



**Pannon Egyetem**  
**Vegyészmérnöki- és Anyagtudományok Doktori Iskola**  
**Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet**  
**Transzlációs Glikomika Kutatócsoport**

**ÚJ ANALITIKAI MEGKÖZELÍTÉSEK TERÁPIÁS  
FEHÉRJÉK ELVÁLASZTÁSÁBAN ÉS  
FLUORESZCENS JELÖLÉSÉBEN NÁTRIUM  
DODECIL SZULFÁT KAPILLÁRIS  
GÉLELEKTROFORÉZIS SORÁN**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Auer Felícia**

DOI:10.18136/PE.2024.899

**Témavezető:**

**Guttman András, DSc, egyetemi tanár**

**Veszprém**

**2024**

**Vegyéssz mérnöki és Anyagtudományok Doktori Iskola**

**2024**

**ÚJ ANALITIKAI MEGKÖZELÍTÉSEK TERÁPIÁS FEHÉRJÉK  
ELVÁLASZTÁSÁBAN ÉS FLUORESZCENS JELÖLÉSÉBEN NÁTRIUM DODECIL  
SZULFÁT KAPILLÁRIS GÉLELEKTROFORÉZIS SORÁN**

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem  
Vegyéssz mérnöki és Anyagtudományok Doktori Iskolája keretében  
Anyagtudományok és technológiák tudományágban

Írta: Auer Felícia

Témavezető: Dr. Guttman András

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....

Dr. Guttman András

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: ..... igen/nem

.....

Bíráló aláírása

Bíráló neve: ..... igen/nem

.....

Bíráló aláírása

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján ..... %-ot ért el.

Veszprém,

.....

a Bíráló bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése: .....

Veszprém,

.....

az EDHT elnöke

## Kivonat

### **Új analitikai megközelítések terápiás fehérjék elválasztásában és fluoreszcens jelölésében nátrium dodecil szulfát kapilláris gélelektroforézis során**

Napjainkban a bioterápiás fehérjék gyártása egyre nagyobb teret hódít, mellyel párhuzamosan a hagyományos kismolekulás gyógyszerek kezdenek háttérbe szorulni. A nátrium dodecil szulfát kapilláris gélelektroforézis (SDS-CGE) a gyógyszeriparban is gyakran használt, nagyhatékonyságú analitikai módszer, ami kiválóan alkalmazható bioterápiás fehérjék karakterizálására. A terápiás fehérjék kritikus ellenőrzési pontja a glikoproteinekhez kötött N-glikánok minőségi és mennyiségi jellemzése is, mivel a terápiás fehérjék hatékonyságát jelentősen befolyásolják ezek a szénhidrát struktúrák. Munkám során a Pannon Egyetemen gyártott 6His-PNGaseF endoglikozidáz enzimmel végzett N-glikán felszabadítási kinetikát vizsgáltam, és meghatároztam az optimális emésztési időt. Megállapítottam, hogy 1 mg/mL glükóz a mintában aktiválta a 6His-PNGaseF enzimet, míg egy kereskedelmi termékre nem volt hatással. A kutatómunka célja továbbiakban az SDS-CGE módszer tovább fejlesztése, elsősorban a gélek optimalizálására és a fehérjék fluoreszcens jelölésére, melyek hozzájárulnak a bioterápiás fehérjék analitikai karakterizálásának hatékonyságához. Az ipari standardként alkalmazott, tetrahydroxiboráttal térhálóított dextransz alapú gélek esetében a szakirodalomban nem készült olyan tanulmány, ami az ultrahíg és nulla dextransz tartalmú gélek alkalmazását vizsgálta volna fehérjék méret szerinti elválasztására. A disszertációban bemutatásra kerül az ultrahíg és nulla dextransz tartalmú gélek alkalmazhatósága és az ebben történő elválasztási mechanizmus egy fehérje standard keverék és egy terápiás monoklonális antitest (mAb) elválasztása esetén. A fehérje standard és a mAb intakt és alegység formáinak felbontása közötti különbségek az alakselektivitás fontosságára utaltak az ultrahíg dextransz tartalmú elválasztó közegekben. A kutatómunka további részében egy új in-migrációs fluoreszcens jelölési eljárás került kidolgozásra propidium-jodiddal (PI), beleértve a PI elektroosmotikus áramlásra (EOF) gyakorolt hatását. A fluoreszcens jelölőként alkalmazott pozitív töltésű és emiatt az elektroforézis során ellentétesen vándorló PI ligandum komplexet képez az SDS-fehérjékkel az elválasztás során, így lehetővé teszi az in situ jelölést, jelentősen felgyorsítva és leegyszerűsítve a fluoreszcens jelölés folyamatát. Az in-migrációs fluoreszcens jelölési módszer egyszerűen alkalmazható a többcsatornás kapilláris elektroforézis (CE) berendezéseknél, amik gyakran csak fluoreszcens detektorral vannak felszerelve.

## Abstract

### **New analytical strategies for separation and fluorescent labelling of therapeutic proteins in sodium dodecyl sulfate capillary gel electrophoresis**

Currently, the production of biotherapeutic proteins is gaining more and more importance, while traditional small molecule drugs are becoming less of a priority. Sodium dodecyl sulfate capillary gel electrophoresis (SDS-CGE) is a high throughput analytical method commonly used in the pharmaceutical industry and an excellent technique for the characterization of biotherapeutic proteins. The qualitative and quantitative characterization of glycoprotein conjugated N-glycans is also a crucial benchmark for therapeutic proteins, as the efficacy of therapeutic proteins is significantly influenced by these carbohydrate structures. In my research work, the N-glycan release kinetics was investigated with 6His-PNGaseF endoglycosidase enzyme produced by University of Pannonia [1] and the optimal digestion time was determined. I found that 1 mg/mL of glucose in the sample activated the 6His-PNGaseF enzyme, while had no effect on the commercial product. The aim of this research was to further develop the SDS-CGE method, focusing on the optimization of gels and fluorescent labelling of proteins, which will improve the analytical characterization of biotherapeutic proteins. In the pharmaceutical industry, tetrahydroxyborate cross-linked dextran-based gels are almost exclusively applied for the separation of therapeutic proteins. However, no studies in the literature have investigated the use of ultra-dilute and zero dextran gels for size based separation of proteins. In my research work I have evaluated the applicability of ultra-dilute and zero dextran concentration gels and the mechanism and effect on the separation for a protein standard mixture and a therapeutic monoclonal antibody (mAb). The saddle differences between the resolution of the protein sizing ladder and the intact/subunit mAb forms in ultra-dilute dextran-borate matrices suggested the importance of shape selectivity, manifested by the adequate separation of the SDS covered intact as well as light and heavy chain subunits of the therapeutic mAb even at zero dextran concentration. Next I studied a new in-migratio based fluorescence labelling method with propidium iodide (PI), including the effect of PI on electroosmotic flow (EOF). The positively charged PI was used as a fluorescent label, migrating in the opposite direction during electrophoresis, forming a ligand complex with SDS proteins during separation, i.e., in situ labeling. The novel in-migratio labeling process significantly shortened and simplified the fluorescent labeling step. The in-migratio fluorescence labeling method can be readily applied to recently introduced multicapillary electrophoresis systems, which are often equipped with only a fluorescence detector, requiring fluorophore labeling of the sample proteins.

## Auszug

### **Neue analytische Konzepte für die Trennung und Fluoreszenzmarkierung von therapeutischen Proteinen in der Natriumdodecylsulfat-Kapillargel-Elektrophorese**

Gegenwärtig gewinnt die Herstellung von biotherapeutischen Proteinen immer mehr an Bedeutung, während herkömmliche niedermolekulare Arzneimittel immer weniger im Vordergrund stehen. Die Natriumdodecylsulfat-Kapillargel-Elektrophorese (SDS-CGE) ist eine in der pharmazeutischen Industrie weit verbreitete analytische Methode mit hohem Durchsatz und eine hervorragende Technik für die Charakterisierung biotherapeutischer Proteine. Die qualitative und quantitative Charakterisierungen von glykoproteinkonjugierten N-Glykanen sind auch für therapeutische Proteine kritische Kontrollpunkte, da die Wirksamkeit therapeutischer Proteine maßgeblich von diesen Kohlenhydratstrukturen beeinflusst wird. In meiner Forschungsarbeit wurde die Kinetik der N-Glykanfreisetzung mit dem von der Universität Pannonia hergestellten Endoglykosidase-Enzym 6His-PNGaseF untersucht und die optimale Verdauungszeit bestimmt. Es wurde festgestellt, daß 1 mg/ml Glukose in der Probe das 6His-PNGaseF-Enzym aktivierte, während es auf das kommerzielle Produkt keine Wirkung hatte. Das Zusatzziel dieser Forschungsarbeit war die Weiterentwicklung der SDS-CGE-Methode, wobei der Schwerpunkt auf der Optimierung der Gele und der Fluoreszenzmarkierung von Proteinen lag, was die analytische Charakterisierung biotherapeutischer Proteine verbessern wird. In der pharmazeutischen Industrie werden für die Trennung von therapeutischen Proteinen fast ausschließlich borsäurevernetzte Gele auf Dextranbasis verwendet. In der Fachliteratur wurden keine Studien gefunden, in denen die Verwendung von ultraverdünnten und dextranfreien Gelen für die größenspezifische Trennung von Proteinen untersucht worden ist. In meiner Forschungsarbeit wurde die Anwendbarkeit von Gelen mit ultraverdünnter und Null-Dextran-Konzentration sowie den Mechanismus und die Auswirkungen auf die Trennung einer Protein-Standardmischung und eines therapeutischen monoklonalen Antikörpers (mAb) untersucht. Die sattelförmigen Unterschiede zwischen der Auflösung der Proteinsortierleiter und den intakten/unterteilten mAb-Formen in ultraverdünnten Dextran-Borat-Matrizen ließen auf die Bedeutung der Formselektivität schließen. Als Nächstes wurde eine neue Fluoreszenzmarkierungsmethode mit Propidiumjodid (PI) auf der Grundlage des Migrationsverhältnisses untersucht, einschließlich der Auswirkungen von PI auf den elektroosmotischen Fluss (EOF). Das positiv geladene PI wurde als fluoreszierende Markierung verwendet, die während der Elektrophorese in die entgegengesetzte Richtung wandert und im Laufe der Trennung einen Ligandenkomplex mit den SDS-Proteinen bildet, der eine in situ-Markierung ermöglicht. Dieses neuartige In-Migratio-Markierungsverfahren verkürzte und vereinfachte den Vorgang der Fluoreszenzmarkierung erheblich. Die In-Migratio-Fluoreszenz-Markierungsmethode kann problemlos bei den kürzlich eingeführten Multikapillar-Elektrophorese-Systeme angewandt werden, die oft nur mit einem Fluoreszenzdetektor ausgestattet sind und eine Fluorophor-Markierung der Probenproteine erfordern.

## Tartalomjegyzék

1	Rövidítések listája .....	1
2	Bevezetés és célkitűzés .....	3
3	Irodalmi áttekintés.....	5
3.1	Bioterápiás fehérjék .....	5
3.1.1	Monoklonális ellenanyagok .....	5
3.1.2	A monoklonális ellenanyagok előállítása.....	7
3.1.3	A mintaként alkalmazott terápiai antitest, a daratumumab jellemzése.....	7
3.1.4	Új típusú bioterápiás fehérjék .....	7
3.1.5	A terápiai fehérjék N-glikozilációjának szerepe.....	8
3.2	Kapillaris elektroforézis .....	10
3.2.1	Elektroozmotikus áramlás .....	11
3.2.2	Kapillaris áramlási profilja.....	12
3.2.3	Analitikai paraméterek: felbontóképesség, elméleti tényezőszám és szelektivitás	12
3.2.4	A feszültség és a hőmérséklet hatása az elválasztásra .....	13
3.3	Kapillaris gélelektroforézis .....	13
3.3.1	Kapillaris gélelektroforézis alapelvei.....	14
3.3.2	Kapillaris gélelektroforézis alkalmazása gyakorlatban.....	17
3.3.3	A kapillaris gélelektroforézis során alkalmazott gélek .....	20
3.4	A fehérjék fluoreszcens jelölése.....	22
4	Anyagok és módszerek .....	24
4.1	Vegyszerek és reagensek.....	24
4.2	Ultrahíg pufferrendszerek elkészítése .....	24
4.3	Propidium-jodid tartalmú gélek elkészítése .....	25
4.4	Mintaelőkészítés.....	25
4.4.1	N-glikán felszabadítás .....	25
4.4.2	Redukált mintaelőkészítés.....	25
4.4.3	Nem redukált mintaelőkészítés .....	26
4.4.4	Minták fluoreszcens jelölése Chromeo P503 festékkel.....	26
4.5	Kapillaris gélelektroforézis .....	26
4.6	cIEF mérések.....	27
4.6.1	pI értékek meghatározása .....	27
4.7	Michealis-Menten kinetika.....	28
4.8	Fizikai és elektrokinetikai paraméterek meghatározása.....	28
4.8.1	Elektroozmotikus áramlás .....	28
4.8.2	Viszkozitás .....	28
4.8.3	Áramerősség.....	29

4.9	Az adatok kiértékelése.....	29
4.9.1	Elektroforetikus mobilitás értékek meghatározása.....	29
4.9.2	Ferguson módszer.....	29
5	Eredmények és következtetések.....	31
5.1	A 6His-PNGaseF enzim emésztési reakció kinetikája.....	31
5.2	Az SDS-fehérje komplexek méret szerinti elválasztása híg és ultrahíg dextrán tartalmú pufferrendszerekben.....	35
5.2.1	Fizikai paraméterek.....	35
5.2.2	A fehérje standardok méret szerinti elválasztása.....	36
5.2.3	Az intakt monoklonális antitest és alegységeinek méret szerinti elválasztása ....	39
5.2.4	Szelektivitás és felbontóképesség.....	42
5.2.5	Migrációs mechanizmus híg és ultrahíg gélek esetében.....	44
5.3	Propidium-jodid, mint fluoreszcens festék alkalmazása terápiás fehérjék elválasztásakor SDS-CGE esetében.....	46
5.3.1	Az SDS-fehérje komplexek CGE elválasztása propidium-jodid jelenlétében.....	46
5.3.2	Terápiás antitest SDS-CGE elválasztása propidium-jodid jelenlétében.....	47
5.3.3	Az SDS-fehérje komplexek propidium-jodidos in-migráció jelölésének elmélete 49	
5.3.4	A propidium-jodid koncentrációjának hatása az elektroforetikus mobilitásra, a csúcsmagasságra és a felbontóképességre.....	52
6	Összefoglalás.....	61
7	Tézispontok.....	63
8	Theses.....	65
9	Publikációk.....	67
10	Az értekezés tématerületét érintő publikációk.....	69
11	Köszönetnyilvánítás.....	71
12	Hivatkozások.....	72

## 1 Rövidítések listája

$\alpha$	szelektivitás
$\alpha_{\text{alak}}$	alakszelektivitás
$\alpha_{\text{C}}$	komplexbépződési szelektivitás
$\alpha_{\text{MW}}$	molekulatömeg alapú méretszelektivitás
AU	abszorbancia egység
BFS	bare fused silica
CE	kapilláris elektroforézis
CGE	kapilláris gélelektroforézis
$C_{\text{H}}$	nehézlánc konstans régiója
cIEF	kapilláris izoelektromos fókuszálás
$C_{\text{L}}$	könnyűlánc konstans régiója
$E_{\text{n}}$	enzim
E	elektromos térerősség
$E_{\text{a}}$	aktiválási energia
EOF	elektroozmotikus áramlás
ES	köztes termék
f	súrlódási együttható
$F_{\text{e}}$	elektromos erő
$F_{\text{f}}$	súrlódási erő
FQ	3-(2-2-furoil)kinolin-2karboxialdehid
GlcNAc	N-acetil-glükózamin
HC	nehézlánc
HEC	hidroxietil-cellulóz
hIgG1	humán immunoglobulin 1 alosztály
IgG	immunoglobulin
$K_{\text{M}}$	Michaelis-Menten állandó
$K_{\text{R}}$	retardációs együttható
LC	könnyűlánc
$\mu$	elektroforetikus mobilitás
mAb	monoklonális antitest
MS	tömegspektrometria
MW	molekulatömeg

---

$\eta$	viszkozitás
N	elméleti tényérszám
NDA	naftalin-2,3-dikarboxialdehid
ngHC	nem glikozilált nehézlánc
P	az enzim katalizálta reakciótól függő termék
PI	propidium-jodid
Q	nettó töltés
R	egyetemes gázállandó
RFU	relatív fluoreszcens egység
Rs	felbontóképesség
S	szubsztrát
SDS	nátrium dodecil szulfát
SDS-CGE	nátrium dodecil szulfát kapilláris gélelektroforézis
SDS-fehérje-PI	nátrium dodecil szulfát fehérje és propidium-jodid komplexek
T%	gél monomer koncentráció
$t_R$	migrációs idő
$V_H$	nehézlánc variábilis régiója
$V_L$	könnyűlánc variábilis régiója
$V_{max}$	maximális reakciósebesség
w	alapvonali csúc szélesség

## 2 Bevezetés és célkitűzés

Míg egy évtizeddel ezelőtt a legkelendőbb gyógyszerek elsősorban a hagyományos kismolekulás készítmények voltak, az utóbbi néhány évben a biológiai gyógyszerkészítmények (biológikumok, biofarmakonok, bioterápiás készítmények) előtérbe kerültek. Napjainkban a bioterápiás fehérjék gyártása egyre nagyobb teret hódít hisz ezek a terapeutikumok specifikusan, közvetlenül a probléma helyén fejtik ki hatásukat, emiatt sokkal kevesebb mellékhatás társul a kezeléshez. A terápiás fehérjék heterogén és dinamikus biológiai rendszereknek tekinthetők, karakterizálásuk nagyon összetett folyamat, ami megköveteli az analitikai módszerek folyamatos fejlődését. A kapilláris elektroforézis különböző módjait rutinszerűen alkalmazzák a gyógyszeriparban a fehérjék tisztaságának és a különböző szerkezeti eltéréseiknek kimutatására. A növekvő számú bioterápiás fehérje készítmények miatt egyre nagyobb az igény a hatékony elválasztási és jelölési módszerek kidolgozására a fehérjék pontos jellemzéséhez. A kapilláris gélelektroforézis (CGE) a biopolimerek, úgy mint a DNS, RNS és fehérje molekulák elválasztására alkalmas nagyhatékonyságú analitikai módszer, amely lehetővé teszi a makromolekulák hidrodinamikai térfogatuk alapján történő elválasztását és számos előnyt biztosít a hagyományos gélelektroforézissel szemben, beleértve a nagyobb felbontást, a gyorsabb analízisi időt, valamint a kisebb minta- és pufferigényt. Ezért kutatómunkám célja volt olyan módszerek kidolgozása, melyek jelentős mértékben felgyorsítják vagy leegyszerűsítik a terápiás fehérjék elválasztását és fluoreszcens jelölését az iparban, ezáltal lecsökkentik az ezzel járó költségeket. Kutatócsoportunk szoros együttműködésben dolgozik a Pannon Egyetem Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratóriumával, ahol módszert dolgoztak ki egy glikozilált fehérjék analízise során is fontos endoglikozidáz enzim (6His-PNGaseF) nagyhozamú előállítására. Emiatt céljaim között szerepelt ennek az enzimnek a forgalomban is kapható enzimmel történő összehasonlítása, és az optimális emésztési idő meghatározása, valamint a minta glükóztartalmának, mint enzim aktivitást befolyásoló tényező hatásának vizsgálata. Kutatómunkám során tetrahidroxiboráttal térhálósított dextrans tartalmú mátrixokat alkalmaztam elválasztó közegként, és célul tűztem ki, hogy megvizsgáljam az ultrahíg és nulla (1,00%-0,00%) dextrans tartalmú mátrixok esetében az SDS-fehérje komplexek elválasztási mechanizmusát, nagy hangsúlyt fektetve egy terápiás monoklonális antitest (daratumumab) és alegységeinek elválasztására. Meghatároztam a háttérektrolitok szempontjából fontos fizikai és elektrokinetikai paramétereket. További célul tűztem ki

egy új típusú elválasztás közbeni (in-migráció) fluoreszcens jelölési módszer bevezetését propidium-jodid (PI) alkalmazásával SDS-CGE esetében. A dolgozat célja bemutatni az új jelölési módszer alkalmazhatóságát terápiás fehérjék analízisakor és megvizsgálni a propidium ligand hatását az SDS-fehérje komplexek elektromigrációjára, illetve az elválasztás hatékonyságára.

### 3 Irodalmi áttekintés

#### 3.1 Bioterápiás fehérjék

A hagyományos kismolekulás készítményekkel szemben az utóbbi időben a biotechnológiai úton előállítható hatóanyagok (makromolekulák: hormonok, antitestek, fúziós fehérjék) kerültek előtérbe a gyógyászatban [2, 3]. Ezen biológiai makromolekulák bevezetése a klinikumba talán a modern orvostudomány egyik legnagyobb előrelépését jelentette, különösen a rákterápiában és az autoimmun betegségek kezelésében [4]. 1970-ben a humanizált inzulin (humulin), mint az első terápiás fehérje megjelenésével [5], valamint a rekombináns DNS, PCR és egyéb molekuláris biológiai technológiák fejlődésével, a bioterápiás fehérjék piaca rendkívül dinamikusan kezdett bővülni. A biotechnológiai úton előállított fehérjealapú hatóanyagokat többnyire baktériumok vagy emlős sejtvonalak állítják elő, emiatt a gyártásuk nagyobb kihívást jelent. A gyártás során a molekulák nagy variabilitása léphet fel, valamint a makromolekulák szerkezeti komplexitása rendkívül megnehezíti az analitikai karakterizálásukat [6]. További nehézséget jelent, hogy a biológikumok tisztítása és tárolása során megjelenhetnek különböző nem kívánatos bomlástermékek [7].

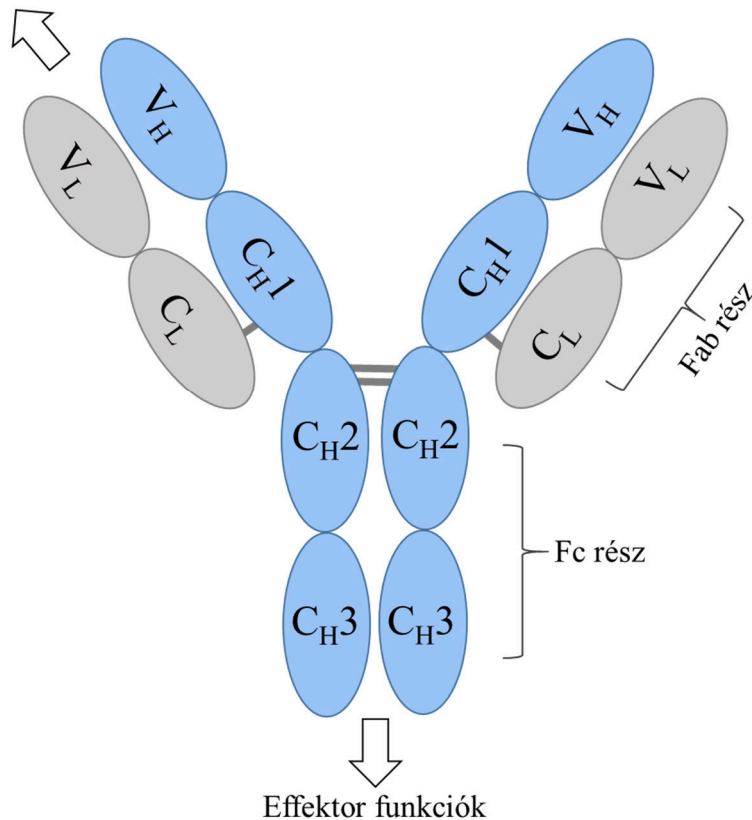
A terápiás fehérjék farmakológiai aktivitásuk alapján öt csoportba sorolhatók: a) egy hiányzó vagy rendellenesen működő fehérjét pótló, b) egy jelátviteli útvonalat kiegészítő, c) egy új funkciót vagy aktivitást biztosító d) egy molekula vagy szerv működését befolyásoló vagy e) más vegyületek vagy fehérjék (például radionuklid, citotoxikus gyógyszer vagy effektorfehérjék) szállítását biztosító fehérjék. Azonban a terápiás fehérjék molekuláris típusaik alapján is csoportosíthatók úgy, mint antitest alapú gyógyszerek, Fc fúziós fehérjék, véralvadásgátlók, vérfaktorok, csont morfogenetikai fehérjék, enzimek, növekedési faktorok, hormonok, interferonok, interleukinok és trombolitikumok [8]. A következőkben a monoklonális úton előállított terápiás fehérjékről szeretnék részletesen beszámolni, hisz kutatásom során főként ebbe a csoportba tartozó bioterápiás fehérjével dolgoztam.

##### 3.1.1 Monoklonális ellenanyagok

A monoklonális antitestek (mAb) olyan laboratóriumi körülmények között előállított immunoglobulin (IgG) molekulák, amelyek egy antigén bizonyos epitópját ismerik fel. A szerkezetük megegyezik a humán IgG valamelyik alosztályával, melyek jellegzetes Y alakját az 1. ábra mutatja be. Ezek az IgG molekulák, általánosan 150 kDa méretű

heterodimer fehérjék, melyet 4 polipeptid lánc épít fel, két azonos nehézlánc (HC) (~50 kDa, kézzel jelölve) és két könnyűlánc (LC) (~25 kDa, szürkével jelölve). A nehéz és könnyű láncok közti diszulfid hidak kovalens kötés formájában biztosítják a polipeptidláncok egyben tartását. Mindegyik lánc konstans ( $C_H$ ,  $C_L$ ) és variábilis ( $V_H$ ,  $V_L$ ) régiókból épül fel [9].

Antigén felismerés



**1. Ábra:** Az IgG ellenanyagok felépítése. (Saját készítésű ábra)

Az antitest antigénköti régióját a HC és LC variábilis doménjei ( $V_H$ ,  $V_L$ ) alkotják, melyekben megjelenik a komplementaritást meghatározó régió, amely a célantigénre való nagyfokú specificitást biztosítja. Az Y alakú molekula ezen részét nevezik a szakirodalomban antigénköti fragmensnek (Fab- antigen binding fragment), míg a másik oldalon a szárrész struktúráját, melyet csak a nehézláncok alkotnak, Fc (fragment crystallizable region - Fc region) régióknak nevezik. Ez a régió felelős a sejtek Fc receptoraihoz való kötődésért, mely által a molekula az effektor funkciókat tudja kifejteni, úgy mint a fagocitózist, az ellenanyagfüggő sejtes citotoxicitást, a szuperoxid termelését, a gyulladási citokinek felszabadítását, továbbá az antigén bemutatását [9].

### 3.1.2 A monoklonális ellenanyagok előállítása

A mAb-ek előállításának első lépése, hogy kiválasztjuk az antigént, amely ellen a mAb-t szeretnénk termeltetni. Ezt követően az immunizációs lépés során a kiválasztott antigént általában egy egérbe vagy nyúlba juttatják be. Az immunizált állat immunrendszere válaszként az antigénre ellenanyagok termelését indítja el. Ezután az immunizált állat szervezetéből szelektálni kell a számunkra szükséges ellenanyagot termelő plazmasejteket. Ezeket a plazmasejteket sejt kultúrákba helyezik és fúzionáltatják mielóma sejtekkel, hogy hibridóma sejteket hozzanak létre, melyek korlátlanul képesek osztódni, megőrizve az antitest termelés képességét. Ezt követően klonozzák a sejtvonalakat és kiválasztják azt a sejtvonalat, mely a legstabilabb kötést alakítja ki az antigénnel és ezt a klónt viszik tovább ipari szintű termelésre, ahol a bioreaktorokban nagy mennyiségű ellenanyag állítható elő. Ezt követően dolgozzák fel a sejt kultúrát és tisztítják a termeltetett antitestet. Azonban a molekuláris biológia fejlődésével a hagyományos hibridóma módszer mellett új technológiák is megjelentek, melyek hatékonyabb ellenanyag termelést biztosítanak. Ezekben leginkább a könnyű és nehézlánc géneket juttatják be rekombináns módon a baktérium és emlős sejtvonalakba, melyeket hatékonyabban lehet tenyészteni [10].

### 3.1.3 A mintaként alkalmazott terápiás antitest, a daratumumab jellemzése

A daratumumab, amelyet Darzalex márkanev alatt értékesítenek, egy rákellenes humanizált monoklonális ellenanyag. Humán IgG génnel rendelkező transzgenikus egerek segítségével állítják elő, melyeket CD38 rekombináns fehérjével immunizálnak. Az antitestet myeloma multiplex kezelésére alkalmazzák, mely a csontvelő plazmasejtjeinek rákos megbetegedése. A daratumumab célpontja a CD38 transzmembrán fehérje, mely a rosszindulatú plazmasejtek felszínén nagymértékben fejeződik ki [11]. A daratumumab a szervezetbe kerülve felismeri a myeloma sejtek felszínén expresszáldott CD38 fehérjéket, majd megköti azokat és az immunrendszer természetes ölüsejtjeinek és T-sejtjeinek bemutatja. Ezek a sejtek felismerik az antitesthez kötött myeloma sejteket és ezt követően elpusztítják azokat. Emellett a komplement rendszer is aktiválódik, ami hozzájárul a tumor sejtek legyőzéséhez [12].

