

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A mérési paraméterek és az elválasztó közeg összetételének hatása
a nátrium – dodecil - szulfát kapilláris gélelektroforézisre terápiais
fehérjék elválasztása során**

Filep Csenge Boróka

Témavezető: Prof. Dr. Guttman András



**DEBRECENI
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2025

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	6
2.	Irodalmi áttekintés	8
2.1	Kapilláris gélelektroforézis története	8
2.2	A kapilláris gélelektroforézis elmélete	9
2.2.1	Elektroforetikus mobilitás	9
2.2.2	Elektroozmotikus áramlás (EOF)	12
2.2.3	Elméleti tényérszám, felbontás, szelektivitás és csúcsszimmetria	13
2.2.4	Elektromigrációs diszperzió	13
2.3	Kapilláris gélelektroforézis a gyakorlatban	15
2.4	Gélek és polimerek	18
2.4.1	Keresztkötött (kémiai) gélek	19
2.4.2	Dextrán-bórsav keresztkötött gél	20
2.5	Terápiás fehérjék	24
2.5.1	Terápiás fehérjék piaca és jelentősége	24
2.5.2	Hagyományos monoklonális antitest alapú terapeutikumok	24
2.5.3	Új típusú bioterápiás fehérjék	25
2.6	Terápiás fehérjék jellemzése	28
3.	Célkitűzések	29
4.	Anyagok és módszerek	30
4.1	Vegyszerek és reagensek	30
4.2	Minták	30
4.3	Mintaelőkészítés	31
4.3.1	Redukált mintaelőkészítés	31
4.3.2	Nem redukált mintaelőkészítés	32
4.3.3	PNGase F emésztés	32
4.4	A különböző kísérletekhez használt gélek és készítésük	32
4.4.1	Különböző dextrán és bórsav koncentrációjú gélek készítése	32
4.4.2	Különböző glicerin koncentrációjú gélek készítése	34
4.5	Fehérjék kapilláris elektroforézissel történő elválasztása	34
4.6	Fizikai és elektrokinetikai paraméterek meghatározása	35

4.6.1	Elektroozmotikus áramlás (EOF)	35
4.6.2	Viszkozitás	35
4.6.3	Áramerősség.....	36
4.7	Az adatok kiértékelése	36
4.7.1	Elektroforetikus mobilitás meghatározása	36
4.7.2	Arrhenius diagram.....	37
4.7.3	Ferguson módszer	38
5.	Eredmények	39
5.1	Fizikai és elektrokinetikai paraméterek	39
5.1.1	Viszkozitás	40
5.1.2	Elektroozmotikus áramlás	40
5.1.3	Áramerősség.....	41
5.2	Fehérjék hőmérséklet-függő elektromigrációja.....	42
5.2.1	Aktiválási energiaigény SDS-fehérje komplexek vándorlása során.....	45
5.2.2	SDS-fehérje komplexek elektroforetikus mobilitása és a molekulatömeg közötti összefüggés	47
5.3	Fehérjék migrációjának vizsgálata Ferguson módszerrel.....	48
5.3.1	Hagyományos (2D) Ferguson módszer alkalmazása	48
5.3.2	3D Ferguson módszer bevezetése	57
5.4	A monomer és keresztkötő ágens arányának hatása az elválasztás szelektivitására	62
5.5	Elektromigrációs diszperzió vizsgálata	68
6.	Eredmények megbeszélése	76
6.1	Fizikai és elektrokinetikai paraméterek vizsgálata	76
6.2	Fehérjék hőmérséklet-függő elektromigrációja.....	78
6.3	Fehérjék elektromigrációjának vizsgálata Ferguson módszerrel	80
6.4	A monomer és keresztkötő ágens arányának hatása az elválasztás szelektivitására	83
6.5	Elektromigrációs diszperzió (EMD)	85
7.	Összefoglalás	87
8.	Irodalomjegyzék	91
8.1	A dolgozat megírásához felhasznált irodalomjegyzék	91
8.2	Publikációs lista	97
9.	Tárgyszavak/Keywords.....	99
10.	Köszönetnyilvánítás.....	100

%RSD - százalékos relatív szórás
 μ - elektroforetikus mobilitás
 μ_0 - szabad oldatban való elektroforetikus mobilitás
 μ_s - mintakomponens mobilitása
A - preexponenciális tényező
A_{10%} - aszimmetria faktor
B - bórsav
BGE - háttérelktrolit
c - konstans
CE - kapilláris elektroforézis
CEC - kapilláris elektrokratográfia
CGE - kapilláris gélelektroforézis
CIEF - kapilláris izoelektromos fókuszálás
CITP - kapilláris izotachoforézis
CZE - kapilláris zónaelektroforézis
D - dextrán
DNS - dezoxiribonukleinsav
E - elektromos erő
E_a - aktiválási energia
EMD - elekromigrációs diszperzió
EOF - elektroozmotikus áramlás
f - transzlációs súrlódási együttható
F_e - elektromos erő
F_f - súrlódási erő
IgG - Immunoglobulin
k - kitevő értéke
Kr - retardációs együttható
MECC - micellás elektrokinetikus kapilláris kromatográfia
Mw - molekulatömeg
N - elméleti tényérszám

PAGE - poliakrilamid gélelektroforézis

Q - nettótöltés

R - egyetemes gázállandó

RNS - ribonukleinsav

Rs - felbontás

SDS - nátrium-dodecil-szulfát

SDS-CGE - nátrium-dodecil-szulfát kapilláris gélelektroforézis

SDS-PAGE – nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis

T% - polimer koncentráció

t_R - migrációs idő

v - sebesség

w - csúcsszélesség

α - szelektivitás

η - viszkozitás

1. Bevezetés

A 10 napjainkban legnagyobb piaci aránnyal rendelkező gyógyszeripari termék közül nyolc valamilyen bioterápiás fehérjekészítmény. Az optimalizált kezelés érdekében a hagyományos kis molekulatömegű gyógyszeres terápiák kiegészíthetők vagy helyettesíthetők terápiás fehérjékkel, mint például monoklonális antitestek és fúziós fehérjék, a hematológiai és szolidtumorkok, valamint autoimmun és gyulladásos betegségek kezelése esetében. Ezen gyógyszerként alkalmazott fehérjéknek a jellemzése rendkívüli kihívások elé állítja a gyógyszeripart, a terápiás fehérjék tisztaságának ellenőrzése, illetve az esetleges szerkezeti eltérések felderítése fontos a minőségellenőrzés szempontjából. A biológiai eredetű gyógyszerkészítmények karakterizálása során a kapilláris elektroforézis (CE) különféle elválasztási módjait rutinszerűen alkalmazzák a minőségellenőrzés során és a fehérje méret és töltés heterogenitásának felmérésére a gyógyszeriparban.

A kapilláris gélelektroforézis (CGE) lehetővé teszi a poliionos makromolekulák hidrodinamikai térfogatuk szerinti elválasztását. Kezdetben térhálósított poliakrilamid géleket alkalmaztak a fehérjék méret szerinti elválasztására, melyeket később felváltottak a hidrofil lineáris polimer mátrixok. Manapság a gyógyszeriparban többnyire borát ionnal térhálósított dextrán gélt alkalmaznak fehérjék nagy felbontású, méret szerinti elválasztására, mely szabvány módszernek is tekinthető.

A bioterápiás fehérjék növekvő száma miatt, egyre nagyobb szükség van a jobb elválasztási technikákra, melyek például alkalmasak a nagymértékben glikozilált fehérjék jellemzésére is. A nátrium-dodecil-szulfát kapilláris gélelektroforézis (SDS-CGE), mely napjainkban tetrahydroxyborát ionnal térhálósított dextrán mátrixot alkalmaz elválasztó közegként, egy nagy hatékonyságú bioanalitikai módszer, gyors elemzési idővel és kis mennyiségű mintaigénnyel, így kiválóan alkalmazható terápiás fehérjék hatékony jellemzésére.

Munkám során nagy hangsúlyt kapott a módszer optimalizálása a hatékonyabb elválasztás érdekében, többek között annak vizsgálata, hogy a mérési paraméterek (pl. hőmérséklet) és az elválasztó közeg összetétele (pl. bórsav, dextrán koncentráció), hogyan hat a terápiás fehérjék kvalitatív analízisére. Munkám során vizsgáltam a dextrán-borát keresztkötés kialakulásának mechanizmusát is. A monomer (dextrán) és a térhálósító (borát) koncentráció változás hatását tanulmányoztam fehérje standardok és antitest minták elválasztása esetén. A háttérelktrolitok

esetében meghatároztam az elválasztás szempontjából fontos fizikai és elektrokinetikus paramétereket, mint például viszkozitást és elektroosmotikus áramlást. A migrációs tulajdonságok behatóbb tanulmányozásához a Ferguson módszert alkalmaztam, mely segíthet a megfelelő összetételű gélt kiválasztani egy adott fehérjekeverék minta esetében. A kapott elektroferogramokat úgy értékeltem ki, hogy részletes információt nyerjek az elválasztások teljesítményét illetően, mint például elméleti tényérszám, felbontás és szelektivitási tényező meghatározása. Vizsgáltam a fehérjék hőmérsékletfüggő migrációját az elválasztások aktiválási energia igényének meghatározása, illetve a felbontás optimalizálása érdekében. Az adott gélrendszerben feltárássra került az aktiválási energia és a molekulatömeg közötti összefüggés, illetve az SDS-fehérje komplex mobilitása és a molekulatömeg közötti összefüggés.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Kapilláris gélelektroforézis története

Biológiai polimerek, úgymint DNS, RNS és fehérjék elektroforetikus elválasztása alapvető analitikai módszernek számít a gyógyszeriparban, a molekuláris biológiában és egyéb bioanalitikai területeken. Elektromos erőterben, vizes vagy híg polimer oldatokban a töltéssel rendelkező részecskék méretük és töltésük arányától függően eltérő sebességgel vándorolnak. Az Ogston-modell szerint a gélelektroforézishez használt polimerhálózat molekulaszitának tekinthető, amely egymással összekapcsolt láncok véletlenszerű hálózatából áll, melyre jellemző egy átlagos pórusméret. A vándorló mintakomponensek pedig adott sugarú nem deformálható gömb alakú objektumoknak tekinthetők, ezért a kisebb molekulák gyorsabban haladnak a mátrixban, mivel a rendelkezésre álló pórusok nagyobb hányadán férnek át [1]. A nagyméretű biopolimerek, mint például a DNS és SDS-fehérje komplexek, úgynevezett reptációs mozgás révén vándorolhatnak át a forgási sugaruknál lényegesen kisebb pórusméretű polimer hálón. Ezt a modellt az oldott anyag mérete és elektroforetikus mobilitása közötti fordított összefüggés jellemzi [2].

Jorgenson és Lukacs 1981-ben vezette be szűk keresztmetszetű (<100 μm) üvegapillárisban a nagyfelbontású kapilláris zónaelektroforézist (CZE), illetve kidolgozták annak elméleti háttérét. 1983-ban Hjertén a SDS-PAGE módszert adaptálta erre, így bevezetve a kapilláris gélelektroforézist (CGE) [3]. 1989-től a kereskedelmi forgalomban is elérhetővé váltak az automatizált és nagyteljesítményű kapilláris elektroforézis készülékek, melyeket rutinszerűen kezdtek alkalmazni az alap- és alkalmazott biokémiai és molekuláris biológiai kutatásokban. Ennek következtében a CGE lehetővé tette a fehérjék, nukleinsavak és komplex szénhidrátok gyors [4-6] és hatékony analizisét, így egyre inkább háttérbe szorította az idő- és munkaigényes hagyományos lapgél elektroforézist.

A további fejlesztéseknek köszönhetően számos CE alapú módszert vezettek be a CGE-vel párhuzamosan, amelyeket napjainkban is alkalmaznak, mint például a kapilláris zónaelektroforézis (CZE), micellás elektrokinetikus kapilláris kromatográfia (MECC), kapilláris elektrokromatográfia (CEC), kapilláris izoelektromos fókuszálás (CIEF) és kapilláris izotachoforézis (CITP) [5]. A CZE az egyik leggyakrabban alkalmazott technika a

kialakult módszerek közül. Hatékony elválasztást tesz lehetővé mind a kis, mind a nagy molekulák esetében, de nem tesz lehetővé tisztán méret szerinti elválasztást.

A kapilláris elektroforézis módszer bevezetése lehetővé tette az időigényes SDS-PAGE automatizálását, így alakult ki a nátrium-dodecil-szulfát kapilláris gélelektroforézis módszere, ami lehetővé tette a fehérjék gyors és hatékony méret alapú elválasztását. A keskeny átmérőjű kapilláris oszlopok használata csökkentette az átviteli és hőelvezetési problémákat [7]. Az elmúlt évezred végére az SDS-CGE a biotechnológiai iparban a minőség-ellenőrzés elfogadott analitikai eszközévé vált, elsősorban terápiás fehérjék jellemzésére, szarzs felszabadításra, tisztaság ellenőrzésre és stabilitás vizsgálatokra használják. Mivel eleinte többnyire monoklonális antitestek analízisére alkalmazták, így nem volt szükségszerű a módszer „finomhangolása” [8], azonban az új generációs terápiás fehérjék megjelenése miatt, ez egyre időszerűbbé válik.

2.2 A kapilláris gélelektroforézis elmélete

2.2.1 Elektroforetikus mobilitás

Elektromos erőterben a töltéssel rendelkező oldott anyagok eltérő sebességgel vándorolnak, mely az elektroforetikus elválasztási módszerek alapja. Konstans elektromos térerő (E) alkalmazása során a vándorló Q nettó töltésű oldott molekulára elektromos erő (F_e) hat, amely az alábbi egyenlettel fejezhető ki:

$$F_e = Q * E \quad (1)$$

Emellett a részecskékre hat az ellentétes irányú súrlódási erő (F_f) is, ami a translációs súrlódási együttható (f) és a sebesség (dx és dt távolság és idő) szorzatával fejezhető ki:

$$F_f = f * \left(\frac{dx}{dt} \right) \quad (2)$$

Amennyiben az F_e és F_f ellentétes irányú erők egyenlő nagyságúak az oldott molekulák állandó sebességgel (v) vándorolnak:

$$v = \frac{dx}{dt} = E \cdot \frac{Q}{f} \quad (3)$$

A translációs súrlódási együttható (f) értéke arányos az elválasztó közeg viszkozitásával (η), illetve a vándorló molekula alakja befolyásolja, ami (c) konstansként jelenik meg az egyenletben:

$$f = c \cdot \eta \quad (4)$$

Az elektroforetikus mobilitás (μ) a fenti egyenletek összevonásával, a következőképpen írható le:

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{Q}{f} \quad (5)$$

Az SDS-fehérje komplex, mint többszörösen töltött poliion, elektroforetikus mobilitása (μ) fizikai állandókkal, a kapilláris gélelektroforézis során az alábbi összefüggéssel írható le [6] a (4) és (5) egyenlet összevonásával:

$$\mu = \frac{Q}{6\pi r \eta} \quad (6)$$

ahol tehát Q a többszörösen töltött poliion nettó/effektív töltése, a $6\pi r$ tag a molekula alakját jellemzi –jelen esetben kis gömb alakú molekula - ahol r az oldott molekula sugara és η az elválasztó közeg viszkozitása. A rendszer pontosabb leírása érdekében bevezetésre került az oldott molekula sugárnak megfelelő molekulatömeg (MW) értéke is:

$$\mu = \frac{Q}{MW^k \eta} \quad (7)$$

ahol a (k) kitevő értékét a molekuláris jellemzők határozzák meg.

Offord javasolta, hogy a pontosabb számítás érdekében gömb alakú molekulák esetén a térfogattal ($Mw^{1/3}$) vagy a felülettel (az $Mw^{2/3}$) egyenértékű hatványait alkalmazzák [6]. Ricard és munkatársai a forgási sugárnak megfelelő $Mw^{1/2}$ hatvány használatát vezették be [9]. Más kutatók az SDS-fehérje komplexeket rúdszerű hengeres alakzatként modellezték [10], illetve az SDS-fehérje komplexeket nyaklánc-szerű szerkezetnek fogták fel [11] azt feltételezve, hogy a kitekert polipeptid láncon a gömb alakú SDS micellák úgy helyezkednek el, mint a gyöngyök.

Az Eyring-Polanyi [12] egyenletet felhasználva a viszkozitás (η) kifejezhető az alábbiak szerint:

$$\eta = Ae^{E_a/RT} \quad (8)$$

ahol az A egy preexponenciális tényező, E_a a viszkózus áramlás aktiválási energiája, R az egyetemes gázállandó és T az abszolút hőmérséklet. A (6) és (7) egyenlet összevonásával kifejezhető az elektroforetikus mobilitás (μ):

$$\mu = \frac{Q}{const} \cdot e^{-E_a/RT} \quad (9)$$

ahol *const* a konstansok összevonásának felel meg. A gyakorlatban az aktiválási energia érték meghatározható az Arrhenius-görbe meredekségéből, ahol a mobilitás logaritmusát ábrázoljuk $1/T$ függvényében [13].

A kapilláris gélelektroforézis során molekulaszűrő funkcióval rendelkező polimer oldatban megy végbe az elválasztás. Ez a közeg lassítja az SDS-fehérje komplexek vándorlását, a polimer koncentrációja (T%) és annak a mintakomponensekkel való esetleges fizikai kölcsönhatása határozza meg a retardációs együtthatót (K_r). A (10)-es egyenlet az SDS-fehérje komplex elektroforetikus mobilitását adja meg a K_r és T% függvényében:

$$\mu = \mu_0 \cdot e^{-K_r \cdot T\%} \quad (10)$$

ahol μ_0 az adott mintakomponens szabad oldatban ($T\%=0$) való elektroforetikus mobilitása. A poliionos biopolimerek polimer oldatban történő elektroforetikus migrációjának modellezésére a leggyakrabban használt elmélet, a 2.1 pontban már említett Ogston-modell [1] mely elmélet szerint az SDS-protein komplexek nem deformálódó gömb alakú objektumként vándorolnak keresztül a porózus szűrő közegen.

Természetesen az Ogston-modell kiterjesztése szükséges olyan esetekben, amikor a vándorló molekula hidrodinamikai sugarának mérete nem esik egybe a szűrő közeg átlagos pórusméretével. Más szóval nem áll fenn a lineáris kapcsolat bizonyos esetekben, mint például a polimer szerkezetének és tulajdonságainak megváltozása egy bizonyos gélkoncentráció felett vagy a különböző nagyméretű fehérjék vándorlása esetén. Például növekvő gélkoncentráció esetén a nagyméretű poliionok rúdszerű alakot felvéve kígyószerű mozgással képesek átjutni a kicsi pórusméretű elválasztó közegen [2, 14]. CGE során az elektroforetikus mobilitást befolyásolja a vándorló molekula alakja is a méretén és nettó töltésén kívül. Több alegységből álló fehérje komplexek, mint például az Y alakú IgG (Immunoglobulin) molekulák alakja is változhat az elektromigráció során. A gél szerkezetét, pórusméretét, viszkozitását pedig meghatározza a polimer koncentráció, a viszkozitás módosítók és polimer adalékanyagok, amelyek befolyásolják az elválasztandó molekula vándorlását a molekulaszűrő közegen.

2.2.2 Elektroozmotikus áramlás (EOF)

A kapilláris gélelektroforézishez használt szilika kapillárisok belső falán lévő szilanol csoportok $\text{pH}=3$ felett történő deprotonálódásával szilanolát csoportok keletkeznek, amelyek negatív töltésűvé teszik a kapilláris falát. A szilanolát csoportok negatív töltése és az ellenionok miatt, a felületen egy diffúz kettősréteg alakul ki, amely létre hozza az elektroozmotikus áramlást (EOF), dugószerű áramlási profilt kialakítva. Az EOF szabályozható a puffer pH értékének változtatásával, különféle bázisos vagy szerves anyagok hozzáadásával, a kapilláris falának kémiai módosításával, illetve a háttélektrolit koncentrációjával [15]. Az SDS-fehérje komplexek elektroforetikus mobilitásának számolásánál figyelembe vettem az adott elválasztó közegre jellemző μ_{EOF} értéket (lásd Anyagok és Módszerek).

2.2.3 Elméleti tányérszám, felbontás, szelektivitás és csúcsszimmetria

Az elektroferogramból minőségi és mennyiségi következtetéseket lehet levonni. Az elméleti tányérszám (N) gyakorlati szempontból az 11. egyenlettel jellemezhető, ahol t_R a migrációs idő és w az alapvonalon mért csúcsszélesség:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \quad (11)$$

A kromatográfiához hasonlóan CE-ben a felbontás (R_s) az elválasztási teljesítmény kvantitatív mérésére szolgál. A felbontás értéke két csúcs között meghatározható a migrációs idők (t_R) és csúcsszélesség (w) felhasználásával:

$$R_s = (t_{R2} - t_{R1}) / \left(\frac{w_1 + w_2}{2}\right) \quad (12)$$

A kapilláris gélelektroforézis során a szelektivitás (α) két csúcs mobilitásának (μ_1 és μ_2) vagy migrációs idejének (t_1 , és t_2) hányadosaként határozható meg:

$$\alpha = \frac{\mu_1}{\mu_2} = \frac{t_2}{t_1} \quad (13)$$

Értéke mindig nagyobb 1-nél, amennyiben a két minta komponens elválik egymástól, azaz nincs co-migráció. Minél nagyobb α , annál távolabb vándorol egymástól a két csúcs. $\alpha = 1$ esetén nincs elválasztás.

2.2.4 Elektromigrációs diszperzió

Az elválasztás hatékonyságát befolyásolja az elválasztás során kapott csúcsok szimmetriája. Az elektroferogramok csúcsának alakja alapvetően szimmetrikus, Gauss egyenlettel leírható [16]. Azonban a nem optimális körülmények hatására az elválasztások során a csúcsalak torzulhat, aszimmetrikus lesz. Az aszimmetria faktor ($A_{10\%}$)

meghatározható a csúcsmagasság 10%-nál mért félérték szélességek (a – jobb oldalon mért; b – bal oldalon mért) hányadosaként:

$$A_{10\%} = a/b \quad (14)$$

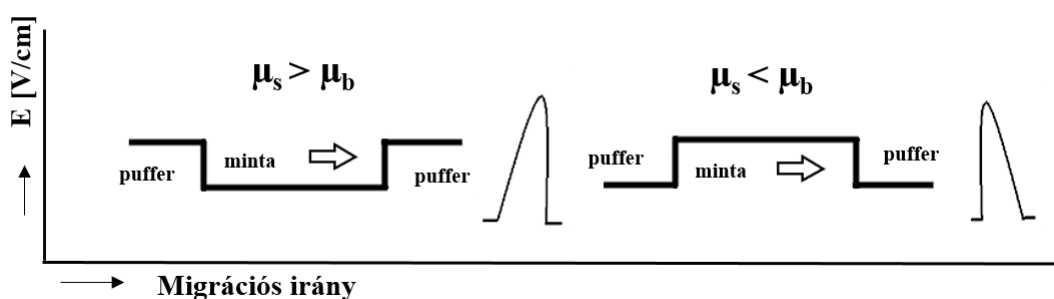
$A_{10\%} = 1$ Gauss alakú a csúcs, $A_{10\%} < 1$ elől aszimmetrikus („frontingos”) és $A_{10\%}$ hátul aszimmetrikus, elhúzódo („tailing”-es) csúcsalak. 0,9 és 1,2 $A_{10\%}$ között elfogadható mértékű a csúcs aszimmetria [17].

Az elektromos erőter hatására differenciális migráción alapuló elválasztási módszerek esetében a háttérekrolitban (BGE) lévő ellenion és ko-ion típusa illetve koncentrációja befolyásolja a pufferkapacitást, illetve a csúcsszimmetriát. A csúcsszimmetriát negatívan befolyásolhatja az elektromigrációs diszperzió (EMD), ami mintakomponensek és az alkalmazott pufferrendszer ko-ionjainak elektroforetikus mobilitásbeli különbségei miatt alakul ki [18-20]. A csúcs alakot számos faktor befolyásolja, de legjelentősebben az EMD és a diffúzió hat rá, mivel ezek az elektromigráció folyamatának velejároi [21]. Nagy biopolimerek esetében a diffúzió jelensége elhanyagolható a csúcs alakra kifejtett hatás tekintetében. A szimmetria javítása, így a maximális elválasztási hatékonyság pl. minimalizálni a diszperzió időben kifejezett variancia négyzetét, σ_t^2 elérésének érdekében az elsődleges paraméter, amit optimalizálni kell az elválasztástudományon alapuló módszerekben [22, 23].

A nagy minta mennyiség (sample overloading) szintén hozzájárulhat a csúcsaszimmetria kialakulásához [24]. Beckman és munkatársai, erős háromszögtorzulást figyeltek meg nátrium-dodecil-szulfát kapilláris gélelektroforézisben (SDS-CGE) erősen hidrofób fehérjék esetében. A csúcsforma javítása érdekében hosszabb lánchosszúságú felületaktív anyagokra (nátrium-hexadecil-szulfátra) volt szükség az elválasztás javítására [25].

Az elektromigrációs diszperzióra vonatkozó általános hipotézis a frontig és tailing képződéseket veszi figyelembe [20, 25-27]. Olyan elválasztási körülmények között, ahol egy adott mintakomponens mobilitása (μ_s) nagyobb, mint a háttérekrolit ko-ionjának mobilitása (μ_b), az elektromos potenciálesés kisebb a mintazónában, mint a környező gél-puffer

rendszerben (1. ábra, bal oldali panel). Emiatt a mintazóna elülső részéből kidiffundáló minta komponensek gyorsabban vándorolnak, a pufferzónában lévő nagyobb elektromos térerő hatására, aminek következtében frontigos csúcsok alakulnak ki. Az adott mintazóna hátsó végén viszont a kidiffundáló analit molekulák gyorsan visszajutnak a mintaterületbe a gél-puffer rendszer nagyobb potenciálcsökkenése miatt, ami a csúcs azon felének élesedését okozza (1. ábra bal oldali panel, csúcs bal szára). Ennek ellenkezője történik, ha a kérdéses mintakomponens mobilitása kisebb, mint a háttélektrolitban lévő ko-ion mobilitása, azaz az elektromos potenciálesés nagyobb a mintazónában, mint a környező gél-puffer rendszerben (1. ábra, jobb oldali panel), ami éles frontokkal rendelkező tailinges csúcsokat eredményez.



1. ábra: Az elektroforézis során fellépő elektromos potenciálesés következtében kialakuló frontingos (bal panel) és tailinges (jobb panel) csúcsalak változás (saját készítésű ábra).

2.3 Kapilláris gélelektroforézis a gyakorlatban

A 2. ábrán látható a kapilláris gélelektroforézis készülék általános felépítése, melyen fel vannak tüntetve a fő alkotórészek, amelyek lehetővé teszik a mintakomponensek elválasztását, detektálását, illetve az adatgyűjtést. A készülék fő egységei a nagyfeszültségű tápegység, a minta- és puffertartó edények, a két elektród (anód és katód), a detektor, illetve a megfelelő adatgyűjtést és feldolgozást lehetővé tevő számítógép és szoftver.

a bemeneti oldalon van az anód, vagyis normál polaritással történik az elválasztás. Az automata készülékeknél a kapilláris termosztált, így állandó feszültség alkalmazásával elérhető az egyenletes áramerősség, és a migrációs idő reprodukálhatósága. Az automatizált, modern gépek esetében a feszültség, hőmérséklet és nyomás esetében a szabályozás pontossága $\pm 0,1\%$ -on belül van.

A minta bejuttatása a kapillárisba két féle módon történhet: nyomás alkalmazásával vagy elektrokinetikusan. Az elektrokinetikus injektálás során feszültség alkalmazásával kerül a minta kapillárisba. Viszkózus gélek esetében ezt a módszert célszerű alkalmazni, bár itt a bejutott minta mennyiség függ a vizsgálandó mintakomponensek mobilitásától. Az injektált minta mennyisége a 15. egyenlettel fejezhető ki [3],

$$q = \frac{(\mu_e + \mu_{EOF}) \cdot U \cdot r^2 \cdot \pi \cdot c \cdot t}{L_t} \quad (15)$$

ahol q az injektált minta mennyiség, μ_e a mintakomponens mobilitása, μ_{EOF} az EOF mobilitása, U az alkalmazott feszültség, r a kapilláris sugara, c a minta koncentrációja, t az injektálás ideje és L_t a kapilláris teljes hossza.

Hidrodinamikus injektálásnál egy adott térfogatú minta mennyiség jut be, melyet főként az injektálási idő, illetve az alkalmazott nyomás és a közeg viszkozitása határoz meg, egyéb paraméterek mellett, de független a mintakomponensek elektroforetikus mozgékonyaságától.

Számos detektálási mód alkalmazható, de a legelterjedtebb az ultraibolya (UV) / látható (VIS) hullámhossz-tartományú fény elnyelésének elvén és mérésén alapuló detektálás a fehérjék esetében, de a lézer indukált fluoreszcenciás (LIF) detektorok használata is elterjedt fehérjék, szénhidrátok és DNS analízisre fluorofóros származékképzést követően. Gyógyszeripari termékek vizsgálata esetén széles körben alkalmazzák ezt a két detektálási módszert.

Az UV/VIS detektálás esetén fontos, hogy az alkalmazott gélnek, puffernek jó UV áteresztő képessége legyen az alkalmazott hullámhosszon. Az UV optika esetén a fényforrás egy 190 - 800 nm hullámhossztartományú deutérium vagy xenon lámpa. Az egysatornás

detektorok esetében egy adott hullámhosszon történik a detektálás, amely megfelelő hullámhosszú szűrő alkalmazásával változtatható. A két-vagy többcsatornás detektorok esetében egyidejűleg több kiválasztott hullámhosszon is történhet a detektálás. Azonban napjainkban már a CE készülékek esetében is elterjedt az ún. diódasoros detektor (DAD, Diode Array Detector) alkalmazása, mely az UV-VIS detektorok legfejlettebb típusa. A DAD-detektálás során az UV-fényforrás teljes fényspektruma a készülék optikai rendszerén keresztül megvilágítja kapillárist. A mintán átjutó fény optikai kábel segítségével eljut a rácsoptikához, ahol spektrumjaira bomlik, majd a több száz érzékelőt tartalmazó diódasorra vetül, így lehetővé válik az 1-2 nm felbontóképességű abszorbancia spektrum felvétele és analízise [28].

2.4 Gélek és polimerek

A kapilláris gélelektroforézis során az elválasztás egy molekulaszűrő hatással rendelkező viszkózus gélben történik, tehát egy polimer hálózatban/oldatban. A gélek koherens rendszerek, mivel a részecskék vázszerkezetet alkotnak, amelyek magukban hordozzák a folyadék és szilárd halmazállapot bizonyos tulajdonságait [29]. Legjelentősebb csoportjukat azon gélek alkotják amelyekben a vázszerkezet polimerekből épül fel. A polimer láncok között fizikai és kémiai kötések jöhetnek létre. A fizikai géleket másodlagos kötések tartják össze, külső fizikai behatásra könnyen felbomlik a szerkezetük. A kémiai géleket erős elsődleges kémiai kötések tartják össze, irreverzibilis géleknek tekinthetők, fizikai behatásra nem szakadnak el [30]. Harmadik csoportként említhetők meg az úgynevezett átmenetileg térhálósított kémiai gélek, mint például a borát-dextrán alapú gél, amelyet rutinszerűen alkalmaznak fehérjék nátrium-dodecil-szulfát kapilláris gélelektroforézise során.

Tehát a hagyományos lap gélelektroforézishez hasonlóan, itt is sokféle összetételű elválasztó közeg került kifejlesztésre. Manapság a legelterjedtebbek a nem keresztkötött (fizikai) gélek, másnéven a lineáris polimert tartalmazó oldatok, mint például a lineáris poliakrilamid (LPA), polietilén-oxid (PEO), polivinilpirrolidon (PVP) és különböző cellulóz származékok [31]. Előnyük, hogy nem érzékenyek az elválasztás körülményeire, mint például magas hőmérséklet, pH vagy sókoncentráció és könnyedén cserélhetők a kapillárisban nyomás

alkalmazásával. Az LPA duplaszálú DNS, SDS-fehérje komplexek és összetett szénhidrátok elválasztását teszi lehetővé [32].

