

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Sárközy Dániel

Témavezető: Dr. Guttman András



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2024

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az **elméleti orvostudományok** tudományágban*

Írta: **Sárközy Dániel** okleveles biomérnök

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája program) keretében

Témavezető: Dr. Guttman András

Az értekezés bírálói:

Dr. Ágoston Csaba, PhD
Dr. Kalló Gergő, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, MTA doktora
tagok: Dr. Frey Krisztina, PhD
Dr. Kádas János, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A"
épületének tanterme, 2024. december 13., 13:30.

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

A műszeres analitikai technikák rutinszerű alkalmazása az utóbbi években alapvető jelentőségűvé vált, amit a jelen biotechnológiai, élelmiszeripari és orvosi kutatások számának ugrásszerű növekedése, valamint a piacon megjelenő új gyógyszer hatóanyagokkal, élelmiszer összetevőkkel szemben támasztott szigorú minőségbiztosítási előírások megjelenése indokol, melyek új kihívások elé állították az analitikai és molekuláris biológiai tudományterületek képviselőit. Az újgenerációs biológiai készítményekre (akár nagy molekulájú terápiás antitestekről, akár kisebb molekulaméretű gyógyszerkészítményekről és étrend-kiegészítő komponensekről beszélünk) egy természetes szerkezeti változatosság jellemzi, mely által a termékek bizonyos fokú heterogenitást mutatnak. Ezen változatok karakterizálásának, illetve biztonságos alkalmazhatóságának és hatásosságának elérése érdekében felmerült az igény, hogy a vizsgált analitikai problémák megoldására a már ismert és elfogadott standard megközelítések mellett ortogónálisan alkalmazható módszerek szülessenek, valamint, hogy azok folyamatos fejlesztési és optimalizálási lépésekkel a mindennapi analitikai gyakorlatba beépíthetők legyenek [1, 2].

Az elérhető, analitikai tudományterületen íródott tananyagok és tudományos publikációk alapján ismeretes, hogy létezik egy olyan egyszerű, gyors és nagyfelbontású műszeres technika, mely kis mintaigényével, valamint páratlan hatékonyságával egyre nagyobb jelentőséggel bír az elválasztástechnika területén, megcélózva főként az ipari (pl. gyógyszer tisztaság vizsgálatok) és orvosi diagnosztikai (pl. biomarker azonosítás) feladatok ellátását, továbbá a klasszikus HPLC-alapú módszerek által nem, vagy csak nehezen megoldható analitikai problémák alternatív áthidalását. Ez a technika a kapilláris elektroforézis (CE), aminek előnyös tulajdonságait és biológiai molekulák analízisére történő alkalmazhatóságát számos kérdés övezi [3]. Doktori munkám során ezért kitűzött céлом volt, hogy a ma ismert, legnagyobb jelentőséggel bíró kapilláris gélelektroforetikus (CGE) módszereknek a biomolekulák két nagyobb csoportján (fehérjéken és oligoszacharidokon) történő alkalmazhatóságát bemutassam, valamint, hogy ismertessem azon alapvető módszerfejlesztési kritériumokat, melyek segítségével megválaszolhatók a vizsgált biológiai mintákat és azok CGE analízisét érintő reprodukálhatósággal és hatékonysággal kapcsolatos kérdések. Ezek mellett fontosnak tartom bemutatni azokat az elektroforetikus elválasztó közegeket, melyeket a kutatómunkám során vizsgált mintákra optimalizálva fejlesztettem ki, ugyanis ezek tették lehetővé számomra a különböző mintatípusok szerinti hatékonyabb analízist.

