



DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

**ANALITIKAI MÓDSZERFEJLESZTÉS AZ N-GLIKÁNOK KAPILLÁRIS  
ELEKTROFORÉZISSSEL TÖRTÉNŐ ELVÁLASZTÁSÁHOZ**

*Készítette:*

**Szigeti Márton Géza**

Okleveles környezetmérnök

DOI:10.18136/PE.2025.969

**Kémiai és Környezettudományok Doktori Iskola**

*Témavezető:*

**Dr. Guttman András**

Egyetemi tanár

**Pannon Egyetem – Mérnöki Kar**

**Bio - nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet**



**Veszprém**

**2025**

Analitikai módszerfejlesztés az N-glikánok kapilláris elektroforézissel történő elválasztásához

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem  
Kémiai és Környezettudományok Doktori Iskolája keretében

Kémiai tudományok tudományágban

Írta: Szigeti Márton Géza

Témavezető: Dr. Guttman András

Elfogadásra javaslom: igen / nem.

.....  
témavezető

Az értekezés bírálatra bocsátható.

.....  
TDHT elnök

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

A bíráló Bizottság tagjai:

Elnök: .....

Bírálók: .....

Tagok: .....

Veszprém, .....

.....  
Bíráló Bizottság elnök

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

Veszprém, .....

.....  
EDHT elnök

# Tartalomjegyzék

1. Irodalmi áttekintés.....	1
1.1. Glikoziláció és glikomika.....	1
1.2. A glikoziláció szerepe az élő szervezetekben.....	2
1.3. A glikoziláció a modern gyógyszergyártásban.....	4
1.4. N-glikánok analízisének lehetőségei és kihívásai .....	6
1.5. Kapilláris elektroforézis .....	10
1.6. A kutatómunka során felhasznált fehérjék .....	18
2. Célkitűzés .....	21
3. Vizsgálati módszerek .....	23
3.1. Felhasznált anyagok és eszközök .....	23
3.2. Az N-glikán mintaelőkészítéshez szükséges törzsoldatok elkészítése .....	25
3.2.1. Fehérjék denaturálása .....	26
3.2.2. Enzimatis N-glikán felszabadítás .....	27
3.2.3. Fluorofór jelölés és a többlet jelölőanyag eltávolítása .....	28
3.2.4. Standardok és fehérje minták .....	29
3.3. Az N-glikán mintaelőkészítés menete .....	30
3.4. N-glikánok elválasztása kapilláris elektroforézis technikával.....	33
3.4.1. Kapilláris kondicionálás .....	33
3.4.2. Standardok és fehérjeminták N-glikán analízise .....	34
3.5. Fehérje tisztaság vizsgálata kapilláris elektroforézissel .....	36
3.5.1. Méret szerinti elválasztás SDS-CGE módszerrel .....	36
3.5.2. Töltésheterogenitás vizsgálata cIEF módszerrel .....	37
3.6. Tömegspektrométer – kapilláris elektroforézis kapcsolás.....	37
3.7. Exoglikozidáz enzimes szekvenálás.....	38
4. Vizsgálati eredmények és kiértékelésük.....	39
4.1. Terápiás gyógyszerfehérjék N-glikán analízise.....	39
4.1.1. Kapilláris elektroforézis alapú fehérje analízis .....	39
4.1.2. Sztérikus gátlás és tripszines előemésztés .....	42
4.2. Mintaelőkészítés optimalizációja CE-MS analízishez .....	47
4.2.1. Fehérje precipitáció és inhibíciós hatások.....	47
4.2.2. Optimalizált mintaelőkészítés nagy mennyiségű fehérjék feldolgozásához.....	51

4.3. A mintaelőkészítési protokoll megbízhatóságának vizsgálata .....	54
4.3.1. Specifitás és szelektitás .....	54
4.3.2. Linearitás .....	57
4.3.3. Reprodukálhatóság .....	60
4.4. Automatizált N-glikán szekvenálás .....	63
5. Összefoglalás .....	68
6. Irodalomjegyzék .....	69
Melléklet .....	76

## Kivonat

A glikoziláció az egyik legfontosabb poszttranszlációs módosítás, amely alapvetően befolyásolja a fehérjék stabilitását, biológiai aktivitását és kölcsönhatási mintázatát. Az N-glikánok szerkezeti és mennyiségi analízise különösen nagy jelentőséggel bír a biotechnológiai iparban és a biomarker-kutatásokban. A dolgozat célja olyan analitikai módszerek fejlesztése volt, amelyek lehetővé teszik a glikozilált fehérjékhez kötött N-glikánok gyors, megbízható és reprezentatív vizsgálatát kapilláris elektroforézis (CE) technikával. A kutatómunkám során több innovatív mintaelőkészítési stratégia került kidolgozásra és validálásra. Elsőként egy tripszines előemésztésen alapuló protokollt fejlesztettem, amely képes hatékonyan felszabadítani a nehezen hozzáférhető N-glikánokat a mesterséges fúziós és gliko-módosított glikoproteinekből is. Ez a megközelítés kiküszöböli a PNGase F enzimess de-glikoziláció során fellépő sztérikus gátlást, anélkül, hogy torzítná a glikánv profil minőségi és mennyiségi analízisét. Második fejlesztési irányként egy hőmérsékletgradiens alapú denaturációs protokollt került kidolgozásra, amely lehetővé tette a fehérje koncentráció jelentős növelését a mintaelőkészítés során. A detergens koncentrációjának optimalizálása és a fokozatos hőemelést révén sikerült minimalizálni a precipitációt, ezáltal elősegítve a kis mennyiségű fehérjék detektálását és tömegspektrometriás analízisre történő előkészítését. Ezen folyamat kiterjesztésenként kifejlesztettem egy mágneses mikrorészecskéken alapuló mintaelőkészítési módszert, amely specifikus amin-funkciós csoportokon keresztül kötötte meg a glikoproteineket, mely megközelítés nemcsak tovább növelte a denaturáció hatékonyságát, hanem lehetővé tette a minta mátrixából származó interferáló komponensek – pl. glükóz – eltávolítását is, ami különösen fontos volt a tömegspektrometriás kompatibilitás biztosításához. A mintaelőkészítési folyamat kiegészítéseként sikerült szignifikánsan lecsökkenteni és automatizálhatóvá tenni az exoglikozidáz alapú N-glikán szekvenálási lépést. A korábban akár több napot igénylő enzimess emésztések optimalizálásával, valamint a CE-berendezés paramétereinek finomhangolásával az analízis immár kevesebb mint egy órán belül elvégezhető. Ez új távlatokat nyit a glikán alapú minőségellenőrzés és gyártásközi kontroll automatizálásában. A dolgozatban bemutatott módszerek több szinten is validálásra kerültek egy kiválasztott terápiás fehérjén (Humira). Az alkalmazott technikák sikeresen bizonyították reprodukálhatóságukat, linearitásukat és szelektivitásukat, továbbá kompatibilisek voltak a CE-LIF és CE-MS rendszerekkel egyaránt.

## Abstract

Glycosylation is one of the most critical post-translational modifications, fundamentally influencing protein stability, biological activity, and interaction patterns. The structural and quantitative analysis of N-glycans holds particular importance in both the biotechnology industry and biomarker research. The aim of this dissertation was to develop analytical methods enabling the rapid, reliable, and representative analysis of N-glycans attached to glycosylated proteins using capillary electrophoresis (CE) techniques. Throughout the research, several innovative sample preparation strategies were developed and validated. Firstly, a protocol based on tryptic pre-digestion was established, capable of efficiently releasing sterically hindered N-glycans from artificially fused and glycoengineered glycoproteins. This approach eliminates steric hindrance commonly encountered during enzymatic deglycosylation with PNGase F, without distorting the qualitative or quantitative characteristics of the glycan profile. As a second line of development, a temperature gradient-based denaturation protocol was devised, which significantly enhanced protein concentration during sample preparation. By optimizing detergent concentrations and applying gradual heating, protein precipitation was minimized, thereby facilitating the detection of low-abundance proteins and their preparation for mass spectrometric analysis. As an extension of this workflow, a sample preparation method based on magnetic microparticles was developed, wherein glycoproteins were selectively captured through specific amino-functional groups. This strategy not only further improved denaturation efficiency but also enabled the removal of matrix-derived interfering components – such as glucose – which is particularly critical for ensuring mass spectrometric compatibility. In addition to the above, the exoglycosidase-based N-glycan sequencing step was significantly shortened and rendered automatable. Through the optimization of enzymatic digestion protocols – previously requiring several days – and the fine-tuning of CE instrumentation parameters, the analysis can now be completed in under one hour. This opens new perspectives for the automation of glycan-based quality control and in-process monitoring. The methods presented in this dissertation were validated on multiple levels using a selected therapeutic protein (Humira). The applied techniques demonstrated excellent reproducibility, linearity, and selectivity, and were compatible with both CE-LIF and CE-MS platforms.

## Abstrakt

Die Glykosylierung zählt zu den bedeutendsten posttranslationalen Modifikationen, da sie grundlegend die Stabilität von Proteinen, ihre biologische Aktivität sowie ihre Interaktionsmuster beeinflusst. Die strukturelle und quantitative Analyse von N-Glykanen hat sowohl in der biotechnologischen Industrie als auch in der Biomarkerforschung eine herausragende Bedeutung. Ziel dieser Dissertation war die Entwicklung analytischer Methoden, die eine schnelle, zuverlässige und repräsentative Untersuchung von an glykolisierte Proteine gebundenen N-Glykanen mittels Kapillarelektrophorese (CE) ermöglichen. Im Rahmen der Forschungsarbeit wurden mehrere innovative Strategien zur Probenvorbereitung entwickelt und validiert. Zunächst wurde ein auf tryptischer Vorverdauung basierendes Protokoll etabliert, das eine effiziente Freisetzung sterisch gehinderter N-Glykane aus künstlich fusionierten und glykoengineerten Glykoproteinen erlaubt. Dieser Ansatz beseitigt sterische Hinderungen, wie sie typischerweise bei der enzymatischen Deglykosylierung mit PNGase F auftreten, ohne dabei das qualitative oder quantitative Glykanprofil zu verfälschen. In einem weiteren Entwicklungsschritt wurde ein denaturierendes Protokoll auf Basis eines Temperaturgradienten konzipiert, das eine signifikante Erhöhung der Proteinkonzentration während der Probenvorbereitung ermöglichte. Durch die Optimierung der Detergens Konzentrationen und die schrittweise Temperaturerhöhung konnte die Präzipitation minimiert werden, was die Detektion gering konzentrierter Proteine sowie deren Vorbereitung für massenspektrometrische Analysen erleichtert.

Als Erweiterung dieses Workflows wurde eine Probenvorbereitungsmethode unter Verwendung magnetischer Mikropartikel entwickelt, bei der Glykoproteine selektiv über spezifische Aminofunktionsgruppen gebunden wurden. Diese Strategie steigerte nicht nur die Effizienz der Denaturierung weiter, sondern ermöglichte auch die Entfernung matrixbedingter interferierender Komponenten – wie etwa Glukose –, was besonders wichtig für die Massenspektrometrie Kompatibilität ist. Darüber hinaus konnte der exoglykosidasebasierte Sequenzierungsschritt der N-Glykane signifikant verkürzt und automatisierbar gestaltet werden. Durch die Optimierung der zuvor mehrere Tage in Anspruch nehmenden enzymatischen Verdauungsprotokolle sowie die Feinabstimmung der Parameter des CE-Systems ist eine Analyse nun in weniger als einer Stunde möglich. Dies eröffnet neue Perspektiven für die Automatisierung der glykobasierten Qualitätskontrolle und der prozessbegleitenden Überwachung. Die in dieser Dissertation vorgestellten Methoden wurden auf mehreren Ebenen anhand eines ausgewählten therapeutischen Proteins (Humira) validiert. Die angewandten Techniken zeigten eine hervorragende Reproduzierbarkeit, Linearität und Selektivität und waren mit sowohl CE-LIF- als auch CE-MS-Systemen kompatibel.

## Új tudományos eredmények – a doktori értekezés tézisei

1) **Biológikumok fejlesztése és gyártása során létrehozott fúziós (fusion) és gliko-módosított (glycoengineered) glikoproteinek N-glikán analízise céljából egy triszpszines előemésztést alkalmazó mintaelőkészítési módszert dolgoztam ki, mely a PNGase F enzimmel történő deglikoziláció során fellépő sztérikus gátlást megszünteti, ezáltal nagy hatékonyságú és reprezentatív N-glikán analízis hajtható végre.** A glikoproteinek hatékony denaturálása ellenére is a mesterségesen létrehozott fehérjék esetén az N-glikán struktúrák hozzáférhetősége a PNGase F enzim számára számos esetben korlátozott lehet, mely jelentősen megnöveli az enzimatis reakció idejét, vagy teljesen hozzá nem férhetővé teszi az enzimet a glikánok számára. A tripszin enzimet alkalmazva ez a sztérikus gátlás megszüntethető anélkül, hogy az N-glikán profilt módosítanánk, így reprezentatív mennyiségi és minőségi analízis végezhető el.

2) **A fehérjék denaturációjakor – tulajdonságaiktól függően, első sorban a koncentráció növelésekor – fellépő precipitációs hatás csökkentés céljából egy hőmérséklet gradiens denaturációs módszert dolgoztam ki, melynek segítségével jelentősen megnövelhető a fehérjék koncentrációja a mintában, így a kis mennyiségben jelen lévő fehérjék is detektálhatóvá válnak, valamint különleges analitikai módszerek alkalmazása esetén (tömegspektrometria) a koncentráció növelés megvalósíthatóvá válik.** A fehérjék koncentrációjának növelése azok precipitációja miatt korlátozott mértékben hajtható végre, azonban, ha az alkalmazott detergensnek mennyiségét és minőségét optimalizáljuk, és a hőmérséklet fokozatos emelésével elősegítjük a reakció hatékony végbemenetelét, jelentősen megnövelhető a mintában a fehérjék mennyisége célzott analitikai munkák elvégzése céljából.

3) **A célzott analitikai mérésekhez szükséges fehérjekoncentráció további növelése céljából egy mágneses mikrorészecskéket tartalmazó mintaelőkészítési módszert dolgoztam ki a denaturációs lépés elősegítése céljából, mely amin-funkciós csoportokon keresztül specifikusan megkötö a glikoproteineket, elősegíti a kapcsolódó reakciókat (PNGase F emésztés) a nem kívánatos mintamátrix komponensek eltávolításán keresztül (glükóz – inhibíció), továbbá szignifikánsan megnöveli a precipitáció nélkül denaturálható fehérje mennyiségét.** A funkcionizált mágneses mikrorészecskék alkalmazásával jelentősen megnövelhető volt a precipitáció nélkül denaturálható fehérjék mennyisége, továbbá a célzott immobilizációt kihasználva a nem kívánatos minta mátrix komponensek is eltávolíthatóak a rendszerből.

4) **A leemésztett N-glikán struktúrák pontos minőségi meghatározása céljából alkalmazott exoglikozidáz szekvenálási folyamatot jelentősen felgyorsítottam oly mértékben, hogy a kapcsolódó analitikai méréssel együtt is akár egy órán belül elvégezhető úgy, hogy az analitikai mérőberendezés megfelelő parametrizálásával a folyamat teljesen automatizálható.** A különböző specifikus enzimeket alkalmazó exoglikozidáz szekvenálás mind mintaelőkészítés, mind mérés szempontjából lassú, akár napokat igénybe vevő folyamat, ahol az enzimek együttes alkalmazásával, az emésztési körülmények együttes optimalizálásával, valamint a mérésre szolgáló analitikai berendezés rendhagyó alkalmazásával a teljes folyamat felgyorsítható és automatizálható volt.

## A doktori értekezéshez kapcsolódó publikációk jegyzéke

### Külföldi folyóiratban megjelent publikációk:

(01) Filep, Csenge; Szigeti, Marton; Farsang, Robert; Habegger, Markus; Reusch, Dietmar; Guttman, Andras, **Multilevel capillary gel electrophoresis characterization of new antibody modalities**, ANALYTICA CHIMICA ACTA 1166 Paper: 338492 (2021)

(02) Szigeti, Marton; Guttman, Andras, **Sample preparation scale-up for deep N-glycomic analysis of human serum by capillary electrophoresis and CE-ESI-MS**, MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS 18 : 12 pp. 2524-2531. Paper: mcp.TIR119.001669 , 8 p. (2019)

(03) Szigeti, Marton; Guttman, Andras, **Automated N-Glycosylation Sequencing Of Biopharmaceuticals By Capillary Electrophoresis**, SCIENTIFIC REPORTS 7 Paper: 11663, 7 p. (2017)

### Konferencia részvétel:

(01) Guttman, A.; Szigeti, M., **Deep N-glycomic analysis of human serum by capillary electrophoresis and CESI-MS: the challenge of sample preparation**, In: Alberto, Escarpa (szerk.) 25th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, LACE 2019

(02) Guttman, A.; Szigeti, M.; Hajba, L., **Comprehensive N-glycosylation characterization of therapeutic antibodies by capillary electrophoresis and mass spectrometry**, In: Leiden, University EUROCARB XX, Leiden 2019, Book of Abstracts, (2019) p. - Paper: OL3.3.1

(03) Guttman, A.; Szekrenyes, A.; Szigeti, M., **LC or CE? Maybe both! Towards comprehensive characteri-zation of N-glycosylation modifications of protein biopharmaceuticals**, In: Alberto, Cavazzini; Massimo, Morbidelli (szerk.) 48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (2019) p. –

(04) Szekrényes, A. ; Szigeti, M. ; Guttman, A., **Validation of a fast and high resolution capillary electrophoresis based mAb N-glycan profiling method**, In: Analytical Technologies Europe: Symposium on the Practical Applications including CE, LC and MS in the Biopharmaceutical Industry (AT Europe 2019)

## A doktori értekezéstől függetlenül megjelent publikációk jegyzéke

### Külföldi folyóiratokban megjelent publikációk:

(01) Lajtai-Szabó, P. ; Hülber-Beyer, É. ; Vonyó, V.Z. ; Szigeti, M.G. ; Nemestóthy, N. ; Bélafi-Bakó, K., **Novel Insights into Filtration Studies of Streptomyces Coelicolor Fermentation Broth for Inoculation of Membrane Gradostat Reactor**, JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE AND RESEARCH 11 : 1 Paper: 2041305 (2025)

(02) Simon-Stóger, Lilla ; Szigeti, Márton ; Varga, Csilla, **Innovative methods lined up for qualification of waste elastomer fillers**, POLYMER TESTING 2025 p. 108819 Paper: 108819 (2025)

(03) Simon-Stóger, L. ; Kovács, A. ; Szigeti, M. ; Bobek-Nagy, J. ; Kurdi, R. ; Varga, Cs., **Oscillation rheology, calorimetry and computed tomography: a practical toolkit combination of qualification for real poly(ethylene terephthalate) waste**, JOURNAL OF CLEANER PRODUCTION 454 Paper: 142346 (2024)

(04) Bobek-Nagy, Janka ; Kurdi, Róbert ; Kovács, András ; Simon-Stóger, Lilla ; Szigeti, Márton ; Varga, Csilla, **How introduction of deposit-refund system (DRS) changes recycling of non-drinking bottle PET wastes**, EXPRESS POLYMER LETTERS 17 : 11 pp. 1166-1179. , 14 p. (2023)

(05) Sarkozy, Daniel ; Farsang, Robert ; Szigeti, Marton ; Austin, Sean ; Lock, Stephen ; Guttman, Andras, **Capillary electrophoresis analysis of industrial galactooligosaccharides**, JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 233 Paper: 115434 (2023)

(06) Farsang, Róbert ; Kovács, Noémi ; Szigeti, Márton ; Jankovics, Hajnalka ; Vonderviszt, Ferenc ; Guttman, András, **Immobilized exoglycosidase matrix mediated solid phase glycan sequencing**, ANALYTICA CHIMICA ACTA 1215 Paper: 339906 (2022)

(07) Kovács, Noémi ; Farsang, Róbert ; Szigeti, Márton ; Vonderviszt, Ferenc ; Jankovics, Hajnalka, **Enhanced Recombinant Protein Production of Soluble, Highly Active and Immobilizable PNGase F**, MOLECULAR BIOTECHNOLOGY 2022 Paper: 10.1007/s12033-022-00464-6 (2022)

(08) Szabo, Miklos ; Sarkozy, Daniel ; Szigeti, Marton ; Farsang, Robert ; Kardos, Zsófia ; Kozma, Adam ; Csanky, Eszter ; Chung, Doo Soo ; Szekanecz, Zoltan ; Guttman, Andras, **Introduction of a Capillary Gel Electrophoresis-Based Workflow for Biotherapeutics Characterization: Size, Charge, and N-Glycosylation Variant Analysis of Bamlanivimab, an Anti-SARS-CoV-2 Product**, FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY 10 Paper: 839374 , 9 p. (2022)

(09) Szabo, Miklos ; Filep, Csenge ; Nagy, Mate ; Sarkozy, Daniel ; Szigeti, Marton ; Sperling, Edit ; Csanky, Eszter ; Guttman, Andras, **N-glycosylation structure – function characterization of omalizumab, an anti-asthma biotherapeutic product**, JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 209 Paper: 114483, 5 p. (2022)

(10) Kaur, Harleen ; Beckman, Jeff ; Zhang, Yiting ; Li, Zheng Jian ; Szigeti, Marton ; Guttman, Andras, **Capillary electrophoresis and the biopharmaceutical industry: Therapeutic protein analysis and characterization**, TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY 144 Paper: 116407 (2021)

- (11) Jarvas, Gabor ; Szigeti, Marton ; Campbell, Matthew P. ; Guttman, Andras  
**Database search assisted N-glycan structure identification**, In: Ziad, El Rassi, Carbohydrate Analysis by Modern Liquid Phase Separation Techniques (Second Edition), Nemzetközi : Elsevier (2021) 954 p. pp. 843-858. , 16 p.
- (12) Sarkozy, Daniel ; Borza, Beata ; Domokos, Apolka ; Varadi, Eszter ; Szigeti, Marton ; Meszaros-Matwiejuk, Agnes ; Molnar-Gabor, Dora ; Guttman, Andras, **Ultrafast high-resolution analysis of human milk oligosaccharides by multicapillary gel electrophoresis**, FOOD CHEMISTRY 341 Paper: 128200 (2021)
- (13) Szigeti, Marton ; Meszaros-Matwiejuk, Agnes ; Molnar-Gabor, Dora ; Guttman, Andras , **Rapid capillary gel electrophoresis analysis of human milk oligosaccharides for food additive manufacturing in-process control**, ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY 413 : 6 pp. 1595-1603. , 9 p. (2021)
- (14) Torok, Rebeka ; Horompoly, Klaudia ; Szigeti, Marton ; Guttman, Andras ; Vitai, Marta ; Koranyi, Laszlo ; Jarvas, Gabor, **N-Glycosylation Profiling of Human Blood in Type 2 Diabetes by Capillary Electrophoresis: A Preliminary Study**, MOLECULES 26 : 21 Paper: 6399 , 11 p. (2021)
- (15) De Leoz, Maria Lorna A. ; Duewer, David L. ; Fung, Adam ; Liu, Lily ; Yau, Hoi Kei ; Potter, Oscar ; Staples, Gregory O. ; Furuki, Kenichiro ; Frenkel, Ruth ; Hu, Yunli et al.  
**NIST Interlaboratory Study on Glycosylation Analysis of Monoclonal Antibodies: Comparison of Results from Diverse Analytical Methods**, MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS 19 : 1 pp. 11-40. , 30 p. (2020)
- (16) Drouin, Nicolas ; van Mever, Marlien ; Zhang, Wei ; Tobolkina, Elena ; Ferre, Sabrina ; Servais, Anne-Catherine ; Gou, Marie-Jia ; Nyssen, Laurent ; Fillet, Marianne ; Lageveen-Kammeijer, Guinevere S.M. et al., **Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry at Trial by Metabo-Ring: Effective Electrophoretic Mobility for Reproducible and Robust Compound Annotation**, ANALYTICAL CHEMISTRY 92 : 20 pp. 14103-14112. , 10 p. (2020)
- (17) Farkas, Anna; Mészáros, Brigitta ; Szarka, Máté ; Szigeti, Márton ; Kappelmayer, János ; Szabó, Miklós ; Csánky, Eszter ; Guttman, András, **Modeling of the desialylated human serum N-glycome for molecular diagnostic applications in inflammatory and malignant lung diseases**, CURRENT MOLECULAR MEDICINE 20 : 10 pp. 765-772. , 8 p. (2020)
- (18) Fonslow, Bryan ; Jarvas, Gabor ; Szigeti, Marton ; Guttman, Andras, **Multilevel characterization of antibody-ligand conjugates by CESI-MS**, CURRENT MOLECULAR MEDICINE 20 : 10 pp. 789-797, 9 p. (2020)
- (19) Jarvas, Gabor ; Szigeti, Marton ; Campbell, Matthew P ; Guttman, Andras, **Expanding the capillary electrophoresis-based glucose unit database of the GUCal app**, GLYCOBIOLOGY 30 : 6 pp. 362-364. , 3 p. (2020)

- (20) Mészáros, Brigitta ; Járvás, Gábor ; Farkas, Anna ; Szigeti, Márton ; Kovács, Zsuzsanna ; Kun, Renáta ; Szabó, Miklós ; Csánky, Eszter ; Guttman, András, **Comparative analysis of the human serum N-glycome in lung cancer, COPD and their comorbidity using capillary electrophoresis**, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B 1137 Paper: 121913 , 7 p. (2020)
- (21) Szekrenyes, Akos ; Szigeti, Marton ; Dvorakova, Veronika ; Jarvas, Gabor ; Guttman, Andras, **Quantitative comparison of the N-glycosylation of therapeutic glycoproteins using the Glycosimilarity Index. A Tutorial**, TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY 122 Paper: 115728 (2020)
- (22) Szarka, Máté ; Szigeti, Márton ; Guttman, András, **Imaging Laser-Induced Fluorescence Detection at the Taylor Cone of Electrospray Ionization Mass Spectrometry**, ANALYTICAL CHEMISTRY 91 : 12 pp. 7738-7743. , 6 p. (2019)
- (18) Borza, Beata ; Szigeti, Marton ; Szekrenyes, Akos ; Hajba, Laszlo ; Guttman, Andras, **Glycosimilarity assessment of biotherapeutics 1: Quantitative comparison of the N-glycosylation of the innovator and a biosimilar version of etanercept**, JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 153 pp. 182-185. , 4 p. (2018)
- (23) Jarvas, G ; Szigeti, M ; Guttman, A, **Effect of the flow profile on separation efficiency in pressure assisted reversed polarity capillary zone electrophoresis of anions: simulation and experimental evaluation**, JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE 41 : 11 pp. 2473-2478. , 5 p. (2018)
- (24) Jarvas, Gabor ; Szigeti, Marton ; Guttman, Andras, **Structural identification of N-linked carbohydrates using the GUcal application: A tutorial**, JOURNAL OF PROTEOMICS 171 pp. 107-115. , 9 p. (2018)
- (25) Járvás, Gabor ; Varga, Tamas ; Szigeti, Marton G ; Hajba, Laszlo ; Fürjes, Peter ; Rajta, Istvan ; Guttman, Andras, **Tilted pillar array fabrication by the combination of proton beam writing and soft lithography for microfluidic cell capture Part 2: Image sequence analysis based evaluation and biological application**, ELECTROPHORESIS 39 : 3 pp. 534-539. , 6 p. (2018)
- (26) Mészáros, B ; Járvás, G ; Hajba, L ; Szigeti, M ; Dallos, A ; Guttman, A, **Quantitative characterization of plasma treated PDMS microfluidic substrates by inverse gas chromatography**, SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL 258 pp. 1184-1190. , 7 p. (2018)
- (27) Reider, Balazs ; Szigeti, Marton ; Guttman, Andras, **Evaporative fluorophore labeling of carbohydrates via reductive amination**, TALANTA 185 pp. 365-369. , 5 p. (2018)
- (28) Szigeti, Marton; Chapman, Jeff ; Borza, Beata ; Guttman, Andras, **Quantitative assessment of mAb Fc glycosylation of CQA importance by capillary electrophoresis**, ELECTROPHORESIS 39 : 18 pp. 2340-2343. , 4 p. (2018)

- (29) Szigeti, M.; Guttman, A, **High-Throughput N-Glycan Analysis with Rapid Magnetic Bead-Based Sample Preparation**, METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY 1503 pp. 265-272. , 8 p. (2017)
- (30) Szigeti, Marton; Guttman, Andras, **High-Resolution Glycan Analysis by Temperature Gradient Capillary Electrophoresis**, ANALYTICAL CHEMISTRY 89 : 4 pp. 2201-2204. , 4 p. (2017)
- (31) Bodnar, Judit ; Szekrenyes, Akos ; Szigeti, Marton ; Jarvas, Gabor ; Krenkova, Jana ; Foret, Frantisek ; Guttman, Andras, **Enzymatic removal of N-glycans by PNGase F coated magnetic microparticles**, ELECTROPHORESIS 37 : 10 pp. 1264-1269. , 6 p. (2016)
- (32) Donczo, B ; Szigeti, M ; Ostoros, G ; Gacs, A ; Tovari, J ; Guttman, A , **N-Glycosylation analysis of formalin fixed paraffin embedded samples by capillary electrophoresis.**, ELECTROPHORESIS 37 : 17-18 pp. 2292-2296. , 5 p. (2016)
- (33) Jarvas, G ; Szigeti, M ; Chapman, J ; Guttman, A, **Triple-Internal Standard Based Glycan Structural Assignment Method for Capillary Electrophoresis Analysis of Carbohydrates**, ANALYTICAL CHEMISTRY 88 : 23 pp. 11364-11367. , 4 p. (2016)
- (34) Kovács, Zsuzsanna ; Szarka, Máté ; Szigeti, Márton ; Guttman, András, **Separation window dependent multiple injection (SWDMI) for large scale analysis of therapeutic antibody N-glycans**, JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 128 pp. 367-370. , 4 p. (2016)
- (35) Rajta, I ; Huszánk, R ; Szabó, ATT ; Nagy, GUL ; Szilasi, S ; Fürjes, P ; Holczer, E ; Fekete, Z ; Járvás, G ; Szigeti, M et al., **Tilted pillar array fabrication by the combination of proton beam writing and soft lithography for microfluidic cell capture: Part 1 Design and feasibility**, ELECTROPHORESIS 37 : 3 pp. 498-503. , 6 p. (2016)
- (36) Szigeti, Marton ; Bodnar, Judit ; Gjerde, Douglas ; Keresztessy, Zsolt ; Szekrenyes, Akos; Guttman, Andras, **Rapid N-glycan release from glycoproteins using immobilized PNGase F microcolumns**, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B 1032 pp. 139-143. , 5 p. (2016)
- (37) Szigeti, Marton ; Lew, Clarence ; Roby, Keith ; Guttman, Andras, **Fully Automated Sample Preparation for Ultrafast N-Glycosylation Analysis of Antibody Therapeutics**, JOURNAL OF LABORATORY AUTOMATION 21 : 2 pp. 281-286. , 6 p. (2016)
- (38) Gabor, Jarvas ; Marton, Szigeti ; Laszlo, Hajba ; Peter, Furjes ; Andras, Guttman, **Computational Fluid Dynamics-Based Design of a Microfabricated Cell Capture Device**, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHIC SCIENCE 53 : 3 pp. 411-416. , 6 p. (2015)
- (39) Jarvas, Gabor ; Szigeti, Marton ; Guttman, Andras, **GUcal: An integrated application for capillary electrophoresis based glycan analysis**, ELECTROPHORESIS 36 : 24 pp. 3094-3096. , 3 p. (2015)
- (40) M., Szigeti ; G., Járvás ; A., Guttman, **Design and Modeling of Microfluidic Cell Capture Devices**, CHEMICKE LISTY 107 : S3 pp. S458-S459. (2013)

### **Haza folyóiratban megjelent publikációk:**

(01) Patthy, Gergely Balázs ; Szigeti, Márton ; Závodi-Fodor, Zsófia ; Vasáros, Mátyás ; Jakab, Miklós, **How to Avoid Acid Corrosion of Laminated Solar Panels by Replacing the Encapsulant**, HUNGARIAN JOURNAL OF INDUSTRY AND CHEMISTRY 52 : 2 pp. 47-56. , 10 p. (2024)

(02) Dönczö, B ; Bodnár, J ; Szigeti, M ; Járvás, G ; Hajba, L ; Guttman, A, **Glikomika a modern orvostudományban: Transzlációs aspektusok**, IME: INTERDISZCIPLINÁRIS MAGYAR EGÉSZSÉGÜGY / INFORMATIKA ÉS MENEDZSMENT AZ EGÉSZSÉGÜGYBEN 14 : 6 pp. 24-28. , 5 p. (2015)

(03) Szigeti, Márton ; Bodnár, Judit ; Járvás, Gábor ; Hajba, László ; Patakiné, Ostoros Györgyi ; Guttman, A, **Transzlációs glikomika: Diagnosztikai és biotechnológiai alkalmazások**; Az MTA PE Transzlációs Glikomika Kutatócsoport bemutatkozása, MAGYAR KÉMİKUSOK LAPJA 70 : 4 pp. 125-127. , 3 p. (2015)

### **Konferencia részvétel:**

(01) Márton Szigeti, Lilla Simon-Stöger, Csilla Varga, **Advanced methods for the assessment of waste elastomer fillers**, 51<sup>st</sup> International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering – SSCHE 2025, Jasná, Demänovská Dolina, Szlovákia

(02) Daniel, Sarkozy ; Mate, Szarka ; Marton, Szigeti ; Andras, Guttman, **Cyclodextrin Mediated Sodium Dodecyl Sulfate Removal for Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Biopharmaceuticals**, In: Analytical Technologies Europe: Symposium on the Practical Applications including CE, LC and MS in the Biopharmaceutical Industry (AT Europe 2019)

(03) Filep, C. ; Borza, B. ; Szigeti, M. ; Demianova, Z. ; Guttman, A., **Comparison of the analysis of fluorophore labeled carbohydrate libraries using HILIC-UPLC and multicapillary electrophoresis**, In: Leiden, University EUROCARB XX, Leiden 2019, Book of Abstracts, (2019) p. - Paper: P76

(04) Filep, Cs. ; Borza, B. ; Szigeti, M. ; Demianova, Z. ; Guttman, A., **Analysis of fluorophore labeled N-glycans using liquid phase separation methods**, In: Alberto, Cavazzini; Massimo, Morbidelli (szerk.) 48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (2019) p. -

(05) Guttman, A. ; Szarka, M. ; Szigeti, M., **Imaging laser induced fluorescence (iLIF) detection at the Taylor cone of electrospray ionization mass spectrometry**, In: Global CESI-MS Symposium (2019) p. -

(06) Guttman, A. ; Szekrenyes, A. ; Szigeti, M., **Comparative Glycosylation Analysis of Biotherapeutics and their Biosimilars**, In: Pittcon Book of Abstracts (2019) p. -

- (07) Guttman, András; Szarka, Máté; Szigeti, Márton, **Imaging Laser Induced Fluorescence Detection at the Taylor Cone of Electrospray Ionization Mass Spectrometry**, In: Global CESI-MS Symposium (2019) p. 3
- (08) Jarvas, G. ; Szigeti, M. ; Campbell, M. ; Guttman, A., **Recent developments of the GUCal application**, In: Tomasz, Bączek CECE 2019 (2019) p. -
- (09) Járvas, G. ; Mészáros, B. ; Borza, B. ; Hajba, L. ; Dönczö, B. ; Kovács, Zs. ; Szarka, M. ; Szigeti, M. ; Guttman, A., **Development of bioanalytical methods for the electrophoresis based separation of glycans**, In: Műszaki Kémiai Napok 2019 (2019) p. 48
- (10) Sarkozy, D. ; Szarka, M. ; Szigeti, M. ; Guttman, A., **Cyclodextrin Mediated Sodium Dodecyl Sulfate Removal in Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Biopharmaceuticals**, In: Analytical Technologies Europe: Symposium on the Practical Applications including CE, LC and MS in the Biopharmaceutical Industry (AT Europe 2019)
- (11) Apolka, Domokos ; Márton, Szigeti ; Máté, Szarka ; András, Guttman, **Effect of capillary length in CE-LIF analysis of N-glycans: a wall interaction study**, In: František, Foret; Jana, Křenková; Iveta, Drobníková; Karel, Klepárník; Jan, Příkryl CECE 2018 15 th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis (2018) p. 123
- (12) Evelin, Farsang ; Szabolcs, Horváth ; Regina, Töröcsik ; Márton, Szigeti ; András, Guttman; Krisztián, Horváth, **Development of HILIC Method for Liquid Chromatographic Separation of Maltodextrins with UV Detection**, In: SCM-9 Book of Abstracts (2018) p. 94
- (13) Horváth, Szabolcs ; Töröcsik, Regina ; Szigeti, Márton ; Guttman, András ; Horváth, Krisztián, **HILIC módszer fejlesztése maltodextrinek folyadékkromatográfiás elválasztására UV detektálás alkalmazásával**, Elválasztástudományi vándorgyűlés, 2018: Tapolca, 2018. november 8-10., Pécs
- (14) Andras, Guttman ; Boglárka, Dönczö ; Márton, Szigeti ; Györgyi, Ostoros ; Alexandra, Gacs ; József, Tóvári, **N-Glycosylation Analysis of Formalin Fixed Paraffin Embedded Samples by Capillary Electrophoresis**, In: 14th HUMAN PROTEOME ORGANIZATION WORLD CONGRESS ABSTRACT BOOK (2015) pp. 260-260. Paper: P 21.06 , 1 p.

## Alkalmazott rövidítések

**2-AA:** 2-aminobenzoésav

**2-AB:** 2-aminobenzamid

**ADCC:** Antitestfüggő sejtcsitotoxicitás

**ANTS:** 8-aminonaftalin-1,3,6-triszulfonsav, dinátriumsó

**APTS:** 8-Aminopirén-1,3,6-triszulfon sav trinátrium só

**Asn:** Aszparagin

**BFS:** Bare fused silica, szilícium üveg

**BST:** Bracketing Standard, a maltodextrin cukor keverék DP2 és DP15 tagot tartalmazó oldata

**CDC:** Komplementfüggő citotoxicitás

**CE:** Kapilláris elektroforézis

**CE-MS:** Kapilláris elektroforézis - tömegspektrométer kapcsolás

**CGE-LIF:** Kapilláris gél elektroforézis lézer indukált fluoreszcens detektálással

**CHO:** Chinese Hamster Ovary, kínai hörcsög petefészek (sejtvonal)

**cIEF:** Kapilláris izoelektromos fókuszálás

**CITP:** Kapilláris izotachoforézis

**CMC:** Kritikus micella koncentráció

**CQA:** Kritikus minőségi attribútum

**CZE:** Kapilláris zóna elektroforézis

**DENAT:** Denaturáláshoz alkalmazott törzsoldat

**DENMIX:** Denaturáláshoz alkalmazott törzsoldatok keveréke

**DIGBUFF:** PNGase F emésztéshez szükséges puffer oldat

**DIGMIX:** PNGase F emésztéshez használt törzsoldatok keveréke

**DoE:** Design of Experiment, kísérlettervezés

**DTT:** 1,4-Dithiothreitol

**EOF:** Elektroosmotikus áramlás

**ESI:** Electrospray ionisation

**Fc:** "Fragment crystallizable" régió

**FDIG:** Gyors PCR módszer emésztéshez

**gaAb:** Glyco engineered antibody, gliko-módosított antitest

**GlcNAc:** N-Acetilglükózamin

**GU:** Glükóz egység

**HC:** Nehéz lánc (fehérje)

**HH:** Nehéz-nehez (fehérje) lánc

**HHL:** Nehéz-nehez-könnyű (fehérje) lánc

**hIgG1:** Humán immunglobulin G1

**HILIC:** Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, hidrofil kölcsönhatású folyadék kromatográfia  
**HPLC:** Nagy nyomású folyadék kromatográfia  
**HR-NCHO:** Glikánok elválasztására alkalmas gél puffer  
**IUB:** International Union of Biochemistry – enzimaktivitás mértéke  
**LABMIX:** APTS jelöléshez alkalmazott törzsoldatok keveréke  
**LC:** Folyadék kromatográfia  
**LC:** Könnyű (fehérje) lánc  
**LOD:** Detektálási határ  
**mAb:** Monoklonáris antitest  
**MAGMIX:** Felesleges jelölőanyag eltávolításához használt mágneses gyöngyöket tartalmazó oldat  
**MALDI:** Mátrix asszisztált lézeres deszorpció/ionizáció (tömegspektrométer – MS)  
**MALDI-TOF:** Mátrix asszisztált lézeres deszorpció/ionizáció (MS) „time of flight” detektorral  
**MD:** Maltodextrin  
**MS:** Tömegspektrometria  
**NCHO:** Speciális bevonattal rendelkező kapilláris  
**NEB:** New England Biolab  
**ngHC:** Nem glikozilált nehéz (fehérje) lánc  
**NMR:** Mágneses nukleáris rezonancia spektroszkópia  
**NP-40:** Nonidet P-40  
**PDA detektor:** „Photodiode array detector” – fotodiódasoros detektor  
**PCR:** Polimeráz láncreakció  
**PNGase F:** Peptide-N-glycosidase F  
**QdB:** Quality by design, tervezésen alapuló minőség  
**REDUCT:** APTS jelöléshez alkalmazott redukáló törzsoldat  
**SDS:** Nátrium-dodecil-szulfát  
**SDS-CGE:** Nátrium-dodecil-szulfát - kapilláris gél elektroforézis  
**SDS-PAGE:** Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézis  
**THF:** Tetrahidrofurán  
**TNFR2 komplex:** Tumor nekrosis faktor receptor 2 komplex  
**UV/VIS:** UV és látható tartományú detektálás  
**VLEN:** Gyors PCR módszer denaturáláshoz

## Nyilatkozat

A mesterséges intelligencia exponenciális ütemű fejlődése jelenleg legalább annyi kérdést válaszol meg, mint amit a használata kapcsán felvet, az ember pedig mindig ember marad, így a megtört, piaci törekvéseket hajszoló tudományos életben is hamar megvetette a lábát annak pozitív és negatív oldalával együtt. Én, Szigeti Márton Géza nyilatkozom, hogy ennek a disszertációnak elkészítésekor felhasználtam a AI, mint eszköz nyújtotta támogatást. Az eredményeim és a megszületett gondolataim, és a szó legjobb értelmében vett tudományos megállapításaim a sajátjaim azt remélve, hogy egyszer ennek az örült sebességgel forgó földgolyónak a lakóinak egy végtelenül kis időszakban és végtelenül kicsi niche-ében valamit tudtam ezáltal adni.

## Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Guttman Andrásnak a belém vetett hitét és a sok éven át tartó támogatását, hogy ez a dolgozat így, ebben a formában meg tudott születni. Köszönöm az évek során minden munkatársamnak a segítségét, akivel hol rövidebb, hol hosszabb ideig együtt vitt az utunk, és együtt forgattuk a tudomány óriáskerekét. Sokat tanultam tőletek!

Szeretném megköszönni feleségemnek, Szigetiné Kerekes Boglárkának és családomnak, hogy ennyi éven át támogattak. Rendhagyó és rögzös volt ez az időszak, aminek talán egy végleges lezárása ez a disszertáció. Köszönöm a barátaimnak, hogy támogattak és keresztül segítettek a mélypontokon. Ha annyi pénzem lenne, ahányszor elhangzott, hogy: „Megvan már a doktorid?“, talán ez a dolgozat sem lenne.

Szeretném megköszönni végezetül Dallos András tanár úrnak, hogy egyáltalán volt lehetőségem elindulni ezen az úton. Nélküle semmi sem valósult volna meg mindebből az elmúlt több, mint egy évtizedben.

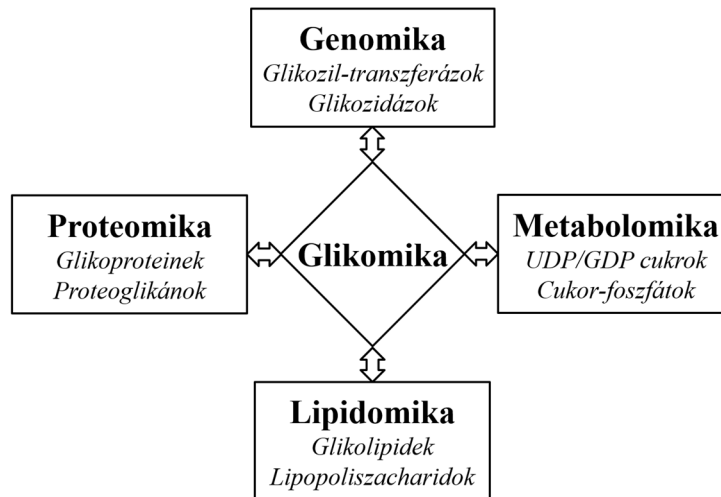
“THERE IS A WAY OUT OF EVERY BOX, A SOLUTION TO EVERY PUZZLE;  
IT’S JUST A MATTER OF FINDING IT”

*(Captain Jean-Luc Picard)*

# 1. Irodalmi áttekintés

## 1.1. Glikoziláció és glikomika

A posztgenomikus éra egyik legnagyobb kihívása az élő rendszerek komplexitásának megértése, amelyhez multidiszciplináris megközelítésekre van szükség. A genomika, proteomika, metabolomika és lipidomika mára már jól körvonalazott „omikai” tudományterületekké váltak, és kritikus szerepet játszanak az élő szervezetek funkcionális térképének feltárásában (1.1. ábra). Ezen tudományterületek mellett a glikomika egyre nagyobb figyelmet kap, noha komplexitása és technológiai kihívásai miatt kezdetben lassabban fejlődött. A glikomika a sejtekben jelen lévő glikán struktúrák – monoszacharid összetételű, elágazó szénhidrátláncok – szerkezetének, funkciójának, biológiai szerepének és dinamikájának átfogó vizsgálatával foglalkozik, s ezzel mára a rendszerbiológia nélkülözhetetlen részévé vált. A genomika a DNS szekvencia feltérképezésével és értelmezésével foglalkozik, a genetikai kódot tekinti az elsődleges információforrásnak. A proteomika ezt a genetikai információt kifejeződési szinten vizsgálja, a fehérjék mennyiségi és kvalitatív jellemzésén keresztül. Ezen tudományok ugyan nagyban hozzájárulnak az élő szervezetek molekuláris mechanizmusainak megértéséhez, de nem képesek közvetlenül megragadni azokat a poszttranszlációs módosításokat, amelyek jelentősen befolyásolják a fehérjék aktivitását, stabilitását, lokalizációját és kölcsönhatásait. A glikoziláció – a glikán láncok fehérjékhez vagy lipidekhez történő kovalens kapcsolása – az egyik leggyakoribb ilyen kotranszlációs módosítás, amely a fehérje szerkezetének és biológiai funkciójának kritikus szabályozója. A glikomika tehát a proteomika egyik fontos kiegészítője, különösen olyan esetekben, ahol a biológiai funkció és a fenotípus nem magyarázható pusztán a fehérjeszintű változásokkal [1]. A metabolomika a sejtek anyagcsere termékeinek (metabolitok) globális elemzését végzi. Ezen kis molekulák gyorsan változnak a környezeti ingerekre, és érzékeny mutatói a sejt aktuális fiziológiai állapotának. A glikánok ugyan nem klasszikus metabolitok, de bioszintézisük szorosan kapcsolódik a metabolikus útvonalakhoz, különösen a nukleotid cukor prekursorok keletkezéséhez. A glikán szintézis nem genetikai templát alapján történik, hanem enzimatis hálózatokon keresztül, amelyek az adott sejt metabolikus státuszára, differenciációs állapotára és patológiás eltéréseire érzékenyen reagálnak. Ez a nem templát alapú szintézis a glikomikát egészen egyedi helyzetbe hozza az „omikai” tudományok között: míg a DNS szekvencia és a fehérjeszerkezet közvetlen genetikai determinációval bír, a glikán profil a sejt dinamikus válasza a belső és külső környezet változásaira [2]. A lipidomika a lipidek teljes spektrumát vizsgálja, beleértve azok bioszintézisét, eloszlását és funkcionális szerepét a sejtmembránban, energia anyagcserében és jelátvitelben. A glikomika itt is szorosan kapcsolódik, mivel a glikolipidek – különösen a gangliozidok – fontos szerepet játszanak a sejtfelszíni kommunikációban és a patogén felismerésben. A glikánoknak ezen túlmenően jelentős szerepük van az immunválasz szabályozásában, receptor ligand kölcsönhatásokban, valamint a sejtfelszíni jelátvitel kialakításában. Az eltérő glikozilációs mintázatok lehetnek akár betegségek biomarkerei, például daganatos, autoimmun vagy gyulladássos állapotok esetén [3].



**1.1. ábra.** A glikomika és kapcsolódó tudományterületei [4]

A glikomika technológiai szempontból számos kihívással néz szembe. A glikánok rendkívüli szerkezeti diverzitása – azonos monoszacharidokból felépülő, különböző elrendezésű és elágazású izomer formák – analitikailag sokkal bonyolultabbá teszi őket, mint a lineáris nukleinsavak vagy polipeptid láncok. A glikánok nemcsak, hogy nem templát vezéreltek, hanem egy adott glikozilációs helyen több száz különböző struktúra is előfordulhat, ez pedig nagy fokú mikroheterogenitást eredményez. A glikomikai módszertan integrálja a tömegspektrometriát, a folyadékkromatográfiát, kapilláris elektroforézist, lektin alapú detektálást, valamint a kiegészítő bioinformatikai eszközöket. A komplexitás miatt azonban a glikomika adatfeldolgozása, szabványosítása és kvantifikálása továbbra is aktív kutatási terület [5]. A glikomika elhelyezkedése az „omikai” tudomány területek között egyre inkább stratégiai jelentőségűvé válik. Míg a genomikai és transzkripciói változások az öröklődő és szabályozó potenciált tükrözik, a proteomika és metabolomika az aktuális funkcionális állapotot mutatja. A glikomika e kettő között helyezkedik el: jellemzi a genetikailag szabályozott enzimrendszerek működését, ugyanakkor dinamikus választ ad a környezeti és sejtfiziológiai változásokra. Ennek következtében a glikomikai adatok funkcionális kapocs szerepét töltik be a genetikai információ és a fenotípusos válasz között [6]. A precíziós orvoslás és a biomarker fejlesztés területén a glikomika integrációja más omikai technológiákkal – multiomikai megközelítésben – új távlatokat nyithat a betegségmechanizmusok jobb megértésében, a terápiás döntéshozatalban, valamint a korai diagnosztikai eljárásokban. A jövő orvoslása várhatóan egyre inkább építeni fog a glikomikai információkra, amelyeket más molekuláris szintű adatokkal együtt értelmezve lehet valóban személyre szabott terápiás stratégiákat kialakítani [7].

## 1.2. A glikoziláció szerepe az élő szervezetekben

A glikoziláció az egyik leggyakoribb és legfontosabb poszttranszlációs módosítás, amely során szénhidrát oldalláncok (glikánok) kapcsolódnak fehérjékhez vagy lipidekhez. Ez a folyamat az eukarióta sejtekben szinte univerzálisan előfordul, és alapvető szerepet játszik a fehérjék stabilitásának, lokalizációjának, funkciójának és kölcsönhatásainak szabályozásában [8]. A glikoziláció típusai közül az N-glikoziláció (az aszparagin oldallánchoz történő kapcsolódás) és az O-glikoziláció (a szerinhez vagy treoninhez való kötődés) a legelterjedtebbek. A folyamat a riboszómán kezdődik, durva felszínű endoplazmatikus retikulumban (ER), majd a Golgi apparátusban fejeződik be, ahol a glikán struktúrák további módosításokon mennek keresztül [9]. A glikánok segítik a fehérjék szerkezetének kialakítását

és stabilizálását, valamint megvédi azokat a proteolitikus lebomlástól. Mindemellett, a glikoziláció hozzájárul a fehérjék vízdékonyságának növeléséhez, és fontos szerepet játszik a fehérje minőség ellenőrzésében az ER-ban, mely esetben a hibás glikoziláció gyakran hibás szerkezeti kialakulásra utal [10]. A glikán struktúrák sejt-sejt és sejt-mátrix kölcsönhatásokban, valamint jelátviteli folyamatokban is részt vesznek. Az immunrendszer számos komponense – immunglobulinok, komplementfehérjék, citokinek – glikozilált formában aktívak. A glikoziláció meghatározza az antitestek effektor funkcióit, például az ADCC (antitestfüggő sejt-citotoxicitás) vagy CDC (komplementfüggő citotoxicitás) mechanizmusokat [11]. A sejtmembránon található glikoproteinek és glikolipidek a sejtek közötti kommunikáció kulcsszereplői. A lektinek specifikusan ismerik fel a glikán mintázatokat, és részt vesznek a patogének felismerésében, a gyulladásos válaszok szabályozásában és az apoptózisban [12]. A glikoziláció alapvető szerepet játszik az embriogenezis, valamint a sejt differenciálódás folyamataiban. Bizonyos glikozilációs mintázatok a sejt típusoktól és fejlődési állapottól függően változnak, és fontos szerepet játszanak a sejtek térbeli és funkcionális szerveződésében [13]. A fehérjékhez kapcsolódó glikán struktúrák számos betegség során is módosulnak, így a glikánok egyre inkább a biomarker kutatás középpontjába kerülnek. A glikánok mint biomarkerek olyan molekuláris jelzők, amelyek különböző betegségek – daganatok, gyulladásos állapotok, autoimmun vagy neurodegeneratív betegségek – diagnosztikájában, prognózisában és terápiás követésében használhatók. A glikoziláció dinamikusan szabályozott folyamat, amelyet számos tényező – genetikai háttér, sejt típus, metabolikus állapot és környezeti hatások – befolyásol. Betegségek esetén a glikozilációs mintázatok gyakran eltérnek a normáltól. Ezek a változások érinthetik a glikánok szerkezetét (pl. fukoziláció, szializáció, galaktoziláció mértéke), eloszlását vagy akár az adott glikozilációs helyek glikoziláltsági fokát is. Az ilyen módosulások stabilan jelen vannak a keringésben is, a vérplazma glikoproteinjeiben, így nem invazív mintákból (pl. szérum, plazma) is vizsgálhatók [14]. Az egyik legismertebb példa a glikánok biomarkerként való alkalmazására a daganatos betegségek területéről származik. Több humán rák esetében megfigyelték a sejt felszíni glikoziláció jelentős megváltozását, különösen a fokozott szializációt és fukozilációt. Ezek a változások elősegítik a tumorsejtek immunelkerülését, invazivitását és metasztázis potenciálját [15]. Hasonlóan, a reumatooid arthritisben (RA) a szérum IgG glikozilációs mintázata – különösen az Fc régió agalaktozilált (G0) formáinak aránya – szignifikánsan megnő, és összefüggést mutat a gyulladásos aktivitással. Ezek az eltérések már a betegség klinikai megjelenése előtt is kimutathatók, így prediktív biomarkerként is alkalmazhatók [16]. Az autoimmun betegségek mellett a gyulladásos és fertőző állapotok is specifikus glikán mintázatokkal járnak. Akut fázisreakciók során, szepszisben, vagy vírusfertőzésekben fokozódik a szérumfehérjék – így a haptoglobin és  $\alpha$ 1-acid glikoprotein – szializációja és „branching”-je, amely tükrözi az immunrendszer aktivációját. Az ilyen változások a beteg állapotának monitorozására, terápiás válasz követésére is használhatók [17]. A neurodegeneratív betegségek esetén is ígéretes biomarker jelöltek a glikán profilok. Alzheimer kórban megfigyelték a cerebrospinális folyadékban és vérben található glikoproteinek glikozilációs mintázatainak eltérését, különösen az N-glikánok fukozilációjának csökkenését és a szekunder glikán formák megjelenését [18]. A glikán profilok megbízhatósága, biológiai jelentősége és stabil jelenléte a keringésben lehetővé teszi, hogy a jövőben a glikán alapú biomarkerek szerepe növekedjen a precíziós orvoslásban, lehetőséget adva korai diagnózisra, terápiás döntéshozatalra és betegségmonitorozásra [19].

### 1.3. A glikoziláció a modern gyógyszergyártásban

A fehérjealapú gyógyszerek, más néven biológikumok, rekombináns DNS technológiával előállított, komplex makromolekulák, amelyek kulcsfontosságú szerepet játszanak a modern terápiás gyakorlatban. Ide tartoznak a monoklonális antitestek (mAb), citokinek, enzimpótló terápiák, vakcinák, valamint fúziós fehérjék. Alkalmazásuk számos területet lefed, többek között onkológiai, autoimmun, metabolikus és fertőző betegségek kezelését [20]. A gyártási folyamat fő lépései [21], [22], [23]:

- Sejtvonala fejlesztés: A kívánt fehérjét kódoló gén rekombináns módon beépül egy gazdasejt genomjába. A leggyakrabban használt gazdasejtek közé tartoznak a CHO (Chinese Hamster Ovary) sejtvonalak, mivel ezek képesek komplex poszttranszlációs módosításokra, így emberhez hasonló glikán profil kialakítására is.
- Upstream folyamatok: A sejtenyésztés kontrollált körülmények között, bioreaktorokban zajlik. A sejt által szintetizált fehérje a sejtenyésztésben szekretálódik, amelyet a további feldolgozás során izolálnak.
- Downstream feldolgozás: A termék tisztítása több lépésben történik (pl. fehérjekicsapás, kromatográfiás eljárások, ultraszűrés). A cél, hogy a végtermék nagy tisztaságú, homogén, szennyeződésektől (pl. DNS, endotoxinok, gazdasejtfehérjék) mentes legyen.
- Formulálás és stabilizálás: A tisztított fehérjét megfelelő hordozó közegbe formulálják, gyakran liofilizálják, és különféle stabilizáló reagensek hozzáadásával biztosítják a termék hosszú távú stabilitását.

A glikoziláció az egyik legfontosabb poszttranszlációs módosítás a fehérjealapú gyógyszerek esetében. A legtöbb terápiás fehérje, különösen az antitestek és fúziós fehérjék, N- és/vagy O-glikozilált formában fordul elő. A glikoziláció befolyásolja a fehérje térszerkezetét és stabilitását, a szérumbéli felezési időt, a biológiai aktivitást és receptorhoz való affinitást és az immunogenitást. A glikozilációs profil nemcsak a fehérje biológiai funkcióját, hanem a gyógyszeripari fejlesztés, engedélyezés és minőségellenőrzés során is kritikus minőségi attribútumnak (CQA) számít. A gyártási folyamat legkisebb változása – például a sejtvonala, a tápoldat összetétele vagy a bioreaktor paraméterei – jelentős változást okozhat a glikán mintázatban [24]. N-glikoziláció esetén a klasszikus konszenzus szekvencia az Asn-X-Ser/Thr, amelyet az endoplazmatikus retikulumban működő oligoszacharil transzferáz enzim ismer fel és glikozilál [25]. Az ilyen konszenzushelyek glikozilációja általában magas hatásfokú, és jól reprodukálható glikán szerkezeteket eredményez. A terápiás fehérjék esetében a glikoziláció lokalizációja (makroheterogenitás) és konzisztenciája (mikroheterogenitás) meghatározza a termék hatékonyságát, immunogenitását és szérumbel stabilitását [26]. Ugyanakkor előfordulhat glikoziláció nem konszenzus szekvenciákon is, bár ez ritkább esetekben fordul elő. Ezekben az esetekben a glikoziláció gyakran nem effektív, inhomogén mintázatot eredményez, vagy csak részleges glikoziláltság figyelhető meg. Az ilyen helyek glikozilációja gyakran sejtvonaltól, redox körülményektől és a fehérje térszerkezetétől függően változik. A hely specifikus glikoziláció vizsgálata és kontrollálása a biotechnológiai gyógyszerfejlesztés egyik kulcsfeladata, különösen monoklonális antitestek, fúziós fehérjék és enzimpótló készítmények esetén [27].

A monoklonális antitestek terápiás hatékonysága részben az általuk kiváltott effektor funkcióknak köszönhető, amelyek közül az ADCC (antitestfüggő sejt közvetített citotoxicitás) és a CDC

(komplementfüggő citotoxicitás) a legjelentősebbek. E mechanizmusok a célsejtek pusztításában játszanak közvetlen szerepet, különösen daganattellenes és autoimmun betegségek kezelésében. Az ADCC során az antitest Fc régiója az Fc $\gamma$ RIIIa (CD16) receptoron keresztül kötődik a „natural killer” (NK) sejtekhez, amelyek ennek hatására citotoxikus granulákat bocsátanak ki, megölve az antitesttel megjelölt célsejtet. Az Fc régió glikozilációja – különösen a fukóz mentesség – jelentősen növeli az Fc $\gamma$ RIIIa affinitását, és ezáltal az ADCC aktivitást [28]. A CDC mechanizmusban az antitestek a komplementrendszer C1q komponensét aktiválják, ami kaszkádszerű folyamatot indít el, végül membránt átszűrő komplex (MAC) képződik a célsejt felszínén, ami sejt lízist okoz. A CDC aktivitás szintén glikoziláció függő, valamint függ az antitest izotípusától és a célsejt antigén expressziójától. Ezen funkciók optimalizálása gyakran célzott fehérje módosításokon keresztül történik, hogy javítsák a terápiás hatékonyságot anélkül, hogy növelnék a nem kívánt immunreakciókat [29].

A bioszimiláris gyógyszerek biotechnológiai úton előállított, nagy molekulatömegű fehérjék, amelyek egy már forgalomban lévő referencia biológiai termékkel hasonló minőségű, biztonságosságú és hatásosságú készítmények. A kis molekulájú generikumokkal ellentétben a bioszimilárisok nem a szó szoros értelmében azonosak, hanem nagyfokú hasonlóságot mutatnak az originális gyógyszerrel, mivel a biológiai rendszerekből származó variabilitás kizárja az abszolút azonosságot [30]. A bioszimiláris fejlesztés során a szerkezeti, funkcionális és klinikai összehasonlító vizsgálatok központi jelentőséggel bírnak. A glikozilációs profil az egyik legfontosabb kritikus minőségi attribútum (CQA), mivel a fehérjék glikán mintázata befolyásolhatja az in vivo stabilitást, immunogenitást, valamint az effektor funkciókat (pl. ADCC, CDC) [31]. A glikán profil összehasonlítása során fejlett analitikai technikák – többek között tömegspektrometria, kapilláris elektroforézis, és HILIC-HPLC – kerülnek alkalmazásra. A szabályozó hatóságok (pl. EMA, FDA) szigorúan előírják, hogy a bioszimiláris készítmények glikozilációs mintázata a referencia termékhez való hasonlóságot mutasson, és ne befolyásolja klinikailag releváns módon a hatékonyságot vagy biztonságot. A bioszimilárisok előnyei közé tartozik a csökkentett fejlesztési költség, a nagyobb beteg hozzáférhetőség, valamint az egészségügyi rendszerek fenntarthatóságának javítása. Mindemellett a megfelelő minőségbiztosítási és glikozilációs kontroll elengedhetetlen a terápiás egyenértékűség biztosításához [32].

## 1.4. N-glikánok analízisének lehetőségei és kihívásai

Az N-glikánok a fehérjék aszparagin oldalláncához kapcsolódnak, jellemzően az Asn-X-Ser/Thr konszenzus szekvencián belül, melyek analízise kulcsfontosságú nemcsak alapkutatás, hanem terápiás fehérjék fejlesztése, minőségellenőrzése és biomarker kutatás szempontjából is. A glikán analízis három fő megközelítése a felszabadított glikánok, a glikopeptidek, valamint az intakt glikoproteinek szintjén történő vizsgálata. Mindegyik szint különböző információt nyújt a glikánok szerkezetéről, elhelyezkedéséről és funkcionális hatásáról. A felszabadított glikánok analízise során a glikánokat enzimés (pl. PNGase F) vagy kémiai úton leválasztják a fehérjéről. Ezután a glikánokat gyakran fluoreszcens jelöléssel (pl. 2-AB, APTS) jelölik meg, hogy az analitikai módszerekkel detektálhatók és kvantifikálhatóak legyenek. A felszabadított glikán profil rendkívül hasznos a glikozilációs mintázat feltérképezésére, azonban az információ elvész arról, hogy a glikán melyik glikozilációs helyhez tartozott [33]. A glikopeptid analízis a proteolitikusan emésztett fehérje peptid fragmentseit vizsgálja, amelyek még tartalmazzák a glikán struktúrát. Ez a megközelítés lehetővé teszi a glikoziláció helyének azonosítását, valamint az adott helyen előforduló glikán formák mennyiségi és kvalitatív jellemzését. A glikopeptid alapú elemzés különösen fontos a hely specifikus glikoziláció feltérképezésében, ami kritikus a terápiás fehérjék esetében [34]. A harmadik szint az intakt glikoproteinek elemzése, amely a teljes fehérjét glikánjaival együtt vizsgálja, anélkül, hogy a molekulát fragmentálnák vagy a glikánokat eltávolítanák. Ez a megközelítés lehetőséget ad a teljes molekula heterogenitásának megértésére. Intakt glikoprotein analízist főként tömegspektrometriás technikák alkalmazásával, valamint top-down proteomikai módszerekkel végeznek [35].

A felszabadított glikánok analízisére számos analitikai technika áll rendelkezésre. A nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), különösen hidrofil interakciós kromatográfia (HILIC), gyakori választás a fluoreszcensen jelölt glikánok elválasztására és kvantifikálására. A HILIC-HPLC előnye a kiváló reprodukálhatóság és az ipari szabványokkal való kompatibilitás, így terápiás fehérjék minőségellenőrzésében széles körben használják [36]. A HPLC módszerek mellett, mint ortogonális technika a kapilláris elektroforézis (CE) – különösen APTS jelöléssel és lézer indukált fluoreszcens (LIF) detektálással – kiváló szeparációs teljesítményt nyújt a glikán izomerek szétválasztására. Előnye a magas felbontás, gyors futási idő és kis mintaigény [37]. Mindkét elválasztási technikát kiegészítve, illetve önmagában is a tömegspektrometria (MS) a glikán analízis egyik leghatékonyabb és leginformatívabb módszere. Alkalmazható mind felszabadított glikánokra, glikopeptidekre, mind intakt fehérjékre. A MALDI-TOF MS és a LC-ESI-MS/MS a leggyakrabban alkalmazott formák, amelyek strukturális azonosítást, glikán kompozíciót és relatív mennyiségi információt is szolgáltatnak. A tandem MS (MS/MS) lehetővé teszi a glikán szerkezetének részletes leképezését, beleértve a monoszacharid összetételt, elágazásokat és szializációs mintázatot is [5]. A klasszikus elválasztási módszerek mellett az NMR spektroszkópia kevésbé elterjedt rutinmódszerként, de kiválóan alkalmas a glikánok konformációjának, konfigurációjának és dinamikájának vizsgálatára. Az NMR nem igényel derivatizálást, és lehetővé teszi az oldatfázisú glikánok természetes szerkezetének tanulmányozását. Ugyanakkor az érzékenység korlátozott, így tipikusan csak tisztított és nagy koncentrációjú minták vizsgálatára alkalmazható [38].

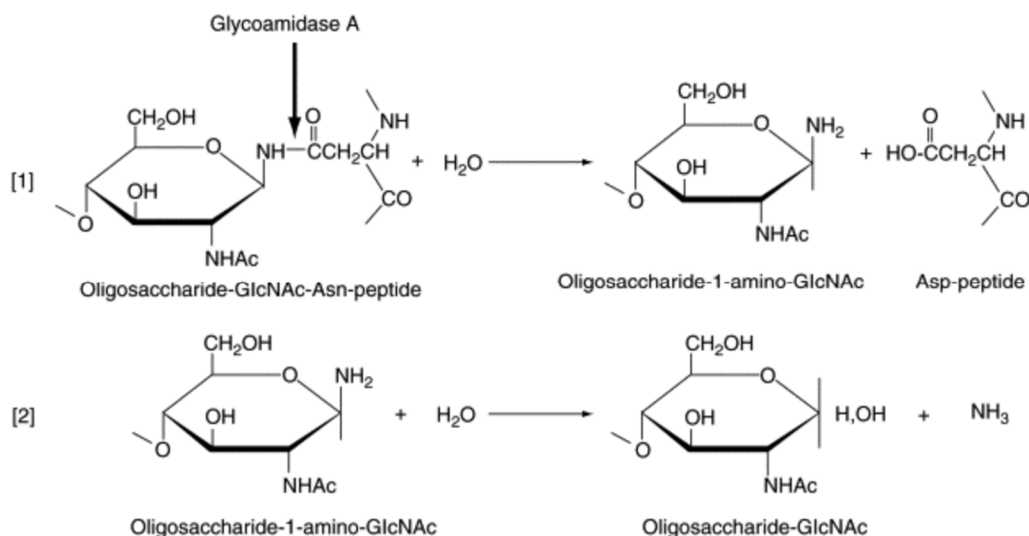
Ezen módszerek egymást kiegészítve alkalmazhatók egy adott glikán profil teljes karakterizálására. A komplex terápiás fehérjék – monoklonális antitestek – esetében a szabályozó hatóságok (pl. EMA, FDA) előírják a glikoziláció többszintű analitikai vizsgálatát, amely magába foglalja mind a glikán profil (released), mind a glikopeptid (site specific), mind az intakt glikoprotein (molekuláris heterogenitás) szintű elemzést. A glikoproteinek N-glikozilációs analízisének lehetséges módszereit az 1.1. táblázatban foglaltam össze.

### 1.1. táblázat Az immunglobulin G glikozilációs analízisének módszerei

Módszerek	Leírás	Referencia
HPLC	PNGase F enzimmel segítségével deglikoziláció, fluorofórral jelölőanyaggal (2-AA, 2-AB) történő derivatizálás, fluoreszcens, vagy UV/VIS detektorral ellátott HPLC-és elválasztás, oligoszacharidok szekvenáláshoz különböző exoglikozidázok használhatók	[39], [40], [41], [42], [43], [44]
CGE-LIF	Deglikolizáció PNGase F, fluorofórral (ANTS, APTS, 2-AA) történő derivatizálás, LIF-detektorral ellátott CE-el történő elválasztás, oligoszacharidok szekvenáláshoz különböző exoglikozidázok használhatók	[42], [44], [45], [46], [47], [48], [49]
HPAEC-PDA	Deglikolizáció PNGase F alkalmazása mellett, további derivatizáció nélkül, elválasztás PDA detektorral felszerelt HPAEC-val	[45], [50]
LC-ESI-MS	Deglikolizáció PNGase F-el, LC-ESI-MS analízis (permetiláció)	[39], [51], [52], [53]
CE-ESI-MS	Deglikolizáció PNGase F-el, CE-ESI-MS analízis	[45], [54]
MALDI-MS	Deglikolizáció PNGase F-el, derivatizáció 1-fenil-3-metilpirazolonnal (PMP), fluorofórral vagy permetilációs ágenssel, MALDI-MS analízis	[41], [50], [55], [56]

A *Peptid-N4-(N-acetil- $\beta$ -glükózaminil) aszparagin amidáz F* (röviden PNGase F) egy széles körben alkalmazott enzim az N-kötésű glikánok fehérjéről történő felszabadítására. Az enzimet az *Elizabethkingia meningoseptica* baktériumból izolálták, és azóta rutin módszerré vált a glikán analízisben, különösen a biológikumok glikozilációs profiljának vizsgálatában [57]. A PNGase F specifikusan hasítja az N-glikozilált fehérjékben található aszparagin és az első N-acetil-glükózamin (GlcNAc) közötti amid kötést. Ennek eredményeként az N-glikán felszabadul a fehérjéről, míg az aszparagin oldallánca aszparaginsavvá alakul át. Az enzim szinte minden komplex, hibrid és nagy mannóz típusú N-glikánt képes felszabadítani, kivéve, ha a GlcNAc  $\alpha$ 1-3-fukozilált (pl. növényi vagy rovar eredetű glikánok esetén), ami gátolja az enzim működését [58]. A PNGase F alkalmazása különösen előnyös, mivel a reakció enyhe, vizes körülmények között történik, és nem károsítja a glikán struktúráját (1.2. ábra). A felszabadított glikánok ezt követően fluoreszcens jelöléssel (pl. 2-AB, APTS)

vagy tömegspektrometriával jól analizálhatók. A glikán profil meghatározása mellett a PNGase F reakcióból származó aszparaginsav detektálása is segíthet a glikozilációs helyek azonosításában [59].



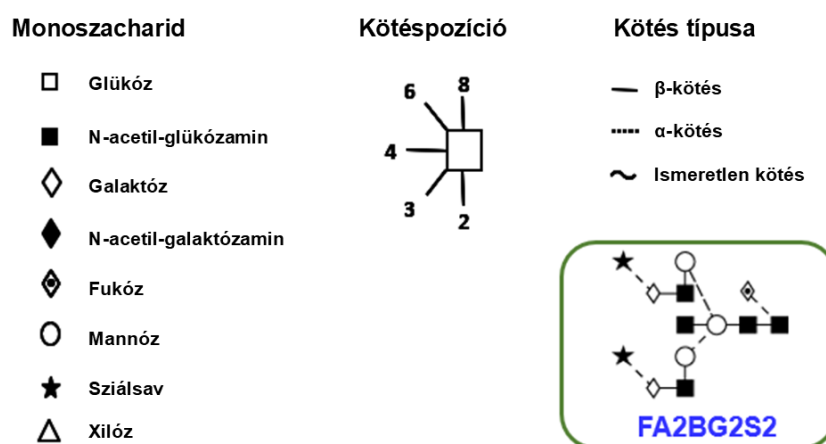
**1.2. ábra.** N-glikánok enzimatisz felszabadítása PNGase F enzim segítségével [60]

Az N-glikánok szekvenálása, azaz az oligoszacharid lánc pontos monoszacharid összetételének, szerkezetének és kapcsolódási sorrendjének meghatározása az analitikai folyamat egy kiemelkedően fontos folyamata. Bár a tömegspektrometria és a kromatográfiás technikák nagy érzékenységgel képesek a glikán profilk jellemzésére, ezek önmagukban a legtöbbször nem elegendők a glikánok szerkezeti izomerjeinek elkülönítésére. Az exoglikozidáz alapú glikán szekvenálás egy specifikus, lépésenkénti enzimatisz módszer, amellyel a glikánok pontos szerkezeti felépítése meghatározhatóak. Az exoglikozidázok olyan specifikus enzimek, amelyek a glikánok nem redukáló végéről hasítják le a monoszacharid egységeket. Ezek az enzimek általában nagy specifitással rendelkeznek mind a cukorfajta (pl. galaktóz, mannóz, fukóz, stb.), mind az anomer konfiguráció ( $\alpha$  vagy  $\beta$ ), mind pedig a glikozidos kötés pozíciója (pl.  $2 \rightarrow 3$ ,  $1 \rightarrow 6$ , stb.) kapcsán. Ennek eredményeképpen a megfelelő enzimek sorrendben történő alkalmazásával – ún. szekvenciális exoglikozidáz emésztéssel – a glikán szerkezete lépésről lépésre az ismételt mintafuttatásokon keresztül megállapítható [61]. A szekvenálási eljárás során a felszabadított és fluoreszcensen jelölt oligoszacharidokat először profilírozzak, hogy megállapítsák a kiindulási glikán mintázatot. Ezt követően specifikus exoglikozidáz enzimeket adnak hozzá egyenként vagy kombinációban, majd minden lépés után újra analizálják a glikán profilt. A detektált retenciós idő vagy elektroforetikus mobilitás változása, valamint migrációs idők módosulása információt ad a lehasított monoszacharid típusáról, pozíciójáról es mennyiségéről (pl. egy vagy több galaktózt vágott le az enzim) [62]. A folyamat a következő lépések és enzimek mellett valósul meg: először neuraminidáz (szialidáz) enzimek alkalmazásával eltávolíthatók a szialsavak, majd  $\beta$ -galaktozidáz enzimmel a galaktóz egységek, azt követően pedig  $\beta$ -N-acetilhexozaminidáz enzimmel a GlcNAc egységek hasíthatók le. Ezen konzekutív enzimatisz lépések kiegészíthetőek  $\alpha$ -fukozidáz enzimmel, mely az  $\alpha 1 \rightarrow 6$  vagy  $\alpha 1 \rightarrow 3$  kötéssel kapcsolt fukóz eltávolítására alkalmas, így ezen lépések kumulatíván lehetővé teszik a glikán struktúrájának részletes térképezését [63]. Az exoglikozidáz alapú szekvenálás legnagyobb előnye, hogy szerkezeti izomerek is megkülönböztethetőek, amelyek tömegspektrometriás analízissel nem mindig választhatók szét. Továbbá a módszer kompatibilis a

legtöbb fluoreszcens jelölési stratégiával és automatizált CE/HPLC rendszerekkel, így jól alkalmazható magas áteresztőképességű (high throughput) környezetekben is, például terápiás fehérjék gyártásközi ellenőrzésére, ugyanakkor a módszer korlátai közé tartozik a hosszú emésztési idő, az enzimek költsége és a szükséges enzimspecifitás ismerete. Emellett a részben elágazó vagy sűrűn szubsztituált glikánok esetében az enzimhozzáférhetőség korlátozott lehet, ami részleges emésztést vagy nehezen értelmezhető profilt eredményezhet. [64].

A teljes körű N-glikán analízis, gyorsaság és alacsony költség egyidejű megvalósítása ritkán lehetséges, ezért a gyakorlatban mindig kompromisszumokkal terhelt megoldások szükségesek. A glikán analitikai platform kiválasztása erősen függ az adott alkalmazástól: egy korai fejlesztési fázisban például nagy felbontású MS alapú szerkezet azonosítás szükséges, míg gyártásközi ellenőrzéshez egy egyszerű, robusztus CE vagy HPLC módszer is elegendő lehet. A technológiák fejlődése és gyógyszeripar által diktált egyre nagyobb fokú igény egyértelműen az automatizálás felé mutat. A glikán analízisben elérhető információ mélysége (coverage), az időráfordítás és a költség szignifikáns tényezők, amelyekhez a célnak megfelelően kell módszert választani. Az automatizált, moduláris rendszerek bevezetése lehetőséget teremt ezen szempontok egyensúlyának javítására, különösen ipari vagy klinikai alkalmazásokban, ahol a nagy áteresztőképesség és a reprodukálhatóság elengedhetetlen.

Az N-glikánok nevezéktana és szerkezeti reprezentációja rendkívül szerteágazó a tradicionális, számítógépes kód alapú megközelítéstől egészen a gyógyszeriparban alkalmazott néhány karakteres rövidítésig (pl. G0). Az akadémiai kutatások során legtöbbször az Oxfordi nevezéktant alkalmazzák, mert a monoszacharid egységekből potenciálisan kialakítható számos glikán struktúrát egyszerűen, de még is egyértelműen írja le. Az N-glikánokat felépítő monoszacharid struktúrákat, majd azok potenciális egymáshoz való viszonyát a kapcsolódó kötés lehetőségeikkel egy példával is szemléltetve az 1.3. ábra tartalmazza [65]. Ezen nevezéktan alkalmazásával, valamint a hozzá kapcsolódó grafikus reprezentációval mutatom be az M.1. táblázatban az N-glikán analízis során potenciálisan felmerülő N-glikán struktúrák GU, valamint tömeg adatait.



1.3. ábra. Az N-glikánok Oxfordi nevezéktana [65]

## 1.5. Kapilláris elektroforézis

Tiselius és munkatársai 1937-ben számoltak be először az elektroforézisről, mint új elválasztási technikáról, melyet először kolloidok elválasztásához alkalmaztak [66]. Ezt követően az 1930-as évektől az 1950-es évekig egyre szélesebb körben kezdték el vizsgálni a módszert és annak potenciális alkalmazási lehetőségeit a biológiai eredetű mintáktól egészen az izotópok elválasztásáig, melyhez szeparációs közegként elsősorban üvegyapotot, üveg port, cellulóz port és agar gélt használtak [67][68][69]. Az elektroforézis, mint elválasztási technika ekkor még kialakulóban volt, a fejlesztések egyik iránya az elválasztási során fellépő problémák – pl. a hőmérsékletfüggés és hővezetés – kiküszöbölése volt, mely során a mai szemmel rendhagyó megoldások születtek, úgy, mint pl. 1954-ben Kolin és munkatársai által megalkotott rendszer, mely az elektroforetikus elválasztás egy forgó koncepcióját tanulmányozta, hogy a hőmérsékleti konvekciót megszüntesse [70], továbbá 1964-ben Ornstein egy lemezen végzett elektroforetikus kísérleteket [71].

A II. világháborút követő ipari fellendülés és az azzal kapcsolatos ipari áttörések lehetővé tették, hogy a fejlesztések fókuszába a miniatürizálás kerüljön, melyet kisebb átmérőjű üvegből és különböző polimerekből [72] készült kapillárisok alkalmazásával oldottak meg. A nagyobb csőátmérő hővezetési problémákat okoz, mely csökkenti az elválasztási hatékonyságát, ezzel szemben a kisebb átmérőjű kapillárisok jobban szétosztatják a hőt a megnövelt felület-térfogat arány révén, melynek eredménye egyenletes hőeloszlás a cső keresztmetszetében. 1981-ben Jorgenson és Lukacs elméleti és kísérleti megközelítésből mutatták be a nagyfelbontású kapilláris elektroforézist (CE) szűk furatú csővezetékben [73]. Később, 1983-ban Hjerten adaptálta az SDS-PAGE módszert a kapilláris gélelektroforézisre (CGE) [74]. 1989-től általános használatra kereskedelmi CE eszközök is elérhetőek voltak. Az első CE készüléket a gyógyszeriparban a HPLC helyettesítésére szánták, de az eltérő elválasztási mechanizmusok révén a CE inkább ortogonális analitikai eszközzé vált [75].

A CE technikák számos típusát alkalmazzák ma standard CE eszközökkel, mint a kapilláris zóna elektroforézis (CZE), kapilláris gélelektroforézis (CGE), micellás elektrokinetikus kapilláris kromatográfia (MECC), kapilláris elektrochromatográfia (CEC), kapilláris izoelektromos fókuszálás (CIEF) és kapilláris izotachoforézis (CITP) csak, hogy a legfontosabbakat említsem [76].

