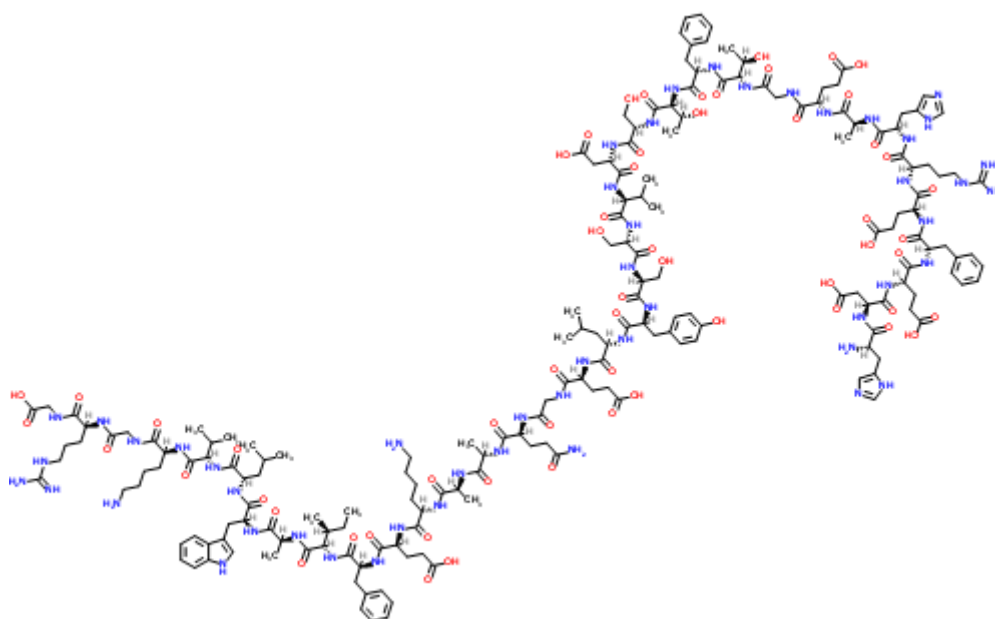




Jonmobilitetskopplad masspektrometri för karaktärisering av peptidbaserade läkemedel

Kandidatarbete 2018, KBTX10-18-03

Helena Bengtsson
Firat Koca
Emma Linsten
Kristin Oskarsdotter
Ajša Sedić
Olivia Stenman

Institutionen för Kemi och kemiteknik
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige, 2018

KANDIDATARBETE 2018: KBTX10-18-03

Jonmobilitetskopplad masspektrometri för karaktärisering av peptidbaserade läkemedel

Helena Bengtsson
Firat Koca
Emma Linsten
Kristin Oskarsdotter
Ajša Sedić
Olivia Stenman

14 maj 2018



CHALMERS

Institutionen för Kemi och kemiteknik
Analytisk kemi
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige, 2018

Jonmobilitetskopplad masspektrometri för karaktärisering av peptidbaserade läkemedel

HELENA BENGTTSSON - helbeng@student.chalmers.se

FIRAT KOCA - koca@student.chalmers.se

EMMA LINSTEN - emmlins@student.chalmers.se

KRISTIN OSKARSDOTTER - kiosk@student.chalmers.se

AJŠA SEDIĆ - ajsa@student.chalmers.se

OLIVIA STENMAN - oliste@student.chalmers.se

© HELENA BENGTTSSON, 2018

© FIRAT KOCA, 2018

© EMMA LINSTEN, 2018

© KRISTIN OSKARSDOTTER, 2018

© AJŠA SEDIĆ, 2018

© OLIVIA STENMAN, 2018

Handledare: Per Malmberg, Institutionen för Kemi och kemiteknik, Analytisk kemi

Handledare: Lena von Sydow, AstraZeneca

Examinator: Nikola Marković, Institutionen för Kemi och kemiteknik, Fysikalisk kemi

Omslagsbild: Bild på peptiden GLP-1. Från [1]. Återgiven med tillstånd.

Bilder som saknar referenshänvisning är egenproducerade och fullständiga rättigheter ägs av författare av detta dokument.

Kandidatarbete 2018: KBTX10-18-03

Institutionen för Kemi och kemiteknik

Analytisk kemi

Chalmers tekniska högskola

SE-412 96 Göteborg

Telefon +46 31 772 1000

Göteborg, Sverige, 2018

Förord

Denna rapport är ett kandidatarbete vid programmen för Bioteknik samt Kemi-teknik vid Chalmers tekniska högskola. Arbetet har genomförts under vårterminen 2018 i ett samarbete mellan Chalmers tekniska högskola och AstraZeneca.

Under arbetets gång har vår handledare Per Malmberg vid Analytisk kemi på Chalmers tekniska högskola erbjudit ett stort stöd och vi vill tacka honom för hans engagemang, goda samarbete och tillgänglighet under hela arbetsprocessen.

Vi vill också rikta ett tack till Lena von Sydow på AstraZeneca i Mölndal för hennes stora engagemang, intresse för detta projekt och hjälp med det laborativa arbetet.

Vidare vill vi tacka Tomas Leek på AstraZeneca för hans bidrag till detta projekt genom sin sakkunnighet om ämnet.

Ion mobility coupled mass spectrometry for characterization of therapeutic peptides

Abstract

Therapeutic peptides are useful to society and individuals as they provide a more efficient treatment of many diseases compared to conventional pharmaceuticals. A powerful analytic method with high resolution, for example ion mobility coupled with mass spectrometry, is required to analyze these peptides. The aim of this study was to investigate if ion mobility coupled with liquid chromatography mass spectrometry could be used to determine the characteristics of selected therapeutic peptides based on their collision cross section. A characterization of these therapeutic peptides would potentially enable the prediction of peptide properties. Ideally, trends would be observed between groups of peptides. The peptides were categorized after their structure and ionic charge. By plotting parameters of the peptides against observed collision cross section values, the results showed significant trends within groups of peptides with the same ionic charge but not between peptides of similar primary structure. Further studies are necessary to investigate how characteristics of peptides can be accurately predicted based on ionic charge and if other structure classifications are more appropriate.

Keywords: ion mobility, massspectrometry, therapeutic peptides, collision cross section, characterization.

Sammanfattning

Peptidbaserade läkemedel är av nytta för samhälle och individ då de erbjuder mer effektiv behandling av många sjukdomar jämfört med konventionella läkemedel. För att analysera peptiderna krävs en kraftfull analysmetod med hög upplösning, som exempelvis jonmobilitetskopplad masspektrometri. Syftet med studien var att undersöka om jonmobilitetskopplad masspektrometri kan användas för att karaktärisera valda peptider använda som läkemedel baserat på deras kollisionstvårsnitt. En karaktärisering av dessa läkemedel skulle potentiellt kunna förutsäga nya peptiders egenskaper. Idealt skulle samband kunna observeras mellan grupper av peptider. Peptiderna sorterades efter struktur och jonladdning. Genom att plotta de erhållna parametrarna för peptiderna mot deras kollisionstvårsnitt visade resultatet signifikanta samband inom grupper av peptider med samma jonladdning men inte med liknande struktur. Vidare studier är nödvändiga för att utreda hur peptiders egenskaper konkret kan förutsägas med avseende på jonladdning och även om andra strukturindelningar är mer lämpliga.

Innehåll

1	Inledning	1
1.1	Bakgrund	2
1.2	Syfte och mål	3
1.3	Avgränsningar	3
2	Teori	4
2.1	Vätskekromatografisk masspektrometri	4
2.2	Jonmobilitet	5
2.2.1	Kollisionstvärsnitt (CCS)	6
2.3	Peptider som biologiska läkemedel	6
2.3.1	Peptidbaserade läkemedel i samhället	8
3	Metod	10
3.1	Litteraturstudier	10
3.2	Laboration	12
3.3	Databehandling och kategorisering	13
4	Resultat	14
5	Diskussion	22
5.1	Analys av resultat	22
5.2	Felkällor	24
5.3	Samhälleliga och etiska aspekter	24
5.4	Framtida möjligheter och fortsatta studier	25
6	Slutsats	26

1 Inledning

Förståelsen för sjukdomars uppkomst har ökat markant under senare årtionden och med detta även kunskapen om hur de ska behandlas. Läkemedelstillverkningen har därför genomgått ett skifte där de etablerade, enkla substanserna ersätts eller kompletteras med mer komplexa substanser med syftet att förbättra kvaliteten, effektiviteten samt öka säkerheten för individen [2], [3]. Historiskt har läkemedelssubstanser varit relativt små och ospecifika molekyler, så kallade småmolekylära läkemedel (*small molecular drugs*, SMD), som istället för att hamna i en specifik vävnad har spridits i hela kroppen [4], [5]. Dagens mer komplexa läkemedelssubstanser kan specialanpassas för att behandla en viss typ av vävnad och därmed endast verka där de behövs [6]. Dessa nya läkemedel kallas för biologiska läkemedel och omfattar medicinska substanser som har ursprung i eller är syntetiserade från biologiska källor [7].

Peptidbaserade läkemedel är ett välstuderat område inom biologiska läkemedel och är av kliniskt intresse. Det existerar redan godkända peptidbaserade läkemedel på marknaden mot bland annat benskörhet, cancer, inkontinens samt hjärt- och kärlsjukdomar [8]. En stor fördel med peptidbaserade läkemedel är att en lägre dos krävs då läkemedlet inte sprids i hela kroppen [9]. Biologiska läkemedel, som peptider, behöver dessutom inte administreras lika ofta som SMD utan ges vanligtvis varannan vecka eller till och med en gång i månaden [10].

För att bättre förstå distributionen av administrerade läkemedel i kroppen krävs en analysmetod med kapacitet att analysera komplexa substanser samt prov med komplex sammansättning, som till exempel blod. I dagsläget tillämpas olika metoder, som exempelvis kärnmagnetisk resonans (*nuclear magnetic resonance*, NMR) eller vätskekromatografisk masspektrometri, för analys av biokemiska molekyler. NMR är en väletablerad metod där atomers interaktion med ett elektromagnetiskt fält ger information om molekylen de ingår i. Metoden kan därför användas för att identifiera molekylers struktur och sammansättning inom till exempel sjukvård, organisk kemi och biokemi. NMR är dock inte utan brister, då analysen kan ta lång tid och kräver mycket analyt för att utföras vilket kan ge en ökad kostnad [11]. Vätskekromatografisk masspektrometri kräver däremot en mindre mängd analyt och är en kraftfull metod för kvalitativ och kvantitativ analys av molekyler i ett prov. Från analys med vätskekromatografisk masspektrometri erhålls information om molekylers struktur, massa samt provets sammansättning med avseende på isotoper. Problem uppstår när provet är en komplex blandning av molekyler med liknande massor eftersom konventionell masspektrometri har svårt att särskilja dem. För en mer exakt analys krävs därför en metod med lika hög pålitlighet som tidigare nämnda metoder men som ger mer information [12].

Jonmobilitet har visats användbart i kombination med masspektrometri [11]. Vid en tidigare studie av stora proteinkomplex observerades samband inom grupper med liknande struktur med hjälp av jonmobilitetskopplad masspektrometri. Resultatet visade att det gick att särskilja de undersökta proteinstrukturerna. Detta indikerar att jonmobilitetskopplad masspektrometri kan karaktärisera proteinkomplex med avseende på vilken struktur de har [13]. Det är därför även av intresse att undersöka eventuella samband inom grupper av peptider på grund av deras signifikans inom läkemedelstillverkning.

