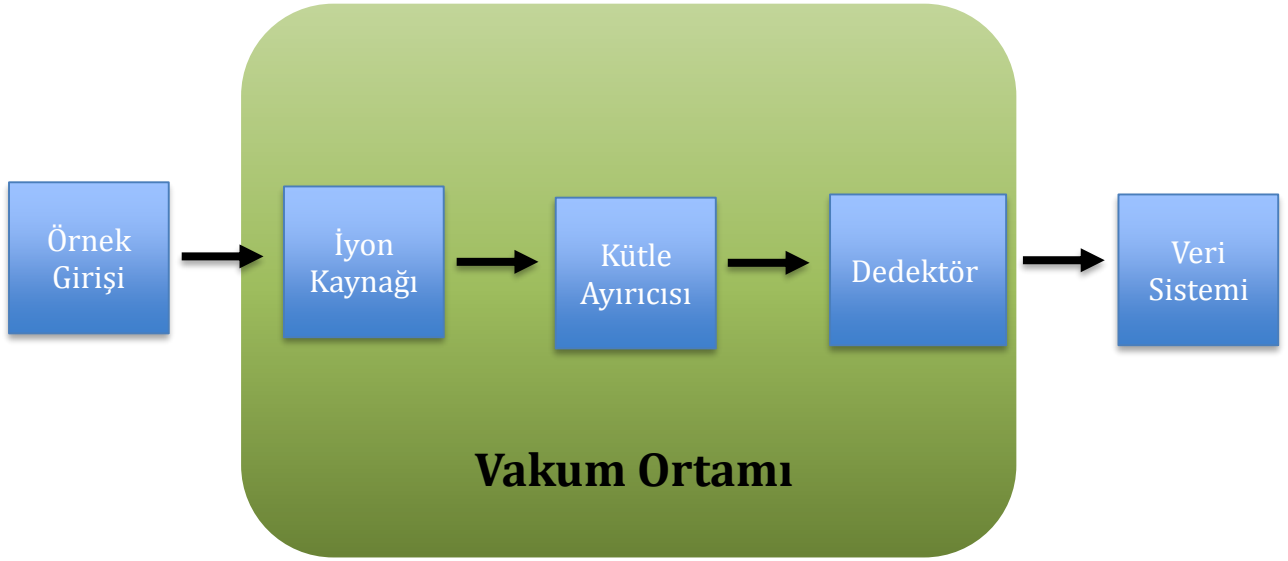
Kütle spektrometrisi, glikomik alanında yapılan çalışmalarda glikanların profilendirilmesinde kullanılan en yaygın analitik tekniklerinde başında yer almaktadır. Kütle spektrometrisi kütle doğruluğu, düşük örnek hacminde çalışma, hassasiyet ve kısa analiz süresi gibi glikan çalışmalarında önemli avantajlara sahiptir. Glikanların düşük bollukta olması ve iyonlaşma verimlerinin zayıf olmasından dolayı etiketleme işleminden sonra kütle spektrometrik teknikler ile analizleri için zenginleştirme ve saflaştırma aşamalarından geçmeleri gerekmektedir. Günümüze kadar bu çalışmalarda kullanılmak üzere; lektin bazlı, hidrofilik etkileşim kromatografisi, gözenekli karbon gibi teknikler geliştirilmiştir. Hidrofilik etkileşim kromatografisi sabit faz ile glikanların arasındaki etkileşime dayanan, yüksek seçicilik ve tekrarlanabilirlik açısından en sık kullanılan tekniklerden biridir. Glikanların zenginleştirilmesinde hidrofilik etkileşim temelli pamuk, selüloz, seferoz gibi malzemeler de kullanılmaktadır.

## 2.5. Kütle Spektrometrisi

Kütle spektrometrisinin temelleri J.J. Thompson tarafından ilk kez 1897 yılında elektronların varlığını kanıtlanması ve elektronun kütle/yük oranının keşfi ile başlamıştır. Bu keşif kendisine 1906 yılında Nobel ödülünü kazandırmıştır. Bu keşfinden sonra 1912 yılında ilk kütle spektrometresini yapmış ve O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, ve CO kütle spektrumunu almıştır. J.J. Thompson öğrencilerinden F.W. Aston <sup>20</sup>Ne ve <sup>22</sup>Ne izotoplarını keşfetmiş ve bu keşif kendisine de 1922 yılında Nobel ödülünü kazandırmıştır[64][65][66]. O yıllardan günümüze hızla gelişmekte olan kütle spektrometresi ilaç, spor, adli tıp, gıda gibi çok geniş bir alanda kullanılan analitik bir teknik haline gelmiştir[67].

Kütle Spektrometrisi, atom veya moleküllerin ayrı ayrı moleküler kütlelerini iyonlara çevirip, çevrilen bu iyonları ölçen bir tekniktir. Analiz edilen türün kütlelerinin yanı sıra yapısı hakkında da bilgi sağlamaktadır. Kütle Spektrometresi, bir türün vakum altında gaz fazında farklı iyonizasyon yöntemleri aracılığıyla iyon haline dönüştürüldükten sonra kütle/yük (m/z) oranına göre veri toplayıp analiz eden analitik bir sistem olarak tanımlanabilir. Kütle spektrometresinde analiz edilecek bir tür sırasıyla iyonlarının oluşturulması, kütle/yük (m/z) oranına göre iyonlarının ayrılması, ayrılan iyonların dedektörler tarafından algılanıp sinyale dönüştürülmesi ve son olarak da dedektör yardımıyla ölçülen sinyallerin veri setlerine dönüştürülüp bilgisayara aktarılarak kütle spektrumuna dönüştürülmesi prensibine göre çalışmaktadır.

Bir kütle spektrometresinde örnek girişi, iyonlaştırma kaynağı, kütle analizörü, dedektör ve veri analiz sistemi bileşenleri yer almaktadır. Kütle spektrometresinde iyonlaştırma kaynağı, kütle analizörleri ve dedektörler yüksek vakum altında tutulmaktadır. Bu sayede analizi gerçekleştirilen bir türün gaz fazında diğer iyonlar ile etkileşmeden serbest bir şekilde hareket edebilmesine olanak sağlanmaktadır.



**Şekil 2.9.** Kütle Spektrometresinin temel bileşenlerinin şematik gösterimi

Kütle spektrometrelerinde geçmişten günümüze birçok iyon kaynağı kullanılmış ve kullanılmakta olup bunlar arasında; elektron iyonlaştırma, kimyasal iyonlaştırma, hızlı atom bombardımanı, alan iyonlaştırma, alan desorpsiyon, lazer desorpsiyon, matriks yardımcı lazer desorpsiyon (MALDI) ve elektrosprey iyonlaştırma (ESI) gibi iyon kaynakları yer almaktadır. Her bir iyonlaştırma tekniğinin kendisine göre avantaj ve dezavantajı bulunmaktadır. Örneğin elektron iyonlaştırma tekniği moleküler kütlesi 1000 Da az olan moleküller için daha uygundur. Bu teknikte ısıtılmış metal bir flandan elde edilen elektronlar elektriksel alanda hızlandırılarak analiz edilmek istenen tür ile çarpıştırılarak, türe ait iyonların oluşması sağlanır. Bu teknikte büyük kütleli moleküllerin analizi için yetersizdir[68]. Bu iyonlaştırma teknikleri arasında matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma ve elektrosprey iyonlaştırma tekniği protein, polimer, peptit, oligonükleotid, organik bileşikler gibi büyükten küçüğe birçok molekülün analizinde kullanılan iyonlaştırma teknikleri arasında yer almaktadır. Yumuşak iyonlaştırma tekniği küçük moleküllerin yanı sıra büyük moleküllerinde bir bütün halinde analiz edilebilmesine olanak sağlamaktadır.



Yumuşak iyonlaştırma tekniğine sahip matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma kütle spektrometrisi (MALDI-MS) ve elektrosprey iyonlaştırma kütle spektrometrisi (ESI-MS) teknikleri özellikle protein ve peptit çalışmalarında sıklıkla kullanılan kütle spektrometrik teknikler arasında yer almaktadır. MALDI-MS' de analizler iki basamakta gerçekleşmektedir. İlk basamakta örnekler matriks adı verilen organik moleküller ile beraber uygun çözücülerde çözülüp bir plaka üzerine uygulanır. Plaka üzerine uygulandıktan sonra kurutulup kristallendirmenin oluşması beklenir. İkinci aşamada ise plaka üzerinde matriks ile kristallendirilmiş örnek üzerine lazer darbeleri uygulanır. Matriks lazer darbelerinin örneğin parçalanmasını engellemek için lazer enerjilerinin büyük bir kısmını kendisine absorblayarak örneğin bir bütün halinde iyonlaşmasını sağlamaktadır. ESI-MS tekniğinde ise çözücü içerisinde yer alan örnek cihaza enjekte edilir. Cihaz içerisine geçen çözücü içerisinde örnek iğne benzeri elektriksel alana sahip kapiler uçtan cihaz içerisine püskürtülür. Bu püskürtme sonrası çözücü moleküllerinin uzaklaşması için kurutucu gaz gönderilir. Küçük damlacık halini alan örnek molekülleri sahip oldukları yükler sayesinde iterek kolombik patlamalara neden olur. Bu patlamalar sonucu örnek molekülleri farklı yükler ile yüklenir. Farklı yüklenmiş iyonlara sahip örnek molekülleri kütle ayırıcısında ayrılır. ESI-MS tekniği MALDI-MS'e kıyasla zor iyonlaşan türlerin iyonlaşmasını sağlamaktadır.

Kütle spektrometresinde kullanılan kütle ayırıcıları arasında uçuş zamanlı (time of flight, TOF), dört kutuplu (quadropole, Q), iyon tuzağı (ion trap, IT), fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonans ( fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR) ve orbitrap yer almaktadır.

### **2.5.1. İyon Hareketliliği- Kütle Spektrometrisi (IM-MS)**

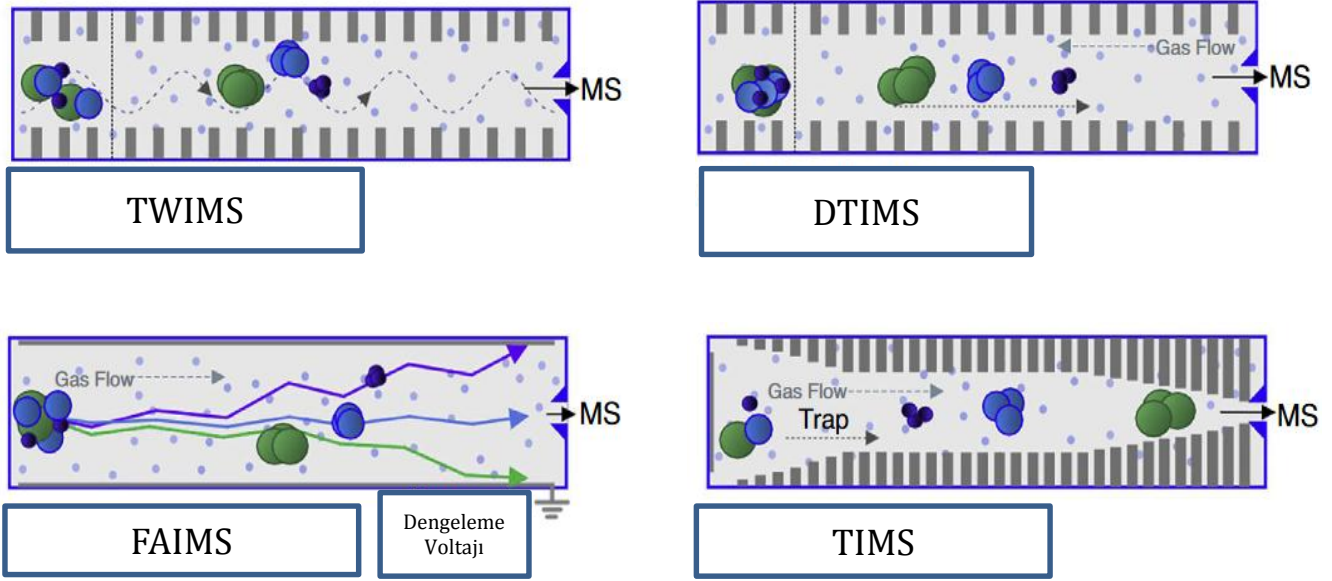
İyon hareketliliği ve kütle spektrometrisinin temelleri benzer teorik çalışmalara dayanmaktadır. 19 yüzyılın sonlarına doğru Rutherford, Thompson ve Townsend gazlardaki iyonlar ile çalışmalarlarıyla X-ışınlarının bir gazdan geçtiğinde iletken duruma geçtiğini gözlemlediler[69][70]. Bu başlangıç gazların iyonları ve iyonların özelliklerinin incelenebilmesi için kullanılabileceğini gösterdi. Bu çalışmaları

takiben Zeleny 1898 yılında iyonlara karşı akan bir gaz akışı temeline dayalı ilk iyon hareketliliği spektrometresini oluşturmuştur[71]. Langevin ise bu çalışmaların teorik temelini atmıştır. Langevin'in teorisine göre iyonlar gazla dolu bir elektrik alanda kendi özelliklerine göre ayrılabilirler[70]. 1930 yıllarında ise Tyndall ise bu alandaki çalışmaları daha ilerletmeye devam etmiştir[72][71]. 1970 yılında ise Karasek ve Cohen tarafından ilk ticari iyon hareketliliği spektrometresi cihazı tanıtılmıştır[74]. Yapılan çalışmaların ilerlemesi ve ticari amaçlı kullanım için üretilmesinden sonra iyon hareketliliği spektrometresi gıda kalite analizi[75], patlayıcı[76], kimyasal silah görüntüleme[77], petrokimya endüstrisi[78], çevre analizi[79], hava kalite analizi[80] ve biyomoleküllerin analizi [81][82] gibi çok geniş bir alanda kullanıldığı birçok çalışmada belirtilmiştir.

İyon hareketliliği spektrometresinde iyonlar elektriksel bir alanda inert bir gaz ile doldurulmuş sürüklenme tüpündeki hareketliliklerine göre ayrımı gerçekleştirmektedir. Sürüklenme tüpündeki inert gazlar Helyum, Azot ve Argon gibi gazlarla doldurulmuş olup, bu inert gazlar gaz fazındaki iyonlar ile etkileşime girmezler. Bu teknik iyonun yüküne, büyüklüğüne ve şekline büyük oranda bağlıdır[70]. Bu sayede iyonların yapısal özellikleri hakkında bilgi elde edilmektedir. Kütle spektrometresi zaman, hız, hassasiyet ve ayırıcılık gibi birçok avantajı sayesinde çok geniş araştırma alanlarında kullanılmaktadır. Kütle spektrometresi sağlamış olduğu birçok avantaja rağmen özellikle aynı kütle/yük oranına sahip farklı yapıların analizlerinde yetersiz kalmaktadır. İyon hareketliliği kütle spektrometresi üzerine yapılan ilk çalışmalar 1950-1960 yılları arasında McDaniel ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda iyonların hareketliliğini ve iyon molekül reaksiyonlarını gözlemlemek için düşük alana sahip sürüklenen hücreler geliştirmişlerdir.[83] Bu iki tekniğin birleştirilmesiyle eş zamanlı bir şekilde hem iyonların kütleleri hakkında bilgi sahibi olunabilmekte hem de yapısal olarak farklı ancak aynı kütle/yük oranına sahip iyonların kesin bir biçimde analiz edilebilmektedir. Bu gelişmeler ışığında iyon hareketliliği ile kombine edilmiş kütle spektrometresi gaz fazındaki iyon analizlerinde çok önemli avantajlar sağlamaktadır. MS analizinden önce iyonların hareketliliklerine bağlı olarak ayrılması özellikle karmaşık ve izomer tür analizlerinde örnek kaybını azaltıp, IM sayesinde analize ekstra boyut katarak kütle spektrometrik tekniklerin

tek başına yapamadığı analizlerde ciddi avantaj sağlamaktadır[84]. Bu sayede örneğin kütesinin yanı sıra boyutsal ayrımında gerçekleştirilmesi son yıllarda bu tekniğe bağlı cihaz türlerinin geliştirilmesinde hızlı ilerlemeler sağlamıştır.

McLean ve arkadaşları iyon hareketliliği kütle spektrometresi tekniklerini çalışma prensiplerine göre üç ana başlık altında ayırmışlardır. Bunlar; konuma göre ayırım, zamana göre ayırım ve iyon tuzaklama/seçilimli bırakma prensibine dayanan tekniklerdir. Konuma göre ayırma prensibinde; farklı sürüklenme yollarını takip eden iyonlar, hareketliliklerindeki farklılıklar sayesinde birbirlerinden ayrılırlar. Bu teknikte kullanılan yöntemler arasında; tekdüze alan hareketlilik analizörleri (uniform – field differential mobility analyzers, DMA), frekans taramalı iyon hareketliliği seçimi yapan çapraz ayarlı iyon hareketlilik spektrometresi (Transverse Modulation Analyzer, TMMIS) ve alan asimetrik iyon hareketliliği spektrometresi (Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry, FAIMS) yer almaktadır. Zaman göre ayırma prensibine bağlı çalışan tekniklerde iyonların aynı yol üzerinde sürüklenmesi sonucu varış noktasına süreleri üzerinden veri elde edilmesine dayanmaktadır. Bu teknikte kullanılan yöntemler arasında; kaydırmalı dalga iyon hareketliliği spektrometresi (Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry, TWIMS), sürüklenme tüpü iyon hareketliliği spektrometresi (Drift Tube Ion Mobility Spectrometry, DTIMS) yer almaktadır. İyon tuzaklamalı/seçilimli bırakma tekniğinde ise iyonlar basınçlı ortamda tuzaklandıktan sonra hareketliliklerine göre seçici olarak dışarı atılarak ayrımı gerçekleştirilmektedir. Bu teknikte iyonlar elektriksel alanlar sayesinde basınçlı ortam koşullarından hareketlilikleri kontrol altına alınarak tutulmuştur [72][85][86][87]. Bu tez çalışmasında iyon hapsetmeli/seçilimli bırakma prensibine göre çalışan tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometresi (Trapped Ion Mobility Spectrometry, TIMS) tekniği kullanılarak çalışmalar yapılmıştır.

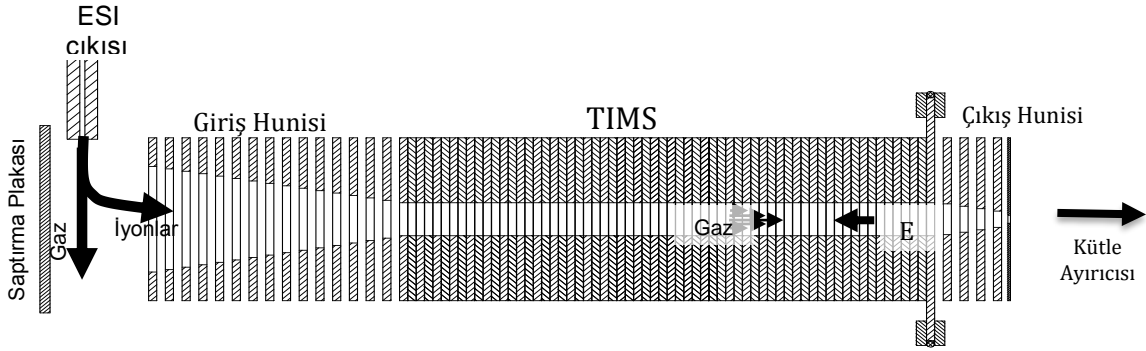


**Şekil 2.10.** İyon Hareketliliği Spektrometresi tekniklerinin çalışma prensiplerinin şematik gösterimi [88].

### 2.5.1.1. Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi

Tuzaklamalı iyon hareketliliği tekniği ilk kez Park ve arkadaşları tarafından 2011 yılında tanıtılmıştır[89][90]. Bu teknikte hareket eden bir gazı karşı iyonları sabit tutmak için elektriksel bir alan kullanılmaktadır. Bu sayede sürüklenme kuvveti elektrik alan yardımıyla karşılanarak iyonların kendi hareketliliklerine göre ayırmalarının gerçekleştirilmesi sağlanmaktadır. Bu şekilde iyonların boyut/yük oranına göre ayırmaları gerçekleştirilmektedir. Bu çalışma prensibi 1898 yılında ilk kez Zeleny tarafından yayınlanan paralel akışlı iyon hareketlilik analizörü çalışmasını[71] izler fakat aralarındaki başlıca fark ise iyonların iletimini ve hassasiyetini garantilemek için dört kutuplu bir alan sınırlamasının uygulanmasıdır[91].

