

Využití metody vodík/deuteriové výměny v biofarmaceutickém průmyslu

Utilization of Hydrogen/Deuterium Exchange in Biopharmaceutical Industry

Coufalová D., Vojtěšek B., Hernychová L.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Vývoj biofarmaceutik je nejrychleji se rozvíjející oblastí dnešního farmaceutického průmyslu. Analýza proteinových terapeutik je však velice náročný úkol kvůli jejich velikosti a komplexnosti prostorové struktury. Jakékoliv změny v primární, sekundární, terciální či kvartérní struktuře proteinů mohou mít výrazný vliv na jejich funkci, účinnost a v neposlední řadě i toxicitu. Hmotnostní spektrometrie se v minulosti osvědčila jako kvalitní nástroj pro analýzu primární struktury proteinů (aminokyselinové sekvence) a v posledních letech je díky rozvoji nových metod schopná analyzovat i vyšší proteinové struktury. Jednou z těchto nových metod je vodík/deuteriová výměna (HDX). HDX je založena na výměně amidových vodíků aminokyselinového řetězce za deuteria z okolního roztoku. Vodíky nacházející se na povrchu proteinu jsou za deuteria vyměňovány mnohem rychleji než vodíky schované uvnitř proteinu. Získané výsledky z HDX metody mohou poskytnout informace o prostorové struktuře proteinu a také o protein-proteinových a protein-ligandových interakcích. Navíc analýzou výměny deuterií v různých časových intervalech může tato metoda poskytnout informace i o dynamických změnách proteinové struktury a dynamice proteinových interakcí. Vzhledem k možnostem, které tato metoda nabízí, se HDX stala atraktivní metodou pro charakterizaci proteinových biofarmaceutik. **Cíl:** Cílem tohoto přehledového článku je poukázat na možnosti využití hmotnostní spektrometrie v biofarmaceutickém průmyslu se zaměřením na metodu HDX a její aplikace.

Klíčová slova

hmotnostní spektrometrie – proteomika – konformace proteinů – objevování léků – farmaceutický průmysl – vodík/deuteriová výměna

Summary

Background: The development of biopharmaceuticals is the fastest growing segment of the present pharmaceutical industry. The analysis of proteins therapeutics is a challenging task due to their large size and complexity of spatial structure. Any changes in the primary, secondary, tertiary or quaternary protein structure can have huge impact on their function, efficiency and toxicity. Mass spectrometry proved itself to be a powerful tool for analysis of primary protein structure (amino acid sequence) and thanks to the development of new techniques in last years it is able to analyse higher order protein structures. One of these new techniques is hydrogen/deuterium exchange (HDX). HDX is based on exchange of amid protons with deuterium from solution on the protein backbone chain. Protons on the surface of protein are exchanging with deuterium much faster than protons buried inside of protein. HDX results could provide information about spatial protein structure and also about protein-protein interactions and protein-ligand interactions. Furthermore, by analysing of deuterium exchange in different time points this method could give information about dynamic changes of protein structure and dynamics of proteins interactions. Because of possibilities of this method, HDX become attractive method for characterization of protein biopharmaceuticals. **Aims:** This review article is focused on the utilization of mass spectrometry in biopharmaceutical industry and mainly on HDX method and its applications.

Key words

mass spectrometry – proteomics – protein conformation – drug discovery – drug industry – hydrogen/deuterium exchange

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

The work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Dominika Coufalová
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: dominika.coufalova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 23. 5. 2016

Přijato/Accepted: 10. 6. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20164559>

