

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Peptidové mapování bioléciv pomocí CE

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Dmytro Kosolapov

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval(a) samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne (.....)

.....

Dmytro Kosolapov

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu práce PharmDr. Pavlu Jáčovi, Ph.D. a PharmDr. Juraji Lenčovi, Ph.D. za odborné vedení při vypracování experimentální části diplomové práce, za odborné konzultace, trpělivost a veškerý věnovaný čas.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Dmytro Kosolapov

Školitel: PharmDr. Pavel Jáč, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D.

Název diplomové práce: Peptidové mapování bioléciv pomocí CE

Tato práce se zabývá optimalizací kapilárně elektroforetické (CE) metody pro peptidové mapování a enzymatického štěpení proteinů pomocí trypsinu. Jako substrát pro enzymatické štěpení byl použit koňský myoglobin a referenční protilátka. Byly testovány dvě metody štěpení: konvenční štěpení trypsinem v roztoku a štěpení za využití komerční soupravy Smart Digest Trypsin Kit, která využívá imobilizovaný trypsin. Štěpení bylo kontrolováno pomocí RP-HPLC. Po optimalizaci tryptického štěpení byla provedena řada pokusů pro stanovení optimálních podmínek pro kvalitní separaci hydrolyzátu pomocí CE. Všechna měření se prováděla v PVA-kapiláře s vnitřním průměrem 50 μm , efektivní délkou 56 cm a celkovou délkou 64,5 cm. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky za tlaku 50 mbar, vkládané napětí mělo hodnotu 30 kV, teplota kapiláry byla nastavena na 20 °C. Zóny analytů byly zaznamenávány UV-VIS detektorem při vlnové délce 200 nm. Byl testován vliv koncentrace a typu základního elektrolytu (30, 60, 90, 120, 150mM kyselina mravenčí a 0,5%, 1%, 1,5%, 2% kyselina octová), doby nástřiku (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 s), a také koncentrace vzorku. Při optimalizaci metody byla použita technika on-line zakoncentrování přechodným pH rozhraním.

Nejkvalitnější peptidové mapy referenční protilátky byly získány při 60s nástřiku roztoku hydrolyzátu o koncentraci 0,1075 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ rozpuštěného v 10mM roztoku hydrogenuhličitanu amonného o pH 8,5. Jako základní elektrolyt byl využit 90mM mravenčanový pufr o pH 3,0. Nejúčinnějšího štěpení protilátky bylo dosaženo za využití komerční soupravy Smart Digest Trypsin Kit po dobu 180 min.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Dmytro Kosolapov

Supervisor: PharmDr. Pavel Jáč, PhD.

Consultant: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D.

Title of graduation thesis: Peptide Mapping of Biopharmaceuticals Using CE

This work focuses on optimization of capillary electrophoresis (CE) method for the peptide mapping, and enzymatic digestion of proteins using trypsin. Myoglobin from equine heart and a reference antibody were used as substrates. Two digestion approaches were compared: a conventional tryptic digestion in solution and digestion with a commercial SMART Digest Trypsin Kit that is based on immobilized trypsin. The digestion was monitored with RP-HPLC. After a short optimization of tryptic digestion, a number of experiments were carried out to determine the optimal conditions for peptide mapping by means of CE. All the measurements were carried out using a PVA-coated capillary of 50 μm internal diameter, effective length of 56 cm and total length of 64.5 cm. Samples were applied hydrodynamically at a pressure of 50 mbar, the separation voltage was 30 kV, the temperature of the capillary was set to 20°C. The analytes were detected with UV-VIS detector at 200 nm. The effect of BGE type and concentration (30, 60, 90, 120, 150 mM formic acid a 0.5%, 1%, 1.5%, 2% acetic acid), injection time (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80s) and the sample concentration was examined. Dynamic pH junction was used for on-line preconcentration of the peptides.

The best peptide maps of the reference antibody were achieved with 60s injection of 0.1075 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ solution of antibody digest dissolved in 10 mM solution of ammonium bicarbonate, pH 8.5. Formate buffer (90 mM, pH 3) was used as the BGE. The most effective digestion of the reference antibody was achieved using the commercial SMART Digest Trypsin Kit for 180 min.

Obsah

1. Seznam použitých zkratk	9
2. Úvod	10
3. Cíl a popis zadání práce	11
4. Teoretická část	12
4.1. Elektroforéza	12
4.1.1. Historie a vývoj elektroforézy	12
4.1.2. Princip kapilární elektroforézy	13
4.1.3. Přístrojové vybavení	15
4.1.3.1. Kapilára	16
4.1.3.1.1. Dynamicky potažené kapiláry	16
4.1.3.1.2. Trvale potažené kapiláry	17
4.1.3.2. Dávkování vzorku	17
4.1.3.2.1. Zakoncentrování přechodným pH rozhraním	18
4.1.3.3. Detektor	19
4.2. Bioléčiva	21
4.2.1. Biosimilární léčivé přípravky	22
4.2.2. Struktura protilátky	24
4.2.2.1. Struktura proteinů	24
4.2.2.2. Struktura imunoglobulinů	24
4.3. Analýza terapeutických proteinů	26
4.3.1. Analýza aminokyselin	26
4.3.2. Analýza intaktního proteinu	27
4.3.3. Analýza na úrovni peptidů – peptidové mapování	28
4.4. Uplatnění kapilární elektroforézy v analýze proteinů	29
5. Experimentální část	31

5.1.	Enzymatické štěpení proteinů.....	31
5.1.1.	Přístrojové vybavení	31
5.1.2.	Použité chemikálie.....	31
5.1.3.	Modelové proteiny	31
5.1.4.	Postup enzymatického štěpení za využití komerční soupravy SMART Digest Kit.....	31
5.1.5.	Postup enzymatického štěpení klasickou cestou	32
5.2.	Úprava vzorků k HPLC analýze	33
5.2.1.	Přístrojové vybavení	33
5.2.2.	Použité chemikálie.....	33
5.2.3.	Postup úpravy vzorků k HPLC analýze	33
5.3.	Kontrola enzymatického štěpení pomocí HPLC	35
5.3.1.	Přístrojové vybavení	35
5.3.2.	Podmínky HPLC analýzy.....	35
5.4.	Kapilární elektroforéza.....	37
5.4.1.	Přístrojové vybavení	37
5.4.2.	Použité chemikálie.....	37
5.4.3.	Testované vzorky	37
5.4.4.	Příprava roztoků	38
5.4.5.	Příprava vzorků	39
5.4.5.1.	Příprava vzorků hydrolyzátu myoglobinu a protilátky NIST	39
5.4.5.2.	Příprava dalších vzorků	39
5.4.6.	Základní podmínky CE-analýzy	40
5.4.7.	Promytí kapiláry.....	40
5.4.8.	Výpočty	41
6.	Výsledky a diskuze	43

6.1.	Enzymatické štěpení proteinů a jeho hodnocení pomocí HPLC	43
6.1.1.	Počáteční hodnocení efektivity komerční soupravy SMART.....	43
6.1.2.	Štěpení myoglobinu za přítomnosti deoxycholátu sodného	44
6.1.3.	Stanovení minimální doby nutné pro rozštěpení myoglobinu.....	46
6.1.4.	Enzymatické štěpení protilátky NIST SMART metodou. Optimalizace doby štěpení protilátky NIST.....	48
6.1.5.	Porovnání kvality konvenční a SMART metody enzymatického štěpení	53
6.2.	Peptidové mapování proteinů pomocí CE	56
6.2.1.	Analýza lidského fibrinopeptidu B.....	56
6.2.2.	Analýza produktů hydrolýzy myoglobinu	58
6.2.3.	Vliv koncentrace BGE na kvalitu peptidové mapy myoglobinu.....	60
6.2.4.	Stanovení optimální doby nástřiku při analýze za použití 90mM mravenčanového pufru jako BGE	64
6.2.5.	Analýza modelové protilátky NIST optimalizovanou metodou.....	68
7.	Závěr	73
	Zdroje a citace	75

1. Seznam použitých zkratk

- BGE – základní elektrolyt
- CE – kapilární elektroforéza
- CEC – kapilární elektrochromatografie
- CZE – kapilární zónová elektroforéza
- EOF – elektroosmotický tok
- FS – kapilára z křemenného skla
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- MEKC – micelární elektrokinetická chromatografie
- MS – hmotnostní spektrometrie
- NIST – Národní institut standardů a technologie
- PVA – polyvinylalkohol
- RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
- SDC – deoxycholát sodný
- SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
- SPE – extrakce na tuhou fázi
- TFA – kyselina trifluoroctová
- UPLC – ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie

2. Úvod

Zavedení prvních bioléciv na konci minulého století lze s jistotou zařadit mezi největší úspěchy medicíny. Díky své vysoké účinnosti a bezpečnosti se bioléciva s výhodou používají v různých oborech medicíny jako jsou onkologie, revmatologie a diabetologie. Ve spojení s rostoucím významem, a tedy i s rostoucími požadavky společnosti na výrobu existujících a vývoj nových biologických léčiv, se trh s biolécivy rozvíjí extrémně rychle. Globální objem trhu s biolécivy měl v roce 2017 hodnotu 186 miliard dolarů a k roku 2025 se očekává dosažení 526 miliard dolarů^[1].

Důležitou součástí jak vývoje, tak i výroby léčiv je jejich kontrola. Pro zajištění maximálně účinného a bezpečného použití bioléciv se používají metody, pomocí kterých lze biolécivo identifikovat, určit jeho koncentraci a kvantifikovat přítomnost nečistot a rozkladných produktů.

Nezastupitelnou roli při identifikaci bioléciv proteinové struktury hraje peptidové mapování. Podstatou metody je rozštěpení molekuly bílkoviny vhodným enzymem a následující rozdělení produktů štěpení, peptidů, vhodnou separační metodou. Získané peptidové mapy se dají použít jak k identifikaci proteinu, tak i ke kontrole jeho čistoty. V současné době představuje standardní přístup k mapování peptidů separace pomocí HPLC. Alternativní metodou separace je například kapilární elektroforéza (CE), která má obecně vysoký potenciál využití v oblasti separace látek peptidické povahy. Díky tomu, že se princip separace v CE liší od HPLC, nabízí separace pomocí CE komplementární selektivitu.

3. Cíl a popis zadání práce

- 1) Zavedení kapilární elektroforézy jako komplementární techniky pro peptidové mapování na pracoviště.
- 2) Zavedení enzymatického štěpení proteinů pomocí komerční soupravy SMART Digest Trypsin Kit.
- 3) Porovnat enzymatické štěpení referenční protilátky NIST konvenční metodou a SMART metodou pomocí HPLC.
- 4) Vyvinout a optimalizovat CE-metodu pro separaci produktů štěpení koňského myoglobinu a referenční protilátky NIST, pomocí které by bylo možné získat specifické a reprodukovatelné peptidové mapy.

4. Teoretická část

4.1. Elektroforéza

4.1.1. Historie a vývoj elektroforézy

První prakticky použitelnou separační metodou založenou na elektromigraci vyvinul švédský biochemik Arne Tiselius. V roce 1926 Tiselius a Svedberg popsali elektroforetický přístroj využívající U-trubici pro výzkum elektroforetické mobility proteinů^[2].

Po přestavbě a modifikaci přístroje Tiselius představil citlivější instrumentaci schopnou práce s větším proudem. Lepší rozlišení svého nového přístroje vědec demonstroval rozdělením proteinů krevního séra na 4 složky: albumin, α -globulin, β -globulin a γ -globulin. I když určité známky heterogenity krevního séra už byly objevené dříve, právě Tiseliusovi se podařilo tyto složky zřetelně odlišit. V roce 1948 Arne Tiselius získal Nobelovu cenu za výzkum v oblasti elektroforézy a adsorpční analýzy^[3].

Separační schopnost elektroforézy ve volném roztoku, jak byla představena Tiseliem, byla limitována tepelnou difuzí a konvekcí. Proto další modifikací metody bylo provedení separace v antikonvekčních mediích, jako jsou agarózové gely nebo polyakrylamid. Analýza v plošném uspořádání však vykazovala i nedostatky mezi něž lze zahrnout obtížnou detekci, dlouhou dobu analýzy či nepříliš vysokou separační účinnost. Nevýhodou je i nízký stupeň automatizace. Lepší variantu metody – kapilární elektroforézu – představili v roce 1979 Mikkers, Everaerts a Verheggen, kteří použili polytetrafluorethylenovou trubici o vnitřním průměru 200 μm ^[4]. O dva roky později Jorgenson a Lukacs dokázali provést separaci ve skleněné kapiláře o průměru menším než 100 μm ^[5].

Téměř nevodivé křemenné kapiláry generují velmi málo tepla, jsou tedy antikonvekční, proto je jejich využití výhodné pro dosažení účinnější separace v porovnání s gely. Dalším důležitým faktorem je velký poměr plochy vnitřního povrchu a vnitřního objemu kapiláry, což je velmi výhodné z hlediska účinného odvodu tepla. Dva výše zmíněné faktory umožňují využití vyšší intenzity elektrického pole (100-500 V/cm) s minimální tvorbou Jouleho tepla. Výsledkem je významný nárůst separační účinnosti.

Již v roce 1981 Jorgenson a Lukacs dosáhli účinnosti separace o hodnotě nad 4×10^5 teoretických pater^[5].

V roce 1988 byl na trh uveden první komerční CE-analyzátor, což umožnilo rychlejší vývoj samotné metody včetně jejího praktického použití^[6].