### 3.1.4 Újtípusú bioterápiás fehérjék

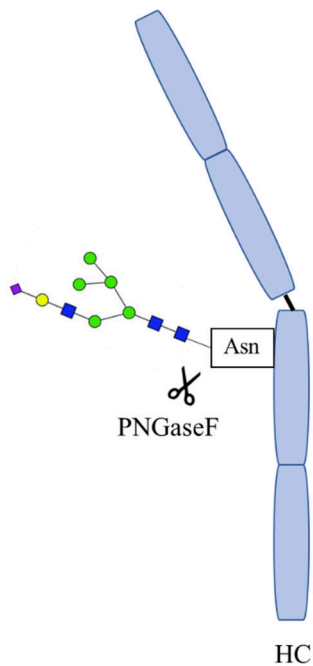
A vegyes klinikai sikerek mellett a mAb-ek hatékonysága az immunogenitásuk és nagyméretük (150 kDa) miatt hátráltatva van. És még mindig jelentős hiányosságokkal rendelkeznek, mivel korlátozott tumorpenetrációval, magas gyártási költségekkel és a

terápiás rezisztencia kialakulásának lehetőségével rendelkeznek. A felmerülő hátrányokara tekintettel fejlesztették ki az új generációs bioterápiás készítményeket, melyek közé tartoznak a bi- és trispecifikus antitestek, a nanobody-k és a fúziós fehérjék. A bispecifikus antitestek egyszerre két antigénhez képesek kötődni. A bispecifikus antitestek ugyanazon sejt felszínén kettő, vagy két sejt felszínén egy-egy különböző receptort vagy ligandumot egyszerre célozhatnak meg, ami két különböző jelátviteli útvonal gátlásához vagy stimulálásához vezethet. A sejtek jelátvitelében bekövetkező ilyen változások következményei közé tartozhat a gyulladással kapcsolatos útvonalak vagy a proliferációs útvonalak inaktiválása. Ezen túlmenően a bispecifikus antitestek az immunsejteket is bevonhatják a rákos sejtek megcélzásába, egy, a rákos sejteken kifejeződő felszíni antigénhez és egy másik, specifikus immunsejteken (természetes ölüsejteken vagy effektor T-sejteken) kifejeződő antigénhez való kötődés révén [13]. A nanobody-k nem rendelkeznek Fc régióval, V<sub>H</sub> régióból állnak és molekulaméretük nagyjából 15 kDa. Előnyeiket ennek a kisebb méretnek köszönhetik. Fokozzák a hatékony szöveti penetrációt, csökkentik a nem specifikus immunsejtek aktiválódását és nagyobb tumorspecifitást mutatnak. Azonban az Fc régió hiánya rövidebb keringési felezési időt eredményez [14]. A terápiás fúziós fehérjék a két vagy több funkcionális fehérjéből álló hibrid szerkezetek, amelyeket a betegségek jobb kezeléséhez szükséges tulajdonságok erősítése érdekében kombinálnak. A fúziós fehérjék legalább két különálló biológiai egységből állnak, az összekapcsolásuk általában genetikai szinten történik, azaz a fúziós fehérjéket kódoló géneket egyesítik egyetlen kódoló szekvenciává, hogy a független fehérjék helyileg együttesen fejtsék ki hatásukat. A fúziós fehérjéket meg lehet úgy tervezni, hogy különféle funkciókat biztosítsanak, mint például a keringési felezési idő növelését, a stabilitás javítását, a specifikus sejtek megcélzását, a génszabályozást, a citotoxicitás fokozását és az immunstimuláció felerősítését [15].

### **3.1.5 A terápiás fehérjék N-glikozilációjának szerepe**

Az emlős sejtek által termelt ellenanyagok egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosulása a glikoziláció. A rekombináns úton előállított antitestek, úgymint a mAb-ek jórésze glikozilált, azonban már nem glikozilált mAb-et is fejlesztenek. A C<sub>H</sub>2 domén Asp-297 pozíciójában megtalálható konzervált N-glikán kötőhelyhez glikozidos kötéssel oligoszacharidok kapcsolódnak, melyek a nehézlánc molekulatömegének kb. 2-3%-t teszik ki. Ezek a glikán struktúrák jelentősen befolyásolják az effektor funkciókat, az ellenanyag stabilitását, farmakokinetikáját, oldhatóságát, szekrécióját és

immunogenitását [16]. Ezek az aszparaginhoz kötött N-glikán struktúrák a terápiás glikoproteinek fontos minőségi jellemzői. Az N-glikánokat legtöbb esetben konjugátlan formában vizsgálják, endoglikozidáz enzimes felszabadítást követően. Az N-kötött glikánokat leggyakrabban peptid-N4-(N-acetil-béta-glükózaminil) aszparagin amidáz (PNGaseF) enzim használatával szabadítják fel. Amidázként a PNGase F a szénhidrátot tartó aszparagin-GlcNAc közötti kötést hasítja a konzervált Asn-X-Ser/Thr konszenzus szekvencia (X bármely aminosav, kivéve prolin) és a trimannozil-kitobióz mag legfelső N-acetilglükózaminja (GlcNAc) között ahogy az a 2.ábra is mutatja. Ez az enzim az irodalmi adatok szerint minden N-kötésű glikánt hasít, kivéve azokat, amelyek a redukáló terminális GlcNAc-maradékhoz 3 kötésű fukózt tartalmaznak, ami azonban emlősökben nem található meg.



**2. Ábra:** A PNGaseF hasítási helye az IgG nehézláncán. (Saját készítésű ábra)

A PNGaseF enzim által történő N-glikán felszabadítás függ az enzimkoncentrációtól, az inkubációs időtől, a hőmérséklettől, a pH-tól és az emésztés során alkalmazott puffer összetételétől [17].

Az enzimek által közvetített biokémiai reakciók kinetikáját általában a Michealis-Menten modellel írják le, amelyben az enzim ( $E_n$ ) egy köztes komplexet (ES) képez a szubsztráttal (S), amely később termékké (P) alakul, miközben az enzim regenerálódik.



A Michaelis-Menten-féle elmélet könnyen felhasználható az enzimatis reakciók kinetikájának tanulmányozására a következő egyenlet szerint:

$$V = V_{max} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

ahol  $V$  a reakciósebesség,  $V_{max}$  a maximális reakciósebesség,  $[S]$  a szubsztrátkoncentráció és  $K_M$  a Michaelis-Menten állandó amely lehetővé teszi, hogy relatív összehasonlításokat végezzünk különböző, azonos specificitású enzimek kinetikája között [18].

A pontos mennyiségi meghatározáshoz vagy az összes N-glikán teljes felszabadulása szükséges, vagy a relatív mennyiségi meghatározáshoz az, hogy az N-glikán felszabadulás mértéke minden glikán esetében minden helyen azonos legyen. Egyes tanulmányok beszámoltak arról, hogy az endoglikozidáz emésztési lépés során a mintákban jelen lévő különböző monoszacharidok, azaz az alacsony polimerizációs fokú DP1 cukrok (pl. glükóz, maltóz) a vérben [19] és ami a legérdekesebb, a felszabaduló Man3GlcNAc2 magot tartalmazó cukorszerkezetek gátlóként hatnak az enzimre [20, 21]. Az összetett szénhidrátok szerkezeti analizisére rendelkezésre álló számos analitikai technika közül a legelterjedtebbek az NMR-spektroszkópia, a folyadék kromatográfiás rendszerek, a tömegspektrométerek és a CE [22, 23]. CE-vel a nagy érzékenység elérése érdekében lézer-indukált fluoreszcenciás (LIF) detektálást alkalmaznak, amely a felszabaduló glikánok töltött fluorofórral, legtöbbször 8-aminopirén-1,3,6-triszulfonsavval (APTS) történő jelölését igényli [24].

### 3.2 Kapilláris elektroforézis

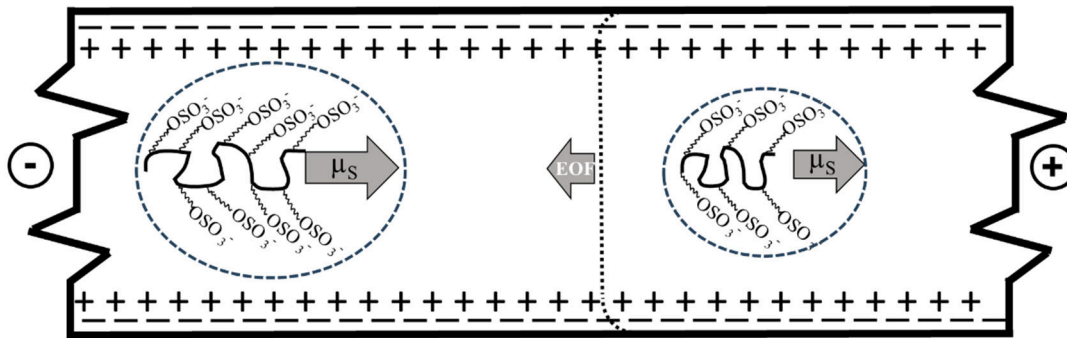
A bioterápiás fehérjék karakterizálására számos analitikai módszer áll rendelkezésre, ezek nélkülözhetetlenek az új gyógyszerek sikeres fejlesztéséhez és klinikai engedélyeztetéshez. A CE kiemelkedő szerepet tölt be a bioterápiás fehérjék elválasztásában, kiegészítve a különböző folyadék kromatográfiás és az azokhoz kapcsolt tömegspektrometriai módszerek eredményeit [25]. A holisztikus megközelítés érdekében szükséges egyes módszerek kombinálása annak érdekében, hogy a lehető legpontosabb analitikai információt nyerjük a fehérjékkel kapcsolatban [26]. A CE gyors és nagy felbontású elválasztást biztosít, ami elengedhetetlen a fehérjék összetett jellemzéséhez és azok különböző izomereinek azonosításához. A CE lehetővé teszi a minták nagyon kis

mennyiségének felhasználását, ami különösen fontos a drága vagy ritka bioterápiás fehérjék esetén. A CE az egymással rokon technikák összefoglaló neve, melyben a kis és nagy méretű molekulák nagyhatékonyságú elválasztása során szűk keresztmetszetű (20-200  $\mu\text{m}$ ) kvarc kapillárisokat alkalmaznak. Alapja, hogy az elválasztás során alkalmazott feszültség hatására a töltéssel rendelkező oldott molekulák, valamilyen közegben eltérő sebességgel migrálnak. A CE különböző technikákat foglal magába, úgy mint a kapilláris zónaelektroforézis, kapilláris gélelektroforézis (CGE), kapilláris elektrokratográfia, kapilláris izoelektromos fókuszálás (cIEF), micellás elektrokinetikus kapilláris kromatográfia és kapilláris izotachoforézis. Ezek közül a bioanalitika területén, a terápiás fehérjék elválasztásánál legjelentősebb CE módok a cIEF és a CGE. A cIEF egy gyakran alkalmazott bioanalitikai módszer, amellyel a terápiás fehérjék töltésheterogenitásáról nyerhetünk információt, ezért az utóbbi években egyre gyakrabban alkalmazzák a fehérjék jellemzésére. Az cIEF módban a kapillárisban pH gradienst hoznak létre, úgy hogy különböző amfolit vegyületeket hagynak egymás mellé rendeződni az izoelektromos pontjuknak megfelelően. A cIEF elválasztás során a fehérjék az izoelektromos pontjuk szerint válnak el, hisz az izoelektromos ponton a fehérjék össztöltése nulla, ezért mobilitásuk is nulla, tehát nem migrálnak tovább miután ezt a pontot elérték. A fókuszálást követően a különböző izoelektromos sávokat hidrodinamikai vagy az elektroosmotikus áramlást kihasználva lehet a detektorhoz eljuttatni. Az izoelektromos pont megváltozásából következtetni lehet a készítmény degradációjára, illetve a fehérje szerkezetbeli megváltozására is. Az CGE módot az értekezés a következőkben részletesen fogja tárgyalni, hiszen a kutatómunkám során ezen technika fejlesztésével foglalkoztam.

### **3.2.1 Elektroosmotikus áramlás**

A CE elválasztások során az analitok elektroforetikus mobilitását az elektroosmotikus áramlás (EOF) jelentősen befolyásolja. Az üveg kapilláris belső felületén lévő szilanol funkciós csoportok pH 2,5 érték felett deprotonálódnak, így a kapilláris teljes belső fala negatív töltésűvé válik. A töltésegyensúly fenntartásának érdekében az elválasztó pufferben található pozitív töltésű ellenionok a negatív töltésű felületen egy diffúz kettősréteget alakítanak ki (3. ábra). Ez a diffúz kettősréteg az elektromos áram hatására a katód irányába kezd áramlani, és mivel a kapillárisban levő folyadék térfogata kicsi a teljes folyadékfázis dugószerű áramlását fogja eredményezni, létrehozva az EOF-t. Az

EOF szabályozható a puffer koncentrációjának és pH értékének változtatásával, illetve a kapilláris falának különböző kémiai módosításaival [27].



**3. Ábra:** Az EOF sematikus ábrája az ellentétes irányba vándorló SDS-fehérje komplexekkel. (Saját készítésű ábra)

### 3.2.2 Kapilláris áramlási profilja

Egy nyomás vezérelt rendszer, úgymint a folyadékkromatográf használata esetén a folyadék szilárd határfelületeken a súrlódási erők jelentős nyomásesést eredményeznek. A súrlódási erők nyitott csőben lamináris áramlás esetén parabolikus áramlási profilt eredményeznek. Ennek következményeként a csőben egy áramlási gradiens alakul ki, amely a cső közepén eredményezi a legnagyobb áramlási sebességet és a cső falánál nullához közelít. Ez a sebességgradiens jelentős sávszélesedést eredményez a csúcsok esetében. Az elektromos áram által vezérelt rendszerekben az EOF hajtóereje egyenletesen oszlik el, ennek köszönhetően nincs nyomásesés, és az áramlási sebesség egyenletes a cső teljes átmérője mentén (dugószerű), kivéve a falhoz nagyon közel, ahol a sebesség ismét a nullához közelít [27].

### 3.2.3 Analitikai paraméterek: felbontóképesség, elméleti tányérszám és szelektivitás

Az elválasztástechnikák végső célja a mintánk komponenseire való szétválasztása, melyet a felbontás ( $R_s$ ) értékével tudunk jellemezni.

$$R_s = (t_{R2} - t_{R1}) / \frac{w_1 + w_2}{2} \quad (3)$$

Amely két csúcs esetében megadható a migrációs idővel ( $t_{R2}$ ,  $t_{R1}$ ), illetve az adott csúcsok alapvonalis szélességével ( $w_1$ ,  $w_2$ ).

Az elválasztás hatékonyságát jellemzi az elméleti tányérszám ( $N$ ).

$$N = 16\left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \quad (4)$$

A 4. egyenlettel adható meg, ahol ( $t_R$ ) a migrációs idő ( $w$ ) a csúcs alapvonalis szélessége. A szelektivitás meghatározható két csúcs mobilitásának hányadosaként.

$$\alpha = \frac{\mu_1}{\mu_2} \quad (5)$$

Abban az esetben, ha a mintakomponensek elválnak egymástól az ( $\alpha$ ) értéke nagyobb, mint 1, tehát nincs ko-migráció, és minél nagyobb az értéke annál jobban elválnak egymástól a komponensek. Ha  $\alpha=1$  akkor nincs elválasztás.

### 3.2.4 A feszültség és a hőmérséklet hatása az elválasztásra

Mind az EOF mind az analitok elektroforetikus sebessége egyenesen arányos a télerőséggel, így a lehető legmagasabb feszültség alkalmazása biztosítja a legrövidebb elválasztási időt. Az alapelmélet szerint a rövid elválasztási idők a legnagyobb hatásfokot is eredményezik, mivel a sávszélesedéshez leginkább a diffúzió járul hozzá, ami időben növekszik. Korlátozó tényező azonban a Joule-féle hőképződés. Kísérleti úton az adott elválasztásokhoz optimális feszültséget meg lehet határozni az ún. Ohm-grafikonok segítségével. Az Ohm-plot elkészítéséhez növekvő feszültségeket alkalmaznak a CE mérések során, és minden feszültséghez mérik a megfelelő áramerősséget. Az adatokat grafikonon ábrázolják, ahol az X-tengelyen a feszültség, az Y-tengelyen az áramerősség szerepel. Az optimális feszültség addig a pontig van amíg 5%-os pozitív eltérés nem jelentkezik a linearitástól, ami a keletkező hő eltávolításának hiányát jelzi [28].

Az elektroforetikus mobilitást és az EOF-t a viszkozitás egyaránt befolyásolja. A viszkozitás pedig a hőmérséklet függvénye, emiatt az elválasztások során fontos a pontos hőmérséklet szabályozás. A hőmérséklet emelésével a közeg viszkozitása csökken, így az elektroforetikus mobilitás nő. Az elválasztási hőmérséklet fontos teljesítményt befolyásoló paraméter, amely az aktiválási energia [29] elve alapján optimalizálható, hogy a lehető legnagyobb felbontóképességet érjük el az elválasztandó mintakomponensek esetében.

### 3.3 Kapilláris gélelektroforézis

Már 1965-ben Grossbach is használt térhálósított poliakrilamiddal töltött nagyon kis átmérőjű oszlopokat humán szérum albumin monomer és dimer formáinak elválasztására [30]. Majd 1967-ben Hjerten bizonyította a nagy elektromos télerősség

alkalmazhatóságát és előnyeit a kapilláris esetében [31]. Néhány évvel később Neuhoff és munkatársai egy mikrokorongos elektroforézis módszerről számoltak be, amellyel 5  $\mu\text{L}$  térfogatú kapillárisokban glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz variánsok kvantitatív vizsgálatát végezték [32]. Az 1960-as évek végére került bevezetésre a nátrium-dodecilszulfát (SDS), mint anionos detergens alkalmazása, mely nagy előrelépést jelentett a fehérjék méret szerinti elválasztásában [33]. Az SDS 1,4 g/1 g fehérje arányban alakít ki hidrofób kölcsönhatásokat. Így a polipeptidlánc belső töltéseit gyakorlatilag elfedi és a fehérjék tömegességére jutó nettó töltése megközelítőleg állandóvá válik. Emiatt az elektroforetikus migrációjuk arányos az effektív molekulasugárral vagy megközelítőleg a polipeptidlánc molekulatömegével. Azonban ez alól számos kivételt lehet találni, hisz a fehérjéket érintő posztranszlációs módosulások jelentősen befolyásolják detergens kötődését. Az egyik leggyakoribb ilyen módosulás esetében, mint a glikoziláció az oligoszacharid láncokhoz az SDS nem kötődik meg, viszont a szénhidrát részek a fehérjék hidrodinamikai térfogatát növelik. A két hatás együtt csökkenti az SDS-fehérje komplexek elektroforetikus mobilitását. 1974-ben Virtanen leírta a kisebb átmérőjű kapilláris oszlopok előnyeit [34], amelyet az 1980-as évek elején Hjerten használt fel [35], aki szarvasmarha szérumfehérjék elválasztásáról számolt be egy keskeny átmérőjű géllal töltött kapillárisban. Azonban az igazi áttörést Jorgenson és Lukacs közleménye jelentette, akik bemutatták a kapilláris zóna elektroforézis rendkívül nagy felbontóképességét 100  $\mu\text{m}$ -nél kisebb belső átmérőjű kapillárisok alkalmazásával [36]. Ezt követően kezdték el forgalmazni az automatizálható és nagyteljesítményű CE készülékeket, amivel egyidejűleg háttérbe szorultak az időigényes lap-gélelektroforézis alapú technikák. A CGE nagyhatékonyságú, molekulatömeg szerinti elválasztást biztosít a biológiai makromolekulák, úgy mint a DNS, RNS és fehérjék számára [23, 37]. A technika a hagyományos gélelektroforézisből fejlődött ki és számos előnyének köszönhetően, mint például az automatizálhatóság, kis minta- és vegyszermennyiség, a nagy hatékonyság és a kapillárison belül történő detektálhatóság miatt vált a gyógyszeripar rutin módszerévé.

### 3.3.1 Kapilláris gélelektroforézis alapelvei

Az elektroforetikus elválasztások alapja, hogy elektromos térben az eltérő töltéssel rendelkező és eltérő méretű molekulák különböző sebességgel vándorolnak. A  $Q$  nettó töltéssel rendelkező oldott molekulákra, konstans  $E$  elektromos térerősség

alkalmazásával az elektromos erő hat ( $F_e$ ), mely meghatározható az alábbi 6. egyenlet szerint:

$$F_e = Q * E \quad (6)$$

Valamint a molekulákra hat a súrlódási erő ( $F_f$ ), mely azokkal ellentétes irányú, és a translációs súrlódási együtthatóval ( $f$ ) valamint a sebesség komponenssel ( $dx$  távolság,  $dt$  idő) fejezhető ki:

$$F_f = f * \left(\frac{dx}{dt}\right) \quad (7)$$

Amennyiben az egymással ellentétes irányú  $F_e$  és  $F_f$  egyensúlyban van akkor az oldott molekulák állandó sebességgel vándorolnak. A translációs súrlódási együttható ( $f$ ) a viszkozitással ( $\eta$ ) arányos és a következőképpen fejezhető ki:

$$f = c * \eta \quad (8)$$

Ahol  $c$  egy a molekula konfigurációjától függő konstans, például kis gömb alakú molekulák esetében  $6\pi r$ -nek van meghatározva ahol  $r$  a molekula sugara [38] vagy henger alakú molekulák, úgy mint például SDS-fehérje-komplexek esetében, ez a molekulatömeg hatodik gyökének függvénye ( $MW^{1/6}$ ) [39].

Az elektroforetikus mobilitás a sebesség és az egységnyi térerősség hányadosa.

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{Q}{f} \quad (9)$$

Az előző egyenletek figyelembevételével az SDS-fehérje komplexek elektroforetikus mobilitása fizikai állandókkal a következőképpen fejezhető ki [40].

$$\mu = \frac{Q}{6\pi r \eta} \quad (10)$$

Az oldott molekula molekulatömeg értékének bevezetésével a rendszer pontosabban leírható, ahol a  $k$  kitevőt molekuláris tényezők befolyásolják.

$$\mu = \frac{Q}{MW^k \eta} \quad (11)$$

A  $k$  értékére vonatkozólag, Offord javaslatára bevezetésre került a gömb alakú molekuláknál a térfogattal ( $MW^{1/3}$ ) vagy a felülettel ( $MW^{2/3}$ ) egyenértékű hatvánnyal pontosított számolás [40]. Rickard és munkatársai az  $MW^{1/2}$  hatvány használatát vezették be a megfelelő forgási sugárra [41]. Henger alakú molekulák esetén a molekulatömeg hatodik gyökének függvénye ( $MW^{1/6}$ ) [39].

Ahhoz, hogy a molekulák átjussanak a polimer mátrix akadályain energiát kell felhasználniuk, ez az energia az aktivációs energia, amely a viszkozitás függvénye is. A viszkozitás ( $\eta$ ) hőmérsékletfüggése az Arrhenius (12.) egyenlettel fejezhető ki [29]:

$$\eta = A_e^{E_a/RT} \quad (12)$$

Ahol  $A$  egy preexponenciális tényező,  $E_a$  a viszkózus áramlás aktiválási energiája,  $R$  az egyetememes gázállandó és  $T$  az abszolút hőmérséklet.

A géllal vagy polimer mátrixokkal töltött kapillárisokban a fehérjék méret szerinti retardációja függ a gél koncentrációjától és a polimernek az analitokkal kialakított fizikai kölcsönhatásától, amit a retardációs együttható ( $K_R$ ) jellemez. A retardációs együtthatót a Ferguson (13.) egyenlet írja le [42].

$$\ln \mu_{eff} = \mu_0 e^{-K_R * T} \quad (13)$$

ahol  $\mu_{eff}$  az effektív elektroforetikus mobilitás (a  $\mu_{app}$  látszólagos mobilitás és az  $\mu_{EOF}$  elektroosmotikus mobilitás algebrai összege),  $\mu_0$  pedig az analitok mobilitása gél vagy polimer mátrix nélküli pufferrel töltött kapillárisban.  $K_R$  a retardációs együttható és  $T$  a gél koncentrációja. A gél koncentráció és az analitok elektroforetikus mozgékonyasága közötti összefüggésnek a CGE-ben fontos szerepe van. Chrambach és Rodbard bevezették az úgynevezett Ferguson diagramot [42], ahol a logaritmus elektroforetikus mobilitást ábrázolták a gél monomer koncentráció függvényében. A módszer lehetővé teszi a fehérjék molekulásúlyának pontosabb meghatározását és az elválasztási mechanizmusok jobb megértését. Javaslatuk szerint a  $K_R$  pontos értékének meghatározásához legalább hét különböző  $T$  értéket kell figyelembe venni, amelyekhez Ferguson diagramokat kell készíteni. Ezek alapján, a standard fehérjékre illesztett Ferguson diagramok segítségével meghatározható az ismeretlen fehérje molekulásúlya. [43].

Az Ogston-elmélet lineáris Ferguson-ábrákat javasol, mivel a migráló molekula az elválasztás során úgy viselkedik, mint egy nem deformálható gömb alakú objektum [38].

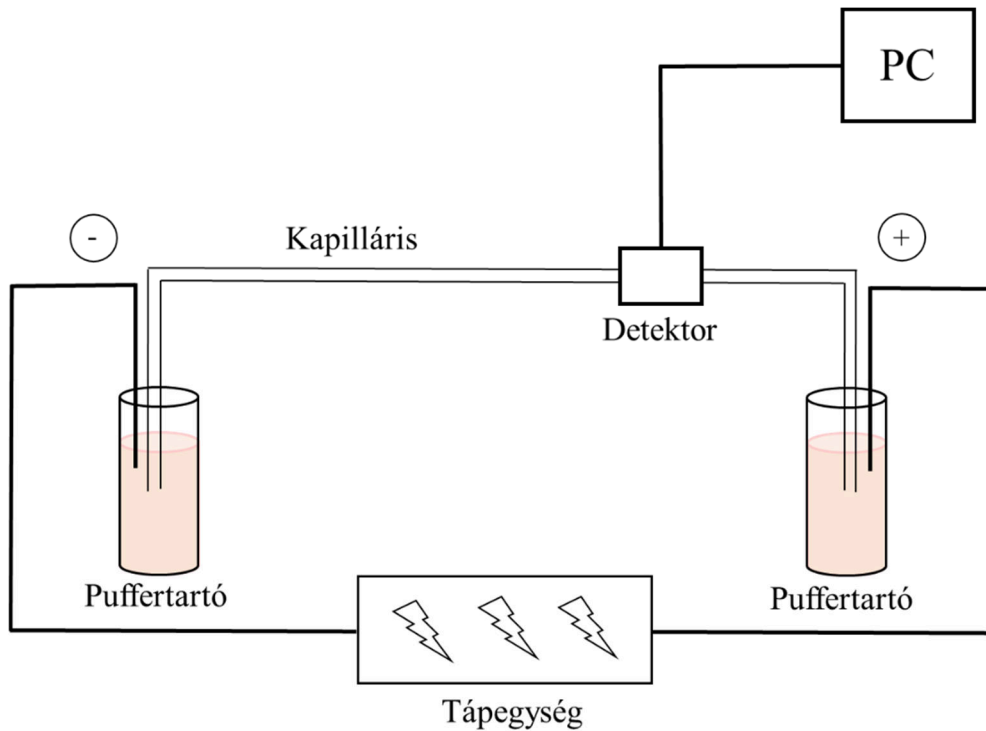
A gélek által képzett polimerhálózat egy merev molekulaszítának tekinthető, melyre jellemző egy átlagos pórusméret eloszlás. Ezen a molekulaszűrőn a gömb alakú oldott molekulák a megfelelő méretű pórusokon tudnak áthaladni, mely méret szerinti elválasztást eredményez. Tehát a mátrix átlagos pórusmérete a vándorló analitmolekula hidrodinamikai sugarával megegyező mérettartományban van, akkor klasszikus szűrés áll fenn. Ebben az esetben, állandó polimer koncentráció mellett, a mobilitás az analit molekula méretének exponenciális függvénye [44].

$$\mu \sim e^{-MW} \quad (14)$$

Azonban nagy méretű biopolimerek, mint például a DNS és a SDS-fehérje molekulák olyan polimerhálózatokon keresztül is tudnak vándorolni, amelyek pórusméretei jelentősen kisebbek a biomolekulák hidrodinamikai méreténél, ilyenkor az Ogston modell kibővítése szükséges [45]. A kiterjesztett Ogston-modell lehetővé teszi a gélkonzentrációtól függő retardációs együtthatók, azaz nemlineáris Ferguson összefüggések használatát [46, 47]. Reptációnak nevezik azt a jelenséget, amely a nagyméretű biopolimerek elektromos mező által közvetített migrációját „kígyószerű” mozgásként írja le a forgási tengelyüknél sokkal kisebb gélpórusok esetében is képesek azon áthaladni. A reptációs modell szerint az oldott anyag mérete és az elektroforetikus mobilitása között fordított összefüggés van ( $\mu \sim 1/MW$ ) [48]. Fontos azt is megjegyezni, hogy a migráló molekula elektroforetikus mobilitását befolyásolja annak molekuláris konformációja is, például az Y alakú IgG molekula alakja, mely nem lineáris Ferguson ábrákat eredményez.