Lukacs és Jorgenson áttörő publikációjukban [73] mutatták be, hogy az analízis ideje a kapilláris elektroforézis esetén arányos a cső hosszának négyzetével és fordítottan arányos az elektroforetikus mozgékonysággal, illetve az alkalmazott feszültséggel. A kapilláris hossza utalhat a tényleges elválasztási távolságra (az injektálási ponttól a detektálási ablakig) és a teljes kapilláris hossza (elektrodtól elektrodig). A migrációs időre megadható formula a következőképpen írható le (1),

$$t = \frac{L_t L_d}{\mu U} \quad (1)$$

ahol  $t$  (s) az elválasztási idő,  $L_d$  (cm) a kapilláris hossza az injektálási ponttól a detektálási ablakig,  $L_t$  (cm) a kapilláris teljes hossza,  $U$  (V) az alkalmazott feszültség és  $\mu$  ( $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) az elektroforetikus mozgékonyság. Az elválasztás elméleti tényérszáma (N) a Giddings-elv alapján [77] (2),

$$N = \frac{\mu U}{2D} \quad (2)$$

ahol  $D$  ( $cm^2s^{-1}$ ) az oldat diffúziós koefficiense. Az első és második egyenlet megmutatja, hogy magasabb elválasztási hatékonyság és rövidebb elválasztási idő érhető el magasabb feszültséget alkalmazása mellett. Ugyanakkor, a magasabb elválasztási feszültség megnövekedett áramot és az azt kísérő Joule-hőt eredményez, ami csökkenti az elválasztás hatékonyságát [78]. Az elektroforetikus mozgékonyág továbbá kifejezhető az alábbi egyenlettel (3),

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

ahol  $q$  az oldat ionjainak nettó töltése,  $\eta$  a háttér elektrolit viszkozitása és  $r$  pedig a migráló molekula sugara. A nettó töltés általában pH-függő. A kapillárison keresztüli molekuláris diffúzió csúcscsúszélesedéshez vezet (4),

$$\sigma^2 = 2Dt = \frac{2DL_t^2}{\mu U} \quad (4)$$

ahol  $\sigma^2$  a csúcscsúszélesedés értéke. A második és negyedik egyenletekből a tényérszám az alábbi kifejezés alapján a tényérszám az alábbi képlettel számolható (5),

$$N = \frac{L_t^2}{\sigma^2} = \frac{\mu U}{2D} \quad (5)$$

Mindezek alapján a két komponens közötti felbontás az elektroforetikus elválasztásban az alábbi képlettel adható meg (6),

$$R_s = 0,25 \frac{\Delta\mu}{\bar{\mu}} \sqrt{N} \quad (6)$$

ahol  $R_s$  a felbontás,  $\Delta\mu$  két komponens elektroforetikus mozgékonyágának különbsége és  $\bar{\mu}$  a két komponens átlagos elektroforetikus mozgékonyága. A nagy feszültség kapcsán fellépő áram hatására indukált Joule-hő, mely szignifikáns hatással van az elválasztás hatékonyságára az alábbi módon számolható (7),

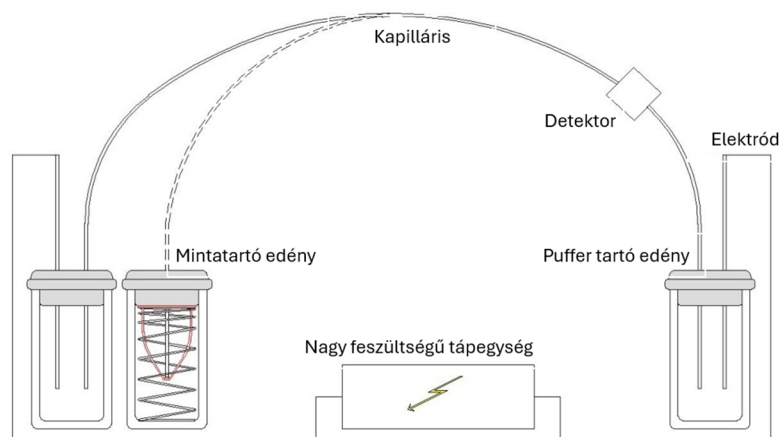
$$\frac{dH}{dt} = \frac{kU^2}{L^2} \quad (7)$$

ahol  $k$  a vezetőképesség és  $H$  az entalpia. Ez alapján megállapítható, hogy az elválasztás feszültségének ( $U$ ) csökkentése, és/vagy a kapilláris hosszának növelése ( $L$ ) szignifikáns hatással vannak a hőképződésre. Mindemellett az alacsony vezetőképességű pufferek alkalmazása is további előnyt jelent, ugyanis a kapillárison belüli hőmérséklet gradiens összefügg a puffer vezetőképességével, mely az alábbi egyenlettel számolható ki (8),

$$\Delta T = 0,24 \frac{Wr^2}{4K} \quad (8)$$

ahol  $r$  a kapilláris sugara,  $K$  a hővezető képesség és  $W$  a leadott teljesítmény [79].

Napjainkban a kapilláris zóna elektroforézis (CZE) a leggyakrabban alkalmazott technika a számtalan CE módszer közül, mely hatékony elválasztást biztosít mind a kis, mind a nagy molekulákra nézve. A berendezés magába foglal egy nagyfeszültségű tápegységet, minta-, és puffertartó edényeket, két elektródot (pozitív és negatív), egy általában üveg (szilika) kapillárist és egy detektort, amely a megfelelő adatgyűjtő és feldolgozó rendszerhez csatlakozik. A CE készülék sematikus rajzát az 1.4. ábra mutatja be.



**1.4. ábra.** A kapilláris elektroforézis sematikus rajza

Általánosságban elmondható, hogy maximum  $\pm 30$  kV a kapillárisra kapcsolt feszültség felső határa, melyet standard elektroforézissel végzett elválasztások során alkalmaznak úgy, hogy az áramerősség ne lépje át a  $50 \mu\text{A}$  áramerősséget, hogy a kapilláris túlmelegedése elkerülhető legyen. A feszültség szabályozás pontosságának  $\pm 0,1\%$ -on belül kell lennie, hogy megfelelő legyen a megfelelő migrációs idő reprodukálhatósága. Abban az esetben, amikor az inlet elektród az anód, normál polaritású elválasztásról beszélünk, de bizonyos esetekben fordított polaritást kell használni (az anód az outlet elektród). A polaritás választást a mintán levő töltések polaritása, valamint a puffer vezetési tulajdonságain túl az is meghatározza, hogy a nyitott kapilláris csövekben adott pH felett ( $\text{pH } 4 >$ ) a kapilláris belső felszínén lévő szilanol csoportok negatív töltésűvé válnak, és a rendszerre kapcsolt egyenáramú elektromos mező hatására létrejön az úgynevezett elektroosmotikus áramlás (EOF), mely során a kettősréteg kationjai az anód felé igyekeznek, magukkal ragadva az elválasztás közegét képező elektrolit oldatot, mely hatására egységes, dugószerű áramlás jön létre. Az EOF nagysága a puffer pH-jával, ionerősségével és a kapilláris felületének kémiai módosításával szabályozható: lúgos mosás ( $0,1 \text{ M NaOH}$ ) fokozza, savas regenerálás ( $0,1 \text{ M HCl}$ ) csökkenti a felületi töltéssűrűséget, így fordított polaritású méréseknél az áramlás visszafogható. A stabil, jól kontrollált EOF lehetővé teszi, hogy az analitok elektroforetikus mobilitás különbségei hatására nagy felbontású elválasztást kapjunk minimális sávszélesedéssel.

Kapilláris elektroforézissel történő elválasztások során a minta kétféleképpen juttatható be a kapillárisba: vagy elektrokinetikusán, vagy nyomás általi (hidrodinamikai) injektálással. Az elektrokinetikai injektálás során rövid időtartamra (1 – 10 sec) feszültség alá helyezzük a kapillárist, mely elindítja az elektroforézis folyamatát a mintát tartalmazó edényből. Ebben az esetben a bejuttatott minta mennyisége függ az analit molekulák mobilitásától és az alkalmazott puffer összetételétől, vezetési tulajdonságaitól. Előnye, hogy a futtató puffer viszkozitása elhanyagolható, azonban elektrokinetikus injektálás esetén tekintetbe kell venni a minta depléciós hatását, ha ismételt injektálás történik, azaz a minta koncentrációja és összetétele idővel változhat, valamint az injektálási eltérés, azaz a nagyobb mobilitású komponensekből több jut be a kapillárisba, mint az alacsonyabb mobilitásúakból. Az injektált minta mennyisége a következőképp fejezhető ki (9),

$$q = \frac{(\mu_e + \mu_{eof}) \cdot U \cdot r^2 \pi \cdot c \cdot t}{L_t} \quad (9)$$

ahol  $q$  az injektált minta mennyisége a koncentrációval megegyező egységben,  $\mu_e$  az analit mobilitása,  $\mu_{eof}$  az EOF mobilitása,  $r$  a kapilláris sugara,  $U$  az elektromos feszültség,  $c$  a koncentráció,  $t$  az idő és  $L_t$  a kapilláris teljes hossza.

A nyomással történő injektálási technika esetén a betöltés független a minta komponensek elektroforetikus mozgékonyaságától, azonban az injektálási idő hatással van a csúcshézagcsökkentésre, ezért a minta tulajdonságainak fényében az injektálás időtartamát érdemes a lehető legnagyobb mértékben csökkenteni. Az injektálás mennyisége a Hagen-Poiseuille egyenlet alapján számítható (10),

$$q = \frac{\Delta P \cdot r^4 \cdot \pi \cdot c \cdot t}{8 \cdot \eta \cdot L_t} \quad (10)$$

ahol  $q$  az injektált minta mennyisége a koncentrációval megegyező egységben,  $\Delta P$  a nyomáskülönbség,  $r$  a kapilláris sugara,  $c$  a koncentráció,  $t$  az idő,  $\eta$  a közeg viszkozitása és  $L_t$  a kapilláris teljes hossza. A mérés hatékonyságának növelése érdekében a két injektálási technika a minta prekoncentrációja céljából kvázi kombinálható, mely módszer a kapilláris izotachoforézis (CITP) elvén alapszik. Először, egy kevés vizet injektálnak nyomással a pufferral töltött kapillárisba, majd elektrokinetikai injektálást alkalmazva a nagyobb áramcsökkenés a kis vezetőképességű víz zónában egy rövid sávba fókuszálja a mintát.

A hatékony elválasztás céljából a megfelelő kapilláris kiválasztása kulcs fontosságú, meghatározó paraméterei a belső átmérő, külső átmérő, a teljes és effektív (detektorig tartó) hossza, valamint anyaga, illetve annak különböző bevonatokkal történő módosítása (külső és belső). A Joule-hő, melyet a nagy feszültség hatására jön létre jelentősen csökkentheti a CE mérések hatékonyságát, ezért kis belső átmérőjű kapilláris csöveket célszerű alkalmazni megfelelő pontosságú termosztálással (temperált folyadék, vagy levegő keringetésével). Általánosságban elmondható, hogy a CZE technikához 20 – 100  $\mu\text{m}$  belső átmérőjű kapilláris az ideális, de a háttér elektrolit viszkozitását is figyelembe kell venni, hogy ezen rendszerek feltölthetőek legyenek. A felbontás és a detektálási határ közötti indirekt kapcsolat

miatt általánosan az 50  $\mu\text{m}$  és 75  $\mu\text{m}$  belső átmérőjű kapillárisokat használnak, melyek nagyobb felbontást biztosítanak. A kapilláris külső átmérője a csatlakozás és az UV, illetve LIF detektálás miatt fontos – más kromatográfias rendszerekhez hasonlóan a tömítés külső oldalról történik.

A kapilláris hossza a kapilláris elektroforézis során alkalmazott elválasztási körülmények egyik kulcsfontosságú paramétere, amely közvetlen és közvetett módon is befolyásolja az elválasztás hatékonyságát és minőségét. A kapilláris méretének optimalizálása során az alkalmazott készülék fizikai korlátain túlmenően több, egymással részben ellentétes hatásmechanizmust szükséges figyelembe venni.

- Elválasztási hatékonyság: Az elválasztás hatékonysága nő, ha az alkalmazott elektromos tér erősségét (V/cm) növeljük. Mivel az elektromos feszültség értéke az adott rendszerben korlátozott, a rövidebb kapillárisok lehetővé teszik a nagyobb térfeszültség alkalmazását, ezáltal rövidebb elválasztási idő mellett nagyobb elválasztási hatékonyság érhető el.
- Felbontás: A hosszabb kapillárisok használata hozzájárul a nagyobb tartózkodási időhöz, így a különböző komponensek közötti szeparációs idő nő, ami – más kromatográfias technikákhoz hasonlóan – javíthatja a felbontást. Ez különösen előnyös összetett minták vagy közel elválasztható analitok esetén, amikor az időbeli szeparáció kulcsfontosságú.
- Detektálási hatékonyság: Az elválasztás szempontjából releváns továbbá a detektáló ablakig tartó kapillárisszakasz aránya a teljes kapilláris hosszhoz viszonyítva. Hosszabb kapilláris használatával a detektálásig eltelt migrációs idő nő, amely lehetőséget biztosít a komponensek jobb szétválására a detektálási pontig. Ez közvetve javítja a kvantifikálás és az azonosítás pontosságát.

A fentiek alapján a kapilláris hosszának megválasztása során kompromisszum szükséges az elválasztási idő, a hatékonyság, a felbontás és a detektálási érzékenység között. Míg a rövidebb kapillárisok gyors elválasztást tesznek lehetővé, a hosszabb kapillárisok nagyobb szeparációs teljesítményt biztosítanak. A gyakorlatban gyakran alkalmaznak effektív (detektorig mért) kapillárishosszt 20 – 50 cm, míg teljes kapillárishosszt 50 – 75 cm között, az adott analitikai célkitűzések és az alkalmazott készülék függvényében.

A kapillárisok végének vágása kritikus a jó minőségű elválasztás szempontjából. Erre általánosan kerámia vágókövet alkalmaznak, mely kis mennyiségű szilánkot és minimális törést hoz létre. A kapillárist 45°-os szögben tartva egy óvatos vágással érdemes elvágni, mely után sorjamentesen lehet elválasztani a két részt egymástól. Általában üveg, nem bevont szilika, vagy bevont (pl. poliimid, fluorokarbon, polimer) kapillárisokat alkalmaznak. A nem bevont szilika jó hővezető és széles elektromágneses színtartományban áttetsző, de törékeny.

A kapilláris elektroforézis (CE) során elérhető nagy elválasztási hatékonyság egyik alapvető feltétele a precíz hőmérséklet szabályozás, mivel a hőmérséklet közvetlen hatással van a migrációs idő reprodukálhatóságára, az oldat viszkozitására, valamint a minta injektálásának pontosságára. A rendszerben jelen lévő elektromos tér Joule hőt generál, amely – különösen magas feszültség és nagy ionerősségű pufferoldatok esetén – lokális hőmérséklet emelkedést okozhat, ezáltal torzíthatja az

elválasztást. A hőmérséklet szabályozása tipikusan  $\pm 0,1^\circ\text{C}$  pontossággal történik, amely elengedhetetlen a kvantitatív és reprodukálható analitikai eredmények biztosításához. A hőelvezetés a kapilláris környezetének levegővel történő szabályozott hűtésével vagy folyadékűtési rendszer alkalmazásával valósítható meg. A folyadék cirkuláltatása – például fluorokarbon – a kapilláris körül hatékonyabb hűtést biztosít, különösen akkor, ha a rendszer nagy áramerősséggel és hőfejlődéssel üzemel. A hőmérséklet szabályozás különösen kritikus tényező, ha érzékeny biológiai molekulák – fehérjék vagy enzimek – elválasztása történik, mivel ezek stabilitása hőmérsékletfüggő. A legtöbb CE eljárás  $20 - 25^\circ\text{C}$ , azaz szobahőmérséklet közeli tartományban zajlik, de bizonyos alkalmazások esetén alacsonyabb vagy magasabb hőmérséklet is szükséges lehet, például enzimaktivitás megőrzése vagy hőérzékeny komponensek stabilizálása céljából. Összességében a hőmérsékleti paraméterek pontos szabályozása nélkülözhetetlen a CE módszer robusztusságának, érzékenységének és reprodukálhatóságának fenntartásához, különösen nagy teljesítményű, kvantitatív analitikai alkalmazások esetén.

A kapilláris elektroforézis során különféle pufferoldatok alkalmazhatók az elválasztási körülmények optimalizálása céljából. A puffer pH-ját jellemzően az elválasztandó minta molekulák izoelektromos pontjához (pI) közeli tartományban, általában  $\pm 1$  pH egységen belül állítják be, a megfelelő elektromos töltésállapot és elválasztási hatékonyság biztosítása érdekében. A pufferoldatok koncentrációja tipikusan  $50 - 100$  mM közé esik, amely elegendő pH stabilitást biztosít, miközben minimalizálja az elektromos vezetőképesség növekedéséhez kapcsolódó nem kívánt hatásokat. Az elválasztási rendszerben alkalmazhatók ún. ikerionos (zwitterionos) pufferkomponensek is, amelyek az adott pH-n alacsony vezetőképességet mutatnak. Ez az alacsony vezetőképesség csökkenti az áramerősséget így mérsékli a rendszerben keletkező Joule hő mennyiségét, ami különösen előnyös nagy feszültségen történő elválasztások során. A pufferoldathoz különböző adalékanyagok is adhatók az elektroforetikus mobilitás módosítása és az elválasztási szelektivitás növelése érdekében. Ezen adalékok alkalmazhatók továbbá a kapilláris belső falának módosítására vagy bevonására, amely hozzájárulhat az irreverzibilis fehérjeadszorpció csökkentéséhez, illetve a módszer reprodukálhatóságának növeléséhez. Az adalékanyagok alkalmazása lehetővé teszi alternatív módszervariánsok, a kapilláris gélelektroforézis (CGE) megvalósítását, amely a hagyományos elektroforetikus elválasztást gélmátrixban végzi, így a molekulasúly szerinti szeparáció is lehetővé válik. A kapilláris elektroforetikus elválasztáskora leggyakrabban alkalmazott pufferek és adalék anyagok a kapcsolódó tulajdonságaik feltüntetésével a 1.2. és a 1.3. táblázatban láthatóak [80].

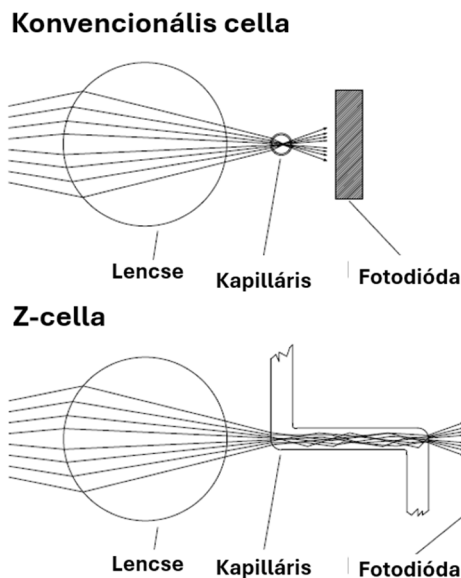
**1.2. táblázat.** Kapilláris elektroforézis során alkalmazott pufferek [80]

<b>Puffer</b>	<b>pH tartomány</b>
Foszfát	1,14 – 3,14
Acetát	3,76 – 5,76
Foszfát	6,20 – 8,20
Borát	8,14 – 10,14
MES	5,15 – 7,15
PIPES	5,80 – 7,80
HEPES	6,55 – 8,55
Tricin	7,15 – 9,15
Tris	7.30 – 9,30

**1.3. táblázat.** Potenciális alapanyagok a kapilláris elektroforetikus elválasztások módosításához [80]

<b>Adalékanyagok</b>	<b>Funkció</b>
Szerves oldószerek	EOF módosítása, feloldás
Szervetlen sók	Fehérje konformáció változtatás
Szulfonsavak	Hidrofób kölcsönhatási ágensek, ionpár képzés
Karbamid	Oligonukleotidok denaturálása, fehérjék feloldása
Kationos felületaktív anyagok	A kapilláris falának töltéscseréje
Cellulóz származékok	EOF csökkentése, molekuláris szűrőhatás
Amminok	Szabad szilanol csoportok lefedése
Polimerek	Méret szeparáció, retenciós idő fluktuációjának csökkentése

A kapilláris elektroforézis (CE) során alkalmazott detektálási elvek nagymértékben hasonlóságot mutatnak a kromatográfiás technikákban használt detektorok működésével, ideértve az abszorbancia-, fluoreszcencia-, vezetőképesség- és tömegspektrometriai alapú detektálást. A leggyakrabban alkalmazott detektálási módok azonban az ultraibolya/látható (UV/VIS) spektroszkópia és a lézerindukált fluoreszcencia (LIF). Az UV/VIS detektálás során a rendszer az oldat fényáteresztő képességét (transzmittanciáját) méri az adott hullámhosszon, majd az így nyert jelintenzitást egy korábban meghatározott kalibrációs görbéhez viszonyítja, amely lehetővé teszi az analit koncentrációjának kvantitatív meghatározását. Az UV detektálás során alkalmazott háttérpuffernek optikailag inaktívnak kell lennie az adott detektálási hullámhosszon, hogy minimalizálja a háttérzajt és maximalizálja a jel/zaj arányt. A detektálás érzékenysége és hatékonysága a kapilláris detektálási zónájának geometriájával is fokozható. Ilyen konstrukció a Z-alakú detektáló cella (Z-cell), amely megnövelt optikai úthosszt biztosít, így javítva az abszorbancia alapú detektálás érzékenységét (lásd 1.5. ábra). A továbbfejlesztett detektálási geometriák különösen előnyösek alacsony koncentrációjú minták esetén. Az UV/VIS detektálásnál elérhető detektálási határ (LOD) tipikusan a  $10^{-13}$  –  $10^{-12}$  mol tartományban mozog, függően az analit moláris extinkciós koefficiensétől, a detektálási hullámhossztól, a kapilláris optikai úthosszától, valamint a rendszer zajszintjétől.



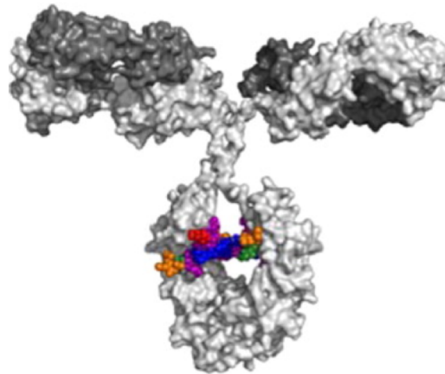
**1.5. ábra.** Konvencionális és Z-cellás detektálási módok [81]

A fluoreszcencia alapú detektálást széles körben alkalmazzák a gyógyszeripari vegyületek analitikai vizsgálata során, különösen akkor, ha alacsony koncentrációjú komponensek nagy érzékenységű kimutatására van szükség. Ugyanakkor számos cél analit eredendően nem rendelkezik fluoreszcens tulajdonságokkal, ezért az esetek többségében fluoreszcens származékképzés – azaz pre- vagy posztkolonnás derivatizálás – szükséges a megfelelő detektálhatóság eléréséhez. A fluoreszcencia és az UV/VIS alapú detektálás közötti egyik alapvető különbség a gerjesztéshez használt fényforrás típusa. Míg az UV/VIS detektálás során általában xenonlámpát alkalmaznak, addig a lézerindukált fluoreszcencia (LIF) detektáláshoz argon ion lézereket használnak, jellemzően 488 nm és 532 nm közötti gerjesztési hullámhosszon. Ezek a monokromatikus, nagy intenzitású fényforrások lehetővé teszik a célzott és nagy érzékenységű fluoreszcencia excitációt. A detektálási határ (limit of detection, LOD) közvetlen korrelációt mutat a lézer teljesítményével: erősebb lézerforrás alkalmazása fokozott érzékenységet eredményez, amely lehetővé teszi pikomól alatti koncentrációk pontos mérését. Ugyanakkor a lézerintenzitás optimalizálása elengedhetetlen, mivel túlzott teljesítmény esetén a fluoreszcens festék fotodegradációja (ún. "kiégés") következhet be, ami a jelcsökkenéshez és reprodukálhatósági problémákhoz vezethet. A LIF technika egyik fő előnye, hogy extrém alacsony kimutatási határ érhető el: a LOD érték tipikusan  $10^{-17}$  mol tartományban mozog, így ez az egyik legérzékenyebb detektálási mód a kapilláris elektroforézisben. Ez különösen előnyös nyomnyi mennyiségű biológiai minták, gyógyszerhatóanyagok vagy metabolitok analízise esetén.

## 1.6. A kutatómunka során felhasznált fehérjék

A PhD kutató munkám során bemutatott eredményekben két humán eredetű – humán immunoglobulin 1 (hIgG1) és vérszérum – valamint három gyógyszeripari (Humira, Enbrel és Roche geAb – glikomódosított antitest: glycoengineered antibody) – glikoprotein mintát alkalmaztam. Ideális esetben egy kidolgozott mintaelőkészítési protokoll minden mintára feltétel nélkül alkalmazható, így ezen glikoproteinek megválasztása önkényes volt, részben azért, mert részben általánosságban alkalmazott teszt fehérjének számítanak, részben azért, mert a választott minták olyan érdekes tulajdonságokat mutattak, melynek kapcsán a protokoll fejlesztésére, módosítására, és kiterjesztésére volt szükség, azonban mindről elmondható, hogy mind gyógyszeripari, mind a betegségekkel kapcsolatos kutatásokban, markerek fejlesztésekben szerepük kiemelkedő.

A **humán immunoglobulin (IgG)** a legnagyobb mennyiségben előforduló antitest izotípus az emberi keringésben, az összes szérumban található immunoglobulin körülbelül 75%-át teszi ki. Az IgG molekulákat plazmasejtek (B-sejtek) szintetizálják és szekretálják [82]. A hIgG1 ezen belül egy antitest izotípus (1. ábra), amely négy peptidláncból épül fel: két azonos nehéz- (heavy) és két azonos könnyű- (light) láncból, Y alakban elrendeződve, ahol minden IgG molekula két antigénkötő hellyel rendelkezik (1.6. ábra).



**1.6. ábra.** Az immunoglobulin G molekula. A színezett rész a konzervált N-glikozilációs helyeket mutatja [83]

Az IgG molekulák egy konzervált N-glikozilációs hellyel rendelkeznek az Aszparagin-297 (Asn-297) aminosav pozíciójában, mindkét CH<sub>2</sub> doménben [84], [85] (1.4. ábra, színezett rész). A glikozilációs mintázat betegségekkel összefüggő változásai fontos információt hordozhatnak az adott kórállapotról vagy annak stádiumáról. Ezen glikánok az IgG effektor funkcióiban is jelentős szerepet játszanak, ezért a terápiás antitestek glikán struktúráinak módosítása lehetőséget biztosít a quality by design (QbD) megközelítés alkalmazására [84]. A fukoziláltság jelenléte vagy hiánya meghatározó tényező lehet az ADCC (antitest függő celluláris citotoxicitás) funkció szempontjából. Az Evaluate Pharma 2024-es kimutatása szerint 2025 és 2030 között közel 100 biológiai gyógyszer vesztí el kizárólagosságát az Egyesült Államokban, amelyek együttes forgalma az engedélyezés lejártát megelőző évben elérte a 120 milliárd amerikai dollárt. Ez a változás jelentős lehetőséget teremt a bioszimiláris készítmények piacán, amely jelenleg még nem aknázza ki teljes mértékben növekedési potenciálját. A jelenlegi analitikai technikák önmagukban nem biztosítanak kielégítő választ a biofarmakonok kvalitatív és kvantitatív

analízisére, ezért ortogonális módszerek alkalmazása válnak szükségessé [86]. A glikoziláció vizsgálatakor, illetve a kapcsolódó módszerek fejlesztésekor, vizsgálatakor a hIgG1 glikoprotein gyakran alkalmazott minta molekula, mert nagy mennyiségben, relatíve olcsón rendelkezésre áll, széles spektrumon és nagy mennyiségben tartalmaz különböző N-glikánokat.

A **Humira** (Adalimumab) egy teljesen humán eredetű, rekombináns monoklonális antitest, amely az anti-TNF $\alpha$  (tumor nekrozis faktor alfa) hatóanyagcsoportba tartozik. Az Európai Unióban és világszerte az egyik legszélesebb körben alkalmazott biológiai terápiás szer gyulladáso autoimmun betegségek – reumatoid arthritisz, Crohn betegség, colitis ulcerosa, pszoriázis és ankylosing spondylitis – kezelésére [87]. Adalimumab szerkezetét tekintve egy IgG1 típusú immunglobulin, molekulatömege kb. 148 kDa, és számos poszttranszlációs módosításon megy keresztül, melyek közül a glikoziláció a legjelentősebb [88]. Az adalimumab glikozilációs jellemzői [29], [89]:

- Az N-glikánok az Asn297 aminosav pozícióban találhatók mindkét nehézlánc Fc régiójában.
- Az Fc régió glikánjai komplex, biantennás struktúrák, amelyek részben vagy teljesen galaktoziláltak, fukoziláltak és szializáltak lehetnek.
- Az Fab régióban (antigénkötő rész) jellemzően nincs glikoziláció (ellentétben néhány más terápiás antitesttel), ami hozzájárul a jól meghatározott, homogén szerkezethez.
- Stabilitás és szerkezet: a glikánok hozzájárulnak az Fc régió szerkezetének stabilizálásához.
- Effektor funkciók: a glikán profil befolyásolja az Fc $\gamma$  receptorokhoz (pl. Fc $\gamma$ RIIIa) és a komplementrendszer C1q komponenséhez való kötődést, ezáltal az ADCC (antitestfüggő sejtcsitotoxicitás) és CDC (komplementfüggő citotoxicitás) hatásmechanizmusokat.
- Immunogenitás: mivel az adalimumabot humán sejtvonal (CHO vagy PER.C6) termeli, glikánjai humán kompatibilisek, így az immunogenitási kockázat alacsony.

A Humira több bioszimilárisa is elérhető (pl. Amgevita, Hyrimoz, Idacio, Halimatoz), amelyek gyártásánál kulcsfontosságú a referenciahatóanyag glikánprofiljának reprodukálása. A glikánprofil kisebb eltérései befolyásolhatják a sejtközvetített citotoxicitás mértékét, az Fc receptorhoz való kötődést, valamint a fehérje szérumbiztonságát és kiürülését [90].

Az **Enbrel** (Etanercept) egy biológiai eredetű, rekombináns fúziós fehérje, amelyet a tumor nekrozis faktor (TNF) gátlására fejlesztettek ki. Alkalmazási területei közé tartozik több autoimmun betegség – a reumatoid arthritisz, pszoriázisos arthritisz, ankylosing spondylitis és plakkos pszoriázis – kezelése [91]. A molekula ezzel szerkezetileg hasonló egy IgG antitesthez, de antigénkötő régió helyett a TNF-hez kötődő receptor doméneket hordoz [2]. Etanercept erősen glikozilált fehérje, amely mind N-glikánokat, mind O-glikánokat tartalmaz. A rekombináns fehérjét CHO sejtekben állítják elő, ami biztosítja a komplex, humán típusú glikán mintázat előállítását, bár kisebb mértékű nem humán glikánok (pl. Neu5Gc vagy  $\alpha$ -Gal) is előfordulhatnak, amelyek immunogenitást válthatnak ki [92]. Az Etanercept molekula:

- Hat N-glikozilációs helyet tartalmaz a TNFR2 komponensben, láncként kettőt, valamint további egyet a FC-n Asn 297-ben.
- Az Fc régióban található egy N-glikozilációs hely (Asn297) hasonló, mint a natív IgG-ben.

- Ezen felül több potenciális O-glikozilációs hely található, főként a TNFR2 doménben, de ezek szerepe kevésbé feltárt – a linkerekben pl. lánconként 13 darab O-glikán található.

A terápiás protein minőségellenőrzése során kiemelt figyelmet fordítanak a glikozilációs mintázat vizsgálatára, mivel ezek a kritikus minőségi attribútumok (CQA-k) közé tartoznak. A bioszimiláris fejlesztések (pl. Benepali) során is a glikán profil egyezősége az egyik legfontosabb értékelési szempont, mivel a hatásmechanizmus glikoziláció függő lehet. [32].

A Roche GmbH. által gliko-módosított antitest: glycoengineered antibody – **Roche geAb** – egy titkosított, fejlesztés alatt álló fúziós fehérje, amivel kapcsolatban annyi információt biztosított a gyártó, hogy erősen glikozilált fúziós fehérjéről van szó, és problémák adódtak az N-glikán analitikája során.

A **humán szérum** a vérplazmának az alvadási faktoroktól (mint a fibrinogén) megtisztított része, amely számos fehérjét és biológiailag aktív molekulát tartalmaz. Ezek közül a glikoproteinek – vagyis a szénhidrát oldalláncokat tartalmazó fehérjék – kulcsfontosságú szerepet játszanak a szervezet homeosztázisában, az immunválaszban, valamint a sejtek közötti kommunikációban [17]. A szérum glikoproteinjeinek többsége a májban szintetizálódik, és a vérkeringésen keresztül jut el rendeltetési helyére. A legnagyobb mennyiségben jelen lévő szérumfehérje, az albumin (~35 – 50 g/L), csak minimális glikozilációval rendelkezik, így nem sorolható a klasszikus glikoproteinek közé. Ezzel szemben több jelentős plazmafehérje – az immunglobulinok (IgG, IgA, IgM), a transferrin, a haptoglobin, az  $\alpha$ 1-antitripszin, és a komplementrendszer komponensei – jól definiált glikán struktúrákkal rendelkeznek [93]. A glikánok szerkezete és eloszlása dinamikusan változik különböző élettani és kórélettani állapotokban, így a glikozilációs mintázat hasznos biomarkerként szolgálhat számos betegség, gyulladással járó állapotok, autoimmun betegségek vagy daganatok esetén [94]. Mennyiségi szempontból, a humán szérumban több mint 200 különböző glikoproteint azonosítottak, amelyek koncentrációja széles tartományban mozog, a legfontosabbak ezek közül [29]:

- IgG: kb. 7,0 – 16 g/L – erősen N-glikozilált, a glikán struktúrák befolyásolják az Fc receptorhoz való kötődést és az ADCC választ
- Transzferrin: ~2,5 – 3,8 g/L – két N-glikozilációs hellyel rendelkezik, glikozilációja befolyásolja a vas szállítását.
- Haptoglobin: ~0,3 – 2,0 g/L – erősen glikozilált, akut fázisfehérje, szintje gyulladásban nő.
- $\alpha$ 1-antitripszin: ~1,5 – 3,5 g/L – N-glikánjai stabilizálják a szerkezetét, glikozilációs profilja májbetegségek indikátora lehet.
- Komplement C3: ~1,0 – 1,5 g/L – glikánjai szerepet játszanak az aktiváció szabályozásában.

Egyes glikán mintázatok, például az agalaktozilált IgG vagy a hiperszialisált transferrin, diagnosztikai értékkel bírnak. Az agalaktozilált IgG típusok arányának emelkedése reumatoid artritiszben megfigyelhető, míg a transferrin glikozilációjának eltérései örökletes kongenitális glikozilációs zavarok (CDG) indikátorai lehetnek [95].

## 2. Célkitűzés

A komplex szénhidrátok, ezen belül a cukrok – N-glikánok – analízisével kapcsolatban megállapítható, hogy elválasztási módszertől és mintaelőkészítési megoldásoktól függetlenül egy rendkívül összetett folyamat, nem rendelkezik se elnyeléssel, se autofluoreszcenciával, és egyes eseteket leszámítva töltéssel sem, ezért kvalitatív és kvantitatív mérésük kihívásokkal teli, legtöbbször soklépéses mintaelőkészítési módszer alkalmazását igényli. Szerkezetüket tekintve igen változatosak, azonban ezen szerkezeti különbségek nem hordoznak magukban megfelelő mértékű fizikai és/vagy kémiai tulajdonságbéli különbséget, mely az elválasztás alapja lehet. A kutatómunkám során a vizsgált N-glikánok ezen felül kötöttek, a legtöbb esetben a fehérje szerkezetek olyan belső régiójában megtalálhatóak, melyek nem egyértelműen és csak nehezen hozzáférhetőek.

A kutatói és ipari gyakorlatban használt N-glikán analitikához kapcsolódó mintaelőkészítési lépéseket nagy általánosságban azonos lépések mentén valósítják meg. A különbséget a felhasznált reagensek minősége és mennyisége adja, illetve fontos kiemelni, hogy ezen fő lépések komoly függőségi viszonyban vannak egymással. Az N-glikán mintaelőkészítés főbb lépései:

- 1) Fehérje denaturáció – a cukor struktúrák hozzáférhetőségének biztosítása
- 2) Enzimatis N-glikán eltávolítása PNGase F enzimmel – célzott emésztés
- 3) Jelölés (festés) – a cukor struktúrák detektálhatóságának, valamint az alkalmazott kapilláris elektroforézis rendszerben történő elválaszthatóságának biztosítása (töltések biztosítása)
- 4) Felesleges jelölőanyag eltávolítása – a detektálást zavaró maradék festékanyag eltávolítása

A mintaelőkészítés főbb lépései előre már vetítik a mintaelőkészítés főbb nehézségeit és kérdéseit úgy, mint a fehérje denaturációt követő enzimfehérjét alkalmazó lépést – további denaturációs hatás –, illetve a jelölés és felesleges jelölőanyag eltávolítása közti relációt. Az egyes részlépésekben alkalmazott ágensek egy későbbi reakciónál gátló hatással lehetnek, melyek koncentrációjának pontos megválasztása kritikus a reakció végbemenetele céljából. Fontos továbbá megemlíteni, hogy az általánosan alkalmazott mintaelőkészítési folyamat két egyensúlyi reakciót is tartalmaz – úgy, mint az enzimes emésztés, valamint az APTS jelölőanyaggal történő fluoreszcens jelölés – melyeknek kivitelezési módja és minősége közvetlenül befolyásolja a mintaelőkészítési módszer reprodukálhatóságát és megbízhatóságát.

A mintaelőkészítési módszerek fejlesztése nem öncélú folyamat, hanem kiemelt célok mentén valósul meg. A mintaelőkészítés folyamatának fejlesztésének szempontjai a vizsgált rendszerre a következők voltak:

- 1) Általánosan alkalmazható?
- 2) Egyszerűsíthető?
- 3) Csökkenthető a mintaelőkészítés ideje?
- 4) Validálható?
- 5) Automatizálható?

Az elmúlt évtizedekről általánosságban megfogalmazható, hogy mind a kutatói, mind az ipari fél igyekezett megoldást találni a felsorolt kérdésekre leginkább úgy, hogy valamelyik aspektusát kiemelt szerepben tűntette fel, és arra építve kínált megoldást az N-glikán mintaelőkészítés komplex folyamatára. Leginkább az idő faktor, ami kiemelkedett a szempontok közül, ugyan is a hagyományos mintaelőkészítési lépések gyakran tartalmaztak éjszakákon át tartó inkubációs lépéseket. Alapvető trend az analitikai munkában az analízis idő minél nagyobb mértékű csökkentése – gondoljunk a HPLC és a UPLC kapcsolatára, ahol sikeresen sikerült egyidejűleg megvalósítani az elválasztás hatékonyságának növelését és az analízis idő csökkentését. Ezen analógián tovább lépve belátható, hogy nem elegáns, praktikus, sem pedig gazdaságilag alátámasztható pl. egy 6 perces elválasztáshoz kapcsolt 48 órás mintaelőkészítési folyamat. A piac mára már számos formában kínál alternatívákat a megemlített főbb mintaelőkészítési lépéseken belül – pl. nagyhatékonyságú enzim és puffer rendszerek, mellyel percek alatt megvalósítható az N-glikánok specifikus eltávolítása a fehérjékről, illetve olyan jelölőanyagok, mely percek alatt képes a leemésztett glikánok jelölésére.

Felmerül azonban a kérdés, hogy pl. a folyamat idejének csökkentése, illetve bármilyen egyéb változtatás a módszerekben milyen hatással van a mintaelőkészítés megbízhatóságára? A természetben megtalálható, valamint a modern gyógyszeripar által előállított glikozilált fehérjék rendkívül változatosak, melyek esetén meg kell vizsgálni, hogy a kifejlesztett módszerek valóban alkalmasak és megbízhatóak-e a fehérjékhez kötött N-glikánok vizsgálatára. Mindemellett a változó, modernizálódó analitikai megoldások újabb kihívásokat indukálnak, így pl. a tömegspektrometriás rendszerekkel történő kapcsolás esetén további, a mintaelőkészítés a rendszerrel való kompatibilitását szükségessé tevő változásokat kell bevezetni a folyamat során. Az egyre növekvő ipari igények a nagyáteresztőképességű analitikai módszerek iránt évről évre egyre nagyobbak, így analitikai módszer alkalmazhatóságát szignifikánsan befolyásolja az alkalmazott lépések potenciális automatizálhatósága. A napjainkban már kereskedelemben elérhetőek olyan robotizált rendszerek, megoldások, melyek ezt a kérdéskört szimplán gazdasági kérdéssé redukálták, mert szinte már minden feladat elvégezhető robotok segítségével, azonban pl. egy centrifugáláshoz szükséges rendszer jóval bonyolultabb és drágább, mint ahol csak egyszerű pipettával történő anyagmozgatáson alapuló robotot kell alkalmazni. A törekvés e tekintetben, hogy milyen mértékben kiválthatóak ezek a lépések, és helyettesíthetőek olyan megoldásokkal, melyek gazdaságosabban automatizálhatóak.

