

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Sárközy Dániel

**Kapilláris elektroforézis és tömegspektrometriás
módszerek fejlesztése terápiás fehérjék, valamint N-kötött
és szabad glikánok karakterizálására**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Kapilláris elektroforézis és tömegspektrometriás
módszerek fejlesztése terápiás fehérjék, valamint N-kötött
és szabad glikánok karakterizálására**

Sárközy Dániel

Témavezető: Dr. Guttman András



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. Terápiás fehérjék karakterizálása	7
2.1.1. A fehérjegyógyszerek jelentősége és fejlődése.....	7
2.1.2. A terápiás antitestek jellemzői	8
2.1.3. A monoklonális antitestek minőségi és mennyiségi meghatározása – műszeres analitikai módszerek a gyakorlatban.....	13
2.1.4. Fehérjeanalitika kapilláris elektroforézis és tömegspektrometria alkalmazásával	14
2.1.5. Fehérjék molekulatömegének SDS-CGE alapú meghatározása: a Ferguson módszer	23
2.1.6. Fehérjék molekulatömegének meghatározása MS alapú módszerekkel.....	27
2.2. Oligoszacharidok karakterizálása	34
2.2.1. N-kötött glikánok jelentősége	34
2.2.2. Glikánanalitika CGE-LIF és CE-MS segítségével	35
2.2.3. Szabad oligoszacharidok jelentősége.....	48
2.2.4. Humán tej oligoszacharidok és csecsemő tápszer formulák szabad cukortartalmának vizsgálata CGE-LIF és MS módszerekkel.....	50
2.3. Módszerfejlesztési stratégiák: CGE-, és SDS-CGE-MS	52
2.4. A dolgozatban bemutatott bioterapeutikumok fehérje-, és glikánanalitikai szempontból végzett CGE-alapú vizsgálatainak jelentősége	56
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	59
3.1. Felhasznált anyagok.....	59
3.2. Módszerek.....	59
3.2.1. Fehérjeminták előkészítése a CGE-UV mérésekhez	59
3.2.2. Peptid és fehérje minták előkészítése a CGE-MS, és SDS-CGE-MS mérésekhez.....	60
3.2.3. N-glikán minták előkészítése a CGE-LIF mérésekhez	60
3.2.4. Szabad oligoszacharid minták előkészítése	61
3.2.5. Alkalmazott elválasztó közegek (pufferek, gélek).....	62
3.2.6. Készülékek és mérési paraméterek	62
4. EREDMÉNYEK	66
4.1. Az omalizumab és bamlanivimab bioterapeutikumok fehérje alegység-, és N-glikán szintű karakterizálása CGE-UV, cIEF és CGE-LIF módszerekkel.....	66
4.1.1. Intakt fehérje és alegység integritás analízis (SDS-CGE) - omalizumab	66
4.1.2. Intakt fehérje, alegység integritás és töltés variáns analízise (SDS-CGE, cIEF) - bamlanivimab.....	68
4.1.3. Omalizumab és bamlanivimab bioterapeutikumok N-glikán analízise	72

4.2.	Agaróz alapú SDS-CGE-UV módszer fejlesztése az elválasztó gél-, és migrációs tulajdonságok jellemzésének, valamint terápiás fehérjék méretének Ferguson-elv szerinti meghatározásának céljából	80
4.3.	MS detektálással kapcsolt CGE módszer és interfész fejlesztése natív, valamint SDS-fehérjék és peptidek analízisére	87
4.4.	Humán tej oligoszacharidok és csecsemő tápszer formulák szabad oligoszacharid tartalmának analízise CGE-LIF módszerrel	95
4.4.1.	Humán tej oligoszacharid analízis	95
4.4.2.	Galaktooligoszacharid analízis	100
5.	MEGBESZÉLÉS	105
5.1.	Omalizumab – fehérje és N-glikán analízis kritikai elemzése.....	105
5.2.	Bamlanivimab – fehérje és N-glikán analízis kritikai elemzése.....	106
5.3.	Az agaróz-SDS-CGE-UV módszer analitikai jellemzőinek értékelése.....	107
5.4.	CGE-MS és SDS-CGE-MS eredmények értékelése.....	109
5.5.	HMO és GOS analízis eredményeinek értékelése	110
5.5.1.	A HMO mérések eredményeinek értékelése.....	110
5.5.2.	A GOS tartalom meghatározás eredményeinek értékelése	112
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	113
7.	SUMMARY	116
8.	IRODALOMJEGYZÉK	118
9.	TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS	126
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	127
11.	PUBLIKÁCIÓS LISTA	128

Rövidítések jegyzéke

ADCC	-	Antitestfüggő sejt-közvetített citotoxicitás (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity)
ADCP	-	Antitestfüggő sejt-közvetített fagocitózis (Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis)
API	-	Atmoszférikus nyomású ionizáció (Atmospheric Pressure Ionization)
APTS	-	8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav (8-Aminopyrene-1,3,6-Trisulfonic Acid)
Asn	-	Aszparagin (Asparagine)
BFS	-	Nem bevont falú szilika kapilláris (Bare Fused-Silica)
BGE	-	Háttér elektrolit (Background Electrolyte)
CE	-	Kapilláris elektroforézis (Capillary Electrophoresis)
CE-LIF	-	Lézer indukált fluoreszcens detektorral ellátott kapilláris elektroforézis (Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescens Detection)
CDC	-	Komplement függő citotoxicitás (Complement-dependent Cytotoxicity)
cIEF	-	Kapilláris izoelektromos fókuszálás (Capillary Isoelectric Focusing)
CSFRI	-	Koaxiális köpenyfolyadékos reaktor interfész (Coaxial Sheath Flow Reactor Interface)
CGE	-	Kapilláris gél elektroforézis (Capillary Gel Electrophoresis)
ESI	-	Elektrospray ionizáció (Electrospray Ionization)
FcFP	-	Fc fúziós fehérje (Fc Fusion Protein)
GOS	-	Galaktooligoszacharid (Galactooligosaccharide)
HILIC	-	Hidrofil kölcsönhatási kromatográfia (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HMO	-	Humán tej oligoszacharid (Human Milk Oligosaccharide)
HPLC	-	Nagyteljesítményű folyadék kromatográfia (High Performance Liquid Chromatography)
Lac	-	Laktóz (Lactose)
LNnT	-	Lakto-N-neotetraóz (lacto-N-neotetraose)
LNT	-	Lakto-N-tetraóz (lacto-N-tetraose)
LNT2	-	Lakto-N-trióz (Lacto-N-triose)
MS	-	Tömegspektrometria/tömegspektrométer (Mass Spectrometry/Mass spectrometer)

MAB	-	Monoklonális antitest (Monoclonal Antibody)
pLNnH	-	Para-lakto-N-neohexaóz (para-lacto-N-neohexaose)
PNGase F	-	Peptid N-glikanáz F
PTM	-	Poszttranszlációs módosítás (Post-Translational Modification)
SD	-	Korrigált empirikus szórás (Standard Deviation)
SDS-CGE	-	Nátrium dodecilszulfát-kapilláris gélelektroforézis (Sodium dodecylsulphate-Capillary Gel Electrophoresis)
SDS-CGE-MS	-	Nátrium dodecilszulfát-kapilláris gélelektroforézissel kapcsolt tömegspektrometria (Sodium Dodecyl Sulphate-Capillary Gel Electrophoresis-coupled Mass Spectrometry)
SDS-PAGE	-	Nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
2'FL	-	2'-fukozillaktóz (2'-fucosyllactose)
3FL	-	3-fukozillaktóz (3-fucosyllactose)
3'SL	-	3'-szialillaktóz (3'-sialyllactose)
6'SL	-	6'-szialillaktóz (6'-sialyllactose)

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Napjainkban a műszeres analitikai technikák alkalmazása iránti igény növekvő tendenciát mutat, mely elsődlegesen a biotechnológiai, élelmiszeripari, illetve orvosi kutatólaboratóriumok elmúlt évtizedekben történő robbanásszerű fejlődésével, valamint a különböző gyógyszer hatóanyagokkal, élelmiszer összetevőkkel és ezek tisztaságával szemben támasztott egyre szigorodó minőségbiztosítási előírások megjelenésével magyarázható. Az újgenerációs biologikumokra (legyen szó akár nagyobb molekulájú terápiás fehérjékről, akár kisebb molekulaméretű étrend kiegészítő komponensekről, melyeket tipikusan élő organizmusok segítségével állítanak elő) egy természetes szerkezeti változatosság jellemző, mely által a késztermékek bizonyos fokú variabilitást (mikroheterogenitást) mutatnak. Ezen változatoknak minden esetben előre definiált tartományokon belül kell maradniuk a biztonságos alkalmazhatóság és hatásosság elérése érdekében, melyek számszerűsítéséhez műszeres analitikai technikák és az azokhoz tartozó módszerek megalkotása, illetve folyamatos fejlesztése válik szükségessé [1, 2].

A kapilláris elektroforézis (CE) egy egyszerűen alkalmazható, gyors és nagyfelbontású analitikai technika, mely kis mintaigényével, valamint rendkívüli hatékonyságával egyre nagyobb teret hódít az elválasztástechnika világában, megcélözva többek közt orvosi diagnosztikai (pl. biomarker azonosítás) és ipari (pl. gyógyszer tisztaság vizsgálatok) feladatok ellátását, továbbá a klasszikus kromatográfiai módszerek által nem, vagy csak nehezen megoldható analitikai problémák áthidalását. A legtöbb biológiai eredetű molekula azonosításához azonban nem csupán a legalkalmasabb elválasztási módszer megtalálása fontos. Legalább ekkora relevanciával bír a megfelelő detektálási mód kiválasztása is, mely optimális esetben egy jól definiálható képet ad a vizsgálandó analitokról, valamint lehetővé teszi azok pontos minőségi és mennyiségi azonosítását. A klasszikus ultraibolya abszorbanancia (UV) alapú detektálási módszerek mellett ma már előnyt élveznek a modernebb, indirekt elven működő (pl. lézer indukált fluoreszcencia, röviden LIF - alapú) módszerek, melyek derivatizált minták nagy érzékenységgű észlelését és karakterizálását teszik lehetővé, valamint azon kapcsolt technikák, melyek direkt módon valósítanak meg ugyancsak nagy érzékenységgű és nagy felbontású strukturális információgyűjtést. Ez utóbbiak közül a biológiai minta típusától függően az elektropray ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS) bizonyul az egyik legjobb megoldásnak és nyújt rendkívül részletes strukturális információt kis-, és nagymolekulákról egyaránt. A tömegspektrometriát a mai analitikai gyakorlatban már előszeretettel alkalmazzák

akár önmagában, akár kromatográfias vagy elektroforetikus elválasztástechnikai módszerekkel kapcsolva, mind a biotechnológiában, mind molekuláris biológiai és orvosi analitikai célokra [3, 4].

Doktori munkám, valamint jelen értekezés célja, hogy a bioanalitikában, illetve mikrofluidikában ismeretes, CE-alapú módszereket újgenerációs, fehérje alapú bioterapeutikumok, valamint N-kötött és szabad oligoszacharidok karakterizálásán keresztül szemléltesse. Ezek mellett fontosnak tartom bemutatni azokat az elektroforetikus elválasztó közegeket (háttér elektrolitok, BGE-k), melyeket kutatómunkám során az alkalmazott detektálási módokhoz optimalizálva fejlesztettem ki, ugyanis ezek tették lehetővé számomra a különböző mintatípusok szerinti hatékonyabb CE analízist. Dolgozatomban kiemelem a tömegspektrometriás detektálást és annak elektroforetikus elválasztás utáni alkalmazhatóságát, mely elsődlegesen a kifejlesztett elválasztó közegek összetevőinek függvényében változik. Célom volt továbbá, hogy egy a biotechnológiai ipar számára évek óta megoldatlan analitikai problémára (fehérjék méret szerinti elválasztását követő pontos, "on-line" szerkezetazonosítás) alternatív megoldást ismertessek. Ennek lényege, hogy a klasszikus nátrium dodecilszulfát poliakrilamid lapgélelektroforézis (SDS-PAGE) technika analógjaként alkalmazható, gyorsabb és on-line detektálást lehetővé tévő SDS-kapilláris gélelektroforézist (SDS-CGE) tömegspektrometriás detektálással kapcsolva optimalizáljam, ezzel megalkotva egy olyan analitikai rendszer kombinációt, mellyel a fehérjék méret szerinti elválasztását tömegspektrometria általi, egyértelmű strukturális azonosítás követheti.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Terápiás fehérjék karakterizálása

2.1.1. A fehérjegyógyszerek jelentősége és fejlődése

A fehérje alapú gyógyszerek klinikumban való felhasználásukat tekintve egyre elterjedtebbé váltak az elmúlt évtizedekben, mely elsősorban széleskörű terápiás alkalmazhatóságuknak köszönhető. 2010-re több, mint száz természetes és ugyanennyi módosított fehérje típusú gyógyszert engedélyeztek az Európai Unió és az Egyesült Államok területén, 2021-re pedig az engedélyezett, kizárólag monoklonális antitest (mAb) alapú terapeutikumok száma is elérte a százat, ezzel csaknem felét kiteve a világ éves gyógyszeripari bevételének [5, 6].

Történelmileg elsősorban két paradigma változást fontos megemlíteni a bioterapeutikumok kapcsán, melyek megalapozták a terápiás antitestek alkalmazásának lehetőségeit. Az első lényeges felfedezés Emil von Behring Nobel-díjas immunológus nevéhez fűződik, aki az 1880-as években kifejlesztett ellenszere révén vált ismertté, melynek neutralizáló hatásával szérum terápia során semlegesíthetővé vált a diftériát okozó baktérium számos esetben halált okozó toxinja. A felfedezett antitoxin ezrek életét mentette meg és vált hatékony terápiává az addig kezelhetetlennek tűnő, magas mortalitású betegséggel szemben. A másik fontos paradigma változást a Köhler és Milstein nevéhez fűződő hibridóma technika hozta el, ami lehetővé tette, hogy csaknem korlátlan mennyiségben szelektálható monoklonális antitest állhasson a kutatók és orvosok rendelkezésére vizsgálati és terápiás szempontból meghatározott specificitással. A technika sikeréhez természetesen hozzájárultak az azóta is folyamatosan fejlődő molekuláris biológiai módszerek, főként a rekombináns DNS alapú eljárások, illetve azok, melyek segítettek részletes képet formálni és megérteni az antitestek szerkezeti sajátosságait, így vezetve el a tudományt a kiméra és humanizált monoklonális antitestek megteremtéséhez, valamint működésük megértéséhez. Mindemellett, a fág display technikák és transzgénikus állatok létrehozása segítette végbemenni eme paradigma változásokat utat nyitva a mai, újgenerációs mAb-ok megalkotásához, fejlesztéséhez azok modern analitikai eszközökkel történő vizsgálatához [5].

A rekombináns fehérjék vizsgálatával foglalkozó tudományterület fejlődésében, valamint azok humán bioterapeutikumként történő előállításának és piacra kerülésének fontos alappillére a molekulák átfogó expressziós ismerete és strukturális tervezhetősége. Ezen terápiás fehérjék alapvetően három nagyobb alcsoportba rendezhetők: (1) hormonok és

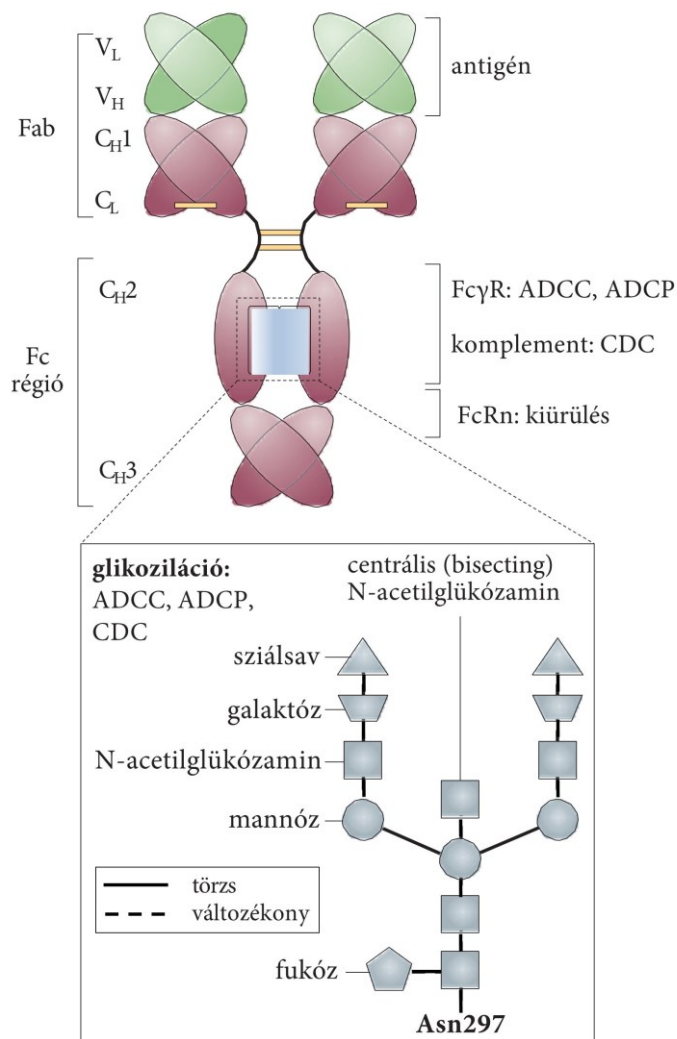
vérfaktorok, (2) enzimek és (3) citokinek. Egy rekombináns humán terapeutikum mindhárom alcsoport esetében valamely hiányzó vagy diszfunkcionális fehérjét hivatott helyettesíteni a betegek szervezetében. A legismertebb példa erre az I-es típusú cukorbetegség, amely során a beteg egyfajta immunológiai támadást indít saját inzulintermelő β -sejtjei ellen, melynek következményeképp szervezete képtelenné válik a vérben lévő glükóz transzportjára és metabolizmusára. 1923-ban az Eli Lilly gyógyszeripari vállalat fejlesztette ki az első gyártási folyamatot, melynek során létrehozták a legelső kereskedelmi forgalomban kapható inzulint, amit ekkor még Iletin néven ismertek. A gyártási módszer eleinte haszonállatok (sertés, szarvasmarha) hasnyálmirigyéből kivont enzim tisztításán alapult, de mivel a fehérje ezen formái szekvenciáiban néhány aminosavval eltértek a humán inzulinétól, sok esetben a beteg szervezete antitesteket termelt a molekulákkal szemben, így ezek súlyos immunreakciót is kiválthattak. A '70-es évek elején ezt a módszert váltotta a rekombináns DNS forradalmat kihasználva a Genentech cég korszakalkotó újítása, mely szerint genetikailag módosított *Escherichia coli* baktériummal is előállítható az enzim jelentősen nagyobb hozammal és tisztasággal. A módszert az addigra már népszerű Eli Lilly cég licenszelte és a sikeres klinikai vizsgálatok után 1982 végén piacra dobta a Humulin nevű, a humán eredetűvel teljesen megegyező szerkezetű fehérjét [7]. Nem sokkal ezt követően jelentek meg az első, antitest alapú fehérje terapeutikumok is.

2.1.2. A terápiás antitestek jellemzői

A monoklonális antitestek és Fc fúziós fehérjék (FcFP-k) funkciójukat tekintve alapvetően eltérnek az inzulinhoz hasonló, helyettesítő szerepet betöltő biológikumoktól. A mAb-ok valójában olyan fehérjék, melyek képesek a szervezet saját, természetes immunoglobulin G (IgG) molekulájához hasonló biokémiai viselkedést mutatni, valamint annak bizonyos funkcióit szabályozni. Ezek segítségével patogénekhez vagy egyéb ismeretlen eredetű entitásokhoz kötődhetnek, hatásosan semlegesítve vagy eltávolítva azokat a szervezetből. Az FcFP-k pedig egy IgG molekula Fc régióját hordozzák oly módon, hogy az fuzionáltatva van egy másik, természetes vagy mesterségesen módosított fehérje molekulával (pl. receptor exodomén, citokin vagy kötőfehérje). Ezen tulajdonságaiknak köszönhetően tehát a mAb-ok és FcFP-k kötődni tudnak extracelluláris célmolekulákhoz, sejtekhez vagy más patogénekhez, melyeket képesek semlegesíteni, funkciójukat blokkolni vagy eltávolítani azokat a keringésből. Mindemellett, sok esetben képesek szabályozni a célmolekulák aktivitását is, aminek eredményeképp némi hasonlóság fedezhető fel azon kisebb méretű molekulákkal, melyek

farmakológiailag aktív ágensekként módosítani tudják egy betegség aktív komponenseit (pl. a tumor nekrozis faktor alfa (TNF α) és az interleukin 1 béta (IL1 β)). Az első kereskedelmi forgalomban kapható terápiás antitest a Humulin megjelenése után 4 évvel került a piacra 1986-ban az Ortho Biotech cég által, mely a Johnson & Johnson leányvállalataként állította elő Orthoclone OKT3 (muronomab CD3) nevű immunszuppresszáns termékét. A gyártási és ellenőrzési folyamatok komplexitását jól mutatja, hogy a következő mAb alapú gyógyszer megjelenéséig újabb 8 év telt el [7, 8]. Ez a folyamat azonban a 2010-es évektől felgyorsult, és napjainkra már csaknem 7000-nél tart a klinikai vizsgálatban szereplő-, és 400 feletti a III. klinikai fázisnál tartó, elfogadás vagy elutasítás előtti monoklonális antitest alapú bioterapeutikumok száma (www.clinicaltrials.gov; search: mAb AND therapy).

Szerkezetüket tekintve a terápiás antitestek olyan glikoproteinek, melyek az öt alcsoport (IgA, IgD, IgE, IgG és IgM) által képviselt immunoglobulin szupercsaládba tartoznak. Mivel az öt alcsoport közül a gyógyszeriparban jelenleg az immunoglobulin G-t használják arra, hogy génmérnökség során bioterapeutikumokat állítsanak elő, ezért a rekombináns mAb és IgG definícióját a biofarmácia egy fogalomként kezeli. Az IgG tehát egy fontos osztályát képezi az immunoglobulinoknak, mely négy alcsoportra osztható: IgG1, IgG2, IgG3 és IgG4. Az alcsoportok képviselői eltérő arányban találhatók meg a humán szervezetben és különböző szerepet töltenek be az immunrendszer működésében. Az IgG1 a legelterjedtebb alcsoport (~66%), mely főként vírusok és baktériumok elleni védelemben, például az opszonizációban (patogének megjelölése fagocitózisra), a komplement rendszer aktiválásában és az antitestfüggő sejtközvetített citotoxicitásban (ADCC) játszik kulcsfontosságú szerepet. Az IgG2 főként bakteriális poliszacharidok felismeréséért felelős, az IgG3 pedig ugyancsak a komplement rendszer aktiválása és az effektor sejtek általi patogén elpusztítás miatt kiemelkedő fontosságú. Végül, az IgG4 jelentős szerepet játszik az immuntolerancia fenntartásában, különösen krónikus antigén expozíció esetén. Együtműködésük révén ezek az alcsoportok biztosítják a szervezet védelmét különböző patogének ellen. A terápiás immunoglobulinok funkcióit főként azok idegen eredetű anyagokkal (antigének), effektorsejtek felszíni receptoraival (Fc γ R), a komplement konstans komponensével (C1q), valamint a neonatális Fc receptorral (FcRn) létrejövő kapcsolatai határozzák meg [9]. Az IgG molekula általánosan értelmezhető struktúráját és fontosabb funkcióit az 1. ábra mutatja be.



1. ábra: Az IgG molekula struktúrája és funkciói [9, 10]. ADCC: antitestfüggő sejt-közvetített citotoxicitás, ADCP: antitestfüggő sejt-közvetített fagocitózis, CDC: komplementfüggő citotoxicitás, Asn297: az Fc régió 297-es pozíciójú aszparagin, melyen keresztül számos esetben a fehérjéhez kötődve fontos biológiai funkciókat betöltő N-glikánok találhatóak.

Ezen immunoglobulinok variábilis régiója képes nem-kovalens kapcsolatot (például hidrogén kötések, Van der Waals kapcsolatot, valamint hidrofób és ionos kölcsönhatásokat) létrehozni az antigénnel, mely kapcsolat erőssége az affinitás mértékétől és a specifikusságától függ. Fontos megjegyezni, hogy ez a specifitás azt is jelenti, hogy az antitest semmilyen más molekulához nem kötődhet a szervezetben. Míg a fehérje könnyű-, és nehéz láncainak variábilis doménjein (rendszerint V_L és V_H) keresztüli kapcsolódás a kötés specifitásért felelős, a nehéz lánc konstans régiójának (Fc) az effektorsejtek felszíni receptoraihoz való kötődése bizonyos funkciókat, többek közt az effektorsejtek fagocitózását

(ADCP), és ellenük kifejtett citototoxikus hatását (ADCC) vagy a komplement által kiváltott sejtpusztítást (CDC) szabályozza. Az antitest Fc régiója továbbá felelős az immunoglobulin exkréciójának szabályozásáért is, melyet az FcRn-nel létrejövő kapcsolatán keresztül valósít meg. Mindezek mellett a mAb Fc régiójához kapcsolódó, poszttranszlációs módosulásakor (PTM) létrejövő szénhidrát struktúrák összetétele is befolyásolja az IgG effektor funkcióinak aktivitását. Ezen glikán struktúrák jelenléte a fehérje molekulán egy ún. "kritikus minőségi jellemző" (CQA), mely nagyban megnehezíti a fehérje terapeutikumok ipari előállítását, ugyanakkor biztosítja azok szerkezeti és funkcionális állandóságát [11, 12]. A glikánok fontosabb szerkezeti tulajdonságairól, jellemzőiről, valamint bioanalitikai eszközökkel történő meghatározásáról bővebben a dolgozatom 2.2 fejezetében térek ki.

Hatásmechanizmusuk alapján megkülönböztethetünk olyan terápiás monoklonális ellenanyagokat, melyek 1) citokinek és növekedési faktorokat gátolnak, 2) receptorokat blokkolnak, illetve csökkentik azok kifejeződését. Az első csoport képviselői közé tartozik például az autoimmun Crohn-betegség kezelésére fejlesztett kiméra (mesterségesen előállított vagy módosított) típusú infliximab, mely a tumor nekrosis faktor alfához (TNF α) kötődve fejt ki hatását. A gyógyszer hatékonyan képes gátolni a nevezett citokint, megakadályozva azt a sejtek aktiválásában való részvételében, ezáltal csökkentve a gyulladást és a szöveti károsodást [13]. A TNF α gátló antitestek jelenleg a leghatékonyabb bioterapeutikumok a piacon, melyeket számos egyéb gyulladással megbetegedés során alkalmaznak a klinikumban. Az infliximab mellett a neutralizáló ellenanyagok legismertebb képviselői továbbá az etanercept, adalimumab, certoluzimab és golimumab, melyek szerkezetileg részben eltérőek, ám hatásuk azonos elven alapszik. A második csoport képviselőivel nem csupán maga a ligandum, hanem a sejtmembrán receptorai is gátolhatók. Példaként itt a tocilizumab, illetve az α L integrin nevű fehérjék hozhatók fel, melyek rendszerint az interleukin-6 (IL-6) receptor blokkolására alkalmasak [14]. Napjaink legsikeresebb tumor ellenes immunterápiái ezen receptorblokkolás, illetve a receptor kifejeződés csökkentésének elvén működnek [9, 15]. Végül pedig fontos megemlíteni azon ellenanyagok csoportját is, melyek sejtpusztítással és szignalizációs folyamatokkal váltják ki hatásukat a receptor internalizációja nélkül, az immunrendszer bizonyos elemeinek (citotoxikus T-sejtek, a természetes ölösejtek és antitest-függő sejtek) aktiválásával. Legismertebb képviselőjük az 1997-ben FDA általi engedélyt szerzett rituximab nevű fehérje gyógyszer, mely hatásmechanizmusaként a B-sejtek felszínén található CD20 antigénnel kölcsönhatásba lépve elpusztítja, vagy inaktíválja azokat, és ezáltal hatékonyan csökkenti a B-sejtes limfóma és a krónikus limfocitás leukémia (CLL) kóros sejteinek számát [16]. Megjegyzendő azonban, hogy a terápia hatásaként a humorális

immunválasz a betegben minimálisra csökkenhet, így az immunhiányos állapot megelőzése érdekében a kezelés előtt kiegészítő terápiákra és védőoltásokra is szükség lehet az immunrendszer védelmének céljából [17].

Számos esetben nem csupán az immunrendszer aktiválása és védelme, hanem annak gátlása is szükségessé válhat. Az autoimmun betegségek előfordulása az elmúlt évtizedekben jelentősen növekedett, mivel napjainkra az autoimmunitásra hajlamosító genetikai tényezők mellett számos környezeti tényező is szerepet játszik ezek növekedésben. Ilyen például a környezeti szennyezés, a dohányzás, a túlzott cukor-, és zsírfogyasztás, valamint az egyéb életmódbeli változások. Az autoimmun betegek számának növekedésével ezért megnőtt az igény bizonyos újgenerációs mAb-ek megtervezésére is, melyek specifikusan képesek gátolni az immunrendszer hibás működését. Ezek a terápiás fehérjék többnyire CD3-specifikus ellenanyagok (pl. orelizumab, teplizumab), melyek Fc régióját is módosították abból a célból, hogy az effektorsejtek Fc γ -receptoraihoz ne tudjon kapcsolódni. A kezelés során ezek a mAb-ek a T-sejt receptor (TCR)-CD3 komplexhez kötődhetnek, mely a T-sejt antigénfelismerő receptorának egy jelentős eleme, és feladata az antigének felismerése, valamint a T-sejt aktiválása, aminek révén kulcsfontosságú szerepet játszik az immunválasz szabályozásában. Az újgenerációs mAb-ek által kiváltott T-sejt aktiválás során a T-sejtek segítő T-sejtekké és regulátoros T-sejtekké alakulhatnak, ezáltal immuntolerancia kiváltását eredményezve. Az itt említett gyógyszerek fontos szerepet töltenek be többek között az 1-es típusú cukorbetegség kezelésében és megelőzésében [9, 17].

Az elmúlt években vizsgált és engedélyezett, főként neutralizáló hatású terápiás antitestek aktualitásának és számának növekedésében jelentős szerepet játszott a 2019-ben megjelenő koronavírus betegség (SARS-CoV2 alfaj) folyamatosan variálódó vírus törzseinek világméretű elterjedése, melyet mind fertőzőképességében, lefolyásában, mind pedig súlyosságát és mortalitását tekintve napjaink legmeghatározóbb vírusbetegségei között tudhatunk [18]. A nagyobb gyógyszeripari cégek gyors reakciójának köszönhetően kifejlesztett és a betegség kirobbanása után viszonylag hamar az emberek számára elérhető, aktív immunizálásra alkalmas vakcina típusok mellett értelmet nyert a monoklonális antitest alapú passzív immunizálás lehetősége is, mely a betegség korai szakaszában képes javítani a súlyosabb lefolyású esetek elszenvetőinek állapotán, csökkentve ezzel az egyébként is magas mortalitási rátát. Ilyen típusú terapeutikumok például az előzetesen FDA által vészhelyzeti felhasználási engedélyt (EUA) szerzett, majd visszavont bamlanivimab, etesevimab, casirivimab, imdevimab, valamint az omicron törzs bizonyos variánsai ellen is hatásosnak bizonyuló

bebtelovimab és az első teljes körű FDA engedélyt nyert, Actemra névvel piacra került tocilizumab hatóanyag tartalmú fehérje gyógyszer [19].

Munkám során a bamlanivimab nevű gyógyszer ideiglenes engedélyeztetésekor lehetőségem adódott eme monoklonális antitestet CE alapú módszerekkel fehérje és N-glikán szinten is karakterizálni, melynek eredményeit a 4. fejezetben ismertetem.

2.1.3. A monoklonális antitestek minőségi és mennyiségi meghatározása – műszeres analitikai módszerek a gyakorlatban

A terápiás fehérjék minőségének pontos és megbízható jellemzése komoly kihívást jelent az ipar számára, mivel előállításuk során számos eltérő tulajdonsággal vértézhető fel, melyek befolyásolják hatékonyságukat és biztonságosságukat. Emiatt váltak nélkülözhetlenné azok az analitikai stratégiák és módszerek, amelyekkel a mAb-ek és más fehérjealapú gyógyszerek minősége meghatározható, ellenőrizhető, és melyek folyamatos fejlesztést igényelnek annak érdekében, hogy megbízható klinikai eredmények szülessenek, és ezáltal hatékony készítményeket lehessen előállítani. A ma ismert legfontosabb fehérjékre alkalmazható analitikai stratégiák a következők:

1) Aminosav szekvencia meghatározása: az aminosav szekvencia meghatározása alapvető fontosságú a monoklonális antitestek minőségének és hatékonyságának meghatározásához. Ez a lépés lehetővé teszi a fehérje polipeptid vázának pontos azonosítását és az esetleges mutációk, modifikációk és degradációs termékek felismerését.

2) Térbeli szerkezet analízise: a mAb-ek háromdimenziós szerkezetének azonosítása fontos a fehérje aktivitásának és stabilitásának meghatározásához. A szekvencia és szerkezet meghatározására alkalmas analitikai módszerek közé tartoznak többek közt a röntgenkristály-diffrakció, valamint a spektroszkópiás módszerek, mint például az ultraibolya (UV) vagy infravörös (IR) spektroszkópia, a mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia és a tömegspektrometria (MS).

3) Poszttranszlációs és kémiai módosítások elemzése: a bioterapeutikumok poszttranszlációs és kémiai módosításai, mint a glikoziláció, hidroxiláció, deamidáció, oxidáció, és ciklizáció, fontos hatással lehetnek a fehérje biológiai aktivitására és immunogenitására. A PTM vizsgálatokhoz legalkalmasabb analitikai módszerek között szintén meg kell említeni a tömegspektrometriát, valamint az elektroforetikus és kromatográfiás módszereket különböző detektálási módokkal kapcsolva. Sok esetben ezek

együttes alkalmazása teszi lehetővé a legpontosabb szerkezeti információ meghatározását, például a nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC), vagy kapilláris elektroforézis (CE) MS-sel való összekapcsolásával.

4) Fizikai tulajdonságok elemzése: a fehérje terapeutikumok fizikai tulajdonságai közé tartozik a tömeg, a töltés, a hidrofobicitás és a termikus stabilitás. Ezek az adatok fontosak a termék vizsgálatokor és a gyártási folyamat optimalizálása végett. A fizikai paraméterek analizéséhez leggyakrabban alkalmazott módszerek a dinamikus fényszórás (DLS), valamint bizonyos kromatográfiás (pl. méretkizárás, ioncsere) elven működő módszerek.

5) Biológiai aktivitás vizsgálata: a fehérjék biológiai aktivitásának vizsgálata fontos a hatékonyság és a biztonságosság meghatározásához. Ezek meghatározására elsőként az antigén-antitest reakció kötési specifitásán alapuló sejtes immunkémiai tesztek a legalkalmasabbak (pl. radio-immuno/komplexált-, (RIA) vagy enzimhez kötött immunszorbens próba (ELISA)).

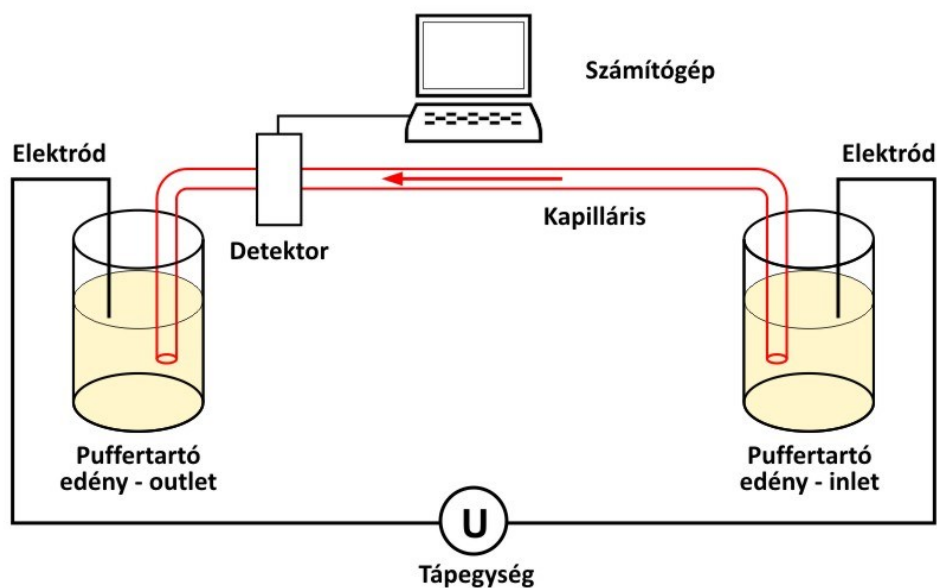
6) Tisztasági vizsgálatok: a molekulák tisztaságának vizsgálata minden esetben esszenciális, hogy biztonságos és hatékony gyógyszer készülhessen a betegek számára. Ezeket az analitikai vizsgálatokat elsősorban ugyancsak kromatográfiás, elektroforetikus és tömegspektrometria alapú módszerekkel végzik [20].

Az itt felsorolt pontokat a továbbiakban a kutatócsoportunk által alkalmazott mikrofluidikai technikák és analizálandó molekulák fényében érintem, kiemelve a kapilláris zóna- (CZE), natív-, és SDS-gélelektroforézis (SDS-CGE), illetve az elektropray ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS) alapú módszereket és a mögöttük rejlő fehérjeanalitikai lehetőségeket.

2.1.4. Fehérjeanalitika kapilláris elektroforézis és tömegspektrometria alkalmazásával

Arne Tiselius 1930-as években megkezdett elektroforézissel kapcsolatos munkáját jutalmazó Nobel-díja óta 75 év telt el. A módszer alapelve, hogy elektromos térben a töltéssel rendelkező részecskék, molekula ionok (pl. nukleinsavak, fehérjék) különböző sebességgel vándorolnak egy elektrolit (puffer vagy gélrendszer) oldatában. A sebesség, amellyel ezek a részecskék migrálnak, elsősorban a részecskék szerkezetétől és mobilitásától függ (amely a méret, töltés, közeg viszkozitás, hőmérséklet, térerősség és kémiai kölcsönhatások függvénye).

Az elektroforézis során a különböző, vagy hasonló tulajdonságú molekulák elválaszthatók és azonosíthatók. Kezdetben az elektroforézist síkágys (lap gél) formátumban végezték, melyet még ma is széles körben alkalmaznak biomolekulák elválasztására. Elmondható azonban, hogy a síkágys megközelítéshez képest a kapilláris oszlopos/csöves elrendezésnek számos előnye mutatkozik meg, főként a sebesség, kvantitálhatóság és online detektálás terén. A kapilláris csövek belső átmérője ma már általában 25-75 μm méretű, ami rendkívül gyors és hatékony szeparációt eredményez (akár 10^6 -os elméleti tényérszám tartományban) [21]. A nagy hatékonyság és a készülékek egyszerű használata az elmúlt 40 év során a technikát az egyre gyakoribb alkalmazás és a gyors fejlődés irányába terelte. Amennyiben a CE-ről, mint egyedülálló analitikai technikáról esik szó, említést kell tennünk Hjertén 1967-es munkájáról [22], mely a technika kezdeti időszakában mutatja be az első kapillárisban végzett elektroforetikus kísérleteket, ekkor még milliméteres átmérőjű csöveket alkalmazva. A technika potenciálját figyelembe véve, annak gyors fejlődésével magyarázható, hogy 1981-ben Jorgenson és Lukacs megalkotta a 100 μm -nél kisebb kapillárisok használatának lehetőségeit [23], ezért ezt az évet tekinthetjük a „modern” CE technika születési évének. Egy általános CE készülék felépítését a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra: A kapilláris elektroforézis felépítése sematikus ábrán szemléltetve [24].

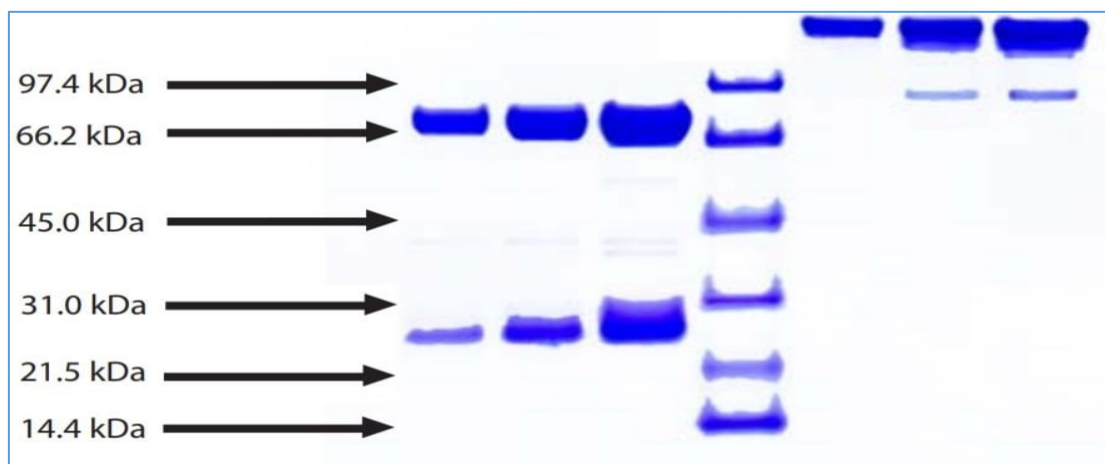
A fehérjék CE analízisekor számos paramétert és mérési körülményt kell szem előtt tartani a választott elektroforetikus módtól és a minta típusától függően. Fehérjék mérésére a legtöbb ismert CE mód alkalmazható, melyek elve lehet kapilláris zónaelektroforézis (CZE), natív-, vagy SDS kapilláris gélelektroforézis (CGE, SDS-CGE), kapilláris izoelektromos fókuszálás

(cIEF), vagy micellás elektrokinetikus kromatográfia (MEKC). Ezen analízis módok kiválasztása elsődlegesen a felmerülő analitikai problémák és minta típusok függvényében változik. A CE-alapú módszerekről általánosságban elmondható, hogy a klasszikus elektroforézishez viszonyítva számos előnnyel rendelkeznek fehérjeanalitikai tulajdonságaik kapcsán. Elsősorban a felbontást érdemes kiemelni, ugyanis az említett módszerek mindegyike hatékony, alapvonalis elválasztást nyújthat a fehérjékre, ami lehetővé teszi az alacsony koncentrációjú, akár hasonló tömegű és töltésű kis-, és nagymolekulák elkülönítését. A CE módszerek továbbá rendkívül gyorsak, így rövidebb idő alatt lefuttatható egy-egy mérésorozat, ami rengeteg időt és erőforrást takarít meg a laboratóriumi munka folyamán. A kromatográfias módszerekhez hasonlóan a CE is automatizálható, ami csökkenti a felhasználói hibák kockázatát és növeli az ismétlések közötti reprodukálhatóságot. Mindemellett, a CE általi analízis nagyon kis minta mennyiségekkel is elvégezhető, ami hasznos lehet, ha korlátozott mennyiségű minta áll rendelkezésre.

Összességében tehát egy olyan magas érzékenységű, nagy hatékonyságú analitikai módszerről beszélhetünk, mely egyszerűsége, relatíve alacsony költségei, kis oldószerigénye és gyorsasága miatt egyre nagyobb teret hódít az iparban és a kutatólaboratóriumokban egyaránt [25], [26].

Az utóbbi évtizedekben a terápiás fehérjék elektroforetikus elválasztása, molekulatömegének és tisztaságának meghatározása többnyire a klasszikus nátrium dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) technika segítségével történt, melyet a mai napig rutinszerűen alkalmaznak a molekuláris biológiában, valamint a biokémiai és proteomikai gyakorlatban. Az SDS-PAGE az egyik legelterjedtebb módszer a fehérjék méretének meghatározására, mely során a fehérjéket elektroforézissel különböző pórusméretű poliakrilamid gélben futtatják (lásd, 3. ábra). Lényege, hogy az SDS segít a fehérjék töltésének egységesítésében és szolubilizációjában, míg a PAGE a fehérjék méret szerinti elválasztását végzi, továbbá lehetővé teszi a fehérjék molekulatömegének és relatív mennyiségének vizsgálatát [27]. A technika hátránya, hogy rendkívül munkaigényes, mert többórás labortevékenységet követel a gél előkészítése, a minták futtatása, a fehérje frakciók festése, valamint a gélek elkészítése és annak elemzése. A kereskedelmi forgalomban kapható előgyártott gélekkel az eljárás első lépése egyszerűbbé válik és kevésbé valószínű a szennyeződés, de összességében a munkafolyamat ezzel együtt is viszonylag lassú és fárasztó. Továbbá, a nagymennyiségű fehérje feldolgozási műveletek során és omikai kutatólaboratóriumokban a fehérjék elemzése gyakran akadályt jelent a munkafolyamatban. Ennek fényében fejlődhetnek ki a műszeres

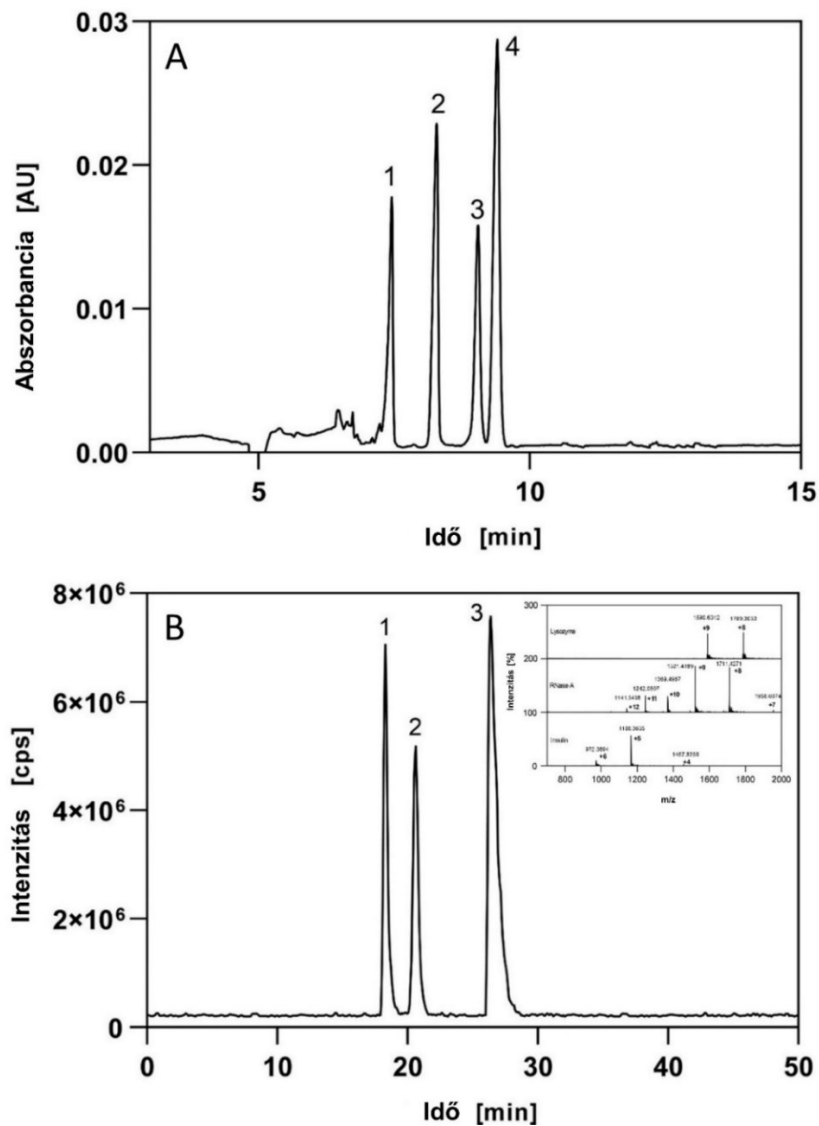
analitika olyan irányzatai, melyek adott indikációival helyettesíteni tudták az addig bevett fehérjeanalitikai módszereket. Ez nem azt jelenti, hogy a korábbi módszerek nem alkalmazhatók (vagy adott esetben szükségesek) a modernebb megközelítések mellett, csupán azt, hogy az idő egyre fontosabb tényezővé válásával és az analizálandó molekulák számának robbanásszerű növekedésével az analitikai tudományterület képviselőinek fel kellett ismerniük az igényt a már meglévő, vagy fejlesztés alatt álló technikák továbbfejlesztésére, automatizálására.