V současnosti se CE využívá ve farmaceutické, biofarmaceutické, klinické, potravinářské, environmentální, chemické a biochemické analýze. Kapilární elektroforéza se ukázala jako velmi efektivní při analýze nukleových kyselin: za operačních hodnot pH jsou molekuly DNA a RNA nabitě záporně, stejně jako vnitřní povrch křemenné kapiláry. Odpudivé elektrostatické síly tedy brání adsorpci analyzovaných látek na povrch kapiláry. CE je pak výbornou metodou pro analýzu klasických léčivých látek, včetně neutrálních a hydrofobních, které lze rozseparovat pomocí micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Vhodné je i použití pro chirální separace^[7]. Mezi poslední trendy ve vývoji této techniky patří například spojení CE s hmotnostní spektrometrií (MS) či miniaturizace metody do čipového formátu^[8] ^[9] ^[10].

4.1.2. Princip kapilární elektroforézy

Po aplikaci vysokého napětí ke koncům kapiláry se složky směsi začínají pohybovat různou rychlostí, která je přímo úměrná intenzitě elektrického pole a elektroforetické pohyblivosti^[10]^[11]:

$$v = \mu_e E$$

Rovnice 1

v – rychlost migrace [m/s]; μ_e – elektroforetická pohyblivost [m^2/Vs]; E – intenzita elektrického pole [V/m]

Elektroforetická pohyblivost je přímo úměrná náboji iontu a nepřímo úměrná poloměru iontu a viskozitě prostředí^[11].

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Rovnice 2

μ_e – elektroforetická pohyblivost [m^2/Vs]; q – náboj iontu [C]; η – dynamická viskozita [$\text{Pa}\cdot\text{s}$]; r – poloměr iontu [m]

Ačkoliv jenom pozitivně nabitě ionty se budou pohybovat směrem ke katodickému konci kapiláry, kde je většinou umístěn i detektor, neutrální, i negativně nabitě ionty se k detektoru dostanou díky elektroosmotickému toku (EOF)^{[10][11]}.

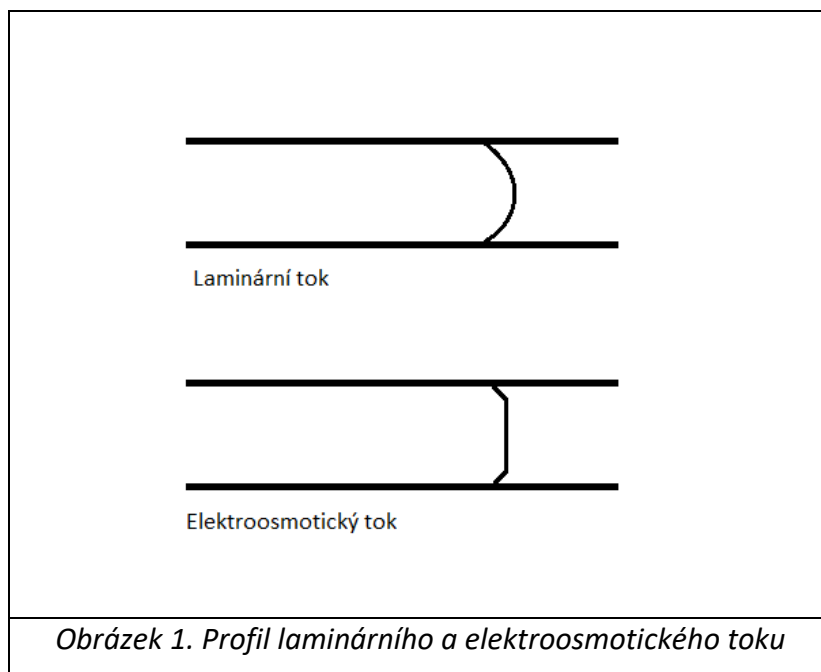
Silanolové skupiny na vnitřním povrchu kapiláry mohou být za vhodných podmínek ionizovány. Rychlost a stupeň ionizace záleží na pH a teplotě roztoku a v menší míře také na koncentraci pufru^[11].

Disociace silanolových skupin vyvolává na rozmezí fází křemen-vodný roztok elektrolytu vznik elektrické dvojvrstvy. První vrstva (tzv. stagnantní vrstva) je tvořena kladně nabitými ionty vyskytujícími se v roztoku, které se shromažďují v bezprostřední blízkosti vnitřního povrchu kapiláry. Druhá vrstva, nebo-li difuzní vrstva, má v závislosti na iontové síle roztoku tloušťku od desítek nanometrů do mikrometru^[12].

Po vložení napětí je stagnantní vrstva nehybná, zatímco difuzní vrstva migruje směrem ke katodě a táhne s sebou celý objem kapaliny v kapiláře. Tímto mechanismem vzniká EOF, který je hybnou silou separace v CE a který umožňuje současnou separaci kladně i záporně nabitých iontů v průběhu analýzy^{[10][11]}.

Rychlost EOF souvisí s nábojem vnitřního povrchu kapiláry, proto je v neutrálním a zásaditém prostředí rychlost EOF vyšší než v kyselém prostředí. Při dostatečně nízké hodnotě pH může být EOF potlačený úplně. Kromě hodnoty pH elektrolytu, závisí rychlost EOF i na koncentraci elektrolytu v pufru; čím je větší, tím je elektrická dvojvrstva užší, což zpomaluje EOF^[11].

Významným rysem EOF je plochý rychlostní profil, což je klíčový rozdíl od parabolického toku v průběhu HPLC separace. Takový tok nevyvolává rozšíření zón analytů, což je důvodem velmi vysoké účinnosti separace^{[10][11]}.



Po aplikaci vysokého napětí na elektrody vzniká v kapiláře EOF. Neutrální látky putují k detektoru nerozseparovány stejnou rychlostí jako EOF, kladně nabitě ionty budou mít rychlost $v_{EOF} + v_i$, záporně nabitě budou migrovat rychlostí $v_{EOF} - v_i$; kde v_{EOF} – rychlost elektroosmotického toku, v_i – elektroforetická rychlost daného iontu^[11].

Pokud jsou podmínky separace nastaveny správně, na katodickém konci kapiláry můžeme detekovat jednotlivé zóny analytů pomocí vhodného detektoru. Kvalitativní charakteristikou látky je migrační čas či elektroforetická pohyblivost. Pro kvantitativní vyhodnocení se používá obdobně jako v HPLC plocha pod píkem^{[10][11]}.

4.1.3. Přístrojové vybavení

V přístrojích pro kapilární elektroforézu je křemenná kapilára naplněna roztokem elektrolytu. Oba konce kapiláry jsou ponořeny do dvou nádobek naplněných stejným roztokem, který se nazývá základní elektrolyt (BGE). Do těchto nádobek jsou také ponořeny platinové elektrody. Elektrolyt musí mít pufrovací vlastnosti, aby se zabránilo změně pH v průběhu separace. Důležitou je i hodnota iontové síly základního elektrolytu, jelikož ovlivňuje generování Jouleho tepla v kapiláře. Velký vliv na tento jev má i hodnota vnitřního průměru použité kapiláry. Nestabilní teplota pufru má za následek jeho nestabilní viskozitu, což podle rovnice č. 1 ovlivní elektroforetickou pohyblivost analytů. Pokud je teplota příliš velká, existuje v extrémním případě i riziko

vření roztoku. Rozseparované zóny analytů jsou zaznamenány vhodným detektorem na koncové části kapiláry, obvykle tedy před katodou. Celý systém je ovládán počítačem^[11].

4.1.3.1. Kapilára

Ideální kapilára pro CE by měla být chemicky a elektricky inertní, transparentní pro elektromagnetické záření v oblasti UV-VIS, ohebná, odolná a levná. Kapiláry z křemenného skla (angl. fused silica, FS) vyhovují většině z těchto požadavků, proto jsou využívány nejčastěji. Vnější povrch kapiláry je potažen ochrannou vrstvou polyimidu pro zajištění potřebné mechanické odolnosti. I když polyimidový povrch není vhodný pro UV-VIS detekci, okno pro detekci lze jednoduše vytvořit pomocí elektricky vyhřívaného drátu nebo kapky horké koncentrované kyseliny sírové^[11].

Vnitřní povrch FS kapiláry avšak chemicky inertní není, což má za následek interakce se složkami pufru a vlastního vzorku, což může způsobit změny v pohyblivosti EOF. Tuto skutečnost je nezbytné zohlednit při analýze bílkovin a peptidů. S výjimkou analýzy ve velmi bazickém prostředí, jsou molekuly peptidů a proteinů kladně nabitě a proto dochází k interakci se zápornými náboji na povrchu nemodifikovaného křemenného skla. Využití základních elektrolytů o extrémním pH, či vysoké iontové síle snižuje pravděpodobnost možných interakcí mezi povrchem kapiláry a analyty. Tento přístup má ale další limitace, jako jsou problémy se stabilitou struktury proteinu či zvýšené riziko vzniku Jouleho tepla^[11].

Komerčně jsou dostupné FS kapiláry o vnitřním průměru 10-200 μm , největší uplatnění mají kapiláry o průměru 25-100 μm . Vnější průměr obvykle bývá v rozmezí 350-400 μm . Efektivní délka kapiláry se pohybuje mezi 25-75 cm. Celková délka kapiláry záleží především na konfiguraci CE-přístroje a převyšuje efektivní délku přibližně o 5-15 cm^[11].

4.1.3.1.1. Dynamicky potažené kapiláry

Při dynamickém pokrytí se modifikující složka nachází v BGE a modifikátor nesmí ovlivňovat detekci. Mezi výhody dynamického krytí patří jednoduchost přípravy, možnost použití standardní FS-kapiláry, nízká nákladnost a kompatibilita s pufrů o širokém koncentračním rozmezí^[11].

Jako přísady pro dynamické krytí se nejčastěji používají surfaktanty v koncentraci pod kritickou micelární koncentrací (CMC). V závislosti na náboji surfaktantu může dojít ke zrychlení, zpomalení, potlačení či obrácení EOF. Koncentrace povrchově aktivních látek nad CMC značně mění průběh separace. Princip rozdělování analyzovaných látek mezi BGE a micelami vznikajícími po překročení CMC se používá v micelární elektrokinetické chromatografii^[11].

Důležitým nedostatkem dynamického potahování je interakce modifikátoru nejenom s povrchem, ale i s molekulami analytu. Další limitací je dlouhá ekvilibrační doba, nutná k zajištění stabilního EOF a reprodukovatelného potahu. Využití surfaktantů omezuje i možnost spojení s MS detektorem^[11].

4.1.3.1.2. Trvale potažené kapiláry

Trvale potažené kapiláry se vyrábějí chemickou modifikací vnitřního povrchu polyakrylamidem, polysacharidy, polyvinylalkoholem, aj. Je možné i pokrytí pomocí fyzikální adherence, např., pomocí polyethylenglykolu. Stejně jako při dynamickém potažení, EOF se mění v závislosti na vlastnostech použitého modifikátoru. Výhodou trvale potažené kapiláry je jednoduchost údržby a vyšší reprodukovatelnost separace. Nevýhodou je relativně vysoká cena takových kapilár^[11].

4.1.3.2. Dávkování vzorku

Nejčastěji používaným způsobem dávkování vzorku je hydrodynamické dávkování, kdy se vloží tlak na vstupní konec kapiláry. Další možností je aplikace podtlaku na protější, tedy výstupní, konec kapiláry, nebo využití sifonového efektu. Dávkování vzorku trvá typicky 0,5-5 s při tlaku v rozmezí 25-100 mbar^[11].

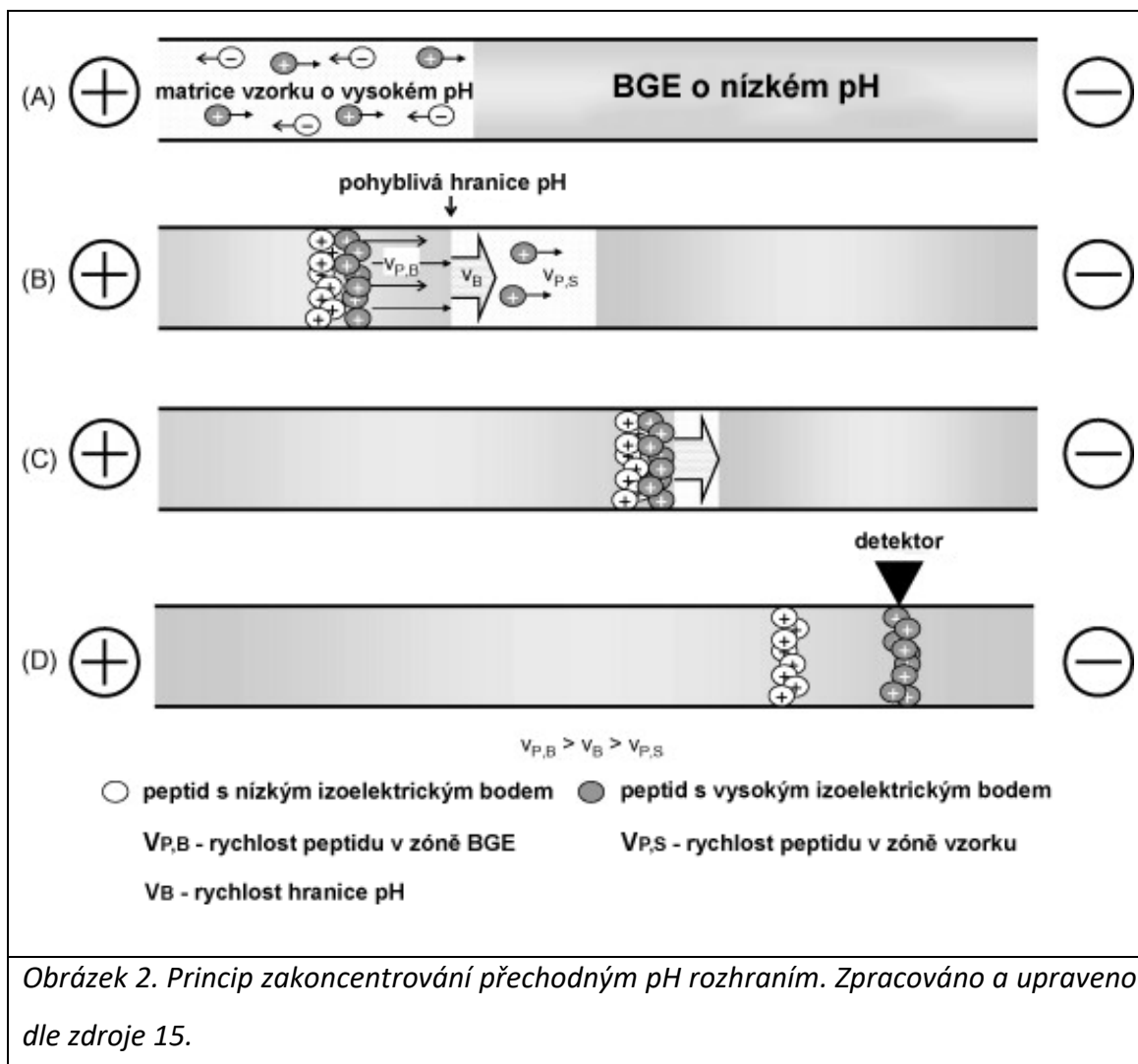
Dalším způsobem je elektrokinetické dávkování, během kterého je rezervoár s pufrem na vstupním konci kapiláry nahrazen nádobkou s roztokem vzorku. Použité napětí je obvykle několikrát nižší než při vlastní separaci. Množství nadávkovaného vzorku je závislé i na elektroforetické pohyblivosti analytu a EOF. Elektrokinetické dávkování vzorku má obvykle nižší reprodukovatelnost výsledků v porovnání s hydrodynamickým způsobem. Zároveň ale tento způsob nevyžaduje žádnou doplňkovou instrumentaci a poskytuje lepší výsledky při separaci ve viskózních mediích^[11].