Úvod

Vývoj biofarmaceutik, z nichž největší část představují protilátky a rekombinantní proteiny, je jednou z nejvíce dynamicky se rozvíjejících oblastí farmaceutického průmyslu. Biofarmaceutika však nejsou žádným nováčkem mezi používanými léčivy a např. rekombinantní protein inzulin je k léčbě diabetu úspěšně užíván již několik desítek let. Proteinová léčiva se od standardních nízkomolekulárních léčiv liší nejen svoji velikostí dosahující až stovky kDa, ale i svou vysokou komplexitou. Kvůli ní vyžaduje navrhování nových biofarmaceutik zcela odlišný přístup. Prostorové uspořádání a funkce nízkomolekulárních léčiv jsou přímo závislé na jejich struktuře. U proteinů je situace složitější, neboť protein se stává funkčním až po sbalení do nativní konformace, obvykle za účasti dalších proteinů (chaperonů). Nesprávně složené proteiny podléhají agregaci *in vivo* i *in vitro* a stávají se cílem proteáz. Navíc kromě ztráty funkce může agregace proteinů spouštět nežádoucí imunitní odpověď. Přes všechny obtíže, které přináší analýza biofarmaceutických produktů, nabízejí proteinová léčiva unikátní vlastnosti a funkce, které nelze zastoupit malými syntetickými molekulami. Mezi jejich velké výhody patří vysoká specifita, bezpečnost, méně negativních vedlejších efektů a dlouhá životnost v organismu.

Nepostradatelným nástrojem pro charakterizaci proteinových léčiv se stala hmotnostní spektrometrie (mass spektrometry – MS), která umožňuje analyzovat nejen kovalentní strukturu, ale i konformaci proteinů, její dynamické změny a interakce s dalšími proteiny či jinými ligandy [1,2]. V současné době je MS nejvíce využívána pro charakterizaci kovalentní struktury proteinů, tedy jejich aminokyselinové sekvence, a posttranslačních modifikací (PTM) [3,4].

Metody analýzy proteinové konformace

Mezi klasické metody studia proteinových konformací patří rentgenová krystalografie a nukleární magnetická rezonance (NMR). Obě metody se v minulosti ukázaly jako velice přínosné pro detailní charakterizaci proteinové struktury

a proteinových komplexů. Avšak vzhledem k jejich limitujícím faktorům nejsou v řadě případů nejvhodnější volbou pro analýzu biofarmaceutik.

Rentgenová krystalografie je jedinečnou metodou pro určení absolutní prostorové struktury proteinů vč. polohy všech atomů a vazeb mezi nimi. Jak již vyplývá z názvu, tato metoda vyžaduje krystalizaci proteinu, což ovšem znemožňuje analýzu proteinů za fyziologických podmínek. Navíc částečně sbalené proteiny je obtížnější krystalizovat, proto při analýze roztoku se směsí složených a částečně složených proteinů není možné určit poměr obou forem. Příbuzná metoda „X-ray scattering“, která umožňuje analýzu proteinů přímo v roztoku, je limitována nízkým rozlišením [5].

Oproti rentgenové krystalografii je vysokorozlišovací NMR schopná odhalit detaily vyšších struktur vč. jejich dynamických změn. Metoda je však omezena maximální velikostí molekul (~30 kDa), čímž je pro většinu biofarmaceutických produktů nevyužitelná. Není tedy překvapením, že rutinní analýzy konformace a stability proteinových léčiv jsou stále závislé na klasických biofyzikálních metodách, jako jsou metody spektroskopické (cirkulární dichroismus, fluorescence, UV absorpce, FTIR spektroskopie), kalorimetrie, analytická ultracentrifugace a gelová chromatografie [6]. Metody umožňují analyzovat protein za fyziologických podmínek, jejich nevýhodou je však nízké rozlišení a neschopnost detekce dynamických změn proteinové konformace.

MS a analýza konformace proteinů

MS je další účinnou metodou pro analýzu struktury biopolymerů, avšak bez spojení s jinými technikami umožňuje pouze charakterizaci aminokyselinové sekvence proteinů a PTM. Teprve až s rozvojem nových metod během posledních dvou desetiletí došlo k výraznému rozšíření použitelnosti MS i pro studium vyšších proteinových struktur, jejich dynamických změn a interakcí s proteiny či nízkomolekulárními ligandy. Přesto však většina aplikací zůstává i nadále pouze doménou akademických pracovišť, a to zejména kvůli

obtížné automatizaci celého postupu. Příkladem je chemické zesítení, které je vhodné pro studium proteinových struktur i protein-proteinových interakcí, ale poskytuje nízké výtěžky, a není tudíž zcela vyhovující pro specifické požadavky biofarmaceutického průmyslu, který vyžaduje vysoké výtěžky, automatizaci přípravy vzorků i vyhodnocení dat [7]. Naproti tomu metody přímé ionizace v elektrospreji (ESI) a vodík/deuteriová výměna (HDX) ve spojení s MS si cestu do biofarmaceutických laboratoří již našly.