Jonmobilitetskopplad masspektrometri har också använts för att bestämma sammansättningen av blod med avseende på metaboliter, som är nedbrytningsprodukter från cellens metabolism. Analysen gav en detaljerad och mer komplett bild av provets innehåll, då mycket låga koncentrationer av metaboliter kunde detekteras och kvantifieras. Dessa skulle vid analys med konventionell masspektrometri troligtvis registreras som bakgrundsbrus. Studien visade även att det gick att skilja på klasser av metaboliter som till exempel aminosyror, fettsyror och kolhydrater. Då det var möjligt att observera liknande samband mellan metaboliter av olika slag är det intressant att se om liknande resultat går att erhålla även med peptider. Vidare behövdes endast en mycket liten mängd prov för att erhålla resultat och analystiden var mycket kort, vilket ytterligare talar för metodens praktiska nytta [14].

1.1 Bakgrund

AstraZeneca är ett stort bioläkemedelsföretag som delvis forskar kring biologiska läkemedel. Stort fokus ligger på att hitta behandlingar för bland annat cancer, hjärt- och kärlsjukdomar samt neurologiska sjukdomar [15]. För att underlätta analys av dessa läkemedel utförs ett samarbete mellan Chalmers tekniska högskola och AstraZeneca. Det främsta önskemålet från AstraZeneca var att undersöka om karaktärisering av peptidbaserade läkemedel kunde utföras med avseende på jonladdning och struktur då dessa var mest relevanta för AstraZenecas pågående forskning. De analyserade peptiderna valdes ut av AstraZeneca baserat på deras relevans för företaget. AstraZenecas mål och förhoppning är att karaktärisering av peptider ska bidra till vidare forskning för att på sikt kunna förutsäga en nysyntetiserad molekyls egenskaper, samt eventuellt identifiera en okänd förorening från en peptidsyntes med hjälp av uppmätta parametrar.

1.2 Syfte och mål

Studien syftar till att undersöka om jonmobilitetskopplad masspektrometri kan användas för att karaktärisera peptider och särskilja dem med avseende på struktur och laddning. Genom att analysera parametrar erhållna från analys samt från litteraturvärden utreds eventuella samband som sedan kan kopplas till karaktäriseringen. Potentiellt är karaktäriseringen av peptider användbar för att förutsäga peptiders egenskaper som exempelvis cellpermeabilitet, struktur och beteende i kroppen.

Långsiktigt är målet att metoden skall kunna tillämpas för att karaktärisera peptider och via detta förutsäga hur de kommer bete sig i kroppen. Detta kan potentiellt leda till att utvecklingen av biologiska läkemedel underlättas.

1.3 Avgränsningar

Avgränsningar utförs i första hand med avsikt att minska tiden för det laborativa arbetet genom att enbart analysera peptidbaserade läkemedel, trots att även andra biologiska läkemedel ursprungligen var av intresse. Analysen baseras enbart på kommersiella peptider och inte peptider ägda av AstraZeneca, delvis för att minska analystid men även av sekretesskäl. Antal peptider begränsas med syfte att minska kostnaden för projektet. Valet av antal peptider är en avvägning mellan att välja tillräckligt många för att kunna se eventuella samband samt ha tid för databehandling.

2 Teori

Nedan förklaras principer och teori bakom centrala delar. Avsnittet berör vätskekromatografisk masspektrometri, jonmobilitet och peptider som biologiska läkemedel.

2.1 Vätskekromatografisk masspektrometri

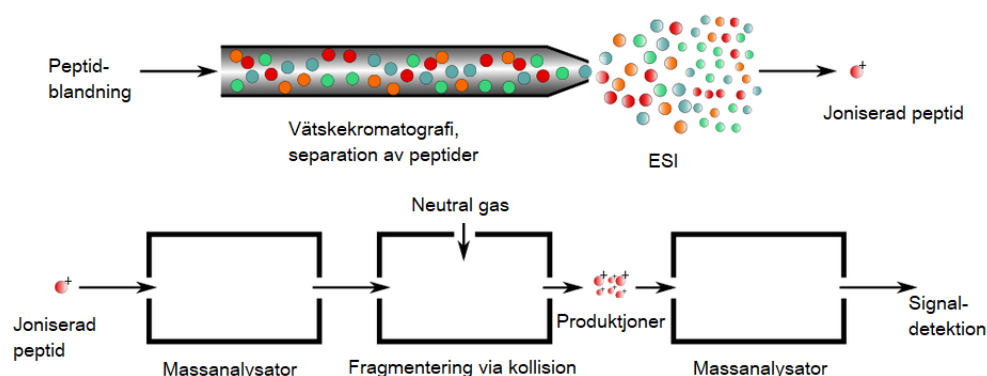
En masspektrometer utför separation av joner i gasfas, där separationen beror på förhållandet mellan massa och laddning, betecknat m/z . Masspektrometri är användbart vid kvantitativ och kvalitativ analys, det vill säga bestämning av ett ämnes exakta massa och analys av provets renhet. I kombination med masspektrometri används ofta vätskekromatografi för att separera molekyler i provet [16]. En typ av vätskekromatografi är omvänd faskromatografi (*reverse phase chromatography*) som eluerar molekyler efter polaritet genom att utnyttja attraktionen som existerar mellan molekyler med lika polaritet. Molekyler transporteras med en polär, mobil vätskefas genom en opolär stationärfas. De opolära molekylerna i den mobila fasen retarderas genom attraktion till stationärfasen, vilket innebär att de polära molekylerna elueras snabbare [17]. Tiden det tar för molekylen att elueras genom kolonnen kallas för retentionstid [18].

Analysprocessen med vätskekromatografisk masspektrometri är uppbyggd kring tre moment: jonisering av analyt, separation samt detektion av bildade joner [16]. Separering av molekyler med vätskekromatografi sker som ett första steg innan analys med masspektrometri påbörjas och sker oftast i samverkan med joniseringen av molekylerna [19]. Jonisering av analyt kan ske på olika sätt beroende på vilken jonkälla som valts. En jonkälla som är lämplig vid analys av biokemiska molekyler som proteiner, biopolymerer och små polära molekyler är elektrosprejjonisering (*electrospray ionization*, ESI) [20]. ESI är lämplig vid biokemiska analyser eftersom jonisering av analyt sker utan att fragmentera molekylerna, då det är viktigt att bevara molekylens struktur inför separation [16].

Nästa steg i analysprocessen är separation av de bildade jonerna, vilket görs i massanalysatorn. En massanalysator använder sig av ett elektriskt och ett magnetiskt fält för att separera jonerna utefter deras m/z . Ofta används flera massanalysatorer för att få en klarare separation, vilket kallas tandem-masspektrometri (MS/MS). En vanlig kombination av massanalysatorer är att använda kvadropol (*quadrupole*) och flygtid (*time-of-flight*, TOF). En kvadropol separerar jonerna genom att mäta deras förmåga att ta sig igenom ett oscillerande elektriskt fält. Kvadropolen kan agera både som ett selektivt jonfilter men även som en kollisioncell för att fragmentera stora joner och studera deras uppbyggnad. TOF använder istället ett elektriskt fält för att accelerera jonerna och sedan mäta den tid det tar för jonerna att avstanna i ett fältfritt område. En kombination av dessa analysatorer medför en klarare fragmentering och därmed ett mer högupplöst masspektrum [16].

Efter separationen passerar jonerna en detektor som transformerar dem till en detekterbar signal, vilket producerar ett masspektrum där intensitet av de infallande jonerna plottas mot m/z . Masspektrumet representerar alltså fördelningen av joner relativt deras massor i form av toppar [16].

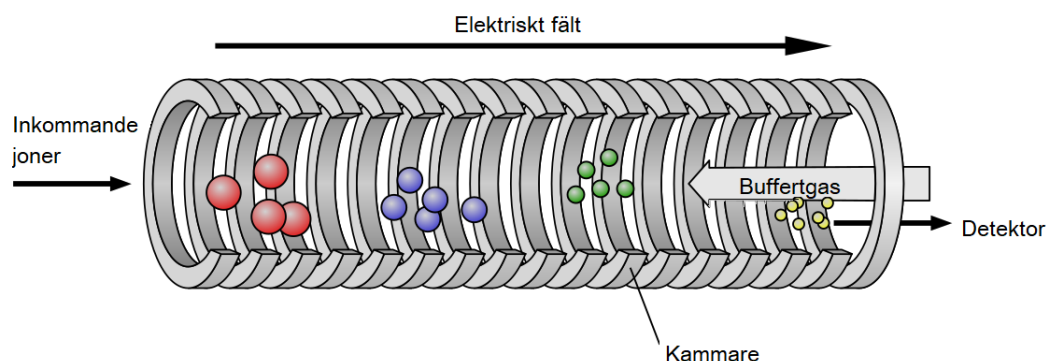
Masspektrometers uppbyggnad åskådliggörs i figur 2.1.



Figur 2.1. Schematisk bild av principen för MS/MS. Från [21]. Omarbetad med tillstånd.

2.2 Jonmobilitet

Jonmobilitet separerar joner efter storlek genom acceleration i en kammare med oladdad, inert buffertgas enligt figur 2.2.



Figur 2.2. Schematisk bild av jonflödet genom jonmobilitetskammaren. Från [22]. Omarbetad med tillstånd.

Kollisioner mellan joner och gasmolekyler leder till en kraftigare retardation av större joner. Detta medför att större joner får en längre drifttid, vilket är jonmobilitetens motsvarighet till retentionstid. Vidare kommer det elektriska fältet utöva starkare påverkan på joner med högre laddning, som accelererar deras färd genom kammaren. På så vis separeras joner både med avseende på storlek och laddning. Under

givna förhållanden kommer jonerna separeras enligt deras kollisionstvärnsnitt (*collision cross section*, CCS), vilket kan relateras till mobiliteten och tillför ytterligare en dimension till masspektrometerns resultat [20].

2.2.1 Kollisionstvärnsnitt (CCS)

CCS beror av jonens geometriska struktur och dess interaktion med buffertgasmolekylerna genom olika typer av kollisioner. En gasmolekyl och en jon kan exempelvis kollidera med stor kontaktyta eller endast vidröra varandra, vilket kommer påverka hur mycket jonen retarderas. För större joner kan även gasmolekylerna kollidera flera gånger inuti jonens struktur, vilket också har inverkan på retardationsgraden [23]. Matematiskt kvantifieras CCS som en area, ofta mätt i $[\text{\AA}^2]$ [20], men är även en beskrivande parameter för hur joner interagerar med buffertgasen och det elektriska fältet. CCS ger därför även information om jonens tredimensionella struktur och inte enbart area [23]. Drifftiden beror utöver antal kollisioner och jonstorlek också på jonens laddning [13].