Bizonyos fehérjék és szénhidrátok CGE technika általi vizsgálatához azonban nem csupán a megfelelő elválasztási alapelv és elválasztó közeg megtalálása szükséges, legalább ekkora relevanciával bír egy érzékeny detektálási mód kiválasztása is. A megfelelő detektor optimális esetben jól definiálható képet ad a vizsgálandó analitokról, melynek révén lehetővé teszi azok pontos kvalitatív és/vagy kvantitatív meghatározását. A klasszikus, ultraibolya abszorbancia (UV) alapú detektálási módszerek mellett napjainkban előnyt élveznek az indirekt elven működő (pl. fluoreszcencia alapú) detektálási módszerek, melyek derivatizált minták nagy érzékenységgel észlelését és karakterizálását teszik lehetővé. Dolgozatomban ezért bizonyos jelölési reakción alapuló detektálási lehetőségekre is kitérek, valamint azon kapcsolt technikákat is érintem, melyek direkt módon valósítanak meg ugyancsak nagy érzékenységgel és nagy felbontású strukturális információgyűjtést [4, 5]. Ezek közül az elektropray ionizációs tömegspektrometriát (ESI-MS) ismertetem részletesebben, melyet a mai analitikai gyakorlatban általában a standardként elfogadott kromatográfiás kapcsolhatósága, valamint kis, és nagymolekulák pontos szerkezetazonosítási képességével jellemeznek. Az általam tanulmányozott koncepció ettől eltérően az ESI-MS technika CGE-vel való bonyolult, ám annál nagyobb potenciállal bíró összekapcsolásának lehetősége, melynek alkalmazhatósága elsődlegesen az elválasztó közegek összetevőinek függvényében változik. Ennek tudatában megfogalmazott célként egy a biotechnológiai ipar számára évek óta fennálló analitikai probléma (fehérjék méret szerinti elválasztását követő, "on-line" szerkezetazonosítás) megoldását is kitértem. Az új megközelítés lényege, hogy a klasszikus nátrium dodecilszulfát poliakrilamid lapgélelektroforézis (SDS-PAGE) technika analógjaként alkalmazható, gyorsabb és on-line detektálást lehetővé tevő SDS-kapilláris gélelektroforézist (SDS-CGE) tömegspektrometriás detektálással kapcsolva optimalizáljam, ezzel megalkotva egy olyan analitikai rendszer kombinációt, mellyel a fehérjék méret alapú elválasztását tömegspektrometria általi, egyértelmű strukturális azonosítás követheti.

A fejlesztett elválasztó közegeket, módszereket és detektálási módokat munkám során elsődlegesen újgenerációs, fehérje alapú bioterapeutikumokon, valamint N-kötött és szabad (nem fehérjéhez kötött) oligoszacharidok karakterizálásán keresztül szemléltetem.

2. Az értekezés új tudományos eredményei

2.1. Terápiás antitestek fehérje alegység integritásának és N-glikán profiljának meghatározása

Munkám során két, a közelmúltban megismert terápiás fehérje (omalizumab és bamlanivimab) nátrium-dodecilszulfát kapilláris gél elektroforézis (SDS-CGE) módszer általi tisztaság vizsgálatát mutattam be intakt, valamint redukált állapotban, hogy ellenőrizsem a molekulák tisztaságát és alegységeinek integritását, kiemelten a nehézlánc glikozilált és nem glikozilált formáinak (HC és ngHC) jelenlétére és szintjeire vonatkozóan. Az asztma elleni, omalizumab hatóanyagtartalmú terapeutikum esetében megállapítottam, hogy a gyógyszer kis mértékben sem mutatja a nem glikozilált nehézlánc (ngHC) fragmentum jelenlétét, ily módon a teljes mAb tartalom nehézlánc N-glikozilációs módosulást hordoz. A fehérjék intakt formája mindkét esetben hosszabb migrációs időbeli eltérést mutatott a várt eredményekhez képest, mely a molekulák kiterjedt Y alakja, valamint a dextrans és borát tartalmú elválasztó gélben történő sajátos migrációs tulajdonságaik révén volt magyarázható. A termékek előállításánál keletkezett szabad alegységek jelenlétét, illetve azok összetapadását is megfigyeltem mindkét mintában, mely jelenséget a nem teljesen végbemenő kémiai reakciók következményeként értelmeztem. A Covid-19 ellen fejlesztett, bamlanivimab hatóanyagú fehérje esetén méréseimet töltés variáns analízissel is kiegészítettem kapilláris izoelektromos fókuszálás (cIEF) módszert alkalmazva, továbbá eredményeimet reprodukálhatósági szempontból is részletesebb elemzésnek vettem alá, hogy bebizonyítsam a CGE technika mAb analízis szempontból vizsgált megfelelőségét.