Přímá ESI-MS

Přímá ESI-MS využívá šetrné ionizace proteinů v ESI, která umožňuje transfer proteinů z kapalně fáze do plynné, aniž by došlo ke změně jejich konformace nebo narušení nekovalentních vazeb. Přímá ESI-MS je v biofarmaceutickém průmyslu nejčastěji používána ke studiu rozložení nábojových stavů a ke studiu protein-proteinových a protein-ligandových interakcí [8,9]. Schopnost proteinu přijímat více nábojů během ionizace přímo souvisí s jeho konformací, díky tomu je možné sledováním nábojových stavů a zejména jejich změn detekovat výrazné strukturální změny proteinů, a to např. jejich denaturaci [10]. Proteiny sbalené v nativní formě mají kompaktní strukturu, která je schopná přijmout relativně malé množství nábojů. Naopak denaturované proteiny, ale i proteiny s navázanými ligandy a proteinové oligomery, které mají mnohem větší strukturu, dokážou přijmout mnohem větší počet nábojů. Z hmotnostních spekter lze následně porovnáním populace píků s nízkým počtem nábojů a vysokým počtem nábojů určit zastoupení jednotlivých forem proteinu.

Hlavními výhodami metody jsou její jednoduchost (nevyžaduje žádné značení ani imobilizaci proteinů), rychlost, nízká spotřeba vzorku a specifita (umožňuje přímo měřit vazebnou stechiometrii a analyzovat směsné vzorky). Mezi nevýhody přímé ESI-MS patří nutnost měření proteinu v roztoku vhodném pro ionizaci, což v řadě případů vylučuje možnost použití pufru optimálního pro protein, a také nízké rozlišení, které sice dovoluje detekci strukturálních

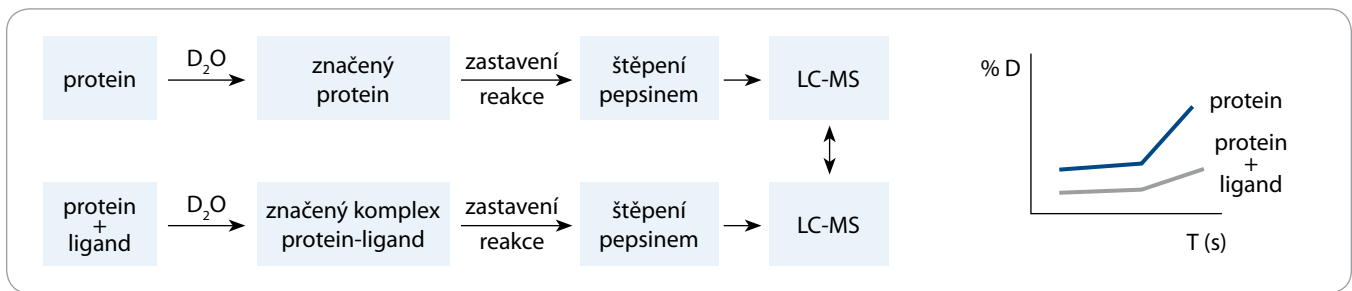


Schéma 1. Schéma HDX-MS experimentu.

Protein je nejprve inkubován samostatně a s ligandem po dobu potřebnou k vytvoření protein-ligandové interakce. Následně je přidáním pufru s D_2O zahájena reakce výměny deuterií, která je v požadovaných časových intervalech zastavena okyselením vzorku na pH 2,5 a zamražením v tekutém dusíku. V dalším kroku je vzorek rychle rozmražen a dávkován na pepsinovou kolonu, kde dochází ke štěpení proteinu. Vzniklé peptidy jsou separovány na analytické koloně a měřeny hmotnostním spektrometrem. Výsledná data pro protein a protein s ligandem jsou porovnávána speciálním softwarem a výsledky jsou nejčastěji prezentovány formou grafů zobrazujících závislost procenta deuterace na délce deuterace.