CCS-värdets beroende av elektriskt fält, typ av buffertgas och temperatur åskådliggörs i ekvationen nedan:

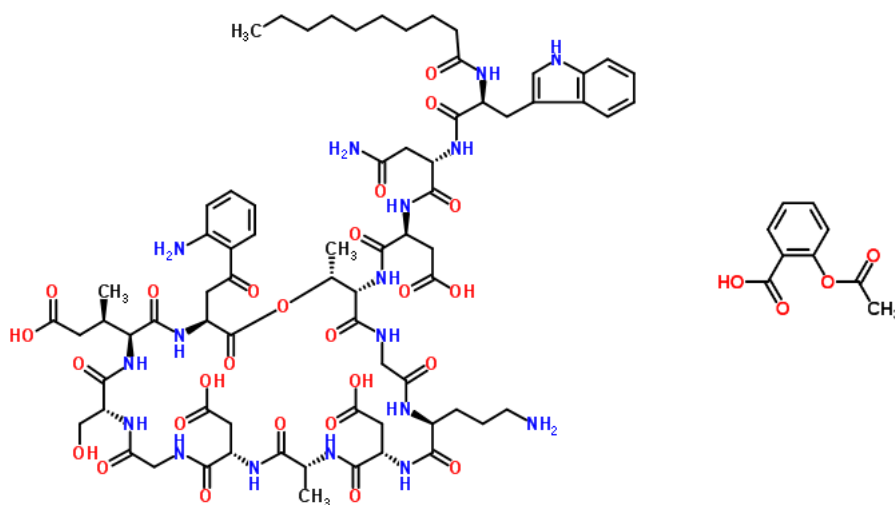
$$\Omega_D = \frac{3}{16} \left(\frac{2\pi}{\mu kT} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{eE}{v_d N} \quad (2.1)$$

där μ är den reducerade massan för jonen och gasmolekylen, k är Boltzmanns konstant, T är den absoluta temperaturen, e är jonens laddning, E är styrkan på det elektriska fältet, v_d är den terminala drifhastigheten för jonen som ges av drifftiden och längden på drifftuben och N är antalsdensiteten, antalet joner i en viss volym [24]. Värdet på CCS är alltså inte en inneboende egenskap hos jonen men är starkt kopplad till dess faktiska tvärnsnitt [23].

2.3 Peptider som biologiska läkemedel

En peptid definieras som en sekvens bestående av färre än femtio aminosyror. Längre sekvenser definieras som ett protein [4]. Aminosyrasekvensens ändar benämns N- och C-terminal, där N-terminalen är änden på en aminosyra som har en fri aminogrupp och C-terminalen avser änden som har en fri karboxylgrupp [25]. Peptider bildas genom att aminosyror binder till andra aminosyror N- eller C-terminaler via en peptidbindning. Beroende på omgivande faktorer och interaktioner mellan sidokedjor kan peptider anta olika former genom att veckas [26]. De enskilda aminosyrorna som bygger upp peptiderna är hydrofoba, hydrofila eller laddade och veckningen påverkas beroende på vilken karaktär en aminosyra har [27]. Veckningen påverkas också av vilken typ av lösningsmedel som används. I till exempel en vattenlösning kommer en peptids veckning påverkas av fördelningen av hydrofila och hydrofoba aminosyror. Laddade aminosyror kan påverkas av ändringar i pH och kommer därför förekomma i olika laddningstillstånd, vilket även påverkar veckningen då elektrostatiska repulsioner och attraktioner kommer ändra peptidens form [28], [29].

Peptider är relevanta för läkemedelsutveckling på grund av deras varierande egenskaper och betydande roller i den mänskliga kroppen, där de till exempel fungerar som hormoner [6], [9]. Många peptider är selektiva signalmolekyler som kan binda till specifika receptorer på cellytan eller på cellens insida. Receptorerna agerar som mottagare av signaler från utsidan av cellen och vidarebefordrar informationen till insidan. Beroende på typ av receptor kommer interaktion med en ligand framkalla olika reaktioner hos cellen, och reaktion kommer endast inträffa om interaktion mellan receptor och ligand sker. Receptorerna är oftast mycket specifika då endast en eller ett fåtal ligander, som kan vara en peptid, korresponderar med samma typ av receptor. De är även specifika för celltyp då olika celler har olika receptorer, en egenskap som utgör en betydande roll för peptiders relevans som läkemedel [30]. Peptider kan också verka genom att interagera direkt med andra molekyler inuti cellen men måste kunna passera cellmembranet och hindras då oftast av sin storlek. Mindre molekyler såsom joner, aminosyror och socker kan passera cellmembranet genom diffusion eller via specialiserade transportproteiner men större molekyler har sällan den förmågan [31]. Problemet blir uppenbart vid jämförelse av storleken på ett SMD som acetylsalicylsyra och exempelvis peptiden daptomycin, se figur 2.3.



Figur 2.3. Jämförelse av strukturerna för daptomycin (vänster) och acetylsalicylsyra (höger). Från [32] respektive [33]. Återgivna med tillstånd.

Acetylsalicylsyra är ett exempel på ett SMD, då den endast består av 21 atomer [34]. Som figur 2.3 visar är det stor skillnad mellan en peptid som daptomycin och acetylsalicylsyra, då daptomycin delvis består av fler atomer men också är mer strukturellt komplex än acetylsalicylsyra. Det har observerats samband mellan peptiders form och deras cellpermeabilitet och därför utforskas cellpenetrerande peptider (*cell penetrating peptides*, CPP) allt mer [35].

CPP är små peptider kapabla att passera cellmembranet och används ofta för att föra in andra substanser i cellen genom att omsluta dem. CPP är ofta cykliska peptider och består vanligen av många positivt laddade aminosyror eller en jämn fördelning av hydrofoba och hydrofila aminosyror. Exakt hur CPP tas upp av cellen är till största del okänt, men cellpermeabiliteten tros vara relaterad till deras storlek och fysiokemiska egenskaper [36]. Just cykliska peptider har många fördelar som läkemedel då deras struktur tillåter dem att agera mer som SMD och mindre som peptider, vilket leder till ett mer effektivt upptag och systemisk fördelning. Cykliska peptider binder med hög affinitet till sina mål och är, som andra peptidbaserade läkemedel, mycket selektiva. På grund av dessa egenskaper har många cykliska peptider nått framgång som läkemedel, till exempel longastatin, vasopressin och daptomycin, vilka är exempel på CPP [37].

Generellt uppvisar peptidbaserade läkemedel fördelar när det gäller styrka, selektivitet och få biverkningar jämfört med SMD [6]. Metaboliterna från peptidbaserade läkemedel är aminosyror som inte ackumuleras i övriga vävnader, vilket metaboliter från SMD kan göra [4]. Nedbrytningsprodukterna från SMD kan bli så kallade aktiva metaboliter, vars uppkomst kan upptäckas långt efter läkemedlet godkännts för mänskligt bruk. Dessa nedbrytningsprodukter är ofta mer reaktiva än ursprungsmolekylen. Beroende på typ av läkemedel kan aktiva metaboliter orsaka oönskade biverkningar som exempelvis ökad risk för allergiska reaktioner [10]. Peptidbaserade läkemedel kan därför vara önskvärda för att minimera risken för dessa biverkningar [6].

Med peptidbaserade läkemedel uppstår utmaningar då peptider generellt är kemiskt och fysikaliskt instabila samt har en tendens att aggregera vilket påverkar deras funktion [6]. Vidare är peptider känsliga mot yttre påverkan som pH, temperatur och övriga nedbrytande faktorer vilket försvårar oral administration av läkemedlet och de flesta peptidbaserade läkemedel administreras därför intravenöst [38]. Genom modifiering av naturligt förekommande peptider kan fysiska och kemiska egenskaper förbättras. Ett sätt att modifiera peptider är exempelvis genom att bilda konjugat med antikroppar eller med SMD [6], [9]. Framsteg inom modifikation av peptider skapar också möjligheter att utveckla multifunktionella peptider, en möjlighet som ytterligare breddar peptiders användbarhet som terapeutiska medel [6].

2.3.1 Peptidbaserade läkemedel i samhället

Idag används peptidbaserade läkemedel främst för behandling av metaboliska och onkologiska sjukdomar såsom diabetes och cancer [6]. Ett exempel på en peptid som behandlar typ 2 diabetes är GLP-1. Efter en måltid frisätts GLP-1 från tarmen, vilken stimulerar frisättningen av insulin och har en dämpande effekt på glukagon som i sin tur motverkar insulin [39], [40], [41]. Individer med typ 2 diabetes kan behandlas med derivat till GLP-1 för att stimulera frisättningen av insulin. En fördel med GLP-1 är att den till skillnad från tidigare läkemedel mot diabetes inte leder till ökad kroppsvikt och endast sänker blodsockret vid för höga halter, vilket innebär att patienten inte hamnar i ett tillstånd med för låg blodsockerhalt [40].

Peptidbaserade läkemedel medför flera fördelar för läkemedelsutvecklingen jämfört med SMD. En sådan fördel är att de i högre grad godkänns av myndigheterna för att lanseras på marknaden. Detta framgick tydligt år 2013 då andelen lyckade försök att lansera ett läkemedel var dubbelt så hög för peptidbaserade läkemedel jämfört med SMD. Vidare har flera peptidbaserade läkemedel hög ekonomisk omsättning [42]. Ett peptidbaserat läkemedel som har uppnått stor kommersiell framgång är VictozaTM som behandlar typ 2 diabetes med den verksamma substansen liraglutid vilken är en analog till GLP-1 [6]. Peptidbaserade läkemedel är dock inte helt utan brister, då komplexiteten leder till en högre produktionskostnad jämfört med SMD [9].

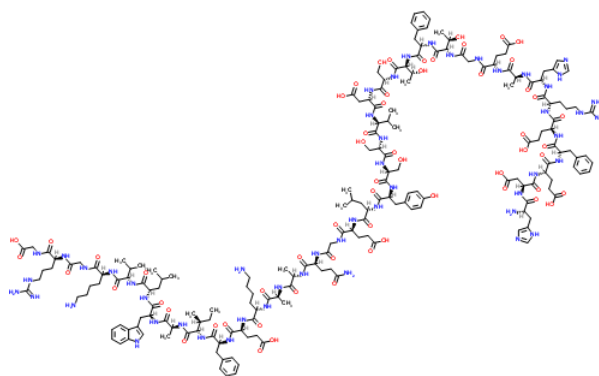
3 Metod

I följande avsnitt redovisas arbetsprocessen som delats in i följande tre områden: litteraturstudier, laboration samt databehandling och kategorisering.

3.1 Litteraturstudier

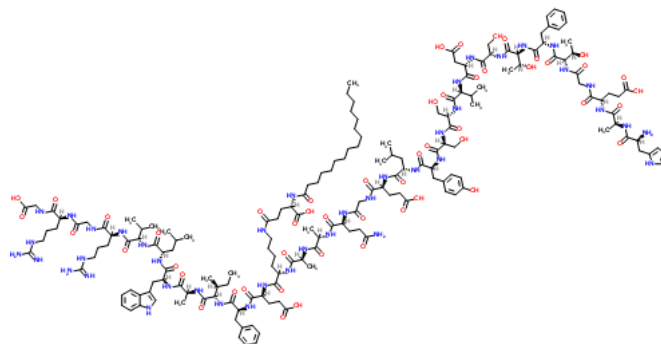
Under hela arbetets gång genomfördes litteraturstudier kring instrument, analysmetod samt peptidbaserade läkemedel. Huvudsakligen användes sökverktygen *Scopus* och *Google Scholar* för att hitta lämpliga referenser. För litteraturvärden om peptiderna användes databaserna *PubChem* och *Chemspider*. Ett fåtal av peptiderna saknades på databaserna och därför hämtades litteraturvärden för dessa från *Bachems* webbsida.

Peptiderna som valts för analys var en blandning av både naturligt förekommande och modifierade peptider. De sorterades efter två huvudsakliga grupper: jonladdning och struktur. Med jonladdning avses molekylens laddningstillstånd, det vill säga antalet laddningar som joniseringen från masspektrometrin orsakat på molekylen. Dessa två indelningar var basen för databehandling och parametrarna plottades därför i två omgångar. Analysen av peptiderna baserades på följande parametrar: antal aminosyror, molvikt, molvolym och m/z . Indelning av jonladdning genomfördes från laddning 1+ till 5+ för de parametrar där litteraturvärden existerade. Indelningen av struktur utfördes med avseende på peptidens primärstruktur, det vill säga ordningen på aminosyrorna, enligt följande kategorier: linjära, grenade, cykliska och semicykliska. En linjär peptid definierades som en rak kedja av aminosyror med sidokedjor som inte är bundna till något annat. Ett exempel på en av peptiderna som definierats som linjär kan ses i figur 3.1.