Platí, že délka dávkované zóny vzorku nesmí překročit 1-2 % efektivní délky kapiláry. Malé dávkované objemy mohou být značným problémem při analýze velmi naředěných vzorků. Vhodným způsobem vyřešení tohoto problému je využití on-line prekoncentrace, tj. zakoncentrování vzorku uvnitř kapiláry^[11].

4.1.3.2.1. Zakoncentrování přechodným pH rozhraním

Jednoduchou a účinnou metodou prekoncentrace, vhodnou pro amfiprotické analyty, je zakoncentrování přechodným pH rozhraním (angl. dynamic pH-junction). Metoda byla poprvé popsána skupinou Ruedi Aebersolda v roce 1990^[13] a byla poprvé pojmenována jako "dynamic pH junction" v publikaci Britz-McKibbina a Chena v roce 2000^[14]. V závislosti na podmínkách analýzy může využití této metody zvýšit detekční limit desetkrát až tisíckrát v porovnání s konvenčním způsobem dávkování.

Zakoncentrování přechodným pH rozhraním nevyžaduje žádné změny v uspořádání CE-systému. Amfiprotické analyty se rozpouštějí v bazickém pufru. Po hydrodynamickém dávkování jsou analyty separovány v kyselém BGE. V bazickém prostředí pufru mají amfiprotické molekuly záporný náboj, ale v kyselém prostředí jsou nabitě kladně. Po kontaktu s kyselejším BGE analyty získávají kladný náboj a soustřeďují se na hranici mezi BGE a elektrolytem vzorku. Pro efektivní zakoncentrování by měla být rychlost analytu v zóně BGE vyšší než rychlost hranice pH. Rychlost analytu v zóně vzorku by měla být naopak menší než rychlost hranice pH (viz obrázek 2).



Když platí, že $v_{P,S} < v_B$ a $v_{P,B} > v_B$, nabité částice analytu jak v BGE, tak i v zóně vzorku se s časem soustřeďují v oblasti hranice pH^[15].

Po neutralizaci bazického elektrolytu kyselým BGE jsou analyty, které jsou zakoncentrovány na rozhraní těchto dvou roztoků o odlišném pH, separovány obvyklým způsobem. Možný je i obrácený postup, kdy se analyty rozpouštějí v kyselé matrici s následnou separací v zásaditém BGE^[16].

4.1.3.3. Detektor

V CE analýze se používá více detekčních metod, ze kterých se mnohé používají i v HPLC. Základní údaje včetně detekčních limitů, výhod a nevýhod jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka 1. Základní vlastnosti nejpoužívanějších CE detektorů. Zpracováno a upraveno dle zdroje 11.

Detekční metoda	Typický detekční limit (mol)	Typický koncentrační detekční limit (mol/l)*	Výhody a nevýhody
UV/VIS	10^{-12} - 10^{-15}	10^{-5} - 10^{-7}	Univerzální; DAD poskytuje spektrální informace
Laserem indukovaná fluorescence	10^{-18} - 10^{-20}	10^{-9} - 10^{-12}	Extrémně vysoká citlivost; drahý; potřeba derivatizace
Amperometrie	10^{-18} - 10^{-20}	10^{-10} - 10^{-11}	Citlivý, selektivní; použitelný jen pro elektroaktivní analyty; není robustní
Konduktometrie	10^{-15} - 10^{-16}	10^{-6} - 10^{-7}	Univerzální
Hmotnostní spektrometrie	10^{-16} - 10^{-17}	10^{-8} - 10^{-9}	Citlivý; poskytuje informace o struktuře
*platí pro objem nástřiku 10 nl			

Stejně jako v HPLC, největší využití v CE mají UV-VIS absorpční detektory. Jelikož křemenné kapiláry neabsorbují elektromagnetické záření v rozmezí UV-VIS, je možné měření přímo přes stěnu kapiláry^[11].

Principem fungování UV-VIS detektoru je stanovení poklesu intenzity elektromagnetického záření emitovaného detektorem po průchodu vrstvou roztoku analytu^[11].

Poměr intenzit detekovaného a emitovaného záření se nazývá transmittance:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Rovnice 3

T – transmittance; I – intenzita záření po průchodu vzorkem [W/m²]; I₀ – intenzita záření před průchodem vzorkem [W/m²].

Od transmittance je odvozena další veličina, která se nazývá absorbance:

$$A = -\log T$$

Rovnice 4

Absorbance je pak přímo úměrná koncentraci absorbující látky ve vzorku:

$$A = \epsilon lc$$

Rovnice 5

A – absorbance; ϵ – molární absorpční koeficient při dané vlnové délce [l×cm⁻¹×mol⁻¹]; l – délka absorpční vrstvy [cm]; c – koncentrace absorbující složky [mol/l].

Hlavním faktorem limitujícím citlivost UV-VIS detekce v průběhu CE separace je malá délka absorpční vrstvy. Vnitřní průměr kapiláry je velmi malý (25-100 μ m), efektivní délka absorpční vrstvy je pak ještě menší kvůli tvaru kapiláry (~80 % vnitřního průměru), protože pouze malá část fotonů prochází přímo skrz střed kapiláry^[11].

4.2. Bioléčiva

Bioléčiva jsou léčivé přípravky odvozené od biologických zdrojů, buď od živých organismů, nebo od jejich aktivních komponent^[17]. K bioléchivům patří jak celé buňky a tkáně, tak i molekuly proteinů, peptidů, nukleových kyselin nebo sacharidů, a také jejich komplexní kombinace. Mezi ně počítáme rekombinantní terapeutické bílkoviny (protilátky a fúzní proteiny), krev a krevní komponenty, tělní buňky a tkáně, genovou terapii, vakcíny aj^[17].

Potenciál využití bioléchiv v medicíně je velmi široký. Monoklonální protilátky, specifické k určitému antigenu, mohou být využity k detekci tohoto antigenu ve tkáních, což pomáhá odhalit výskyt určitých druhů nádoru nebo infekčních onemocnění. Vysoká selektivita monoklonálních protilátek a fúzních proteinů umožňuje bezpečnou a

účinnou léčbu řady onemocnění, zejména onemocnění nádorových, když je důležité omezení toxického účinku aktivních látek pouze na nádorové buňky, aby byla nesespecifická toxicita co nejnižší. V oblasti prevence jsou bioléciva zastoupená vakcínami^[17].

Nevýhodou léčení biologickými přípravky je jejich vysoká cena. Vývoj bioléciva je velice komplikovaný a stojí farmaceutické společnosti mnohonásobně více než vývoj klasického syntetického léčiva. Kromě toho je finančně náročným i uvedení kopie originálního biologického přípravku, tzv. biosimilárního léčivého přípravku, na trh^[17].

4.2.1. Biosimilární léčivé přípravky

Biosimilární léčivý přípravek (angl. biosimilars nebo follow-on biologics) je biologický léčivý přípravek, jenž je téměř totožný s originálním produktem, ale vyráběný jiným výrobcem. Biosimilární přípravek se neliší od originálu z hlediska účinnosti a bezpečnosti, rozdíl lze pozorovat jenom v klinicky neaktivních složkách bioléciva. To je rozdíl od generik, kde se musí prokázat přítomnost stejné aktivní farmaceutické látky v množství shodném s originálem. I když biosimilární přípravky mají stejný klinický účinek jako původní přípravky, nejsou stejné s originálem, jsou pouze obdobné.

Tabulka 2. Porovnání generik a biosimilárních léčivých přípravků.
Zpracováno a upraveno dle zdroje 17.

Vlastnost léčivého přípravku	Generický léčivý přípravek	Biosimilární léčivý přípravek
Hmotnost molekuly	Nízká (stovky Da)	Velká (tisíce Da)
Struktura	Jednoduchá a přesně definovaná	Komplexní s možnými strukturálními rozdíly
Charakterizace	Jednoduchá	Obtížná
Stabilita	Stabilnější při skladování a zacházení	Méně stabilní, velmi citlivé na faktory prostředí
Výroba	Předvídatelné chemické postupy se používají pro výrobu identické kopie	Specializované biologické postupy se používají pro výrobu podobné kopie
Identický s referenčním produktem	Ano; alespoň aktivní farmaceutické substance jsou stejné	Ne; malé rozdíly v klinicky neaktivních částech jsou přijatelné
Nežádoucí imunitní odpověď	Nižší potenciál	Vyšší potenciál
Četnost testů kvality při výrobě	≤50	≥250
Požadavky na klinická hodnocení pro schválení	Malá klinická hodnocení na zdravých dobrovolnících	Velká klinická hodnocení na pacientech
Náklady na vývoj	Nízké	Relativně vysoké

Na rozdíl od malých molekul klasických léčiv mají molekuly bioléciv výrazně vyšší molekulovou hmotnost (až 2 000 kDa) a jejich strukturu nelze často přesně definovat. Když mluvíme o konkrétním biolécivu ze skupiny monoklonálních protilátek, nejedná se o jednotlivou chemickou substanci, ale o směs strukturálně blízkých látek. Chemické složení bioléciva je pak velmi citlivé ke změně výrobních podmínek. Tyto dvě skutečnosti znemožňují přesnou reprodukci struktury léčiva, jak je to běžné při výrobě generik^[18].

4.2.2. Struktura protilátky

4.2.2.1. Struktura proteinů

Strukturu proteinů včetně monoklonálních protilátek můžeme rozdělit na čtyři základní úrovně: primární, sekundární, terciární a kvarterní. Jelikož štěpení proteinů probíhá za přítomnosti denaturačního činidla nebo za podmínek způsobujících denaturaci, peptidové mapování poskytuje informaci pouze o struktuře primární.

Primární struktura proteinu je dána pořadím aminokyselin spojených mezi sebou peptidovou vazbou.

Kanonických aminokyselin, které se vyskytují výhradně v L-konfiguraci, existuje dvacet. Další nestandardní aminokyseliny, které mohou být obsaženy v bílkovinách, se včleňují do řetězce buď během translace (např. selenocystein, pyrolysin) anebo posttranslační úpravou.

Na délce a složení primárního řetězce záleží klasifikace molekuly. Jako *proteiny* jsou tradičně označovány látky s délkou řetězce nad 50 AK. Kratší řetězce nazýváme *peptidy*^[19].

Z hlediska UV-VIS detekce se využívá absorpce záření o vlnové délce 214 nm peptidovými vazbami, což umožňuje hodnocení délky peptidového řetězce na základě absorbance příslušné odseparované složky. Zbytky aromatických aminokyselin (tyrosin, fenylalanin, tryptofan) absorbují záření o vlnové délce 280 nm^[20].