### 3.3.2 Kapilláris gélelektroforézis alkalmazása gyakorlatban

A 4. ábra sematikusán mutatja a kapilláris elektroforézis berendezés felépítését és elektromos áramkörét gélelektroforézis esetén.



**4. Ábra:** A kapilláris elektroforézis berendezés sematikus ábrája gél elektroforézis esetén. (Saját készítésű ábra.)

A műszer fő egységei a szabályozható nagyfeszültségű tápegység, a puffer- és mintatartó edények, a két elektród, a detektor és az adatgyűjtésre szolgáló számítógép és szoftver. A CGE során leggyakrabban fused silica kapillárist alkalmaznak, melyet kívülről vékony poliimid réteggel vonnak be, hogy megakadályozzák a hajszál vékony kapilláris töredezését. Ezt a poliimid réteget az UV és fluoreszcens detektálhatóság érdekében egy kis szakaszon (kb. 2-4 mm) el kell távolítani. Ez a folyamat egyszerűen elvégezhető a poliimid réteg leégetésével és letörölgetésével, aminek köszönhetően a fényút számára egy átlátszó szakasz keletkezik a kapillárison. Azonban a módszer lehetővé teszi a kapilláris után történő detektálási módokat is, mint például amperometriás, elektrokémiai és MS detektálást. A tipikus kapilláris hossz 30 és 60 cm között van, de egyes esetekben még hosszabb, például bizonyos CE-MS beállításoknál akár 1 m is lehet. Az SDS-fehérje komplexek esetében elegendő a 30 cm hosszúságú kapilláris is (20 cm effektív hossz). Emellett fontos paraméter az elválasztáskor a kapilláris belső átmérője is. A kisebb átmérőjű kapillárisok az oszlopon átfolyó kisebb áram (nagyobb ellenállás) miatt kevesebb Joule-hőt termelnek; viszont nehézséget jelenthet nagy viszkozitású gélek alkalmazásakor. A nagyobb átmérőjű kapillárisok viszont lehetővé teszik a viszkozus elválasztó mátrixok könnyebb feltöltését, és nagyobb mintamennyiségek injektálását is,

azonban az ezeken átfolyó nagyobb áram (kisebb ellenállás) miatt több Joule-hő keletkezik, amelyet az elválasztás során megfelelően el kell vezetni. A műszerben nagyfeszültségű tápegység biztosítja az elválasztáshoz szükséges elektromos térerősséget és általában az elválasztás 10-30 kV feszültségen történik.

Leggyakrabban állandó feszültség mellett történik az elválasztás, mely során a két puffer tartó edénybe merül a két elektród és a viszkozus géllal feltöltött kapilláris két vége. A háttélektrolit vezetőképességétől függően a nagyobb elektromos térerősség alkalmazása akár több W nagyságú teljesítményt is eredményezhet, bár ez 1.5 W felett csökkenti az elérhető elméleti tányérszámot és ezen keresztül az elválasztóképességet. Ezért a keletkező hő elvezetéséhez hatékony hőmérsékletszabályozó rendszerre van szükség. A CGE-t többnyire negatív töltésű polionos molekulák (pl. DNS, RNS, SDS-fehérje komplexek és fluoreszcensen jelölt glikánok) méret szerinti elválasztására használják, ezért az elválasztás során alkalmazott elektromos mező fordított polaritású, azaz a komponensek a negatív elektródtól (katód) a pozitív elektród (anód) felé migrálnak. Az elektromos tér bekapcsolásával az oldott molekulák hidrodinamikai térfogat-töltés arányuknak megfelelően elkezdenek vándorolni a kapillárisban, ennek megfelelően szétválnak és áthaladnak a detektáló rendszer előtt, amely a jelet egy adatgyűjtő és feldolgozó modulba továbbítja. Az elválasztás során kapott eredményeket az elektroferogramok reprezentálják, melyek az elválasztott molekulákhoz tartozó csúcsokat a migrációs idő függvényében mutatják. A minta kapillárisba történő injektálása általában a bemeneti oldalon történik, de egyes esetekben pl. EOF mérése esetén történhet a kimeneti oldalról is, annak érdekében, hogy a futtatás időtartamát csökkentsük. A minta injektálása történhet elektrokinetikusán vagy nyomás alkalmazásával. A nagy viszkozitású gélek esetén elektrokinetikus injektálás a leggyakrabban alkalmazott módszer, viszont ebben az esetben a kapillárisba jutó minta mennyisége függ a molekulák mobilitásától. A kereskedelemben kapható kapilláris elektroforézis műszerek pumpákkal vannak felszerelve vagy nagynyomású nitrogéntartályokkal a szükséges injektálási nyomás elérése érdekében. Ezek biztosítják a hidrodinamikai injektálást, mely során a bejutott mintamennyiséget az alkalmazott nyomás, az idő és a gél viszkozitása határozza meg, függetlenül az injektált molekula elektroforetikus mobilitástól.

Kapilláris gélelektroforézis során alkalmazott detektáló rendszerek közé tartoznak az UV-látható fény abszorbancián, fluoreszcencián, vezetőképességen és MS-n alapuló módszerek. Az SDS-fehérjék CGE-sel történő elválasztásakor a leggyakrabban

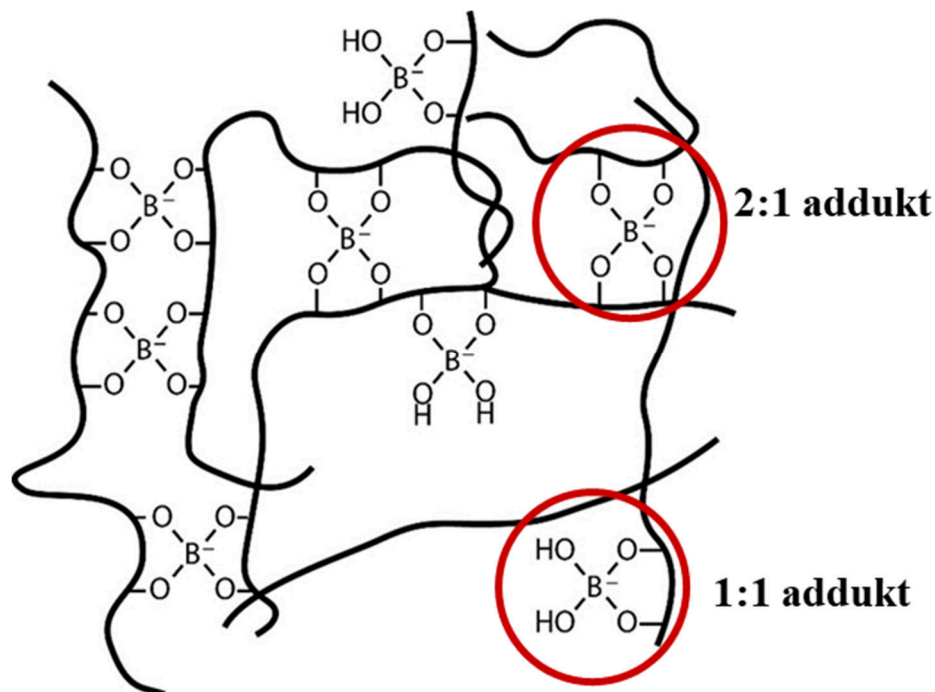
alkalmazott detektor típus az UV-detektor. Azonban ha nagy detektálási érzékenységre vagy specifitásra van szükség akkor lézer indukált fluoreszcens (LIF) detektort célszerű alkalmazni. A detektálás a korábban említett a szilika rétegtől megszabadított ablak részen keresztül történik, mely a mi műszereink esetében a kimeneti oldaltól 10 cm-es távolságot jelent. A jelintenzitást a műszerhez kapcsolt számítógép dolgozza fel és jeleníti meg elektroferogramok formájában.

### 3.3.3 A kapilláris gélelektroforézis során alkalmazott gélek

A polionos makromolekulák, úgy mint az SDS-fehérje komplexek méret szerinti elválasztásához szűrő mátrixra van szükség, hisz a negatív töltésű felületaktív anyaggal borított fehérjék nagyon hasonló töltéssűrűséggel rendelkeznek, azaz egyszerű puffer oldatban nem válnak el egymástól [43]. Ezek a gélek leggyakrabban olyan anyagok, melyek vázszerkezetét polimer láncok építik fel [49]. A gélek és polimerhálózatok legfontosabb jelensége a fázisátalakulás, amit az oldószer összetétele, a hőmérséklet, a pH érték és az ionösszetétel befolyásol. A gélesedés történhet kémiai kötés vagy fizikai adhézió révén. A fizikai keresztkötések nem állandóak, de elég erősek ahhoz, hogy hosszú időn keresztül összekapcsolják a polimer szegmenseket, azonban környezeti behatásra könnyen elszakadnak. A kémiailag térhálósított gélek a polimerláncok kovalens térhálósítása révén (a monomer-keresztkötő oldatainak keverésével és azok polimerizációjával) jönnek létre és fizikai behatásra nem bomlanak fel ezek a polimerláncok [50]. Emellett még megkülönböztetjük az átmenetileg, kémiailag keresztkötött géleket is, úgymint az SDS- fehérje elválasztás során rutinszerűen alkalmazott borát-dextrán alapú géleket [51, 52].

A hagyományos lap-gélelektroforézishez poliakrilamidot és agarózt alkalmaznak leggyakrabban. Az SDS-fehérje komplexek kapilláris gélelektroforézisével kapcsolatos korai kísérletek során N,N-metilén-biszakrilamiddal térhálósított poliakrilamid géleket használtak. A pórusméretet a monomer és a térhálósító szer koncentrációja határozza meg [53]. A korai időszakokban a kapillárisokat a poliakrilamid vagy agaróz gélekkel töltötték meg, melyek különösen hatékonyak bizonyultak a DNS fragmentumok elválasztása során. Az SDS-fehérjék első CGE-n alapuló méret szerinti elválasztását Karger és munkatársai mutatták be az 1980-as évek végén, amikor akrilamid-monomert használtak az inzulin A és B monomerek elválasztása érdekében [54]. A gél polimerizációja a kapillárison belül történt, ami gyakran vezetett inhomogenitáshoz és levegő buborékok képződéséhez, mindezek problémássá tették használatukat. Ezenfelül a poliakrilamidnak

magas az UV elnyelése, emiatt nem biztosított megfelelő UV detektálási érzékenységet [37]. Az új évezred elejétől kezdve a fehérjék CGE során az átmenetileg bórsavval, SDS jelenlétében keresztkötött (2 M molekulatömegű) dexrán gélek használata került előtérbe és vált ipari standardá [53]. Ez a típusú gél lehetővé teszi az elválasztó mátrix könnyű cseréjét a szűk keresztmetszetű kapillárisokba. Semleges pH felett a borátionok könnyen képeznek komplexeket a polihidroxi-vegyületek vicinális (vagy max egy szénatom az OH-tartó szénatomok között) diol csoportjaival, feltéve, hogy a hidroxilcsoportok orientációja cisz-pozícióban van [55, 56]. Az  $\alpha$ 1-6 építőelemekből álló glükóz polimerek, úgy mint a dexrán esetében, hattagú borát komplexek képződhetnek 1:1 (egy glükóz-egy borát) vagy 2:1 (két glükóz-egy borát) arányban, így láncon belüli, illetve láncok közötti adduktok képződhetnek, amit az 5. ábra reprezentál [57].



**5. Ábra:** A láncon belüli (1:1) és láncok közötti (2:1) adduktok borátionokkal térhálósított dexrán gél esetében [51].

A komplexek élettartama a miliszekundumos tartományban van, azaz a bomlásuk és újraképződésük folyamatos, amit a pH, az ionerősség és a hőmérséklet befolyásol [58]. Ez a folyamatos felbomló és újjáépülő folyamat fontos a mátrix szűrő képességének fenntartásához a migráló nagy méretű SDS-fehérje komplexek által okozott esetleges deformációk után [51]. Valamint ez a jelenség enyhítette a helyi EOF által közvetített buborékképződési hatást is, ami komoly problémát jelentett a kémiaailag keresztkötött

poliakrilamid gélek használatakor [59]. Az 1:1 láncon belüli adduktok esetén a borátion szabad, funkciós csoportjai komplexeket képezhetnek a fehérjéken megtalálható glikán struktúrákkal, befolyásolva így a glikozilált fragmensek elektromigrációját, nagyobb szelektivitást biztosítva [60]. A borát koncentráció növelése állandó dextrán koncentráció mellett növeli a láncok közötti kötések számát és ezzel egyidejűleg csökkenti a gél pórusméretét. A polimer koncentrációja az elektroforézis során döntő szerepet játszik az elválasztás szűrő tulajdonságainak és az elérhető felbontóképesség meghatározásában, azaz az elválasztás során a különböző gélkonzentrációk befolyásolják az SDS-fehérje komplexek elektroforetikus mobilitását. A magasabb gélkonzentrációk jellemzően nagyobb szűrő hatást biztosítanak, ami a fehérjekomplexek jobb elválasztásához vezet, de lassítja illetve akadályozhatja a nagyobb molekulák vándorlását. Az alacsonyabb gélkonzentrációk az analitok nagyobb mobilitását biztosítják, de ronthatják a felbontást. A poliionos makromolekulák, úgy mint a nagyméretű DNS molekulák elválasztásának lehetőségét ultrahív polimertartalmú elválasztó pufferekben Grossman és Soane javasolták először [61]. Elméletük alapján Barron és munkatársai részletesen tanulmányozták a nukleinsavak elválasztását 72 - 23 000 bp közötti mérettartományban, ultrahív hidroxietil-cellulóz (HEC) oldatok alkalmazásával [62]. Arról számoltak be, hogy még <0,15%-os polimer koncentrációnál is jól elkülönültek a > 2000 bp méretű dsDNS fragmentumok az átmeneti összefonódás elválasztási elv alapján, míg a kisebb, <600 bp méretű fragmensek együtt migráltak. Elméletük szerint a nagy DNS molekulák összefonódtak a HEC-láncokkal, a kisebbek pedig sokkal kisebb mértékben, azaz a nagyok ultrahív polimeroldatokban is jól elváltak, míg a kisebbek nem.

### **3.4 A fehérjék fluoreszcens jelölése**

A bioterápiás fehérjék fluoreszcens jelölése és azok CGE-sel történő elválasztása napjainkban egyre nagyobb figyelmet kap az analitikai kémia területén [63]. A fehérjeláncok szekvenciájában megtalálható egyes aminosavak, mint például a tirozin és triptofán belső fluoreszcenciája bár alkalmas lehet fluoreszcens detektálásra, de az elérhető kimutatási határ nem mindig elegendő [64]. Emiatt egyre nagyobb hangsúlyt kap a fehérjék fluoreszcens festékekkel történő jelölése, mely történhet kovalens kötést eredményező reakcióval [65], valamint a fluorofór és a fehérjemolekula között kialakuló nem kovalens kölcsönhatásokon alapuló módszerek segítségével [66]. A kovalens vagy nem kovalens módszerekkel történő fluoreszcens jelölések esetében is további három altípust lehet megkülönböztetni aszerint, hogy maga a jelölési reakció hol megy végbe: 1)

az oszlop előtt II) az oszlopon belül vagy III) az oszlop után. Az oszlop előtti eljárás során az analit molekulákat még az előtt reagáltatják a fluorofór festékekkel mielőtt bekerülnének az elválasztó kapillárisba [67]. Az oszlopon belül történő jelölés során jellemző, hogy a reagensek és az analitok közvetlen kölcsönhatását használják ki az elválasztás közben [68]. Az oszlop utáni jelölés során az elválasztást követően a reakció a kapilláris kimeneti oldalán történik [69]. A leggyakrabban alkalmazott kovalens jelölő anyagok a naftalin-2,3-dikarboxaldehid (NDA), a 3-(2-(2-furoil)kinolin-2-karboxaldehid (FQ), a fluoreszcein-izotiocianát (FITC) és a pirilium (Chromo) színezékek [25]. Michels és munkatársai hatékony mintaelőkészítési protokollt mutattak be terápiás fehérjék vizsgálatához SDS-CGE-vel és LIF-detektálással, kifejezetten a rekombináns mAb-k tisztaságának értékelésére fókuszálva [70]. Módszerük az FQ festék alkalmazásával, nukleofil jelenlétében, kovalensen jelölte a terápiás fehérjét, így kiküszöbölve a felesleges festék eltávolítására irányuló tisztítási lépés szükségességét. Dovichi és munkatársai elektroforetikusan közvetített oszlopon történő derivatizálási stratégiát dolgoztak ki a fehérjék FQ-val történő jelölésére natív gélelektroforézishez [68]. A kovalens jelölés kihívása az, hogy egyetlen fehérjemolekula számos reaktív helyet tartalmazhat, amelyek mindegyike kölcsönhatásba léphet a fluoreszcens jelölőanyaggal. Tehát nehéz az összes rendelkezésre álló helyet egységesen megjelölni, mivel a reaktivitásukban különbségek vannak. Ezáltal a kovalens jelölési módszer olyan minta keveréket eredményezhet, amely nem jelölt, részben jelölt és teljesen jelölt fehérjét tartalmaz. Az ilyen keverék szétválasztása a csúcsok kiszélesedését vagy akár azonos mintakomponensek több csúcsként való megjelenését okozhatják [69]. A probléma megoldására Kaneta és munkatársai egy oszlop utáni derivatizálási módszert dolgoztak ki a fehérjék kapilláris gélelektroforézissel történő analizálására, ahol 2-merkaptóetanol jelenlétében NDA-t alkalmaznak a jelölésre [71].

A nem kovalens jelölési módszerek során gyakran használt negatív töltésű Sypro Red és Sypro Orange nevezetű fluorofór festékek komplexeket képeznek a fehérjékkel kémiai reakció szükségessége nélkül [72, 73]. A Sypro Redet az ultra-vékonyrétegű gélelektroforézis alapú fehérjeanalízisben használták, az analitok valós idejű képalkotásával kombinálva. Ebben az esetben a negatív töltésű festék az elektroforézis során együtt migrált az SDS-fehérje komplexekkel [74]. Kifejlesztettek egy mikrochip-es kapilláris elektroforézis platformot is, amely nem kovalens fluorofór jelölést alkalmaz, és képes az 5 kDa és 250 kDa közötti molekulatömeg tartományban lévő fehérjék elválasztására [75]. Régóta ismert, hogy a pozitív töltésű fenantridínium típusú

színezékek, például az etídium- és propidium alapú vegyületek, nem kovalens fluorofór jelölésre alkalmasak a DNS analízisében [76]. Ezek a fluorofór jelölők interkalálódnak a DNS szálakhoz. Azonban a fehérjék esetében csak ritka példa van arra, hogy etídium-bromid festéssel teszik láthatóvá azokat SDS-poliakrilamid lap-gélelektroforézis elválasztásokat követően [77].

## **4 Anyagok és módszerek**

### **4.1 Vegyszerek és reagensek**

A bórsavat, TRIS bázist, EDTA-t (etilén-diamin-tetraecetsav), glicerint, SDS-t, 2-merkaptoetanolt, nátrium-hidroxidot, sósavat és az acetont a VWR-től szereztem be. A foszforsavat, karbamidot, dextrán (2 MDa), a jódacetamid, a mezitil-oxid, ditiotreitolt, propidium-jodid és a belső standardként használt lizozim a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) lettek megvásárolva. A 10 kDa belső fehérje standardot, az SDS-MW módszerhez használt fehérje standard keveréket (20-225 kDa) és a mintaelőkészítő puffert (100 mM Tris-HCl, 1% SDS, pH 9) a cIEF mérésekhez a kit-et, amely tartalmazta az NCHO kapillárist a Bio-Science Kft.-től (Budapest, Magyarország) vásároltam meg. A humán IgG1-t (hIgG1) a Molecular Innovation-től (Novi, MI, USA) vásároltam. A terápiás mAb-t (daratumumab) a Janssen Biotech-től (Horsham, PA, USA) szereztem be. Az N-glikánok enzimatisz feliszabadításához használt enzim (6His-PNGaseF) a Pannon Egyetem Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratóriumtól (Pannon Egyetem) (Veszprém, Magyarország) származott. A kereskedelmi forgalomban kapható PNGaseF enzim a New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) cégtől származott. A propidium-jodid a Thermo Fisher Scientific-től (Waltham, MA, USA) került beszerzésre. Chromeo P503 jelölő reagenst az Active Motif-től szereztem be (Rixensart, Belgium). A PI mérésekhez használt fehérje standard keveréket (Broad range - 10 mg/mL) a Bio-Radtól (Hercules, CA, USA) szereztem be.

### **4.2 Ultrahíg pufferrendszerek elkészítése**

A 4% (w/v) bórsav tartalmú háttér elektrolitot TRIS bázissal és 2 mM EDTA-val pH 8 értékre állítottam, majd 10% (v/v) glicerint és 0,2% (w/v) SDS-t adtam hozzá. 20 mL pufferhez 200 mg dextrán (2 MDa) adtam, hogy 1%-os (w/v) polimeroldatot kapjak, mely egy éjszakán át szobahőmérsékleten volt kevertetve. Ezt az 1% dextrán tartalmú

pufferrendszert hígítottam az dextrans mentes pufferrel, hogy 0,5%, 0,1% 0,05% és 0,01% végkoncentrációjú dextrans tartalmú pufferrendszereket kapjak.

### 4.3 Propidium-jodid tartalmú gélek elkészítése

A PI jelöléssel történő CE elválasztásokhoz az ipari standard, 10% dextrans/4% bórsav tartalmú pufferrendszert alkalmaztam. A pufferrendszer alapját az ultra-híg géleknél leírt módon készítettem el, annyi különbséggel, hogy a dextrans végkoncentrációját 10%-ra állítottam be. A fluoreszcens detektáláshoz 10-200  $\mu\text{g/mL}$  PI-t adtam a gél-puffer rendszerekhez, úgy hogy a hígítási sorozatokat a PI-t nem tartalmazó gél-puffer rendszerrel állítottam be, tehát a legtöményebb (200  $\mu\text{g/mL}$ ) PI-t tartalmazó gél-puffert készítettem el elsőként, melyet egy éjszakán át, sötétben, szobahőmérsékleten kevertettem. Majd ezt hígítottam a továbbiakban a fluoreszcens festéket nem tartalmazó gélekkel, hogy 100, 50, 25, 10  $\mu\text{g/mL}$  PI tartalmú géleket kapjak.

### 4.4 Mintaelőkészítés

#### 4.4.1 N-glikán felszabadítás

Az enzimkinetikai vizsgálatok során 1,5-10  $\mu\text{L}$  10 mg/mL koncentrációjú hIgG1-et használtam szubsztrátként. A mintát 10  $\mu\text{L}$  végtérfogatra hígítottam (ha szükséges volt) és denaturáltam 2,0  $\mu\text{L}$  denaturáló reagens (SDS, DTT, Np-40, glicerin) hozzáadásával, majd 15 percig 70 °C-on inkubáltam. Ezután 20  $\mu\text{L}$  18 mM-os ammónium-acetátot adtam a denaturált mintákhoz, majd az N-glikánokat 1  $\mu\text{L}$  6His-taggal ellátott vagy kereskedelmi forgalomban kapható PNGaseF enzim (1,5 mU) hozzáadásával szabadítottam fel. A reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltam 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 perc időtartamokig. Az emésztési termékeket SDS-CGE módszerrel analizáltam a reakciósebesség követésének érdekében.

A terápiás antitest elválasztások esetében, mind az ultrahíg gélben történő és mind a PI tartalmú géles mérések során 20 mg/mL koncentrációjú mAb-ből (daratumumab) 5  $\mu\text{L}$  mennyiséget 2  $\mu\text{L}$  denaturáló reagens segítségével 15 percig 70 °C fokon denaturáltam, majd 1  $\mu\text{L}$  PNGaseF (200mU) enzim hozzáadásával a terápiás antitestben levő N-glikánokat részlegesen felszabadítottam, egy óra 37 °C fokos inkubációt alkalmazva így a mintáim tartalmazták a nem glikozilált nehézlánc alegységet is.

#### 4.4.2 Redukált mintaelőkészítés

A fehérje létra mérésekhez 5  $\mu\text{L}$  SDS-MW fehérje standard keverék lett összekeverve 2  $\mu\text{L}$  10 kDa belső standarddal és 5  $\mu\text{L}$  2-merkaptóetanollal. Az endoglikozidázzal

emésztett terápiás fehérje mintát 2  $\mu\text{L}$  10 kDa belső fehérje standarddal, 5  $\mu\text{L}$  2-merkaptoetanol redukálószerrel és 80  $\mu\text{L}$  SDS-MW mintapufferrel kevertem össze, majd 70 °C fokon 15 percig denaturáltam azokat és a redukálást követően könnyűlánc, nem glikozilált nehézlánc és nehézlánc fragmentumokat kaptam. A PI tartalmú elválasztások során, a redukált minta a 10 kDa belső standard helyett, a 14 kDa méretű lizozimet (10 mg/mL) tartalmazott, 5  $\mu\text{L}$  mennyiségben. A terápiás ellenanyag redukált formája ugyanúgy lett előkészítve, mint az ultrahíg gélek esetében. A PI tartalmú gélek esetében mért fehérje standardból 5  $\mu\text{L}$  mennyiséget kevertem össze 5  $\mu\text{L}$  2-merkaptoetannal és 80  $\mu\text{L}$  SDS-MW mintapufferrel.

#### **4.4.3 Nem redukált mintaelőkészítés**

A nem redukált, intakt mAb minta előkészítéséhez 5  $\mu\text{L}$  intakt fehérjét 2  $\mu\text{L}$  10 kDa belső standarddal, 5  $\mu\text{L}$  250 mM jódcetamid alkilálószerrel és 80  $\mu\text{L}$  SDS-MW mintapufferrel kevertem össze. Minden mintát 70 °C fokon 15 percig denaturáltam. A redukált és nem redukált mintákat nem kevertem össze a mérések során, az injektálások külön mintatartókból történtek.

#### **4.4.4 Minták fluoreszcens jelölése Chromeo P503 festékkel**

A Chromeo P503 fluoreszcens jelölő reagenst 1 mg/ml végkoncentrációban oldottam fel metanolban, és a törzsoldatot 4 °C-on tároltam. A nem redukált mintaelőkészítéshez 5  $\mu\text{L}$  intakt fehérjéhez 1,5  $\mu\text{L}$  250 mM jódcetamidot, 2,5  $\mu\text{L}$  10% SDS-t 15,5  $\mu\text{L}$  25 mM  $\text{NaHCO}_3$  puffert (pH 9,2) és 0,5  $\mu\text{L}$  Chromeo P503-t adtam és 60 °C-on 10 percig inkubáltam. A redukált PNGaseF emésztett minták esetében hasonlóan jártam el, de jódcetamid helyett DTT-t alkalmaztam a diszulfid hidak felbontásához és a mintaelegyet 90 °C-on 10 percig denaturáltam. Ezt követően a mintákat lehűtöttem és centrifugáltam (3000 x g 30 másodperc).

#### **4.5 Kapilláris gélelektroforézis**

A CE mérésekhez egy UV és lézerindukált fluoreszcens detektorral is felszerelhető P/ACE MDQ vagy PA800 plus Capillary Electrophoresis készüléket használtam (Beckman Coulter, Brea, CA). A méréseket 20 cm effektív hosszúságú (30 cm teljes hosszúságú), 50  $\mu\text{m}$  belső átmérőjű kezeletlen kvarc kapillárisal hajtottam végre. A kapillárisokat minden mérési nap elején, illetve minden mérés között kondicionáltam, azaz 3 percig 0,5 M NaOH-dal, 2 percig 0,5 M HCl-dal és 2 percig HPLC tisztaságú vízzel öblítettem, majd ezt követően az aktuális gél-puffer rendszerrel 4 percig töltöttem.

A mérések során alkalmazott elektromos potenciál minden minta injektálásakor 5 kV, illetve az elválasztáskor 15 kV volt, fordított polaritású módban (anód a detektálási oldalon). Minden esetben először az intakt mAb mintát injektáltam 20 másodpercig 5 kV elektrokinetikus injektálással, majd ezt követően a redukált mintát ugyanúgy 20 másodpercig 5 kV feszültséggel egy másik mintatartó edényből, hogy a redukálószert tartalmazó minta ne keveredjen az intakt molekulával. A 10 kDa belső fehérje standardot és a fehérje létrát 20 másodpercig 5 kV feszültséggel injektáltam az adott mérésekhez. Az elválasztási hőmérséklet 25 °C fok volt, és minden mérést háromszor ismételt meg (n=3).