A permanensen keresztkötött gélek közül a legelterjedtebb a poliakrilamid alapú, analóg módon az SDS-PAGE technikához, amely rövidebb egyszálú DNS és kisméretű fehérjék elválasztására használható. A tranzicionálisan keresztkötött mátrixok nagy előnye, hogy a néhány tíz mikrométer átmérőjű kapilláris könnyedén feltölthető vele, illetve eltávolítható belőle, így lehetővé teszi a teljesen automatizált működést.

2.4.1 Keresztkötött (kémiai) gélek

A kémiailag térhálósított gélek esetében a polimer láncokat kovalens kötések tartják össze. A kovalens kötés alapján három kategória különböztethető meg, létrejöhet addícióval, kondenzációval és keresztkötéssel [33]. Viskozitásuk nagy és pórusszerkezetünk jól meghatározott, a térháló stabilitása magas. A térhálót létre lehet hozni direkt eljárással vagy utólagos térhálósítással. Az első esetben monomer molekulák polimerizációjával alakul ki a gél, térhálósító molekulák felhasználásával. Az utólagos térhálósítás során már kész polimerláncok összekapcsolása történik meg a megfelelő térhálósító molekulák alkalmazásával [34].

A hagyományos gélelektroforézishez poliakrilamidot és agarózt használnak. A poliakrilamid gélét alkalmazzák a legszélesebb körben, amely a hagyományos lapgél elektroforézis szerves része. Az akrilamidot N,N-metilén-biszakrilamiddal (BIS) térhálósítják, amelyhez megfelelő iniciátorra és katalizátorra van szükség. A kapott gél pórusméretét a monomer és térhálósító koncentráció aránya határozza meg [35], így az változtatható az elválasztási feladat függvényében.

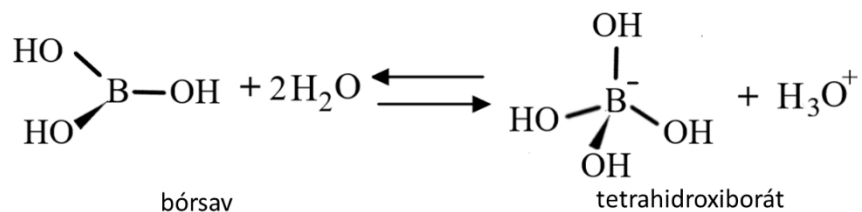
Az agaróz gél a forró agaróz oldat hőmérsékletének csökkentésével alakul ki. Az agaróz egy poliszacharid, amely 1,3- β -D-galaktopiranoz és 1,4-hez kötött 3,6-anhidro- α -l-galaktóz egységekből áll [36]. Az agaróz géleket a nagy pórusméret és nagy mechanikai szilárdság jellemzi. Fontos megjegyezni, hogy kémiai gélek esetén kialakulhat az EOF által közvetített buborékképződés, amely például nehézkessé teszi a kovalens kötéssel térhálósított poliakrilamid gélek használatát [37]. Ezeket a géleket akár kapilláris léptékben is alkalmazva

főként kettős szálú DNS-fragmentumok elválasztására használják, melyek mérete a több 100 bázispártól a több 10000 bázispárig terjedhet [38].

2.4.2 Dextrán-bórsav keresztkötött gél

A boráttal térhálósított polihidroxi makromolekulák géljei reverzibilis, átmeneti gélek [9]. Azonnal beindul a gélesedés folyamata diffúzió révén, a keverés segít abban, hogy a gél összetétel homogén legyen. Az iparban már régóta alkalmazzák, azon képességük miatt, hogy a szerkezetük fizikai behatásra torzul, majd annak megszűnését követően helyreáll. Tehát a polihidroxi-borát komplexek folyamatosan törnek és helyreállnak milliszekundumos időtartam alatt az oldat pH értékétől, az ionerősségtől és a hőmérséklettől függően [39]. Ez a viselkedés teszi lehetővé a tranziens/reverzibilis térhálósítást [9], illetve változnak a reológiai tulajdonságai is, amelyet az iparban, a rétegrepszítés során már régóta hasznosítanak [40].

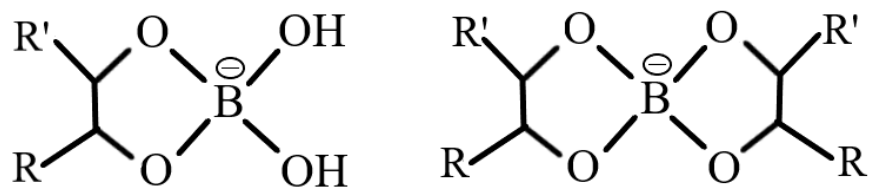
A bórsav egy gyenge Lewis-sav elektron-akceptorként viselkedik. Híg vizes oldatban tetrahidroxiborát ion képződik belőle, azáltal, hogy felvesz egy hidroxilcsoportot, ami proton felszabadulással jár, így savas pH eltolódást okoz [41]. Töményebb oldatokban polimerizálódhat.



3. ábra: Bórsav-tetrahidroxiborát egyensúlyi átmenet vizes oldatokban.

Már 1842-ben megfigyelték, hogy a cukrok növelik a bórsav oldat savasságát [42]. A borát emellett megváltoztatja a poliol-borát rendszerekben például az optikai forgást, a viszkozitást, oldhatóságot és elektromos vezetőképességet [43]. Ezen tulajdonságok a borát ionok és a polihidroxi vegyületek komplexálásának köszönhetők. Semleges pH érték felett a borát ionok komplexeket alkotnak a polihidroxi-molekulák 1,2 vagy 1,4 cisz-diol csoportjaival. Kétféle komplex jöhet létre (4. ábra). Egy borát reakcióba léphet egy poliol molekulával, amely során két vízmolekula szabadul fel, így létre jön az 1:1 (borát:poliol, BP⁻)

komplex. Komplexálhat két poliol molekulával is, amely esetben 1:2 (borát:poliol, BP_2^-) komplex keletkezik.

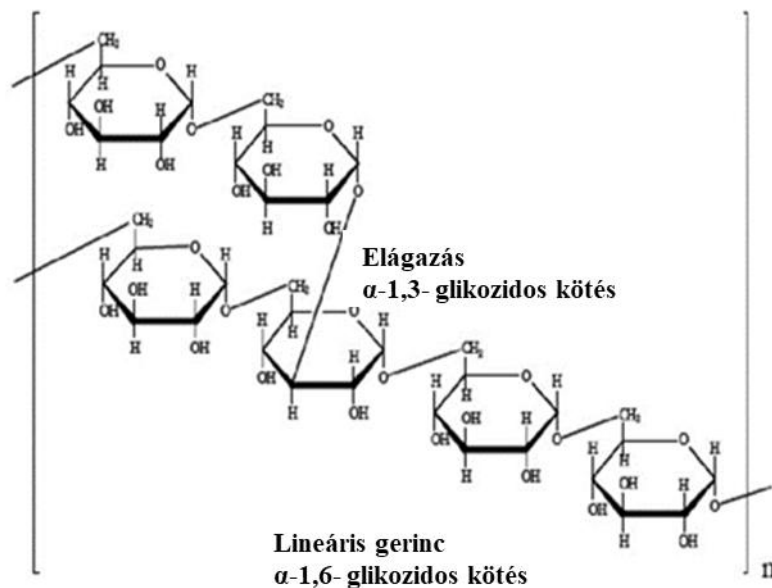


4. ábra: Mono (bal) és didiol (jobb) tetraborát:poliol komplexek (saját készítésű ábra).

Glükóz polimerek esetében, mint például a dextrán, hattagú komplexek képződhetnek 1:1 (egy borát/egy glükóz) vagy 1:2 (egy borát/két glükóz) arányban. Az említett 1:1 és 1:2 sztöchiometria a borátion és a dextrán szacharid monomerjei közötti kölcsönhatásra vonatkozik. Bár a bórsav a dextrán ismétlődő egységeivel, azaz monomereivel reagál, fontos kiemelni, hogy az alkalmazott dextrán valójában egy 2 MDa molekulatömegű polimer. Az így létrejött hálószerkezetű rendszer eredményeként gél keletkezik, ami a borát-kötésekkel stabilizálódik.

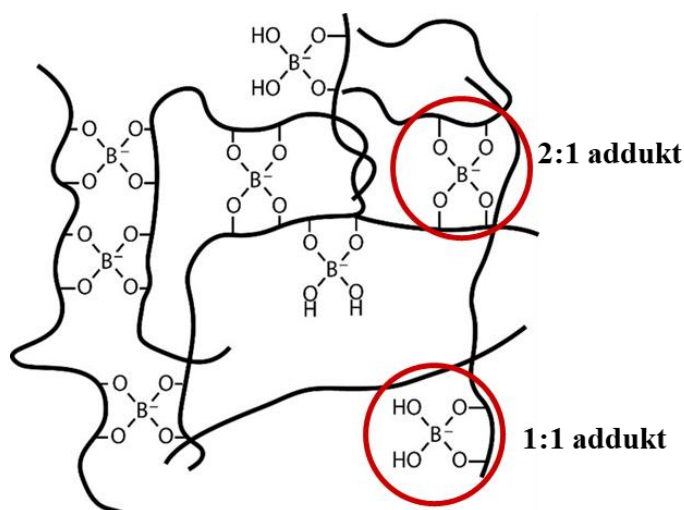
A borát-poliol komplexek stabilitása nagymértékben függ az alkalmazott polihidroxi vegyület típusától. Erős komplexek képződnek, ha az OH-csoportok térbeli orientációja megegyezik a tetraédres borát molekula szerkezeti paramétereivel [44, 45]. Például a komplexképződés egyensúlyi állandója két nagyságrenddel magasabb a glükóz esetében, szemben a glicerinnel [46].

A dextrán a *Leuconostoc mesenteroides* tejsavbaktérium által termelt, glükóz egységekből felépülő extracelluláris mikrobiális poliszacharid. A dextrán molekula (5. ábra) gerincét α -1,6-glikozidos kötéssel kapcsolódó glükóz egységek építik fel, mely kis mértékben α -1,2; α -1,3; és α -1,4 kötésű elágazásokat tartalmazhat [47]. A molekulatömeg függ az előállítás paramétereitől. A kísérleteimhez 2 millió Dalton molekulatömegű dextránt használtam, mely magas szacharóz tartalmú táptalaj használatával állítható elő [48].



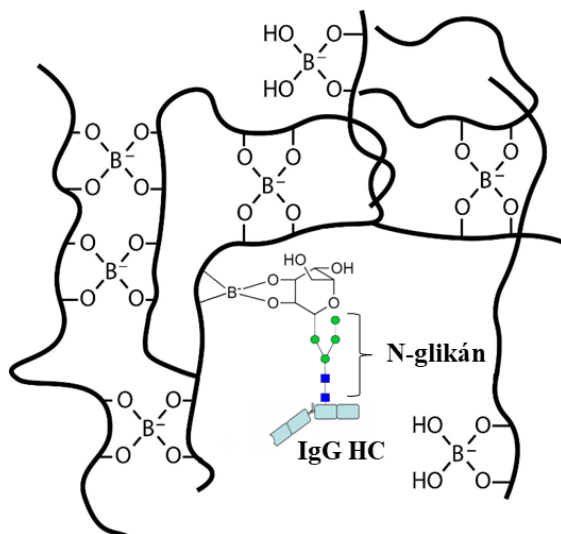
5. ábra: A dextrán kémiai szerkezete (módosított ábra) [49].

A dextrán és bórsav reakciója során hattagú borát komplexek jöhetnek létre 1:1 (borát:dextrán, BD^-) vagy 1:2 (borát:dextrán, BD_2^-) arányban [50]. Ennek eredményeként láncon belüli (1:1) és láncok közötti (1:2) adduktok képződnek. Utóbbi biztosítja a kémiai gélképződéshez szükséges térhálósítást, amint az a 6. ábrán is látható.



6. ábra: Borát ionnal térhálósított dextrán gél sematikus ábrázolása, jelölve a lánconbelüli (1:1) és láncok közötti (1:2) komplexképződést (saját készítésű ábra).

A dextrans polimer meglehetősen merev szerkezete miatt a 1:2 komplexek láncon belüli kialakulása (hurok) gyakorlatilag elhanyagolható [51]. 1:1 komplex esetén a borátion szabad funkcionális csoportja komplexet képezhet a glikoproteinek szénhidrát-részeivel (glikán) is [52], például a monoklonális antitestek glikozilált nehézláncjaival (7. ábra), befolyásolva azok elektromigrációját, és nagyobb szelektivitást biztosítva azoknak, a nem borát tartalmú rendszerekhez képest [53].



7. ábra Diol-borát-glikoprotein komplex (saját készítésű ábra).

Kék négyzet: GlcNAc; Zöld kör: Mannóz

A borát-diól komplex élettartama az ezredmásodperces tartományba esik. Tehát a komplex folyamatosan törik és újra formálódik [39]. SDS-protein komplexek elektromigrációja során a nagymértékben térhálósított gél struktúrája torzul, de az áthaladást követően a deformáció helyreáll. Tehát a folyamatos törés/helyreállítás fontos a mátrix szűrési képességének fenntartásában. Ennek a tulajdonságnak köszönhető az is, hogy a kis belső átmérőjű kapilláris (50-100 mikrométer) könnyen feltölthető a géllal, illetve nyomás segítségével ki is mosható onnan.

Fix dextrans koncentráció mellett a bórsav koncentráció emelése növeli a láncok közötti kötések számát (keresztkötés) és ezzel egyidejűleg csökkenti a keletkező gél pórusméretét. Másrészt, ha a rendszerben van feleslegben borát ion, a láncon belüli borát 1:1 komplexképződés is emelkedhet, és az így létrejövő negatív töltésű részek a láncok taszítását

idézhetik elő. Ennek következtében növekedhet a lokális pórusátmérő[54], miközben biztosítja a glikánnal való komplexképződés lehetőségét a szabad vicinális hidroxil csoport jelenléte miatt.

2.5 Terápiás fehérjék

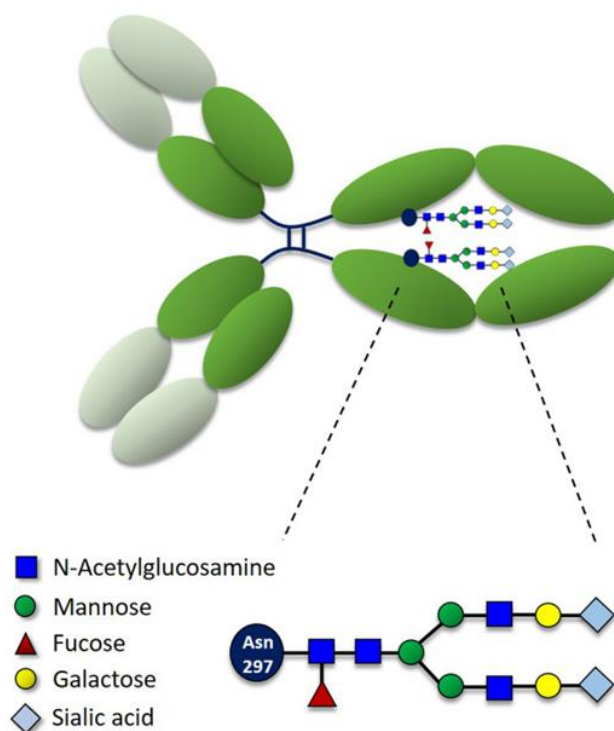
2.5.1 Terápiás fehérjék piaca és jelentősége

Napjainkban a legtöbb forgalomba hozott humán gyógyászati felhasználásra szánt bioterápiás készítmény fehérje vagy peptid alapú. 2014-2018 között több mint 100 biológiai gyógyszer került a piacra, melyek nagyobb része antitest alapú fehérje készítmény [55]. Azonban egyre több gyógyszeripari fejlesztés alkalmaz új megközelítést, így megjelentek a nanobodyk, bi/ trispecifikus antitestek és fúziós fehérjék is, amelyek a rákellenes szerek ígéretes osztályát képviselik [56]. Azonban a fehérje alapú gyógyszerek fejlesztése, gyártása során számos potenciális molekuláris variáns keletkezhet. A heterogén molekulák keverékeként jellemezhető fehérjék különféle aminosav oldallánc módosításokkal, S-S kötésekkel, alegység struktúrákkal, mérettel, töltéssel, glikoformákkal és aggregátumokkal jöhetnek létre. Sejtes rendszerben kerülnek előállításra így a referencia molekula tökéletes lemásolása nem lehetséges, azaz valamilyen mértékű variabilitás várható. A biológiai előállítási folyamat során a heterogenitás felhalmozódhat, a tisztítás és tárolás során pedig megjelenhetnek a bomlástermékek.

2.5.2 Hagyományos monoklonális antitest alapú terapeutikumok

Az antitest alapú terápiás fehérjék alapszerkezete (8. ábra) azonos a humán immunoglobulin G (IgG) molekulák valamelyik altípusával (1-4). 150 kDa molekulatömegű heterodimer fehérjék, négy polipeptidláncból épülnek fel, amelyek közül kettő nehéz- (HC, 50 kDa) és kettő könnyűlánc (LC, 25 kDa). A láncokat összekötő diszulfidhidak kialakulása után jellegzetes „Y” alakú molekulaformát vesznek fel. A láncok variábilis (V) és konstans (C) doménekből állnak. A nehézláncok konzervatív C-terminális doménjei (C_{H2} és C_{H3}) építik fel a konzervatív Fc-régiót (fragment crystallizable region - Fc region) [57]. A C_{H2} doménon, általában az Asn-297 pozícióban található a konzervált N-glikán kötő hely [58]. Ehhez a pozícióhoz glikozidos kötéssel kapcsolódó oligoszacharidok a nehéz lánc molekulatömegének

2-3%-t teszik ki [59]. Az Fc C_H2 domén N-glikozilációja fontos szerepet játszik a terápiás monoklonális antitestek farmakokinetikájában, stabilitásában és az effektor funkciókban [60].



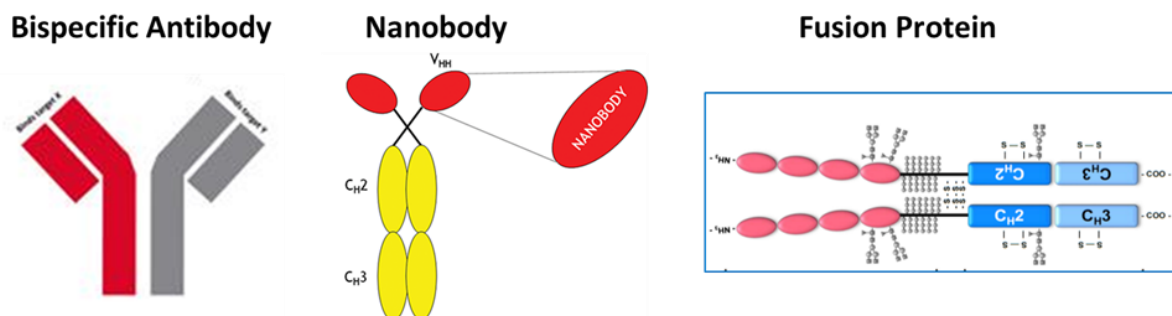
8. ábra: Humán IgG szerkezete a CH₂ doméneken lévő konzervált Asn-297 glikán kötő helyekkel [61].

A glikoziláció az egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosítás, amely nagymértékben befolyásolja az mAb-alapú fehérjék hatékonyságát, biztonságos terápiás alkalmazhatóságát és stabilitását. A fehérjék glikozilációs profilját az előállításra használt sejtvonal, a gyártási folyamat és mindezek változása befolyásolja [62].

2.5.3 Új típusú bioterápiás fehérjék

A hagyományos monoklonális antitestek mellett az új típusú monoklonális antitest alapú termékek fejlesztése és gyártása is jelentős napjainkban. Ezek a fehérjegyógyszerek sokkal összetettebb molekulák (9. ábra), mint a hagyományos mAb-ok ezért kihívást jelenthet a minőségellenőrzésre használt analitikai módszerek alkalmazása, azok optimalizálása [63]. A bi/trispecifikus monoklonális antitestek, az alacsony molekulatömegű antitestek és a

módosított glikán részt tartalmazó monoklonális antitestek (gliko-manipulált antitestek = glycoengineered monoclonal antibodies) következő generációs termékeknek számítanak [64]. Ezek a szerkezetek számos előnnyel rendelkeznek, mint például a nagyobb kötési aviditás, fokozott effektor funkció és hatékonyabb antitest-függő sejtes citotoxicitás (ADCC) [65].



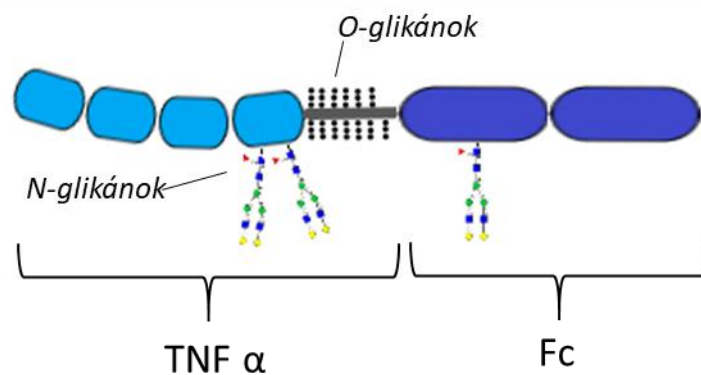
9. ábra: Néhány jelentős új típusú bioterápiás fehérje: bispecifikus antitest, nanobody és fúziós fehérje [66].

A multispecifikus antitesteket különböző antitestek fragmentumaiból állítják elő felhasználva a molekuláris, genetikai és biokémiai módszerek eszközeit. Ezek az antitestek több antigénkötő doménnel rendelkeznek egyetlen molekulán belül. A bispecifikus antitestek két epitópot ismernek fel, így képesek akár két különböző antigénhez is kötődni [67]. Ezen tulajdonságuk miatt fejlesztik őket terápiás és diagnosztikai célzattal. Az ilyen típusú antitest egyik része képes felismerni a célsejtet, míg a másik része az effektor sejtet, ezáltal fokozva a citotoxikus hatást [68]. 2020 elején végzett felmérések szerint csaknem 123 klinikai tesztvegyületet vizsgáltak, ezzel a rákgyógymódra irányuló kutatások vezető gyógyszercsoportját képezik [69]. Ezen túlmenően számos krónikus betegség, például gyulladásoz betegségek, cukorbetegség, Alzheimer kór és akár vírusfertőzések kezelésében is hatékony terapeutikumokká válhatnak [70].

A fehérjék glikozilációs profilja megváltoztatható különböző molekuláris biológiai módszerekkel. A glycoengineering megközelítés egyik célja a glikánok heterogenitásának csökkentése, a másik pedig az új antitest-variánsok létrehozása, amelyek fokozott biológiai funkciókkal rendelkeznek, és adott terápiás céltól függően hatékonyabbak lehetnek [71]. Például a core fukózzal rendelkező N-glikán struktúrák számának csökkentése fokozza az

ADCC aktivitást az erősebb Fc γ R IIIa kötési affinitás miatt [72], a galaktóz molekulák számának növelése fokozza az antitest-dependens sejt- közvetítette fagocitózist (ADCP) [73].

A fúziós fehérjék, olyan fehérjék, amelyek legalább két olyan domént tartalmaznak, amelyek külön génen kódoltak. Az etanercept egy dimer fúziós fehérje, amelyben egy humán tumor nekrozis faktor (TNF α) receptor kötődik az IgG molekula Fc-részéhez. Autoimmun betegségek, mint például reumatoid arthritis és pikkelysömör kezelésére alkalmazzák. A TNF α által kiváltott proinflammatorikus aktivitás gátlása révén hat [74]. Nagymértékben glikozilált, három N-glikozilációs (kettő a TNF α -án, egy az Fc részen) és tizenhárom O-glikozilációs helyet tartalmaz a kapocsrégióban [75]. A 10. ábrán látható a fehérje felépítése, jelölve az N- és O-glikozilációs kötőhelyek elhelyezkedését.



10. ábra: Az etanercept fúziós fehérje szerkezetének sematikus ábrázolása (saját készítésű ábra).

A körülbelül 15 kDa molekulatömegű nanobody a nehézlánc egyetlen variábilis régiójából áll, ennek segítségével képes kötődni az antigénhez. Legelőször tevéfélék vészérumából izolálták, de funkcionális immunoglobulinból is előállítható [76]. A kisméretű terápiai antitestek változatai közé sorolható. Nagyon stabil, illetve nagyon specifikusan kötődik, így számos célra felhasználják, mind az alap kutatásban, diagnosztikában és terápiai szerként is alkalmazzák [77].

2.6 Terápiás fehérjék jellemzése

A terápiás fehérjék komplex molekulák, amelyeket gyakran rekombináns expressziós rendszerekkel termeltetnek. Az egyre fejlődő biotechnológiai módszerek – antitesttervezés és gyártási technikák – ellenére melléktermékek keletkezhetnek, mint például szabad láncok, aggregátumok, különböző glikoformák és homodimerek. Ezek befolyásolhatják a gyógyszerbiztonságot, minőséget és hatékonyságot [78]. A tárolás során bekövetkező lebomlás, pedig nem kívánt proteoformák előfordulásához vezethet, amelyek befolyásolhatják a gyógyszer biológiai aktivitását, farmakokinetikáját, farmakodinamikáját és az immunogenitást, ezáltal a gyógyszerbiztonságot.

A biotechnológiai termékeket, különösen a fehérjéket olyan szigorúan és teljes mértékűen kell analizálni és jellemezni, amilyen mértékben lehetővé teszi azt az elválasztás technika aktuális állása. A különböző kapilláris elektroforézis módszerek széles körben elfogadottak a gyógyszeriparban a terápiás fehérjék jellemzésére. Az előállítási folyamat minden stádiumában alkalmazhatók köszönhetően a sokoldalúságuknak, beleértve a folyamatfejlesztést, a sarzs felszabadítást és stabilitási vizsgálatokat. Számos CE módszer került kifejlesztésre a terápiás fehérjék polipeptid és szénhidrát részének analizálására [79].

Az SDS-CGE módszer fehérjeszintű analizisre használható. Ez a hatékony technika fehérjék tanulmányozására lehetővé teszi a gyors tisztaság-ellenőrzést és a méret heterogenitás becslését [8], ami azt jelenti, hogy meghatározható a nem glikozilált nehéz lánc (ngHC) fragmentum jelenléte vagy hiánya a termékben. A mintaelőkészítéstől függően intakt és redukált fehérjék vizsgálatára is alkalmas.

A kapilláris elektroforézis lézer indukált fluoreszcens detektálással (CE-LIF) nagy felbontóképessége és érzékenysége miatt alkalmas fehérjék glikozilációjának vizsgálatára is [80]. Gyakran használják az eredeti és a biohasonló gyógyszerek összehasonlító analizisére, mivel a glikoziláció befolyásolja azok hatékonyságát, biztonságosságát és immunogenitását. A cIEF alapú módszerek a gyártást követően nyújthatnak információkat a terápiás fehérjék tisztaságáról, töltés heterogenitásáról, stabilitásról és a poszttranszlációs módosulásokról.

3. Célkitűzések

A nátrium-dodecil-szulfát kapilláris gélelektroforézis (SDS-CGE), mely napjainkban tetrahydroxyborát ionnal térhálósított dexrán mátrixot alkalmaz elválasztó közegként, egy nagy hatékonyságú bioanalitikai módszer, gyors elemzési idővel és kis mennyiségű mintaigénnyel, így kiválóan alkalmazható terápiás fehérjék hatékony jellemzésére.

Dolgozatom célja bemutatni 1) a terápiás fehérjék kapilláris gélelektroforézissel történő analízise során a mérési paraméterek optimalizálása hatékonyabb elválasztást eredményezhet, és számos új típusú glikoprotein esetében nélkülözhetetlen, valamint, hogy 2) a dexrán-borát gél-puffer rendszer tulajdonságainak feltárása, az összetétel változtatásának tanulmányozásával lehetővé teszi az elválasztás mechanizmusának mélyebb megismerését, így segítve a glikoproteinek elválasztása során felmerülő kihívások kezelését.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Vegyszerek és reagensek

A kísérleteim során analitikai tisztaságú reagenseket használtam. A dextrán (2 MDa), bórsav, TRIS bázis (Trisz-(hidroximetil)-amino-metán), CHES (N-ciklohexil-2-amino-etánszulfonsav), nátrium-dodecil-szulfát (SDS), EDTA- Na_2 (etiléndiamin-tetraecetsav nátrium sója), glicerin, 2-merkaptoetanol, jodoacetamid, mezitil-oxid és HPLC tisztaságú víz a Sigma-Merck (St. Louis, Missouri, Egyesült Államok) cégtől kerültek beszerzésre. A belső standardot (10 kDa), a fehérjelétrát (20-225 kDa), a savas (0,1 M HCl) és bázisos (0,1 M NaOH) mosófolyadékot, az SDS-MW gélt és mintapuffert (100 mM TRIS-HCl, 1% SDS, pH 9,0) a Sciex (Framingham, Massachusetts, Egyesült Államok) gyártotta. A PNGase F-et (peptid N-glikozidáz enzim) az Asparia Glycomics (San Sebastian, Spanyolország) gyártotta.

4.2 Minták

Standard fehérjék: A belső standardot (10 kDa) és a fehérjelétrát (20-225 kDa) a a Sciex (Framingham, Massachusetts, Egyesült Államok) gyártotta. A marker sorozat az alábbi méretű fehérjéket tartalmazta: 20, 35, 50, 100, 150 és 225 kDa, melyek azonos polipeptid egységekből épültek fel és nem tartalmaztak poszttranszlációs és egyéb módosításokat [81]. Minden kísérletet első lépésben a fehérjelétrán hajtottam végre, majd ezt követően az adott terápiás antitesten, illetve azokból összeállított tesztkeveréken. A minta minden esetben tartalmazta a 10 kDa-os belső standardot.

Omalizumab: Az omalizumab (Xolair, Novartis Pharma GmbH, Németország) terápiás monoklonális antitestet a Semmelweis Kórház (Miskolc, Magyarország) biztosította. Az omalizumab egy glikoprotein alapú terápiás antitest, melyet célzott terápiás szerként IgE (immunglobulin E) közvetítette asztma kezelésére alkalmaznak a súlyos asztma exacerbációk csökkentése, a tüdőfunkció javítása, illetve az orális kortikoszteroidok bevitelének mérséklése érdekében [82]. Rekombináns DNS-eredetű humanizált IgG1 (immunglobulin G1)

monoklonális antitest alapú hagyományosnak tekinthető terápiás fehérje. Két könnyű és két nehézláncból épül fel, molekulatömege 149 kDa. Szelektíven kötődik a humán IgE molekulához, ezért gátolja az IgE kötődését a hízósejtek és a bazofil sejtek felszínén található nagy affinitású IgE receptorhoz (FcεRI). A sejt felszínén kötött IgE molekulák mennyiségének csökkenése korlátozza az allergiás reakció mediátorok felszabadulásának mértékét [83].

Etanercept: Az etanercept (Enbrel) fúziós fehérjét a Debreceni Egyetem (Debrecen, Magyarország) biztosította, a Pfizer Manufacturing (Puurs, Belgium) gyártotta.

Nanobody: A nanobody-t (prosztata specifikus antigén - PSA ellen) a Veszprémi Egyetem, Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet (Veszprém, Magyarország) biztosította.