MS – hmotnostní spektrometrie, LC – kapalinová chromatografie

změn proteinů, ale je již nedostačující pro lokalizaci změn v rámci aminokyselinové sekvence.

HDX-MS

HDX-MS je spolehlivá, robustní a dostatečně senzitivní metoda pro analýzu proteinové konformace, protein-proteinových interakcí, protein-ligandových interakcí a agregace proteinů [11,12]. Na rozdíl od výše zmiňovaných metod dokáže nejen detekovat globální změny ve struktuře proteinu, ale je schopná je lokalizovat na aminokyselinové úrovni. Experimenty je navíc možné provádět v pufrách za fyziologických podmínek, pH a přítomnosti solí [13].

Základním principem metody HDX-MS je schopnost proteinů vyměňovat své vodíky za vodíky přítomné v okolním prostředí. Výměna se sice týká všech vodíků v primární struktuře, ale pouze výměna amidových vodíků hlavního řetězce je touto metodou detekovatelná [14]. Vodíky vázané v postranních řetězcích aminokyselin podléhají velice rychlé výměně, která je téměř neměřitelná, zatímco vodíky vázané na uhlících hlavního řetězce jsou vyměňovány pomalu, což neumožňuje sledování konformačních změn proteinu v žádaných časových intervalech. Rychlost výměny amidových vodíků je závislá na přítomnosti vodíkových můstků a lokalizaci vodíků v rámci prostorové struktury. Amidové vodíky vystavené na povrchu proteinu jsou vyměňovány za vodíky

z okolí rychleji než vodíky tvořící vodíkové můstky nebo méně přístupné vodíky uprostřed proteinové struktury. Princip metody byl popsán již v 50. letech 20. století při sledování výměny vodíků za deuteria u inzulinu [15]. K detekci vodíků vyměněných za deuteria byla dříve využívána zejména NMR [16] a infračervená spektroskopie [17], ale širšího využití se tato metoda dočkala až po jejím spojení s MS [18]. Vlivem výměny jednoho atomu vodíku za jeden atom deuteria vzroste molekulová hmotnost proteinu o jednotku a tuto změnu je možné přesně detekovat právě hmotnostním spektrometrem.

Základní schéma HDX-MS experimentu je znázorněno na schématu 1. V prvním kroku je protein inkubován za požadovaných podmínek s ligandem a bez ligandu. Výměnná reakce vodíků je zahájena přidáním pufru s D_2O a ve stanovených časových intervalech je reakce zastavena okyselením na pH 2,5 a zamražením v tekutém dusíku. Před měřením jsou vzorky rychle rozmrazeny a naneseny na pepsinovou kolonu, v níž dochází ke štěpení proteinů. Vzniklé peptidy jsou separovány na analytické koloně a analyzovány v hmotnostním spektrometru. Hmotnostní spektra peptidů jsou zpracována softwarem, který porovnává molekulové hmotnosti totožných deuterovaných a nedeuterovaných peptidů a vypočítává procenta deuterace. Výsledkem jsou grafy pro jednotlivé peptidy srovnávající protein s ligan-

dem a bez ligandu, kde na ose x je doba inkubace a na ose y procento deuterace.

HDX-MS si rychle nachází cestu z akademických pracovišť do biofarmaceutických laboratoří, a to díky možnosti automatizace celého procesu od přípravy vzorků, přes jejich analýzu až po vyhodnocování dat [19,20]. Mezi její nejčastější použití v biofarmaceutickém průmyslu patří epitopové mapování, studium vlivu PTM na strukturu biofarmaceutik, srovnávací studie biofarmaceutik z různých produkcí a v neposlední řadě i analýza protein-ligandových interakcí, kterou lze využít ke screeningu potenciálních nízkomolekulárních léčiv [12,21].