#### **4.6 cIEF mérések**

A cIEF mérésekhez a PA800 plusz kapilláris elektroforézis berendezést használtam, 280 nm-es UV detektálással. Az elválasztásokhoz 50 µm belső átmérőjű és 20 cm effektív (30 cm teljes) hosszúságú NHCO típusú kapillárist használtam. A minta injektálás előtt a kapillárist 6 M karbamiddal 50 psi nyomáson 5 percig, majd HPLC minőségű vízzel 50 psi nyomáson 5 percig mostam. A mérésekhez cIEF Master Mixet alkalmaztam, mely mintánként 100 µL cIEF gélt, 3,75 M karbamidot, 24 µL Pharmalyte 3-10-et, 40 µL 500 mM L-arginint, 4,0 µL 200 mM iminodiacetsavat, 0,5-0,5 µL pI markert (4,1 és 10,0) tartalmazott. A 10 mg/mL koncentrációjú enzim mintákból 2 µL mennyiséget kevertem össze 100 µL cIEF Master Mix-xel. A minta injektálása úgy történt, hogy a kapillárist feltöltöttem a Master Mixbe kevert mintával (25 psi/100 s). A pH-gradiens kialakítását és a fókuszálást úgy kezdtem meg, hogy 833 V/cm elektromos teret alkalmaztam normál polaritású üzemmódban 15 percig úgy, hogy a bemeneti oldalon 200 mM foszforsav anolit míg a kimeneti oldalon 300 mM nátrium-hidroxid katolit oldat volt. Ezután a mobilizálást 1000 V/cm elektromos térerősséggel (30 kV) végeztem normál polaritású üzemmódban az anolit és a kémiai mobilizátor (350 mM ecetsav) között 45 percig 20 °C-os kapilláris hőmérsékleten.

##### **4.6.1 pI értékek meghatározása**

A mérések során alkalmazott 5 standard peptid marker pI értékeit (pI: 10,0; 9,5; 7,0; 5,5; 4,1) az azokhoz tartozó migrációs idők függvényében ábrázoltam. A pontokra egyenest illesztettem és a kapott egyenletből a PNGaseF enzimek cIEF elválasztása során kapott migrációs időkből kiszámoltam a fehérjékhez tartozó pI értékeket.

#### 4.7 Michealis-Menten kinetika

A minta cukortartalmának a reakciókinetikára gyakorolt hatásának vizsgálatához mindkét típusú enzimre Michealis-Menten diagramokat vettem fel. A reakció sebességeket a következő egyenlet szerint határoztam meg:

$$\text{Reakció sebesség} = \frac{hI_{gG1} \text{ koncentráció} \cdot \text{relatív ngHC area}}{\text{emésztési idő}} \quad (15)$$

A  $V_{\max}$  és  $K_M$  értékeket GraphPad Prism (San Diego, CA, USA) szoftver segítségével számoltam ki mindkét enzimre vonatkozóan, 1 mg/ml glükóz jelenlétében és anélkül a reakcióelegyben.

#### 4.8 Fizikai és elektrokinetikai paraméterek meghatározása

##### 4.8.1 Elektroozmotikus áramlás

Az EOF-t 50 mM mezitil-oxid segítségével mértem 254 nm hullámhosszon, minden gélpuffer rendszer esetében. A mérés a kapilláris rövid oldalán történt (10 cm), tehát az EOF markert minden esetben a kimeneti oldalról injektáltam elektrokinetikus módon a híg gélek, valamint a 10% dextrans tartalmú gélek esetében 5 kV 20 másodpercig. Az elválasztások fordított polaritású módban 15 kV feszültség mellett, 25 °C hőmérsékleten történtek. Az EOF méréseket 3-szor ismételttem meg, és markerből a kapott csúcsok migrációs idejének segítségével kiszámoltam annak mobilitását.

##### 4.8.2 Viszkozitás

A viszkozitás méréshez szintén a kapilláris elektroforézis berendezést és mezitil-oxid markert alkalmaztam. A markert hidrodinamikai injektálással (5 psi, 5 sec) jutattam a kapillárisba a bemeneti oldalon majd 20 psi nyomást (előre irányuló) adva a kapillárisra (elektromos feszültség adása nélkül) a marker a detektor felé mozdult. A viszkozitás értékeket a Hagen-Poiseuille (16.) egyenlettel számoltam ki, így állandó nyomás mellett a detektált idők felhasználásával meghatároztam a gélek viszkozitását.

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

A  $\eta$  [Pa s] a mért folyadék, ez esetben a gél viszkozitását adja meg az alkalmazott nyomás  $\Delta P$  [Pa], a belső kapilláris átmérő  $D$  [m] és az idő  $t$  [sec] függvényében, amely alatt a töltéssel nem rendelkező marker végig halad a kapilláris effektív (injektálási oldal-detektor közötti távolság) hosszán.

### 4.8.3 Áramerősség

Az áramerősség értékeit az elválasztások során alkalmazott 32Karat szoftver folyamatosan rögzítette, így ezen értékeket csak le kellett olvasni a diagramokról.

## 4.9 Az adatok kiértékelése

Az adatgyűjtéshez és analízishez a 32Karat (8.0 verzió) szoftvercsomagot (Beckman Coulter) és a Peakfit (4.12 verzió) szoftvert (SeaSolve, San Jose, CA) használtam, míg a számolásokhoz és az ábrakészítéshez a Graphpad Prism (8.0.1 verzió) és Excel programokat használtam.

### 4.9.1 Elektroforetikus mobilitás értékek meghatározása

A migrációs idők segítségével meghatároztam az SDS-fehérje és PI-SDS-fehérje komplexek látszólagos mobilitását ( $\mu_{app}$ ), valamint az adott közegre jellemző EOF mobilitások segítségével az effektív mobilitás értékeit ( $\mu_{eff}$ ). Minden elválasztó gél esetében az EOF a mintakomponensek migrációjával ellentétes irányban (katód irányába) haladt. Ezért a  $\mu_{app}$  értékekhez hozzáadtam a mért géltre jellemző EOF mobilitás értékeit, hogy megkapjam az  $\mu_{eff}$  értékeket az 17. egyenlet szerint

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

Az ultrahíg dextrán tartalmú pufferrendszerek esetében a pontosabb számolás érdekében a relatív mobilitás értékeit is kiszámoltam, azaz az adott analit effektív mobilitás értékeit osztottam a 10 kDa belső standard effektív mobilitásával.

### 4.9.2 Ferguson módszer

Gélelektroforézis során az analitok elektroforetikus mobilitását befolyásolja a polimer (T%) és a térhálósodás mértéke. A Ferguson diagramokat megkapjuk, ha a molekulák elektroforetikus mobilitásának logaritmusát ábrázoljuk a gél koncentráció függvényében. Ennek a meredeksége  $K_R$  retardációs együttható, mely arányos a molekulatömeggel.

$$\ln\mu = \ln\mu_0 - K_R T\% \quad (18)$$

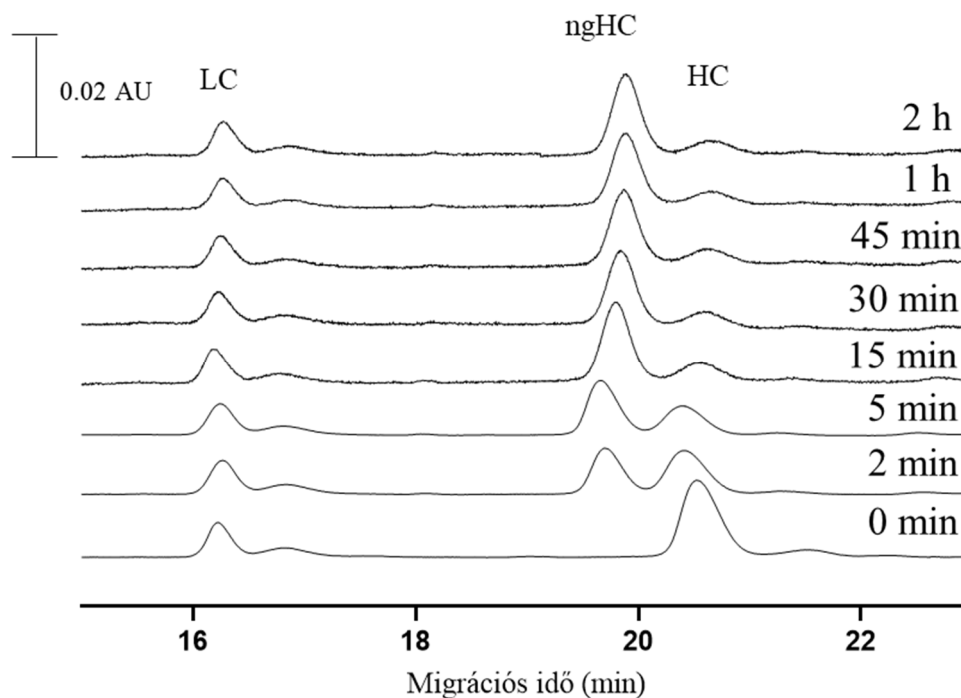
Ha több különböző fehérjéhez tartozó Ferguson ábrát készítünk és kiszámítjuk a  $K_R$  értékeit, azt kapjuk, hogy a  $K_R$  és az MW között lineáris kapcsolat van. Így egy ismeretlen fehérje MW értékének kiszámításához mindössze annyi szükséges, hogy megmérjük az ismeretlen és az ismert méretű standard fehérjék mobilitását különböző koncentrációjú

gékben majd kalibrációs egyenest vegyünk fel a standard fehérjék  $K_R$  értékeinek molekulatömeg függvényében való ábrázolásával.

## 5 Eredmények és következtetések

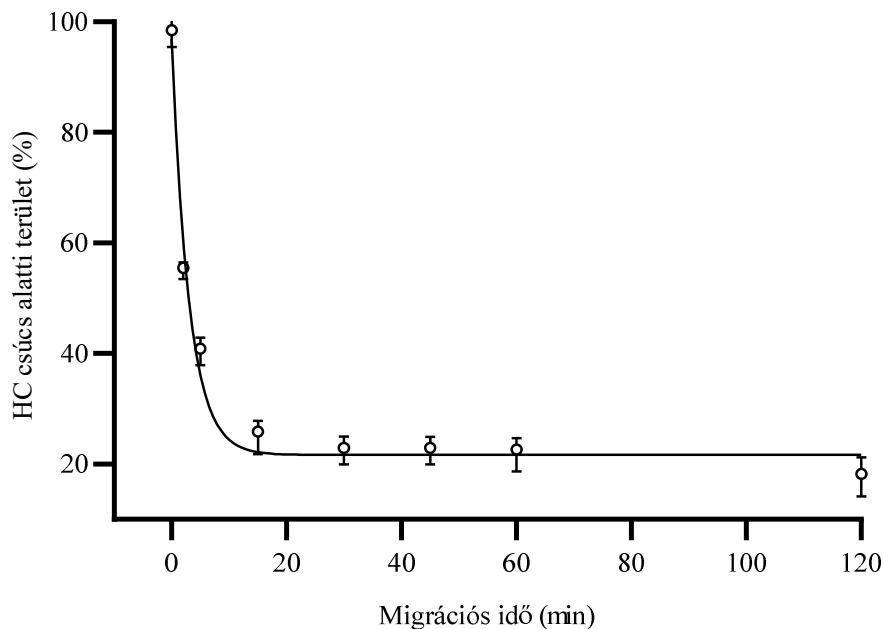
### 5.1 A 6His-PNGaseF enzim emésztési reakció kinetikája

Jelentős igény mutatkozik mind az alap, mind pedig az alkalmazott kutatásokban a PNGaseF enzim használata iránt, emiatt gyors és olcsó nagyüzemi előállítási módszerekre nagy szükség van. A Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratórium (Pannon Egyetem) a 6His-PNGaseF enzim nagyhozamú előállításáról számolt be [1]. Munkám során céljaim között szerepelt az optimális emésztési idő meghatározása az egyetemen belül előállított 6His-PNGaseF enzim esetében. Szubsztrátként hIgG1-t használva az enzim emésztési hatékonyságát vizsgáltam az emésztési idő függvényében. Az emésztési reakciót 120 percig követtem. Az endoglikozidáz emésztési reakció előrehaladtával a glikozilált HC csúcsterülete csökkent, míg a ngHC nőtt, melyet a 6. ábrán látható elektroferogramok mutatnak be.



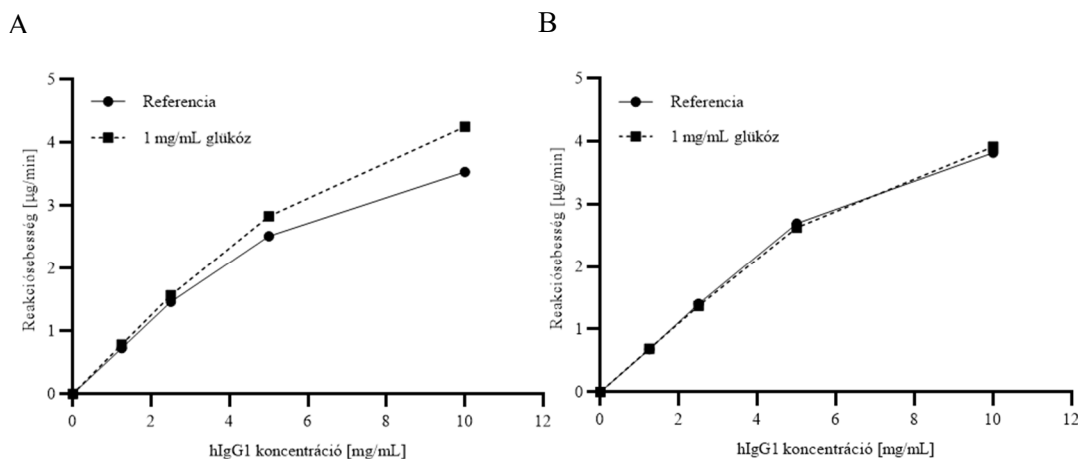
**6. Ábra:** A hIgG1 minta SDS-CGE analízise a különböző emésztési időkkel a 6His-PNGaseF enzim által 37 °C fokon. Körülmények: 30 cm teljes (20 cm effektív) hosszúságú, 50 µm belső átmérőjű BFS kapilláris; puffer: 4% bórsav pH 8-ra állítva TRIS segítségével, majd 2 mM EDTA, 10% glicerin, 0,2% SDS és 10% dextrans hozzáadásával; 25°C kapilláris, 20 °C mintatároló hőmérséklet; 5 kV 20 másodperc elektrokinetikus mintainjektálás; 15 kV fordított polaritású (katód az injektálás oldalán) elválasztófeszültség. UV detektálás 220 nm-en.

A 7. ábra a HC alegység csúcsterületének csökkenésén alapuló emésztési idődiagramot mutatja a házon belül előállított 6His-PNGaseF enzim használatával. Az első 15 percben szinte teljes deglikoziláció történt.



**7. Ábra:** Deglikozilációs idődiagram, amely a HC fragmentum csúcs alatti területének csökkenését mutatja az endoglikozidáz emésztés során a házon belül előállított 6His-PNGaseF használatával.

Ezért a Michaelis-Menten diagramok felvételéhez a 15 perces emésztési időintervallumot választottam. A minta cukortartalmának a reakciókinetikára gyakorolt hatásának megértése érdekében 1 mg/mL végkoncentrációban glükózt adtam a reakcióelegyekhez. A 8. ábra a kapott Michaelis-Menten diagramokat mutatja a relatív ngHC-csúcsterület %-os értékei alapján (15. egyenlet), 1 mg/mL glükóz jelenléte nélkül (folytonos vonal) és glükóz jelenlétében (szaggatott vonal) az emésztési reakcióban a saját gyártású 6His-PNGaseF felhasználásával. A reakciósebességeket a 15. egyenlet alapján határoztam meg.



**8. Ábra:** Michaelis-Menten deglikozilációs diagramok a házon belül előállított 6His-PNGaseF enzim A) és a kereskedelmi forgalomban kapható PNGaseF enzim B) felhasználásával, 1 mg/mL glükóz jelenlétében (szaggatott vonal) és anélkül (folytonos vonal, referencia).

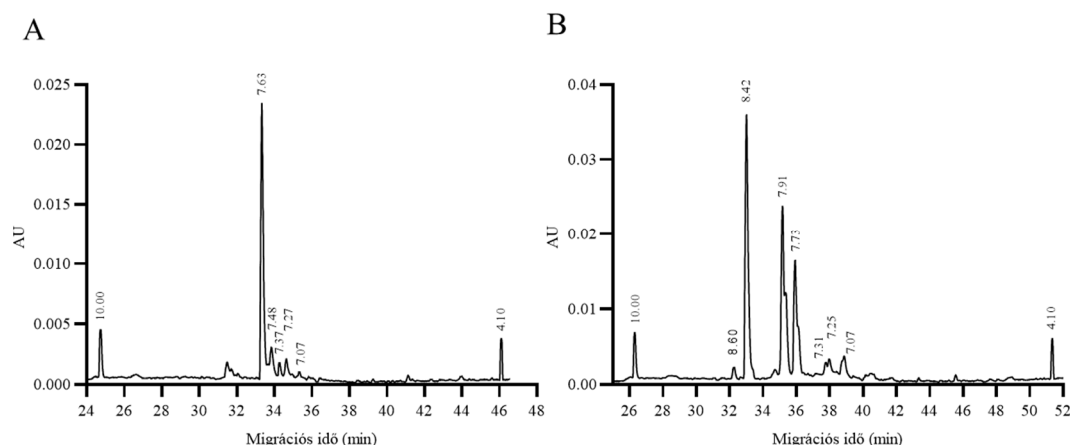
Mint megfigyelhető a 8. A) ábrán, a szubsztrát koncentráció növekedésével a reakciósebesség a glükóz jelenlétében nőtt. 10 mg/mL hIgG1 szubsztrát koncentráció mellett 1 mg/mL glükóz hozzáadása 16,8%-os javulást eredményezett a reakciósebességben. Ezért a glükózt a 6His-PNGaseF enzim aktivátorának lehet tekinteni. A 8. B) ábrán látható eredmények alapján az emésztés hatékonyságát egy általánosan használt, kereskedelmi forgalomban kapható PNGaseF enzim esetében is vizsgáltam. Erre az enzimre vonatkozó Michaelis-Menten diagramokat mutatja a 8. B) ábra a reakcióelegyben lévő 1 mg/mL glükózzal (szaggatott vonal) és anélkül (folytonos vonal, referencia). Ebben az esetben nem találtam jelentős különbséget a reakciósebesség között. A két enzim összehasonlítása érdekében kiszámoltam a  $V_{max}$  és  $K_M$  értékeket. Az eredményeket az 1. táblázat mutatja.

**1. Táblázat:** A maximális reakciósebességek ( $V_{max}$ ) és Michaelis-Menten állandók ( $K_M$ ) a 8. ábrán látható eredmények alapján a 6His-PNGaseF és a kereskedelmi PNGaseF esetében. A referenciaoszlopok a reakcióelegyben lévő 1 mg/mL glükóz nélküli értékeket mutatják.

	Kereskedelmi PNGaseF		6His-PNGaseF	
	Referencia	1 mg/mL glükóz	Referencia	1 mg/mL glükóz
$V_{max}$ (μg/min)	8,39 ± 0,17	9,43 ± 0,12	6,80 ± 0,07	9,73 ± 0,17
$K_M$ (nM)	81 ± 2,2	90 ± 2,5	59 ± 1,7	85 ± 2,3

A 6His-PNGaseF esetében történő emésztés során 1 mg/mL glükóz jelenlétében a reakciósebesség jelentősen nőtt, ellentétben a kereskedelmi enzimmel történő emésztés során. Amint 1. táblázat adatai mutatják, glükóz jelenléte nélkül a kereskedelmi enzim

$V_{\max}$  értéke 23%-kal magasabb volt, mint a 6His-PNGaseF  $V_{\max}$  értéke. 1 mg/mL glükóz reakció elegyhez történő hozzáadásával a 6His-PNGaseF enzim 3%-kal jobban működött, mint a kereskedelmi megfelelője glükóz jelenlétében. A glükóz hozzáadása azonban a kereskedelmi enzim reakciósebességét 12%-kal növelte, míg a 6His-PNGaseF enzim teljesítményében 43%-os növekedés eredményezett. Annak érdekében, hogy a reakciósebesség közti különbségeket megértsem, cIEF módszerrel vizsgáltam a 6His-PNGaseF és a kereskedelmi forgalomban kapható enzim töltésheterogenitását.



**9. Ábra:** KapillárisIEF elválasztások elektroferogramjai a saját gyártású 6His-PNGaseF (A panel) és a kereskedelmi PNGaseF enzim (B panel) esetében. A csúcsok feletti számok az azokhoz tartozó pI értékeket jelölik. Elválasztási körülmények: 20 cm effektív kapilláris hossz (30 cm teljes hossz, 50  $\mu$ M ID, NHCO bevonat); az alkalmazott fókuszáló és mobilizáló elektromos feszültség 25 kV és 30 kV volt, pI-markerek: 4,1 és 10,0. Elválasztási hőmérséklet: 20 °C. A minta a Master Mixbe lett keverve, és 25 psi nyomás alkalmazásával 100 másodpercig a kapillárisba töltve.

A 9. A) és B) ábrán láthatók a cIEF elválasztások elektroferogramjai, a profilok között jelentős különbségek mutatkoztak. A két endoglikozidáz enzim funkcionális csoportja feltételezhetően hasonló, de a 6His-PNGaseF enzim (9. A) ábra) csak egy domináns csúcsot mutatott pH 7,63-nál, jelentős savas és bázikus változatok nélkül. Az irodalmi adatok alapján 6 hisztidin címke a savas régió felé tolja el konjugátum pI-jét. Ezzel szemben a kereskedelmi enzim cIEF elválasztása során (9. B) ábra) kapott eredmények szerint a kereskedelmi PNGaseF enzim töltésheterogenitási mintázata összetettebb volt. pH 8,42-nél lévő fő csúcs mellett két fő savasabb izoforma jelent meg (pH 7,91 és 7,73). Ez arra utal, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható enzim feltételezhetően három PNGaseF enzim keveréke. Úgy vélem, hogy a savas változatok jelenléte és hiánya valamelyest felelős lehet a megfigyelt aktivitás változásokért a deglikozilációs reakció

során, glükóz jelenlétében. Tehát a glükózfüggő enzimaktivitásukban mutatkozó különbségek a szerkezeti eltérésekből adódhattak.

## 5.2 Az SDS-fehérje komplexek méret szerinti elválasztása híg és ultrahíg dextrans tartalmú pufferrendszerekben

Az értekezésben a híg és ultrahíg 2 MDa molekula méretű dextrans tartalmú gélek alkalmazása kerül bemutatásra a 20 és 225 kDa közötti fehérje standardok, valamint egy terápiás mAb intakt és alegység formáinak elválasztása esetében. Az elválasztásokhoz nulla és 1% közötti dextrans koncentrációkat alkalmaztam, miközben a háttélektrolit koncentrációja (425 mM Tris, 4% bórsav, 2 mM EDTA és 10% glicerin) állandó volt.

### 5.2.1 Fizikai paraméterek

Először az elválasztó mátrixokat a dextrans koncentráció függvényében (1,00%, 0,50%, 0,10%, 0,05% és 0%) olyan fontos fizikai paraméterek szempontjából karakterizáltam, mint a viszkozitás, EOF és az elektromos áramerősség 15 kV kapcsolófeszültség mellett.

**2. Táblázat:** A híg és ultrahíg dextrans alapú elválasztó mátrixok fontos elektrokinetikai és fizikai paraméterei.

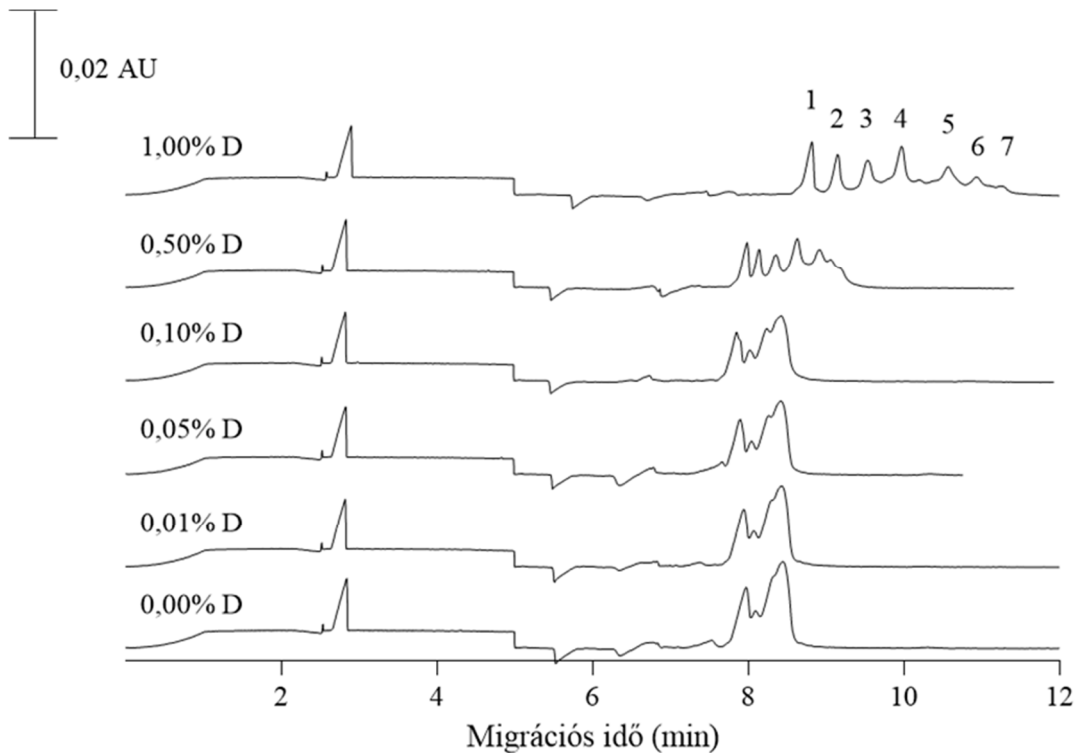
Dextrans koncentráció	1,00%	0,50%	0,10%	0,05%	0,01%	0,00%
$\mu_{\text{EOF}}$ ( $\times 10^{-9}$ ) [m <sup>2</sup> /V s]	4,08 ± 0,1	4,24 ± 0,1	4,29 ± 0,1	4,24 ± 0,1	4,17 ± 0,1	3,94 ± 0,1
Viszkozitás (mPa s)	7,3 ± 0,1	5,9 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,1
Áramerősség ( $\mu\text{A}$ )	36,8 ± 0,2	37,3 ± 0,2	37,8 ± 0,2	37,9 ± 0,2	37,9 ± 0,2	37,9 ± 0,2

Ahogy a 2. táblázat is mutatja a viszkozitás értékek 1,00%-0,10% dextrans koncentráció mellett folyamatosan csökkentek, majd 0,10%-tól 0,00%-ra csökkentve a polimer koncentrációt, a viszkozitás nem változott. Az áramerősség a dextrans koncentráció csökkenésével kismértékű emelkedést mutatott, feltételezhetően a csökkent dextrans/borát komplexképződés során felszabaduló protonok és a viszkozitás csökkenése miatt. A legnagyobb EOF mobilitás értékeket a 0,10% dextrans koncentráció mellett tapasztaltam. Az alacsony dextrans koncentrációval csökkenő viszkozitás, illetve növekvő áramerősség értékek feltételezhetően ellentétesen befolyásolták az EOF-t, ami a megfigyelt

maximumot eredményezhette. Azonban a mért értékekben nincs jelentős eltérés a dextrán koncentráció csökkenésével, hisz a polimer ilyen alacsony koncentráció tartományban minimálisan befolyásolja a mérés során kialakult EOF-t.