Tuzaklamalı iyon hareketliliği spektrometresi tekniği diğer iyon hareketliliği tekniklerine göre zıt şekilde çalışmaktadır. Tuzaklamalı iyon hareketliliğinde iyonlar hareketli bir gazı karşı elektriksel alan sabit tutulur iken, diğer tekniklerde iyonlar sabit bir gazdan elektriksel alan yardımıyla itilerek hareketliliklerine göre ayırımı gerçekleştirmektedirler.[92][93]



**Şekil 2.11.** TIMS (Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Spektrometresi) çalışma prensibinin şematik gösterimi [94]

TIMS analizörlerinde temel olarak 3 birim yer almaktadır. Bunlar; giriş hunisi, TIMS tüneli ve çıkış hunisi olarak belirtilmiştir. Burada analiz iyonlar tünelde tutulduğu biriktirme ve tutulanların hareketliliklerine göre salındığı elüsyonu içeren iki basamaktan oluşmaktadır[92][93]. Örneklerin atmosferik basınçta elektro spre y iyonlaştırma tarafından üretilen iyonları cam bir kapilerden hareketli gaz ile geçerek saptırma plakasına çarptırılıp giriş hunisine girerler. Buraya giren iyonlar hareketli gazın ittirilmesiyle TIMS analizöründe kendi hareketliliklerine göre elektriksel alanda tuzaklanırlar. Tuzaklanan iyonlar şekillerine göre sıralanı p çıkış hunisinden çıkarak kütle analizörüne doğru ilerlerler.

Tuzaklamalı iyon hareketliliği kütle spektrometrisinde hareketliliklerine göre ayrılan iyonlar öncelikle dört kutuplu ayırıcı ve çarpışma hücresinden geçerek uçuş zamanlı ayırıcıya (TOF) gelir. Burada iyonlar hızlanıp uçuş tüpünden geçerek dedektöre ulaşması için enerji uygulanır. Hareketliliklerine göre ayrımı sağlanan iyonlar kütle/yük oranlarına göre de ayrılır. Ayrılan iyonlar dedektörde oluşturulan sinyaller sayesinde kütle spektrumunu oluşturur[95][96]. TIMS-MS cihazlarında uçuş zamanlı ayırıcı kullanılmasının en önemli sebebi hızıdır. TIMS-MS de bir hareketlilik piki yaklaşık bir milisaniye sürer iken, uçuş zamanlı ayırıcıda ki analiz yaklaşık ikiyüz mikrosaniye sürmektedir. Bu sayede hareketlilik piki

başına birden fazla kütle spektrumu elde edilebilmektedir[97]. Tuzaklamalı iyon hareketliliği kütle spektrometrelerinin diğer iyon hareketliliği spektrometrelerine göre daha yüksek ayırıcılığa sahip olduğu bazı çalışmalarda belirtilmiştir[93][94].

### 2.5.1.2 Etkin Çarpışma Kesiti

İyon hareketliliği spektrometrelerinde, basit indirgemek istediğimizde iyonun bir elektrik alanda gaz yardımıyla sürüklenme tüpünde geçirdiği süre ölçülmektedir. Bu iyonların bu tüp içerisinde geçirdiği süre boyunca oluşturduğu yapının şekil ve boyut anlamında bilgisinin elde edilebilmesi için etkin çarpışma kesiti (collision cross section, CCS) değerlerine bakılmaktadır. Bu değeri elde edebilmek için teorik olarak bazı eşitliklerden yola çıkmak gerekmektedir.

Başlangıçta iyonların sürüklenme tüpünde aldıkları hız,  $V_d$ , iyon hareketlilik sabiti  $K$  ve elektriksel alan,  $E$  ile tanımlanır. Buna göre;

$$v_d = KE. \quad (1)$$

Bu eşitlikte verilen iyon hareketlilik sabiti  $K$  gazın basıncı, bileşimi, sıcaklığı ve polarize edilebilirlik gibi özelliklerinin yanı sıra iyonun şekli, yükü ve boyutu gibi birçok parametreye bağlıdır. Bu eşitlikte  $K$  iyon hareketlilik sabitini daha da basit hale indirgemek için standart basınç  $P_0$  ve standart  $T_0$  koşullarına indirgenen  $K_0$  kullanılabilir. Buna göre;

$$K_0 = K \frac{T_0}{T} \frac{P}{P_0}. \quad (2)$$

İndirgenmiş iyon hareketliliği sabiti  $K_0$  iyon hareketliliği spektrometrelerinde sağladığı bilgiler açısından önemli iken, iyon hareketliliği spektrometresinin kütle spektrometresi ile birleştirildiğinde hem iyonun kütle/yük oranına hem de etkin

çarpışma kesiti ile alakalı bilgiler sağlayabilmektedir. Bu sabit Mason Schamp eşitliğinde direk kullanılabilir. Buna göre;

$$CCS = \frac{3ze}{16N} \frac{1}{K} \sqrt{\frac{2\pi}{\mu k_b T}} \quad (3)$$

Bu eşitlikte iyonun yükü z, elektron yükü e, Boltzmann sabiti  $k_b$ , indirgenmiş kütle ise  $\mu$  ile gösterilmektedir. İyon hareketlilik sabiti K yerine indirgenmiş iyon hareketlilik sabiti  $K_0$  koyulduğunda yoğunluğu temsil eden N eşitlikten çıkartılabilmektedir.

$$CCS = \frac{3ze}{16} \frac{1}{K_0} \sqrt{\frac{2\pi}{\mu k_b T}} \quad (4)$$

Eşitlikte yer alan bütün sabitler hesaplandığında;

$$CCS = 18500 \frac{z}{K_0} \sqrt{T \frac{Mm}{M+m}} \quad (5)$$

Eşitlik son halini almaktadır. Bu eşitlikte yer alan z, T,  $K_0$ , iyonun kütlesi M ve sürükleyici gazın kütlesi m etkin çarpışma kesiti (CCS) değerini hesaplanması için gereklidir. Etkin çarpışma kesiti (collision cross section, CCS) ve indirgenmiş iyon hareketlilik sabiti  $K_0$  iyon ile sürükleyici gaz arasındaki etkileşimin sonucu ortaya çıkmaktadır[97][98].

Tuzaklamalı iyon hareketliliği kütle spektrometrisinde şekil olarak büyük iyonlar hareketli gaz ortamında elektriksel alandan daha az tutuldukları için çıkışa daha yakındır ve bu sayede kütle analizörüne daha erken giderler. Şekil olarak küçük

iyonlar ise elektriksel alanda daha çok tutularak kütle ayırıcısına daha geç giderler. Buna göre analizöre ilk gelen şekil olarak büyük iyonlar daha önce analiz edilmektedirler. Aynı kütle/yük oranına sahip iyonlarda TIMS analizörü içerisinde farklı şekillere sahip olabildikleri için elektriksel alanda tutulmaları şekillerine göre değişmektedir. Bu sayede iyonlar şekillerine göre TIMS analizöründe ayrılarak kütle ayırıcısına gitmektedirler.



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

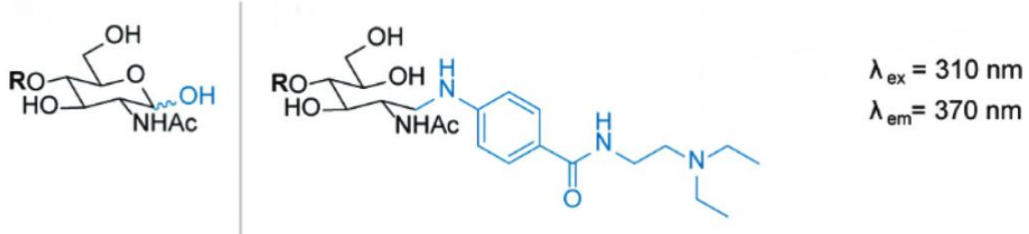
#### 3.1 Kullanılan Kimyasallar

Trastuzumab ve Bevacizumab ilaçları (Roche) firmasından satın alınmıştır. Dimetil sülfoksit (DMSO), sodyum dodesil sülfat, sodyum siyanoborhidrür, trifloroasetik asit (TFA), IgG, asetik asit, Sigma Aldirch (St. Louis, MO USA); asetonitril, amonyum format, formik asit, Carlo Erba Reagents S.A.S (Paris, France); Nonidet P-40 çözültisi, PNGase F enzimi Roche Diagnostics (Mannheim, Germany); Prokainamid hidroklorür ajanı Abcam (Cambridge, United Kingdom) firmasından satın alınmıştır. Bu tez çalışmasında yapılan tüm deneyler Milli-Q deiyonize su sistemi (Mirae St Co. Ltd, Güney Kore) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2 IgG ve Monoklonal Antikor'ların Deglikozilasyon işlemi

İmmünglobulin G ve Monoklonal Antikor'ların deglikozilasyonu için, literatürde açıklanmış yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir[99]. Öncelikle monoklonal antikorlardan 110 µg ve İmmünoglobulin G'den ise 0.5 mg tartılıp, %2 SDS çözültisinden 25 µL eklenerek 60°C 10 dakika bekletilerek denatürasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Çözültüler oda sıcaklığına geldikten sonra bu çözültülere sırasıyla %4 NP-40, 12.5 µL ve 5x PBS çözültisinden 12,5 µL ilave edilmiştir. Bu çözültüler ile iyi karışmaları sağlandıktan sonra 1 U PNGase F enzimi ilave edilerek 37°C'de bir gece inkübasyon edilmiştir. Örnekler analiz edileceği zamana kadar -20°C'de tutulmuştur.

### 3.3 Prokainamid ile N-Glikanların Etiketlenmesi



**Şekil 3.1** Prokainamid ajanı ile etiketlenen glikan gösterimi

N-Glikanların kütle spektrometrik yöntem ile analizleri için yapıları daha kararlı hale getirmek, iyonlaşma verimini arttırmak ve floresans özelliğini kazanmasını sağlamak amacıyla prokainamid ajanı ile etiketleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Etiketleme çözeltisi için, stok olarak 63 mg/mL sodyumsiyonaborhidrür ve 50 mg/mL prokainamid DMSO:CH<sub>3</sub>COOH (70:30 v/v) içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler eşit hacimde karıştırılıp, glikan salınımı gerçekleştirilmiş her bir örneğe 25 µL ilave edilerek thermomixer de 3 saat 65°C'de inkübe edilmiştir.

### 3.4 Etiketlenmiş N-glikanların Saflaştırılması

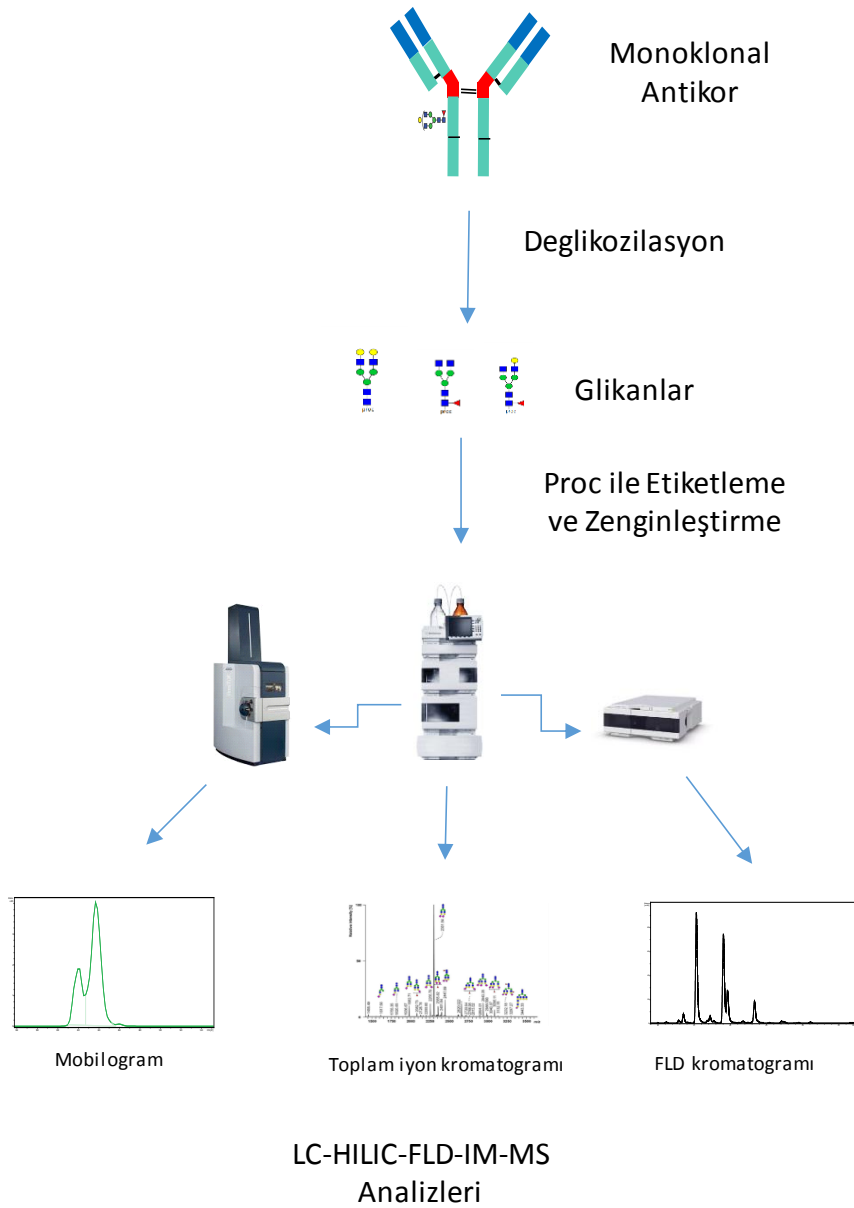
Prokainamid ile etiketlenen tüm örnekleri saflaştırmak için pamuk ile hidrofilik etkileşim sıvı kromatografi tekniği (HILIC) kullanılmıştır. Bu teknikte 100 µL'lik pipet ucunun uç kısmına yaklaşık 0.1 mg pamuk kapiler vasıtasıyla yerleştirildi. Pipetin ucuna yerleştirilmiş pamuk 3 kez deiyonize su ve 3 kez %85 ACN çözeltisi ile yıkandı. Etiketlenmiş N-glikanlar çözeltilerinden 15 µL alınıp üzerine 85 µL ACN ilave edilerek iyice karıştırıldı. Hazırlanmış pipet ucu bu çözeltiden 15 kez geçirilerek etiketlenmiş N-glikanların pamuk ile etkileşime girmesi sağlandı. Pamuk içeren pipet ucu 5 kez %85 ACN içerisinde %0.1 TFA içeren çözeltiden ve %85 ACN çözeltisi ile yıkandı. Elüsyon işlemleri için 25 µL deiyonize su içeren bir tüpte 20 defa çekilip bırakılarak gerçekleştirildi.

### 3.5 LC-HILIC-FLD-IM-MS Analizleri

LC-HILIC-FLD-IM-MS analizleri için Agilent 1260 serisi FLD dedektör içeren bir Agilent 1200 serisi HPLC ile Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi (TIMS-MS, Bruker Daltonics, Germany) cihazının online olarak birbirleriyle bağlanması ile yapılmıştır. N-Glikanların kolonda ayrılmasını sağlamak için Waters Glycan BEH Amide 1.7 µm (2.1 mm ID x 15 cm L) HILIC kolonu kullanılmıştır. Bu analizlerde örneklerin kolonda ayrıldıktan sonra hem kütle spektrometrisine hem de floresans detektöre aynı anda ve aynı zamanda gidebilmesi eşit uzunlukta 2 adet tubing peek adı verilen ince bir boru vasıtasıyla T bağlantısı sağlanıp, eş zamanlı olarak hem kütle hem de floresans sonuçları alınmıştır. Floresans dedektörün emisyon ve uyarma dalga boyları sırasıyla 370 nm ve 310 nm olarak ayarlanmıştır. Safılaştırılma işlemi gerçekleştirilmiş N-Glikanların (25 µL) analize uygun hale getirilmesi için üzerlerine 75 µL asetonitril ilave edilmiş, sonrasında bu çözeltilerden hem kütle spektrometrisine hem de floresans detektöre eşit hacimde (20 µL) enjeksiyon edilmiştir. Akış hızı 0.35 dk/mL olarak ayarlanmıştır. Kolon sıcaklığı 60°C'a ayarlandı. Hareketli faz olarak A ve B sırasıyla 100 mmol/L amonyum formata (pH 4.3 formik asit ile ayarlanmış) ve asetonitril kullanılmıştır. MS şartları; kaynağın sıcaklığı 200°C, nebulizatör gazı 1.0 bar, kapilerin gerilimi 4500 V, kurutma gazı 7 L/dk, kütle spektrumlarının edinimi 1 Hz frekansında 500 ile 1550 m/z arasında seçilip gerçekleştirilmiştir. Glikanların kolonda alıkonmaları için 72 dakikalık asetonitrilin %80-20 oranlar arasında değişen gradyan program olarak kullanıldığı bir program yazılmıştır.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında uygulanan analitik yöntemlerin şematik olarak gösterimi şekil 4.1'de verilmektedir. Kısaca belirtmek gerekirse, öncelikle monoklonal antikorlardan (monoclonal antibody, mAb) N-glikanların elde edilmesi için enzimatik deglikozilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra prokainamid ile glikanlar etiketlenmiştir. Etiketlenen glikanlar saflaştırma işlemi gerçekleştirilerek LC-HILIC-FLD-IM-MS analizlerine hazır hale getirilmiştir.



**Şekil 4.1** Tez çalışmasında uygulanan analitik yöntemlerin şematik gösterimi

Bu tez çalışmasında, insan serumundan elde edilen immunoglobulin G (IgG), mAb temelli ilaç olarak kullanılmakta olan trastuzumab ve bevacizumab türleri analiz edilmiştir. Örnekler analize hazır duruma getirildikten sonra, eş zamanlı bir biçimde hem floresans dedektörü (FLD) hem de kütle spektrometrik analizleri ile birlikte iyon hareketliliği analizlerinin gerçekleştirilmesini mümkün kılan "T bağlantılı" akış sistemi kurulmuştur. Bu sayede, glikanların hem kütle/yük oranları (m/z) ve iyon hareketlilik değerleri tespit edilmiş, floresans dedektör sayesinde de glikanların miktarları ile ilgili verileri elde edilebilmiştir. Bu analizler öncesinde cihazın m/z ve iyon hareketlilik kalibrasyonları Agilent firmasına ait Tune mix çözeltisi [100] kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen glikanlara ait toplam iyon, floresans kromatogramları ve iyon hareketlilik mobilogramları, analizler sonrasında Bruker firmasına ait DataAnalysis programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu sayede, farklı mAb türlerinden elde edilen glikanların m/z değerleri, miktarları ve etkin çarpışma kesitleri (collision cross section, CCS) tek bir analiz setinde belirlenerek incelenebilmiştir.

Çalışmada yapılan MS ve FLD analizleri sonucunda farklı mAb türleri için tespit edilen N-glikanların yapıları, yük ve teorik kütle değerleri Çizelge 4.1'de verilmektedir. Bu tablodaki veriler incelendiğinde, analizler sonucunda insan immunoglobulin G ve trastuzumab türlerinin N-glikan formlarının büyük oranda benzer oldukları, bevacizumab yapısında ise daha az sayıda N-glikan türünün bulunduğu görülmektedir.