HDX-MS a srovnávací studie

Při výrobě biofarmaceutik je nutné zajistit srovnatelnost výsledných produktů mezi jednotlivými produkovanými šaržemi. Proteiny v nesprávné konformaci podléhají v organismu agregaci a následné degradaci a navíc mohou spouštět odpověď imunitního systému. Změny v primární struktuře proteinů je možné snadno detekovat klasickou či tandemovou MS, ale nemusí vypovídat nic o změnách vyšších struktur. HDX-MS se ukázala být velice vhodnou ortogonální metodou ke standardně používaným metodám pro analýzu proteinových konformací, jako jsou cirkulární dichroismus, kalorimetrie a gelová chromatografie. HDX-MS navíc od těchto metod dokáže konformační změny lokalizovat v rámci aminokyselinové sekvence.

HDX-MS byla použita pro srovnání tožné monoklonální protilátky vyrobené ve třech různých výrobních procesech [22]. Pro analýzu vzorků byla použita globální i lokální analýza a automatizovaný systém pro přípravu i měření vzorků. Výsledky ukázaly, že mezi vzorky nebyly změny na globální proteinové úrovni ani na lokální peptidové úrovni. Analýza stejných vzorků protilátek byla pro srovnání provedena i v jiné laboratoři vybavené stejným hmotnostním spektrometrem, ale bez automatizovaného systému přípravy vzorků. Výsledná data též potvrdila, že mezi analyzovanými protilátkami není rozdíl v proteinové struktuře.

HDX-MS a epitopové mapování

Epitopové mapování je přístup sloužící k popisu specifické interakce mezi paratopem protilátky a epitopem antigenu. Vzniklý komplex protilátka-antigen může aktivovat imunitní odpověď organismu nebo inaktivovat antigen. Epitopy se dělí na lineární a konformační. Lineární epitopy jsou definované aminokyselinovou sekvencí a denaturace neovlivňuje jejich funkčnost. U konformačních epitopů je funkce úzce spjatá s jejich prostorovou strukturou a denaturací se ztrácí. Zejména charakterizace konformačních epitopů je náročná, jelikož je nutné antigeny i protilátky analyzovat za nativních podmínek. Identifikace a charakterizace epitopů je zásadní pro vývoj nových protilátek i ochranu duševního vlastnictví v biofarmaceutickém průmyslu [23,24].

HDX-MS je vhodná metoda pro identifikace lineárních i konformačních epitopů, jak ukazuje následující příklad. Zhang et al analyzovali epitop u alergenu (Ana o 2) z kešu oříšků v komplexu s dvěma protilátkami (2B5 a 1F5) [25]. Výsledek odhalil, že protilátka 2B5 interaguje s lineárním epitopem, zatímco protilátka 1F5 pro vazbu potřebuje epitop konformační. HDX-MS v tomto případě umožnila přesně lokalizovat epitop, a to s vynaložením menšího úsilí, než vyžadují konvenční metody epitopového mapování. V některých případech je však vhodné kombinovat více metod, jako tomu bylo u epitopového mapování meningokového lipoproteinu fHbp (faktor H vázající protein) [26]. V tomto pří-

padě byla použita HDX-MS i rentgenová krystalografie. Nalezený epitop byl konformační povahy, což vysvětlilo, proč se v předchozích experimentech využívajících klasické metody epitopového mapování (např. fágový display) nepodařilo epitop dostatečně charakterizovat. Popsaný epitop slouží k přípravě syntetické peptidové vakcíny obsahující imunodominantní epitop navržený dle výsledků z epitopového mapování.

HDX-MS a vliv posttranslační modifikace na strukturu proteinů

Posttranslační modifikace proteinových biofarmaceutik mohou vznikat přirozeně (glykosylace, fosforylace, metylace...) nebo uměle (PEGylace, konjugace s léky) v závislosti na výrobním procesu a požadavcích. Kromě detekce a identifikace PTM je u biofarmaceutik nutné ověřit, zdali přítomnost dané PTM ovlivňuje strukturu proteinu a tím i jeho funkčnost. Například u glykosylací, které patří mezi nejčastější PTM, byl prokázán vliv na skládání proteinu, vazby s interakčními partnery i na imunitní odpověď organismu [27].