3. ábra: Fehérjék méret alapú elválasztása SDS-PAGE technikával. A gélképen jól láthatók az elektroforetikus elválasztás során létrejövő, Coomassie blue festékkel detektálhatóvá tett sávok, melyek a különböző méretű fehérjéket (esetleg alegységeiket) jelölik (saját forrás).

Napjainkban a mikrofluidika integrációs és automatizálási előnyei gyorsabb és egyszerűbb alternatívának bizonyulnak a hagyományos SDS-PAGE-hez, valamint más, lap gél alapú módszerekhez képest. Többek között ismeretes, hogy már a mintaelőkészítési folyamat is lényegesen egyszerűbbé tehető az automatizált SDS-kapilláris gélelektroforézis (SDS-CGE) módszer alkalmazásával, révén, hogy a fehérjék vizsgálata során elhagyható a molekulák festése és a gél teljes megszilárdulása a méret alapú elválasztás ideje alatt és után. Továbbá, az SDS-CGE, mint SDS-PAGE alternatíva rendkívül magas feszültség melletti elektromos erőteret alkalmaz, ami lehetővé teszi a fehérjék gyorsabb és hatékonyabb elválasztását, ezáltal kisebb mintaigényű, gyorsabb végeredményt kínál a hagyományos eljáráshoz képest. Általánosságban elmondható, hogy az SDS-CGE módszer egyszerűbb is a konvencionális PAGE-nél, mivel a kis átmérőjű kapillárisban történő elektroforézis magasabb felbontást és jobb szelektivitást is biztosít a mintákra online, azaz elválasztással egyidejű detektálással. Ezek

az értékek azonban az alkalmazott detektorok érzékenységének függvényében változhatnak. Fontos megjegyezni, hogy mindkét módszer érzékenysége és felbontása javítható a megfelelő mintaelőkészítési paraméterek, illetve az elválasztó közegek optimalizálásával. Dolgozatomban ezen paraméterek optimalizálására a 2.3 fejezetben térek ki. Az SDS-CGE technikát UV detektálással, valamint a CGE-MS kapcsolt megközelítést a 4. ábra mutatja be.



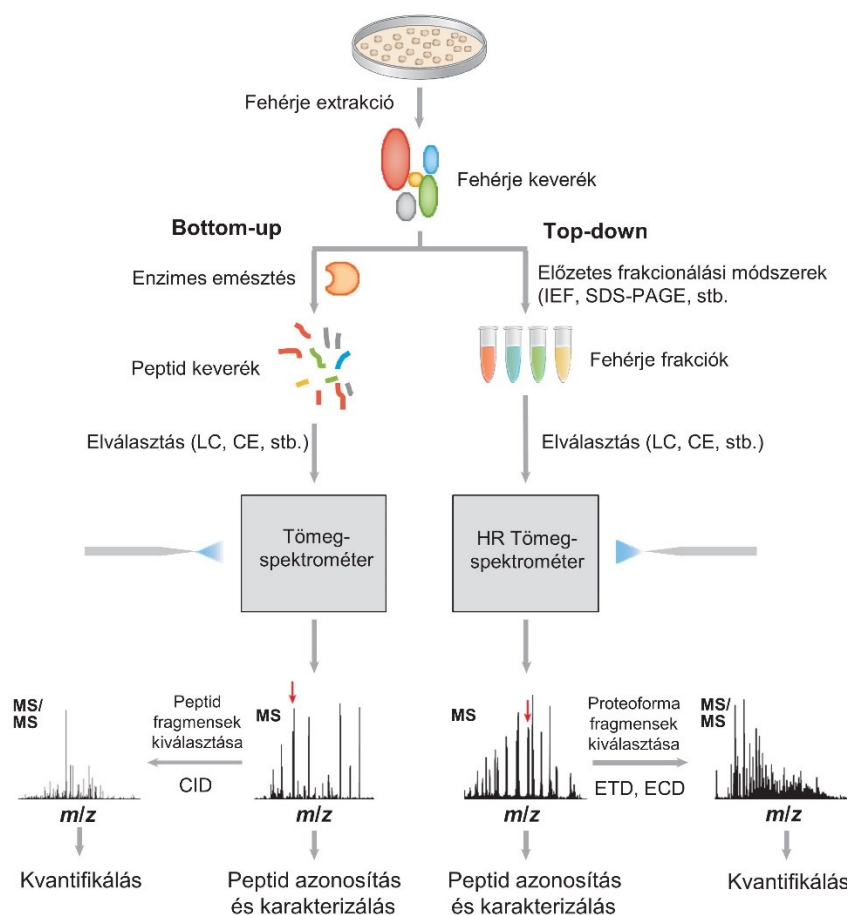
4. ábra: Fehérjék analízise SDS-CGE és CZE-MS alapú módszerekkel (saját forrás).

Panel A: Egy terápiás antitest gyógyszer tisztaság vizsgálata SDS-CGE technikával UV detektálással. Csúcsok: 1 – 10 kDa belső standard, 2 – 24 kDa könnyű lánc (LC), 3 – 48 kDa nem glikozilált nehéz lánc (ngHC), 4 – 50 kDa nehéz lánc (HC).

Panel B: Natív fehérje keverék elválasztása CZE-MS kapcsolt technikával. Csúcsok: 1 – lizozim, 2 – ribonukleáz A, 3 – humán inzulin (jobb felső sarokban a csúcsokhoz tartozó tömegspektrumokkal).

Annak ellenére, hogy a CE-alapú fehérjevizsgáló módszerek hatékony analitikai jellemzőkkel és nagy felbontással rendelkeznek, hátrányuk, hogy az elektroforetikus elválasztást direkt UV, vagy egyéb indirekt detektálási módokkal alkalmazva sok esetben hiányzik egy olyan migrációs idő, valamint méret alapú elválasztás során a csúcsok sorrendjén felüli tulajdonság, amely részletesebb szerkezeti információt nyújthat az elválasztott molekulákról (pl. pontos molekulatömeg). Ennek ellenére a CE alapú technikák alkalmazása peptidek és fehérjék analízisére önmagában is fel tudott törni a "gold standard" kromatográfiás és hagyományos elektroforetikus módszerek mellett, mert idővel szükségessé vált ezen anyagok gyorsabb, nagyobb felbontású elválasztása és tisztaságvizsgálata, mely az előbb említett technikákkal nem, vagy csak hosszadalmas optimalizálás eredményeként valósulhatott meg. A hagyományos és rutinszerűen alkalmazott HPLC-alapú módszerek, melyeket erre a célra leggyakrabban használtak (és használnak a mai napig), nem minden esetben képesek megoldani egy adott fehérjeanalitikai problémát. Ugyan az ultramagas nyomású kromatográfiás megközelítés (UPLC, vagy UHPLC) fejlődése rendkívül gyors és nagy hatékonyságú fehérje elválasztást tett lehetővé az elmúlt két évtizedben, melynek köszönhetően a kis részecskeméretű töltőanyagok és a magas (akár 1000 bar) nyomású rendszer segítségével rövidebb idő alatt érhető el sokkal jobb felbontás, mint a hagyományos HPLC esetében. A minta szükségletet, valamint az oldószer igényt is szem előtt tartva az UPLC jelenleg a legvonzóbb kromatográfiás alternatívát nyújthatja, ha cél a nagyobb felbontás és rövidebb analízis idők elérése, ám sok esetben gondot okozhat a magasabb rendszer terhelés, valamint a kromatográfiás alapelvek átfogó lehetőségei mellett is elválasztási nehézségeket okozó strukturális izomerek és bizonyos nagy molekulatömegű biopolimerek elválasztása. Így jöhet számításba a CE, mint ortogonális technika, mely új információt adhat a fehérjéről hasonló felbontással és hatékonysággal, a kromatográfiástól eltérő elválasztási alapelvek révén. A CE technika alkalmazásakor hatalmas előny, hogy még az UPLC-nél is alacsonyabb a minta és oldószer igénye, valamint nincs szükség költséges kolonnákra, csupán egy tetszés szerint felületmódosítható és méretre vágható szilika kapillárisra az elválasztáshoz. Reprodukálhatóság és kapcsolhatóság szempontjából az UPLC-től ugyan kissé elmarad, ám számos előnyös tulajdonsága miatt (pl. szabályozható elektrooszmózis, gélek alkalmazása, multikapilláris formátum, stb.) egyre nagyobb jelentőséggel bír a standard kromatográfiás módszerek mellett. Ma már kijelenthető, hogy az elektroforetikus és kromatográfiás technikák nem igazán versenytársai egymásnak, sokkal inkább kiegészítik egymás hiányosságait és adott esetben együttesen oldják meg a felmerülő analitikai kihívásokat [26].

A terápiás fehérjék azonosításán és elválasztás alapú tisztaságvizsgálatán felül térbeli szerkezetük és szekvenciájuk mélyebb azonosítására is többféle megközelítés alkalmazható. Az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a "bottom-up" fehérjeazonosítás, mely során a célfehérjéket elsőként proteolitikus enzimekkel (pl. tripszin) hasítják kisebb peptid alkotóikra. Ezek a peptidok direkt módon, vagy elválasztástechnikai módszerekkel kapcsolva analizálhatók például tömegspektrométerrel, mely ily módon nem csupán detektálási idő és csúcsintenzitás adatokat szolgáltat az elválasztott peptidekről, de az MS ütközési cellájában történő peptid alkotók (jellemzően ütközés indukált disszociációval - CID) történő továbbfragmentálásával pontos szerkezeti információt és tömeganalízist is biztosít, melyet adatbázisok segítségével egyértelműen értelmezhetünk. A kapott információk alapján lehetővé válik az eredeti fehérjemolekula visszafejtése, annak pontos azonosítása. Egy másik megközelítés, a "top-down" fehérje meghatározás esetén először MS azonosítás történik enzimek általi alkotókra való darabolás nélkül, majd a teljes fehérje tömegspektrum adatai használhatók az azonosításhoz, mely szintén adatbázisok segítségével történhet. A két módszer közti lényeges eltérés, hogy a bottom-up eljárás gyorsabb és hatékonyabban alkalmazható nagy mennyiségű minta vizsgálata esetében, míg a top-down megközelítés lehetővé teszi a fehérjék teljes hosszában történő meghatározását, ezáltal az izoformák és módosítások azonosítását. Ez utóbbi azonban technikailag nagyobb kihívást jelenthet a minta komplexitásától függően [28, 29]. A két említett eljárást az 5. ábra szemlélteti.



5. ábra: Tömegspektrometria alapú fehérjeazonosítás és karakterizálás "bottom-up", és "top-down" módszerrel. A "top-down" megközelítés esetén közvetlenül az intakt fehérjét vizsgálják, míg a polipeptidek proteolitikus hasításával kapott kisebb peptidek vizsgálatát "bottom-up" mérésnek nevezzük.

IEF: izoelektromos fókuszálás, SDS-PAGE: SDS-poliakrilamid gélelektroforézis, LC: folyadékromatográfia, CE: kapilláris elektroforézis, CID: ütközés segített fragmentálás, ECD: elektron befogásos fragmentálás - (szerkesztve [28] alapján).

A tömegspektrometriás analízis napjainkban az egyik leggyakrabban alkalmazott analitikai módszer fehérjék azonosítására és jellemzésére. A technika előnye, hogy rendkívül nagy érzékenységgel és dinamikus tartománnyal rendelkezik, ami lehetővé teszi az alacsony és magas expressziós szintű fehérjék vizsgálatát egyaránt. Mindemellett, a mai modern készülékeket nagy specifikusság és multiplex képesség jellemzi, ami azt jelenti, hogy a megfelelő felbontással rendelkező tömegspektrométerek a kisebb szerkezeti eltéréseket is ki tudják mutatni, valamint, hogy ezek a készülékek detektorként más analitikai módszerekkel (főként kromatográfiával és CE-vel) kapcsolva még hatékonyabb analízist biztosíthatnak [30].

A korábban említett elválasztástechnikai módszerek (pl. kromatográfia, elektroforézis) alkalmazása, MS detektálással nagyobb szelektivitást és érzékenységet eredményezhetnek. Egyrészt ezek a technikák lehetővé teszik a mintakezelési problémák megoldását, amelyek nehézséget okozhatnak az MS analízis során. Bizonyos fokú minta komplexitás esetében ugyanis a keverékek elválasztása elengedhetetlen ahhoz, hogy a tömegspektrumok átfedését vagy a háttérzaj intenzitásának emelkedését megakadályozzuk. Az elválasztás a mintát adott összetevőkre bontja, így lehetővé teszi a magasabb tisztaságú és szelektivitású anyagok elemzését, ezáltal javul az érzékenység, és csökkenthető a mérési hibák száma. Másrészt, az elválasztási metódusok révén lehetővé válik a minta előzetes koncentrációja, ami kulcsfontosságú a nagyon kis mennyiségben előforduló anyagok azonosításakor. Ezek a tulajdonságok vonatkoznak például az összetettebb biológiai minták (pl. peptid és fehérje komplexek) analízisére, ahol a különböző anyagok és összetevők széles körének együttes jelenléte nehezítené a tömegspektrumból történő identifikálást. Az elválasztási technikák által jobban megismerhetők a minták jellemzői, mivel az összetevők specifikus (valamilyen kémiai, fizikai vagy biológiai elven alapuló) szétválasztása lehetővé teszi a szerkezetekre vonatkozó információk megszerzését, mely fontos az anyagok azonosításához és a biológiai hatásmechanizmusok megértéséhez. Összességében, elválasztástechnikai módszereket alkalmazva nagyobb érzékenységű, pontosabb és megbízhatóbb analitikai eredményeket kaphatunk, melyek lehetővé teszik a vizsgálandó anyagok egyértelmű definiálását, és MS detektálással együtt a pontos molekula tömeg mellett részletes strukturális információt biztosíthatnak egy komplex fehérjeanalitikai probléma megoldása során [31].

A fehérjék analízise kapcsán ma már ismert, hogy egyetlen gén több változatot is képes létrehozni egyetlen fehérjéből, melyeket proteoformáknak nevezünk. A különféle ko-, és poszttranszlációs módosítások jelenléte befolyásolhatja a fehérjék tulajdonságait (például sejtszignalizáció és fehérjeaktivitás), ezért lényeges ezeknek a módosításoknak a megértése annak érdekében, hogy a biológiai folyamatok átláthatóbbá váljanak, és ezáltal betekintést nyerhessünk a biológiai gyógyszerek gyártásának és optimalizálásának folyamatába. Ez utóbbi egy rendkívüli gyorsasággal fejlődő tudományterület, ami számos különböző eredetű betegség kezelésére összpontosít, melyre a legtöbb ma elérhető biológiai glikoprotein típusú nagymolekula. A hagyományos monoklonális antitest gyógyszerek előállításával szemben az utóbbi időben történt fejlesztések lehetővé tették új antitest formátumok előállítását is, mint például a fúziós fehérjék és bispecifikus antitestek, amik hatékonyan céloznak meg akár két különböző antigén kötőhelyet is. Ezen új antitest formáknak a biológiai aktivitását is célszerű analitikai

vizsgálat alá vonni, és jellemezni a bioterapeutikum előállításánál keletkező lebomlási termékeket és potenciális szennyezőanyagokat [31]. Ehhez olyan pontos analitikai platformokra van szükség, melyek képesek különbséget tenni a kisebb molekulaméret és töltés variánsok között, továbbá nagy érzékenységgel detektálni a különböző proteoformákat. Ily módon belátható, hogy a már fentebb említett SDS-CGE technika UV detektálással, és a kapcsolt C(G)E-MS módszerek olyan ortogonális platformok, melyek együttes alkalmazásával részletes információ nyerhető a rendszerint alegységeire bontott (redukált), vagy sértetlen (intakt) formájú fehérjékről, illetve a vélt szennyezőkről, bomlástermékekről. Az SDS-CGE által kapott információból (pl. az ún. Ferguson módszerrel [32], lásd 2.1.5 fejezet) történő molekulaméret meghatározás MS analízis nélkül is megvalósulhat, de ezeket MS általi elemzéssel kiegészítve még magasabb fokú bizonyosságot kapunk a fehérje tömegéről (lásd, 2.1.6 fejezet). Online MS kapcsolást alkalmazva továbbá lehetőség adódik a proteoformák analízisére a fehérjék eredeti formájában, lehetővé téve a molekula konformációjának, komplexeinek és feltekeredésének (foldingjának) vagy denaturált és redukált alegységeinek vizsgálatát [31].

2.1.5. Fehérjék molekulatömegének SDS-CGE alapú meghatározása: a Ferguson módszer

A Ferguson módszer (vagy Ferguson elv) egy olyan fehérjeanalitikában használatos megközelítés, amely elektroforézist alkalmaz fehérjék és egyéb biológiai nagymolekulák migrációs tulajdonságainak definiálására, valamint méretük, illetve molekulatömegük becslésére. A módszer továbbá alkalmazható biomolekulák strukturális tulajdonságainak vizsgálatára is, de legfőbb előnye a molekulatömeg meghatározásban és glikoproteomikai jelentőségében rejlik. Az SDS-PAGE és az SDS-CGE technikákkal történő fehérjetulajdonságok meghatározása arra az alapfeltevésre épül, miszerint a legtöbb fehérjéhez az SDS 1:1,4 arányban kötődik így azok azonos töltés/tömeg hányadossal rendelkeznek. Ennek ellenére sok SDS-fehérje komplex nem jellemezhető ezzel az általános töltés/tömeg aránnyal, ugyanis az SDS fehérjéhez való kötődése bizonyos molekula típusok esetében eltérő lehet. Ide tartoznak az erősen bázikus fehérjék, glikoproteinek és lipoproteinek. Ezekre a fehérje típusokra a hagyományos SDS-CGE alapján készült standard kalibrációs görbék legtöbb esetben jelentősen eltérő (magasabb vagy alacsonyabb) molekulatömeg becslést eredményeznének, melyen a Ferguson módszer alkalmazása segíthet, ami a módosított fehérjék

eltérő migrációs viselkedését is figyelembe veszi annak érdekében, hogy pontosabb becslést kapjunk a molekulatömegekről. A Ferguson módszerhez azonban szükség van valamennyi vizsgálni kívánt fehérje analízisére többféle elválasztó gélkonzentráció alkalmazása mellett. Ez persze tovább növelné a hagyományos SDS-PAGE protokollok alkalmazásának idő-, és munkaigényét. A Ferguson módszer alkalmazása ezért ma főként SDS-CGE technika általi fehérjeanalízis során történik, mely automatizálható, így a mérési idő és a költségek is jelentősen csökkenthetők [33].

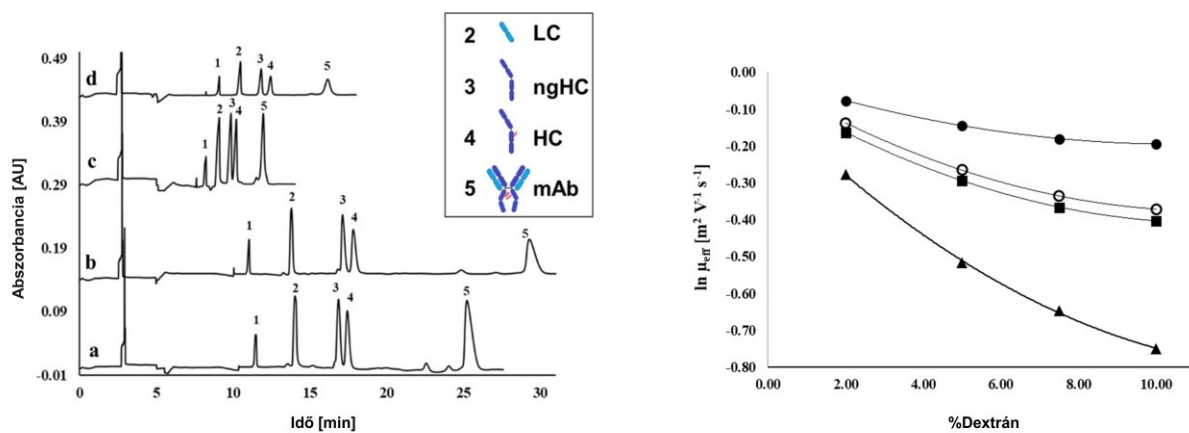
Az eljárás alapján először egy kijelölt elválasztó gélben történő referencia anyagok analízise szükséges, melyeknek pontos molekulatömege és migrációs tulajdonságai ismertek (pl. mezitil-oxid és ismert fehérje standardok). Ezek a referencia molekulák segítenek felállítani egy összefüggést az ismert gél/puffer rendszerben az analízis idő és a molekulatömegek között. A módszer során a mintákat elsőként elő kell készíteni az elektroforézishez a megfelelő módszerrel, például denaturálással és/vagy kémiai kezeléssel (főként szolubilizáló és töltést adó detergenssek, pl. SDS hozzáadásával, időnként redukáló ágensekkel). Ezután az elektroforézis során az elektromos erőter hatására a molekulák egységes töltésük, és eltérő méretük miatt eltérő sebességgel vándorolhatnak a detektor felé. A referencia migrációs időket ezt követően össze lehet hasonlítani az ismeretlen minták detektálási időpontjaival, majd az ismert referenciák alapján kialakított kalibrációs görbék segítségével megbecsülhető az ismeretlen molekulák tömege, melyek pontossága függ az alkalmazott elválasztó közegtől és a fehérjék tulajdonságaitól. Fontos megjegyezni, hogy a mérés során az elválasztó közeg és az alkalmazott elválasztási paraméterek (pH, viszkozitás, elektroosmotikus áramlás mértéke (EOF), hőmérséklet, kapilláris hossz, stb.) pontos ismeretével kell rendelkezünk.

A poli-ionos biopolimerek (pl. SDS-fehérjék) elektroforetikus vándorlásának modellezésére leggyakrabban használt tudományos magyarázat eddigi ismereteink szerint az Ogston elméleten alapszik [34]. Ez a modell azt feltételezi, hogy az SDS-fehérjekomplexek nem deformálódó, gömb alakú objektumokként haladnak keresztül egy szűrő mátrixon, mely az effektív mobilitás logaritmus (μ_{eff}) és a gél koncentráció (T) közötti lineáris összefüggést eredményezi [35]. Ezt az összefüggést az (1)-es számú egyenlet szemlélteti:

$$(1) \quad \ln \mu_{\text{eff}} = \ln \mu_{\text{eff},0} - K_{\text{R}}T,$$

ahol $\mu_{\text{eff},0}$ a nulla gél koncentráció esetén a mintakomponens szabad oldatban mért mobilitása, és K_{R} a visszatartási együttható, mely az elektromigráció sebességének változását mutatja a gél koncentráció függvényében. A szűrőpolimer szerkezetének és tulajdonságainak változásai

azonban a gél koncentrációtartományban és/vagy a különféle oldatkomponensek molekulatömege, töltéssűrűsége és alakja (pl. nem gömb alakú részecskék) esetén nem-lineáris összefüggést eredményezhetnek [36, 37], mely esetén az Ogston modell kiterjesztése javasolt [38]. Ez a módszer lehetővé teszi a molekulatömeg megbízható meghatározását az elektroforézis során mért analízis idő és az ismert referenciaanyagok közötti összefüggés felhasználásával, ami különösen fontos a bioanalitikai, biokémiai és gyógyszeripari kutatásokban [39]. A Ferguson-módszer alapvetően két diagramra épül. Először a fehérjék egyéni relatív migrációs időinek logaritmusát ábrázolják a változó gélkonzentrációk függvényében (6. ábra). Ezen görbék meredeksége adja K_R értékét.

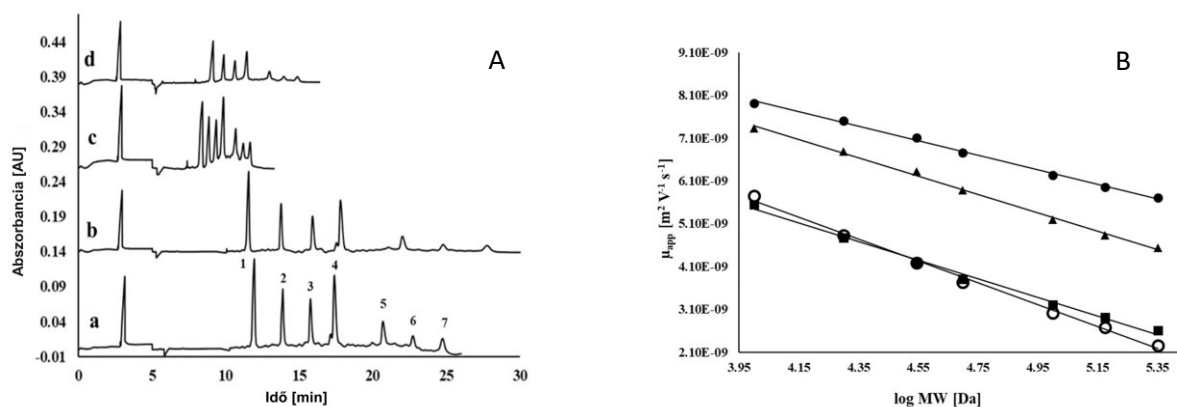


6. ábra: Monoklonális antitest tesztfehérje és alegységeinek elválasztása SDS-CGE technikával dextrans (D) és borátot (BA) tartalmazó gélkompozíciókban (panel A), és az elektroferogramokhoz tartozó Ferguson diagramok 4% borátot és különböző dextrans koncentrációkat alkalmazva (panel B) - (szerkesztve [39] alapján).

Csúcsok (A): 1 – 10 kDa belső standard, 2 – mAb könnyűlánc, 3 – nem glikozilált mAb nehézlánc, 4 – mAb nehézlánc, 5 – intakt mAb. Elektroferogramok gélkomponensek szerint (A): a - 10% D/4% BA, b - 10% D/2% BA, c - 2% D/2% BA, és d - 2% D/4% BA.

Jelölések (B): (●) = könnyűlánc, (■) = nehézlánc, (○) = nem glikozilált nehézlánc, (▲) = mAb.

Másodsorban, egy univerzális molekulatömeg-kalibrációs egyenes hozható létre standardok segítségével a molekulatömegek logaritmusának értékeiből és a látszólagos " μ_{app} " mobilitásokból (lásd, 7. ábra). A kalibrációs egyenes nem csak a nem-konjugált fehérjékre, hanem különböző konjugált formákra is alkalmazható, például glikoproteinekre és lipoproteinekre is.



7. ábra: Standard fehérje létra elválasztása SDS-CGE technikával dextrans (D) és borátot (BA) tartalmazó géلكompozíciókban (panel A), és az elektroferogramokhoz tartozó Ferguson diagramok a molekulatömeg kalibrációs pontokkal (panel B) – (szerkesztve [39] alapján).

Csúcsok (A): 1 - 10 kDa internal standard, 2 - 20 kDa, 3 - 35 kDa, 4 - 50 kDa, 5 - 100 kDa, 6 - 150 kDa, 7 - 225 kDa. Elektroferogramok géلكomponensek szerint (A): a - 10% D/4% BA, b - 10% D/2% BA, c - 2% D/2% BA, és d - 2% D/4% BA.

Jelölések (B): (■) = 10% D/4% BA, (○) = 10% D/2% BA, (▲) 2% D/2% BA, és (●) 2% D/4% BA.

A 6. és 7. ábrákon jól szemléltethető, hogy egyértelmű összefüggés van a molekulák mobilitásai, valamint a géلكoncentrációk és molekulatömegek között. A látszólagos mobilitás (μ_{app}) értéke azonban sok esetben korrigálást igényel, ugyanis általában az alkalmazott (pl. dextrans-borát alapú) SDS-CGE gélszisztéma pH-értékén az EOF áramlás katód irányú, ami azt eredményezi, hogy a negatívan töltött SDS-fehérje komplexek elektromigrációjával (anód irányú migráció) ellenirányú. Így az EOF mobilitásának (μ_{EOF} , mely szintén mérhető paraméter) értékét hozzáadva μ_{app} értékhez meghatározható a molekulák effektív mobilitása (μ_{eff}). Ezen adatok segítségével, valamint az ismert méretű standard anyagokkal végzett kalibráció révén megbecsülhetők a vizsgálni kívánt, azonos elválasztó gélszisztémában futtatott fehérjék (pl. mAb-ok, mAb alegységek és potenciális szennyezők) molekulatömegei [33].

A kereskedelmi forgalomban kapható, CGE technikához használt elválasztó gélek mellett alternatív géلكompozíciók fejlesztése is fontos információt nyújthat nem csupán a különböző fehérjék molekulatömegének meghatározásában, de az elválasztási paraméterek optimalizálásában is. Ilyen esetben számos egyéb analitikai jellemző géلكomponens koncentrációjának változtatása melletti tanulmányozása is hasznosnak bizonyul a fehérjék

migrációs tulajdonságára és szerkezetére nézve. Ezek vizsgálata során ezért az elválasztott komponensek közti szelektivitás (α), felbontás (R_s), és elméleti tányérszám (N) változását is érdemes figyelembe venni. Dolgozatom 4. fejezetében ezért az SDS-CGE technikában eddig nem használt gélrendszer alkalmazásával egy terápiás monoklonális antitest alapú gyógyszer analízise során mutatom be a fent említett paraméterek változásának hatását és az ezekből Ferguson módszerrel levont következtetéseket [40].

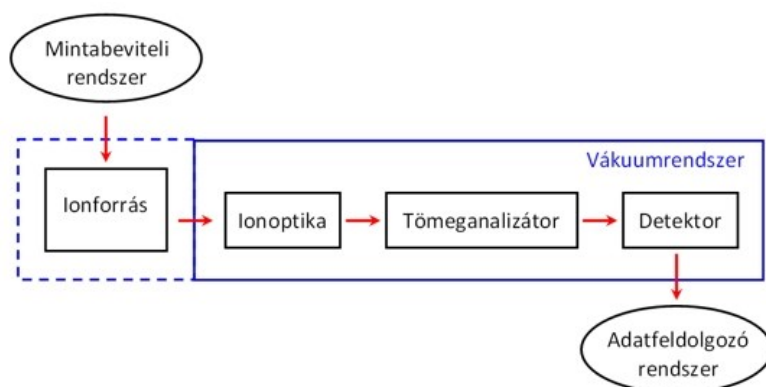
2.1.6. Fehérjék molekulatömegének meghatározása MS alapú módszerekkel

Ismeretes, hogy a fehérjék aminosav szekvenciája kapcsolatot teremt a fehérjék és kódoló gének között a genetikai kód révén, mely összekapcsolja a sejt fiziológiáját a genetikai információval. Ezen információk birtokában a fehérjék azonosítása során lehetővé válik a komplex sejtes szabályozó hálózatok megértése. A genomika forradalma előtt a molekula szerkezetek vizsgálatához kémiai, vagy enzimatisz mődszereket alkalmaztak egyetlen, magas tisztaságú fehérje azonosításához és az ilyen reakciók termékeit UV abszorbancia vagy fluoreszcens spektroszkópia segítségével detektálták. A polipeptideket lépésről lépésre kémiai lebontással szekvenálták az N-terminustól a C-terminus irányába (Edman lebontás) [41], majd a felszabadult aminosav származékokat UV spektroszkópiával azonosították. Az elmúlt három évtized során azonban a klasszikus módszer mellett fokozatosan teret nyert a tömegspektrometria alkalmazása a különféle fehérjeanalitikai vizsgálatokban [42].

Alapelvét röviden áttekintve a tömegspektrometria egy olyan modern analitikai technika, mely a vizsgálandó anyagok ionizációját, az ionok tömegszelekciját és detektálását biztosítja nagy érzékenységgel és felbontással. Először a mintából ionok képzése történik egy ionforrás segítségével. Ezután az ionokat egy tömegszűrő vagy tömeganalizátor választja szét azok töltésének és tömegének függvényében (melyre ma már többféle elv létezik). Az így elválasztott ionokat egy detektor érzékeli, és ez alapján egy tömegspektrumot hoz létre. A tömegspektrumból nyert adat hasznos információt hordoz a vizsgált molekulákról (m/z , tömeg/töltés arány), melyek alapján lehetőség van a mintában található vegyületek azonosítására és amennyiben szükséges, azok standardok melletti abszolút, vagy relatív kvantitatív elemzésére. A műszerek teljesítményének és sokoldalúságának növekedésével új fehérjeelemző stratégiák jelentek meg, melyekben az MS központi elemmé vált [43]. Az MS-alapú stratégiák mára gyakorlatilag felváltották az Edman lebontást, mint a polipeptidek aminosav szekvenciájának meghatározási módszerét. A tömegspektrometria alkalmazása

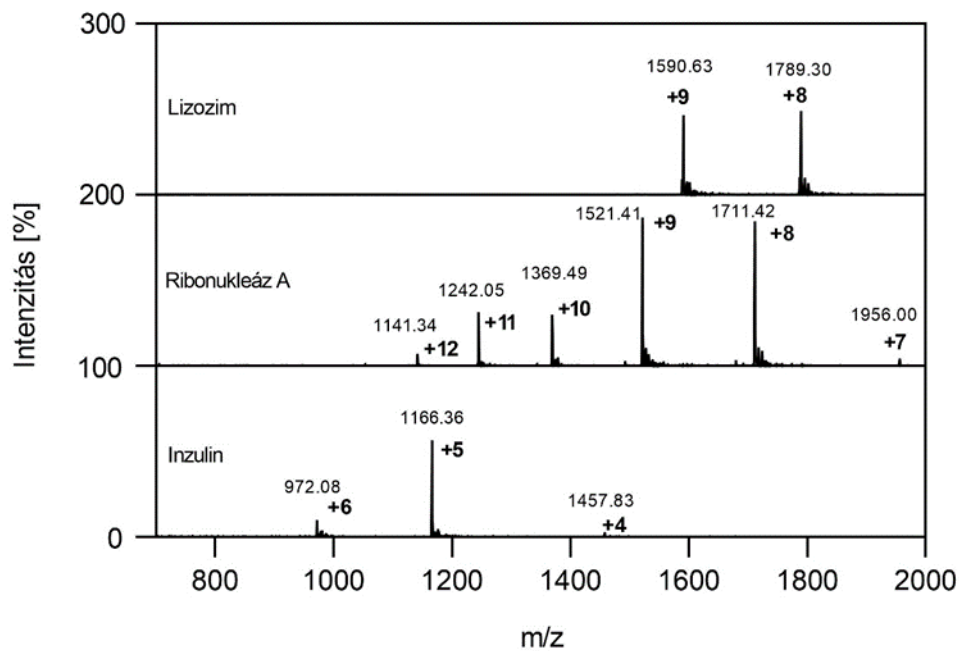
először a genom projekt kapcsán vált kiemelkedő fontosságúvá. A genomikai adatok elemzésének eredménye, hogy napjainkra már teljes genom szekvenciák is elérhetők, amelyek gyors és megbízható azonosítást segítik a peptidek tömegspektrometriás méréseinek szekvencia adatbázisokkal történő megfeleltetésével. A teljes, rendszerszerű fehérje analízis egy szövet vagy sejt esetében proteomika néven vált ismertté, ahol a tömegspektrometria kulcsszerepet játszik valamennyi azonosítási lépésben. A teljes proteom elemzése azonban hatalmas feladatot jelent, és a legújabb technikai fejlesztések ellenére sem könnyen megvalósítható folyamat. A feladat azért jelent kihívást, mert a proteomok száma és mérete óriási, valamint többnyire ismeretlen komplexitással rendelkeznek [44]. A proteomikai feladatok mellett továbbá nagy jelentősége van az egyszerűbb, MS általi fehérje tisztaságvizsgálatoknak, főként a biológiai gyógyszerek karakterizálásakor [45].

Az MS általi minőségi és mennyiségi analízis hosszú ideig csupán kis és hőálló vegyületekre korlátozódott, mert hiányoztak azok a "lágymű" ionizációs technikák, melyek segítségével lehetőség nyílt volna a biológiai molekulák túlzott fragmentáció nélkül ionizációjára. A 80-as évek végén ezen a problémán segített két olyan ionizációs technika fejlesztése, amelyek révén elérhetővé vált az épp biomolekulák molekula ionokká való átalakítása: az elektropray ionizáció (ESI) és mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció (MALDI) lehetővé tették többek között a fehérjék tömegspektrometriás elemzését. Ez a változás elhozta az újabb tömeganalizátorok és összetett, kombinált (pl. hibrid kvadrupól-repülési idő (QToF), tandem repülési idő (ToF-ToF), stb.) eszközök fejlesztését is, melyeket a fehérje és proteom elemzés nehézségeinek leküzdésére terveztek. Napjainkra az MS alkalmazási területei tovább bővültek és lehetővé vált a fehérjék mellett számos fehérje konjugátum molekulatömegének nagy pontosságú mérése, vagy további szerkezeti jellemzők meghatározása, ideértve az aminosav szekvenciákat, a poszttranszlációs módosítások helyét, típusát és azok pontos szerkezetét [46]. Egy tömegspektrométer általános felépítését a 8. ábra mutatja be.



8. ábra: A tömegspektrométer (MS) felépítése. Az ionforrásban a vizsgálandó atomokból vagy molekulákból valamilyen gerjesztés (pl. kémiai vagy elektromos energia) hatására ionok keletkeznek. Az ionoptika biztosítja, hogy ezek az ionok bejussanak a tömeganalizátorba, majd az analízátor szétvélogatja azokat tömeg/töltés arányuk szerint. Az elválasztott ionok intenzitását a detektor méri, mely segítségével egy intenzitás - fajlagos tömeg kapcsolathoz jutunk, amit tömegspektrumnak nevezünk [47].

A fehérjék molekulatömegének meghatározása ma leggyakrabban elektropray ionizációs tömegspektrometria (ESI-MS) segítségével, az alábbi módon történik: adott egy vizsgálandó fehérje, melynek pontos tömegét kívánjuk definiálni. Az ionizáció minden esetben alapfeltétel, hiszen csak a töltéssel rendelkező molekulaionok képesek eljutni az analízátoron át a detektorig és láthatóvá válni a felhasználó számára tömegspektrumok formájában. Ehhez a legtöbb esetben pozitív vagy negatív ionizációs mód is alkalmazható, melyek a minta típusától függően adnak információt az analitikusnak. Pozitív ionmódban az MS az ionokat pozitív töltéssel rögzíti. Ebben az esetben az ionizáció során a molekulák elveszítik egy vagy több elektronjukat, (illetve pozitív ionok, pl. H^+ , Na^+ , NH_4^+ , stb. adduktálhatnak a molekulára) ami pozitív töltést eredményez, míg negatív módban a fehérjék az ionizáció során egy vagy több elektront, (illetve más negatív töltésű ion, pl. Cl^-) szerezhetnek, ami negatív töltést eredményez. Az érzékenység a tömegspektrometriás módok között változhat, és függ a konkrét körülményektől, az alkalmazott berendezésektől és a vizsgált molekulától. Általánosan véve a pozitív ionmód gyakran érzékenyebb kisebb molekulák, például peptidok, illetve kisebb fehérjék tömegének meghatározására. A töltött fehérje ily módon a detektorba jut és koncentrációjának megfelelően adott intenzitással (Y tengely) jelenhet meg spektrumként m/z információt (X tengely) szolgáltatva, melynek interpretálása nem mindig egyszerű feladat [48].



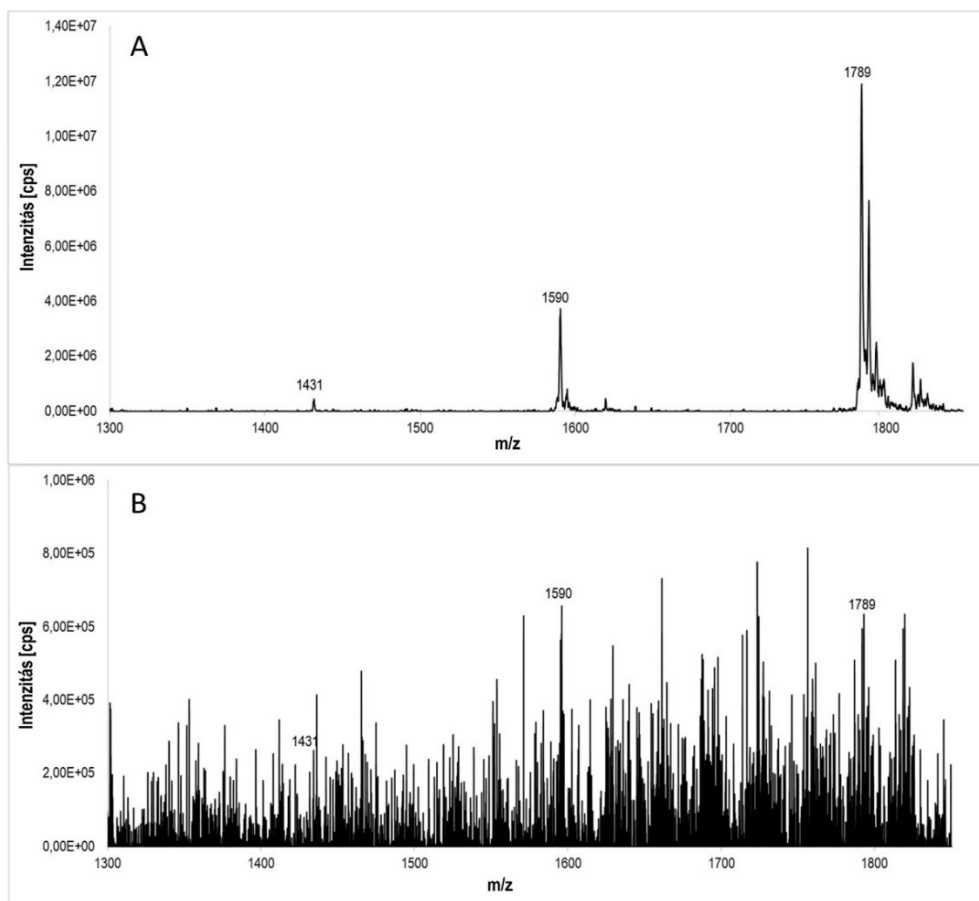
9. ábra: Standard fehérjék ESI-MS analízissel mért tömegspektruma az elektropray ionizáció során megjelenő, jellegzetes fehérje csúcsokkal, a hozzájuk tartozó töltöttségi fokokkal és m/z értékekkel (saját forrás).

Az ESI során a minta ionokká alakításakor a molekulák egyszeres, vagy többszörös töltésre tesznek szert. Ennek eredményeként az ionizált molekulák különböző töltöttségi állapotokkal rendelkezhetnek, melyek lehetővé teszik a vizsgált anyagok tömegének meghatározását, mivel egyazon molekula különböző töltöttségi állapotokban jelenik meg a spektrumon (lásd, 9. ábra). Ezáltal a különböző fehérjék és peptidjeik pontos tömege kiszámolható. A molekulatömeg meghatározása egy egyszerű összefüggéssel történhet: adott egy burkológörbe alakú, Gauss-eloszlást mutató spektrum, mely a fehérje jelenlétére utal. Ilyenkor a két szomszédos töltöttségi fokkal rendelkező, adott m/z értékkel megjelenő csúcsból kiszámolhatók a töltöttségi fokok, melyek segítségével a molekulatömeg visszafejthető:

$$(2) \quad d = M_{(n+1)} - M_{(n)}; z_{(n+1)} = \frac{M_{(n)}}{d} \times M_{(n+1)}; M = M_{(n+1)} \times z_{(n+1)}$$

Ahol ' $M_{(n+1)}$ ' és ' $M_{(n)}$ ' a két szomszédos fehérje csúcs m/z értéke a spektrumon, ' d ' ezek egymástól való távolsága, ' z ' a töltöttségi fok, ' M ' pedig a fehérje számolt tömege [48].

Egy fehérje tömegének MS általi meghatározásakor számos esetben zavaró tényezők jelentkezhetnek a mérés során, melyek megnehezítik az molekulák azonosítását. Ezek közül leggyakoribbak az ionszupresszió és a mátrix hatás. Az ionszupresszió egy olyan jelenség, ahol egy adott ion (akár a minta valamely komponense, akár a mintától független anyag) jelenléte vagy magas koncentrációja gátolja vagy elnyomja más ionok észlelését, azonosítását. Ez egy olyan potenciális probléma, amely legtöbbször negatívan befolyásolhatja a fehérjevizsgálatok pontosságát és megbízhatóságát. A zavaró ion általi analit intenzitás csökkenés olyan hátráltató tényező, amely során fontos kideríteni, hogy mely ionok okozzák ezt a jelenséget, és hogyan lehet minimalizálni vagy megszüntetni a szupressziós hatást. Ilyenkor többnyire a mintaelőkészítési, vagy tömegspektrometriás módszert kell módosítani annak érdekében, hogy az érdeklődés tárgyát képező ionok detektálási hatékonyságát növeljük. A mátrix hatás kifejezés arra utal, hogy a mintát körülvevő egyéb vegyületek, anyagok vagy szennyeződések befolyásolják a tömegspektrometriás mérést. Ezek a mátrixkomponensek olyan interferenciát vagy háttérzajt okoznak, amelyek zavarják a vizsgált ionok azonosítását és mennyiségi meghatározását. Tipikus példa erre a denaturált, SDS-fehérjék analízise, mely során a minta mátrixban, valamint az elválasztó közegben lévő, nem illékony SDS molekulák könnyedén ionizálódhatnak a tömegspektrometriás ionforrásban, melynek eredményeként többszörösen töltött SDS-klaszterek keletkeznek, amik repulziós hatásuk révén gátolják a vizsgálandó fehérjék analízátorban történő szeparálását, valamint a töltött molekulaionok detektorba jutását (10. ábra). Emellett számos detergens és más ionos, nem illékony vegyület képes a fehérjék úgynevezett maszkolására, gátolva ezzel azok ionizációját. Továbbá, ezek az anyagok megtapadhatnak a készülék ionforrásánál (vagy rosszabb esetben az analízátorban), ami gyakran a készülék elszennyeződését eredményezi hosszadalmas tisztítási folyamatot vonva maga után. Ezen okokból kifolyólag adódhat az igény olyan pufferek és gélrendszerek fejlesztésére, valamint technikai újítások kivitelezésére, melyek csökkenthetik az ionszupressziót és a mátrix hatást okozó zavaró tényezőket, lehetővé téve a kevésbé MS-barát, ám analíziskor fontos szerepet betöltő anyagok jelenléte melletti tömegspektrometriás fehérjeazonosítást.



10. ábra: Lizozim fehérje ESI-MS analízissel mért tömegspektrumai vízben oldott mintából (panel A), valamint 2% SDS-oldatban denaturált formában (panel B). Az ábra jól szemlélteti natív fehérjéhez viszonyítva az SDS okozta fehérje jel intenzitás csökkenést (saját forrás).

Az MS paraméterek optimalizálásáról, illetve a zavaró hatások kiküszöböléséről részletesebben dolgozatom 4. fejezetében teszek említést, ugyanis ezen optimalizálási lépések mellett egy saját megoldást is kidolgoztam az SDS-fehérjék tömegspektrometriás detektálhatósága érdekében.