Az omalizumab esetén pusztán az alegység integritás analízisből következtetve, a bamlanivimabnál pedig a töltés variáns analízis eredményeivel kiegészítve azt a következtetést vontam le, hogy érdemes átfogó N-glikozilációs analízist végezni a főbb glikán struktúrák azonosításához, melyek fehérjéhez kapcsolt jelenléte vagy hiánya képes szabályozni bizonyos adaptív immunreakciókat. Az omalizumab N-glikán mérések során azt tapasztaltam, hogy csak az ún. high-mannóz cukor szerkezetek voltak afukoziláltak, ami az antitest-függő sejt-közvetített citotoxicitás (ADCC) funkció nagymértékben történő gátlásának tényét bizonyítja. A galaktózmentes IgG molekula általában hosszabb keringési idővel rendelkezik, ami az Fc γ RI-hez való alacsonyabb kötődési affinitással magyarázható. Megállapítottam továbbá, hogy a monogalaktozilált glikánok mennyisége a mintában hosszabb szérumszűrés időre utal,

valamint, hogy az N-acetil-glükózamin jelenléte gyorsabb kiürüléssel társul, ezáltal az FA2 és FA1 típusú glikánok is kulcsfontosságú szereppel rendelkeznek. Mindemellett, a high-mannóz szerkezetű glikánok jelenléte az irodalmi adatokkal való egyezést bizonyítva feltehetően emeli a gyógyszer molekula clearance rátáját a mannóz receptorokon keresztül [6, 7].

A Covid-19 elleni mAb glikánok core struktúráinak fukozilációs szintjéből arra következtettem, hogy a termékben lévő körülbelül 8,2% afukozilált glikán tartalom valamilyen ADCC funkciót mutat, mely szintén megegyezik a más technikákkal vizsgált és megállapított analitikai és immunológiai következtetéssel. Továbbá, a kapott eredmények és az irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy az IgG molekuláknak kötőhelyet biztosító Fc γ RIIIa fehérje glikozilációja és az IgG Fc régióján lévő core struktúrák fukozilációjának hiánya közötti összefüggés nagyobb mértékű szénhidrát-szénhidrát kölcsönhatást eredményez, mely növeli a kötődés erősségét [8, 9]. Ezenfelül, méréseim alapján a fukozilált biantennáris core szerkezetek jelentős része terminális galaktozilációt is mutatott, ami jellemzően fokozza az említett ADCC effektor funkciót és emellett a molekula szérumban felezési idejét [10, 11]. Végül pedig megállapítható volt, hogy az analízis során detektált nagyon kis mennyiségű (~1,3%) high mannóz szerkezetek jelenléte az irodalmi információk alapján nem járul hozzá számottevően a szérumban felezési idő csökkentéséhez [12]. Összességében tehát a terápiás fehérjékhez köthető CGE glikánanalitikai eredményeim azt mutatják, hogy a vizsgált molekulák ismert inaktiváló, illetve neutralizáló hatása mellett ezen ortogonális technika által megerősíthető a glikozilációhoz köthető ADCC funkció gátlása vagy jelenléte.

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

Agarózos kísérleteim során két alapvető géskomponens, az agaróz és borát koncentráció arányok hatását ismertettem az SDS–fehérje komplexek elektromigrációs tulajdonságaira nézve, ahol a már korábban analízisnek alávetett omalizumab terápiás fehérje könnyű és nehéz lánc alegységeit használtam modellként. A vizsgált fragmentumok migrációs viselkedésének megértése érdekében 15-féle saját készítésű gél formulára viszonyítva hasonlítottam össze a fehérje könnyű láncának (LC), nem glikozilált nehéz láncának (ngHC) és nehéz láncának (HC) viselkedését trisz-acetát-EDTA (TAE) és trisz-borát-EDTA (TBE) alapú pufferrendszerek

alkalmazásával, 0.2-1.0% agaróz tartalom mellett. Az optimalizálási folyamat során ezzel egyidejűleg háromdimenziós Ferguson-diagramokat készítettem a migrációs tulajdonságok könnyebb megértése és analitikai összefüggések (mint az elméleti tényérszám vagy hatékonyság (N), felbontás (Rs) és szelektivitás (α)) változásának feltárása érdekében.