A fejlesztési folyamat mérőszámai legtöbbször meglehetősen önkényes választáson alapulnak, hogy a teljesítmény paramétereiket milyen bázis értékhez képest vizsgáljuk. Az N-glikánok specifikus emésztéshez használt PNGase F enzimet hagyományos értelemben egész éjszakán át alkalmazzuk, azonban a piacon kapható már olyan enzim, ami fél órás emésztési időt ígér, de ha a 4.1. és a 4.2. fejezetben tárgyalt helyzet áll elő, a reakciósebesség másodlagos kérdéssé válik, ami természetesen nem eredményezi azt, hogy nincs törekvés a leghatékonyabb megoldás megtalálásra. Az exoglikozidázok automatizálására irányuló törekvéseim kapcsán azonban elmondható, hogy az enzimes reakció a mérőberendezésen belül történő lejátszatása, valamint a mérésnek a folyamatba való integrálása jelentős idő megtakarításához (25 – 50%) vezethet úgy, hogy az analízis megőrzi megbízhatóságát.

Általánosan elmondható, hogy egyszerre minden feltételrendszernek nem lehet megfelelni, hanem egy megfelelő cél artikulálása mellett a lehető legjobb módszert kell megtalálni, mely a lehető legtöbb

szempontot a lehetőségekhez mérten optimális eredményt biztosít. A kutatómunkám, ezen belül is ezen doktori disszertáció célja, hogy bemutassa az N-glikán mintaelőkészítés lépéseit és kihívásait, melyek célja, hogy a kapilláris elektroforézissel megvalósított analitikai munka során gyorsan kapjunk megbízható eredményeket. Célom bemutatni:

- 1) olyan gyógyszeripari fehérjét, ahol az általánosságban alkalmazott mintaelkészítési megoldás nem alkalmazható a denaturáció ellenére is fellépő sztérikus gátlás miatt,
- 2) olyan módosításokat a mintaelőkészítési folyamatban, mely lehetővé teszi nagy mennyiségű fehérjék – gyógyszeripari és biológiai minta esetén történő – feldolgozását tömegspektrometriás mérések céljából,
- 3) a mintaelőkészítési módszer megbízhatóságának vizsgálatát,
- 4) valamint a csúcsazonosításnál alkalmazott szekvenálási eljárás reakcióidejének szignifikáns lecsökkentésének és automatizálásának potenciális lehetőségét.

A megfogalmazott célkitűzéseken keresztül célom rávilágítani a mintaelőkészítési lépések önálló, valamint a rendszerben elfoglalt helyének ismeretében történő vizsgálatának fontosságára. A javasolt megoldások a tapasztalt problémákra egyik esetben sem feleltek meg a mintaelőkészítési módszerek fejlesztésével kapcsolatban felvetett kérdések közül az egyszerűsítés törekvéseinek. Ennek ellenére a bemutatott problémák és az azokra adott potenciális megoldás rávilágít a mintaelőkészítés egyes elemeinek mélységeire és buktatóira, melyeket érdemes figyelembe venni az ismert minták mellett és a rutinfeladatok mellett is.

### 3. Vizsgálati módszerek

#### 3.1. Felhasznált anyagok és eszközök

A kutatói munkám és a doktori disszertációban bemutatott eredményekhez alkalmazott eszközök, vegyszerek és reagensek listáját az 3.1 és a 3.2 táblázatokban foglaltam össze.

##### 3.1. táblázat. A felhasznált eszközök listája

Berendezés	Típus
Kapilláris elektroforézis	Beckman Coulter P/ACE MDQ
Szoftver	32Karat software; Version 10.1 Build 44.
PCR készülék	Genomyx cycle LR
Blokk termosztát	Biosan TDB-120 Dry Block Thermostat (A-103)
Centrifuga 1	Tomy Centrifuge PMC-060; 6 200 rpm max
Centrifuga 2	Biosan Microspin; 12 000 rpm max.
Centrifuga 3	Jouan rc.10.100 SpeedVac (2 500 rpm)
Vortex	IKA Mini Vortexer MV1 (VWR)
Kapilláris 1	Molex Polymicro 50 µm i.d. bare fused silica
Kapilláris 2	Beckman Coulter N-CHO (#477601)
Kapilláris 3	Sciex OptiMS (Sciex #B07367)
Pipetta	Rainin Pipet-Lite LTS Pipette L-XLS+ (2,0 µL; 20 µL, 200 µL;1,0 mL)
Víz tisztító berendezés	Merck Synergy UV Water Purification System (18,2 mΩ)

### 3.2. táblázat. A felhasznált reagensek listája

Reagens	Forgalmazó
Nátrium dodecil szulfát (SDS)	Amresco #0227-100G
Nonidet P-40 (NP-40)	Amresco #M158-100ML
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich #43816-50ML
Glicerin	VWR #24388.295
PNGase F	Asparia Glycomics PNGase F-500 IUB (Carboclip, <i>Elizabethkingia sp.</i> )
Jégecet	Sigma Aldrich #A6283-500ML
APTS	Fast Glycan Analysis and Labeling Kit (L6)
1 M NaBH <sub>3</sub> CN THF-ben	Sigma Aldrich #296813-100ML
Glikán mágneses gyöngyök	Fast Glycan Analysis and Labeling Kit – (M1)
Acetonitril	Millipore #1.0029.2500
Sósav	Millipore #1.09058.1000
Nátrium hidroxid	Molar Chemicals #24149-101-340
Glikán elválasztó gél puffer	Fast Glycan Analysis and Labeling Kit – (HR-NCHO)
Maltodextrin	Fast Glycan Analysis and Labeling Kit – (GU)
Bracketing standard (BST)	Fast Glycan Analysis and Labeling Kit – (BST-10)
Humán IgG (hIgG1)	Sigma Aldrich #I4506-100MG
Ammónium acetát (7.5 M)	Sigma Aldrich #A2706-100ML
Tetrahidrofurán (THF)	VWR #28553.293
Tripszin	Sigma Aldrich #T1426-100MG
PBS puffer	Sigma Aldrich #P4417-100TAB
2-merkaptoetanol	Sigma Aldrich #M7154
Iodoacetamide	Sigma Aldrich #I-1149
SDS-CGE elválasztó gél puffer	Beckman Coulter SDS-CGE analysis kit (A30341)
SDS-CGE minta puffer	Beckman Coulter SDS-CGE analysis kit (Samle buffer)
10 kDa standard	Beckman Coulter SDS-CGE analysis kit (A26487)
Foszforsav	Sigma Aldrich #345245
Karbamid	Sigma Aldrich #U0631
Iminodiacetsav	Sigma Aldrich #220000
L-arginin	Sigma Aldrich #A5006
cIEF elválasztó gél puffer	Beckman Coulter #A477497
cIEF Peptide pI Marker Kit	Beckman Coulter #A58481
Pharmalyte 3-10 (Carrier Ampholytes)	GE Healthcare #A58481
Amin mágneses gyöngyök	Chemicell #1401-5 (50 mg/mL; 1.0 µm)
Szialidáz A; α(2→3,6,8,9)R	ProZyme #GK80040 ( <i>Arthrobacter ureafaciens</i> in <i>E. coli</i> )
β-galaktozidáz; β(1 → 3,4,6)R	ProZyme #GKX-5012 (Jack bean)
β-N-acetil-hexózaminidáz; β(1 → 2,3,4,6)R	ProZyme #GKX-5023 (Jack bean)

### 3.2. Az N-glikán mintaelőkészítéshez szükséges törzsoldatok elkészítése

Az N-glikánok kapilláris elektroforézissel megvalósított analitikájához kapcsolódó mintaelőkészítésének fő lépési megegyeznek a korábban leírt négy fő lépéssel úgy, mint a 1) fehérje denaturáció, 2) enzimatis cukor felszabadítás, 3) fluoreszcens jelölés és 4) a felesleges jelölőanyag eltávolítása. A doktori dolgozatban tárgyalt reagensek és mennyiségeik irodalmi adatokra, valamint a kutatási témán korábban dolgozó kollégák eredményeire támaszkodva saját mérések kapcsán kerültek meghatározásra. Számos esetben kísérlettervezésen (DoE) alapuló mérésorozatok segítségével határoztam meg az optimumot egy adott reagens mennyiségét illetően, azonban ezen eredmények tárgyalása nem célja a doktori disszertációnak, de a kulcs paraméterek, aspektusok megfelelően kihangsúlyozva kerülnek majd bemutatásra.

Az N-glikánok a fehérjékről történő eltávolítása PNGase F enzimmel történt minden esetben, a kémiai módszerekkel, illetve más enzimekkel nem foglalkoztam. A kapcsolódó mintaelőkészítési lépések is ennek megfelelően lettek kialakítva. Hasonlóan elmondható, hogy a felszabadított glikán struktúrák a leggyakrabban alkalmazott APTS fluoreszcens jelölőanyaggal lettek megjelölve. A piacon megtalálható más jelölőanyagok, illetve az APTS jelöléshez kapcsolódó egyéb reagensek vizsgálata nem képi ennek a disszertációnak a témáját.

Fontos szempont volt a reagenseket illetően az tárolási körülmények és az eltarthatóság idejének meghatározása. A tárolás hőmérséklete a kutatócsoport korábbi tapasztalataira támaszkodva kerültek megállapításra, az eltarthatóság ideje pedig egy három hónapos maximumban lett megállapítva – a méréshez kiserelt mennyiségeket eszerint állítottuk be –, melynek fényében meghatározásra került, hogy az adott törzsoldat, reagens meddig tárolható.

Az alkalmazott mintaelőkészítési módszer az élettudományokban is rendszeresen alkalmazott törzsoldatokon alapuló rendszerben került kialakítása. A törzsoldatok száma más protokollokhoz képest nagy, azonban a mintaelőkészítési folyamat során az előre elkészített törzsoldatokból a reakcióhoz szükséges kész reagensek az inkubációs lépésekkel párhuzamosan összeállíthatóak, így elkészítésük nem növeli a teljes folyamat idejét.

Az automatizálhatósággal kapcsolatos célkitűzéseket szem előtt tartva a többlet jelölőanyag eltávolításához funkciós csoporttal ellátott mágneses mikrorészecskék (gyöngyök) kerültek felhasználásra. Más gyártók hasonlóan a gyöngyökhöz HILIC alapon, szerves oldószer jelenlétében képesek a leemésztett cukorstruktúrák befogására, azonban a centrifugáláson és centrifugacsöveken alapuló megoldása az automatizálhatóság szempontjából egy költségesebb megoldást jelent.

Fontos megjegyezni, hogy a kutatói munkám során felhasznált mintafehérjék esetén mindegyikről elmondható, hogy a leírásra kerülő mintaelőkészítési módszerben javasolt anyagmennyiségek betartása mellett a mintamátrix nem fejtett ki zavaró hatást a mintaelőkészítés folyamatára, így az általánosan alkalmazott protokollokban gyakran javasolt puffercserére nem volt szükség. Egyéb esetben, pl. ahol a tömegspektrometriával történő kapcsolás ettől eltérő mintamennyiséget indokolt, a 4.2. fejezetben kerülnek bemutatásra a szükséges változtatások és azok okai.

### 3.2.1. Fehérjék denaturálása

A fehérjék denaturálásához – az N-glikán struktúrák hozzáférhetőségének biztosítása céljából – nátrium dodecil szulfátot (SDS), dithiothreitol (DTT), nonidet P-40-et (NP-40), valamint glicerint alkalmaztam. Az alkalmazott reagensek mindegyikéről elmondható, hogy a dolgozatban bemutatott mintafehérjék esetén a Roche cég által biztosított geAb fehérjét leszámítva önmagában képesek a mintafehérjéket denaturálni 60°C-on, vagy annál nagyobb hőmérsékleten. A keverék alkalmazásának célja, hogy széles spektrumon, egy közel általános denaturáló reagens keverék álljon rendelkezésre. Az alkalmazott detergens és felületaktív anyagok minőségi és mennyiségi megfontolásai a következők voltak:

- 1) NP-40: A NEB cég denaturáló oldataiban alkalmazott reagens, melyről megállapították, hogy a fehérjék denaturálásán túl a denaturálást követő PNGase F enzim reakciónak kedvez. Mennyisége a NEB honlapján (<https://www.neb.com/en/products/p0708-pngase-f-recombinant>) megtalálható denaturáló ágensük összetétele alapján lett megállapítva.
- 2) Glicerín: A fehérje stabilizációjában alkalmazzák, csökkenti az aggregáció kialakulásának lehetőségét, valamint növeli a fehérje oldhatóságát. Használata alapvetően ellentmond a denaturálás folyamatának céljával, ám alkalmazásával növelhető a precipitáció nélkül denaturálható fehérje mennyisége (lásd: 4.2. fejezet).
- 3) SDS: A leggyakrabban alkalmazott felületaktív anyag a fehérje denaturációja során. A töltött SDS molekulák a fehérje láncokhoz kapcsolódva kifeszítik azokat. A megállapított mennyiséget alkalmazva a denaturációkor az SDS kritikus micella koncentráció (CMC) skálájának alsó határán folyik a reakció, így biztosított a megfelelő minőségű denaturációs folyamat, azonban amikor a PNGase F enzimet tartalmazó pufferes oldat a reakciót követően a mintához hozzáadásra kerül, a CMC alá csökken az SDS mennyisége, így kevésbé zavarja az enzimes emésztés folyamatát.
- 4) DTT: A fehérje analitikában gyakran alkalmazott reagens, mely felbontja a diszulfidhidakat. A kapcsolódó jodoacetamidot, mely megakadályozza a kén-kén kötések újbóli kialakulását nem szükséges alkalmazni, ugyan is a PNGase F enzim reakció megfelelően gyors ahhoz, hogy a kénhidak visszazáródása ne befolyásolja negatívan a folyamatot. Mennyisége az irodalmi adatok alapján lett beállítva.

A denaturáláskor a két fő törekvés az N-glikán mintaelőkészítés során, hogy éppen megfelelő mennyiségű reagenst alkalmazzunk, hogy 1) a fehérje struktúrákat megfelelően hozzáférhetővé tegyük és 2) a denaturálást követő PNGase F enzim reakciót ne gátoljuk. A felületaktív anyagok megfelelő megválasztásával, valamint a koncentrációk pontos beállításával ezen két törekvés egyszerre megvalósítható. A kutatómunkám során alkalmazott denaturáló keverék összetétele, elkészítésének módja, valamint a kapcsolódó tárolási és eltarthatósági információkat az 3.3. táblázatban láthatóak.

### 3.3. táblázat. A mintaelőkészítés során felhasznált denaturáló oldatok előkészítése

Törzsoldat	Leírás	Elkészítés	Tárolás és eltarthatóság
DENAT 1	0,5% NP-40 17% glicerin	- 3,3 mL HPLC víz - 20 µL NP-40 - 680 µL glicerin	Szobahőmérsékleten 3 hónapig
DENAT 2	5,0% SDS	- 4,0 mL HPLC víz - 0,2 g SDS	Szobahőmérsékleten 3 hónapig
DENAT 3	100 mM DTT	- 900 µL HPLC víz - 100 µL 1 M DTT	-20°C-on 3 hónapig
DENMIX	A fentebb megnevezett három törzsoldat keveréke fehérje denaturáláshoz	- 30 µL DENAT 1 - 5,0 µL DENAT 2 - 5,0 µL DENAT 3	Szobahőmérsékleten 1 napig

#### 3.2.2. Enzimatisus N-glikán felszabadítás

A peptide-N-Glycosidase F (PNGase F) enzim megválasztásakor lehetőség nyílt egy új piaci szereplő termékét kipróbálni. Az Asparia Glycomics az eredmények születésekor rendkívül kedvező áron árulta a termékeit, és tekintetbe véve azt, hogy az enzim ára képezi a kétharmadát a mintaelőkészítés teljes anyagköltségének, gazdaságilag előnyös egy olcsóbb alternatíva felhasználása, amennyiben ez nem befolyásolja a kapott eredményeket. A kutatócsoportban korábban a ProZyme GKE-5006B (jelenleg Agilent) enzimmel volt tapasztalat, így az új enzimet ehhez az termékhez hasonlítottuk, valamint a liofilizált enzim felvételekor arra törekedtünk, hogy a hígításkor megegyezzenek az aktivitások a korábban alkalmazott enzimmel.

Az alkalmazott Asparia Glycomics PNGase F batch-ről megállapítható volt, hogy megfelelő hígításban ekvivalens eredményeket kaptunk a ProZyme termékével összehasonlítva, pH és hőmérséklet optimuma is megegyezett, továbbá nem tapasztaltunk csúcsarány béli eltolódásokat, különbségeket. Ezen, és más piaci szereplők által forgalmazott PNGase F enzimfehérjék bemutatása és összehasonlítása nem képezi a jelen doktori disszertáció témáját.

A denaturálási lépésnél alkalmazott detergensok és felületaktív anyagok, elsősorban a DTT jelentősen lecsökkenti a mintaoldat pH-ját ( $\text{pH} = 2-3$ ), mely nem kedvez az enzim reakciónak – jóval az optimális tartomány alatt van ( $\text{pH}_{\text{opt}} = 5-9$ ). A megfelelő reakciósebesség elérése céljából a pH beállítására ammónium acetát puffert alkalmaztam, mely a mintafehérjét tartalmazó puffer/mátrix függvényében  $\text{pH} = 6-7$  közé emelte az oldat pH-ját az emésztés során. További előnye, hogy hő/párolgás hatására és szétesik, így többlet sóbevitel nélkül befolyásolhatóak a reakció körülményei, melyek a későbbi lépésekben – tisztítás és a kapilláris elektroforézissel végzett mérések folyamán – igen előnyös. Az alkalmazott enzim előkészítésének, valamint a mintaelőkészítési protokollban történt felhasználását a 3.4. táblázatban szemléltetem a kapcsolódó tárolási és eltarthatósági paraméterekkel.

### 3.4. táblázat. Az Asparia Glycomics cég által gyártott PNGase F enzim előkészítése

Törzsoldat	Leírás	Elkészítés	Tárolás és eltarthatóság
PNGase F	Cél enzimaktivitás: 1,5 IUB milliunit/ $\mu$ L.	- Enzim feloldásához szükséges víz mennyisége ( $\mu$ L-ben): <u>Batch aktivitása (IUB milliunit)</u> 1,5 (IUB milliunit/ $\mu$ L)	4°C - 8°C-on 3 hónapig
DIGBUFF	16,7 mM ammónium acetát oldat	- 3,6 mL HPLC víz - 8,0 $\mu$ L 7.5 M ammónium acetát	4°C - 8°C-on 1 hónapig.
DIGMIX	A fentebb megnevezett két törzsoldat keveréke N-glikánok emésztéshez maximum 8 mintához	- 160 $\mu$ L DIGBUFF - 8,0 $\mu$ L PNGase F	4°C - 8°C-on 1 napig

### 3.2.3. Fluorofór jelölés és a többlet jelölőanyag eltávolítása

A felszabadított N-glikán struktúrák jelölésére a napjainkban leggyakrabban alkalmazott 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS) fluoreszcens jelölőanyagot használtam. Az APTS egy Schiff-bázis reakcióval kapcsolódik az N-glikán struktúrák core részéhez 1:1 arányban, mely ideálissá teszi a kvantitatív analízisre. Széles gerjesztési sávval rendelkezik (340 nm – 503 nm,  $E_{x_{max}} = 425$  nm), a cukrok kötése után 520 nm-en detektálható [96]. A reakcióhoz szükséges redukáló ágensként szintén a gyakran alkalmazott tetrahidrofuránban oldott nátrium-cioanoborohidridet használtam. A fluoreszcens jelölési reakció elsődrendű kinetika szerint zajlik le, így a jelölőanyagot nagy feleslegben kell alkalmazni, továbbá a hőmérséklet növelésével gyorsítható a reakció sebessége. Az el nem reagált jelölőanyag nagy intenzitású jelet ad az elektroferogrammon, mely interferálhat a minta komponensekkel, így annak eltávolítása szükségszerű. A jelölési reakció gyorsítása céljából a kutatócsoport korábban egy bepárláson alapuló technikát dolgozott ki, mely a hőmérséklet túlzott mértékű növelésének elkerülése céljából a reakciósebességet oly módon gyorsította, illetve biztosított a lehető legnagyobb hatásfokú jelölést, hogy az oldószert a folyamat során elpárologtatta, mely során folyamatosan nőtt a jelölőanyag koncentrációja úgy, hogy nem volt szükséges többlet jelölőanyag alkalmazására [97].

A felesleges jelölőanyag eltávolításhoz HILIC alapon működő funkciós csoporttal rendelkező mágneses mikrorészecskék kerültek felhasználásra, melyek szerves oldószer (acetonitril) jelenlétében megkötik a megjelölt cukrokat, ezáltal a felesleges festékanyag egy mágneses állványon eltávolítható a minta mellől, vizes fázisban pedig újra oldatba kerülnek a jelölt N-glikánok. A fluoreszcens jelöléskor alkalmazott, valamint a többlet jelölőanyag eltávolításakor alkalmazott reagensek, azok elkészítésének módszere, valamint az tárolás és eltarthatóság körülményei a 3.5. táblázatban láthatóak.

**3.5. táblázat.** A felszabadított N-glikánok fluoreszcens jelöléséhez, valamint a többlet jelölő anyag eltávolításához alkalmazott törzsoldatok előkészítése

Törzsoldat	Leírás	Elkészítés	Tárolás és eltarthatóság
APTS	120 mM APTS	- 5,0 mg APTS - 80 µL HPLC víz	4°C - 8°C-on 3 hónapig
REDUCT	100 mM NaBH <sub>3</sub> CN THF-ben 25% ecetsav	- 50 µL HPLC víz - 50 µL jégcet - 80 µL THF - 20 µL of NaBH <sub>3</sub> CN	4°C - 8°C-on 1 napig
LABMIX	A fentebb megnevezett két törzsoldat keveréke leemésztett N-glikánok jelöléséhez maximum 8 mintához	- 160 µL REDUCT - 8,0 µL APTS	4°C - 8°C-on 1 napig
MAGMIX	Funkciós csoporttal ellátott mágneses mikrorészecske keverék a többlet jelölő anyag eltávolításához	- 1,6 mL M1 Process Solvent - Tárolófolyadék eltávolítása mágneses állványon - 160 µL HPLC víz	Szobahőmérsékleten 1 napig

### 3.2.4. Standardok és fehérje minták

Az N-glikánok kapilláris elektroforézissel történő mérése során két standardot használtam. Az egyik a maltodextrin (MD), mely glükóz molekulákból álló különböző hosszúságú oligomerek keveréke, a másik pedig az ún. „bracketing standard” (BST), mely a maltodextrin kettő (DP2), illetve tizenöt glükóz (DP15) egységet tartalmazó, HPLC segítségével frakcionálással elválasztott része. A maltodextrin, mint standard mérésének céljai, 1) hogy a méréssel ellenőrizzük a berendezés megfelelő működését, valamint 2) hogy a Kováts-indexhez hasonlóan biztosítsunk egy homológ sort, melyet felhasználva egy normalizálási lépést követően nagy pontossággal meghatározhatóak, azonosíthatóak legyenek a kapott mintacsúcsok. A csúcsokat így nem a migrációs idejükkal, hanem az ún. glükóz egységgel jellemezzük (GU), ahol a mintacsúcs migrációs idejét az MD futtatás csúcsaihoz viszonyítjuk százalékosan [45].

Mindemellett az azonosítás megbízhatóságának növelése céljából a minta injektálást követően BST is injektálásra kerül, melynek az a szerepe, hogy a mérési bizonytalanságból származó migrációs idő különbségek kiküszöbölhetőek legyenek úgy, hogy a konsekutív futtatások DP2 és DP15 csúcsainak migrációs idejeit megfeleltetjük egymással. A csúcsazonosítás, valamint a futtatások egymásra illesztésének megkönnyítése céljából a kutatócsoport készített egy GUCal nevű alkalmazást, mely gombnyomások segítségével gyorsan és hatékonyan végzi el az említett matematikai műveleteket, és a beépített adatbázisa segítségével javaslatot is tesz a kapott csúcsnak megfelelő cukor struktúrára [98]. A mérések során használt standardok előkészítésének módját, valamint a tárolási és eltarthatósági információit a 3.6. táblázat tartalmazza.

### 3.6. táblázat. Az N-glikán mérések során alkalmazott standardok előkészítése

Törzsoldat	Leírás	Elkészítés	Tárolás és eltarthatóság
MD	100 mg/mL maltodextrin.	- 10 mg maltodextrin - 100 µL HPLC vízzel	4°C - 8°C-on 3 hónapig
BST	DP2 és DP15 maltodextrin frakciót tartalmazó standard	- BST-10 standard (1 fiola) - 200 µL HPLC víz	4°C - 8°C-on 3 hónapig

A standardokat tartalmazó törzsoldatokat mérés előtt hígítani kell, az MD törzsoldatot ezerszeresére, a BST törzsoldatot pedig tízszeresére. A fent említett referencia anyagokat mindemellett érdemes/szükséges kiegészíteni jól ismert, biztos forrásból álló fehérjékkel, melynek futtatása a létra mellett további információval szolgál a rendszer megbízhatóságát illetően. Ilyen fehérje az immunoglobulin G1 (hIgG1), illetve bármely ismert gyógyszerfehérje, ahol a gyártás garantálja annak állandóságát és minőségét. Az ideális kiindulási fehérje koncentráció mind a standardokat, mint a mintafehérjéket tekintve 5,0 mg/mL és 10 mg/mL között (50 µg – 100 µg fehérje) mozog. A glikoziláltság függvényében a kapott jel nagysága adott injektálási paraméterek alkalmazása mellett szignifikánsan eltérhet különböző fehérjék között. Kis jel nagyságnál az injektálási paramétereket érdemes változtatni (figyelve a mintadugó maximális méretére – felbontás mértéke), nagy jel nagyság esetén azonban a minta hígításával érdemes a mérésnek megfelelő koncentrációra hozni.

### 3.3. Az N-glikán mintaelőkészítés menete

Az N-glikán mintaelőkészítés optimális kivitelezése céljából a 3.2. fejezetben leírt reagenseket érdemes az analízist megelőző napon elkészíteni. A reagenseket kisebb részekre (pl. 10 mintánként) szétszedve tárolva mindig csak annyit veszünk elő, amennyire szükségünk van a mindennapi analitikai munka elvégzéséhez. Emellett az inkubálási időket ki lehet arra használni, hogy a következő lépéshez tartozó – a mintába közvetlenül belekerülő – reagenst a leírt törzsoldatok felhasználásával összeállítsuk, így az össz analízis ideje jelentősen csökkenthető. Hasonló szempont az olyan berendezések előre bekapcsolása és pl. a kiindulási hőmérsékletre történő előmelegítése, mellyel úgyszintén jelentős mennyiségű idő nyerhető.

A mintaelőkészítés során alkalmazott PCR készülék programok:

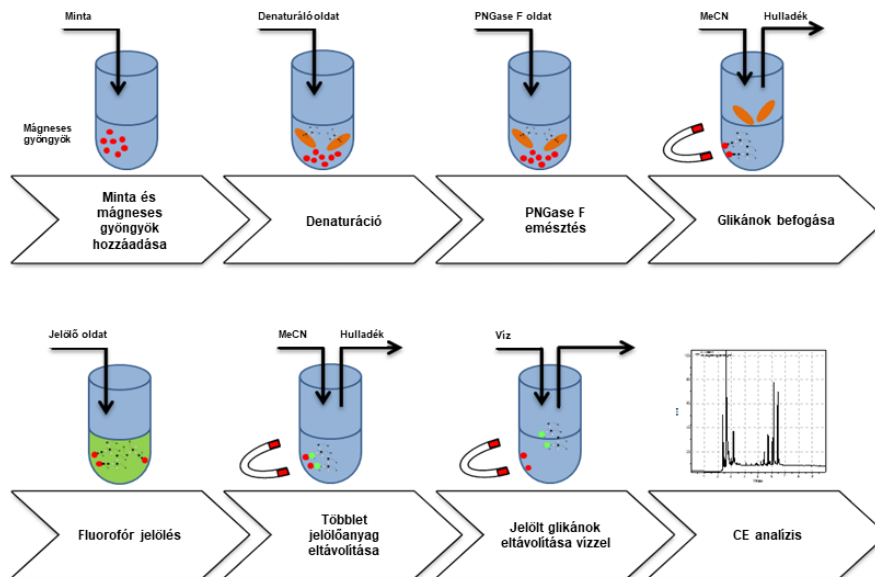
**V DEN módszer** (fűtött tetővel) – fehérjék denaturálásához alkalmazott módszer. Teljes idő: 10 min.

- 1) Felfűtés 30°C-ról 80°C-ra 0,5°C/5,0 sec felfűtési sebességgel. Időtartam: 8 min 20 sec.
- 2) Izoterm inkubáció 80°C-on 1 min 40 sec időtartamig.
- 3) Lehűtés 30°C-ra. Időtartam: 2,0 min.

**FDIG módszer** (fűtött tetővel) – PNGase F emésztéshez alkalmazott módszer. Teljes idő: 20 min.

- 1) Felfűtés 40°C-ról 60°C-ra 0,1°C/6,0 sec felfűtési sebességgel. Időtartam: 20 min.
- 2) Lehűtés 30°C-ra. Időtartam: 2,0 min.

A mintaelőkészítés folyamatát a 3.1. ábra szemlélteti. A mintaelőkészítés pontos menete a fent említett szempontokat kiemelve az ábra alatt került ismertetésre. Fontos megjegyezni, hogy a leírt mintaelőkészítési protokoll olyan elemeket, lépéseket és megoldásokat tartalmaz, melyek az eredmények fejezetben leírt problémák és az azokra adott megoldási javaslatok alapján kerültek implementálásra oly formában, hogy a többlet lépéseket – úgy, mint a tripszines előemésztés, illetve a mágneses gyöngyöt alkalmazó puffercsere – nem tartalmazza, azonban egymással kompatibilisek.



3.1. ábra. Az N-glikán mintaelőkészítés főbb lépései

### 1) Hőmérséklet gradiens denaturálás [Teljes idő: 10 min; mintaelőkészítés ideje: 1,0 min]

- Megelőző lépések: 1) Készítsük elő a denaturáló oldatot (**DENMIX**), 2) Állítsuk be a blokk termosztát egységünket az emésztés és/vagy a fluoreszcens jelölés hőmérsékletére, amennyiben nem PCR készüléket alkalmazunk.

- Adjunk 10  $\mu\text{L}$  mintát (5,0 mg/mL; 50  $\mu\text{g}$  fehérje) egy 200  $\mu\text{L}$  térfogatú PCR csőbe.

- Adjunk a mintához 2,0  $\mu\text{L}$  denaturáló oldatot (**DENMIX**)

- Pipetta segítségével elegyítsük az oldatot. Szükség esetén pörgessük le a mintát egy centrifuga segítségével.

- Denaturáljuk a mintát a PCR készülékben a **V DEN** módszer alapján.

- Párhuzamos lépések: 1) Készítsük elő a PNGase F oldatot (**DIGMIX**), 2) Indítsuk el a PCR készüléket, és állítsuk be a megfelelő programot.

### 2) PNGase F emésztés [Teljes idő: 20 min – 16 h; mintaelőkészítés ideje: 1,0 min]

- Adjunk 20  $\mu\text{L}$  PNGase F oldatot (**DIGMIX**) a mintához.

- Pipetta segítségével elegyítsük az oldatot. Szükség esetén pörgessük le a mintát egy centrifuga segítségével.

- A mintafehérjétől függően inkubáljuk a mintát – hőmérséklet gradiens módszer – 20 min / 1,0 h (**FDIG**); konvencionális emésztés – 37°C / 16 h.

- Párhuzamos lépések: 1) Készítsük elő a jelölő oldatot (**LABMIX**).

### 3) Bepárlásos fluoreszcens jelölés [Teljes idő: 16 h; mintaelőkészítés ideje: 2,0 min]

- Adjunk 20 µL jelölő oldatot (**LABMIX**) a mintához.
- Pipetta segítségével elegyítsük az oldatot. Szükség esetén pörgessük le a mintát egy centrifuga segítségével.
- Inkubáljuk a mintát 37°C-on 16 órán keresztül egy blokk termosztátban nyitott kupakkal (elszívó fülke alatt), amíg teljesen be nem párolódik.

### 4) Többllet jelölőanyag eltávolítása [Teljes idő: 15 min; mintaelőkészítés ideje: 15 min]

- Megelőző lépések: 1) Készítsük elő a mágneses gyöngyöket tartalmazó oldatot (**MAGMIX**).
- Adjunk 20 µL mágneses gyöngyöt tartalmazó oldatot (**MAGMIX**) a mintához.
- Vortex segítségével alaposan keverjük át a mintát (5,0 sec maximum sebességen). Ismételjük meg a minta keverését összesen háromszor úgy, hogy közben egy-egy percig szobahőmérsékleten hagyjuk a mintát
- Adjunk 185 µL acetonitrilt a mintához anélkül, hogy a mágneses gyöngyökhöz érnénk. Ne keverjük/vortexeljünk a mintát.
- Várjunk 1 percet.
- Helyezzük a mintát egy mágneses állványra, várjuk meg, míg az összes gyöngy az edény falához tapad (~ 1.0 min), majd pipetta segítségével távolítsuk el a felülúszót.
- A fenti lépések mintájára végezzünk el további három mosási ciklust az alábbi módon:
  - Adjunk 20 µL HPLC vizet a mintához anélkül, hogy a mágneses gyöngyökhöz érnénk.
  - Keverjük össze vortex segítségével a mintát.
  - Adjunk 185 µL acetonitrilt a mintához. Ne keverjük se pipettával, se vortexxel.
  - Várjunk egy percet.
  - Távolítsuk el a felülúszót egy mágneses állványon.

### 5) Minta elúció [Teljes idő: 2,0 min; mintaelőkészítés ideje: 2,0 min]

- Adjunk 100 µL HPLC vizet a mintához a legutolsó felülúszó eltávolítást követően. (A minta 10X hígul ki a kezdeti koncentrációhoz képest).
- Keverjük meg a mintát vortex segítségével (5,0 sec maximum sebességen).
- A kupakba esetlegesen felkerült mintát mini asztali centrifuga segítségével pörgessük le az edény aljára.
- Várjunk egy percet.
- Egy mágneses állványra felhelyezve a mintát pipetázzunk át 80 µL mintát egy mintatároló edénybe.
- Szükség esetén hígítsuk meg a mintát HPLC vízzel a kapilláris elektroforézissel történő analízis előtt.
- Az előkészített minta 4°C - 8°C-on 3 hónapig, -20°C-on pedig több, mint egy évig tárolható.

### 3.4. N-glikánok elválasztása kapilláris elektroforézis technikával

A kapilláris elektroforézissel technikával megvalósított N-glikán mérések a Beckman Coulter cég által gyártott P/ACE MDQ mérőberendezésen kerültek kivitelezésre a rendszerhez tartozó 32Karat szoftvercsomaggal vezérelve. A berendezés lézer indukált fluoreszcens (LIF) detektorral volt felszerelve, ahol a gerjesztési hullámhossz 480 nm, az emissziós hullámhossz pedig 520 nm volt. A mérések során a felhasznált pufferektől, kapilláristól, illetve egy potenciális tömegspektrometriás kapcsolástól függetlenül a következő lépéseknek szerint valósul meg az analízis:

- 1) Kapilláris kondicionálása
- 2) Standardok analízise
- 3) Minták analízise
- 4) Kapilláris kondicionálása

#### 3.4.1. Kapilláris kondicionálás

A kapillárisok állapota, rendszeres és megfelelő mosása – kondicionálása – jelentősen hozzájárul a mérések megbízhatóságához és reprodukálhatóságához. A felületi szennyeződések azon túl, hogy aktív kötőhelyeket képesek indukálni, befolyásolhatják a kialakult elektroosmotikus áramlást, minek hatására az elválasztás hatékonysága megváltozik. Az N-glikán analízis során bevont, illetve bevont nélküli üveglapilláris – bare fused silica (BFS) – alkalmazhatunk. Kutatómunkám során az utóbbit részesítettem előnyben, ugyanis a bevont falu kapillárisok mellett, hogy érzékenyek, felhasználásuk limitált, továbbá igen drágák, azonban bizonyos esetekben – lásd cIEF (kapilláris izoelektromos fókuszálás) mérések – használatuk nem csak hogy előnyös, hanem elengedhetetlen. Bevont kapillárisokként NCHO kapillárisok alkalmaztam, melyet csak és kizárólag vízzel szabad mosni, és tárolás során is vízben kell tartani 2-8°C-on. Az NCHO kapillárisok belső átmérője 50 µm, hossza 30 cm és 60 cm között változtatható felhasználás függvényében. Az üveglapillárisok a bevont kapillárisokkal szemben sokkal nagyobb mozgásteret biztosítanak az analitikai fejlesztési munka kapcsán. Belső átmérőjük jellemzően 20 µm és 200 µm között változik, hosszát pedig a felhasználó határozza meg. A munkám során 50 µm belső átmérőjű kapillárisokkal dolgoztam 30 cm és 60 cm hosszúságokban.

A kapillárisok kondicionálását illetően megkülönböztetünk 1) kapilláris tárolásához/első használatbavételéhez alkalmazott, 2) mérések előtti, valamint 3) mérések közti kapilláris kondicionálást. Típustól függően változik a mosás ideje és intenzitása – a felhasznált vegyszerek minősége és mennyisége. Általános hüvelykujj szabály, hogy három darab kilépő csepp a kapillárisból egy alapos mosásnak számít tekintve a kapilláris térfogat és a felhasznált folyadék térfogatának arányát. A kapilláris átmérője és hossza azonban nem csak a kapilláris térfogatot befolyásolja, hanem a kapillárison eső nyomást, így a kondicionálási paramétereket a felhasznált kapilláris paramétereinek alapján kell megválasztani – alkalmazott nyomás és idő –, melynek biztosítani kell, hogy adott idő alatt a kapillárison a megfelelő mennyiségű mosófolyadék haladjon át azt figyelembe véve, hogy túl nagy nyomás esetén a reagens tároló edények percek alatt akár ki is ürülhetnek.

Érdekes a kondicionálás során – és minden olyan lépésnél, ahol pufferral járjuk át, illetve töltjük meg a kapillárisot – a kapilláris végét folyadékba lógatni, hogy megakadályozzuk a cseppképződést a kapilláris végén és az esetleg egymással nem kompatibilis anyagok feldúsulását, ami potenciális

só/kiválás képződéssel járhat, ami elzárhatja a kapillárist. Éppen ezért érdemes a BFS kapillárisokat szárazon tárolni, hogy a lehetséges kiválás esélyét minimálisra csökkentsük. Ilyenkor a kapillárist üres edényekbe állítva nyomás ráadásával levegővel tudjuk átfújni a rendszert. A kapilláris szárazon korlátlan ideig tárolható szobahőmérsékleten. Fontos megjegyezni, hogy a kapillárist külsejét borító poliimid réteg, melynek célja a kapilláris mechanikai stabilitásának növelése meg tud a kapilláris végein repedezni a hosszabb használat során, mely potenciális gócpontja lehet a keresztzennyeződések kialakulásának. Ezek tisztítása szinte lehetetlen, így gyanú, illetve látható sérülések esetén a kapillárist le kell cserélni. A glikán analízis során a tapasztalat azt mutatja, hogy a mérés reprodukálhatóságát nem befolyásolja a mérések közti kondicionálás, elegendő a mérések között az elválasztó puffer cseréje. Ebből az okból kifolyólag sem a mérések között, sem a puffer töltést megelőzően nem használtam semmiféle kapilláris kondicionálási lépést. Előfordul azonban – lásd SDS-CGE mérések –, ahol a kapilláris kondicionálásnak a tisztításon túl az üveg felületének módosítása is a célja (0,1 M nátrium hidroxidos mosás), ahol a mosási lépés nem hagyható ki.

A kutatómunkám során felhasznált 50 µm belső átmérőjű BFS kapillárisok kondicionálásra az alábbi lépéseket alkalmaztam:

- 1) Kapilláris tárolásához/első használatbavételéhez:
  - a. 5,0% SDS (vagy 50% IPA tömegspektrométerrel kapcsolt rendszer esetén) – 20 psi / 30 min / 50°C.
  - b. 0,1 M sósav – 80 psi / 10 min / 25°C
  - c. 0,1 M nátrium hidroxid – 80 psi / 10 min / 25°C
  - d. HPLC víz – 80 psi / 10 min / 25°C
  - e. Kifúvatás (üres edények) – 80 psi / 10 min / 25°C
- 2) Mérések előtt:
  - a. 0,1 M sósav – 80 psi / 10 min / 25°C
  - b. 0,1 M nátrium hidroxid – 80 psi / 10 min / 25°C
  - c. HPLC víz – 80 psi / 10 min / 25°C

Megállapítható, hogy ahogy a HPLC rendszereknél az oszlop, úgy a kapilláris elektroforézis rendszereknél a kapilláris állapota és rendszeres regenerációja kiemelkedő szerepet tölt be a megfelelő analitikai munkához.