4.3 Mintaelőkészítés

4.3.1 Redukált mintaelőkészítés

Hő-denaturáció és redukálószer jelenlétében, az SDS, mint felületaktív anyag lefedi a polipeptidlánc hidrofób gerincét. A fehérjék az SDS-t 1 g/1,4 g arányban kötik. A fehérje oldathoz redukáló szert adagolva (pl. β-merkaptóetanol), a polipeptid láncok között lévő diszulfid hidak (-S-S-) felbomlanak. A minták az SDS kötődésével a tömegükkel arányos negatív töltést kapnak, így lehetővé téve a molekulatömeg szerinti elválasztást. 10 µL 16 mg/ml fehérje létrához 2 µL belső standardot (10 kDa) adtam, majd 80 µL SDS-MW (100 mM TRIS-HCl, 1% SDS, pH 9,0) mintapufferrel hígítottam. A mintát 5 µL 2-merkaptóetanolal redukáltam. A terápiás fehérjék esetében, hasonlóan jártam el csak a kiindulási mintamennyiség a következőképpen alakult: 10 µL 10 mg/ml fehérjeoldat. A hőmérsékletfüggő migráció vizsgálatának esetében a fehérje keverék előállításához 20 µL 0,8 mg/ml nanobody-t (PSA specifikus) összekevertem 3 µL 10 mg/ml omalizumab monoklonális antitesttel.

Ezt követően a redukált minta esetén gradiens denaturálást alkalmaztam, hogy minimalizáljam a minta esetleges fragmentálódását [84]. A mintát 30°C-ról 90°C-ra

melegítettem 0,5°C/5 s fűtési sebességgel. Ezt 5 perces inkubáció követte 90°C hőmérsékleten. A denaturálás végén a biztonságos kezelés érdekében a mintát visszahűtöttem 40°C hőmérsékletre. A mintákat közvetlenül mérés előtt készítettem elő.

4.3.2 Nem redukált mintaelőkészítés

10 µl 10 mg/ml terápiás fehérjéhez 2 µl belső standardot (5 mg/ml), majd 80 µl SDS-MW (100 mM TRIS-HCl, 1% SDS, pH 9,0) mintapuffert adtam. Végző lépésben 5 µl jodoacetamidot adtam hozzá alkilálószerként, majd a mintát 70°C hőmérsékleten 15 percig inkubáltam. Bizonyos méréseknél az így előkészített mintát olyan redukált mintához adtam, amely tartalmazta a deglikozilált és glikozilált nehézláncot is. Így egyszerre tudtam analizálni az intakt terápiás fehérjét, illetve annak alegységeit is.

4.3.3 PNGase F emésztés

Az N-glikánok eltávolításához 5 µl 10 mg/ml redukált és denaturált monoklonális ellenanyagot összekevertem 1 µL PNGase F (200 mU) enzimmel és 50°C hőmérsékleten 60 percig inkubáltam. A kapott deglikozilált nehézláncot tartalmazó oldatot összekevertem 5 µl eredeti (glikozilált) termékkel, amelyben a fehérje koncentrációja szintén 10 mg/ml volt. Erre azért volt szükség, hogy vizsgálhassam azt, hogy a fehérjén lévő N-glikán struktúrák, hogyan befolyásolják az elektromigrációt. Mivel a nem glikozilált és glikozilált nehézlánc molekulatömege csak 1-2 kDa-nál tér el egymástól, ezért nem minden elválasztó gél-puffer rendszerrel érhetem el tökéletes alapvonal elválasztást, amely lehetőséget adott a felbontás optimalizálására.

4.4 A különböző kísérletekhez használt gélek és készítésük

4.4.1 Különböző dextrans és bórsav koncentrációjú gélek készítése

Az elválasztó gélek különböző mennyiségű dextrans, bórsavat és TRIS bázist tartalmaztak. Első lépésben bemértem az *1. táblázatban* látható koncentrációknak megfelelő bórsavat és TRIS bázis mennyiséget egy 25 ml térfogatú laborüvegbe, majd hozzáadtam 7 ml analitikai tisztaságú vizet. A TRIS bázis mennyisége úgy került meghatározásra, hogy a kész

gél pH értéke 7,00 legyen. Ezután folyamatos keverés mellett (500 rpm) hozzáadtam 1 ml glicerint és 1 ml 20 mM EDTA-Na₂ törzsoldatot. Ezt követően kis adagokban hozzáadtam a megfelelő mennyiségű 2 MDa dextrans, elérve az *1.táblázatban* feltüntetett végkoncentrációkat. A puffert egy éjszakán át kis sebességgel, folyamatosan kevertetem, majd hozzáadtam 1 ml 2,0 % (m/V, vegyesszázalék) SDS törzsoldatot. A gél további 1 órán át kevertetem, annak érdekében, hogy egyenletesen beoldódjon az SDS de lassú sebességgel, hogy megakadályozzam a felhabzást.

1. Táblázat: Fő összetevők 10 ml gél puffer mennyiségre.

Bórsav		TRIS bázis	Dextrán 2MDa
Végkoncentráció		Végkoncentráció (mM)	Végkoncentráció [%(m/V)]
(mM)	[%(m/V)]		
640	4	428	10
			7,5
			5
			2
540	3,3	388	10
			7,5
			5
			2
440	2,7	244	10
			7,5
			5
			2
340	2	226	10
			7,5
			5
			2

4.4.2 Különböző glicerín koncentrációjú gélek készítése

Azon kísérleteknél, ahol a glicerín koncentrációt hatását vizsgáltam – 0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 % (V/V) - hasonló módon készítettem a géleket, csak eltérő glicerín mennyiség került 10 ml gélhez – 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 ml. Ennek függvényében a hozzáadott analitikai tisztaságú víz mennyisége is változott – 8,0, 7,8, 7,6, 7,4, 7,2, 7,0 ml.

4.5 Fehérjék kapilláris elektroforézissel történő elválasztása

A CE méréseket diódasoros detektorral felszerelt PA800 Pharmaceutical Analysis System (Beckman Coulter, Brea, Kalifornia, Egyesült Államok) kapilláris elektroforézis készülékkel végeztem. A detektálás 214 nm hullámhosszon történt.

A bare fused (kezeletlen felületű) 50 μm belső átmérőjű, 375 μm külső átmérőjű szilika kapillárisokat az Optronis GmbH cégtől (Kehl, Németország) vásároltam. A méréshez használt kapillárisok effektív hosszúsága 20 cm (teljes hosszúság 30 cm) volt. Az újonnan méretre vágott kapillárisokat első lépésben a következő módon kondicionáltam: 2 perces öblítés vízzel, majd 8 perces öblítés 0,1 M NaOH oldattal 40°C hőmérsékleten. A nap elején és végén a kapillárist 30°C hőmérsékleten mostam az alábbi szekvencia szerint: víz, 0,1 M NaOH, 0,1 M HCl és víz. Utolsó lépésként 25°C hőmérsékleten, levegő átnyomásával szárítottam ki a kapillárist. Minden mérés előtt prekondicionálás történt 80 psi-on végzett mosással: 0,1 M NaOH (3 perc), 0,1 M HCl (1 perc), víz (1 perc) és az adott elválasztó puffer (4 perc). Az elválasztások 25°C hőmérsékleten történtek, kivételt képeztek ez alól a SDS-fehérje komplexek migrációjának hőmérséklet függésére irányuló kísérletek. Az elválasztásokhoz minden esetben 15 kV feszültséget alkalmaztam, kivéve a hőmérsékletfüggő migráció vizsgálatokat ahol az alkalmazott feszültség 20 kV volt. A mérések fordított polaritású módban zajlottak (katód az injektálási oldalnál, anód a detektálási oldalnál). A mintákat elektrokinetikusán injektáltam: 10 kV, 20 s. Minden esetben 3-3 párhuzamos mintaelőkészítés és mérés történt.

4.6 Fizikai és elektrokinetikai paraméterek meghatározása

4.6.1 Elektroozmotikus áramlás (EOF)

Az összes gél pufferben fellépő elektroozmotikus áramlás mérése 50 mM mezitil-oxid injektálásával történt, melyet 254 nm hullámhosszon detektáltam. Az EOF mérések kivitelezésénél az előző bekezdésben leírtak szerint történt a kapilláris kondicionálása. Az elválasztás 15 kV feszültséggel, 25°C hőmérsékleten normál polaritású üzemmódban (anód az injektálási oldalnál) zajlott. Az EOF markert (mezitil-oxid) elektrokinetikusan injektáltam 5 kV feszültséggel 20 másodpercig. Az összes többi elválasztási körülmény megegyezett az előző fejezetben leírtakkal. A méréseket gélenként 3-szor megismételtem, illetve a reprodukálhatóságot vizsgáltam a kapillárisok között, illetve gél sarzsonként is. A kapott csúcsok esetében a migrációs idők felhasználásával kiszámoltam a marker adott gélben való mobilitását.

4.6.2 Viskozitás

A gél-pufferek dinamikus viszkozitásának meghatározása a kapilláris elektroforézis készülékkel történt. Markerként a mezitil-oxidot használtam a viszkozitás méréseknél is. A mezitil-oxidot hidrodinamikusan injektáltam 5 psi nyomással 5 másodpercig. Ezt követően a bemeneti oldalra 20 psi nyomást adtam, elektromos feszültség ráadása nélkül. A nyomás révén a marker a detektor felé mozdult el. A rögzített detektálási időből a Hagen-Poiseuille egyenlet segítségével számoltam ki a viszkozitást, mely leírja a folyadékok áramlását a kapillárisban állandó nyomás mellett [85]. Az elválasztó gélek viszkozitása tehát az 16. egyenlet segítségével határozható meg, a migrációs idő ismeretében. A η [Pa s] a folyadék (gél) viszkozitását írja le az alkalmazott nyomás ΔP [Pa], a belső kapilláris átmérő D [m] és az idő t [s] függvényében, amely alatt a neutrális minta végig vándorol a kapilláris effektív (injektálási oldal-detektor közötti távolság) hosszán.

$$\eta = \frac{\Delta P D^2}{32 l^2} \cdot t \quad (16)$$

4.6.3 Áramerősség

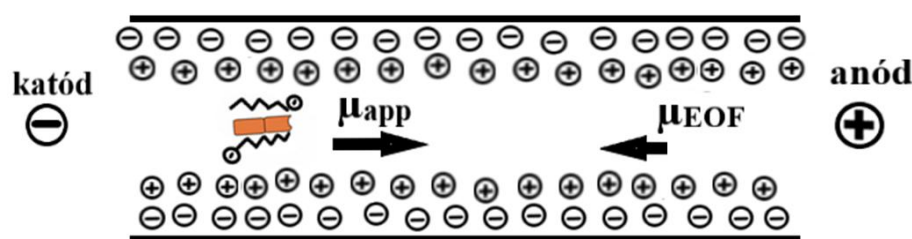
A kapilláris elektroforézis során az adatok gyűjtésére szolgáló szoftver folyamatosan rögzítette és megjelenítette az áramerősséget diagram formájában. Az x-tengelyen az idő, az y tengelyen az áramerősség kerül ábrázolásra. Ezen diagramokról olvastam le az áramerősségeket.

4.7 Az adatok kiértékelése

Az adatok gyűjtésére a 32Karat (10.1 verzió) szoftvercsomagot (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, Amerikai Egyesült Államok) használtam. A számolásokhoz, statisztikai értékeléshez, táblázatok és diagramok készítéséhez Excelt használtam. A sematikus ábrák szerkesztéséhez a 3D Paint alkalmazást hívtam segítségül. Minden mérést több párhuzamossal végeztem, így minden adat esetében rendelkezésre álltak olyan statisztikai adatok, amelyek a reprodukálhatóság megállapításához szükségesek voltak.

4.7.1 Elektroforetikus mobilitás meghatározása

Az adatok kiértékeléséhez rögzítettem az SDS-fehérje komplexek látszólagos mobilitását (μ_{app}), meghatároztam az effektív mobilitását (μ_{eff}), illetve az adott elválasztó közegre jellemző EOF mobilitást (μ_{EOF}). Az általam használt elválasztó közegek esetében az EOF áramlás a katód irányába történt, ahogyan ezt a 11. ábra szemlélteti, de a minta töltésének megfelelően fordított polaritást alkalmaztam (injektálás a katódnál, detektálás az anódnál). Tehát az EOF ellentétes irányú a negatív töltésű SDS-fehérje migrációjához viszonyítva.



11. ábra: Az EOF és SDS-fehérje komplexek elektromigrációjának sematikus ábrázolása (saját készítésű ábra).

Tehát az effektív mobilitás (kiszámolásánál egy adott gél esetében mért μ_{EOF} értékét hozzáadtam az SDS-fehérje komplexek látszólagos mobilitáshoz (μ_{app}):

$$\mu_{eff} = \mu_{app} + \mu_{EOF} \quad (17)$$

A negatívan töltött gél migrációja elhanyagolható volt a mérési körülmények között, így nem került figyelembevételre. A még pontosabb számolás érdekében, szükséges volt a relatív mobilitásokkal számolnom, azaz az adott molekula effektív mobilitását osztottam a 10 kDa belső standard effektív mobilitásával.

4.7.2 Arrhenius diagram

Izoterm elválasztási körülmények között a μ -t ábrázolva az $1/T$ függvényében egyenest kapunk, ahol a meredekséget az aktiválási energia határozza meg. Adott molekulatömegű minták estében, ha a mobilitást meghatározzuk több elválasztási hőmérsékleten, akkor meghatározható annak aktiválási energia (E_a) igénye, ami ahhoz szükséges, hogy keresztülvándoroljon a polimer hálózaton. Amennyiben a μ természetes alapú logaritmusát ábrázoljuk az abszolút hőmérséklet reciprokának függvényében ($\ln\mu$ -át a $1/T$ függvényében) megkapjuk az Arrhenius diagramot,

$$\ln\mu = \ln\frac{Q}{const} - E_a/RT \quad (18)$$

A kapott egyenesek meredekségéből határozható meg az E_a az alábbi egyenlet szerint:

$$E_a = mR \quad (19)$$

Ahol m az $\ln\mu$ a $1/T$ függvényében ábrázolása során kapott egyenes meredeksége, R az egyetemes gázállandó, melynek értéke $8,314 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$. A μ értékek esetében figyelembe vettem a gél-puffer rendszer hőmérsékletfüggő viszkozitásváltozását ($4\%/\Delta 5^\circ\text{C}$) mely befolyásolja annak értékét [86].

4.7.3 Ferguson módszer

A molekula migrációját befolyásolja a gél teljes monomer koncentrációja ($T\%$, dextrans koncentráció), illetve a létrejött térhálósódás mértéke. A Ferguson módszer alkalmazása során adott molekula elektroforetikus mobilitásainak logaritmusát ábrázoljuk a $T\%$ függvényében (10. egyenlet logaritmus). Így megkapjuk a Ferguson diagramot, melynek meredeksége a retardációs együttható (K_R), amely arányos a molekulatömeggel (MW).

$$\ln \mu = \ln \mu_0 - K_R T\% \quad (20)$$

A polion elektroforetikus mobilitásának egyenletét (6. egyenlet) és 20. egyenletet kombinálva a K_R -ot olyan paraméterek segítségével fejezhetjük ki, mint a viszkozitás, a molekulatömeg és a nettó töltés:

$$\ln \frac{Q}{M_w^k \eta} = \ln \mu_0 - K_R T\% \quad (21)$$

A 21. egyenlet átrendezése azt mutatja, hogy állandó $T\%$ mellett a K_R az MW (a k kitevő a molekuláris jellemzőket jelöli), a viszkozitás és a mintakomponens szabad oldatban ($T\%=0$) történő mobilitásának (μ_0) logaritmikusan függvénye, míg a molekula nettó töltésének reciproklógaritmikus függvénye (22. egyenlet).

$$K_R = \frac{1}{T\%} \ln \frac{\eta \mu_0}{Q} + \frac{k}{T\%} \ln M_w \quad (22)$$

A 22. egyenlet alapján, a K_R logaritmikusan molekulatömeg függvényében történő ábrázolásával a kapott diagram meredeksége a molekuláris jellemzőket (k) jelöli. Az Y tengely metszéspontja viszont a mátrix viszkozitásának és a nettó molekuláris töltésnek a hatására vonatkozó információt hordozza. A K_R értéke függ az elválasztási paraméterektől, ezért az olyan tényezőket, mint a hőmérséklet, a puffer összetétele (beleértve a pH-t és az ionerősséget) és a monomer és a térhálósító arányát állandó értéken kell tartani.

Tehát kapcsolat áll fenn a K_R és MW paraméterek között. Egy ismeretlen fehérje molekulatömege meghatározható, ha megmérjük annak illetve ismert molekulatömegű standard fehérjéknek a mobilitását különböző monomer koncentrációjú gélekben. A standard fehérjék K_R értékeit ábrázolva a molekulatömegük függvényében megkapjuk az ismeretlen molekulatömegének meghatározásához szükséges kalibrációs egyenest [87].

5. Eredmények

5.1 Fizikai és elektrokinetikai paraméterek

Az elválasztó pufferek esetében meghatároztam néhány fontos fizikai és elektrokinetikus paramétert, mint például viszkozitás, elektroosmotikus áramlás és áramerősség.

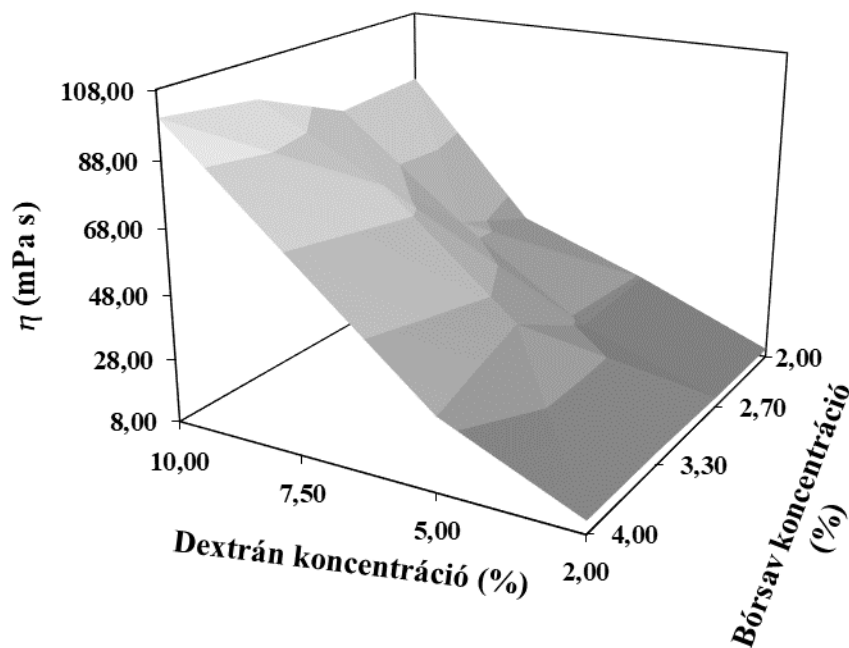
Ezen paraméterek értékeinek figyelembe vételével szabtam meg a kísérletek során alkalmazott dextrans és bórsav koncentrációk peremértékeit $50\ \mu\text{m}$ átmérőjű, $30\ \text{cm}$ teljes hosszúságú ($20\ \text{cm}$ effektív hossz) kapilláris alkalmazása esetén. Emellett értéküket figyelembe vettem az adatok kiértékelésénél, illetve a következtetések levonásánál.

A $2\ \text{MDa}$ molekulatömegű dextrans viszkozitása 10% koncentráció feletti tartományban, olyan mértékben növekszik, hogy nem teszi lehetővé az egyszerű gélcserét a keskeny átmérőjű kapillárisban, figyelembe véve a mérőműszer alkalmazható felső nyomáshatárát ($100\ \text{psi}$). 2% koncentráció alatt a molekulaszűrő képesség jelentősen csökkent a vizsgált $20 - 225\ \text{kDa}$ tartományban.

Magas bórsav koncentráció esetében ($> 4\%$) az alkalmazott $500\ \text{V/cm}$ térerősség és $30\ \text{cm}$ oszlophossz mellett jelentősen megnőtt az elektromos áramerősség, amely nemkívánatos Joule-hő képződést eredményez. 2% bórsav koncentráció alatt, az elemzési idő jelentősen megnőtt az ellenirányú EOF növekedése miatt. A fentieknek megfelelően további kísérleteim során $2-10\%$ dextrans (D) és $2-4\%$ bórsav (B) koncentráció tartományokba eső géleket vizsgáltam.

5.1.1 Viskozitás

Az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint kapilláris elektroforézis készülékkel határoztam meg a gélek viszkozitását. A viszkozitás mérések esetében a százalékos relatív szórás (%RSD) 0,4% volt. Az 12. ábrán láthatóak a kapott viszkozitás értékek 2-10% dextrans és 4-2% bórsav tartalmú gélek esetében



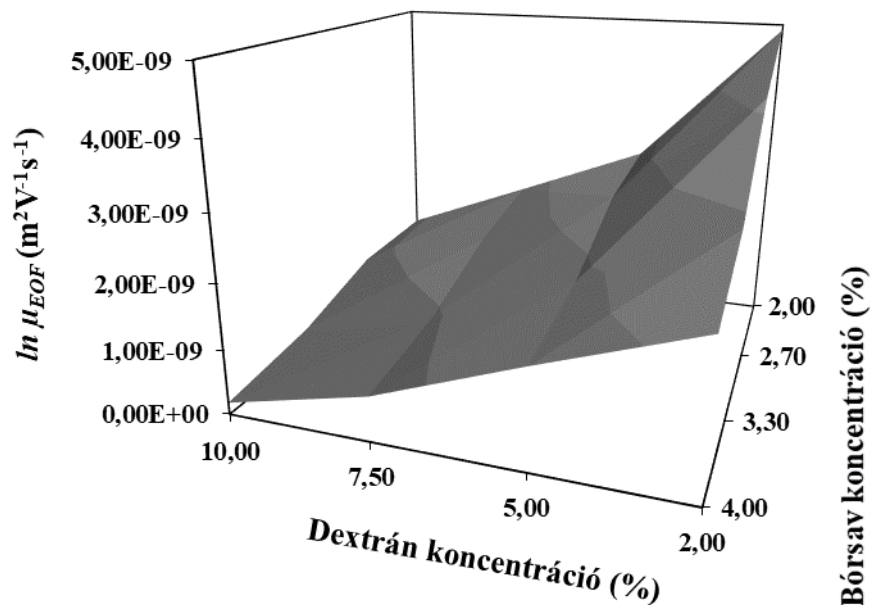
12. ábra: A különböző dextrans/borát tartalmú gélek viszkozitása (η) 2-10% dextrans és 2-4% bórsav tartományban.

A 10%D/4%B gélnek volt a legnagyobb a viszkozitása, 100 mPa·s, a legkisebb viszkozitást a 2%D/2%B gélnél mértem, 10,7 mPa·s. Kevesebb bórsav használatával csökkent a viszkozitás az adott dextrans tartalmú géleknél, a 10%D/2%B esetében 85 mPa·s –ra csökkent a viszkozitás. A dextrans koncentrációt alacsony szinten tartva (2%) a bórsav mennyiségének emelésével, a viszkozitás nőtt (10,7-12 mPa·s), de még így is csaknem 10-szer alacsonyabb volt, mint a 10% dextrans tartalmú gélek esetében.

5.1.2 Elektroosmotikus áramlás

Nem bevont falú szilika kapillárist alkalmaztam a kísérleteimhez, amely esetben pH=2,5 fölött elektroosmotikus áramlás léphet fel, amely befolyásolja a mintakomponensek vándorlási sebességét. A dextrans-borát gélek esetében katód irányú EOF által generált

folyadékáramlás jött létre, így lassítva a negatív töltésű SDS-fehérje komplexek migrációját. Az EOF mérések esetében a migrációs idők $\%RSD = 0,76$ volt. A 13. ábrán láthatóak az különböző dextrans és bórsav tartalmú gélek EOF értékei.

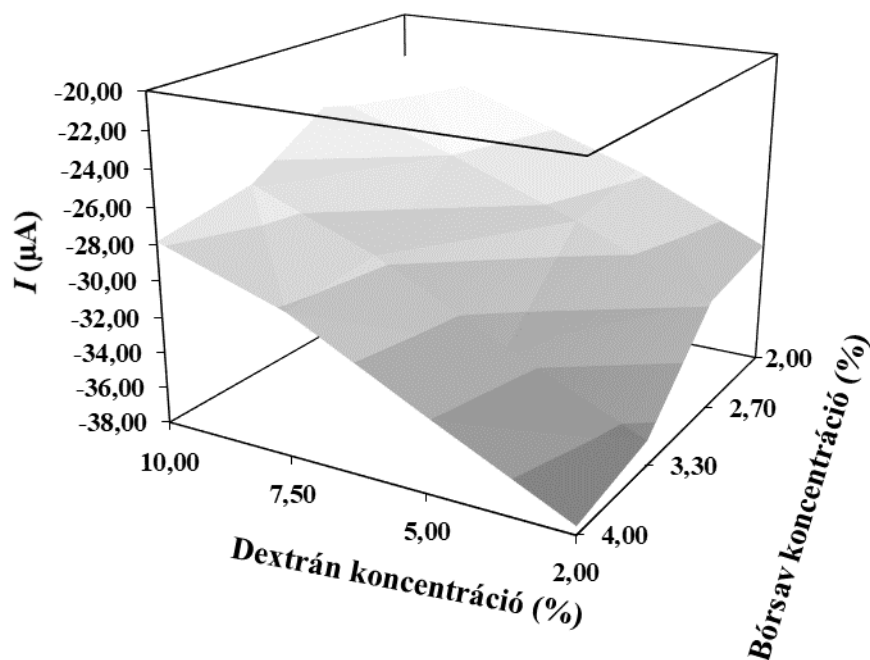


13. ábra: A különböző dextrans/borát tartalmú gélek EOF értékei (μ_{EOF}) 2-10% dextrans és 2-4 % bórsav tartományban.

Az EOF mobilitások csökkenő tendenciát mutatnak a növekvő dextrans (növekvő viszkozitás) – és bórsav (növekvő ionerősség és kereszt kötés képződés) koncentrációval: $-4,92 - -0,18 \cdot 10^{-9} m^2/Vs$. Ebből következik, hogy 10%D/4%B gél készítmény esetében volt a legalacsonyabb az EOF ($-0,18 \pm 0,001 \cdot 10^{-9} m^2/Vs$), köszönhetően a nagy viszkozitásnak és ionerősségnek, illetve ennek megfelelően a 2%D/2%B formula esetében mértem a legnagyobb EOF áramlást: $-4,92 \pm 0,03 \cdot 10^{-9} m^2/Vs$.

5.1.3 Áramerősség

Másik fontos fizikai paraméter, amely meghatározásra került 500 V/cm elektromos térerősség mellett az áramerősség volt. A mérések $\%RSD$ értéke 0,56-nak adódott. A kapott áramerősség értékeket a 14. ábra szemlélteti a gél dextrans és bórsav tartalmának függvényében.



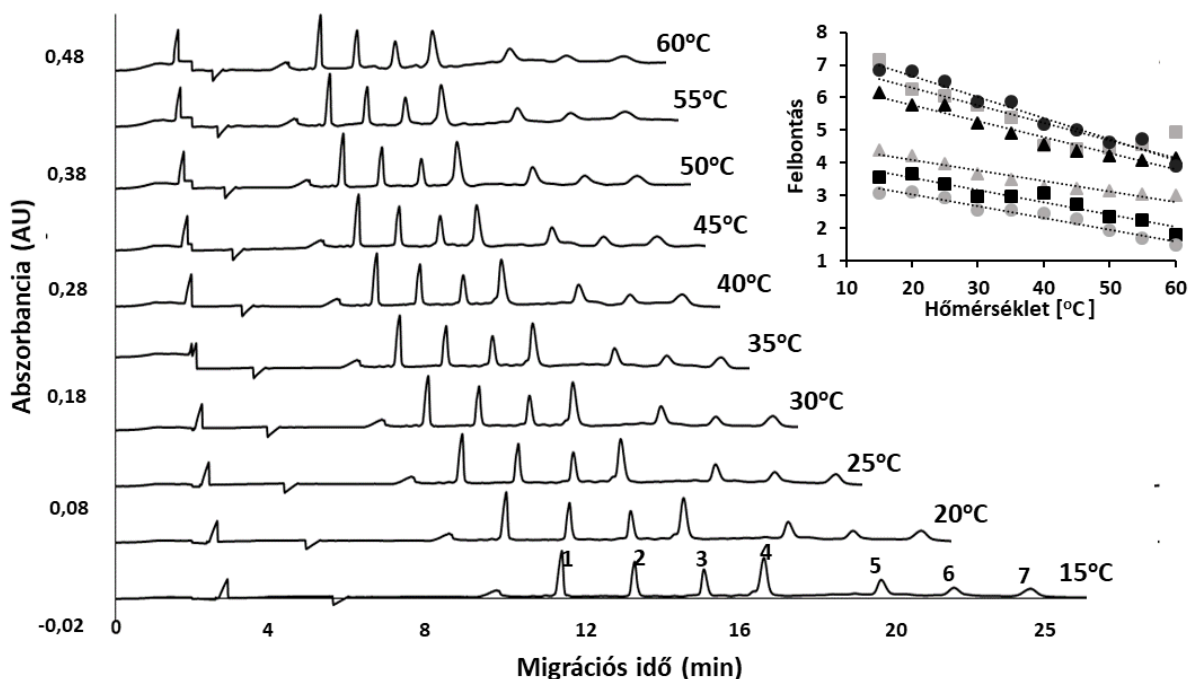
14. ábra: A különböző dextrán/borát tartalmú gélekben mért áramerősség (I) a 2-10% dextrán és 2-4 % bórsav tartományban 500 V/cm elektromos térerősség mellett.

Egyértelműen magasabb áramerősséget mértem a 4% bórsav tartalmú géleknél szemben a 2% bórsav összetételű gélekkel. A legnagyobb áramerősség az alacsony dextrán/magas bórsav összetételű (2%D/4%B) gélnél volt megfigyelhető (37,53 μA), feltételezhetően a dextrán-borát komplexképződés során felszabaduló protonok és kis viszkozitás miatt. A legalacsonyabb áramerősséget a nagy monomer/alacsony térhálósító koncentrációjú, 10%D/2%B gélben mértem: 22,58 μA .

5.2 Fehérjék hőmérséklet-függő elektromigrációja

Korábbi tanulmányok szerint a megfelelő elválasztási hőmérséklet megválasztása a CE-ben fontos szerepet játszik az elválasztás hatékonyságában és szelektivitásában. A fehérjék migrációs idejét és csúcsfelbontását 15-60°C közötti kapilláris hőmérséklet függvényében vizsgáltam. A hőmérsékletet 5°C-os lépésekben emeltem. Arrhenius diagramokat készítettem a fehérjeelválasztások hőmérsékletfüggésének és aktiválási energiaigényének vizsgálatára.

A 15. ábrán láthatók a standard fehérje sorozat (20 – 225 kDa) elektroferogramjai, 15 és 60°C közötti elválasztási hőmérsékleteket alkalmazva 5°C-os intervallumokban. Az ábra jobb felső sarkában a csúcsok közötti felbontás értékek ábrázolása látható az elválasztási hőmérséklet függvényében.