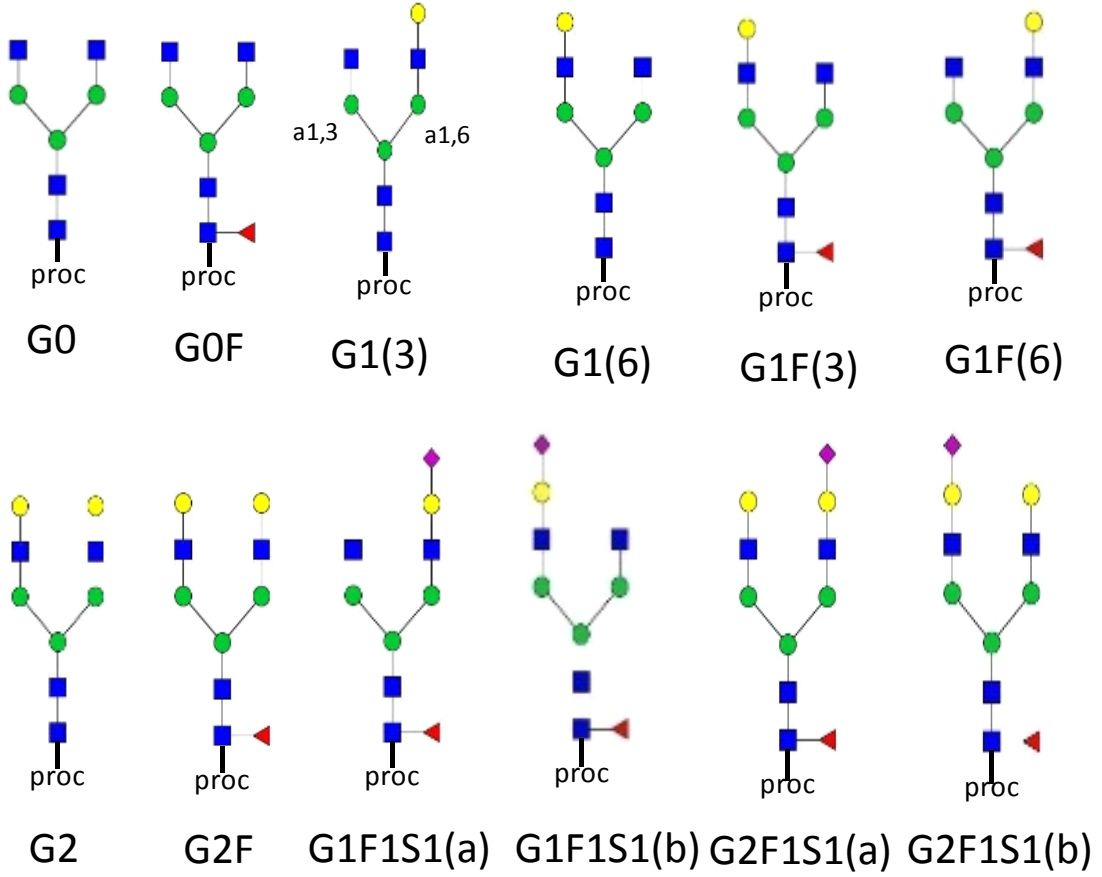
**Çizelge 4.1.** İmmunoglobulin G, trastuzumab ve bevacizumab örneklerinin tez çalışması kapsamında yapılan analizleri sonucunda tespit edilen N-glikan türleri. (+/var, -/yok)

Sıra	Glikan Yapısı	Z (yük)	m/z	İmmunoglobulin G	Trastuzumab	Bevacizumab
1	Hex3HexNAc3dHex1-proc	2	740,3258	-	+	+
2	Hex3HexNAc4-proc	2	768,8365	+	+	+
3	Hex3HexNAc4dHex1-proc	2	841,8655	+	+	+
4	Hex4HexNAc3dHex1-proc	2	821,3522	-	+	-
5	Hex3HexNAc5dHex1-proc (a)	2	943,4052	+	-	-
6	Hex4HexNAc4-proc	2	849,8637	+	+	+
7	Hex4HexNac5-proc	2	951,4026	+	-	-
8	Hex4HexNAc4dHex1-proc (a)	2	922,8919	+	+	+

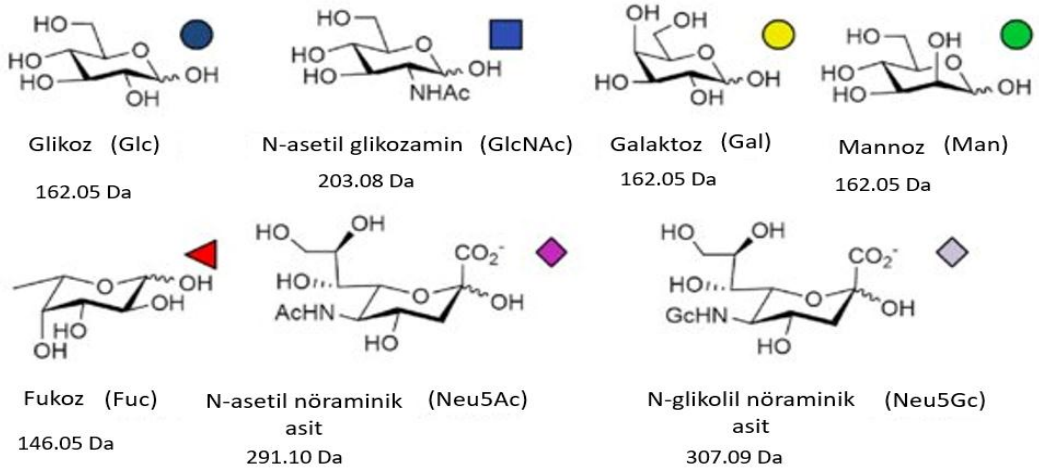
9	Hex4HexNAc4dHe x1-proc (b)	2	922,8919	+	+	+
10	Hex4HexNAc3Neu Ac1dHex1-proc	2	966,8999	-	+	-
11	Hex4HexNAc5dHe x1-proc	2	1024,432 4	+	+	-
12	Hex5HexNAc4-proc	2	930,8894	+	+	-
13	Hex5HexNAc4dHe x1-proc	2	1003,918 3	+	+	+
14	Hex5HexNAc5dHe x1-proc (a)	2	1105,458 8	+	-	-
15	Hex4HexNAc4Neu Ac1dHex1-proc (a)	2	1068,439 6	+	+	-
16	Hex5HexNAc4Neu Ac1-proc	2	1076,437 8	+	-	-
17	Hex5HexNAc4Neu Ac1dHex1-proc	2	1149,466	+	+	-
18	Hex5HexNAc5Neu Ac1dHex1-proc (a)	2	1251,006 5	+	-	-
19	Hex5HexNAc4Neu Ac2-proc (a)	3	814,9969	+	-	-

20	Hex5HexNAc4Neu Ac2-proc (a)	2	1221,985	+	-	-
21	Hex5HexNAc4Neu Ac2dHex1-proc (a)	3	863,6842	+	+	-
22	Hex5HexNAc4Neu Ac2dHex1-proc	2	1295,013 7	+	+	-
23	Hex5HexNAc5Neu Ac2dHex1-proc (a)	3	931,3719	+	-	-
24	Hex5HexNAc5Neu Ac2dHex1-proc (a)	2	1396,555 3	+	-	-

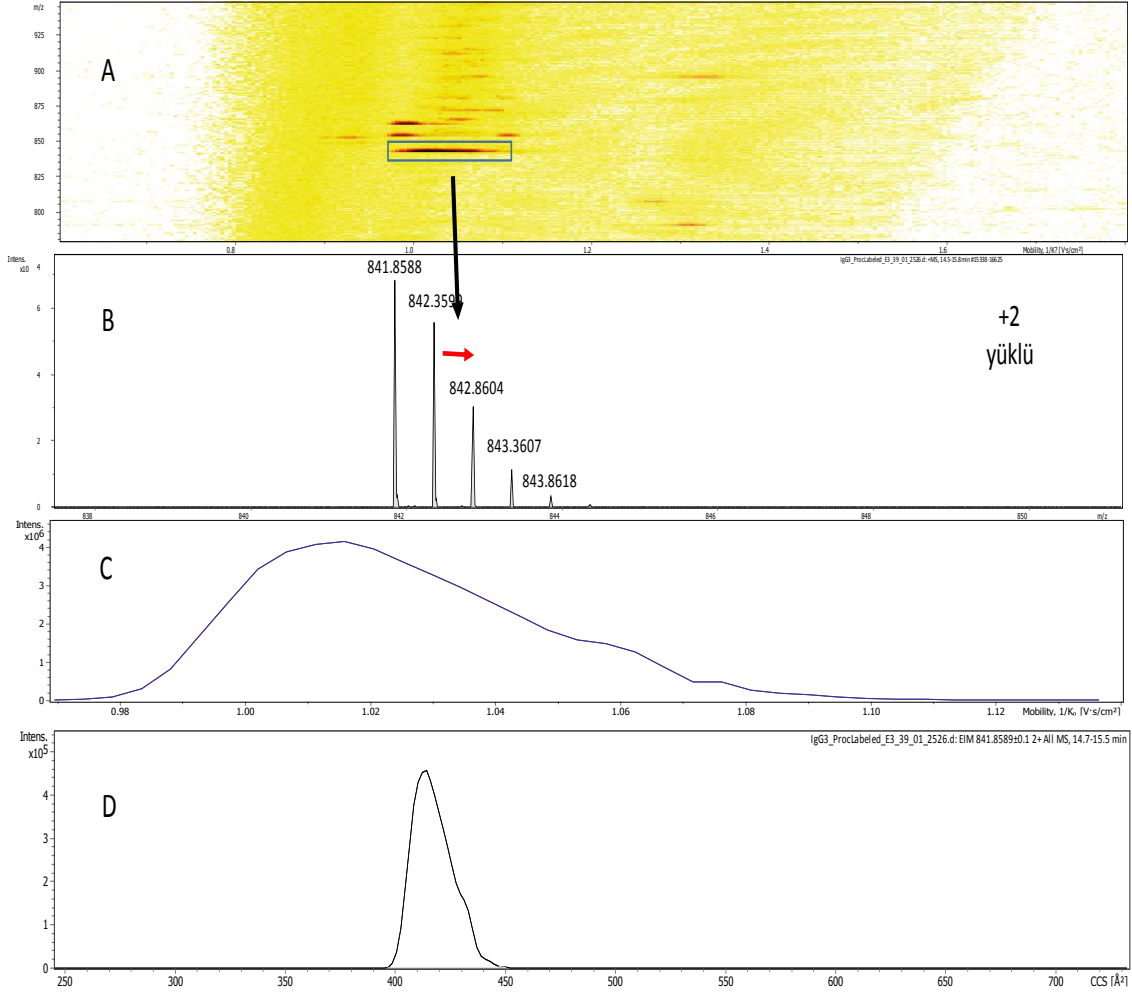




**Şekil 4.2** Tez Çalışmasında İncelenen N-glikan Formları



**Şekil 4.3** N-glikanları oluşturan monosakkarit birimlerinin şekilsel gösterimi

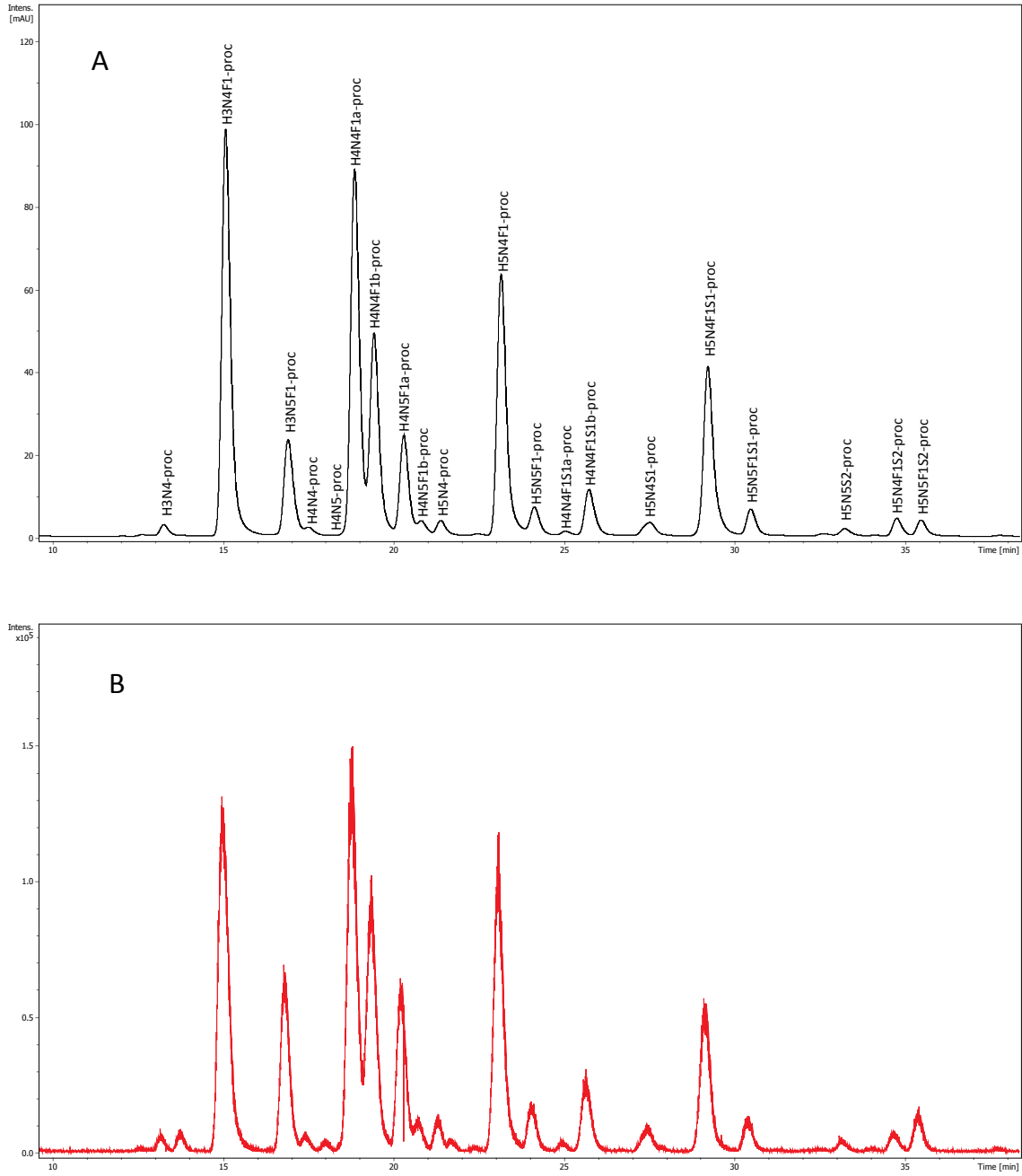


**Şekil 4.4** IgG Proteininden Elde Edilen H3N4F1 N-Glikan Formunun A) Isı Haritası, B) Kütle Spektrumu, C) İyon Hareketlilik Spektrumu, D) Etkin Çarpışma Kesiti'nin şekilsel gösterimi.

IgG proteininden elde edilen glikan formlarından H3N4F1 N-glikan formunun ısı haritası (Heat Map) üzerinden tek başına aldığımızda glikanın iyonunun +2 yük değerine sahip olduğu (Şekil 4.4) görülmüştür. Bu glikan formunun hareketliliği ( $1/K_0$ ) incelendiğinde ise 1.016 gibi değerine elde edilmiştir. Bu hareketlilik değerinden yola çıkılarak etkin çarpışma kesiti (CCS) değeri  $413.6 \text{ \AA}^2$  elde edilmiştir.

#### **4.1 İnsan İmmunoglobulin G proteininden elde edilen N-glikanların analizleri**

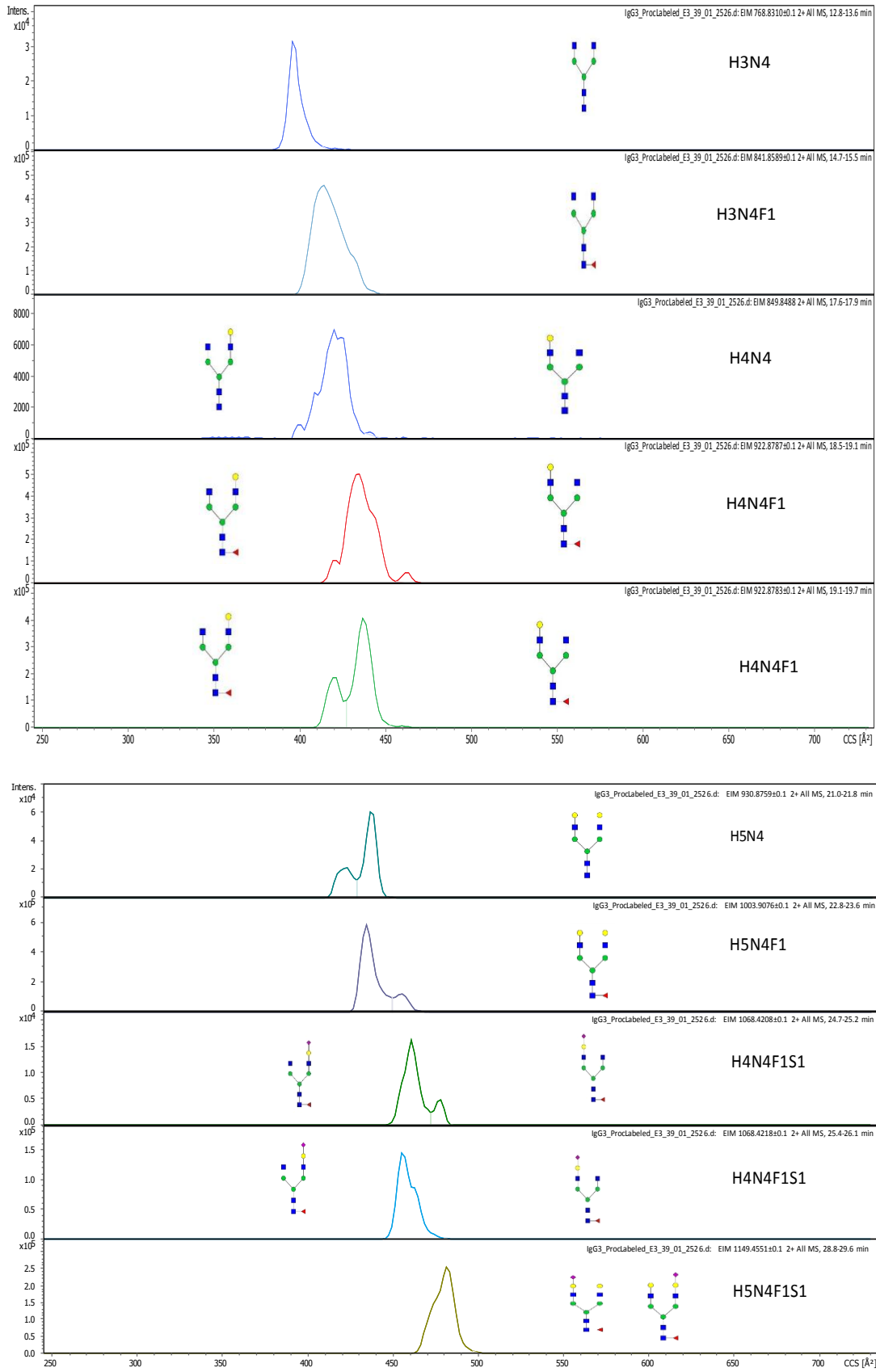
Tez çalışmalarının başlangıcında insan serumundan IgG proteininden N-glikanların elde edilmesi için deglikozilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen N-glikanlar, prokainamid etiketiyle etiketlenmiş sonrasında ise pamuk doldurulmuş pipet uçları ile saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalar sonrasında analize hazır hale getirilmiş olan insan IgG proteininden elde edilmiş N-glikanlar HILIC-FLD-IM-MS sistemi ile analiz edilmiştir. Şekil 4.3 de analizler sonucu elde edilen floresans (FLD) ve temel pik kromatogramları görülmektedir.



**Şekil 4.5** IgG proteinine ait A) Floresans ve B) Temel Pik kromatogramları

Üç farklı tüp içerisinde aynı miktarda hazırlanmış olan insan IgG proteininden elde edilen N-glikan örnekleri, HILIC-FLD-IM-MS sistemi ile 3 tekrarlı olacak şekilde analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda elde edilen veriler değerlendirilerek insan IgG proteininin yapısındaki 18 adet N-glikan yapısı tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Hex5HexNAc4NeuAc2, Hex5HexNAc4NeuAcHex1 ve Hex5HexNAc5NeuAc2 yapılarındaki N-glikanların MS düzeyinde gerçekleştirilen

analizlerinde hem +2 hem de +3 yüklü iyon formları gözlenmiştir. Bunların yanı sıra, diğer proteinlerde görülmeyen Hex3HexNAc5dHex1, Hex4HexNAc5, Hex5HexNAc5dHex1, Hex5HexNAc4NeuAc1, Hex5HexNAc5NeuAc1dHex1, Hex5HexNAc4NeuAc2 ve Hex5HexNAc5NeuAc2dHex1 N-glikan formları da insan IgG proteininin analizlerinde gözlenmiştir. Analizler sonucu elde edilen kütle spektrumları floresans kromatogramlarındaki alıkonma süreleri ile uyumlulukları dikkate alınarak doğrulanmıştır.



**Şekil 4.6** İnsan IgG proteininden elde edilen N-glikanların yapıları ve etkin çarpışma kesiti grafikleri

İyon hareketliliği kütle spektrometrisi sistemi ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarda x eksenini genellikle iyonun bulunma bolluğu (intensity), y eksenini ise hareketlilik tüneline ilerleyen iyonların sistemin çalışma prensibine dayalı olarak hesaplanan etkin çarpışma kesiti (CCS, Å<sup>2</sup>) değerlerini göstermektedir. Etkin çarpışma kesiti (CCS) değeri, Mason-Champ eşitliğinde yer alan sabitlerin ve iyona bağlı olarak değişen parametrelere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

İyon hareketliliği analizinde elde edilen veriler değerlendirilerek bütün N-glikan formlarının etkin çarpışma kesitleri yazılım vasıtasıyla hesaplanmıştır. H3N4, H3N4F1, H4N4, H4N4F1(a), H4N4F1(b), H5N4, H5N4F1, H4N4F1S1 ve H4N4F1S2 şeklinde tanımlanan N-glikan formları, yapılarında fukoz, galaktoz ve siyalik asit birimlerinin bulunmasına bağlı olarak benzerlik gösterebilmektedir. Yapılarında bulunan şeker birimlerinin bu N-glikanların sahip oldukları etkin çarpışma kesiti (CCS) değerlerine etkilerinin izlenebildiği, HILIC-FLD-IM-MS analizlerinde elde edilen mobilogramları Şekil 4.4'de verilmektedir. Yukarıda belirtilen N-glikanların mobilogramlarındaki sinyallerin tepe noktalarına göre belirlenen CCS, m/z ve alıkonma zamanı değerleri detaylı bir şekilde çizelge 4.2 de verilmiştir.