Az SDS-kapilláris gélelektroforézis mérések területén klasszikusnak tekinthető dextrán és borát alapú gélrendszer felbontó képességét alapul véve, az általam kifejlesztett agaróz tartalmú elválasztó közeg alkalmazhatósága a konvencionális gélhez viszonyítva hasonlóknak bizonyult, de teljesítménye és analitikai paraméterei eltértek a monoklonális antitest fragmenseinek elválasztására nézve. Az agaróz-SDS-CGE módszer analitikai jellemzőinek értékelése során megerősítést nyert, hogy a felbontás (Rs) gyakorlatilag a szelektivitás (α) és a hatékonyság (N) közötti összefüggés eredményeként definiálható. Az agaróz alapú szűrőmátrixok esetében a jelentős mértékű, ellenáramú elektroosmotikus áramlás (EOF) főként a bórsav koncentrációtól való függést mutatott, míg a viszkozitás jellemzően az agaróz koncentráció függvényében változott. A számolt paraméterek fényében egy példán keresztül ismertettem, hogy a Ferguson-elv segítségével hogyan lehet egy ismeretlen méretű komponens molekulatömegét megbecsülni, pusztán a kalkulált, gélelektroforetikus futtatásokból kinyert migrációs idő, EOF és hőmérséklet értékek segítségével.

Bemutattam továbbá, hogy a gélrendszer a rövid elválasztási idők biztosítása mellett kevesebb előkészületet igényel a párhuzamos mérések között, ugyanis alkalmazásával elhagyhatóvá válnak a hosszadalmas kapilláris regenerációs mosási lépések, melyeket más, SDS alapú elválasztó mátrixok alkalmazása során minden futtatás között szükséges elvégezni. Ezáltal elmondható, hogy az általam fejlesztett borát stabilizált agarózos rendszer kapilláris oszlopokba való, mosás nélküli sorozatos újratöltése jelentősen lecsökkentheti a már egyébként is rendkívül gyors (akár 10 perces) mérések közötti holtidőt, továbbá, hogy a migrációs idők reprodukálhatóságának tekintetében a kapilláris regeneráló lépések nélkül is 0,75% alatti RSD értékek érhetők el kiváló felbontás mellett.

2.3. MS detektálással kapcsolt CGE módszer fejlesztése peptidek, valamint natív és SDS-fehérjék analízisére

Doktori munkám során a kapilláris gélelektroforézis módszerek és elválasztó közegek fejlesztése mellett azok tömegspektrometriával való együttes alkalmazhatóságát is vizsgáltam,

melynek eredményeként egy egyszerű és széleskörűen alkalmazható koaxiális elven működő interfészt (Coaxial Sheath Flow Reactor Interface, röviden CSFRI) fejlesztettem ki. Ez az interfész CE és CGE-alapú, MS-kapcsolt elválasztástechnikai módszer megvalósítására alkalmas, mely által részletesebb strukturális információ nyerhető az elektroforetikus (akár viszkozusabb szűrőmátrixokban is) elválasztott komponensekről. A módszer ezáltal elsődlegesen fehérjék és peptidek CGE módszerrel történő, nagy felbontású analízisét biztosíthatja, beleértve az SDS-fehérje komplexeket, melyek méret szerinti elválasztása eddig csak UV detektálással együtt volt értelmezhető. Ezen interfész kapcsolat létrehozásakor ismertettem, hogy a minta eljutása az elválasztó kapillárisból az aktuális, gyártó által tervezett ESI ionforráshoz egy újfajta elven alapul. Ugyan az elektromos kapcsolat zárása ebben az esetben is az elválasztó kapilláris kimeneti oldalán történik, az elválasztott mintakomponensek az elválasztó gélből kilépve a köpenyfolyadék által hordozva jutnak el az ionforráshoz egy zárt áramkörű (~200 µm belső átmérőjű) kapillárisban az áramlási reakcióterén (ún. csőreaktoron) keresztül, mely reakcióteret biztosít az esetleges poszt-kapilláris reakcióknak. Az interfész így módon lehetővé teszi, hogy bármilyen gyári MS ionforrást összekapcsoljunk a CE készülékkel, ehhez csupán a köpenyfolyadék és a szárító gáz áramlási sebességét, valamint az utóbbi hőmérsékletét szükséges optimalizálni. Az interfész kialakításából adódóan a nagyobb (akár 75 µL/perc) folyadékáram a nanoliteres áramlást lehetővé tevő (nanospray típusú) összekötő egységekhez képest a CSFRI alkalmazásakor a minta hígulása, és ezáltal kisebb érzékenység mutatkozik, ám egy jóval stabilabb elektropray folyamatot biztosít az elválasztás teljes időtartama alatt (akár 60+ percen át).