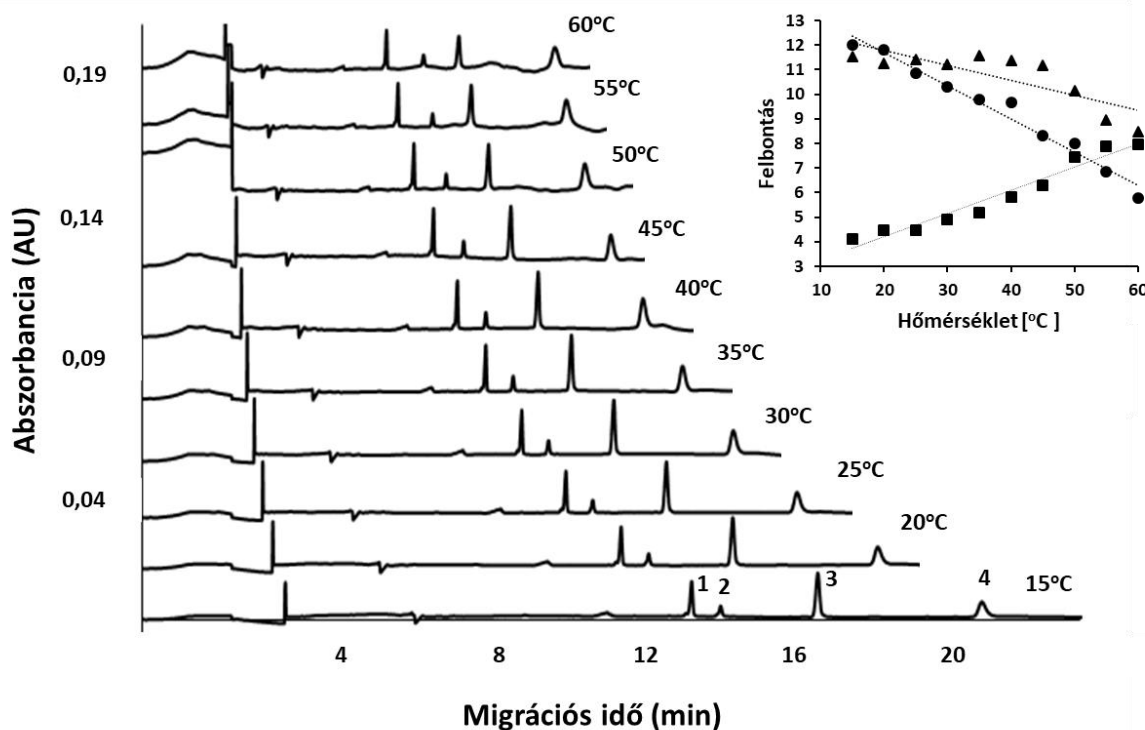


15. ábra: Fehérje létra SDS-CGE elválasztása különböző hőmérsékleteken.

Csúcsok: 1–10, 2–20, 3–35, 4–50, 5–100, 6–150, 7–225 kDa. A jobb felső sarokban lévő ábrán a csúcsok közötti felbontási értékek láthatók az elválasztási hőmérséklet függvényében (a csúcsok közötti felbontást jelképező szimbólumokkal: ■ 1–2, ▲ 2–3, ▲ 3–4, ● 4–5, ■ 5–6, ● 6–7). Az elválasztás körülményei: 20 cm effektív hossz (30 cm totál), 50 μ m ID, BFS kapilláris; alkalmazott elválasztási feszültség: 20 kV; minta injektálása: 10 kV 20 s. Minta koncentráció: 1,57 mg/ml.

A standard fehérje létra 6 különböző molekulásúlyú fehérjét tartalmazott 20 és 225 kDa között, így elektroferogramján 7 jól elkülönülő csúcs látható belső standardot (10 kDa) is figyelembe véve. A standard fehérje esetében az egyes csúcsok mobilitása az elválasztási hőmérséklet emelésével folyamatosan nőtt: $\mu_{20 \text{ kDa}} = 3,71 \cdot 10^{-9} - 4,66 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{Vs}$, míg a felbontás csökkent: $RS_{20 \text{ kDa}-35 \text{ kDa}} = .7,14 - 4,95$.

A 16. ábrán a 10 kDa-os belső standard, a PSA specifikus nanobody (14,26 kDa), valamint a terápiás monoklonális antitest (omalizumab) könnyű (23,98 kDa) és nehéz (49,37 kDa) láncainak elválasztása látható azonos módon a fehérje létrához.



16. ábra Teszt fehérje keverék SDS-CGE elválasztása különböző hőmérsékleteken.

Csúcsok: 1 - 10 kDa fehérje standard, 2 - nanobody (PSA specifikus, M_w 14,26 kDa), 3 - omalizumab könnyűlánc (M_w 23,98 kDa), 4 - omalizumab nehézlánc (M_w 49,37 kDa). A jobb felső sarokban lévő ábrán a csúcsok közötti felbontási értékek láthatók az elválasztási hőmérséklet függvényében (a csúcsok közötti felbontást jelképező szimbólumokkal: ■ 1–2, ● 2–3, ▲ 3–4. Az elválasztás körülményei megegyeztek a 15. ábra alatt írottakkal.

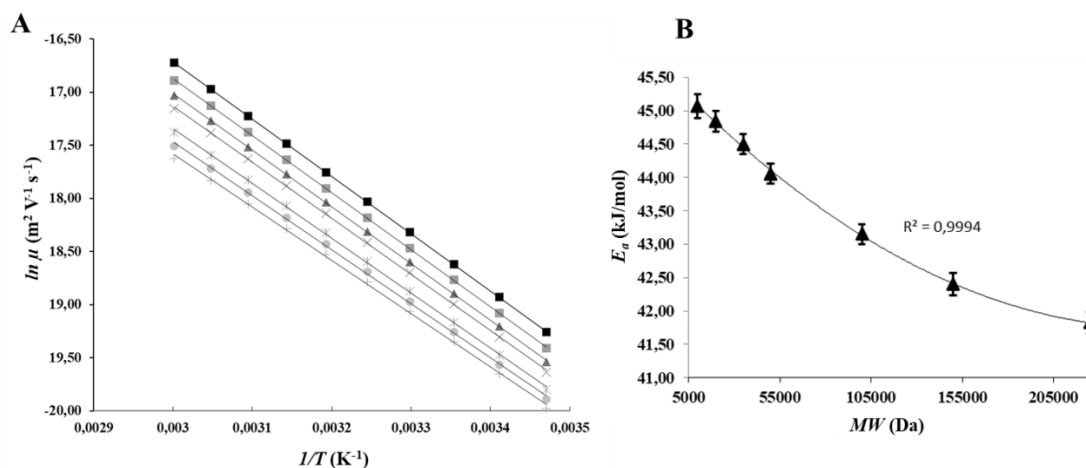
A teszt fehérje keverék csúcsai között a felbontás eltérően változott a hőmérséklet emelésével, szemben a fehérje létra csúcsai esetében megfigyelt szabályossággal. Az 1-2 csúcsok között nőtt a felbontás ($R_s = 4,11-7,94$) a hőmérséklet emelésével, csaknem megduplázódott annak értéke a legmagasabb hőmérsékleten. Az ellenkezője történt a 2-3 csúcsok között, ahol a felbontás több mint felére esett vissza 60°C-on, mint 15°C-on: $R_s=1,99$ és $R_s=5,78$. A 3-4 csúcs esetében 35°C elválasztási hőmérséklet alkalmazása mellett volt a legnagyobb a felbontás ($R_s=11,39$), majd körülbelül 30%-kal csökkent a hőmérséklet további emelésével ($R_s= 8,46$). Figyelembe kell venni azt is, hogy az egyéni aktiválási energiaigény

mellett az elektromigráló molekulák diffúzió változás közvetítette sávszélesedése is hozzájárulhatott a felbontás változásához a különböző hőmérsékleteken.

5.2.1 Aktiválási energiaigény SDS-fehérje komplexek vándorlása során

Az elválasztási hőmérséklet kulcsfontosságú tényező, amely befolyásolja az elválasztás hatékonyságát. Az optimalizálása az aktiválási energia elvének figyelembevételével történhet, hogy adott terápiás fehérje esetében a lehető legjobb felbontás legyen elérhető. Más szóval, mivel az elektromigrációs tulajdonsága bármely oldott molekulának, beleértve az SDS-protein komplexeket is egy aktivált folyamat, így minden egyes molekulának más és más az aktiválási energiaszükséglete az elválasztás során.

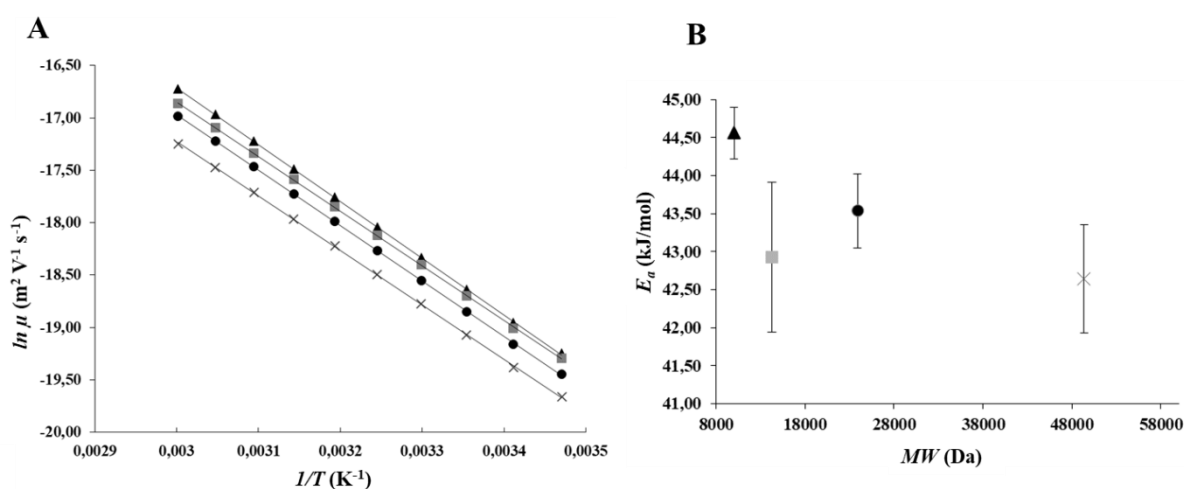
Az elektroforetikus mobilitás logaritmusát ábrázolva az abszolút hőmérséklet reciprokának függvényében (17. ábra A panel) 15°C - 60°C (288 - 333°K) között, az egyenesek meredekségéből kiszámíthatók az egyes molekulákhoz tartozó aktiválási energia értékek (E_a), melyek ahhoz szükségesek, hogy a gélen keresztülhaladjanak. Az E_a -t az egyes fehérjemolekulák molekulatömegének függvényében ábrázoltam (17. ábra B panel), mely, mint látható, konvex csökkenő tulajdonságot mutat, a molekulatömeg növekedésével, $E_{a20\text{ kDa}} = 44,76\text{ kJ/mol}$ és $E_{a225\text{ kDa}} = 41,91\text{ kJ/mol}$.



17. ábra: (A) A fehérje standardok Arrhenius diagramjai ($\ln \mu$ az $1/T$ függvényében, $r > 0,999$) és (B) E_a értékek ábrázolása - A panel egyeneseseinek meredekségéből származtatva - az MW függvényében.

Szimbólumok: ■ 10kDa, ■ 20 kDa, ▲ 35 kDa, × 50 kDa, ● 100 kDa, ● 150 kDa, + 225 kDa

A 18. ábrán a teszt fehérje keverék analízise látható (A panel Arrhenius diagram, B panel az E_a ábrázolása a molekulatömeg függvényében). Hasonlóan a fehérjelétrához itt is az Arrhenius diagramból számoltam az aktiválási energia értékeket. A fehérje keverék komponenseinek E_a igényében nem figyelhető meg semmilyen szabályszerűség, szemben a fehérje létrával. A 49,37 kDa molekulatömegű nehéz lánc esetében a legkisebb az E_a , viszont majdnem ekkora a mindössze 14,26 kDa-os nanobody E_a értéke is. A bioterápiás fehérje tesztkeverék SDS-CGE analízise nem mutatott összefüggést a különféle fehérjék aktiválási energiaigénye és molekulatömege között, hangsúlyozva az elválasztási hőmérséklet optimalizálás fontosságát a számunkra fontos molekula mintakomponensek esetében, a lehető legnagyobb felbontás elérése érdekében.

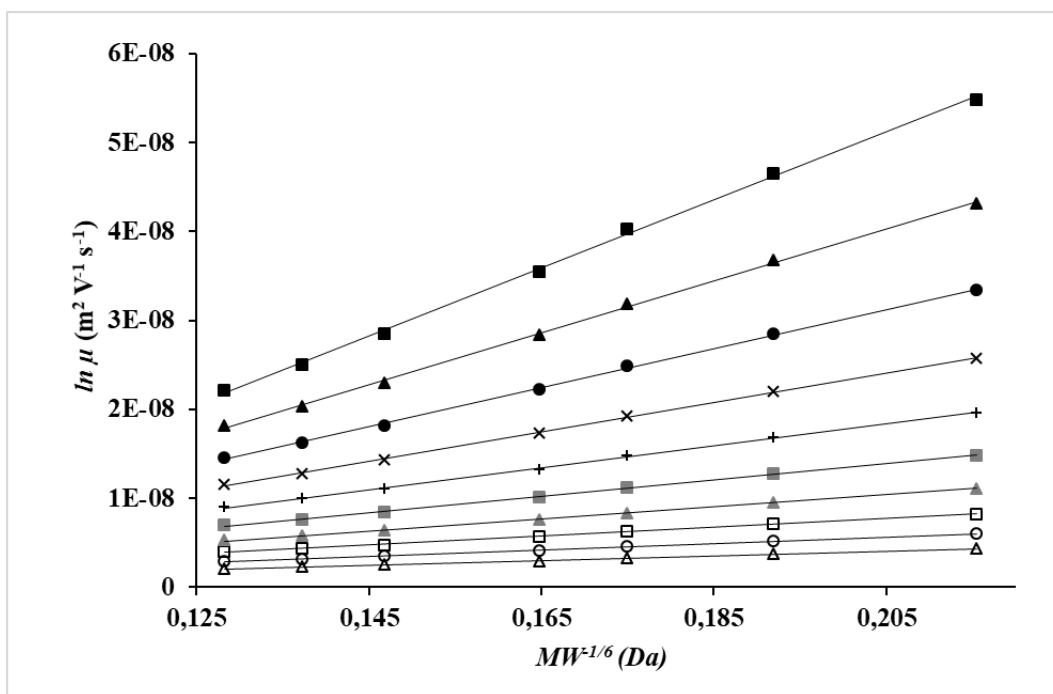


18. ábra: (A) A teszt fehérje keverék Arrhenius diagramjai ($\ln \mu$ az $1/T$ függvényében, $r > 0,999$ és (B) E_a értékek ábrázolása - A panel egyeneseinek meredekségéből származtatva - az MW függvényében.

Szimbólumok: ▲ 10kDa, ■ nanobody (14,26 kDa), ● omalizumab könnyű lánc (23,89 kDa), × omalizumab nehéz lánc (49,37 kDa)

5.2.2 SDS-fehérje komplexek elektroforetikus mobilitása és a molekulatömeg közötti összefüggés

Annak érdekében, hogy jobban megértsem az SDS-protein komplexek migrációs viselkedését a dextranszorbát gélben történő elválasztásuk során, a mobilitás és a molekulatömeg közötti összefüggést is vizsgáltam, felhasználva a molekulásugár lehetséges molekulatömeg ekvivalenseit. Ezzel a módszerrel kalibrációs egyenesek vehetők fel, és megbecsülhető egy ismeretlen fehérje molekulatömege az adott rendszerben. Az SDS-fehérje-komplexek migrációs viselkedésének jobb megértése érdekében a folyamatosan törő/újraépülő dextranszorbát gélen keresztül a kapilláris oszlopokon az elektroforetikus mobilitási értékeket izoterm elválasztási körülmények között a 7. egyenlet szerint ábrázoltam, a molekulásugár lehetséges M_w kitevőit (k érték) használva. Offord javaslatát figyelembe véve, a mobilitást ábrázoltam a molekulatömeg $-1/3$ és $-2/3$ hatványának függvényében. A vizsgált hőmérséklet tartományban az adatpontokra illeszthető egyenesek r^2 értéke 0,994 és 0,953 volt. A forgási sugárral egyenértékű MW értéket alkalmazva ($MW^{1/2}$) az $r^2 > 0,978$ szerint alakult.



19. ábra: Az elektroforetikus mobilitás (μ) ábrázolása a molekulatömeg $-1/6$ hatványának ($MW^{1/6}$) függvényében $15-60^\circ\text{C}$ közötti elválasztási hőmérsékleteket alkalmazva.

Szimbólumok: (Δ) 15, (\circ) 20, (\square) 25, (\blacktriangle) 30, (\blacksquare) 35, (+) 40, (\times) 45, (\bullet) 50, (\blacktriangle) 55, (\blacksquare) 60 °C. Az összes egyenes esetében r^2 legalább 0,999.

Végül, ahogy a 19. ábra mutatja, az SDS-fehérje komplexek elektroforetikus mobilitási értékeit az $Mw^{-1/3}$ négyzetgyökének függvényében ábrázoltam ($Mw^{-1/6}$), feltételezve azt, hogy alakjuk hengeres (nyakláncmodell). Ez a megközelítés 0,999-es átlagos r^2 értéket eredményezett. E közel tökéletes lineáris kapcsolat alapján arra a következtetésre jutottam, hogy izoterm körülmények között az SDS - fehérje komplexek elektroforetikus mobilitása és a molekulatömeg $-1/6$ hatványa között lineáris kapcsolat áll fenn.

Ezért a következő egyenletet javaslom az SDS-fehérje komplexek migrációjának leírására boráttal térhálósított dextrans gélek alkalmazása esetén:

$$\mu = const_A \cdot Q \cdot Mw^{-1/6} \cdot e^{-E_a/RT} \quad (23)$$

ahol μ a mobilitás, $const_A$ a konstansok összegzése, Q a SDS-fehérje komplex nettó töltése, MW molekulatömeg, E_a aktiválási energia, R egyetemes gázállandó és T abszolút hőmérséklet.

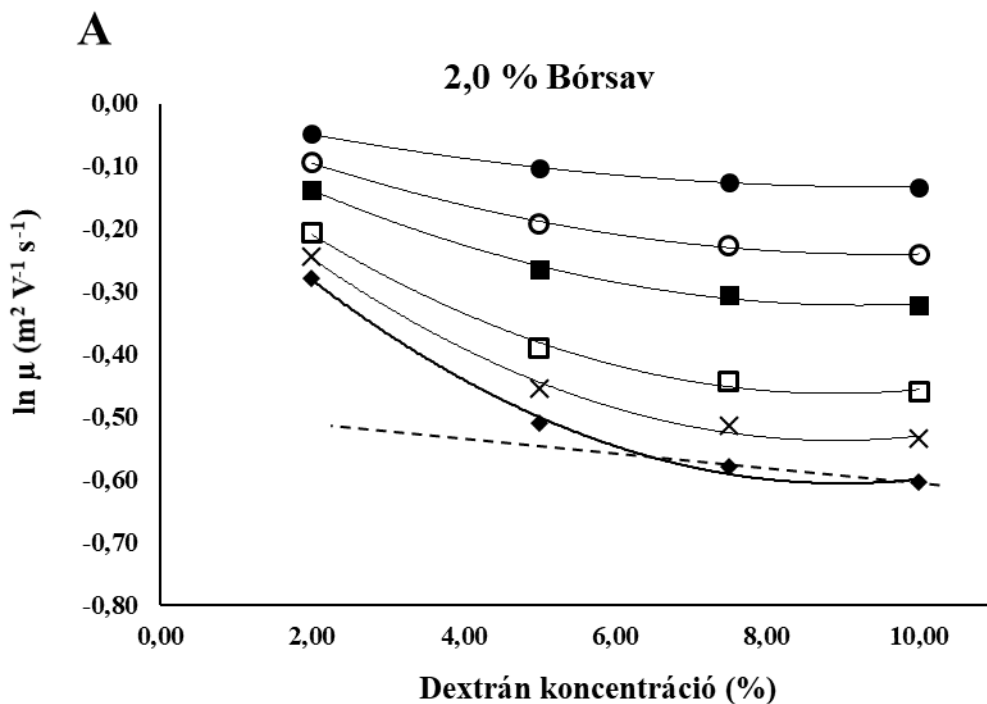
A kapott eredményeket figyelembe véve további kísérleteimnél 25°C elválasztási hőmérsékletet alkalmaztam. A molekulatömegek meghatározására pedig az adott körülmények között mért fehérje létra elválasztásából nyert adatok $\mu \sim MW^{-1/6}$ diagramját ábrázoltam. A kapott egyenes egyenletéből a meghatározni kívánt molekula mobilitásának ismeretében meg tudtam becsülni annak molekulatömegét.

5.3 Fehérjék migrációjának vizsgálata Ferguson módszerrel

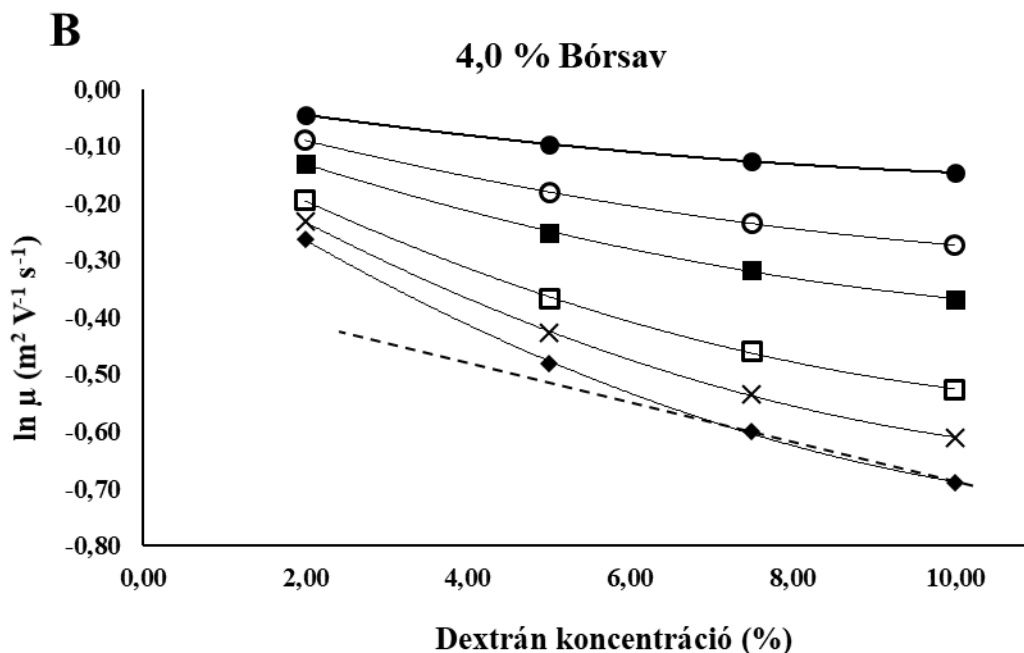
5.3.1 Hagyományos (2D) Ferguson módszer alkalmazása

5.3.1.1 Fehérje létra analízise

A dextrans-bórsav gélek szűrő hatásának vizsgálata céljából a standard fehérje sorozat tagjainak mobilitását határoztam meg 2% és 4% bórsav koncentrációjú gélekben, melyek 2, 5, 7,5 és 10% dextransot tartalmaztak. A 20-225 kDa közötti fehérjék effektív mobilitásait ábrázoltam a dextrans koncentráció függvényében állandó bórsav koncentráció mellett. A 20. ábrán a 2%B tartalmú gélek esetében ábrázolt Ferguson diagramok láthatóak, míg a 21. ábrán a 4%B tartalmú gélek eredménye.



20. ábra: Standard fehérje sorozat Ferguson diagramja a 2% bórsav tartalmú gélekben. A fehérjék relatív elektroforetikus mobilitásának ábrázolása a dextrán koncentrációk függvényében. Szimbólumok: ● 20 kDa, ○ 35 kDa, ■ 50 kDa, □ 100 kDa, x 150 kDa és ♦ 225 kDa fehérje standard. Az elválasztás körülményei: 20 cm effektív hossz (30 cm totál), 50 μm ID, BFS kapilláris; alkalmazott elválasztási feszültség: 20 kV; minta injektálása: 10 kV 20 s. Minta koncentráció: 1,57 mg/ml. A szaggatott vonalak a két legmagasabb dextrán koncentráció (7,5 és 10,0%) közötti meredekséget szemléltetik.



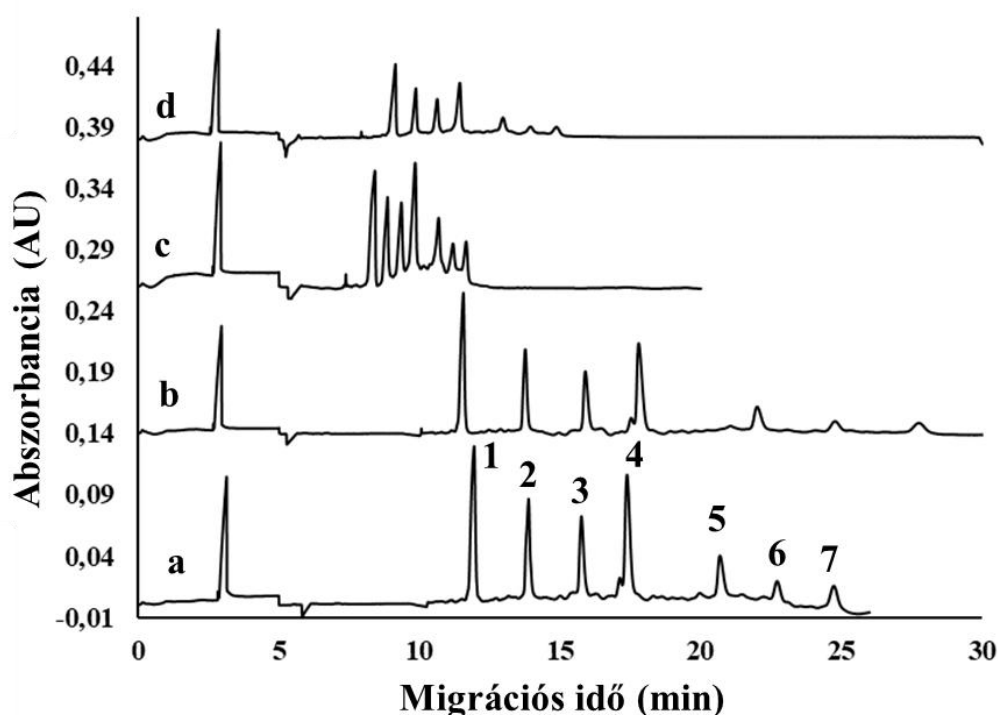
21. ábra: Standard fehérje sorozat Ferguson diagramja a 4% bórsav tartalmú gélekben. A fehérjék relatív elektroforetikus mobilitásának ábrázolása a dextrán koncentrációk függvényében. Szimbólumok: ● 20 kDa, ○ 35 kDa, ■ 50 kDa, □ 100 kDa, × 150 kDa és ◆ 225 kDa fehérje standard. Az elválasztás körülményei megegyeznek a 18. ábra alatt írottakkal. A szaggatott vonalak a két legmagasabb dextrán koncentráció (7,5 és 10,0%) közötti meredekséget szemléltetik.

A Ferguson diagramok esetében jól látszik, hogy az elvárt lineáris összefüggés helyett, nemlineáris, konkáv görbéket kaptam. A molekulatömeg növekedésével a magasabb dextrán koncentrációjú gélek irányába nő a görbület mértéke. A 2%B tartalmú gélek esetében az irodalmi adatok alapján várt linearitás még inkább torzult, szemben a 4%B tartalmú gélekkel. A szaggatott vonalak a két legnagyobb dextrán koncentrációjú mátrix között (7,5 és 10%) hangsúlyozzák a meredekség különbségeket a 2 és a 4%B gélek között. Azt is fontos megjegyezni, hogy a borát ionokkal térhálósított mátrix és a nagy viszkozitáskülönbségek (~10×, 4.1.1. *Viszkozitás*) a 2 és 10%D gélek között hatással vannak az eredményül kapott elektroforetikus mozgékonyságokra.

Ezt követően a tényleges CE elektroferogramokat analizáltam. A méréseket az összes 2-4% bórsav és 2-10% dextrán tartalmú gélekre végeztem el, de az eredmények kiértékelése során a felső és alsó koncentráció határon lévő gélekkel foglalkoztam

részletesebben: 10%D/4%B, 10%D/2%B, illetve 2%D/4%B és 2%D/2%B melyek alapvetően jellemzik a teljes gélsorozatot.

A 7,5 dextrán tartalmú gélek nagyon hasonló eredményt mutattak a 10%D tartalmú gélekkel, az alacsonyabb dextrán koncentrációk legelőnyösebb jellemzőit pedig a 2%D tartalmú gélek mutatták az előzetes kísérletek során. A 4% és 2%B kiválasztása is hasonló képpen alakult.



22. ábra: *Standard fehérje sorozat elektroferogramjai: a) 10%D/4%B, (b) 10%D/2%B, (c) 2%D/4%B és (d) 2%D/2%B tartalmú gélekben. Csúcsok: 1 – 10 kDa, 2 - 20 kDa, 3 - 35 kDa, 4 - 50 kDa, 5 - 100 kDa, 6 -150 kDa és 7 - 225 kDa fehérje standard. Az elválasztás körülményei: 20 cm effektív hossz (30 cm totál), 50 μ m ID, BFS kapilláris; alkalmazott elválasztási feszültség: 15 kV; minta injektálása: 5 kV 20 s; elválasztás hőmérséklete: 25°C; nyomás a kapilláris két oldalán: 20 psi; UV detektálás 214 nm hullámhosszon. Minta koncentráció: 1,57 mg/ml.*

Az 22. ábrán látható elektroferogramok jól tükrözik a molekulaszűrés és az EOF különbségek együttes hatását az elválasztásra a különböző monomer/térhálósító tartalmú

gélkészítmények esetében. Míg a 10%D/4%B gél esetében bár jelentős molekulaszűrőhatás látható, a 10%D/2%B gél esetében a legnagyobb a migrációs ablak, melyhez jobb felbontás is párosul (22. ábra a és b elektroferogramok). Fontosnak tartom megjegyezni, hogy az utóbbi gél esetében az EOF 4,5-szer nagyobb, mint az előzőnél (4.1.2. Elektroozmotikus áramlás). A 2%D gélek esetében is hasonló eredmények figyelhetők meg, de a migrációs idők jelentősen csökkentek (22. ábra c és d elektroferogramok). Az alacsony dextrán tartalmú gélek viszkozitása csaknem azonos, de az EOF értéke több mint kétszer nagyobb a 2%B tartalmú gélben ($\mu_{EOF} = 4,92 \cdot 10^{-9}$), szemben a 4%B tartalmú géllel ($\mu_{EOF} = 2,29 \cdot 10^{-9}$). Az elválasztási sebesség ebben a két alacsony dextrán koncentrációjú készítményben magasabb volt, a körülbelül 10-szer alacsonyabb viszkozitásuk miatt, valószínűleg az elektroforetikus mobilitás és a viszkozitás közötti korreláció következtében [88].

Az elválasztás teljesítményének alaposabb vizsgálatához és megértéséhez a 2. táblázat foglalja össze a felbontás (R_s) és szelektivitás (α , mind a látszólagos, mind az EOF-korrigált effektív) értékeket a 20 kDa/50 kDa fehérje standard párra, valamint az 50 kDa/150 kDa és a 150 kDa/225 kDa párokra vonatkozóan mind a négy peremkoncentráció tartalmú gél esetében. A választott standard fehérjepárok, állnak méretükben a legközelebb a következőkben vizsgált monoklonális antitest könnyű (24 kDa) és a nehéz (49 kDa) lánc alegységekhez, valamint az intakt (~149 kDa) monoklonális antitesthez. Továbbá még a 225 kDa fehérje csúcs került analízisre.

2. Táblázat: A 20 kDa/50 kDa, 50 kDa/150 kDa és 150 kDa/225 kDa SDS-MW standard fehérje csúcsok felbontás (R_s) és szelektivitás (α , látszólagos és EOF-korrigált effektív) értékei a 10%D/2%B, 10%D/4%B, 2%D/2%B és 2%D/4%B gélekben.