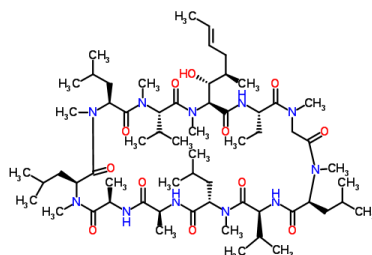
Figur 3.1. Peptiden GLP-1 som definierats som linjär. Från [1]. Återgiven med tillstånd.

I en grenad peptid har ytterligare aminosyror bundit genom att binda till sidokedjor på grundkedjan. Dessa sidokedjor har en aminogrupp eller karboxylgrupp som den nya aminosyran kan binda till med en peptidbindning. Figur 3.2 visar en grenad peptid.



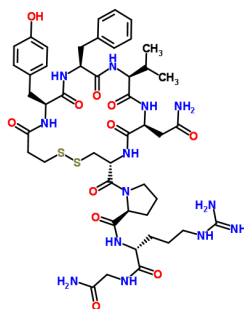
Figur 3.2. Peptiden Liraglutid som definierats som grenad. Från [43]. Återgiven med tillstånd.

Cykliska peptider är helt slutna där N-terminalen och C-terminalen har bundit till varandra med en peptidbindning. Figur 3.3 åskådliggör en cyklisk peptid.



Figur 3.3. Peptiden Cyklosporin A som definierats som cyklisk. Från [44]. Återgiven med tillstånd.

För de semicykliska peptiderna har antingen ena terminalen eller en sidokedja bundit till en annan sidokedja i grundkedjan. Ett exempel på en semicyklisk peptid illustreras i figur 3.4.



Figur 3.4. Peptiden Vasopressin som definierats som semicyklisk. Från [45]. Återgiven med tillstånd.

3.2 Laboration

För analys av peptider användes instrumentet Acquity Synapt G2-Si High Definition Mass Spectrometry från tillverkaren Waters, härnå efter refererad till som Synapt. Synapt består av en vätskekromatograf och en MS/MS där joniseringskällan är ESI och massanalysatorerna är kvadropol och TOF men består även av en jonmobilitetskomponent. Synapt analyserar provet med avseende på parametrarna retentionstid, m/z samt drifttid [46]. Kalibrering utfördes med avseende på alla tre parametrarna och därefter förbereddes plattor med brunnar fyllda med lösningar av de peptider som var av intresse. Plattorna analyserades tre gånger med något varierande pH för att säkerställa rätt miljö för peptiderna, se tabell 3.1. Inför varje analys omkalibrerades Synapt.

Tabell 3.1. pH vid analys av peptiderna.

Peptid	pH analys 1	pH analys 2	pH analys 3
Angiotensin I/II	3	10	3
Angiotensin II	3	10	3
Bacitracin	3	10	3
Bivalirudintrifluoracetat	3	3	3
Kalcitonin	3	3	3
Cyklosporin A	3	10	3
Daptomycin	3	10	3
Eledoisinacetat	3	3	3
Endotelin	3	10	3
Enfuvirtid(T-20)	3	10	3
Exenatid	3	10	3
GLP1 (7-36)	3	10	3
Goserelin	3	3	3
hCNP(1-22)	3	10	3
Lanreotidacetat	3	3	3
Leucine-enkefalin	3	10	3
Liraglutid	3	10	3
Longastatin	3	10	3
Metionin-enkefalin	3	10	3
Natriuretisk peptid	3	10	3
Neurotensin (1-11)	3	3	3
pTH (3-34)-trifluoracetat	3	10	3
Sekretin	3	3	3
Somatostatin	3	3	3
Substans P-acetat	3	3	3
Thymalfasin	3	3	3
Vankomycin	3	10	3
Vasopressin	3	3	3

Från instrumentet erhöles ett masspektrum där de experimentella värdena avlästes.

3.3 Databehandling och kategorisering

Från litteraturstudier erhöles struktur, antal aminosyror, molvolym samt molvikt och vid analys antal jonladdningar, m/z och CCS-värde för peptiderna. Värdena sorterades efter jonladdning och struktur och därefter beräknades standardavvikelse och procentavvikelse för peptiderna. Ett medelvärde av erhållna CCS-värden för varje peptid och jonladdning beräknades. Grafer konstruerades i Excel, där medelvärdena av CCS plottades mot antal aminosyror, m/z , molvikt samt molvolym baserat på både jonladdning och struktur. Trendlinjer infogades och en linjär regressionsanalys utfördes för graferna där peptider sorterades efter jonladdning. Graferna studerades med avsikt att hitta samband mellan de plottade parametrarna och sedan koppla dessa till jonladdning och struktur.

4 Resultat

I tabell 4.1 redovisas litteraturvärden samt experimentella värden för peptiderna som erhöles från analysen med jonmobilitetskopplad masspektrometri. Tabellen är sorterad främst efter jonladdning och några peptider ingår därför flera gånger då flera olika jonladdningar analyserades. Inom sorteringen efter jonladdning är peptiderna även grupperade efter struktur. Notera avsaknad av vissa molvolym i tabellen på grund av att litteraturvärden saknas.

Tabell 4.1. Värden från analys och litteraturstudie för peptidernas struktur, antal aminosyror, molvolym, molvikt, laddning, m/z samt CCS.

Peptid	Struktur	Aminosyror [antal]	Molvolym [cm ³]	Molvikt [g/mol]	Laddning [antal per jon]	Observerat m/z	CCS [Å ²]
Angiotensin I/II	Linjär	7	609,7	898,47	1+	899,4741	278
Angiotensin II	Linjär	8	726,9	1045,53	1+	1046,5431	307
Eledoisinacetat	Linjär	11		1187,60	1+	1188,6097	332
Leucin-enkefalin	Linjär	5	436,0	555,27	1+	556,2769	227
Metionin-enkefalin	Linjär	5	433,1	573,23	1+	574,2338	228
Neurotensin (1-11)	Linjär	11	948,7	1445,74	1+	1446,7494	260
Lanreotidacetat	Semicyklisk	8	781,0	1095,47	1+	1096,4750	309
Longastatin	Semicyklisk	8	730,7	1018,44	1+	1019,4497	300
Vasopressin	Semicyklisk	9	688,4	1039,44	1+	1040,4449	305
Cyklosporin A	Cyklisk	11	1183,6	1201,84	1+	1202,8492	343
Angiotensin I/II	Linjär	7	609,7	898,47	2+	450,2409	176
Angiotensin II	Linjär	8	726,9	1045,53	2+	523,7751	187
Bivalirudintrifluoracetat	Linjär	20	1431,3	2178,99	2+	1090,5026	250
Eledoisinacetat	Linjär	11		1187,60	2+	594,8083	193
Goserelin	Linjär	9	844,7	1268,64	2+	635,3293	195
Neurotensin (1-11)	Linjär	11	948,7	1445,74	2+	723,8799	205
Sekretin	Linjär	27	2011,2	3025,61	2+	1513,8107	308
Substans P-acetat	Linjär	11	944,4	1346,73	2+	674,3709	205
Bacitracin	Semicyklisk	10	994,5	1421,75	2+	711,8831	208
Daptomycin	Semicyklisk	13	1110,8	1619,71	2+	810,8646	214
Endotelin	Semicyklisk	21		2490,02	2+	1246,0172	267
hCNP (1-22)	Semicyklisk	22	1504,5	2196,09	2+	1099,0510	262
Lanreotidacetat	Semicyklisk	8	781,0	1095,47	2+	548,7413	188
Longastatin	Semicyklisk	8	730,7	1018,44	2+	510,2281	184
Natriuretisk peptid	Semicyklisk	15	1025,1	1593,76	2+	797,8901	213
Somatostatin	Semicyklisk	14	1144,2	1636,72	2+	819,3685	220
Vankomycin	Semicyklisk	7	874,7	1447,43	2+	724,7227	211
Vasopressin	Semicyklisk	9	688,4	1039,44	2+	520,7262	180
Cyklosporin A	Cyklisk	11	1183,6	1201,84	2+	601,9297	206
Enfuvirtid (T-20)	Linjär	36		4489,19	3+	1497,4034	272
Exenatid	Linjär	39		4184,03	3+	1395,6836	257
GLP1 (7-36)	Linjär	37		3295,66	3+	1099,5630	249
Neurotensin (1-11)	Linjär	11	948,7	1445,74	3+	482,9217	174
Sekretin	Linjär	27	2011,2	3025,61	3+	1009,5450	238
Substans P-acetat	Linjär	11	944,4	1346,73	3+	449,9172	174
Thymalfasin	Linjär	28	2284,5	3106,50	3+	1036,5110	236
Bacitracin	Semicyklisk	10	994,5	1421,75	3+	474,9241	164
Endotelin	Semicyklisk	21		2490,02	3+	831,0154	204
hCNP (1-22)	Semicyklisk	22	1504,5	2196,09	3+	733,0363	195
Kalcitonin	Semicyklisk	32	2221,4	3429,71	3+	1144,2488	248
Natriuretisk peptid	Semicyklisk	15	1025,1	1593,76	3+	532,2617	175
Enfuvirtid (T-20)	Linjär	36		4489,19	4+	1123,3042	232
Exenatid	Linjär	39		4184,03	4+	1047,0169	216
GLP1 (7-36)	Linjär	37		3295,66	4+	824,9235	214
pTH (3-34)-trifluoracetat	Linjär	32		3936,00	4+	985,0098	231
Sekretin	Linjär	27	2011,2	3025,61	4+	757,4093	211
Thymalfasin	Linjär	28	2284,5	3106,50	4+	777,6339	206
Kalcitonin	Semicyklisk	32	2221,4	3429,71	4+	858,4362	212
Liraglutid	Grenad	31		3013,18	4+	938,2473	224
Exenatid	Linjär	39		4184,03	5+	837,8133	206
GLP1 (7-36)	Linjär	37		3295,66	5+	660,1403	203
Liraglutid	Grenad	31		3013,18	5+	750,7971	202

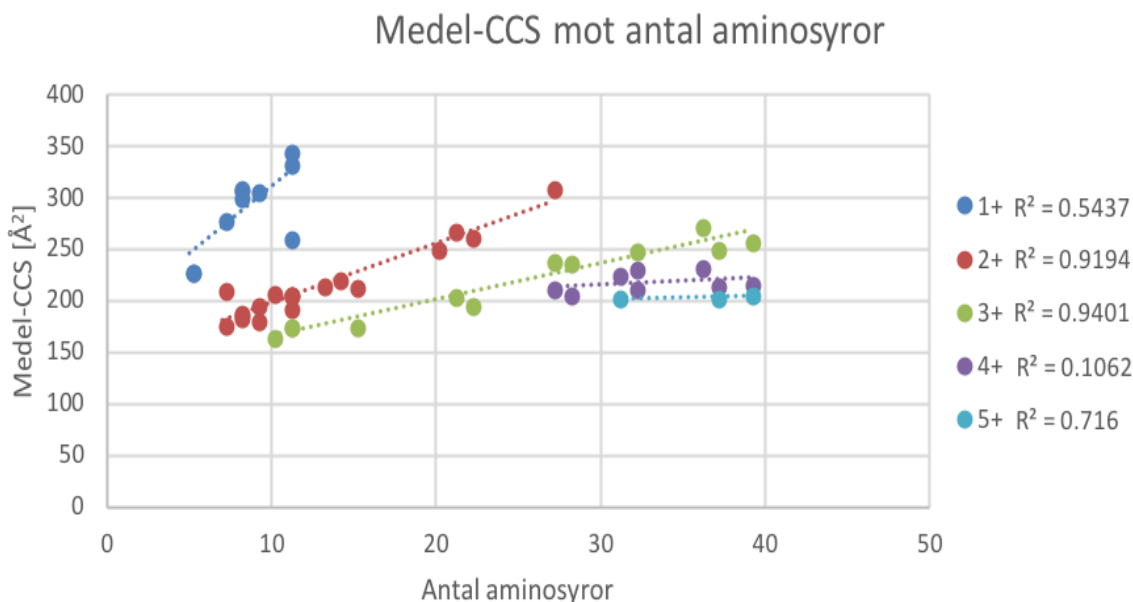
Standardavvikelsen och procentavvikelsen av CCS för varje peptid redovisas i tabell 4.2. Tabellen är sorterad efter jonladdning på samma sätt som i tabell 4.1. Notera att ett varierande antal analyser utfördes för varje peptid och att vissa standardavvikelser är noll på grund av det endast finns ett mätvärde.