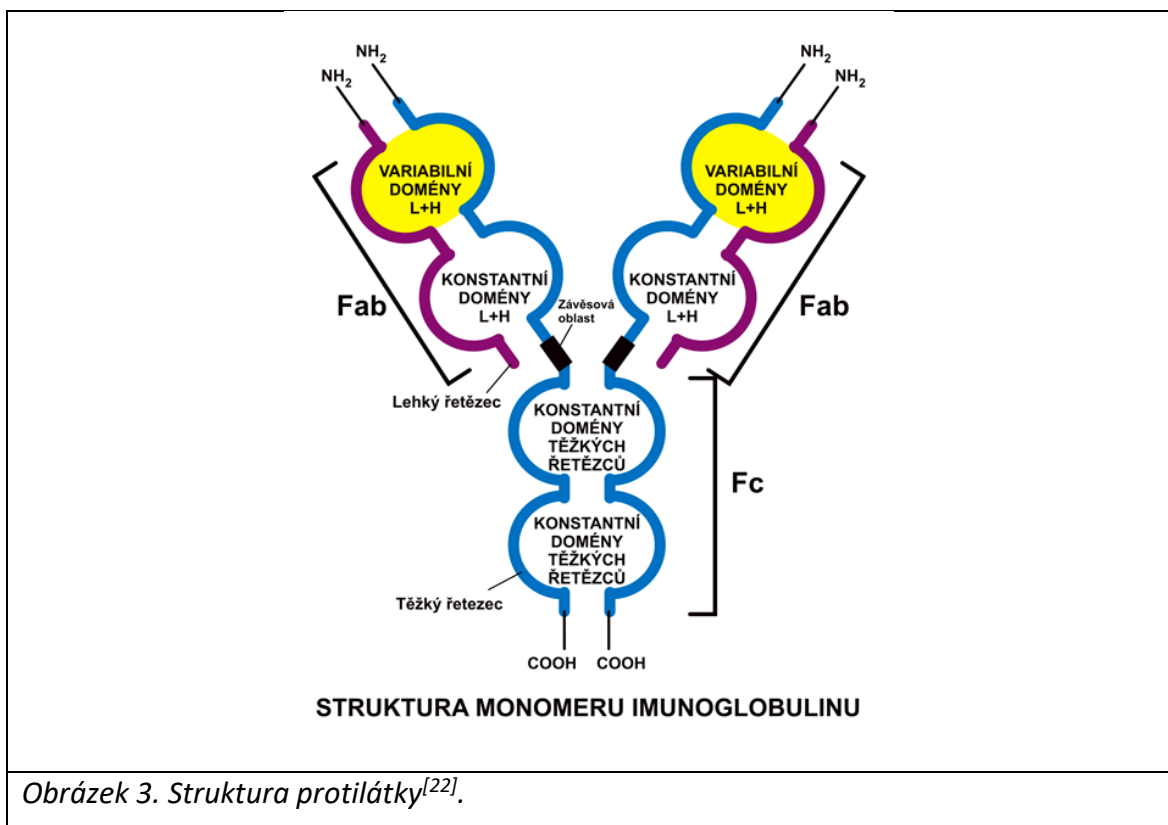
Velmi důležitými z hlediska účinnosti a stability terapeutického proteinu jsou posttranslační modifikace. V současné době se při výrobě bioléciv dává přednost produkčním systémům ze savčích buněk a to právě díky jejich schopnosti provádět komplexní posttranslační modifikace: prostorové uspořádání a agregace, oxidace metioninu, deamidace asparaginu a glutaminu, glykosylace a fosforylace^[21]. Důležitým požadavkem na analytické metody, vhodné pro charakterizaci bioléciv, je schopnost dané modifikace detekovat.

4.2.2.2. Struktura imunoglobulinů

Protilátky jsou globulární plasmatické glykoproteiny produkované B lymfocyty. V rámci normální imunitní odpovědi organismu jsou vytvářeny polyklonální protilátky, tedy

protilátky vytvořené řadou různých lymfocytů. Takové protilátky jsou strukturně odlišné a vážou se na různé epitopy antigenu. V medicíně se ale používají protilátky monoklonální (mAb), které jsou tvořeny klonem jednoho lymfocytu B. Monoklonální protilátky mají tedy stejnou primární strukturu^[22].

Monomery protilátek se skládají ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců spojených disulfidickými můstky za vzniku specifického útvaru podobnému písmenu ypsilon. Takový tvar zajišťuje dvojí funkci: vazbu antigenu přes F_{ab} fragment (antigen vázající fragment) a interakci se složkami imunitního systému přes F_c fragment (krystalizující fragment). Každý monomer protilátky je tedy složen ze dvou F_{ab}-fragmentů a jednoho F_c-fragmentu o přibližně stejné velikosti^[22].



Lehké řetězce protilátky jsou složeny z jedné variabilní (V_L) a jedné konstantní (C_L) domény. Těžké řetězce mají jednu variabilní (V_H) a tři (IgA, IgD, IgG) nebo čtyři (IgE, IgM) konstantní (C_H 1-4) domény. Specifita protilátky je určena strukturou variabilních domén těžkého a lehkého řetězce. Konstantní domény určují typ protilátky (IgA, IgD, IgE, IgG a IgM). V závislosti na typu je protilátka složena z jednoho nebo více monomerů^[22].

V medicíně se běžně používají i modifikované protilátky. U fragmentovaných protilátek (např. caplacizumab, ranibizumab, abciximab) se místo celého imunoglobulinu používají fragmenty protilátky, což může zlepšit farmakokinetiku a usnadnit průnik léčivé látky do cílové tkáně. Fragmentované protilátky mají obvykle jenom jedno vazebné místo. Humanizované a chimérické protilátky (např. trastuzumab, rituximab) nejsou původně odvozené z lidského organismu, jsou ale technologií rekombinantní DNA upraveny tak, aby byly více podobné lidským. Takové protilátky s menší pravděpodobností vyvolají imunitní odpověď, než originální živočišné imunoglobuliny. Bifunkční protilátky (např. emicizumab, blinatumomab) jsou výsledkem fúze dvou protilátek s různou specifitou. Protilátky konjugované s léčivem nebo toxinem (např. moxetumomab pasudotox, polatuzumab vedotin) umožňují cílený transport účinné látky na specifické místo, což umožňuje zvýšit koncentraci této látky v cílové tkáni a omezit její působení v jiných tkáních. Antigenizované protilátky se používají jako vakcíny, v nich je část imunoglobulinu nahrazena mikrobiálním antigenem^[23].

4.3. Analýza terapeutických proteinů

Jelikož struktura terapeutických proteinů je velmi komplexní, nároky na metody pro jejich charakterizaci a kvantifikaci jsou mnohem vyšší než pro konvenční nízkomolekulární léčiva. Při analýze látek s peptidickou strukturou lze postupovat podle třech základních strategií: analýza aminokyselin, analýza intaktní bílkoviny a analýza na úrovni peptidů.

Různé zkoušky totožnosti monoklonálních protilátek předepisuje Český lékopis 2017. Výběr zkoušky záleží na povaze a mikroheterogenitě vybrané protilátky, a také na přítomnosti izoform. Jako vhodné zkoušky pro analýzu protilátek uvádí Český lékopis 2017 peptidové mapování, izoelektrickou fokusaci, iontovou vylučovací chromatografii, hydrofobní interaktivní chromatografii, mapování oligosacharidů, stanovení obsahu monosacharidů a hmotnostní spektrometrii^[24].

4.3.1. Analýza aminokyselin

Strategie analýzy aminokyselin může být použita pro kvantifikaci proteinů a peptidů, jejich identifikaci na základě stanovení poměru aminokyselin v primárním řetězci, pro

hodnocení strategie fragmentačních postupů pro peptidové mapování a pro detekci atypických aminokyselin, jež mohou být součástí daného proteinu nebo peptidu^[25].

Analýza začíná úplnou hydrolýzou proteinu nebo peptidu. Proces probíhá v silně kyselém prostředí za zvýšené teploty (nad 100 °C) a trvá až 24 hodin. K separaci získané směsi aminokyselin se používá vhodná chromatografická nebo vzácněji elektroforetická separační metoda. Konvenční HPLC na nepolárních sorbentech (RP-HPLC) často poskytuje horší rozlišení kvůli amfoterní podstatě aminokyselin. Tento problém se dá vyřešit derivatizací aminokyselin či spojením s MS-detektorem. Jako další vhodné chromatografické metody, které mají jiný princip separace, lze použít iontově-výměnnou chromatografii, iontově-interakční chromatografii a hydrofilní interakční chromatografii^[25].

4.3.2. Analýza intaktního proteinu

Analýza intaktního proteinu je důležitá pro stanovení přesné molekulové hmotnosti a také pro získání informací o heterogenitě proteinu (např. pro kvantifikaci glykoforem). Mezi metody pro analýzu intaktních proteinů patří spektroskopie, chromatografie, elektroforéza a MS^[26].

Spektroskopie (nukleární magnetická rezonance, rentgenová spektroskopie, infračervená spektroskopie, cirkulární dichroismus aj.) se používá pro stanovení sekundární a terciární struktury proteinu. Nukleární magnetická rezonance a rentgenová spektroskopie jsou velmi účinné pro určení 3D-struktury proteinu. Existují ale určité limitace, jež překáží rutinnímu použití těchto metod. Rentgenová spektroskopie je možná výhradně s krystalizovanými proteiny (krystalizace je obtížná např. pro glykosylované proteiny). Nukleární magnetická rezonance může pracovat efektivně jenom s molekulami o molekulové hmotnosti pod 25 kDa; koncentrace vzorku by navíc měla být relativně vysoká^[26].

Mezi běžně používané chromatografické metody patří RP-HPLC, molekulově vylučovací chromatografie (SEC), hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), hydrofobní interakční chromatografie, iontově výměnná chromatografie a afinitní chromatografie. Mezi výhody chromatografie v analýze intaktních proteinů patří časová nenáročnost, vysoká rozlišovací schopnost většiny separačních módů, reprodukovatelnost výsledků a

možnost spojení s MS (RP-HPLC, HILIC, vzácně SEC). Z elektroforetických metod se poměrně často používá planární PAGE či SDS-PAGE. Dalšími možnostmi jsou izoelektrická fokusace a kapilární metody: kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární gelová elektroforéza, kapilární izoelektrická fokusace, kapilární elektrochromatografie^[26].

4.3.3. Analýza na úrovni peptidů – peptidové mapování

Mapování peptidů je metodou identifikace bílkovin zahrnující enzymatické nebo chemické štěpení proteinu následované rozdělením a identifikací získaných peptidů. Jedná se o velmi citlivý přístup, obvykle schopný rozpoznat i nejmenší rozdíl (často i o jednu aminokyselinu) mezi standardem a vzorkem. Metoda zahrnuje 4 kroky:

- 1) Oddělení a čištění proteinu, pokud se nachází v směsi
- 2) Selektivní rozštěpení peptidických vazeb
- 3) Separace získaných peptidů
- 4) Detekce a identifikace peptidů

Analyzovaný vzorek se štěpí a analyzuje souběžně se vzorkem standardu.

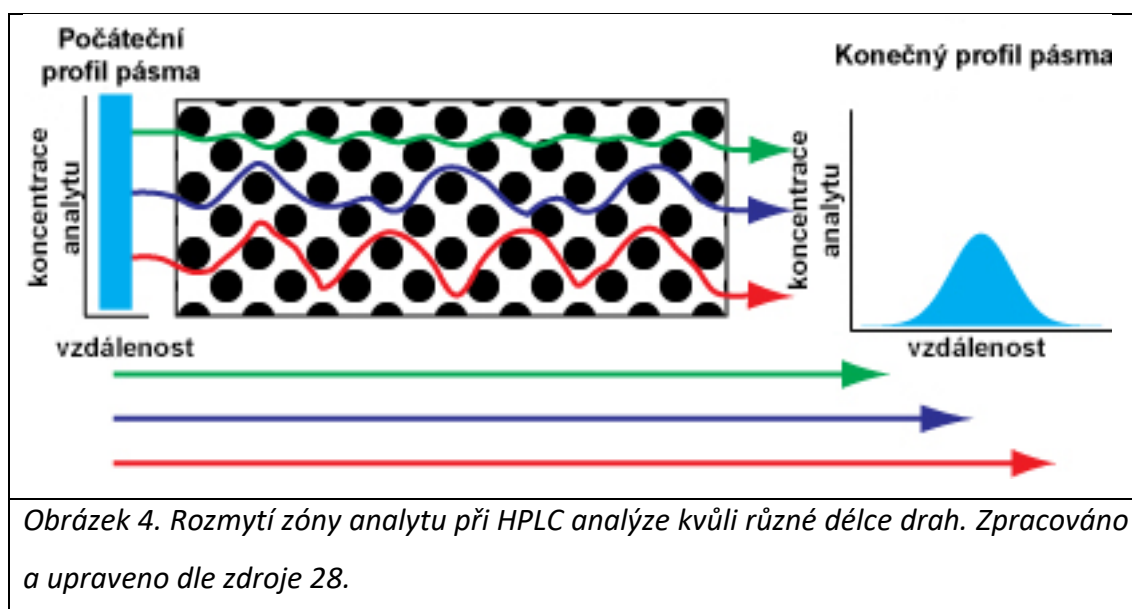
Nejběžnějším enzymem pro štěpení proteinů je trypsin, a to díky své definované specifitě. Trypsin hydrolyzuje peptidové vazby před argininem nebo lysinem (pořadí aminokyselin v primární struktuře stanovujeme od N-konce). Hydrolyza ale ve většině případů neproběhne, pokud pozici před argininem nebo lysinem zaujímá prolin^[27].

Pro separaci peptidů se běžně používá metoda RP-HPLC nebo RP-UHPLC. Pro detekci se obvykle používá UV-detektor, identitu peptidů lze určit hmotnostní spektrometrií. Metoda kapilární elektroforézy může sloužit jako alternativa nebo doplněk ke standardní HPLC metodě, a to díky těmto skutečnostem:

- 1) CE je metodou ortogonální k RP-HPLC. Principem RP-HPLC je výměna analytu mezi stacionární a mobilní fází o odlišné polaritě. Čím je afinita analytu ke stacionární fázi vyšší, tím bude více zdržován na separační koloně, a tím větší bude jeho retenční čas. Při elektroforetické separaci jsou analyty separovány podle poměru náboje a poloměru částice (viz rovnice 2). Díky různému separačnímu mechanismu lze metodou CE rozdělit směsi

peptidů obtížně separovatelné pomocí HPLC jako jsou například peptidy s velmi blízkou lipofilitou.

- 2) Separační účinnost CE je velmi vysoká. Na rozdíl od RP-HPLC, při CE separaci neprobíhá přenos analytu mezi dvěma fázemi, dále neexistuje problém s různou délkou drah analytů (viz obrázek 4). EOF pak poskytuje plochý profil toku na rozdíl od parabolického toku při RP-HPLC separaci (viz Obrázek 2). Díky tomu při CE separaci nedochází k výraznému rozmytí zón, které je typické pro RP-HPLC. Výsledkem je separace se separační účinností dosahující až stovek tisíc teoretických pater.