A '80-as évek végére egyértelművé vált, hogy a fent említett fehérjeanalitikai problémák megoldására (a migrációs időn és sorrenden felüli információ hiánya) létrehozható egy olyan kapilláris elektroforézissel összekötött technika is, mely a kapcsolt folyadékkromatográfiás (LC) módszerek analógjaként részletesebb és mélyebb strukturális információt nyújthat mind kisebb fehérje komponensek, mind pedig nagyobb fehérjék pontos, tömeg alapú meghatározásával, nagy érzékenységgel. Míg az elválasztott fehérjék méretének és szerkezetének azonosítása UV detektálást alkalmazva első sorban standardek alkalmazásával érhető el, ez a megközelítés nem mindig nyújt pontos információt a vizsgálandó anyagok

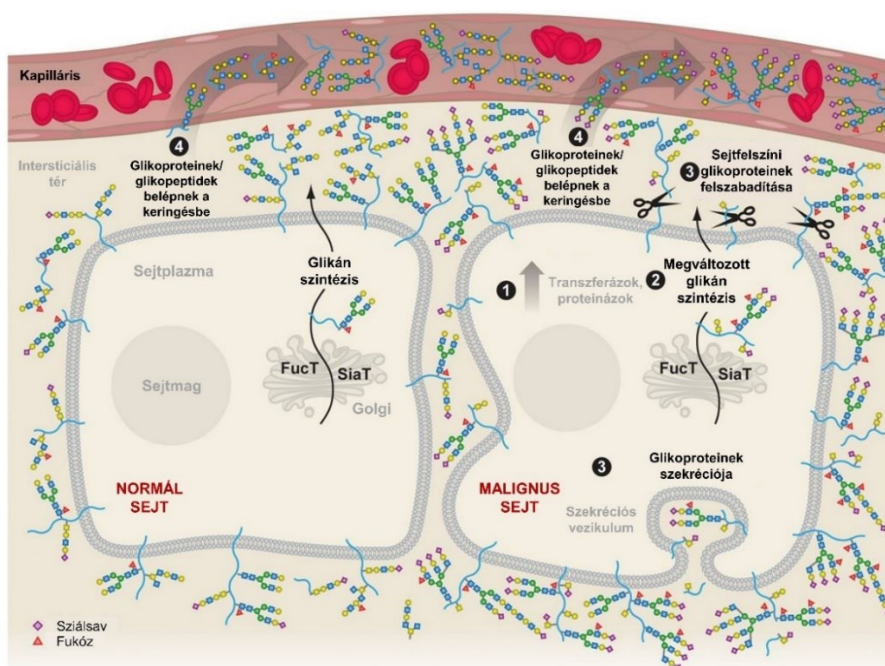
tényleges molekulatömegéről és struktúrájáról. Így történhetett, hogy a CE megszületése után a 80-as évek végén megjelentek az első próbálkozások a tömegspektrometriás detektálás CE analízissel való kapcsolására [49]. A CE-t tömegspektrometriás detektálással összekapcsolva értékes extra információhoz juthatunk az elektromos térben elválasztott, sőt, akár komigráló (együtt a detektorba jutó) analitokról is.

A CE és CE-MS-alapú fehérjeanalitikai megközlítések a fehérjék szerkezetmeghatározása mellett azok különféle poszttranszlációs módosulásainak (például N-glikoziláció), valamint más, fehérjéhez nem kötött biológiai eredetű komponensek (például "szabad" oligoszacharidok) elemzéséről is szót ejtek, bemutatva ezzel a technikák kutatócsoportunk által képviselt legfontosabb alkalmazási területeit. Dolgozatomban a glikoproteinek, N-glikánok és szabad cukrok részletesebb CE és MS alapú analitikai vizsgálatáról, valamint a kapcsolt technika további előnyeiről és kihívásairól a következő fejezetekben térek ki.

2.2. Oligoszacharidok karakterizálása

2.2.1. N-kötött glikánok jelentősége

A glikánok olyan szénhidrát típusú molekulák, melyek a sejtek bizonyos fehérjéin és lipidjein találhatóak. A poszttranszlációs módosítások során létrejövő glikánok és glikoproteinek átfogó vizsgálata napjainkban ígéretes megközelítésnek bizonyul különböző biomarkerek felfedezése kapcsán, ugyanis a glikánok szerkezeti változását vizsgálva számos betegség kialakulását, vagy fiziológiai állapot megváltozását lehet nyomon követni (lásd, 11. ábra). A napjainkban ismert elválasztástechnikai tudományok, a szénhidrát kémia és a rendszer szintű biológia terén történt legújabb tudományos fejlemények mára lehetővé tették, hogy a fehérjékhez kapcsolt cukorszerkezeteket és azok jelentőségét mélyebben is megértsük [50, 51]. Az N-glikoziláció az egyik leggyakoribb olyan fehérjemódosítás, mely kulcsfontosságú szerepet tölt be az élő organizmusok anyagcsere-, és sejtjelzési folyamataiban [52].



11. ábra: Normál és malignus sejt által felszabadított glikoproteinek transzportja. Megfigyelhető, hogy az egészséges, valamint az attól eltérő állapotú sejtek rendszerint különböző N-glikán szerkezettel rendelkező glikoproteineket szabadítanak fel a sejten belüli térben, ahonnan azok a keringésbe eljutva eltérő szignál transzdukciós folyamatok beindítását kezdeményezhetik. FucT – fukozil-transzferáz; SiaT – szialil-transzferáz (szerkesztve [51] alapján).

Az ilyen glikán módosítások fehérjekeverékekből történő azonosítása azonban még ma is kihívást jelent, mivel a glikoziláció a fehérjék különböző régióin is megtörténhet, (makroheterogenitás) illetve mindegyik kötőhelyre eltérő összetételű glikánok kapcsolódhatnak (mikroheterogenitás) [52, 53].

Az idő előrehaladtával azonban jelentős előrelépés történt a glikoproteinek szénhidrát struktúráinak és szerepének feltárásában, különösen az oligoszacharid mikroheterogenitás, a kötőhelyek azonosítására irányuló vizsgálatok és a biológiai felismerés (például a receptor-ligand vagy sejt-sejt kölcsönhatások, az immunogenitás és a fehérjehajtogatás szabályozása, valamint a fehérjék biológiai aktivitásának szabályozása) terén [52]. A szénhidrátoknak jelentős szerepük van emellett a biotechnológiai iparágakban is. A glikoprotein aktivitásának és hatékonyságának változása [54], bizonyos élelmiszerek gyártási hozama, tisztasága és oligoszacharid összetétele kritikus tényezők (kritikus minőségi attribútumok – CQA-k) a különböző szénhidrát tartalmú termékek előállításánál [55]. Ezért vált szükségessé a gyors, hatékony és nagy felbontású analitikai módszerek alkalmazása a glikozilációs mintázat meghatározásához biológiai mintákban, valamint a gyógyszeripari és élelmiszeripari termékek szénhidrátprofiljának elemzésekor.

2.2.2. Glikánanalitika CGE-LIF és CE-MS segítségével

Jelenleg a glikánok szerkezetének hatalmas változatossága jelenti a legnagyobb kihívást az oligoszacharid elemzés terén, azok kapcsolódási sorrendjének és pozíciós izomereinek sokasága miatt. Emellett analitikai nehézséget jelent a cukrok kromofór/fluorofór molekularészleteinek és a töltéssel rendelkező csoportjainak alapvető hiánya is. A leggyakrabban használt szénhidrát analitikai technikák közé sorolható a mágneses magrezonancia (NMR), a folyadékkromatográfia (LC), a kapilláris elektroforézis (CE) és a tömegspektrometria (MS). A kromatográfias és elektroforézis alapú technikákhoz képest a NMR sokkal több mintát igényel az analízishez, ám megfelelő szakértelem mellett a molekulák atomjainak helyezkedése nagy pontossággal meghatározható. A szénhidrátok vizsgálatára leggyakrabban használt módszerek ma jellemzően kromatográfia alapúak, mint a hidrofíli kölcsönhatási kromatográfia (HILIC) és a grafit állófázisokat alkalmazó LC, fluoreszcens vagy MS detektálással kombinálva [56]. A kromatográfias módszerek általában nagyon időigényesek, ám hatékonyságuk és reprodukálhatóságuk miatt ezeket ma is standard módszerként alkalmazzák. A mikrochip LC és a fentebb már említett ultramagas nyomású

folyadékkromatográfia (UPLC) megszületése növelte az elválasztás sebességét, ezzel csökkentve az analízis időt [57, 58]. Az LC módszerek mellett a permetiláció segítségével történő tömegspektrometriás glikán analízis is teret hódított [59], de az utóbbi években az MS-alapú szénhidrát vizsgálat főként LC és CE készülékekkel kapcsolva, elválasztás utáni detektálási módokként terjedt el, és vált a glikozilációs mintázatok elemzésének egyik legelterjedtebb módjává. Ezek ellenére talán kijelenthető, hogy a leghatékonyabb és legérzékenyebb elválasztástechnikai módszer a glikánok karakterizálására a lézer indukált fluoreszcens detektálással kapcsolt kapilláris gélelektroforézis (CGE-LIF) [60].

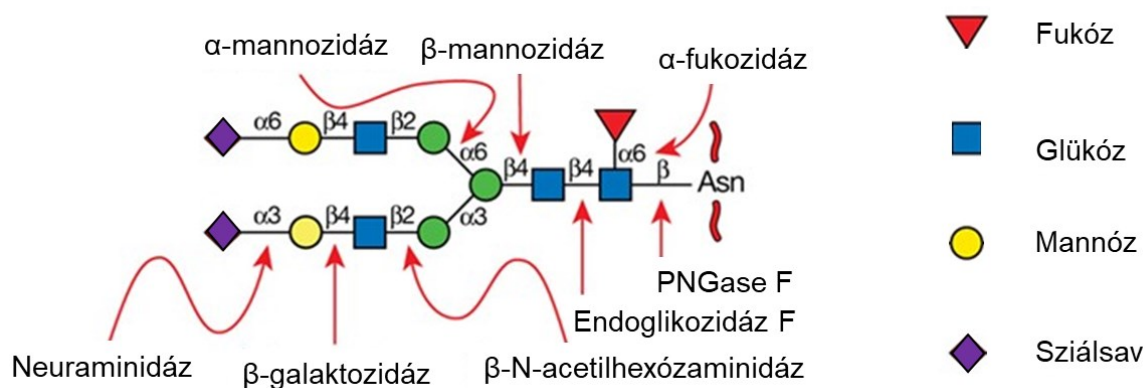
A kapilláris elektroforézis jelentősége és alkalmazása a glikomikai vizsgálatokban meghatározóvá vált, főként az enzimesen felszabadított N-glikánok analízisére összpontosítva, melyet a modern CE készülékek megjelenése és a módszerek gyors fejlődése segített [61-63]. A közelmúltban 20 független kutatócsoport az Egyesült Államokból, Európából és Ázsiából egy együttműködés keretein belül a résztvevő kutatólaboratóriumok együttes tesztjeinek elvégzését kezdeményezte, fókuszba helyezve a mintaelőkészítés és a CE általi glikán analízis ismételtetését egy átfogó glikán "mapping" gyakorlat során glikoprotein tesztminták felhasználásával [64]. Ennek az erőfeszítésnek eredményeként kiváló reprodukálhatóság mutatkozott a migrációs idő és a csúcs alatti terület értékekben, ami közvetlenül vezetett a CE alapú glikán azonosításához jelenleg is használt, kereskedelemben kapható glikomikai kitek megalkotásához. Ez lehetővé tette a nagy átteresztőképességű, rutinszerű N-glikán mintaelőkészítési és mintaelemzési folyamatot. Az idők során ez a megközelítés egy validált bioipari módszerré nőtte ki magát, továbbá egy potenciálisan még nagyobb átteresztőképességű, multikapilláris elektroforézis formátum is létrejöhett [65], mely nem csupán az N-glikánok, hanem szabad oligoszacharidok ultragyors jellemzésére egyaránt lett alkalmazható [66]. Ugyan napjainkra a kapilláris elektroforézis az egyik leggyakrabban használt cukoranalitikai technikává lépett elő, a szénhidrát molekulák elektromos tér közvetítette elválasztása sok esetben ezzel együtt is kihívást jelentő feladat maradt, melynek révén további módszerfejlesztési lépések megalkotása vált szükségessé. Ezek tipikusan a negatív töltésű kromofórral/fluorofórral történő jelölés optimalizálásán és a minta tisztítási folyamatának tökéletesítésén alapulnak. A fluorofór jelölés legnagyobb előnye, hogy lehetővé teszi az analitikusok és kutatók számára az oligoszacharidok gyors és rendkívül érzékeny, akár attomólos koncentrációtartományon belüli detektálását [67].

A glikoproteinek aszparagin régióinak nitrogén atomjaihoz kapcsolt oligoszacharidjainak (innen az N-glikán megnevezés) szerkezetmeghatározása általában a cukor szerkezet

enzimatis felszabadításával kezdődik [68]. A glikoprotein kezelése endoglikozidázokkal (például peptid-N-glikozidáz F (PNGáz F), endoglikozidáz F2 (Endo F2), endoglikozidáz H (Endo H)) a leggyakrabban alkalmazott módszer, de az enzimes emésztés mellett kémiai megközelítések is alkalmazhatók [69, 70]. Az N-kötött cukrok enzimatikus felszabadítása általában a fehérjék mobilitásának változását eredményezi, így az N-glikoziláció jelenlétét vagy hiányát az előző fejezetben bemutatott SDS-gél elektroforézissel (SDS-PAGE vagy SDS-CGE) is ellenőrizhetjük. Az O-kötött glikánok esetében az O-glikanáz (endo- α -N-acetilgalaktózaminidáz) használható a cukorstruktúrák felszabadítására, de emellett szükség lehet más enzimek általi előkezelésre is a diszacharid "core" régió felfedéséhez, ami bonyolultabbá teszi az O-glikánok elemzését. Ezen glikoprotein konjugátumokról O-glikánanalitikai célok megfogalmazása és mérési eredmények hiányában nem esik szó a dolgozatomban.

A felszabadított N-glikán szerkezetekből a cukor monomer egységek exoglikozidázokkal, (például neuraminidáz (szialidáz), β -galaktozidáz, α -fukozidáz, β -N-acetilhexozaminidáz és α - vagy β -mannozidáz), egymás után hasíthatók, melyek mobilitásbeli változásokat eredményeznek a lehasított cukrok számától és méretétől függően. A legelterjedtebb endo- és exoglikozidáz vágási helyeket a 12. ábra szemlélteti.

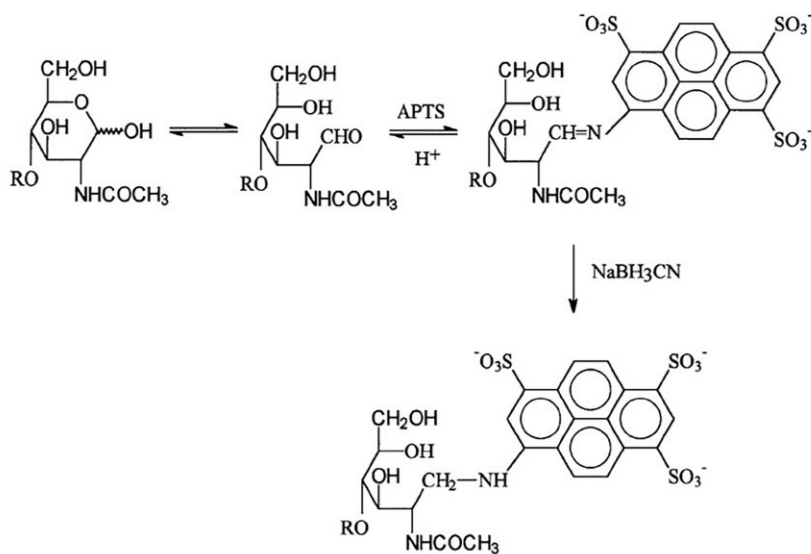
Glikozidázok általi emésztés (komplex N-glikánok)



12. ábra: N-glikánok szerkezeti analysiséhez alkalmazott glikozidáz enzimek fajtái és hasító helyei (szerkesztve [71] alapján).

Fontos megjegyezni, hogy az enzimekkel szemben ellenálló struktúrák nem szabadíthatók fel és detektálhatók ilyen módszerrel. A hasítással szembeni ellenállás főként akkor tapasztalható, amikor a glikán hidroxilcsoportjaihoz valamilyen módosítás (például szulfatálás, acetilálás, foszforilálás) társulnak, így a glikozid kötések nem ismerhetők fel a hasító enzimek által. Egy másik lehetséges ok a sztérikus akadályozásban rejlik. Az N- és O-glikánok teljes eltávolítása

kémiai kezeléssel érhető el (például hidrazinolízissel vagy β -eliminációval), de ilyenkor a peptidek sérülése általában megakadályozza a pontosabb fehérjekarakterizálási lépéseket [71], valamint az O-glikánok egyidejű lehasítása módosíthatja a kinyerni kívánt információt [69]. Bár az N-glikán felszabadítási módszerek manapság rutinszerűen alkalmazhatók és kevesebb időt igényelnek [72, 73], az azt követő CE alapú analízis előtt továbbra is szükség van derivatizálási lépésekre. Az egyik legegyszerűbb megközelítés a monoszacharidok vagy oligoszacharidok származékképzése borát komplexációval, amely lehetővé teszi a rövid hullámhosszú UV detektálást [74]. Ennek a megközelítésnek egyszerűsége ellenére a leggyakrabban használt származékolási módszer az elválasztás előtti fluorofórral való jelölés redukzív aminálással [75, 76], amely lehetővé teszi bizonyos derivatizáló reagensek (2-AP, 6-AQ, CBQCA, stb.) széles skálájának alkalmazását [77, 78]. Az elmúlt három évtizedben a nagyfelbontású kapilláris gélelektroforézist széles körben használták az N-kötött oligoszacharidok elválasztására redukzív aminálási lépés általi 1-aminopirén-3,6,8-triszulfonáttal (APTS) való jelöléssel (13. ábra) [67].

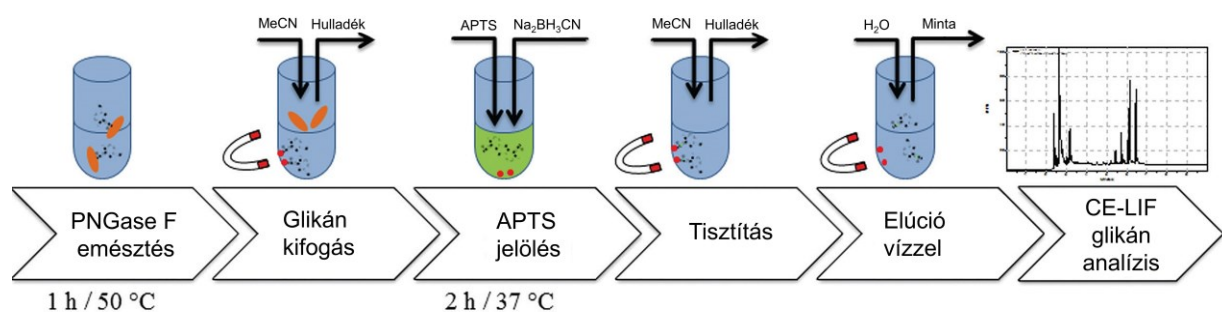


13. ábra: N-glikánok APTS festékekkel történő jelölési reakciója nátrium-cianoborohidrid jelenlétében. A redukzív aminálás során a piranóz vagy furanóz cukor gyűrű felnyitásra kerül, hogy aldehidet vagy ketont képezzen, majd a származékképző reagens amin csoportja nukleofil addícióval imin (Schiff bázis) képződéséhez vezet, melyből a következő lépésként a redukáló ágens stabil komplexet hoz létre [67].

A Schiff bázis redukciója nátrium-cianoborohidriddel, vagy annak kevésbé káros alternatíváival (például 2-pikolinsav-boránnal) a származékolási reagens (mely leggyakrabban 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav, röviden APTS), jelenlétében stabil adduktot eredményez,

amelyet UV elnyelés révén vagy lézeres indukált fluoreszcencia (LIF) segítségével lehet detektálni. Mivel az addíciós reakció a cukor redukív végére specifikus, csak egyetlen, háromszoros negatív töltéssel rendelkező APTS molekula kapcsolódik egy adott cukormolekulához, mely ezáltal gyors elválasztást és egyértelmű kvantitatív meghatározást tesz lehetővé. A jelölési lépés után a felesleges festéket a legtöbb esetben célszerű eltávolítani a mintából annak érdekében, hogy elkerüljük a CE-LIF analízis során a festék felesleg zavaró hatását (és ezzel együtt a lehetséges ionszuppressziós hatást az esetleges CE-MS vizsgálatok során). A szérumban lévő glikoproteinek glikán analízise során továbbá nem csupán a feleslegben lévő jelölőanyag káros hatásait kell kiküszöbölni, hanem a szabad vércukor komponensek nemkívánatos enzim inhibícióját is [79]. Emiatt általában egy denaturáló lépés előzi meg az enzimes felszabadítást, hogy a kitekeredett glikoproteinek glikánjai szterikus szabaddá váljanak és az endoglikozidázok hozzáférjenek szubsztrátjaikhoz. A hagyományos denaturáló eljárásokat alkalmazva megfigyelhető, hogy a szérumban lévő minták bizonyos térfogat felett (~ 10 µL) precipitálódnak, mely eltérő denaturáló módszereket tesz szükségessé a nagyobb mintamennyiségek és/vagy fehérje koncentrációk vizsgálatakor [79]. Ezenfelül, az endoglikozidáz emésztés során különféle monoszacharidok és egyéb, alacsony polimerizációs fokú (DP) cukrok (pl. a vérben lévő glükóz, maltóz, Man₃GlcNAc₂, stb.) jelenléte gátló hatással bírnak [80-82]. Ezért kutatócsoportunk nemrégiben bemutatott egy új, szérumban lévő mintaelőkészítési protokollt, mely során akár 50 µL-es kiindulási mintamennyiség is alkalmazható anélkül, hogy a denaturáló lépés során a minta kicsapódása jelentkezne [83]. A folyamat magába foglalja a szérumban lévő glikoproteinek aminosav alapú szelektív kifogását egy új, hőmérsékleti gradiens denaturálási eljárással együtt, valamint lehetővé teszi az akár 1,5 mg/50 µL koncentrációjú glikoprotein minták előkészítését is N-glikán analízisre.

A denaturálási lépés utáni, automatizálható mintaelőkészítés folyamatát a 14. ábra szemlélteti.



14. ábra: Laboratóriumi automatizálás folyamatábrája a mágneses gyöngy általi N-glikán mintaelőkészítéshez és analíziséhez CE-LIF alkalmazásával (szerkesztve [84] alapján).

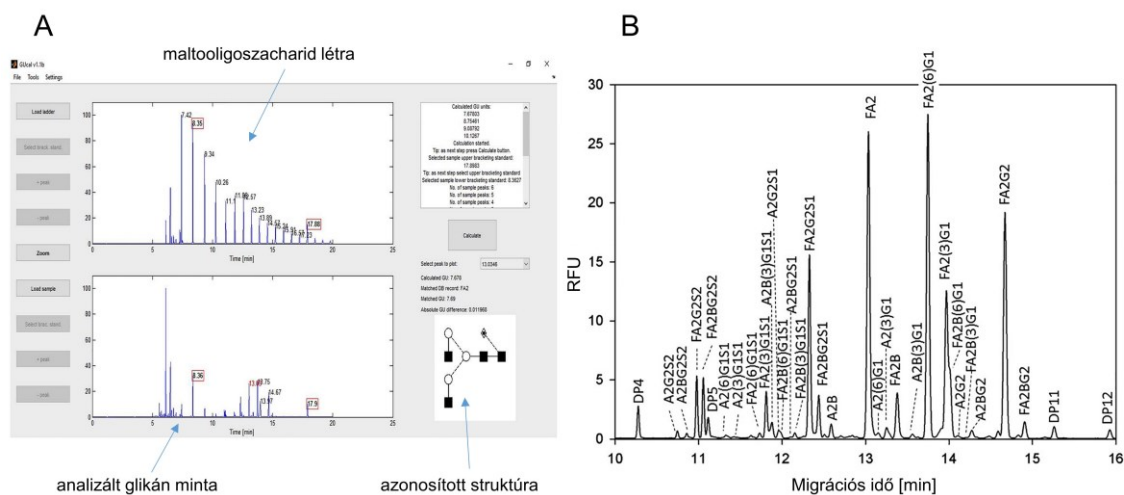
A teljes és részletes N-glikán mintaelőkészítési folyamatról dolgozatom "Anyagok és módszerek" fejezetében írok. Érdeemesnek tartom azonban megemlíteni, hogy kutatócsoportunk folyamatosan törekszik az említett CE alapú glikán mintaelőkészítési folyamatok egyszerűsítésére, beleértve a tisztítási procedúra teljes elhagyásának lehetőségét, mely jelentősen csökkentené a tisztításból adódó reprodukálhatósági problémákat és a munkafolyamat időtartamát.

A mintaelőkészítési folyamat után a fluorofórral jelölt glikánokat kapilláris elektroforézissel analizálhatjuk (szeparálhatjuk), LIF detektálással kapcsolva. Ez a módszer kiváló érzékenységet és rövidebb elválasztási időt tesz lehetővé, mint a legtöbb folyadékfázisú elválasztási módszer [84]. Az APTS festékkel jelölt cukor komponensek migrációs idő értékeit a CE-LIF során általában glükózegységekre (GU) vonatkoztatva definiálhatjuk, mely ezáltal rendszertől független, normalizált adatokat biztosít a felhasználónak az adatbázis keresés által segített szerkezet meghatározáshoz [85, 86]. A GU-számításban használt glükózegység koncepciója alapvetően hasonló a gáz-kromatográfiában ismert Kováts retenciós indexhez [87]. A klasszikus GU-számítási módszer azonban egy további oligoszacharid létra futtatást igényel minden analizálandó minta esetében, így növelve a szerkezetazonosítás pontosságát, ám ezzel együtt a mintafeldolgozási időt is. Ezenfelül bevezetésre került egy úgynevezett hármas belső standard megközelítés is a GU-számításban, mely segítségével sokszor elhagyhatók a minta melletti glükóz létra futtatások. Ez a folyamat a DP2, DP3 és DP15 három belső standard minta melletti beinjektálása és egyidejű analízise révén normalizálja a migrációs időket az elektroferogramokon [88]. A gyakorlat ugyanakkor azt mutatja, hogy a minta analízis előtt a legtöbb esetben informatív lehet a maltooligoszacharid létra futtatása (jelintenzitás, csúcsalakok, stb. ellenőrzése), így célszerű azt elvégezni, amennyiben az analitikai feladat során az idő nem kulcs tényező.

Az adatbázisok által segített glikán szerkezet meghatározás egyik alapvető feladata a kereskedelmi forgalomban lévő standardek GU-értékeinek közvetlen összehasonlítása a vizsgálni kívánt ismeretlen mintakomponensek GU-értékeivel. Az elektroferogramon szereplő bármely ismeretlen szerkezet GU-értékeit a mellette lévő oligoszacharid létra csúcsok migrációs idejének figyelembevételével lehet kiszámítani:

$$(3) \quad GU_X = G_N + \frac{t_X - t_N}{t_{N+1} - t_N},$$

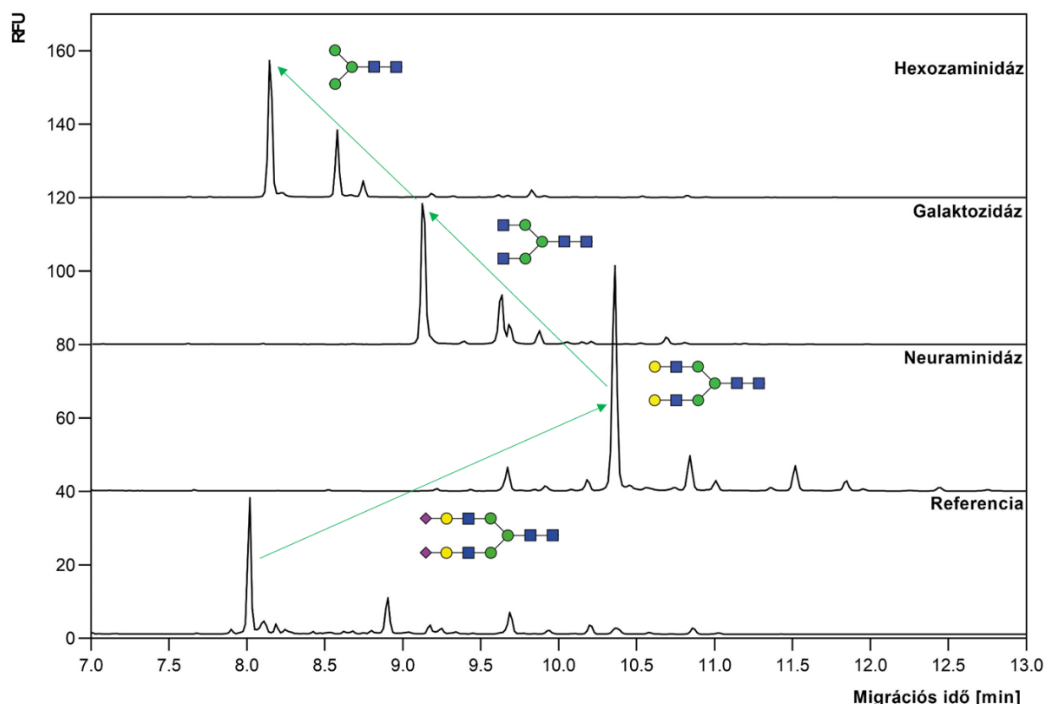
ahol GU_X a meghatározandó csúcs GU értéke, G_N a maltooligoszacharid létra meghatározandó csúcs előtti elemének polimerizációs foka, t_X az ismeretlen csúcs migrációs ideje, t_N és t_{N+1} pedig az ismeretlen csúcs előtti és utáni létra csúcsok migrációs idői [89]. Összességében, a GU értékek használata a tényleges migrációs idők helyett csökkenti a mérési pontatlanságokat, melyeket a szeparációs paraméterek változása, a kapilláris előléte vagy a puffer összetételének módosítása okozhat [90]. A 2015-ben kutatócsoportunk által kifejlesztett GU érték alapú glikán szerkezetazonosítás egy ingyenesen elérhető, "GUcal" nevű szoftver segítségével könnyen elvégezhető (<http://www.gucal.hu>). A számítási műveletek és azok grafikus felhasználói felülete MATLAB nyelven íródtak. Ez az egyszerű GU érték számító program gyors és megbízható csúcsazonosítást tesz lehetővé, továbbá az alkalmazás folyamatos fejlesztés alatt áll, ezáltal rendszeresen olyan új glikán szerkezetekkel bővül, melyek (például az emberi sérumban) időről-időre azonosításra kerülnek. A szoftver felületét a 15. ábra mutatja be.



15. ábra: A glikán szerkezetazonosításra fejlesztett GUcal szoftver felülete (A) és egy a szoftverrel meghatározott, glikán szerkezetekkel ellátott CE-LIF mérés elektroferogramja (B). Minden feltüntetett glikán rövidített neve követi az Oxford nomenklaturát, mely a www.GlycoStore.org oldalon fellelhető a releváns GU értékekkel együtt (szerkesztve [91] alapján).

Mivel a szénhidrátok nagyfokú szerkezeti változatossága rendkívüli kihívást jelent az analízisük és azonosításuk szempontjából, az adatok validálása érdekében legtöbbször exoglikozidáz-mediált glikán szekvenálás alkalmazandó mind az adatbázis segítségével történő, mind pedig a szoftveres módszerrel végzett szerkezet meghatározás mellett [64].

Az oligoszacharidok CE általi szekvenciális analízise egymást követő exoglikozidáz emésztési lépésekkel az egyik leggyakrabban használt technika a bonyolultabb szénhidrátok szerkezetének meghatározására, beleértve a pozíciós és kötési izomerek felismerését [92-94]. Révén, hogy az exoglikozidáz enzimek rendelkeznek monoszacharid egység, kapcsolódási helyzet és orientációs (α/β) specificitással, nem csak a szekvencia, hanem az ehhez társuló kapcsolódási és anomer konfigurációs információ is feltárható [63, 93]. Az exoglikozidáz mátrixon alapuló glikán szekvenálás a reakciótermékek elválasztását igényli minden egyes enzimreakció esetén, melyekből strukturális információt nyerhetünk a reakciók utáni glikán szerkezetek elektroferogramokon látható csúcsainak eltolódásaiból, eltűnéséből vagy megjelenéséből és a csúcsintenzitás-változás adatokból (lásd, 16. ábra). Az enzimek mátrixban történő használatának egyik korlátja, hogy aktivitásukat kis idő elteltével elveszíthetik, mely jelentősen növeli az analízis pontatlanságát és költségét. Ezért ma már olyan szekvenálási lépéseket célszerű beiktatni, melyek esetében az enzimek immobilizált formában találkoznak a szubsztrátjaikkal [95]. Ezen módszer alkalmazásával az enzimaktivitás tovább fenntartható, a glikozidázok ellenálló képessége a denaturációval szemben növelhető, mindemellett pedig lehetővé válik az adott folyamat során alkalmazott enzimek ismételt használata is [96, 97].



16. ábra: PNGase F emésztett, APTS jelölt humán szérum IgG N-glikán szekvencia analízise CGE-LIF módszerrel. Az ábrán jól követhető a glikán struktúrák enzimes emésztéseit követő, monomer vesztések során létrejövő cukor oligomerek elektroferogramjai (szerkesztve [97] alapján).

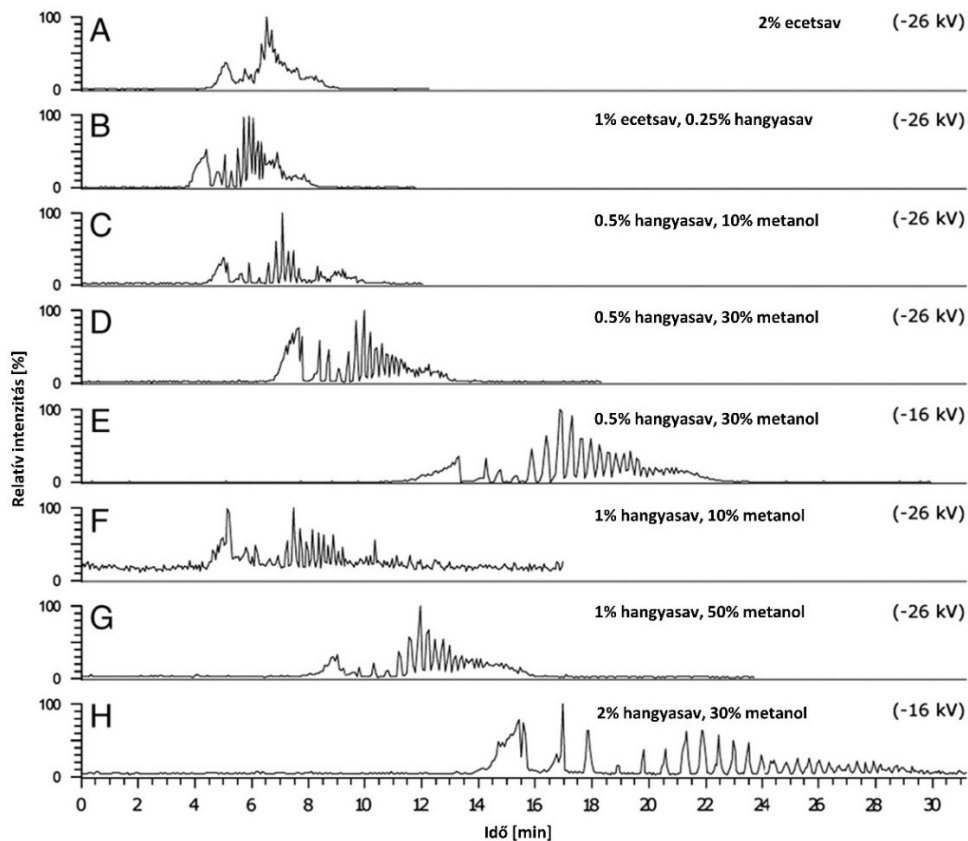
A minőségi szerkezet meghatározás mellett olykor az azonosított, vagy már ismert struktúrák mennyiségi meghatározására (kvantitatív analízis) is szükség lehet. Ahogy fentebb már említésre került, a cukrokhoz kapcsolódó APTS molekula három negatív töltést biztosít a szénhidrátoknak az elektromos tér közvetítette migrációhoz, valamint az egy festékmolekula - egy cukorszerkezet sztöichiometria révén lehetővé teszi az egyszerű kvantifikálást. Napjainkig azonban relatíve kevés kísérlet folyt az APTS-jelölt cukrok pontos mennyiségi meghatározására [98, 99]. Ellenben megfigyelhető, hogy ezen publikációk jelentéseiben a jelölt szénhidrátok koncentrációjának meghatározása jó linearitást mutat, akár 2-3 nagyságrend tartományban.

Az APTS-cukrok CE-LIF általi kvantitatív meghatározásról dolgozatom 2.2.3 alfejezetében, valamint az eredményeim ismertetésénél (4. fejezet) tesztek bővebb említést, továbbá, tapasztalataimat egy konkrét példával is szemléltetem (szabad oligoszacharid minták kapilláris-, és multikapilláris gélelektroforézise során).

Bár a CE alapú oligoszacharid vizsgálati módszerek hatékony analitikai tulajdonságai ismertek, egyik hátrányuk, hogy a fehérjék esetéhez hasonlóan hiányzik egy olyan rutinszerűen alkalmazható, egyszerű detektálási módszer, amely enzimes szekvencia analízis, vagy szoftveres becslés nélküli, pontos szerkezeti információt tudna nyújtani az elválasztott analitokról. Így merülhet fel nem csak a fehérjék, hanem a szénhidrátok esetén is a tömegspektrometriás detektálással való CE kapcsolat lehetősége, mely által értékes szerkezeti információt kaphatunk az elválasztott, sőt, sok esetben a komigráló cukormolekulákról is.

Elsőként 1987-ben végeztek online kapilláris elektroforézissel kapcsolt elektropray ionizációs tömegspektrometriás (CE-ESI-MS) analízist [49], de azóta a különféle CE-MS összekapcsolási technikák és interfész típusok megszületésével, (köztük a koaxiális, [100], folyadék kapcsolatos, (liquid junction) [101], és köpenyfolyadék nélküli (sheathless) [102] rendszerek) megnőtt a módszer alkalmazhatóságának jelentősége. Ezekkel a fejlesztésekkel párhuzamosan a szénhidrátanalitikai CE-MS módszerek is folyamatosan fejlődtek [103, 104], azonban még ma is viszonylag kevés információval rendelkezünk ezen eljárások megbízhatóságáról és reprodukálhatóságáról a biofarmáciai, vagy biotechnológiai ipar területén (főként a HPLC-MS alapú "golden standard" módszerekhez viszonyítva). Fontos megemlíteni továbbá, hogy a szénhidrátok CE analízise során használatos fluorofór derivatizáló reagensek negatív töltése, (például az APTS esetén), nem csupán gyorsítják az elektromigrációt, hanem segítségükkel lehetővé válik a derivatizált minta MS detektálása is, főként negatív ionizációs módban [105, 106]. A jelölt glikánok és más oligoszacharid

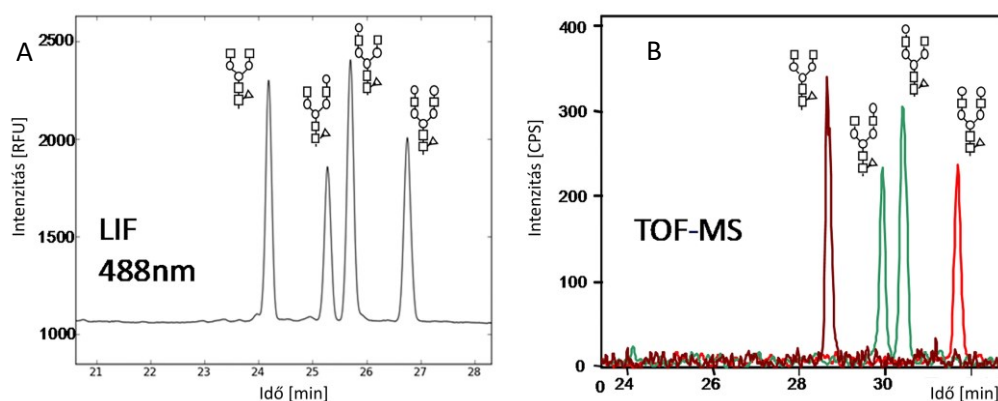
molekulák CE-MS analízise azonban nem mindig egyszerű feladat, révéen, hogy számos paramétert kell pontosan összehangolni, valamint ellenőrizni annak érdekében, hogy a módszer reprodukálható maradjon a migrációs idők és a csúcs alatti területek vonatkozásában. Ilyenek például a két technika között kapcsolatot létesítő interfész típus beállítása a CE és MS egységek elektromos áramkörének szétválasztásával, valamint a megfelelő polaritások használata az elektroforézis és az MS ionizáció során [107-109]. Mindemellett lényeges a megfelelő kapilláris hossz és belső átmérő kiválasztása, az elválasztó és konduktív (sheath) pufferek összetételének, pH-jának, valamint az elektroforetikus és elektropray feszültségek pontos beállítása is a stabil elektropray folyamat biztosításához. Legfőbb probléma, hogy számos esetben a CE elválasztáshoz alkalmazott szeperációs feltételek nem összeegyeztethetők a tömegspektrometriás detektálással (többek között a fentebb már említett szuppressziós hatások miatt). A szénhidrátok meghatározása CE-LIF során általában viszkózus elválasztó mátrixok használatát igényli a magasabb felbontás érdekében, ami általában nem kompatibilis az MS-sel a nem illékony gélképző anyagok és egyéb zavaró komponensek analizátorba és detektorba jutása végett [110]. Az oligoszacharidok CE-MS mérése ezért általában alacsonyabb felbontást eredményez gélképzők alkalmazása nélküli háttér elektrolit oldat használata mellett. Lényeges továbbá, hogy a legtöbb CE-LIF alapú glikánanalitikai módszer módosítatlan falú szilika (BFS) kapillárist használ fordított polaritású elválasztási módban (anód a detektálási oldalon), ami azt jelenti, hogy az EOF iránya a kapillárisban az injektálási irány felé mutat, ellentétesen a negatív töltésű analitok detektor irányú migrációjával. Ez azért jelenthet gondot a CE-MS analíziskor, mert a legtöbb interfész működésének és a stabil elektropray folyamat fenntartásának feltétele, hogy a szeperációs puffer ne ürüljön ki a kapillárisból az elektroforézis során, valamint a köpenyfolyadék se hígítson rajta jelentősen (ez bizonyos esetekben előnyös is lehet, lásd 2.3 fejezet), ezzel csökkentve az elválasztás alatti állandó feszültség mellett jelentkező áramerősséget [111]. A gyakorlatban az elektroozmózis csökkentéséhez vagy elnyomásához gyakran savas háttér elektrolitokat használnak az összekapcsolás során anélkül, hogy megváltoztatnák a CE vagy MS polaritásokat, vagy módosítanák a kapilláris fal belső felületét (17. ábra).



17. ábra: APTS jelölt maltooligoszacharid létra CE-MS analízise különböző összetételű savas elválasztó pufferekben. Az ábrán kétféle sav (ecetsav és hangyasav), valamint változó metanol koncentrációk alkalmazását láthatjuk, melyek eltérő felbontást és elválasztási időt eredményeznek (szerkesztve [107] alapján).

Egy másik kritikus paraméter a konduktív köpenyfolyadék és/vagy az elválasztó közeg illékony, szerves oldószer tartalmának optimalizálása, mely jelentősen befolyásolja az elektropray folyamat során a minta ionizációját, segítve a szénhidrátokat tartalmazó oldószer cseppek gyorsabb eltávolítását és javítva a detektálás érzékenységét. Továbbá, bizonyos oldószerek együttes alkalmazása az elválasztó és sheath folyadékokban (pl. cukrok esetén izopropanol, fehérjéknél metanol) segíthet kiküszöbölni a két folyadék közti konduktivitásbeli különbségeket, mely a reprodukálható CE-MS mérés alapfeltétele. A különböző lehetőségek közül azonban néhány további alternatíva is rendelkezésre áll az EOF hatásának megszüntetésére a savas BGE-k használata mellett, például a kapilláris inlet oldalán alkalmazott nyomással mely különösen a "sheathless" interfészek használata során lehet fontos, ugyanis ekkor az elválasztó közeg folyadékárama nem találkozik fizikailag a köpenyfolyadékkal, így a kapilláris inlet oldalán alkalmazott nyomás nélkül az elektropray folyamat megszakíthatja az elválasztó közeg folytonosságát, ezzel csökkentve az elválasztás

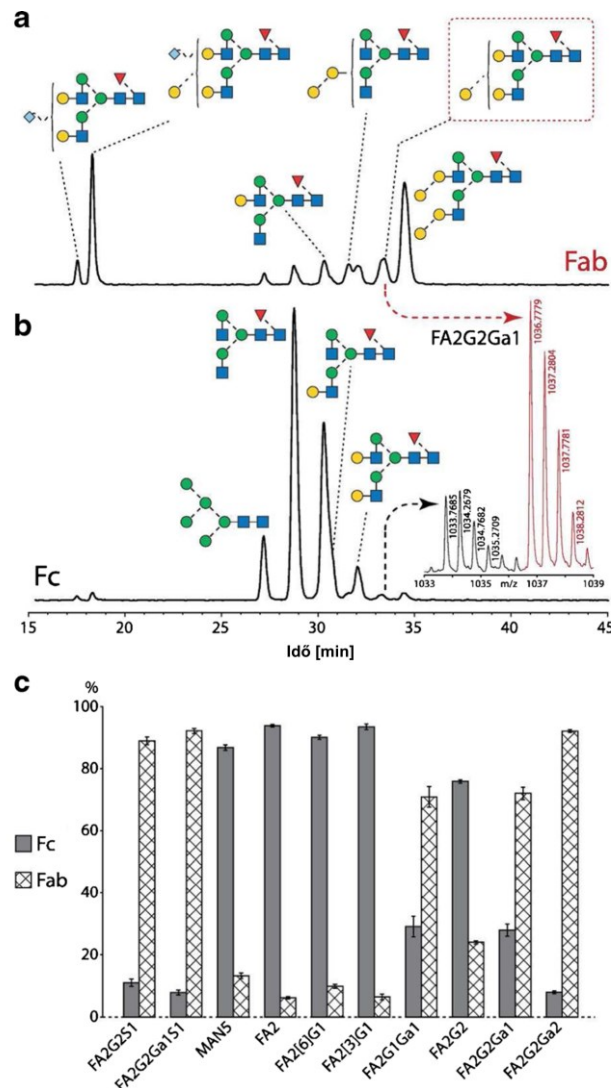
hatékonyságát és a folyamat reprodukálhatóságát [83], [112]. Emellett a kapilláris belső falának bevonatolásával (coating) is csökkenthető az EOF mértéke és a minta adszorpciója, továbbá sok esetben magasabb felbontás is elérhető bizonyos bevonatok alkalmazásával [105]. Az N-glikánok MS detektálással kapcsolt CE elválasztásának hatékonyságát mindig célszerű más detektálási módszerekkel is összehasonlítani és alátámasztani, hogy megbizonyosodjunk az MS-alapú módszer alkalmazhatóságáról. Ezt megtehetjük egy rutinszerű CE-LIF analízis által kapott elektroferogram segítségével, mely felbontásban és reprodukálhatóságban általában megbízhatóbb, valamint gyorsabb a kapcsolt módszernél (lásd, 18. ábra).



18. ábra: APTS jelölt glikán standardok CE-LIF (panel A) és CE-MS (panel B) analíziseinek összehasonlítása. Egy jól beállított CE-MS rendszer a megfelelő paraméterek optimalizálásával a CE-LIF mérés során kapott eredményekkel összehasonlítva közel azonos felbontás és analízis idő érhető el, on-line m/z adatokkal, ezáltal strukturális információval is kiegészítve (szerkesztve [105] alapján). Rövidítések: LIF –lézer indukált fluoreszcens, TOF-MS: repülési idő analizátorral szerelt tömegspektrometriás analízis.