### **3.4.2. Standardok és fehérjeminták N-glikán analízise**

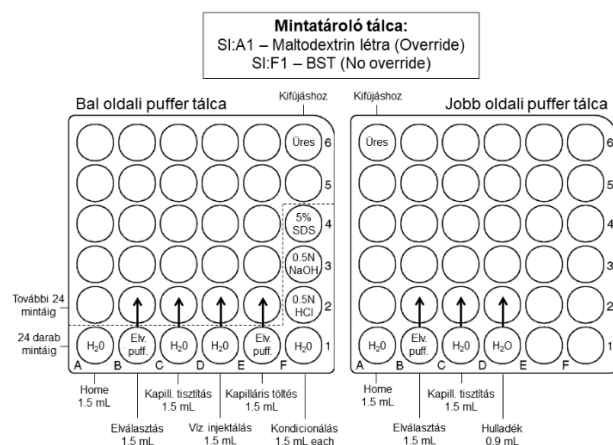
Az N-glikánok elválasztásakor HR-NCHO (glikánok elválasztására alkalmas nagy felbontású – high resolution – elválasztó közeg) gél elválasztó puffert, valamint a tömegspektrométerrel kapcsolt mérések folyamán 10 mM-os ammónium acetát (pH = 4,5) puffert alkalmaztam. A korábban említett okok miatt a glikán analitika során nem szükséges a mérések között a kapillárist kondicionálni, csupán friss pufferrel feltölteni. A méréseknél is igaz az a megállapítás, hogy a töltéshez használt nyomást a kapilláris paramétereinek, továbbá a puffer viszkozitásának megfelelően kell megválasztani. A kapilláris pufferrel való megtöltése után, valamint minden olyan lépés esetén, ahol más oldatba került át a kapilláris vége (pl. minta, vagy BST injektálása) a kapilláris végeit vízbe merítettem, hogy a keresztkontamináció lehetőségét csökkentssem. Ennem a törekvésnek megfelelően a berendezés standard

úgynevezett „Home” állapotában is a kapilláris mindkét vége vízben áll. A minta injektálás a HR-NCHO gél esetén elektrokinetikusán történt (a gél nagy viszkozitása miatt a nyomással történő injektálás kis hatékonyságú), a tömegspektrometriás méréseknél pedig nyomással. Az elektrokinetikus injektálást minden esetben megelőzte egy nyomással történő víz dugó injektálása, mely jelentősen növelte a jel nagyságot. A minta injektálását a HR-NCHO-val végzett mérések során a BST injektálása követte szintén elektrokinetikusán. Elválasztáskor a megválasztott feszültséget a megfelelő polaritásban egy rövid feszültség felfutási periódust követően adtam rá a rendszerre (ramp), ugyanis a hirtelen feszültségváltozás a kapilláris töréséhez vezethet. A mérési feszültség, hőmérséklet, valamint idő korábbi tapasztalatokra támaszkodva, az elválasztási közegnek megfelelően lett beállítva [99].

Az kapilláris elektroforézissel megvalósított N-glikán mérés lépései a következők:

- 1) Puffer töltés (90 psi / 5,0 min)
- 2) Kapilláris végek mosása
- 3) Víz injektálás (1,0 psi / 5,0 sec)
- 4) Minta injektálása (2,0 kV / 2,0 sec)
- 5) Kapilláris végek mosása
- 6) BST injektálása (2,0 kV / 2,0 sec)
- 7) Kapilláris végek mosása
- 8) Elválasztás – 30 kV / 30 sec ramp / 25°C / fordított polarizáció  
(negatív elektród a bal, azaz injektálási oldalon)
- 9) Home állás – a mérés vége

Az elválasztásnál használt pufferek és a kondicionáláshoz használt oldatok elrendezése a 3.2. ábrán látható. A reagensek elhelyezésekor szempont volt, hogy a lépések között a lehető legkevesebbet mozgassa a gép a tálcát ezzel is időt spórolva, illetve a nyilak által indukált többlet puffer elhelyezésének lehetősége, hogy nagyobb mintaszámok esetén folyamatosan tudjon a berendezés üzemelni. Fontos megjegyezni, hogy az elválasztás során az alkalmazott elválasztó pufferek koncentrációja az elektroosmotikus áramlásnak, az elektrolízisnek, valamint a polaritásnak megfelelő ionvándorlásnak köszönhetően folyamatosan változik így, ha csekély mértékben is, változnak a migrációs idők. Ennek a hatásnak a csökkentése céljából bizonyos számú minta mérés után le kell cserélni az elválasztó puffereket.



**3.2. ábra.** Az elválasztások során alkalmazott pufferek és oldatok elhelyezése

A hatékony N-glikán analízis céljából a beállított mérési módszereken kívül egyfajta napi rutin is kialakításra került. Ennek oka, hogy a berendezés bekapcsolása után nem csak a kapilláris felülete változik minimális szinten a mosási és puffer töltési lépéseket követően, hanem a berendezésen belüli hőmérséklet is, mely egyrészt hatással van az elválasztás fizikai/kémiai folyamatára, de ami az indulásnál még inkább kézzelfogható, hogy hatással van a gélen eső feszültségre, így a migrációs idők az első futtatások során szignifikánsan eltérnek. Tapasztalat szerint egy megfelelően termosztált helyiségben nagyjából 3 futtatás elegendő (15 min / futtatás), hogy a rendszeren belül beálljon a termikus egyensúly, és a migrációs idők már ne változzanak. Ezeket a méréseket jellemzően MD mintával végezzük, mely lehetőséget ad ellenőrizni a berendezés működését, valamint a rendszer egyensúlyba kerülése után egyből biztosítja a GU számoláshoz szükséges futtatást.

### **3.5. Fehérje tisztaság vizsgálata kapilláris elektroforézissel**

A fehérjék tisztaság vizsgálata SDS-CGE – méret szerinti elválasztás –, valamint kapilláris izoelektromos fókuszálás – töltésheterogenitás vizsgálat – mérésekkel valósult meg. A felhasznált módszerek szorosan követik a mindennapi gyakorlatban használt protokollokat kisebb változtatásokkal, melyeket a kutatócsoporton belül történt fejlesztések, illetve gyógyszeripari partnerektől származó előírások, tapasztalatok alapján kerültek implementálásra. A berendezéssel és méréssel kapcsolatos, az N-glikán analízis kapcsán megfogalmazott általános megállapítások, a kondicionálással kapcsolatos megfontolások stb. az SDS-CGE és cIEF mérésekre is érvényesek, így ezek nem kerülnek ismételtén kifejtésre.

#### **3.5.1. Méret szerinti elválasztás SDS-CGE módszerrel**

A fehérjék SDS-CGE módszerrel történő méret szerinti analízise során a mintát első lépésben – típustól függően redukáló, illetve nem redukáló körülmények között – felületaktív anyagok jelenlétében denaturáljuk a mintafehérjéket, majd a hagyományos gél (SDS-PAGE) elválasztásokhoz hasonlóan egy SDS tartalmú térhálós polimer gélen keresztül a kapillárisra nagy feszültséget kapcsolva azt méret szerint elválasztjuk. A módszer alkalmas a fehérjeláncok (pl, IgG eseten könnyű és nehéz lánc) vizsgálatára, a különböző szennyezőanyagok detektálására, a fehérje tisztaságának meghatározására, a glikoziláció fokának meghatározására, ezáltal a PNGase F-el történő enzimés deglikozilációs folyamat nyomon követésére.

Az SDS-CGE mérések során 10 µL mintához (max. 100 µg fehérje) 80 µL mintapuffert (100 mM Tris-HCl; pH 9,0; 1,0% SDS), 2,0 µL 10 kDa belső standardot, valamint típustól függően 5,0 µL 2-merkaptóetanolt (redukált), vagy 5,0 µL 250 mM-os jodoacetamidot (nem redukált) adtam, majd a kapott mintákat 70°C-on 15 percig inkubáltam. Az elválasztás során a 30 cm (20 cm effektív) hosszúságú üveg kapillárist alkalmaztam. Az elválasztás az SDS-CGE gél elválasztó pufferben végeztem, a mérés során 30 kV feszültséget alkalmaztam 25°C-on. Az előkészített mintát 5,0 kV / 20 sec injektálási paraméterek alkalmazása mellett juttattam a kapillárisba. A mérések között a kapilláris falának minősége biztosítása, valamint az esetleges fehérje szennyeződések eltávolítása céljából 0,1 M nátrium hidroxiddal kondicionáltam. A detektálás hullámhossza  $220 \pm 10$  nm volt.

### 3.5.2. Töltésheterogenitás vizsgálata cIEF módszerrel

Kapilláris izoelektromos fókuszálás (cIEF) segítségével meghatározható a fehérje minták töltésheterogenitása, azaz a különböző töltésvariánsok aránya a fő fehérjéhez (termékhez) képest. A folyamat során egy pH gradienst alakítunk ki a kapillárisban, melyre feszültséget adva a fehérje komponensei a pK értékeiknek megfelelően elfoglalják azon régiókat a kapillárison belül, ahol nem rendelkeznek töltéssel – fókuszálás. Az egyensúly beállítását követően vagy nyomással, vagy egy másik pufferrendszer alkalmazásával elektromos feszültség rákapcsolásával a szétvált mintát mobilizáljuk és detektáljuk. A mérés alkalmas a fehérje tisztaságának, azon belül is a különböző töltésvariánsok mennyiségének és arányának meghatározására a célfehérje mennyiségéhez viszonyítva.

A cIEF mérések során 2,0  $\mu\text{L}$  10 mg/mL-es fehérje mintát egy úgynevezett Master Mix-hez kevertem, mely a mérés hivatalos leírása szerinti mennyiségekben tartalmazott cIEF elválasztó gél puffert (200  $\mu\text{L}$ ), Phymalyte 3-10-et (12  $\mu\text{L}$ ), L-arginint (20  $\mu\text{L}$  – 500 mM), iminodiacetsavat (2,0  $\mu\text{L}$  – 200 mM), valamint a pH 7-es és pH 10-es markereket (1,0 – 1,0  $\mu\text{L}$ ). A kutatócsoportban végzett kísérletek alapján a hivatalos protokollban javasolt „Neutral” bevonattal ellátott kapilláris helyett 30 cm (20 cm effektív) hosszúságú, 50  $\mu\text{m}$  belső átmérőjű NCHO kapillárist alkalmaztunk, az elválasztás hőmérsékletét 20°C-ra csökkentettük, a mintatárolás hőmérsékletét pedig 10°C-on állapítottuk meg, mely változtatásokkal szignifikánsan növeltük a mérés reprodukálhatóságát. További változtatás, hogy a kapillárist a mérések között 3 M karbamid helyett 6 M karbamiddal kondicionáltuk, mely szintén növelte a mérés megbízhatóságát. Az analízis első részében a fehérjemintát tartalmazó Master mix reagenssel teljesen feltöltöttük a kapillárist, majd a fókuszálási lépés folyamán a kapilláris egyik végét 300 mM-os nátrium hidroxidba, a másik végét 200 mM-os foszforsavba merítettük, majd 25 kV-on 15 percig fókuszáljuk a mintát. Ezt követően a nátrium hidroxidot 350 mM-os ecetsavra cserélve 30 kV feszültséget alkalmazva 45 perc alatt az elvált komponenseket mobilizáltuk és 220  $\pm$  10 nm hullámhosszon UV-ben detektáljuk.

### 3.6. Tömegspektrométer – kapilláris elektroforézis kapcsolás

A kapilláris elektroforézis tömegspektrometriával való kapcsolására OptiMS rendszert használtam. A kialakított kapilláris rendszer egy cső a csőben megoldás, ahol a két kapilláris közti elektromos vezetést a belső kapilláris megmaratásával érik el – a töltések képesek átugrani az elvékonyított üveg falon anélkül, hogy anyagbéli keveredés lenne a két kapilláris között. A rendszer az úgynevezett „nano flow” tartományban működik, ahol az áramlási sebesség rendkívül kicsi, kb. 10 – 20 nL/min körüli a felhasznált puffer által generált elektroosmotikus áramlás függvényében. A megoldás a „sheathless” kapcsolási módszerek közé tartozik, ahol a mintát tartalmazó ág áramlásán keresztül a tömegspektrométerbe bevitt folyadékáramon kívül nincs egyéb segéd folyadékáram. Az mérések során 10 mM ammónium acetát puffert alkalmaztam (pH = 4,5). Az elválasztáshoz 30 kV feszültséget használtam 25°C-on. A megfelelő vezetés biztosítása céljából a mintát nem tartalmazó ágon (conductive line) 5,0 psi nyomás ráadásával folyamatosan áramoltattam az elválasztó puffert.

A tömeganalízishez 6500+ típusú triple quad tömegspektrometriás mérőrendszert alkalmaztam. Az orifisz hőmérséklete 80°C volt, az ESI ionforrás feszültségét pedig a mérendő minta függvényében negatív ionizációs módban -1 400 V és -1 600 V között változtattam. A mérés során „multiple reaction monitoring” (MRM) módszerrel detektáltam a glikánokat úgy, hogy az átmenet mindkét detektált

tömegére a kétszeresen töltött, APTS fluoreszcens festékkel jelölt glikánok tömegét adtam meg 15 msec analízis idővel abból a célból, hogy az alapvonal zaj mértékét a lehető legkisebbre csökkentsem, és biztosítsam a nehezen ionizálódó glikán struktúrák detektálhatóságát. A mérésnél megcélzott glikán struktúrákat, valamint az MRM analízishez felhasznált tömeg értékeket a melléklet M.1. táblázatában találhatók.

### **3.7. Exoglikozidáz enzimes szekvenálás**

A PNGase F enzimmel előkészített és APTS jelölt N-glikánok pontos szerkezeti meghatározása céljából a kutatómunkám során három exoglikozidáz enzimet használtam, melyek a szialidáz A [ $\alpha(2\rightarrow3,6,8,9)R$ ], a  $\beta$ -galaktozidáz [ $\beta(1\rightarrow3,4,6)R$ ], valamint a  $\beta$ -N-acetil-hexóزامinidáz [ $\beta(1\rightarrow2,3,4,6)R$ ] voltak. A kutatómunkám során a gyártók által javasolt 37°C / 1 h reakció paramétereket módosítottam abból a célból, hogy a lehető legrövidebb idő alatt meg lehessen valósítani az N-glikánok minőségi analíziséhez szükséges enzimes szekvenálást a hozzá tartozó analízissel együtt. Az enzimeket vizsgáltam külön-külön, valamint előre összekeverve is az optimális reakcióparamétereket tekintve. A folyamat automatizálásának céljából a kapilláris elektroforézis berendezés mintatároló kompartmentjét inkubátorként 40°C-on, illetve 60°C-on használtam, továbbá az elválasztó kapillárist a megfelelő nyomás ráadásával (köbözéssel meghatározva) enzimbeviteli eszközként. Az enzimes reakciók pontos leírását és az alkalmazott reakcióparamétereket az eredmények 4.4. fejezetében mutatom be.

## 4. Vizsgálati eredmények és kiértékelésük

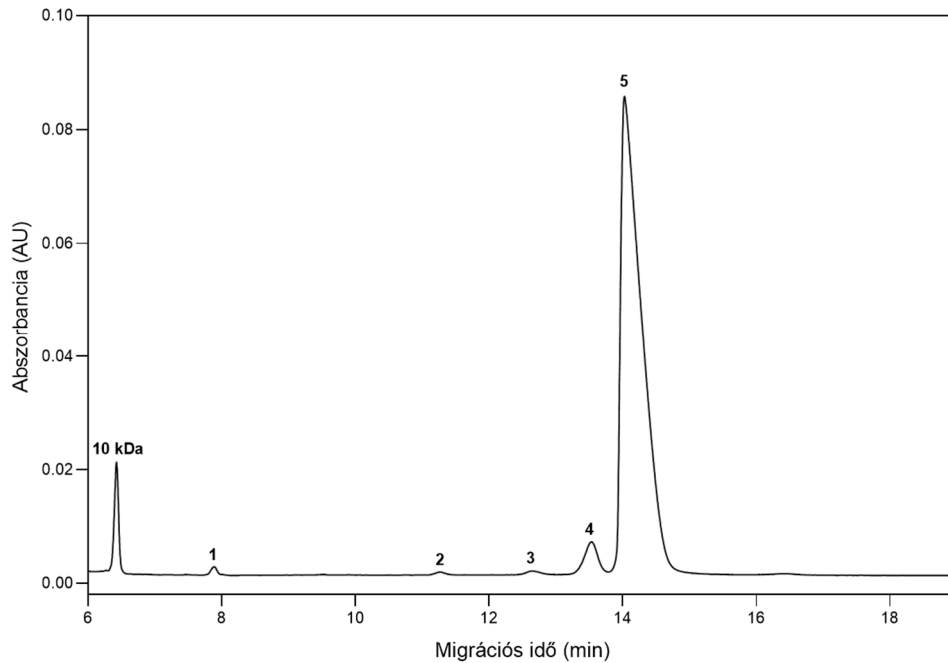
A kutatómunkám során végzett számtalan mérés és a disszertációban bemutatott eredmények célja egy megfelelő keretrendszer kialakítása volt a hatékony kapilláris elektroforézissel történő fehérje karakterizálásának céljából. A mérések során felhasznált fehérjék vagy fizikai-kémiai tulajdonságaik kapcsán, vagy az elvégezni kívánt mérés által támasztott feltételekkel szemben vagy elsöre nem látható (lásd: 4.1. fejezet), vagy épp ellenkezőleg, szemmel igencsak látható (lásd: 4.2. fejezet) módon gördítettek akadályt az analízis útjába. Ennek megfelelően az eredményeken belül bemutatott négy fejezet az alábbi négy kulcskérdésre próbál választ találni, úgy mint 1) van-e gátló tényező, ami a standard módszereket akadályozza – sztérikus gátlás, 2) mik a határai a mintaelőkészítési módszernek – precipitáció és MS applikáció, 3) mennyire megbízható a kidolgozott mintaelőkészítési módszer – módszer validáció és 4) automatizálható / felgyorsítható az identifikációs folyamat – exoglikozidáz emésztés? A kutatómunkám célja a mintaelőkészítési lépések megértése és optimalizációja volt, melyet a 3. fejezetben részletesen tárgyalok, így az eredmények kapcsán tett tömör megállapításaim ennek részeként és reprezentációjaként értendőek és értékelendőek. A kapilláris elektroforézis technikával kutatómunka szépsége és kihívása, hogy a mintaelőkészítés lépései egymásra épülve, egymásra komoly hatást gyakorolva fejtik ki a mindenkori eredményre a hatásukat, és a legtöbb esetben nincs lehetőség köztes ellenőrzési pontokat elhelyezve a folyamatot megállítva ellenőrizni az aktuális lépéseket, vagy annak módosításának hatását, így a legvégén kapott eredményből kell visszafejteni és értelmezni a látottakat.

A kutatómunkám során vizsgált ipari gyógyszer fehérjék, valamint humán szérum fehérjék karakterizálását végeztem el kapilláris elektroforézis technikával. A kapott eredmények bemutatják az alkalmazott fehérjék egyedi tulajdonságain keresztül a mintaelőkészítési, valamint az az alkalmazott analitikai módszer előnyeit és hátrányait, és a felmerült problémákra, kérdésekre igyekszem hatékony, robosztus megoldásokat bemutatni.

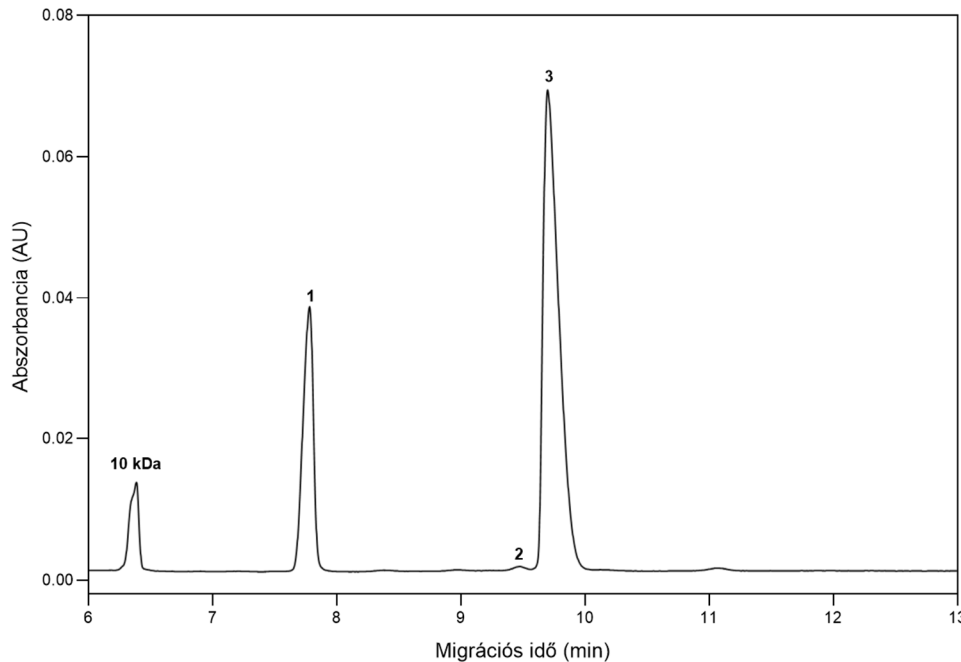
### 4.1. Terápiás gyógyszerfehérjék N-glikán analízise

#### 4.1.1. Kapilláris elektroforézis alapú fehérje analízis

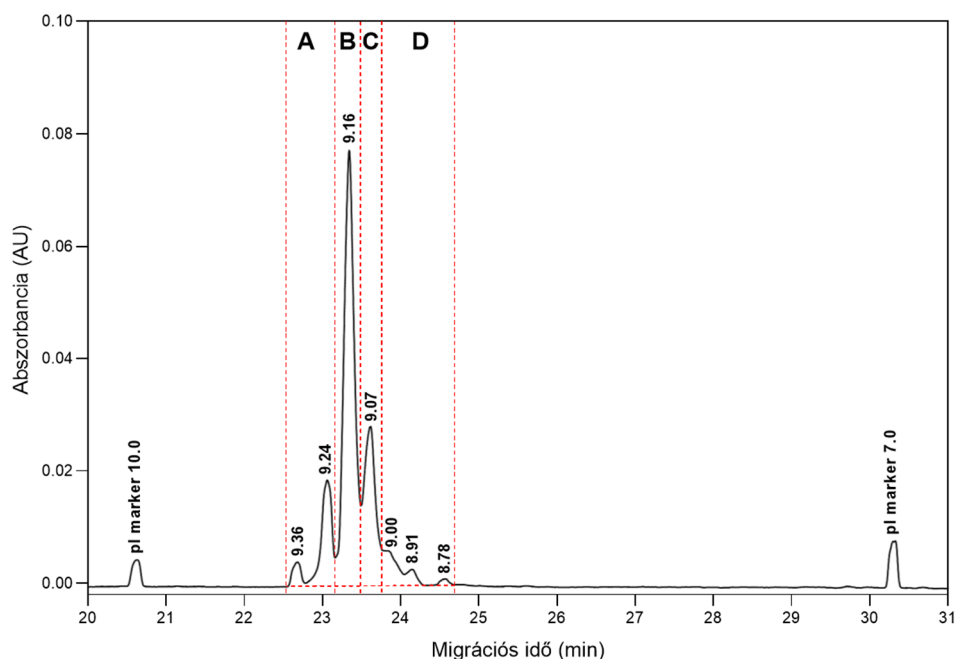
A Roche GmbH által biztosított, egy fejlesztési fázisban lévő új típusú monoklonális antitest – gliko-módosított (glycoengineered, geAb) fehérje több szintű, kapilláris elektroforézissel megvalósított analitikáját végeztem el először: intakt formában (SDS-CGE kapilláris gélelektroforézissel, valamint kapilláris izoelektromos fókuszálással – cIEF), redukált fehérjeszinten (SDS-CGE), valamint a felszabadított N-glikánok szintjén. A fehérje mintaelőkészítését a 3.5.1. (SDS-CGE) és a 3.5.2. (cIEF) fejezetek alapján végeztem el. A glikánok PNGase F enzimmel történő specifikus eltávolítását a 3.3. fejezetben bemutatott módszer alkalmazásával hajtottam végre, mely esetben a ráépülő SDS-CGE mintaelőkészítésnél 80  $\mu$ L mintapuffer helyett csak 60  $\mu$ L adtam, hogy a végtérfoogat és végkoncentrációk megegyezzenek a mérések folyamán. Az alkalmazott változtatás nem okozott különbséget az eredményekben, és a változtatás hatása megfelelő alaposággal lett körüljárva. A felhasznált geAb fehérje SDS-CGE analízisének eredménye nem redukált és redukált formában a 4.1 és 4.2. ábrán látható, valamint a cIEF módszerrel végzett töltésheterogenitás vizsgálatának eredményét a 4.3. ábrán mutatom be.



**4.1. ábra.** Nem redukált geAb fehérje kapillaris SDS-CGE analízise. Csúcsok: 10 kDa belső standard, 1: könnyű lánc (LC), 2: nehéz lánc (HC), 3: nehéz-nehéz lánc (HH), nehéz-nehéz-könnyű lánc (HHL), 5: intakt fehérje (geAb). Az elválasztás körülményei: 30 cm (20 cm effektív) hosszúságú, 50  $\mu$ m belső átmérőjű üveg kapillaris, SDS-CGE gél puffer rendszer, 500 V/cm elektromos télerősség, 25°C elválasztási hőmérséklet, 214 nm UV detektálás. Injektálás: 5,0 kV / 10 sec.



**4.2. ábra.** Redukált geAb fehérje kapillaris SDS-CGE analízise. Csúcsok: 10 kDa belső standard, 1: könnyű lánc (LC), 2: nem glikozilált nehéz lánc (ngHC), 3: nehéz lánc (HC). Az elválasztás körülményei azonosak voltak a 4.1 ábrán bemutatottakkal.

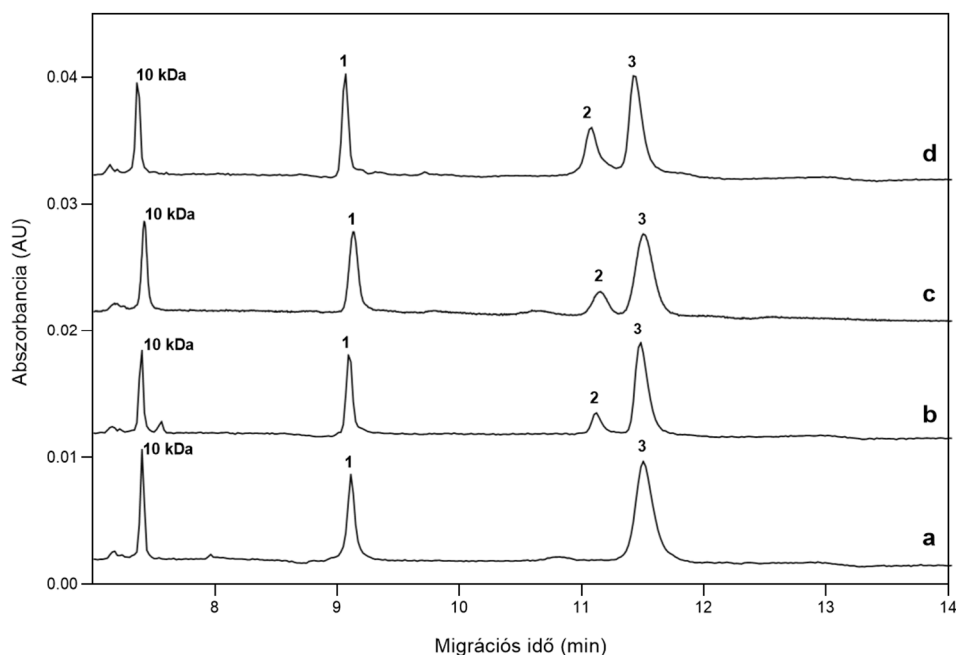


**4.3. ábra.** A geAb fehérje minta töltésheterogenitásának vizsgálata cIEF módszerrel. Az ábrán megjelölt szekciók a következők: A – bázikus izoforma, B – fő csúcs, C – savas izoforma első csoport, D – savas izoforma második csoport. Az elválasztás körülményei: 30 cm (20 cm effektív) hosszúságú, 50  $\mu\text{m}$  belső átmérőjű NCHO bevonattal ellátott kapilláris, a fókuszálásnál alkalmazott térerősség: 833 V/cm, a mobilizálásnál alkalmazott térerősség: 1 000 V/cm. Injektálás (kapilláris feltöltése): 25 psi / 100 sec.

A 4.1. ábrán látható kromatogrammon több, bomlással összefüggő kisebb csúcs (1–4. csúcs) jelent meg az intakt antitest (5. csúcs) előtt, amelyek feltehetően rendre a könnyű lánc (LC), a nehéz-könnyű lánc (HL), a nehéz-nehez lánc (HH), illetve a nehéz-nehez-könnyű lánc (HHL) formáknak felelnek meg. A 4.2. ábrán ugyan ezen fehérje SDS-CGE analízisének eredménye látható redukált formában, hogy a könnyű- és nehézlánc alegységek elválaszthatóvá váljanak. Fontos megjegyezni, hogy ez a kezelés szétbontotta a korábban megfigyelt HL, HH és HHL formákat, továbbá a könnyű lánc (1. csúcs) mellett egy kisebb csúcs (2. csúcs) is megjelent a nehéz lánc (3. csúcs) előtt, amely feltehetően annak nem glikozilált formájának felel meg. A 4.3. ábrán látható cIEF analízis során a vizsgált fehérje komponenseinek effektív (főcsúcs) arányát a főcsúcs területének és az elektroferogrammon mért teljes csúcsterület hányadosaként határoztuk meg. A fő csúcs pI értéke 9,16 volt, a pI tartomány 0,10, a fő csúcs terület aránya a teljes integrált területhez viszonyítva 54,32% (B), a bázikus izoformák területaránya 15,36% (A), a két savas izoforma régió területaránya pedig 22,59% (C) és 7,73% (D) volt. Mivel az előzetes glikozilációs vizsgálat nem mutatott ki számottevő szializáltságot, első közelítésként feltételezhető, hogy a megfigyelt töltésheterogenitás nem a kapcsolt oligoszacharidokból ered, így valószínűsíthető, hogy az olyan degradációs hotspot-ok, mint a glutaminsav ciklizáció, metionin oxidáció, aszparagin deamidáció, C-terminális lizin heterogenitás stb. idézték elő a kisebb, de többféle savas és bázikus variáns kialakulását.

Az SDS-CGE méréseket oly módon egészítettem ki, hogy PNGase F enzim alkalmazásával eltávolítottam az N-glikánokat a fehérjéről. Az enzimátikus emésztést 37°C-on végeztem különböző

reakcióidők mellett (1,0 h, 24 h és 48 h keresztül). A kapott elektroferogrammok a 4.3. ábrán láthatóak a PNGase F kezelést megelőző, valamint a három különböző időtartamig emésztett minták esetén.



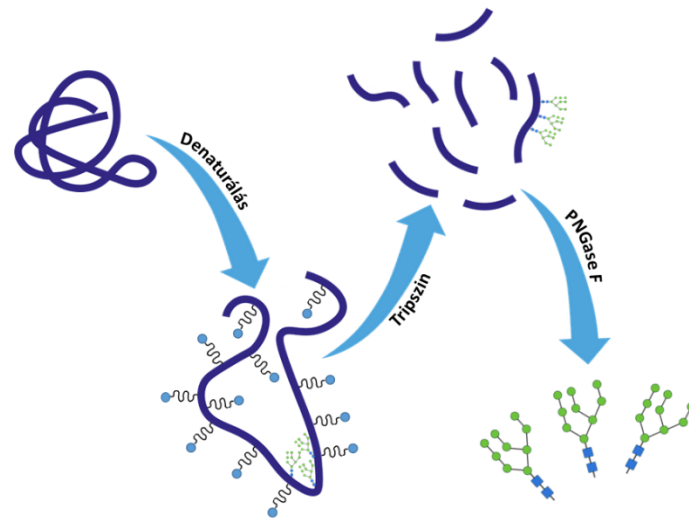
**4.4. ábra.** A geAb fehérje minta PNGase F emésztésének nyomokövetése kapilláris SDS-CGE módszerrel, ahol (a) – kiindulási minta; a további három elektroferogramm pedig PNGase F emésztés eredményét mutatja be 37°C-on (b) 1,0 h, (c) 24 h és (d) 48 h keresztül. Az elválasztás körülményei azonosak voltak a 4.1. ábrán bemutatottakkal.

A 4.4. ábrán jól látható, hogy a glikozilált nehézlánchoz tartozó csúcs (3. csúcs) 48 órát követően is jelentős területarányban jelen van az elektroferogrammon, mely jól mutatja, hogy a PNGase F enzimmel végzett deglikozilációs reakció nem ment végbe teljesen, a folyamat gátolt volt.

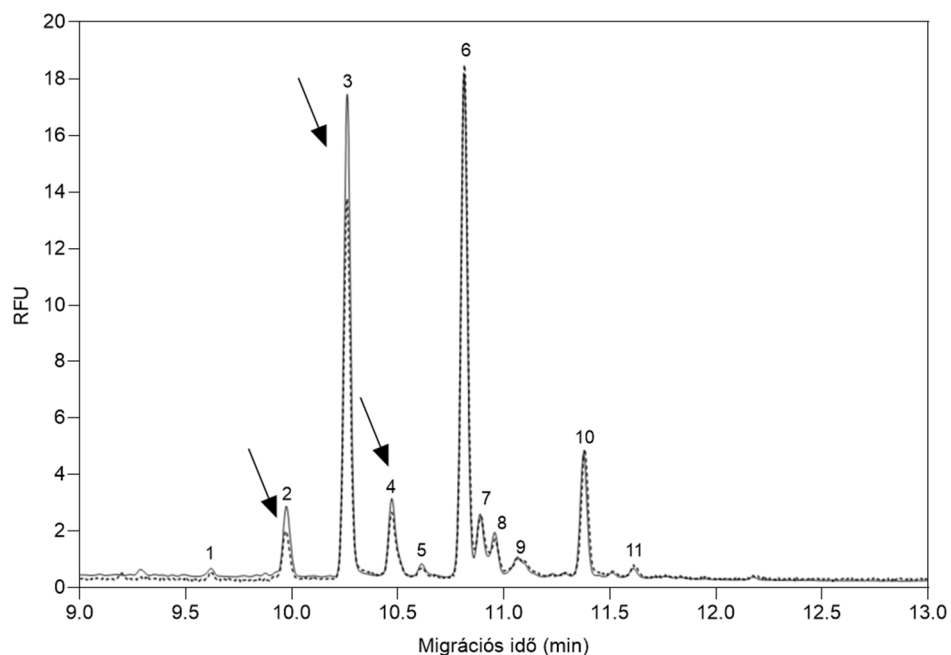
#### 4.1.2. Sztérikus gátlás és tripszines előemésztés

A 4.4. ábrán bemutatott SDS-CGE mérések PNGase F enzimmel kiegészített mérései jól reprezentálják, hogy az enzimátikus folyamat jelentősen gátolt. A fehérje gyógyszeripari jellege végett nem rendelkezünk pontos információkkal, de arról tájékoztattak, hogy a fehérje szerkezete komplex, amely arra engedett következtetni, hogy az enzimátikus reakció sztérikus gátlás miatt nem megy végbe teljesen. A gátló hatás megszüntetése érdekében egy tripszin enzimet alkalmazó előemésztési protokollt dolgoztam ki, melynek a sematikus folyamat a 4.5. ábrán látható. A tripszinnel kiegészített mintaelőkészítés célja, hogy a fehérje harmadlagos és negyedleges szerkezete miatt a PNGase F enzim által nem hozzáférhető részeket elérhetővé tegye úgy, hogy annak hővel történő inaktiválását követően teljes mértékben végbe tudjon menni a deglikozilációs emésztés. Az előkísérletek során hIgG1 mintával végeztem a méréseket, mely eredmények kapcsán meggyőződtem arról, hogy sem a fehérje analízis szintjén, sem a glikán analízis szintjén nem okoz változást a csúcsokban és azok százalékos eloszlásában a tripszines kezelés. A tripszines előemésztési folyamatot 37°C-on végeztem 8,0  $\mu$ L tripszin hozzáadásával (10 U – 1,0  $\mu$ g 10 mM sósavban), mely után az emésztő fehérjét 80°C-on 10 percen keresztül inaktiváltam, majd a korábbi mérések során alkalmazott protokollnak megfelelően folytattam a glikán szintű mintaelőkészítést. A konvencionális módszerrel, valamint a tripszines előemésztést

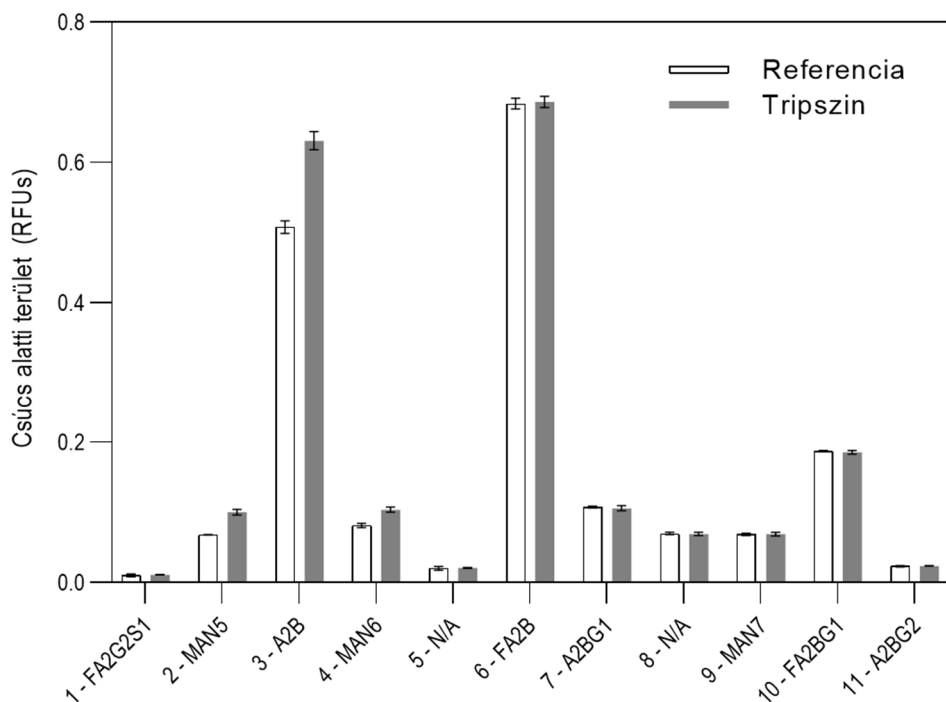
alkalmazó mintaelőkészítéssel előkészített geAb fehérje glikán analízise során felvett elektroferogrammok a 4.6. ábrán látható, az azonosított glikán szerkezetekhez tartozó csúcsok területei a két előkészítési módszer esetén a 4.7. ábrán láthatóak.



**4.5. ábra.** A tripszines előemésztés jelentősége a sztirikus gátlás megszüntetése céljából a PNGase F enzimmel történő N-glikán lehasítást megelőzően.



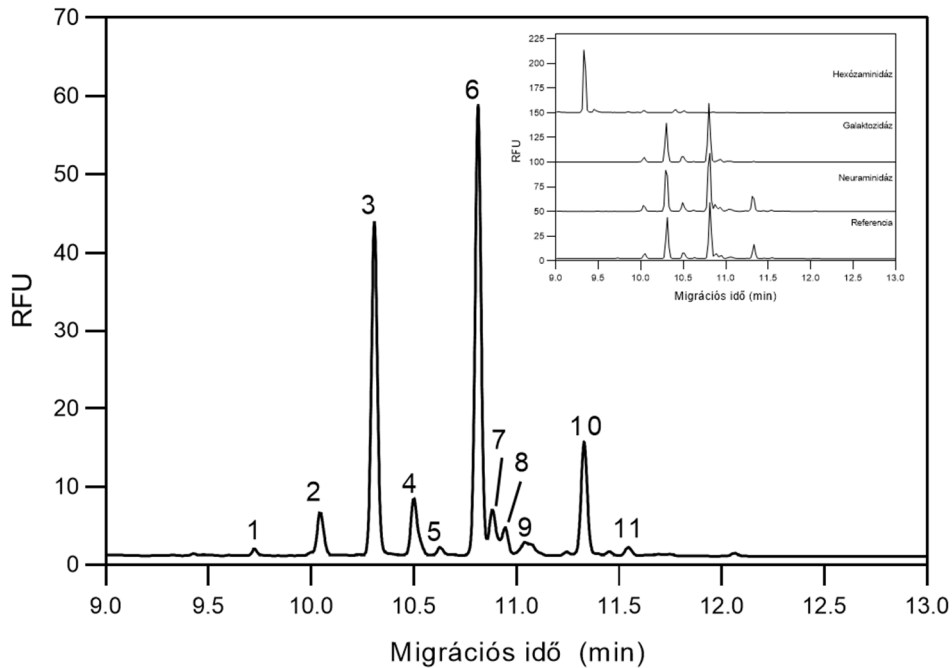
**4.6. ábra.** A geAb fehérje minta PNGase F enzimmel felszabadított N-glikánjai a konvencionális módszerrel előkészítve (szaggatott vonal), valamint tripszines előemésztés alkalmazása mellett (folytonos vonal). Az elválasztás körülményei: 50 cm (40 cm effektív) hosszúságú, 50 µm belső átmérőjű üveg kapilláris, HR-NCHO gél puffer rendszer, 600 v/cm alkalmazott térerősség, 25°C elválasztási hőmérséklet, LIF detektálás (488 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhossz). Injektálás: 1,0 psi / 5,0 sec víz → 2,0 kV / 2,0 sec minta.