### **5.2.2 A fehérje standardok méret szerinti elválasztása**

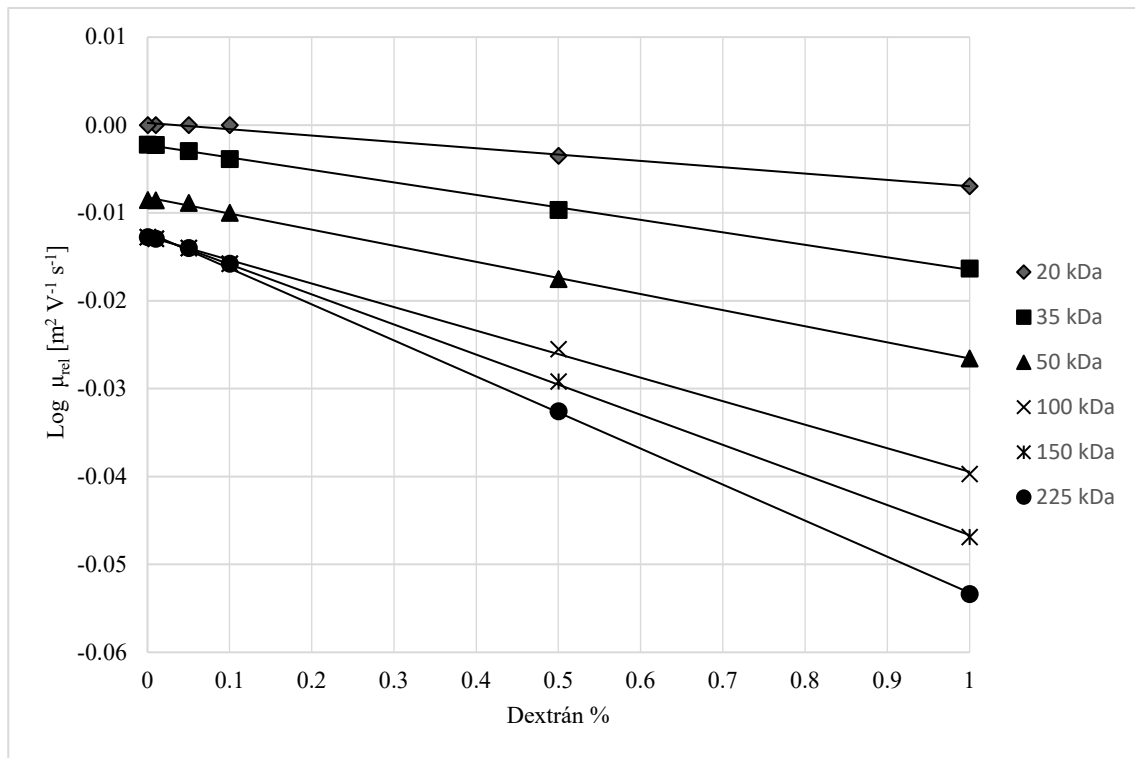
A fizikai paraméterek meghatározását követően a 20-225 kDa MW-tartományú standard fehérje létrát vizsgáltam a csökkenő dextrán koncentrációjú mátrixokban. A 10. ábra összehasonlítja az elválasztások során kapott elektroferogramokat. Az 1,00% és 0,50% dextránt tartalmazó háttérelktrolitoknál gyakorlatilag még mind a 7 csúcstól fel lehetett ismerni, bár a 6. és 7. csúcshoz tartozó standardok a 0,50%-os dextrán koncentrációnál már nagymértékű átfedést mutattak. A 0,10%-os dextrán tartalomtól kezdve az alacsonyabb MW-jú standardok közül csak néhányat lehetett azonosítani (1-4. csúcsok, MW < 50 kDa, de az 1. és 2. csúcsok átfedésben voltak), a nagyobb mintakomponensek (5-7. csúcsok, MW > 50 kDa) együtt migráltak. Ez a tendencia megfigyelhető volt az alacsonyabb (0,05% és 0,01%) és a 0% dextrán koncentrációknál is, ahol az átfedő 10 kDa belső standard és a 20 kDa fehérje létra csúcsok mellett csak a 35 kDa-os komponens volt megkülönböztethető, az 50 kDa vállcsúcsként, a többi nagyobb MW-jú (100, 150, 225 kDa) komponensek pedig együtt migráltak. Értelemszerűen ebben az esetben megfelelő koncentrációjú szűrő mátrix jelenléte nélkül nem várható méret alapú elválasztás, mivel ezek a fehérje standard molekulák poszttranszlációs módosulásokat nem hordozó polipeptidekből épülnek fel és nincs alakbeli különbség köztük így feltételezhetően nagyon hasonló felületi töltéssűrűséggel rendelkeznek az SDS-sel komplexet képzett formájukban.



**10. Ábra:** A fehérje standard MW létra elektroferogramjai csökkenő dextrán koncentrációjú háttérelktrolitban. Csúcsok: 1 - 10 kDa belső standard, 2 - 20 kDa, 3 - 35 kDa, 4 - 50 kDa, 5 - 100 kDa, 6 - 150 kDa és 7 - 225 kDa fehérje standard. Az elválasztási körülmények megegyeznek a 6. ábrával.

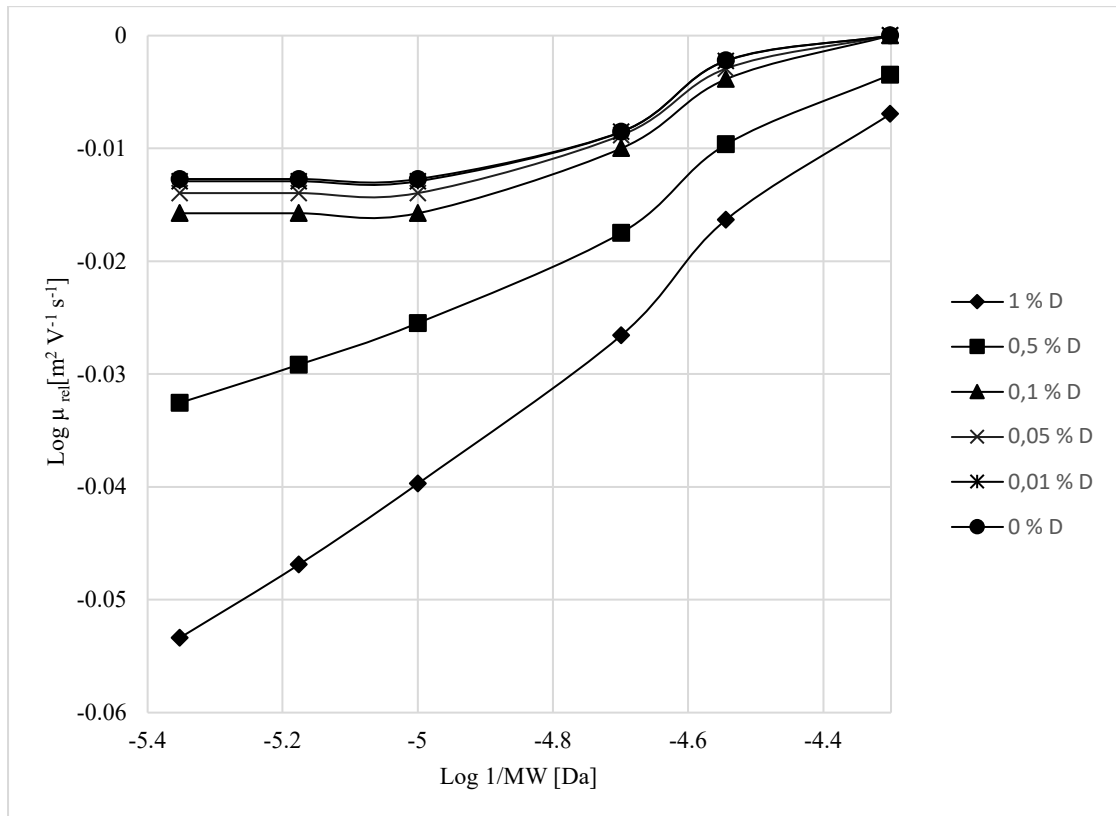
Annak érdekében, hogy megértsem a molekulaszűrő mechanizmusokat meghatároztam a fehérje standardok mobilitás értékeit 0-1,00% dextrán tartalmú gélek esetében. A dextrán koncentráció függvényében ábrázoltam a relatív effektív mobilitás értékeket a 20-225 kDa standardok esetében, melyet a 11. ábra mutat be. A Ferguson ábrák esetében megfigyelhetők a lineáris Ferguson egyenesek, melyek a korábbi vizsgálatok során mért irodalmi adatok alapján várható volt [51], hisz a Ferguson diagramok görbülete csak a 2%-nál nagyobb dextrán koncentráció esetében mélyült. Ahogy az ábrán látható, a nagy molekulású 100-225 kDa fehérjék Ferguson ábrái 0% dextrán koncentrációnál keresztelték egymást, ami azt jelenti, hogy a molekulák csak méretükben különböznek, de töltésükben nem, ami csak a tiszta méret szerinti elválasztásra (Ogston modellre) lenne jellemző. Azonban az ultra-híg polimer tartalmú, megfelelő mértékű összefonódás (azaz szűrőhatás) nélküli elválasztó közegekben nem ez volt megfigyelhető. Az alacsonyabb molekulású standardok Ferguson ábrái egymáshoz közeledtek, viszont nem keresztelték egymást 0% dextrán koncentráció mellett. Ez arra utal, hogy a molekula

méret csökkenésével növekszik a molekulák szabad oldatbeli mozgékonyága, feltételezhetően a méret és töltés alapú elválasztás kölcsönhatásának eredményeként.



**11. Ábra:** A fehérje standard létra sorozat Ferguson diagramja. A relatív mobilitás értékeket az adott gél-puffer rendszer EOF értékei alapján számoltam és a 10 kDa belső standard mobilitás értékére normalizáltam. Az így kapott relatív mobilitás értékek logaritmusát ábrázoltam a dextrán koncentráció függvényében.

A 12. ábra mutatja a különböző dextrán koncentrációk esetében a mért fehérje standardok reptációs diagramját, amely a logaritmus relatív effektív mobilitás értékeket a logaritmus reciprokok molekulatömeg függvényében ábrázolja.



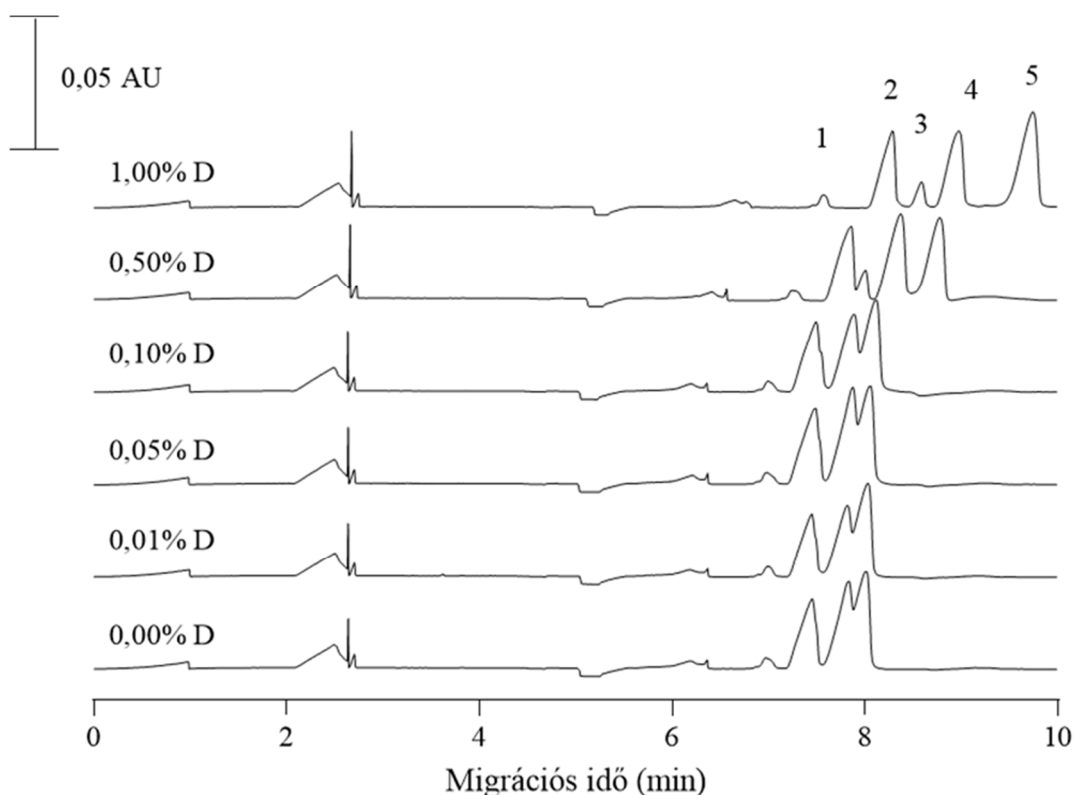
**12. Ábra:** A fehérje standard létra sorozat reptációs diagramja. A fehérjék relatív elektroforetikus mobilitás értékeit ábrázoltam a fehérjék logaritmus 1/molekulatömeg függvényében.

A reptációs elmélet szerint a nagyobb méretű biopolimerek reptációs mozgás szerint vándorolhatnak a kisebb pórusméretű polimer hálózatokon keresztül. A diagramon mért meredekség értékek nullához közeli értékeket adtak, ami arra utal, hogy a molekulaszűly változtatásával az analitok mobilitás értékei nem változnak jelentős mértékben. Ezenfelül nagyon hasonló viselkedést mutattak a nagy dsDNS fragmentumok ultra-híg HEC oldatokban történő vándorlásához, ezért a reptációs mechanizmust, miszerint a molekulák kígyószerű mozgással képesek átjutni az elválasztó közegen, elvettem.

### 5.2.3 Az intakt monoklonális antitest és alegységeinek méret szerinti elválasztása

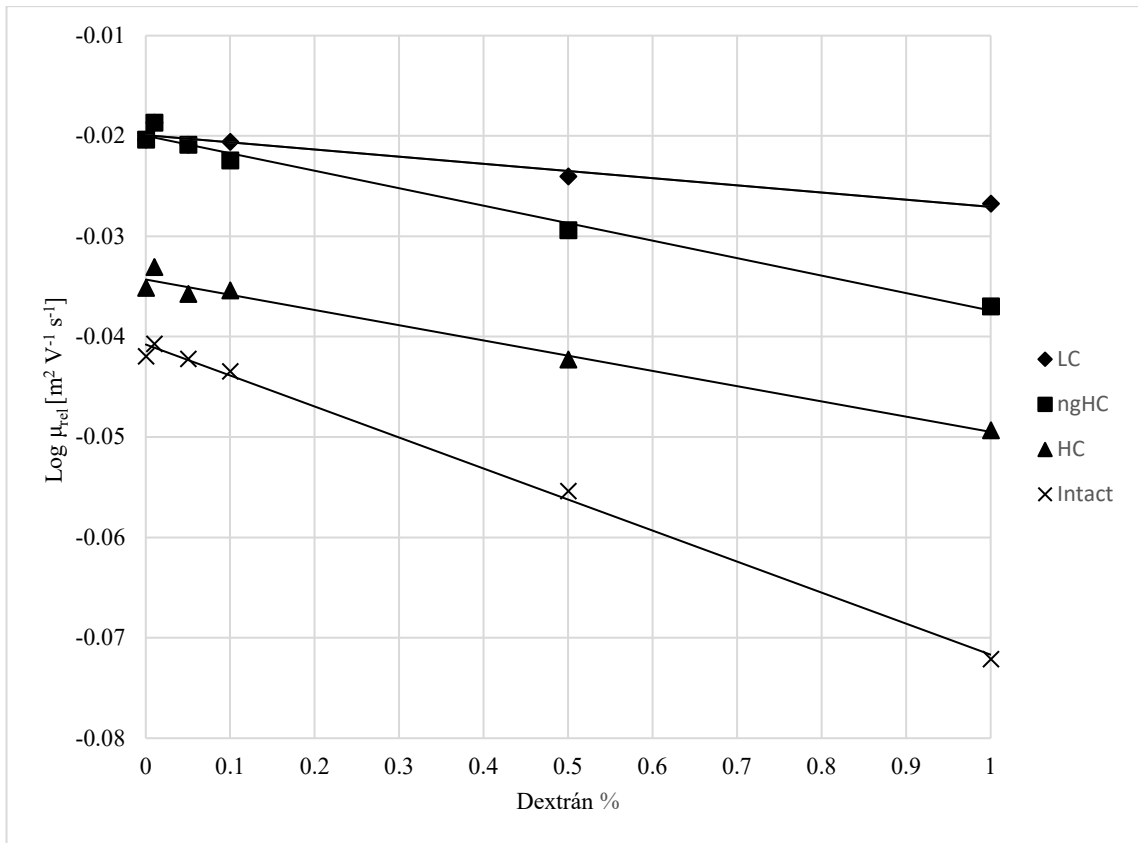
A daratumumab terápiás antitest intakt és alegység (LC, ngHC és HC) formáinak elválasztásával kapott elektroferogramokat a 13. ábra mutatja be. Az elválasztási körülmények megegyeztek az 10. ábrán bemutatottakkal. Megfigyelhető az elektroferogramokon a fehérje standard elválasztásokkal szemben, hogy a 10 kDa belső standard, az LC, HC és az intakt forma elválasztása még a 0% dextrán koncentráció mellett is megtörtént. Azonban megjegyzendő, hogy a dextrán koncentráció

csökkenésével a ngHC csúcs fokozatosan belesimult a LC csúcsba és 0,1% vagy annál alacsonyabb polimer koncentrációnál a két komponens együtt migrált.



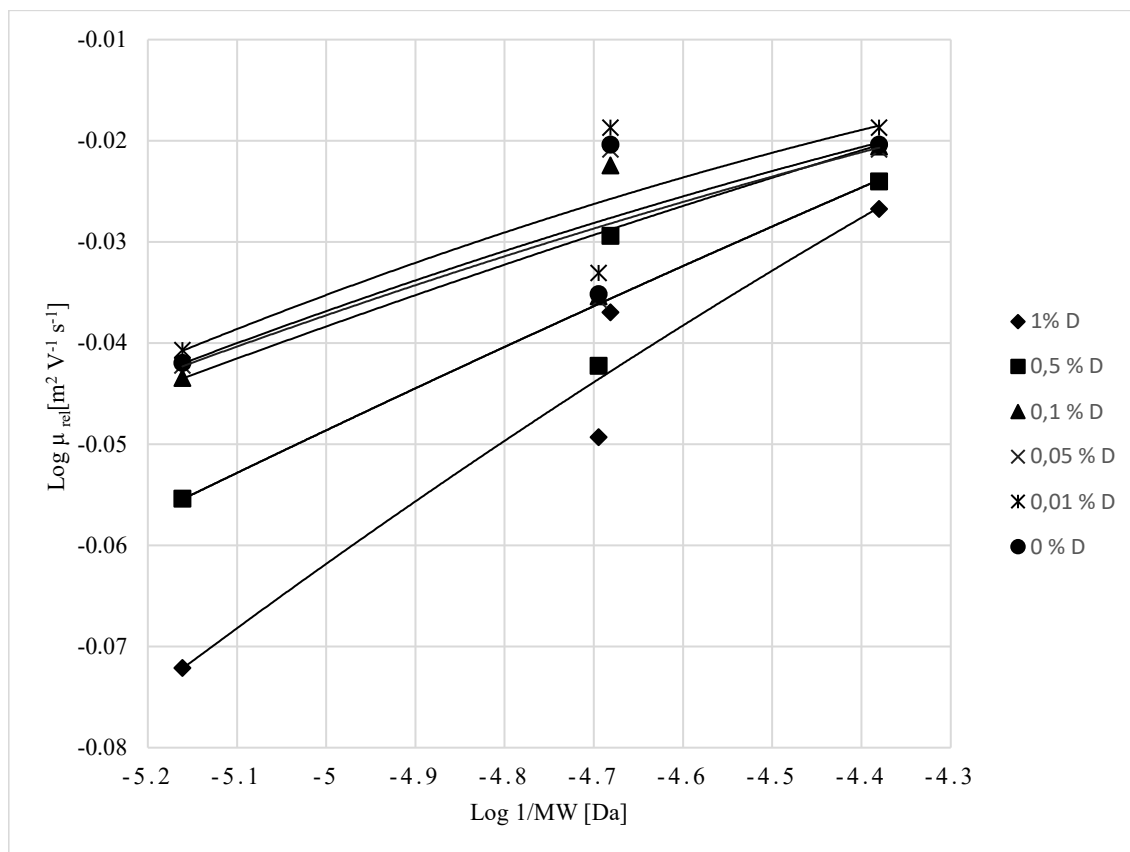
**13. Ábra:** Az intakt daratumumab terápiás antitest és alegységeinek elektroferogramjai csökkenő dextrán koncentrációjú háttérelktrolitban. Csúcsok: 1 - 10 kDa belső standard, 2 - LC, 3 - ngHC, 4 - HC, 5 - intakt mAb. Az elválasztási körülmények megegyeznek a 6. ábrával.

Az antitest mérésekből származó Ferguson és reptációs diagramokat a 14. és 15. ábrák reprezentálják. A LC és ngHC alegységek Ferguson diagramjai keresztelték egymást 0% gél koncentráció mellett, tehát a szabad oldatbeli mozgékonyosságuk megegyezett. A LC/ngHC, a HC és az intakt mintakomponensek viszont némileg egymáshoz közelítő lefutást mutattak, ami a kisebb méretű fehérje standardok esetében tapasztalt szinergikus méret és töltés szerinti elválasztásra utal.



**14. Ábra:** A daratumumab SDS-CGE elválasztásának Ferguson diagramja. A logaritmus relatív mobilitás értékeit a dextrán koncentráció függvényében ábrázoltam.

A reptációs ábrákon a logaritmus relatív effektív mobilitás értékek a logaritmus reciprok MW függvényében a 15. grafikonon látható. A kapott görbék lefutása alapján a reptációs mechanizmust elvettem ezekre a mintakomponensekre is.



**15. Ábra:** A daratumumab intakt és alegységeinek reptációs diagramja. A komponensek relatív elektroforetikus mobilitás értékek logaritmusát ábrázoltam a logaritmus 1/molekulatömeg függvényében.

#### 5.2.4 Szelektivitás és felbontóképesség

Annak érdekében, hogy a terápiás antitest esetében tapasztalt méret szerinti elválasztás mechanizmusát megértssem a szelektivitás ( $\alpha$ ) és felbontóképesség ( $R_s$ ) értékeket vizsgáltam, melyet a 3. táblázat mutat be.

**3. Táblázat:** Szelektivitás és felbontóképesség értékek az ngHC/ LC, HC/LC, HC/ngHC és az intakt mAb/HC csúcspárok között.

Dextrán koncentráció	1,00%	0,50%	0,10%	0,05%	0,01%	0,00%
$\alpha$ (ngHC/LC)	1,024±0,002	1,012±0,001	1,004±0,001	egységes	egységes	egységes
$R_s$ (ngHC/LC)	1,22±0,01	0,62±0,01	0	0	0	0
$\alpha$ (HC/LC)	1,083±0,001	1,065±0,001	1,053±0,001	1,053±0,001	1,050±0,001	1,046±0,001
$R_s$ (HC/LC)	2,45±0,02	1,73±0,02	1,20±0,01	1,11±0,01	1,04±0,01	1,01±0,01
$\alpha$ (HC/ngHC)	1,029±0,002	1,030±0,002	1,031±0,002	1,034±0,002	1,035±0,02	1,035±0,002
$R_s$ (HC/ngHC)	1,41±0,02	1,27±0,02	1,05±0,01	1,04±0,01	1,03±0,01	1,00±0,01
$\alpha$ (intakt/HC)	1,054±0,002	1,031±0,002	1,019±0,001	1,018±0,001	1,017±0,001	1,016±0,001
$R_s$ (intakt/HC)	2,04±0,02	1,10±0,01	0,61±0,01	0,56±0,01	0,54±0,01	0,51±0,01

A mérések során az intakt mAb és a HC fragmentumok részleges elválasztása volt megfigyelhető, azonban a LC alegység teljes elválasztását tapasztaltam az ultra-híg, sőt nulla dextrans koncentráció mellett is. Ez arra utal, hogy a korábban bemutatott, 1:1 dextrans-borát adduktokkal történő komplexképződési jelenség és a konfiguráción alapuló alakszelektivitás szerepet játszhatott az elválasztásban. Ezért első közelítésként a látszólagos szelektivitást a következő három komponens szempontjából vizsgáltam: i) molekulatömeg alapú méretszelektivitás ( $\alpha_{MW}$ ), ii) borát-dextrans 1:1 addukt által közvetített komplexképződési szelektivitás a glikozilált nehézlánccal ( $\alpha_C$ ) és iii) alakszelektivitás ( $\alpha_{alak}$ ):

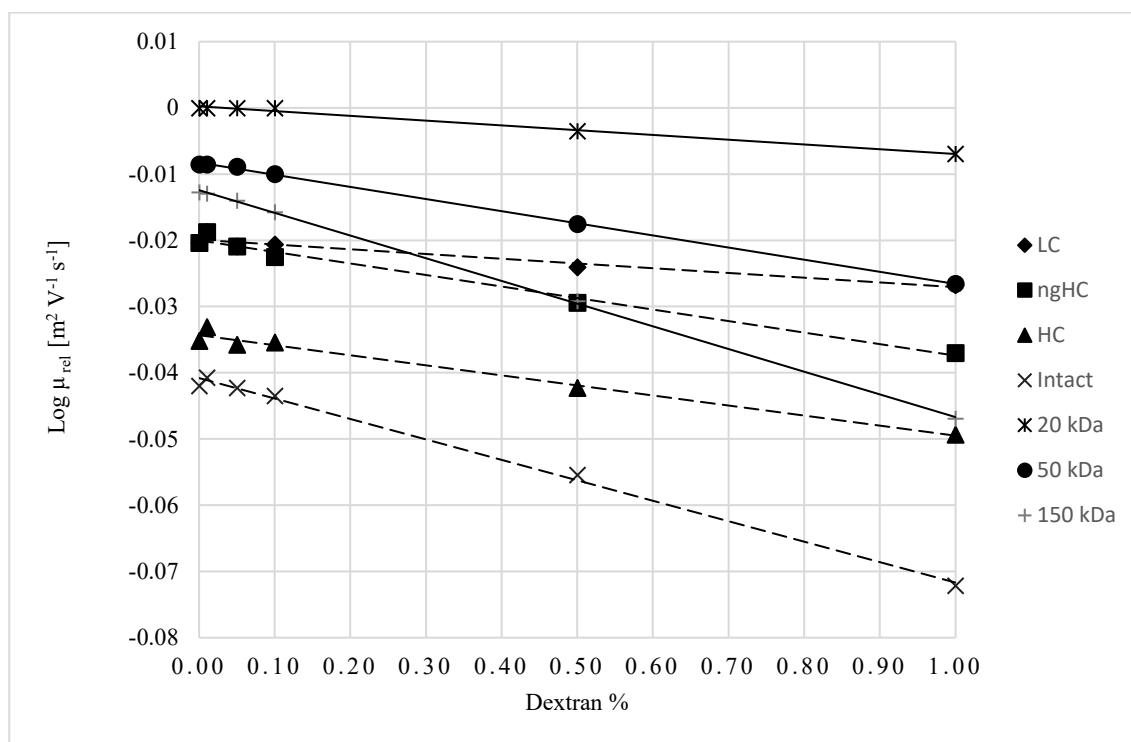
$$\alpha = \alpha_{MW} * \alpha_C * \alpha_{alak} \quad (19)$$

A 19. egyenlet azt mutatja, hogy még molekulaszűrés ( $\alpha_{MW} = 1$ ) és komplexképződés ( $\alpha_C = 1$ ) nélkül is, az alakszelektivitás eredményezheti a mintakomponensek bizonyos mértékű elválasztását. A 3. táblázat az ngHC/LC, HC/LC, HC/ngHC és az intakt/HC csúcspárok közötti szelektivitás ( $\alpha$ ) és felbontás ( $R_s$ ) értékeket mutatja. Mint megfigyelhető, az  $R_s$  értékek a dextrans koncentráció csökkenésével minden mintakomponens-pár esetében csökkentek. A  $\alpha$  értékek bár csökkentek az ngHC/LC, HC/LC és az intakt/HC csúcspárok esetében, de nőttek a ngHC és a glikozilált HC nehézláncc-fragmentumok között. Ez utóbbi megfigyelés szoros összhangban állt kutatócsoport korábbi munkájával [51], azaz a glikozilált és nem glikozilált SDS-fehérjék között alacsonyabb dextrans koncentráció mellett, magas borát koncentrációjú környezetben jobb felbontás érhető el, ami fontos információ az elválasztás optimalizálásához. A 3. táblázat utolsó oszlopának (0% dextrans) az  $\alpha_{alak}$  szükséges figyelembe venni, hisz ebben az esetben nincsenek jelen a dextrans-borát láncok az elválasztó háttér elektrolitban, hogy a méret- vagy komplexképződésen alapuló elválasztást lehetővé tegyék. Az alakszelektivitás az intakt mAb és alegységeinek analízise során valószínűleg a HC fragmentumon lévő nagyméretű, nem-SDS-kötő hidrofil glikán oldalláncból és az intakt molekula Y alakjából ered. Míg a HC/intakt analitpárok felbontás értékei némileg csökkenő tendenciát mutattak alacsonyabb dextrans koncentrációknál, a nagyobb molekulásúly tartományban meredekebb volt a csökkenés, amint az a 10. és 13. ábra profiljain megfigyelhető. Mivel az ngHC (MW ~ 48 kDa) és az LC (MW ~ 24 kDa) nem rendelkezett glikozilációs módosításokkal, elhanyagolható alakszelektivitásuk gyakorlatilag nem eredményezett elválasztást 0,10%-os és annál

kisebb dextrans koncentrációjánál, hisz nagyon korlátozott szűrő képességű háttérelektrolitokat tartalmazott.