Tabell 4.2. Antal analyser samt beräknade standard- och procentavvikelser för samtliga peptider sorterat efter jonladdning.

Peptid	Antal analyser (n)	Standardavvikelse	Procentavvikelse [%]
Angiotensin I/II	4	3,44	1,24
Angiotensin II	3	4,24	1,38
Eledoisinacetat	3	4,50	1,35
Leucin-enkefalin	3	3,09	1,36
Metionin-enkefalin	3	2,62	1,15
Neurotensin (1-11)	1	0	0
Lanreotidacetat	3	2,83	0,92
Longastatin	6	3,21	1,07
Vasopressin	3	1,41	0,46
Cyklosporin A	3	0,47	0,14
Angiotensin I/II	2	1,00	0,57
Angiotensin II	1	0	0
Bivalirudintrifluoracetat	3	0,82	0,33
Eledoisinacetat	1	0	0
Goserelin	3	0,82	0,42
Neurotensin (1-11)	3	0,47	0,23
Sekretin	1	0	0
Substans P-acetat	3	0,82	0,40
Bacitracin	6	1,12	0,54
Daptomycin	6	1,49	0,70
Endotelin	1	0	0
hCNP (1-22)	3	0	0
Lanreotidacetat	1	0	0
Longastatin	2	2,00	1,09
Natriuretisk peptid	3	0,47	0,22
Somatostatin	3	0	0
Vankomycin	3	2,62	1,25
Vasopressin	1	0	0
Cyklosporin A	12	2,03	0,99
Enfuvirtid (T-20)	1	0	0
Exenatid	1	0	0
GLP1 (7-36)	3	0,47	0,19
Neurotensin (1-11)	1	0	0
Sekretin	3	0	0
Substans P-acetat	1	0	0
Thymalfasin	3	0,94	0,40
Bacitracin	2	2,00	1,22
Endotelin	3	2,16	1,06
hCNP (1-22)	1	0	0
Kalcitonin	3	0,47	0,19
Natriuretisk peptid	1	0	0
Enfuvirtid (T-20)	3	2,62	1,13
Exenatid	4	1,66	0,77
GLP1 (7-36)	1	0	0
pTH (3-34)-trifluoracetat	3	2,16	0,94
Sekretin	1	0	0
Thymalfasin	1	0	0
Kalcitonin	1	0	0
Liraglutid	3	2,83	1,26
Exenatid	1	0	0
GLP1 (7-36)	1	0	0
Liraglutid	1	0	0

Standardavvikelsen för varje peptid visar hur mycket de erhållna CCS-värdena avviker från medelvärdet. Enligt handledare bör felmarginalen för procentavvikelsen inte överstiga 2% vilket stämmer överens med resultaten redovisade i tabell 4.2.

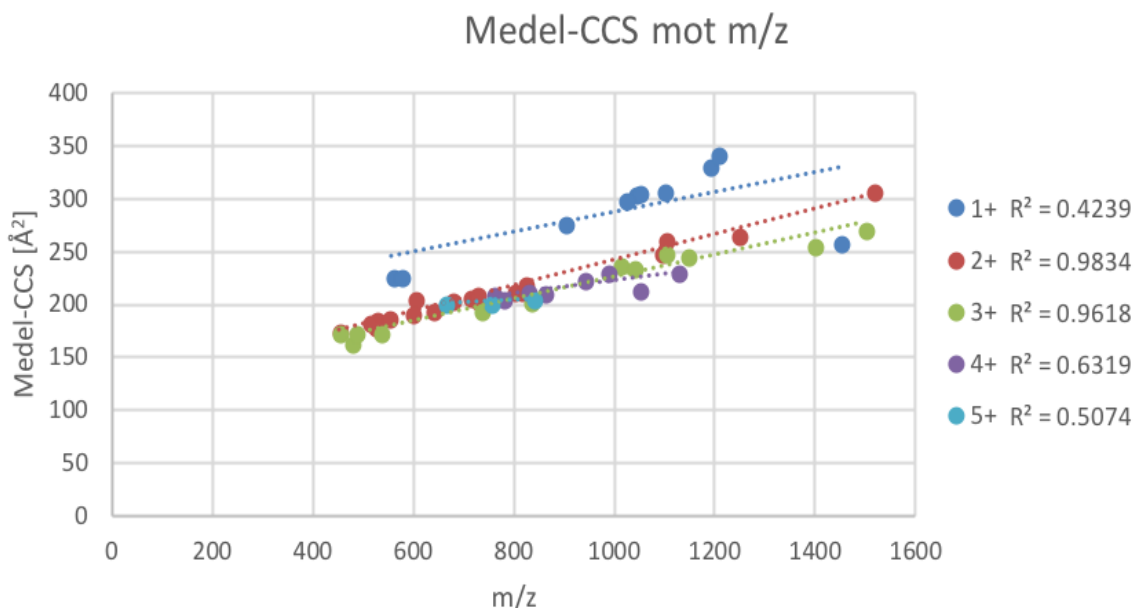
Resultaten redovisade i tabell 4.1 har plottats i följande grafer där peptiderna är grupperade efter jonladdning i figur 4.1-4.4 och efter struktur i figur 4.5-4.8. I figur 4.1 nedan redovisas förhållandet mellan medelvärdet på CCS, härnäst refererat till medel-CCS i samtliga grafer, och antal aminosyror i peptiderna med infogade trendlinjer.



Figur 4.1. Graf av medel-CCS mot antal aminosyror med infogade trendlinjer sorterat efter jonladdning. Till höger visas R^2 för samtliga trendlinjer.

Linjära samband observeras mellan peptider med samma laddning då medel-CCS plottas mot antal aminosyror. Korrelationen förefaller vara starkare för joner med laddning 2+ och 3+, där punkterna är bäst anpassade till trendlinjen enligt R^2 med ett värde på 0,9194 respektive 0,9401. Vid laddning 1+ observeras två avvikande punkter men det linjära sambandet för övriga mätpunkter är fortfarande märkbart då R^2 är 0,5437. Mätvärden för laddning 4+ påvisar sämst linjärt samband enligt R^2 med ett värde på endast 0,1062. CCS förefaller bero mindre av aminosyralängden med ökande jonladdning, då trendlinjens lutning minskar med ökande laddning.

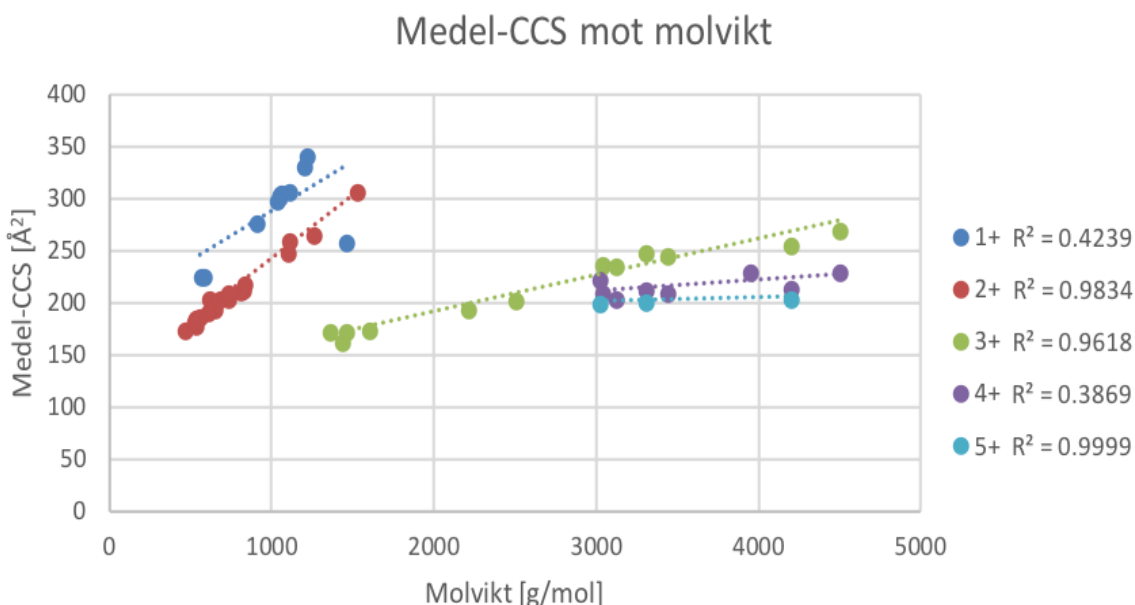
I figur 4.2 nedan redovisas förhållandet mellan medel-CCS och m/z för peptiderna med infogade trendlinjer.



Figur 4.2. Graf av medel-CCS mot m/z med infogade trendlinjer sorterat efter jonladdning. Till höger visas R^2 för samtliga trendlinjer.

När CCS plottas mot m/z observeras linjära samband då värdena på R^2 är acceptabla för samtliga jonladdningar. R^2 för peptider med jonladdning 2+ är högst med ett värde på 0,9834 som indikerar god linjär anpassning. Det linjära sambandet för joner med laddning 3+ förefaller också väl anpassat med ett R^2 på 0,9618. Majoriteten av punkterna ligger mycket nära varandra förutom mätvärden för peptider med laddning 1+ där den större andelen av punkterna inte är väl anpassade till resten. Anpassningen av trendlinjen verkar påverkas starkt av flera avvikande punkter vid värden för m/z på ungefär 590 respektive 1425, då värdet på R^2 är 0,4239. För värden på m/z som överstiger ungefär 870 observeras en något större spridning i både y- och x-led för punkter oavsett jonladdning. Samtliga trendlinjer har likartad lutning.