Elválasztás teljesítmény	10D/2B (%)	10D/4B (%)	2D/2B (%)	2D/4B (%)
R_s (20/50)	9,33	8,08	4,94	2,99
$t_{50\text{ kDa}}$ [min]	17,9	17,5	11,3	9,9
α_{app} (20/50)	1,28	1,26	1,16	1,12
α_{eff} (20/50)	1,21	1,24	1,09	1,09
R_s (50/150)	12,05	10,97	5,94	3,45
$t_{150\text{ kDa}}$ [min]	24,8	22,9	13,8	11,2
α_{app} (50/150)	1,37	1,31	1,22	1,15

$\alpha_{eff(50/150)}$	1,25	1,28	1,11	1,10
$Rs(150/225)$	4,26	3,49	1,99	1,19
$t_{225\text{ kDa}} [\text{min}]$	27,8	24,9	14,7	11,7
$\alpha_{app(150/225)}$	1,12	1,09	1,07	1,04
$\alpha_{eff(150/225)}$	1,09	1,08	1,03	1,03

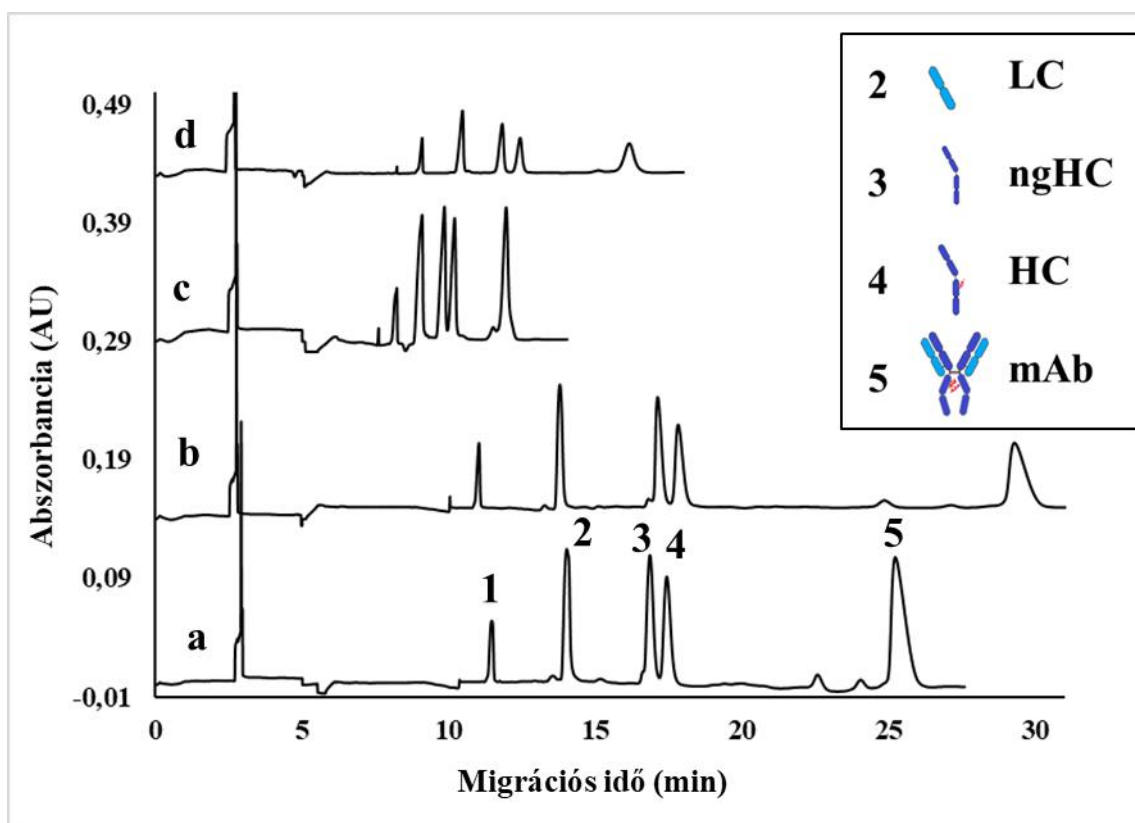
Az eredmények alapján a 2. táblázatban látható fehérje méretpárok esetén a 10%D/2%B gél biztosította a legnagyobb felbontást: $Rs_{20/50\text{ kDa}}=9,33$, $Rs_{50/150\text{ kDa}}=12,05$ és $Rs_{150/225\text{ kDa}}=4,26$ és látszólagos szelektivitást: $\alpha_{app(20/50)}=1,28$, $\alpha_{app(50/150)}=1,37$ és $\alpha_{app(150/225)}=1,12$, bár a leghosszabb elválasztási idővel járt: $t_{50\text{ kDa}}=17,9$ min, $t_{150\text{ kDa}}=24,8$ min és $t_{220\text{ kDa}}=27,8$ min. Az elektroozmotikus áramlás (EOF) szignifikánsan hozzájárult a nagyobb látszólagos szelektivitásokhoz, különösen a nagyobb molekulatömegű anyagok esetében. Az effektív szelektivitás a 10%D/4%B összetételű gélek esetében volt a legnagyobb ($\alpha_{eff(20/50)}=1,24$ és $\alpha_{eff(50/150)}=1,28$), kivéve a 150/225 kDa méretpárt. A 4%-os borátot tartalmazó gélek jobb szűrési szelektivitással rendelkeztek, míg a 2%B gélekhez képest az elektroozmotikus áramlás nagyobb hatással volt rájuk, hozzájárulva a jobb felbontáshoz. A nagyobb ellenirányú EOF hatására az SDS-fehérje komplex vándorlása visszatartott, olyan mintha hosszabb kapilláris alkalmaznánk az elválasztáshoz, amely alapvetően jobb felbontást eredményez.

5.3.1.2 Terápiás monoklonális antitest és alegységeinek analízise

A különböző összetételű gélek alapvető molekulaszűrő hatását a monoklonális antitest és annak alegységei esetén is vizsgáltam. Míg a monoklonális antitestek (mAbs) CE-analízise széles körben elterjedt a kereskedelmi D/B oszlopokon, az intakt mAb és alegységeinek vizsgálata, összehasonlítva a hasonló molekulatömegű fehérje standardokkal további betekintést nyújthat az SDS-fehérje komplexek vándorlásába és szétválasztásába a boráttal térhálósított dextrans gélekben. Az SDS-mAb és alegységeinek, még akkor is, ha közel azonos a molekulatömegük, más a keresztmetszeti területe, mint a hasonló SDS-standardoknak, különösen akkor, ha poszttranszlációs módosításokkal, például glikozilációval rendelkeznek [89]. Az intakt monoklonális antitest és könnyű láncának (LC), valamint nehéz láncának (HC) elválasztása a 23. ábrán látható. A jobb felső sarokban látható betét a molekulák sematikus szerkezeti alakját mutatja. Az elektroferogrammon a különböző összetételű gélek esetében ugyanolyan mértékű migrációs idő eltolódás figyelhető meg, mint a fehérje standard

(22. ábra) esetében, köszönhetően az eltérő ellenirányú EOF, viszkozitás és az eltérő mértékű térhálósodás együttes hatásának. A migrációs idők a 2%D/4%B tartalmú gél esetében voltak a legkisebbek míg a 10%D/2%B gél esetében volt a legnagyobb a migrációs időablak ($t_{ngHC}=17,2$ min).

Az LC/ngHC csúcsok tekintetében a 10%D/2%B tartalmú gél esetében volt a legnagyobb a felbontás ($R_s = 15,18$) és a látszólagos szelektivitás ($\alpha_{app}=1,24$). Az elválasztási idő ebben az esetben volt a leghosszabb.



23. ábra: Teszt fehérje keverék elektroferogramjai: a) 10%D/4%B, b) 10%D/2%B, c) 2%D/4%B és d) 2%D/2%B tartalmú gélekben. Csúcsok: 1 – 10 kDa belső standard, 2 – könnyű lánc (LC), 3 – nem glikozilált nehéz lánc (ngHC), 4 – intakt monoklonális antitest (mAb). Az elválasztás körülményei ugyanazok, mint a 22. ábrán.

A 3. táblázatban a felbontás és a szelektivitás értékek láthatók az LC/ngHC és az ngHC/HC fragmentumok, valamint a HC/intakt mAb minta komponensekre vonatkozóan. A könnyű és a nem glikozilált nehézláncok nem rendelkeztek glikán részekkel, ezért elválasztásuk a borát-

dextrán mátrix molekulatömeg szerinti szűrőhatásának köszönhető. A 20 kDa/50 kDa standard fehérjepar analíziséhez hasonlóan, mint ahogyan azt az előzőekben láthattuk a 10%D/2%B gélösszetétel eredményezte a legnagyobb felbontást és látszólagos szelektivitást az LC/ngHC csúcspárok esetében, illetve ezúttal is a leghosszabb analízis időt. Azonban a tényleges (EOF-korrigált) szelektivitás a 10% D/4%B koncentrációjú gélben volt a legnagyobb, úgymint a standard minta esetében.

A közel azonos molekulatömegű (csak kb. 2,5% molekulatömeg-különbségű) nem-glikozilált (ngHC) és szokványos (HC) nehézlánc-fragmentumok szétválasztása minden géloszlop összetételben az alakbeli különbségek következményének tekinthető (23. ábra, jobb felső sarok, beágyazott kép), ahol a glikozilált forma (HC) terjedelmesebb, mint a nem-glikozilált (ngHC). Azonban a legjobb elválasztási teljesítmény ezen ngHC/HC párnak a legalacsonyabb koncentrációjú (2%D/2%B) monomer/keresztelő-összetétellel volt elérhető. A 2%D/2%B gél esetén nagyobb α -érték figyelhető meg, bár csak 20%-kal nagyobb, mint a 10%D/2%B gél esetén, azonban ez jelentős, mivel az α -értékek közötti kis különbségek, amennyiben közel vannak az 1-hez, nagy hatással vannak az elválasztás hatékonyságára. A 2%D/2%B gél esetén megfigyelt nagyobb felbontás a glikozilált és nem-glikozilált nehézlánc-fragmentumok között összefügg a láncon belüli (1:1) dextrán-borát adduktumok nagyobb számával, amelyek lehetővé teszik a dextrán-borát-glikoprotein komplexek kialakulását, és ezáltal növelik a szelektivitást.

3. Táblázat: Az LC/ngHC, ngHC/HC és HC/intakt mAb csúcsok felbontás (R_s) és szelektivitás (α , látszólagos és EOF-korrigált effektív) értékei a 10%D/2%B, 10%D/4%B, 2%D/2%B és 2%D/4%B gélekben.

Elválasztás teljesítmény	10D/2B (%)	10D/4B (%)	2D/2B (%)	2D/4B (%)
$R_{sLC/ngHC}$	15,18	12,37	6,46	4,6
t_{ngHC} [min]	17,2	16,9	11,9	9,8
α_{app} (LC/ngHC)	1,24	1,21	1,13	1,09
α_{eff} (LC/ngHC)	1,18	1,19	1,07	1,06
$R_{sngHC/HC}$	1,64	1,32	2,31	1,04
t_{HC} [min]	17,9	17,5	12,5	10,2
α_{app} (ngHC/HC)	1,04	1,03	1,05	1,03

$\alpha_{eff} (ngHC/HC)$	1,03	1,03	1,03	1,03
$R_{SHC/intakt\ mAb}$	12,81	10,25	6,81	1,49
$t_{intakt\ mAb}$ [min]	29,2	25,3	16,2	11,9
$\alpha_{app} (HC/intakt\ mAb)$	1,64	1,45	1,3	1,17
$\alpha_{eff} (HC/intakt\ mAb)$	1,42	1,41	1,14	1,11

A HC és az intakt mAb (3. táblázat) között, hasonlóan a 50 kDa/150 kDa molekulatömeg-standard párhoz (2. táblázat), a legnagyobb felbontás a 10%D/2%B géllal vált elérhetővé. Ahogyan már említettem dolgozatomban, a molekulatömeg-létra fehérjéit ugyanabból a polipeptid egységből állították össze, poszttranszlációs módosítás nélkül, ezért elektromigrációs viselkedésük nem volt várhatóan ugyanolyan, mint a hasonló méretű mAb fragmentumoké és intakt formájuké, az alak szelektivitás drámai hatása miatt. Valójában az intakt mAb minden összetételben körülbelül ugyanabban a migrációs időzónában vándorolt, mint a 225 kDa SDS-MW standard. Az intakt mAb hosszabb vándorlási ideje (a molekulatömeg-standardhoz képest) minden géloszlop-összetételben az inherens Y profilja által magyarázható (lásd a 23. ábra beágyazását), és ennek következtében magasabb hidrodinamikai sugarú, mint a hasonló méretű 150 kDa standard fehérje.

4. Táblázat: A HC, ngHC és az intakt mAb valamint a megfelelő SDS-MW fehérje standardok (50 és 150 kDa) közötti alak szelektivitása

Alak szelektivitás	10%D/2%B	10%D/4%B	2%D/2%B	2%D/4%B
$\alpha_{app} (50/HC)$	1,00	1,00	1,10	1,03
$\alpha_{eff} (50/HC)$	1,04	1,04	1,05	1,04
$\alpha_{app} (50/ngHC)$	0,96	0,97	1,04	1,00
$\alpha_{eff} (50/ngHC)$	1,01	1,01	1,02	1,02
$\alpha_{app} (150/intakt\ mAb)$	1,18	1,11	1,17	1,06
$\alpha_{eff} (150/intakt\ mAb)$	1,17	1,15	1,08	1,07

A 4. táblázatban látható, hogy az azonos méretű SDS MW méretstandardok között az alak szelektivitások hasonlóak voltak a legtöbb lineáris IgG alegységhez, a nem-glikozilált nehézlánc (50/ngHC) esetében. Kissé eltérőek a glikozilációt tartalmazó HC esetében a glikán lánc okozta terjedelmesebb alak (50/HC) miatt, és nagyon különbözőek a Y alakú intakt forma (150/mAb) esetében a legtöbb gél esetében.

Az alak szelektivitás hangsúlyozása érdekében kalibrációs módszerrel számítottam ki az intakt monoklonális antitest és alegységeinek molekulatömegét (5. táblázat), úgy, hogy az SDS-MW fehérje standard csúcsainak látszólagos elektroforetikus mobilitását ábrázoltam az ismert molekulatömegük logaritmusának függvényében gélenként, majd a kapott egyenesek egyenletének felhasználásával meghatároztam a mAb komponensek molekulatömegét.

5. Táblázat: Az intakt IgG és alegységeinek névleges (zárójelben) és számolt molekulatömege A tényleges molekulatömeg-értékek az első oszlopban zárójelben vannak felsorolva.

MW (kDa)	10%D/2%B	10%D/4%B	2%D/2%B	2%D/4%B
LC (24,0)	20,7	21,0	30,4	23,2
ngHC (48,1)	48,2	48,9	66,5	50,2
HC (49,4)	55,2	56,1	89,5	68,8
intact mAb (149,0)	204,3	194,8	337,3	252,7

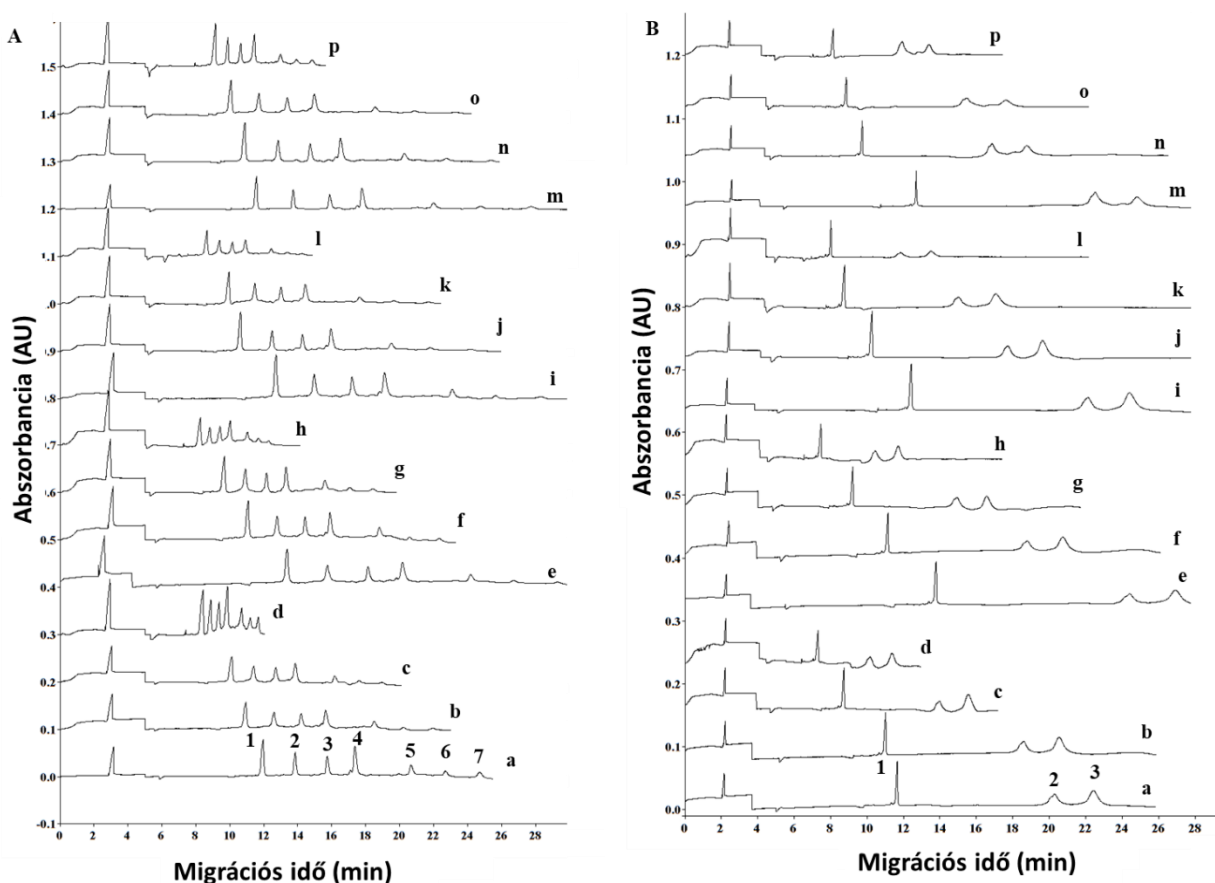
Az intakt IgG jelentős molekulatömeg-túlbecslése (tényleges MW = 149 kDa) minden esetben a borát dextrán kötött gél alak-szelektivitását tükrözi. A legnagyobb mértékű eltérés a 2%D/2%B gél esetében figyelhető meg. A 10%D gélek esetében enyhe alábecslés történt a könnyűlánc molekulatömegét illetően, és elfogadható értékeket kaptam a nem-glikozilált nehézlánc fragmentumra nézve.

5.3.2 3D Ferguson módszer bevezetése

Háromdimenziós Ferguson diagramokat készítettem az oldott fehérje molekulák migrációs viselkedésének tanulmányozásához, amelyen egyszerre tudtam figyelembe venni a bórsav és dextrán koncentrációk hatását. Ehhez a homológ polipeptid sorozatot (fehérje létra) és egy erősen glikozilált fúziós fehérje (Enbrel) alegységeit választottam el 16 különböző dextrán és bórsav tartalmú gélben, amelyek 2,0, 5,0, 7,5 és 10% dextránt tartalmaznak, valamint mindegyik 2,0, 2,7, 3,3 és 4,0% bórsavat.

Az etenerceptből összeállított minta annak redukált formáját és redukált nem glikozilált formáját tartalmazta (lásd Anyagok és Módszerek). A 24. ábra A paneljén a fehérje létra, míg a B panelen az etenerceptre kapott elektroferogramok összehasonlítása látható. A migrációs

idő és az elválasztási ablak csökkent adott bórsav tartalom mellett a dextrans koncentráció csökkenésével, ennek ellenére alapvonalis elválasztást eredményezett minden gél kompozíció. A csökkenő borátkoncentráció mellett viszont az elválasztási ablak nem változott konzisztensen (pl, a, e, i és e elektroferogramok), valószínűleg a borát koncentráció csökkenése következtében kialakuló növekvő ellenáramú elektroosmotikus áramlás és a dextrans koncentráció által meghatározott viszkozitás változás közötti kölcsönhatásnak köszönhetően. Fontosnak tartom megemlíteni, hogy az etanercept glikozilált lánc (75 kDa) láthatóan ugyanabban a helyzetben vándorolt, mint a 2x nagyobb 150 kDa-os fehérje standard.

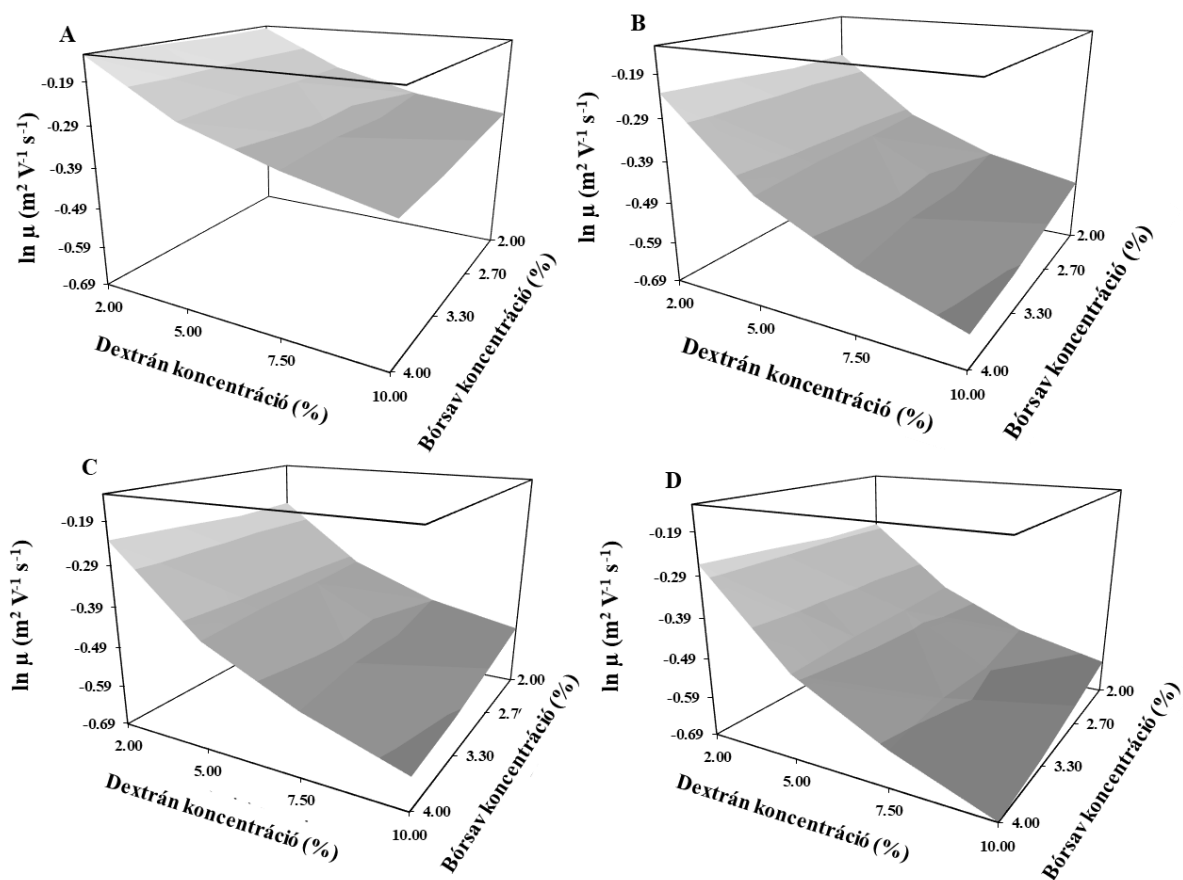


24. ábra: A standard fehérje létra SDS-CGE elektroferogramja (panel A) és az etanercept redukált hagyományos és de-glikozilált formája (panel B) 16 gél összetétel esetén. Elektroferogramok: a – 10%D/4%B; b – 7,5%D/4%B; c – 5%D/4%B; d – 2%D/4%B; e – 10%D/3,3%B; f – 7,5%D/3,3%B; g – 5%D/3,3%B; h – 2%D/3,3%B; i – 10%D/2,7%B; j – 7,5%D/2,7%B; k – 5%D/2,7%B; l – 2%D/2,7%B; m – 10%D/2%B; n – 7,5%D/2%B o – 5%D/2%B; p – 2%D/2%B. Csúcsok: panel A: 1-10 kDa, 2-20 kDa, 3-35 kDa, 4-50 kDa, 5-100 kDa, 6-150 kDa, 7-225 kDa; panel B: 1-10 kDa, 2 – de-

N-glikozilált etanercept alegység (~70 kDa), 3 – eredeti (glikozilált) etanercept alegység (75 kDa). Az elválasztás körülményei ugyanazok, mint a 20. ábrán.

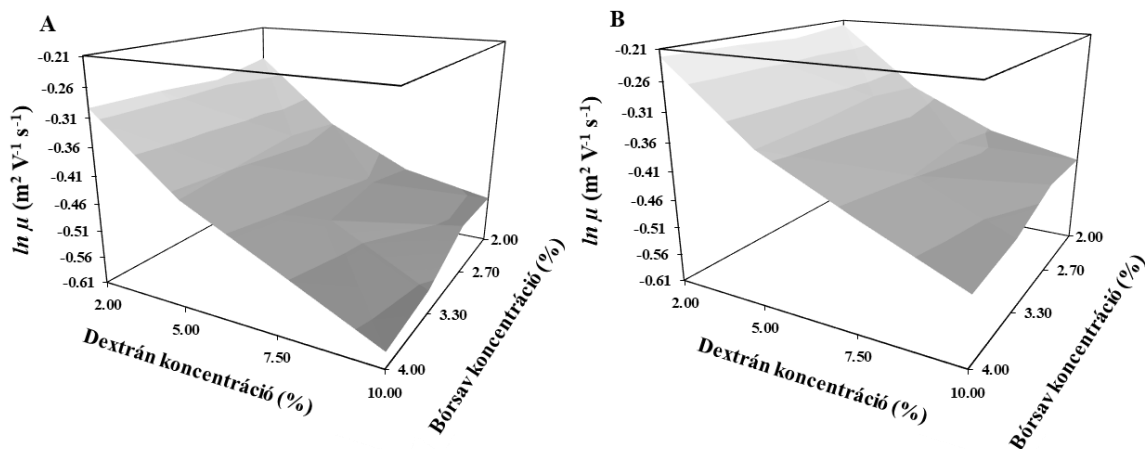
A 24. ábrán látható csúcsok logaritmikus EOF korigált mobilitását ábrázolva a dextrán és bórsav koncentráció függvényében 3 dimenziós Ferguson diagramokat vezettem be. A 3D Ferguson diagramok magas információ tartalmú mobilitás alapú diagramok és rávilágítanak a SDS-fehérje komplexek különböző formáinak elektromigrációs viselkedésére. A 25. ábra mutatja az eredményül kapott 3D Ferguson diagramokat 50 (A), 100 (B), 150 (C) és 225

(D) kDa fehérje standardok esetén, amelyek lefedik a reguláris és a nem *N*-glikozilált etanercept láncok változatainak molekulatömegét (~70 és 75 kDa).



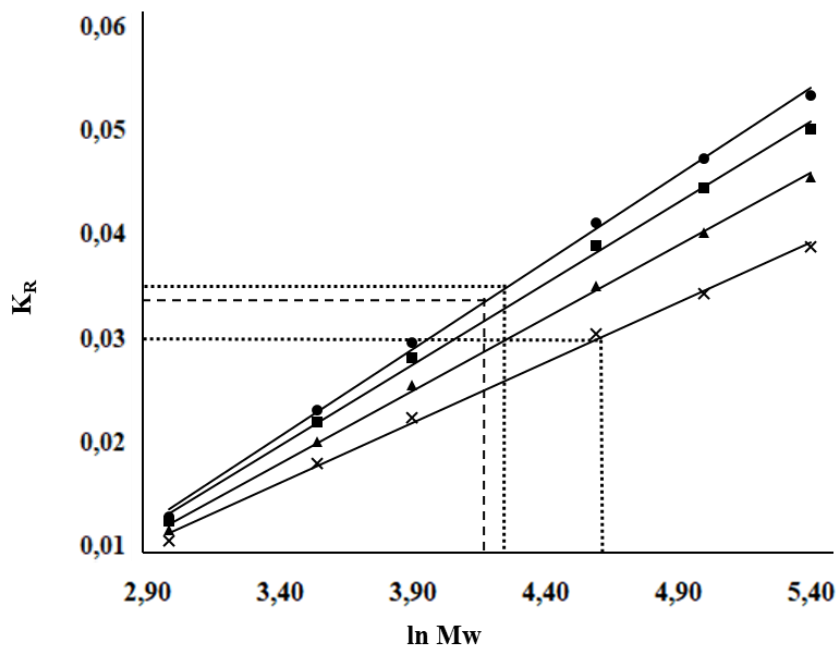
25. ábra: 3D Ferguson diagramok: a fehérjesorozat néhány tagjának EOF korigált logaritmikus relatív elektroforetikus mobilitásai a dextrán és a borát koncentráció függvényében: 50 (A), 100 (B), 150 (C) és 225 (D) kDa fehérje standard.

A diagramokon látható, hogy a fehérje létra komponenseinek elektromigrációs mobilitása csökken a dextrans koncentráció növekedésével minden bórsav szinten. Azonban az alacsony dextrans koncentrációjú régióban a növekvő borát koncentráció megnövekedett mobilitást eredményezett, míg a magasabb dextrans koncentrációk esetén az ellenkező hatás figyelhető meg. Ez a migrációs viselkedés a bórsav és dextrans koncentrációk változásának függvényében azt támasztja alá, hogy a dextrans/borát gél pórusmérete alacsony dextrans koncentráció esetén csökken a bórsav tartalom csökkentésével (csökkenő taszító effektus), de növekszik magasabb dextrans koncentráció esetén (keresztkötő effektus)



26. ábra: 3D Ferguson diagrammok: Etanercept láncok az EOF korrigált logaritmikusan relatív elektroforetikus mobilitásai a dextrans és borát koncentráció függvényében. N-glikozilált, (A panel) és nem N-glikozilált (B panel) etanercept alegységek.

A 26. ábrán a glikozilált (A) és nem glikozilált (B) etanercept 3D Ferguson diagramjai láthatók, melyek felülete nagyon hasonló. Ebben az esetben is növekvő borát koncentrációnál a mobilitási lejtők görbülete csökkent. A felületek gyakorlatilag párhuzamosak, ami eltérő szabad oldatban történő vándorlásra utal.



27. ábra: A retardációs együttható K_R diagramja a fehérjesorozat logaritmikus molekulatömegének függvényében. A pontozott és szaggatott vonalak a reguláris és de-N-glikozilált etanercept alegységek molekulatömegét mutatják a 4%-os és 2%-os bórsav tartalmú gélek esetében. Szimbólumok: ● - 4,0%, ■ - 3,3%, ▲ - 2,7% és X - 2,0% bórsav tartalmú gél.

A 3D Ferguson felületek nem-linearitása miatt a K_R diagramot (27. ábra) használtam a molekulatömeg és molekuláris jellemzők becslésére. A K_R a keresztköti ágens koncentrációjától függő molekulatömeg becslést tesz lehetővé. Az így kapott egyenesek meredeksége a molekuláris jellemzőket (k) reprezentálja a különböző összetételű gélekben A 22. egyenlet alapján a K_R értékeket a molekulatömegek természetes alapú logaritmusának függvényében ábrázoltam a vizsgált bórsav koncentrációkra vonatkozóan. A k értékét az egyenesek meredekségéből származtattam. 4%-os bórsav koncentráció esetében értéke 0,164 (~1/6), ami arra utal, hogy ebben az esetben a vándorló SDS-fehérje komplexek henger alakúak. Ezen eredmény összhangban van azon kísérletem eredményével, ahol a molekulatömeg és mobilitás közötti összefüggést vizsgáltam (4.2.2. SDS-fehérje komplexek elektroforetikus mobilitása és a molekulatömeg közötti összefüggés). A bórsav koncentráció csökkenésével a k értéke csökkent, 2% bórsav esetén $k = 0,113$, ami az SDS –fehérje komplex

alacsony bórsav koncentrációjú gélben történő migrációja során fellépő alakváltozásra utal. A redukált reguláris és de-N-glikozilált etanercept K_R értékei 0,35 és 0,33-nek adódtak. A molekulatömegeket a K_R diagram felhasználásával határoztam meg: 77,5 kDa (pontosított vonal) és 68,9 kDa (szaggatott vonal). Ezek a molekulatömeg értékek szignifikánsan közelebb állnak a 75 kDa és ~70 kDa irodalmi értékekhez, mint amit az elektroferogramok tükröznek (100 és 150 kDa). Másrészt, a 2%-os borát alkalmazásakor a molekulatömegek 109 és 93 kDa-nak adódtak.