### 5.2.5 Migrációs mechanizmus híg és ultrahíg gélek esetében

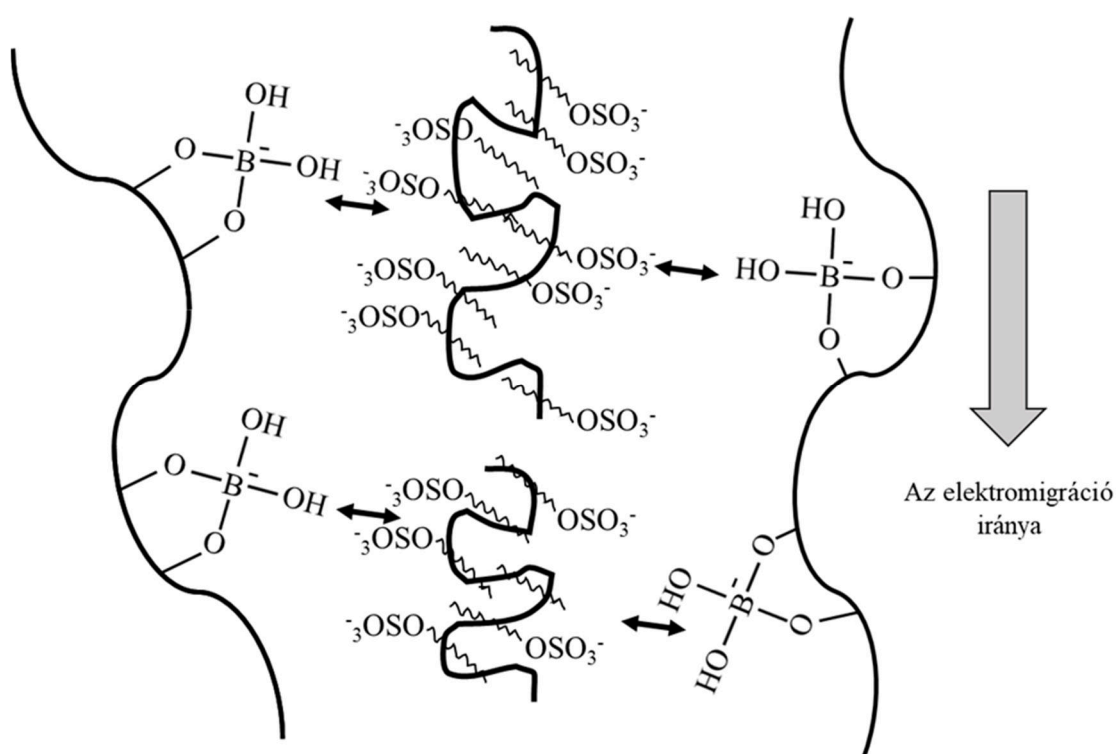
A 16. ábra mutatja be az összehasonlító Ferguson diagramokat a hasonló MW-ű fehérje standardok (20, 50 és 150 kDa, folytonos vonalak) és az alegységek, valamint az intakt mAb molekulák (24 kDa - LC, 48 kDa - ngHC, 50 kDa - HC és 148 kDa - intakt, szaggatott vonalak) között. A 20, 50 és 150 kDa méretű standardok, valamint az LC, HC és intakt mAb komponensek megfelelő Ferguson diagramjai párhuzamosak voltak, azaz a szabad oldatban való mozgékonyáguknak eltérőnek kellene lennie, valószínűleg alakbeli eltéréseik miatt, mivel töltöttségi állapotuknak nagyfokú hasonlóságot kell mutatnia, figyelembe véve az irodalomban általánosan elfogadott 1,4 g SDS-hez kötött 1,0 g fehérje által meghatározott szabályt.



**16. Ábra:** Az összehasonlító Ferguson diagramok a 20, 50 és 150 kDa fehérje standardok (folytonos vonalak) és az LC (MW=24 kDa), ngHC (MW=48 kDa), HC (MW=50 kDa) alegységek és az intakt mAb (MW=148 kDa) (szaggatott vonalak) esetében.

Az ngHC diagram viszont az intakt mAb-hez hasonló meredekséget mutatott, de nagyobb mobilitással, és nulla dextrans koncentrációjánál keresztezte az LC-diagramot. Fontos megjegyezni, hogy a fehérje standardok effektív mobilitás értékei nagyobbak voltak, mint a megfelelő méretű mAb-hez kapcsolódó párjuké, ami az utóbbiak esetében nagyobb

hidrodinamikai térfogatra utal, egyébként feltételezhetően hasonló felületi töltéssűrűség mellett, lassabb elektromigrációt eredményezett az ellenáramú EOF-fel szemben. A korábban bemutatott eredmények alapján, az elválasztó mátrixban csökkenő szűrő hálózatokkal az Ogston-modell (beleértve a kiterjesztett Ogstont is) és a reptációs mechanizmusok nem tudták leírni az SDS-fehérje komplexek különböző elektromigrációját ultrahíg és polimert nem tartalmazó háttér elektrolitok esetében. A Barron és munkatársai által javasolt tranziens összefonódás modell [62] sem volt alkalmazható a negatív töltésű tetrahidroxiborát által keresztköötött dextransláncok és a szintén negatív töltésű SDS-fehérje komplexek taszító tulajdonságai miatt, ahogyan azt az 1. séma vízszintes kettős nyilakkal mutatja.



**1. Séma:** Az SDS-fehérje komplexek migrációs mechanizmusa ultrahíg gélek esetében. A negatív töltésű tetrahidroxiborát borította dextransláncok (1:1 adduktok) és az SDS - fehérje komplexek közötti taszító tulajdonságok. A vízszintes fekete kettős nyilak jelölik az elektrosztatikus taszító tulajdonságokat, a nagy szürke függőleges nyíl a komponensek elektromigrációját mutatja.

Ezért az 1,00% - 0,50%-os dextranskoncentrációknál az 1:1 addukt alapú boráttal fedett dextransláncok néhány lehetséges 2:1 addukttal (keresztköötés) képezhetnek némi hálózatot (retikulációt), ami megfelelő molekulaszűrést eredményez a posztranszlációs módosulásokat nem tartalmazó fehérje standardok számára. Alacsonyabb dextrans

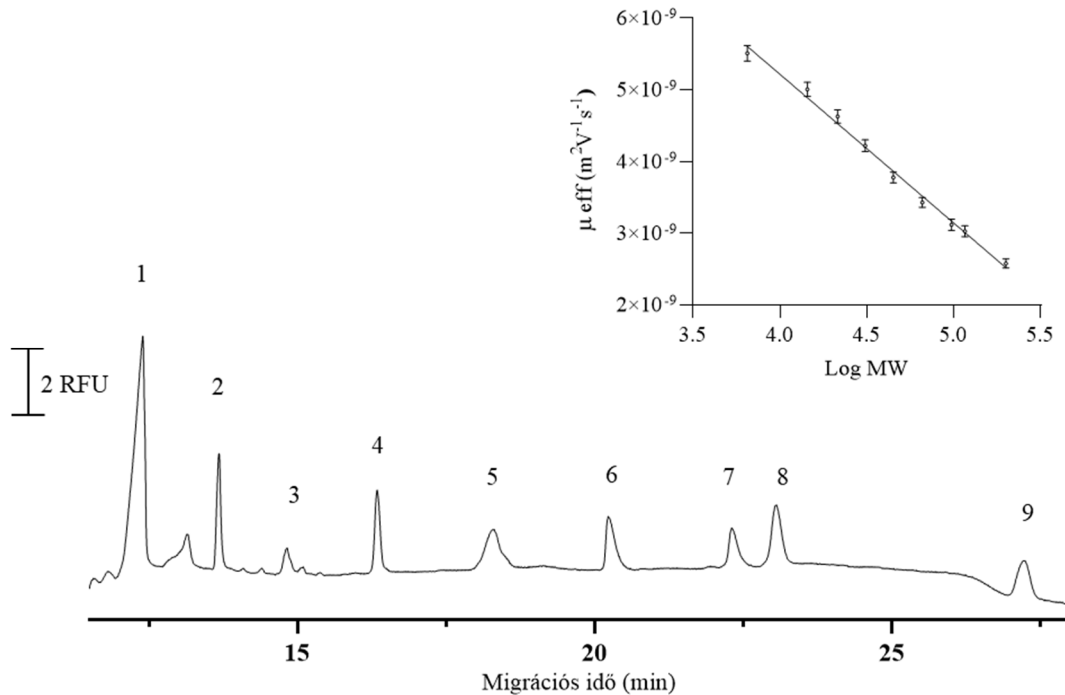
koncentrációnál a negatív töltésű SDS-fehérje komplexek a töltés taszítás miatt nem tapadó/nem-összekapcsolódó módon találhatják el a véletlenszerűen eloszló negatív töltésű 1:1 borát-dextrán addukt láncokat, és addig billeghetnek, amíg le nem csúsznak és lefelé vándorolnak, ahogy azt korábban Calladine és munkatársai [78] javasolták. Ez a rövidebb rúdszerű fehérjék esetében történhet meg, míg a hosszabb fehérjeláncok nagyobb perzisztencia hosszúságú szegmensekkel cérnaszálként átpördülhetnek és lecsúszás után tovább vándorolhatnak, ami a megfigyelt elválást eredményezi alacsonyabb dextrán koncentrációknál, mivel a keresztkötésen (2:1 adduktok) alapuló polimerhálózat kialakulása csak kis valószínűséggel fordul elő.

### **5.3 Propidium-jodid, mint fluoreszcens festék alkalmazása terápiás fehérjék elválásakor SDS-CGE esetében**

Az értekezés következő része egy új típusú, elválás közbeni (in-migráció) fluoreszcens jelölési technikát vezet be a terápiás fehérjék analitikai vizsgálatára. Kutatómunkám során sikeresen alkalmaztam a korábban csak nukleinsavak jelölésére használt PI-t, mint nem kovalens módon kötődő fluoreszcens jelölő anyagot, SDS-CGE módszer esetében. Az előző részben bemutatott terápiás mAb-t (daratumumab) alkalmaztam mintaként ezen elválások során is. Az antitest intakt és aegység formáinak elválását hasonlítottam össze a PI-t tartalmazó és PI nélküli háttérelitrok esetében. Vizsgáltam a propidium ligandum koncentrációjának hatását az elektroforetikus mobilitásra, a csúcsterületekre, az elméleti tányérszámra és a felbontóképességre.

#### **5.3.1 Az SDS-fehérje komplexek CGE elválása propidium-jodid jelenlétében**

A PI, mint fluoreszcens festék elválás közbeni alkalmazásának lehetőségét először egy fehérje standard mintán teszteltem. A standard minta a fehérjék széles MW tartományát lefedi (6,5 kDa-200 kDa), mely komponensek izoelektromos pontja eltérő, illetve többféle poszttranszlációs módosulást hordoznak.



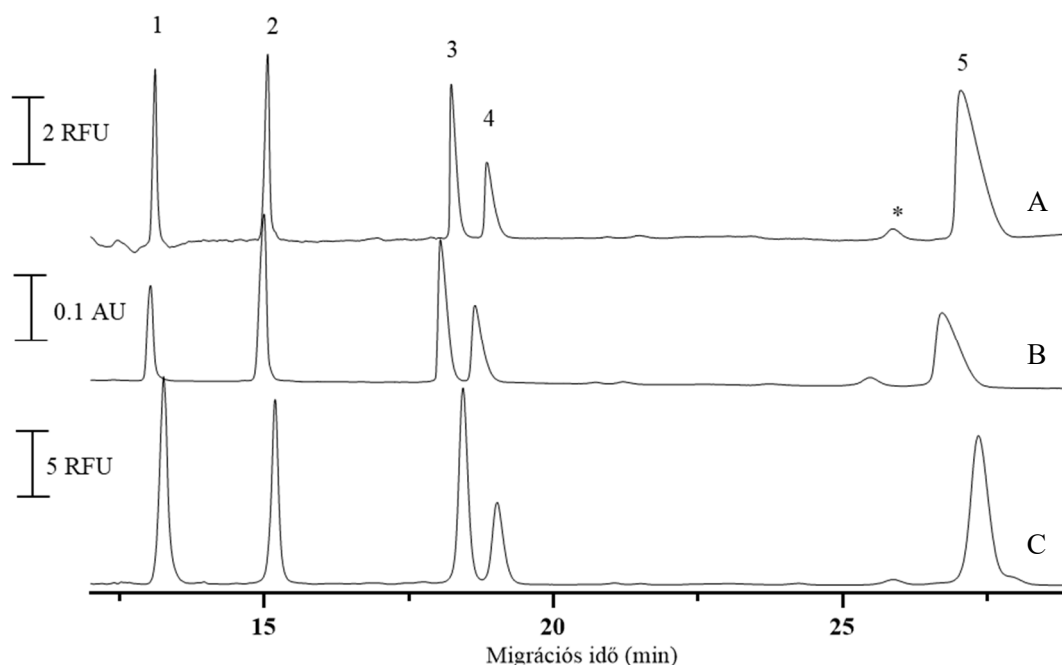
**17. Ábra:** A standard fehérje sorozat elektroferogramja 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI tartalmú gél esetében, LIF detektálással, gerjesztés 488 nm / emisszió 600 nm. Csúcsok: 1 - aprotinin (6,5 kDa), 2 - lizozim (14,4 kDa), 3 - tripszin inhibitor (21,5 kDa), 4 - karbonátnhidráz (31 kDa), 5 - ovalbumin (45 kDa), szérumalbumin (66,2 kDa), 7 - foszforiláz B (97,4 kDa), 8 -  $\beta$ -galaktozidáz (116,2 kDa) és 9 - miozin (200 kDa). Körülmények: 30 cm teljes (20 cm effektív) hosszúságú, 50  $\mu\text{m}$  belső átmérőjű BFS kapilláris; gél: 4% borsav pH 8-ra állítva TRIS segítségével majd 2 mM EDTA, 10% glicerin, 0,2% SDS, 10% dextrans, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI hozzáadása; 25°C kapilláris, 20 °C mintatároló hőmérséklet; 5 kV 20 másodperc elektrokinetikus mintainjektálás; 15 kV fordított polaritású (katód az injektálás oldalán) elválasztófeszültség. A jobb felső sarokban standard fehérjék logaritmikus MW és effektív mobilitása közötti összefüggés látható.  $R^2=0,993$

A 17. ábra mutatja az LIF detektálással kapott elektroferogramot a fehérje standard létra esetében. Az elválasztás 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI koncentráció mellett történt. Az eredményül kapott elektroferogram igazolja a PI elválasztás közbeni alkalmazhatóságát általánosan a fehérjék esetében fluoreszcens detektálás esetén. A 17. ábra jobb felső sarkában látható a standardhoz tartozó fehérjék effektív mobilitásának függvényében a logaritmus MW-hez tartozó grafikon, amely jó linearitást mutat ( $R^2=0,993$ ). Ez arra utal, hogy a gél-puffer rendszer kiváló molekulaszűrő képessége a PI jelenlétében is megmaradt, ezt figyelembe véve kezdtem el a terápiás mAb alegységeinek analízisét a továbbiakban.

### 5.3.2 Terápiás antitest SDS-CGE elválasztása propidium-jodid jelenlétében

A 18. ábra hasonlítja össze az intakt mAb és alegységeinek elválasztásából származó elektroferogramokat. Az alsó C) elektroferogramon látható a kovalensen (Chromo-P503) jelölt minta LIF detektálás során, a középső B) elektroferogram az UV detektálás

által azonosított csúcsokat mutatja, mely során az elválasztó mátrix PI-t nem tartalmazott, míg a felső A) elektroferogram a LIF detektor által mért adatokat, 100  $\mu\text{g/mL}$  PI koncentráció mellett.



**18. Ábra:** A daratumumab intakt és alegységeinek (LC, ngHC, HC) SDS-CGE elektroferogramjai. Elektroferogram A): LIF detektálás 100  $\mu\text{g/mL}$  PI tartalmú gél esetében. B): UV detektálás PI nélküli elválasztó gélben. C): LIF detektálás kovalens fluorofór (Chromo P503) jelölést követően PI nélküli gélben. Csúcsok: 1 - lizozim (belső standard), 2 - LC, 3 - ngHC, 4 - HC és 5 - intakt mAb. A csillag a nehéz-nehez-könnyűlánc fragmentum szennyeződést jelöli. Az elválasztási körülmények megegyeznek a 17. ábrával.

A mérések során belső standardként lizozimet alkalmaztam, az ehhez tartozó csúcsot 1-es számmal jelöltem. Továbbiakban a 2-es szám jelöli a LC-t, 3-as az ngHC-t, 4-es a HC-t és az 5-ös az intakt mAb-t. Az elektroferogramok ábráján megfigyelhető, hogy az összes mintakomponens migrációs ideje a PI-t tartalmazó gél-puffer rendszerben némileg lassabb volt (A elektroferogram), mint a fluorofór komplexet nem képző megfelelőik (B) elektroferogram). A jelenséget az alacsonyabb felületi töltéssűrűség okozhatja, mely a nem kovalens módon kötött pozitív töltésű jelölőanyag és a csökkent ellenáramú EOF által kifejtett, csökkent retardáció együttes hatásának eredménye. A kovalensen jelölt mintakomponensek elektroforetikus mobilitása is kisebb volt a PI-t nem tartalmazó pufferrendszerben (C elektroferogram), mint a nem jelölt mintáké ugyanabban a pufferrendszerben (B elektroferogram), valószínűleg a kovalensen kötött fluoreszcens

festék többlettömege miatt. Az eltérő csúcsmagasságok és csúcs alatti területek az elektroferogramok között valószínűleg az eltérő detektáló (UV vs. LIF) és jelölő (nem kovalens vs. kovalens) módszerek használatából adódtak.

Egy másik érdekes megfigyelés a három jelölési módszer között a csúcshatékonyság és felbontásbeli különbségekben mutatkozott meg. A 4. táblázat mutatja az elméleti tényérszám és  $R_s$  értékeket a 18. ábra három elektroferogramja esetében.

**4. Táblázat** A 18. ábrán elválasztott csúcsok elméleti tényérszám (N, felső panel) és felbontóképesség ( $R_s$ , alsó panel) értékeinek összehasonlítása.

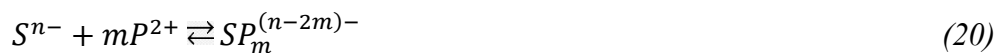
Csúcsok	1 (Liz)	2 (LC)	3 (ngHC)	4 (HC)	5 (mAb)
LIF, PI	78310	82369	104890	52025	20506
UV	61717	52193	55236	50789	19039
LIF, Chromeo	26634	28416	26709	27042	25600
Csúcs párok	Liz/LC	LC/ngHC	HC/ngHC	mAb/HC	
LIF, PI	9,81	14,48	2,16	14,16	
UV	8,25	1,79	1,65	13,76	
LIF, Chromeo	6,04	7,94	1,41	14,07	

Az intakt mAb kivételével a  $R_s$  és N értékei a PI-dal jelölt minták esetében mutatták a legmagasabb értékeket, ezt követték a nem jelölt minták a PI-t nem tartalmazó gél-puffer rendszerben UV-detektálással, végül a legalacsonyabb értékeket a kovalensen jelölt minták esetében kaptam. Ez arra utal, hogy a kovalens jelöléssel szemben a nem kovalens in-migrációs jelölés homogénebb, és a dsDNS-molekulák vizsgálatához hasonlóan [79] a  $R_s$  növelését is segítette. A kovalens jelölés során problémás egy fehérjén az összes rendelkezésre álló reaktív hely egységes jelölését elérni, ami nem jelölt, részben jelölt és teljesen jelölt formák keveredését eredményezi, ez pedig sávszélesedést okozhat [69], amint azt a 4. táblázat is mutatja. Érdekes módon a kovalensen jelölt intakt mAb elméleti tényérszáma magasabb volt, mint jelölés nélkül vagy PI festéssel. Úgy vélem, hogy ez az elektromigrációs diszperzióknak tudható be. A mintakomponensek és a pufferrendszer kationjainak mobilitás értékei eltérnek, amely negatívan befolyásolja csúcshatékonyságot és ezáltal az  $R_s$ -et, mint azt kutatócsoportunk korábban már bemutatta [52].

### 5.3.3 Az SDS-fehérje komplexek propidium-jodidos in-migráció jelölésének elmélete

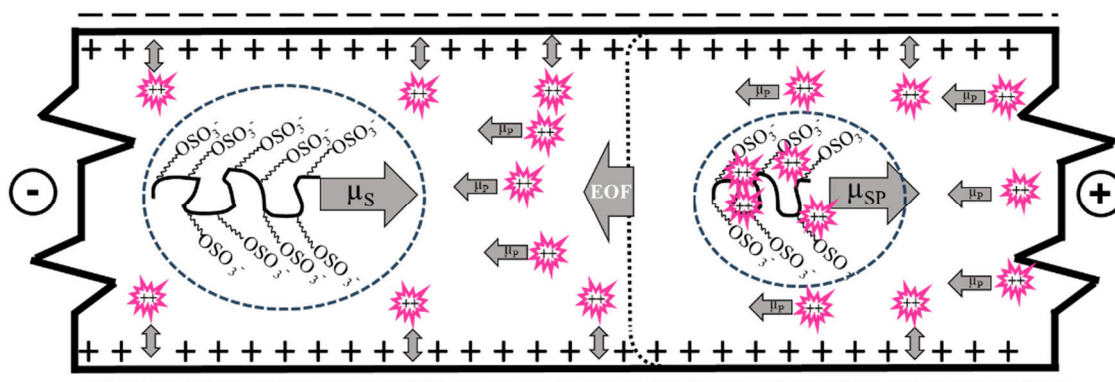
A propidium ion ( $P^{2+}$ ), mint általános biomassza festék, az elválasztás közben (in-migráció) az SDS-fehérjékhez ( $S^{n-}$ ) kötődik egy egyensúlyi reakcióban (20. egyenlet), nem kovalens módon. Ez erős fluoreszcenciát biztosít az így kialakult SDS-fehérje-

propidium ( $SP_m^{(n-2m)-}$ ) adduktoknak. A kapcsolódó propidium ion kétszeres pozitív töltése miatt az SDS-fehérje-propidium komplex felületi töltéssűrűsége csökken, következésképpen csökken a komplex elektroforetikus mozgékonyága is.



$$K = \frac{[SP_m^{(n-2m)-}]}{[S^{n-}][P^{2+}]^m} \quad (21)$$

ahol K a komplexképződési állandó, n a fehérjéhez kötődött negatívan töltött SDS molekulák száma (nagyjából egy SDS két aminosav arányban), és m a fehérjéhez kötött komplexképző propidium ligandumok száma az SDS-fehérje-propidium adduktban. Megjegyzendő, hogy  $n > m/2$ , különben az elektromigráció iránya megfordulna.



**2. Séma:** Az in-migrációs fluorofór jelölés sematikus ábrázolása. Az SDS-fehérje komplexek ( $\mu_s$ ) a katód felől az anód irányába migrálnak. A pozitív töltésű propidiumionok ( $\mu_p$ ) ellentétes irányba vándorolnak. Az SDS-sel fedett fehérjék komplexeket képeznek a propidium ionokkal, aminek következtében az SDS-fehérje-propidium ( $\mu_{SP}$ ) elektroforetikus mobilitása csökken. A propidiumionok a kapilláris belső falán lévő elektromos kettősréteg egyes részeit is megbonthatják, ez csökkent ellenáramú EOF-ot eredményez (5. táblázat), ami csökkentett retardáló hatással van a mintakomponensek elektroforetikus mobilitására.

A gél-puffer rendszerben a propidium ligandumok az SDS-fehérjékkal komplexeket képezhetnek, de nem komplexált formában is megtalálhatók. Ha R és 1-R a nem komplexált és a propidiummal komplexált SDS-fehérjék moláris aránya, akkor a mintakomponensek  $\mu_{eff}$  megadható a nem komplexált ( $\mu_s$ ) és a komplexált ( $\mu_{SP}$ ) formák összegeként.

$$\mu_{eff} = \mu_s R + \mu_{SP} (1 - R) \quad (22)$$

A 21. egyenletből levezetve az R és az 1-R következésképpen fejezhető ki:

$$R = \frac{1}{1+K[P^{2+}]^m} \quad \text{és} \quad 1 - R = \frac{K[P^{2+}]^m}{1+K[P^{2+}]^m} \quad (23 \text{ a,b})$$

A 22. és 23. a, b egyenleteket kombinálva az oldott analitok  $\mu_{eff}$  az alábbiak szerint adható meg:

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_S}{1+K[P^{2+}]^m} + \frac{\mu_{SP} K[P^{2+}]^m}{1+K[P^{2+}]^m} \quad (24)$$

Továbbá feltételezem, hogy a propidiumion koncentrációjának és/vagy a komplexképződési állandónak (pl. az elválasztási hőmérséklet változása miatt) a megváltozásával az oldott molekulák  $\mu_{eff}$ -a az elválasztás során megváltozik. A propidium ligandum koncentrációjának az elektroforetikus mobilitásra gyakorolt hatását illetően három lehetőséget vettem figyelembe  $K[P^{2+}]^m \gg 1$ ,  $\sim 1$  és  $\ll 1$  értékkel, amelyek a mobilitás csökkenését, változatlanságát, illetve növekedését eredményeznék.

A 24. egyenlet arra utal, hogy izoterm körülmények között a propidium ligandum koncentrációjának növekedése az oldott molekulák  $\mu_{eff}$ -nak csökkenését eredményezi. Figyelembe kell venni azonban, a nagy viszkozitású boráttal térhálósított dextranszűrő mátrixsal töltött kapillárisban a nagyon alacsony, de fennálló ellenirányú EOF-t is, így az oldott molekulák  $\mu_{app}$  a következésképpen számítható ki:

$$\mu_{app} = \mu_{eff} - \mu_{EOF} \quad (25)$$

Megjegyzendő, hogy ebben az esetben is az  $\mu_{EOF}$  ellentétes irányú a mintakomponensek migrációs irányával. A pozitív töltésű propidium ionok növekvő koncentrációja a gél-puffer rendszerben azonban csökkentette az EOF-t, valószínűleg a kapilláris belső felületén lévő elektromos kettős réteg egyes részeinek megbontása révén, ahogy azt a 2. séma is szemlélteti. Ez a csökkent ellenirányú EOF csökkentette a mintakomponensek  $\mu_{eff}$ -ra gyakorolt retardációs hatást.

**5. Táblázat:** Az EOF és az áramerősség 15 kV kapcsolófeszültség mellett a gél PI koncentrációjának függvényében. \* a negatív előjel az ellentétes EOF irányt jelöli. Az áram- és  $\mu_{EOF}$  mérések RSD értékei 0,58% és 0,76% volt.

PI [ $\mu\text{g/mL}$ ]	0	10	25	50	100	200
$\mu_{EOF} (\times 10^{-9}) [\text{m}^2/\text{V s}]^*$	-0,18	-0,17	-0,15	-0,14	-0,13	-0,12
Áramerősség [ $\mu\text{A}$ ]	31,8	31,8	31,8	31,9	31,9	31,9

Az 5. táblázat mutatja az EOF mobilitás és az áramerősség értékeit a mérések során alkalmazott PI koncentrációk mellett. Míg a  $\mu_{EOF}$  értékek több mint 30%-kal csökkentek a propidium koncentráció növekedésével, az áramerősség értékek gyakorlatilag változatlanok maradtak. Ez azt mutatja, hogy az ionerősség nem változott a PI koncentráció emelkedésével, azaz nem az ionerősség megváltozása befolyásolta az EOF-t. Az 5. táblázat adatai alapján lineáris korrelációt találtam a logaritmikus propidium ligandum koncentráció és az EOF mobilitásának értékei között ( $R^2 = 0,998$ ):

$$\mu_{EOF} = a + b \cdot \log[P^{2+}] \quad (26)$$

Ebben az esetben (5. táblázat)  $a = 1,82 \times 10^{-10}$  és  $b = -3,11 \times 10^{-11}$ , ami arra utal, hogy az EOF csökken a  $[P^{2+}]$  érték növekedésével. A 24., 25. és 26. egyenletek kombinálásával megkapjuk a mintakomponensek  $\mu_{app}$ -t a PI koncentráció függvényében.