A minőségi azonosítás melletti, N-glikán szerkezetekre vonatkoztatott CE-MS alapú kvantitatív analízis még napjainkban is ritkaságnak számít. Erre korábban főleg izobár (ahol a különböző mintákból származó, különböző jelölő ágenssel jelölt molekulák tömege azonos, de az MS/MS során keletkezett ionok csak az adott jelölő anyagra jellemzők) és stabil izotóp jelöléses MS-t (ahol a glikánt eltérő tömegű izotópokkal jelölik, melyek beépülve tömegeltérést okoznak a tömegspektrumon és bizonyos ionátmenetek során), valamint HILIC-MS alapú módszereket alkalmaztak [113, 114]. A CE-MS általi kvantitálás során felmerülő alapvető probléma a fehérjék analízise során is oly sokszor felmerülő ionszuppresszió jelensége, mely azzal magyarázható, hogy a leghatékonyabb CE általi glikán analízis (ahogyan a fehérjéké is) komplex elválasztó gérendszerben valósulhat meg, melyek az esetek túlnyomó részében ionszuppressziót okozó komponenseket tartalmaznak (pl. trisz, borát, PEO, stb.) Emiatt a

felbontás rovására a gélképző ágensek elhagyásával olyan puffer rendszerek megtervezése és megalkotása szükséges, melyek lehetővé teszik a jelölt glikánok elválasztását és érzékeny MS detektálását. Oligoszacharidok kvantitálása ugyan MS alkalmazása nélkül is lehetséges pl. CE-LIF módszerrel (lásd, 2.2.2 alfejezet), azonban a glikán jelölő ágenseket eltérő izotópokkal (pl. ^{12}C – ^{13}C) szintetizálva remek lehetőség adódik a cukorszerkezetek CE-MS alapú, relatív mennyiségi meghatározásra (lásd, 19. ábra) [115].



19. ábra: Egy monoklonális antitest (Cetuximab) Fab és Fc glikánjainak relatív kvantitatív analízise $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ izotóparány alapú 2AA (2-aminobenzoesav) jelöléses módszerrel (szerkesztve [115] alapján).

Panel a és b: extrahált ion elektroferogramok (EIE-k) az Fab (a) és Fc (b) régiók glikán profiljairól, valamint az FA2G2Ga1 struktúra mennyiségi eltéréseinek MS spektrumok általi (izotóparány különbségek) szemléltetésével. Panel c: a meghatározott, Fab és Fc régiókon található N-glikán struktúrák mennyiségének relatív eloszlása.

2.2.3. Szabad oligoszacharidok jelentősége

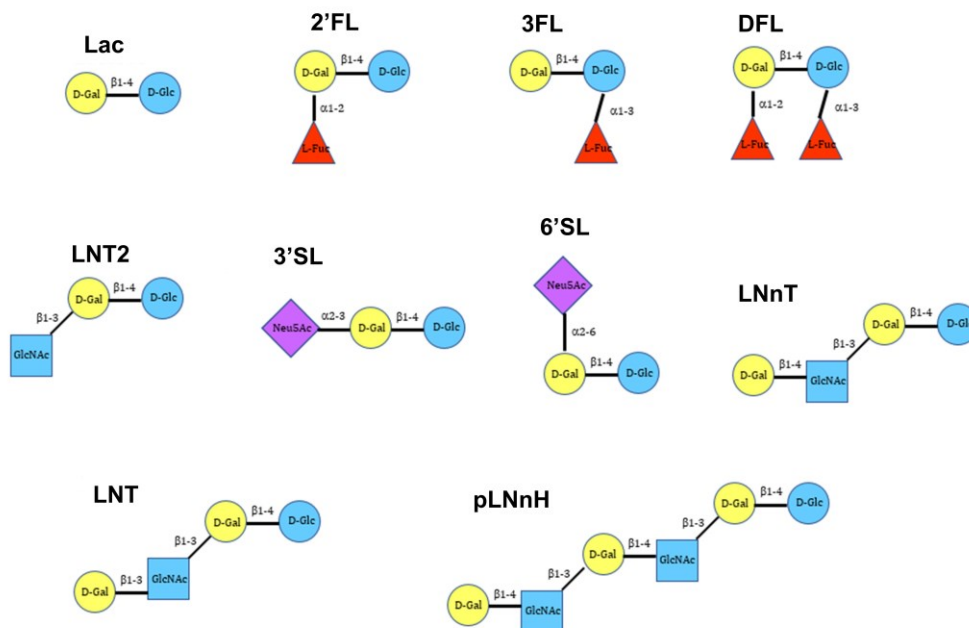
A molekuláris biológiában, orvostudományokban és táplálkozástudományokban a "szabad cukor" kifejezés leggyakrabban akkor használatos, amikor azon szénhidrátokról esik szó, melyek például az N-kötött glikánokkal ellentétben nem részei más összetett molekuláknak, azaz sem biológiai, sem kémiai úton nem kapcsolódnak más molekulatípusokhoz (pl. fehérjékhez, lipidekhez, stb.). Jelentőségük a különböző biológiai funkcióik révén kimagaslóvá vált az utóbbi évtizedekben, ugyanis számos pozitív élettani hatással rendelkeznek. Elég csak a humán anyatejben magas koncentrációban megtalálható, speciális, nagyfokú diverzitást és szerkezeti sajátosságot mutató, nem emészthető oligoszacharidokra (HMO-k) gondolnunk, melyek jelenléte (változó mennyiségekben és arányokban) kritikus tényező az anyatejjel táplált csecsemők és kisgyermek korai fejlődési szakaszaiban [116].

A HMO-k felfedezésének története egészen a 19. századra mutat vissza, ugyanis az akkori gyermekorvosok egy csoportja már az 1800-as évek végén megfigyelte, hogy az anyatejjel táplált csecsemők arányaiban kisebb valószínűséggel kapnak el fertőző betegségeket, így az akkoriban elég magas (~ 30%-os) csecsemő mortalitási ráta mellett jobb túlélési eséllyel rendelkeznek, mint a tehéntejjel, vagy más állati eredetű tejjel táplált társaik. Elsőként Theodor Escherich osztrák mikrobiológus és gyermekorvos talált összefüggést a csecsemők emésztése és az intesztinális baktériumflóra között, majd eredményeit alapul véve Moro és Tissier felfedezték, hogy az anyatejjel, táplált csecsemők székletének baktériumflórája eltér az állati eredetű tejjel táplált csecsemőkéétől [117-119]. Ezt követően Eschbach az anyatejet vizsgálva azt a következtetést vonta le, hogy a humán eredetű tej egy "másfajta laktózt" tartalmaz, mely eredményeképp számos kutatás középpontjává váltak az ekkor még ismeretlen szerkezetű és tulajdonságú szabad oligoszacharidok [120]. Természetesen hamar kiderült, hogy a különböző eredetű tejek között nem a laktóz szempontjából van különbség, hanem abban, hogy az anyatej tartalmaz egy speciális, a laktóztól eltérő komplex szénhidrát frakciót is, mely képviselőinek koncentrációja a laktáció előrehaladtával folyamatosan változik. Ezen molekulák legfontosabb biológiai tulajdonságaik között tudható a prebiotikus hatásuk (egészséges bélrendszer kialakulása, baktériumok általi kolonizációja) [121], antiadhezív funkciójuk (patogének receptor analójként való megkötése, megakadályozva a fertőzést az epitél sejteken keresztül) [122], továbbá immunmoduláns hatásuk [123] és az agyi fejlődésben betöltött szerepük is (glikolipidek biztosítása) [124]. Érdekesség, hogy egyes kutatások szerint bizonyos struktúrák a szoptatás során nem csak a csecsemők fejlődését segítik, hanem a gyakran jelentkező

mellgyulladás (mastitis) ellen az anya szervezetét is védik, receptor analógokként gátolva a patogén inváziót [125].

Felmerülhet azonban a kérdés, hogy az anyatejes táplálás lehetőségének hiányában ezekhez az esszenciális cukorszerkezetekhez hogyan juthatnak hozzá azok a gyermekek, akik valamilyen biológiai, vagy egyéb külső okból kifolyólag soha nem találkoznak ezen struktúrákkal azok természetes forrásán keresztül. A válasz ilyenkor a mesterséges táplálásban rejlik, ugyanis a modern orvostudomány és műszeres analitika ebben az esetben is kézenfogva talált megoldást a problémára, mely eredményeként napjainkra már több multinacionális vállalat is kifejlesztett és forgalomba hozott olyan életkor-, és egyéb speciális igények szerint különböző összetételű csecsemő tápszereket, melyek speciális összetevőik révén a humán anyatejet hivatottak helyettesíteni. Ezen tápszerek az idő előrehaladtával egyre pontosabban (de korántsem tökéletesen) képesek lemásolni az anyatej összetételét. Ezáltal evidenssé válik annak jelentősége, hogy megfelelő analitikai eszközök és módszerek álljanak rendelkezésre eme speciális szabad cukrok minőségi és mennyiségi vizsgálatára.

A vizsgált humán tejmintákból napjainkig több, mint 200 egyedi HMO szerkezet azonosítására került sor, de a szerkezeti változatosság még ennél is nagyobb lehet, melyet a folyamatosan növekvő referencia könyvtárak adatai is bizonyítanak [126]. Egy adott HMO változat többféle izomérikus szerkezetet eredményezhet a szintézis során változatos monoszacharid kötéstípusokkal, ami ezáltal nagyszámú izomer szerkezetet eredményez (például: 2'FL-3FL és LNT-LNnT izomerpárok esete, lásd, 20. ábra). Szerkezeti felépítésüket tekintve elmondható, hogy a legegyszerűbb HMO struktúrák redukáló végén lévő laktóz egységek LacNAc (β -N-acetil-laktózámin), vagy lakto-N-bióz (LNB) beépülésével egészülhetnek ki, melyek tovább módosíthatók különböző kötéstípusokkal beépülő fukóz (Fuc) vagy sziálsav (NANA) egységekkel, növelve a komplexitást [127, 128]. A speciális HMO-k bioszintézisének főbb tényezői az anya szekretor státusza, Lewis-vércsoportja, az egyes glikozidáz, vagy glikoziltranszferáz enzimek polimorfizmusai (SNP-k), valamint a terhesség időtartama és az anya egészségi állapota. A szekretor státusz olyan gének jelenlétére vagy hiányára utal, amelyek kódolják azon sejtfelszíni enzimeket, melyek az ABO vércsoport antigének kialakításáért felelősek, és ezen keresztül befolyásolják az anyatej oligoszacharid összetételét. A Lewis-vércsoport a vörösvérsejtek felületén található antigének egy csoportját jelenti, mely a humán tejben előforduló specifikus HMO-k kialakulását befolyásolja különböző transzferáz enzimeket kódoló gének megléte vagy hiánya révén - (pl. FUT3 gén \rightarrow fukoziltranszferáz \rightarrow fukozilált struktúrák kialakulása) [129].



20. ábra: A humán tejben megtalálható, leggyakrabban vizsgált oligoszacharidok szerkezete (a teljesség igénye nélkül - saját forrás).

Szerkezetek: Lac – laktóz, 2'FL – 2'-fukozillaktóz, 3FL – 3-fukozillaktóz, DFL – difukozillaktóz, LNT2 – lakto-N-trióz, 3'SL – 3'-szialillaktóz, 6'SL – 6'-szialillaktóz, LNnT – lakto-N-neotetraóz, LNT – lakto-N-tetraóz, pLNnH – para-lakto-N-neohexaóz.

2.2.4. Humán tej oligoszacharidok és csecsemő tápszer formulák szabad cukortartalmának vizsgálata CGE-LIF és MS módszerekkel

Számos glikoanalitikai módszer alkalmas arra, hogy különböző biológiai mátrixokból átfogóan jellemezze a szénhidrátokat monoszacharid szinttől az egészen bonyolult, többszálú szerkezetekig [130]. Míg a gázkromatográfia (GC) továbbra is kompatibilis technika a szénhidrát analízisben [131], az utóbbi időkben inkább a különböző állófázisokkal rendelkező HPLC módszerek nyertek teret. Tekintve a cukor oligomerek hatalmas számát és az izomerjeik variabilitását, a szénhidrát kromatográfia ma is rendkívüli kihívást jelent. Jelenleg főként HILIC alapú módszereket alkalmaznak a natív vagy derivatizált tej oligoszacharidok nagy felbontású és jó érzékenységgel vizsgálására [127], de emellett az ioncserélő kromatográfia is nagy jelentőséggel bír [132]. Minden előnyük ellenére azért megemlítendő, hogy a speciális tejcukrok analízisére szolgáló kromatográfiai módszerek általában 30–60 perc elválasztási időt

igényelnek, ami napjainkban már hosszadalmasnak számít a bioipari folyamatok tekintetében, amikor is minél nagyobb számú minta minél gyorsabb analízise a cél.

Az utóbbi időben a HPLC mellett a CE technikák is népszerűvé váltak, hiszen hatékony ortogonális módszerként a komplexebb szénhidrátok analízisében gyorsabb és nagyobb áteresztőképességű módszereik (pl. multikapilláris) révén nem csupán a gyógyszeriparban és a biomedicina területein, hanem az élelmiszeriparban is egyre elterjedtebb lett az alkalmazásuk [55]. A lézerindukált fluoreszcens detektálás megjelenésével a kapilláris elektroforézis alapú módszerek érzékenysége elérheti a 10^{-10} M koncentrációt a szénhidrátok fluoreszcens jelölése után, például a fentebb már említett APTS festékkel végzett derivatizáció által, mely a tömegspektrometria mellett jelenleg a legérzékenyebb módszer a cukrok detektálására. A szabad cukrok CE analízise az N-glikánokhoz hasonlóan történik, ám kisebb méretük révén a különböző optimalizált gélszisztemek segítségével még gyorsabban elválaszthatók az elektromos erőterben, mint a fehérjékről felszabadított társaik. Analitikai kihívást leginkább azok a strukturális izomer szerkezetek jelenthetnek, melyek mérete és monomer összetétele azonos, ám kapcsolódási sorrendjük, vagy az egymáshoz való kötődés típusai eltérők (lásd 20. ábra – 2'FL – 3FL, 3'SL – 6'SL, illetve LNT és LNnT). Igaz, a tömegspektrometriás analízis (főként tandem MS alkalmazása esetén) lehetővé teszi, hogy ezen strukturális izomerek még koelúció, vagy komigráció esetén is megkülönböztethetők legyenek ionátmeneteik és fragmentációs MS/MS "ujjlenyomataik" által, azonban számos cukorszerkezetre jellemző, hogy hajlamosak sérülni az ESI folyamat alatt, ezzel torzítva a kapott spektrum pontosságát. Ez ad magyarázatot arra, hogy miért is van jelentősége azon elektroforetikus elválasztó rendszerek megtervezésének, fejlesztésének és tesztelésének, melyek akár a legkisebb izomériai eltérések ellenére is megfelelő felbontást biztosíthatnak az oligoszacharidok gyors és átfogó analízise során.

Doktori munkám során lehetőségem volt egy különösen gyors és hatékony CE alapú módszer humán tej oligoszacharidokon történő bemutatására, mely során egy 12 csatornás, multikapilláris gélelektroforézis készülék segítségével vizsgálhattam két, egymás hatását kiegészítő gél-puffer kompozíció felbontóképességét, melyek különböző elven képesek elválasztani a szabad oligoszacharidok meghatározott elegyének összetevőit. A módszer egy HMO standardokat tartalmazó keveréken és egy komplex humán anyatej mintán is tesztelésre került, [66] továbbá egy neves élelmiszeripari cég fejlesztés alatt álló, galaktooligoszacharid (GOS) tartalmú tápszer formula összetételének (kvalitatív és kvantitatív) meghatározása is a vizsgálataim tárgyát képezte [133] (lásd, 4. fejezet).

2.3. Módszerfejlesztési stratégiák: CGE-, és SDS-CGE-MS

Annak megértése érdekében, hogy miért is fontos az analitikai eszközök és módszerek folyamatos fejlesztése mind az akadémiai kutatócsoportok, mind a biotechnológiai ipar számára, az alábbi igénypontok nyújthatnak segítséget a kutatóknak [134]:

1. Magasabb érzékenység és szelektivitás igénye: Általánosságban elmondható, hogy minél újabb és fejlettebb egy analitikai módszer, annál nagyobb érzékenységet, szelektivitást és pontosabb szerkezetmeghatározást tesz lehetővé a vizsgálandó minta típusának függvényében. Ez minden analitikai módszer fejlődésének az alapja, ha alacsony koncentrációban lévő komponensek azonosítása és pontos mennyiségének meghatározása a cél.
2. Gyorsabb analízisére és hatékonyságra való törekvés: Az idő egyre fontosabb tényezővé válásával egyenes arányban következik, hogy a fejlettebb analitikai módszerek egyre hatékonyabb analízist tesznek lehetővé, ezáltal elérhetővé válik a nagyobb mintaszám feldolgozása rövidebb idő alatt. Ez az iparban ma már kulcsfontosságú tényező, de az orvosi és klinikai kutatólaboratóriumok számára is kritikus lehet (pl. Covid 19 esete).
3. Szélesebb alkalmazhatósági kör lehetősége: Az új módszerek általában szélesebb körű alkalmazhatóságot biztosítanak, ami többféle mintatípus analízisére nyújt lehetőséget. Maguk a kapcsolt analitikai módszerek is ezen igény felmerülése során jöhettek létre, felismerve, hogy az együttes alkalmazás nagyobb szelektivitást és extra információt biztosíthat a kutatók számára, ezzel előremozdítva az analitikai tudományok fejlődését.
4. Jobb reprodukálhatóság és pontosság: Azon analitikai módszerek, melyeket hosszabb ideig fejlesztenek, általában jobb reprodukálhatóságot és nagyobb pontosságot tesznek lehetővé, ami létfontosságú az analitikai eredmények megbízhatósága szempontjából.
5. Az emberi egészségre és környezetre vonatkozó hatások vizsgálata: Az új analitikai módszerek lehetővé teszik az egészségügyi és környezeti minták analízisét, így hozzájárulnak az orvosdiagnosztika és környezetvédelem terén történő fejlesztésekhez, valamint az egészségre és környezetre káros hatások azonosításához.
6. Technológiai előrelépések kihasználása: Az új technológiák kihasználása, például az automatizálhatóság, az új technikai megoldások (pl. multikapilláris, ami az LC alapú módszereknél nem megoldható) és speciális detektálási technikák integrálása elősegítheti a modern analitikai módszerek relevanciájának növekedését.

Ezen szempontokat figyelembe véve érthetővé válik, hogy mindennemű analitikai fejlesztési folyamat a tudomány és az ipar számára is kulcsfontosságú, és hozzájárul a jobb kutatási eredmények eléréséhez, valamint a környezeti és egészségügyi kérdések megértéséhez, a felmerülő tudományos problémák megoldásához. Továbbá, a napjainkban elfogadott gyógyszeripari irányelvek (főként az FDA, EMA, USP és ICH) folyamatos változása és egyre szigorúbbá válása szintén megköveteli az analitikai módszerek folyamatos fejlesztését (főként az új gyógyszermolekulák megjelenése esetén) [134, 135].

Esetemben ezért jelen doktori munka gerincét az általam vizsgált anyagok (peptidek, fehérjék és oligoszacharidok) analízisén és az analízis során levonható inkább analitikai, mint élettani következtetéseken túl főként az alkalmazott elválasztó közegek, analitikai módszerek és eszközök (CE és MS) fejlesztése, továbbá egy új kapcsolt fehérjeanalitikai megközelítés optimalizálása képezi [136].

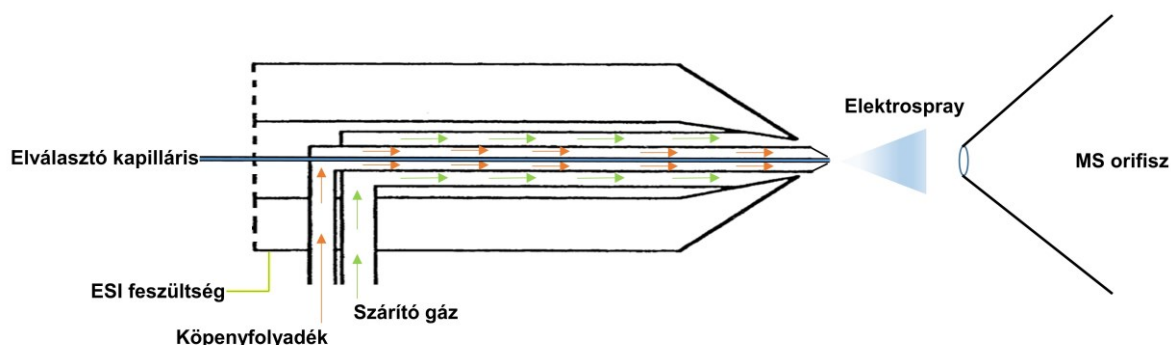
Az elmúlt néhány évtizedben számos, a CE és MS készülékek között kapcsolatot teremtő interfész típus kifejlesztése történt, beleértve a köpenyfolyadékös ("sheath liquid"), köpenyfolyadék nélküli ("sheathless") és folyadék kapcsolatos ("liquid junction") megoldásokat [137]. Ezekre főként azért volt szükség, mert a kutatócsoportok próbálták megtalálni a saját analitikai projektjeikhez és készülékeikhez legmegfelelőbb és legkézenfekvőbb megoldást, melyekkel az adott minta típusokra minél érzékenyebb és reprodukálhatóbb módon működhetett a CE-MS kapcsolat. A CE technika összekapcsolása MS-sel a kromatográfiás MS kapcsolással ellentétben sokkal nagyobb kihívást jelent, ugyanis az elválasztó feszültség (akár ± 30 kV) és az elektropray feszültség (akár ± 5000 V) együttes alkalmazása jelentősen megnehezíti a folyamatot. Ilyenkor mindig fennáll annak a veszélye, hogy az elektroforézis során keletkező áram nem a CE készülék föld elektródáján záródik, hanem a tömegspektrométer bemeneti nyílásán (orifice) át az MS magasfeszültségű tápegységén, vagy más részein vezetődik le. Jobb esetben ez csupán az elválasztó feszültség ingadozását, és reprodukálhatóságbeli romlást, rosszabb esetben a tömegspektrométer károsodását is előidézheti, melynek javítási költségei rendkívül magasak. Ezért, a készülékek fejlesztői és a kutatók évek óta együtt próbálják áthidalni ezen technikai problémákat oly módon, hogy különféle interfész típusokat és kapcsolódási stratégiákat dolgoznak ki a megfelelő analitikai hatékonyság érdekében [138].

A köpenyfolyadékot használó CE-ESI-MS interfész típusok stabil elektropray-t tesznek lehetővé az elektroforézis során, azonban a mintakomponensek jelentősen kihígulnak mielőtt

belépnének a tömegspektrométerbe [139]. A sheatless interfészek ezzel ellentétben ugyan nem hígítják a mintát (így érzékenységük jóval nagyobb), de a legyártásukhoz időigényes mikrofabrikálási folyamatokra és miniatürizált alkatrészek beépítésére van szükség, emellett gyakran stabilitási problémáik lépnek fel az elektropray kialakulása során, mely a nanoliteres folyadékáramlásnak köszönhető [140]. A folyadék kapcsolatos interfész esetében az elválasztó kapilláris egy néhány mikroliteres folyadéktartályban végződik, majd egy megszakítással folytatódik, melynek révén elektromos kapcsolatot teremt a CE és MS áramkörök (injektálási és detektor oldali CE edények (elválasztó áramkör); valamint az elektropray hegy és a MS orifice) között. Ennek alkalmazása azonban sok esetben csúcshéledést eredményez. A folyadékáram a köpenyfolyadék rendszerhez hasonlóan ilyenkor is egy pozitív, vagy negatív nyomással tartható fent az elektropray folyamat stabilizálásához [141].

Az elmúlt évtizedben a CE-MS technika hatalmasat fejlődött az érzékenység és robusztusság terén, melynek révén a szakma egyre több képviselője építette be a "gold standard" HPLC-MS módszerek mellett a CE-kapcsolt megközelítés alkalmazását is az analitikai gyakorlatba [142, 143]. A számos kísérlet, melyek ma már főként a CE-MS kapcsolat lehetőségeinek bővítésére irányulnak olyan kiemelkedő jellemzőkkel, mint a lehetőség megteremtése a géllal töltött kapillárisok és nem MS kompatibilis pufferkomponensek, (pl. SDS) MS detektálás melletti alkalmazására - azonban továbbra is kihívást jelentenek. Ezen problémák mellett továbbra is gondot okoz az egyenes elektropray folyamat fenntartása, a CE elválasztás során megjelenő buborékok képződésének elkerülése és a stabil elektromos kapcsolat megőrzése, melyek egytől egyig komplikációt okozhatnak a CE-MS analízis során [144]. A helyzet bonyolultságát fokozza, hogy a legtöbb napjainkban használatos CE-MS interfész alkalmazása speciális beavatkozásokat tesz szükségessé az elválasztó kapillárison, mint például annak kilyukasztása, hegyezése, maratása, vagy más bonyolult és nehezen reprodukálható módosítások [145]. A szilika kapilláris pontos elhelyezése a sprayerhez viszonyítva, valamint a megfelelő elválasztó-, és elektropray feszültségek együttes megválasztása szintúgy kritikus tényezőnek számítanak a kapcsolat fenntartásához. A fentebb felsorolt kapcsolódási típusok mindegyike használható CE-MS analízishez, ám a leggyakrabban választott módszer az elektropray interfész koaxiális köpenyfolyadék rendszerrel történő alkalmazása, mivel ez a kialakítás rendkívül stabil kapcsolatot hoz létre a két analitikai eszköz között. Ebben a beállításban ugyanis az elválasztó kapilláris végén található egy kapillárison kívüli csőszakasz, melyben folyamatos folyadékáramlás megy végbe, ami zárja az elektromos kapcsolatot az elválasztó kapilláris injektálási és detektálási

oldalai között (CE és MS áramkörök biztosítása), emellett segíti az elektropray ionizációs folyamatot. Ebben az esetben a sprayer hegyének MS orifice-től való távolságán és az elektropray feszültség változtatásán felül fontos a köpenyfolyadék áramlási sebességét is optimalizálni, melynek hatására a minta túlságosan kihígulhat, vagy hiányában az elektropray folyamat megszakadhat. A túl nagy áramlási sebességek esetében fűtött nitrogén árammal (nebulizer gáz) lehetőség van segíteni az ionizációt, így a szárító gázok áramlásának és hőmérsékletének optimalizálása is fontos tényezők egy CE-MS módszer fejlesztése során. A megfelelő sprayer-orifice távolság beállítása azért jelent kihívást, mert a távolság csökkentése korona kisüléseket okozhat, ami károsíthatja a tömegspektrométert. Ez problémát okozhat a túl magas elektropray feszültség alkalmazásakor is, ami ionforráson belül létrejövő, úgynevezett "in-source" fragmentációs jelenséget idézhet elő ezzel csökkentve a kapott eredmények megbízhatóságát [146]. A technikai paraméterek beállítása mellett azonban fontos, hogy egy megfelelően nagy felbontást és reprodukálható elválasztást lehetővé tevő elválasztó közeg (puffer, vagy gél rendszer) is rendelkezésre álljon, ezért annak minta specifikus megtervezése és beállítása is lényeges feladat a CE-MS interfész fejlesztéssel és optimalizálással párhuzamosan. Egy általános, koaxiális CE-MS interfész felépítését a 21. ábra szemlélteti.



21. ábra: Egy koaxiális CE-MS interfész felépítése. Az elválasztott minta komponensek a háttér elektrolitot tartalmazó kapillárisból a köpenyfolyadékba migrálnak, melynek szerves oldószer tartalma protonáló (vagy deprotonáló) környezetben az elválasztó áramkör zárása mellett segíti a minta ionizációját, valamint a mátrix illékonyágának növelését. Az ionizációt és a minta oldószertartalmának csökkentését az interfészen átvezetett, szabályozható hőmérsékletű, általában tiszta N₂ tartalmú szárító gáz segíti. Ezek együttes optimalizálása az ESI feszültség helyes megválasztásával a koaxiális rendszerben stabil elektropray folyamatot eredményezhet (saját forrás).

Az MS analízist zavaró ágensek problémaköre ma már a legtöbb nemzetközi biotechnológiai céget foglalkoztatja, ezért kulcsfontosságúvá válni látszik egy olyan reprodukálható, robosztus CE-MS módszer megalkotása, mely megbirkózik a legtöbb fehérje típusú biológiai gyógyszer nagy hatékonyságú elválasztásával és tömegspektrométerrel történő strukturális azonosításával. A tudomány jelenlegi állása szerint még nem ismert olyan általánosan alkalmazható analitikai módszer, mely méret szerinti, gélelektroforetikus elválasztást "on-line", azaz közvetlenül a folyamathoz kötött ESI-MS kapcsolással valósítaná meg. Kutatómunkám során ezért egy olyan speciális, CGE-MS interfész kapcsolatot is kifejlesztettem, melyet eddig a műszeres analitika területén nem használtak. E megközelítés lehetővé teszi, hogy a kapilláris gélelektroforézis (CGE) MS detektálást ellehetetlenítő ágenseit és az elektropray ionizációt zavaró tényezőket kiküszöbölve "online" módon történő, gélelektroforézissel összekapcsolt MS analízist biztosítson akár a fehérjék méret alapú elválasztása mellett (lásd, 4. fejezet).

2.4. A dolgozatban bemutatott bioterapeutikumok fehérje-, és glikánanalitikai szempontból végzett CGE-alapú vizsgálatainak jelentősége

A terápiás fehérjék analízisének alanyaiként az omalizumab és bamlanivimab hatóanyag tartalmú monoklonális antitesteket vizsgáltam CGE alapú módszerekkel. Mivel ezen antitestek hatásmechanizmusát és szervezetből történő eltávolításukat a tudomány jelenlegi állása szerint befolyásolja az Fc régió N-glikozilációja, érdemes részletes vizsgálatnak alávetni ezeket az N-kötött szénhidrát szerkezeteket. Mielőtt azonban a konkrét mérési eredményeimet bemutatnám, fontosnak tartom, hogy a vizsgált fehérjék alapvető szerepét röviden ismertessem.

Omalizumab: A súlyos asztmás betegek omalizumab antitesttel történő kezelése általában magas Th2 endotípus és emelkedett szérum IgE-szintekkel jár [147]. A terápiás fehérje hatásmechanizmusát tekintve szelektíven kötődik az IgE immunoglobulin Cε3 doménjéhez, gátolva annak gyulladáshoz vezető mediátorokat felszabadító képességét az effektor sejtekhez való kötődés révén. Ezért, az omalizumab hatékonyan alkalmazható az asztma és egyéb allergiás betegségek kezelésére [148]. Az omalizumabot kéthetente vagy négyhetente adják be a betegeknek, a testsúlyhoz és a kiindulási IgE-szinthez igazítva. A szérum csúcskoncentrációkat általában 7-8 nappal a szubkután injekció beadása után érik el. A kiürülés (clearance) magában foglalja az IgE-vel történő komplexképződést és a lebomlást a máj retikuloendoteliális rendszerében és az endotél sejtekben. Fontos továbbá megjegyezni, hogy az antitestek

kiürülése eltér a kis molekulájú gyógyszerektől, mivel előbbiek főleg a lizoszómákban történő katabolizmus révén ürülnek ki az endocitózis után. Emellett, a humanizált és humán eredetű monoklonális antitestek képesek gyógyszer elleni antitesteket is létrehozni, ami sok esetben inaktív immunkomplexek kialakulásához vezet, melyek lizoszomális lebontást okozhatnak. Azonban vannak védő mechanizmusok is, melyek lelassítják az IgG molekulák, és ezáltal a monoklonális antitestek kiürülését. A monoklonális antitestek Fc régiója megvédi azokat a lizoszomális lebontástól az FcRn (neonatalis Fc receptor) kötődésével az endothel sejtek endoszómáiban, továbbá a mAb-ok Fc régiójának módosítása jelentősen befolyásolja a klinikai hatás erősségét, valamint a gyógyszer immunogenitását, farmakokinetikáját és farmakodinámiáját. Különösen igaz ez az Fc régió konzervált Asn 297 helyén, ahol a glikozilációs mintázatok közötti különbségek kulcsfontosságúak lehetnek ezen paraméterek meghatározásában. Az ADCC funkcióját ezáltal jelentősen befolyásolják az N-kötött szénhidrátok "core" aszparagin 297 helyén található CH2 domén fukozilálódásának jelenléte vagy hiánya. Más szóval, a "core" szerkezet afukozilációja növelheti az ADCC-t a Fc γ R IIIa erősebb kötődési affinitása miatt, ami gyorsított kiürülést eredményezhet [149].

Bamlanivimab: A COVID-19 betegség I, és IIa fázisaiban az antivirális terápiák elsődleges célja a vírus replikációjának gátlása vagy a sejtbe való bejutásának megakadályozása [150]. A vírus felszínén kifejeződő, úgynevezett spike protein (tüskefehérje) kulcsfontosságú szerepet játszik a vírus gazdaszervezet sejtjeibe történő bejutásában. Ez a fehérje a receptorhoz kötő doménje (RBD) révén az angiotenzin konvertáló enzim 2 (ACE2) receptorhoz kötődik, amely a célszerv sejtjének plazmamembránján található, és amely lehetővé teszi a gazdaszervezet sejtjeibe való behatolást. Az RBD célzott (neutralizáló) monoklonális antitestek alkalmazása ez ellen az egyik leghatékonyabb terápiás lehetőség [151]. Az ilyen antitesteket tartalmazó (rekonvaleszcens) vérplazmát korábban már sikeresen alkalmazták passzív immunterápiaként számos vírusfertőzés esetében, ugyanis a plazmában lévő antitestek hatásukat többnyire a kórokozók neutralizálásával és speciális antitest-effektor mechanizmusuk által fejtik ki [152]. A COVID-19 betegségből felgyógyult betegekből származó B-limfocitákból tehát nagyfokú specifikussággal olyan neutralizáló antitestek nyerhetők, amelyek gátolják a vírus kötődését és bejutását a sejtbe. Ezeket a neutralizáló antitesteket továbbá rekombináns technikával lehet módosítani és nagy mennyiségben előállítani. A bamlanivimab volt az első ilyen, IgG1 izotípusú neutralizáló monoklonális antitest, amely az RBD kulcsfontosságú szegmenséhez kötődve képes volt megakadályozni a vírus bejutását a sejtbe, és ezáltal a jelentések szerint a betegség egy kritikus időszakában (vészhelyzeti felhasználási engedélyt (EUA) szerevezve)

képes volt csökkenteni a víruskoncentrációt és a vírus replikációját a betegek légutaiban. Az omalizumab esetében említett tény, hogy ezen mAb-ok Fc régiójának módosítása jelentősen befolyásolja a klinikai hatás erősségét, immunogenitást, farmakokinetikát és farmakodinámiát, természetesen ebben az esetben is igaznak bizonyult, ily módon fontosnak tartottuk, hogy egy ortogonális analitikai technika által megerősítsük és bizonyítsuk a fehérjéhez kötött N-glikánok ADCC funkciót befolyásoló szerkezeti sajátosságait.

Tanulmányom során ezért az omalizumab és bamlanivimab fehérjék átfogó, N-glikozilációs szerkezeti jellemzését mutatom be, melyeket előzetesen SDS kapilláris gél elektroforézissel és UV detektálással teljes fehérje, valamint a fehérje alkotóegységeinek szintjén is analizáltam a tisztaság és alegység integritás megfelelőségének vizsgálata céljából. A fehérjékhez kötött cukor szerkezetek azonosításához egy a kutatócsoportunk által fejlesztett mintaelőkészítési folyamatot alkalmaztam, a fluoreszcensen jelölt glikánokat pedig egy szoftver segítségével, valamint CE általi enzimes szekvenálással azonosítottam LIF detektálással kapcsolva. Ez utóbbi magába foglalta a glikán profilozást és azonosítást, hogy egy ortogonális analitikai módszer segítségével is megerősíthessük a lehetséges N-glikán szerkezet és a fehérje biológiai funkcióinak kapcsolatát [153].

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

A munkám során felhasznált terápiás fehérjék (omalizumab, bamlanivimab), és a humán anyatej minták a Debreceni Egyetem Orvostudományi Karának, valamint a Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Központi Kórház és Egyetemi Oktatókórházának nagylelkű felajánlásából származtak. A kapcsolódó regionális kutatásetikai engedély száma: BORS-24/2021. A galaktooligoszacharid (GOS) formulát, maltodextrin létrát és laktózt a Nestlé Research (Lausanne, Svájc), a humán tej oligoszacharid standardokat pedig a Glycom (Hørsholm, Dánia) cégek biztosították. Az amiloglikozidáz enzim a Roche-tól (Bázel, Svájc) a galaktozidáz a Megazyme cégtől származott (Wicklow, Írország). A fehérje, valamint glikánanalitikai mérésekhez beszerzett SDS-MW, cIEF, és Fast Glycan kitek a kaliforniai Beckman (Brea, CA) cég termékei, a PNGáz F enzim pedig a veszprémi Pannon Egyetem Biotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézetének hozzájárulása volt. A cIEF méréshez alkalmazott, pH gradiens előállításához szükséges "Pharmalyte 3-10" amfolit oldatot a GE Healthcare (Chicago, IL, USA) cégtől szereztük be. A ciklodextrineket a Cyclolab Kft-től (Budapest) kaptuk. Az ecetsavat a Molar Chemicals Kft-től vásároltuk (Halásztelek, Magyarország), a peptid és fehérje standardok, SDS, nátrium-cianoborohidrid, 2-pikolinborán, gélképző ágensek (agaróz és dextrans), oldószerek, továbbá minden más felhasznált vegyszer a Sigma-Aldrich-től (St Louis, MO) származott.

3.2. Módszerek

3.2.1. Fehérjeminták előkészítése a CGE-UV mérésekhez

A fehérjeméret heterogenitás-, és alegység integritás analízisek (SDS-CGE) előtt mind az omalizumab, mind a bamlanivimab hatóanyagú biologikum 10 mg/mL koncentrációjú oldatából 10 μ L-t a 10 kDa méretű belső standardból pedig 2 μ L-t pipettáztunk 80 μ L SDS-MW minta pufferhez. A nem redukált minták előkészítése során a mintákhoz 5 μ L jodoacetamid hozzáadása volt szükséges, míg a redukált fehérje analízis esetén a mintához 5 μ L merkaptotanol kellett a diszulfid hidak felbontása érdekében. Ezt követően a nem redukált mintaelőkészítésnél 70 °C-on 15 percig történő inkubálás történt az SDS-fehérje kötés létrejöttének céljából. A redukált fehérjék esetében a denaturálási lépés magába foglalta egy

90 °C-ig történő, 0,5 °C/5 s hőmérsékleti gradiens alkalmazását, majd a magas hőmérséklet 5 percig történő megtartását. A reakciókeveréket ezután jeges vízzel hűtöttük le a kapilláris elektroforézis analízis előtt. A fehérje létra előkészítése a redukált módszerrel azonosan történt. Az agaróz gél alapú alegység integritás elemzés és gélfeljlesztés esetében a monoklonális antitest minta előkészítése a fentebb leírt móddal megegyezően történt. Amennyiben a redukált fehérjék glikozilált alegységeinek migrációs tulajdonságait vizsgáltuk, a mérés előtt PNGáz F enzim (200 mU) általi emésztést alkalmaztunk 50°C-on 1 óráig.

A bamlanivimab minta töltés variánsainak analízise esetében (cIEF) a minta speciális előkészítési folyamatot nem igényelt, csupán a fehérje 10 mg/mL koncentrációjú törzsoldatának "Master Mix" oldatával való hígítását, mely az elválasztó gélt, az izoelektromos pont (pI) markereket, L-arginint és az amfolit oldat keverékét tartalmazta.

3.2.2. Peptid és fehérje minták előkészítése a CGE-MS, és SDS-CGE-MS mérésekhez

Az angiotenzin II, bradikinin és neurotenszin peptideket HPLC tisztaságú vízben oldottam fel 10 mM koncentrációban, majd 4,0% hangyasavval hígítottam azokat a végleges 100 µM koncentráció eléréséhez. Az RNáz A és a lizozim fehérjéket szintén vízben oldottam, mely eredményeképp 10 mg/mL koncentrációjú törzsoldatokat kaptam. Az inzulin esetében az U-100 Humulin ampulla tartalma szolgált kiindulási oldatként (~ 3,5 mg/mL). Az SDS-CGE-MS méréseknél a fehérjék 10-10 µL-jét, valamint a 10 kDa fehérje méretstandardból 2 µL-t kevertem össze 80 µL gyári SDS-MW mintapufferrel (Beckman), majd denaturáltam (90 °C, 10 perc).

3.2.3. N-glikán minták előkészítése a CGE-LIF mérésekhez

A bamlanivimab és omalizumab terápiás fehérjék N-glikánjainak mintaelőkészítési folyamata megegyezett. Mindkét esetben a Beckman által forgalmazott Fast Glycan kitet alkalmaztam, beleértve az előkészítés folyamán a tisztítási lépésben használt mágneses gyöngyöket, illetve a szintén a kit részét képező 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsav (APTS) fluoreszcens ágenst.

Az N-glikán minta előkészítése a Reider és mtsai által bevezetett módszeren alapult (evaporatív jelölés) [154]. A módszer során 10 µL 10 mg/mL (100 µg fehérjetartalmú) mAb oldatot 80°C-on 10 percig denaturáltam 2,0 µL denaturáló keverékkel, majd 1,0 µL PNGáz F enzim hozzáadásával 20 µL 20 mM ammónium-acetátban 37°C-on 2 órán át tartó emésztés következett. Az emésztési lépés után 20 µL jelölőoldatot (6,0 mM APTS, 100 mM nátrium-cianoborohidrid 1 M THF-ben, 24% ecetsav) adtam a mintához, és egy éjszakán át 37°C-on inkubáltam nyitott mintatartó fedéllel. A minta analízise előtt a felesleges festéket 20 µL ötszörös koncentrációjú M1 gyöngy szuszpenzióval és 185 µL acetonitrillel távolítottam el összesen 4 mosási ciklusban, majd az APTS-jelölt mintát 100 µL HPLC tisztaságú vízzel eluáltam. Továbbá, a minták tízszeres, HPLC tisztaságú vízzel történő hígítást igényeltek a CGE-LIF mérés előtt. Az oligoszacharid szekvenálás során a mintákhoz 1,0 µL exoglikozidáz enzimeket (rendszerint neuraminidázt, galaktózidázt és hexózaminidázt) adtam, melyet 37°C-on, 1 órán át történő inkubálás követett. A mérés előtt 40 µL vizet adtam a mintákhoz, hogy elérjem a megfelelő detektálási koncentrációt (jel intenzitást).

3.2.4. Szabad oligoszacharid minták előkészítése

Minden HMO cukorstandardból 2 mg-ot jelöltem APTS festékkel NaBH₃CN (1 M THF-ben) jelenlétében, majd egy éjszakán át inkubáltam 37°C-on nyitott kupakkal [154]. A jelölt mintákat 100 µL HPLC tisztaságú vízben oldottam fel (jelölt törzsoldatok). Ezeket a törzsoldatokat megfelelő detektálási tartománytól függően további 1000-10000-szeresre hígítottam a multikapilláris gél elektroforézis analízis előtt a megfelelő detektálási tartománytól függően. Az emberi anyatej mintát Stahl és mtsai 1994-es eljárása szerint készítettem elő [155], majd APTS festékkel jelöltem a fentebb már említett módszerrel. Az összes törzsoldatot a jelölésig, illetve a jelölés után a mérésig -20°C-on tároltam. Az LOD és LOQ méréseket 3,2 mg/mL koncentrációjú pLNnH oldatból végeztem hét hígítási lépésben, lépésenként kétszeres hígítást végezve. A GOS minták esetében a jelölést a HMO standardokhoz hasonló közegben végeztem NaBH₃CN helyett 2-pikolinboránnal, valamint 60 °C-on 1,5 órán át nyitott kupakkal. A laktóz kalibrációhoz 12,5, 25, 50, 100 és 200 µg/mL koncentrációjú oldatokat hígítottam az 1 mg/mL-es törzsoldatból.

3.2.5. Alkalmazott elválasztó közegek (pufferek, gélek)

A fehérjék, peptidek és oligoszacharidok CE analízise során mindig az adott elválasztási célnak és detektálási módnak megfelelő elválasztó közeg alkalmazása volt szükséges. A standard mAb-ok karakterizálása azok redukált és nem redukált formáiban is a Beckman által forgalmazott, trisz-borát-dextrán alapú gyári SDS-MW géllal történtek. A kapilláris izoelektromos fókuszáláshoz szintén a Beckman gyári cIEF géljét alkalmaztam. Munkám gélfelkészítés részének alapját képező, agaróz alapú fehérje elválasztó gél eltérő koncentrációkban tartalmazott triszt, borátot vagy acetátot, illetve alacsony hőmérsékleten gélesedni képes agarózt, EDTA komplex képzőt, glicerint és SDS-t (agaróz-TBE és agaróz-TAE gélek). Az eredményeimben ezek ismertetésére részletesebben is kitérek. N-glikán analízisre a kutatócsoportunk által fejlesztett és Beckman cég által forgalmazott HR-NCHO gél, a szabad oligoszacharidok analíziséhez pedig ugyancsak a fehérje elválasztásnál említett gyári SDS-MW mátrixot, és a multikapilláris formátumhoz fejlesztett C100HT gél (Beckman) használtam.

A tömegspektrometriával kapcsolt CE módszerek során 4% hangyasav alapú puffert és géleket alkalmaztam az elválasztáshoz, köpenyfolyadék-ként pedig eltérő koncentrációban hangyasavat és metanolt tartalmazó oldattal töltöttem fel a konduktív ágat a megfelelő elektropray képződéshez. A natív CGE-MS és SDS-CGE-MS kísérletekhez rendszerint az injektálási oldalon 4% hangyasavat, 0,6% agarózt és 20% glicerint tartalmazó oldatot (natív CGE-MS), valamint 428 mM TAE-t, 0,6% agarózt 10% glicerolt és 0,1% SDS-t alkalmaztam (SDS-CGE-MS). Köpenyfolyadék-ként a CGE mérésekhez 4% hangyasavat és 20% metanolt tartalmazó oldatokat használtam azzal az eltéréssel, hogy az SDS eltávolításához az oldat 0.8% γ -ciklodextrint is tartalmazott.

3.2.6. Készülékek és mérési paraméterek

Az SDS-CGE méréseket minden esetben P/ACE MDQ, illetve Proteomelab PA 800 kapilláris elektroforézis készülékekkel végeztem, melyek UV detektorral voltak felszerelve és a fehérje analízis esetében 220 ± 10 nm hullámhossz tartományban szűrő UV filterrel voltak ellátva. A nem bevonatolt szilika (BFS) kapillárist minden elválasztás előtt a megfelelő elválasztó (dextrán vagy agaróz gélképző alapú) géllal töltöttem fel, és 15 kV feszültséget alkalmaztam fordított polaritással, 25°C-os kapilláris hőmérsékleten. A minta injektálása

elektrokinetikus, 5,0 kV feszültség mellett, 20 másodpercig tartott. A kapillárist a dextrans alapú gél alkalmazása esetén minden futtatás előtt 0,1 M nátrium-hidroxiddal, 0,1 M sósavval és HPLC tisztaságú vízzel mostam át minden esetben 80 psi nyomással 2 percig a szilanol csoportok regenerálásának céljából. Az eredményeket a 32Karat szoftverrel értékeltem ki (7.0 verzió, Beckman). Az agaróz mérések során a pontosabb kiértékeléshez a PeakFit 4.12 verziójú (www.sytat.com) programot használtam. Az elektroosmotikus áramlás (EOF) és viszkozitás mérés során az EOF markert (mezitil-oxid) 254 nm hullámhosszon detektáltam. Az elválasztó kapillárist ebben az esetben csak az első futtatás előtt kondicionáltam a fentebb leírtak szerint, majd a megfelelő agaróz koncentrációjú géllal töltöttem fel. A mezitil-oxidot 50 mM koncentrációjúra hígítottam HPLC tisztaságú vízben, majd 20 másodpercig +5 kV feszültség segítségével injektáltam a kapillárisba. Ezután 15 kV normál polaritású feszültséget alkalmaztam 25°C elválasztási hőmérsékleten. Ilyen paraméterek mellett a háttér elektrolit pH-ja az EOF katód (detektor) irányú áramlását biztosította. Az elektroosmotikus áramlás értékeit minden gérendszer esetén a marker detektálási ideje alapján számoltam ki. A viszkozitás mérésekor a markert nyomással injektáltam (5,0 psi/5,0 s), majd 20 psi inlet oldali nyomást alkalmaztam a minta detektorig történő eljuttatásához. A viszkozitási értékeket a Hagen–Poiseuille egyenlet alapján kalkuláltam (melyet részletesebben az "Eredmények" fejezetben fejtek ki).