**4.7. ábra.** A 4.6. ábrán bemutatott geAb fehérje minta N-glikánjainak csúcsterület megoszlása a tripszinnel előemésztett mintaelőkészítés esetén (teli oszlop), valamint a konvencionális módszerrel előkészített minta esetén (üres oszlop).

A 4.6. és 4.7. ábrákon jól látható, hogy a tripszines előkészítési módszer lehetővé tette, hogy a PNGase F enzim megfelelően hozzá férjen a geAb fehérje azon részeihez, melytől megelőzően nem volt megfelelően hozzáférhető, mely nem csak teljes és gyors deglikozilációt eredményezett, mely a csúcsnagyságokban volt megfigyelhető, hanem csúcсарány eltolódást is tapasztaltam a MAN5, A2B, MAN struktúrákban, mely jól mutatja, hogy az ezen struktúrák körüli fehérje szerkezet nehezen tette lehetővé a PNGase F enzim hozzáférhetőségét. Fontos ismét megjegyezni, hogy azon fehérjék esetén, ahol nincs szterikus gátlás (pl. az említett hlgG1, melyet az előkísérletek során alkalmaztam standard fehérjékén a folyamat ellenőrzéséhez), ott a tripszines előemésztéssel kiegészített mintaelőkészítési folyamat nem okoz változást sem fehérje, sem glikán szinten, így alkalmazása felesleges. A tripszines előemésztéssel kiegészített mintaelőkészítési módszer alkalmazásával előkészített geAb fehérje glikán analízisének eredménye a 4.8. ábrán látható a hozzá kapcsolódó exoglikozidáz emésztésekkel (belső ábra betét). Az azonosított struktúrák a kapcsolódó migrációs idő, GU egység és terület százalékos megoszlással a 4.1. táblázatban láthatóak.

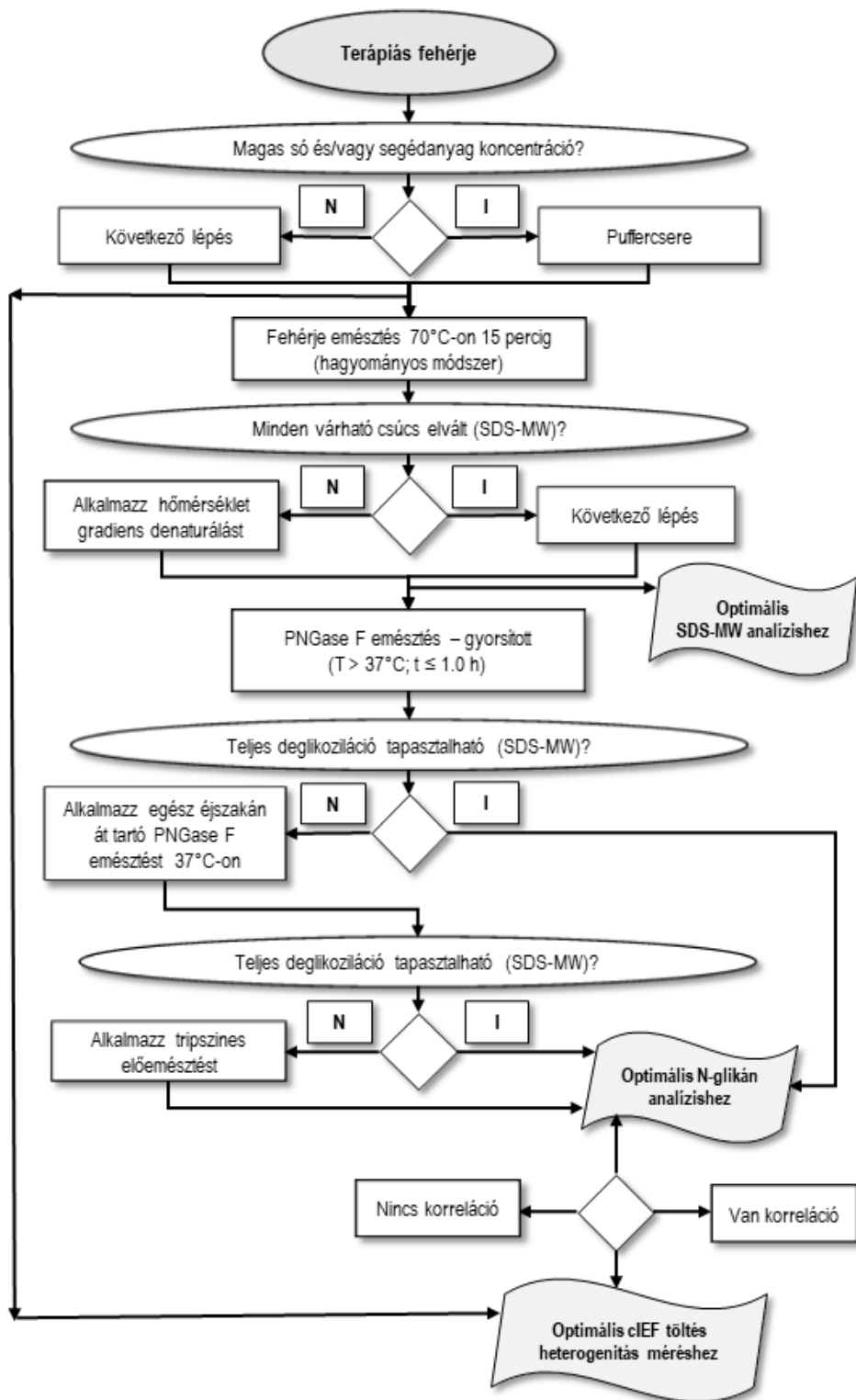
A geAb fehérje kapilláris elektroforézis technikával végzett több szintű karakterizálása, első sorban a PNGase F enzimmel kapcsolatos szterikus gátolt deglikozilációs folyamat kapcsán rávilágított arra, hogy az egymásra épülő, és egymást kiegészítő analitikai módszerek együttes alkalmazása között egy megfelelő sorrendiség és feltételrendszer szükséges kialakítani, mely alkalmazásával hatékonyan és megbízhatóan tudjuk elvégezni a karakterizálás folyamatát. A 4.9. ábrán látható az a folyamatábra, melynek követésével, az elágazási pontok helyes megválasztásával és megválaszolásával egy hatékony, megbízható, és gyors fehérje karakterizálási folyamat érhető el. Az ábrán látható hőmérséklet gradienssel történő denaturálási módszer jelentőségéről és alkalmazásának okairól a 4.2. fejezetben térek ki részletesen.



**4.8. ábra.** A geAb fehérje minta N-glikán struktúráinak exoglikozidáz szekvenálással való meghatározása. Az ábrabetétben az exoglikozidáz (neuraminidáz, galaktosidáz, hexózaminidáz) enzimés emésztést követő futtatások eredményei láthatóak. Az elválasztás körülményei azonosak voltak a 4.6. ábrán bemutatottakkal. Az azonosított N-glikán struktúrák a 4.1. táblázatban kerültek bemutatásra.

**4.1. táblázat.** A geAb fehérje mintában exoglikozidáz szekvenálással meghatározott N-glikán struktúrái (NEU: neuraminidáz, GAL: galaktosidáz, HEX: hexózaminidáz)

Csúcs	Idő (min)	GU	Terület %	Exoglikozidáz enzimre adott válasz				Struktúra
				NEU	GAL	HEX	N/A	
1	9,72	6,61	0,43	x				FA2G2S1
2	10,04	7,20	4,01				x	MAN5
3	10,31	7,70	29,53			x		A2B
4	10,50	8,07	5,65				x	MAN6
5	10,63	8,31	0,52				x	N/A
6	10,81	8,67	40,09			x		FA2B
7	10,88	8,80	4,64		x			A2BG1
8	10,95	8,92	2,32			x		N/A
9	11,04	9,11	1,99				x	MAN7
10	11,33	9,65	10,19		x			FA2BG1
11	11,55	10,06	0,64		x			A2BG2



4.9. ábra. Folyamatábra a kapilláris elektroforézissel történő fehérje analitikához

A 4.9. ábrán jól látható az az egymásra épülő folyamat, mellyel a geAb fehérje analízise kapcsán felmerült sztérikus gátlással kapcsolatos kérdéseket hatékonyan meg lehet válaszolni. A kiindulási terápiás fehérje minta tároló pufferének sótartalma, mint az ábrán is látható, a teljes mérési folyamat megelőző nulladik lépésnél az általam végzett megannyi terápiás fehérje analízis során egyszer merült fel, mely teljesen ellehetetlenítette a mérést, melyről utólag kiderült, hogy a pufferben található nagy

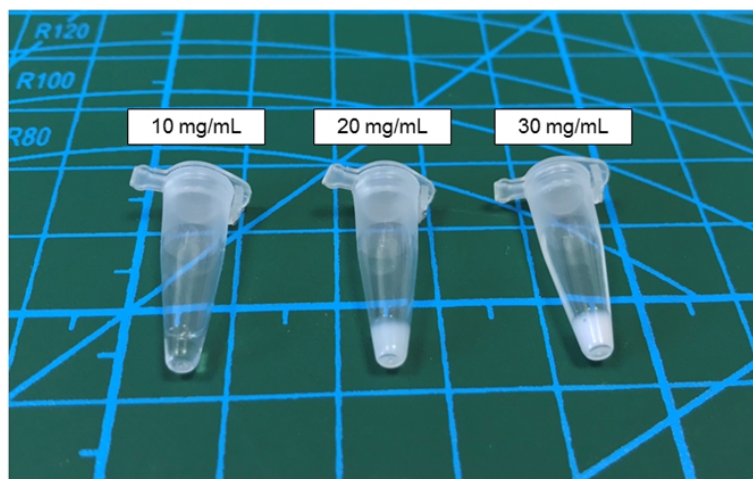
mennyiségű egyszerű cukor okozta a problémát a PNGase F emésztés során. Ezen okok feltárása azonban egy egészen más területről és céllal indult, mely végül magyarázatot adott a rossz enzimatikus hatásokra.

## **4.2. Mintaelőkészítés optimalizációja CE-MS analízishez**

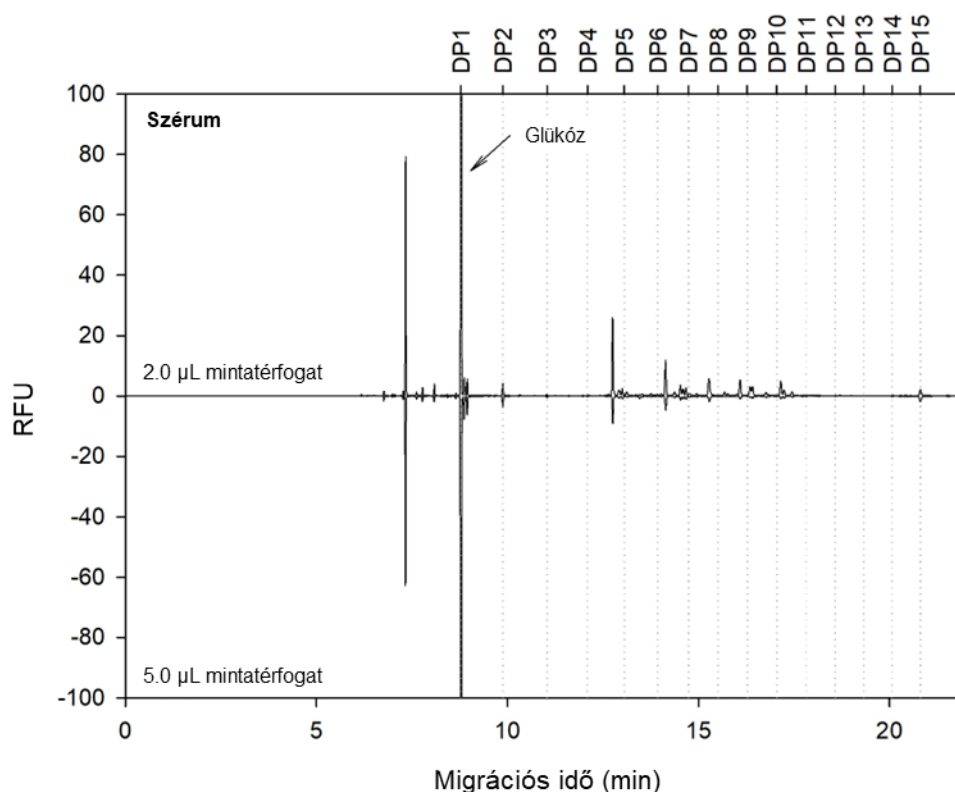
### **4.2.1. Fehérje precipitáció és inhibíciós hatások**

A kutatómunkám során a terápiás fehérjék vizsgálata mellett nagy hangsúlyt kapott a humán szérumban glikánok analízise abból a célból, hogy a különböző megbetegedések kapcsán – úgy, mint daganatos elváltozások, cukorbetegség – a vérszérumban található glikozilált fehérjéken található glikán struktúrák mind szerkezetileg, mind mennyiségükben (eloszlás, eltolódás) megváltoznak, és összefüggés található a betegségek, azon stádiuma stb. és a változás között, így a glikánok, mint potenciális biomarkerek jelenhetnek meg a orvostudományban a diagnózisok felállítása során. A humán szérumban minták analízisét a glikánok szintjén a PhD disszertáció keretein belül azt pusztán analitikai szempontból vizsgálva már a minta jellegéből adódóan is hamar felvetette a tömegspektrometriás analízis szükségességét, a CE-MS mérési technikát és annak kapcsolását a 3.6. fejezetben leírtak alapján tényszerűen kezelem, nem térek ki a mérés technika és a beállítások sajátosságaira és részleteire. A szérumban minták PNGase F enzimmel leemésztett N-glikán struktúráinak CE-MS technikával történő analízise a tömegspektrometria specifikus korlátok (pl. megfelelő pufferhasználat, detergens elkerülése stb.) mellett az alábbi problémákat vetette fel.

A glikánok tömegspektrométerben történő detektálása negatív ionizációs módban lehetséges a megfelelő detektálhatóság szempontjából, továbbá az alkalmazott pufferrendszer esetén a két nagy feszültségű egyenáramú rendszer kapcsolásakor ezen polaritás mellett működik a kapilláris elektroforézissel történő elválasztás és a kapcsolt tömegspektrometriás detektálás szimultán. Ennek ellenére a negatív ionizációs mód önmagában nagyságrendekkel marad el érzékenységekben a pozitív ionizációs módtól, így a mintakonzentráció jelentős növelésére volt szükség, hogy az alapvetően rosszul ionizálódó, és kis koncentrációban jelen lévő struktúrák is detektálhatóak legyenek. A fehérje mennyiség növelésének lehetőségeit mind hIgG1, mind szérumban mintával párhuzamosan vizsgáltam, utóbbi minden esetben, mint egy jól kontrollálható, pontosan ismert standard szerepelt a kísérletsorozatban. Már az első próbálkozás esetén látszott, hogy a fehérjekonzentráció növelése igen hamar precipitációs gondokat okoz a minta előkészítés első, denaturációs lépésekor. A 4.10. ábrán jól látható hIgG1 fehérje mintával reprezentálva, hogy ha az általánosságban alkalmazott 10 mg/mL alkalmazott fehérje koncentráció duplára növelésekor már jelenetős precipitáció tapasztalható, a háromszoros mennyiségnél pedig szinte teljesen „becsirizesedik” a minta a denaturálási lépés folyamán. A precipitálódáshoz tartozó mintakonzentráció fehérjénként eltérő, de a munkám során vizsgált fehérjék mindegyikéről elmondható, hogy az optimális CE-MS mérések elvégzéséhez szükséges koncentráció alatt minden esetben precipitálódtak a fehérjék. A szérumban minták esetén is hasonlóak voltak a tapasztalatok, azonban ez a negatív hatás kiegészült azzal, hogy azon koncentráció tartományon belül, ahol még nem tapasztaltam precipitációt is a minta mennyiségének növelésével csökkent a kapott jel nagysága. A 4.11. ábrán jól látható ez a hatás, hogy ahogy 2,0 µL szérumban mennyiségről megnöveltem a minta mennyiségét 5,0 µL-re, a kapott jel nagyság szignifikánsan csökkent.



**4.10. ábra.** A hIgG1 fehérje minta precipitációja a denaturálási lépés közben különböző kiindulási koncentrációk mellett

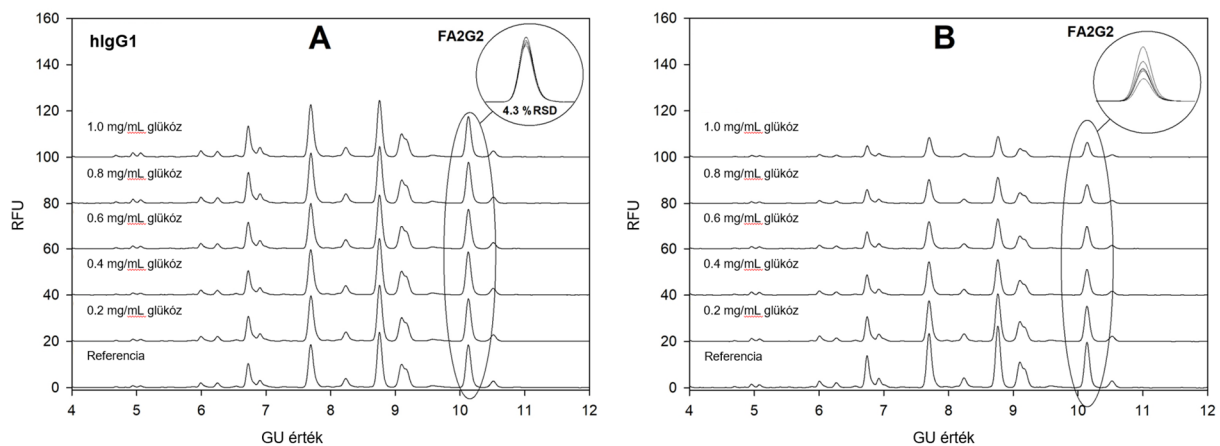


**4.11. ábra.** A humán szérum minta N-glikánjainak elválasztása 2,0 µL (felső elektroferogram), valamint 5,0 µL (alsó elektroferogram) kiindulási mintamennyiség alkalmazása mellett. A DP számok a referenciaként futtatott létra csúcsmaximumait jelzik. Az elválasztás körülményei: 60 cm (50 cm effektív) hosszúságú, 50 µm belső átmérőjű üveg kapilláris, HR-NCHO gél puffer rendszer, 30 kV alkalmazott elválasztási feszültség, 30°C elválasztási hőmérséklet. Injektálás: 5,0 psi / 5,0 sec víz → 6,0 kV / 3,0 sec minta → 1,0 kV / 1,0 kV BST.

A fehérje koncentráció növelésére tett próbálkozás esetén az előzetes eredmények jól mutatták, hogy a precipitáció, valamint a szérum esetén egy további hatás okoz komoly problémákat. A precipitáció hatásának csökkentésére először abból indultam ki, hogy denaturálási lépésnél alkalmazott különböző detergensok bomlási hőmérséklete jóval alacsonyabb, mint az irodalmilag és az általam is alkalmazott

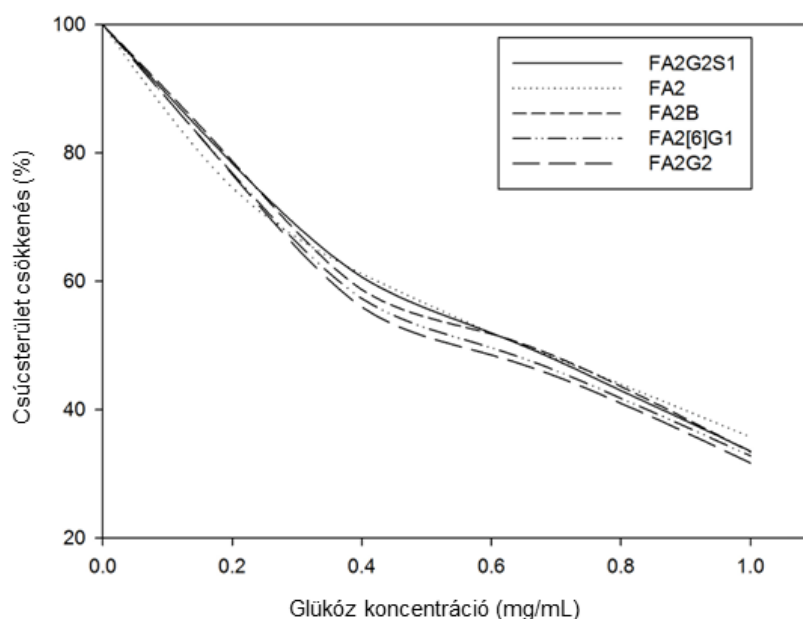
denaturálási hőmérséklet. A DTT pl. egy olyan általam is alkalmazott reagens a mintaelőkészítés során, amit minden nap frissen kell készíteni, vagy  $-20^{\circ}\text{C}$  kell tárolni korlátozott ideig, mert  $30^{\circ}\text{C}$ -on már komoly bomlásnak indul, a denaturáláskor pedig egyből  $80^{\circ}\text{C}$ -ra kerülnek a minták. A felvetés az volt, hogy ha folyamatosan, egy hőmérséklet gradiens mentén kerülnek felfűtésre a fehérje minták a hozzáadott denaturáló detergensekkel, akkor van ideje megfelelően kifejteni a hatásukat a detergenseknek, és csökkenthető a precipitáció mértéke. Az elvégzett kísérletek azt mutatták, hogy  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  felfűtési sebességet alkalmazva ( $30^{\circ}\text{C} \rightarrow 80^{\circ}\text{C}$ ) a precipitáció mértéke szignifikánsan csökkenthető, mely módszer felhasználásának eredményeképpen a 4.11. ábrán látható  $30\text{ mg/mL}$  koncentrációjú hIgG1 minta is precipitációmentesen denaturálható volt, ennél nagyobb fehérje koncentráció esetén azonban a módszer alkalmazása mellett is precipitálódott a fehérje, azonban így is a kiinduláshoz képest háromszoros fehérjekoncentráció mellett sikerült gondmentesen denaturálni a mintát.

A 4.1. fejezetben tárgyalt, a geAb fehérjével kapcsolatos inhibíciós hatás, mint potenciális gátló faktor merült fel a szérumban megtalálható nagy mennyiségű glükóz – vércukor – esetleg inhibitora lehet a PNGase F enzimnek, mellyel párhuzamosan az is számításba jött, hogy a jelölésnél a nagy mennyiségű cukor egyszerűen felhasználja a jelölési reakcióban az APTS jelölő anyagot, így fajlagosan kevesebb jelölő anyag jut a glikánoknak, nem jön létre az optimális jelöléshez szükséges feleslegben hozzáadott jelölőanyaggal támasztott feltétel. A PNGase F enzimet vizsgáló irodalom nem foglalkozott még ennyire behatóan ezzel a glükóz által okozott gátló hatással kapcsolatos kérdéskörrel, csupán marginális utalásokat tett az esetleges jelenségre. A jelenség vizsgálatához hIgG1 fehérjemintát alkalmaztam úgy, hogy glükózt tartalmazó puffert adagoltam a mintához különböző koncentrációkban először az APTS fluoreszcens festékkel történő jelölés előtt (4.12. ábra, A panel), másodsor pedig a denaturálási lépést követően, a PNGase F enzimmel történő emésztés előtt (4.12. ábra, B panel).



**4.12. ábra.** A növekvő glükóz koncentráció hatása a fluoreszcens jelölés folyamatára (A), valamint a PNGase F emésztésre (B). Az elválasztás körülményei megegyeznek a 4.11. ábrán bemutatottakkal azzal a különbséggel, hogy  $30\text{ cm}$  ( $20\text{ cm}$  effektív) hosszúságú,  $50\text{ }\mu\text{m}$  belső átmérőjű üveg kapilláris került felhasználásra.

A 4.12. ábrán jól látható, hogy a glükóz a jelölési lépés előtti adagolása esetén a kiemelt FA2G2 struktúrán nem okozott szignifikáns változást a kapott területekben, így elmondható, hogy a szérumban levő glükóz mennyisége nem zavarja az APTS jelölési reakciót, az az alkalmazott mennyiségben elegendő a jelölési reakcióhoz. Ezzel ellentétben a PNGase F emésztés előtt bémért különböző glükóz annak mennyiségével arányosan szignifikánsan lassította az enzimátikus reakciót. A glükóz koncentráció hatását főbb glikán struktúrákra a 4.13. ábrán szemléltetem, ahol jól látható, hogy a glükóz mennyiségének növelésével közel lineárisan csökken az egységnyi idő alatt leemésztett glikánok mennyisége. Ez alapján megállapítottam, hogy a glükóz mennyiségét csökkenteni kell a szérumban az enzimátikus reakció hatékonyságának növelése érdekében.



**4.13. ábra.** A növekvő glükóz koncentráció hatása a hIgG1 fehérje különböző típusú N-glikánjainak enzimátikus eltávolítására (szializált – FA2G2S1, galaktozilált – FA2G2, FA2[6]G1, nem-galaktozilált – FA2, és bisecting – FA2B).

A glikánok jelölését követően alkalmazott tisztítási technikára fókuszálva a szérumban levő glükóz koncentrációjának csökkentése céljából kézenfekvő technikának tűnt olyan specifikus felülettel bevont mágneses gyöngyök alkalmazása, melyre célzottan fel lehet kötni egy megfelelő pufferrendszerben a mintában található fehérjéket, így a mintamátrix zavaró komponenseinek koncentrációját hatékonyan le lehet csökkenteni. Az irodalomkutatást követő előkísérletek egyből azt mutatták, hogy amin funkciós csoporttal ellátott mágneses részecskék kiválóan alkalmazhatóak a fehérjék megkötésére és a zavaró komponensek koncentrációjának csökkentésére. A fehérjék megkötését követően pedig a még kötött fehérjéket a kidolgozott gradiens denaturálási módszer segítségével kíméletesen, fokozatosan, precipitáció mentesen tudtam denaturálni. A 3.3. fejezetben ismertetett glikán mintaelőkészítési módszerbe illeszthetően módosítottam és optimalizáltam a mintaelőkészítés lépéseit úgy, hogy nagy mennyiségű kiindulási fehérje mellett CE-MS mérések céljából megfelelően előkészíthető legyen a méréshez a minta. A módosított lépések a 4.2.2. fejezetben láthatóak.

## **4.2.2. Optimalizált mintaelőkészítés nagy mennyiségű fehérjék feldolgozásához**

### **1. Fehérjék megkötése amin funkcionális mágneses gyöngyökre**

- Adjunk 50 µL mintát egy 1,5 mL-es Eppendorf csőbe.
- Adjunk 50 µL 1 M NaBH<sub>3</sub>CN (THF) a mintához.
- Vortex segítségével keverjük meg alaposan a mintát.
- Várjunk egy percet.
- Adjunk 1,0 mL 0.1X PBS oldatot a mintához.
- Adjunk 20 µL amin funkcióval rendelkező mágneses gyöngyöt a mintához.
- Várjunk 30 percet (szobahőmérséklet).

### **2. Mágneses gyöngyök mosása**

- Egy mágneses állványon pipetta segítségével távolítsuk el a felülúszót.
- Adjunk 500 µL HPLC vizet a mintához.
- Vortex segítségével keverjük meg alaposan a mintát.
- Várjunk 5 percet.
- Egy mágneses állványon pipetta segítségével távolítsuk el a felülúszót.

### **3. Hőmérséklet gradiens denaturálás**

- Adjunk 20 µL HPLC vizet a mintához.
- Asztali centrifuga segítségével pörgessük le a mintát az Eppendorf cső aljára.
- Adjunk 10 µL denaturáló oldatot a mintához (DENMIX).
- Vortex segítségével keverjük meg alaposan a mintát.
- Asztali centrifuga segítségével pörgessük le a mintát az Eppendorf cső aljára.
- Denaturáljuk a mintát egy PCR készülékben a VDEN módszer segítségével.

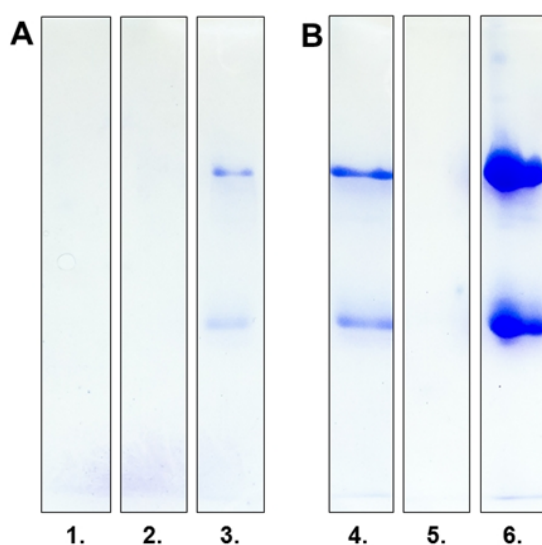
### **4. PNGase F emésztés**

- Adjunk 50 µL HPLC vizet a denaturált mintához.
- Adjunk 2,0 µL of PNGase F enzimet a mintához.
- Vortex segítségével keverjük meg alaposan a mintát.
- Asztali centrifuga segítségével pörgessük le a mintát az Eppendorf cső aljára.
- Inkubáljuk a mintát 50°C-on egy órán keresztül.

### **5. Fehérje precipitáció**

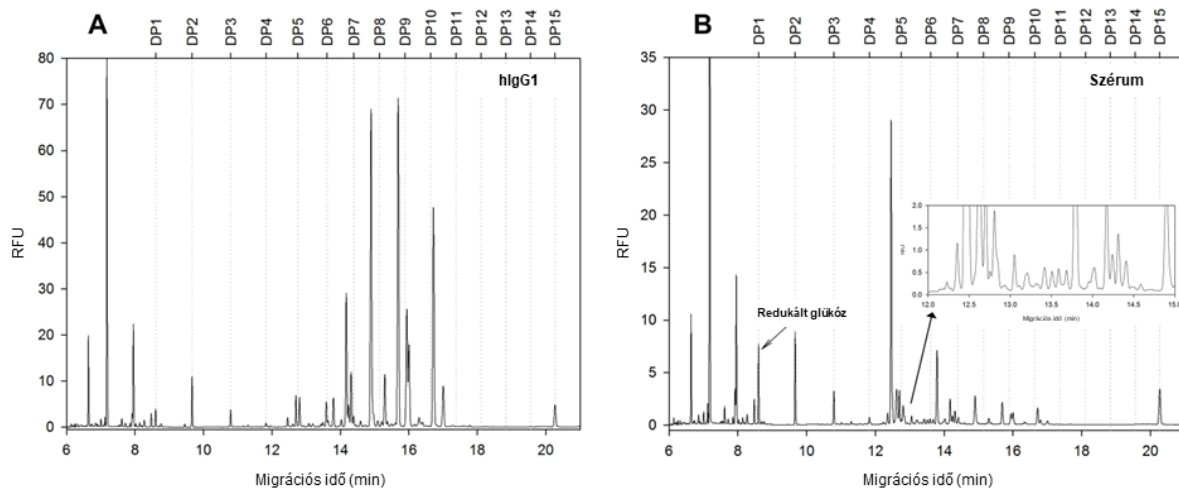
- Adjunk a mintához 120 µL -20°C-os acetonitrilt.
- Inkubáljuk a mintát -20°C-on 15 percig.
- Centrifugáljuk le a mintát 10,700 x g 5 percig.
- A felülúszót (200 µL) pipettázzuk át egy 0,5 mL Eppendorf csőbe.
- Szárítsuk ki a mintát egy vákuum bepárlóban (60°C / 60 min).

A kidolgozott, amin funkciós csoportot tartalmazó mágneses gyöngyöket alkalmazó mintaelőkészítési módszert SDS-PAGE módszerrel vizsgáltam 10  $\mu\text{L}$  10 mg/mL (A) és 50  $\mu\text{L}$  30 mg/mL (B) kiindulási koncentrációjú és mennyiségű hIgG1 minta esetén. Az kapott futtatások eredményei a 4.14. ábrán láthatóak. Az első és negyedik sávokon az amin gyöngyökökön történő fehérje megkötést követő visszamaradt fehérjék mennyisége látható, ami jól mutatja, hogy a kikötés hatékony, de a kapacitása függ a felhasznált gyöngy mennyiségétől. A második és ötödik sávon a gyöngyök vizes mosási lépéséből származó minta fehérje tartalma látható. Mindkét esetben elmondható, hogy a mosási lépésben elhanyagolható a fehérje veszteség, minden megkötött fehérje a gyöngyökökön marad. A harmadik és hatodik sávban pedig a gyöngyökről citromsav segítségével eluált fehérjék láthatóak a kiindulási koncentrációval arányos intenzitásban.

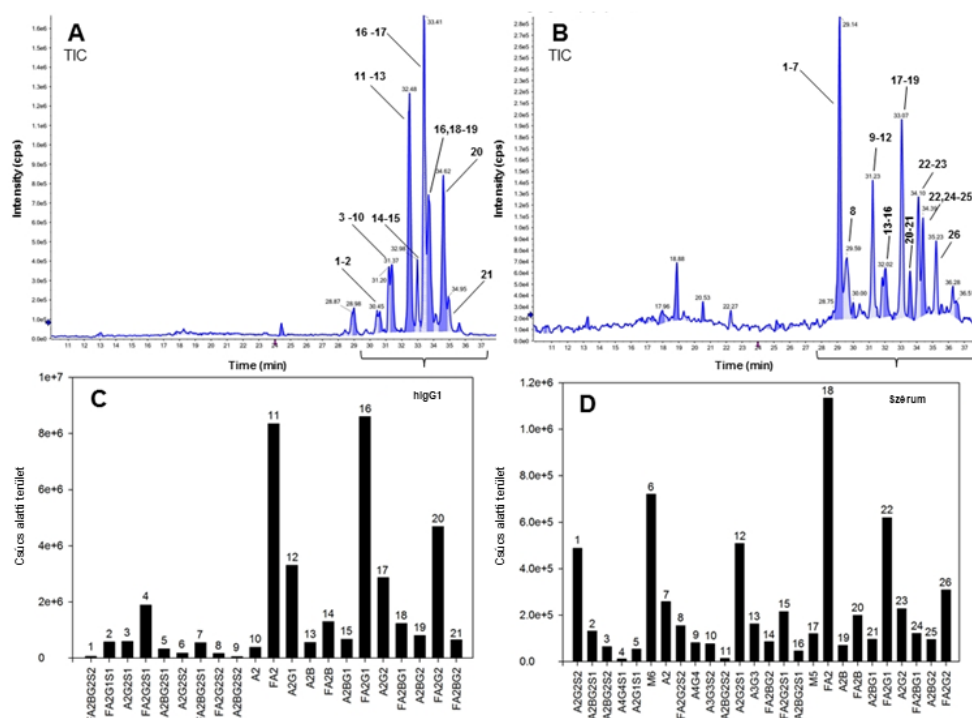


**4.14. ábra.** A kidolgozott módosított mintaelőkészítési módszer hatékonyságának vizsgálata SDS-PAGE módszerrel 10  $\mu\text{L}$  10 mg/mL hIgG1 mintamennyiség (A) és 50  $\mu\text{L}$  30 mg/mL kiindulási mintamennyiség (B) mellett. 1 és 4: mintában visszamaradt fehérjék, 2 és 5: gyöngyök mosó folyadéka, 3 és 6: 50 mM-os citromsavval (pH = 3.0) eluált fehérjék.

Az amin gyöngyök és a gradiens denaturálás együttes alkalmazásával, több mint 1,0 mg fehérjét sikerült hIgG1 esetén precipitációmentesen előkészíteni, mely mennyiség már elegendő a megfelelő minőségű CE-MS-el történő analízishez. A szérumból a mintában található nagy mennyiségű glükóz mennyiségét szignifikánsan csökkentette egy olyan megfelelően kis koncentrációra, mely már nem gátolta a PNGase F enzimmel történő deglikozilációs reakciót, így 50  $\mu\text{L}$  mintából sikerült nagy mennyiségű szérumból glikánokat tartalmazó mintát előállítani. A módosított mintaelőkészítési módszerrel előkészített hIgG1 és szérumból glikánjainak az elektroferogrammmjai a 4.15. ábrán láthatóak. Fontos megjegyezni, hogy az amin funkciós csoporttal rendelkező mágneses gyöngyök alkalmazása a csúcsok és azok arányait tekintve nem mutatnak szignifikáns eltérést a hagyományos módszerrel előkészített mintákhoz képest. Az új módszerrel előkészített mintákat a 3.6. fejezetben részletezett módszerrel CE-MS technika alkalmazásával is megmérésre kerültek, melyből származó futtatások totál ion elektroferogramm (TIE) görbéi és a kapott csúcsterület eloszlásai a 4.16. ábrán láthatóak.



**4.15. ábra.** hIgG1 és szérumból minták N-glikánjainak CE-LIF analízise nagy kiindulási fehérjekoncentráció (hIgG1 – 1,5 mg, szérumból – 50 µL) mellett a módosított mintaelőkészítési módszer alkalmazásával. Az elválasztás körülményei megegyeztek a 4.12. ábrán bemutatottakkal azzal a különbséggel, hogy a minták 1,0 kV / 1,0 sec paraméterek beállításával lettek injektálva.



**4.16. ábra.** Human IgG1 (A, C) és szérumból (B, D) minták CE-ESI-MS analízise valamint az azonosított N-glikánok struktúrái. Az elválasztás körülményei: 91 cm hosszúságú, 30 µm belső átmérőjű üveg kapilláris (Opti MS), 10 mM ammónium acetát (pH = 4,5) + 10% izopropanol elválasztó puffer, 20 kV elválasztási feszültség, 2.0 psi állandó nyomás a conductive (jobb) oldalon, 20°C elválasztási feszültség. Injektálás: 1,0 psi / 5,0 sec víz → 10 kV / 20 sec minta.

A 4.15. és 4.16. ábrákon bemutatott human IgG1 és szérumból minták glikánjainak CE-LIF és CE-MS mérési jól mutatják, hogy az funkciós csoportokkal rendelkező mágneses részecskéket és a gradiens denaturálási lépést együttesen alkalmazó módosított mintaelőkészítési lépés lehetővé teszi nagy

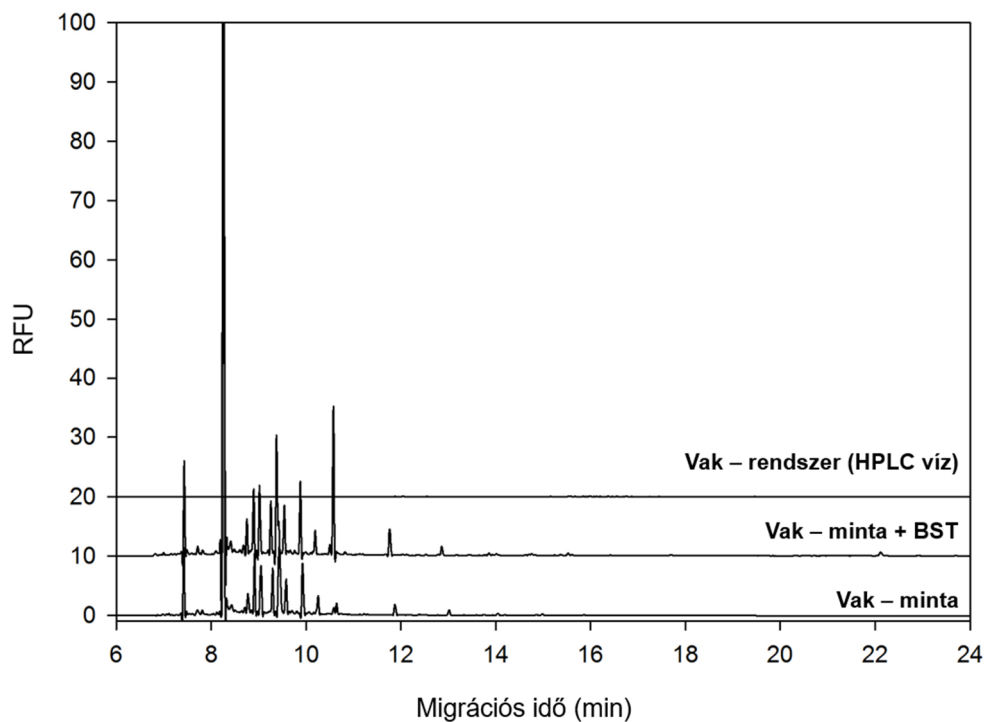
mennyiségű fehérje minták precipitáció mentes feldolgozását a csúcsarányok szignifikáns megváltozása nélkül. Mindemellett a módszer alkalmas a mintamátrixban, mintapufferben található, a mintaelőkészítési lépéseket zavaró komponensek eltávolítására, illetve koncentrációjuk szignifikáns csökkentésére. A szérumban található, a PNGase F enzim reakcióra gátló hatást kifejtő glükóz koncentrációját oly módon le lehetett csökkenteni, hogy az már nem zavarja a deglikoziláció folyamatát. Visszatulva a 4.1. fejezet végén a sóalanítással kapcsolatos kitekintésre, nagy só, illetve cukor tartalmú tároló pufferben levő terápiás fehérjék analízisének előnyösen felhasználható a módszer a fent említett előnyök végett.