Houde et al ve své studii pomocí HDX-MS srovnávali účinek glykosylace na konformaci monoklonálních IgG1 protilátek [28]. Výsledky ukázaly, že oxidace a galaktosylace methioninu ovlivnila strukturu IgG1, zatímco fukosylace na ni neměla žádný vliv. Z uměle vytvořených modifikací jsou velice zajímavé konjugáty protilátky s lékem (antibody-drug conjugate – ADC) tvořené specifickou tumor rozpoznávající protilátkou s navázaným chemoterapeutikem, které je takto zacíleno přímo do nádorové buňky. Nezbytným krokem ve vývoji nových ADC je ověření, zdali vazba léku s protilátkou nezpůsobuje změny ve struktuře protilátky, k čemuž je možné využít právě metodu HDX-MS [29].

HDX-MS a protein-ligandové interakce

Kromě charakterizace samotných proteinových léčiv je možné metodu HDX-MS využít i ke sledování účinku nízkomolekulárních léčiv na cílové proteiny. Takto lze pozorovat, zdali léčivo interaguje s předpokládanou oblastí či zdali dokáže změnit konformaci proteinu na aktivní či neaktivní formu.

HDX-MS byla např. použita pro ověření interakce mezi navrženým nízkomolekulárním ligandem a onkoproteinem Reptin [30]. Analýza potvrdila protein-ligandovou interakci a navíc s přesností na peptidy určila interakční místo. Obdobně i v případě proteinu MDM2 HDX-MS potvrdila interakci s nízkomolekulárním ligandem Nutlin-3 [31].

Závěr

Vzrůstající poptávka po nových biofarmaceutikách vytváří tlak na vývoj analytických metod schopných léčiva kompletně analyzovat s vysokou reprodukcibilitou a ve velkých množstvích. Metoda MS si již našla své stabilní místo pro analýzu primární struktury proteinů a propojením s novými technikami se pomalu stává nepostradatelnou i pro charakterizaci proteinových konformací a vazeb s interakčními partnery. Zejména spojení s HDX je zajímavé pro biofarmaceutický průmysl, jelikož dokáže snadno odpovědět na otázky týkající se komplexní struktury biofarmaceutik, jejich dynamických změn a interakcí a navíc umožňuje proces od přípravy vzorků až po vyhodnocování dat z velké části automatizovat.

Literatura

1. Kaltashov IA, Eyles SJ. Studies of biomolecular conformations and conformational dynamics by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2002; 21(1): 37–71.
2. Dvořáková P, Hernychová L, Vojtěšek B. Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. *Klin Onkol* 2014; 27 (Suppl 1): S104–S109. doi: 10.14735/amko2014S104.
3. Zhang Z, Pan H, Chen X. Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies. *Mass Spectrom Rev* 2009; 28(1): 147–176. doi: 10.1002/mas.20190.
4. Srebalus Barnes CA, Lim A. Applications of mass spectrometry for the structural characterization of recombinant protein pharmaceuticals. *Mass Spectrom Rev* 2007; 26(3): 370–388.
5. Petoukhov MV, Svergun DI. Analysis of X-ray and neutron scattering from biomacromolecular solutions. *Curr Opin Struct Biol* 2007; 17(5): 562–571.
6. Capelle MA, Gurny R, Arvinte T. High throughput screening of protein formulation stability: practical considerations. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 65(2): 131–148.
7. Back JW, de Jong L, Muijsers AO et al. Chemical cross-linking and mass spectrometry for protein structural modeling. *J Mol Biol* 2003; 331(2): 303–313.
8. Griffith WP, Kaltashov IA. Highly asymmetric interactions between globin chains during hemoglobin assembly revealed by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry* 2003; 42(33): 10024–10033.
9. Van den Bremer ET, Jiskoot W, James R et al. Probing metal ion binding and conformational properties of the colicin E9 endonuclease by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Protein Sci* 2002; 11(7): 1738–1752.