A cIEF mérések során az izoelektromos pont meghatározást szintén Beckman típusú készülékekkel végeztem, 280 ± 10 nm hullámhosszon történő detektálással, az elválasztáshoz NCHO-bevonatolt kapillárist alkalmazva. A fehérje CGE-UV elválasztásokhoz minden esetben 30 cm teljes (20 cm effektív) hosszúságú, 50 μ m belső átmérőjű kapillárist használtam. Az elválasztó-, és mintatárolási hőmérsékleteket rendszerint 20°C-ra és 10°C-ra állítottam be, majd az analízist két lépésben hajtottam végre. 1) a minta fókuszálása normál polaritású módban 833 V/cm elektromos térerősség mellett 15 percig anolit (200 mM foszforsav) és katolit (300 mM nátrium-hidroxid) között, majd 2) a mobilizációt 1000 V/cm elektromos térerősséggel végeztem normál polaritású módban az anolit és a 350 mM ecetsav kémiai mobilizátor segítségével 45 percig. A kapillárist 2,0 μ L 10 mg/mL mAb oldattal és 240 μ L Master Mix-szel töltöttem fel. Az elválasztó kapillárist minden futtatás előtt 6 M ureával és HPLC minőségű vízzel mostam 2-2 percig, az elválasztás eredményeit pedig ebben az esetben is a 32Karat szoftverrel értékeltem ki (7.0 verzió, Beckman).

Az N-glikozilációs analízis esetén a P/ACE MDQ készüléket lézer indukált fluoreszcens (LIF) detektorral felszerelve használtam (lézer excitáció: 488 nm, emisszió: 520 nm), a

mérésekhez 50 cm teljes és 40 cm effektív hosszúságú, 50 µm belső átmérőjű BFS kapillárist alkalmazva. Az elválasztási feszültséget ebben az esetben fordított polaritású módban 30 kV-ra állítottam be, 25°C-os kapilláris hőmérséklet mellett. A kapillárist HR-NCHO elválasztó géllal töltöttem fel, a mintát pedig egy vízdugó injektálása (1,0 psi/5,0 s) után juttattam a kapillárisba elektrokinetikus injektálással (2,0 kV/2,0 s). A kiértékelés ebben az esetben is a készülék saját szoftverével történt (32Karat).

A szabad oligoszacharidok vizsgálata során a HMO mérésekhez az egykapillárisos Beckman készülékek mellett egy multikapilláris elektroforézis készüléket is alkalmaztam (C100HT Biologics Analyzer, Beckman), mely 12 kapillárisal felszerelve egyidejűleg 12 csatornán volt képes rögzíteni a led indukált fluoreszcens jelet ($\lambda_{ex}=450$ nm / $\lambda_{em}=540$ nm). A 12 kapillárist tartalmazó cartridge-ot vagy a gyári C100HT elválasztó gél rendszerrel (hagyományos szénhidrát elválasztó mátrix), vagy a cartridge kézzel történő kiürítése és tisztítása után az elsődlegesen fehérje elválasztáshoz használt SDS-MW (boráttal keresztkötött dextrán alapú) géllal töltöttem fel. A cartridge-ban elhelyezett 50 µm belső átmérőjű kvarc kapillárisok teljes hossza 17 cm volt (mely 13 cm effektív hossz a detektálási pontig). A mintákat elektrokinetikusan injektáltam 2,0 kV feszültséget alkalmazva 2,0 másodpercig, majd 6,0 kV feszültség mellett választottam el a C100HT gél esetében. Az SDS-MW gél esetén 6,0 kV/5,0 s injektálás után 9,0 kV feszültséget állítottam be az elektromigrációhoz. Mindkét esetben fordított polaritású módban végeztem a méréseket (katód az injektálási oldalon). Az adatgyűjtéshez és feldolgozáshoz a C100HT Biologics Analyzer (1.0.1.11. verziójú) szoftvercsomagot (Beckman) használtam.

Az egykapillárisos HMO és GOS mérésekhez szintén a P/ACE MDQ készüléket használtam LIF detektorral felszerelve (lézer excitáció: 488 nm, emisszió: 520 nm), a mérésekhez pedig 50 cm teljes és 40 cm effektív hosszúságú, 50 µm belső átmérőjű BFS kapillárist alkalmaztam. Az elválasztási feszültséget ebben az esetben is fordított polaritású módban 30 kV-ra állítottam be, 15°C-os minta tárolási és mérési hőmérséklet, valamint NCHO gél alkalmazása mellett. Az injektálás ezekben az esetekben 5 psi nyomással történt 5 másodpercig.

A tömegspektrometriás peptid és fehérje detektáláshoz Waters gyártmányú, Xevo TQ-S típusú hármas kvadрупól készüléket használtam (Milford, MA). A peptidek és alacsony molekulatömegű fehérje minták kapcsolt analíziséhez a CE rendszert egy saját készítésű koaxiális folyadékáramlásos interfészen (CSFRI) keresztül kötöttem össze a tömegspektrométerrel (lásd, eredmények fejezet). A 70 cm hosszú, 50 µm belső és 360 µm

külső átmérőjű BFS elválasztó kapillárist egy módosított OptiMS Cartridge-ba helyeztem (Beckman Coulter), melyet egy zárt reakciótérrel (csőreaktor) hosszabbítottam meg, amit az MS gyári ESI sprayer-ével kapcsoltam (Waters Z-spray duális ortogonális API ionforrás). Az MS analíziskor az adatgyűjtéshez a MassLynx 4.1 szoftvercsomagot használtam, mely a Waters cég saját fejlesztése. A peptid és fehérje mérésekor egyaránt elsődlegesen MS2 full scan módot alkalmaztam rendszerint 400-1000 m/z , illetve 700-2000 m/z tartományokat beállítva, valamint a kapott TIE-k (Total Ion Electropherogram-ok) mellett bizonyos ionokat extrahálnom kellett az ún. EIE (Extacted Ion Electropherogram) mód segítségével. A mintákat nyomással (5.0 psi/20.0 s) injektáltam, majd a peptid és natív fehérje vizsgálatoknál normál, az SDS-fehérje mérések során pedig fordított polaritással analizáltam rendszerint 215 és 285 V/cm térerősségeket alkalmazva. A mérések során a spray feszültség +2300 V-ra, a cone feszültség +30 V-ra, a szárító gáz áramlási sebessége 600 L/h értékre, a deszolvációs hőmérséklet pedig 250 °C-ra volt beállítva.

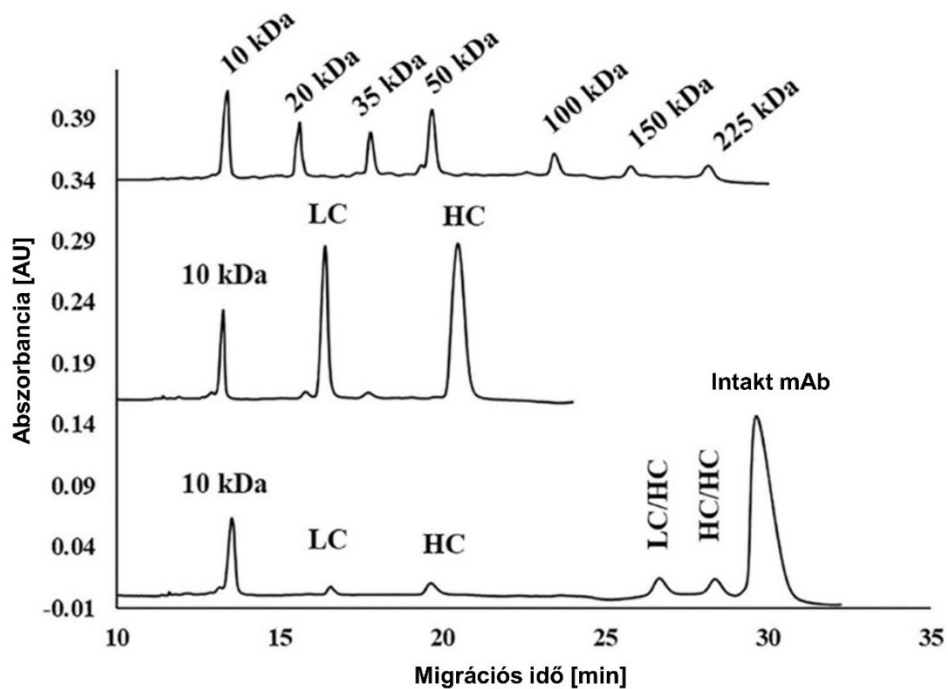
4. Eredmények

4.1. Az omalizumab és bamlanivimab bioterapeutikumok fehérje alegység-, és N-glikán szintű karakterizálása CGE-UV, cIEF és CGE-LIF módszerekkel

4.1.1. Intakt fehérje és alegység integritás analízis (SDS-CGE) - omalizumab

A nátrium-dodecilszulfát kapilláris gél elektroforézis (SDS-CGE) módszer általi omalizumab terápiás fehérje tisztaság vizsgálatát intakt, valamint redukált állapotban is elvégeztem, hogy ellenőrizsem a molekula nehézlánc nem glikozilált formájának (ngHC) jelenlétét és szintjét. A fehérje vizsgálatok során Filep Csenge doktorandusz hallgatótársam és Nagy Máté szakdolgozó segítettek a mérési paraméterek és CE módszer beállításában, valamint az intakt és redukált minták előkészítésében.

A 22. ábra jól szemlélteti a fehérje molekulatömeg standardok elektroferogramjaival összehasonlított omalizumab minta redukált formájának profilját, annak könnyű és a nehéz láncainak méret szerinti elválasztása által, valamint a molekula intakt formáját, mely a teljes fehérje tisztaságáról szolgáltatott információt. Mindkét módszer esetén 10 kDa méretű belső standard fehérjét alkalmaztam a migrációs tulajdonságok összehasonlításának és a relatív mennyiségek esetleges változásának detektálása céljából.



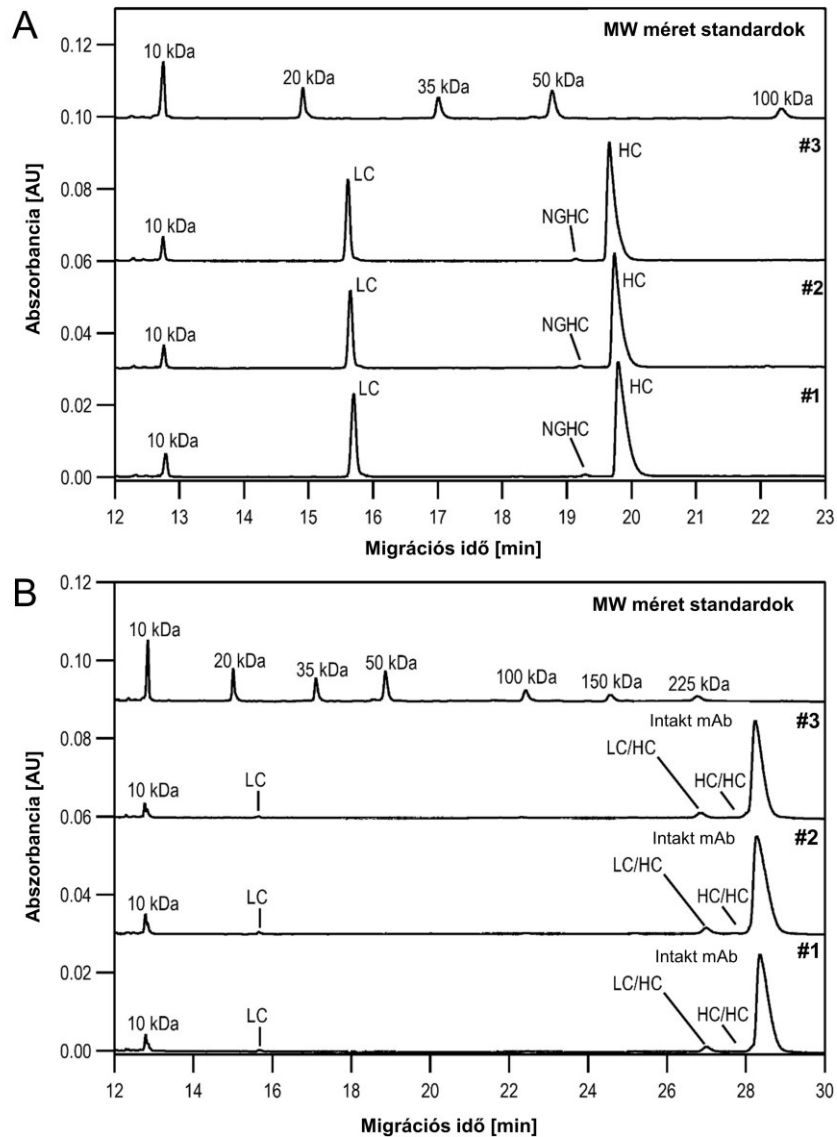
22. ábra: Az omalizumab terápiás fehérje SDS kapilláris gélelektroforézis analízise intakt (alsó futtatás) és redukált (középső futtatás) formáinak molekulatömeg standardokkal (felső futtatás) való összehasonlításával. Csúcsok: 10–225 kDa MW standardok, LC: könnyű lánc, HC: nehéz lánc, LC/HC: könnyű/nehez láncok aggregációja, HC/HC: nehéz/nehez láncok aggregációja. Elválasztási körülmények: SDS-MW elválasztó gél, 50 μm kapilláris belső átmérő és 20 cm effektív hossz (teljes hossz: 30 cm), alkalmazott feszültség: 15 kV (fordított polaritás), elválasztási hőmérséklet: 25 $^{\circ}\text{C}$, elektrokinetikus injektálás: 5 kV/10 s. Szerkesztve, [153] alapján.

Az ábrán jól látható, hogy nem glikozilált nehéz lánc nem volt jelen a mintában, magyarán a fehérje teljes mértékben glikoziláltnak tekinthető. A monoklonális antitest könnyű láncának (LC) migrációja közel az irodalmi 24 kDa-os molekulatömeggel egyezett meg, míg a nehézlánc tényleges molekulatömege 49,5 kDa volt, az 50 kDa molekulatömeg standardnál azonban lassabb migrációt, ezáltal nagyobb látszólagos molekulatömeget mutatott. Eredményeim kritikai elemzését dolgozatom 5.1 alfejezetében fejtem ki részletesebben.

4.1.2. Intakt fehérje, alegység integritás és töltés variáns analízise (SDS-CGE, cIEF) - bamlanivimab

A bamlanivimab fehérje esetén méréseimet töltés variáns analízissel is kiegészítettem kapilláris izoelektromos fókuszálás (cIEF) módszert alkalmazva, továbbá eredményeimet reprodukálhatósági szempontból is részletesebb vizsgálatnak vettem alá [156]. A cIEF analízist Farsang Róbert, valamint Szigeti Márton tanszéki mérnökök segítségével végeztem, a mérések szakmai értelmezésében pedig Dr. Guttman András és Dr. Doo Soo Chung professzor urak nyújtottak segítséget.

Első lépésként ugyancsak az antitest alegységeinek méretbeli heterogenitását tanulmányoztam a fehérje redukált formájában. A gyógyszerkészítmény tisztaságának vizsgálata ebben az esetben is az intakt fehérje SDS-CGE analízise által történt. A bamlanivimab esetében egy helyett már három minta párhuzamos előkészítését végeztem el, hogy a módszer reprodukálhatóságáról is tanúbizonyságot tehessek. Az 23/A ábra összehasonlítja a redukált minták injektálásait a méretstandardok elektroferogramjával, a B panel pedig ugyanezen standardokat a nem redukált forma ismételt mérésével veti össze.



23. ábra: A bamlanivimab bioterapeutikum redukált (panel A) és intakt (panel B) formáinak fehérje méret standardokkal történő összehasonlítása tisztaság és alegység integritás vizsgálat céljából. Csúcsok (panel A): 10–225 kDa MW standardok, LC: könnyű lánc, HC: nehéz lánc, LC/HC: könnyű/nehez láncok aggregációja, HC/HC: nehéz/nehez láncok aggregációja, valamint az intakt fehérje. Elválasztási körülmények: SDS-MW elválasztó gél, 50 μ m kapilláris belső átmérő és 20 cm effektív hossz (teljes hossz: 30 cm), alkalmazott feszültség: 15 kV (fordított polaritás), elválasztási hőmérséklet: 25 °C, elektrokinetikus injektálás: 5 kV/20 s. Szerkesztve, [156] alapján.

1. Táblázat: A bamlanivimab terápiás fehérje redukált SDS-CGE analízise során kapott csúcsprofilok statisztikai kiértékelése. Szerkesztve, [156] alapján.

Redukált mintaelőkészítés												
Csúcs	Migrációs idő [min]						Korrigált terület %					
	Aliquot #1	Aliquot #2	Aliquot #3	Medián	Szórás	%RSD	Aliquot #1	Aliquot #2	Aliquot #3	Medián	Szórás	%RSD
LC	15.72	15.65	15.67	15.68	0.04	0.24	31.55	31.37	30.97	31.30	0.30	0.95
NGHC	19.29	19.21	19.22	19.24	0.04	0.23	0.62	0.66	0.64	0.64	0.02	3.13
HC	19.80	19.74	19.75	19.76	0.03	0.15	67.83	67.97	68.39	68.06	0.29	0.43

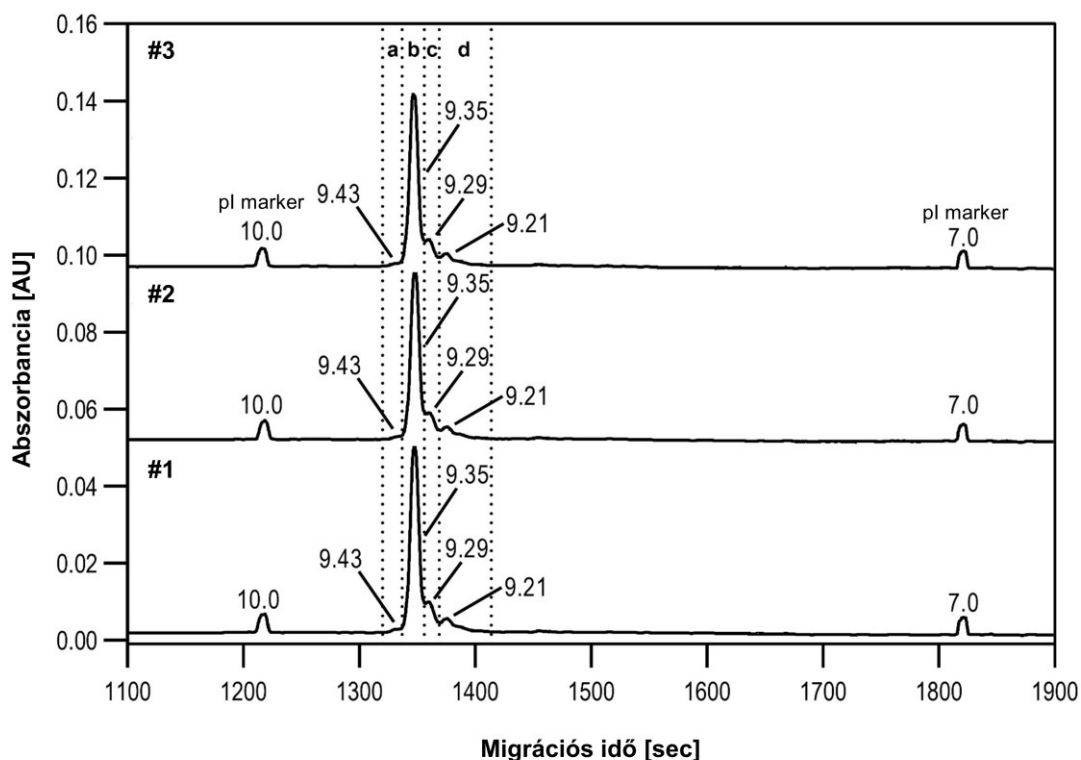
A redukált minta mérési eredményeinek statisztikai kiértékelése látható az 1. táblázatban, amely a következő csúcsarányeloszlást mutatja: 31,3% LC, mindössze 0,64% NGHC és 68,06% HC alegység.

2. Táblázat: A bamlanivimab terápiás fehérje nem redukált SDS-CGE analízise során kapott csúcsprofilok statisztikai értékelése. Szerkesztve, [156] alapján.

Nem redukált mintaelőkészítés												
Csúcs	Migrációs idő [min]						Korrigált terület %					
	Aliquot #1	Aliquot #2	Aliquot #3	Medián	Szórás	%RSD	Aliquot #1	Aliquot #2	Aliquot #3	Medián	Szórás	%RSD
LC	15.68	15.71	15.69	15.69	0.02	0.12	0.76	0.82	0.81	0.80	0.03	4.04
LC/HC	27.01	27.05	27.02	27.03	0.02	0.08	3.43	3.71	3.68	3.61	0.15	4.26
HC/HC	27.79	27.79	27.82	27.80	0.01	0.05	0.12	0.11	0.12	0.12	0.01	4.95
Intakt mAb	28.36	28.32	28.42	28.37	0.05	0.18	95.69	95.36	95.39	95.48	0.18	0.19

A nem redukált minta analízise (23. ábra, panel B) során kapott adatok statisztikai értékelését a 2. táblázat mutatja be. A csúcsarány eloszlás ebben az esetben: 95,48% az intakt mAb-ra vonatkoztatva, a többi csúcs pedig a minta mellett található alegységek és azok összetapadásával létrejött reakció termékeket mutatja. A kapott eredményeket az 5.2 alfejezetben értelmezem.

Töltés variáns analízist az omalizumab fehérje vizsgálatokor még nem végeztem, azonban ahogy fentebb már említésre került, a bamlanivimab minta beszerzésekor már módunkban állt e vizsgálati módszer cIEF technika általi kivitelezése. A fehérje töltésvariánsainak meghatározása a glikán szerkezetek azonosítása előtt releváns információt nyújtott számunkra a fehérje savas vagy bázikus formáinak felderítésével, feltételezve a lehetséges szialosav N-glikánok jelenlétét.



24. ábra: A bamlanivimab fehérje cIEF analízise. Szegmens 'a': bázikus csúcsok; szegmens 'b': fő csúcs; szegmens 'c' és 'd': savas csúcsok. Elválasztási paraméterek: 30 cm-es teljes kapilláris hossz, (20 cm effektív hossz), 50 μm belső átmérőjű, NCHO bevonatolt szilika kapilláris; alkalmazott fókuszáló térerősség: 833 V/cm; mobilizációs térerősség: 1,000 V/cm; 20°C-os elválasztási hőmérséklet; Injektálási mód: 2,0 μL minta keverése a Master Mix oldatba, majd 25 psi nyomással történő 100 s időtartamú injektálás (teljes kapilláris feltöltése). Szerkesztve, [156] alapján.

A 24. ábra a kapott cIEF elektroferogramokat mutatja, kiemelve a bázikus (a), fő csúcs (b) és két savas régiót (c és d). A módszer elválasztóképességét bizonyítja, hogy a fő csúcs és a bázikus régió közötti pI-különbség kevesebb, mint 0,08 pH egység volt. A két savas variáns régió csúcsai 13,6% és 10,8%-ot tettek ki, (összesen ~25%-ot). A cIEF mérések reprodukálhatóságát és a kapott eredmények statisztikai kiértékelését a 3. táblázat foglalja össze.

3. Táblázat: A bamlanivimab terápiás fehérje cIEF analízise során kapott csúcsprofilok statisztikai kiértékelése. Szerkesztve, [156] alapján.

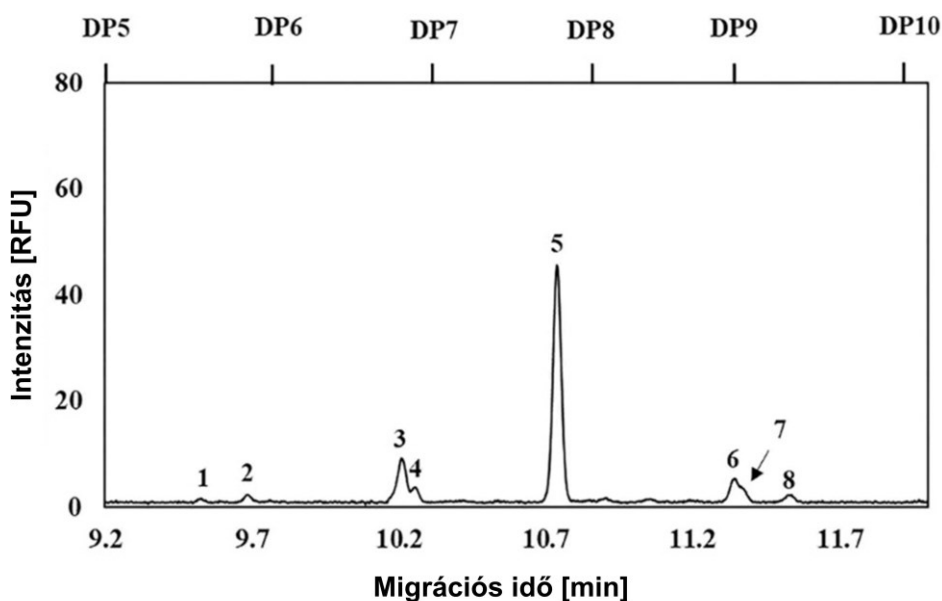
Csoport	Terület %						pI érték						
	Aliquot #1	Aliquot #2	Aliquot #3	Meadián	Szórás	%RSD	Csúcs	Aliquot #1	Aliquot #2	Aliquot #3	Meadián	Szórás	%RSD
Bázikus csúcsok	1.447	1.463	1.418	1.443	0.023	1.577	1	9.428	9.433	9.433	9.431	0.003	0.030
Fő csúcs	74.379	74.373	73.688	74.146	0.397	0.536	2	9.351	9.353	9.354	9.353	0.002	0.019
Savas csúcsok -1	13.481	13.274	13.954	13.569	0.348	2.568	3	9.291	9.291	9.288	9.290	0.002	0.021
Savas csúcsok -2	10.694	10.889	10.940	10.841	0.130	1.200	4	9.213	9.216	9.213	9.214	0.001	0.016

A 3. táblázat statisztikai eredményei bizonyították a szialsavas glikán struktúrák jelenlétét (részletesebben lásd, 5.2 alfejezet), mely alapján szükséges volt egy átfogó, N-glikozilációs analízis elvégzése.

4.1.3. Omalizumab és bamlanivimab bioterapeutikumok N-glikán analízise

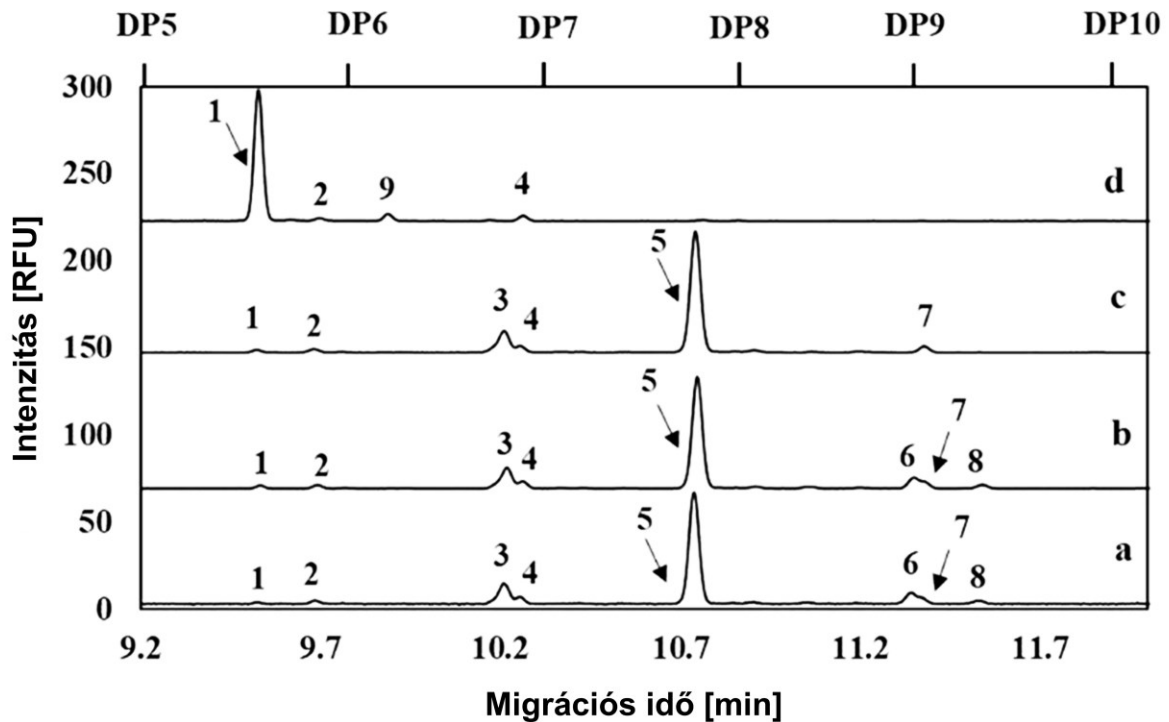
Az omalizumab alegységeinek SDS-CGE analízise a molekula nehéz láncának (HC) teljes mértékű N-glikozilációjára utalt. Ezen N-kötött oligoszacharidok analízise azok fehérjéről történő endoglikozidáz (PNGáz F) általi emésztéssel és APTS fluorofórral való jelöléssel valósult meg, melyet CGE-LIF analízis követett. A glikánanalitikai minták előkészítését, valamint a SDS-CGE mérések kiértékelését Filep Csenge és Szigeti Márton kollégáim végezték. A levont szakmai következtetéseket témavezetőmmel, Dr. Guttman Andrással, valamint Dr. Csányk Eszter és Dr. Szabó Miklós orvosok segítségével elemeztük.

A 25. ábra az omalizumabról lehasított, teljes N-glikán profil elektroferogramját mutatja, melyen 8 csúcs látható.



25. ábra: Az ovalbumin fehérje CGE-LIF analízis által kapott N-glikán profilja. Jelölések: 1-8: az elválasztott N-glikán csúcsok (az egyes csúcsokhoz tartozó szénhidrátstruktúrák a 4. táblázatban vannak feltüntetve), DP5-DP10: az APTS-jelölt maltooligoszacharid létracsúcsok polimerizációs fokai. Körülmények: HR-NCHO elválasztó gél, kapilláris: 50 cm effektív hossz (60 cm teljes hossz, belső átmérő: 50 μm), alkalmazott elválasztási feszültség: -30 kV, hőmérséklet: 25 °C. Injektálás: 2 kV/2 s. Szerkesztve, [153] alapján.

Azon csúcsokat, melyek területhányada magasabb volt, mint 1%, belevettem a kvantitatív csúcseloszlás profilozási folyamatába, és részletes N-glikán szekvenálással történő szerkezetmeghatározásnak vettem alá. Mivel az egyszerűbb, migrációs idő alapú, kalibráló standardok szerinti normalizálás után az összes elválasztott csúcs interpretálható glükózegység (GU) értékkel rendelkezett, az enzimes szekvenálás előtt a fentebb már említett GUcal szoftvert és az ehhez tartozó adatbázisok segítségével generált struktúrákat is rögzítettem a csúcsok előzetes szerkezetvizsgálatakor. A szoftver által sugallt szénhidrát szerkezetek validálásához azonban a PNGáz emésztett, (majd jelölt és tisztított) teljes N-glikán tartalmán exoglikozidázos szekvenálására volt szükség neuraminidáz, galaktozidáz és hexózaminidáz enzimek felhasználásával (26. ábra).












26. ábra: Az omalizumab fehérje exoglikozidáz enzimekkel történő N-glikán szekvenálása során kapott cukor struktúrái. Elektroferogramok: (a): emésztetlen kezeletlen minta, (b): neuraminidázos emésztés utáni futtatás, (c): neuraminidáz + galaktozidáz emésztés utáni futtatás, (d): neuraminidáz + galaktozidáz + hexózaminidáz emésztés utáni futtatás. DP5-DP10: az APTS-jelölt maltooligoszacharid létracsúcsok polimerizációs fokai. A mérési körülmények megegyeztek a 25. ábra alatt leírtakkal. Szerkesztve, [153] alapján.

Az alsó elektroferogram (a) az APTS-jelölt, emésztetlen, teljes N-glikán szerkezet elválasztását mutatja az omalizumab fehérje esetében. Az ábrán jól látható, hogy a neuraminidáz (szialidáz) enzimes kezelés nem okozott csúcseltolódást, ami azt sugallta, hogy sziálsavas struktúrák nem voltak jelen a mintában (b futtatás), ami fontos információ a glikán szerkezet – biológiai funkció kapcsolat feltárásában. A galaktozidázos emésztés 6. és 8. csúcsok eltolódását eredményezte (c futtatás), melynek következtében ezek eltérő, galaktozilált szerkezeteknek bizonyultak. Végül, a hexózaminidázos kezelés eltávolította az összes N-acetil-glükózamin maradékot, ami eltolódást okozott a 3., 5. és 7-es csúcsoknál az 1-es és 9-es csúcsokba történő vándorlással (d futtatás). A 1-es csúcsot a fukozilált "core" struktúráként azonosítottuk. Mivel a 7-es csúcs nem volt érintett a neuraminidáz /galaktóidáz/hexózaminidáz kezelések során, de az utolsó kezeléskor 9-es csúcsként megjelent az elektroferogramon, egy nagyobb szerkezetnek bizonyult, ami egy fukozilált

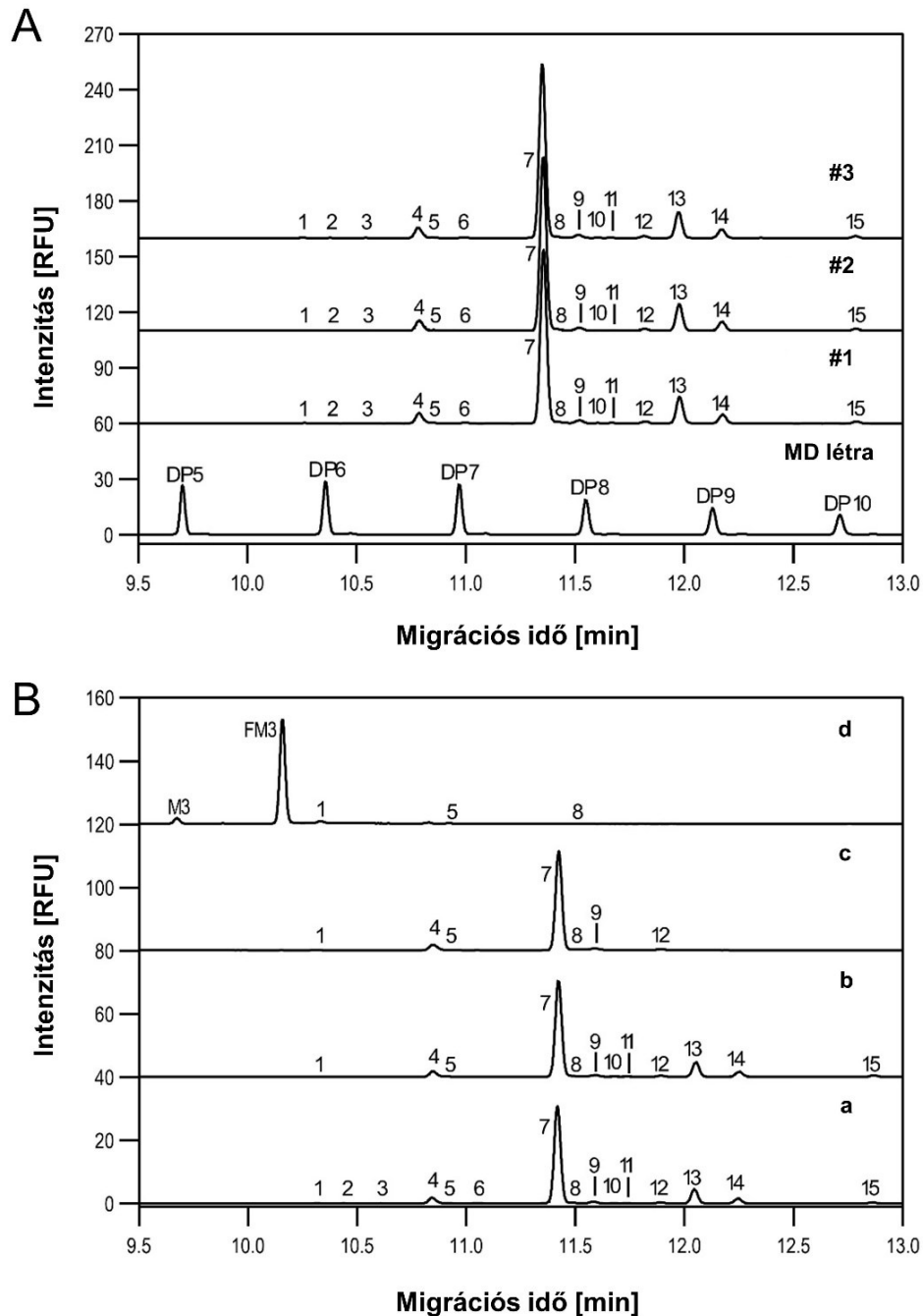
”core” struktúrát tartalmaz. Első megközelítésből, valamint korábbi analitikai vizsgálatok alapján ez egyfajta hibrid szerkezetnek tekinthető, amely tartalmaz egy GlcNAc-Gal-GlcNAc motívumot a szerkezet 3-as karján és egy mannóz maradékot annak 6-os karján (FA1GN(3)Man(6)) [157]. A 2. és 4. csúcsot nem érintette egyik exoglikozidázos emésztés sem. Ezeket GU értékeik alapján azonosítottunk magas mannóztartalmú (ún. high-mannóz) szerkezetekként, melyekről ismeretes, hogy befolyásolhatják a terápiás fehérje szérumban felezési idejét. A szekvenálás eredményét és az azonosított szerkezeteket a dolgozatomban 4. táblázata ismerteti, a levont következtetéseket pedig az 5.1 alfejezetben fejtem ki.

4. Táblázat: Az omalizumab terápiás fehérje N-glikán szekvencia analízisének statisztikai értékelése az azonosított struktúrák feltüntetésével. Rövidítések: GU – glükóz egység, NEU – neuraminidáz, GAL – galaktozidáz, HEX – hexózaminidáz. Szerkesztve, [153] alapján.

Csúcs azonosító	Migrációs idő [min]	GU érték	Terület %	Exoglikozidáz enzimekre adott válasz				Glikán struktúrák
				NEU	GAL	HEX	Nincs változás	
1	9.533	5.654 ± 0.001	0.955 ± 0.090				x	FM3 
2	9.693	5.907 ± 0.001	1.671 ± 0.089				x	M4 
3	10.219	6.793 ± 0.001	13.146 ± 1.132			x		FA1(3) 
4	10.261	6.865 ± 0.001	3.335 ± 0.249				x	M5 
5	10.757	7.741 ± 0.001	68.124 ± 0.067			x		FA2 
6	11.347	8.795 ± 0.001	5.589 ± 0.211		x			FA2G(6)1 
7	11.373	8.842 ± 0.002	2.642 ± 0.096			x		FA1GN(3)Man(6) 
8	11.538	9.136 ± 0.002	1.554 ± 0.146		x			FA2G(3)1 
9	9.951	6.236 ± 0.002	4.088 ± 0.206					FM4 

A mérési eredmények alapján a monogalaktozilált glikánok mennyisége 7%-nak bizonyult, valamint körülbelül 5% high-mannóz (Man4 és Man5), 13% FA1 és 68% FA2 glikán mennyiséget határoztunk meg a mintában.

A bamlanivimab esetében az N-glikán analízis eredményeként 15 struktúra azonosítása történt meg, melyek a 27. ábra A paneljének elektroferogramjain (1-3 párhuzamos futtatás) vannak jelölve. A glükóz egység (GU) értékeket ebben az esetben is a kutatócsoportunk által bevezetett módszer alapján szoftveresen kalkuláltattam, valamint a megfelelő struktúrákat egy nyilvánosan is elérhető adatbázisban (glycostore.org) elérhető adatok alapján ellenőriztem.



27. ábra: A bamlanivimabmab fehérje 3 párhuzamos mintaelőkészítésből származó teljes N-glikán profilja (panel A), valamint exoglikozidáz enzimekkel történő N-glikán szekvencia analízise során kapott szénhidrát struktúrái (panel B). Elektroferogramok: (a): emésztetlen (kezeletlen) minta, (b): neuraminidázos emésztés utáni futtatás, (c): neuraminidáz + galaktozidáz emésztés utáni futtatás, (d): neuraminidáz + galaktozidáz + hexóزامинидáz emésztés utáni futtatás. DP5-DP10: az APTS-jelölt maltooligoszacharid létracsúcsok polimerizációs fokai. A mérési körülmények megegyeztek a 25. ábra alatt leírtakkal. Szerkesztve, [156] alapján. Rövidítések: MD – maltodextrin.

A 27. ábra A paneljén jól látható, hogy a háromszori mintaelőkészítésből származó minták analízise rendkívül jó reprodukálhatóságot mutatott. A B panel pedig a szekvenálás során kapott csúcsokat hasonlítja össze az emésztetlen, referencia mérés elektroferogramjának csúcsaival (alsó futtatás). Megfigyelhető, hogy a szialidázos emésztés eltávolította az összes szialsavas struktúrát, míg a galaktozidáz és hexózaminidáz enzimes kezelés hatására eltűnt az összes galaktóz és a fennmaradó N-acetil-glükózamin tartalom. A hexózaminidázos futtatáskor megjelenő nagy csúcs a core struktúra alapú trimannozil kitobióz szerkezetet jelöli. A core fukóz nélküli glikánok mennyisége (az ún. high-mannóz típusú struktúrákat kivéve) körülbelül 8,2%-nak bizonyult, míg a galaktozilált és szialilált oligoszacharidok ~17,3 és 0,6%-ot, a high-mannóz szerkezetek pedig ~1,3%-ot tettek ki.

Az 5. táblázat a minőségi és (relatív) mennyiségi meghatározás eredményeit listázza az exoglikozidázos emésztések során történő szekvenancia vizsgálat után.

5. Táblázat: A bamlanivimab terápiás fehérje N-glikán szekvencia analízisének statisztikai értékelése az azonosított struktúrák és reprodukálhatósági adatok feltüntetésével. Szerkesztve, [156] alapján. Rövidítések: Rövidítések: GU – glükóz egység, NANáz – N-acetil-neuraminidáz, GALáz – galaktozidáz, HEXáz – hexózaminidáz, RSD – relatív szórás.

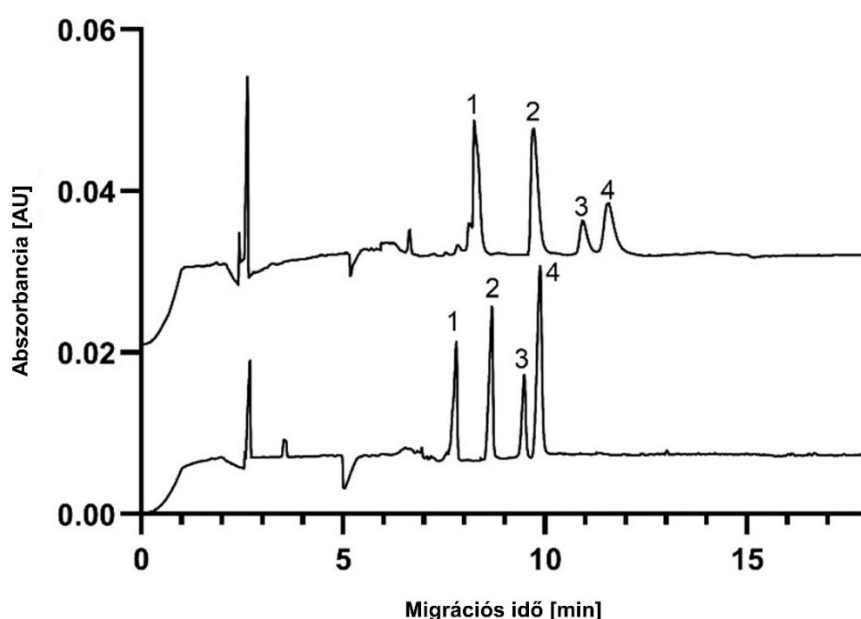
Csúcs	Azonosító	GU	Exoglikozidázos emésztésre adott válasz				Migrációs idő [min]							Terület %								
			NANáz	GALáz	HEXáz		Aliquot #1	Aliquot #2	Aliquot #3	Medián	Std.Dev.	%RSD	Aliquot #1	Aliquot #2	Aliquot #3	Medián	Std.Dev.	%RSD				
1	M4	5,74				10,28	10,26	10,25	10,26	0,01	0,13	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,00	2,17			
2	FA2[G1S1	5,92	x			10,40	10,38	10,38	10,39	0,01	0,12	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,00	1,26			
3	A2G2S1	6,18	x			10,57	10,55	10,55	10,56	0,01	0,12	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,00	4,37			
4	A2	6,56			x	10,81	10,79	10,78	10,79	0,01	0,12	4,71	4,81	4,86	4,79	4,79	4,79	0,08	1,64			
5	M5	6,67				10,87	10,85	10,85	10,85	0,01	0,12	0,41	0,42	0,43	0,42	0,42	0,42	0,01	2,81			
6	A2B	6,89	x			11,02	11,00	10,99	11,00	0,01	0,13	0,32	0,32	0,29	0,31	0,31	0,31	0,02	5,52			
7	FA2	7,49			x	11,38	11,35	11,35	11,36	0,01	0,12	73,51	73,32	73,74	73,52	73,52	73,52	0,21	0,28			
8	M6	7,59				11,44	11,42	11,42	11,42	0,01	0,09	0,70	0,66	0,67	0,68	0,68	0,68	0,02	2,63			
9	N/A	7,76			x	11,54	11,52	11,51	11,52	0,01	0,12	1,65	1,71	1,64	1,66	1,66	1,66	0,04	2,26			
10	A2G1	7,90		x		11,63	11,61	11,61	11,61	0,01	0,11	0,23	0,23	0,21	0,23	0,23	0,23	0,01	5,19			
11	A2B[G1	8,01		x		11,69	11,67	11,67	11,68	0,01	0,12	0,23	0,24	0,23	0,23	0,23	0,23	0,00	1,45			
12	N/A	8,26			x	11,84	11,82	11,82	11,83	0,01	0,12	0,94	0,95	0,92	0,93	0,93	0,93	0,02	1,84			
13	FA2[G1	8,53		x		12,00	11,98	11,97	11,98	0,01	0,11	11,67	11,73	11,55	11,65	11,65	11,65	0,10	0,82			
14	FA2[G1	8,85		x		12,20	12,17	12,17	12,18	0,01	0,12	4,22	4,21	4,12	4,18	4,18	4,18	0,05	1,24			
15	FA2G2	9,87		x		12,81	12,78	12,78	12,79	0,01	0,11	0,99	0,98	0,93	0,96	0,96	0,96	0,03	3,40			
Összes afukozilát (beleértve a high mannóz str.) csúcs (%)						9,56	%RSD medián - minden csúcs (< 0,01%)							0,12	%RSD medián - minden csúcs (< 0,01%)							2,46
Összes terminálisan galaktozilát csúcs (%)						17,25	%RSD medián - terület % - 1% alatti							0,12	%RSD medián - terület % - 1% alatti							3,06
Összes high mannóz csúcs (%)						1,29	%RSD medián - terület % - 1 és 5% közötti							0,12	%RSD medián - terület % - 1 és 5% közötti							1,71
Összes szialilát csúcs (%)						0,55	%RSD medián - terület % - 5% feletti							0,12	%RSD medián - terület % - 5% feletti							0,55

A bioterapeutikum N-glikán eloszlása a következőképp alakult: sziálsavas struktúrák: 0,55%, összes afukozilált struktúra: 9,56%, összes high-mannóz szerkezet: 1,29%, terminálisan galaktózilált struktúrák: 17,25%. Ezen eredményekből levont következtetéseket az 5.2 alfejezetben ismertetem.