Bu verilere göre, H3N4, H3N4F1 ve H4N4 yapılarındaki N-glikan formlarının her biri için birer mobilogram dağılımının gözlemlendiği görülmektedir (Şekil 4.4.) Bu durum, bu glikan yapılarının izomer oluşturma olasılıklarının düşük olduğunu göstermektedir. Öte yandan, H4N4F1 yapısındaki glikan formunda uçtaki galaktozun bağlanma farklılığından kaynaklı olarak izomerik oluşum olasılığının artması sonucunda tek bir glikan yapısı için iki farklı mobilogramın elde edildiği görülmüştür. H4N4F1 N-glikanının daha düşük alıkonma zamanında elde edilen mobilogramına bakıldığında CCS ekseninde tek tepe noktasına sahip bir sinyal gözükmemektedir. Diğer mobilogramda ise 2 farklı izomerin ayrımı net bir şekilde görülmektedir. İyon hareketliliği analizlerinden elde edilen CCS değerleri için yapısal olarak daha sıkı (compact) konformasyona sahip iyonların daha düşük CCS değerlerine sahip oldukları, yapısal olarak daha geniş (extended) konformasyona sahip iyonların ise daha yüksek CCS değerlerine sahip oldukları ifade edilmektedir. H4N4F1 N-glikanı için elde edilen mobilogram, birbirlerine göre daha sıkı ve geniş konformasyonlara sahip iki farklı izomerin varlığını ve

ayrımını net bir şekilde göstermektedir. Literatürde kaydırmalı dalga iyon hareketliliği spektrometrisi (Travelling Wave IMS, TWIMS) tekniği ile yapılan çalışmaların birinde H4N4F1 glikanına en son bağlanan şeker birimi olan galaktozun a-1,3 ve a-1,6 şeklinde bağlanma özelliğine göre aralarındaki konformasyonel farklılıklar incelenmiş ve buna göre yapılan yorumlamalar teorik çalışmalar ile desteklenmiştir. Bu çalışmada özellikle, H4N4F1 glikan yapısındaki en uç galaktoz biriminin N-asetil glikozamine a-1,3 veya a-1,6 olarak isimlendirilen H-bağı ile bağlanma biçimine göre konformasyonel özelliklerinde meydana gelen değişime yönelik yorumlamalar yapılmıştır[101][102]. Buna göre, glikan yapısının uç kısmında bulunan galaktoz a-1,3 bağlanması olacak şekilde bağlanır ise yapı daha küçük ve kompakt bir hale gelmektedir. Söz konusu galaktoz birimi, glikan yapısına a-1,6 bağlanması gerçekleştirir ise, yapı daha büyük ve uzun bir çubuk benzeri bir hal almaktadır[102]. Bu çalışmalardan elde edilen veriler ile tez kapsamında elde edilen veriler kıyaslandığında, H4N4F1 glikanının HILIC kolonda ayırmada farklı alıkonma zamanlarında belirlenen türlerinin birincisine (18.5-19.1 dk.) ait mobilogramın daha yüksek CCS değerine sahip olan, a-1,6 bağlanması gerçekleştirmiş izomere karşılık geldiği düşünülmektedir (Şekil 4.4). Aynı yapının HILIC kolonda daha yüksek alıkonma zamanında (19.1-19.7 dk.) gelen a-1,3 bağlanmasına sahip izomeri için elde edilen mobilogramda daha düşük CCS değeri gözlenmiştir. Bu glikan yapısı ile ilgili olarak literatürde mevcut olan bilgilerin tez kapsamında yapılan analizlerden elde edilen verilerle oldukça uyumlu olduğu görülmektedir[101].

H4N4F1S1 N-glikanı için ise N-asetil nöraminik asitin (NeuAc) galaktoz birimine a-2,3 ve a-2,6 bağlanmasına göre farklı konformasyonel özellikler oluşmaktadır. Farklı glikopeptitlerden elde edilen H2S1, H1N1S1 parçalanma ürünleri üzerinden yapılan siyalik asit bağlanma çalışmalarında a-2,6 şeklinde bağlanan siyalik asidin a-2,3 e göre daha az kararsız bir yapıya sahip olduğu ve iyon hareketlilik çalışmalarında daha önce gelen izomer olduğu belirtilmiştir[103][104][105]. Bu tez kapsamında yapılan analizlerden elde edilen veriler değerlendirildiğinde, HILIC kolon içerisinde farklı alıkonma zamanlarında geçen H4N4F1S1 N-glikan formlarının mobilogramlarının da farklı dağılımlara sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.4.). H4N4F1 N-glikanında belirtilen iki farklı izomer yapısının bu glikana bir siyalik asit ilavesi ile oluşan H4N4F1S1 N-



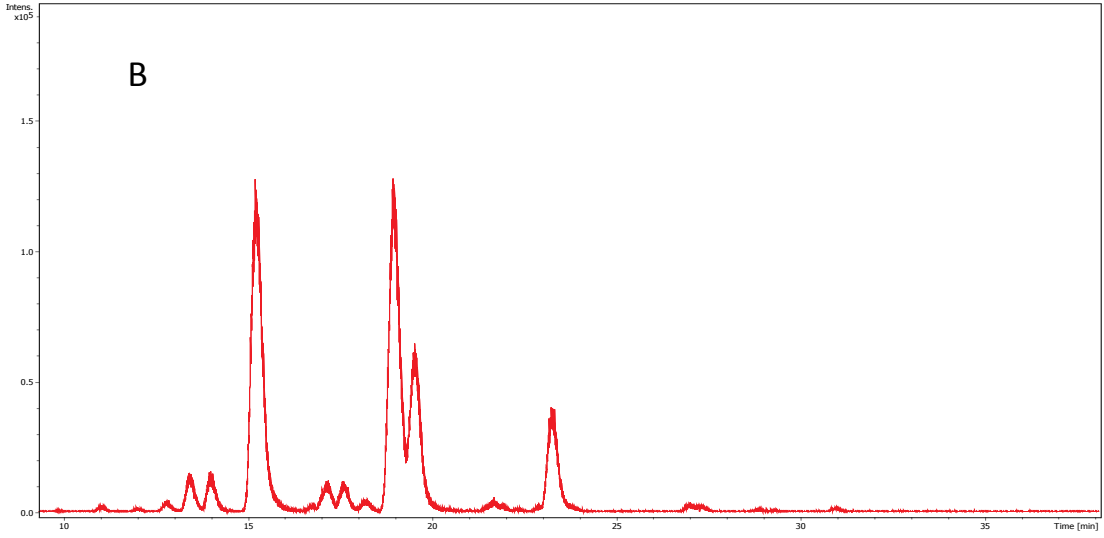
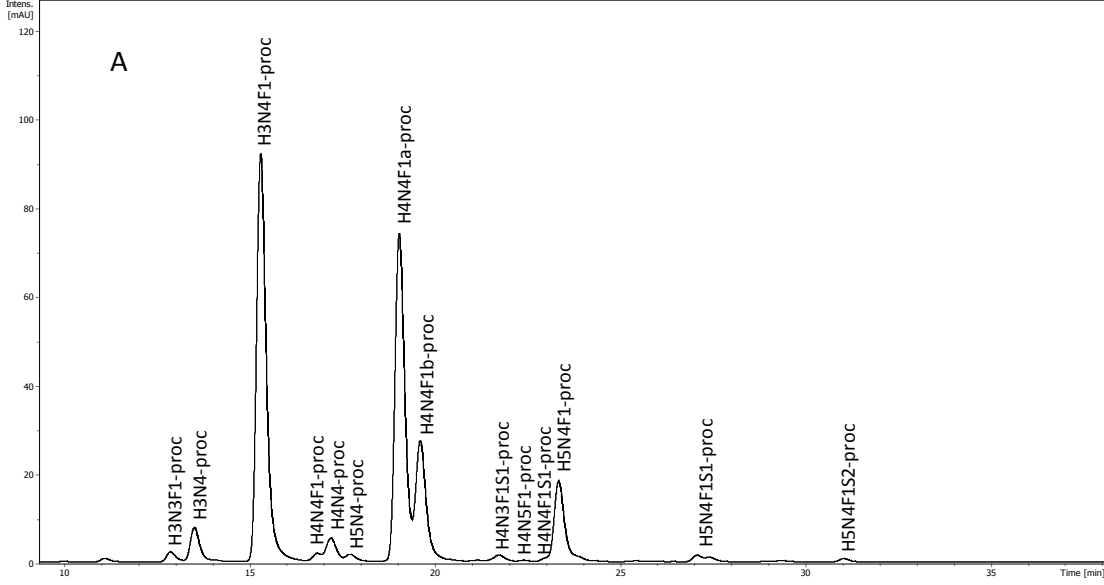
glikanında da gözlenmektedir (Şekil 4.4). Burada siyalik asidin galoktoz birimine farklı bölgelerden bağlanması durumu düşünüldüğünde (a-2,3 ve a-2,6) beklenen izomer yapısının 4 olmaktadır. Fakat literatürde gerçekleştirilen çalışmalarda bütün halde N-glikana odaklanılarak bu ayırım iyon hareketliliği kütle spektrometresinde gerçekleştirilememiştir[103][105]. Burada CID ile elde edilen özgün parçalanma ürünü olan H1N1S1 iyon hareketliliğinde takip edilerek glikan yapısındaki siyalik asidin galaktoza bağlanma bölgesi belirlenmiştir. Kullandığımız sistemde CID sonrası bir iyon hareketliliği tespiti mümkün olmadığı için bu izomer yapısı belirlenememiştir. İlerleyen çalışmalarda kaynak içi parçalanma ürünleri iyon hareketliliği kütle spektrometresinde takip edilerek bu ayarımın yapılması hedeflenmektedir. HILIC kolon içerisinde daha düşük alıkonma zamanında geçen glikan formunun farklı izomer varlığını gösteren bir mobilogram dağılımına sahip olduğu gözlenmiştir. Bu izomer yapılarının, H4N4F1S1 N-glikanının a-2,3 ve a-2,6 bağlanmalarına sahip olan formlarına karşılık geldiği düşünülmektedir. Daha geç alıkonma zamanına sahip glikoformun tek bir izomere ait mobilogramının bu glikoformun daha düşük CCS değerine sahip olan a-2,6 bağlanmalarına sahip olan izomere karşılık geldiği ifade edilebilir. Bu sonuç H4N4F1S1 N-glikanı için literatürde var olan iyon hareketliliği analiz verileri ile uyumludur. Gözlenen diğer glikanlardan daha büyük olan H5N4F1S1 N-glikan formu için ise herhangi bir izomer oluşumu gözlenmezken, yapının büyüklüğüne bağlı olarak daha büyük CCS değerlerinde geniş bir dağılıma sahip mobilogram elde edilmiştir.

**Çizelge 4.2** İnsan IgG proteininden elde edilen N-glikanların yük, m/z, alıkonma zamanı ve etkin çarpışma kesiti değerleri

Glikan Yapısı	Yük	m/z	Alıkonma Zamanı (RT, dk.)	Etkin Çarpışma Kesiti (CCS, Å <sup>2</sup> )	Standart Sapma (s)
H3N4 (G0)	2	768,8310	13,2	397,3	0,9
H3N4F1 (G0F)	2	841,8589	15,0	412,2	1,0
H4N4 (G1)	2	849,8621	17,9	421,6	0,4
H4N4F1 (G1F(6))	2	922,8787	18,9	432,9	0,8
H4N4F1 (G1F(3))	2	922,8783	19,4	420,5	0,4
H4N4F1 (G1F(6))	2	922,8783	19,4	436,9	0,3
H5N4 (G2) (a)	2	930,8759	21,3	422,1	0,4
H5N4 (G2) (b)	2	930,8759	21,3	437,5	0,1
H5N4F1 (G2F) (a)	2	1003,9076	23,1	434,6	0,1
H5N4F1 (G2F) (b)	2	1003,9076	23,1	453,7	0,9
H4N4F1S1 (a) (G1F1S1 (a))	2	1068,4208	24,9	460,7	0,3
H4N4F1S1 (b) (G1F1S1 (b))	2	1068,4208	24,9	476,9	0,9
H4N4F1S1 (c) (G1F1S1 (c))	2	1068,4208	25,7	455,7	0,2
H5N4F1S1	2	1149,4551	29,1	480,5	1,1

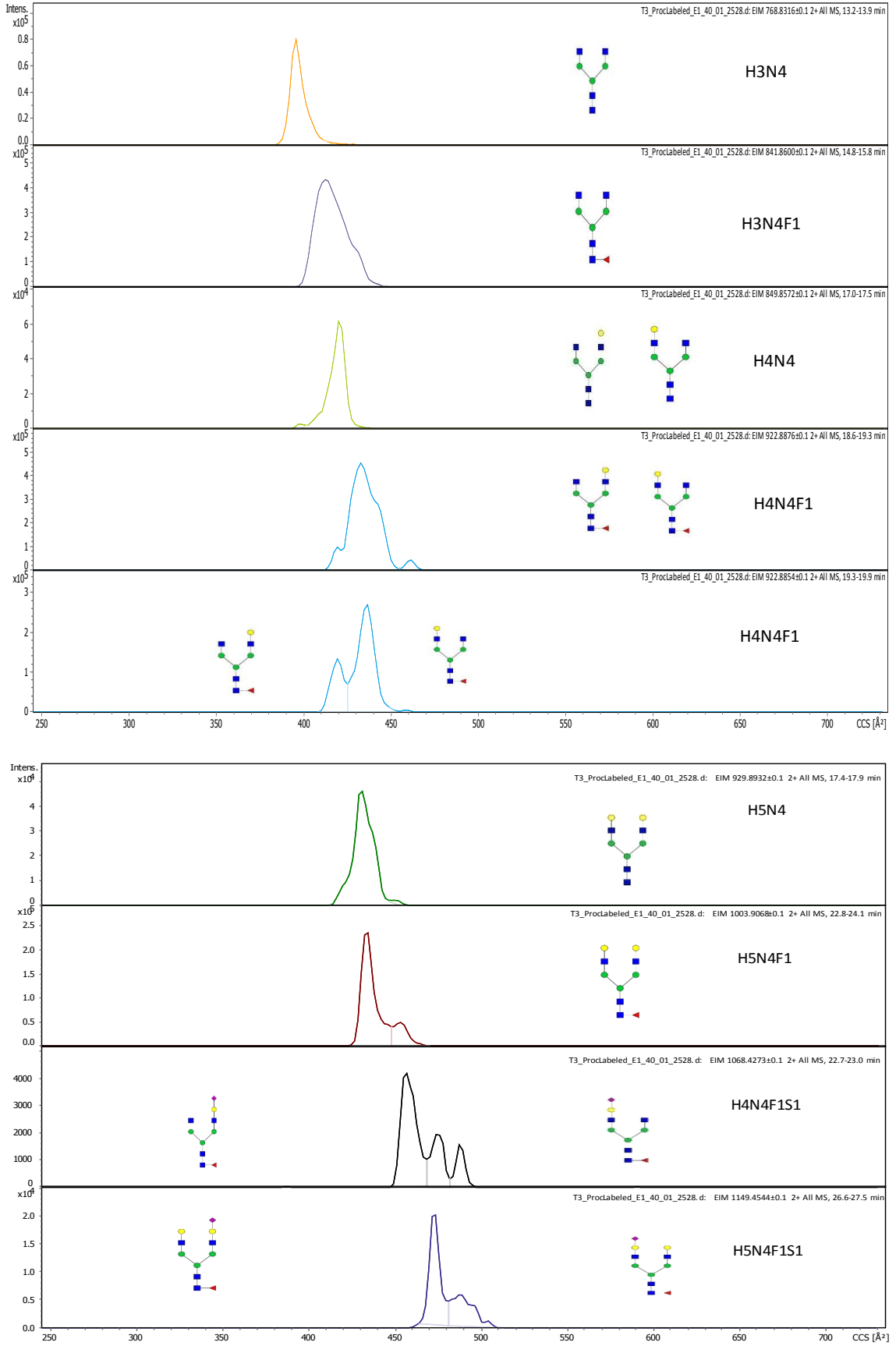
## 4.2 Trastuzumab örneğinden elde edilen N-glikanların analizleri

Çalışmalar sırasında on farklı üretim prosesinden elde edilmiş trastuzumab örnekleri kullanılmıştır. Kullanılan trastuzumab örneklerinin derişimlerinin standart olarak 22.0 µg/µL olduğu bilinmektedir. Bu standartlardan yaklaşık 100 µg olacak şekilde ayrı tüplere alınıp deglikozilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Deglikozilasyon işlemi sonrasında elde edilen N-glikanlar prokainamid etiket ajanı ile etiketlenmiştir. Pamuk doldurulmuş pipet uçları kullanılarak N-glikanların zenginleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonrasında trastuzumab dan elde edilen N-glikanlar HILIC-FLD-IM-MS sistemi ile analiz edilmiştir. Şekil 4.5 de analizler sonucu elde edilen floresans (FLD) ve temel pik kromatogramları görölmektedir.



**Şekil 4.7** Trastuzumaba ait A) Floresans ve B) Temel Pik kromatogramları

Bazı N-glikan formları, insan immunoglobulin g proteininde tespit edilmemesine rağmen trastuzumab örneklerinde tespit edilmiştir. Tez kapsamında on farklı trastuzumab örneği, her birinden üç tekrar olacak şekilde analiz edilmiştir. Analiz verileri değerlendirildiğinde trastuzumab için 15 adet N-glikan yapısı MS düzeyinde tespit edilmiştir. H3N4F1, H4N3F1, H4N3F1S1 N-glikan formları sadece trastuzumab örneklerinin analizlerinde görülmüştür. Bu analizlerde ayrıca H5N4F1S2 glikan formunun +2 ve +3 yüklü formlarıda görülmüştür. MS spektrumları floresans kromatogramlarındaki alıkonma süreleri dikkate alınarak doğrulanmıştır.



**Şekil 4.8** Trastuzumab örneğinden elde edilen N-glikanların yapıları ve etkin çarpışma kesiti grafikleri

İyon hareketliliği tekniği kullanılarak yapılan analizler sonucunda trastuzumab örneğinden elde edilen N-glikanların da mobilogram verileri elde edilmiş ve CCS değerleri yazılım vasıtasıyla hesaplanmıştır. H3N4, H3N4F1, H4N4, H4N4F1, H5N4, H5N4F1, H4N4F1S1, H5N4F1S1 N-glikan formları arasında fukoz, siyalik asit, galaktoz birimlerinin varlığına bağlı olarak yapısal farklılıklar veya benzerlikler bulunabilmektedir. Bu N-glikanların mobilogramları şekil 4.6'de verilmektedir. H3N4, H3N4F1, H4N4 N-glikan formlarına ait mobilogramlar dikkate alındığında bu glikanlar için konformasyonel farklılığa bağlı izomer varlığı gözlenmemektedir. Trastuzumabdan elde edilen H4N4F1 N-glikan formu için ise, insan immünooglobulin g proteininin analizinde olduğu gibi HILIC kolonda iki farklı alıkonma zamanına sahip türlere ait farklı mobilogram elde edilmiştir (Şekil 4.6). Bu türlerden HILIC kolonda daha kısa alıkonma zamanına (18.6-19.3 dk.) sahip tür için tek, uzun alıkonma zamanına sahip olanı (19.3-19.9 dk.) için ise iki farklı konformerin varlığını gösteren dağılıma sahip mobilogram elde edilmiştir. İnsan immünooglobulin G proteininde olduğu gibi, H4N4F1 N-glikanında galaktozun en uçta N-asetil glikozamine a-1,3 ve a-1,6 şeklinde bağlandığı bilinmektedir[101][102]. Buna göre, trastuzumabın H4N4F1 N-glikan formuna ait izomerlerin de (a-1,3 ve a-1,6) HILIC kolonda ve iyon hareketliliğinde insan IgG proteininde olduğu gibi benzer şekilde tanımlanabildiği görülmektedir. Söz konusu glikanın daha düşük CCS değerine sahip olan a-1,3 izomeri, HILIC kolonda daha uzun alıkonma zamanına sahip paket içerisinde yer alırken, a-1,6 izomerinin her iki paket içerisinde yer aldığı gözlenmiştir. Trastuzumab örneğinde insan immünooglobulin G'den farklı olarak H4N4F1S1 glikan formu içinde tek bir mobilogramda 3 adet izomerin varlığı gözlenmektedir (Şekil 4.6). Bu izomer yapılarının, H4N4F1S1 N-glikanının a-2,3 ve a-2,6 bağlanmalarına bağlı olarak dinamik yapıda meydana gelebilecek konformasyonel değişimler sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. Diğer glikanlara kıyasla daha büyük bir yapıya sahip olan H5N4F1S1 N-glikan formunun mobilogramı, insan immünooglobulin G proteininde olduğu trastuzumab örneği için de gibi geniş bir CCS dağılımında elde edilmiştir (Şekil 4.6). Ancak trastuzumabın söz konusu N-glikanı için elde edilen mobilogramda farklı olarak, düşük CCS değerine sahip konformerlere karşılık gelen bölgede keskin bir pik gözlenirken dağılımın yüksek CCS değerine sahip

konformere karşılık gelen bölümünün düşük sinyal şiddetine sahip olduğu görölmektedir. Tez kapsamında alınan bu verilere göre, H4N4F1S1 ve H5N4F1S1 gibi büyük N-glikanların insan IgG proteini ve trastuzumab gibi mAb türleri için değişken yapısal olasılıklarının artmasına bağlı olarak farklı konformasyonlara sahip olabildikleri gözlenmiştir.