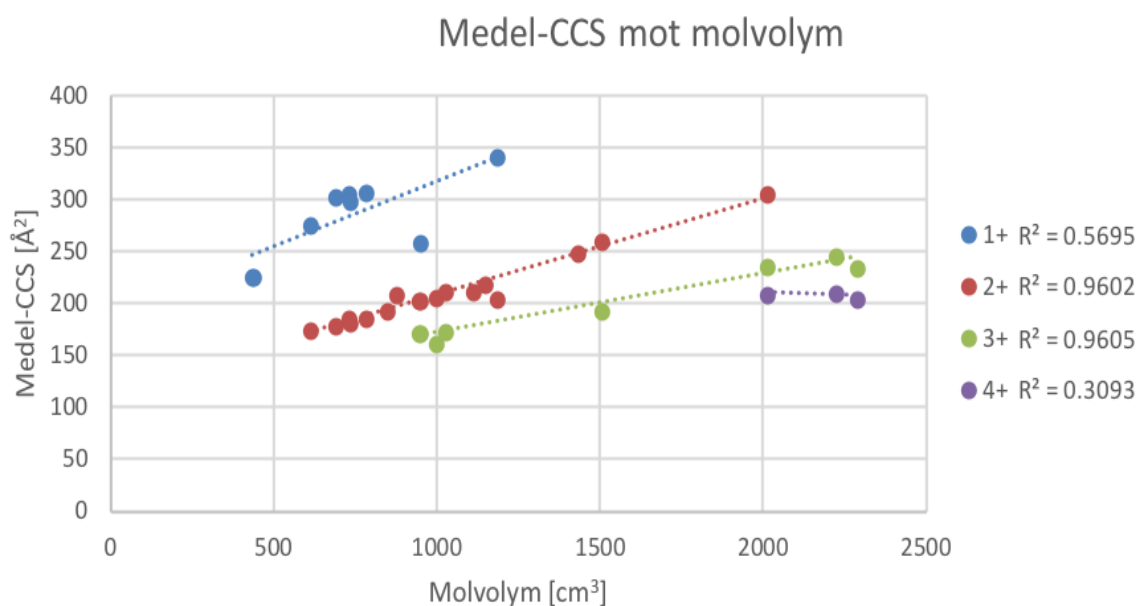
I figur 4.3 nedan redovisas förhållandet mellan medel-CCS och peptidernas molvikt med infogade trendlinjer.



Figur 4.3. Graf av medel-CCS mot molvikt med infogade trendlinjer sorterat efter jonladdning. Till höger visas R^2 för samtliga trendlinjer.

Tydliga linjära samband kan observeras då CCS plottas mot molvikt med avseende på jonladdning. CCS verkar bero starkt av molvikten för låga jonladdningar och beroendet minskar med ökande jonladdning då lutningen på dessa trendlinjer avtar. Det linjära sambandet är bäst för joner med laddning 5+ vilket indikeras av att R^2 är 0,9999. Observera att det endast finns tre datapunkter för denna jonladdning. Trendlinjerna är även välanpassade till datapunkter för jonladdning 2+ och 3+ där R^2 är 0,9834 respektive 0,9618. Det sämsta linjära sambandet observeras för jonladdning 4+ med ett R^2 på 0,3869. För jonladdning 1+ är resultatet i princip likvärdigt med 4+ då R^2 är 0,4239 och en från trendlinjen avvikande punkt observeras ungefär vid 1500 g/mol.

I figur 4.4 nedan redovisas förhållandet mellan medel-CCS och peptidernas molvolym med infogade trendlinjer.



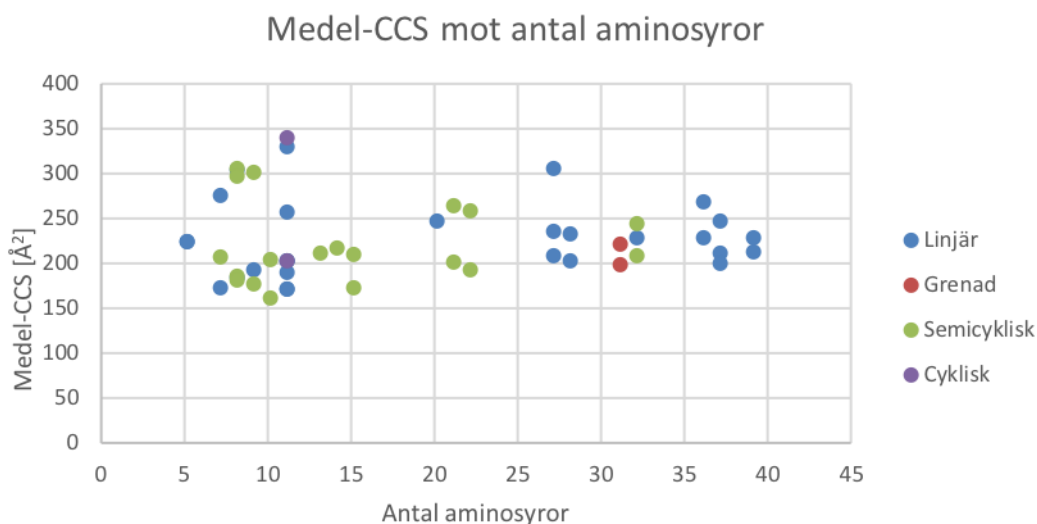
Figur 4.4. Graf av medel-CCS mot molvolym med infogade trendlinjer sorterat efter jonladdning. Till höger visas R^2 för samtliga trendlinjer.

Grafen innehåller färre datapunkter då molvolym saknades för flera peptider. För laddning 2+ och 3+ anpassas trendlinjer bäst efter befintliga datapunkter med ett värde för R^2 på 0,9602 respektive 0,9605. Det linjära sambandet mellan datapunkter inom gruppen med laddning 1+ är också märkbart trots att R^2 endast är 0,5695, dock med fler avvikande punkter än de högre jonladdningarna. Det sämsta linjära sambandet uppvisas inom jonladdning 4+ där R^2 är 0,3093. Observera att det endast finns tre datapunkter inom denna kategori. Precis som för CCS som en funktion av antal aminosyror i figur 4.1 minskar CCS beroende av molvolymen med ökande jonladdning, vilket indikeras av lutningen på trendlinjerna för varje laddningskategori.

Övergripande för figur 4.1-4.4 gäller att det linjära sambandet mellan peptider är bättre för jonladdning 2+ och 3+ där R^2 inte understiger 0,9 oavsett vilken parameter som CCS plottas mot. Antalet datapunkter varierar beroende på laddningskategori, där det minsta antalet punkter observeras för jonladdning 4+ och 5+.

När peptiderna sorteras efter struktur kan inga tydliga samband observeras och därmed finns inga trendlinjer i figur 4.5-4.8. Notera att vissa peptider är med flera gånger då dessa har olika jonladdningar. Därför är vissa mätpunkter på samma x-värde då deras litteraturvärden är identiska.

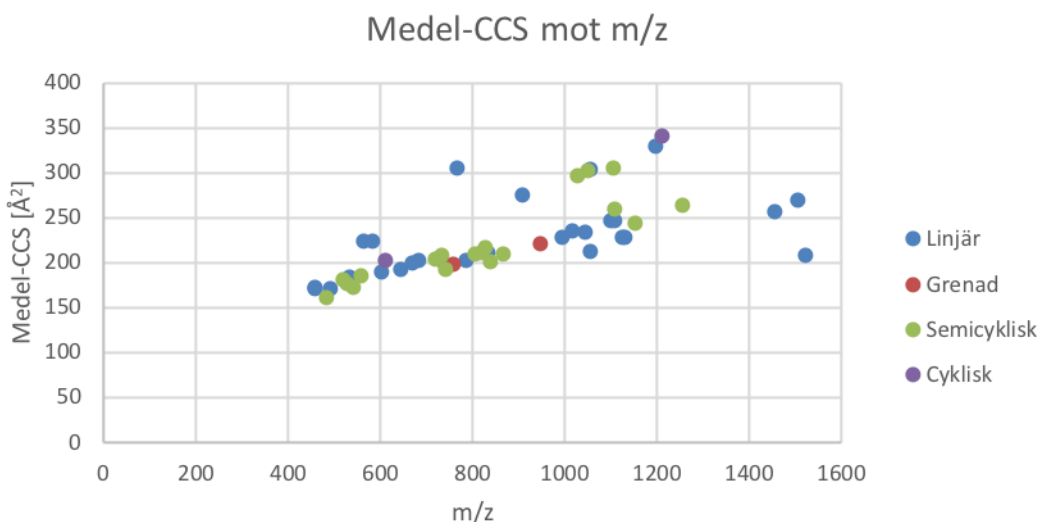
I figur 4.5 nedan redovisas förhållandet mellan medel-CCS och antal aminosyror i peptiderna.



Figur 4.5. Graf av medel-CCS mot antal aminosyror sorterat efter struktur.

Inga tydliga samband observeras mellan peptider sorterade efter struktur. CCS verkar inte vara starkt beroende av antal aminosyror inom strukturgrupperna.

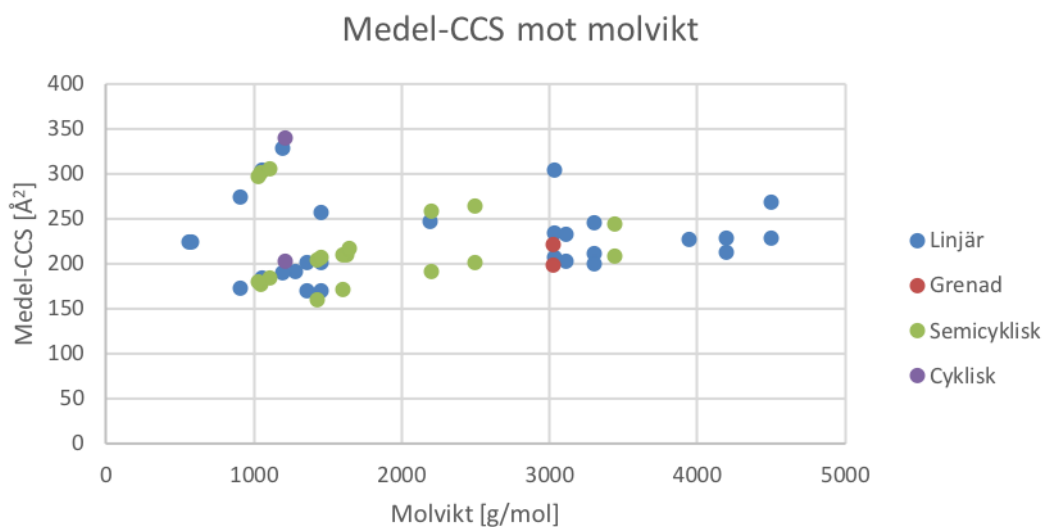
I figur 4.6 nedan redovisas förhållandet mellan medel-CCS och peptidernas m/z .



Figur 4.6. Graf av medel-CCS mot m/z sorterat efter struktur.

Inga tydliga samband observeras inom strukturgrupper när CCS plottas mot m/z .

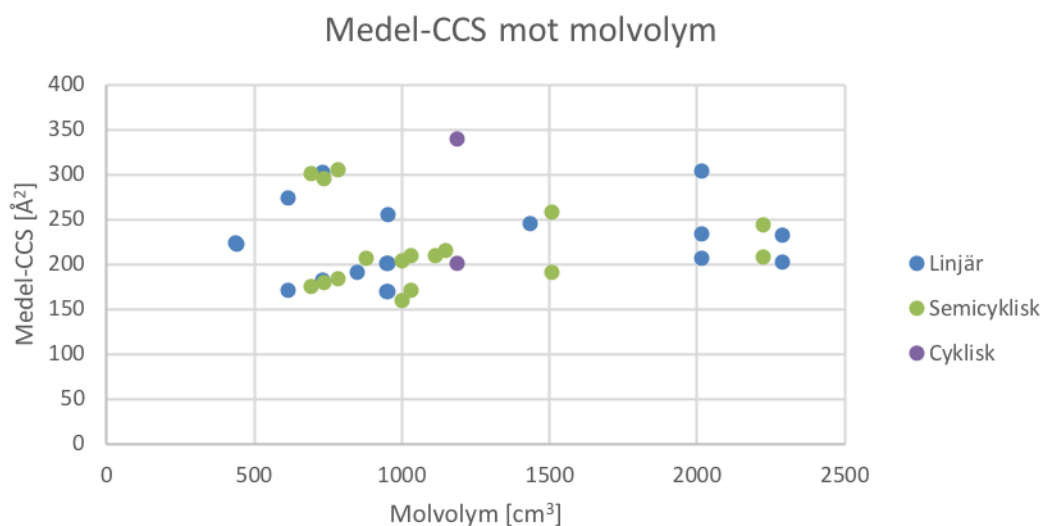
I figur 4.7 nedan redovisas förhållandet mellan medel-CCS och molvikt för peptiderna.