Je ale nutné zmínit, že rozdíl v separační účinnosti mezi CE a UPLC už není tak výrazný, jako mezi CE a HPLC^[7].

4.4. Uplatnění kapilární elektroforézy v analýze proteinů

Při analýze peptidů a proteinů pomocí CE se setkáváme s problémem adsorpce těchto analytů na stěnu křemenné kapiláry, a to v celém operačním rozmezí pH (2-12). Tento problém se dá vyřešit dynamickým nebo trvalým krytím vnitřního povrchu kapiláry, a také vhodnou úpravou pH a iontové síly pufru^[29].

Důležitou a často používanou metodou analýzy proteinů a peptidů je kapilární isoelektrická fokusace (cIEF). Např. v analýze proteomu bakterie *Deinococcus radiodurans* bylo dosaženo hodnoty separační kapacity ~ 800 a faktoru zakoncentrování vzorku ~ 500 , hodnota ΔpI (minimální rozdíl hodnot isoelektrických bodů dvou rozseparovaných látek) byla 0,004. Při separaci produktů trypsinového hydrolyzátu stejného substrátu byla hodnota ΔpI 0,01^[30-33].

Zavedenou metodou pro analytickou charakterizaci, vývoj procesů a kontrolu kvality monoklonálních protilátek je kapilární gelová elektroforéza. Kapilární uspořádání dané metody má v porovnání s plošným uspořádáním řadu výhod: on-line detekce přímo na kapiláře, automatizace, vysoké rozlišení a možnost přesné kvantifikace proteinů a stanovení jejich molekulové hmotnosti^[34].

Kapilární zónová elektroforéza má vysoký potenciál použití a oproti RP-HPLC je výhodnější např. při separaci malých polárních peptidů. Naopak hydrofobní peptidy a také peptidy s velmi blízkým poměrem náboj/hmotnost jsou mnohem lépe separovány pomocí HPLC. Pro tento typ peptidů je tedy výhodnější použití MEKC či CEC, což jsou kapilární elektromigrační metody kombinující elektromigraci s chromatografickým principem separace^[7]. CE se ukázala jako výborný nástroj pro separaci selektivních endoproteázových a chemických proteinových hydrolyzátů. Za optimálních podmínek může tedy poskytnout peptidové mapy porovnatelné nebo i lepší kvality než za využití HPLC. Cobb a Novotný v roce 1989 porovnali absolutní citlivost při mikrokolonovém peptidovém mapování pomocí HPLC a CZE. Ukázalo se, že pro separaci pomocí mikrokolonové HPLC je třeba alespoň 4 pmol tryptického hydrolyzátu β -kaseinu, zatímco stejná CE-separace může být uskutečněna pouze s 80 fmol hydrolyzátu^[35].

5. Experimentální část

5.1. Enzymatické štěpení proteinů

5.1.1. Přístrojové vybavení

- Centrifugační filtr Nanosep 0,2 μm , modifikovaný nylon. Pall Corporation, USA
- Třepačka s termostatem Thermo-Shaker TS-100c, Biosan, Lotyšsko
- Centrifuga MiniSpin Plus, Eppendorf, Německo

5.1.2. Použité chemikálie

- Ultračistá voda byla produkována systémem Milli-Q plus (Millipore, Bedford, MA, USA)
- Tris(2-karboxyethyl)fosfin monohydrát (TCEP), $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, USA
- Deoxycholát sodný (SDC), Sigma-Aldrich, USA
- Imobilizovaný trypsin (*jako složka komerční soupravy SMART*), Thermo Fisher Scientific, USA
- SMART digest buffer (*jako složka komerční soupravy SMART – výrobce neposkytuje přesné složení daného pufru*), dále jen SMART pufr; Thermo Fisher Scientific, USA
- Modifikovaný trypsin, čistota pro sekvenování, Promega, USA
- Cystein bezvodý, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina trifluoroctová (TFA), 99%, Sigma-Aldrich, USA

5.1.3. Modelové proteiny

- Myoglobin z koňského srdce, $\geq 90\%$, $M_r = 17600$ Da, Sigma-Aldrich, USA
- Monoclonal Antibody Reference Material 8671, $M_r = 150$ kDa, NIST, USA

5.1.4. Postup enzymatického štěpení za využití komerční soupravy SMART Digest Kit

a) Myoglobin:

Navážka myoglobinu byla rozpuštěna ve vodě za vzniku roztoku o koncentraci 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Pět μl tohoto roztoku bylo naředěno vodou na objem 50 μl . Tímto způsobem naředěný vzorek byl kvantitativně přenesen do mikrozkušavky s imobilizovaným tryptinem (SMART digest tube), ke kterému bylo přidáno 150 μl SMART pufru. Po promíchání

roztoku probíhalo enzymatické štěpení za teploty 70 °C a 1400 otáčkách za minutu (dále ot/min) na třepačce s termostatem. Štěpení trvalo dvě hodiny.

Po štěpení byl imobilizovaný trypsin oddělen od roztoku peptidů desetiminutovou centrifugací při 14100 × g. Supernatant byl odebrán mikropipetou. V případech, kdy sraženinu imobilizovaného trypsinu nešlo kvalitně oddělit mikropipetou, byl použit centrifugační filtr.

b) Myoglobin s deoxycholátem sodným:

Byl použit roztok myoglobinu (20 µg/µl) v 2% roztoku deoxycholátu sodného ve vodě. Tento roztok byl naředěn destilovanou vodou tak, aby vzniklo 50 µl roztoku o výsledné koncentraci 1 µg/µl. Naředěný vzorek byl kvantitativně přenesen do mikrozkušavky s imobilizovaným trypsinem (SMART digest tube), ke kterému bylo přidáno 150 µl destilované vody. Po promíchání roztoku probíhalo enzymatické štěpení za teploty 70 °C a 1400 ot/min na třepačce s termostatem. Štěpení trvalo dvě hodiny.

Postup pro oddělení imobilizovaného trypsinu byl stejný jako v předchozím případě (viz bod a).

c) Protilátka NIST:

Roztok protilátky o koncentraci 10 µg/µl byl upraven tak, že 45 µl tohoto roztoku bylo smícháno s 5 µl destilované vody. Výsledná koncentrace protilátky byla 9 µg/µl. Do mikrozkušavky s imobilizovaným trypsinem bylo přidáno 150 µl SMART pufru a 50 µl roztoku protilátky. Obsah mikrozkušavky byl protřepán. Enzymatické štěpení probíhalo za teploty 70 °C a při 1400 ot/min. Štěpení by mělo trvat minimálně dvě hodiny.

Po štěpení byl roztok peptidů oddělen od imobilizovaného trypsinu pomocí centrifugy či centrifugačního filtru.

5.1.5. Postup enzymatického štěpení klasickou cestou

Dvacet µl roztoku protilátky NIST o koncentraci 10 µg/µl bylo smícháno s 20 µl 1M Tris-HCl, 5 µl 1% roztoku deoxycholátu sodného a 5 µl 50mM roztoku TCEP. Směs byla protřepána a zahřívala se 60 min za teploty 60 °C a 1000 ot/min. Po vychlazení bylo do směsi přidáno 5,56 µl 150mM roztoku jodoacetamidu v propanolu. Směs byla

protřepána a inkubována 30 min za pokojové teploty ve tmě. Po přidavku 6,18 μl 200mM roztoku cysteinu byla směs opět protřepána a inkubována 30 min za pokojové teploty ve tmě. Po inkubaci bylo do směsi přidáno 20 μl roztoku trypsinu o koncentraci 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Získaný roztok byl doplněn vodou na 200 μl a byl inkubován přes noc za teploty 37 °C při 1000 ot/min.

5.2. Úprava vzorků k HPLC analýze

5.2.1. Přístrojové vybavení

- SPE kolonky Oasis HLB 1cc 10 mg, Waters, USA
- Vakuový koncentrátor Concentrator Plus, Eppendorf, Německo

5.2.2. Použité chemikálie

- Ultračistá voda byla produkována systémem Milli-Q plus (Millipore, Bedford, MA, USA)
- Acetonitril 99,9%, HPLC čistota pro gradientovou eluci, Sigma-Aldrich, USA
- Methanol 99,9%, VWR International, USA
- TFA 99%, Sigma-Aldrich, USA
- Dichlormethan, Sigma-Aldrich, USA

5.2.3. Postup úpravy vzorků k HPLC analýze

a) Intaktní myoglobin

Roztok myoglobinu o koncentraci 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ byl naředěn dvakrát jednoprocenním roztokem TFA ve vodě. Výsledná koncentrace roztoku myoglobinu byla 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

b) Hydrolyzát myoglobinu

Čtyřicet μl hydrolyzátu získaného enzymatickým štěpením roztoku myoglobinu pomocí komerční soupravy SMART bylo napipetováno do mikrozkušavky, do které bylo přidáno 40 μl 1% roztoku TFA ve vodě. Obsah mikrozkušavky byl protřepán a následně centrifugován po dobu 5 min při 14100 \times g. Padesát μl tohoto roztoku bylo napipetováno do vialky. Výsledná koncentrace roztoku byla 0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

c) Hydrolyzát myoglobinu: stanovení doby úplného rozštěpení

Během enzymatického štěpení (viz 5.1.4, bod a) byly po 5, 10, 20, 40, 60, 90 a 120 min odebrány alikvoty (25 µl), které potom byly umístěny do mikrozkuvek s 25 µl 1% (v/v) roztoku TFA pro zástavu štěpení. 40 µl takovým způsobem získaného roztoku bylo napipetováno do mikrozkuvky. Do stejné zkuvky pak bylo přidáno 40 µl 1% (v/v) roztoku TFA ve vodě. Obsah mikrozkuvky byl protřepán a následně centrifugován po dobu 5 min. Padesát µl tohoto roztoku bylo napipetováno do vialky pro HPLC analýzu. Jeho výsledná koncentrace byla 0,0625 µg/µl.

d) Intaktní protilátka NIST

Pět µl základního roztoku protilátky o koncentraci 10 µg/µl bylo smícháno s 39 µl destilované vody a 0,22 µl 99% TFA. Tento roztok protilátky měl koncentraci 1,136 µg/µl.

e) Hydrolyzát protilátky NIST s redukcí

Roztok peptidů po enzymatickém štěpení (viz 5.1.4, bod c) byl smíchán s 10 µl redukčního činidla TCEP a zahříván na třepačce s termostatem (30 min, 60 °C, 1000 ot/min). Výsledná koncentrace byla 2,143 µg/µl. Čtyřicet µl zredukovaného roztoku rozštěpené protilátky bylo smícháno se 40 µl 1% (v/v) roztoku TFA ve vodě. Padesát µl tohoto roztoku bylo použito pro analýzu ($c = 1,07 \mu\text{g}/\mu\text{l}$).

f) Hydrolyzát protilátky NIST bez redukce

Ke 40 µl hydrolyzátu NIST získaného za neredukujících podmínek (viz 5.1.4, bod c) bylo přidáno 40 µl 1% (v/v) roztoku TFA ve vodě. Obsah mikrozkuvky byl protřepán, pak byl odstředován po dobu 5 min při 14100 × g. 50 µl tohoto roztoku bylo přeneseno do HPLC vialky. Výsledná koncentrace peptidů v tomto roztoku byla 1,125 µg/µl.

g) Hydrolyzát protilátky NIST klasickou cestou

Po inkubaci (viz 5.1.5) byl roztok okyselen 20 μl 10% (v/v) roztoku TFA ve vodě a následně inkubován 10 min ve tmě za pokojové teploty. Sraženina byla odstředěna při 14100 \times g, čirý roztok byl přenesen do nové zkumavky. Poté byla provedena extrakce na tuhou fázi za využití SPE kolonek Oasis HLB dle tohoto postupu:

- Aktivace: methanol, 1 ml
- Ekvilibrace: 0,1% TFA, 1 ml
- Nanesení vzorku
- Promytí: 0,1% TFA, 1 ml
- Promytí: dichlormethan, 0,5 ml
- Promytí: 0,1% TFA, 1 ml
- Eluce: acetonitril : H₂O (8 : 2), 0,5 ml

Eluát byl odpařen v koncentrátoru za pokojové teploty. Zbytek po odpaření byl rozpuštěn ve 200 μl 0,1% TFA. Finální koncentrace hydrolyzátu byla 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