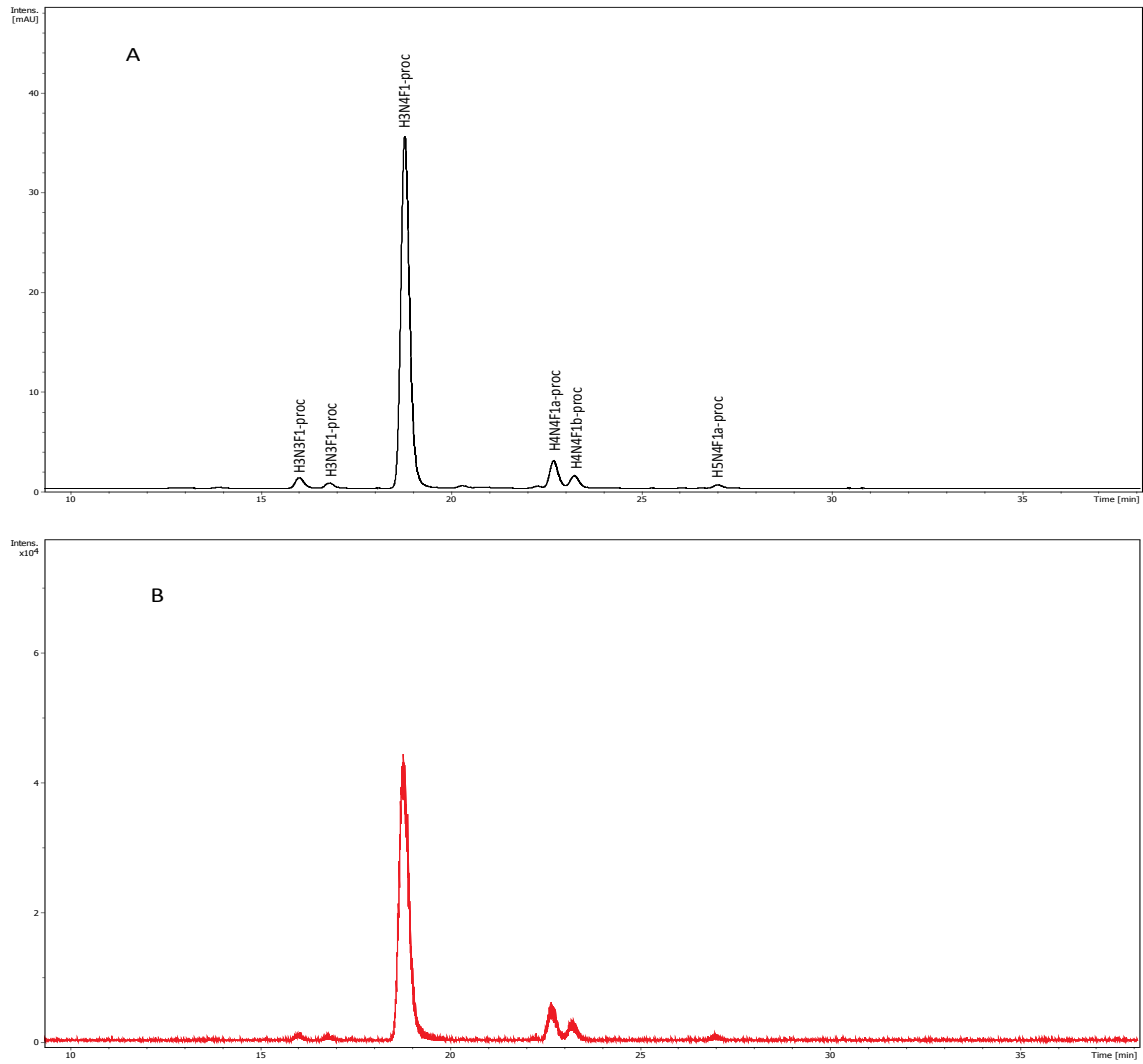
**Çizelge 4.3** Trastuzumab'dan elde edilen N-glikanların yük, m/z, alıkonma zamanları ve etkin çarpışma kesiti değerleri

Glikan Yapısı	Yük	m/z	Alıkonma Zamanı (RT, dk.)	Etkin Çarpışma Kesiti (CCS, Å <sup>2</sup> )	Standart Sapma (s)
H3N4 (G0)	2	768,8316	13,4	396,1	0,4
H3N4F1 (G0F)	2	841,8600	15,2	412,6	0,6
H4N4 (G1)	2	849,8572	17,2	420,4	0,7
H4N4F1 (G1F(6))	2	922,8876	19,0	431,1	0,9
H4N4F1 (G1F(3))	2	922,8854	19,6	419,4	0,5
H4N4F1 (G1F(6))	2	922,8854	19,6	435,9	0,7
H5N4 (G2) (a)	2	929,8932	17,6	431,1	0,1
H5N4F1 (G2F) (a)	2	1003,9068	23,3	433,5	0,6
H5N4F1 (G2F) (b)	2	1003,9068	23,3	452,3	0,8
H4N4F1S1 (G1F1S1)	2	1068,4273	24,9	456,7	0,7
H4N4F1S1 (G1F1S1)	2	1068,4273	24,9	474,9	0,7
H4N4F1S1 (G1F1S1)	2	1068,4273	24,9	488,0	0,6
H5N4F1S1	2	1149,4551	29,1	472,8	0,6
H5N4F1S1	2	1149,4551	29,1	488,1	0,7



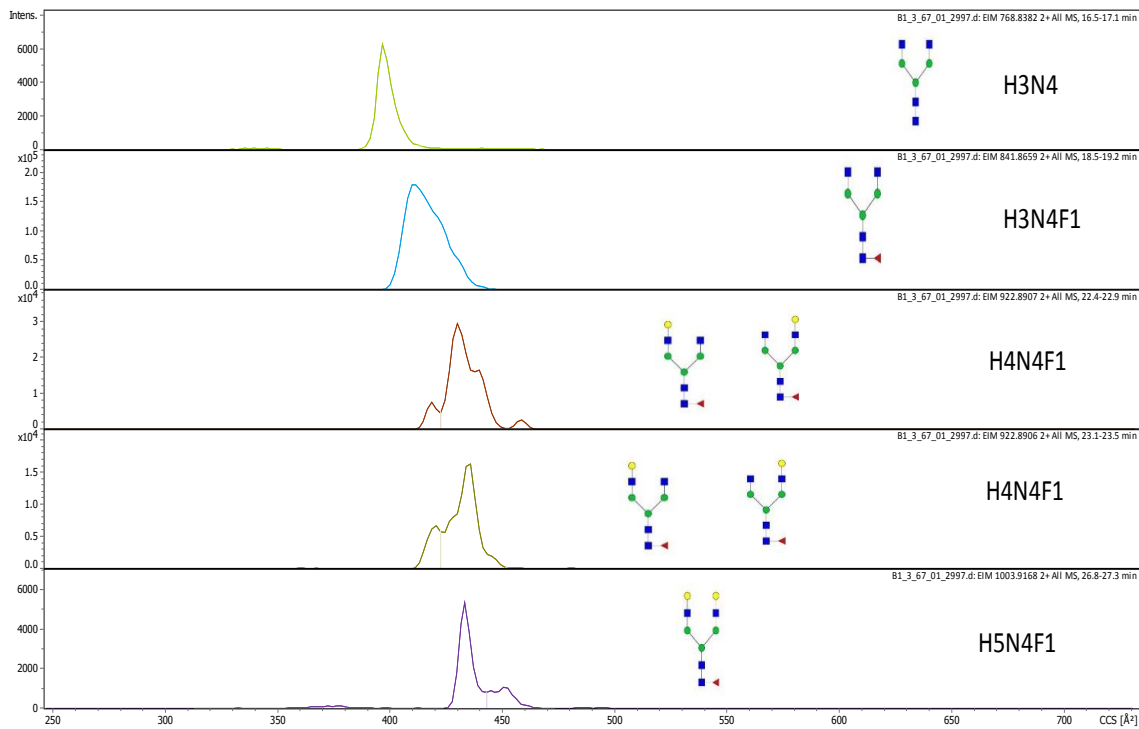
### 4.3 Bevacizumab örneğinden elde edilen N-glikanların analizleri

Tez çalışmalarında üç farklı üretim prosesinden elde edilmiş bevacizumab örnekleri kullanılmıştır. Kullanılan bevacizumab örneklerinin derişimlerinin standart olarak 20.0 µg/µL olduğu bilinmektedir. Bu standartlardan yaklaşık 100 µg olacak şekilde ayrı tüplere alınıp deglikozilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Deglikozilasyon işlemi sonrasında elde edilen N-glikanlar prokainamid etiket ajanı ile etiketlenmiştir. Pamuk doldurulmuş pipet uçları kullanılarak N-glikanların zenginleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonrasında bevacizumab'dan elde edilen N-glikanlar, HILIC-FLD-IM-MS sistemi ile analiz edilmiştir. Şekil 4.7'de analizler sonucu elde edilen floresans (FLD) ve temel pik kromatogramları (BPC) görölmektedir.



Şekil 4.9 Bevacizumaba ait A) Floresans ve B) Temel Pik kromatogramları

Bevacizumab ile yapılan analizler sonucunda trastuzumab ve insan immünoglobulin G proteinine kıyasla daha az sayıda N-glikan formu tespit edilmiştir. Bunun nedeni, rekombinant şekilde üretilen proteinin, glikozilasyon sonucunda yapısında oluşan N-glikan türlerinin azlığı olduğu bilinmektedir. Üç farklı bevacizumab örneği, her birinden üç tekrar olacak şekilde analiz edilmiştir. Analiz verileri değerlendirildiğinde, bevacizumab örnekleri için toplam 6 adet N-glikan formu belirlenmiştir (Çizelge 4.4).



**Şekil 4.10** Bevacizumab örneğinden elde edilen N-glikanların yapıları ve etkin çarpışma kesiti grafikleri

İyon hareketliliği tekniği kullanılarak yapılan analizler sonucunda bevacizumab örneğinden elde edilen N-glikanların mobilogram verileri elde edilmiş ve CCS değerleri yazılım vasıtasıyla hesaplanmıştır. Belirlenen H3N4, H3N4F1 H4N4F1 ve H5N4F1 N-glikan formları arasında fukoz ve galaktoz birimlerinin varlığına bağlı olarak yapısal farklılıklar veya benzerlikler bulunabilmektedir. Bu N-glikanların mobilogramları Şekil 4.8'de verilmektedir. Bu mobilogramlar incelendiğinde, H3N4, H3N4F1 N-glikan formları için konformasyonel farklılığa

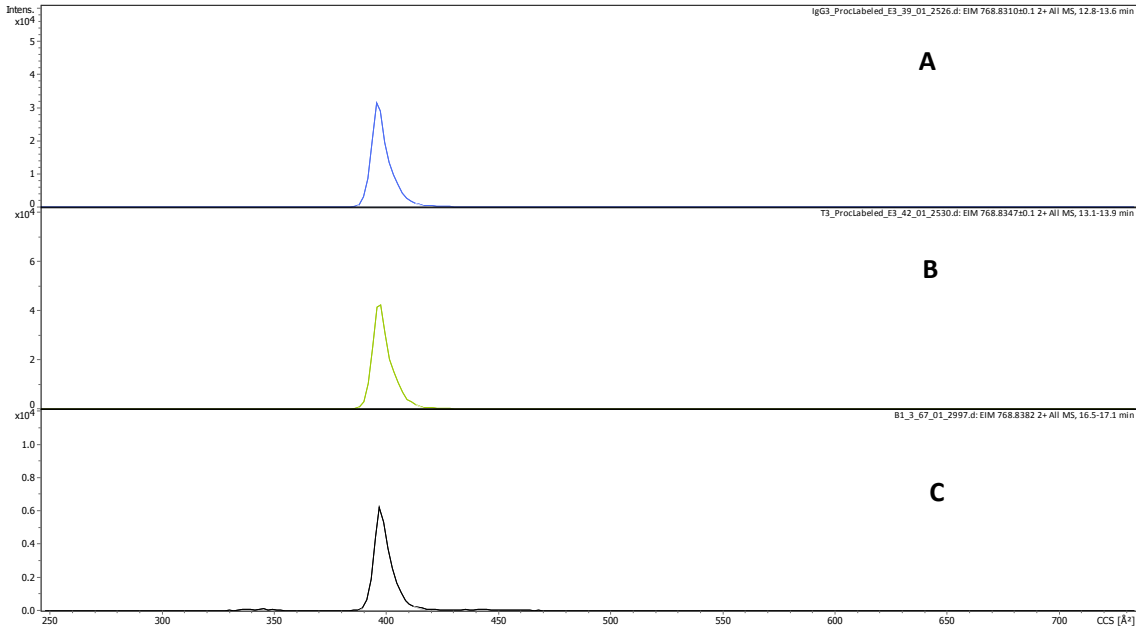
bağlı izomer varlığı gözlenmemektedir. Bevacizumab örneğinden elde edilen H4N4F1 N-glikan formunun mobilogramlarında trastuzumab ve insan immüoglobulin G proteinindeki gibi galaktoz biriminin a-1,3 ve a-1,6 bağlanmalarına bağlı olarak iki adet konformerin varlığı gözlenmektedir(Şekil 4.8). H4N4F1 glikan formu bevacizumab proteininden elde edildiğinde a-1,3 ve a-1,6 bağlanması yapmış galaktoz izomerlerinin trastuzumab ve immüoglobulin G proteininden farklı olarak her iki mobilogramda da tespit edildiği görülmüştür. Bevacizumabın H5N4F1 N-glikan formu için de trastuzumab ve insan immüoglobulin G proteininin aynı glikan formuna benzer mobilogram elde edilmiştir. Bu verilere göre, bevacizumab örneğinden elde edilen glikanların analiz edilen diğer mAb türlerinin glikanları ile çok benzer konformasyonel özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir.

**Çizelge 4.4** Bevacizumab'dan elde edilen N-glikanların yük, m/z, alıkonma zamanı ve etkin çarpışma kesiti değerleri

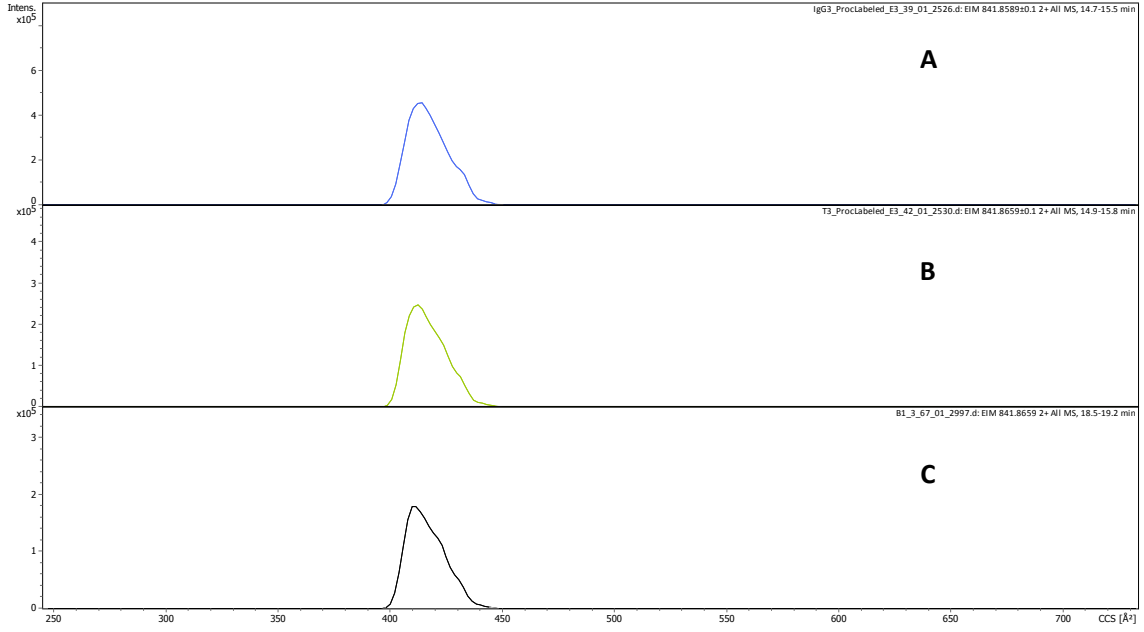
Glikan Yapısı	Yük	m/z	Alıkonma Zamanı (RT, dk.)	Etkin Çarpışma Kesiti (CCS, Å <sup>2</sup> )	Standart Sapma (s)
H3N4 (G0)	2	768,8354	17,0	397,9	0,1
H3N4F1 (G0F)	2	841,8643	18,9	410,5	0,5
H4N4F1 (G1F(3))	2	922,8907	22,4	419,1	0,3
H4N4F1 (G1F(6))	2	922,8907	22,4	430,7	0,4
H4N4F1 (G1F(3))	2	922,8907	23,1	420,8	0,4
H4N4F1 (G1F(6))	2	922,8907	23,1	435,1	0,5
H5N4F1 (G2F) (a)	2	1003,9143	23,3	433,3	0,5
H5N4F1 (G2F) (b)	2	1003,9143	23,3	451,1	0,4

#### 4.4 IgG, Trastuzumab ve Bevacizumab proteinlerinden elde edilen benzer glikanların konformasyonel özelliklerinin kıyaslanması

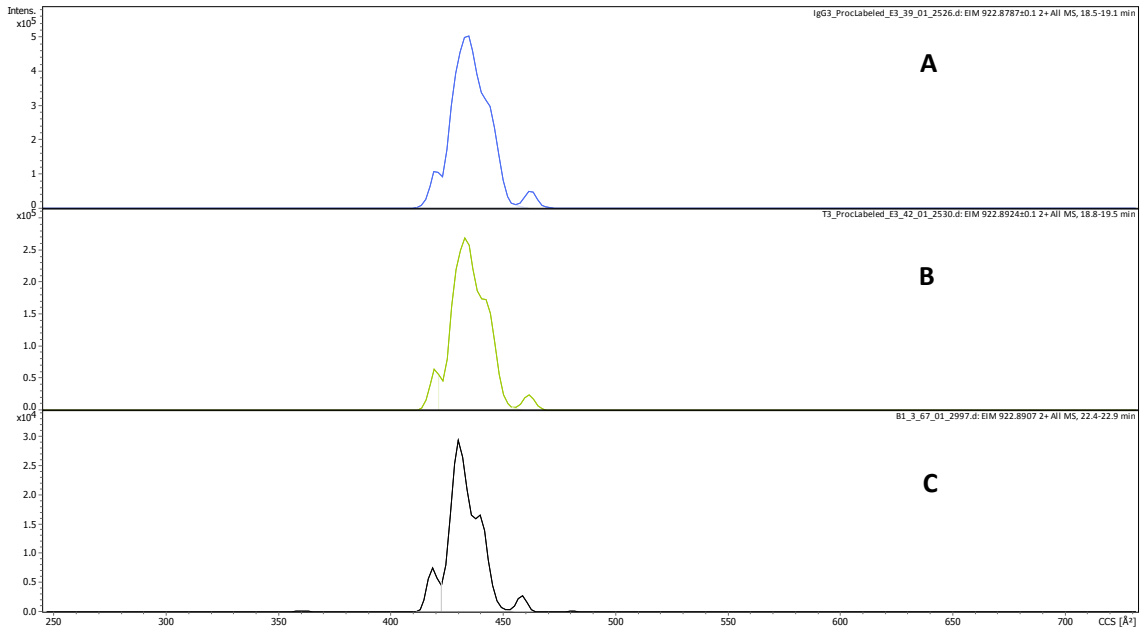
Tez çalışmasında kullanılan glikoproteinlerden aynı yapısal özelliklere sahip olan H3N4, H3N4F1, H4N4F1(a), H4N4F1(b) ve H5N4F1 glikanlarının mobilogramları şekil 4.9, şekil 4.10, şekil 4.11, şekil 4.12 ve şekil 4.13 de sırasıyla verilmiştir. Bu glikanların mobilogramlarından elde edilen etkin çarpışma kesitleri (CCS) ise Çizelge 4.5 de verilmiştir. Çalışmalar sonucunda farklı glikoproteinlerden elde edilmiş aynı glikan formlarına ait mobilogramların oldukça benzer oldukları gözlenmiştir. Böylece aynı glikan formlarının farklı glikoproteinlerden elde edilse bile birbirlerine yakın etkin çarpışma kesiti değerlerine sahip oldukları belirlenmiştir.