Figur 4.7. Graf av medel-CCS mot molvikt sorterat efter struktur.

Inga uppenbara samband kan observeras då CCS beror av molvikt sorterat efter peptidernas struktur.

I figur 4.8 nedan redovisas förhållandet mellan medel-CCS och peptidernas molvolym.



Figur 4.8. Graf av medel-CCS mot molvolym sorterat efter struktur.

Tydliga samband saknas för CCS som en funktion av molvolym sorterat efter peptidernas struktur.

5 Diskussion

Nedan följer en sammanfattande diskussion av resultatet, möjliga felkällor, en analys kring samhälleliga och etiska aspekter samt framtidsmöjligheter och fortsatta studier.

5.1 Analys av resultat

Vid bearbetning av insamlad data erhöles blandade resultat. De tydligaste sambanden kunde observeras när peptiderna grupperades efter vilken individuell jonladdning de hade och inte efter struktur. Sambanden är uppenbara vid jämförelse mellan figur 4.1-4.4 och figur 4.5-4.8. För peptidjoner med lägre individuell laddning verkade sambanden vara tydligare, vilket syns i figur 4.1, 4.3 och 4.4. Det är viktigt att ta i beaktning vid tolkning av data att antalet datapunkter skiljer sig mellan grupper av peptider inom indelningen som valts. Detta kan vara en möjlig förklaring till att det linjära sambandet generellt är bättre för lägre jonladdningar, då det existerar ett större antal datapunkter inom dessa grupper. För högre jonladdningar kan det sämre linjära sambandet förklaras av att grafen konstruerats efter få datapunkter. Avvikande punkter kommer därmed påverka anpassningen till trendlinjen i högre grad. Ett större antal datapunkter inom varje grupp hade underlättat för att enklare kunna dra en slutsats.

Som observerat i figur 4.1 minskar aminosyralängdens inverkan på CCS med ökande jonladdning. Då en peptid med många aminosyror kan ha större möjlighet att bära fler laddningar leder detta till att längre peptiders form kan påverkas i högre grad. Formen på en längre peptid bör därför bli mer fixerad på grund av växelverkan mellan intramolekylära laddningar. Därför borde formen inte ändras nämnvärt vid addition av fler aminosyror vilket kan förklara utseendet på graf 4.1. I figur 4.2 överlappar datapunkterna och det verkar finnas ett linjärt samband mellan CCS och m/z för alla jonladdningar. Detta kan bero på att hänsyn redan tagits till laddningen i m/z . När CCS plottas mot molvikt i figur 4.3 observeras en likhet med figur 4.1. Jonladdning verkar fortfarande ha en signifikant inverkan på trendlinjernas lutning och CCS ser ut att bero mindre på molvikt med ökande jonladdning. Detta indikeras av att lutningen för trendlinjer motsvarande joner med hög laddning avtar. Likheten beror troligtvis på att ökande antal aminosyror innebär ökande molvikt. Skillnader som observeras kan bero på att olika aminosyror har olika vikt. När CCS plottas mot molvolym i figur 4.4 observeras precis som i tidigare fall att CCS beror mindre på molvolym för peptider med ökande jonladdning. Detta kan bero på att med ökande jonladdning förändras strukturen och därmed volymen, vilket då kan skilja sig från litteraturvärden.

En anledning till att jonladdning påvisade tydliga samband i jämförelse med struktur kan vara att molekylen laddning påverkar jonens drifttid. Drifttiden är direkt relaterat till CCS enligt ekvation 2.1 och kan möjligtvis förklara erhållna resultat. Värt att notera är att utseendet av figur 4.1 och 4.3-4.4 möjligtvis kan förklaras av att samtliga parametrar är direkt korrelerade till veckningen och därmed dess form.

Avsaknaden av samband när peptiderna kategoriserats efter struktur i figur 4.5-4.8 kan bero på att peptiderna har kategoriserats efter primärstruktur, vilket inte alltid reflekterar hur de ser ut i verkligheten. Analysen med jonmobilitetskopplad masspektrometri sker i gasfas, med undantag för i vätskekromatografen, och det är inte säkert att peptiderna antar samma form i gasfas som de har enligt den kategorisering som gjorts. Värt att notera är att vid vätskekromatografi befinner sig peptiderna i ett visst pH som kan skilja sig från det kroppsegna. Skillnaden i pH kan ytterligare påverka deras utseende och kan förklara varför inga signifikanta samband kunde observeras.

Det kan finnas ytterligare strukturellerade faktorer som inte togs hänsyn till och som hade kunnat leda till tydligare samband. Ett möjligt förslag på en sådan faktor är vilka aminosyror som ingår i peptiderna, då karaktären av dessa påverkar veckningen. På grund av aminosyrornas koppling till form kan det därför vara intressant att plotta CCS mot de olika aminosyrorna i en peptid. Fördelningen av aminosyror inom en peptid har även visats signifikant för peptidens cellpermeabilitet, då CPP ofta består av många positivt laddade aminosyror eller en jämn fördelning mellan hydrofoba och hydrofila enheter. Då CPP används som etablerade läkemedel samt har stor utvecklingspotential kan karaktärisering utifrån aminosyrafördelning eventuellt användas för att förutsäga en peptids cellpermeabilitet. Detta vore användbart för utveckling av peptidbaserade läkemedel samt för att vidare studera hur CPP tas upp av cellen.

Grupperingen av peptider utfördes enligt definitionen som beskrivs i avsnitt 3.1. Peptiderna vasopressin, longastatin och daptomycin har i en tidigare studie definierats som cykliska peptider men enligt definitionen i avsnitt 3.1 är de semicykliska. Detta indikerar att kategoriseringen var bristfällig och en annan strukturindelning kan vara att föredra vid fortsatt utveckling.

Ytterligare en faktor som kan ha påverkat resultatet är att en del av peptiderna är outforskade vilket innebär att en del litteraturvärden saknas. Dessutom finns en viss osäkerhet kring hur väl de framtagna litteraturvärdena stämmer och vid vilket laddningstillstånd de är framtagna.

Det är svårt att tala om resultatens faktiska nytta i praktiken, eftersom karaktärisering med hjälp av jonmobilitetskopplad masspektrometri är ett relativt outforskat ämne. Förhoppningsvis har de redovisade resultaten lagt grunden för utveckling av metoden, vidare studier av andra parametrar samt att med hjälp av CCS kunna karaktärisera en peptid med avseende på parametrar som kan förutsäga en peptids egenskaper.

5.2 Felkällor

Anledningen till att ett varierande antal analyser utfördes var att vissa peptidlösningar tillsattes i fler än en brunn på plattan, på grund av ett laborativt misstag. Som följd av yttre faktorer samt tidsbrist erhöles endast ett CCS-värde för vissa av peptiderna. För dessa peptider kunde ingen standardavvikelse beräknas och därmed inte någon procentavvikelse. Osäkerheter i resultatet skulle kunna bero på det varierande antalet erhållna CCS-värden, dock verkar inte detta troligt då ingen av procentavvikelserna i tabell 4.2 överskred 2%. Ytterligare en potentiell felkälla är att en ny kalibrering utfördes mellan varje analys. Detta verkar ha påverkat en del av CCS-värdena då vissa skiljer sig något mellan analyserna.

5.3 Samhälleliga och etiska aspekter

Vidare forskning kan förhoppningsvis leda till att jonmobilitetskopplad masspektrometri kan bidra till företagens möjlighet att utveckla nya och mer effektiva läkemedel. Detta kan ha fördelar både i form av marknadsvärde och samhällsnytta. Som tidigare nämnts kräver inte peptidbaserade läkemedel lika hög dosering som SMD och de bryts även ned till kroppsegna molekyler istället för aktiva metaboliter. Fortsatt forskning och utveckling av metoden kan därför leda till en förbättrad patientvård då lägre dos och färre biverkningar innebär fördelar för både den enskilda individen samt belastningen på sjukvården. Även det faktum att peptidbaserade läkemedel inte kräver administration lika ofta minskar belastningen på sjukvården men har framförallt fördelar för den enskilda individen.

Peptidbaserade läkemedel har i dagsläget en högre produktionskostnad än konventionella läkemedel, vilket gör det rimligt att anta en högre marknadskostnad. Ekonomin kan alltså vara en faktor som hindrar många människor att ta del av dem. I sin tur kan detta leda till en ytterligare ökning av skillnaderna mellan de socioekonomiska klasserna i samhället, vilket kan bli ett motstånd till biologiska läkemedels utbredning. Det kan dock antas att priserna successivt kommer sjunka allt eftersom fler tillverkare tillkommer. En faktor som kan påverka klyftorna mellan utvecklingsländer och industriländer är att de flesta peptidbaserade läkemedel inte kan ges oralt utan i många fall kräver intravenös administration. Höga krav ställs därför på en steril omgivning vilket redan är ett problem i många utvecklingsländer. Även det faktum att peptidbaserade läkemedel är temperaturkänsliga utgör ett problem för utvecklingsländer då det krävs korrekt kylning vid förvaring.

Analyserna som genomförts med jonmobilitetskopplad masspektrometri har enbart utförts med hjälp av stamlösningar. Senare forskning kan dock leda till att metoden kräver djurförsök då det kan vara önskvärt att studera vävnadsprover vid läkemedelsutveckling. Denna etiska aspekt är svår att undvika då djurförsök är en vanlig del vid utveckling av läkemedel, och är inte på något sätt specifik för denna metod.

5.4 Framtida möjligheter och fortsatta studier

Jonmobilitetskopplad masspektrometri skulle potentiellt kunna utvecklas för att tillämpas på vävnadsprover vilket kan vara ett värdefullt verktyg för att studera verkningsmekanismen för många läkemedel och deras distribution i kroppen. Eftersom ett läkemedels nytta är beroende av att det hamnar i rätt vävnad i kroppen är det nödvändigt med en metod som kan verifiera detta vid utveckling av läkemedel. På grund av metodens känslighet och tidigare framgång vid profilering av blodprov är det rimligt att jonmobilitetskopplad masspektrometri även kan tillämpas på vävnadsprover. Metoden skulle därmed vara ett användbart verktyg vid tidiga stadier i läkemedelsutvecklingen och potentiellt förkorta tiden det tar för ett läkemedel att komma ut på marknaden.

I framtiden vore det intressant att med hjälp av jonmobilitetskopplad masspektrometri vidare analysera cykliska peptider. Då dessa uppvisat bättre cellpermeabilitet på grund av sin struktur finns stor potential för vidare studier. Metoden skulle även vara intressant att tillämpa på andra biologiska läkemedel som kan möjliggöra för behandling av de sjukdomar som peptidbaserade läkemedel eventuellt inte kan behandla.