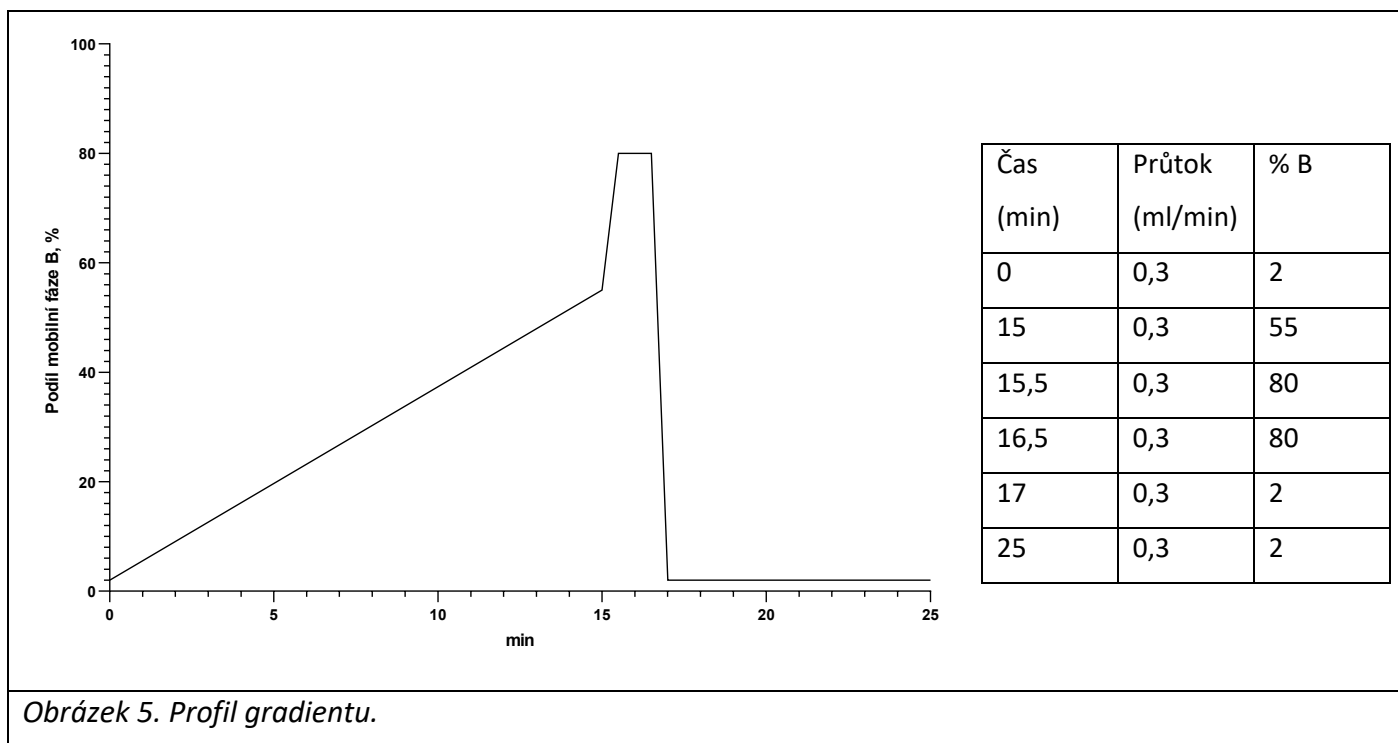
5.3. Kontrola enzymatického štěpení pomocí HPLC

5.3.1. Přístrojové vybavení

- Kapalinový chromatograf UltiMate 3000 RS, Thermo Fisher Scientific, USA
- Kolony:
 - Halo Peptide ES-C18, 160 Å, 2 μm , 2,1 \times 150 mm, Advanced Materials Technology, USA
 - BioResolve RP mAb Polyphenyl, 450 Å, 2,7 μm , 2,1 \times 150 mm, Waters, USA

5.3.2. Podmínky HPLC analýzy

Jako mobilní fáze pro HPLC analýzu byl použit 0,1% (v/v) roztok TFA ve vodě (A) a 0,1% (v/v) roztok TFA v acetonitrilu (B). Byla použita gradientová eluce, jejíž profil je uveden na obrázku 5:



Jako slepý vzorek se při všech měřeních použila mobilní fáze A.

Teplota na koloně:

Kolona BioResolve byla termostatována na 40 °C. Teplota na koloně Halo Peptide byla nastavena na 60 °C.

Objem nástřiku:

Objem nástřiku jednotlivého vzorku byl vždy zvolen tak, aby byl na kolonu dávkován

1 µg analytů.

5.4. Kapilární elektroforéza

5.4.1. Přístrojové vybavení

- CE-systém 7100, Agilent Technologies, USA
- SPE kolonky Oasis HLB 1cc 10 mg, Waters, USA
- Koncentrátor Concentrator Plus, Eppendorf, Německo
- Stříkačkové filtry Agilent Captiva Econofilter, 25 mm, 0,45 μm , nylon. Agilent Technologies, USA
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec, Bandelin, Německo
- pH-metr SI400, Sentron, Nizozemsko
- PVA-kapilára (šarže: BHCG02A), Agilent Technologies, USA
Vnitřní průměr: 50 μm ; efektivní délka: 56 cm; celková délka: 64,5 cm

5.4.2. Použité chemikálie

- Kyselina octová 100%, VWR International, USA
- Kyselina mravenčí 98%, Sigma-Aldrich, USA
- Ultračistá voda byla produkována systémem Milli-Q plus (Millipore, Bedford, MA, USA)
- Methanol 99,9%, VWR International, USA
- TFA 99%, Sigma-Aldrich, USA
- Acetonitril 99,9%, HPLC čistota pro gradientovou eluci, Sigma-Aldrich, USA
- 1M roztok NaOH ve vodě
- 1M roztok amoniaku ve vodě
- Hydrogenuhličitan amonný, $\geq 90\%$, Sigma-Aldrich, USA

5.4.3. Testované vzorky

- Lidský fibrinopeptid B, $\geq 90\%$, $M_r = 1570,57 \text{ Da}$, Sigma-Aldrich, USA
- Myoglobin z koňského srdce, $\geq 90\%$, $M_r = 17600 \text{ Da}$, Sigma-Aldrich, USA
- Monoclonal Antibody Reference Material 8671, $M_r = 150 \text{ kDa}$, NIST, USA

5.4.4. Příprava roztoků

a) Mravenčanový pufr (BGE):

Do kádinky s 30 ml destilované vody byl přidán potřebný objem 98% kyseliny mravenčí (viz Tabulka 3). Hodnota pH byla upravena pomocí 1M roztoku NaOH na hodnotu 3,0. Tento roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky a objem byl upraven destilovanou vodou na 100,0 ml.

Množství 98% HCOOH, μ l	115,5	231	346,5	462	577,5
Výsledná koncentrace, mmol/l	30	60	90	120	150

b) Roztoky kyseliny octové (BGE)

Do kádinky s 30 ml destilované vody byl přidán potřebný objem 100% kyseliny octové (viz Tabulka 4). Tento roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky a objem byl upraven destilovanou vodou na 100,0 ml.

Množství 100% CH ₃ COOH, ml	0,5	1	1,5	2
Výsledná koncentrace, %	0,5	1	1,5	2
Výsledná koncentrace, mmol/l	87,4	174,8	262,2	349,6
Výsledné pH	2,82	2,75	2,64	2,59

c) 10mM hydrogenuhličitanový pufr, pH 8,5:

Do nádoby s 30 ml destilované vody bylo přidáno 79 mg hydrogenuhličitanu amonného. Hodnota pH byla upravena na hodnotu 8,5 pomocí 1M roztoku NH₃ ve vodě. Dále byl roztok doplněn destilovanou vodou na 100 ml. Před použitím byl tento roztok filtrován přes stříkačkový filtr.

5.4.5. Příprava vzorků

5.4.5.1. Příprava vzorků hydrolyzátu myoglobinu a protilátky NIST

Enzymatické štěpení proteinů bylo provedeno podle kapitoly 5.1.4.

Získaný hydrolyzát byl okyselen TFA (0,5-1%) a poté byl odsolen pomocí SPE za využití kolonek Oasis HLB:

- Aktivace: methanol, 1 ml
- Ekvilibrace: 0,1% TFA, 1 ml
- Nanesení vzorku
- Promytí: 0,1% TFA, 1 ml
- Eluce: acetonitril : H₂O (8 : 2), 0,5 ml

Eluát byl vysušen v koncentrátoru za pokojové teploty. Zbytek po vysušení byl rozpuštěn ve vhodném objemu 10mM pufru z hydrogenuhličitanu amonného, aby vznikl roztok peptidů o požadované koncentraci. Vialka se směsí peptidů v pufru byla na 2 min ponořena do ultrazvukové lázně pro odplynění. Poté byl vzorek přímo dávkován do CE-systému.

5.4.5.2. Příprava dalších vzorků

Lidský fibrinopeptid B

Byl použit základní roztok lidského fibrinopeptidu B ve vodě o koncentraci 1 µg/µl. Daný roztok byl smíchán s 10mM hydrogenuhličitanovým puftrem o pH 8,5 v poměru 1:9. Vzniklý roztok o koncentraci 0,1 µg/µl byl dále přenesen do vialky, která před vlastní aplikací do CE-systému byla na 2 min ponořena do ultrazvukové lázně pro odplynění.

5.4.6. Základní podmínky CE-analýzy

Níže uvedené hodnoty platí pro všechny experimenty.

Separační napětí: + 30 kV

Tlak hydrodynamického dávkování: 50 mbar po dobu 20 až 80 s

Teplota kapiláry: 20 °C

5.4.7. Promytí kapiláry

Před prvním použitím kapiláry byla provedena její kondicionace. V jejím průběhu byla kapilára promývána methanolem po dobu 600 s, destilovanou vodou 900 s a potom roztokem BGE 1200 s.

Na začátku dne (tj. před první analýzou) byla kapilára promývána roztokem BGE po dobu 600 s.

Před každou analýzou byla PVA kapilára promývána roztokem BGE po dobu 300 s. Elektroda a kapilára na vstupní straně kapiláry byla následně opláchnuta 10mM roztokem hydrogenuhličitanového pufru o pH 8,5, aby se zabránilo přenosu BGE do vialky se vzorkem. Po nástřiku vzorku za tlaku 50 mbar byl vždy proveden nástřik BGE za stejného tlaku po dobu 5 s. Pro promývání kapiláry roztokem BGE a pro nadávkování krátké zóny BGE byly použity samostatné vialky a to z důvodu zamezení kontaminace vialek s roztokem BGE pro samotnou separaci.

Na konci každé sekvence byla kapilára promývána destilovanou vodou po dobu 600 s a potom profouknuta vzduchem po dobu 120 s. Tlak pro promytí byl vždy 1000 mbar.

5.4.8. Výpočty

1. Výběrová směrodatná odchylka

$$SD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - x_p)^2}$$

Rovnice 6

SD – výběrová směrodatná odchylka; N – počet pokusů; x_i – naměřená hodnota;
 x_p – průměr naměřených hodnot.

2. Relativní směrodatná odchylka

$$RSD = \frac{SD \times 100\%}{x_p}$$

Rovnice 7

RSD – relativní směrodatná odchylka [%]; SD – výběrová směrodatná odchylka; x_p –
průměr naměřených hodnot.

3. Píková kapacita^[36]

$$C_p = 1 + \frac{\Delta t}{1,7 \times w_{0,5}}$$

Rovnice 8

C_p – píková kapacita; Δt – časový rozdíl mezi prvním a posledním píkem na
elektroferogramu [s]; $w_{0,5}$ – šířka píku v polovině výšky [s].

4. Počet teoretických pater

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_m}{w_{0,5}}\right)^2$$

Rovnice 9

N – počet teoretických pater; t_m – migrační čas [s]; $w_{0,5}$ – šířka píku v polovině výšky [s].

5. Poměr signálu k šumu

$$\frac{S}{N} = \frac{H}{h}$$

Rovnice 10

S/N – poměr signálu k šumu; H – výška píku [mAu]; h – šum v nejbližším rozsahu [mAu].

6. Výsledky a diskuze

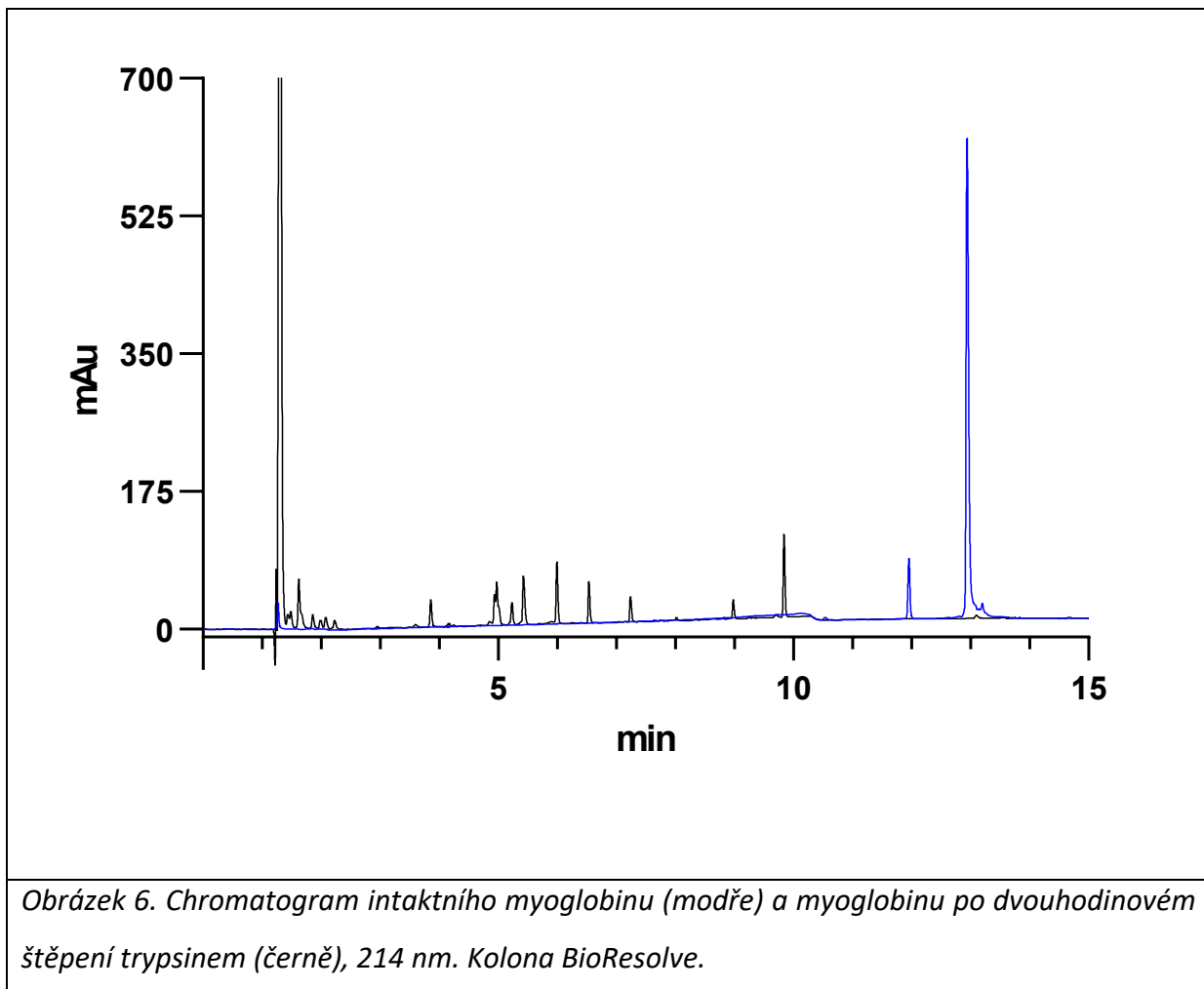
6.1. Enzymatické štěpení proteinů a jeho hodnocení pomocí HPLC

6.1.1. Počáteční hodnocení efektivity komerční soupravy SMART

Pro počáteční hodnocení účinnosti enzymatického štěpení proteinů pomocí kitu SMART byla použita jednodušší a levnější bílkovina, tj. koňský myoglobin. Principem fungování SMART Digest Kit je enzymatické štěpení proteinů imobilizovaným trypsinem.