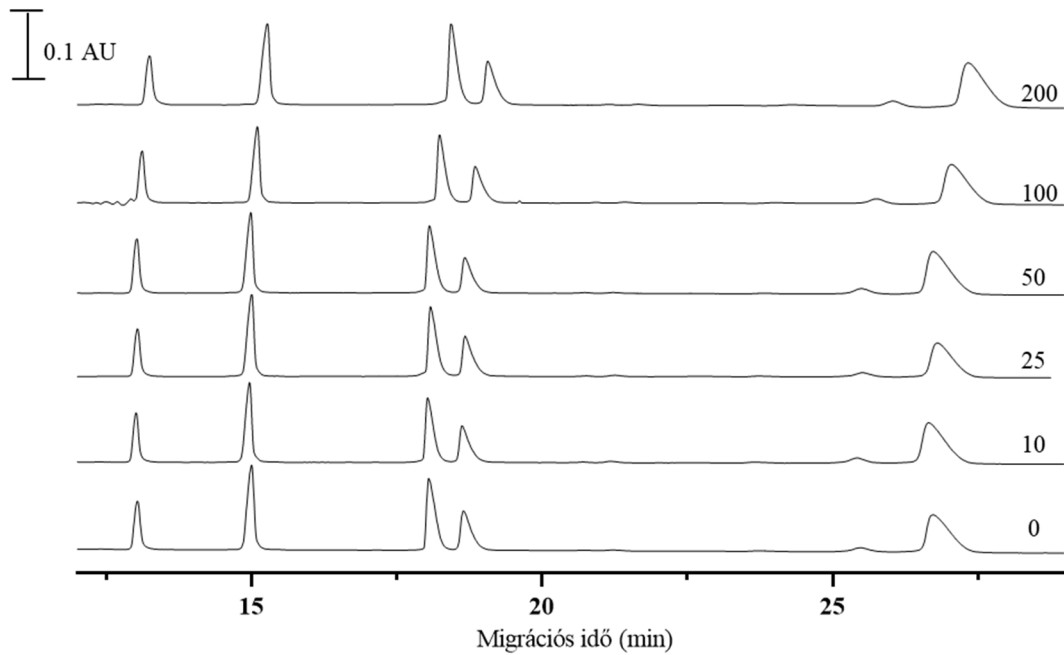
$$\mu_{app} = \frac{\mu_S}{1+K[P^{2+}]^m} + \frac{\mu_{SPK}[P^{2+}]^m}{1+K[P^{2+}]^m} - a - b \cdot \log[P^{2+}] \quad (27)$$

$$\begin{array}{cc} \underbrace{\hspace{10em}} & \underbrace{\hspace{10em}} \\ \text{A} & \text{B} \end{array}$$

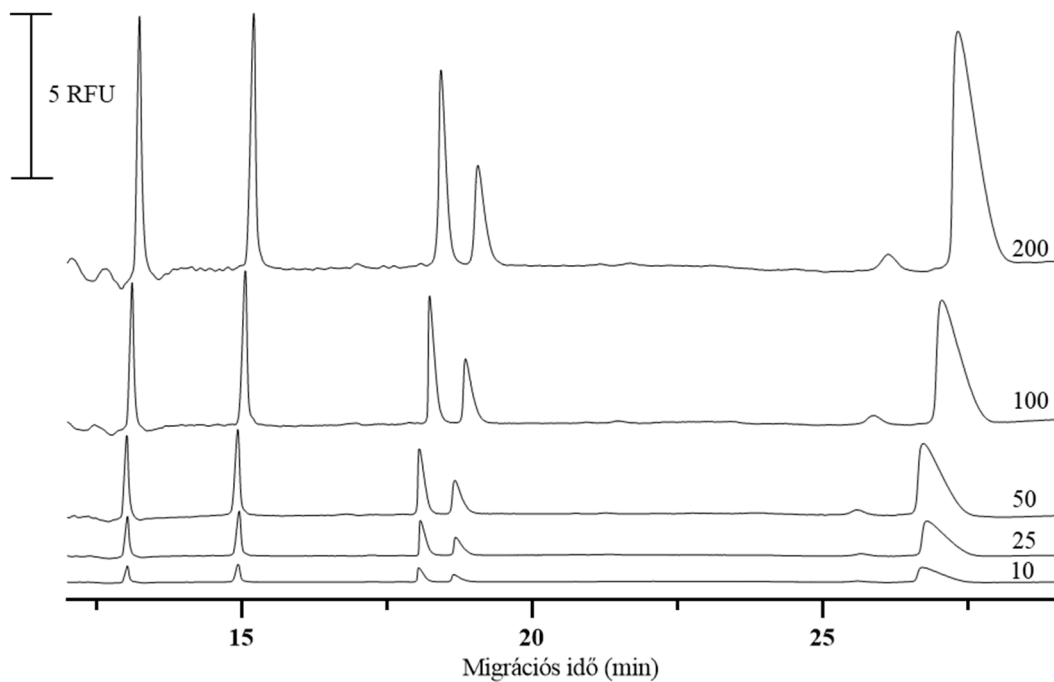
A csökkent felületi töltéssűrűségű SDS-fehérje-propidium komplex kisebb mobilitása (27. egyenlet A tag) és az ellenáramú EOF által közvetített csökkenő retardáció (27. egyenlet B tag) egymással ellentétes hatást feltételez. Fontos megjegyezni, hogy mivel  $b$  negatív szám a B tag növeli a látszólagos mobilitást magasabb ligandum-koncentrációknál, némileg kompenzálva az A tag csökkenő tendenciáját.

#### 5.3.4 A propidium-jodid koncentrációjának hatása az elektroforetikus mobilitásra, a csúcsmagasságra és a felbontóképességre

Következőkben a PI koncentrációjának hatását vizsgáltam az analitok migrációs idejére, a csúcsalatti terület értékek és  $R_s$  változására. UV detektálás esetében a gél-puffer rendszer PI koncentrációja 0, 10, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ , míg a LIF detektálás esetében 10, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$  volt. A 19. és 20. ábra hasonlítja össze az UV és LIF detektálási módok során kapott elektroferogramokat.

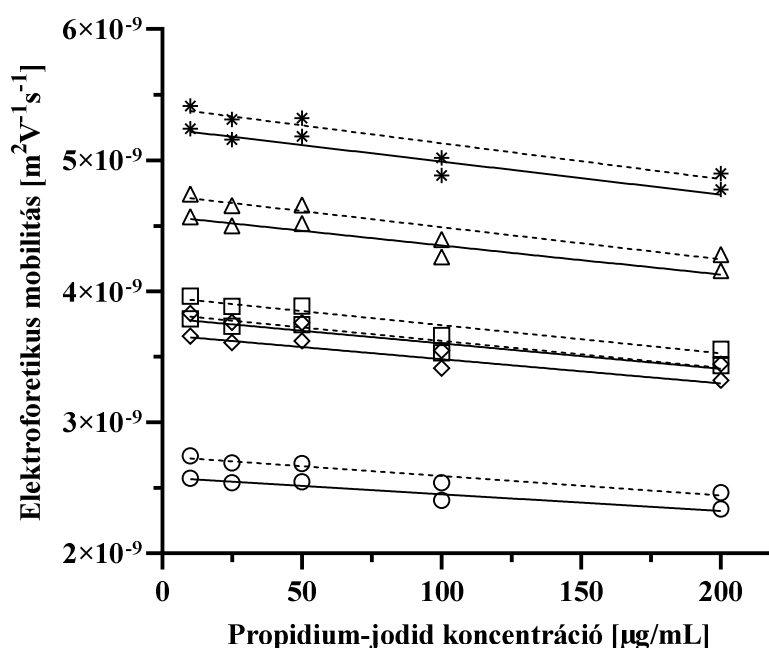


**19. Ábra:** A növekvő PI koncentráció hatása a mintakomponensek migrációs idejére és csúcs alatti terület értékekre UV detektálás (220 nm) esetén. A számok az elektroferogramokon a gél-puffer rendszerben lévő PI koncentrációt ( $\mu\text{g/ml}$ ) jelölik. A csúcsok megegyeznek a 18. ábrán feltüntetettekkel, az elválasztási körülmények pedig a 17. ábráéval.



**20. Ábra:** A növekvő PI koncentráció hatása a mintakomponensek migrációs idejére és csúcs alatti terület értékekre lézer indukált fluoreszcens detektálás (gerjesztés 488 nm/emisszió 600 nm) esetében. A számok az elektroferogramokon a gél-puffer rendszerben lévő PI koncentrációt ( $\mu\text{g/ml}$ ) jelölik. A csúcsok megegyeznek a 18. ábrán feltüntetettekkel, az elválasztási körülmények pedig a 17. ábráéval.

Mindkét panel esetében enyhe, de folyamatos növekvő tendencia figyelhető meg a migrációs időkben, azaz az intakt fehérjék és az alegységek elektroforetikus mozgékonyasága csökken a PI koncentráció emelésével, amit az EOF csökkenése azért valamelyest redukált. Az elektroforetikus mobilitásokban bekövetkező tényleges változásokat a 21. ábra mutatja, amelyen a  $\mu_{\text{app}}$  látszólagos elektroforetikus mozgékonyaságot a folytonos vonal, míg az  $\mu_{\text{eff}}$  effektív elektroforetikus mozgékonyaságot a szaggatott vonal jelöli.



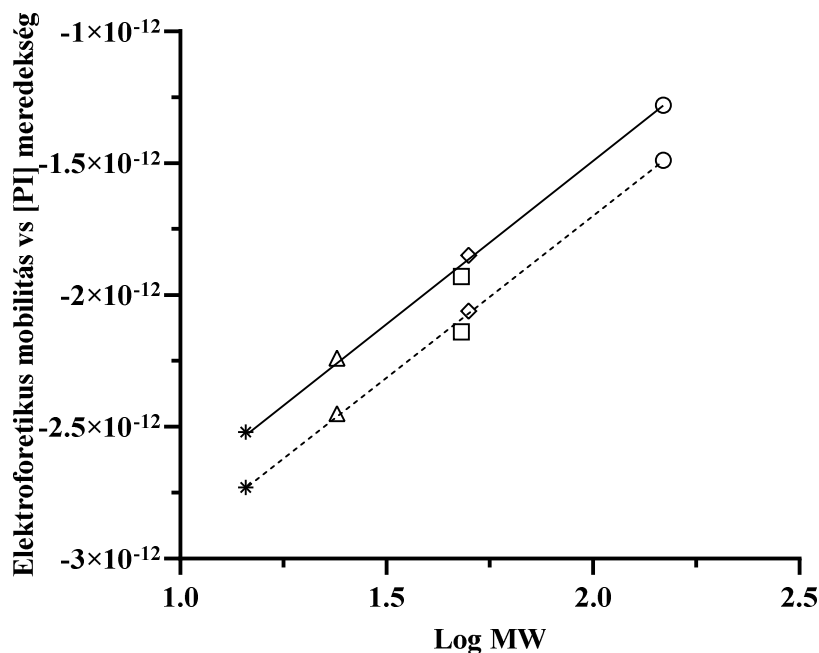
**21. Ábra:** Az elválasztó gélben lévő PI koncentrációjának hatása a mintakomponensek látszólagos (folytonos vonalak) és effektív (szaggatott vonalak) elektroforetikus mobilitására. Jelek: \* - lizozim,  $\Delta$  - LC,  $\square$  - ngHC,  $\diamond$  - HC,  $\circ$  - intakt mAb. Az egyes gélek között ( $n=3$ ) a migrációs idő reprodukálhatósága 0,98% RSD volt.

A propidium ligandum koncentrációjának növekedésével a mobilitás értékekből származó egyenesek enyhén közeledtek egymáshoz az összes mintakomponens esetében. Feltételezésem szerint ez az SDS-fehérje-propidium komplexek effektív mobilitásának csökkenése (csökkent felületi töltéssűrűség) és a csökkenő ellenáramú EOF (csökkent retardáció) közötti kölcsönhatás eredménye. Ahogy az elméleti levezetésben utaltam az elektroforetikus mozgékonyaságok csökkenése arra enged következtetni, hogy:  $\text{K}[\text{P}2+]^m$

>>1. Ezért izoterm körülmények között a propidium ligandum koncentrációjának növelése a mintamolekulák effektív elektroforetikus mozgékonyságának csökkenését eredményezi, így a 24. egyenlet egyszerűsíthető a következőre:

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_S}{K[P^{2+}]^m} + \mu_{SP} \quad (28)$$

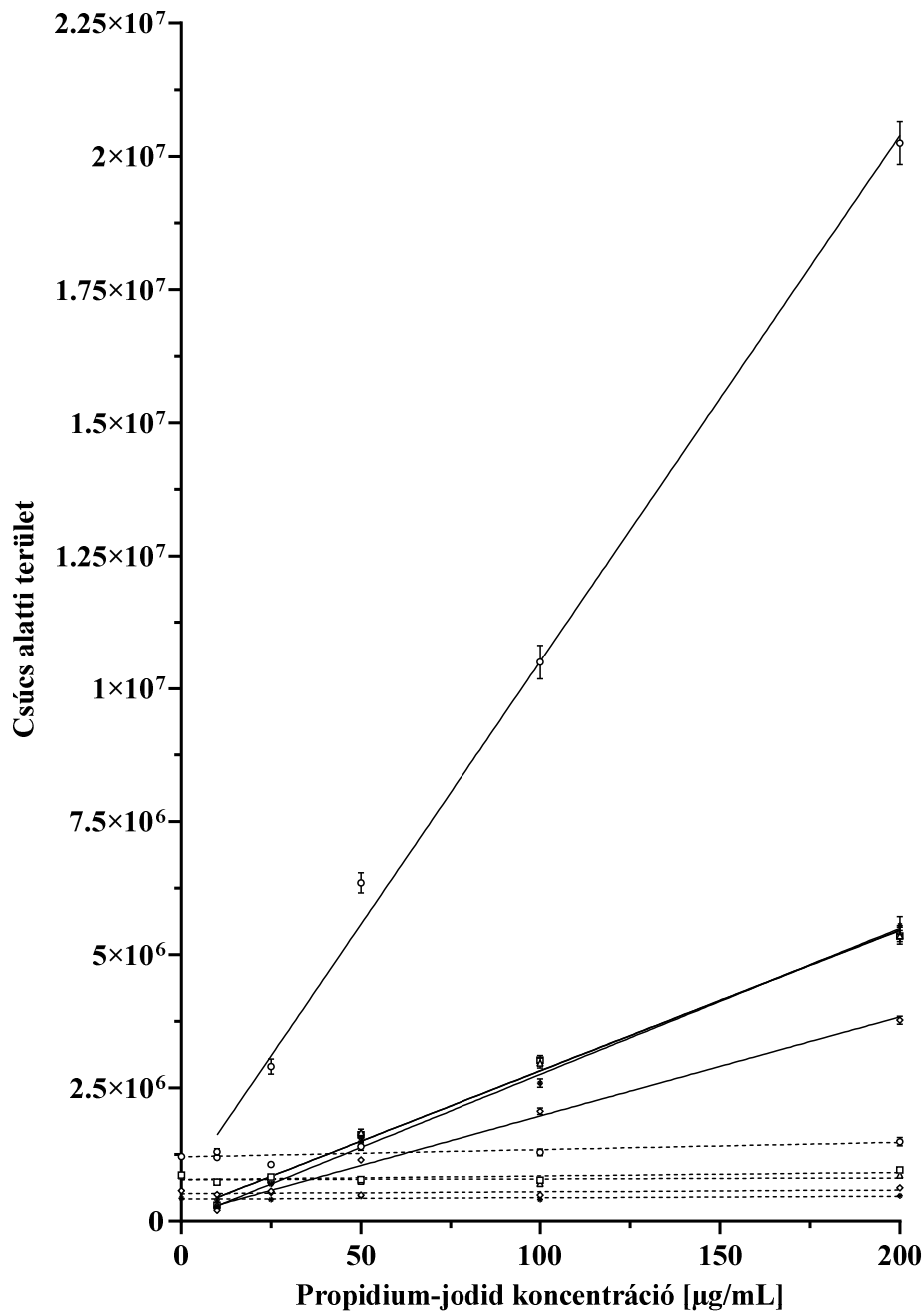
Figyelembe véve a 28. egyenletben szereplő egyszerűsítést, azaz ha  $K[P^{2+}]^m \gg 1$ , akkor a 27. egyenlet „A” kifejezésének második része a ligandum koncentrációjától független. A 21. ábrán kapott meredekség értékeket a 22. ábrán ábrázoltam, ami logaritmikus összefüggést feltételez a molekulásúly növekedésével, hisz magas korrelációs együtthatót ( $R^2=0,998$ ) mutatott. Ez a komplexképződési állandó, K változására utal, amely megerősíti az elméleti megfontolásokat.



**22. Ábra:** A 21. ábra meredekség értékei a mintakomponensek logaritmikus molekulásúlyainak MW-nek függvényében.

A 23. ábrán láthatóak az előzőleg bemutatott elektroferogramokon elválasztott fehérjék csúcs alatti terület értékei, ami a UV és LIF detektálásból kapott eredményeket hasonlítja össze. Az ábrán megfigyelhető, hogy az intakt mAb az UV detektálás során (szaggatott vonal) csak csekély 1,23 szoros növekedést mutatott a csúcs alatti terület értékek változásában, a legtöményebb 200 µg/mL koncentrációjú PI mellett. Ennek ellenére a LIF

detektálás esetében ugyanez a molekula, jelentős 17 szerez csúcs alatti terület növekedést mutatott 10  $\mu\text{g/ml}$  és 200  $\mu\text{g/ml}$  ligandum koncentráció között. A 200  $\mu\text{g/ml}$  PI koncentráció felett a fluoreszcens háttérzaj túl magas volt, emiatt az értékeket ennél magasabb koncentráció mellett nem vizsgáltam. A propidium molekulának 300 nm körül abszorbancia maximuma van, ezért 280 nm hullámhosszon is megvizsgáltam a csúcs alatti terület értékeket, ebben az esetben az intakt molekulának 3,86 szorosára növekedett a kontroll PI-t nem tartalmazó gél pufferrel mért eredményekhez képest. Ezek az adatok az ábrán nincsenek feltüntetve, mivel a továbbiakban a 220 nm-es UV detektálási hullámhosszt alkalmaztam a mérések során, melyet a borát-dextrán alapú gélekhez javasol a szakirodalom.

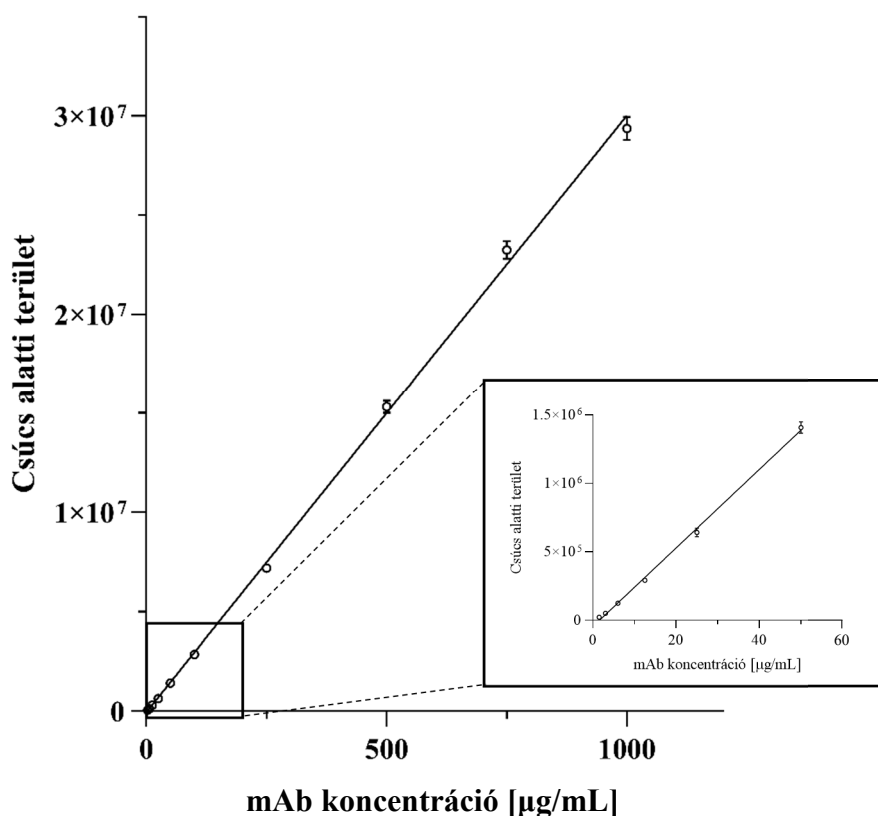


**23. Ábra:** A 19. és 20. ábrán látható csúcs alatti területek és a gél-pufferben lévő PI ligandum koncentrációja közötti összefüggés. Szaggatott vonalak: UV 220 nm-es detektálás (0 PI koncentrációtól kezdve); folytonos vonalak: LIF-detektálás (10 µg/mL PI koncentrációtól kezdve) Jelek: \*-lizozim, Δ-LC, □-ngHC, ◆-HC, ○-intakt mAb. A hibasávok a háromszoros méréseken alapuló adatok szórását mutatják.

A meredekség értékeit megvizsgálva azt kaptam, hogy LIF detektálással az intakt mAb mutatta a legnagyobb értéket, míg a nehézlánc fragmentumhoz tartozó egyenes meredeksége mutatta a legalacsonyabb értéket. A másik három mintakomponens

meredekség értéke nagyon hasonló volt. Lényeges kiemelni, hogy a nehézlánc fragmentum glikozilált, ami megnövekedett hidrofil tulajdonságot eredményez, ezáltal csökkentheti a propidium kötődését. Míg a lizozim, a LC és a ngHC glikán struktúrákat nem hordoz, ezért nagyon hasonló felületi töltéssűrűséggel rendelkeznek. Az intakt mAb bár glikozilált, de az Y alakú molekula belseje felé néző glikán struktúrák nem befolyásolták sem az SDS sem a propidium kötődését. Ezen kívül a denaturált, de nem redukált mAb-molekula másodlagos szerkezetének elvesztése miatt az extra hidrofób felületek valószínűleg vonzották a nagy planáris propidium molekulákat, szoros van der Waals kötések képezve, ezzel növelve a megkötött fluorofór molekulák számát, és egyidejűleg nagyobb fluoreszcens jelet eredményezve.

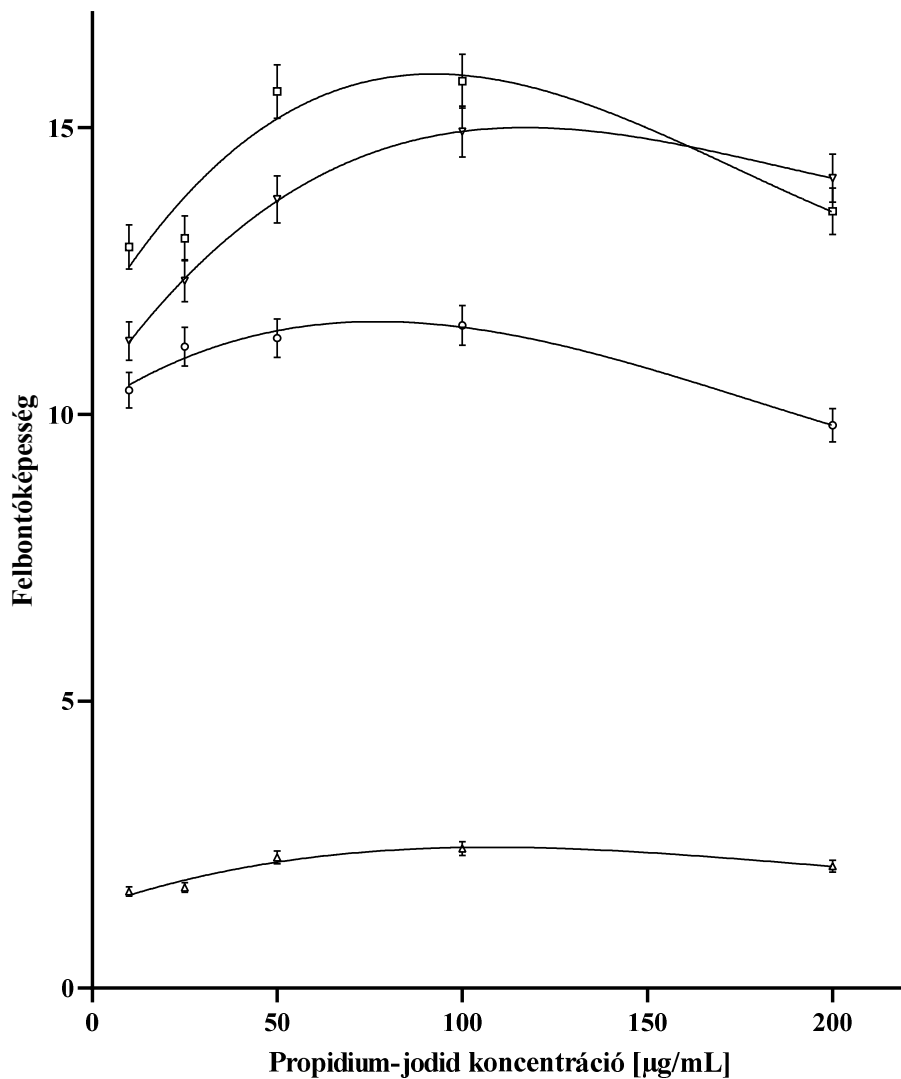
Továbbiakban megvizsgáltam a módszer kimutatási határát az intakt mAb-re, 1,5-1000  $\mu\text{g/ml}$  koncentráció tartományban, melyet a 24. ábra szemléltet.



**24. Ábra:** Az intakt mAb kimutatási határa SDS-CGE-LIF-vel, 200  $\mu\text{g/mL}$  PI-t használva a gél-puffer rendszerben ( $R^2=0,997$ ). A belső ábra az alacsonyabb koncentrációjú adatpontokat ábrázolja, a hibásávok pedig a háromszoros méréseken alapuló adatok szórását mutatják.

A belső ábra az alacsonyabb koncentrációjú adatpontokat ábrázolja. A 200 mg/mL PI tartalmú gél esetén az LOD 2  $\mu\text{g/mL}$  ( $1,35 \times 10^{-8}$  M), mely érték megegyezik a kereskedelmi forgalomban levő mikrochip kapilláris elektroforézis által mért eredményekkel [75].

Ezt követően megvizsgáltam a növekvő molekulatömegű mintakomponensek közötti felbontás értékeit is, melyet a 25. ábra mutat be.



**25. Ábra:** A növekvő molekulatömegű mintakomponensek közötti  $R_s$  értékek a háttérelktrolitban lévő PI ligandum koncentrációjának függvényében. Jelek: ○-Lys/LC; □-LC/ngHC; △-ngHC/HC; ▽-HC/mAb. A hibásávok a háromszoros méréseken alapuló adatok szórását mutatják.

A felbontóképesség maximális értéke a lizozim-LC, LC-ngHC, ngHC-HC és HC-mAb egymást követő mintapárok esetében a 100  $\mu\text{g/ml}$  PI koncentrációnál volt tapasztalható.

A korábbi eredményeket figyelembe véve, ha az érzékenység kiemelt fontosságú az elválasztás során, akkor a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI tartalmazó gél puffer rendszert javasolt használni, mivel ez propidium koncentráció biztosította a legnagyobb csúcsalatti terület értéket az összes mintakomponens esetében. Azonban ha a csúcsok közötti felbontás maximalizálása a cél, akkor a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI-t tartalmazó gélt ajánlott használni. Lehetőség van a propidium ligandum koncentrációjának az adott minta keverékhez a 100 és 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  között történő finomhangolására, hogy nagy felbontást biztosítson, ugyanakkor detektálás érzékenysége is megfelelően magas maradjon.

## 6 Összefoglalás

A terápiás fehérjék széleskörű felhasználási lehetőségei az elmúlt évtizedekben fokozott figyelmet és kutatási törekvéseket váltottak ki, amelyek klinikai sikerekben csúcsosodtak ki. Az SDS-CGE módszerét gyakran alkalmazzák a bioterápiás fehérjék minőségellenőrzésére, mivel számos előnyt biztosít a hagyományos lap gélelektroforézissel szemben, beleértve az automatizálhatóságot, a nagyobb felbontást, a gyorsabb elválasztási időt, valamint a kis vegyszerigényt. Ezért kutatómunkám célja olyan új analitikai stratégiák bevezetése és megértése volt, melyekkel a bioterápiás készítmények karakterizálásának hatékonysága növelhető.

A terápiás fehérjék hatékonyságát és működését jelentősen befolyásolja az aszparaginhoz kötött N-glikánok jelenléte. Ezeket a kötött N-glikánokat általában endoglikozidázokkal, például PNGaseF enzimmal történő felszabadítás után analizálják. Munkám során értékeltem az N-glikán felszabadulás kinetikáját a korábban általunk előállított 6His-PNGaseF enzim által történő emésztés során. Az emésztési idő optimalizálása érdekében a reakciótermékeket SDS-CGE módszerrel kvantifikáltam. Ezt követően megvizsgáltam a minta glükóztartalmának hatását, mint potenciális endoglikozidáz aktivitás módosító tényezőt. Összehasonlító Michaelis-Menten kinetikai vizsgálatot végeztem a 6His-PNGaseF és egy gyakran használt kereskedelmi PNGaseF termék között, glükóz jelenlétében és anélkül. Megállapítottam, hogy a mintában lévő 1 mg/mL glükóz aktiválta a 6His-PNGaseF enzimet, míg a kereskedelmi termék felszabadítási hatékonyságára nem volt hatással. A cIEF elválasztások során enyhe töltésbeli különbségeket mutattam ki a két endoglikozidáz között, ami feltételezhetően amiatt van, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható PNGaseF enzim feltételezhetően három enzim keveréke. Ezek a különbségek valószínűleg befolyásolták a glükóz által közvetített enzimaktivitás változásait.