6 Slutsats

Det finns en stark korrelation mellan CCS och peptiders laddningstillstånd då linjärt beroende observeras i samtliga grafer där CCS beror av de undersökta parametrarna. Det verkar dock inte existera någon nämnvärd korrelation mellan CCS och de undersökta parametrarna beroende av peptidernas struktur då skillnader mellan strukturgrupper inte kan observeras.

Eftersom ett starkt linjärt beroende observeras mellan CCS och peptiders laddningstillstånd verkar karaktärisering av peptidbaserade läkemedel med avseende på laddningsberoende parametrar vara möjlig. Vidare studier krävs dock för att utreda hur detta konkret skulle gå till för att kunna förutsäga peptiders egenskaper som exempelvis cellpermeabilitet, struktur och beteende i kroppen och även med avseende på andra indelningar än jonladdning. Ett förslag på en sådan indelning är efter aminosyrafördelning inom en peptid, då detta har koppling till peptidens cellpermeabilitet.

Rekommendationer för vidareutveckling av karaktärisering med hjälp av jonmobilitetskopplad masspektrometri är undersökning av vävnadsprover för att kunna ge mer insikt i hur dessa läkemedel beter sig i kroppen.

Referenser

- [1] ChemSpider, "GLP-1," [Elektronisk bild]. Tillgänglig: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=17287783>
- [2] M. McCamish och G. Woollett, "Worldwide experience with biosimilar development," *mAbs*, vol. 3, nr. 2, ss. 209–217, mar. 2011, [Online]. Tillgänglig: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/mabs.3.2.15005>
- [3] P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, och M. Khrestchatisky, "Synthetic therapeutic peptides: science and market," *Drug Discovery Today*, vol. 15, nr. 1-2, ss. 40–56, jan. 2010, [Online]. Tillgänglig: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644609003705>
- [4] N. Tsomaia, "Peptide therapeutics: Targeting the undruggable space," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 94, ss. 459–470, apr. 2015, [Online]. Tillgänglig: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523415000343>
- [5] D. D. Nwibo, C. A. Levi, och M. I. Nwibo, "Small Molecule Drugs; Down but Not Out: A Future for Medical Research and Therapeutics," *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences Ver. I*, vol. 14, nr. 1, ss. 70–77, 2015, [Online]. Tillgänglig: <https://pdfs.semanticscholar.org/ae71/5df59f5d328d49640b0ad41375d09e102022.pdf>
- [6] K. Fosgerau och T. Hoffmann, *Peptide therapeutics: Current status and future directions*, vol. 20, Elsevier Current Trends, 2015, [Online]. Tillgänglig: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644614003997>
- [7] H. Grabowski, I. Cockburn, och G. Long, "The Market For Follow-On Biologics: How Will It Evolve?" *Health Affairs*, vol. 25, nr. 5, ss. 1291–1301, sep. 2006, [Online]. Tillgänglig: <http://content.healthaffairs.org/cgi/doi/10.1377/hlthaff.25.5.1291>
- [8] C. Stevenson, "Advances in Peptide Pharmaceuticals," *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 10, nr. 1, ss. 122–137, jan. 2009, [Online]. Tillgänglig: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2010&volume=10&issue=1&spage=122>
- [9] E. Valeur *et al.*, "New Modalities for Challenging Targets in Drug Discovery," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 56, nr. 35, ss. 10 294–10 323, 2017, DOI:10.1002/anie.201611914.
- [10] J. Samanen, "Similarities and differences in the discovery and use of biopharmaceuticals and small-molecule chemotherapeutics," *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development*, 2013, kap. 5, ss. 161–203.
- [11] E. Reading *et al.*, "Elucidation of Drug Metabolite Structural Isomers Using Molecular Modeling Coupled with Ion Mobility Mass Spectrometry," *Analytical Chemistry*, vol. 88, nr. 4, ss. 2273–2280, feb. 2016, [Online]. Tillgänglig: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.5b04068>
- [12] J. Boschmans, F. Lemi re, och F. Sobott, "Analyzing complex mixtures of drug-like molecules: Ion mobility as an adjunct to existing liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry methods," *Journal of Chromatography A*, vol. 1490, ss. 80–88, mar. 2017, [Online]. Tillgänglig: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967317302388?via%3Dihub>

- [13] B. T. Ruotolo, J. L. P. Benesch, A. M. Sandercock, S. Hyung, och C. V. Robinson, "Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes," *Nature Protocols*, vol. 3, ss. 1139–1152, 2008, [Online]. Tillgänglig: <https://www.nature.com/articles/nprot.2008.78>
- [14] P. Dwivedi, A. J. Schultz, och H. H. Hill, "Metabolic profiling of human blood by high-resolution ion mobility mass spectrometry (IM-MS)," *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 298, nr. 1-3, ss. 78–90, dec. 2010, [Online]. Tillgänglig: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387380610000552>
- [15] AstraZeneca, "Vår forskning," [Online]. Tillgänglig: <https://www.astrazeneca.se/var-forskning.html>
- [16] E. D. Hoffmann och V. Stroobant, *Mass Spectrometry - Principles and Applications*, vol. 29, 2007, [Online]. Tillgänglig: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057935>
- [17] Waters, "HPLC Separation Modes," [Online]. Tillgänglig: http://www.waters.com/waters/en_SE/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=en_SE
- [18] D. A. Skoog, F. J. Holler, och S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 7e uppl., 2016.
- [19] J. J. Pitt, "Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry," *The Clinical Biochemist. Reviews*, vol. 30, nr. 1, ss. 19–34, [Online]. Tillgänglig: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643089/>
- [20] S. R. Harvey, C. E. MacPhee, och P. E. Barran, "Ion mobility mass spectrometry for peptide analysis," *Methods*, vol. 54, nr. 4, ss. 454–461, aug. 2011, [Online]. Tillgänglig: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104620231100096X>
- [21] P. Hupé, "Mass spectrometry protocol," 2012, [Elektronisk bild]. Tillgänglig: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mass_spectrometry_protocol.png
- [22] J. Dahl, "Diagram of an ion mobility spectrometer," 2009, [Elektronisk bild]. Tillgänglig: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ion_mobility_spectrometry_diagram.svg
- [23] J. C. May, C. B. Morris, och J. A. McLean, "Ion mobility collision cross section compendium," *Analytical Chemistry*, vol. 89, nr. 2, ss. 1032–1044, jan. 2017, [Online]. Tillgänglig: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.6b04905>
- [24] W. F. Siems, L. A. Viehland, och H. H. Hill, "Improved Momentum-Transfer Theory for Ion Mobility. 1. Derivation of the Fundamental Equation," *Analytical Chemistry*, vol. 84, nr. 22, ss. 9782–9791, nov. 2012, [Online]. Tillgänglig: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac301779s>
- [25] D. González de Llano och C. Polo Sánchez, *PEPTIDES*, Elsevier, 2003, [Online]. Tillgänglig: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012227055X009068>
- [26] G. M. Cooper, "Protein synthesis, processing, and regulation: Protein folding and processing," *The cell : a molecular approach*, ASM Press, 2000, [Format]. Tillgänglig: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9843/>
- [27] M. Aftabuddin och S. Kundu, "Hydrophobic, hydrophilic, and charged amino acid networks within protein," *Biophysical journal*, vol. 93, nr. 1, ss. 225–231,

- jul. 2007, [Online]. Tillgänglig: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349507712754?via%3Dihub>
- [28] I. C. Gray och M. R. Barnes, "Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions," *Bioinformatics for Geneticists*, vol. 4, ss. 289–304, 2003, [Online]. Tillgänglig: <http://www.ksrbiotech.com/uploads/AminoacidSubstitutions.pdf>
- [29] S. T. Whitten, J. O. Wooll, R. Razeghifard, E. Garcia-Moreno, och V. J. Hilser, "The origin of pH-dependent changes in m-values for the denaturant-induced unfolding of proteins," *Journal of Molecular Biology*, vol. 309, nr. 5, ss. 1165–1175, jun. 2001, [Online]. Tillgänglig: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283601947266?via%3Dihub>
- [30] A. Melander, "receptor," *Nationalencyklopedin*, [Format]. Tillgänglig: <https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/l%C3%A5ng/receptor>
- [31] G. M. Cooper, "The cell surface: Transport of small molecules," *The cell : a molecular approach*, ASM Press, 2000, [Format]. Tillgänglig: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9847/>
- [32] ChemSpider, "Daptomycin," [Elektronisk bild]. Tillgänglig: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=10482098>
- [33] ChemSpider, "Aspirin," [Elektronisk bild]. Tillgänglig: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=2157>
- [34] P. P. N. Rao, S. N. Kabir, och T. Mohamed, "Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Progress in Small Molecule Drug Development," *Pharmaceuticals*, vol. 3, nr. 5, ss. 1530–1549, maj. 2010, [Online]. Tillgänglig: <http://www.mdpi.com/1424-8247/3/5/1530>
- [35] S. El-Andaloussi, T. Holm, och Langel, "Cell-Penetrating Peptides: Mechanisms and Applications," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 11, ss. 3597–3611, [Online]. Tillgänglig: <https://search.proquest.com/docview/215112526?pq-origsite=360link>
- [36] G. Guidotti, L. Brambilla, och D. Rossi, "Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics." *Trends in pharmacological sciences*, vol. 38, nr. 4, ss. 406–424, apr. 2017, [Online]. Tillgänglig: [https://www.cell.com/trends/pharmacological-sciences/fulltext/S0165-6147\(17\)30017-2](https://www.cell.com/trends/pharmacological-sciences/fulltext/S0165-6147(17)30017-2)
- [37] A. Zorzi, K. Deyle, och C. Heinis, "Cyclic peptide therapeutics: past, present and future," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 38, ss. 24–29, jun. 2017, [Online]. Tillgänglig: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593116302010?via%3Dihub>
- [38] L. Diao och B. Meibohm, "Pharmacokinetics and Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Correlations of Therapeutic Peptides," *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 52, nr. 10, ss. 855–868, okt. 2013, [Online]. Tillgänglig: <http://link.springer.com/10.1007/s40262-013-0079-0>
- [39] J. F. Todd *et al.*, "Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): a trial of treatment in non-insulin-dependent diabetes mellitus," *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 27, nr. 6, ss. 533–536, jun. 1997, [Online]. Tillgänglig: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2362.1997.1490691.x>
- [40] L. Prasad-Reddy och D. Isaacs, "A clinical review of GLP-1 receptor agonists: efficacy and safety in diabetes and beyond," *Drugs in Context*, vol. 4,

- ss. 1–19, jul. 2015, [Online]. Tillgänglig: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4509428>
- [41] “glukagon,” *Nationalencyklopedin*, [Format]. Tillgänglig: <https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/l%C3%A5ng/glukagon>
- [42] D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras, och D. Price, “The Future of Peptide-based Drugs,” *Chemical Biology & Drug Design*, vol. 81, nr. 1, ss. 136–147, jan. 2013, [Online]. Tillgänglig: <http://doi.wiley.com/10.1111/cbdd.12055>
- [43] ChemSpider, “Liraglutide,” [Elektronisk bild]. Tillgänglig: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=17291477>
- [44] ChemSpider, “Cyklosporin A,” [Elektronisk bild]. Tillgänglig: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=4447449>
- [45] ChemSpider, “Vasopressin,” [Elektronisk bild]. Tillgänglig: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=23278682>
- [46] Waters, “SYNAPT G2-Si High Definition Mass Spectrometry : Waters,” [Online]. Tillgänglig: http://www.waters.com/waters/en_SE/SYNAPT-G2-Si-High-Definition-Mass-Spectrometry/nav.htm?cid=134740622&locale=en_SE