Pro peptidové mapování i pro analýzu intaktního myoglobinu byla použita kolona BioResolve RP mAb. Jedná se o reverzní fázi, u které je silikagel funkcionalizován polyfenylovými zbytky. Velikost povrchově porézních částic je 2,7 μm . Tento typ kolony byl vyvinut přímo pro analýzu intaktních proteinů, především monoklonálních protilátek^[37].

Tato kolona byla zvolena, protože u prvních experimentů existovalo riziko přítomnosti nerozštěpeného myoglobinu ve vzorku. Použití stacionární fáze s drobnějšími póry, jako např. u Halo Peptide ES-C18 s velikostí pórů 160 Å, by bylo rizikové z hlediska možnosti zanesení kolony nerozštěpeným proteinem. Jak je patrné na obrázku 6, tak původní píky odpovídající intaktnímu myoglobinu nebyly ve vzorku obsahujícím hydrolyzát myoglobinu detekovány. Enzymatické štěpení myoglobinu pomocí kitu SMART tedy proběhlo v plné míře.



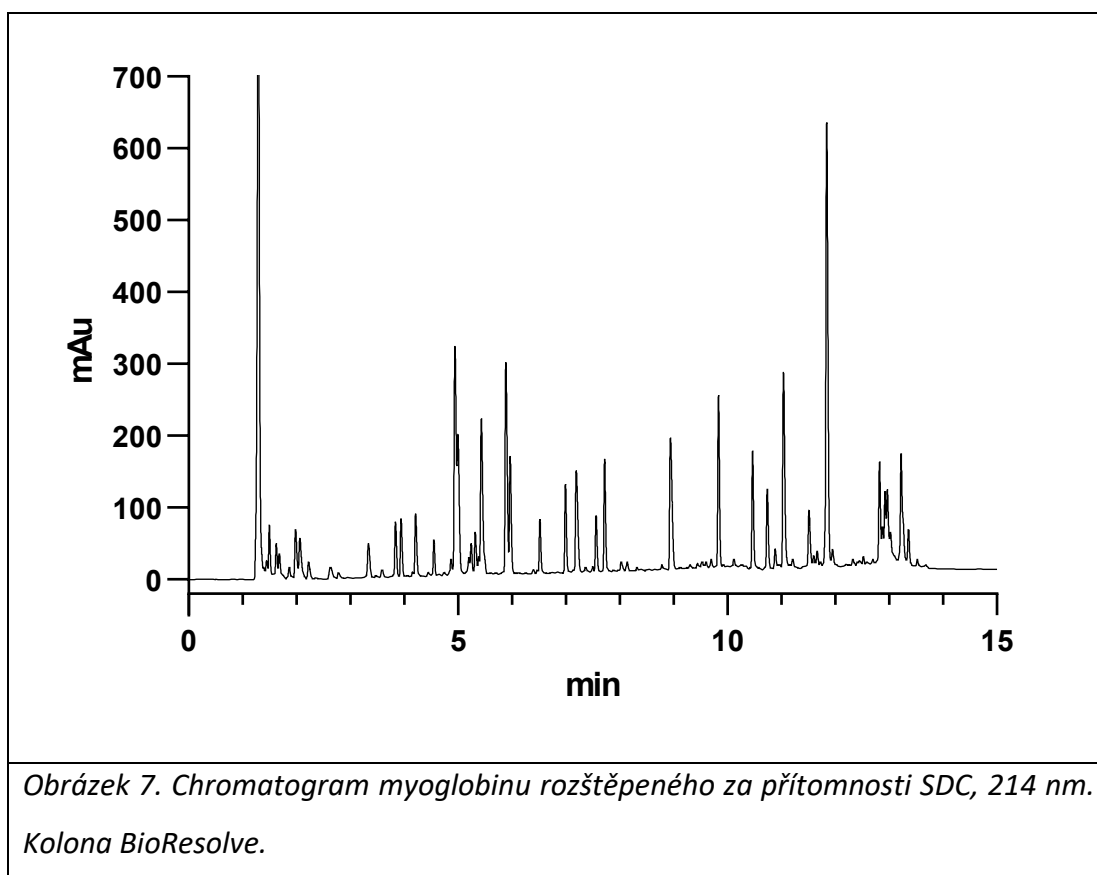
Obrázek 6. Chromatogram intaktního myoglobinu (modře) a myoglobinu po dvouhodinovém štěpení trypsinem (černě), 214 nm. Kolona BioResolve.

6.1.2. Štěpení myoglobinu za přítomnosti deoxycholátu sodného

Deoxycholát sodný (SDC) je solubilizačním činidlem často používaným pro zlepšení enzymatického štěpení proteinů^[38].

Proto byl sledován vliv přítomnosti SDC na štěpení proteinů SMART metodou. Zde je ale nutné zmínit, že použití doplňkových činidel není obecně doporučeno v návodech k použití SMART digest kit^[39].

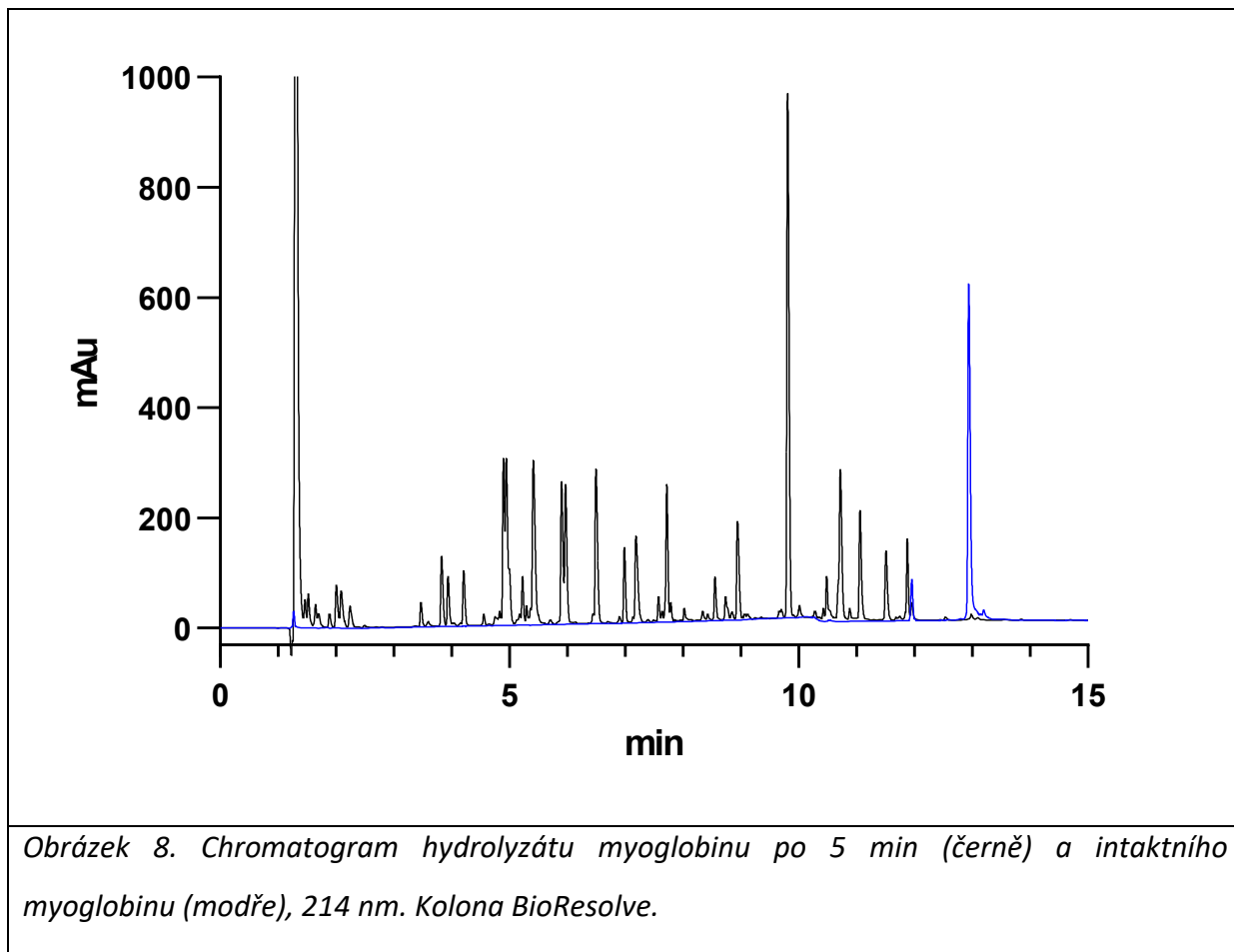
Náhrada SMART pufru destilovanou vodou je nezbytná, protože po přidání vzorku myoglobinu v roztoku deoxycholátu sodného do SMART pufru vzniká sraženina. SDC zřejmě není kompatibilní se SMART pufrům. Pro HPLC-analýzu byl vzorek upraven stejnou cestou jako hydrolyzát myoglobinu bez přítomnosti deoxycholátu sodného.



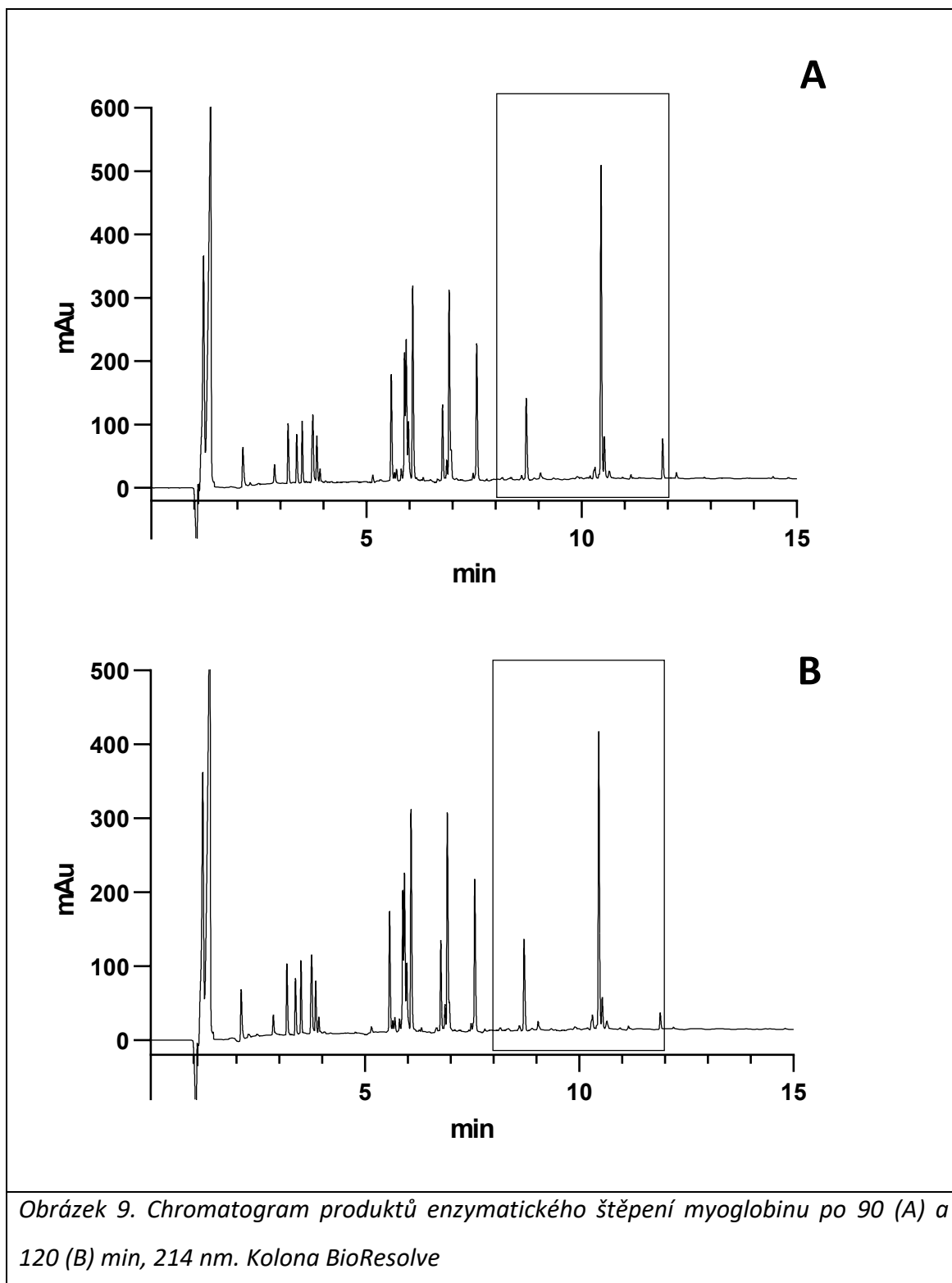
Jak je vidět na obrázcích 7 a 6, nelze s jistotou říci, jestli došlo k úplnému rozštěpení myoglobinu v prostředí deoxycholátu sodného. Na chromatogramu hydrolyzátu s využitím SDC pozorujeme píky s velmi podobným retenčním časem, jež by mohly odpovídat intaktnímu myoglobinu (retenční čas 11,9 a 13 min, obrázek 6) na chromatogramu intaktního myoglobinu. To je rozdíl oproti štěpení za použití SMART pufru, kde žádný z těchto píků po 120 min nepozorujeme (viz obrázek 6). Na druhou stranu je peptidová mapa po štěpení s SDC bohatší než bez jeho přidavku, jak vyplývá z porovnání chromatogramů na obrázcích 6 a 7. Vzhledem k tomu, že enzymatické štěpení pomocí kitu SMART v přítomnosti SDC s největší pravděpodobností neproběhlo po dvou hodinách kvantitativně, bylo od dalších pokusů s SDC upuštěno.