Az ipari standardként fehérje elválasztásra használt, tetrahidroxiboráttal térhálósított dextrán gélek esetében ultrahív dextrán tartalmú mátrixok alkalmazhatóságát nem vizsgálták ezidáig a szakirodalomban. Munkám során eltéréseket figyeltem meg a mintaként alkalmazott fehérje standard keverék és a mAb intakt és alegységeinek elválasztásában. Az elválasztási mechanizmus megértésének érdekében Ferguson és reptációs diagramokat vettem fel. A csökkent dextrán koncentrációknál mindkét minta esetében lineáris Ferguson diagramokat kaptam, hasonlóképpen az Ogston elmélet által javasoltakhoz. Azonban ez a modell egy merev pórusszerkezetet feltételez, ezért nem

alkalmas az elválasztási mechanizmus leírására ultrahíg polimeroldatokban, ahol feltételezhetően nem alakul ki ilyen mértékű stabil retikuláció. Emiatt ezeket az elméleteket elvettem és feltételezésem szerint a híg és ultrahíg dextrans tartalmú polimeroldatokban a véletlenszerűen eloszló dextrans láncokba való ütközés okozza az SDS-fehérjék méret szerinti elválasztását, ami kisebb fehérjék esetén billegést, míg a nagyobbaknál kötélszerű függést eredményez az elektromigráció alatt, ezzel befolyásolva a retardációt. A terápiás mAb SDS-sel fedett intakt, valamint LC és HC alegységei még nulla dextrans koncentráció mellett is bár részlegesen, de elkülönültek. A nagyon hasonló töltéssűrűséggel rendelkező makromolekulák méret szerinti elválasztásáért valószínűleg az alakszelektivitás volt felelős. Ugyanis az alakváltozatok hiányával (pl. glikoziláció) még a nagy molekulású különböző fragmentumok sem különültek el, amint azt a LC (24 kDa) és ngHC (48 kDa) ko-migrációja mutatja a dextrans nélküli oldatokban.

A rohamosan növekvő bioterápiás fehérje készítmények száma megköveteli az SDS-fehérjék nagy áteresztőképességű analízisét gélelektroforézis esetében. A közelmúltban bevezetett multikapilláris elektroforézis berendezések lehetővé teszik a nagy áteresztőképességű működést, azonban többnyire ezek csak fluoreszcens detektorral vannak felszerelve, ami a fehérjék fluorofórral történő jelölését igényli. Ezért a könnyen alkalmazható fluoreszcens jelölési módszerek kidolgozása rendkívül fontos. Az időigényes és költséges kémiai derivatizációs reakció elkerülése érdekében kifejlesztettem egy kapillárison belüli jelölési módszert PI alkalmazásával, amit korábban csak nukleinsav analízishez alkalmaztak. A pozitív töltésű propidium ligand az elektromigráció során komplexet képez az SDS-fehérjékkel, lehetővé téve az *in situ* jelölést az elektroforézis folyamat során, előzetes vagy utólagos derivatizáció nélkül. A módszert először egy kereskedelmi forgalomban kapható fehérje standard alkalmazásával mutattam be, majd egy terápiás mAb és annak alegységei jelölésének optimalizálására fókuszáltam. A legjobb érzékenységet az intakt mAb detektálása során 200 µg/mL PI használatával értem el. A terápiás fehérje fragmentumai közötti  $R_s$  értékek 50–200 µg/mL ligandum koncentráció tartományban megfelelőek voltak, de a ng/glikozilált HC pár esetében a 100 µg/mL koncentráció használata ajánlott. A módszer pontossága, érzékenysége, detektálási tartománya és felbontása a PI koncentrációjának változtatásával optimalizálható.

## 7 Tézispontok

### 1. Tézispont: A Pannon Egyetem Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratórium által gyártott 6His-PNGaseF enzim emésztési idejének optimalálása során megállapítottam, hogy a glükóz jelenléte növeli az enzimátikus emésztési folyamat hatékonyságát.

A terápiás fehérjék minőségi ellenőrzésekor fontos lépés a glikoproteinekhez kötött N-glikánok jellemzése is. A legtöbb esetben ezeket az oligoszacharid struktúrákat egy endoglikozidáz enzimmel, PNGaseF alkalmazásával szabadítják fel. Munkám során egy egyetemen belül gyártott 6His-PNGaseF enzim deglikozilációs kinetikáját vizsgáltam az optimális emésztési idő meghatározásához, valamint a minta glükóz tartalmának hatását vizsgáltam, mint potenciális endoglikozidáz aktivitást módosító tényezőt. Az enzim aktivitást a Michaelis-Menten modell segítségével vizsgáltam és összevettem egy kereskedelmi forgalomban kapható és széles körben alkalmazott PNGaseF enzim aktivitásával.

### 2. Tézispont: Híg és ultra-híg dextrans tartalmú gélek alkalmazásának lehetősége SDS-CGE módszer esetében

Munkám során a szakirodalomban először vizsgáltam a híg és ultra-híg (1%-0,01%) valamint nulla dextrans koncentrációjú elválasztó pufferrendszerek hatását egy fehérje standard keverék és egy terápiás fehérje alegységeinek SDS-CGE elválasztása esetében, valamint tanulmányoztam a szeparációs mechanizmusokat. A híg és ultrahíg polimeroldatok gyors elválasztási időket biztosítanak a terápiás fehérjék analízisének mely rendkívül előnyös lehet a fejlesztés és gyártás során.

### 3. Tézispont: Elválasztási mechanizmus bizonyítása a híg és ultrahíg dextransborát mátrixokban

A Ferguson diagramok a fehérje standard és a terápiás mAb minták esetében lineáris karakterisztikát mutattak, annak ellenére, hogy híg polimer oldatokban nem várható a retikuláció kialakulása. A fehérje standard és terápiás fehérje mintakomponensek közötti felbontásbeli különbségek az alakszelektivitás fontosságára utaltak. Az SDS-fehérje komplexek az elektromigráció során a véletlenszerűen eloszló dextransláncokba való ütközése a kisebb méretű fehérjék esetében billegést a nagyobbak esetében pedig kötélzerű függést eredményez, ami egyfajta méretalapú elválasztást eredményezett.

#### **4. Tézispont: A propidium-jodid, mint fluoreszcens festék alkalmazása terápiás fehérjék vizsgálatokor**

Munkám során bevezettem az SDS-fehérje komplexek elválasztás közbeni (in-migráció) fluoreszcens jelölésének koncepcióját propidium-jodid alkalmazásával, melyet korábban csak nukleinsavak jelölésére használtak. A módszerrel egyszerűen elvégezhető az *in situ* jelölés az elválasztás során, mely így nem igényel sem elválasztás előtti vagy utáni derivatizálási lépést, jelentősen felgyorsítva és megkönnyítve ezáltal a jelölés munkafolyamatát.

## 8 Theses

- 1. During the optimization of the digestion time of 6His-PNGaseF enzyme produced by the Bio-Nanosystems Laboratory of the University of Pannonia I observed that the presence of glucose increased the efficiency of the enzymatic digestion process.**

In my work, the deglycosylation kinetics of an in-house produced 6His-PNGaseF enzyme was investigated to determine the optimal digestion time and the effect of sample glucose content as a potential modifier of endoglycosidase activity was studied. The enzyme activity was evaluated by using the Michaelis-Menten model and compared with the activity of a commercially available and widely used PNGaseF enzyme.

- 2. The use of dilute and ultra-dilute dextran solutions in SDS-CGE**

I have investigated the effects of dilute and ultra-dilute (1%-0.01%) as well as zero dextran concentration separation buffer systems for the separation of a protein standard mixture as well as a therapeutic protein and its subunits to study the mechanism of separation. Dilute and ultra-dilute polymer solutions can provide extremely fast separation times for the analysis of therapeutic proteins during development and production.

- 3. Investigation of the separation mechanism in dilute and ultra-dilute dextran-borate matrices**

Ferguson diagrams showed linear characteristics for both samples, despite the fact that reticulation was not expected in ultradilute polymer solutions. The differences in resolution between the protein standard and the therapeutic protein sample components indicated the importance of shape selectivity. The intermittent non-sticky bumping of the SDS proteins into the randomly distributed dextran chains resulting in pivoting for smaller and rope like hanging for the larger proteins during their electromigration, consequently resulting in some size based separation.

- 4. In-migratio application of propidium iodide as a fluorescent dye in the analysis of therapeutic proteins**

I introduced the concept of in migratio fluorescent labelling of SDS-protein complexes using propidium iodide, which was previously used only for nucleic acid labelling. The method allowed simple *in situ* labelling during the separation process, thus requiring no

pre- or post-column derivatization steps, significantly speeding up and facilitating the labelling workflow.

## 9 Publikációk

### Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó publikációk

#### Szabadalom

**Felicia Auer**, András Guttman: Módszer az SDS-fehérjék nem kovalens migrációs fluorofór címkézésére,ellenáramú elektromigrációt használva SDS-CGE során Bejelentés napja: 2023. december 22.

#### Tudományos cikkek

**Felicia Auer**, Andras Guttman: In Migratio Noncovalent Fluorophore Labeling of Proteins by Propidium Iodide in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis, *Analytical Chemistry* 27, (2024), 10969–10977 DOI: 10.1021/acs.analchem.4c01371

**Felicia Auer**, Andras Guttman: Size separation of sodium dodecyl sulfate–proteins by capillary electrophoresis in dilute and ultra-dilute dextran solutions, *Electrophoresis* 19-20, (2023), 1607-1614, DOI: 10.1002/elps.202300067

Rebeka Torok, **Felicia Auer**, Robert Farsang, Eszter Jona, Gabor Jarvas, Andras Guttman: The Effect of Sample Glucose Content on PNGase F-Mediated N-Glycan Release Analyzed by Capillary Electrophoresis, *Molecules* 23, (2022), 8192. DOI: 10.3390/molecules27238192

#### Poszterek

**Felicia Auer**, Andras Guttman: Noncovalent Labeling of Proteins in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis MSB 2024 40th International Symposium on Microscale Separation and Bioanalysis Brno, Czech Republic 19-22 May, 2024

**Felicia Auer**, Andras Guttman: Separation of sodium dodecyl sulfate-proteins by capillary electrophoresis using dilute and ultra-dilute dextran solutions CECE 2023 18th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis Brno, Czech Republic 23-26 October, 2023

**Felicia Auer**, Andras Guttman: Analysis of SDS-Proteins by capillary electrophoresis in dilute and ultra-dilute dextran solutions The 28th Latin American Symposium on

Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology Mexico City, Mexico 2-4 December, 2023

**Felicia Auer**, Rebeka Torok, Robert Farsang, Eszter Jona, Gabor Jarvas, Andras Guttman: On the Michaelis-Menten Kinetics of N-Glycan Release of Peptide:N-Glycosidase F (PNGase F). 27th Latin American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, Panama city, Panama 3-6 December, 2022

## 10 Az értekezés tématerületét érintő publikációk

### Tudományos cikkek

Balázs Gyebrovski, András Ács, Dániel Szabó, **Felícia Auer**, Soma Novozánszki, Bernadette Rojkovich, Anna Magyar, Ferenc Hudecz, Károly Vékey, László Drahos, Gabriella Sármay The Role of IgG Fc Region N-Glycosylation in the Pathomechanism of Rheumatoid Arthritis International Journal of Molecular Sciences 10 (2022), 5828, DOI: 10.3390/ijms23105828

**Felícia Auer**, Gabor Jarvas, Andras Guttman: Recent advances in the analysis of human milk oligosaccharides by liquid phase separation methods, Journal of Chromatography B 1162, (2021),122497, DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122497

### Előadások

**Felícia Auer**, Kinga Hogyor, Klaudia Horompoly, Andras Guttman: Módszerfejlesztés SARS-CoV-2 vírus N-glikán profiljának analíziséhez kapilláris elektroforézissel

**Felícia Auer**, Márton Szigeti, Gábor Járvas, András Guttman: Az A1 és A2 típusú tehéntej immunogén glikánjainak vizsgálata kapilláris elektroforézissel 25th Spring Wind Conference Pécs, Hungary, 6-8 May 2022

**Felícia Auer**, Marton Szigeti, Gabor Jarvas, Andras Guttman N-glikán minta előkészítés módszeroptimalizálása kapilláris elektroforézis rendszerekre Chemical Engineering Days, Veszprém Hungary, 26-28 April, 2022

**Felícia Auer**, Marton Szigeti, Gabor Jarvas, Andras Guttman: Analysis of possibly immunogenic glycans in type A1 and A2 cow milks Chemical Engineering Days, Veszprém Hungary, 21 April, 2021

### Poszterek

**Felícia Auer**, Tamas Bihari, Gellert Sipos, Ferenc Darvas, Gabor Jarvas, Andras Guttman: Optimized oligosaccharide labelling protocol applying continuous flow catalysis V4 Symposium, Flow analysis & Capillary electrophoresis, Krakow, Poland, 28 June-1 July, 2021

Gabriella Sarmay, **Felicia Auer**, Lili Végh, Andras Acs, Bernadette Rojkovich, Anna Magyar, Ferenc Hudecz, Gergo Gyulai, Eva Kiss, Karoly Vekey

Complexed anti-citrullinated peptide antibodies with altered glycosilation profile may bind to Fc $\gamma$ RI and induce TNF $\alpha$  release from U937 cells The 5th International Congress of Controversies in Rheumatology & Autoimmunity, Florence, Italy, 14-16 March, 2019

András Acs , **Felicia Auer**, Gabriella Sarmay, Oliver Ozohanics, Andras Telekes, Karoly Vekey, Laszlo Drahos, Lilla Turiak: Structural evaluation of immunoglobulin G glycans 3rd International Symposium on Scientific and Regulatory Advances in Biological and Non – Biological Complex Drugs: A to Z in Bioequivalence, Budapest, Hungary 12-14 November, 2018

## 11 Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Guttman Andrásnak, aki fáradhatatlanul osztotta meg velem a szakértelmét és támogatását azáltal, hogy folyamatosan koordinálta a kutatómunkámat. Hozzáértése és elkötelezettsége folyamatosan inspirált, hogy a legjobbat hozzam ki magamból.

Köszönöm a Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet igazgatójának, Dr. Járvás Gábornak nyújtott segítségét, aki nemcsak biztosította a szükséges infrastruktúrát a kutatásomhoz, hanem kiemelt figyelmet fordított egy támogató, pozitív kutatócsoport létrehozására is.

Hálás vagyok Szigeti Mártonnak és Farsang Róbertnek, akik érkezésemkor a laboratóriumi munka minden egyes részével megismertettek és idejüket nem sajnálva folyamatosan egyengették utamat, és hogy mindig mellettem álltak a kutatás ösvényein. Köszönöm srácok!

Emellett szeretnék köszönetet mondani Hogyor Kingának a rengeteg segítségért, amit a munkám során biztosított, illetve hogy még a legnehezebb napjaimon is mindig mellettem állt, elkötelezetten támogattott és nem hagyta, hogy elveszítsem a motivációm.

Szeretném megköszönni Török Rebekának a munkám során nyújtott segítséget és támogatást.

Szeretnék köszönetet mondani továbbá a Transzlációs Glikomika Kutatócsoport további tagjainak, név szerint: Szerényi Dórának, Bokrossy-Csiba Máriának, hogy hozzájárultak ahhoz, hogy ez a kutatás sikeres legyen.

Szeretnék köszönetet mondani Filep Csengének, aki szakmai tudásával folyamatosan segítette a munkámat, bármikor fordulhattam hozzá, ha kérdésem volt.

Szeretném kifejezni a köszönetem a Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratórium munkatársainak, Prof. Vonderviszt Ferencnek, Dr. Jankovics Hajnalkának, Tóth Évának és Kovács Noéminek hogy a munkámhoz szükséges enzimek gyártásával, valamint különböző típusú mérésekkel támogatták a kutatásom.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Ács Andrásnak a kezdeti közös munkánkért, és hogy megismertette velem a bioanalitika csodás világát, és ha szakmai kérdésem volt, hozzá is bármikor fordulhattam.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani a családomnak és páromnak, akik támogatása nélkül biztos vagyok benne, hogy nem készült volna el ez a kutatás.

## 12 Hivatkozások

1. Kovács, N., et al., *Enhanced Recombinant Protein Production of Soluble, Highly Active and Immobilizable PNGase F*. Mol Biotechnol, 2022. **64**(8): p. 914-918.
2. Piggee, C., *Therapeutic Antibodies Coming through the Pipeline*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(7): p. 2305-2310.
3. Ebrahimi, S.B. and D. Samanta, *Engineering protein-based therapeutics through structural and chemical design*. Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 2411.
4. Strohl, W.R., *Current progress in innovative engineered antibodies*. Protein Cell, 2018. **9**(1674-8018 (Electronic)): p. 86-120.
5. Goeddel Dv Fau - Kleid, D.G., et al., *Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin*. Proc Natl Acad Sci USA, 1979. **76**(0027-8424 (Print)): p. 106-110.
6. Liu, H., et al., *Heterogeneity of monoclonal antibodies*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **97**(1520-6017 (Electronic)): p. 2426-2447.
7. Zaman, R., et al., *Current strategies in extending half-lives of therapeutic proteins*. Journal of Controlled Release, 2019. **301**: p. 176-189.
8. Dimitrov, D.S., *Therapeutic proteins*. Methods Mol Biol, 2012. **899**: p. 1-26.
9. Chiu, M.L., et al., *Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics*. antibodies, 2019. **8**(2073-4468 (Electronic)).
10. Alejandra, W.-P., et al., *Production of monoclonal antibodies for therapeutic purposes: A review*. International Immunopharmacology, 2023. **120**: p. 110376.
11. Duivelshof, B.L., et al., *A generic workflow for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies—application to daratumumab*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019. **411**(19): p. 4615-4627.
12. Chillemi, A., et al., *Generation and Characterization of Microvesicles after Daratumumab Interaction with Myeloma Cells*. Blood, 2015. **126**(23): p. 1849.
13. Hosseini, S.S., et al., *Bisppecific monoclonal antibodies for targeted immunotherapy of solid tumors: Recent advances and clinical trials*. International Journal of Biological Macromolecules, 2021. **167**: p. 1030-1047.
14. Yang, E.Y. and K. Shah, *Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics*. Frontiers in Oncology, 2020. **10**.
15. Marsh, M.C. and S.C. Owen, *Therapeutic Fusion Proteins*. Aaps j, 2023. **26**(1): p. 3.
16. Reusch, D. and M.L. Tejada, *Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes*. Glycobiology, 2015. **25**(1460-2423 (Electronic)): p. 1325-1334.
17. Bodnar, J., et al., *Enzymatic removal of N-glycans by PNGase F coated magnetic microparticles*. ELECTROPHORESIS, 2016. **37**(10): p. 1264-1269.
18. Michaelis, L. and M.L. Menten, *Die kinetik der invertinwirkung Biochem Z 49: 333–369*. Find this article online, 1913.
19. Olajos, M., et al., *Sample preparation for the analysis of complex carbohydrates by multicapillary gel electrophoresis with light-emitting diode induced fluorescence detection*. Analytical chemistry, 2008. **80**(11): p. 4241-4246.
20. Huang, Y. and R. Orlando, *Kinetics of N-Glycan Release from Human Immunoglobulin G (IgG) by PNGase F: All Glycans Are Not Created Equal*. J Biomol Tech, 2017. **28**(4): p. 150-157.
21. Suzuki, T., et al., *Carbohydrate-binding property of peptide: N-glycanase from mouse fibroblast L-929 cells as evaluated by inhibition and binding experiments using various oligosaccharides*. J Biol Chem, 1995. **270**(25): p. 15181-6.

22. Townsend, R.R. and A.T. Hotchkiss, *Techniques in Glycobiology*. FEBS Letters, 1997. **419**(1): p. 147-149.
23. Guttman, A., *High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 461-462.
24. Guttman, A., et al., *High-Resolution Capillary Gel Electrophoresis of Reducing Oligosaccharides Labeled with 1-Aminopyrene-3,6,8-trisulfonate*. Analytical Biochemistry, 1996. **233**(2): p. 234-242.
25. Hajba, L., et al., *Capillary Gel Electrophoresis of Proteins: Historical overview and recent advances*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2023. **162**: p. 117024.
26. Fekete, S., et al., *Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals*. Analytical Chemistry, 2016. **88**(1520-6882 (Electronic)): p. 480-507.
27. Li, S.F.Y. and Y.S. Wu, *ELECTROPHORESIS | Capillary Electrophoresis*, in *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson, Editor. 2000, Academic Press: Oxford. p. 1176-1187.
28. Krebs, F., et al., *Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications—Updated and completely revised edition*. ELECTROPHORESIS, 2023. **44**(17-18): p. 1279-1341.
29. Arrhenius, S., *Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren*. 1889. **4U**(1): p. 226-248.
30. Grossbach, U., *Acrylamide gel electrophoresis in capillary columns*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1965. **107**(1): p. 180-182.
31. Hjertén, S., *Free zone electrophoresis*. Chromatographic Reviews, 1967. **9**(0009-5907 (Print)): p. 122-143, 147-219.
32. Cremer, T., W. Dames, and V. Neuhoff, *Micro Disc Electrophoresis and Quantitative Assay of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase at the Cellular Level*. 1972. **353**(2): p. 1317-1329.
33. Shapiro Al Fau - Viñuela, E., J.V. Viñuela E Fau - Maizel, Jr., and J.V. Maizel, Jr., *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1967. **28**(0006-291X (Print)): p. 815-820.
34. Virtanen, R., *Zone Electrophoresis in a Narrow-bore Tube Employing Potentiometric Detection: A Theoretical and Experimental Study*. 1974, Finnish Acad. of Techn. Sciences.
35. Hjertén S Fau - Pan, H. and H. Pan, *Purification and characterization of two forms of a low-affinity Ca<sup>2+</sup>-ATPase from erythrocyte membranes*. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 1983. **728**(0006-3002 (Print)): p. 281-288.
36. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries*. Analytical Chemistry, 1981. **53**(8): p. 1298-1302.
37. Guttman, A.a.H., Laszlo, *Capillary Gel Electrophoresis*. 2022: Elsevier Science.
38. Ogston, A.G., *The spaces in a uniform random suspension of fibres*. Transactions of the Faraday Society, 1958. **54**(0): p. 1754-1757.
39. Filep, C. and A. Guttman, *The Effect of Temperature in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis of Protein Therapeutics*. Anal Chem, 2020. **92**(5): p. 4023-4028.
40. Offord, R.E., *Electrophoretic Mobilities of Peptides on Paper and their Use in the Determination of Amide Groups*. Nature, 1966. **211**(5049): p. 591-593.

41. Rickard, E.C., M.M. Strohl, and R.G. Nielsen, *Correlation of electrophoretic mobilities from capillary electrophoresis with physicochemical properties of proteins and peptides*. Analytical Biochemistry, 1991. **197**(1): p. 197-207.
42. Chrambach, A. and D. Rodbard, *Polyacrylamide gel electrophoresis*. Science, 1971. **172**(3982): p. 440-51.
43. Andrews, A.T., *Electrophoresis. Theory, techniques, and biochemical and clinical applications* 1986: Oxford Science Publications. 440.
44. Grossman, P.D., S. Menchen, and D. Hershey, *Quantitative analysis of DNA-sequencing electrophoresis*. Genet Anal Tech Appl, 1992. **9**(1): p. 9-16.
45. Lumpkin, O.J., P. Déjardin, and B.H. Zimm, *Theory of gel electrophoresis of DNA*. Biopolymers, 1985. **24**(8): p. 1573-1593.
46. Tietz, D., *Gel electrophoresis of intact subcellular particles*. J Chromatogr, 1987. **418**: p. 305-44.
47. Rodbard, D. and A. Chrambach, *Unified theory for gel electrophoresis and gel filtration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **65**(4): p. 970-7.
48. Slater, G.W. and J. Noolandi, *The biased reptation model of DNA gel electrophoresis: Mobility vs molecular size and gel concentration*. Biopolymers, 1989. **28**(10): p. 1781-1791.
49. Tanaka, T., *Gels*. Scientific American, 1981. **244**(1): p. 124-S-17.
50. Redaelli, F., M. Sorbona, and F. Rossi, *10 - Synthesis and processing of hydrogels for medical applications*, in *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications*, G. Perale and J. Hilborn, Editors. 2017, Woodhead Publishing. p. 205-228.
51. Filep, C. and A. Guttman, *Effect of the Monomer Cross-Linker Ratio on the Separation Selectivity of Monoclonal Antibody Subunits in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis*. Anal Chem, 2021. **93**(7): p. 3535-3541.
52. Filep, C. and A. Guttman, *Electromigration Dispersion in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis of Proteins*. Analytical Chemistry, 2022. **94**(38): p. 13092-13099.
53. Sanger-van de Griend, C.E., *CE-SDS method development, validation, and best practice-An overview*. Electrophoresis, 2019. **40**(18-19): p. 2361-2374.
54. Cohen, A.S. and B.L. Karger, *High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins*. Journal of Chromatography A, 1987. **397**: p. 409-417.
55. Mitchelson, K.R. and J. Cheng, *Capillary electrophoresis with glycerol as an additive*. Methods Mol Biol, 2001. **162**: p. 259-77.
56. Sacco, P., et al., *Boric Acid Induced Transient Cross-Links in Lactose-Modified Chitosan (Chitlac)*. Biomacromolecules, 2017. **18**(12): p. 4206-4213.
57. Deuel, H. and H. Neukom, *Biological and Synthetic Polymer Networks*. Makromol. Chem., 1949. **3**: p. 113-126.
58. Harris, P.C., *Chemistry and rheology of borate-crosslinked fluids at temperatures to 300F*. Journal of Petroleum Technology, 1993. **45**(03): p. 264-269.
59. Karger, B.L. and A. Guttman, *DNA sequencing by CE*. Electrophoresis, 2009. **30 Suppl 1**(Suppl 1): p. S196-202.
60. Hoffstetter-Kuhn, S., et al., *Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(15): p. 1541-1547.
61. Grossman, P.D. and D.S. Soane, *Capillary electrophoresis of DNA in entangled polymer solutions*. Journal of Chromatography A, 1991. **559**(1): p. 257-266.

62. Barron, A.E., H.W. Blanch, and D.S. Soane, *A transient entanglement coupling mechanism for DNA separation by capillary electrophoresis in ultradilute polymer solutions*. *Electrophoresis*, 1994. **15**(5): p. 597-615.
63. Karger, B.L., *Perspectives on capillary electrophoresis*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2023. **167**: p. 117215.
64. Koutny, L.B. and E.S. Yeung, *On-line detection of proteins in gel electrophoresis by ultraviolet absorption and by native fluorescence utilizing a charge-coupled device imaging system*. *Analytical Chemistry*, 1993. **65**(2): p. 183-187.
65. Hu, S., et al., *Separation of proteins by sodium dodecylsulfate capillary electrophoresis in hydroxypropylcellulose sieving matrix with laser-induced fluorescence detection*. *Journal of Chromatography A*, 2000. **894**(1): p. 291-296.
66. Colyer, C., *Noncovalent labeling of proteins in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*. *Cell Biochem Biophys*, 2000. **33**(3): p. 323-37.
67. Szekrényes, Á., et al., *High-throughput analysis of therapeutic and diagnostic monoclonal antibodies by multicapillary SDS gel electrophoresis in conjunction with covalent fluorescent labeling*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012. **404**: p. 1485-1494.
68. Lee, I.H., et al., *Picomolar analysis of proteins using electrophoretically mediated microanalysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*. *Anal Chem*, 1998. **70**(21): p. 4546-8.
69. Oldenburg, K.E., X. Xi, and J.V. Sweedler, *Simple sheath flow reactor for post-column fluorescence derivatization in capillary electrophoresis*. *Analyst*, 1997. **122**(12): p. 1581-5.
70. Michels, D.A., et al., *Fluorescent Derivatization Method of Proteins for Characterization by Capillary Electrophoresis- Sodium Dodecyl Sulfate with Laser-Induced Fluorescence Detection*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(15): p. 5963-5971.
71. Kaneta, T., D. Yamamoto, and T. Imasaka, *Postcolumn derivatization of proteins in capillary sieving electrophoresis/laser-induced fluorescence detection*. *ELECTROPHORESIS*, 2009. **30**(21): p. 3780-3785.
72. Steinberg, T.H., et al., *SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein*. *Anal Biochem*, 1996. **239**(2): p. 223-37.
73. Harvey, M.D., D. Bandilla, and P.R. Banks, *Subnanomolar detection limit for sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis using a fluorogenic, noncovalent dye*. *Electrophoresis*, 1998. **19**(12): p. 2169-74.
74. Csapo, Z., et al., *Automated ultra-thin-layer SDS gel electrophoresis of proteins using noncovalent fluorescent labeling*. *Anal Chem*, 2000. **72**(11): p. 2519-25.
75. Bousse, L., et al., *Protein sizing on a microchip*. *Anal Chem*, 2001. **73**(6): p. 1207-12.
76. Gelfi, C., et al., *Capillary zone electrophoresis in polymer networks of polymerase chain reaction-amplified oligonucleotides: the case of congenital adrenal hyperplasia*. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1994. **657**(1): p. 201-5.
77. Vincent, A. and K. Scherrer, *A rapid and sensitive method for detection of proteins in polyacrylamide SDS gels: staining with ethidium bromide*. *Mol Biol Rep*, 1979. **5**(4): p. 209-14.
78. Calladine, C.R., et al., *A study of electrophoretic mobility of DNA in agarose and polyacrylamide gels*. *J Mol Biol*, 1991. **221**(3): p. 981-1005.

79. Guttman, A. and N. Cooke, *Effect of temperature on the separation of DNA restriction fragments in capillary gel electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1991. **559**(1): p. 285-294.