4.2. Agaróz alapú SDS-CGE-UV módszer fejlesztése az elválasztó gél-, és migrációs tulajdonságok jellemzésének, valamint terápiás fehérjék méretének Ferguson-elv szerinti meghatározásának céljából

Agarózos kísérleteim során két alapvető géلكomponens, az agaróz és borát koncentráció arányok hatását mutattam be az SDS–fehérje komplexek elektromigrációs tulajdonságaira nézve, ahol a már korábban analízisnek alávetett omalizumab terápiás fehérje könnyű és nehéz lánc alegységeit használtam modellként. A vizsgált fragmentumok migrációs viselkedésének megértése érdekében 15-féle saját készítésű agaróz alapú gél formulára viszonyítva hasonlítottam össze a fehérje könnyű láncának (LC), nem glikozilált nehéz láncának (ngHC) és nehéz láncának (HC) viselkedését trisz-acetát-EDTA (TAE) és trisz-borát-EDTA (TBE) alapú pufferrendszerek alkalmazásával, 0.2-1.0% agaróz tartalom mellett. Az optimalizálási folyamat során ezzel egyidejűleg 3 dimenziós Ferguson-diagramokat készítettem a migrációs tulajdonságok könnyebb megértése és analitikai összefüggések (mint az elméleti tényérszám vagy hatékonyság (N), felbontás (Rs) és szelektivitás (α)) változásának feltárása érdekében.

Méréseim során a háttér elektrolit trisz koncentrációja minden esetben azonos volt (428 mM), a pH-t pedig ecetsavval vagy bórsavval állítottam be a kívánt értékekre. Ahogy a 28. ábra felső elektroferogramja mutatja, a TAE puffer alapú elválasztó közeg kissé hosszabb elválasztást eredményezett jelentősen alacsonyabb hatékonysággal (N) és gyengébb felbontással (Rs), mint a TBE alapú gél-puffer rendszer, annak ellenére, hogy magasabb látszólagos szelektivitás (α) értékeket kaptam az acetátos közegben (lásd, 6. táblázat).



28. ábra: Az omalizumab fehérje alegységeinek kapilláris SDS-agaróz gélelektroforézis analízise trisz-acetát-EDTA (TAE, felső futtatás) és trisz-borát-EDTA (TBE, alsó futtatás) alapú gél puffer rendszerekben. Csúcsok: 1 – 10 kDa belső standard, 2 – LC, 3 – ngHC, 4 – HC. Elválasztási körülmények: nem bevont falú (BFS) kapilláris, 50 μm kapilláris belső átmérő, 20 cm effektív hossz (teljes hossz: 30 cm), alkalmazott térerősség: 500 V/cm (fordított polaritás), elválasztási hőmérséklet: 25 $^{\circ}\text{C}$, elektrokinetikus injektálás: 5 kV/10 s. Detektálás: UV, 214 nm. Szerkesztve, [40] alapján.

6. Táblázat: Az agaróz-TAE és agaróz-TBE gél-puffer rendszerek elválasztási jellemzőinek összehasonlítása (α – szelektivitás, N – hatékonyság, R_s – felbontás). Szerkesztve, [40] alapján.

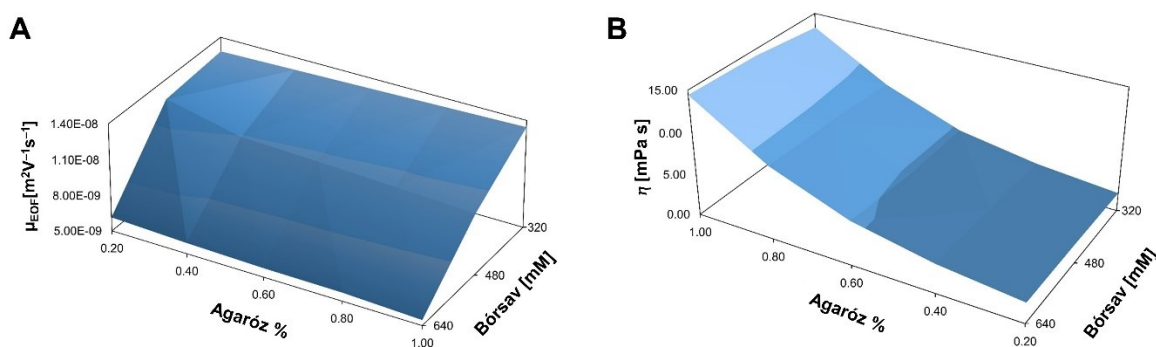
Csúcs	alfa		N			Rs	
	ngHC/LC	HC/ngHC	LC	ngHC	HC	ngHC/LC	HC/ngHC
Agaróz-TAE	1.140	1.055	15967	10579	6455	3.000	0.962
Agaróz-TBE	1.092	1.039	39316	45012	32201	3.435	1.505

A 28. ábrán és a 6. táblázatban megfigyelhető ellentmondást a (4)-es számú egyenlettel magyarázhatjuk, amit korábban Karger és munkatársai definiáltak enantiomerek kapilláris gél elektroforézissel történő vizsgálata során [158], és melyet kutatócsoportunk korábban már dextransz alapú elválasztó gélek optimalizálása során is megfogalmazott [159]:

$$(4) \quad R_S = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \sqrt{N} K \quad ,$$

ahol K az elektroforetikus mobilitás (μ), az alkalmazott elektromos térerősség (E) és az effektív kapilláris hossz (ℓ) függvénye.

A fentebb vizsgált három paraméter mellett a gélekben mérhető elektroosmotikus áramlás (EOF) mértékét és viszkozitás (η) értékeit is meghatároztam egy töltéssel nem rendelkező komponens (mezitil-oxid) segítségével a különböző géلكompozíciókra nézve, hogy jobban megértsem a mintára vonatkozatható migrációs idő és csúcsarány különbségek közötti összefüggést. A jelenségek könnyebb interpretálása érdekében a 29. ábra szemlélteti a különböző agaróz-TBE géلكompozíciók 3D elektroosmotikus áramlási (panel A) és viszkozitási (panel B) görbéit.

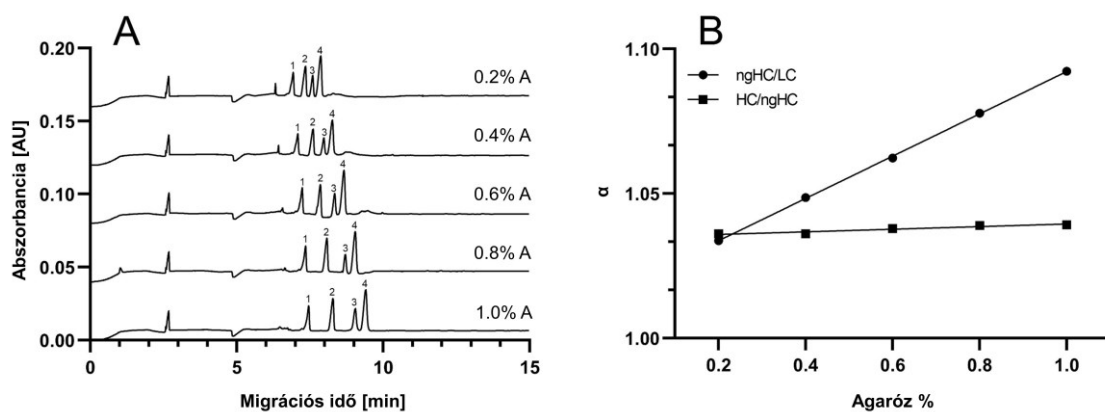


29. ábra: Háromdimenziós elektroosmotikus áramlás (μ_{EOF} , panel A) és viszkozitás (η , panel B) diagramok a különböző agaróz-TBE géلكompozíciók esetében. Szerkesztve, [40] alapján.

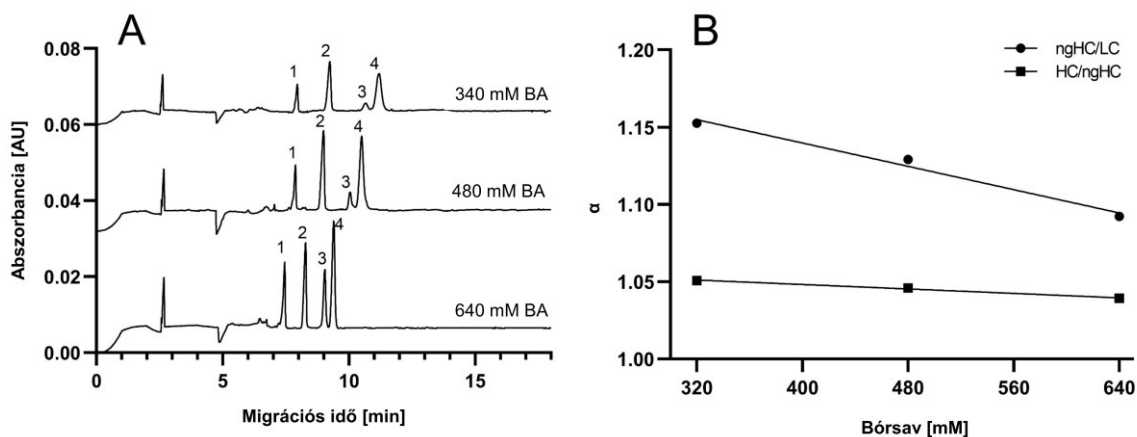
A kapott eredmények és a 3D ábrázolás alapján egyértelmű összefüggést tudtam definiálni az EOF és viszkozitás értékek változásai kapcsán (lásd, 5.3 fejezet).

Mivel az agaróz és borát koncentráció változtatása (a TAE alapú rendszer agaróz-acetát kombinációjával ellentétben) jól szemléltette a vizsgált analitikai jellemzők eme két komponensből való függését, ezért minden további kísérletemhez a TBE alapú háttélektrolitot választottam. A redukált omalizumab fehérje alegységek migrációs viselkedésének részletesebb megértése érdekében az agaróz-TBE alapú gélekben az agaróz koncentrációját 0,2% és 1,0% között 0,2%-os léptékben növelve változtattam, valamint 320, 480 és 640 mM bórsavat tartalmazó háttélektrolitokat alkalmaztam, melyek pH értékét 8,0-ra állítottam trisz bázissal. A különböző agaróz-TBE koncentrációk kombinációinak eredményeinek elválasztási szempontból relevánsabb részleteit a 30. és 31. ábrák mutatják be, melyeknél a legoptimálisabb

bórsav koncentráció (640 mM) melletti agaróz tartalom növelése (0,2-1,0%), illetve a legoptimálisabb agaróz koncentráció (1,0%) melletti bórsav koncentráció változtatása szemlélteti a felbontás, hatékonyság és szelektivitás gélképzőtől és ionerősségtől való függését. Az összes borát és agaróz koncentrációra számolt analitikai paramétert a 7. táblázat foglalja össze.



30. ábra: Az SDS-omalizumab aleggységek CGE elválasztása növekvő agaróz (röviden A) koncentrációjú gélekben (fentről lefelé - 0,2%-tól 1,0%-ig) 640 mM-os TBE háttéreléktról alkalmazása mellett (panel A). A B panel az emelkedő agaróz koncentráció mellett megfigyelhető szelektivitást (α) szemlélteti az ngHC/LC és HC/ngHC fragmensekre vonatkoztatva. A csúcsok jelölése és az elválasztási paraméterek megegyeztek a 28. ábra alatt jelöltekkel. Szerkesztve, [40] alapján.



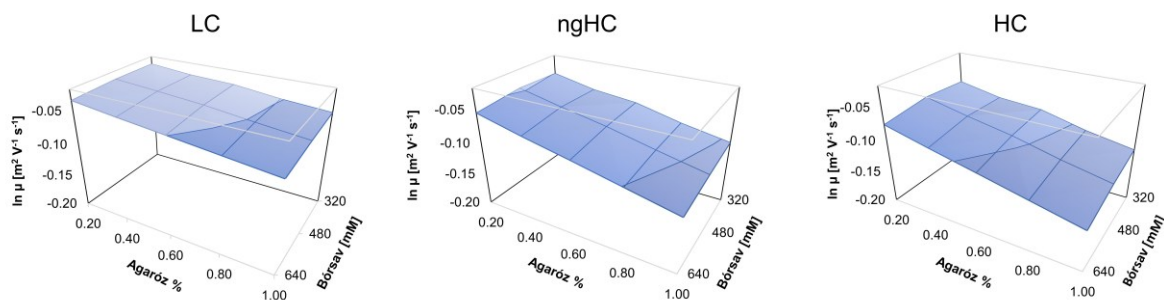
31. ábra: Az SDS-omalizumab aleggységek CGE elválasztása növekvő bórsav (röviden BA) koncentrációjú gélekben (fentről lefelé - 340, 480 és 640 mM) 1,0% agaróz koncentráció mellett (panel A). A B panel az emelkedő bórsav koncentráció mellett megfigyelhető szelektivitást (α) szemlélteti az ngHC/LC és HC/ngHC fragmensekre vonatkoztatva. A csúcsok jelölése és az elválasztási paraméterek megegyeztek a 28. ábra alatt jelöltekkel. Szerkesztve, [40] alapján.

7. Táblázat: A különböző agaróz és borát koncentrációjú TBE gél-puffer rendszerek elválasztási jellemzőinek összehasonlítása az omalizumab terápiás fehérje alegységeire vonatkoztatva (α – szelektivitás, N – hatékonyság, Rs – felbontás). Szerkesztve, [40] alapján.

Agaróz %	320 mM Bórsav						
	alfa		N			Rs	
	ngHC/LC	HC/ngHC	LC	ngHC	HC	ngHC/LC	HC/ngHC
0.2	1.048	1.049	22321	31125	16204	1.504	1.450
0.4	1.073	1.051	27609	29863	22158	2.476	1.593
0.6	1.088	1.045	29155	30386	19964	3.799	1.545
0.8	1.124	1.051	29528	24799	20088	4.051	1.580
1.0	1.153	1.051	22114	18238	12858	4.319	1.254
Agaróz %	480 mM Bórsav						
	alfa		N			Rs	
	ngHC/LC	HC/ngHC	LC	ngHC	HC	ngHC/LC	HC/ngHC
0.2	1.043	1.050	22755	38553	21541	1.374	1.440
0.4	1.063	1.045	27691	31503	22210	1.718	1.318
0.6	1.082	1.044	29063	30346	25263	2.789	1.581
0.8	1.108	1.048	30118	34139	28627	3.931	1.602
1.0	1.129	1.046	27624	39007	19911	3.939	1.536
Agaróz %	640 mM Bórsav						
	alfa		N			Rs	
	ngHC/LC	HC/ngHC	LC	ngHC	HC	ngHC/LC	HC/ngHC
0.2	1.034	1.036	32775	52624	29885	1.170	1.342
0.4	1.049	1.036	33757	50221	28982	1.811	1.292
0.6	1.062	1.038	34210	48996	29605	2.155	1.389
0.8	1.078	1.039	32818	66250	34239	3.032	1.653
1.0	1.092	1.039	39316	45012	32201	3.435	1.505

Az SDS-fehérjék elektromos térerő által közvetített, különböző gélekben történő migrációja azt feltételezi, hogy a vizsgált fragmensek egy pórusos szűrőmátrixon haladnak át, ily módon lineáris kapcsolat feltételezhető a logaritmusos effektív elektroforetikus mobilitás ($\ln \mu_{\text{eff}}$) és a gél koncentráció (T) között, amelyet dolgozatomban 2.1.5 alfejezetében már bemutatott (1)-es számú egyenlet ($\ln \mu_{\text{eff}} = \ln \mu_{\text{eff},0} - K_R T$) definiál. Az effektív elektroforetikus mobilitások (μ_{eff}) kiszámításához a töltéssel nem rendelkező mezitil-oxid komponens segítségével meghatározott elektrooszmotikus áramlás mobilitásait (μ_{EOF}) kellett hozzáadnom a minta komponenseinek látszólagos elektroforetikus mobilitásaihoz (μ_{app}), melyek a migrációs időkből és elválasztási paramétereiből (kapilláris hossz, alkalmazott feszültség) voltak származtathatók.

Az összefüggések könnyebb megértése érdekében az EOF és viszkozitási panelekhez hasonló 3-dimenziós Ferguson-diagramokat ábrázoltam, melyeken a logaritmusos mobilitást és gél koncentrációkat tüntettem fel az omalizumab fehérje alegységeire vonatkoztatva.



32. ábra: Háromdimenziós Ferguson-diagramok az omalizumab terápiás fehérje alegységeinek agaróz-TBE rendszerekben vizsgált migrációs tulajdonságaira nézve. LC – könnyűlánc, ngHC – nem glikozilált nehézlánc, HC – nehézlánc. Szerkesztve, [40] alapján.

Ahogy az ábrán látható, a borát koncentrációjának növekedésével az alkotóelemek mobilitása nem változott jelentősen a 0,2% agaróz koncentrációs mellett, de enyhén csökkenő tendenciát mutatott az 1,0% agarózt tartalmazó szűrőmátrixban. Másrészt, az agaróz koncentrációjának növekedésével lineárisan csökkenő tendencia volt megfigyelhető mindhárom SDS-fehérje fragmentumra, minden alkalmazott bórsav koncentráció mellett. Ezen eredményekből levont következtetéseket dolgozatom 5.3 alfejezetében fejtem ki.

Az irodalmi áttekintés releváns alfejezetében már említésre került, hogy a vizsgált migrációs tulajdonságok mellett az elektroforézis során a Ferguson-módszer alkalmazásával számos olyan paraméter kiszámítható, melyek segítségével a méret szerinti elválasztás során analizált molekulák tömege megbecsülhető. Munkám során az ismert fehérje alegységek méreteinek ismeretében erre ugyan nem volt szükség, ám a módszer sokoldalúsága miatt röviden szeretném bemutatni a saját példával szemlélítve, hogyan lehet pusztán a mért paramétereiből molekulatömeg becslést végezni:

1. Az alegységek adott gélben mért migrációs időiből az effektív, és teljes kapilláris hossz, valamint az elválasztó feszültség adatokból kiszámítható a már említett látszólagos mobilitás (μ_{app}) értéke.
2. A μ_{app} értékekből a viszkozitási együtthatókkal korrigálva, különböző hőmérsékleteken (esetemben 25, 35, 45 és 55 °C) megadhatók a korrigált μ_{app} értékek, illetve azok természetes alapú logaritmusai (itt a 10 kDa IST, LC, ngHC és HC, csúcsokra - ($\ln \mu_{app}$, mely jelen esetben 4x4 érték)).
3. Az $\ln \mu_{app}$ értékeket (Y-tengely) és az adott mérési hőmérsékletek reciprokát ($1/T$, X-tengely) ábrázolva úgynevezett Arrhenius-egyeneseket vehetünk fel a négy vizsgált alegységre nézve, melyekből kiolvassva az egyenesek meredekségét és megszorozva

azokat az egyetemes gázállandó (8,314) értékével, megkaphatjuk az adott alegységekhez tartozó aktiválási energia értékeket J/mol egységben (pl.: IST=39753, LC=38505, ngHC=37478 és HC=37241 J/mol).

4. A kapott aktiválási energia értékekből, valamint a standard, illetve az alegységek molekulatömegeinek ismeretében (rend szerint 10000, 23900, 48100 és 49400 Da) egy logaritmikus függvényt vehetünk fel, melynek egyenlete esetemben:

$$(5) \quad y = -1,518 \ln(x) + 53,763; r^2 = 0,9942$$

5. Ezen egyenletből az ismeretlen alegységek vagy szennyezők aktiválási energiáinak ismeretében (melyek a migrációs időkből a fent leírt módon levezethetők) megbecsülhetők az ismeretlen komponensek molekulatömegei.

Például, ha van egy ismeretlen molekulánk, melyet ugyanezen gélrendszerben, megegyező mérési és kapilláris paraméterek mellett vizsgálunk, és melynek aktiválási energiája kiszámolva és átváltva 36,800 kJ, akkor az (5)-ös egyenletből az alábbi érték számolható:

$$36,800 = -1,518 \ln(x) + 53,763$$

$$-1,518 \ln(x) = 36,800 - 53,763$$

$$-1,518 \ln(x) = -16,963$$

$$\ln(x) = \frac{-16,963}{-1,518}$$

$$\ln(x) \approx 11,183$$

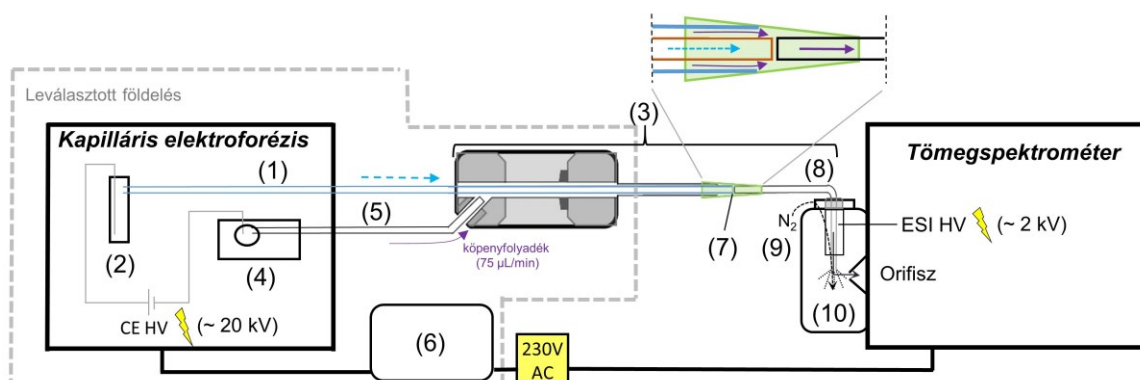
$$x \approx e^{11,183}$$

melyből $x \approx \underline{70653 \text{ Da}}$

A feltételezett molekula tömege tehát körülbelül 70,7 kDa lenne.

4.3. MS detektálással kapcsolt CGE módszer és interfész fejlesztése natív, valamint SDS-fehérjék és peptidok analízisére

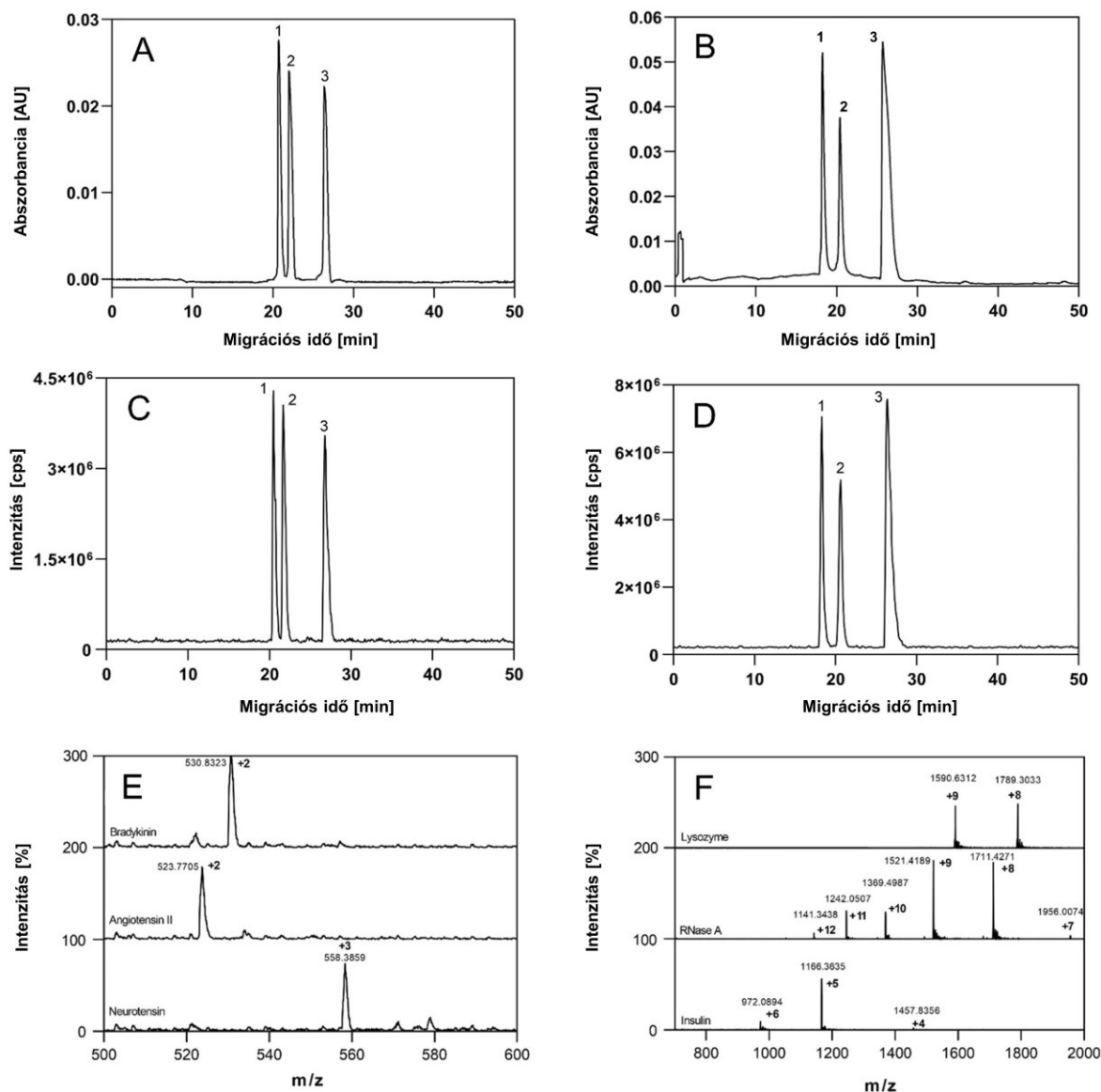
Doktori munkám során a fehérjéket érintő kapilláris gélelektroforézis módszerek és elválasztó közegek fejlesztése mellett azok tömegspektrometriával való együttes alkalmazhatóságát is vizsgáltam, melynek eredményeként egy egyszerű és széleskörűen alkalmazható koaxiális elven működő interfészt (Coaxial Sheath Flow Reactor Interface, röviden CSFRI) fejlesztettem ki. Ez az interfész CE és CGE-alapú, MS-kapcsolt elválasztástechnikai módszerek megvalósítására alkalmas, mely által részletesebb struktúrális információ nyerhető az elektroforetikus (akár viszkozusabb gélekben is) elválasztott komponensekről. A módszer ezáltal főként fehérjék és peptidok CGE technikával történő, nagy felbontású analízisét biztosíthatja, beleértve az SDS-fehérje komplexeket, melyek méret szerinti elválasztása eddig csak UV detektálással együtt volt értelmezhető. Az új interfész és a kapcsolt rendszer felépítését a 33. ábra szemlélteti.



33. ábra: A CE-CSFRI-ESI-MS kapcsolás sematikus ábrázolása. (1) - elválasztó kapilláris, (2) - CE inlet oldali puffer edény, (3) - CSFRI interfész, (4) - CE outlet oldali puffer edény, (5) - köpenyfolyadékot biztosító kapilláris, (6) - leválasztó transzformátor, (7) - zárt áramkör és folyadék kapcsolat (részletek a nagyított ábrán: szaggatott nyíl - elektroforetikus migráció iránya; folytonos nyíl - a köpenyfolyadék áramlási iránya), (8) - áramlási reakciótér, (9) - szárító gáz, (10) gyári ESI ionforrás. Rövidítések: CE HV – kapilláris elektroforézisen alkalmazott magas feszültség, ESI HV – elektroprayhez alkalmazott magas feszültség, AC – váltóáram. Szerkesztve, [136] alapján.

Ezen interfész kapcsolat során a minta eljutása az elválasztó kapillárisból az aktuális, gyártó által tervezett ESI ionforráshoz egy újfajta elven alapul. Ugyan az elektromos kapcsolat zárása ebben az esetben is az elválasztó kapilláris kimeneti oldalán történik, azonban az elválasztott

mintakomponensek az elválasztó gélből kilépve a köpenyfolyadék által hordozva jutnak el az ionforráshoz egy zárt áramkörű (~200 µm belső átmérőjű) kapillárisban az áramlási reakcióterén (ún. "csőreaktoron") keresztül. Az interfész ily módon lehetővé teszi, hogy bármilyen gyári MS ionforrást összekapcsolhassunk a CE készülékkel, ehhez csupán a köpenyfolyadék és a szárító gáz áramlási sebességét, valamint az utóbbi hőmérsékletét szükséges optimalizálni. Az interfész kialakításából adódóan a nagyobb (akár 75 µL/perc) folyadékáram a nanoliteres áramlást lehetővé tevő (nanospray típusú) összekötő egységekhez képest a CSFRI alkalmazásakor kisebb érzékenység mutatkozik, ám egy jóval stabilabb elektropray folyamatot biztosít az elválasztás teljes időtartama alatt (akár 60< percen át). Továbbá kijelenthető, hogy az ipari alkalmazhatóság szempontjából a rendelkezésre álló fehérje minták koncentrációja jellemzően nem limitáló tényező, ez inkább a metabolomikai vizsgálatok során okozhat kihívást, ahol a vizsgált biomolekulák koncentrációja rendkívül alacsony lehet. A 34. ábra egy natív peptid és fehérje keverék CGE-UV és CGE-MS elválasztásait hasonlítja össze egy agaróz géles pufferrendszerben.



34. ábra: Peptidek (panel A és C) és fehérjék (panel B és D) natív kapilláris agaróz gélelektroforézis analízise UV, és MS detektálással a CSFRI beállítással. Az MS detektálásból származó spektrumokat az E (peptidek) és F (fehérjék) panelek mutatják. Csúcsok: (A és C panelek): (1) - bradikinin, (2) - angiotenzin II, (3) - neurotenszin; (B és D panelek): (1) - lizozim, (2) - RNáz A, (3) - inzulin. A pontos elválasztási és detektálási paraméterek, valamint az alkalmazott gérendszer összetevői a 3. fejezetben kerültek felsorolásra. Szerkesztve, [136] alapján.

Ahogy a 34. ábrán jól látható, a 0,6% agaróztartalmú géllal töltött kapilláris alkalmazása az analízis végéig egyenletes alapvonalat eredményezett, ami bizonyítja az elektropray folyamat stabilitását a CSFRI beállítással. A bradikinin és angiotenzin peptidek esetében 2^+ , a neurotensinnél 3^+ töltés állapot volt egyértelműen azonosítható a kapott MS spektrumon, a

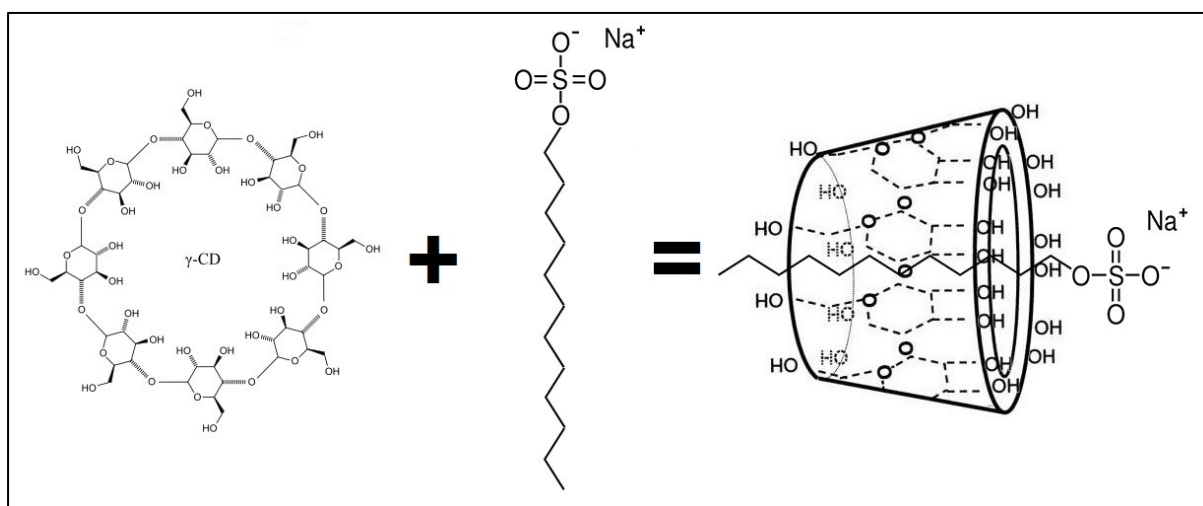
fehérjeanalízis esetében pedig 8^+ és 9^+ töltöttségi állapotban detektáltam a lizozim enzimet, 8^+ és 12^+ közötti töltöttségi fokokban jelent meg az RNáz A enzim, míg a humán inzulinnál a 3^+ , 4^+ és 5^+ állapotok voltak megfigyelhetők. A reprodukálhatóság vizsgálatának céljából három egymást követő futtatást végeztem mind a peptidek, mind a fehérjék keverékére vonatkoztatva, hogy összehasonlíthassam a két detektálási módszert, melynek eredményeit a 8. táblázat mutatja be.

8. Táblázat: Az analizált peptid-, és alacsony molekulatömegű fehérje keverékek CGE-UV és CSFRI-ESI-MS detektálására vonatkozó elválasztási teljesítmény statisztikai értékelése. Az "FA" rövidítés a hangyasavat (formic acid), míg az "A" az agarózt jelöli. Szerkesztve, [136] alapján.

Paraméter	CGE-UV (4% FA, 0.6%A)						CGE-CSFRI-ESI-MS (4% FA, 0.6%A)					
	1. futtatás	2. futtatás	3. futtatás	Átlag	Szórás	%RSD	1. futtatás	2. futtatás	3. futtatás	Átlag	Szórás	%RSD
Bradikinin - migrációs idő [min]	20.4	20.5	20.7	20.5	0.16	0.77	20.5	20.5	20.6	20.5	0.09	0.43
Angiotenzin II - migrációs idő [min]	21.6	21.6	21.8	21.7	0.10	0.47	21.7	21.7	21.8	21.7	0.07	0.30
Neurotenzin - migrációs idő [min]	26.7	26.7	26.9	26.8	0.10	0.37	26.8	26.9	27.0	26.9	0.10	0.37
Bradikinin - csúcs alatti terület	601556	603568	589123	598082	7824	1.31	1658215	1631226	1665568	1651670	18082	1.09
Angiotenzin II - csúcs alatti terület	495681	481257	473255	483398	11365	2.35	1751823	1735681	1765981	1751622	15161	0.87
Neurotenzin - csúcs alatti terület	1025681	1002681	1035568	1021310	16874	1.65	1956874	1929554	1963582	1950003	18024	0.92
Felbontás - (Angiotenzin II/Bradikinin)	1.67	1.66	1.69	1.68	0.02	0.99	1.57	1.55	1.51	1.55	0.03	1.94
Felbontás - (Neurotenzin/Angiotenzin II)	4.95	5.01	4.93	4.96	0.04	0.86	4.85	4.81	4.77	4.81	0.04	0.80
Lizozim - migrációs idő [min]	18.25	18.14	18.22	18.20	0.05	0.30	18.29	18.31	18.48	18.36	0.11	0.58
RNáz A - migrációs idő [min]	20.40	20.31	20.54	20.42	0.12	0.57	20.60	20.63	20.71	20.65	0.06	0.27
Inzulin - migrációs idő [min]	25.71	25.63	25.94	25.76	0.17	0.64	26.36	26.42	26.66	26.48	0.15	0.58
Lizozim - csúcs alatti terület	1864889	1885446	1855221	1868519	15436	0.83	2493212	2468556	2511235	2491001	21425	0.86
RNáz A - csúcs alatti terület	1551213	1587332	1575214	1571253	18382	1.17	2315455	2356223	2314556	2328745	23801	1.02
Inzulin - csúcs alatti terület	5597435	5582998	5525778	5568737	37897	0.68	5884387	5851553	5701286	5812409	97625	1.68
Felbontás - (RNáz A/Lizozim)	2.59	2.55	2.56	2.56	0.02	0.80	2.47	2.45	2.50	2.48	0.02	0.99
Felbontás - (Inzulin/RNáz A)	3.34	3.30	3.34	3.33	0.02	0.67	3.20	3.25	3.27	3.24	0.03	1.05

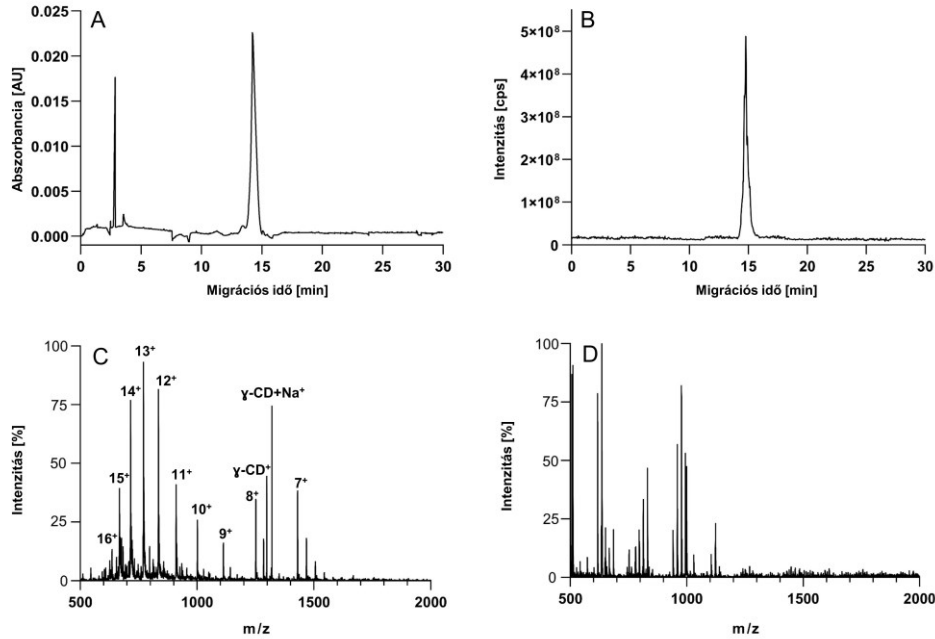
Az eredményekből levont következtetéseket dolgozatom 5.4 alfejezetében ismertetem.

Az interfész további előnyeinek kihasználása érdekében megvizsgáltam egy az ionszuppresszió csökkentésére irányuló alternatívát, melynek során az irodalomban fellelhető, nátrium-dodecil-szulfát (SDS) és gamma-ciklodextrin (γ -CD) közötti komplexáláson alapuló SDS befogási folyamatot tanulmányoztam [160]. Ezen SDS befogási elv hatékonyságát analizálva, annak SDS-kapilláris agaróz gélelektroforézis melletti alkalmazhatóságát teszteltem, mely az alábbiak szerint történt: az SDS által okozott ionszuppresszió csökkentése érdekében különböző koncentrációkban γ -CD-t adtam a metanol és hangyasav tartalmú köpenyfolyadékhoz, hogy kihasználjam a ciklikus oligoszacharid hidrofób üregét az SDS molekulák komplexáció alapú befogásához, azok hidrofób láncá révén (lásd, 35. ábra).



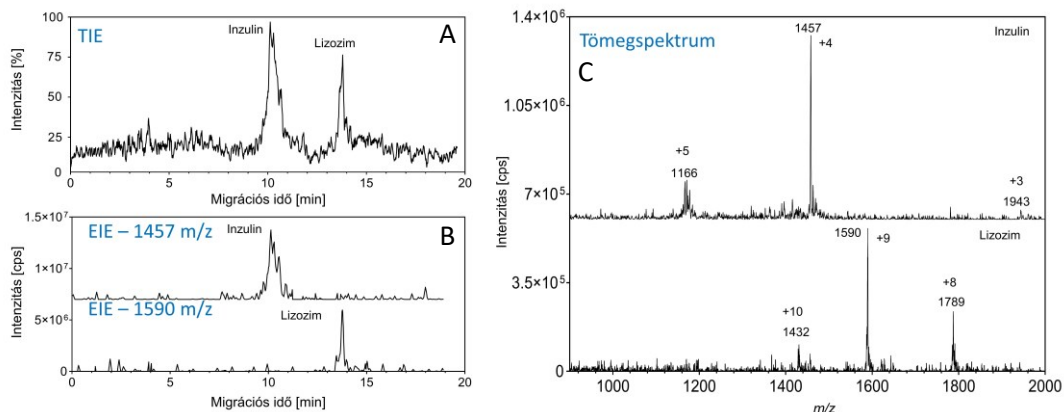
35. ábra: A γ -CD és SDS molekulák komplexálási reakciója (saját forrás).

Az interfész reakcióterében ezáltal az on-line elválasztási folyamat során létrejött ciklodextrin-szurfaktáns komplexeket nem észleltem a tömegspektrumon, vélhetően a komplex gyenge ionizálhatósága miatt. Ezáltal a módszer lehetővé tette számomra bizonyos fehérjék SDS-kapilláris gélelektroforézissel történő MS-detektálását, és az SDS által okozott ionszuppresszió csökkentését. A 36. ábra jól szemlélteti, hogy az agaróz alapú SDS-kapilláris gélelektroforézis MS-detektálással kapott 10 kDa IST tesztmérés elektroferogramja nagyon hasonló az UV detektálással kapott csúcshoz (panel A és B). Továbbá elmondható, hogy a vizsgált standard jellegzetes töltés állapotai alig voltak azonosíthatók a γ -CD alkalmazása nélkül (panel D), azonban a komplexáló ágens optimalizált koncentrációjának köpenyfolyadékba juttatásával láthatóvá vált az injektált, 2 mg/mL koncentrációjú fehérje tömegspektruma.



36. ábra: 10 kDa molekulatömegű fehérje standard SDS-kapilláris agaróz gélelektroforézis analízise UV (panel A) és MS detektálással (panel B), valamint az MS detektáláshoz tartozó spektrumok γ -ciklodextrin köpenyfolyadékba való keverésével (panel C) és anélkül (panel D). Mérési paraméterek: lásd, 3. fejezet. Szerkesztve, [136] alapján.

A 10 kDa standardre való optimalizálás után két, alacsony molekulatömegű, kisebb koncentrációjú (~0,35 mg/mL) fehérje méret szerinti elválasztását is elvégeztem, mely a módszer és az interfész alkalmazhatóságát bizonyította.



37. ábra: Inzulin és lizozim fehérjék SDS-CGE elválasztása MS detektálással a CSFR interfész alkalmazásával. Panel A: Az elválasztás teljes ionáram elektroferogramja (TIE), Panel B: Az elválasztás extrahált ionáram elektroferogramja a spektrum alapján kiválasztott m/z értékek (inzulin - 1457 és lizozim - 1590) szerint. Panel C: Az elválasztás során kapott elektroferogramból kinyert, fehérjékhez tartozó tömegspektrumok.

Az SDS-CGE és MS mérési paramétereket dolgozatom 3. fejezete, az eredményekből levont következtetéseket pedig az 5.4 alfejezete ismerteti.

4.4. Humán tej oligoszacharidok és csecsemő tápszer formulák szabad oligoszacharid tartalmának analízise CGE-LIF módszerrel

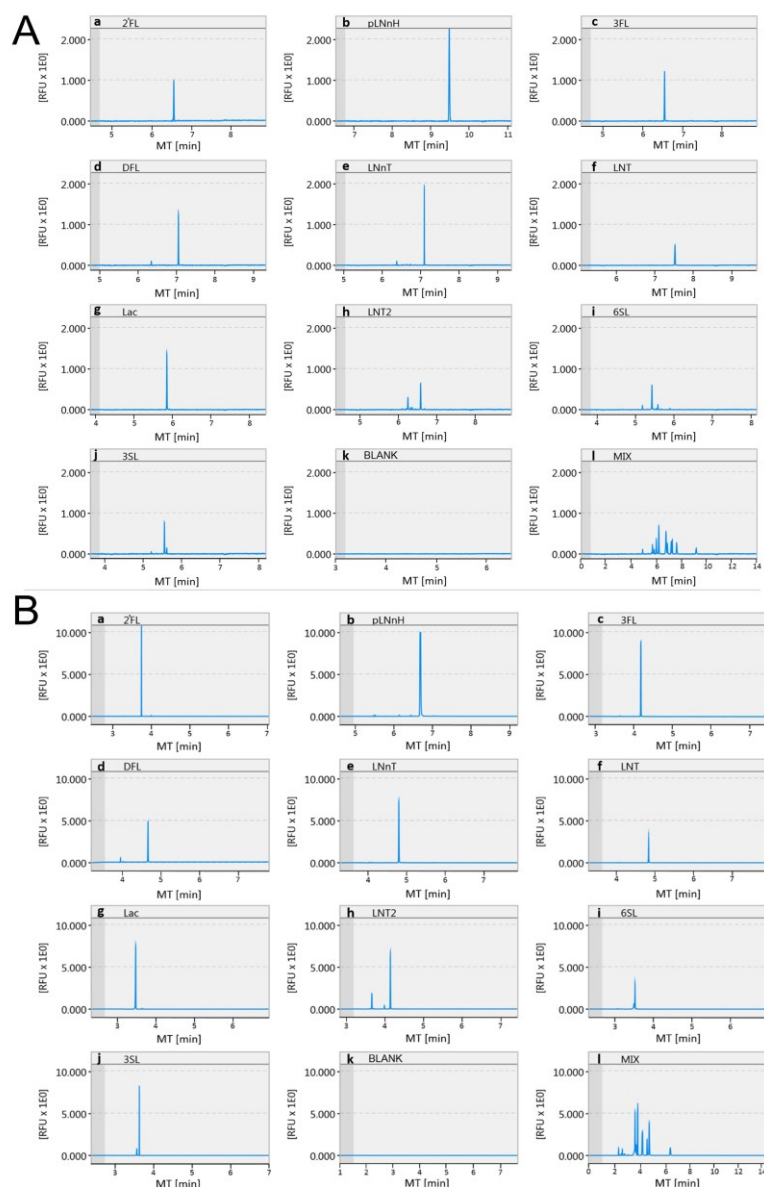
4.4.1. Humán tej oligoszacharid analízis

A humán tej oligoszacharidok (HMO-k) CGE-LIF analízisére egy különösen gyors és hatékony analitikai rendszert állítottam be. A HMO cukrok vizsgálata mellett egy átfogó, galaktooligoszacharid (GOS) összetétel analízist is elvégeztem egy újonnan kifejlesztett csecsemő tápszer formulán.

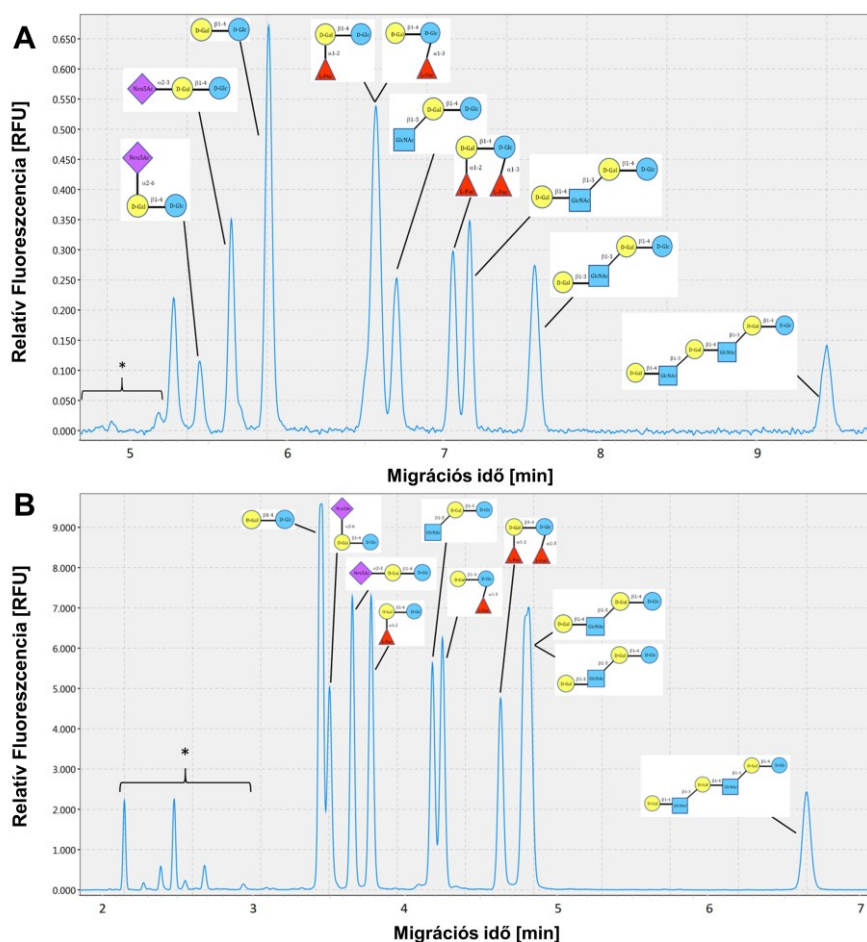
A humán tej oligoszacharidokról gyűjtött információt és a mintagyűjtést Domokos Apolka hallgatótársam és Váradí Eszter szakdolgozó végezték, a HMO standardokat pedig Mészáros-Matwiejuk Ágnesnek és Molnár-Gábor Dórának, a dániai Glycom munkatársainak köszönhetem. A mérésekben Borza Beáta és Szigeti Márton hallgatótársaim, míg a projekt megszervezésében és az eredmények kiértékelésében témavezetőm, Dr. Guttman András nyújtott segítséget. A GOS analízishez a tápszer formulát és az előzetes kutatási adatokat a svájci Nestlé cég kutatója, Dr. Sean Austin biztosította. A mérések kivitelezésében Farsang Róbert és Szigeti Márton kollégáim voltak segítségemre, az eredmények kiértékelését pedig Dr. Guttman Andrással és Dr. Stephen Lock-kal (Sciex) végeztük el.