5.4 A monomer és keresztkötő ágens arányának hatása az elválasztás szelektivitására

Állandó dextrans koncentráció mellett a borát mennyiségétől függ az 1:1 (BD⁻) és 1:2 (BD²⁻) kötések képződésének aránya, melyek befolyásolják a térhálósodás mértékét. Emelve a bórsav koncentrációt nő a láncok közötti kötések (keresztkötések) száma, ami a gél átlag pórusméret csökkenését és strukturáltabb térhálót eredményez. Azonban alacsony dextrans koncentráció mellett a pufferben lévő bórsav felesleg a 1:2 kötések telítéséhez vezethet és az ennek következtében megnövekedett 1:1 kötések száma a dextrans láncok taszítását okozhatja, ami növeli a pórusméretet. Mivel a komplexképződés révén a gél negatív töltésű, a láncok az elektromos mező irányába igazodnak, így egy strukturáltabb hálózat jön létre (csökkent konfigurációs entrópia), hasonlóan mint az agaróz esetében lap gélelektroforézisnél.

Jelen kísérlet sorozattal azt vizsgáltam, hogy a bórsav és a dextrans aránya, hogyan hat az elválasztás szelektivitására. Retenciós modellt dolgoztam ki a glikozilált és nem glikozilált nehézláncok közötti szelektivitás jobb megértése érdekében, figyelembe véve a dextrans-borát adduktok interakcióját a fehérjén lévő glikánokkal.

A látszólagos szelektivitás (α) a borát-dextrans rendszerekben SDS-CGE során a molekulatömeg szerinti szűrés szelektivitásának (α_{MW}) és a másodlagos egyensúlyi komplexképződésen alapuló szelektivitás (α_C) szorzata, amely a dextrans-borát-glikán komplexképződésre épül:

$$\alpha = \alpha_{MW} \times \alpha_C \quad (24)$$

A glikoproteinek polipeptid láncához kapcsolódó hidrofil cukrokat az SDS nem fedi le, ezért a rajtuk lévő megfelelő pozícióban lévő diol csoportok komplexeket képezhetnek a boráttal. Két féle módon mehet végbe a komplexképződés. A gélben lévő szabad boráttal, amely során nő a komplex felületi töltés sűrűsége és csökken a mobilitás különbség, szelektivitás a nem-glikozilált és glikozilált láncok között. Másfelől a gélben lévő láncon belüli borát (1:1, *6. ábra*) adduktumok szintén komplexet képezhetnek a glikoprotein szénhidrát részével. Jelen kísérletekhez omalizumab glikoproteint használtam. Ebben az esetben a core fukóz, terminális manóz, szialinsavas és terminális galaktóz struktúrák α orientált vicinális hidroxil csoportokkal vehetnek részt a komplexképződésben. Egy ilyen példa látható a *7. ábrán*, mannóz-5 glikánhoz tartozó nehézlánc komplexet képez a gélben lévő borát-dextrán 1:1 adduktjával. Az ilyen jellegű komplexképződés befolyásolja a differenciális eletromigrációt, mivel a másodlagos egyensúlyon alapuló hídképződés során a nehézlánc átmenetileg immobilizáltá válik, azzal, hogy a boráttal keresztkötött dextrán struktúrához kapcsolódik. A szeparációs időablak ennek következtében növekszik a nem-glikozilált nehézlánc és glikozilált nehézlánc között, tehát eltérő sebességgel fognak vándorolni a gélben.

A fent vázolt rendszerekben tehát a glikoprotein egy része (P) nem komplexált (f) állapotban lesz (R), míg a többi molekula komplexált formában ($1-R$) lesz jelen. A glikoprotein mobilitása (μ) kifejezhető a szabad és komplexált forma összegével:

$$\mu = R\mu^f + (1 - R)\mu^c \quad (25)$$

Az R frakció (*29. és 30. egyenletek*) kiszámítható a komplexképződési állandóból (K , *27. egyenlet*). n a dextrán-borát láncal komplexet alkotó glikoproteinek száma.



$$K = \frac{[D_B P_n]}{[D_B][P]^n} \quad (27)$$

$$R = \frac{1}{1+K[D_B]} \quad 1 - R = \frac{K[D_B]}{1+K[D_B]} \quad (28,29)$$

A 25., 28. és 29. egyenlet összevonásával kifejezhető a glikozilált nehéz lánc mobilitása:

$$\mu_{HC} = \frac{\mu_{HC}^f}{1+K[D_B]} + \frac{\mu_{HC}^c K[D_B]}{1+K[D_B]} \quad (30)$$

A glikozilált (HC) és a nem glikozilált (ngHC) nehézláncok közötti másodlagos egyensúlyi komplexképződésen alapuló szelektivitás (α_C) az alábbi módon fejezhető ki, a molekulatömeg szerinti szűrés szelektivitásának (α_{MW}) figyelembevétele nélkül:

$$\alpha_C = \frac{\mu_{ngHC}}{\mu_{HC}} = \frac{\mu_{ngHC}(1+K[D_B])}{\mu_{HC}^f + \mu_{HC}^c K[D_B]} = \frac{\mu_{ngHC}(1+K[D_B])}{\mu_{HC}^f(1+K[D_B]) \mu_{HC}^c / \mu_{HC}^f} \quad (31)$$

A szabad glikozilált nehézlánc mobilitása feltételezhetően sokkal nagyobb, mint a dextransboráttal komplexet képzőé ($\mu_{HC}^f \gg \mu_{HC}^c$), így a szelektivitás az alábbi módon egyszerűsíthető:

$$\alpha_C = \frac{\mu_{ngHC}}{\mu_{HC}^f} (1 + K[D_B]) \quad (32)$$

ha $K[D_B] \gg 1$ a szelektivitási egyenlet az alábbi módon adható meg:

$$\alpha_C = \frac{\mu_{ngHC}}{\mu_{HC}^f} K[D_B] \quad (33)$$

Továbbá, ha $K[D_B] \ll 1$ a szelektivitási egyenlet a következő lesz:

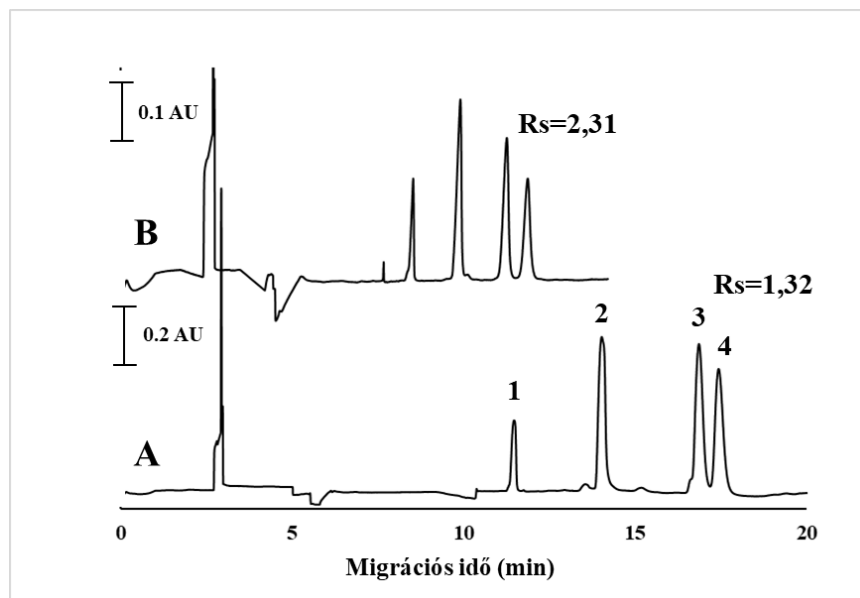
$$\alpha_C = \frac{\mu_{ngHC}}{\mu_{HC}^f} \quad (34)$$

A láncok közötti csúcspont felbontás (Rs) kifejezhető a látszólagos szelektivitással (α), ahol E – az elektromos térerősség, N – az elméleti tényező és l – a kapilláris effektív hossza [90].

$$Rs = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \sqrt{N} \frac{\mu E}{l} \quad (35)$$

Amennyiben α közel áll egyhez, jelentős hatással lesz a felbontásra, a kromatográfias módszerekben tapasztaltakhoz hasonlóan.

A következő lépésben az elméleti modellben megállapított tények kerülnek alátámasztásra kísérleti eredményekkel. Az Omalizumab redukált alegységeire kapott eredmények kerülnek bemutatásra, de a kísérleteket az intakt glikoproteinekre is elvégeztem [89]. Tehát a nem glikozilált nehézlánc és a normál (glikozilált) nehézlánc közötti elválasztási szelektivitást különböző monomer/keresztköti arányú gélek alkalmazásával vizsgáltam.

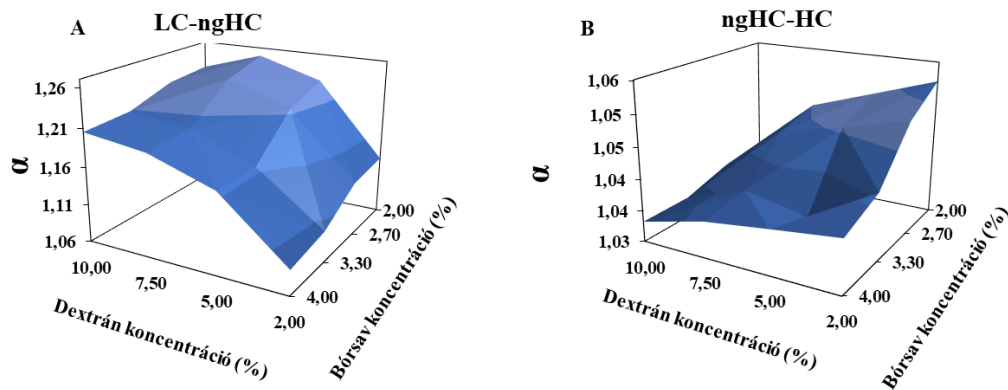


28. ábra: SDS-CGE elválasztása az Omalizumab monoklonális antitestnek magas (2,5) és alacsony (1,0) monomer/keresztköti (dextrán/borát) arányú gélekkel. A elválasztás: 10%D/4%B. B elválasztás: 2%D/2%B. Csúcsok: 1- 10 kDa belső standard, 2 – könnyű lánc, 3 – nem glikozilált nehéz lánc (ngHC) és 4 – glikozilált nehézlánc (HC). Az elválasztás körülményei ugyanazok, mint az 20. ábrán.

A 28. ábrán egy magas (2,5) és egy alacsony (1,0) monomer/keresztköti (dextrán/borát) arányú gélben történő elválasztások elektroferogramjai láthatóak. Magas arányúnak a 10%D/4%B gél tekinthető, alacsonynak a 2%D/2%B. A látszólagos szelektivitás értéke (α) a nem-glikozilált és glikozilált nehézláncoknak a 10%D/4%B gélben 1,055 és 1,029

a 2%D/2%B gélben volt. Az elméleti modellben részletezetteknek megfelelően az eredő alfát a molekulatömeg (α_{MW}) és a komplexképződési (α_C) szelektivitás szorzata eredményezi. A felbontás értékeket a 34. egyenlet alkalmazásával határoztam meg, kiszámolva az $(\alpha-1)/\alpha$ tagot, felhasználva a kapott látszólagos szelektivitás értékeket. Az elméleti tényérszámok \sqrt{N} formában megadva a következők szerint alakultak: $\sqrt{N} = 205$ és $\sqrt{N} = 208$ az ngHC esetében, illetve $\sqrt{N} = 167$ és $\sqrt{N} = 168$ a HC esetében, a magasabb, 10%D/4%B és alacsonyabb, 2%D/2%B koncentrációjú gélösszetétel esetén. Ez azt eredményezte, hogy a 2%D/2%B gél esetében a $R_s = 2,31$ a ngHC és HC között, míg a 10%D/4%B gél esetében $R_s = 1,32$. Tehát az alacsony koncentrációjú gélben, a nehezen elválasztható láncok felbontása 75%-al emelkedett. Figyelembe véve a két lánc hasonló molekulatömegét (ngHC~48,1 kDa, HC~49,4 kDa), a megfigyelt szelektivitási különbségekhez valószínűleg az α_C kifejezés járult hozzá a legnagyobb mértékben. Megjegyzendő, hogy a magasabb koncentrációjú és ezért kisebb pórusméretű gélben a teljes elválasztási idő jelentősen hosszabb volt, azaz 19 perc szemben 12 perccel.

Ugyanakkor, az LC és ngHC között a felbontás körülbelül 50%-kal csökkent az alacsonyabb monomer/keresztköti arányú gél használatával ($R_s = 12,37$ és $R_s = 6,46$). Az α értékek és az \sqrt{N} értékek az alábbiak voltak: $\alpha = 1,21$ és $\alpha = 1,13$, illetve $\sqrt{N} = 236$ és $\sqrt{N} = 202$ az LC esetében, illetve $\sqrt{N} = 205$ és $\sqrt{N} = 208$ a ngHC esetében a 10%D/4%B és 2%D/2%B gélekben. Megjegyzendő, hogy itt az elválasztás kizárólag méretkülönbségeken alapult (α_{MW} , 23. egyenlet). Tehát a 10%D/4%B gél jobb elválasztást eredményezett az LC és ngHC tekintetében, a nagyobb α és N értékének köszönhetően.



29. ábra: Az Omalizumab LC és ngHC (A panel), valamint az ngHC és HC (B panel) 3D elválasztási szelektivitási diagramjai SDS-CGE-vel. Különböző koncentrációarányú, 2,0, 5,0, 7,5 és 10,0% monomert és 2,0, 2,7, 3,3 és 4,0% keresztkötőt tartalmazó dextrán/borát gélekben.

A komplexképződés további vizsgálata érdekében az α értékeket meghatároztam mind a 16 géltre, amelyek 2,0, 5,0, 7,5 és 10,0% dextrán monomert és 2,0, 2,7, 3,3 és 4,0% bórsavat, mint keresztkötő ágenszt tartalmaztak, a dextrán/bórsav arányt, tehát az elemezhető monomer/keresztkötő arányt 0,5-5-ig terjesztve ki. A 29. ábra a kapott α értékeket mutatja be a bórsav és dextrán koncentráció függvényében. A dextrán koncentráció növelésével a legtöbb gélben nőtt az α értéke az Omalizumab LC és ngHC között (29. ábra A panel). Helyi szelektivitási maximum figyelhető meg az alacsonyabb bórsav tartalmú (2,0 és 2,7%), 7,5%-os dextránt tartalmazó gélekben. A bórsav koncentrációjának növelése adott monomer koncentráció mellett viszont csökkentette az α értékeket. Ezzel ellentétes hatás figyelhető meg a 29. ábra B panelen, amely a mAb nem glikozilált nehézlánca és reguláris nehézlánca közötti szelektivitás-változásokat mutatja, ugyanazon monomer/keresztkötő formulák alkalmazásával. Ennél a csúcspárnál a legmagasabb α értéket a 2,0%D/2,0%B azaz a legalacsonyabb koncentrációjú monomert és keresztkötőt tartalmazó gélnél figyeltem meg. A monomer vagy a térhálósító koncentrációjának növelése egyaránt a szelektivitás csökkenését eredményezte.

5.5 Elektromigrációs diszperzió vizsgálata

Az elektroforetikus elválasztások során az elektromigrációs diszperzió a csúcsszimmetria csökkentése révén rontja az elválasztás hatékonyságát, a csúcsfelbontást és a csúcs kapacitást. Ez a probléma a háttélektrolit ko-ionja és a minta komponensek mobilitásainak illesztése révén kiküszöbölhető. A terápiás fehérjék kapilláris gél elektroforézise során leggyakrabban használt borát háttélektrolit alapú polimer gélek, úgymint agaróz és dextrán esetén, a bórsav nem csak ko-ionként funkcionál, hanem kereszt kötőként is szolgál a megfelelő szűrőhatású polimer térháló kialakításához. Ennek a kettős funkcionalitással bíró nagyon fontos puffer alkotónak a hatását vizsgáltam az elektromigrációs diszperzióra, és azon keresztül az elválasztás hatékonyságára, melynek analizését az irodalom szerint eddig még nem tették meg. Első lépésben felállítottam egy elméletet, amelyet kísérleti eredményekkel támasztottam alá. Az átláthatóság érdekében az egyensúlyi egyenletek esetében az ionokat a nevükre utaló szimbólumokkal jelöltem.

Vizes oldatokban a bórsav ($B(OH)_3 \Rightarrow B$) egyértékű savként viselkedik (3. ábra), disszociációját, illetve a bórsav és a tetrahidroxiborát ion ($B(OH)_4^- \Rightarrow B^-$) közötti megoszlást a következőképpen írta le Zittle [91]:

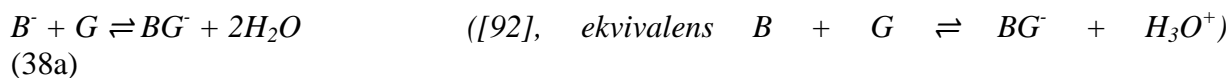


A K_B (37a) bórsav egyensúlyi állandójával kifejezhető a tetrahidroxiborát koncentrációja (37b):

$$K_B = [B^-][H_3O^+]/[B] \quad [B^-] = K_B[B]/[H_3O^+] \quad (37a, b)$$

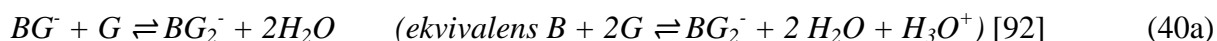
A tetrahidroxiborát ionok egyensúlyi reakcióban reagálnak a polioloikkal – pl. glicerin, glükóz – monomer (37) és dimer (39) adduktokat képezve (6. ábra), amelyek képződésének mértékét a poliól és a tetrahidroxiborát ionok relatív koncentrációja befolyásol. A glicerinrel (G) való reakciót, amely során monomer addukt keletkezik a 38. egyenlet és a dimer addukt képződést a 40. egyenlet írja le. A két reakció egyensúlyi állandóját a 39a és 41a egyenletek szemléltetik. A 39b és 41b egyenleteket a 37b-vel történő kombinációval kaptam, tehát behelyesítettem az

egyenletekbe a tetrahidroxi-borát ion bórsav egyensúlyi állandójával kifejezett koncentrációját.



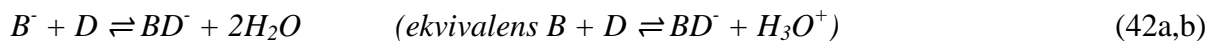
$$K_{BG^-} = [BG^-]/[B^-][G] \quad [BG^-] = K_{BG^-}[B^-][G] = K_{BG^-}[G]K_B[B]/[H_3O^+] \quad (39a, b)$$

és



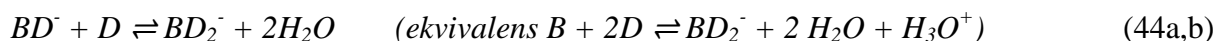
$$K_{BG_2^-} = [BG_2^-]/[BG^-][G] \quad [BG_2^-] = K_{BG_2^-}[G][BG^-] = K_{BG_2^-}K_{BG^-}[G]^2K_B[B]/[H_3O^+] \quad (41a, b)$$

A következő lépésben a bórsav-glicerin reakcióval analóg módon kerül levezetésre a bórsav-dextrán reakció. A bórsav komplexeket képezhet a dextrán ($\Rightarrow D$) polimer láncok glükóz egységeivel is, így monomer (láncon belüli, 42. *egyenlet*) és dimer (láncok közötti keresztkötéssel, 44. *egyenlet*) adduktumokat hozva létre, amint azt a 4. *ábra* is szemlélteti. Ezek a reakciók a ko-ion komplexek mobilitását jóformán a nullára csökkentik a dextrán polimer gyakorlatilag elhanyagolható mobilitása miatt [53]. Az egyensúlyi állandók, a K_{BD} és K_{BD_2} a 43a és 45a egyenletekben kerültek kifejezésre. A 43b és 45b egyenleteket a 37b egyenlettel történő kombináció eredményezte.



$$K_{BD^-} = [BD^-]/[B^-][D] \quad [BD^-] = K_{BD^-}[D][B^-] = K_{BD^-}[D]K_B[B]/[H_3O^+] \quad (43a, b)$$

és



$$K_{BD_2^-} = [BD_2^-]/[BD^-][D] \quad [BD_2^-] = K_{BD_2^-}[D][BD^-] = K_{BD_2^-}K_{BD^-}[D]^2K_B[B]/[H_3O^+] \quad (45a, b)$$

Továbbá a monomer borát-glicerín addukt komplexet képezhet a dextrans polimerrel (46. egyenlet) a 47a egyenletben leírt K_{BGD} egyensúlyi állandóval, melyet kombinálva a 37b egyenlettel a 47b egyenletet kapjuk:



$$K_{BGD} = [BGD^-]/[BG^-][D] \quad [BGD^-] = K_{BGD}[BG^-][D] = K_{BGD}K_{BG}[G][D]K_B[B]/[H_3O^+] \quad (47a, b)$$

A borát alapú negatív töltésű ko-ionok (C_B^-) összkonzentrációja a háttérelktrolitban a 36b, 39b, 41b, 43b, 45b és 47b egyenletekben szereplő egyes tetrahydroxi-borát ion – poliolo koncentrációjának összegével fejezhető ki:

$$C_B^- = [B^-] + [BG^-] + [BG_2^-] + [BD^-] + [BD_2^-] + [BGD^-] \quad (48)$$

A ko-ionok móltörtjei (R) a következők:

$$R_B^- = [B^-]/C_B^- \quad (49)$$

$$R_{BG^-} = [BG^-]/C_B^- \quad (50)$$

$$R_{BG_2^-} = [BG_2^-]/C_B^- \quad (51)$$

$$R_{BD^-} = [BD^-]/C_B^- \quad (52)$$

$$R_{BD_2^-} = [BD_2^-]/C_B^- \quad (53)$$

$$R_{BGD^-} = [BGD^-]/C_B^- \quad (54)$$

A borát alapú ko-ion effektív mobilitása ($\mu_{\text{eff}(ko-ion)}$) a megfelelő ionos mobilitások (μ^0) és móltörtjeik (R) lineáris kombinációjával határozható meg:

$$\mu_{co-ion}^{\text{eff}} = \mu_B^0 \cdot R_B^- + \mu_{BG^-}^0 \cdot R_{BG^-} + \mu_{BG_2^-}^0 \cdot R_{BG_2^-} + \mu_{BD^-}^0 \cdot R_{BD^-} + \mu_{BD_2^-}^0 \cdot R_{BD_2^-} + \mu_{BGD^-}^0 \cdot R_{BGD^-} \quad (55)$$

37b, 39b, 41b, 43b, 45b, 47b és 48-54 egyenleteket összevonva, az alábbi eredményre jutunk:

$$\mu_B^0 + \mu_{BG^-}^0 \cdot K_{BG}[G] + \mu_{BG_2^-}^0 \cdot K_{BG_2}K_{BG}[G]^2 + \mu_{BD^-}^0 \cdot K_{BD}[D] + \mu_{BD_2^-}^0 \cdot K_{BD_2}K_D[D]^2 + \mu_{BGD^-}^0 \cdot K_{BGD}[D]K_{BG}[G]$$

$$\mu_{co-ion}^{eff} = \frac{1}{1 + K_{BG}[G] + K_{BG^2}K_{BG}[G]^2 + K_{BD}[D] + K_{BD^2}K_D[D]^2 + K_{BGD}[D]K_{BG}[G]} \quad (56)$$

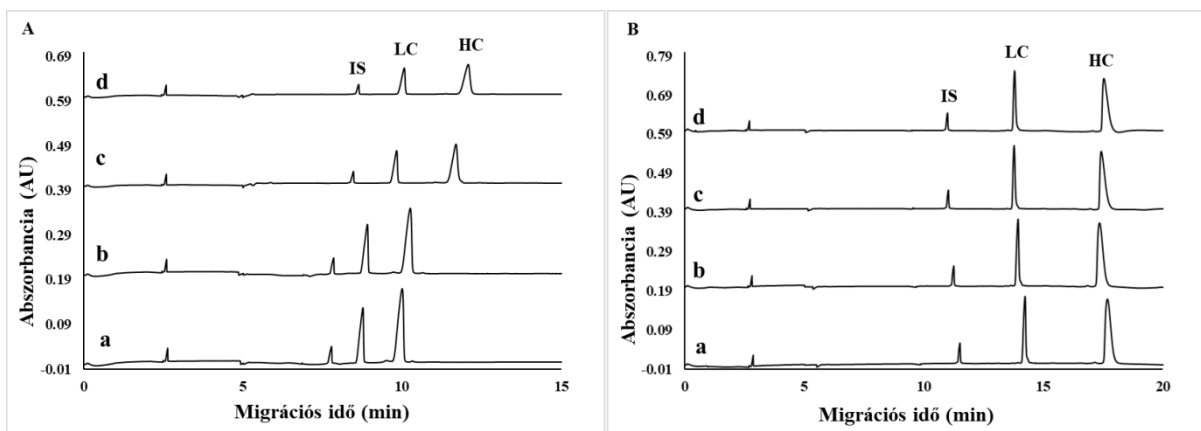
Fontos ismét hangsúlyozni, hogy a dextránhoz kötött tetrahydroxi-borátok gyakorlatilag immobilizálódnak a nagy, térhálósított 2 MDa polimer elhanyagolható mozgékonyasága miatt, azaz $\mu_{BD}^{0-} \sim \mu_{BD^2}^{0-} \sim \mu_{BGD}^{0-} \sim 0$. Következésképpen az utolsó három tag a 56-os egyenlet számlálójában bármekkora tetrahydroxi-borát koncentrációnál a nullához közelít, ami fontos következtetés az eredményeink értékelése szempontjából

Fehérjék SDS-CGE során a csúcshévesedés vagy torzulás két fő faktora a diffúzió (σ_D^2) és az elektromigrációs diszperzió (σ_{EMD}^2). Minden más variancia elhanyagolható, beleértve az adszorpciót is, a negatív töltésű kapilláris fal és az SDS-fehérjék közötti taszító hatások miatt. A Joule-hő képződés is elhanyagolható mértékű, köszönhetően a modern kapilláris elektroforézis gépek pontos hőmérséklet szabályozásának. Ehhez még hozzájárulnak a konstans detektálási zóna és injektálási paraméterek is. A csúcsok teljes varianciája (σ_t^2) az alábbi egyenlettel írható le:

$$\sigma_t^2 = \sigma_D^2 + \sigma_{EMD}^2 \quad (57)$$

Az előzőekben bemutatott levezetés, illetve az előző fejezetekben bemutatott eredmények alapján nyilvánvaló, hogy a bórsavval stabilizált dextrán gélek esetében az elektromigrációs diszperzió jelentősen megváltozik a bórsav koncentráció növelésével. Ennek a jelenségnek a megértéséhez a borát koncentráció hatását vizsgáltam az SDS-fehérje komplexek csúcshimetriájára, 2% és 10% dextrán alapú gélek (körülbelül 0,12 M és 0,60 M glükóz építőelemeket tartalmaznak) felhasználásával.

A 30. ábrán az IgG alegységeinek és a 10 kDa-os belső standard elválasztásának elektroferogramjai láthatók 2%-os (A panel) és 10%-os (B panel) dextrán alapú gélekben, 2-4% közötti bórsav koncentrációt alkalmazva (*a-b vonalak a különböző bórsav koncentrációk mellett történt méréseket jelölik*). Az ábra a mAb könnyű (LC, ~25 kDa) és nehéz (HC, ~50 kDa) láncainak, valamint a belső standardnak (IS, 10 kDa) megfelelő csúcsokat tartalmazza. A pH-t (7,16) és a glicerín koncentrációt (10% V/V) állandó értéken tartottam a kísérleteim ezen részében.



30. ábra: A növekvő bórsav-koncentráció hatása a csúcsaszimetriára 2 %-os (A panel) és 10 %-os dextrán alapú gélekben. Elektroferogramok: a) 4, b) 3,3, c) 2,7 és d) 2% bórsav. Csúcsok: IS - belső standard, LC - omalizumab könnyű lánc és HC - omalizumab nehéz lánc. Az elválasztás körülményei: 20 cm effektív hossz (30 cm totál), 50 μm ID, BFS kapilláris; alkalmazott elválasztási feszültség: 15 kV; minta injektálása: 5 kV 20 s; elválasztás hőmérséklete: 25°C; nyomás a kapilláris két oldalán: 20 psi; UV detektálás 214 nm hullámhosszon. Minta koncentráció: 1,57 mg/ml

A 2%-os gélek esetében látható, hogy a csúcsok nagymértékben frontingosak ($A_{10\%} < 1$), azaz a bórsav koncentráció növelése csökkenő csúcsszimmetriát eredményezett. A 2. táblázatban láthatóak az A panelhez tartozó csúcsok csúcsaszimmetria értékei ($A_{10\%}$), valamint a felbontás (R_s), a variancia (σ_t^2), a látszólagos mobilitás (μ_{app}) és az effektív mobilitás (μ_{eff}) értékek. A gélekhez tartozó viszkozitás (η) és EOF (μ_{EOF}) értékeit is feltüntettem a táblázatban. Az összes mintakomponens látszólagos mobilitása (μ_{app}) 14-20%-kal nőtt a bórsav koncentráció növelésével, az effektív mobilitások (μ_{eff}) – elektroosmotikus áramlással (μ_{EOF}) korrigált mobilitások – megközelítőleg azonos mértékben csökkentek. Továbbá, míg az EOF-mobilitások kétszeresére változtak a két szélső borátkoncentráció között, a mintakomponensek effektív mobilitása kevesebb, mint 20%-kal változott. Tehát a háttélelektrolit függő elektroosmotikus áramlás (alacsonyabb EOF magasabb bórsav koncentrációnál) a 2%D gélekben jelentősen befolyásolta az oldott anyagok elektromigrációját, amit a 6. táblázatban látható mobilitás értékek szemléltetnek. A bórsav koncentrációjának növekedésével a csúcsok variancia értéke nőtt, és a köztük lévő felbontás ennek megfelelően csökkent.

6. Táblázat: A mintakomponensek csúcsaszimmetria (A10%), látszólagos (μ_{app}) és effektív (μ_{eff}) elektroforetikus mobilitás értékei növekvő bórsav koncentrációjú (%B) 2%-os dextrans gélekben. A gélek viszkozitás (η) és az EOF mobilitás (μ_{EOF}) értékeit szinten feltüntettem.