2.4. Szabad oligoszacharidok analízise CGE-LIF módszerekkel

Dolgozatom szabad cukrokat érintő vizsgálataiban során egy különösen gyors és hatékony analitikai rendszer bemutatása valósult meg humán tej oligoszacharidok (HMO-k) CGE-LIF analízisére. A HMO cukrok vizsgálata mellett egy átfogó, galaktooligoszacharid (GOS) összetétel analízist is elvégeztem egy újonnan kifejlesztett csecsemő tápszer formulán.

A HMO méréseket egy a szabad oligoszacharidok analízisére korábban még nem alkalmazott, 12 csatornás multikapilláris gélelektroforézis készülék segítségével végeztem két, egymás hatását kiegészítő, kereskedelmi forgalomban kapható géلكompozíciót alkalmazva. Elsőként, egy az iparban szénhidrát elválasztáshoz használt hagyományos gél-mátrix, majd egy

dextránt és borátot tartalmazó gél multikapilláris gélelektroforetikus optimalizálását végeztem el, melyek segítségével a humán tejben leggyakrabban előforduló HMO standardok, valamint egy humán tejminta kiválasztott komponenseinek kvalitatív és kvantitatív meghatározása vált lehetővé.

Eredményeim kimutatták, hogy amennyiben az analizálandó komponensek közt a 2-fukozillaktóz (2'FL), a 3-fukozillaktóz (3FL) valamint a lakto-N-tetraóz (LNT) és a lakto-N-neotetraóz (LNnT) struktúrális izomerpárok együtt voltak jelen a minta keverékben, mindkét optimalizált gélrendszer alkalmazása indokoltá válik az adott izomerek komigrációs jelensége miatt. Az elválasztó mátrixok eltérő tulajdonságaiknak köszönhetően képesek megoldani a komigrációs jelenség problémáját. Megfigyeltem, hogy a hagyományos, szénhidrát elválasztáshoz alkalmazott gélkompozíció esetében a különböző oligoszacharidok a töltésük és hidrodinamikai térfogatuk aránya szerint válnak el a kapilláris zónaelektroforézis mód (CZE) elve alapján, mindezt kevesebb, mint 10 perc alatt. A dextrán és borát tartalmú gél használva azonban eltérő migrációs sorrend született. A nagy mennyiségű borát tartalom révén feltételeztem, hogy a gélrendszer képes komplexet képezni a cukor molekulák vicinális hidroxil csoportjával, ezáltal extra töltést adva az oligoszacharidoknak. Az elválasztás így mindössze 6,5 percet vesz igénybe és kölcsönösen korrigálja a korábban alkalmazott mátrix izomer párok esetén megfigyelhető hiányosságokat, ami azt jelenti, hogy az első esetben komigráló 2'FL és 3FL izomer párt a második kompozíció sikeresen elválasztja, míg az LNT és LNnT esetében fordítva. Figyelembe véve, hogy minden HMO molekula redukáló véggel rendelkezik, megállapítható, hogy a vizsgált cukor szerkezetek kizárólag egyetlen APTS molekulával lépnek jelölési reakcióba, ami ezáltal megkönnyíti azok CGE-LIF technikával történő kvantitatív analízisét. A pLNnH standard segítségével készített kalibrációs görbe ily módon könnyen alkalmazható volt a többi HMO szerkezetre is. A kalibrációs görbe segítségével az összes ismert alacsony koncentrációjú (RFU <0,1) oligoszacharidra, a humán anyatej mintában található öt alacsony előfordulású HMO szerkezet (LNT2, DFL, LNnT, LNT és pLNnH) koncentrációit meghatároztam. A meghatározott értékek az irodalmi adatok, valamint a minta származásának ismeretében megfeleltethetőek a laktáció harmadik hónapjában mérhető koncentrációknak [13].

A szabad oligoszacharidokat tartalmazó komplex csecsemő tápszer formula teljes GOS tartalmának meghatározására irányuló meréseim során egy olyan gyors és ortogonális CE alapú analitikai módszert mutattam be, amely különböző enzimes emésztési lépések által alternatív megoldást kínál a standard, LC-alapú oligoszacharid összetétel meghatározás mellett, és amely

alkalmazható olyan minták esetében is, melyek rendkívül magas laktóz tartalommal rendelkeznek.

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

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

A folyamat során először a maltodextrinet távolítottam el amiloglükozidáz enzimes emésztéssel, majd a GOS tartalom a 3. és 4. lépések analíziseinek különbségként lett meghatározható, magyarul a β -galaktozidázos kezeléssel és anélkül kapott eredményekből. A mérések mellett egy standard laktóz kalibrációs sort is készítettem az azonosított struktúrák mennyiségi meghatározásának céljából.