A HMO mérések egy 12 csatornás multikapilláris gélelektroforézis készülék segítségével történtek két, egymás hatását kiegészítő, kereskedelmi forgalomban kapható gélszuszpenziót alkalmazva. Elsőként, egy az iparban szénhidrát elválasztáshoz használt hagyományos gél-mátrix, majd egy dextrans és borátot tartalmazó gél multikapilláris gélelektroforetikus optimalizálása történt meg, melyek segítségével a legfontosabb HMO standardok, valamint egy humán tejminta kiválasztott komponensei kvalitatív és kvantitatív módon is meghatározhatók voltak. A multikapilláris elektroforézissel történő, csatornánként 1-1 standard, illetve a standardok keverékének a két alkalmazott gélszuszpenzióban történő elválasztását a 37. ábra A és B részei szemléltetik.

A 38. ábra A és B elemei pedig bemutatják, hogy amennyiben az analizálandó komponensek közt a 2'-fukozillaktóz (2'FL), a 3-fukozillaktóz (3FL) valamint a lakto-N-tetraóz (LNT) és a lakto-N-neotetraóz (LNnT) struktúrális izomerek együtt voltak jelen a minta keverékben, mindkét gélszuszpenzió alkalmazása indokoltá vált egyes izomerek komigrációs jelensége miatt. A mérések során minden esetben LED-indukált fluoreszcens detektálást alkalmaztam.



38. ábra: HMO standardok multikapillaris gelelektroforézis analízisének képernyőképe: a standardok egyenkénti (és egyidejű) mérése (a-k elektroferogramok) és azok keverékeinek (l elektroferogram) futtatásai egy hagyományos szénhidrát elválasztó mátrixban (panel A), valamint egy borát keresztkötött dextrans gélben (panel B). Futtatások csatornénként: a – 2'-fukozillaktóz (2'FL), b – para-lakto-N-neohexaóz (pLNnH), c – 3'-fukozillaktóz (3'FL), d – difukozillaktóz (DFL), e – lakto-N-neotetraóz (LNnT), f – lakto-N-tetraóz (LNT), g - Lac, h – lakto-N-trióz (LNT2), i – 6'-szialillaktóz (6'SL), j – 3'-szialillaktóz (3'SL), k - Blank, l - HMO keverék. Paraméterek: Panel A – Elválasztó feszültség: 6.0 kV, minta injektálás: 2.0 kV/2.0 s; B panel - Elválasztó feszültség: 9.0 kV, minta injektálás: 6.0 kV/5.0 s. Mindkét esetben a teljes kapillaris hossz kapillárisonként 17 cm volt (a hatékony hossz 13 cm). Az elválasztás mindkét alkalmazott gél esetében 25 °C-on történt. Szerkesztve, [66] alapján.



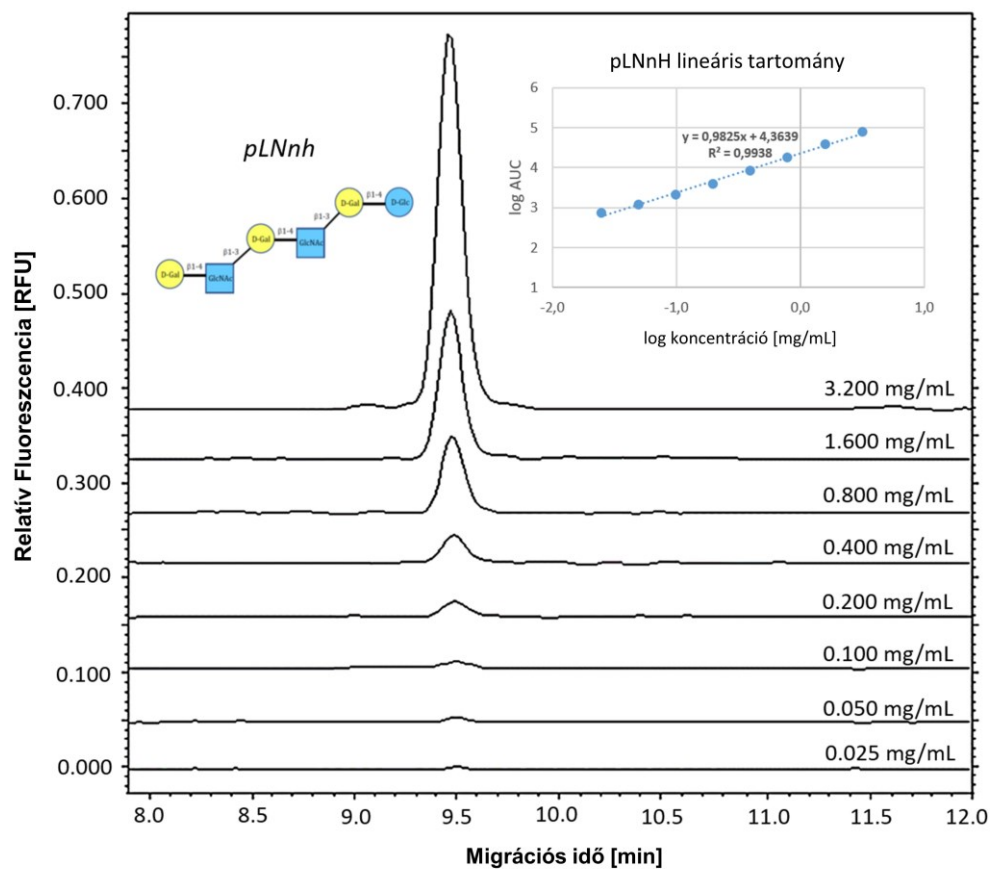
39. ábra: HMO standardok keverékének analízise LED indukált fluoreszcens detektálással kapcsolt multikapilláris gél elektroforézissel (CGE-LIF), egy hagyományos szénhidrát elválasztó mátrix (panel A) és egy borát-keresztított dextransz alapú gél (panel B) segítségével. Az elektroferogramok elején csillaggal jelölt csúcsok az APTS-jelölt standardok bomlásából adódó, gyorsan vándorló szennyeződések jelölik, melyek nem zavarták a minta komponenseinek detektálását. A 38. és 39. ábrákhoz tartozó szerkezeteket az alábbi táblázat foglalja össze:

9. Táblázat: A vizsgált HMO standardok, és azok szerkezetei.

Lac	3'SL	6'SL	2'FL	3'FL	DFL	LNT2	LNT	LNnT	pLNnH

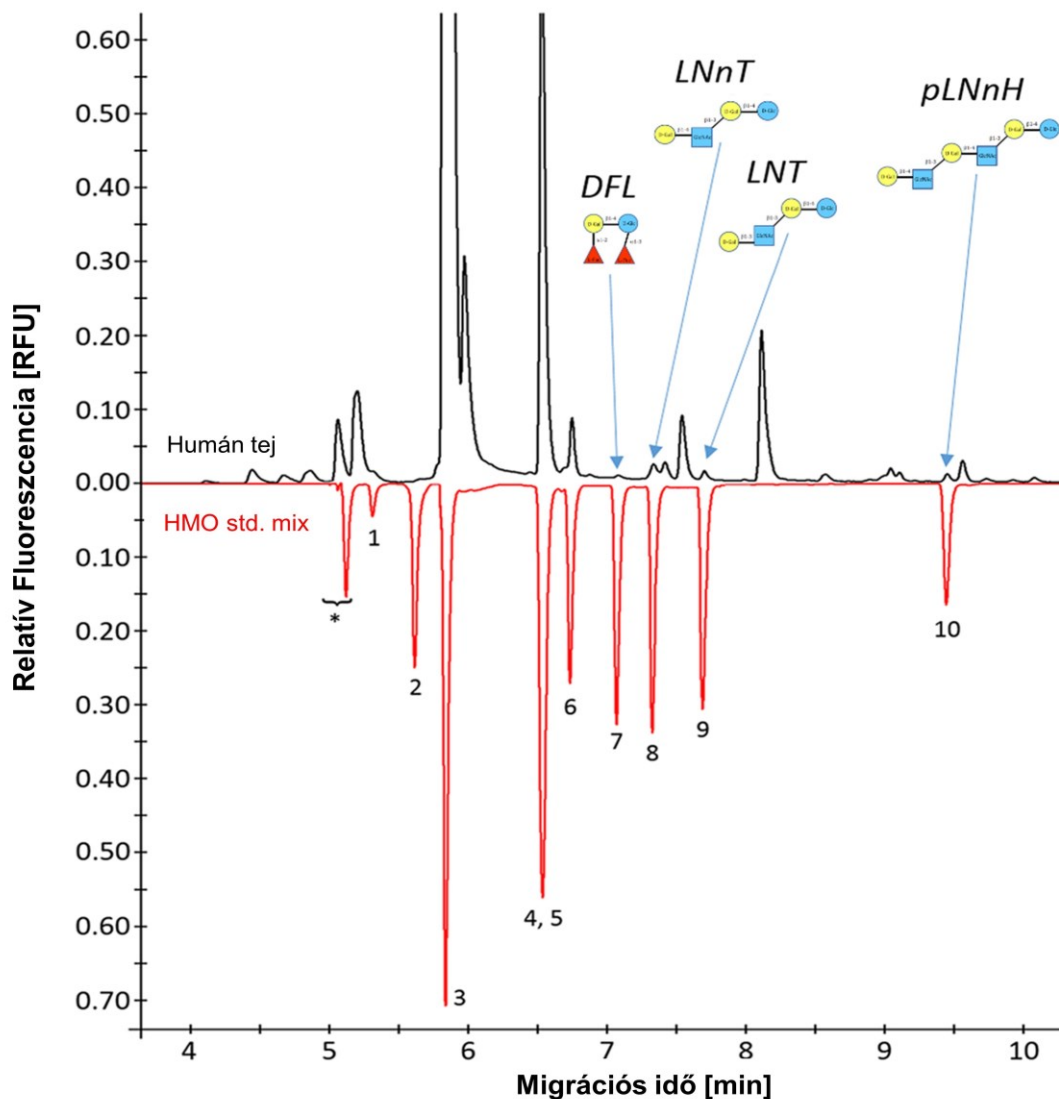
Lac – laktóz, 3'SL – 3'-szialillaktóz, 6'SL – 6'-szialillaktóz, 2'FL – 2'-fukozillaktóz, 3'FL – 3'-fukozillaktóz, DFL – difukozillaktóz, LNT2 - lakto-N-trióz, LNT - lakto-N-tetraóz, LNnT – lakto-N-neotetraóz, pLNnH - para-lakto-N-neohexaóz. Az egyes monomerek jelölése megegyezik a 12. ábrán történő jelöléssel. Szerkesztve, [66] alapján.

A standardok migrációs tulajdonságainak vizsgálata után a legnagyobb méretű cukor standard para-lakto-N-neohexaóz (pLNnH) segítségével meghatároztam, hogy mekkora detektálási határ (LOD) és kvantitálási határ (LOQ) rendelhető az alkalmazott, LED-indukált fluoreszcens rendszerre a HMO-k vonatkozásában, melynek során a detektálási linearitást 0,025 és 3,200 mg/ml koncentrációtartományban vizsgáltam. A 40. ábra összehasonlítja az eltérő koncentrációjú minta injektálások elektroferogramjait, valamint az ezek segítségével definiált kalibrációs egyenest.



40. ábra Kalibrációs egyenes felvétele az APTS-jelölt para-lakto-N-neohexaóz (pLNnH) standard segítségével. A detektálás linearitását a jobb felső sarokban beágyazott egyenes szemlélteti. Szerkesztve, [66] alapján.

A HMO standardok multikapilláris gélelektroforézis analízise mellett egy humán tejminta 0,1 RFU érték alatti fontosabb oligoszacharidjainak koncentráció meghatározása is megtörtént az ismert standardek segítségével, melyet a 41. ábra mutat be.



41. ábra Egy humán tejmintában található alacsony koncentrációjú (RFU <0,1) oligoszacharidok (LNT2, DFL, LNnT, LNT és pLNnH) kvantitatív meghatározása. A pillangó diagram felső elektroferogramja egy humán tej minta futtatását, míg az alsó az alkalmazott HMO standardok futtatását mutatja. A számokkal jelölt csúcsokhoz tartozó struktúrák: 1 – 6'SL, 2 – 3'SL, 3 – Lac, 4, 5 – 2'FL és 3FL, 6 – LNT2, 7 – DFL, 8 – LNnT, 9 – LNT, 10 – pLNnH. A struktúrák rövidítéseinek magyarázatát a 9. táblázat aláírása jelöli. Szerkesztve, [66] alapján.

Az LOD és LOQ meghatározás eredményét, illetve a humán tejminta oligoszacharidjainak kvantitatív analízise során kapott koncentrációkat dolgozatomban 5.5 fejezetében ismertetem.

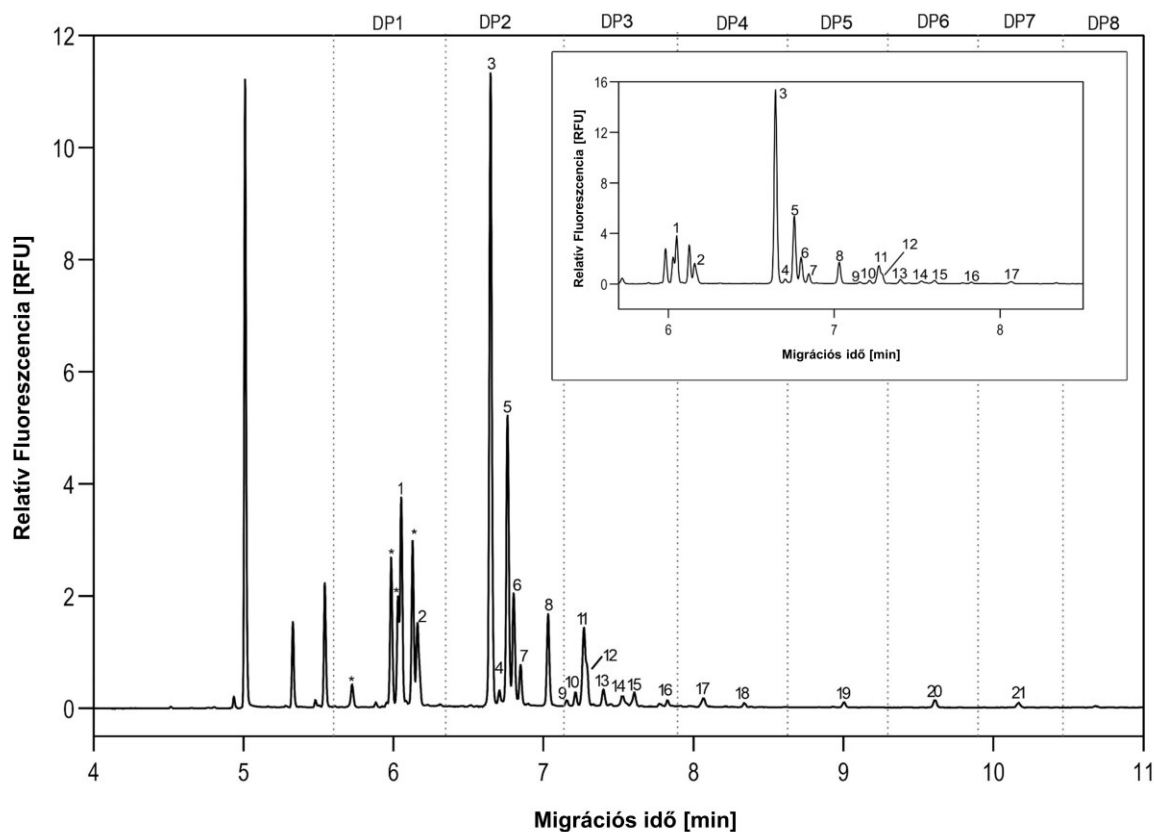
4.4.2. Galaktooligoszacharid analízis

A humán tej oligoszacharidok analízise mellett lehetőségem adódott egy komplex csecsemő tápszer formula galaktooligoszacharid (GOS) tartalmának vizsgálatára is, melynek célja volt, hogy egy olyan gyors és ortogonális CE alapú analitikai módszert mutassak be, amely differenciált enzimes emésztési lépések által egy kiegészítő alternatívát kínáljon a standard, LC-alapú oligoszacharid összetétel meghatározás mellett, és amely alkalmazható olyan minták esetében is, melyek magas laktóztartalommal rendelkeznek.

Az ipari, GOS tartalmú mintát négy különböző megközelítésben vizsgáltam az alábbiak szerint:

- (1) - kezelés nélküli, referencia galaktooligoszacharid minta,
- (2) - laktóz hozzáadása mellett vizsgált (ún. spikeolt) minta,
- (3) - amiloglükozidázzal emésztett minta,
- (4) - amiloglükozidázzal + β -galaktozidázzal emésztett minta.

A folyamat során először a maltodextrineket távolítottam el amiloglükozidáz enzimes emésztéssel, majd a GOS tartalom a 3. és 4. lépések analíziseinek különbségeként lett meghatározható, a β -galaktozidázos kezeléssel és anélkül kapott eredményekből. A mérések mellett egy standard laktóz kalibrációs sort is készítettem az azonosított struktúrák mennyiségi meghatározásának céljából. A 42. ábra a GOS tartalmú referencia minta kapilláris gélelektroforézissel mért teljes oligoszacharid profilját mutatja, melyen 21 csúcsot választottam el 8-as polimerizációs fokig, alig 11 perc alatt. A laktóz csúcs elektroferogramon történő azonosítása érdekében a mintához laktóz standardot adtam. A 42. ábra jobb felső sarkában beágyazott része jól szemlélteti, hogy a 3-as csúcs felelt meg a laktóznak, és szemmel láthatóan jól elkülöníthető volt a mérettartományában található többi oligoszacharid komponensből.



42. ábra: A GOS tartalmú minta gyors oligoszacharid profilozása CGE-LIF módszerrel. A polimerizációs fok (DP) tartományok a felső vízszintes tengelyen szaggatott vonallal vannak feltüntetve. A csillaggal jelölt csúcsok a vizsgált tartományban lévő APTS eredetű csúcsokat jelzik. A beágyazott ábrán a laktózzal spikeolt minta DP2-DP3 tartománya látható. A mérési körülményeket dolgozatom 3. fejezetében részletezem. Szerkesztve, [133] alapján.

Az elválasztott csúcsok statisztikai értékelése a 10. táblázatban látható, mely a migrációs idő és csúcs alatti terület értékek reprodukálhatóságát mutatja egy háromnapos mérési sorozat folyamán. A táblázatban szereplő "Átlag" kifejezés 3 párhuzamosan előkészített minta analíziseinek átlagaira vonatkozik. Minden mintából 3-3 injektálás történt (összesen tehát 9 mérés / 3 nap).

10. Táblázat: A GOS tartalmú tápszer minta szabad oligoszacharid-analízis eredményeinek statisztikai értékelése. Szerkesztve, [133] alapján.

Csúcs	DP	Migrációs idő [min]			Area			Terület %
		Átlag	Szórás	%RSD	Átlag	Szórás	%RSD	
1	1	6.04	0.016	0.270	6.48E-02	1.67E-03	2.581	11.17
2	1	6.15	0.017	0.269	2.95E-02	4.65E-04	1.576	5.08
3	2	6.64	0.018	0.272	2.17E-01	5.34E-03	2.459	37.49
4	2	6.69	0.018	0.273	5.31E-03	2.17E-04	4.086	0.92
5	2	6.75	0.019	0.275	1.00E-01	2.26E-03	2.248	17.33
6	2	6.79	0.018	0.272	3.89E-02	1.03E-03	2.648	6.72
7	2	6.84	0.019	0.273	1.41E-02	5.27E-04	3.746	2.43
8	2	7.02	0.019	0.276	3.19E-02	7.33E-04	2.300	5.50
9	3	7.14	0.020	0.274	2.09E-03	5.99E-05	2.864	0.36
10	3	7.20	0.020	0.275	4.89E-03	1.43E-04	2.931	0.84
11	3	7.26	0.020	0.278	2.77E-02	5.29E-04	1.910	4.78
12	3	7.28	0.020	0.278	1.39E-02	2.92E-04	2.099	2.40
13	3	7.39	0.020	0.276	6.24E-03	1.22E-04	1.947	1.08
14	3	7.51	0.021	0.275	4.20E-03	1.02E-04	2.431	0.72
15	3	7.59	0.021	0.274	5.10E-03	7.57E-05	1.482	0.88
16	3	7.81	0.022	0.277	2.14E-03	7.34E-05	3.425	0.37
17	4	8.05	0.022	0.276	3.35E-03	6.11E-05	1.823	0.58
18	4	8.33	0.023	0.275	1.30E-03	1.72E-05	1.322	0.22
19	5	8.99	0.025	0.276	1.74E-03	6.11E-05	3.513	0.30
20	6	9.60	0.027	0.283	3.00E-03	5.84E-05	1.947	0.52
21	7	10.15	0.029	0.288	1.91E-03	5.86E-05	3.074	0.33
		Átlag		0.276	Átlag		2.496	
		Minimum		0.269	Minimum		1.322	
		Maximum		0.288	Maximum		4.086	

A CGE-LIF technika HMO struktúrákra fentebb már bemutatott kvantitálási folyamatot a GOS minta esetén is elvégeztem egy laktóz kalibrációs görbe segítségével, mely során egy laktóz hígítási sorozat csúcsterület értékeit használtam a számoláshoz. A laktóz koncentrációját a kalkulációhoz annak ismert tisztaságával korrigáltam. (lásd, 11. táblázat).

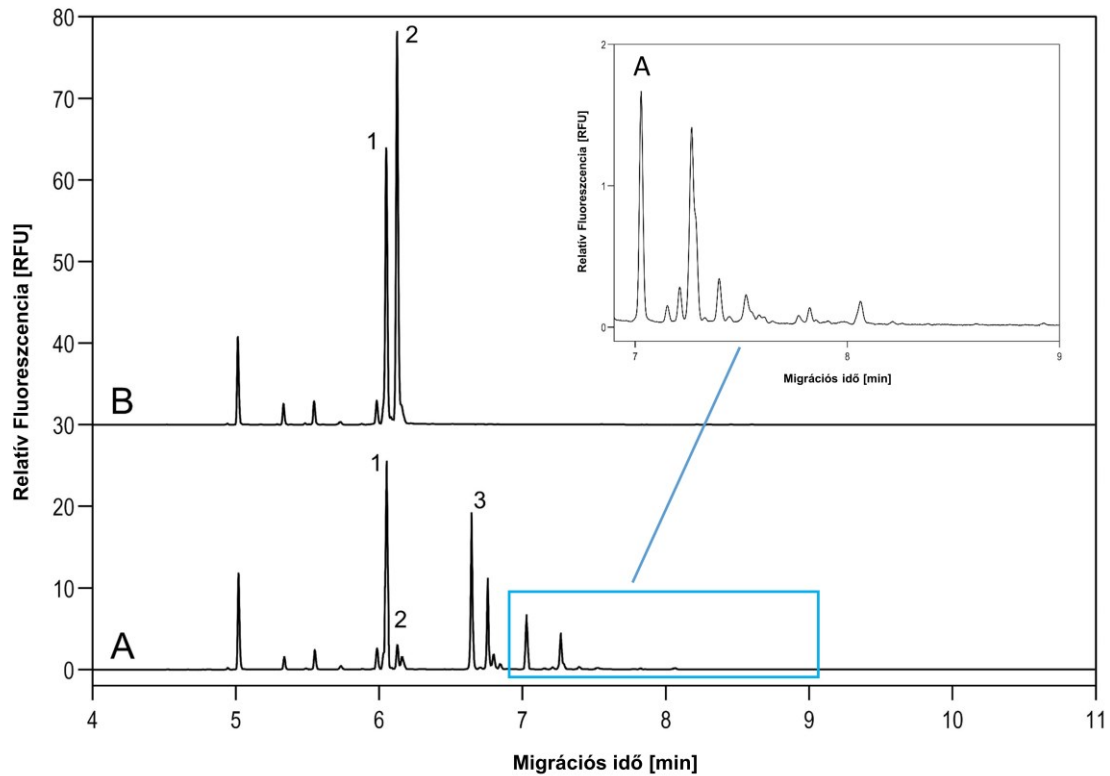
11. Táblázat: A laktóz kalibráció hígítási sora és az abból számolt koncentráció értékek.

Laktóz tisztaság = 94,56%; $MW_{\text{laktóz}} = 342,3$ g/mol. Szerkesztve, [133] alapján.

Laktóz koncentráció [mg/mL]	Korrigált koncentráció [mg/mL]	Terület %	Mért koncentráció [mg/mL]	Mért / Aktuális koncentráció
2.000	1.891	310.210	1.888	0.998
1.000	0.946	158.867	0.944	0.998
0.500	0.473	82.458	0.472	0.998
0.250	0.236	41.311	0.236	1.000
0.125	0.118	18.876	0.120	1.014

A laktóz kalibráció pontosságát mutatja, hogy a kalibrációs egyenes r^2 értéke 0,999 feletti volt, a kalibrációhoz tartozó RSD érték pedig 2,15 %-nak bizonyult.

Hasonlóan a korábbi, HPLC alapú GOS tartalom meghatározási módszerhez [161], a minta analízise amiloglükozidáz enzimes kezeléssel kezdődött, úgy, hogy annak összes maltooligomer tartalmát glükóz monomer alkotóelemeire bontsam, azaz csökkentsem azon minta komponensek számát, amelyek aldóz redukáló véggel rendelkeznek. Az amiloglükozidázos emésztést követően a mintát β -galaktozidázos kezelésnek vettem alá, majd a két mérés különbségeként meghatározhatóvá vált a teljes oligoszacharid tartalomra vonatkoztatott GOS tartalom. Az enzimes kezelések utáni CGE analízisek elektroferogramjait a 43. ábra mutatja be.



43. ábra: A GOS tartalmú minta enzimatis élesztések során kapott elektroferogramjai. Panel A: amiloglükozidáz élesztett oligoszacharid minta, Panel B: amiloglükozidáz + β -galaktóidáz élesztett minta. Releváns csúcsok: 1 - glükóz; 2 - galaktóz; 3 - laktóz. Az elválasztási körülmények azonosak voltak a referencia minta mérési körülményeivel. A bekeretezett elektroferogram részletet a beágyazott elektroferogram mutatja a kisebb csúcsok (DP2-DP7 tartományban) jobb láthatóságának érdekében. Szerkesztve, [133] alapján.

A mennyiségi meghatározás során kapott adatok alapján a 100 g teljes oligoszacharid tartalomra vonatkoztatott GOS tartalom 37,23 g-nak bizonyult, mely eredményt részletesebben dolgozatom 5.5 alfejezetében értékelem.

5. Megbeszélés

5.1. Omalizumab – fehérje és N-glikán analízis kritikai elemzése

Az omalizumab fehérje SDS-CGE vizsgálata során megfigyelt elektromigrációs különbség valószínűleg az Fc régió C_{H2} doménjének konzervált, relatíve nagy kiterjedésű és SDS-t nem kötő szénhidrát részével volt összefüggésben, mely által az alegység felszíni töltéssűrűsége részben lecsökkent. Ennél azonban fontosabb információ, hogy a molekula egyáltalán nem mutatta az ngHC fragmentum jelenlétét, azaz a teljes mAb tartalom glikozilált nehéz láncsal rendelkezett. Az intakt forma még hosszabb migrációs időbeli eltérést mutatott az irodalmi 150 kDa mérethez képest, látszólagos molekulatömege jóval nagyobbak bizonyult (225 kDa) az intakt mAb-okéhoz viszonyítva. A molekula glikozilációja mellett a lényegesen hosszabb migrációs idő valószínűleg az intakt molekula kiterjedt Y alakja és ennek megfelelően nagyobb hidrodinamikusan térfogata miatt jelentkezhetett. Összehasonlítást végezve a molekulatömeg standardokkal ez az eltérés azzal magyarázható, hogy a méret standardok SDS-MW elválasztó gélben történő migrációja lineáris szerkezetük miatt eltérő lehet. Megfigyelhető volt továbbá, hogy több, kisebb csúcs is megjelent az elektroferogramon az intakt forma mellett, melyek a molekula előállításánál keletkező, szabadon maradt fragmentumok jelenlétével és azok összekapcsolódásával magyarázhatók. Ez a jelenség már korábban is észlelhető volt bizonyos mAb alegységek elektroforetikus analízise folyamán. Az ilyen artefaktumok jelenléte redukált körülmények között valószínűleg a nem teljesen végbemenő kémiai reakciók következményei, melyek a vizsgált mintákra optimalizálhatók. Nem redukált körülmények között ezek a mAb fragmentum csúcsok valószínűleg az antitestben lévő szabad '-SH' csoportok jelenlétéből származnak (felszakadt diszulfid, vagy szabad cisztein csoportok), amelyek a felmelegítés hatására katalizálják a diszulfid kötések átrendeződését [162].

Az omalizumab N-glikán mérések során azt tapasztaltam, hogy csak a high-mannóz cukor szerkezetek voltak afukoziláltak. A galaktózmentes IgG általában hosszabb keringési idővel rendelkezik, ami az FcγRI-hez való alacsonyabb kötődési affinitással magyarázható. Továbbá, a monogalaktozilált glikánok mennyisége hosszabb szérumban felezési időre utal. Az N-acetilglükózamin jelenléte gyorsabb kiürüléssel társul, ezáltal az FA2 és FA1 típusú glikánok is kulcsfontosságú szereppel rendelkeznek. Mindemellett, a high-mannóz szerkezetű glikánok feltehetően emelik a gyógyszer molekula clearance rátáját a mannóz receptorokon keresztül [149, 163].

5.2. Bamlanivimab – fehérje és N-glikán analízis kritikai elemzése

A bamlanivimab fehérjevizsgálati módszerünk reprodukálhatósága a migrációs idők és csúcsarányok tekintetében is kiválóan bizonyult. A redukált formához hasonlóan a nem redukált minta analízisekor is kiváló migrációs idő és csúcs alatti terület reprodukálhatóság volt megfigyelhető a három párhuzamos mintaelőkészítés esetében. Az intakt monoklonális antitest csúcson kívül (mely ~95,5% volt az összes csúcsra nézve), néhány kis mintaelőkészítésből/bomlási termékből származtatható csúcs is megfigyelhető volt, ideértve a két nehéz lánc összekapcsolódásával létrejött (HC/HC) fragmentumot, a könnyű-nehez lánc (LC/HC) fragmentumot és egyedülálló könnyű láncot (LC), melyek jelenléte a fentebb már említett jelenség által magyarázhatók [162].

A fehérje töltés variáns analízise során kapott 0,14 pH egység alatti pI különbségek arra utaltak, hogy indokolt átfogó N-glikozilációs analízist végezni a szialsav tartalom pontos meghatározásához, és a főbb glikán struktúrák azonosításához. Az elvégzett fehérjevizsgálati módszerek megbízhatóságáról az eredmények alapján továbbá elmondható, hogy a relatív szórás értékek (%RSD) mind az SDS-CGE, mind a cIEF módszer esetében kiváló reprodukálhatóságról tettek tanúbizonyságot. Míg migrációs idők esetén az ismételhetőség 0,3% alatti, területszázalék esetében pedig minden esetben 5,0 % alatti volt.

A bamlanivimab N-glikozilációs profilozása és szekvencia vizsgálata kimutatta, hogy a gyógyszer teljes szialsavas struktúráinak mértéke meglepő módon, csupán ~0,6%, ily módon a cIEF analízis során detektált savas töltés variánsok valószínűleg a polipeptid láncban lévő savas jellegű aminosavak számának és a fehérje lehetséges deamidációjának eredményei. A Covid-19 elleni antitest glikánok core struktúráinak fukozilációs szintje ~91,8% volt, melyből arra következtethetünk, hogy a termékben lévő körülbelül 8,2% afukozilált glikán tartalom antitest-függő sejt közvetítette citotoxikus hatást (ADCC) mutat. Valójában a bamlanivimab ADCC funkcióját az FC γ RIIIa fehérjét expresszáló Jurkat sejtek kapcsán definiálták az irodalomban, miután azok tüske fehérjét expresszáló célsejtekkel való reakcióját megfigyelték. Komplement függő citotoxicitást (CDC) azonban nem állapítottak meg az erre irányuló vizsgálatok során [164]. Az Fc γ RIIIa fehérje glikozilációja és az IgG Fc régióján lévő core struktúrák fukozilációjának hiánya közötti összefüggés nagyobb mértékű szénhidrát-szénhidrát kölcsönhatást eredményez, növelve a kötődés erősségét [165, 166]. Ezenfelül, méréseim alapján a fukozilált biantennáris core szerkezetek ~17%-a terminális galaktozilációt is mutatott, ami jellemzően fokozza a fent említett ADCC effektor funkciót [167, 168]. Fontos továbbá

megemlíteni, hogy a terminális galaktoziláció általában növeli a molekula szérumban való felezési idejét, valamint azt, hogy az analízis során detektált, nagyon kis mennyiségű (~1,3%) high mannóz szerkezetek jelenléte nem járul hozzá számottevően a szérumban való felezési idő csökkentéséhez [169]. Összességében tehát az eredmények azt mutatják, hogy a molekula ismert neutralizáló hatása mellett valamelyest érvényesülhet a glikozilációhoz köthető ADCC funkció is.

5.3. Az agaróz-SDS-CGE-UV módszer analitikai jellemzőinek értékelése

Az eredményeimben feltüntetett összefüggések alapján megerősíthető, hogy az agaróz tartalmú gélek alkalmazása során a felbontás gyakorlatilag a szelektivitás és a hatékonyság közötti egyensúly eredményeként definiálható. Ebben az esetben a borát alapú (TBE) pufferrel kapott jelentősen magasabb N értékek jobb felbontáshoz vezettek a magasabb szelektivitású, de alacsonyabb hatékonyságú acetátos (TAE) pufferrel szemben. Elmondható továbbá, hogy a TAE alapú rendszerrel megfigyelt hosszabb migrációs idő a TBE rendszerhez viszonyított, a migrációval ellentétes irányú, majd kétszeres mértékű elektroosztatikus áramlás eredménye ($EOF_{TAE} = 9.15 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{Vs}$, illetve $EOF_{TBE} = 5.45 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{Vs}$). A két futtatás közötti migrációs időkülönbség (~90 szekundum) valószínűleg a borát stabilizált agaróz gél magasabb viszkozitásának volt köszönhető ($\eta_{TAE} = 10.04 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, illetve $\eta_{TBE} = 14.45 \text{ mPa}\cdot\text{s}$), amely jelentősen lelassította az elektromigrációt. A mért és ábrázolt EOF értékek jól szemléltetik, hogy az agaróz alapú szűrőmatrixaim esetében az ellenáramú EOF (azaz a negatív töltésű mintakomponensekkel ellentétes irányú áramlás) főként a bórsav koncentrációjától (ionerősségtől) függött, és csak kis mértékben az agaróz koncentrációjától. A viszkozitási ábrán ennek ellenkezője mutatkozott: a viszkozitás főként az agaróz koncentráció függvényében változott, és csupán kis mértékben befolyásolta a borát koncentráció változása.

Ugyancsak érdekes megfigyelés volt, hogy a TAE alapú háttéreltrolit alkalmazása esetén a növekvő molekulatömegű csúcsok intenzitásának csökkenése lett észlelhető, míg a TBE puffer rendszer esetén ezzel ellentétes csúcsintenzitás eloszlást kaptam. Ez az effektus az injektálás típusának tulajdonítható, azaz a TAE pufferben történő mintabeviteli eltérés következményének, amit a kétszer nagyobb ellenáramú EOF okozott, befolyásolva ezzel a kapillárisba jutó minta mennyiségét.

Az agaróz koncentráció változtatásának hatása esetén a mintakomponensek mobilitása csökkent a gél koncentrációjának és viszkozitásának növekedésével. Az agaróz koncentrációjának emelkedésével a nem glikozilált nehézlánc (ngHC) és a nehézlánc (HC) fragmentumok közötti szelektivitás gyakorlatilag nem változott, azonban jelentősen nőtt a könnyűlánc (LC) és a nem glikozilált nehézlánc (ngHC) fragmentumok között. Ez a jelenség valószínűleg a közel azonos méretű ngHC és HC (kb. 48 és 50 kDa) fragmentumok glikoziláció által közvetített felületi töltéssűrűségének különbségeiből adódik, szemben az azonos felületi töltéssűrűségű, de különböző méretű LC és ngHC (kb. 24 és 48 kDa) alegységekkel. Más szóval, az ngHC/HC csúcsok esetén az elválasztás valószínűleg a hidrodinamikai térfogat / töltés arányukon alapult, látszólag függetlenül az agaróz koncentrációjától, ellentétben az utóbbi esettel, ahol az agaróz gél szűrő hatása játszott kulcsfontosságú szerepet.

A borát koncentráció alapú szelektivitás függés az LC/ngHC és ngHC/HC csúcspároknál mindkét esetben megmutatkozott, de különböző mértékben jelentkezett a bórsav koncentráció növelésével. Ez az eredmény az alábbi jelenségnek tudható be: a kisebb borát koncentrációknál nagyobb ellenáramú EOF hatás érvényesül, ami hasonló hatást vált ki, mint amikor egyre hosszabb kapilláris oszlopokat alkalmaznánk az elválasztáshoz. Gyakorlatilag minden agaróz koncentráció esetén a 640 mM borát koncentráció mellett érhető el a legjobb hatékonyság, míg a legjobb szelektivitást a 320 mM borátot tartalmazó háttélektrolitok alkalmazásánál figyeltem meg. Annak ellenére, hogy az alacsonyabb borát tartalmú gélek kisebb N értéket mutatnak, a legjobb felbontást az LC/ngHC pár esetében a 320 mM borát koncentrációval értem el, mely a fentebb definiált egyenletből következtetve a magas α értékek miatt volt lehetséges. Érdekes továbbá, hogy az ngHC/HC pár esetében a legjobb felbontást 0,8% agaróz tartalom és a 640 mM borát koncentráció mellett értem el.

A Ferguson-diagramok kiértékelése során megállapítható, hogy az agaróz koncentrációjának növelésével lineárisan csökkenő mobilitási tendencia figyelhető meg mindhárom SDS-fehérje fragmentumra, minden alkalmazott bórsav koncentráció mellett, ellentétben a korábban kutatócsoportunk által vizsgált dextrans alapú gélekkel, melyeknél nem lineáris változás volt definiálható.

Az agaróz-TBE rendszerben kapott éles csúcsokat és rendkívül jó felbontást a borát komplexáció eredményének tekintetem, amely az agaróz galaktóz alkotórészeivel való kölcsönhatása révén jöhetett létre, megalkotva ezzel egy új, nagy felbontású és gyors (akár 10 percen belüli elválasztást biztosító) alegység integritás analízist lehetővé tevő elválasztó

közeget. A gélrendszer rövid elválasztási idők melletti további előnyét mutatja, hogy méréseim során elhagyhatóvá váltak az egyébként sok esetben nélkülözhetetlen kapilláris regenerációs mosási lépések, melyeket más, SDS alapú elválasztó mátrixok alkalmazása során minden futtatás között elvégeznek. Ezáltal megállapítható, hogy az általam fejlesztett borát stabilizált agarózos rendszer kapillárisba való, mosás nélküli sorozatos újratöltése jelentősen lecsökkentheti a már egyébként is rendkívül gyors analízisek közötti holtidőt, továbbá, hogy a migrációs idők reprodukálhatóságának tekintetében a kapilláris regeneráló lépések nélkül is 0,75% alatti RSD értékek érhetők el.

5.4. CGE-MS és SDS-CGE-MS eredmények értékelése

Az eredmények fejezetben bemutatott CGE-MS interfészeiről és fehérjeanalitikai megközelítésről elmondható, hogy egyszerű alkalmazhatósága mellett képes teret adni bizonyos MS detektálás előtti, úgynevezett poszt-kapilláris reakcióknak, melyek segítségével egy újfajta zárt kapcsolat révén lehetővé válik a nem MS-kompatibilis (jel intenzitás csökkenést okozó) komponensek alkalmazása anélkül, hogy jelentős ionszuppressziós hatás érvényesülne az elektropray folyamat során. Továbbá, ez az egyszerűen felépíthető MS kapcsolat lehetővé teszi bármely kereskedelmi forgalomban kapható, gyári ESI ionforrás kapilláris elektroforézissel együtt történő alkalmazását, melyekhez eredetileg speciális, a különböző tömegspektrométer típusokra egyedileg fejlesztett egységeket szoktak optimalizálni.

Az elválasztási módonként három-három párhuzamos futtatás eredményeiből jól látszik, hogy az MS-kapcsolt módszer a CGE-UV mérésekhez hasonlóan, a migrációs idők és csúcs alatti terület értékek elemzése esetén is 2,35% alatti RSD értékeket mutatott, mindezt megfelelő felbontással, bizonyítva ezzel a CGE-CSFRI-ESI-MS megközelítés megbízhatóságát és hatékonyságát. Az interfész lehetővé teszi továbbá a két analitikai eszköz elektronikai áramköreinek és folyadék áramainak szétválasztását egyaránt, speciális ionforrások és ellenállások alkalmazása nélkül, ezáltal biztosítva a stabil elektropray folyamatot.

A peptidek és fehérjék gélelektroforetikus elválasztására MS detektálással együttesen alkalmazható módszernek mégis az a legnagyobb előnye, hogy SDS-kapilláris gélelektroforézis módban (SDS-CGE) a stabil elektroprayhez és elválasztó áramkör elektronikai zárásához szükséges köpenyfolyadékhoz γ -ciklodextrin (és egyéb komplexképző,

vagy hidrofób kölcsönhatást csökkentő) segéd ágenst hozzáadva hatékonyan eltávolítható a minta puffer, valamint a minta felesleges SDS tartalma, melyhez reakcióteret az interfész meghosszabbított "csőreaktor" része biztosít. A fehérjék méret szerinti elválasztásának tényét bizonyítja, hogy a vizsgált molekulák izoelektromos pontjaik alapján (inzulin – 5,4; lizozim – 11,4), valamint az elválasztó gél pH értékét (~7,0) és az alkalmazott polaritást (-) figyelembe véve a migráció CZE módban fordított sorrendben történne.

Az interfész megnevezhető hátránya a minta hígulása miatt bekövetkező, fehérje mintákra vonatkoztatott érzékenység csökkenés, azonban ezzel kapcsolatosan további optimalizálási lépéseket tervezek végezni a jövőben. Méréseimet továbbá szeretném nagyobb méretű fehérjékre is kiterjeszteni, ám ezt a doktori munkám során használt hármass kvadrupól készülék detektálási tartományából adódó limitációja eddig nem tette lehetővé.

5.5. HMO és GOS analízis eredményinek értékelése

5.5.1. A HMO mérések eredményeinek értékelése

A HMO mérések során az elválasztó mátrixok eltérő elektromigrációt befolyásoló viselkedése megoldotta a biológiai szempontból is releváns 2'FL-3FL és LNT-LNnT strukturális izomerpárok komigrációs jelenségének problémáját. A hagyományos, szénhidrát elválasztáshoz alkalmazott géلكompozíció esetében (39. ábra / A panel) azt a következtetést vontam le, hogy a különböző oligoszacharidok a töltésük és hidrodinamikai térfogatuk aránya szerint migráltak és váltak el a kapilláris zónaelektroforézis mód (CZE) elve alapján, mindezt kevesebb, mint 10 perc alatt. A dextrans és borát tartalmú gélt használva (lásd, 39. ábra / B panel) eltérő migrációs sorrend született. A nagy mennyiségű borát tartalom révén feltételezhető volt, hogy a gélszisztéma képes komplexet képezni a cukor molekulák vicinális hidroxil csoportjával, ezáltal extra töltést adva a vizsgált oligoszacharidoknak. Az elválasztás így mindössze 6,5 percet vett igénybe és kölcsönösen korrigálta a korábban alkalmazott mátrixnak az izomer párok elválasztása esetén megfigyelhető hiányosságait, ami azt jelentette, hogy az első esetben komigráló 2'FL és 3'FL izomer párt a második kompozíció sikeresen elválasztotta, míg az LNT és LNnT esetében fordítva.

Figyelembe véve, hogy minden HMO molekula redukáló véggel rendelkezik, megállapítható, hogy a vizsgált cukor szerkezetek kizárólag egyetlen APTS molekulával

lépnek jelölési reakcióba, ami ezáltal megkönnyíti azok CGE-LIF technikával történő kvantitatív analizését. A pLNnH standard segítségével készített kalibrációs görbe ily módon könnyen alkalmazható volt a többi HMO szerkezetre is. A mérések során és a jel/zaj arányok megállapításával az LOD értéke $\sim 0,03$ mg/mL-nek ($S/N = 3,71$), míg az LOQ $\sim 0,10$ mg/mL-nek ($S/N = 11,2$) bizonyult, a detektálási linearitás pedig majd három nagyságrendnyi dinamikus tartományt ölelt fel. Ez a tartomány a LED-indukált fluoreszcens detektálási rendszert figyelembe véve jónak számít, ám az egykapillárisos lézer indukált fluoreszcens, valamint tömegspektrometriás megközelítések mellett, ahol akár 4-5 nagyságrendre kiterjedő tartományok érhetők el, nem számít kiemelkedőnek. A kalibrációs görbét alkalmazva az összes ismert alacsony koncentrációjú (RFU $< 0,1$) oligoszacharidra, a humán anyatej mintában található öt alacsony előfordulású, ám fontos HMO szerkezet (LNT2, DFL, LNnT, LNT és pLNnH) koncentrációit határoztam meg, melyek ebben a sorrendben 1,95, 0,25, 0,94, 0,34, illetve 0,26 mg/mL voltak. Ezen értékek az irodalmi adatok, valamint a minta származásának ismeretében megfeleltethetők a laktáció harmadik hónapjában mérhető koncentrációknak [170].

Összességében tehát elmondható, hogy a két vizsgált nagy áteresztőképességű elválasztási rendszerrel 12 HMO mintát egyidejűleg és rendkívül rövid idő alatt lehet analizálni kiváló felbontással. Abban az esetben, amikor a strukturális izomerpárok analizésekor a szükséges felbontás elérése érdekében mindkét gél használata indokolt, a multikapilláris gélelektroforézis rendszerrel az analízis 12 mintára nézve és két gél együttes alkalmazásával is kevesebb, mint 20 perc alatt elvégezhető. Mivel dolgozatom elsődleges célja a potenciális, CE-alapú módszerek bemutatása, nagyobb mintaszámú humán tejminták szabad oligoszacharid analízise nem került fókuszba, de a jövőben mindenképp érdemes lehet megvizsgálni a technika robusztusságát és összehasonlítani az ismert kromatográfia alapú módszerekkel. Fontosnak tartom megjegyezni, hogy a HMO és GOS tartalom vizsgálatára irányuló CGE-LIF méréseim mellett végeztem a szabad cukor struktúrák azonosításra irányuló gélelektroforézis-kapcsolt tömegspektrometria alapú méréseket is, azonban ezek eredményei dolgozatomban nem kerültek bemutatásra. A CGE technikával elválasztott, APTS-jelölt minták MS azonosítására a jövőben további gélfejlesztési és interfész optimalizálási lépéseket tervezek megvalósítani, melyek során a szénhidrát elválasztó gélek ionszuppressziót okozó ágenseinek (PEG, PEO, stb.) csökkentését és a negatív MS mód érzékenységének glikánokra való optimalizálását tervezem elvégezni.