2% dextrans	2%B	2,7%B	3,3%B	4%B
$A_{10\%(LC)}$	0,26	0,25	0,20	0,19
$A_{10\%(HC)}$	0,46	0,42	0,32	0,30
$RS_{(LC-HC)}$	5,80	5,76	4,36	4,02
$\sigma_t^2 (LC)$	0,0160	0,0165	0,0179	0,0179
$\sigma_t^2 (HC)$	0,0254	0,0258	0,0319	0,0326
$\mu_{app(LC)}(\cdot 10^{-9}) [m^2/(V s)]$	6,59	6,74	7,43	7,53
$\mu_{app(HC)}(\cdot 10^{-9}) [m^2/(V s)]$	5,50	5,67	6,46	6,60
$\mu_{eff(LC)}(\cdot 10^{-9}) [m^2/(V s)]$	11,51	10,92	10,27	9,82
$\mu_{eff(HC)}(\cdot 10^{-9}) [m^2/(V s)]$	10,42	9,85	9,30	8,89
$\eta [mPa s]$	10,7	10,9	11,9	12,0
$\mu_{EOF} (\cdot 10^{-9}) [m^2/(V s)]$	-4,92	-4,18	-2,84	-2,29

A BGE koncentrációjától függő EOF (alacsonyabb EOF-értékek a magasabb bórsav koncentrációk esetén) jelentősen befolyásolta a 2% dextrans alapú gélekben a mintakomponensek elektromigrációját, ahogy a 6. táblázatban is látható. A bórsav koncentrációjának növekedésével a csúcsok térbeli varianciája nőtt, és a közöttük lévő felbontás ennek megfelelően csökkent. Fontos megjegyezni az emelkedő csúcsmagasságokat a növekvő bórsav koncentrációjú gélekben, amelyek láthatóan a körülbelül 50%-os csökkenő ellenáramú EOF és a kb. 15%-os μ_{eff} változás hatására alakultak ki. Ez az említett látszólagos mobilitásnövekedést eredményezte, így hatással van az elektrokinetikus injektálással bejuttatható minta mennyiségre. Feltéve, hogy az összes egyéb paraméter változatlan marad, az elektrokinetikus injektálás során az elválasztó kapillárisba belépő analit molekulák mennyiségét befolyásolja a mintakomponensek effektív mobilitása ($\mu_{eff(LC)}$ és $\mu_{eff(HC)}$) és az elektroosztatikus áramlás (μ_{EOF}). Az EOF irányától függően növelheti (azonos irányú) vagy csökkentheti (ellenirányú) a tényleges mintabevitelt. Az ellenirányú EOF hatása a 2% és 2,7% bórsavat tartalmazó mátrixok magasabb EOF-szintjeinél fokozottan nyilvánult meg.

A 7. táblázatban láthatóak a 31-es ábra B paneljéhez tartozó csúcsok adatai, hasonlóan a 6. táblázathoz. A magasabb polimer koncentrációjú - 10%D- gélek esetén az omalizumab nehéz lánc alegysége csökkenő tailinges csúcsalakot ($A_{10\%}=4,31 - 2,06$) mutat növekvő borsav koncentrációval. A csúcsforma változását illetően a könnyű lánc alegység átmenetet mutat az enyhe tailing ($A_{10\%}=1,04$) és mérsékelt fronting ($A_{10\%}=0,41$) között. 10%-os gélek esetében az EOF mértéke 5-10-szer kisebb, mint a 2% gélekben, illetve a magasabb viszkozitás is jellemzi.

7. Táblázat: A mintakomponensek csúcsasszimmetria ($A_{10\%}$), látszólagos (μ_{app}) és effektív (μ_{eff}) elektroforetikus mobilitás értékei növekvő borsav koncentrációjú (%B) 10%-os dextrán gélekben. A gélek viszkozitás (η) és EOF mobilitás (μ_{EOF}) értékeit is feltüntettem.

10% dextrán	2%B	2,7%B	3,3%B	4%B
$A_{10\%(LC)}$	1,04	0,80	0,42	0,41
$A_{10\%(HC)}$	4,31	4,23	2,35	2,06
$Rs_{(LC-HC)}$	11,21	11,43	10,75	11,45
$\mu_{app(LC)}(\cdot 10^{-9}) [m^2/(V s)]$	4,79	4,76	4,73	4,58
$\mu_{app(HC)}(\cdot 10^{-9}) [m^2/(V s)]$	3,79	3,79	3,81	3,69
$\mu_{eff(LC)}(\cdot 10^{-9}) [m^2/(V s)]$	5,71	5,61	5,13	4,76
$\mu_{eff(HC)}(\cdot 10^{-9}) [m^2/(V s)]$	4,71	4,63	4,20	3,87
$\eta [mPa s]$	85,3	94,7	95,9	100,2
$\mu_{EOF} (\cdot 10^{-9}) [m^2/(V s)]$	-0,92	-0,84	-0,39	-0,18

A 10%D/2%B gél esetében az $A_{10\%(LC)}=1,04$, amely érték közel áll a tökéletes Gauss alakhoz, így ebben az esetben ezen mintakomponens mobilitása szoros egyezést mutatott a háttérelktrolitban lévő ko-ionos formákkal. Emelkedő borát koncentrációnál a mobilitása fokozatosan csökkent, ami az enyhe tailingtől mérsékelt frontingot okozott ($A_{10\%} = 0,41$). A variancia (σ_t^2) mindkét csúcs esetében csökkent a borsav koncentrációjának növekedésével, ugyanakkor a felbontási értékek nem változtak sokat, és átlagosan $Rs=11,21$ (%RSD=2,53) értéket mutattak (7. táblázat).

Az egy nagyságrenddel kisebb EOF a nagyobb viszkozitású, 10%-os dextrán alapú gélekben láthatóan nem változtatta az elektrokinetikus injektálás során bejutó minta mennyiségét, azaz mindegyikben hasonló csúcsmagasság volt megfigyelhető, szemben a 2%-os gélekkel (25. ábra) ahol ezt szignifikánsan befolyásolta.

A glicerin hatásának értékeléséhez 2%D/2%B és 10%D /4%B géleket készítettem 0, 2, 4, 6, 8 és 10% (V/V) végső glicerin koncentrációkkal. A kapott elektroferogramokat, illetve azok analízisét hasonló módon végeztem, mint a fixen 10% glicerint tartalmazó gélek esetében [93], beleértve annak hatását a háttélektrolit pH-jára, és ennek következtében az elektroosmotikus áramlásra (EOF), valamint a mintakomponensek elektroforetikus mobilitásaira és az elektrokinetikus injektálás teljesítményére. Glicerin hozzáadása a BGE-hoz savas pH eltolódást eredményezett a bórsav és a glicerin reakciója során felszabaduló protonok miatt, amely hatással volt az elektroosmotikus áramlásra és a tetrahidroxi-borát alapú azonos töltésű ionkomplexek vándorlási sebességére. Az ellenirányú elektroosmotikus áramlás befolyásolta a mintakomponensek látszólagos elektroforetikus mobilitását, így az elektrokinetikus injektálás hatásossága az EOF és az effektív mobilitások függvénye volt. A glicerin és a dextrán összetevőkkel történő poliol-tetrahidroxi-borát komplexek képződése olyan ko-ionokat eredményezett, amelyek esetében az effektív mobilitás alacsonyabb (akár nulla) volt, illetve a bórsav gyenge disszociációját is befolyásolta semleges pH-n. Ezek láthatóan kulcsfontosságú tényezők voltak az EMD-re gyakorolt hatásban.

6. Eredmények megbeszélése

6.1 Fizikai és elektrokinetikai paraméterek vizsgálata

A polimertudományban közismert, hogy jelentős változás következik be, amikor egy lineáris szerkezetű polimerből térhálósódás következtében gél szerkezet alakul ki [94]. A dolgozatom alapját képező dextrán-borát esetében, ez a jelenség akkor figyelhető meg, amikor a dextránt (2MDa) borsav oldatban semleges pH értéken feloldjuk, azaz a borsav, mint keresztkötő anyag, a dextrán, mint monomer részt vesz a gél szerkezet kialakulásában. A mátrix szerkezetében jelentős változás megy végbe, ahogyan az 5. és 6. ábra összevetésével megfigyelhető.

A munkám során az SDS-fehérje komplexek CE elektromigrációját vizsgáltam, különböző dextrán és borsav koncentrációjú gélekben. A munkám első lépéseként meghatároztam a dextrán és borsav koncentrációk peremértékeit 50 μm átmérőjű, 30 cm teljes hosszúságú (20 cm effektív hossz) kapilláris alkalmazása esetén, figyelembe véve a gél viszkozitását, vezetőképességét a könnyű kezelhetőség szempontjából.

10% dextrán koncentráció felett, a növekvő viszkozitás nem teszi lehetővé a megfelelő gélcseret a keskeny átmérőjű kapillárisban, figyelembe véve a mérőműszer nyomáshatárait. 2% koncentráció alatt a molekulaszűrő képesség jelentősen csökkent a vizsgált 20 – 225 kDa tartományban.

A magasabb >4% borsav koncentráció esetén az alkalmazott 500 V/cm térerősség és 30 cm oszlophossz mellett jelentősen megnőtt az elektromos áramerősség, amely nemkívánatos Joule-hő képződést eredményez. 2% borsav koncentráció alatt, az elemzési idő jelentősen megnőtt az ellenirányú EOF növekedése miatt. Ennek következtében a kísérleteimhez 2-10% dextrán (D) és 2-4% borsav (B) koncentráció tartományokba eső géleket használtam.

Ezt követően koncentráció sorozat felállításával 16 különböző összetételű gélt választottam, melyeket a kísérleteimhez felhasználtam, ezek 10, 7,5, 5 és 2 % dextránt valamint 4, 3,3, 2,7 és 2% borsavat tartalmaztak. Ezen gélek esetében meghatároztam néhány

fontos fizikai és elektrokinetikus paraméteret, mint például viszkozitás, elektroozmotikus áramlás és áramerősség, melyek a fent említett koncentráció határértékek meghatározásához is szükségesek voltak.

A 10%D/4%B gélnek volt a legnagyobb a viszkozitása (12. ábra), 100 [mPa s], valószínűleg a 1:2 borát:dextrán kötések (7. ábra) nagy száma miatt, melyek térhálósítják a dextrán mátrixot. Kevesebb bórsav (10%D/2%B) használatával csökkent a térhálósodás, ami alacsonyabb viszkozitású gélt eredményezett. A dextrán koncentrációt alacsony szinten tartva (2%) a bórsav mennyiségének emelésével, a viszkozitás nőtt (10,7-12 [mPa s]), de még így is csaknem 10-szer alacsonyabb volt, mint a 10% dextrán tartalmú gélek esetében. A 2% koncentrációjú dextrán gélekben az alacsonyabb számú polimer szálak a 1:2 kötések nagyarányú képződését eredményezik, különösen a legalacsonyabb borát koncentrációnál. Ezzel szemben a megnövelt mennyiségű (4%) boráttal az alacsony dextrán tartalmú gélekben az 1:1 kötések száma nő, ami növeli a töltéssűrűséget a nem kereszt kötött dextrán szálak esetében, és a láncon belüli negatív töltésű adduktok taszítják egymást, amely egy kevésbé rendezett és lazább szerkezetű polimer mátrix létrejöttéhez vezet (megnövekedett konfigurációs entrópia) [95].

A dextrán-bórsav alapú gélek alkalmazásánál nem bevont falú kapillárisokat alkalmaztam, ezért fontos volt az EOF meghatározása a gélekben. A dextrán-borát gélek esetében katód irányú EOF által generált folyadékáramlás jön létre, így lassítva a negatív töltésű SDS-fehérje komplexek migrációját. A kapott EOF értékeket felhasználtam a kísérleteim során μ_{eff} meghatározásához (lásd 3.7.1 *Elektroforetikus mobilitás meghatározása*). EOF nélkül az összes oldott molekula gyorsabban vándorolt volna. A töltött gélmátrix vándorlása az alkalmazott elektromos tér alatt jelentéktelen volt, így azt nem vettem figyelembe. Az EOF mobilitások csökkenő tendenciát mutatnak a növekvő dextrán (növekvő viszkozitás) és bórsav (növekvő ionerősség és kereszt kötés képződés) koncentrációval (13. ábra). Ebből következik, hogy a 10%D/4%B gél készítmény esetében volt a legalacsonyabb az EOF, köszönhetően a nagy viszkozitásnak és ionerősségnek, illetve ennek megfelelően a 2%D/2%B formula esetében mértem a legnagyobb az EOF áramlást.

Másik fontos fizikai paraméter, amely meghatározásra került 500 V/cm elektromos térerősség mellett az áramerősség volt. Egyértelműen magasabb áramerősséget mértem a 4% bórsav tartalmú géleknél szemben a 2% bórsav összetételű gélekkel (14. ábra). A legnagyobb áramerősség az alacsony dexrán/magas bórsav összetételű (2%D/4%B) gélnél volt megfigyelhető, feltételezhetően a dexrán-borát komplexképződés során felszabaduló protonok miatt. A legalacsonyabb áramerősséget a nagy monomer/alacsony térhálósító koncentrációjú, 10%D/2%B gélben mértem.

6.2 Fehérjék hőmérséklet-függő elektromigrációja

A nátrium-dodecil-szulfát kapilláris gél elektroforézis rutinszerűen alkalmazott módszer a terápiás fehérjék gyártási folyamata során, beleértve a termékjellemzést, a stabilitásvizsgálatot és sarzs felszabadítást. Az SDS-CGE módszer a hagyományos monoklonális antitestek esetében lehetővé teszi a fehérjét alkotó alegységek számának meghatározását, elválasztható vele a könnyű lánc, a glikozilált és nem glikozilált nehéz lánc. Azonban vannak olyan új típusú terápiás fehérjemolekulák, amelyek analíziséhez a módszer optimalizálása szükséges, például bispecifikus antitestek esetében, amelyek két különböző könnyű láncot tartalmaznak melyek nem választhatóak el megfelelően az általánosan használt módszerek alkalmazásával.

A kapilláris hőmérsékletének hatását vizsgáltam az SDS-fehérje komplexek elválasztására az aktiválási energia igény koncepción keresztül. Először egy fehérjelétra elválasztását vizsgáltam (15. ábra *Fehérje létra SDS-CGE elválasztása különböző hőmérsékleteken*), hogy megértssem az SDS-fehérje komplexek hőmérsékletfüggő migrációjának alapelveit. Majd a módszert alkalmaztam egy terápiás fehérjékből álló keverékre (16. ábra *Teszt fehérje keverék SDS-CGE elválasztása különböző hőmérsékleteken*) azzal a céllal, hogy optimalizáljam a hőmérsékletet a lehető legmagasabb felbontás elérése érdekében. Az SDS-protein komplexek migrációs viselkedésének jobb megértése érdekében a folyamatosan törő / helyreálló dexrán-borát géllal, a mobilitás és a molekulatömeg közötti összefüggést is vizsgáltam.

Eredményeim alapján arra a következtetésre jutottam, hogy izoterm körülmények között az SDS-protein komplexek elektroforetikus mobilitása a molekulatömeg $-1/6$ -ik hatványával arányos, (23. egyenlet), ami elektromigrációjuk során hengeres molekula alak felvételére utal. Ezzel a módszerrel kalibrációs egyenesek vehetők fel és becsülhető egy ismeretlen tömegű fehérje molekulatömege.

$$\mu = \text{const}_A \cdot Q \cdot M_w^{-1/6} \cdot e^{-E_a/RT} \quad (58)$$

ahol μ a mobilitás, const_A a konstansok összegzése, Q az SDS-fehérje komplex nettó töltése, MW a molekulatömeg, E_a az aktiválási energia, R az egyetemes gázállandó és T az abszolút hőmérséklet.

A logaritmikus elektroforetikus mobilitást ábrázolva az abszolút hőmérséklet reciprokanak függvényében meghatároztam a fehérjék aktiválási energiaigényét is. Az E_a a fehérje létra esetében, konvex csökkenő tulajdonságot mutatott (17. ábra B panel), a molekulatömeg növekedésével. Ez a jól meghatározott változás a mintakomponensek nagyon hasonló molekula jellemzőiknek köszönhető, melyek ugyanolyan polipeptid blokkokból épülnek fel és nem tartalmaznak poszttranszlációs fehérjemódosításokat. Emellett befolyásolhatja a borát-térhálósított dexrán mátrixképződés milliszekundumos élettartama [39] is a konvex csökkenő aktiválási energia igényt a molekulatömeg növekedésével. A felbontás az egymást követő csúcsok között a teljes mérettartományban hasonlóan változott (16. ábra jobb felső sarok), valószínűleg szintén ezen fehérjék hasonló karakterisztikája miatt.

Fontos megjegyezni, hogy a hőmérséklet emelkedésével a növekvő diffúzió is hozzájárul a felbontás csökkenéséhez. Az aktiválási energiaigény szerepét illetően *Dovich* és *munkatársai* hasonló jelenséget figyeltek meg a dsDNS fragmensek elválasztása során [96]. Feltételezem, hogy az elválasztás során torzulnia kell a gélszerkezetnek, ahhoz, hogy lehetővé váljon az erősen negatív töltésű nagyméretű SDS-fehérje komplexek migrációja. Feltételezésem szerint a konvex típusú növekvő molekulatömegegél járó E_a csökkenést befolyásolja a boráttal térhálósított dexrán mátrix képződésének nagyon rövid, néhány

miliszekundumos élettartama. A dextransláncok között a keresztkötések folyamatosan megszakadnak és újjáépülnek, így a nagyméretű molekulák áthaladása miatt torzult szerkezet könnyen helyreáll.

Az bioterápiás fehérje mintakeverék komponenseinek E_a igényben (15. ábra B panel) nem volt megfigyelhető semmilyen szabályszerűség, szemben a standard fehérjelétrával. Ezeknek a fehérje molekuláknak jelentősen eltér a polipeptid szekvenciája, más-más poszttranszlációs módosulással rendelkeznek, amelyek eltérő és előre nem jósolható E_a -t igényelnek a gélmátrixon keresztül történő elektromigrációjukhoz.

6.3 Fehérjék elektromigrációjának vizsgálata Ferguson módszerrel

A fehérje létra Ferguson analízise során a csúcsok molekulatömegének függvényében ábrázolt migrációs idők nem lineáris, konkáv görbét eredményeztek. A vonal görbülete a molekulatömeg növekedésével, illetve a dextrans koncentráció növekedésével nőtt. A görbület 2% bórsav mellett még inkább hangsúlyozott volt. Jelen helyzetben kijelenthető, hogy a fehérje létra esetében a töltés sűrűség és a molekula alakja a különböző molekulatömegű csúcsok esetében hasonló, annak eredményeként, hogy hasonló polipeptid blokkokból épülnek fel és nem tartalmaznak poszttranszlációs módosításokat. Ezért a 20. ábrán (2% bórsav) megfigyelhető görbék minden valószínűség szerint a tranziens gél szerkezet (milliszekundumos tartományban folyamatosan törő/helyreálló gél szerkezet) változását tükrözik egy adott dextrans koncentráció tartományban. Alacsonyabb bórsav (2%) tartalom esetén nagyobb mértékben képződnek láncközi kötések (2:1). 7,5% dextrans tartalom körül a bórsav ionok nagy része keresztkötést alkot, emiatt nincs további szignifikáns görbület változás a 10 % gél esetében. 4% bórsav tartalom esetében, azonban még mindig elegendő mennyiségű bórsav van az oldatban, ahhoz, hogy a dextrans tartalmat 10%-ra növelve, növekedjen a dextrans láncok közötti keresztkötések száma, ezzel tovább csökkentve a gél pórusméretét, amelyet az SDS-fehérje létra effektív elektroforetikus mobilitásának csökkenése is alátámaszt. Tehát a dextrans láncok közötti kötések száma, így a térhálósódás mértéke nagyobb dextrans koncentráció mellett 4% bórsav esetén nagyobb, mint alacsonyabb, 2%

bórsav tartalom mellett. Továbbá alacsonyabb dextrán és magasabb bórsavkoncentrációknál több a 1:1 arányú dextrán/borát addukt képződik, ami a láncok negatív töltése következtében fellépő taszításnak köszönhetően még nagyobb pórusméretet eredményez. A dextrán-borát kötések folyamatos képződése és felszakadása miatt feltételezhető, hogy elektromigrációjuk során az SDS-fehérje komplexek torzítják a gélmátrixot ami változó pórusmérethez vezet. Ezen hatás feltételezhetően a 225 kDa fehérje esetében a legnagyobb. A 2% bórsav tartalmú gélek esetében a kevesebb keresztkötés eredményeként a torzulás jelentősebb, mint a 4% bórsav tartalmú géleknél, ami nagyobb méretű görbületet okoz, ahogyan az az *20. ábrán* is látható. Fontos megjegyezni, hogy a nagy viszkozitás különbségek is befolyásolják a 2% (10,7-12 Pa·s között növekedik a bórsav koncentráció emelésével) és 10% dextrán tartalmú gélek (85-100 Pa·s között emelkedik a bórsav koncentráció emelésével) esetében a kapott elektroforetikus mobilitásokat. A nemlineáris Ferguson diagramok azt mutatják, hogy a dextrán/borát gél dinamikus szerkezeti változásokon megy keresztül, amikor az SDS-fehérjék a mátrixon keresztül vándorolnak. A szerkezeti változások mértékét befolyásolja a gél összetétel és a minta fehérjék mérete.

Az *22. ábrán* látható elválasztások jól tükrözik a molekulaszűrés és az EOF különbségek együttes hatását a molekulák migrációjára a különböző dextrán/borát gélekben. Bár a 10%D/4%B gél esetében nagyon jó a molekulaszűrőhatás, a 10%D/2%B gél esetében a legszélesebb a migrációs ablak, melyhez jobb felbontás is párosul. A 10%D/4%B gél esetében az EOF értéke $2,55 \cdot 10^{-10}$, míg a 10%D/2%B gél esetében $2,77 \cdot 10^{-9}$. Az ellenirányú EOF bár hátráltatja a negatív töltésű SDS-fehérje komplexek migrációját, de a nagyobb EOF olyan hatást vált ki mintha hosszabb kapillárist használnánk az elválasztáshoz. Ezen gélek viszkozitása majdnem azonos, de az EOF csaknem kétszer magasabb a 2% bórsav tartalmú gélben, szemben a 4% bórsav tartalmú géllal. Nagyobb bórsav tartalom mellett 2%D esetén a nagyobb gél pórusméret jellemző. Ennek a két jellemzőnek köszönhető, hogy a 2%D/4%B gél esetében gyorsabban migrálnak a fehérjék, mint a 2%D/2%B gélben. Az elválasztási sebesség az alacsony dextrán koncentrációjú gélek esetében magasabb, köszönhetően, hogy a viszkozitásuk 10-szer alacsonyabb, mint a magas dextrán tartalmú géleknek, figyelembe véve az elektroforetikus mobilitás és a viszkozitás közötti összefüggést. Az eredményekből következik, hogy a viszkozitás és az EOF változtatásával, ami a bórsav és dextrán

koncentráció függvénye, az SDS-CGE elválasztási módszer elválasztóképessége finomhangolható. A 10%D/4%B gél mutatta a legjobb általános képességet (jó felbontás de nem túl hosszú elválasztási idő), így jó kiindulási gélösszetételt jelentett kísérlettervezés során. A különféle monomer/keresztítő koncentráció arányú gélek széles alapot kínálnak az elválasztás optimalizálásához és a hatékonyabb kiválasztásához a konkrét elválasztási problémától függően.

Mivel a boráttal térhálósított dextrans gélek lehetővé teszik az SDS-fehérje komplexek méretalapú kapilláris elektroforézis elválasztását, munkám következő lépésében más megközelítést alkalmazva azt vizsgáltam, hogy a borát és dextrans koncentráció aránya hogyan hat a molekulaszűrő hatásra a fehérjelétra és egy nagymértékben glikozilált terápiai fúziós fehérje, az etanercept SDS-CGE vizsgálata során. 16 különböző összetételű dextrans-borát gélben hajtottam végre az elválasztásokat (24. ábra) amelyek 10, 7,5, 5 és 2% dextrans valamint 4, 3,3, 2,7 és 2% bórsavat tartalmaztak, és analizáltam a kapott eredményeket. 3D Ferguson diagramokat készítettem (25. és 26. ábra) annak érdekében, hogy megértsem az oldott molekulák migrációs viselkedését. A diagramokat az etanercept analíziséhez optimális gél összetétel meghatározásához használtam. K_R diagramok (27. ábra) segítségével becsültem meg a fehérje molekulatömegét.

Adott borát koncentráció esetén az elválasztási idő a dextrans koncentráció csökkenésével csökkent, azonban még mindig alapvonalis elválasztást eredményezett. Adott dextrans koncentráció esetén a borát koncentráció változtatásának sokkal kisebb hatása volt a migrációs időkre. Feltehetően ez a viszkozitás és az EOF közötti kölcsönhatásnak köszönhető, mivel ezeket nagymértékben befolyásolja a gél e két fő komponensének mennyisége (lásd 4.1 Fizikai és elektrokinetikai paraméterek).

A 3D Ferguson diagramok lehetővé teszik az elválasztott SDS-fehérje komplexek migrációs viselkedésének gyors felmérését a dextrans-borát koncentráció függvényében. Ezért ez a megközelítés segíthet kiválasztani a megfelelő összetételű gél egy adott fehérjekeverék esetében, melynek elválasztása esetleg nem megfelelő a standard összetételű gélben (10%D/4%B).

Ezt követően ábrázoltam a hagyományos valamint a nem N-glikozilált etanercept alegységpárokra adott szelektivitást a borát és dextrán koncentráció függvényében, ami a 2%D/2%B tartalmú gélben volt a legjobb. Az ismert molekulatömegű fehérjelétrat standardként futtatva, kalibrációs görbét vettem fel. Ennek alapján nem volt megfelelő az etanercept molekulásúlyának meghatározása. A kapott eredmény nagymértékben eltért az irodalmi adatok szerint elvárttól, ezért a Ferguson módszerrel kapott adatokat felhasználva a retardációs koefficiens (K_R) ábrázoltam a molekulatömeg logaritmusának függvényében, mely pontosabb meghatározást tett lehetővé. Ezek a molekulatömeg értékek szignifikánsan közelebb álltak a 75 kDa és ~70 kDa irodalmi értékekhez, mint amit az elektroferogramok tükröztek (100 és 150 kDa).

6.4 A monomer és keresztkötő ágens arányának hatása az elválasztás szelektivitására

A monomer (dextrán) és keresztkötő (borát) arány hatását vizsgáltam az elválasztás szelektivitása szempontjából, ahol egy monoklonális antitest redukált alegységeit és annak intakt formáját választottam el. Kidolgoztam egy retenciós modellt, hogy jobban megértsem a nem glikozilált és glikozilált nehéz láncok közötti elválasztási szelektivitást, kihasználva a dextrán-borát adduktok és a terápiás antitest glikán lánca közötti kölcsönhatást. A dextrán/borát arány hatással van az analízis időre, és befolyásolja a ngHC és HC között a szelektivitást, azonban nincs hatással a monoklonális antitest glikozilált és nem glikozilált intakt formáinak elválasztására. A dextrán és bórsav koncentráció függvényében ábrázolt szelektivitás értékek diagramjai egyszerű elválasztási optimalizálási lehetőséget kínálnak, az adott elválasztási problémára.

A nem glikozilált nehézlánc és a normál (glikozilált) nehézlánc közötti elválasztási szelektivitást különböző monomer/keresztkötő (dextrán/bórsav) arányú gélek alkalmazásával vizsgáltam. A magas monomer/keresztkötő típusú gélben kevesebb szabad láncközötti dextrán-borát adduktra lehet számítani, mint az alacsony monomer/keresztkötő tartalmú gélben, azaz több dextrán-borát-glikán komplexképződésre.

A 10%D/4%B tartalmú gélben a monomer/keresztelő arány 2,5 volt, a 2%D/2%B gélben esetében pedig egységnyi. Ezért szignifikánsan magasabb a 2%D/2%B gélben az 1:1 arányú dextrán-borát adduktok képződése (6. ábra), míg a 10%D/4%B gélben a láncközötti (1:2) kötések száma nagyobb. Következésképpen a 2% D/2%B összetételű gél több nyitott kötőhellyel rendelkezett, amivel komplexálni tudott a glikozilált nehézlánc szénhidrát-részeivel, ami nagyobb mértékű retardációt eredményezett. A bevezetett elméleti levezetés, szerint a legjobb elválasztás akkor érhető el, amikor a szabad glikozilált nehézlánc mozgékonyasága sokkal nagyobb volt, mint a komplexálté ($\mu_{HC}^f \gg \mu_{HC}^c$), mivel ez utóbbi esetben a kötött fehérje gyakorlatilag nem mozdult el. Fontos megjegyezni, hogy az omalizumab szénhidrátlánc változatos, reprezentatív a legtöbb glikánrész tekintetében, amelyet más glikoproteinek is hordozhatnak. A monomer (dextrán) koncentrációjának növelésével a legtöbb készítményben nőttek a látszólagos szelektivitási értékek az omalizumab könnyű lánc és a nem glikozilált nehézlánc között (30. ábra A panel), ami a nagyobb keresztelésnek (1:2 dextrán/borát komplexképződés) és a gél egyidejűleg növekvő molekulaszűrő hatásának köszönhető. Helyi szelektivitási maximum volt figyelhető meg az alacsonyabb térhálósítót tartalmazó, 2,0 és 2,7%-os bórsav tartalmú, 7,5%-os dextrán monomerrel rendelkező formuláknál, azaz ez a megközelítés könnyen alkalmazható a gél összetételének optimalizálására. A bórsav koncentrációjának növelése adott monomer koncentráció mellett viszont alacsonyabb α értékeket eredményezett, valószínűleg a növekvő számú 1:1 dextrán/borát komplexképződés okozta taszító hatás és az ezzel párhuzamosan csökkenő molekulaszűrő hatás következtében, amelyet a pórusméret növekedése okoz.

Ezzel ellentétes hatás figyelhető meg a 30. ábra B paneljén, amely a mAb nem glikozilált nehézlánc és glikozilált nehézlánc közötti szelektivitás-változásokat mutatja. Ennél a csúcspárnál a legmagasabb α értéket a 2%D/2%B tartalmú gélnél számoltam, amely esetben a legalacsonyabb a koncentrációja mindkét összetevőnek. A monomer vagy a térhálósító koncentrációjának növelése egyaránt a szelektivitás csökkenését eredményezte. feltételezhetően, a monomer koncentrációjának növekedésével egyre több bórsav vesz részt az 1:2 típusú komplexképződésben, azaz csökken a glikozilált nehézlánc szénhidrát-részeivel komplexet képezni képes 1:1-es rendelkezésre álló adduktok száma. A bórsav növekvő mennyisége a háttéreltrolitban ezzel szemben növelte a borát-glikoprotein addukt képződést,

következésképpen csökkentette az 1:1 dextransz/borát helyekkel való komplexképződési lehetőséget. Ezenkívül a negatív töltésű borát-glikán adduktok taszították a negatív töltésű dextransz/borát adduktokat. A 24. egyenletet figyelembe véve az α_{MW} -nek nagyobb szerepe volt az LC és az ngHC elválasztásánál kapott látszólagos α értékben, míg az α_C az ngHC és a HC fragmentumok közötti szelektivitásban érvényesült.

6.5 Elektromigrációs diszperzió (EMD)

Munkám során vizsgáltam a fehérjék elektromigrációs diszperzióját boráttal térhálósított dextransz gélben. A bórsav koncentrációjának növekedésével a 2%D koncentrációjú gélekben megnövekedett frontképződést figyeltem meg az omalizumab terápiás mAb nehéz és könnyű lánc esetében. Magas dextransz koncentráció (10%D) esetében viszont csökkent a tailinget tapasztaltam a HC esetében, de az LC esetében viszont növekedett a fronting mértéke. A glicerinnel hozzáadása a háttérektrólit oldathoz savas pH eltolódást okozott (37. egyenlet), ami befolyásolta az elektroosmotikus áramlást, így a tetrahidroxiborát alapú ko-ionos vegyületek mobilitását. Az elektroosmotikus áramlás (EOF) befolyásolta a mintakomponensek – omalizumab LC és HC – effektív elektroforetikus mobilitásait, illetve az elektrokinetikus injektálással bevitt minta mennyiségét. Semleges pH-n a bórsav gyenge disszociációja mellett a gél-puffer rendszer poliol-tetraaborát komplexek képződése a glicerinnel és a dextransz alacsonyabb és az utóbbi esetben még nulla effektív mobilitást is eredményezett bizonyos ko-ionokra. Mindezek láthatóan az elektromigrációs diszperzió kialakulásának valamint mértékének kulcsfontosságú tényezői. Ennek következtében feltételezem, hogy a monoklonális antitest könnyű és nehézlánc fragmentumainak csúcsaszimmetria értékei az SDS-CGE során az emelt borát koncentráció mellett az alábbi változások eredményének kombinációja: 1) az ionerősség és a pH értéke által befolyásolt elektroosmotikus áramlás, 2) a pH függő disszociáció, 3) a különböző mértékben képződő borát-glicerinnel és –dextransz adduktok csökkentik és/vagy megállítják az elektroforetikus migrációt és 4) a térhálósódás mértékétől függő pórusméret (molekulaszűrő képesség).