### **4.3. A mintaelőkészítési protokoll megbízhatóságának vizsgálata**

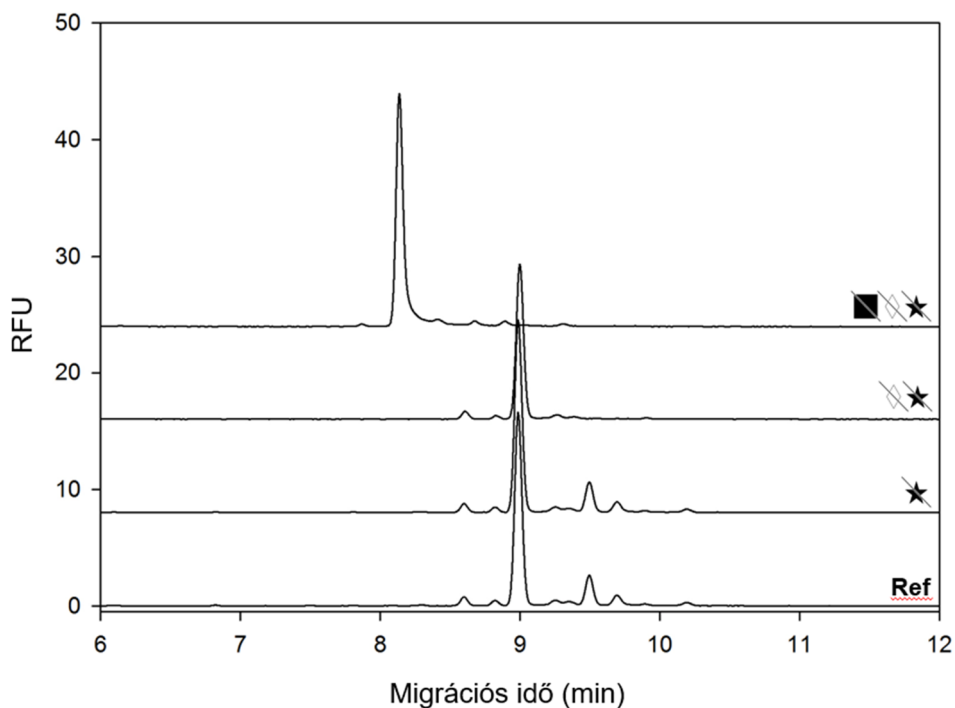
A terápiás fehérjékkel kapcsolatos analitikai fejlesztési munka kapcsán – figyelembe véve a bemutatott problémákat és az azokra kidolgozott mintaelőkészítéssel kapcsolatos megoldási javaslatokat –, ha nem is feltétlenül elsődleges célként, de megjelenik a gyógyszeriparnak a kidolgozott módszer megbízhatóságának vizsgálatával kapcsolatos igénye. Általánosságban elmondható, hogy a kifejezetten akadémiai kutatásoknak nem célja a kidolgozott eljárás, termék ipari szintre történő emelése, legtöbbször a megfelelő körülmények sem adottak – pl. több helyszínen álljon rendelkezésre több ugyanolyan típusú analitikai berendezés megfelelő képzettségű kezelő személyzettel – a validálás módszertanának bizonyos elemeinek alkalmazása elősegítheti a folyamatok mélyebb szintű megértését, segít feltárni a bizonytalansági pontokat, a módszer robusztusságát, valamint az alkalmazhatóság határait. A doktori munkám során kidolgozott mintaelőkészítési és mérési módszer az ipari környezetben alkalmazott validálási stratégiák mentén történő, rész szempontok szerinti vizsgálatának is ez volt a célja első sorban, hogy a kutatás során felmerült kérdésekre a megbízható választ tudjak adni, így, mint validációs munka nem teljes, de a kapott információk indikatívak és kiemelten fontosak.

#### **4.3.1. Specifitás és szelektivitás**

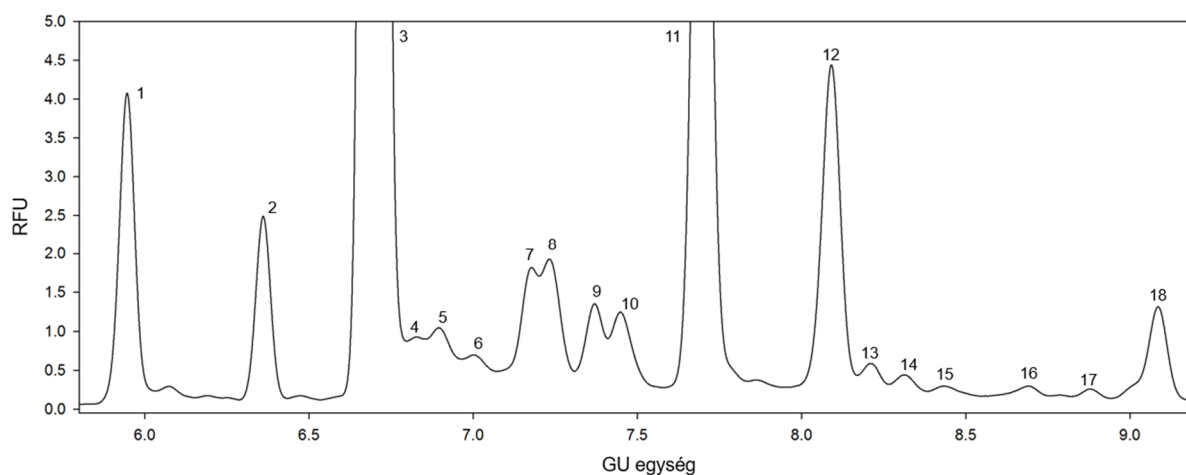
A glikán mintaelőkészítés egy rendkívül komplex folyamat, enzimes és egyensúlyi reakciókat tartalmaz, több tudományterület együttes alkalmazásán alapszik, és számtalan reagens, törzsoldat egy egymásra épülő folyamat mentén történő felhasználáson keresztül valósul meg, így a módszer megbízhatóságának vizsgálatakor először annak specifitását és szelektivitását határoztam meg. A kísérletsorozathoz Humira terápiás fehérjét alkalmaztam. A mintaelőkészítési módszer során bevitt reagens hatásait vak mintával vizsgáltam több szinten, 1) mérőberendezés szinten HPLC tisztaságú víz segítségével és 2) a mintaelőkészítés szintjén, ahol a teljes mintaelőkészítési módszert hajtottam végre a mintával úgy, hogy a minta fehérjét nem tartalmazott és 3) azonosítás szinten, ahol a maltodextrin keverékből DP2 és DP15 oligoszaharidokat tartalmazó standardot (BST) injektáltam a mintához, mely a csúcsok GU érték alapján történő azonosítását segíti elő. A vak futtatásokból kapott elektroferogramok a 4.17. ábrán láthatóak. A kidolgozott analitikai módszerrel előkészített Humira terápiás fehérje mintát ezután a 3.7. fejezetben leírt módon exoglikozidáz enzimek segítségével – szialidáz, galaktozidáz és hexózaminidáz – szekvenáltam (4.18. és 4.19. ábra), mely futtatásokból a GUcal szoftver segítségével meghatároztam az egyes csúcsokhoz tartozó GU értékeket, és az alapján beazonosítottam a Humira fehérjén található N-glikán struktúrákat, amit a 4.2. táblázatban mutatok be.



**4.17. ábra.** Különböző vak minták vizsgálata – rendszer vak (HPLC víz), minta vak (HPLC víz, mint minta), valamint minta vak az alkalmazott BST hozzáadása mellett.



**4.18. ábra.** A Humira fehérje minta exoglikozidáz enzimekkel megvalósított szekvenálása a csúcsok azonosítása céljából.



**4.19. ábra.** A Humira fehérje minta azonosított N-glikán csúcsai (lásd 4.2. táblázat).

**4.2. táblázat.** A Humira fehérje minta azonosított N-glikán csúcsai

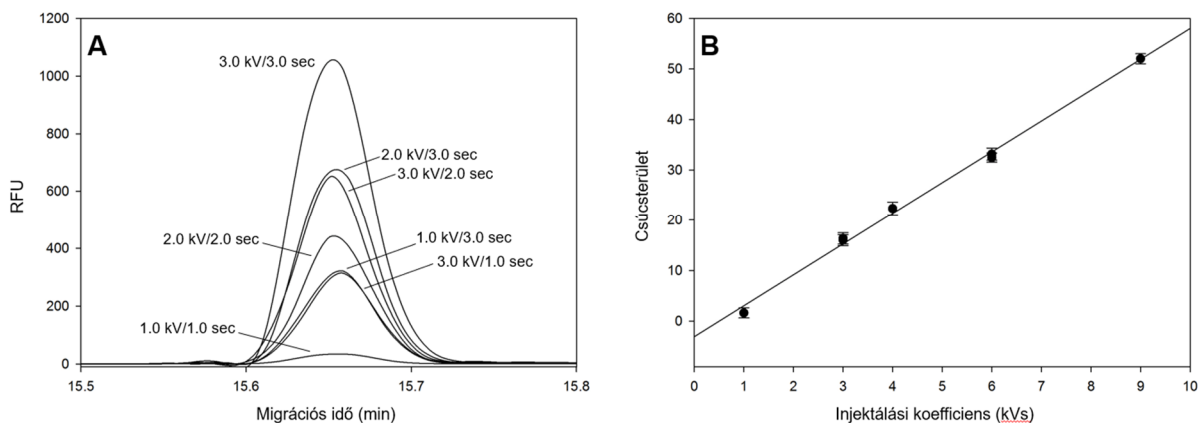
Ssz.	Glikán struktúra	Migrációs idő (min)	GU egység
-	DP3	11,666	2,999
1	A2	14,639	5,946
2	Man5	14,996	6,360
3	FA2	15,285	6,698
4	A2G1	15,396	6,828
5	FA1G1	15,453	6,896
6	A3	15,544	7,002
7	Man6	15,688	7,178
8	FA3	15,732	7,232
9	N/A	15,844	7,370
10	A3	15,909	7,449
11	FA2[6]G1	16,111	7,697
12	FA2[3]G1	16,433	8,091
13	A2G2	16,531	8,210
14	FA3G1	16,615	8,313
15	Man7	16,714	8,434
16	Man8	16,925	8,691
17	Man9	17,078	8,878
18	FA2G2	17,250	9,086

A 4.17. ábrán bemutatott elektroferogramokon látható, hogy míg a HPLC víz injektálásakor egyáltalán nem tapasztaltunk jelet, megállapítható, hogy a mérőberendezésben elhelyezett pufferekből és mosó

reagensekből kis mennyiségben, de kerül a rendszerbe zavaró komponens a mintaelőkészítés és a BST injektálás során. Az előbbi esetben a jelölésből, utóbbi esetben pedig a maltodextrin fragmentumok HPLC-vel történő frakció szedési bizonytalanságából belekerült anyagok jelentős mennyiségű és nagyságú jelet generálnak az elválasztás során. Ennek ellenére a mintaelőkészítés és az analitikai kiértékeléshez használt BST reagensből bekerült szennyezők által adott jelek az N-glikánokból kapott csúcsoktól szignifikánsan eltérő migrációs idővel és megfelelő szeparációval jelennek meg, így nem zavarják azok minőségi és mennyiségi analizését. Elmondható továbbá, hogy a mérések megszületése óta eltelt időben több olyan új módszer született, amely először részben, majd teljes mértékben megszüntette a jelölésből származó okozta problémákat, de ennek tárgyalása nem képezi ezen dolgozat tárgyát. A 4.18. és 4.19. ábrán bemutatott futtatásokon jól láthatóak a Humira terápia fehérjékről PNGase F enzim segítségével leemésztett N-glikán struktúráiból származó jelek. A kapilláris elektroforézis, mint a HPLC módszerrel ortogonális mérési technika egyik nagy előnye az izomerek hatékony elválasztásában rejlik, azonban a kutatási munka során alkalmazott HR-NCHO gél puffer nem alkalmas ezen struktúrák alapvonal elválasztására, ennek következtében precíz mennyiségi analízisre, azonban a kapott csúcsmaximumok alapján történő GU egység számítás segítségével pontosan beazonosíthatóak voltak a csúcsok (4.2. táblázat).

#### **4.3.2. Linearitás**

A linearitást először a kapilláris elektroforézissel történő mérések kapcsán, azon belül pedig az elektrokinetikus injektálás vonatkozásában vizsgáltam. A mérések során nyomással történő vízdugó injektálást követően elektrokinetikus minta injektálást alkalmaztam. Ennek a kétféle mintabejuttatási technikának az előnye, hogy nagy intenzitású, a kizárólag nyomással történő mintabejuttatáshoz képest kisebb szélességgel rendelkező csúcsok kaphatóak, teoretikus hátránya, hogy arányaiban és összkoncentrációját tekintve is megváltoztatja a minta összetételét. Ennek ellenőrzésére az előkísérletek során mind vízdugó injektálás mellett, mind annak alkalmazása nélkül egy 100 µL ösztérfogatú mintából százszor injektáltam 1,0 kV / 1,0 sec paraméterek alkalmazásával, de egyik esetben sem tapasztaltam változást a kapott csúcsterületekben, így elmondható a potenciális mintakoncentráció változás, de a mérési folyamat és időtartam keretein belül nem okozott szignifikáns változást. Az elektrokinetikus injektálás kapcsán vizsgáltam az injektálás feszültségének és idejének hatását a kapott jelre, melyhez a Humira fehérjéből kapott legnagyobb intenzitású FA2 struktúrához tartozó csúcsterület változásával követtem nyomon. Az injektálást idejét 1,0 és 3,0 sec között, az injektálás feszültségét pedig 1,0 és 3,0 kV között változtattam. Az injektálási idő és feszültség szorzatából létrehoztam egy ún. injektálási koefficiens, mely egyszerre jellemzi az injektálás két paraméterét, és ennek függvényében ábrázoltam az FA2 struktúrához tartozó csúcs területét. A különböző injektálási paraméterekhez tartozó FA2 csúcsok, valamint az kapott csúcsterület értékeit az injektálási koefficiens függvényében a 4.20. ábrán látható, a kapott eredményekből származtatott adatok úgy, mint a visszanyerés és eltérés értékeit a különböző paraméter párok esetén a 4.3. táblázat tartalmazza.



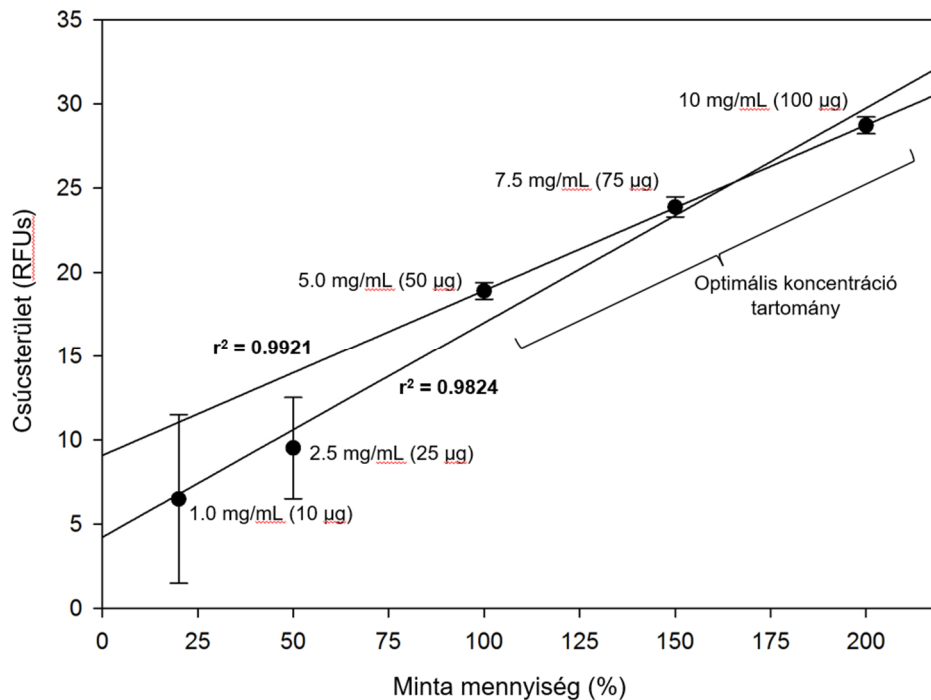
**4.20. ábra.** Az injektálás linearitásának vizsgálata az FA2 csúcsot alapul véve (A), valamint az injektálási koefficiens és a kapott csúcsterület összefüggése szintén az FA2 csúcs esetén (B)

**4.3. táblázat.** Az injektálás vizsgálata különböző mintaterhelések mellett (100% → 50 µg kiindulási fehérje)

Fesz. (kV)	Idő (sec)	Inj.koeff. (kVs)	Mért csúcsterület	%RSD	Mintaterhelés (%)	Számolt csúcsterület	Visszanyerés (%)	Eltérés (%)
1	1	1	4,257	1,032	25	5,588	131,3	31,277
3	1	3	16,343	1,124	75	16,765	102,6	2,583
1	3	3	16,000	1,355	75	16,765	104,8	4,786
2	2	4	22,354	1,325	100	-	-	-
3	2	6	33,153	1,224	150	33,531	101,1	1,140
2	3	6	32,467	0,935	150	33,531	103,3	3,278
3	3	9	52,039	0,994	225	50,296	96,7	3,350

A 4.20. ábrán, valamint a 4.3. táblázatban szereplő eredmények jól reprezentálják az alkalmazott kapilláris elektroforézis készülék injektálási megbízhatóságát és linearitását, azonban az 1,0 kV / 1,0 sec injektáláshoz tartozó visszanyerés (recovery) érték szignifikánsan nagyobb az elvártnál, több, mint 30%-al nagyobb. Ez valószínűsíthetőleg a kapilláris elektroforézis rendszer kialakításából fakadóan olyan paraméterek eredménye, mely nagy bizonytalanságot hordoz magában, így a mérésorozat alapján megállapítottam, hogy a megbízható mérésekhez legalább 2,0 sec és 2,0 kV paraméter együttes mellett érdemes injektálni az előkészített glikán mintákat.

Az injektáláshoz hasonlóan vizsgáltam a linearitást a kiindulási mintamennyiség függvényében 10 mg/mL és 100 mg/mL közötti fehérjekoncentráció tartományban. A kiértékeléskor az injektálási vizsgálatokhoz hasonlóan az FA2 csúcsához tartozó területet vizsgáltam. A kapott csúcsterület értékeket a kiindulási mintakoncentráció függvényében 4.21. ábrán mutatom be, valamint az eredményekből számolt szórás értékek a 4.4. táblázatban láthatóak.



**4.21. ábra.** A detektálási linearitás vizsgálata különböző kiindulási mintamennyiség (mintaterhelés) mellett (100% → 50 µg kiindulási fehérje)

**4.4. táblázat.** A mérés reprodukálhatósága különböző kiindulási mintamennyiség (mintaterhelés) mellett (100% → 50 µg kiindulási fehérje)

Minta fehérje (µg)	Minta terhelés (%)	Csúcsterület (FA2)	Szórás	%RSD
20	20	6,497	4,930	75,884
50	50	9,510	3,110	32,702
100	100	18,891	0,534	2,827
150	150	23,881	0,664	2,780
200	200	28,729	0,530	1,845

A különböző fehérjekoncentrációk esetén vizsgált linearitás vizsgálat során – az injektlási kísérlet sorozathoz hasonlóan – látszik, hogy kis koncentráció tartományban a mintaelőkészítés bizonytalanná válik, a párhuzamosok szórása szignifikánsan megnő és jelentős negatív eltérést mutat a lineáris összefüggéstől. A jelenség pontos oka nem került feltárásra, számos tényező játszhat szerepet az enzim fehérje aránytól kezdve, a jelölési koncentráció arányok megváltozásán keresztül egészen a kis koncentrációk pipettázásából és a minták esetenként több lépcsős, nagy hígításakor fellépő hibáig, melynek kapcsán megállapítottam, hogy megbízható analízis elvégzéséhez a Humira fehérje esetén legalább 5,0 mg/mL kiindulási fehérjekoncentrációra van szükség. Figyelembe véve a 4.2. fejezetben tárgyalt precipitációs problémákat, fehérjétől függően ugyan, de mintaelőkészítés és a mérés linearitás tartománya esetenként nagy mértékben beszűkülhet, ugyanis a fehérje koncentráció csökkentése esetén a mintaelőkészítési és mérési bizonytalanságok terhelik a rendszert, nagyobb koncentráció mellett pedig a denaturálási lépéskor fellépő precipitáció gátolja a folyamatot, mely utóbbi esetben a 4.2. fejezetben

bemutatott amin funkcionizált gyöngyöket és gradiens denaturálási módszert alkalmazó mintaelőkészítési módszert érdemes alkalmazni a megfelelő linearitási tartomány eléréshez. A Humira ennek ellenére nagyobb koncentrációtartományban is precipitáció nélkül denaturálható fehérje, így ebben az esetben problémamentesen kiterjeszhető a mérési tartomány a nagyobb fehérjekoncentrációk irányába.

### 4.3.3. Reprodukálhatóság

A mintaelőkészítési módszer és a kapcsolódó kapilláris elektroforézissel történt mérés reprodukálhatóságát három párhuzamos minta, azok egyenként három párhuzamos mérésével vizsgáltam két különböző napon, két analitikus segítségével (az Analitikus 1 jómagam voltam), melyek eredményeit külön-külön a 4.5 és 4.6. táblázatban, majd ezek összesített eredményeit a 4.7. táblázatban, a csúcsok területarányaira történő lebontását követően pedig a 4.8. táblázatban mutatom be.

### 4.5. táblázat. Az analízis reprodukálhatóságának vizsgálata eltérő napokon

Csúcs	Nap #1_1	Nap #1_2	Nap #1_3	Nap #2_1	Nap #2_2	Nap #2_3	Átlag	Szórás	%RSD
A2	67,926	69,481	65,445	60,920	64,650	61,733	65,026	3,355	5,2
Man5	45,948	46,577	43,424	43,428	47,540	44,007	45,154	1,768	3,9
FA2	1281,114	1491,809	1392,177	1337,682	1426,446	1358,966	1381,366	73,222	5,3
A2G1	13,656	14,792	15,265	12,783	12,427	12,979	13,650	1,150	8,4
A3	7,638	7,680	7,577	6,545	7,622	6,196	7,210	0,660	9,2
Man6	28,899	32,695	29,941	29,901	32,905	30,135	30,746	1,650	5,4
FA3	30,855	32,480	31,570	26,942	29,542	27,064	29,742	2,330	7,8
N/A	23,679	22,809	21,458	20,090	21,862	20,118	21,669	1,437	6,6
A3	22,709	23,093	23,826	19,082	20,746	19,207	21,444	2,052	9,6
FA2[6]G1	241,411	245,199	235,687	222,271	238,688	225,359	234,769	9,098	3,9
FA2[3]G1	86,351	87,827	84,929	76,191	82,408	77,294	82,500	4,817	5,8
A2G2	10,331	10,654	10,077	10,077	10,116	8,934	10,032	0,582	5,8
FA3G1	7,549	7,444	7,123	5,883	6,551	5,825	6,729	0,762	11,3
Man7	4,275	4,143	4,490	3,731	4,143	3,623	4,068	0,330	8,1
Man8	4,120	4,497	4,898	4,129	4,613	4,120	4,396	0,327	7,4
Man9	3,057	4,195	4,214	3,537	3,928	3,537	3,745	0,451	12,0
FA2G2	26,552	27,281	25,630	22,309	24,336	22,621	24,788	2,053	8,3
<b>Összesen</b>	1906,069	2132,655	2007,732	1905,501	2038,525	1931,717	1987,033	90,053	4,532

**4.6. táblázat.** Az analízis reprodukálhatóságának vizsgálata eltérő mintaelőkészítést végző személyek esetén.

Csúcs	Analitikus 1			Analitikus 2			Átlag	Szórás	%RSD
	Minta #1 1	Minta #1 2	Minta #1 3	Minta #2 1	Minta #2 2	Minta #2 3			
A2	67,926	69,481	65,445	66,985	64,650	65,206	66,615	1,859	2,8
Man5	45,948	46,577	43,424	48,880	47,540	47,958	46,721	1,916	4,1
FA2	1281,114	1491,809	1392,177	1478,795	1426,446	1427,277	1416,270	75,747	5,3
A2G1	13,656	14,792	15,265	12,529	12,427	12,548	13,536	1,249	9,2
A3	7,638	7,680	7,577	7,758	7,622	7,743	7,670	0,071	0,9
Man6	28,899	32,695	29,941	33,805	32,905	33,075	31,887	1,974	6,2
FA3	30,855	32,480	31,570	30,405	29,542	29,682	30,756	1,131	3,7
N/A	23,679	22,809	21,458	22,621	21,862	21,984	22,402	0,800	3,6
A3	22,709	23,093	23,826	21,474	20,746	20,954	22,134	1,254	5,7
FA2[6]G1	241,411	245,199	235,687	248,025	238,688	239,255	241,377	4,537	1,9
FA2[3]G1	86,351	87,827	84,929	85,457	82,408	82,774	84,958	2,083	2,5
A2G2	10,331	10,654	10,077	10,306	10,116	10,374	10,310	0,207	2,0
FA3G1	7,549	7,444	7,123	6,779	6,551	6,775	7,037	0,401	5,7
Man7	4,275	4,143	4,490	4,327	4,143	4,432	4,302	0,144	3,4
Man8	4,120	4,497	4,898	4,792	4,613	4,828	4,625	0,288	6,2
Man9	3,057	4,195	4,214	4,100	3,928	4,195	3,948	0,449	11,4
FA2G2	26,552	27,281	25,630	25,270	24,336	24,673	25,624	1,122	4,4
<b>Összesen</b>	1906,069	2132,655	2007,732	2112,309	2038,525	2043,734	2040,170	81,004	4,0

**4.7. táblázat.** Az összes reprodukálhatósági vizsgálat kapcsán elvégzett mérésből származó összesített adatok

<b>Csúcs</b>	<b>Terület</b>	<b>%RSD</b>	<b>Terület %</b>	<b>%RSD</b>
A2	65,492	3,7	3,222	2,9
Man5	46,118	4,5	2,268	3,4
FA2	1425,226	4,5	70,060	1,2
A2G1	12,605	8,7	0,621	9,7
A3	7,393	7,0	0,364	6,0
Man6	31,621	5,3	1,555	3,4
FA3	29,440	5,9	1,448	5,4
N/A	21,504	6,1	1,058	6,3
A3	20,761	7,9	1,022	8,0
FA2[6]G1	238,007	3,6	11,706	2,1
FA2[3]G1	82,450	4,3	4,055	3,5
A2G2	9,768	8,9	0,481	9,2
FA3G1	6,630	8,5	0,326	8,3
Man7	4,159	5,9	0,204	4,9
Man8	4,494	6,3	0,221	5,1
Man9	3,885	8,4	0,191	6,2
FA2G2	24,375	7,1	1,199	6,8
Összesen	2033,927	6,1	-	5,4

**4.8. táblázat.** A szórás adatok csúcsterület megoszlás alapján csoportosítva

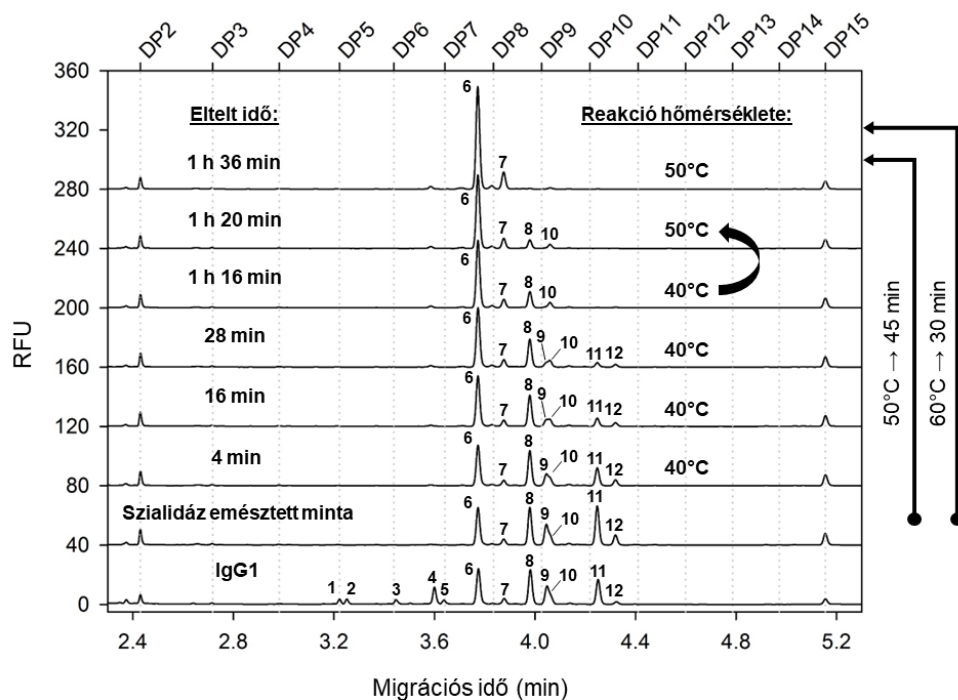
<b>Csúcs csoport</b>	<b>Szórás</b>	<b>%RSD</b>
>10%	0,559	1,7
1-10%	0,084	5,0
<1,0%	0,027	7,1

A 4.5. – 4.8. táblázatokban bemutatott reprodukálhatósági értékek alapján, figyelembe véve, hogy az alkalmazott HR-NCHO elválasztási közegben az egyes glikán struktúrák kis hatékonysággal válnak el, a kiértékelés jelentősen terhelt az integrálási hibáktól. Ennek ellenére a 4.8. táblázatban, ahol a csúcsterület alapján három kategóriába kerültek besorolásra és átlagolásra a kapott szórási adatok, még az 1,0% alatti csúcsok esetén is a teljes sorozatra vonatkoztatott relatív szórás 7,1%-nak adódott, amely kiemelkedő érték, úgy, hogy a 10%-nál nagyobb csúcsok relatív szórása 1,7% lett, így megállapítható, hogy a mintaelőkészítési módszer megfelelően reprodukálható.

#### 4.4. Automatizált N-glikán szekvenálás

A glikoproteinekről PNGase enzim segítségével leemésztett N-glikán struktúrák hatékony minőségi analiziséhez az általános gyakorlatban különböző exoglikozidáz enzimeket alkalmaznak [45]. Ezeknek a megfelelő specifitással rendelkező enzimeknek a segítségével a glikán molekulát alkotó cukor monomerek egyesével lehasíthatók, amit a megfelelő sorrendben használva a minták analizisekor megjelenő csúcstolódások megfelelő értelmezésével a cukor struktúrák pontosan megállapíthatók, a mérésorozattól visszafejthetőek. A három legáltalánosabban alkalmazott exoglikozidáz enzim a  $[\alpha(2\rightarrow3,6,8,9)R]$ , a  $\beta$ -galaktozidáz  $[\beta(1\rightarrow3,4,6)R]$ , valamint a  $\beta$ -N-acetil-hexóزامinidáz  $[\beta(1\rightarrow2,3,4,6)R]$ , melyek mellett alkalmazhatóak nagyobb specifitással – pl. izomer specifitással – rendelkező variánsok, vagy N-glikán struktúrák további két cukor monomerére, a mannózra és a fukózra specifikus enzimek, de ezen három fehérje egymásra épülő alkalmazásával, és egy pontos GU egység meghatározással a fehérjékhez között N-glikán szerkezetek a kapilláris elektroforézissel történő analízis során nagy pontossággal meghatározhatóak. Mind három enzim esetén a 37°C, legalább 16 órán keresztül emésztés a javasolt, azonban az enzim használatkor – első sorban a szialidáz enzim esetén – még szobahőmérsékleten is olyan hatékony az emésztési folyamat, hogy reakció időként csak a mérést megelőző puffercsere és mintainjektálási idő (1 – 2 perc módszertől függően) alatt már teljesen lezajlott az enzim reakció. Enzim reakció révén teljes konverzióról technikai értelemben nem beszélhetünk, azonban fontos kiemelni, hogy a csúcstolódások pontos értelmezhetősége miatt elengedhetetlen, hogy az emésztési reakció közel 100%-osan végbe menjen. Az egymásra épülő reakciók gyorsítása végett a leggyakrabban alkalmazott gyakorlat az előkészített glikán minta négy felé történő felosztását követően az exoglikozidáz enzimek együttes használata, ahol az első minta a referencia, majd a további három mintarész esetén az elsőbe csak a szialidáz, a másodikba a szialidáz és a galaktozidáz, a harmadikban pedig mind a három együttesen kerül felhasználásra.

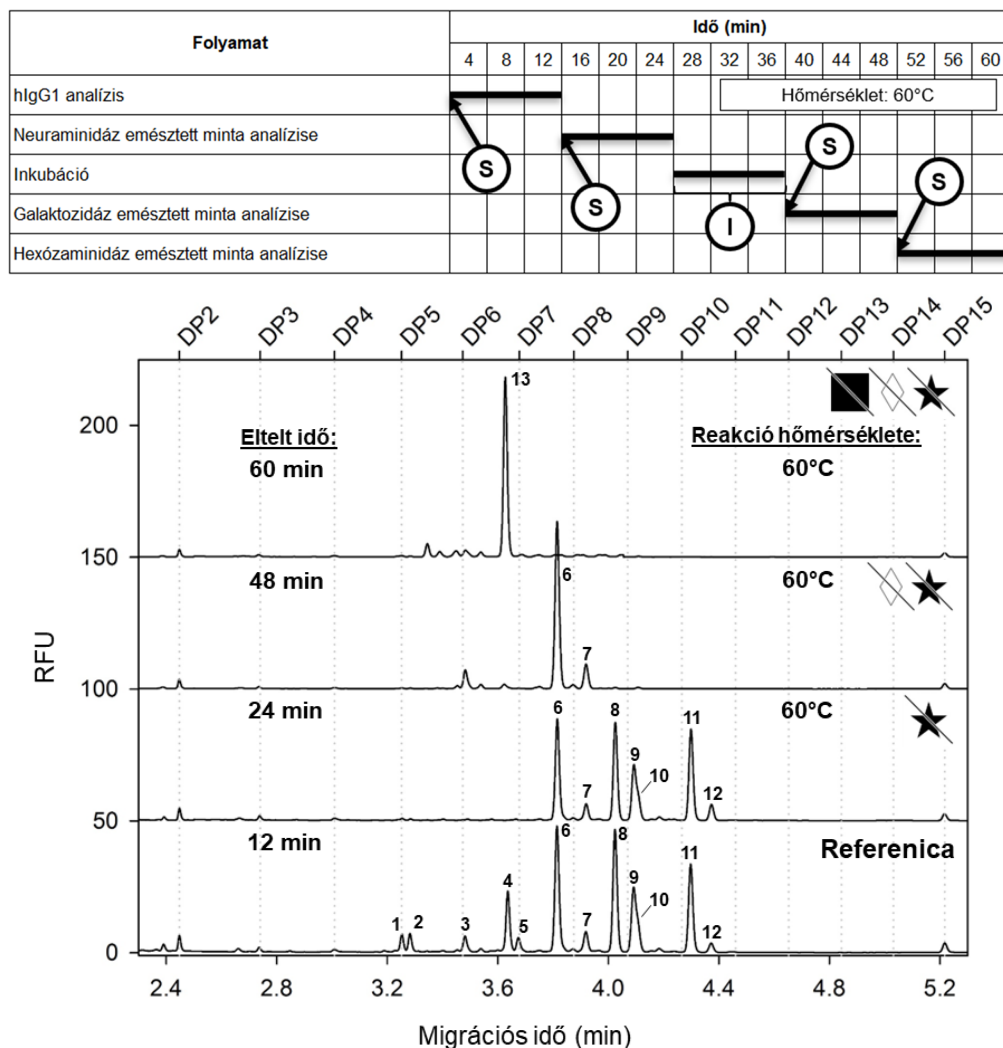
A komplett glikán analízis folyamat egy teljes egységenkénti vizsgálata során hamar felmerül az igény az identifikációhoz tartozó exoglikozidáz szekvenálás össz idejét a mintaelőkészítés és az analízis gyors természetéhez igazítani, így egy 1 órás mintaelőkészítés követő 5 – 10 perces analízis idő mellé nem társulna egy legalább egy éjszakán át tartó kapcsolódó folyamat. Az előkísérletek azt mutatták, hogy a sebességmeghatározó lépés hármas exoglikozidáz enzim reakció esetén a hexóزامinidáz enzim volt. A 4.22. ábrán a három enzim együttes használatához tartozó hőmérséklet optimalizálási lépéseket szemléltetem. A szialidáz enzimmel történő szialinsavak eltávolítása a korábbiakban ismertetett módon gyakorlatilag azonnal lejátszódik, az ezt követő galaktozidáz enzim esetén az ábra jól reprezentálja a különböző hőmérsékletek és az eltelt idő hatását a kapott elektroferogramokra, akkor tekinthető teljesnek az emésztés, ha csak a 6-os (FA2) és 7-es (FA2B) csúcsokhoz tartozó glikán struktúrák vannak már csak a jelent a mintában. Jól látható, hogy a hőmérséklet folyamatos növelésével, valamint az idő előrehaladtával fokozatosan játszódik le a glikán struktúrák degalaktozidációja, amit a kísérletsorozat követően egyből 50°C, majd 60°C alkalmazásával újra lejátszattam, amihez tartozó reakció utat a kapcsolódó reakció időkkal az ábra jobb oldalán mutatom be.



**4.22. ábra.** A galaktozidáz enzim reakció hőmérsékleti és idő optimalizációja hIgG1 fehérje minta alkalmazásával. Az elválasztás körülményei megegyeznek a 4.11. ábrán bemutatottakkal azzal a különbséggel, hogy 60 cm teljes hosszúságú kapilláris helyett 30 cm teljes hosszúságú, 20 cm effektív hosszúságú BFS kapilláris került felhasználásra.

A kísérletsorozat alapján megállapítható, hogy a hőmérséklet optimalizációjával szignifikánsan gyorsítható a reakció, azonban a három enzim együttes alkalmazásánál két paramétert figyelembe kell venni. Egyrészt a szialidáz enzim bár rendkívül gyors, és széles hőmérséklet optimummal rendelkezik, 60°C-on nem működik, azonban – mely külön nem került ábrák szintjén bemutatásra – a hexózáminidáz enzim rendkívül nagy hatékonysággal működik 60°C-on. A precipitáció elkerülésekor alkalmazott hőmérséklet gradiens alkalmazása itt is előnyös, azonban az exoglikozidáz szekvenálás esetén ez a hatás egy kevésbé direkt módon elérhető. Technikailag két dolognak kell megvalósulnia egyszerre, a szialidáz enzim reakciólépéshez álljon rendelkezésre legalább 5 perc nem több, mint 40°C-on, a galaktozidáz és hexózáminidáz enzimek esetén pedig 60°C és 30 perc. A reakció gyors és hatékony lejátszatosára egy félautomata és egy teljesen automata módszert dolgoztam ki mindezek figyelembe vételével. A mindkét esetben a kapilláris elektroforézis mérőberendezés mintatároló kompartmentjét fűtöttem fel 60°C-ra, így, mint egy inkubátor működött az egymást követő analízis lépések alatt, így a reakciókat úgy lehetett lejátszatosni, hogy azok már egyből bent voltak a berendezésben mérésre készen. Mivel a hőátadás a minta kompartmentben a felmelegített levegőn keresztül történik, így kevésbé direkt, mint egy fűtött fém blokkba helyezés esetén, a folyadékoknak kellett néhány perc, hogy átvegyék a műanyag mintatárolókon keresztül a környezeti hőmérsékletet. Ennek a megoldásnak a segítségével a szialidáz enzim reakció nem volt gátolt a nagy hőmérséklet alkalmazása végett, mert mire átlépte a minta hőmérséklete a kritikus hőmérsékletet, a folyamat már végbement, a galaktozidáz és hexózáminidáz enzimek esetén a szükséges reakció időt pedig a referencia minta, a szialidázal emésztett minta, illetve egy további rövid, 12 perces szünet alkalmazásával volt biztosítható, mellyel, amennyiben rendelkezésre áll megfelelő mintamennyiség, hogy azt a glikán mintaelőkészítést követően négy részre lehessen szedni, a teljes

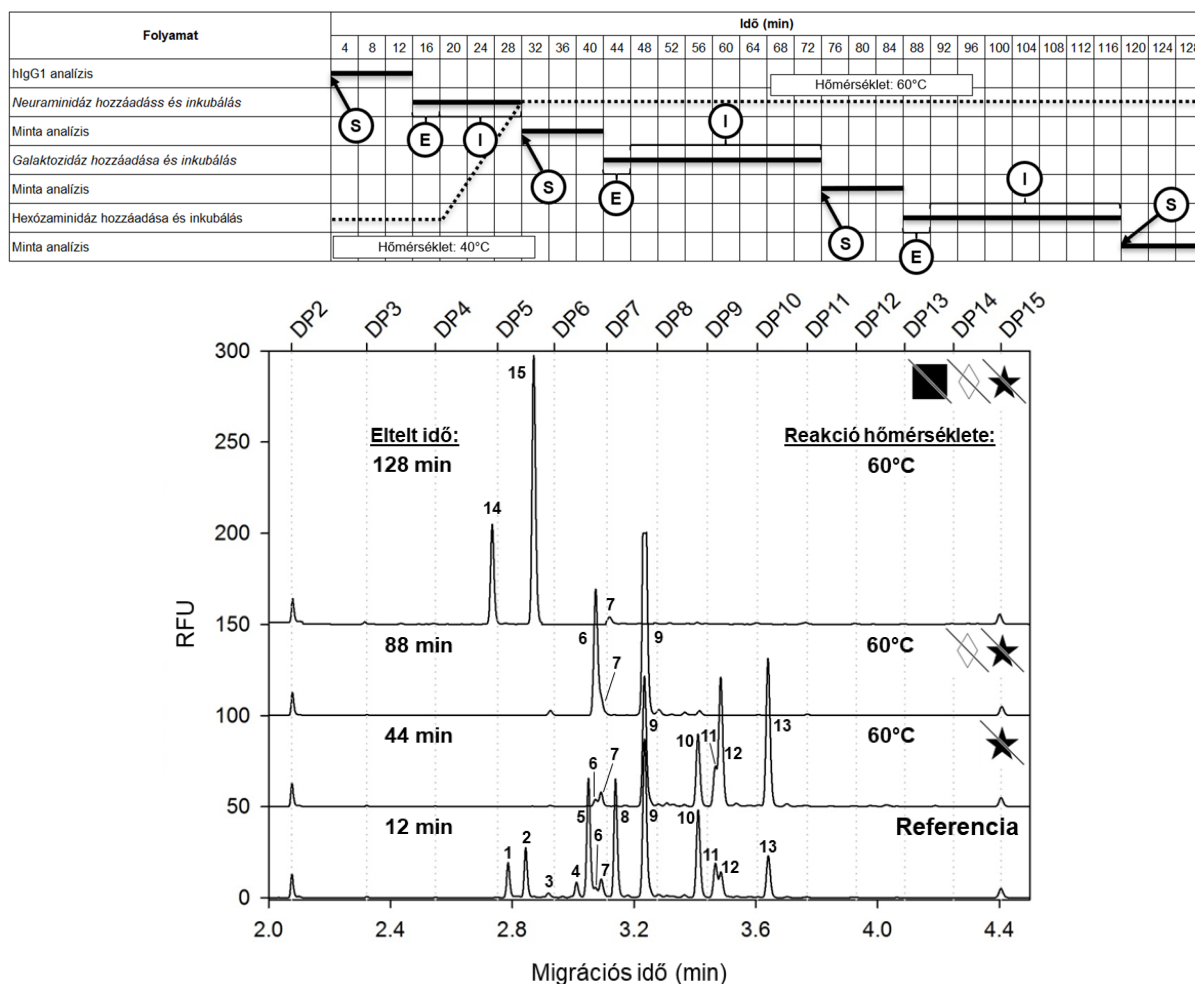
exoglikozidáz emésztés mérésel egybekötve a mintatároló kompartment, mint inkubátor alkalmazása mellett 60 perc alatt elvégezhető. A folyamatot leíró Gantt-diagram, valamint a kapcsolódó mérési eredmények hIgG1 fehérje minta esetén a 4.23. ábrán látható.