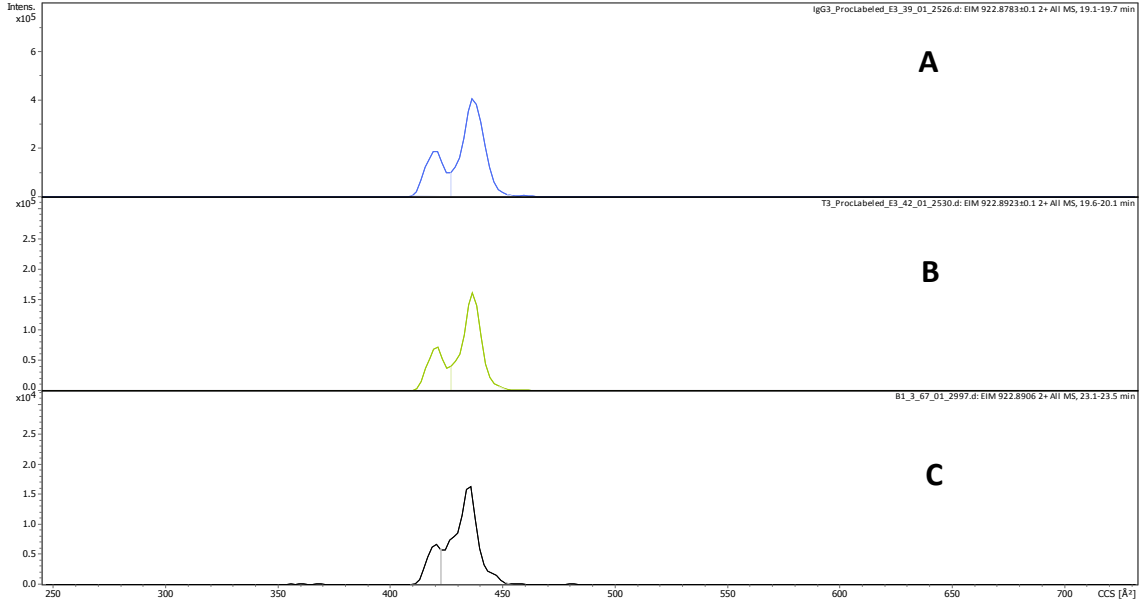
**Şekil 4.11** A) IgG, B) Trastuzumab ve C) Bevacizumab proteininden elde edilen H3N4 glikan formunun etkin çarpışma kesiti grafikleri



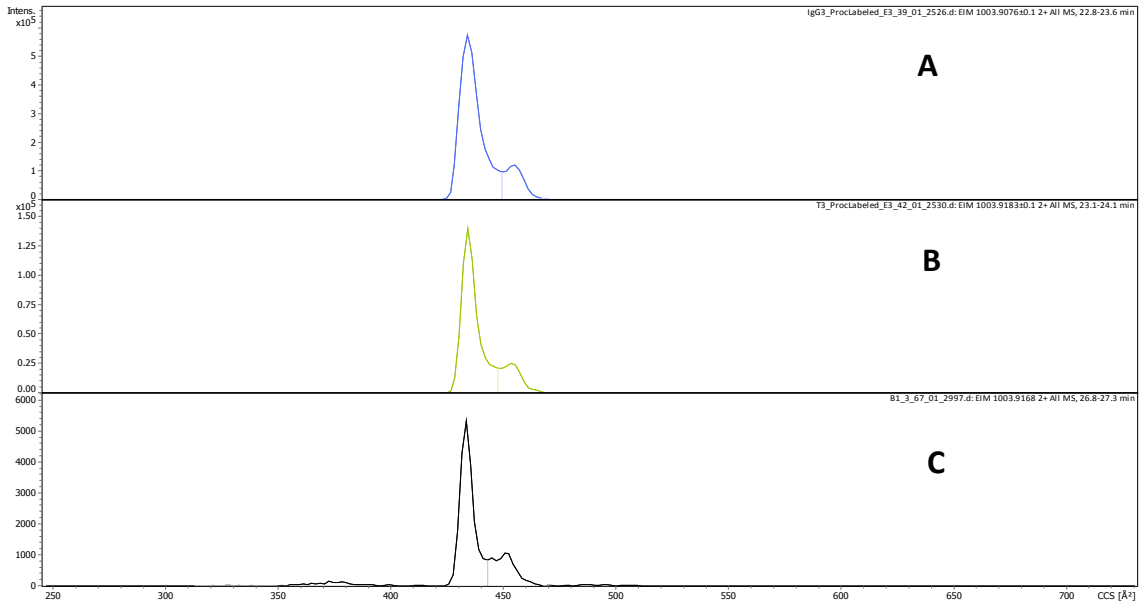
**Şekil 4.12** A) IgG, B) Trastuzumab ve C) Bevacizumab proteininden elde edilen H3N4F1 glikan formunun etkin çarpışma kesiti grafikleri



**Şekil 4.13** A) IgG, B) Trastuzumab ve C) Bevacizumab proteininden elde edilen H4N4F1(a) glikan formunun etkin çarpışma kesiti grafikleri



**Şekil 4.14** A) IgG, B) Trastuzumab ve C) Bevacizumab proteininden elde edilen H4N4F1(b) glikan formunun etkin çarpışma kesiti grafikleri



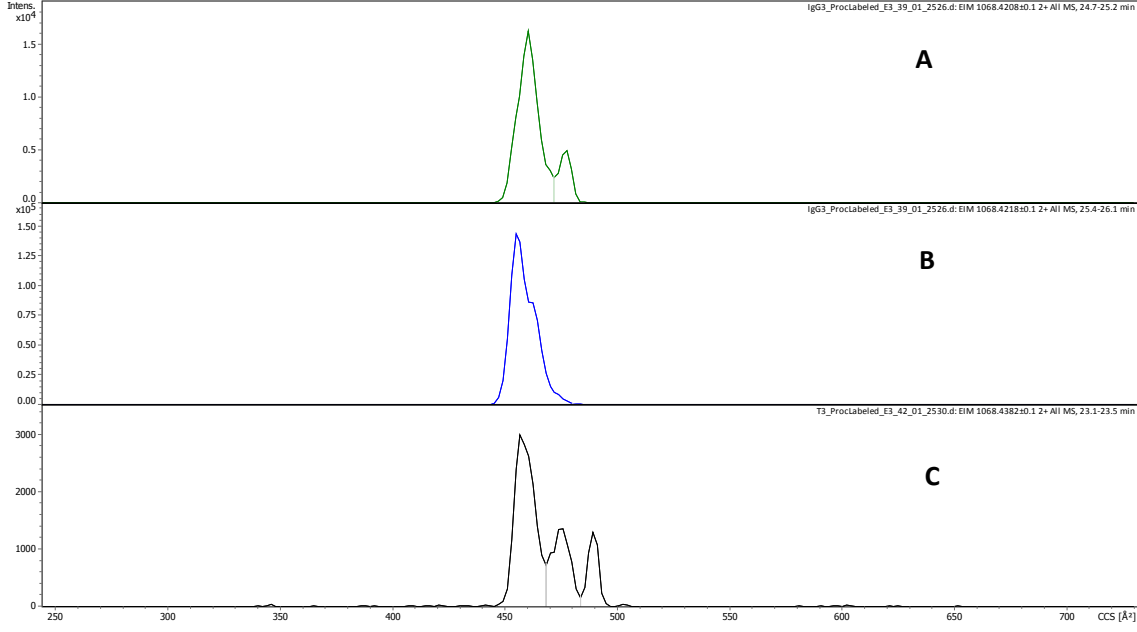
**Şekil 4.15** A) IgG, B) Trastuzumab ve C) Bevacizumab proteininden elde edilen H5N4F1 glikan formunun etkin çarpışma kesiti grafikleri

**Çizelge 4.5** IgG, Trastuzumab ve Bevacizumab glikoproteinlerinden elde edilen glikanların etkin çarpışma kesiti (CCS) değerleri

Glikan Yapısı	m/z	IgG CCS, Å <sup>2</sup>	Trastuzumab CCS, Å <sup>2</sup>	Bevacizumab CCS, Å <sup>2</sup>
H3N4 (G0)	768,831	397,3 + 0,9	396,1 + 0,4	397,9 + 0,1
H3N4F1 (G0F)	841,8589	412,2 + 1,0	412,6 + 0,6	410,5 + 0,5
H4N4F1 (G1Fa)	922,8783	-	-	419,1 + 0,3
H4N4F1 (G1Fa)	922,8783	432,9 + 0,8	431,1 + 0,9	430,7 + 0,4
H4N4F1 (G1Fb)	922,8973	420,5 + 0,4	419,4 + 0,5	420,8 + 0,4
H4N4F1 (G1Fb)	922,8973	436,9 + 0,3	435,9 + 0,7	435,1 + 0,5
H5N4F1 (G2Fa)	1003,9183	434,6 + 0,1	433,5 + 0,6	433,3 + 0,5
H5N4F1 (G2Fb)	1003,9183	453,7 + 0,9	452,3 + 0,8	451,1 + 0,4

#### 4.5 IgG ve Trastuzumab proteinlerinden elde edilen glikanların konformasyonel özelliklerinin kıyaslanması

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda insan serumu IgG ve Trastuzumab proteinlerinden elde edilen glikanların sayısı, bevacizumab proteinine göre oldukça fazladır. Bu nedenle, bu başlık altında yapılan karşılaştırmalarda genellikle IgG ve Trastuzumab proteinlerinden elde edilen glikanların konformasyonel farklılıklarını odaklanılmıştır.

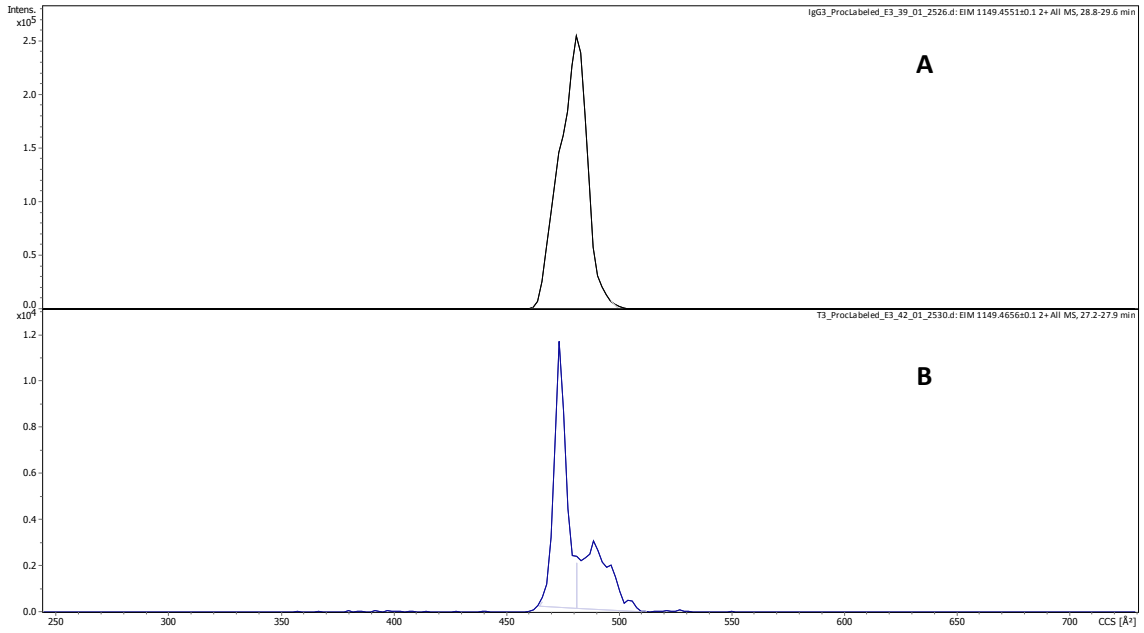


**Şekil 4.16** A) IgG (RT:25.0), B) IgG (RT:25.8) ve C) Trastuzumab proteininden elde edilen H4N4F1S1 glikan formunun etkin çarpışma kesiti grafikleri

Yapılan LC-HILIC-FLD-IM-MS analizlerinde IgG proteininin iki farklı alıkonma zamanında gözlenen H4N4F1S1 glikan formuna ait iki adet mobilogram (Şekil 4.14. A ve B) elde edilmiştir. Trastuzumab proteini için ise tek bir alıkonma zamanına karşılık gelen mobilogramda üç farklı konformer olduğu görülmektedir (Şekil 4.14.C). H4N4F1S1 glikan yapısındaki siyalik asidin varlığının, glikan yapısının IgG ve trastuzumab proteinleri için farklı konformasyonlara sahip olmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bunun nedeninin insan serumundan elde edilen IgG ile hücre ortamında üretilen trastuzumab proteinlerinin üç boyutlu yapılarında farklılıkların meydana gelme olasılığı olduğu ifade edilebilir. Bu durum her iki proteinin Şekil 4.14'de verilen mobilogramlarında gözlenmektedir. H4N4F1S1 glikanına galaktoz ( $\alpha$ -1,3 ve  $\alpha$ -1,6) ve siyalik asit ( $\alpha$ -2,3 ve  $\alpha$ -2,6) birimlerinin farklı şekillerde bağlanma olasılıkları, bu glikan için dört farklı izomerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu glikanın Şekil 4.14'de verilen mobilogramlarındaki sinyaller, söz konusu dört izomerin karışımına karşılık gelmektedir. Ancak elde edilen bu verilerle izomerlerin CCS değerleri net bir şekilde ayırt edilememektedir. IgG proteini için Şekil 4.14 A'daki mobilogramda iki farklı konformer varlığının görülmesi, siyalik asidin  $\alpha$ -1,3 veya  $\alpha$ -1,6



bağlanması yapan galaktoza a-2,3 veya a-2,6 bağlanması yaptığını göstermiş olabilir. Trastuzumab proteininin hücre ortamında üretilmesi ve IgG proteininden farklı aminoasit dizilimine sahip olması, mobilogramda benzer izomerlere ait farklı sinyallerin elde edilmesine neden olmaktadır(Şekil 4.14.C). Ancak IgG proteininde olduğu gibi trastuzumabın mobilogramında (Şekil 4.14 C) görülen sinyallerin de hangi izomerlere karşılık geldiği net bir şekilde belirlenmemektedir.



**Şekil 4.17** A) IgG ve B) Trastuzumab proteininden elde edilen H5N4F1S1 glikan formunun etkin çarpışma kesiti grafikleri

Şekil 4.15'de verilen mobilogramlara bakıldığında ise H5N4F1S1 glikan formunun IgG proteini için tek bir konformasyona sahip olduğu belirlenmiş ve aynı glikanın, trastuzumab proteininde ise iki izomer halinde bulunduğu gözlenmiştir. IgG proteininin H5N4F1S1 glikan formunun analizi sonucunda elde edilen mobilogramda siyalik asidin daha büyük bir glikan formuna katılması sebebiyle a-1,3 ve a-1,6 bağlanması yapmış galaktoza bağlanma ihtimali sonucunda oluşan izomerleri tek tepe noktasına sahip geniş bir dağılım içerisinde bir arada gözlenmiştir (Şekil 4.15.A). Bunun nedeni, yapısında siyalik asit bulduran geniş

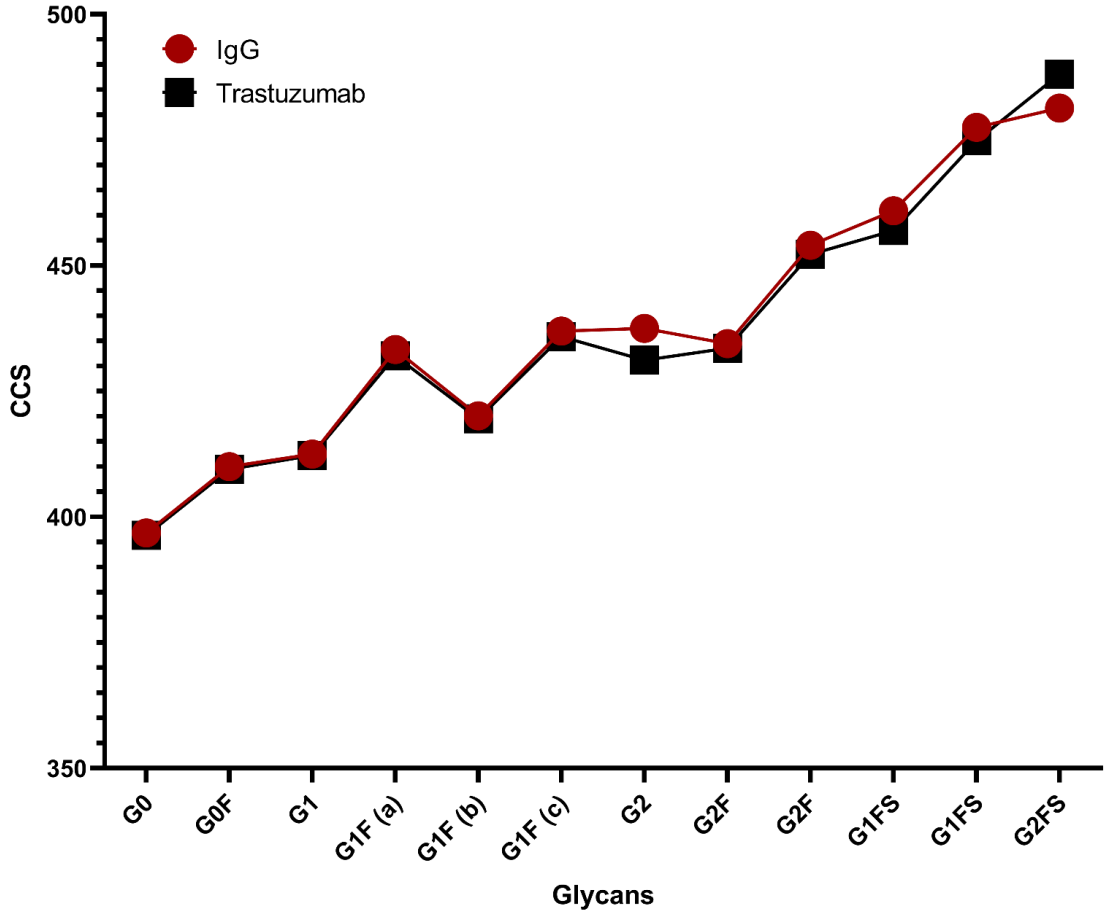
konformer iyonlarının iyon hareketlilik tüpünde ayrımlarının tam olarak gerçekleşmemesi olabilir. Trastuzumabın aynı glikan formunun analizinden elde edilen mobilogramda ise iki farklı izomer görülmüştür(Şekil 4.15.B). Ancak IgG proteininde olduğu gibi a-1,3 ve a-1,6 bağlanması yapmış galaktoza siyalik asidin hem a-2,3 hem de a-2,6 bağlanma ihtimallerinin olması nedeniyle mobilogramda görülen izomerlerin CCS değerleri net bir Şekilde belirlenememiştir.