10. Loo JA, Loo RR, Udseth HR et al. Solvent-induced conformational changes of polypeptides probed by electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1991; 5(3): 101–105.
11. Coufalová D, Vojtěšek B, Hernychová L. Co může přinést studium oligomerizace proteinů v procesu onkogeneze? *Klin Onkol* 2015; 28 (Suppl 2): 2S6–2S10. doi: 10.14735/amko20152S6.
12. Huang RY, Chen G. Higher order structure characterization of protein therapeutics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2014; 406(26): 6541–6558. doi: 10.1007/s00216-014-7924-3.
13. Hamuro Y, Coales SJ, Southern MR et al. Rapid analysis of protein structure and dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J Biomol Tech* 2003; 14(3): 171–182.
14. Hvidt A, Nielsen SO. Hydrogen exchange in proteins. *Adv Protein Chem* 1966; 21: 287–386.
15. Hvidt A, Linderstrom-Lang K. The kinetics of the deuterium exchange of insulin with D₂O; an amendment. *Biochim Biophys Acta* 1955; 16(1): 168–169.
16. Englander SW, Mayne L. Protein folding studied using hydrogen-exchange labeling and two-dimensional NMR. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992; 21: 243–265.
17. Haris PI, Chapman D. The conformational analysis of peptides using Fourier transform IR spectroscopy. *Biopolymers* 1995; 37(4): 251–263.
18. Katta V, Chait BT. Conformational changes in proteins probed by hydrogen-exchange electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1991; 5(4): 214–217.
19. Chalmers MJ, Busby SA, Pascal BD et al. Probing protein ligand interactions by automated hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal Chem* 2006; 78(4): 1005–1014.
20. Kaltashov IA, Bobst CE, Abzalimov RR et al. Conformation and dynamics of biopharmaceuticals: transition of mass spectrometry-based tools from academe to industry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2010; 21(3): 323–337. doi: 10.1016/j.jasms.2009.10.013.
21. Marciano DP, Dharmarajan V, Griffin PR. HDX-MS guided drug discovery: small molecules and biopharmaceuticals. *Curr Opin Struct Biol* 2014; 28: 105–111. doi: 10.1016/j.sbi.2014.08.007.
22. Wei H, Mo J, Tao L et al. Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications. *Drug Discov Today* 2014; 19(1): 95–102. doi: 10.1016/j.drudis.2013.07.019.
23. Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D et al. Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem* 2013; 85(2): 715–736. doi: 10.1021/ac3032355.
24. Li Pira G, Ivaldi F, Moretti P et al. High throughput T epitope mapping and vaccine development. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 325720. doi: 10.1155/2010/325720.
25. Zhang Q, Willison LN, Tripathi P et al. Epitope mapping of a 95 kDa antigen in complex with antibody by solution-phase amide backbone hydrogen/deuterium exchange monitored by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chem* 2011; 83(18): 7129–7136. doi: 10.1021/ac201501z.
26. Malito E, Faleri A, Lo Surdo P et al. Defining a protective epitope on factor H binding protein, a key meningococcal virulence factor and vaccine antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(9): 3304–3309. doi: 10.1073/pnas.1222845110.
27. Muthana SM, Campbell CT, Gildersleeve JC. Modifications of glycans: biological significance and therapeutic opportunities. *ACS Chem Biol* 2012; 7(1): 31–43. doi: 10.1021/cb2004466.
28. Houde D, Peng Y, Berkowitz SA et al. Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9(8): 1716–1728. doi: 10.1074/mcp.M900540-MCP200.
29. Pan LY, Salas-Solano O, Valliere-Douglass JF. Conformation and dynamics of interchain cysteine-linked antibody-drug conjugates as revealed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal Chem* 2014; 86(5): 2657–2664. doi: 10.1021/ac404003q.
30. Healy AR, Houston DR, Remnant L et al. Discovery of a novel ligand that modulates the protein-protein interactions of the AAA+ superfamily oncoprotein reptin. *Chem Sci* 2015; 6(5): 3109–3116. doi: 10.1039/C4SC03885A.
31. Hernychova L, Man P, Verma C et al. Identification of a second Nutlin-3 responsive interaction site in the N-terminal domain of MDM2 using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Proteomics* 2013; 13(16): 2512–2525. doi: 10.1002/pmic.201300029.