5.5.2. A GOS tartalom meghatározás eredményeinek értékelése

A galaktooligoszacharid mérések során kapott referencia elektroferogram azonos számú csúcst eredményezett, mint a korábban ugyanezenre a mintára vonatkozó HPLC analízis [161], azzal a különbséggel, hogy a CGE futtatások ideje két injektálás között háromszor gyorsabbnak bizonyult. A három mérési nap során vizsgált átlagos migrációs idők és csúcs alatti területek reprodukálhatósága rend szerint 0,276 és 2,496 % RSD értékeket mutattak. Az amiloglükozidáz enzim kezelés során látszólag az összes kisebb (15-ös és 21-es közötti tartományban lévő) csúcs az 1. csúcsba tolódott, ami azt sugallta, hogy ezek mind glükóz építőegységekből álló maltooligoszacharidok voltak. Az amiloglükozidázos emésztést követő β -galaktozidázos kezelés eredményeképp az összes csúcs eltolódott a 2-es számmal jelölt galaktóz csúcsba, melyből az a következtetés volt levonható, hogy ezek a cukrok mind galaktóz egységekből felépülő GOS típusú struktúrák. A két enzim kezelés utáni analízisek eredményeinek különbségét felhasználva kiszámolható volt a minta teljes galaktooligoszacharid tartalma, melyet 37,23 g/100 g értékben határoztam meg. Ez az eredmény jól összevethető a hivatalosan elfogadott, HPLC módszerrel meghatározott 37,0 g/100 g értékkel [171], és ezáltal elmondható, hogy a bemutatott CGE alapú módszer alkalmasnak bizonyul a csecsemő tápszer prebiotikus GOS tartalmának meghatározására. Eredményeim alapján talán nem téves a felvetés, hogy a bemutatott elektroforetikus módszer képes akár helyettesíteni is a hosszabb analízis idővel rendelkező kromatográfias megközelítést, illetve ortogonális módszerként alkalmas lehet a különböző tápszerekben és más laktózt tartalmazó mintákban található GOS tartalom pontos kimutatására.

6. Összefoglalás

Az omalizumab és a bamlanivimab bioterapeutikumok fehérje-, és N-glikán szintű, CGE-alapú analízise doktori értekezésem fontos részét képezi. Az asztma elleni antitest esetében elsőként SDS-CGE általi tisztaság-, és alegység integritás vizsgálatokat végeztem, melyek során megállapítottam, hogy a gyógyszer kis mértékben sem mutatja a nem glikozilált nehézlánc (ngHC) fragmentum jelenlétét, ily módon a teljes mAb tartalom nehézlánca 100%-ban N-glikozilációs módosulást hordoz. A fehérje intakt formája hosszabb migrációs időbeli eltérést mutat a várt eredményekhez képest, mely a molekula kiterjedt hidrodinamikus térfogatú Y alakja, valamint a dextrans és borát tartalmú elválasztó gélben történő sajátos migrációs tulajdonságai révén magyarázható. További megfigyeléseim azt mutatták, hogy a termék előállítása során keletkezett, szabad alegységek is jelen vannak a mintában, ami vélhetően a nem teljesen végbemenő kémiai reakciók (diszulfid hidak kialakulásának) következménye. A termék ennek ellenére tisztának tekinthető, de az alegység integritás tesztek alapján célszerű a fehérje glikozilációs mintázatának egyidejű vizsgálata. Az omalizumab N-glikán analízise során megállapítást nyert, hogy csak az ún. high-mannóz cukor szerkezetek afukoziláltak. Ez, valamint a monogalaktozilált glikán szerkezetek mennyisége hosszabb keringési időt feltételez.

A bamlanivimab terápiás antitest esetében a fehérjevizsgálatok során reprodukálhatósági vizsgálatokkal is alátámasztottam a CGE alapú módszer alkalmazhatóságát. A kapott RSD értékek alapján a módszer kiválóan bizonyult mind redukált, mind nem redukált fehérje mérések esetén. Az intakt monoklonális antitest SDS-CGE analízisekor az antitest mellett néhány kisebb melléktermék jelenlétét is megfigyeltem, melyek az omalizumabhoz hasonlóan a Covid elleni antitest esetében is az előállítás során keletkező szabadon marad fragmensek jelenlétével magyarázhatók. A fehérje töltés variánsainak meghatározása érdekében a tisztaság vizsgálat mellett cIEF analízist is végeztem, mely során a kapott eredményekből arra következtettem, hogy a megjelenő, izoelektromos pontjaik szerint savas jellegű struktúrákra átfogó N-glikozilációs analízist célszerű végezni a szíálsav tartalom pontos meghatározásához. Az antitest N-glikánjainak profilozása ezt követően kimutatta, hogy a gyógyszer teljes szíálsavas struktúráinak mennyisége a felvetés ellenére meglepően alacsony, és a jelenség a polipeptid láncban lévő savas jellegű aminosavak és a fehérje lehetséges deamidációjának eredményéből következhet. Az antitest N-glikánok core struktúráinak fukozilációs szintje 90% felettinek bizonyult, melyből az irodalmi adatok fényében arra következtettem, hogy a

termékben lévő afukozilált glikán tartalom is mutathat valamilyen ADCC funkciót, ami a CGE-LIF mérések által megerősíthető. Ezenfelül, a fukozilált biantennáris core szerkezetek jelentős része terminális galaktózilációt is mutat, ami az említett ADCC effektor funkciót fokozhatja.

A standard mAb alegység integritás és glikozilációs vizsgálatok mellett az SDS-kapilláris gélelektroforézis mérések területén alapértelmezettnek tekinthető dextrans/borát alapú gélrendszer alkalmazhatóságát alapul véve kifejlesztettem egy agaróz alapú elválasztó közeget, mely tulajdonságaiban hasonló, de teljesítményében és analitikai paramétereiben eltérőnek bizonyul a monoklonális antitestek analízisére nézve a jól ismert SDS-MW rendszerhez képest. Az agaróz-SDS-CGE módszer analitikai jellemzőinek értékelése során megerősítést nyert, hogy a felbontás (R_s) gyakorlatilag a szelektivitás (α) és a hatékonyság (N) közötti összefüggés eredményeként definiálható. A kifejlesztett agaróz alapú szűrőmátrixok esetében a jelentős mértékű, ellenáramú EOF főként a bórsav koncentrációtól való függést mutat, míg a viszkozitás jellemzően az agaróz koncentráció függvényében változik. Bemutattam továbbá, hogy a gélrendszer a rövid elválasztási idők biztosítása mellett kevesebb előkészületet igényel a párhuzamos mérések között, ugyanis alkalmazásával elhagyhatóvá válnak a hosszadalmas kapilláris regenerációs mosási lépések, melyeket más, SDS alapú elválasztó mátrixok alkalmazása során minden futtatás között szükséges elvégezni. Ezáltal elmondható, hogy az általam fejlesztett borát stabilizált agaróz rendszer kapilláris oszlopokba való, mosás nélküli sorozatos újratöltése jelentősen lecsökkentheti a már egyébként is rendkívül gyors (akár 10 perces) analízisek közötti holtidőt, továbbá, hogy a migrációs idők reprodukálhatóságának tekintetében a kapilláris regeneráló lépések nélkül is 0,75% alatti RSD értékek érhetők el.

Doktori munkám során a CGE-UV és CGE-LIF alapú módszerek mellett a tömegspektrometriás detektálás lehetőségét is vizsgáltam. Kifejlesztettem egy új típusú interfészt a két analitikai eszköz összekapcsolására, mely potenciálisan megoldást kínálhat a fehérje tisztaságvizsgálatok során zavaró, nem MS-kompatibilis komponensek ionszuppressziós hatásának csökkentése mellett a fehérje molekulák (és szennyezőik) méret szerinti elválasztására és az elválasztás utáni MS detektálására, ezáltal pontos méretük meghatározására. Az ilyen koaxiális típusú CGE-MS interfésznek számos előnye mellett megemlíthető hátránya, hogy a nagyobb folyadékáramú köpenyfolyadék a minta hígulását okozhatja, amelyre további optimalizációs lépéseket tervezek elvégezni a jövőben.

A HMO és GOS analíziseim során bemutattam, hogy a különböző elválasztási módszerek eltérő elektromigrációs viselkedésük révén különböző előnyöket kínálnak a nem fehérjéhez

kötött oligoszacharidok, valamint azok struktúrális izomerjeinek hatékony szeparációjára. Ismertettem, hogy egy konvencionális szénhidrát elválasztó gél, valamint egy szintén a kereskedelmi forgalomban kapható, méret szerinti fehérje elválasztáshoz alkalmazott borát-dextrán alapú elválasztó mátrix a szabad cukrok esetén is alkalmazható, nagy felbontást és rövid analízis időt biztosítva. Továbbá megállapítottam, hogy mindkét géلكompozíció alkalmas a HMO szerkezetek hatékony elválasztására, akár multikapilláris elektroforézis rendszerben is, lecsökkentve ezzel a teljes analízis időtartamát és növelve a módszer robusztusságát. Végül pedig megállapítottam, hogy az APTS általi HMO és GOS derivatizálási reakciók a CGE-LIF technikával történő, nem csupán minőségi, de mennyiségi analízist is lehetővé teszik.

7. Summary

The protein and N-glycan level analysis of omalizumab and bamlanivimab bioterapeutics represents an important part of my doctoral dissertation. In the case of the anti-asthma drug (omalizumab), I first conducted purity and subunit integrity tests using SDS-CGE, where I found that the drug shows no presence of the non-glycosylated heavy chain (ngHC) fragment, indicating 100% N-glycosylation modification of the mAb heavy chain. The intact form of the protein showed longer migration time deviation from the expected results, explained by the extended Y shape mediated larger hydrodynamic volume of the molecule and its specific migration properties in the dextran-borate-containing separation gel. Further observations revealed the presence of free protein subunits formed during the product manufacturing, likely due to incomplete chemical reactions (disulfide bridge formation). Nevertheless, the product can be considered pure, and based on the subunit integrity tests, it is recommended to examine its N-glycosylation pattern as well. Analysis of the omalizumab N-glycans revealed that only the high-mannose sugar structures were afucosylated. Additionally, the quantity of monogalactosylated glycans suggested longer circulation time.

As the Covid-19 antibody bamlanivimab, reproducibility studies during protein analysis supported the applicability of the CGE-based method. The obtained RSD values indicated the excellence of the method in both reduced and non-reduced protein measurements. During SDS-CGE analysis of intact monoclonal antibodies, I observed the presence of minor by-products, similar to omalizumab, possibly resulting from free fragments formed during production. To determine its charge variants, alongside purity assessment, I conducted cIEF analysis, which prompted the need of comprehensive N-glycosylation characterization based on the appearing protein isoelectric point values which assumed the presence of high sialic acid content. Subsequent antibody N-glycan profiling revealed surprisingly low levels of total sialic acid structures, possibly resulting from acidic amino acids in the polypeptide chain and potential deamidation of the protein. The fucosylation level of the antibody N-glycan core structures exceeded 90%, suggesting that the remaining low afucosylated glycan content in the product may exhibit some ADCC function, which can be confirmed by CGE-LIF measurements. Furthermore, a significant portion of the fucosylated biantennary core structures showed terminal galactosylation, potentially enhancing the above mentioned ADCC effector function.

In addition to the standard subunit integrity and glycosylation analysis of mAbs, I developed an agarose-based separation media, considering the applicability of the earlier studied dextran/borate-based gel-buffer system, otherwise conventional for SDS-capillary gel electrophoresis measurements. Evaluation of the analytical characteristics of the agarose-SDS-CGE method confirmed that resolution (R_s) is practically defined as by the interplay between selectivity (α) and efficiency (N). For the developed agarose-based sieving matrices, the significant counter-current EOF was dependent mainly on the boric acid concentration, while the viscosity typically varied with agarose concentration. I also demonstrated that the gel system, besides ensuring short separation times, requires less capillary preparation between parallel measurements since it eliminates the need for the time-consuming capillary regeneration/washing steps necessary between runs with other SDS-polymer based separation matrices. Consequently, capillary reloading of the developed borate-stabilized agarose system can significantly reduce the dead time between the already extremely fast (<10 minutes) analyses, and without the capillary regeneration steps, the migration time reproducibility was below 0.75% RSD.

During my doctoral work, I also explored the possibility of a specific, CGE-coupled mass spectrometric detection approach. I developed a novel CE-ESI-MS interface to connect the two analytical tools. This new interface is potentially offering a solution to reduce the ion suppression effects of non-MS-compatible components during protein purity analysis, enabling size-based separation of protein molecules (and their contaminants), and post-separation MS detection for precise size determination. Despite numerous advantages of the such coaxial CGE-MS interfaces, their notable drawback is that the higher flow rate sheath liquid may cause sample dilution, prompting further optimization steps planned for the future.

In my HMO and GOS analyses, I demonstrated that the use of different separation matrices offer distinct advantages for effective separation of non-protein-bound oligosaccharides and their structural isomers due to their differential electromigration behaviors. I showed that both a conventional carbohydrate separation gel and a borate-dextran-based separation matrix otherwise developed for size-based protein separation can also be applied for high-resolution and rapid free oligosaccharide analysis. Furthermore, I found that both gel compositions are suitable for efficient separation of HMO structures, even in a multicapillary electrophoresis format, reducing the total analysis time and increasing the robustness of the method. Finally, I determined that HMO and GOS derivatization reactions via APTS enable not only qualitative but also quantitative analysis using CGE-LIF.

8. Irodalomjegyzék

1. István, D.B., *Műszeres analitikai technikák a gyógyszerészi és bioanalitikai vizsgálatokban*. 2011, Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerhatástani Tanszék Gyógyszerészi műszeres- és bioanalitikai részleg.
2. Bizottság, E.G.E., *A biológiaiailag hasonló gyógyszerek helyzete az EU-ban*. 2019.
3. Attila, D.G., *A kapilláris zónaelektroforézis*. 2000, Debreceni Egyetemi Kiadó.
4. Vékey, K.r., A.s. Telekes, and A. Vertes, *Medical applications of mass spectrometry*. 1st ed. 2008, Amsterdam; Boston: Elsevier. 581 p.
5. Voynov, V. and J.A. Caravella, *Therapeutic proteins : methods and protocols*. 2nd ed. Methods in molecular biology,. 2012, New York: Humana Press ; Springer. xi, 502 p.
6. Mullard, A., *FDA approves 100th monoclonal antibody product*. Nat Rev Drug Discov, 2021. **20**(7): p. 491-495.
7. Luo, X., K.C. Herold, and S.D. Miller, *1 - Introduction to biologics and monoclonal antibodies*, in *Therapeutic Antibody Engineering*, W.R. Strohl and L.M. Strohl, Editors. 2012, Woodhead Publishing. p. 1-595.
8. An, Z., *Therapeutic monoclonal antibodies : from bench to clinic*. 2009, Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons. xv, 889 p., 16 p. of plates.
9. Buday László, N.L., Perczel András, ed. *Ezerarcú fehérjék*. 1 ed. 2018, Semmelweis Kiadó. 960.
10. Chan, A.C. and P.J. Carter, *Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 301-16.
11. Ratner, M., *Genentech's glyco-engineered antibody to succeed Rituxan*. Nat Biotechnol, 2014. **32**(1): p. 6-7.
12. Reusch, D. and M.L. Tejada, *Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes*. Glycobiology, 2015. **25**(12): p. 1325-34.
13. Hemperly, A. and N. Vande Casteele, *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Infliximab in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease*. Clin Pharmacokinet, 2018. **57**(8): p. 929-942.
14. Sharma, R., C.L. Sharma, and A. Mahajan, *Biological agents targeting beyond TNF-alpha*. Indian J Crit Care Med, 2008. **12**(4): p. 181-9.
15. Firestein, G.S., et al., *Kelley and Firestein's textbook of rheumatology*. Tenth edition. ed. 2017, Philadelphia, PA: Elsevier. 1 volume (pagings).
16. Prica, A., et al., *Rituximab in Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukaemia: A Practice Guideline*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2017. **29**(1): p. e13-e28.
17. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. ed. 2015, New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group. 1 volume (various pagings).
18. Salzberger, B., et al., *Epidemiology of SARS-CoV-2*. Infection, 2021. **49**(2): p. 233-239.
19. *COVID-19 Monoclonal Antibodies*. 2023 2023. 02. 27.]; Available from: <https://www.cms.gov/monoclonal>.
20. Fekete, S., et al., *Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013. **42**: p. 74-83.
21. Ermolenko, Y., et al., *Simultaneous determination of rifabutin and human serum albumin in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2017. **85**: p. 55-60.
22. Hjerten, S., *Free zone electrophoresis*. Chromatogr Rev, 1967. **9**(2): p. 122-219.
23. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *Free-zone electrophoresis in glass capillaries*. Clin Chem, 1981. **27**(9): p. 1551-3.
24. Galbács, G.I., István; Felinger, Attila; Csóka, Balázs;, *Illusztrált segédanyag a modern műszeres analitikai kémia oktatásához*. 2013.

25. Li, M., et al., *Interlaboratory method validation of capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) methodology for analysis of mAbs*. *Electrophoresis*, 2021. **42**(19): p. 1900-1913.
26. Wiesner, R., et al., *An interlaboratory capillary zone electrophoresis-UV study of various monoclonal antibodies, instruments, and ϵ -aminocaproic acid lots*. *Electrophoresis*, 2023. **44**(15-16): p. 1247-1257.
27. Matsumoto, H., H. Haniu, and N. Komori, *Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE*, in *Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols*, B.T. Kurien and R.H. Scofield, Editors. 2019, Springer New York: New York, NY. p. 101-105.
28. Zhang, Z., et al., *High-throughput proteomics*. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2014. **7**: p. 427-54.
29. Chen, D., et al., *Recent advances (2019-2021) of capillary electrophoresis-mass spectrometry for multilevel proteomics*. *Mass Spectrom Rev*, 2023. **42**(2): p. 617-642.
30. Di Venere, M., et al., *Advances in the analysis of "less-conventional" human body fluids: An overview of the CE- and HPLC-MS applications in the years 2015-2017*. *Electrophoresis*, 2018. **39**(1): p. 160-178.
31. Wang, W., W. Wang, and G.S.M. Lageveen-Kammeijer, *CE-MS Approaches for Glyco(proteo)mic Analysis*, in *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Proteomics and Metabolomics*. 2022. p. 335-375.
32. Werner, W.E., et al., *Size-Dependent Separation of Proteins Denatured in SDS by Capillary Electrophoresis Using a Replaceable Sieving Matrix*. *Analytical Biochemistry*, 1993. **212**(1): p. 253-258.
33. He, Y. and E.S. Yeung, *Rapid Determination of Protein Molecular Weight by the Ferguson Method and Multiplexed Capillary Electrophoresis*. *Journal of Proteome Research*, 2002. **1**(3): p. 273-277.
34. Ogston, A.G., *The spaces in a uniform random suspension of fibres*. *Transactions of the Faraday Society*, 1958. **54**(0): p. 1754-1757.
35. Ferguson, K.A., *Starch-Gel Electrophoresis--Application to the Classification of Pituitary Proteins and Polypeptides*. *Metabolism*, 1964. **13**: p. SUPPL:985-1002.
36. Rodbard, D. and A. Chrambach, *Unified Theory for Gel Electrophoresis and Gel Filtration**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1970. **65**(4): p. 970-977.
37. Bryan, J.K., *Molecular weights of protein multimers from polyacrylamide gel electrophoresis*. *Analytical Biochemistry*, 1977. **78**(2): p. 513-519.
38. Tietz, D., *Gel electrophoresis of intact subcellular particles*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1987. **418**: p. 305-344.
39. Guttman, A., C. Filep, and B.L. Karger, *Fundamentals of Capillary Electrophoretic Migration and Separation of SDS Proteins in Borate Cross-Linked Dextran Gels*. *Analytical Chemistry*, 2021. **93**(26): p. 9267-9276.
40. Sarkozy, D. and A. Guttman, *Capillary Sodium Dodecyl Sulfate Agarose Gel Electrophoresis of Proteins*. *Gels*, 2022. **8**(2).
41. Shively, J.E., *The chemistry of protein sequence analysis*, in *Proteomics in Functional Genomics: Protein Structure Analysis*, P. Jollès and H. Jörnvall, Editors. 2000, Birkhäuser Basel: Basel. p. 99-117.
42. Domon, B. and R. Aebersold, *Mass Spectrometry and Protein Analysis*. *Science*, 2006. **312**(5771): p. 212-217.
43. Guerrero, I.C. and O. Kleiner, *Application of Mass Spectrometry in Proteomics*. *Bioscience Reports*, 2005. **25**(1-2): p. 71-93.
44. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. *Nature*, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
45. Gahoual, R., et al., *Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry*. *MABs*, 2013. **5**(3): p. 479-90.

46. Skinner, J.P., et al., *Introduction of the mass spread function for characterization of protein conjugates*. Anal Chem, 2012. **84**(2): p. 1172-7.
47. Boros, B.B., Anita; Csóka, Balázs; Dörnyei, Ágnes; Farkas, Nelli; Felinger, Attila; Kiss, Ibolya; Kilár, Anikó; Kilár, Ferenc; Lambert, Nándor; Makszin, Lilla; Páger, Csilla; Petz, Andrea, *Műszeres analitika gyakorlatok - Egyetemi gyakorlati jegyzet*. 2011, Pécsi Tudományegyetem.
48. De Hoffmann, E. and V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*. 2007: John Wiley & Sons.
49. Olivares, J.A., et al., *On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1987. **59**(8): p. 1230-1232.
50. Mariño, K., et al., *A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(10): p. 713-23.
51. Drake, P.M., et al., *Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation*. Clin Chem, 2010. **56**(2): p. 223-36.
52. Varki, A. and P. Gagneux, *Biological Functions of Glycans*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2015, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Copyright 2015-2017 by The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California. All rights reserved.: Cold Spring Harbor (NY). p. 77-88.

53. Wang, M., G. Yu, and H.W. Ransom, *Integrative Analysis of Proteomic, Glycomic, and Metabolomic Data for Biomarker Discovery*. IEEE J Biomed Health Inform, 2016. **20**(5): p. 1225-1231.
54. Hancock, W.S., *Glycosylation, who cares?* J Proteome Res, 2002. **1**(4): p. 297.
55. Szilágyi, T.G., et al., *Analysis of the oligosaccharide composition in wort samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection*. Food Chem, 2018. **256**: p. 129-132.
56. Ruhaak, L.R., A.M. Deelder, and M. Wührer, *Oligosaccharide analysis by graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2009. **394**(1): p. 163-74.
57. Bynum, M.A., et al., *Characterization of IgG N-glycans employing a microfluidic chip that integrates glycan cleavage, sample purification, LC separation, and MS detection*. Anal Chem, 2009. **81**(21): p. 8818-25.
58. Kurihara, T., et al., *Rapid analysis of N-linked oligosaccharides in glycoproteins (ovalbumin, ribonuclease B and fetuin) by reversed-phase ultra-performance liquid chromatography with fluorescence detection and electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry*. Biomed Chromatogr, 2009. **23**(5): p. 516-23.
59. Kang, P., Y. Mechref, and M.V. Novotny, *High-throughput solid-phase permethylation of glycans prior to mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008. **22**(5): p. 721-34.
60. Szigeti, M. and A. Guttman, *High-Throughput N-Glycan Analysis with Rapid Magnetic Bead-Based Sample Preparation*. Methods Mol Biol, 2017. **1503**: p. 265-272.
61. Hajba, L., E. Csanky, and A. Guttman, *Liquid phase separation methods for N-glycosylation analysis of glycoproteins of biomedical and biopharmaceutical interest. A critical review*. Anal Chim Acta, 2016. **943**: p. 8-16.
62. Mantovani, V., et al., *Recent advances in capillary electrophoresis separation of monosaccharides, oligosaccharides, and polysaccharides*. Electrophoresis, 2018. **39**(1): p. 179-189.
63. Lu, G., et al., *Capillary Electrophoresis Separations of Glycans*. Chem Rev, 2018. **118**(17): p. 7867-7885.
64. Szekrényes, Á., et al., *Multi-Site N-glycan mapping study 1: Capillary electrophoresis - laser induced fluorescence*. MAbs, 2016. **8**(1): p. 56-64.
65. Filep, C., et al., *N-glycosylation analysis of biopharmaceuticals by multicapillary gel electrophoresis: Generation and application of a new glucose unit database*. J Pharm Biomed Anal, 2020. **178**: p. 112892.
66. Sarkozy, D., et al., *Ultrafast high-resolution analysis of human milk oligosaccharides by multicapillary gel electrophoresis*. Food Chem, 2021. **341**(Pt 2): p. 128200.

67. Guttman, A., *High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 461-2.
68. Tarentino, A.L., R.B. Trimble, and T.H. Plummer, Jr., *Enzymatic approaches for studying the structure, synthesis, and processing of glycoproteins*. Methods Cell Biol, 1989. **32**: p. 111-39.
69. Patel, T., et al., *Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins*. Biochemistry, 1993. **32**(2): p. 679-93.
70. Iyer, R.N. and D.M. Carlson, *Alkaline borohydride degradation of blood group H substance*. Arch Biochem Biophys, 1971. **142**(1): p. 101-5.
71. Mulloy, B., et al., *Structural Analysis of Glycans*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2015, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Copyright 2015-2017 by The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California. All rights reserved.: Cold Spring Harbor (NY). p. 639-52.

72. Szabo, Z., A. Guttman, and B.L. Karger, *Rapid release of N-linked glycans from glycoproteins by pressure-cycling technology*. Anal Chem, 2010. **82**(6): p. 2588-93.
73. Szigeti, M., et al., *Rapid N-glycan release from glycoproteins using immobilized PNGase F microcolumns*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016. **1032**: p. 139-143.
74. Hoffstetter-Kuhn, S., et al., *Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(15): p. 1541-1547.
75. Jackson, P., *The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid. Detection of picomolar quantities by an imaging system based on a cooled charge-coupled device*. Biochem J, 1990. **270**(3): p. 705-13.
76. Jackson, P., *The analysis of fluorophore-labeled glycans by high-resolution polyacrylamide gel electrophoresis*. Anal Biochem, 1994. **216**(2): p. 243-52.
77. Honda, S., K. Suzuki, and K. Takechi, *Simultaneous determination of iodate and periodate by capillary zone electrophoresis: application to carbohydrate analysis*. Anal Biochem, 1989. **177**(1): p. 62-6.
78. Nashabeh, W. and Z. el Rassi, *Capillary zone electrophoresis of linear and branched oligosaccharides*. J Chromatogr, 1992. **600**(2): p. 279-87.
79. Warder, S.E., et al., *Reducing agent-mediated precipitation of high-abundance plasma proteins*. Anal Biochem, 2009. **387**(2): p. 184-93.
80. Olajos, M., et al., *Sample preparation for the analysis of complex carbohydrates by multicapillary gel electrophoresis with light-emitting diode induced fluorescence detection*. Anal Chem, 2008. **80**(11): p. 4241-6.
81. Suzuki, T., et al., *Carbohydrate-binding property of peptide: N-glycanase from mouse fibroblast L-929 cells as evaluated by inhibition and binding experiments using various oligosaccharides*. J Biol Chem, 1995. **270**(25): p. 15181-6.
82. Huang, Y. and R. Orlando, *Kinetics of N-Glycan Release from Human Immunoglobulin G (IgG) by PNGase F: All Glycans Are Not Created Equal*. J Biomol Tech, 2017. **28**(4): p. 150-157.
83. Szigeti, M. and A. Guttman, *Sample Preparation Scale-Up for Deep N-glycomic Analysis of Human Serum by Capillary Electrophoresis and CE-ESI-MS*. Mol Cell Proteomics, 2019. **18**(12): p. 2524-2531.
84. Szigeti, M., et al., *Fully Automated Sample Preparation for Ultrafast N-Glycosylation Analysis of Antibody Therapeutics*. J Lab Autom, 2016. **21**(2): p. 281-6.
85. Mittermayr, S. and A. Guttman, *Influence of molecular configuration and conformation on the electromigration of oligosaccharides in narrow bore capillaries*. Electrophoresis, 2012. **33**(6): p. 1000-7.
86. Váradi, C., C. Lew, and A. Guttman, *Rapid magnetic bead based sample preparation for automated and high throughput N-glycan analysis of therapeutic antibodies*. Anal Chem, 2014. **86**(12): p. 5682-7.

87. Kováts, E., *Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone*. Helvetica Chimica Acta, 1958. **41**(7): p. 1915-1932.
88. Jarvas, G., et al., *Triple-Internal Standard Based Glycan Structural Assignment Method for Capillary Electrophoresis Analysis of Carbohydrates*. Anal Chem, 2016. **88**(23): p. 11364-11367.
89. Jarvas, G., M. Szigeti, and A. Guttman, *GUcal: An integrated application for capillary electrophoresis based glycan analysis*. Electrophoresis, 2015. **36**(24): p. 3094-6.
90. Guttman, A., M. Kerekyarto, and G. Jarvas, *Effect of Separation Temperature on Structure Specific Glycan Migration in Capillary Electrophoresis*. Anal Chem, 2015. **87**(23): p. 11630-4.
91. Jarvas, G., M. Szigeti, and A. Guttman, *Structural identification of N-linked carbohydrates using the GUcal application: A tutorial*. J Proteomics, 2018. **171**: p. 107-115.
92. Mechref, Y. and M.V. Novotny, *Mass spectrometric mapping and sequencing of N-linked oligosaccharides derived from submicrogram amounts of glycoproteins*. Anal Chem, 1998. **70**(3): p. 455-63.
93. Gattu, S., C.L. Crihfield, and L.A. Holland, *Microscale Measurements of Michaelis-Menten Constants of Neuraminidase with Nanogel Capillary Electrophoresis for the Determination of the Sialic Acid Linkage*. Anal Chem, 2017. **89**(1): p. 929-936.
94. Szigeti, M. and A. Guttman, *Automated N-Glycosylation Sequencing Of Biopharmaceuticals By Capillary Electrophoresis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 11663.
95. Sheldon, R.A. and S. van Pelt, *Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how*. Chem Soc Rev, 2013. **42**(15): p. 6223-35.
96. Krenková, J. and F. Foret, *Immobilized microfluidic enzymatic reactors*. Electrophoresis, 2004. **25**(21-22): p. 3550-63.
97. Farsang, R., et al., *Immobilized exoglycosidase matrix mediated solid phase glycan sequencing*. Analytica Chimica Acta, 2022. **1215**: p. 339906.
98. Shaheen, R. and J.P. Senn, *Quantification of polysaccharides in water using capillary electrophoresis*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2005. **85**(3): p. 177-198.
99. Kabel, M.A., et al., *Capillary electrophoresis fingerprinting, quantification and mass-identification of various 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate-derivatized oligomers derived from plant polysaccharides*. J Chromatogr A, 2006. **1137**(1): p. 119-26.
100. Smith, R.D., et al., *Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface*. Analytical Chemistry, 1988. **60**(5): p. 436-441.
101. Johansson, I.M., et al., *Capillary electrophoresis-atmospheric pressure ionization mass spectrometry for the characterization of peptides. Instrumental considerations for mass spectrometric detection*. J Chromatogr, 1991. **554**(1-2): p. 311-27.
102. Janini, G.M., et al., *A sheathless nanoflow electrospray interface for on-line capillary electrophoresis mass spectrometry*. Anal Chem, 2003. **75**(7): p. 1615-9.
103. Gennaro, L.A., et al., *Capillary electrophoresis/electrospray ion trap mass spectrometry for the analysis of negatively charged derivatized and underivatized glycans*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002. **16**(3): p. 192-200.
104. Zürgbig, P., et al., *Biomarker discovery by CE-MS enables sequence analysis via MS/MS with platform-independent separation*. Electrophoresis, 2006. **27**(11): p. 2111-25.
105. Bunz, S.C., E. Rapp, and C. Neusüss, *Capillary electrophoresis/mass spectrometry of APTS-labeled glycans for the identification of unknown glycan species in capillary electrophoresis/laser-induced fluorescence systems*. Anal Chem, 2013. **85**(21): p. 10218-24.
106. Gennaro, L.A. and O. Salas-Solano, *On-line CE-LIF-MS technology for the direct characterization of N-linked glycans from therapeutic antibodies*. Anal Chem, 2008. **80**(10): p. 3838-45.
107. Maxwell, E.J., et al., *A promising capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry method for carbohydrate analysis*. Electrophoresis, 2011. **32**(16): p. 2161-6.

108. Lin, L., et al., *Analysis of heparin oligosaccharides by capillary electrophoresis-negative-ion electrospray ionization mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2017. **409**(2): p. 411-420.
109. Maxwell, E.J., et al., *Decoupling CE and ESI for a more robust interface with MS*. Electrophoresis, 2010. **31**(7): p. 1130-1137.
110. Guttman, A. and T. Pritchett, *Capillary gel electrophoresis separation of high-mannose type oligosaccharides derivatized by 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonic acid*. Electrophoresis, 1995. **16**(10): p. 1906-11.
111. Amon, S., A.D. Zamfir, and A. Rizzi, *Glycosylation analysis of glycoproteins and proteoglycans using capillary electrophoresis-mass spectrometry strategies*. Electrophoresis, 2008. **29**(12): p. 2485-507.
112. Ruiz-Calero, V., et al., *Pressure-assisted capillary electrophoresis-electrospray ion trap mass spectrometry for the analysis of heparin depolymerised disaccharides*. J Chromatogr A, 2001. **914**(1-2): p. 277-91.
113. Atwood, J.A., III, et al., *Quantitation by Isobaric Labeling: Applications to Glycomics*. Journal of Proteome Research, 2008. **7**(1): p. 367-374.
114. Giménez, E., V. Sanz-Nebot, and A. Rizzi, *Relative quantitation of glycosylation variants by stable isotope labeling of enzymatically released N-glycans using [12C]/[13C] aniline and ZIC-HILIC-ESI-TOF-MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(23): p. 7307-7319.
115. Váradi, C., et al., *Quantitative twoplex glycan analysis using 12C6 and 13C6 stable isotope 2-aminobenzoic acid labelling and capillary electrophoresis mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016. **408**(30): p. 8691-8700.
116. Bode, L., *Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama*. Glycobiology, 2012. **22**(9): p. 1147-62.
117. Tissier, H., *Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique)*. 1900: Méd.--Paris.
118. Moro, E., *Morphologische und bakteriologische Untersuchungen über die Darmbakterien des Säuglings: Die Bakteriumflora des normalen Frauenmilchstuhls*. Jahrbuch Kinderh. **61**: p. 686-734.
119. Escherich, T., *Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung*. 2016: hansebooks.
120. Kunz, C., *Historical aspects of human milk oligosaccharides*. Adv Nutr, 2012. **3**(3): p. 430s-9s.
121. Knol, J., et al., *Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005. **40**(1): p. 36-42.
122. Bode, L., *Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond*. Nutr Rev, 2009. **67 Suppl 2**: p. S183-91.
123. Atochina, O. and D. Harn, *LNFP III/LeX-stimulated macrophages activate natural killer cells via CD40-CD40L interaction*. Clin Diagn Lab Immunol, 2005. **12**(9): p. 1041-9.
124. Kunz, C., et al., *Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects*. Annu Rev Nutr, 2000. **20**: p. 699-722.
125. Delgado, S., et al., *Staphylococcus epidermidis strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics*. BMC Microbiol, 2009. **9**: p. 82.
126. Ninonuevo, M.R., et al., *A strategy for annotating the human milk glycome*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(20): p. 7471-80.
127. Grabarics, M., et al., *Analytical characterization of human milk oligosaccharides - potential applications in pharmaceutical analysis*. J Pharm Biomed Anal, 2017. **146**: p. 168-178.
128. Kobata, A., *Structures and application of oligosaccharides in human milk*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2010. **86**(7): p. 731-47.
129. Zeuner, B. and A.S. Meyer, *Enzymatic transglucosylation for synthesis of human milk oligosaccharides*. Carbohydrate Research, 2020. **493**: p. 108029.

130. Rassi, Z.E. *Carbohydrate analysis : high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis*. 1995.
131. Idda, I., et al., *Gas chromatography analysis of major free mono- and disaccharides in milk: Method assessment, validation, and application to real samples*. *Journal of Separation Science*, 2016. **39**(23): p. 4577-4584.
132. Thurl, S., B. Muller-Werner, and G. Sawatzki, *Quantification of individual oligosaccharide compounds from human milk using high-pH anion-exchange chromatography*. *Anal Biochem*, 1996. **235**(2): p. 202-6.
133. Sarkozy, D., et al., *Capillary electrophoresis analysis of industrial galactooligosaccharides*. *J Pharm Biomed Anal*, 2023. **233**: p. 115434.
134. Swartz, M.E. and I.S. Krull, *Analytical Method Development and Validation*. 1997: Taylor & Francis.
135. Honour, J.W., *Development and validation of a quantitative assay based on tandem mass spectrometry*. *Ann Clin Biochem*, 2011. **48**(Pt 2): p. 97-111.
136. Sarkozy, D. and A. Guttman, *Analysis of Peptides and Proteins by Native and SDS Capillary Gel Electrophoresis Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry via a Closed-Circuit Coaxial Sheath Flow Reactor Interface*. 2023. **95**(18): p. 7082-7086.
137. Maxwell, E.J. and D.D. Chen, *Twenty years of interface development for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry*. *Anal Chim Acta*, 2008. **627**(1): p. 25-33.
138. Zhang, W. and R. Ramautar, *CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2018-2020*. 2021. **42**(4): p. 381-401.
139. Wojcik, R., et al., *Simplified capillary electrophoresis nanospray sheath-flow interface for high efficiency and sensitive peptide analysis*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010. **24**(17): p. 2554-60.
140. Issaq, H.J., et al., *Sheathless electrospray ionization interfaces for capillary electrophoresis-mass spectrometric detection advantages and limitations*. *J Chromatogr A*, 2004. **1053**(1-2): p. 37-42.
141. Foret, F., et al., *Subatmospheric electrospray interface for coupling of microcolumn separations with mass spectrometry*. *Electrophoresis*, 2000. **21**(7): p. 1363-71.
142. Xu, T., L. Han, and L. Sun, *Automated Capillary Isoelectric Focusing-Mass Spectrometry with Ultrahigh Resolution for Characterizing Microheterogeneity and Isoelectric Points of Intact Protein Complexes*. 2022. **94**(27): p. 9674-9682.
143. Johnson, K.R. and Y. Gao, *On-capillary Cell Lysis Enables Top-down Proteomic Analysis of Single Mammalian Cells by CE-MS/MS*. 2022. **94**(41): p. 14358-14367.
144. Smith, R.D., C.J. Barinaga, and H.R. Udseth, *Improved electrospray ionization interface for capillary zone electrophoresis-mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 1988. **60**(18): p. 1948-1952.
145. Moini, M., *Simplifying CE-MS operation. 2. Interfacing low-flow separation techniques to mass spectrometry using a porous tip*. *Anal Chem*, 2007. **79**(11): p. 4241-6.
146. González-Ruiz, V., et al., *Evaluation of a new low sheath-flow interface for CE-MS*. *Electrophoresis*, 2016. **37**(7-8): p. 936-46.
147. McGregor, M.C., et al., *Role of Biologics in Asthma*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019. **199**(4): p. 433-445.
148. Easthope, S. and B. Jarvis, *Omalizumab*. *Drugs*, 2001. **61**(2): p. 253-60; discussion 261.
149. Liu, L., *Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins*. *J Pharm Sci*, 2015. **104**(6): p. 1866-1884.
150. Szekanecz, Z., et al., *[Antiviral and anti-inflammatory therapies in COVID-19]*. *Orv Hetil*, 2021. **162**(17): p. 643-651.
151. Majumder, J. and T. Minko, *Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19*. *Aaps j*, 2021. **23**(1): p. 14.

152. Mair-Jenkins, J., et al., *The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis*. J Infect Dis, 2015. **211**(1): p. 80-90.
153. Szabo, M., et al., *N-glycosylation structure - function characterization of omalizumab, an anti-asthma biotherapeutic product*. J Pharm Biomed Anal, 2022. **209**: p. 114483.
154. Reider, B., M. Szigeti, and A. Guttman, *Evaporative fluorophore labeling of carbohydrates via reductive amination*. Talanta, 2018. **185**: p. 365-369.
155. Stahl, B., et al., *Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal Biochem, 1994. **223**(2): p. 218-26.
156. Szabo, M., et al., *Introduction of a Capillary Gel Electrophoresis-Based Workflow for Biotherapeutics Characterization: Size, Charge, and N-Glycosylation Variant Analysis of Bamlanivimab, an Anti-SARS-CoV-2 Product*. Front Bioeng Biotechnol, 2022. **10**: p. 839374.
157. Stadlmann, J., et al., *Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides*. Proteomics, 2008. **8**(14): p. 2858-71.
158. Guttman, A., et al., *Use of complexing agents for selective separation in high-performance capillary electrophoresis: Chiral resolution via cyclodextrins incorporated within polyacrylamide gel columns*. Journal of Chromatography A, 1988. **448**: p. 41-53.
159. Filep, C. and A. Guttman, *Effect of the Monomer Cross-Linker Ratio on the Separation Selectivity of Monoclonal Antibody Subunits in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis*. Anal Chem, 2021. **93**(7): p. 3535-3541.
160. Quirino, J.P., *Sodium dodecyl sulfate removal during electrospray ionization using cyclodextrins as simple sample solution additive for improved mass spectrometric detection of peptides*. Anal Chim Acta, 2018. **1005**: p. 54-60.
161. Austin, S., et al., *Determination of β -Galactooligosaccharides by Liquid Chromatography*. Int J Anal Chem, 2014. **2014**: p. 768406.
162. Székely, A., et al., *Multicapillary SDS-gel electrophoresis for the analysis of fluorescently labeled mAb preparations: A high throughput quality control process for the production of QuantiPlasma and PlasmaScan mAb libraries*. ELECTROPHORESIS, 2014. **35**(15): p. 2155-2162.
163. Ryman, J.T. and B. Meibohm, *Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies*. CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology, 2017. **6**(9): p. 576-588.
164. Eli Lilly and Company, U.S.F.a.D.A., *Fact sheet for health care providers emergency use authorization (EUA) of bamlanivimab (B3.01-BAM-0006-EUA HCP-20210318)*. 2021.
165. Hsieh, Y.T., et al., *Characterization of Fc γ R1IIIA effector cells used in in vitro ADCC bioassay: Comparison of primary NK cells with engineered NK-92 and Jurkat T cells*. J Immunol Methods, 2017. **441**: p. 56-66.
166. Wang, X., M. Mathieu, and R.J. Brezski, *IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions*. Protein Cell, 2018. **9**(1): p. 63-73.
167. Raju, T.S. and R.E. Jordan, *Galactosylation variations in marketed therapeutic antibodies*. MAbs, 2012. **4**(3): p. 385-91.
168. Aoyama, M., et al., *Effects of terminal galactose residues in mannose α 1-6 arm of Fc-glycan on the effector functions of therapeutic monoclonal antibodies*. MAbs, 2019. **11**(5): p. 826-836.
169. Filep, C., et al., *Multilevel capillary gel electrophoresis characterization of new antibody modalities*. Anal Chim Acta, 2021. **1166**: p. 338492.
170. Coppa, G.V., et al., *Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation*. Acta Paediatr Suppl, 1999. **88**(430): p. 89-94.
171. *Official Methods of Analysis*. 2019, AOAC International: Rockville, MD. p. Method 2001.02.

9. Tárgyszavak/keywords

kapilláris elektroforézis

tömegspektrometria

monoklonális antitestek

tisztaság vizsgálat

alegység integritás analízis

töltés variáns analízis

módszerfejlesztés

gélfejlesztés

elválasztási paraméterek optimalizálása

interfész fejlesztés

N-glikoziláció

szabad oligoszacharidok

capillary electrophoresis

mass spectrometry

monoclonal antibodies

purity determination

subunit integrity analysis

charge heterogeneity analysis

method development

gel development

optimization of separation parameters

interface development

N-glycosylation

free oligosaccharides

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Guttman Andrásnak, a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium vezetőjének munkám során nyújtott iránymutatásáért és támogatásáért, továbbá, hogy lehetőséget és szakmai háttérrel biztosított számomra doktori értekezésem elkészítéséhez. Emellett köszönettel tartozom szakmai tanácsaiért valamint azért, hogy megmutatta, hogy a remek lehetőségek sokszor megoldhatatlan problémának vannak álcázva.

Köszönet illeti Szarka Máté kollégámat és barátomat, aki tapasztalataival, szakértelmével támogatta munkámat és segítséget nyújtott mind az elméleti kérdések, mind a felmerülő gyakorlati problémák megoldásában.

Továbbá köszönettel tartozom a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium, valamint a Horváth Csaba Memorial Laboratory of Bioseparation Sciences többi munkatársának is, akik értékes tanácsaikkal segítettek szakmai előrehaladásomat. Kiemelten hálás vagyok Szigeti Mártonnak, Farkas Annának és Filep Csengének, akik elméleti és gyakorlati tanácsaikkal segítettek munkámat.

Hálával tartozom családomnak és barátaimnak, akik mindvégig türelmet és megértést tanúsítottak irányomba doktoranduszi éveim alatt.

Az értekezésemet feleségemnek és kollégámnak, Borza Beátának ajánlom, akinek a türelme, megértése és tanácsai nélkül jelen dolgozat nem készülhetett volna el.

11. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/17/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sárközy Dániel
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10064668

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Sárközy, D.**, Guttman, A.: Analysis of Peptides and Proteins by Native and SDS Capillary Gel Electrophoresis Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry via a Closed-Circuit Coaxial Sheath Flow Reactor Interface.
Anal. Chem. 95 (18), 7082-7086, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.2c04332>
IF: 7.4 (2022)
2. **Sárközy, D.**, Farsang, R., Szigeti, M., Austin, S., Lock, S., Guttman, A.: Capillary electrophoresis analysis of industrial galactooligosaccharides.
J. Pharm. Biomed. Anal. 233, 1-5, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115434>
IF: 3.4 (2022)
3. **Sárközy, D.**, Guttman, A.: Capillary Sodium Dodecyl Sulfate Agarose Gel Electrophoresis of Proteins.
Gels. 8 (2), 1-10, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/gels8020067>
IF: 4.6
4. Szabó, M., **Sárközy, D.**, Szigeti, M., Farsang, R., Kardos, Z., Kozma, Á., Csánky, E., Chung, D. S., Szekanez, Z., Guttman, A.: Introduction of a Capillary Gel Electrophoresis-Based Workflow for Biotherapeutics Characterization: size, Charge, and N-Glycosylation Variant Analysis of Bamlanivimab, an Anti-SARS-CoV-2 Product.
Front. Bioeng. Biotechnol. 10, 1-9, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2022.839374>
IF: 5.7
5. Szabó, M., Filep, C. B., Nagy, M., **Sárközy, D.**, Szigeti, M., Sperling, E., Csánky, E., Guttman, A.: N-glycosylation structure - function characterization of omalizumab, an anti-asthma biotherapeutic product.
J. Pharm. Biomed. Anal. 209, 1-5, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114483>
IF: 3.4





6. **Sárközy, D.**, Borza, B., Domokos, A., Váradi, E., Szigeti, M., Mészáros-Matwiejuk, Á., Molnár-Gábor, D., Guttman, A.: Ultrafast high-resolution analysis of human milk oligosaccharides by multicapillary gel electrophoresis.
Food Chem. 341 (2), 1-8, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128200>
IF: 9.231

További közlemények

7. **Sárközy, D.**, Guttman, A.: CE and CE-MS approaches for glycan analysis.
In: Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry for Proteomics and Metabolomics: Principles and Applications. Ed.: Rawi Ramautar, David D. Y. Chen, Wiley, Weinheim, 313-334, 2022.
8. Szarka, M., Szilási, S., Dönczö, B., **Sárközy, D.**, Rajta, I., Guttman, A.: The effect of simulated space radiation on the N-glycosylation of human immunoglobulin G1.
Electrophoresis. 39 (22), 2872-2876, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201800151>
IF: 2.754

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 36,485

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 33,731

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.01.18.