**Çizelge 4.6** IgG ve Trastuzumab glikoproteinlerinden elde edilen siyalik asit içeren glikanların etkin çarpışma kesiti (CCS) değerleri

Glikan Yapısı	m/z	IgG CCS, � <sup>2</sup>	Trastuzumab CCS, � <sup>2</sup>
H4N4F1S1 (G1F1S1a)	1068,4273	460,7 + 0,3	456,7 + 0,6
H4N4F1S1 (G1F1S1b)	1068,4273	476,9 + 0,9	474,9 + 0,7
H4N4F1S1 (G1F1S1c)	1068,4273	455,7 + 0,2	488,0 + 0,6
H5N4F1S1 (G2F1S1a)	1149,4551	480,5 + 1,1	472,8 + 0,6
H5N4F1S1 (G2F1S1a)	1149,4551	-	488,1 + 0,7

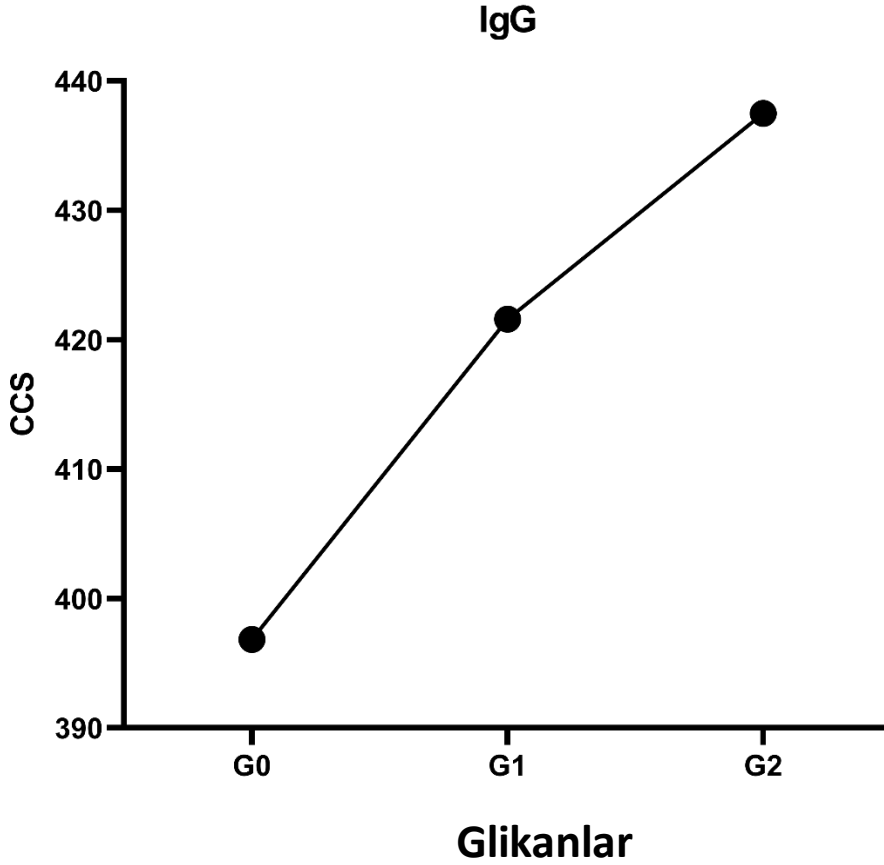
#### 4.6 IgG ve Trastuzumab proteinlerinden elde edilen glikanlardaki Şeker birimlerinin glikan konformasyonları üzerindeki etkilerinin incelenmesi

IgG ve Trastuzumab proteinlerinden elde edilen glikanların büyük bir çoğunluğu benzer yapıdadır. Tez çalışmalarının bu bölümünde Şeker birimlerinin glikan konformasyonları üzerindeki etkileri, etkin çarpışma kesitlerindeki (CCS) nicel değişimler üzerinden incelenerek değerlendirilmiştir.



**Şekil 4.18** IgG ve Trastuzumab proteinlerinden elde edilen glikanların etkin çarpışma kesiti (CCS) değerlerinin karşılaştırılmasının şematik gösterimi

Çizelge 4.6'da görüldüğü üzere IgG ve Trastuzumab proteinlerinden elde edilen glikanların büyük bir çoğunluğunun etkin çarpışma kesitleri (CCS) değerleri neredeyse birbirleriyle örtüşmektedir. Bu bölümde gerçekleştirilen analizlerden elde edilen veriler kullanılarak şeker birimlerinin glikanların CCS değerleri üzerindeki etkileri için de değerlendirilmeler yapılabilir. Örneğin; tek bir galaktoz biriminin glikanın CCS değerinde meydana getirdiği fark, hem IgG hem de Trastuzumab proteinlerine ait G0, G1 ve G2 glikanları arasındaki tek bir galaktoz birimim farkından faydalanılarak hesaplanabilir. Bu sayede, tek bir galaktoz birimine karşılık gelen CCS değeri de belirlenebilecektir.



**Şekil 4.19** IgG proteininden elde edilen G0, G1 ve G2 glikanları arasındaki galaktoz birimi farklılıklarına göre CCS değerindeki değişimin grafiksel gösterimi

Tek bir galaktoz biriminin IgG proteininden elde edilen G0, G1 ve G2 glikanları CCS değerlerine etkisi Şekil 4.17'de belirtilmiştir. Bu proteinden elde edilen G0, G1 ve G2 glikanlarının CCS değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bu CCS değerlerine bakıldığında G1 ve G0 glikanları arasındaki tek bir galaktoz farkının oluşturduğu etkin çarpışma kesiti değeri farkı incelendiğinde aralarında yaklaşık  $24 \text{ \AA}^2$  olduğu belirlenmiştir. G2 ile G1 glikanları arasındaki tek bir galaktoz farkının ise CCS değerleri arasında yaklaşık  $16 \text{ \AA}^2$ 'lik bir farka neden olduğu görülmektedir. Burada daha büyük glikan yapısına katılan monosakkarit biriminin tüm yapıya etkisinin azaldığı görülmektedir. Ayrıca diğer glikan yapıları arasındaki galaktoz katılması sonucu oluşan etkin çarpışma kesiti farklılıklarını örneğin G0F ve G1F(6) ile G1F(3) arasında incelediğimizde, G0F ile G1F(6) arasındaki galaktoz katılmasının etkin çarpışma kesiti değerine yaklaşık  $21 \text{ \AA}^2$  fark oluşturduğu gözlenirken, G0F ile G1F(3) arasındaki galaktoz katılmasının

etkin çarpışma kesiti değerine yaklaşık 8 Å<sup>2</sup> fark oluşturduğu görülmektedir. Tek bir galaktoz biriminin katılmasının etkin çarpışma kesiti değerine etkisi G1F1S1 ve G2F1S1 glikanları arasında da izlenilebilir. Ancak bu glikan yapılarının diğer glikanlara göre daha büyük yapıya sahip olmaları ve elde edilen mobilogramlar üzerinde (Şekil 4.14, Şekil 4.15) konformasyonel özelliklerinin net bir şekilde yorumlanamaması sebebiyle bu glikanlar için galaktoz etkisi net bir şekilde tartışılmamaktadır. Galaktoz biriminin daha küçük glikan yapılarına katıldıkça etkin çarpışma kesitine olan etkisinin arttığı gözlenir iken, daha büyük glikan yapılarına katıldıkça bu etkinin azaldığı gözlenmiştir. Daha büyük glikan yapılarında molekül içi etkileşim olasılığının yüksek olmasının tek bir galaktoz biriminin bağlandığı glikanın CCS değeri üzerindeki etkisini azalttığı düşünülmektedir(Şekil 4.17).

IgG proteininden elde edilen G0 ve G0F, G1 ile G1F(6) ve G1F(3) , G2 ile G2F glikanları arasında da tek bir fukoz biriminin yapıya katılmasının etkin çarpışma kesiti değerlerine etkileri incelenebilmektedir. Bu glikanlara fukoz biriminin katılmasının etkin çarpışma kesiti değerlerine etkisi çizelge 4.7'de görülmektedir. Bu proteinden elde edilen glikanların etkin çarpışma kesiti değerleri ise tablo 4.2'de verilmektedir. Bu etkin çarpışma kesiti değerlerine bakıldığında G0 ile G0F arasındaki tek bir fukoz biriminin oluşturduğu etkin çarpışma kesiti değeri farkının yaklaşık 15 Å<sup>2</sup> oluşturduğu görülmüştür. G1 ile G1F(6) arasındaki fukoz birimi farkının etkin çarpışma kesiti değerine etkisi yaklaşık 11 Å<sup>2</sup> iken, G1 ile G1F(3) arasındaki fukoz birimi farkının etkin çarpışma kesiti değerine etkisi 8 Å<sup>2</sup> olduğu görülmüştür. G2 ile G2F arasındaki fukoz birimi farkının etkin çarpışma kesiti değerine etkisi ise net bir şekilde belirlenememektedir. Çünkü her iki glikan yapısında yapısal olarak tek bir konformerin görülmesi beklenir iken, bu glikanlara ait mobilogramlarda iki farklı konformer gözlenmektedir. Bu glikanların mobilogramlarında ilk görülen konformerler a ve sonra görülen konformerler b olarak isimlendirildiğinde G2a ile G2F1a arasındaki fukoz birimi farkının etkin çarpışma kesiti değerine etkisinin yaklaşık 12 Å<sup>2</sup> olduğu görülür iken, G2b ile G2F1b arasındaki fukoz birimi farkının etkin çarpışma kesiti değerine etkisinin 16 Å<sup>2</sup> olduğu görülmüştür. Burada da galaktoz birimlerinin katılımında olduğu gibi, glikan yapısına tek bir fukoz biriminin katılmasının yapısal olarak küçük glikanların etkin çarpışma kesiti değerlerinde daha çok farklılık oluşturduğu

gözlenir iken, daha büyük yapılı glikanlar arasında daha az etkin çarpışma kesiti değeri farkı oluşturduğu gözlenmiştir. Ancak bu durum G2 ile G2F glikanları için net bir şekilde gözlenememektedir. Çünkü bu iki glikanın mobilogramında görülen 2 konformerden hangisinin net olarak bu glikana ait olduğu tespit edilemediği için mobilogram görülen konformerlerin oluşturduğu etkin çarpışma kesiti değerleri dikkate alınarak yorumlamalar yapılmıştır.

Trastuzumab ve Bevacizumab proteinlerinde de IgG proteininde olduğu gibi tek bir şeker biriminin glikan yapısına katılması sonucu oluşturduğu etkin çarpışma kesiti farklılıkları incelenebilir. Ancak her üç proteinde de yer alan glikan formlarının etkin çarpışma kesiti değerleri (Çizelge 4.5) birbirlerine çok yakın olduğu için tez metni içerisinde diğer iki protein (Trastuzumab ve Bevacizumab) için elde edilen veriler üzerinden değerlendirme ve yorumlama yapılmamıştır. Tez kapsamında sadece IgG proteininden elde edilen glikanlar üzerinden şeker birimlerinin glikanların yapıları ve etkin çarpışma kesiti değerlerine etkileri incelenmiştir.

## 5.SONUÇLAR

Bu tez kapsamında insan serum İmmunoglobulin G (IgG), hücre ortamında üretilmiş Trastuzumab ve Bevacizumab proteinlerinden elde edilen N-glikanların analizleri HPLC-HILIC-FLD-IM-MS sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonrasında elde edilen veriler değerlendirildiğinde;

- IgG proteininde MS düzeyinde 18 adet N-glikan yapısı tespit edilmiştir.
- Trastuzumab proteininde MS düzeyinde 14 adet N-glikan yapısı tespit edilmiştir.
- Bevacizumab proteininde MS düzeyinde 7 adet N-glikan yapısı tespit edilmiştir.
- H3N5F1, H4N5, H5N5F1, H5N4F1, H5N4S2, H5N5F1S1 ve H5N5F1S2 N-glikan yapıları sadece IgG proteininin analizlerinde gözlenmiştir.
- H4N3F1 ve H4N3F1S1 N-glikan yapıları sadece Trastuzumab proteininin analizinde gözlenmiştir.
- H3N3F1 N-glikan yapısı ise Trastuzumab ve Bevacizumab proteinlerinin analizlerinde gözlenmiştir.
- Her bir glikan yapısı MS düzeyinde temel pik kromatogramı (BPC) haricinde eş zamanlı olarak floresans kromatogramı ile de tespit edilmiş olup böylece her bir proteinden elde edilen glikan yapılarının varlığı kanıtlanmıştır.
- IgG, Trastuzumab ve Bevacizumab proteinlerinin H4N4F1 N-glikanlarının analizlerinden iki farklı mobilogram elde edilmiştir. Bu glikan yapısının IgG ve Trastuzumab proteinlerinden elde edildiğinde, HILIC kolonda önce alikonan kısmında galaktozun glikan yapısına tek başına  $\alpha$ -1,6 şeklinde bağlandığı, daha sonra alikonan kısmında ise galaktozun izomer karışımı halinde geldiği  $\alpha$ -1,3 ve  $\alpha$ -1,6 bağlanmasını yapan izomerler olduğu belirlenmiştir.
- H4N4F1 N-glikan yapısı bevacizumab proteininden elde edildiğinde ise, iki farklı alikonma zamanına karşılık gelen mobilogramda da iki konformer içerdiği görülmüş olup, daha küçük CCS değerine sahip olan konformerin

a-1,3, daha büyük CCS değerine sahip olan konformerin a-1,6 bağlanması yapan galaktozu birimini içerdiği tespit edilmiştir.

- Siyalik asidin N-glikan yapılarına bağlanması sonucu oluşan konformasyonel farklılıklar, mobilogramlarda gözlenmiştir.
- Trastuzumab ve Bevacizumab proteininin hücre ortamında üretilmesi ve IgG proteininden farklı aminoasit dizilimlerine sahip olmaları nedeniyle mobilogramlarda benzer izomerlere ait farklı sinyallerin elde edilmiştir.
- Monosakkarit birimlerinin (Galaktoz, Fukoz, Siyalik asit) glikan yapılarına katılmalarında etkin çarpışma kesiti değerlerinde ve konformasyonlarında meydana getirdiği etkileri gözlenmiştir.
- Dört boyutta (LC-HILIC-FLD-IM-MS) N-glikan analizleri iki adet mAb ve IgG proteini için prokainamid etiketi kullanılarak ilk kez uygulanmıştır.
- Bu proteinlerden elde edilen N-glikanların prokainamid etiketi ile etiketlendikten sonra konformasyonel özellikleri ilk kez Tuzaklamalı İyon Hareketliliği Kütle Spektrometrisi (TIMS-TOF) cihazı ile incelenmiştir.
- Dört boyutta glikanların karakterizasyonun yapılmasına yönelik analitik bir yöntem geliştirilmiştir.
- Özellikle mAb geliştirme ve kalite kontrol aşamalarındaki glikanların karakterizasyon çalışmalarında da tuzaklamalı iyon hareketliliği kütle spektrometrisi yönteminin de kullanılabileceği gösterilmiştir.



## 6. KAYNAKLAR

- [1] B. L. Ligon, "Penicillin: Its Discovery and Early Development", *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, c. 15, sayı 1, ss. 52–57, 2004, doi: 10.1053/j.spid.2004.02.001.
- [2] G. Walsh, "Second-generation biopharmaceuticals", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, c. 58, sayı 2, ss. 185–196, 2004, doi: 10.1016/j.ejpb.2004.03.012.
- [3] H. Waegeman ve W. Soetaert, "Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, c. 38, sayı 12, ss. 1891–1910, 2011, doi: 10.1007/s10295-011-1034-4.
- [4] A. Mullard, "2020 FDA drug approvals", *Nat. Rev. Drug Discov.*, c. 20, sayı 2, ss. 85–90, 2021, doi: 10.1038/d41573-021-00002-0.
- [5] "Human medicines: highlights of 2020 | European Medicines Agency". <https://www.ema.europa.eu/en/news/human-medicines-highlights-2020> (erişim Nis. 20, 2021).
- [6] L. Urquhart, "Top companies and drugs by sales in 2020", *Nat. Rev. Drug Discov.*, c. 20, sayı 4, ss. 253–253, 2021, doi: 10.1038/d41573-021-00050-6.
- [7] J. K. Ryu, H. S. Kim, ve D. H. Nam, "Current status and perspectives of biopharmaceutical drugs", *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, c. 17, sayı 5, ss. 900–911, 2012, doi: 10.1007/s12257-012-0095-1.
- [8] J. L. Lau ve M. K. Dunn, "Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions", *Bioorganic Med. Chem.*, c. 26, sayı 10, ss. 2700–2707, 2018, doi: 10.1016/j.bmc.2017.06.052.
- [9] B. Leader, Q. J. Baca, ve D. E. Golan, "Protein therapeutics: A summary and pharmacological classification", *Nat. Rev. Drug Discov.*, c. 7, sayı 1, ss. 21–39, 2008, doi: 10.1038/nrd2399.
- [10] C. Lee Ventola, "Biosimilars: Part 1: Proposed regulatory criteria for FDA

- approval”, *P T*, c. 38, sayı 5, 2013.
- [11] M. Kesik-Brodacka, “Progress in biopharmaceutical development”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, c. 65, sayı 3, ss. 306–322, 2018, doi: 10.1002/bab.1617.
- [12] “Biocon Limited Stock Analysis: The Next (Bio)Pharma Giant? - FinMedium”. <https://finmedium.com/2020/08/biocon-limited-stock-analysis/> (erişim Nis. 25, 2021).
- [13] G. Walsh, “Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals”, *Drug Discov. Today*, c. 15, sayı 17–18, ss. 773–780, 2010, doi: 10.1016/j.drudis.2010.06.009.
- [14] M. N. Baeshen *vd.*, “Production of biopharmaceuticals in *E. Coli*: Current scenario and future perspectives”, *J. Microbiol. Biotechnol.*, c. 25, sayı 7, ss. 953–962, 2015, doi: 10.4014/jmb.1412.12079.
- [15] T. W. Overton, “Recombinant protein production in bacterial hosts”, *Drug Discov. Today*, c. 19, sayı 5, ss. 590–601, 2014, doi: 10.1016/j.drudis.2013.11.008.
- [16] F. C. Korucu, H. Nazli, G. Gedik, ve İ. Çiçin, “Biyobenzer Ürünlerde Klinik Uygulamada Karşılaşılabilecek Sorunlar”, ss. 44–51, 2016, doi: 10.12991/mpj.20164450877.
- [17] Walsh G, “Biopharmaceutical benchmarks 2010”, *Nat. Biotechnol.*, c. 28, sayı 9, ss. 917–924, 2010.
- [18] G. Zauner *vd.*, “Glycoproteomic analysis of antibodies”, *Mol. Cell. Proteomics*, c. 12, sayı 4, ss. 856–865, 2013, doi: 10.1074/mcp.R112.026005.
- [19] H. W. Schroeder ve L. Cavacini, “Structure and function of immunoglobulins”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, c. 125, sayı 2 SUPPL. 2, ss. S41–S52, 2010, doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- [20] “The utility of SARS-CoV-2 IgA in COVID-19 testing - Logical Biological”. <https://logicalbiological.com/sars-cov-2-iga/> (erişim Nis. 26, 2021).
- [21] M. Berger, V. Shankar, ve A. Vafai, “Therapeutic applications of

- monoclonal antibodies”, *Am. J. Med. Sci.*, c. 324, sayı 1, ss. 14–30, 2002, doi: 10.1097/00000441-200207000-00004.
- [22] A. Beck, T. Wurch, C. Bailly, ve N. Corvaia, “Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies”, *Nat. Rev. Immunol.*, c. 10, sayı 5, ss. 345–352, 2010, doi: 10.1038/nri2747.
- [23] R. M. Lu *vd.*, “Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases”, *J. Biomed. Sci.*, c. 27, sayı 1, ss. 1–30, 2020, doi: 10.1186/s12929-019-0592-z.
- [24] A. L. Grilo ve A. Mantalaris, “The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market”, *Trends Biotechnol.*, c. 37, sayı 1, ss. 9–16, 2019, doi: 10.1016/j.tibtech.2018.05.014.
- [25] P. A. Todd ve R. N. Brogden, “Muromonab CD3: A Review of its Pharmacology and Therapeutic Potential”, *Drugs*, c. 37, sayı 6, ss. 871–899, 1989, doi: 10.2165/00003495-198937060-00004.
- [26] D. D. Banker, “Monoclonal antibodies. A review.”, *Indian J. Med. Sci.*, c. 55, sayı 12, ss. 651–654, 2001, doi: 10.2174/1574884712666170809124728.
- [27] H. Kaplon ve J. M. Reichert, “Antibodies to watch in 2019”, *MABs*, c. 11, sayı 2, ss. 219–238, 2019, doi: 10.1080/19420862.2018.1556465.
- [28] K. Todoroki, H. Mizuno, E. Sugiyama, ve T. Toyo’oka, “Bioanalytical methods for therapeutic monoclonal antibodies and antibody–drug conjugates: A review of recent advances and future perspectives”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, c. 179, 2020, doi: 10.1016/j.jpba.2019.112991.
- [29] C. Napodano *vd.*, “Immunological Role of IgG Subclasses”, *Immunol. Invest.*, c. 50, sayı 4, ss. 1–18, 2020, doi: 10.1080/08820139.2020.1775643.
- [30] L. H. Sigal, “Basic science for the clinician 58 IgG subclasses”, *J. Clin. Rheumatol.*, c. 18, sayı 6, ss. 316–318, 2012, doi: 10.1097/RHU.0b013e318269446b.
- [31] A. Beck, S. Sanglier-Cianférani, ve A. Van Dorsselaer, “Biosimilar, biobetter, and next generation antibody characterization by mass spectrometry”, *Anal. Chem.*, c. 84, sayı 11, ss. 4637–4646, 2012, doi:

10.1021/ac3002885.