Az első, teljes oligoszacharid profil meghatározására irányuló mérési eredményeim alapján megállapítható, hogy a kapott referencia elektroferogram azonos számú csúcsot eredményezett, mint a korábban ugyanerre a mintára vonatkozó HPLC analízis [14], azzal a különbséggel, hogy a CGE futtatások ideje két injektálás között háromszor gyorsabbnak bizonyult. Továbbá a módszer alkalmasságát bizonyítja, hogy az átlagos migrációs idők és csúcs alatti területek reprodukálhatósága 2,5 % alatti RSD értékeket mutatott. Az enzimes emésztések során megfigyelhető csúcsetolódások és csúcsarányok változásából egyértelmű következtetést tudtam levonni a GOS struktúrák elektroferogramokon elfoglalt helyzetéről, ami lehetővé tette számomra, hogy kiszámoljam a minta teljes galaktooligoszacharid tartalmát. A kapott 37,23 g/100 g értéket összevetve a hivatalosan elfogadott, HPLC módszerrel meghatározott 37,0 g/100 g értékkel [15] elmondható volt, hogy a bemutatott CGE alapú módszer alkalmas a csecsemő tápszer pontos GOS tartalmának meghatározására. Eredményeim alapján talán nem téves a felvetés, hogy a bemutatott elektroforetikus módszer képes akár helyettesíteni is a hosszabb analízis idővel rendelkező kromatográfias megközelítést, illetve ortogonális módszerként alkalmas lehet a különböző tápszerekben és más laktózt tartalmazó mintákban található prebiotikus GOS tartalom pontos kimutatására, mely érték többek közt a különböző tápszer készítmények minőségének ellenőrzésére alkalmazható.

3. Irodalomjegyzék

1. István, D.B., *Műszeres analitikai technikák a gyógyszerészi és bioanalitikai vizsgálatokban*. 2011, Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Gyógyszerésztudományi Kar Gyógyszerhatástani Tanszék Gyógyszerészi műszeres- és bioanalitikai részleg.
2. Bizottság, E.G.E., *A biológiailag hasonló gyógyszerek helyzete az EU-ban*. 2019.
3. Attila, D.G., *A kapilláris zónaelektroforézis*. 2000, Debreceni Egyetemi Kiadó.
4. Guttman, A., *High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis*. *Nature*, 1996. **380**(6573): p. 461-462.
5. De Hoffmann, E. and V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*. 2007: John Wiley & Sons.
6. Liu, L., *Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins*. *J Pharm Sci*, 2015. **104**(6): p. 1866-1884.
7. Ryman, J.T. and B. Meibohm, *Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies*. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 2017. **6**(9): p. 576-588.
8. Hsieh, Y.T., et al., *Characterization of FcγRIIIA effector cells used in in vitro ADCC bioassay: Comparison of primary NK cells with engineered NK-92 and Jurkat T cells*. *J Immunol Methods*, 2017. **441**: p. 56-66.
9. Wang, X., M. Mathieu, and R.J. Brezski, *IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions*. *Protein Cell*, 2018. **9**(1): p. 63-73.
10. Raju, T.S. and R.E. Jordan, *Galactosylation variations in marketed therapeutic antibodies*. *MAbs*, 2012. **4**(3): p. 385-91.
11. Aoyama, M., et al., *Effects of terminal galactose residues in mannose α 1-6 arm of Fc-glycan on the effector functions of therapeutic monoclonal antibodies*. *MAbs*, 2019. **11**(5): p. 826-836.

12. Filep, C., et al., *Multilevel capillary gel electrophoresis characterization of new antibody modalities*. Anal Chim Acta, 2021. **1166**: p. 338492.
13. Coppa, G.V., et al., *Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation*. Acta Paediatr Suppl, 1999. **88**(430): p. 89-94.
14. Austin, S., et al., *Determination of β -Galactooligosaccharides by Liquid Chromatography*. Int J Anal Chem, 2014. **2014**: p. 768406.
15. *Official Methods of Analysis*. 2019, AOAC International: Rockville, MD. p. Method 2001.02.

4. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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

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

A PhD értekezés alapján szolgáló közlemények

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





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

További közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 36,485

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

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

Debrecen, 2024.01.18.