A csúcsok alakjának javítása és ezen keresztül a felbontóképesség növelése érdekében a kapilláris gélelektroforézis során az elektromigrációs diszperziót csökkenteni kell. Ez

elérhető a megfelelő puffer-ko-ion komponens típusának és koncentrációjának megválasztásával, úgyhogy az illeszkedjen a vizsgált mintamolekulák mobilitásához. A háromszög típusú torzulások elkerülése érdekében figyelembe kell venni, hogy a boráttal térhálósított dextrans gél használó SDS-CGE rendszerekben a bórsavnak kettős szerepe van: co-ion és részt vesz a molekulaszűrő térháló kialakításában is. A bórsav koncentrációjának illesztése nélkülözhetetlen a csúcsalak torzulások elkerülése érdekében. Az SDS-CGE során az LC csúcs esetében, figyelembe véve a detektálhatóságot (azaz csúcsmagasságot) a legjobb csúcsalakot ($A_{10\%} = 1$) a 10%D/2%B gél eredményezte. A nagyobb molekulatömegű HC esetében a 10%D/4%B koncentráció bizonyult a legeredményesebbnek.

Kijelenthető, hogy az LC és HC fragmensek borát koncentrációtól függő aszimmetria értékei feltárták a ko-ion koncentráció-gradiens által közvetített tranziens mobilitás illeszkedésének lehetőségét SDS-CGE-ben. Ezért az ez irányú optimalizáció támogatja a különböző méretű mintakomponensek és a ko-ionos BGE típusok mobilitása közötti elfogadható harmonizációt, új perspektívát kínálva több elválasztandó molekula csúcsszimmetriájának javítására egy futtatáson belül. Sőt, megfigyeltem, hogy a változó borát koncentráció a molekulaszűrő mátrix térhálósodási szintjének változását is eredményezi, így lehetőséget nyújthat további kísérletek végrehajtásával a régóta keresett kapilláris gradiens gélelektroforézis megvalósításához.

7. Összefoglalás

PhD munkám során SDS-fehérje komplexek elektromigrációját vizsgáltam boráttal térhálósított dextrán gélekben. Redukált és intakt terápiás fehérjék elektroforetikus migrációját vizsgáltam különböző mérési paraméterekkel, illetve összetételű elválasztó pufferben kapilláris elektroforézis készülékkel, UV detektálást alkalmazva.

Első lépésben meghatároztam az alkalmazható alsó és felső bórsav és dextrán peremkoncentrációkat, figyelembe véve a gél egyszerű cseréjét a kapillárisban, a viszkozitást, illetve a vezetőképességet. Ezt követően meghatároztam a gélek viszkozitását, az elválasztás áramerősségét és a kialakuló elektroosmotikus áramlást, amelyek megszabják az elválasztási profilt, ennek kapcsán nélkülözhetetlenek az SDS-fehérje komplexek migrációs viselkedésének megértéséhez a dextrán-bórsav keresztkötött gélben.

Az elválasztás hatékonyságának növelésében korábbi tanulmányok szerint fontos szerepet játszik a megfelelő hőmérséklet megválasztása is. Ennek tükrében Arrhenius diagramok segítségével vizsgáltam a fehérjék elválasztásának hőmérséklet függését illetve, az elválasztás aktiválási energia (E_a) igényét. A gélek, illetve mérési paraméterek tesztelése különböző terápiás antitestek - monoklonális antitest, bispecifius mAB, nanobodyk – elválasztásával és karakterizálásával valósult meg. A kapott eredmények alátámasztják a sikeres módszerfejlesztést, optimalizálást.

A gél alapvető szűrőképességének vizsgálatához 2,0, 5,0, 7,5 és 10,0% 2 millió molekulatömegű dextrán (D) monomert és 2,0, 2,7, 3,3 és 4,0% borát (B) térhálósító ágenst tartalmazó kémiai géleket készítettem melyekkel egy 20-225 kDa tartományt felölelő fehérje létra komponenseit valamint egy terápiás monoklonális antitest alegységeit és intakt formáját, illetve egy fúziós fehérjét választottam el kapilláris elektroforézissel.

A migrációs tulajdonságok további tanulmányozásához a Ferguson módszert alkalmaztam, mely segíthet a megfelelő összetételű gél kiválasztani egy adott fehérjekeverék esetében. A kapott elektroferogramokat úgy értékeltem ki, hogy részletes információt nyerjek az elválasztások teljesítményét illetően, mint például elméleti tányérszám, felbontás és

szelektivitási tényező meghatározása. A 3D Ferguson ábrázolás bevezetésével egyszerűen értékelni lehet az elválasztott fehérjemolekula migrációs tulajdonságait különböző monomer és térhálósító koncentráció mellett, így a megfelelő összetételt kiválasztani adott fehérjekeverék esetében. Kísérleteim során vizsgáltam, hogy a bórsav és dextrán aránya hogyan hat az elválasztás szelektivitására. Kidolgoztam egy retenciós modellt a glikozilált és nem glikozilált nehézláncok közötti szelektivitás jobb megértése érdekében, figyelembe véve a dextrán-borát adduktok kölcsönhatását a fehérjén lévő komplex cukrokkal. A dextrán-borát-glikoprotein komplexképződés alacsonyabb monomer/térhálósító koncentráció mellett fokozta a felbontást az antitest glikozilált és nem glikozilált nehézlánc között. Az eredmények ismeretében, olyan összetételű géleket lehet fejleszteni, amelyek a nagymértékben glikozilált új modalitású terápiás fehérjék elválasztástechnikai kihívásában is segíthetnek.

A csökkenő felbontás és csúcs kapacitás egyre nagyobb problémákat okoz az új típusú terápiás fehérjék elektroforetikus elválasztásánál, amihez az elektromigrációs diszperzió révén kialakuló csökkenő csúcsalak (tailing és fronting hatás) is hozzájárul. Az elektromigrációs diszperzió vizsgálatára irányuló kísérleteim alátámasztották, hogy a csúcsok alakjának javítása érdekében a kapilláris gélelektroforézis során az elektromigrációs diszperziót csökkenteni kell. Ez elérhető a megfelelő puffer-ko-ion komponens típusának és koncentrációjának megválasztásával úgy, hogy az illeszkedjen a vizsgált mintamolekulák mobilitásához. A háromszög típusú torzulások elkerülése érdekében figyelembe kell venni, hogy a boráttal térhálósított dextrán gélt használó SDS-CGE rendszerekben a bórsavnak kettős szerepe van: SDS-fehérje komplexel azonos töltésű ion és részt vesz a molekulaszűrő térháló kialakításában is.

Summary

In my PhD work I investigated the electromigration properties of SDS-protein complexes in borate cross-linked dextran gels. I analyzed the electrophoretic migration of reduced and intact therapeutic proteins with different separation parameters and gel and buffer composition using capillary electrophoresis with UV detection.

In the first step, I determined the applicable lower and upper boric acid and dextran boundary concentrations, taking into account the ease of gel exchange in the capillary, the viscosity, and the conductivity. Subsequently, I determined the viscosity of the gels, the separation current and the resulting electroosmotic flow, which all influence the separation profile, essential in this context for understanding the migration behavior of SDS-protein complexes in dextran-borate crosslinked gels. Previous studies have also shown that the choice of the appropriate temperature plays an important role in enhancing the resolution of the separation. In view of this, Arrhenius plots were used to investigate the temperature dependence of protein separation and the activation energy (E_a) requirement for the separation. The gels and the measurement parameters were tested by separating and characterizing different therapeutic proteins - monoclonal antibody, bispecific mAB and nanobodies. The results obtained supported the successful method development and separation optimization. To investigate the basic screening ability of the borate crosslinked dextran gels, 2.0, 5.0, 7.5 and 10.0% 2 million molecular weight dextran (D) monomer and 2.0, 2.7, 3.3 and 4.0% borate (B) cross-linking agent were prepared to separate the protein ladder units in the range 20-225 kDa and the subunits and intact forms of a therapeutic monoclonal antibody and a fusion protein chains by SDS-CGE.

To further study the migration properties, I used the Ferguson method, which can help to select the appropriate gel composition for a given protein mixture. The obtained electrophorograms were evaluated to attain detailed information on the performance of the separations, such as theoretical plate number, resolution and selectivity factor determination. By introducing the 3D Ferguson plot concept, it was easy to evaluate the migration properties of the separated protein molecules at different monomer and cross-linker concentrations, so that the appropriate composition can be selected for a given protein mixture. In my

experiments, I investigated how the boric acid to dextran ratio affects the selectivity of the separation. I have developed a retention model to better understand the selectivity between glycosylated and non-glycosylated heavy chains, taking into account the interaction of dextran-borate adducts with the complex sugars on the protein. Dextran-borate-glycoprotein complexation at lower monomer/crosslinker concentrations enhanced the resolution between the glycosylated and non-glycosylated heavy chains of the antibody. In light of these results, SDS gel formulations can be developed that may also help to address the challenge of separating highly glycosylated new modality therapeutic proteins.

Decreasing resolution and peak capacity are becoming increasingly problematic for the separation of new types of therapeutic proteins possibly due to the reduced peak shape symmetry (tailing and fronting effect). My results by investigating the electromigration dispersion have confirmed the need to reduce this effect during capillary gel electrophoresis to improve peak shape. This can be achieved by choosing the right type and concentration of buffer co-ion component to match the mobility of the sample molecules under investigation. In order to avoid triangular distortions, it should be considered that in SDS-CGE systems using borate-cross-linked dextran gels, the boric acid has a dual role: it is a co-ion with the same charge as the SDS-protein complex and also participates in the formation of the molecular sieve as a crosslinker.

8. Irodalomjegyzék

8.1 A dolgozat megírásához felhasznált irodalomjegyzék

- [1] Ogston, A. G. The spaces in a uniform random suspension of fibres. *Transactions of the Faraday Society* **1958**, 54 (0), 1754-1757.
- [2] Lumpkin, O. J.; Déjardin, P.; Zimm, B. H. Theory of gel electrophoresis of DNA. *Biopolymers* **1985**, 24 (8), 1573-1593.
- [3] Hjertén, S.; Pan, H. Purification and characterization of two forms of a low-affinity Ca²⁺-ATPase from erythrocyte membranes. *Biochimica et biophysica acta* **1983**, 728 (2), 281-288.
- [4] Heiger, D. N. *High Performance Capillary Electrophoresis*; Hewlett-Packard GmbH, 1992.
- [5] Khaledi, M. G. *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*; John Wiley & Sons, Inc., 1998.
- [6] Offord, R. E. Electrophoretic Mobilities of Peptides on Paper and their Use in the Determination of Amide Groups. *Nature* **1966**, 211 (5049), 591-593.
- [7] Guttman, A. *Capillary Electrophoresis Using Replaceable Polymers*. USA 1995.
- [8] Sanger-van de Griend, C. E. CE-SDS method development, validation, and best practice-An overview. *Electrophoresis* **2019**, 40 (18-19), 2361-2374.
- [9] Pezron, E.; Ricard, A.; Leibler, L. Rheology of galactomannan-borax gels. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **1990**, 28 (13), 2445-2461.
- [10] He, L.; Niemeyer, B. A Novel Correlation for Protein Diffusion Coefficients Based on Molecular Weight and Radius of Gyration. *Biotechnology Progress* **2003**, 19 (2), 544-548.
- [11] Shirahama, K.; Tsujii, K.; Takagi, T. Free-boundary electrophoresis of sodium dodecyl sulfate-protein polypeptide complexes with special reference to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of biochemistry* **1974**, 75 (2), 309-319.
- [12] Eyring, H.; Polanyi, M. *Zeitschrift für Physikalische Chemie, Abteilung A* **1931**, 12, 279-311.
- [13] Arrhenius, S. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift für Physikalische Chemie Abteilung B* **1889**, 4, 226-248.
- [14] Barron, A. E.; Blanch, H. W.; Soane, D. S. A transient entanglement coupling mechanism for DNA separation by capillary electrophoresis in ultradilute polymer solutions. *Electrophoresis* **1994**, 15 (1), 597-615.
- [15] Shintani, H. *Handbook of Capillary Electrophoresis Applications*; Springer Science & Business Media, 2012.
- [16] Giddings, J. C. Generation of Variance, "Theoretical Plates," Resolution, and Peak Capacity in Electrophoresis and Sedimentation. *Separation Science* **1969**, 4 (3), 181-189.
- [17] Berruex, L. G.; Freitag, R. Separation and Purification of Biochemicals. In *Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)*, Meyers, R. A. Ed.; Academic Press, 2003; pp 651-673.
- [18] Bekri, S.; Leclercq, L.; Cottet, H. Influence of the ionic strength of acidic background electrolytes on the separation of proteins by capillary electrophoresis. *Journal of chromatography. A* **2016**, 1432, 145-151.

- [19] Erny, G. L.; Bergström, E. T.; Goodall, D. M. Electromigration dispersion in capillary zone electrophoresis. Experimental validation of use of the Haarhoff-Van der Linde function. *Journal of chromatography. A* **2002**, 959 (1-2), 229-239.
- [20] Sustacek, V.; Foret, F.; Bocek, P. Selection of the background electrolyte composition with respect to electromigration dispersion and detection of weakly absorbing substances in capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography* **1991**, 545, 239-248.
- [21] Dvořák, M.; Dubský, P.; Dohunová, M.; Gaš, B. The dynamics of band (peak) shape development in capillary zone electrophoresis in light of the linear theory of electromigration. *Electrophoresis* **2019**, 40 (5), 668-682.
- [22] Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, T. P. E. M. Concentration distributions in free zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1979**, 169, 1-10.
- [23] Rawjee, Y. Y.; Williams, R. L.; Vigh, G. Efficiency Optimization in Capillary Electrophoretic Chiral Separations Using Dynamic Mobility Matching. *Analytical Chemistry* **1994**, 66 (21), 3777-3781.
- [24] Khodabandehloo, A.; Chen, D. D. Y. Electroosmotic Flow Dispersion of Large Molecules in Electrokinetic Migration. *Analytical Chemistry* **2017**, 89 (15), 7823-7827.
- [25] Beckman, J.; Song, Y.; Gu, Y.; Voronov, S.; Chennamsetty, N.; Krystek, S.; Mussa, N.; Li, Z. J. Purity Determination by Capillary Electrophoresis Sodium Hexadecyl Sulfate (CE-SHS): A Novel Application For Therapeutic Protein Characterization. *Analytical Chemistry* **2018**, 90 (4), 2542-2547.
- [26] Chen, Z.; Ghosal, S. Electromigration dispersion in a capillary in the presence of electroosmotic flow. *Journal of Fluid Mechanics* **2012**, 697, 436-454.
- [27] Gebauer, P.; Bocek, P. Predicting Peak Symmetry in Capillary Zone Electrophoresis: The Concept of the Peak Shape Diagram. *Analytical Chemistry* **1997**, 69, 1557-1563.
- [28] Kremmer, T. T., K. *Elvázástéchnikai módszerek elmélete és gyakorlata*; Akadémiai Kiadó, 2019.
- [29] László, H. *Bevezetés a polimerfizikába*; Műszaki KvK., 1989.
- [30] Horkay, F.; Douglas, J. F. Polymer Gels: Basics, Challenges, and Perspectives. In *Gels and Other Soft Amorphous Solids*, ACS Symposium Series, Vol. 1296; American Chemical Society, 2018; pp 1-13.
- [31] Guttman, A. Gel and Polymer-Solution Mediated Separation of Biopolymers by Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatographic Science* **2003**, 41 (9), 449-459.
- [32] Camilleri, P. *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*; CRC Press, 1997.
- [33] Redaelli, F.; Sorbona, M.; Rossi, F. 10 - Synthesis and processing of hydrogels for medical applications. In *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications*, Perale, G., Hilborn, J. Eds.; Woodhead Publishing, 2017; pp 205-228.
- [34] Şucu, T.; Shaver, M. P. Inherently degradable cross-linked polyesters and polycarbonates: resins to be cheerful. *Polymer Chemistry* **2020**, 11 (40), 6397-6412.
- [35] Hjerten, S. "Molecular sieve" chromatography on polyacrylamide gels, prepared according to a simplified method. *Archives of biochemistry and biophysics* **1962**, Suppl 1, 147-151.
- [36] Boros, I.; Kiss, A.; Venetianer, P. Physical map of the seven ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* **1979**, 6 (5), 1817-1830.
- [37] Yin, H.-F.; Lux, J. A.; Schomburg, G. Production of polyacrylamide gel filled capillaries for capillary gel electrophoresis (CGE): Influence of capillary surface pretreatment on performance and stability. *Journal of High Resolution Chromatography* **1990**, 13 (9), 624-627.

- [38] Szoke, M.; Sasvari-Szekely, M.; Guttman, A. Ultra-thin-layer agarose gel electrophoresis: I. Effect of the gel concentration and temperature on the separation of DNA fragments. *Journal of Chromatography A* **1999**, *830* (2), 465-471.
- [39] Harris, P. C. Chemistry and Rheology of Borate-Crosslinked Fluids at Temperatures to 300F. *Journal of Petroleum Technology* **1993**, *45* (03), 264-269.
- [40] Bean, S. R.; Lookhart, G. L. Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Electrophoresis of Wheat Proteins. 1. Uncoated Capillaries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47* (10), 4246-4255.
- [41] Jolly, W. L. *Modern inorganic chemistry*; McGraw-Hill, 1984.
- [42] Wanner, K. L. Equilibrium Constants of Various Polyol-borate Systems. Ursinus College, 1967.
- [43] Frankel, M. Stereochemistry of Carbon Compounds, by Ernest L. Eliel, McGraw-Hill Series in Advanced Chemistry, McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, 1962. pp. 468. Price \$15.00. *Israel Journal of Chemistry* **1963**, *1* (1), 44-44.
- [44] Makkee, M.; Kieboom, A. P. G.; van Bekkum, H. Studies on borate esters III. Borate esters of D-mannitol, D-glucitol, D-fructose and D-glucose in water. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1985**, *104* (9), 230-235.
- [45] Van Duin, M.; Peters, J. A.; Kieboom, A. P. G.; Van Bekkum, H. Studies on borate esters 1: The pH dependence of the stability of esters of boric acid and borate in aqueous medium as studied by ¹¹B NMR. *Tetrahedron* **1984**, *40* (15), 2901-2911.
- [46] Kemp, P. H. *The Chemistry of Borates: Part 1*; Borax Consolidated Limited, 1956.
- [47] Díaz-Montes, E. Dextran: Sources, Structures, and Properties. In *Polysaccharides*, 2021; Vol. 2, pp 554-565.
- [48] Sarwat, F.; Ul Qader, S. A.; Aman, A.; Ahmed, N. Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *International journal of biological sciences* **2008**, *4* (6), 379-386.
- [49] Aldrich, S. *Dextran specific rotation*. <https://www.sigmaaldrich.com/HU/en/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-pulldown/dextran> (accessed 2022.10.13).
- [50] Deuel, v. H.; Neukom, H. Über die reaktion von borsäure und borax mit polysacchariden und anderen hochmolekularen polyoxy-verbindungen. *Die Makromolekulare Chemie* **1949**, *3* (1), 13-30.
- [51] Miyazaki, Y.; Yoshimura, K.; Miura, Y.; Sakashita, H.; Ishimaru, K. ¹¹B NMR investigation of the complexation behavior of borate with polysaccharides in aqueous solution. *Polyhedron* **2003**, *22* (6), 909-916.
- [52] Hoffstetter-Kuhn, S.; Paulus, A.; Gassmann, E.; Widmer, H. M. Influence of Borate Complexation on the Electrophoretic Behavior of Carbohydrates in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1541-1547.
- [53] Mitchelson, K. R.; Cheng, J. Capillary Electrophoresis with Glycerol as an Additive. *Methods in Molecular Biology* **2001**, *162*, 259-277.
- [54] Sacco, P.; Furlani, F.; Paoletti, S.; Donati, I. pH-Assisted Gelation of Lactose-Modified Chitosan. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (8), 3070-3075.
- [55] Walsh, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology* **2018**, *36*, 1136.
- [56] Strohl, W. R. Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein & cell* **2018**, *9* (1), 86-120.
- [57] Matera, M. G.; Calzetta, L.; Rogliani, P.; Cazzola, M. Monoclonal antibodies for severe asthma: Pharmacokinetic profiles. *Respiratory medicine* **2019**, *153*, 3-13.

- [58] Arnold, J. N.; Wormald, M. R.; Sim, R. B.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A. The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annual Review of Immunology* **2007**, *25* (1), 21-50.
- [59] Pilkington, C.; Rook, G.; Isenberg, D. A. Glycosylation of Immunoglobulins. *Clinical Immunotherapeutics* **1994**, *1* (3), 169-172.
- [60] Zhang, Z.; Shah, B.; Richardson, J. Impact of Fc N-glycan sialylation on IgG structure. *mAbs* **2019**, *11* (8), 1381-1390.
- [61] Barrientos, G.; Habazin, S.; Novokmet, M.; Almousa, Y.; Lauc, G.; Conrad, M. L. Changes in subclass-specific IgG Fc glycosylation associated with the postnatal maturation of the murine immune system. *Scientific reports* **2020**, *10* (1), 15243.
- [62] Wada, R.; Matsui, M.; Kawasaki, N. Influence of N-glycosylation on effector functions and thermal stability of glycoengineered IgG1 monoclonal antibody with homogeneous glycoforms. *mAbs* **2019**, *11* (2), 350-372.
- [63] Filep, C.; Szigeti, M.; Farsang, R.; Habegger, M.; Reusch, D.; Guttman, A. Multilevel capillary gel electrophoresis characterization of new antibody modalities. *Analytica Chimica Acta* **2021**, *1166*, 338492.
- [64] Tsumoto, K.; Isozaki, Y.; Yagami, H.; Tomita, M. Future perspectives of therapeutic monoclonal antibodies. *Immunotherapy* **2019**, *11* (2), 119-127.
- [65] Sedykh, S. E.; Prinz, V. V.; Buneva, V. N.; Nevinsky, G. A. Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug design, development and therapy* **2018**, *12*, 195-208.
- [66] *Better Separation Resolution of New Biopharmaceutical Modalities through Fine Tuning of the Temperature with CE-SDS*. 2021. <https://sciex.com/tech-notes/ce/better-separation-resolution-of-new-biopharmaceutical-modalities> (accessed 02.21.2021).
- [67] Kontermann, R. E. Dual targeting strategies with bispecific antibodies. *mAbs* **2012**, *4* (2), 182-197.
- [68] Brinkmann, U.; Kontermann, R. E. The making of bispecific antibodies. *mAbs* **2017**, *9* (2), 182-212.
- [69] Huang, S.; van Duijnhoven, S. M. J.; Sijts, A. J. A. M.; van Elsas, A. Bispecific antibodies targeting dual tumor-associated antigens in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **2020**, *146*, 3111-3122.
- [70] Labriijn, A. F.; Janmaat, M. L.; Reichert, J. M.; Parren, P. W. H. I. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nature Reviews Drug Discovery* **2019**, *18* (8), 585-608.
- [71] Mastrangeli, R.; Palinsky, W.; Bierau, H. Glycoengineered antibodies: towards the next-generation of immunotherapeutics. *Glycobiology* **2019**, *29* (3), 199-210.
- [72] Kellner, C.; Otte, A.; Cappuzzello, E.; Klausz, K.; Peipp, M. Modulating Cytotoxic Effector Functions by Fc Engineering to Improve Cancer Therapy. *Transfus Med Hemoth* **2017**, *44* (5), 327-336.
- [73] Chung, A. W.; Crispin, M.; Pritchard, L.; Robinson, H.; Gorny, M. K.; Yu, X. J.; Bailey-Kellogg, C.; Ackerman, M. E.; Scanlan, C.; Zolla-Pazner, S.; et al. Identification of antibody glycosylation structures that predict monoclonal antibody Fc-effector function. *Aids* **2014**, *28* (17), 2523-2530.
- [74] Goldenberg, M. M. Etanercept, a novel drug for the treatment of patients with severe, active rheumatoid arthritis. *Clinical Therapeutics* **1999**, *21* (1), 75-87.
- [75] Houel, S.; Hilliard, M.; Yu, Y. Q.; McLoughlin, N.; Martin, S. M.; Rudd, P. M.; Williams, J. P.; Chen, W. N- and O-Glycosylation Analysis of Etanercept Using Liquid Chromatography and Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Equipped with Electron-Transfer Dissociation Functionality. *Analytical Chemistry* **2014**, *86* (1), 576-584.

- [76] Chen, J.; He, Q.-h.; Xu, Y.; Fu, J.-h.; Li, Y.-p.; Tu, Z.; Wang, D.; Shu, M.; Qiu, Y.-l.; Yang, H.-w.; et al. Nanobody medicated immunoassay for ultrasensitive detection of cancer biomarker alpha-fetoprotein. *Talanta* **2016**, *147*, 523-530.
- [77] De Meyer, T.; Muyltermans, S.; Depicker, A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends in Biotechnology* **2014**, *32* (5), 263-270.
- [78] Wang, Q.; Chen, Y.; Park, J.; Liu, X.; Hu, Y.; Wang, T.; McFarland, K.; Betenbaugh, M. J. Design and Production of Bispecific Antibodies. *Antibodies* **2019**, *8* (3), 1-16.
- [79] Lechner, A.; Giorgetti, J.; Gahoual, R.; Beck, A.; Leize-Wagner, E.; François, Y.-N. Insights from capillary electrophoresis approaches for characterization of monoclonal antibodies and antibody drug conjugates in the period 2016–2018. *Journal of Chromatography B* **2019**, *1122-1123*, 1-17.
- [80] Borza, B.; Szigeti, M.; Szekrenyes, A.; Hajba, L.; Guttman, A. Glycosimilarity assessment of biotherapeutics 1: Quantitative comparison of the N-glycosylation of the innovator and a biosimilar version of etanercept. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2018**, *153*, 182-185.
- [81] Corporation, E. M. *EMD Millipore Corporation Protein Markers 10-225 kDa*. 2019. http://www.emdmillipore.com/US/en/product/Perfect-Protein-Markers-10-225-kDa,EMD_BIO-69079 (accessed 03.21.2021).
- [82] Poddighe, D.; De Amici, M.; L. Marseglia, G. Spontaneous (Autoimmune) Chronic Urticaria in Children: Current Evidences, Diagnostic Pitfalls and Therapeutic Management. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* **2016**, *10* (1), 34-39.
- [83] Poddighe, D.; Brambilla, I.; Licari, A.; Marseglia, G. L. Omalizumab in the Therapy of Pediatric Asthma. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* **2018**, *12* (2), 103-109.
- [84] Szigeti, M.; Guttman, A. Sample Preparation Scale-Up for Deep N-glycomic Analysis of Human Serum by Capillary Electrophoresis and CE-ESI-MS*. *Molecular & Cellular Proteomics* **2019**, *18* (12), 2524-2531.
- [85] Allmendinger, A.; Dieu, L.-H.; Fischer, S.; Mueller, R.; Mahler, H.-C.; Huwyler, J. High-throughput viscosity measurement using capillary electrophoresis instrumentation and its application to protein formulation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2014**, *99*, 51-58.
- [86] Werner, W. E.; Demorest, D. M.; Stevens, J.; Wiktorowicz, J. E. Size-Dependent Separation of Proteins Denatured in SDS by Capillary Electrophoresis Using a Replaceable Sieving Matrix. *Analytical Biochemistry* **1993**, *212* (1), 253-258.
- [87] Andrews, A. T. *Electrophoresis, Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications*; Claredon Press Oxford, 1986.
- [88] Grossman, P. D.; Colburn, J. C.; Lauer, H. H. A semiempirical model for the electrophoretic mobilities of peptides in free-solution capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **1989**, *179* (1), 28-33.
- [89] Filep, C.; Guttman, A. Effect of the Monomer Cross-Linker Ratio on the Separation Selectivity of Monoclonal Antibody Subunits in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **2021**, *93* (7), 3535-3541.
- [90] Guttman, A.; Paulus, A.; Cohen, A. S.; Grinberg, N.; Karger, B. L. 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*, 41-53.

- [91] Zittle, C. A. Reaction of Borate with Substances of Biological Interest. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology, 1951; pp 493-527.
- [92] Böeseken, J. The use of Boric Acid for the Determination of the Configuration of Carbohydrates. In *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Pigman, W. W., Wolfro, M. L. Eds.; Vol. 4; Academic Press, 1949; pp 189-210.
- [93] Filep, C.; Guttman, A. Electromigration Dispersion in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis of Proteins. *Analytical Chemistry* **2022**, *94* (38), 13092-13099.
- [94] Maitra, J.; Shukla, V. Cross-linking in hydrogels - a review. *American Journal of Polymer Science* **2014**, *4*, 25-31.
- [95] Sacco, P.; Furlani, F.; Cok, M.; Travan, A.; Borgogna, M.; Marsich, E.; Paoletti, S.; Donati, I. Boric Acid Induced Transient Cross-Links in Lactose-Modified Chitosan (Chitlac). *Biomacromolecules* **2017**, *18* (12), 4206-4213.
- [96] Fang, Y.; Zhang, J. Z.; Hou, J. Y.; Lu, H.; Dovichi, N. J. Activation energy of the separation of DNA sequencing fragments in denaturing noncross-linked polyacrylamide by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **1996**, *17* (9), 1436-1442.

8.2 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/97/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Filep Csenge Boróka
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10068626

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Filep, C. B.**, Guttman, A.: Electromigration Dispersion in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis of Proteins.
Anal. Chem. 94 (38), 13092-13099, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02348>
IF: 7.4
2. **Filep, C. B.**, Guttman, A.: Capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis of proteins: introducing the three dimensional Ferguson method.
Anal. Chim. Acta. 1183, 1-9, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2021.338958>
IF: 6.911
3. **Filep, C. B.**, Guttman, A.: Effect of the Monomer Cross-Linker Ratio on the Separation Selectivity of Monoclonal Antibody Subunits in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis.
Anal. Chem. 93 (7), 3535-3541, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04927>
IF: 8.008
4. Guttman, A., **Filep, C. B.**, Karger, B.: Fundamentals of Capillary Electrophoretic Migration and Separation of SDS Proteins in Borate Cross-Linked Dextran Gels.
Anal. Chem. 93 (26), 9267-9276, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01636>
IF: 8.008
5. **Filep, C. B.**, Guttman, A.: The Effect of Temperature in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis of Protein Therapeutics.
Anal. Chem. 92 (5), 4023-4028, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05566>
IF: 6.986





További közlemények

6. 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
7. **Filep, C. B.**, Szigeti, M., Farsang, R., Habberger, M., Reusch, D., Guttman, A.: Multilevel capillary
gel electrophoresis characterization of new antibody modalities.
Anal. Chim. Acta. 1166, 1-9, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2021.338492>
IF: 6.911
8. Csomós, I., Nagy, P., **Filep, C. B.**, Rebenku, I., Nizsalóczki, E., Kovács, T., Vámosi, G., Mátyus,
L., Dóczy-Bodnár, A.: Opposing Effects of Chelidonine on Tyrosine and Serine
Phosphorylation of STAT3 in Human Uveal Melanoma Cells.
Int. J. Mol. Sci. 22 (23), 1-14, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312974>
IF: 6.208
9. **Filep, C. B.**, Borza, B., Járvás, G., Guttman, A.: N-glycosylation analysis of biopharmaceuticals by
multicapillary gel electrophoresis: generation and application of a new glucose unit database.
J. Pharm. Biomed. Anal. 178, 1-5, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112892>
IF: 3.935

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 57,767

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):

37,313

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, 2024.03.18.

9. Tárgyszavak/Keywords

bioterápiás fehérjék, SDS-CGE, bórsav, dextrans, keresztkötés, polimer

biotherapeutic products, SDS-CGE, boric acid, dextran, cross-linking, polymer

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a témavezetőmnek, Prof. Dr. Guttman Andrásnak, a szakmai iránymutatásért, melyek nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani a Horváth Csaba Elválasztástudományi Laboratórium munkatársainak, akik segítettek munkámat.

A kutatást az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 című projekt (doktori képzés támogatása) támogatta, amely az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.