- [32] A. Beck, E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, A. Van Dorsselaer, ve S. Sanglier-Cianfèrani, "Characterization of therapeutic antibodies and related products", *Anal. Chem.*, c. 85, sayı 2, ss. 715–736, 2013, doi: 10.1021/ac3032355.
- [33] I. van den Broek, W. M. A. Niessen, ve W. D. van Dongen, "Bioanalytical LC-MS/MS of protein-based biopharmaceuticals", *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, c. 929, ss. 161–179, 2013, doi: 10.1016/j.jchromb.2013.04.030.
- [34] H. G. Markley, "Editorial for Therapeutic Monoclonal Antibodies: What Headache Specialists Need to Know", *Headache*, c. 55, sayı 8, ss. 1169–1170, 2015, doi: 10.1111/head.12641.
- [35] O. N. Jensen, "Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, c. 8, sayı 1, ss. 33–41, 2004, doi: 10.1016/j.cbpa.2003.12.009.
- [36] N. Blom, T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta, S. Gammeltoft, ve S. Brunak, "Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence", *Proteomics*, c. 4, sayı 6, ss. 1633–1649, 2004, doi: 10.1002/pmic.200300771.
- [37] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, ve G. J. Gatto, "Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications", *Angew. Chemie - Int. Ed.*, c. 44, sayı 45, ss. 7342–7372, 2005, doi: 10.1002/anie.200501023.
- [38] C. Temporini, E. Calleri, G. Massolini, ve G. Caccialanza, "Integrated analytical strategies for the study of phosphorylation and glycosylation in proteins", *Mass Spectrom. Rev.*, c. 27, sayı 3, ss. 207–236, 2008, doi: 10.1002/mas.20164.
- [39] A. Dell, A. Galadari, F. Sastre, ve P. Hitchen, "Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes", *Int. J. Microbiol.*, c. 2010, 2010, doi: 10.1155/2010/148178.
- [40] C. H. Wong, "Protein glycosylation: New challenges and opportunities", *J.*

- Org. Chem.*, c. 70, sayı 11, ss. 4219–4225, 2005, doi: 10.1021/jo050278f.
- [41] J. L. Abrahams, G. Taherzadeh, G. Jarvas, A. Guttman, Y. Zhou, ve M. P. Campbell, “Recent advances in glycoinformatic platforms for glycomics and glycoproteomics”, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, c. 62, sayı December 2019, ss. 56–69, 2020, doi: 10.1016/j.sbi.2019.11.009.
- [42] H. Lu, Y. Zhang, ve P. Yang, “Advancements in mass spectrometry-based glycoproteomics and glycomics”, *Natl. Sci. Rev.*, c. 3, sayı 3, ss. 345–364, 2016, doi: 10.1093/nsr/nww019.
- [43] K. T. Schjoldager, Y. Narimatsu, H. J. Joshi, ve H. Clausen, “Global view of human protein glycosylation pathways and functions”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, c. 21, sayı 12, ss. 729–749, 2020, doi: 10.1038/s41580-020-00294-x.
- [44] V. Dotz *vd.*, “Mass spectrometry for glycosylation analysis of biopharmaceuticals”, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, c. 73, ss. 1–9, 2015, doi: 10.1016/j.trac.2015.04.024.
- [45] Q. Zhou ve H. Qiu, “The Mechanistic Impact of N-Glycosylation on Stability, Pharmacokinetics, and Immunogenicity of Therapeutic Proteins”, *J. Pharm. Sci.*, c. 108, sayı 4, ss. 1366–1377, 2019, doi: 10.1016/j.xphs.2018.11.029.
- [46] R. Gupta, F. Leon, S. Rauth, S. K. Batra, ve M. P. Ponnusamy, “A Systematic Review on the Implications of O-linked Glycan Branching and Truncating Enzymes on Cancer Progression and Metastasis”, *Cells*, c. 9, sayı 2, 2020, doi: 10.3390/cells9020446.
- [47] H. LIS ve N. SHARON, “Protein glycosylation: Structural and functional aspects”, *Eur. J. Biochem.*, c. 218, sayı 1, ss. 1–27, 1993, doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18347.x.
- [48] S. A. Overview, A. Illiano, G. Pinto, C. Melchiorre, ve A. Carpentieri, “Protein Glycosylation Investigated by Mass”, ss. 1–22, 2020.
- [49] L. R. Ruhaak, G. Zauner, C. Huhn, C. Bruggink, A. M. Deelder, ve M. Wuhrer, “Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification”, *Anal. Bioanal. Chem.*, c. 397, sayı 8, ss. 3457–3481, 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3532-z.

- [50] A. Shubhakar, K. R. Reiding, R. A. Gardner, D. I. R. Spencer, D. L. Fernandes, ve M. Wuhrer, “High-Throughput Analysis and Automation for Glycomics Studies”, *Chromatographia*, c. 78, sayı 5–6, ss. 321–333, 2015, doi: 10.1007/s10337-014-2803-9.
- [51] R. Raman, S. Raguram, G. Venkataraman, J. C. Paulson, ve R. Sasisekharan, “Glycomics: An integrated systems approach to structure-function relationships of glycans”, *Nat. Methods*, c. 2, sayı 11, ss. 817–824, 2005, doi: 10.1038/nmeth807.
- [52] L. Oliveira-Ferrer, K. Legler, ve K. Milde-Langosch, “Role of protein glycosylation in cancer metastasis”, *Semin. Cancer Biol.*, c. 44, ss. 141–152, 2017, doi: 10.1016/j.semcancer.2017.03.002.
- [53] C. Reily, T. J. Stewart, M. B. Renfrow, ve J. Novak, “Glycosylation in health and disease”, *Nat. Rev. Nephrol.*, c. 15, sayı 6, ss. 346–366, 2019, doi: 10.1038/s41581-019-0129-4.
- [54] H. Geyer ve R. Geyer, “Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation”, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, c. 1764, sayı 12, ss. 1853–1869, 2006, doi: 10.1016/j.bbapap.2006.10.007.
- [55] Y. Mechref ve M. V. Novotny, “ChemInform Abstract: Structural Investigations of Glycoconjugates at High Sensitivity”, *ChemInform*, c. 33, sayı 20, s. no-no, 2010, doi: 10.1002/chin.200220290.
- [56] F. Maley, R. B. Trimble, A. L. Tarentino, ve T. H. Plummer, “Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases”, *Anal. Biochem.*, c. 180, sayı 2, ss. 195–204, 1989, doi: 10.1016/0003-2697(89)90115-2.
- [57] M. Szigeti, J. Bondar, D. Gjerde, Z. Keresztessy, A. Szekrenyes, ve A. Guttman, “Rapid N-glycan release from glycoproteins using immobilized PNGase F microcolumns”, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, c. 1032, ss. 139–143, 2016, doi: 10.1016/j.jchromb.2016.02.006.
- [58] W. Q. Cao, M. Q. Liu, S. Y. Kong, M. X. Wu, Z. Z. Huang, ve P. Y. Yang, “Novel methods in glycomics: a 2019 update”, *Expert Rev. Proteomics*, c. 17, sayı 1, ss. 11–25, 2020, doi: 10.1080/14789450.2020.1708199.

- [59] L. R. Ruhaak, G. Xu, Q. Li, E. Goonatileke, ve C. B. Lebrilla, “Mass Spectrometry Approaches to Glycomic and Glycoproteomic Analyses”, *Chem. Rev.*, c. 118, sayı 17, ss. 7886–7930, 2018, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00732.
- [60] A. Planinc, J. Bones, B. Dejaegher, P. Van Antwerpen, ve C. Delporte, “Glycan characterization of biopharmaceuticals: Updates and perspectives”, *Anal. Chim. Acta*, c. 921, ss. 13–27, 2016, doi: 10.1016/j.aca.2016.03.049.
- [61] R. P. Kozak, C. B. Tortosa, D. L. Fernandes, ve D. I. R. Spencer, “Comparison of procainamide and 2-aminobenzamide labeling for profiling and identification of glycans liquid chromatography with fluorescence detection coupled to electrospray ionization-mass spectrometry”, *Anal. Biochem.*, c. 486, ss. 38–40, 2015, doi: 10.1016/j.ab.2015.06.006.
- [62] V. Del Solar, R. Gupta, Y. Zhou, G. Pawlowski, K. L. Matta, ve S. Neelamegham, “Robustness in glycosylation systems: Effect of modified monosaccharides, acceptor decoys and azido sugars on cellular nucleotide-sugar levels and pattern of N-linked glycosylation”, *Mol. Omi.*, c. 16, sayı 4, ss. 377–386, 2020, doi: 10.1039/d0mo00023j.
- [63] T. Keser, T. Pavic, G. Lauc, ve O. Gornik, “Comparison of 2-aminobenzamide, procainamide and RapiFluor-MS as derivatizing agents for high-throughput HILIC-UPLC-FLR-MS N-glycan analysis”, *Front. Chem.*, c. 6, sayı JUL, ss. 1–12, 2018, doi: 10.3389/fchem.2018.00324.
- [64] Jennifer Griffiths, “A brief history of mass spectrometry”, *Anal. Chem.*, c. 80, sayı 15, ss. 5678–5683, 2008, doi: <https://doi.org/10.1021/ac8013065>.
- [65] J. R. Yates, “A century of mass spectrometry: From atoms to proteomes”, *Nat. Methods*, c. 8, sayı 8, ss. 633–637, 2011, doi: 10.1038/nmeth.1659.
- [66] M. Smoluch ve J. Silberring, “A brief history of mass spectrometry”, *Mass Spectrom. An Appl. Approach*, ss. 5–8, 2019, doi: 10.1002/9781119377368.ch2.
- [67] H. Awad, M. M. Khamis, ve A. El-Aneed, “Mass spectrometry, review of the basics: Ionization”, *Appl. Spectrosc. Rev.*, c. 50, sayı 2, ss. 158–175, 2015,

doi: 10.1080/05704928.2014.954046.

- [68] A. El-Aneed, A. Cohen, ve J. Banoub, “Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers”, *Appl. Spectrosc. Rev.*, c. 44, sayı 3, ss. 210–230, 2009, doi: 10.1080/05704920902717872.
- [69] J. J. Thomson ve E. Rutherford, “XL. On the passage of electricity through gases exposed to Röntgen rays”, *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.*, c. 42, sayı 258, ss. 392–407, 1896, doi: 10.1080/14786449608620932.
- [70] C. Uetrecht, R. J. Rose, E. van Duijn, K. Lorenzen, ve A. J. R. Heck, “Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies”, *Chem. Soc. Rev.*, c. 39, sayı 5, ss. 1633–1655, 2010, doi: 10.1039/b914002f.
- [71] J. Zeleny, “VI. On the ratio of the velocities of the two ions produced in gases by Röntgen radiation; and on some related phenomena”, *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.*, c. 46, sayı 278, ss. 120–154, 1898, doi: 10.1080/14786449808621173.
- [72] J. C. May ve J. A. McLean, “Ion mobility-mass spectrometry: Time-dispersive instrumentation”, *Anal. Chem.*, c. 87, sayı 3, ss. 1422–1436, 2015, doi: 10.1021/ac504720m.
- [73] A. M. Tyndall, L. H. Starr, ve C. F. Powell, “The mobility of ions in air. Part IV.—Investigations by two new methods”, *Proc. R. Soc. London. Ser. A, Contain. Pap. a Math. Phys. Character*, c. 121, sayı 787, ss. 172–184, 1928, doi: 10.1098/rspa.1928.0189.
- [74] M. J. Cohen ve F. W. Karasek, “Plasma chromatographytm -a new dimension for gas chromatography and mass spectrometry”, *J. Chromatogr. Sci.*, c. 8, sayı 6, ss. 330–337, 1970, doi: 10.1093/chromsci/8.6.330.
- [75] W. Vautz, D. Zimmermann, M. Hartmann, J. I. Baumbach, J. Nolte, ve J. Jung, “Ion mobility spectrometry for food quality and safety”, *Food Addit. Contam.*, c. 23, sayı 11, ss. 1064–1073, 2006, doi: 10.1080/02652030600889590.



- [76] R. G. Ewing, D. A. Atkinson, G. A. Eiceman, ve G. J. Ewing, "A critical review of ion mobility spectrometry for the detection of explosives and explosive related compounds", *Talanta*, c. 54, ss. 515–529, 2001.
- [77] M. A. Mäkinen, O. A. Anttalainen, ve M. E. T. Sillanpää, "Ion mobility spectrometry and its applications in detection of chemical warfare agents", *Anal. Chem.*, c. 82, sayı 23, ss. 9594–9600, 2010, doi: 10.1021/ac100931n.
- [78] G. A. Eiceman, M. E. Fleischer, ve C. S. Leasure, "Sensing of Petrochemical Fuels in Soils Using Headspace Analysis with Photoionization-Ion Mobility Spectrometry", *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, c. 28, sayı 4, ss. 279–296, 1987, doi: 10.1080/03067318708079829.
- [79] J. I. Baumbach, D. Berger, J. W. Leonhardt, ve D. Klockow, "Ion mobility sensor in environmental analytical chemistry - concept and first results", *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, c. 52, sayı 1–4, ss. 189–193, 1993, doi: 10.1080/03067319308042859.
- [80] G. A. Eiceman, E. G. Nazarov, B. Tadjikov, ve R. A. Miller, "Monitoring Volatile Organic Compounds in Ambient Air inside and outside Buildings with the Use of a Radio-Frequency-Based Ion-Mobility Analyzer with a Micromachined Drift Tube", *F. Anal. Chem. Technol.*, c. 4, sayı 6, ss. 297–308, 2000, doi: 10.1002/1520-6521(2000)4:6<297::aid-fact50>3.0.co;2-h.
- [81] D. E. Clemmer ve M. F. Jarrold, "Ion mobility measurements and their applications to clusters and biomolecules", *J. Mass Spectrom.*, c. 32, sayı 6, ss. 577–592, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1096-9888(199706)32:6<577::AID-JMS530>3.0.CO;2-4.
- [82] S. J. Valentine vd., "Toward plasma proteome profiling with ion mobility-mass spectrometry", *J. Proteome Res.*, c. 5, sayı 11, ss. 2977–2984, 2006, doi: 10.1021/pr060232i.
- [83] E. W. McDaniel, D. W. Martin, ve W. S. Barnes, "Drift tube-mass spectrometer for studies of low-energy ion-molecule reactions", *Rev. Sci. Instrum.*, c. 33, sayı 1, ss. 2–7, 1962, doi: 10.1063/1.1717656.
- [84] J. W. Lee, "Basics of ion mobility mass spectrometry", *Mass Spectrom.*

- Lett.*, c. 8, sayı 4, ss. 79–89, 2017, doi: 10.5478/MSL.2017.8.4.79.
- [85] R. Cumeras, E. Figueras, C. E. Davis, J. I. Baumbach, ve I. Gràcia, “Review on Ion Mobility Spectrometry. Part 1: Current instrumentation”, *Analyst*, c. 140, sayı 5, ss. 1376–1390, 2015, doi: 10.1039/c4an01100g.
- [86] M. Atakay, “MODEL SENTETİK POLİMERLERİN VE KOMPLEKSLERİNİN GAZ FAZI KARAKTERİSTİKLERİNİN İNCELENMESİ”.
- [87] V. D’Atri *vd.*, “Adding a new separation dimension to MS and LC–MS: What is the utility of ion mobility spectrometry?”, *J. Sep. Sci.*, c. 41, sayı 1, ss. 20–67, 2018, doi: 10.1002/jssc.201700919.
- [88] K. A. Morrison ve B. H. Clowers, “Contemporary glycomic approaches using ion mobility–mass spectrometry”, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, c. 42, ss. 119–129, 2018, doi: 10.1016/j.cbpa.2017.11.020.
- [89] F. Fernandez-Lima, D. A. Kaplan, J. Suetering, ve M. A. Park, “Gas-phase separation using a trapped ion mobility spectrometer”, *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.*, c. 14, sayı 2, ss. 93–98, 2011, doi: 10.1007/s12127-011-0067-8.
- [90] F. A. Fernandez-Lima, D. A. Kaplan, ve M. A. Park, “Note: Integration of trapped ion mobility spectrometry with mass spectrometry”, *Rev. Sci. Instrum.*, c. 82, sayı 12, ss. 12–15, 2011, doi: 10.1063/1.3665933.
- [91] F. Fernandez-Lima, “Trapped Ion Mobility Spectrometry: past, present and future trends”, *Int. J. Ion Mobil. Spectrom.*, c. 19, sayı 2–3, ss. 65–67, 2016, doi: 10.1007/s12127-016-0206-3.
- [92] K. Michelmann, J. A. Silveira, M. E. Ridgeway, ve M. A. Park, “Fundamentals of trapped ion mobility spectrometry”, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, c. 26, sayı 1, ss. 14–24, 2014, doi: 10.1007/s13361-014-0999-4.
- [93] J. A. Silveira, K. Michelmann, M. E. Ridgeway, ve M. A. Park, “Fundamentals of Trapped Ion Mobility Spectrometry Part II: Fluid Dynamics”, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, c. 27, sayı 4, ss. 585–595, 2016, doi: 10.1007/s13361-015-1310-z.
- [94] C. J. Gray *vd.*, “Applications of ion mobility mass spectrometry for high

- throughput, high resolution glycan analysis”, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, c. 1860, sayı 8, ss. 1688–1709, 2016, doi: 10.1016/j.bbagen.2016.02.003.
- [95] T. Wyttenbach, P. R. Kemper, G. Baykut, M. A. Park, ve M. T. Bowers, “A new instrument with high mass and high ion mobility resolution”, *Int. J. Mass Spectrom.*, c. 434, ss. 108–115, 2018, doi: 10.1016/j.ijms.2018.09.008.
- [96] D. R. Hernandez, J. D. DeBord, M. E. Ridgeway, D. A. Kaplan, M. A. Park, ve F. Fernandez-Lima, “Ion dynamics in a trapped ion mobility spectrometer”, *Analyst*, c. 139, sayı 8, ss. 1913–1921, 2014, doi: 10.1039/c3an02174b.
- [97] M. E. Ridgeway, M. Lubeck, J. Jordens, M. Mann, ve M. A. Park, “Trapped ion mobility spectrometry: A short review”, *Int. J. Mass Spectrom.*, c. 425, ss. 22–35, 2018, doi: 10.1016/j.ijms.2018.01.006.
- [98] W. Jiang ve R. A. S. Robinson, “Ion Mobility-Mass Spectrometry”, *Encycl. Anal. Chem.*, 2013, doi: 10.1002/9780470027318.a9292.
- [99] H. M. Kayili, N. Barlas, M. Atakay, ve B. Salih, “Fast purification of glycans and glycopeptides using silk-packed micropipette tip for matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection analysis”, *Microchem. J.*, c. 139, ss. 492–499, 2018, doi: 10.1016/j.microc.2018.03.034.
- [100] C. G. Vasilopoulou *vd.*, “Trapped ion mobility spectrometry and PASEF enable in-depth lipidomics from minimal sample amounts”, *Nat. Commun.*, c. 11, sayı 1, ss. 1–11, 2020, doi: 10.1038/s41467-019-14044-x.
- [101] Y. Yamaguchi, W. Nishima, S. Re, ve Y. Sugita, “Confident identification of isomeric N-glycan structures by combined ion mobility mass spectrometry and hydrophilic interaction liquid chromatography”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, c. 26, sayı 24, ss. 2877–2884, 2012, doi: 10.1002/rcm.6412.
- [102] S. Re *vd.*, “Characterization of Conformational Ensembles of Protonated N-glycans in the Gas-Phase”, *Sci. Rep.*, c. 8, sayı 1, ss. 1–10, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-20012-0.

- [103] C. S. Lane *vd.*, “Separation of sialylated glycan isomers by differential mobility spectrometry”, *Anal. Chem.*, c. 91, sayı 15, ss. 9916–9924, 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b01595.
- [104] A. Barroso, E. Giménez, A. Konijnenberg, J. Sancho, V. Sanz-Nebot, ve F. Sobott, “Evaluation of ion mobility for the separation of glycoconjugate isomers due to different types of sialic acid linkage, at the intact glycoprotein, glycopeptide and glycan level”, *J. Proteomics*, c. 173, sayı November 2017, ss. 22–31, 2018, doi: 10.1016/j.jprot.2017.11.020.
- [105] M. Guttman ve K. K. Lee, “Site-Specific Mapping of Sialic Acid Linkage Isomers by Ion Mobility Spectrometry”, *Anal. Chem.*, c. 88, sayı 10, ss. 5212–5217, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b00265.