**4.23. ábra.** A hIgG1 fehérje minta félautomatikus módszerrel megvalósított exoglikozidáz enzimekkel történő szevenálása. A folyamatot az ábra tetején látható Gantt-diagramm szemlélteti, ahol az 'S' a minták injektálását (Start), az 'I' pedig a minta enzimes reakció inkubációs idejét jelzi.

A kidolgozott megoldás előnye, hogy az egy órás N-glikán mintaelőkészítés alkalmazásával, a tényleges emberi tevékenység figyelembevételével is alig több, mint két óra alatt a kiindulási fehérje mintából el lehet jutni a teljes exoglikozidáz szekvenálással történő minőségi analízisig a tényleges mérési időket beleértve. A kapilláris elektroforézis készülék mintatároló kompartmentje, mint inkubátor alkalmazása lehetőséget adott a félautomata megoldás mellett a teljesen automatizált exoglikozidáz szekvenálás kidolgozására. A berendezés alkalmas arra, hogy a kapilláris mosás és feltöltéskor alkalmazott nyomást tetszőleges oldalon, és megfelelően kis nyomáson és ideig is biztosítja, így lehetőség nyílt arra, hogy a kapillárist, mint az enzimek bejuttatására szolgáló eszközt alkalmazzam. A három exoglikozidáz enzimet a jobb oldali puffertálcán elhelyezve a megfelelő beállításokat követően lehetőség nyílt arra, hogy a berendezés konszekutív módon pontosan 1 – 1  $\mu\text{L}$  enzimet adagoljon az N-glikán mintába, majd

a mintát behelyezze a termosztált minta kompartmentbe, ahol a megfelelő reakció idő biztosítását követően egyből mérhetővé vált a minta. A folyamatnál ez esetben figyelembe kell venni a szialidáz hőmérséklet optimumát, így a kompartment hőmérsékletét a folyamat során 40°C-ról 60°C-ra kell emelni. A teljes folyamat Gantt-diagramja a kapcsolódó mérési eredményekkel a 4.24. ábrán láthatóak Enbrel terápiás fehérje N-glikánjainak szevenálására.



**4.24. ábra.** Az Enbrel fehérje teljesen automatizált módszerrel megvalósított exoglikozidáz enzimekkel történő szevenálása. A folyamatot az ábra tetején látható Gantt-diagramm szemlélteti, ahol az 'S' a minták injektálását (Start), az 'E' a glikozidáz enzim a mintához adagolását, az 'I' pedig a minta enzimes reakció inkubációs idejét jelzi.

A bemutatott ábrán jól látható, hogy a megfelelő hőmérséklet és inkubációs idők, valamint a kapillárist és a berendezést, mint az enzimet bejuttató rendszert alkalmazva, egy minta esetén, teljesen automatizálhatóan végrehajtható az exoglikozidáz alapú glikán szekvenálás. Ez esetben is elmondható, hogy a teljes reakcióidő mindenféle beavatkozás mentesen elvégezhető alig több, mint két óra alatt, ami az eredeti, legalább 16 órás verzióhoz képest kiemelkedő. Az elvégzett szekvenálást követően a GUCal szoftver segítségével és GU egységek kiszámolását követően már nagy pontossággal megállapíthatóak a glikozilált fehérjéken található struktúrák. A kísérletsorozatnál alkalmazott hlgG1, valamint Enbrel terápiás fehérjék azonosított N-glikán struktúrái a 4.9. és 4.10. táblázatban láthatóak.

**4.9. táblázat.** A hIgG1 fehérje azonosított N-glikán csúcsai (xx. ábra)

<b>Csúcs</b>	<b>Struktúra</b>	<b>Idő (min)</b>	<b>GU egység</b>
1	FA2G2S2	3,224	5,00
2	FA2BG2S2	3,253	5,14
3	FA2(3)G1S1	3,451	6,04
4	FA2G2S1	3,605	6,80
5	FA2BG2S1	3,643	6,98
6	FA2	3,781	7,69
7	FA2B	3,885	8,23
8	FA2(6)G1	3,990	8,76
9	FA2(3)G1	4,057	9,11
10	FA2B(6)G1	4,070	9,18
11	FA2G2	4,262	10,16
12	FA2BG2	4,336	10,55
13	F(6)M3	3,567	6,75

**4.10. táblázat.** Az Enbrel fehérje azonosított N-glikán csúcsai (xx. ábra)

<b>Csúcs</b>	<b>Struktúra</b>	<b>Idő (min)</b>	<b>GU érték</b>
1	A2G2S2	2,767	5,18
2	FA2G2S2	2,825	5,50
3	FA2(6)G1S1	2,899	5,90
4	FA2(3)G1S1	2,991	6,42
5	A2G2S1	3,030	6,65
6	A2	3,053	6,78
7	M5	3,072	6,89
8	FA2G2S1	3,119	7,17
9	FA2	3,214	7,75
10	FA2(6)G1	3,390	8,82
11	FA2(3)G1	3,446	9,16
12	A2G2	3,464	9,27
13	FA2G2	3,619	10,22
14	M3	2,737	4,94
15	F(6)M3	2,873	5,67

## 5. Összefoglalás

Az N-glikoziláció ko- és poszttranszlációs módosításként alapvető szerepet játszik a fehérjék biológiai aktivitásának, stabilitásának és kölcsönhatásainak szabályozásában. Az N-glikánok analitikai szintű feltérképezése különösen fontos a biotechnológiai ipar, a diagnosztika és a precíziós orvoslás területén, legyen szó terápiás fehérjék karakterizálásáról vagy új biomarkerek azonosításáról. A dolgozat célkitűzései ennek megfelelően az N-glikán analízis módszertani háttérének újratervezésére és a kapilláris elektroforézis technika lehetőségeinek kiterjesztésére irányultak, különös tekintettel azokra a kihívásokra, amelyek a nagy komplexitású minták és a gyors, reprodukálható mintaelőkészítés területén jelentkeznek. A kutatás során elsődleges céloom egy olyan mintaelőkészítési protokoll kialakítása volt, amely képes alkalmazkodni a különböző eredetű és szerkezetű glikoproteinekhez, és kompatibilis a CE-LIF, illetve CE-MS rendszerekkel. Ennek részeként először egy tripszines előemésztési lépést integráltam a mintaelőkészítési folyamatba, amely képes volt feloldani azt a sztérikus gátlást, amelyet a gliko-módosított (glycoengineered) vagy fúziós fehérjék komplex szerkezete következtében jött létre a PNGase F enzim de-glikoziláció során. Ezzel a megközelítéssel sikerült olyan glikánokat is felszabadítani, amelyek a hagyományos denaturálási lépések után sem voltak hozzáférhetőek. Ezt követően a fehérje denaturáció hatékonyságának fokozása céljából hőmérsékletgradiens alapú protokollt dolgoztam ki. A fokozatos hőemelést és az optimalizált detergens összetétel alkalmazásával sikerült jelentősen megnövelni a denaturált fehérjék oldhatóságát, miközben csökkentettem a precipitáció kockázatát – ez különösen kritikus volt nagy koncentrációjú vagy érzékeny minták, valamint tömegspektrometriás alkalmazások esetén. A hőmérséklet gradiens módszer kiterjesztéseként mágneses mikrorészecskékkel kombinált specifikus mintatisztítási eljárást vezettem be, amely amin funkció csoportokon keresztül szelektíven kötötte meg a glikoproteineket. Ez a megközelítés lehetővé tette a mintában jelen lévő zavaró komponensek – glükóz vagy más pufferkomponensek – hatékony eltávolítását, miközben a kívánt fehérje célzottan koncentrálhatóvá vált. Ezzel a lépéssel jelentősen növelhetővé vált a tömegspektrometriával kompatibilis, nagy koncentrációjú, mégis stabil minták előállítására. Az N-glikán struktúrák pontos minőségi meghatározása céljából kapilláris elektroforézissel végzett analízishez szükséges exoglikozidáz emésztési eljárást optimalizáltam. A különféle specifikus enzimek kombinált, inkubációs hőmérsékleten történő alkalmazásával, valamint a CE-berendezés mintatároló egységének inkubátorként való kihasználásával jelentős időmegtakarítás volt elérhető. Az optimalizált szekvenálási protokoll segítségével az N-glikánok szerkezeti azonosítása a mintaelőkészítéssel együtt akár egy órán belül kivitelezhetővé vált – szemben a korábban gyakori 1–2 napos analitikai időigénnyel. A dolgozatban bemutatott munka során egy új protokoll kidolgozását és validálását mutattam be, egy teljes, integrált és moduláris rendszer kialakítása mentén, amely alkalmazható volt gyógyszeripari és biológiai glikoprotein minták esetén.

## 6. Irodalomjegyzék

- [1] A. Varki, "Biological roles of glycans," *Glycobiology*, vol. 27, no. 1, pp. 3–49, Jan. 2017, doi: 10.1093/glycob/cww086.
- [2] E. C. Soo and J. P. M. Hui, "Metabolomics in Glycomics," 2010, pp. 175–186. doi: 10.1007/978-1-60761-454-8\_12.
- [3] S. S. Pinho and C. A. Reis, "Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications," *Nat Rev Cancer*, vol. 15, no. 9, pp. 540–555, Sep. 2015, doi: 10.1038/nrc3982.
- [4] M. ; B. J. ; J. G. ; H. L. ; P. O. G. ; G. A. Szigeti, "Transzlációs glikomika: Diagnosztikai és biotechnológiai alkalmazások; Az MTA PE Transzlációs Glikomika Kutatócsoport bemutatkozása," *MAGYAR KÉMİKUSOK LAPJA*, vol. 70, pp. 125–127, 2015.
- [5] J. Zaia, "Mass Spectrometry and the Emerging Field of Glycomics," *Chem Biol*, vol. 15, no. 9, pp. 881–892, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.chembiol.2008.07.016.
- [6] L. R. Ruhaak, G. Zauner, C. Huhn, C. Bruggink, A. M. Deelder, and M. Wührer, "Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification," *Anal Bioanal Chem*, vol. 397, no. 8, pp. 3457–3481, Aug. 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3532-z.
- [7] D. Reusch and M. L. Tejada, "Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes," *Glycobiology*, vol. 25, no. 12, pp. 1325–1334, 2015, doi: 10.1093/glycob/cwv065.
- [8] A. Varki *et al.*, *Essentials of Glycobiology, second edition*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- [9] A. Helenius and M. Aebi, "Intracellular Functions of N-Linked Glycans," *Science (1979)*, vol. 291, no. 5512, pp. 2364–2369, Mar. 2001, doi: 10.1126/science.291.5512.2364.
- [10] J. Roth, "Protein N -Glycosylation along the Secretory Pathway: Relationship to Organelle Topography and Function, Protein Quality Control, and Cell Interactions," *Chem Rev*, vol. 102, no. 2, pp. 285–304, Feb. 2002, doi: 10.1021/cr000423j.
- [11] R. Jefferis, "Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics," *Biotechnol Prog*, vol. 21, no. 1, pp. 11–16, Sep. 2008, doi: 10.1021/bp040016j.
- [12] G. A. Rabinovich, Y. van Kooyk, and B. A. Cobb, "Glycobiology of immune responses," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1253, no. 1, pp. 1–15, Apr. 2012, doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06492.x.
- [13] R. S. Haltiwanger and J. B. Lowe, "Role of Glycosylation in Development," *Annu Rev Biochem*, vol. 73, no. 1, pp. 491–537, Jun. 2004, doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074043.
- [14] D. Thomas, A. K. Rathinavel, and P. Radhakrishnan, "Altered glycosylation in cancer: A promising target for biomarkers and therapeutics," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1875, no. 1, p. 188464, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188464.
- [15] M. A. Comunale *et al.*, "Identification and Development of Fucosylated Glycoproteins as Biomarkers of Primary Hepatocellular Carcinoma," *J Proteome Res*, vol. 8, no. 2, pp. 595–602, Feb. 2009, doi: 10.1021/pr800752c.
- [16] M. Ząbczyńska, P. Link-Lenczowski, and E. Pocheć, "Glycosylation in Autoimmune Diseases," 2021, pp. 205–218. doi: 10.1007/978-3-030-70115-4\_10.
- [17] O. Gornik and G. Lauc, "Glycosylation of Serum Proteins in Inflammatory Diseases," *Dis Markers*, vol. 25, no. 4–5, p. 493289, 2008, doi: <https://doi.org/10.1155/2008/493289>.

- [18] S. Schedin-Weiss, B. Winblad, and L. O. Tjernberg, "The role of protein glycosylation in Alzheimer disease," *FEBS J*, vol. 281, no. 1, pp. 46–62, Jan. 2014, doi: 10.1111/febs.12590.
- [19] Y. van der Burgt and M. Wuhrer, "The Role of Clinical Glyco(proteo)mics in Precision Medicine," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 22, no. 6, p. 100565, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.mcpro.2023.100565.
- [20] G. Walsh and E. Walsh, "Biopharmaceutical benchmarks 2022," *Nat Biotechnol*, vol. 40, no. 12, pp. 1722–1760, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41587-022-01582-x.
- [21] J. Y. Kim, Y.-G. Kim, and G. M. Lee, "CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 93, no. 3, pp. 917–930, Feb. 2012, doi: 10.1007/s00253-011-3758-5.
- [22] A. A. Shukla and J. Thömmes, "Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins," *Trends Biotechnol*, vol. 28, no. 5, pp. 253–261, May 2010, doi: 10.1016/j.tibtech.2010.02.001.
- [23] M. C. Manning, D. K. Chou, B. M. Murphy, R. W. Payne, and D. S. Katayama, "Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update," *Pharm Res*, vol. 27, no. 4, pp. 544–575, Apr. 2010, doi: 10.1007/s11095-009-0045-6.
- [24] A. Beck, T. Wurch, C. Bailly, and N. Corvaia, "Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies," *Nat Rev Immunol*, vol. 10, no. 5, pp. 345–352, May 2010, doi: 10.1038/nri2747.
- [25] R. Kornfeld and S. Kornfeld, "ASSEMBLY OF ASPARAGINE-LINKED OLIGOSACCHARIDES," *Annu Rev Biochem*, vol. 54, no. 1, pp. 631–664, Jun. 1985, doi: 10.1146/annurev.bi.54.070185.003215.
- [26] G. Walsh and R. Jefferis, "Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins," *Nat Biotechnol*, vol. 24, no. 10, pp. 1241–1252, Oct. 2006, doi: 10.1038/nbt1252.
- [27] A. M. Goetze *et al.*, "High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans," *Glycobiology*, vol. 21, no. 7, pp. 949–959, Jul. 2011, doi: 10.1093/glycob/cwr027.
- [28] R. Kapur, H. K. Einarsdottir, and G. Vidarsson, "IgG-effector functions: 'The Good, The Bad and The Ugly,'" *Immunol Lett*, vol. 160, no. 2, pp. 139–144, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.imlet.2014.01.015.
- [29] R. Jefferis, "Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 8, no. 3, pp. 226–234, Mar. 2009, doi: 10.1038/nrd2804.
- [30] M. McCamish and G. Woollett, "The State of the Art in the Development of Biosimilars," *Clin Pharmacol Ther*, vol. 91, no. 3, pp. 405–417, Mar. 2012, doi: 10.1038/clpt.2011.343.
- [31] A. Beck, S. Sanglier-Cianfèrani, and A. Van Dorsselaer, "Biosimilar, Biobetter, and Next Generation Antibody Characterization by Mass Spectrometry," *Anal Chem*, vol. 84, no. 11, pp. 4637–4646, Jun. 2012, doi: 10.1021/ac3002885.
- [32] M. Weise *et al.*, "Biosimilars: what clinicians should know," *Blood*, vol. 120, no. 26, pp. 5111–5117, Dec. 2012, doi: 10.1182/blood-2012-04-425744.
- [33] D. J. Harvey, "Proteomic analysis of glycosylation: structural determination of N- and O-linked glycans by mass spectrometry," *Expert Rev Proteomics*, vol. 2, no. 1, pp. 87–101, Jan. 2005, doi: 10.1586/14789450.2.1.87.

- [34] R. Chen *et al.*, “Glycoproteomics Analysis of Human Liver Tissue by Combination of Multiple Enzyme Digestion and Hydrazide Chemistry,” *J Proteome Res*, vol. 8, no. 2, pp. 651–661, Feb. 2009, doi: 10.1021/pr8008012.
- [35] S. Chen, D. Wu, C. V. Robinson, and W. B. Struwe, “Native Mass Spectrometry Meets Glycomics: Resolving Structural Detail and Occupancy of Glycans on Intact Glycoproteins,” *Anal Chem*, vol. 93, no. 30, pp. 10435–10443, Aug. 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.1c01460.
- [36] L. R. Ruhaak *et al.*, “Hydrophilic Interaction Chromatography-Based High-Throughput Sample Preparation Method for N-Glycan Analysis from Total Human Plasma Glycoproteins,” *Anal Chem*, vol. 80, no. 15, pp. 6119–6126, Aug. 2008, doi: 10.1021/ac800630x.
- [37] I. Trbojević-Akmačić *et al.*, “High-Throughput Glycomic Methods,” *Chem Rev*, vol. 122, no. 20, pp. 15865–15913, Oct. 2022, doi: 10.1021/acs.chemrev.1c01031.
- [38] M. Lundborg and G. Widmalm, “Structural Analysis of Glycans by NMR Chemical Shift Prediction,” *Anal Chem*, vol. 83, no. 5, pp. 1514–1517, Mar. 2011, doi: 10.1021/ac1032534.
- [39] G. C. Flynn, X. Y. Chen, Y. D. Liu, B. Shah, and Z. Q. Zhang, “Naturally occurring glycan forms of human immunoglobulins G1 and G2,” *Mol Immunol*, vol. 47, no. 11–12, pp. 2074–2082, 2010, doi: 10.1016/j.molimm.2010.04.006.
- [40] K. S. Cook, K. Bullock, and T. Sullivan, “Development and qualification of an antibody rapid deglycosylation method,” *Biologicals*, vol. 40, no. 2, pp. 109–117, 2012, doi: 10.1016/j.biologicals.2011.12.010.
- [41] M. Onitsuka *et al.*, “Glycosylation analysis of an aggregated antibody produced by Chinese hamster ovary cells in bioreactor culture,” *J Biosci Bioeng*, vol. 117, no. 5, pp. 639–644, 2014, doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.11.001.
- [42] J. E. Huffman *et al.*, “Comparative performance of four methods for high-throughput glycosylation analysis of immunoglobulin G in genetic and epidemiological research,” *Mol Cell Proteomics*, vol. 13, no. 6, pp. 1598–1610, 2014, doi: 10.1074/mcp.M113.037465.
- [43] Y. Takegawa, K. Deguchi, T. Keira, H. Ito, H. Nakagawa, and S. Nishimura, “Separation of isomeric 2-aminopyridine derivatized N-glycans and N-glycopeptides of human serum immunoglobulin G by using a zwitterionic type of hydrophilic-interaction chromatography,” *J Chromatogr A*, vol. 1113, no. 1–2, pp. 177–181, 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.052.010.
- [44] S. Mittermayr, J. Bones, M. Doherty, A. Guttman, and P. M. Rudd, “Multiplexed Analytical Glycomics: Rapid and Confident IgG N-Glycan Structural Elucidation,” *J Proteome Res*, vol. 10, no. 8, pp. 3820–3829, 2011, doi: 10.1021/pr200371s.
- [45] S. Mittermayr, J. Bones, and A. Guttman, “Unraveling the Glyco-Puzzle: Glycan Structure Identification by Capillary Electrophoresis,” *Anal Chem*, vol. 85, no. 9, pp. 4228–4238, May 2013, doi: 10.1021/ac4006099.
- [46] K. Van Beneden *et al.*, “Reversible changes in serum immunoglobulin galactosylation during the immune response and treatment of inflammatory autoimmune arthritis,” *Ann Rheum Dis*, vol. 68, no. 8, pp. 1360–1365, 2009, doi: 10.1136/ard.2008.089292.
- [47] S. Kamoda, R. Ishikawa, and K. Kakehi, “Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for detailed studies on N-linked oligosaccharide profile of therapeutic recombinant monoclonal antibodies,” *J Chromatogr A*, vol. 1133, no. 1–2, pp. 332–339, 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.08.028.

- [48] F. Q. Dang *et al.*, “Rapid analysis of oligosaccharides derived from glycoproteins by microchip electrophoresis,” *J Chromatogr A*, vol. 1109, no. 2, pp. 138–143, 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2005.11.133.
- [49] A. E. Mahan *et al.*, “A method for high-throughput, sensitive analysis of IgG Fc and Fab glycosylation by capillary electrophoresis,” *J Immunol Methods*, vol. 417, pp. 34–44, 2015, doi: 10.1016/j.jim.2014.12.004.
- [50] J. A. Saba *et al.*, “A study of immunoglobulin G glycosylation in monoclonal and polyclonal species by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry,” *Anal Biochem*, vol. 305, no. 1, pp. 16–31, 2002, doi: 10.1006/abio.2002.5651.
- [51] J. Stadlmann, M. Pabst, D. Kolarich, R. Kunert, and F. Altmann, “Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides,” *Proteomics*, vol. 8, no. 14, pp. 2858–2871, 2008, doi: 10.1002/pmic.200700968.
- [52] K. Kodar, J. Stadlmann, K. Klaamas, B. Sergeyev, and O. Kurtenkov, “Immunoglobulin G Fc N-glycan profiling in patients with gastric cancer by LC-ESI-MS: relation to tumor progression and survival,” *Glycoconj J*, vol. 29, no. 1, pp. 57–66, 2012, doi: 10.1007/s10719-011-9364-z.
- [53] L. Royle *et al.*, “Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 22, pp. 20140–20153, 2003, doi: 10.1074/jbc.M301436200.
- [54] R. G. Jayo *et al.*, “Simple Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Method for Complex Glycan Analysis Using a Flow-Through Microvial Interface,” *Anal Chem*, vol. 86, no. 13, pp. 6479–6486, 2014, doi: 10.1021/ac5010212.
- [55] B. Liu, M. Spearman, J. Doering, E. Lattova, H. Perreault, and M. Butler, “The availability of glucose to CHO cells affects the intracellular lipid-linked oligosaccharide distribution, site occupancy and the N-glycosylation profile of a monoclonal antibody,” *J Biotechnol*, vol. 170, pp. 17–27, 2014, doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.11.007.
- [56] J. Krenkova, A. Szekrenyes, Z. Keresztessy, F. Foret, and A. Guttman, “Oriented immobilization of peptide-N-glycosidase F on a monolithic support for glycosylation analysis,” *J Chromatogr A*, vol. 1322, pp. 54–61, 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.10.087.
- [57] A. L. Tarentino and T. H. Plummer, “[4] Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: Purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*,” 1994, pp. 44–57. doi: 10.1016/0076-6879(94)30006-2.
- [58] F. Maley, R. B. Trimble, A. L. Tarentino, and T. H. Plummer, “Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases,” *Anal Biochem*, vol. 180, no. 2, pp. 195–204, Aug. 1989, doi: 10.1016/0003-2697(89)90115-2.
- [59] M. Szigeti, J. Bondar, D. Gjerde, Z. Keresztessy, A. Szekrenyes, and A. Guttman, “Rapid N-glycan release from glycoproteins using immobilized PNGase F microcolumns,” *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 1032, pp. 139–143, 2016, doi: 10.1016/j.jchromb.2016.02.006.
- [60] Hans Kamerling, *Comprehensive Glycoscience From Chemistry to Systems Biology Reference Work • 2007*. Elsevier Science, 2007.

- [61] S. Mittermayr, J. Bones, and A. Guttman, "Unraveling the Glyco-Puzzle: Glycan Structure Identification by Capillary Electrophoresis," *Anal Chem*, vol. 85, no. 9, pp. 4228–4238, 2013, doi: 10.1021/ac4006099.
- [62] L. Gotz *et al.*, "GlycoDigest: a tool for the targeted use of exoglycosidase digestions in glycan structure determination," *Bioinformatics*, vol. 30, no. 21, pp. 3131–3133, 2014, doi: 10.1093/bioinformatics/btu425.
- [63] G. Jarvas, M. Szigeti, and A. Guttman, "GUcal: An integrated application for capillary electrophoresis based glycan analysis," *Electrophoresis*, vol. 36, no. 24, pp. 3094–3096, 2015, doi: 10.1002/elps.201500397.
- [64] M. Szigeti and A. Guttman, "Automated N-Glycosylation Sequencing Of Biopharmaceuticals By Capillary Electrophoresis," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 11663, Sep. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-11493-6.
- [65] D. J. Harvey, A. H. Merry, L. Royle, M. P. Campbell, and P. M. Rudd, "Symbol nomenclature for representing glycan structures: Extension to cover different carbohydrate types," *Proteomics*, vol. 11, no. 22, pp. 4291–4295, Nov. 2011, doi: 10.1002/pmic.201100300.
- [66] A. Tiselius, "A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures," *Transactions of the Faraday Society*, vol. 33, no. 0, pp. 524–531, 1937, doi: 10.1039/TF9373300524.
- [67] H. T. Haglund Arne, "Zone Electrophoresis in a Glass Powder Column. Preliminary Report.," *Acta Chem Scand*, vol. 4, pp. 957–962, 1950.
- [68] T. B. Coolidge, "A simple cataphoreses apparatus," *J Biol Chem*, vol. 127, pp. 551–553, 1939.
- [69] J. K. E. D. Crittenden, "The Separation of Isotopes," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 9, pp. 75–78, 1923.
- [70] A. Kolin, "Method for Elimination of Thermal Convection," *J Appl Phys*, vol. 25, no. 11, pp. 1442–1443, 1954, doi: doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.1721589.
- [71] L. Ornstein, "Disc electrophoresis. I. Background and theory," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 121, pp. 321–349, 1964.
- [72] S. W. Compton and R. G. Brownlee, "Capillary electrophoresis," *Biotechniques*, vol. 6, no. 5, pp. 432–440, 1988.
- [73] J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, "Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries," *Anal Chem*, vol. 53, no. 8, pp. 1298–1302, 1981.
- [74] S. Hjertén, "High-performance electrophoresis: the electrophoretic counterpart of high-performance liquid chromatography," *J Chromatogr A*, vol. 270, no. 0, pp. 1–6, 1983, doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)96347-2.
- [75] B. O'Flaherty and B. K. Nunnally, "Equipment considerations for capillary electrophoresis," in *Separation Science and Technology*, vol. Volume 9, A. Satinder and M. I. Jimidar, Eds., Academic Press, 2008, pp. 43–62. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0149-6395(07)00003-7.
- [76] S. Ahuja, "Overview of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis," in *Separation Science and Technology*, vol. Volume 9, A. Satinder and M. I. Jimidar, Eds., Academic Press, 2008, pp. 1–8. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0149-6395(07)00001-3.
- [77] J. C. Giddings, "Generation of Variance, 'Theoretical Plates,' Resolution, and Peak Capacity in Electrophoresis and Sedimentation," *Separation Science*, vol. 4, no. 3, pp. 181–189, 1969, doi: 10.1080/01496396908052249.

- [78] J. H. Knox and K. A. McCormack, "Temperature Effects in Capillary Electrophoresis. 1: Internal Capillary Temperature and Effect upon Performance," *Chromatographia*, vol. 38, pp. 207–214, 1994.
- [79] N. W. Smith and M. B. Evans, "Capillary zone electrophoresis in pharmaceutical and biomedical analysis," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 12, no. 5, pp. 579–611, 1994.
- [80] Beckman Coulter Handbook, "Introduction to Capillary Electrophoresis," <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/customer-docs/user-guide/IntroductiontoCapillaryElectrophoresisVol-I.pdf>.
- [81] "University of Florida, Separation sciences lecture," <https://cao.chem.ufl.edu/wp-content/uploads/sites/22/2015/01/Lecture29-2015.pdf>.
- [82] V. Hughes, "Molecular mechanisms: Newborns boost immune theory of autism," 2011, [Online]. Available: <http://sfari.org/news-and-opinion/in-brief/2011/molecular-mechanisms-newborn-blood-boosts-immune-theory-of-autism>
- [83] C. N. Scanlan, D. R. Burton, and R. A. Dwek, "Making autoantibodies safe," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 11, pp. 4081–4082, 2008, doi: 10.1073/pnas.0801192105.
- [84] J. N. Arnold, M. R. Wormald, R. B. Sim, P. M. Rudd, and R. A. Dwek, "The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins," *Annu Rev Immunol*, vol. 25, pp. 21–50, 2007, doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702.
- [85] K.-T. C. Shade and R. M. Anthony, "Antibody Glycosylation and Inflammation," *Antibodies*, vol. 2, pp. 392–414, 2013, doi: 10.3390/antib2030392.
- [86] A. Guttman, "Capillary electrophoresis in the N-glycosylation analysis of biopharmaceuticals," *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, vol. 48, pp. 132–143, 2013, doi: 10.1016/j.trac.2013.04.006.
- [87] D. Tracey, L. Klareskog, E. H. Sasso, J. G. Salfeld, and P. P. Tak, "Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review," *Pharmacol Ther*, vol. 117, no. 2, pp. 244–279, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.10.001>.
- [88] J. M. Reichert, "Marketed therapeutic antibodies compendium," *MAbs*, vol. 4, no. 3, pp. 413–415, May 2012, doi: 10.4161/mabs.19931.
- [89] F. Higel, A. Seidl, F. Sörgel, and W. Friess, "N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 100, pp. 94–100, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.ejpb.2016.01.005.
- [90] N. Nupur, S. Joshi, D. Gulliarne, and A. S. Rathore, "Analytical Similarity Assessment of Biosimilars: Global Regulatory Landscape, Recent Studies and Major Advancements in Orthogonal Platforms," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, Feb. 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.832059.
- [91] J. M. Bathon *et al.*, "A Comparison of Etanercept and Methotrexate in Patients with Early Rheumatoid Arthritis," *New England Journal of Medicine*, vol. 343, no. 22, pp. 1586–1593, Nov. 2000, doi: 10.1056/NEJM200011303432201.

- [92] C. H. Chung *et al.*, “Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose- $\alpha$ -1,3-Galactose,” *New England Journal of Medicine*, vol. 358, no. 11, pp. 1109–1117, Mar. 2008, doi: 10.1056/NEJMoa074943.
- [93] N. L. Anderson and N. G. Anderson, “The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects \*,” *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 1, no. 11, pp. 845–867, Nov. 2002, doi: 10.1074/mcp.R200007-MCP200.
- [94] M. Pučić *et al.*, “High Throughput Isolation and Glycosylation Analysis of IgG–Variability and Heritability of the IgG Glycome in Three Isolated Human Populations,” *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 10, no. 10, p. M111.010090, Oct. 2011, doi: 10.1074/mcp.M111.010090.
- [95] D. Reusch and M. L. Tejada, “Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes,” *Glycobiology*, vol. 25, no. 12, pp. 1325–1334, Dec. 2015, doi: 10.1093/glycob/cwv065.
- [96] Z. Sharrett *et al.*, “Exploring the use of APTS as a fluorescent reporter dye for continuous glucose sensing,” *Org Biomol Chem*, vol. 7, no. 7, p. 1461, 2009, doi: 10.1039/b821934f.
- [97] B. Reider, M. Szigeti, and A. Guttman, “Evaporative fluorophore labeling of carbohydrates via reductive amination,” *Talanta*, vol. 185, pp. 365–369, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.03.101.
- [98] G. Jarvas, M. Szigeti, and A. Guttman, “GUcal: An integrated application for capillary electrophoresis based glycan analysis,” *Electrophoresis*, vol. 36, no. 24, pp. 3094–3096, Dec. 2015, doi: 10.1002/elps.201500397.
- [99] M. Szigeti and A. Guttman, “High-Resolution Glycan Analysis by Temperature Gradient Capillary Electrophoresis,” *Anal Chem*, vol. 89, no. 4, pp. 2201–2204, Feb. 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b00016.

## Melléklet

**M.1. táblázat.** Az N-glikán analízis során potenciálisan felmerülő N-glikán struktúrák GU, valamint tömeg adatai

Ssz.	Megnevezés	Összetétel	GU érték HR-NCHO	Tömeg (kDa)	Kétszeresen töltött APTS-el jelölt tömeg (kDa)	Struktúra
1.	N2/NN	N2	2,38	424,17	431,56	
2.	N2F	N2F1	2,90	570,23	504,59	
3.	MNN	H1N2	3,15	586,22	512,59	
4.	MNNF	H1N2F1	3,81	732,28	585,61	
5.	A3G(4)3S(6,6,3,6)4	H6N5A4	4,07	3170,11	1804,53	
6.	A3G(4)3S(3,6,3,6)4	H6N5A4	4,19	3170,11	1804,53	
7.	A4G(4)4S(6)4	H7N6A4	4,53	3535,24	1987,09	
8.	A3G(4)3S(6)3	H6N5A3	4,77	2879,01	1658,98	
9.	A2G(4)2S2	H5N4A2	4,84	2222,78	1330,87	
10.	A3G(4)3S(6,6,3)3	H6N5A3	4,92	2879,01	1658,98	
11.	M3 (core)	H3N2	4,96	910,33	674,64	
12.	A2BG(4)2S2	H3N5	5,00	1519,57	979,26	
13.	A3G(4)3S(3,6,3)3	H6N5A3	5,03	2879,01	1658,98	
14.	F(6)A2G(4)2S2	H5N4A2F1	5,12	2368,84	1403,89	
15.	A4G(4)4S(3)4	H7N6A4	5,13	3535,24	1987,09	
16.	A3G(4)3S(3)3	H6N5A3	5,21	2879,01	1658,98	

Ssz.	Megnevezés	Összetétel	GU érték HR-NCHO	Tömeg (kDa)	Kétszeresen töltött APTS-el jelölt tömeg (kDa)	Struktúra
17.	F(6)A2BG(4)2S2	H5N5A2F1	5,25	2571,92	1505,43	
18.	A4G(4)4S(6)3	H7N6A3	5,46	3244,14	1841,55	
19.	A2[6]G(4)1S1	H4N4A1	5,56	1769,63	1104,29	
20.	A2[3]G(4)1S1	H4N4A1	5,69	1769,63	1104,29	
21.	A3G(4)3S(6)2	H6N5A2	5,99	2587,92	1513,43	
22.	F(6)A2[6]G(4)1S1	H4N4A1F1	6,01	1915,69	1177,32	
23.	A4G(4)4S(3)3	H7N6A3	6,04	3244,14	1841,55	
24.	F(6)A2[3]G(4)1S1	H4N4A1F1	6,14	1915,69	1177,32	
25.	F(6)M3	H3N2F1	6,15	1056,39	747,67	
26.	A3G(4)3S(3)2	H6N4A2	6,35	2384,84	1411,89	
27.	A2G(4)2S1	H5N4A1	6,43	1931,69	1185,32	
28.	A2BG(4)2S1	H5N5A1	6,70	2134,77	1286,86	
29.	F(6)A2G(4)2S1	H5N4A1F1	6,90	2077,75	1258,35	
30.	A2	H3N4	6,90	1316,49	877,72	
31.	M5	H5N2	6,91	1234,43	836,69	
32.	A4G(4)4S(6)2	H7N6A2	6,97	2953,05	1696,00	
33.	F(6)A2BG(4)2S1	H5N5A1F1	7,10	2280,82	1359,89	
34.	A2B	H3N5	7,19	1519,57	979,26	

Ssz.	Megnevezés	Összetétel	GU érték HR-NCHO	Tömeg (kDa)	Kétszeresen töltött APTS-el jelölt tömeg (kDa)	Struktúra
35.	A4G(4)4S(3)2	H7N6A2	7,36	2953,05	1696,00	
36.	F(6)A2	H3N4F1	7,77	1462,54	950,75	
37.	M6	H6N2	7,81	1396,49	917,72	
38.	A2[6]G(4)1	H4N4	7,89	1478,54	958,74	
39.	A2[3]G(4)1	H4N4	8,04	1478,54	958,74	
40.	A3G(4)3S(6)1	H7N5A1	8,05	2458,87	1448,91	
41.	A3G(4)3S(3)1	H7N5A1	8,19	2458,87	1448,91	
42.	F(6)A2B	H3N5F1	8,31	1665,62	1052,29	
43.	A2B[6]G(4)1	H4N5	8,46	1681,62	1060,28	
44.	M7 D2	H7N2	8,56	1558,54	998,74	
45.	A2B[3]G(4)1	H4N5	8,58	1681,62	1060,28	
46.	M7 D3	H7N2	8,74	1558,54	998,74	
47.	M7 D1	H7N2	8,85	1558,54	998,74	
48.	F(6)A2[6]G(4)1	H4N4F1	8,85	1624,60	1031,77	
49.	F(6)A2[3]G(4)1	H4N4F1	9,19	1624,60	1031,77	
50.	F(6)A2B[6]G(4)1	H4N5F1	9,28	1827,68	1133,31	
51.	A4G(4)4S(6)1	H7N6A1	9,47	2661,95	1550,45	
52.	A4G(4)4S(3)1	H7N6A1	9,62	2661,95	1550,45	

Ssz.	Megnevezés	Összetétel	GU érték HR-NCHO	Tömeg (kDa)	Kétszeresen töltött APTS-el jelölt tömeg (kDa)	Struktúra
53.	A2G(4)2	H5N4	9,67	1640,59	1039,77	
54.	F(6)A2B[3]G(4)1	H4N5F1	9,67	1827,68	1133,31	
55.	M8 D1-D3	H8N2	9,73	1720,59	1079,77	
56.	A2BG(4)2	H5N5	9,84	1843,67	1141,31	
57.	F(6)A2[6]G(4)1Gal(3) 1	H6N4	9,87	1802,64	1120,80	
58.	F(6)A2G(4)2	H5N4F1	10,24	1786,65	1112,80	
59.	M9	H9N2	10,35	1882,64	1160,80	
60.	F(6)A2BG(4)2	H5N5F1	10,63	1989,73	1214,34	
61.	F(6)A2G(4)2[6]Gal(3) 1	H5N4F1	11,27	1786,65	1112,80	
62.	F(6)A2G(4)2[3]Gal(3) 1	H5N4	11,55	1640,59	1039,77	
63.	A3G(4)3	H6N5	11,75	2005,72	1222,34	
64.	F(6)A2G(4)2Gal(3)2	H5N4F1	12,56	1786,65	1112,80	
65.	A4G(4)4	H7N6	13,82	2370,86	1404,90	