6.1.3. Stanovení minimální doby nutné pro rozštěpení myoglobinu

Pík myoglobinu byl pod limitem kvantifikace už po 5 min enzymatického štěpení (viz obrázek 8).



V rozmezí 5-90 min se profil peptidové mapy měnil. K jeho ustálení došlo po 90 min štěpení.



Obrázek 9. Chromatogram produktů enzymatického štěpení myoglobinu po 90 (A) a 120 (B) min, 214 nm. Kolona BioResolve

Jak je vidět na obrázcích 9A a 9B, určité rozdíly lze pozorovat i na chromatogramech zobrazujících peptidové mapy po 90 a 120 min štěpení. To je nejlépe vidět u píků s retenčním časem mezi 8. a 12. min (označená oblast). Na obrázku 9B pozorujeme mírný pokles píků v daném rozmezí, nepozorujeme ale růst žádných píků v porovnání

s chromatogramem 90min štěpení (obrázek 9A), což bychom mohli očekávat, kdyby po 90 min pořád probíhaly procesy enzymatického štěpení. Rozdíl ve výšce píků v rozmezí 8-12 min lze vysvětlit adsorpcí lipofilních peptidů, které pozorujeme na konci chromatogramu, na stěnu plastové mikrozkušavky. Čím déle se dané peptidy nacházejí ve zkumavce, tím je větší podíl adsorbovaných peptidů a tím je i menší obsah těchto peptidů v roztoku vzorku. Lze tedy konstatovat, že pro dostatečné štěpení myoglobinu pomocí kitu SMART stačí 90 min.

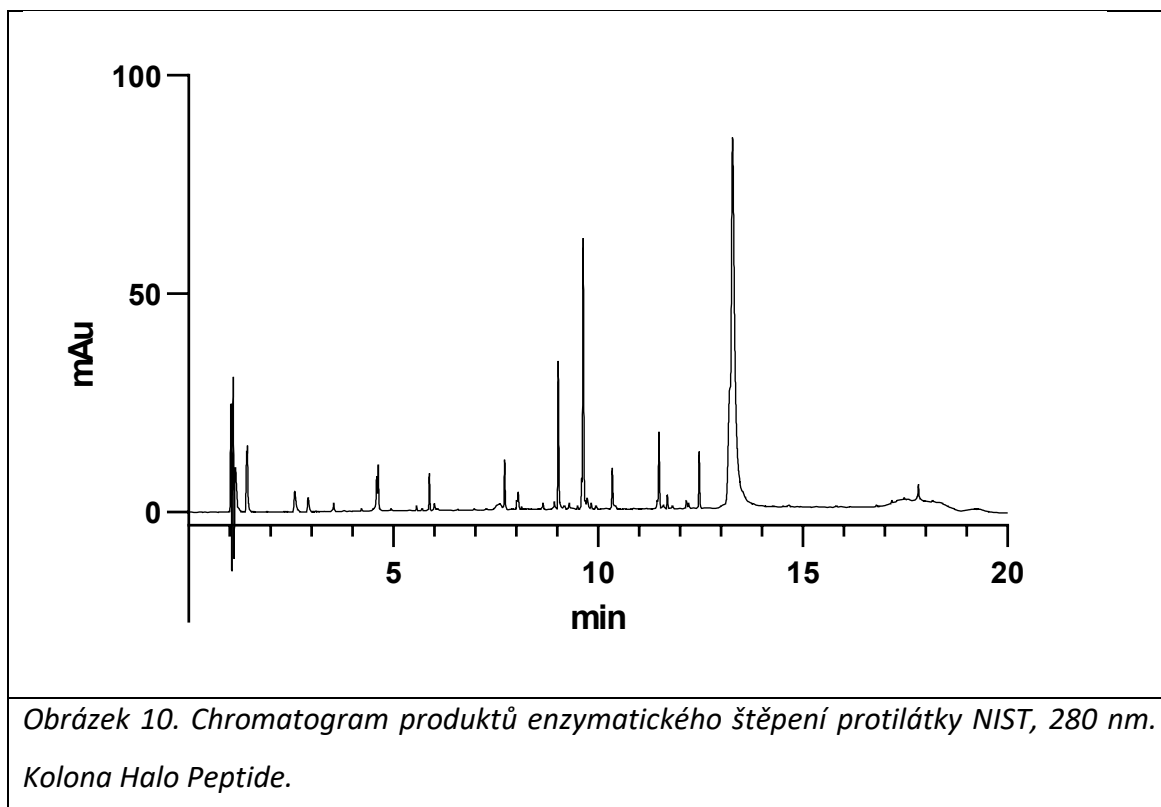
6.1.4. Enzymatické štěpení protilátky NIST SMART metodou.

Optimalizace doby štěpení protilátky NIST

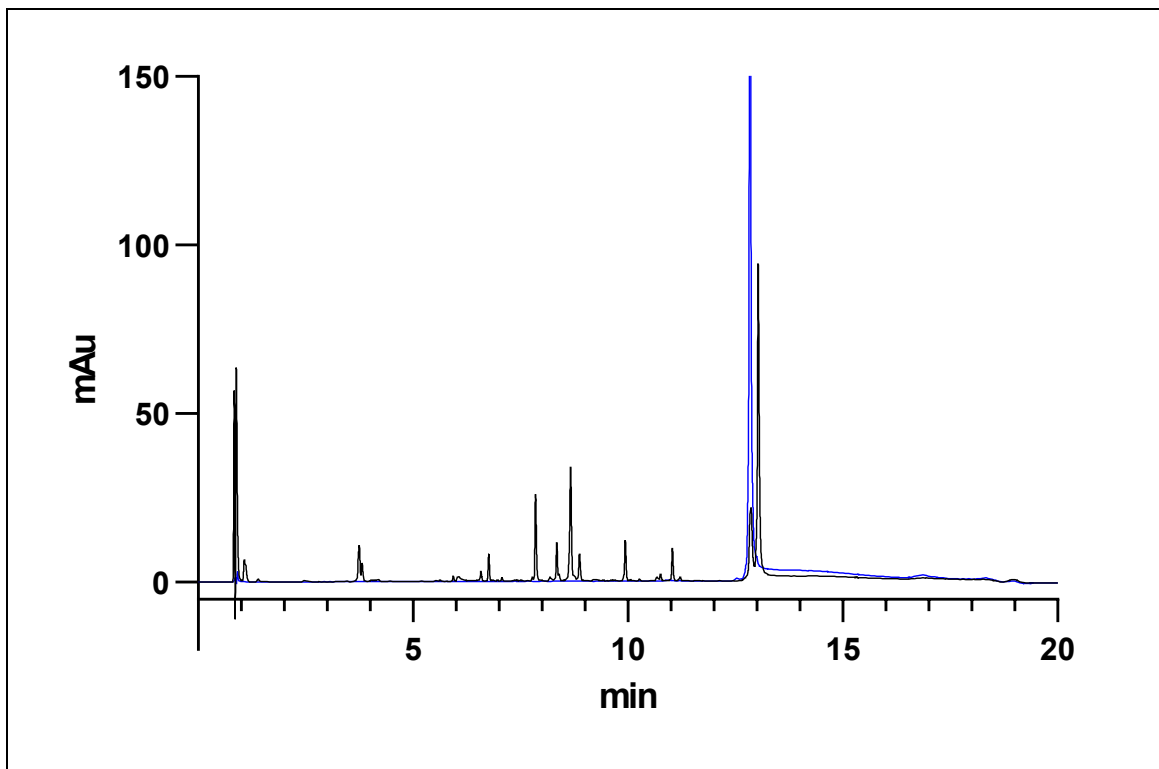
Jako další modelový protein pro enzymatické štěpení byla vybrána referenční monoklonální protilátka NIST, která se používá jako modelová protilátka pro vyhodnocení výkonnosti metod, které slouží ke zkoumání fyzikálně-chemických a biofyzikálních vlastností monoklonálních protilátek^[40].

Enzymatické štěpení trvalo nejprve 2 hodiny. HPLC separace pro kontrolu štěpení nejprve probíhaly na koloně Halo Peptide ES-C18 s velikostí pórů 160 Å. Daná kolona je vhodná pro práci s proteiny a peptidy s molekulovou hmotností pod 20 kDa a měla by dosahovat lepších hodnot šířky, výšky a píkové kapacity, než kolona BioResolve^[41].

Na rozdíl od minulých experimentů s myoglobinem, při práci s protilátkou NIST byla pro hodnocení kvality enzymatické hydrolýzy použita detekce při vlnové délce 280 nm. Důvodem je lepší kvalita chromatogramů hydrolyzátu protilátky při dané vlnové délce.



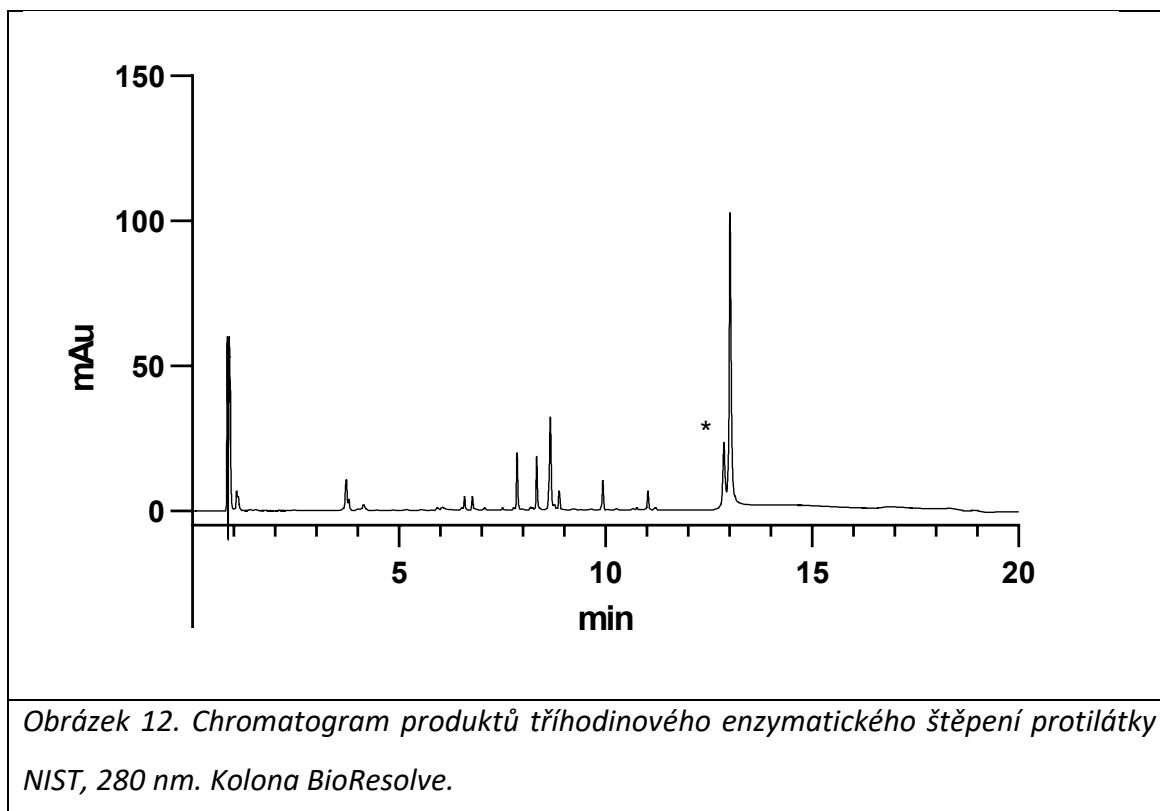
Na chromatogramech pozorujeme poměrně velký počet píků, které odpovídají peptidům vzniklých v průběhu enzymatického štěpení. Původ majoritního píku s retenčním časem 13,5 min ale nebyl úplně jasný. Tento pík může odpovídat jak samotné protilátce, tak se může jednat i o jeden z produktů štěpení. Proto bylo nutné porovnat chromatogram produktů štěpení NIST s chromatogramem intaktní protilátky. Pro tento účel byla provedena separace na HPLC koloně BioResolve o porozitě 450 Å. Jak již bylo zmíněno dříve (viz kapitola 6.1.1.), kolona Halo Peptide o porozitě 160 Å není vhodná pro analýzu intaktních proteinů kvůli riziku ucpání kolony.



Obrázek 11. Porovnání chromatogramu intaktní protilátky NIST (modře) a chromatogramu produktů dvouhodinového enzymatického štěpení protilátky NIST (černě), 280 nm. Kolona BioResolve.

Jelikož má pík intaktní protilátky retenční čas velmi blízký retenčnímu času dvou píků, pozorovaných na chromatogramu peptidové mapy po dvouhodinovém štěpení (viz obrázek 11, retenční čas ~ 13 min), nelze vyloučit pravděpodobnost přítomnosti zbytků intaktní protilátky ve vzorku hydrolyzátu.

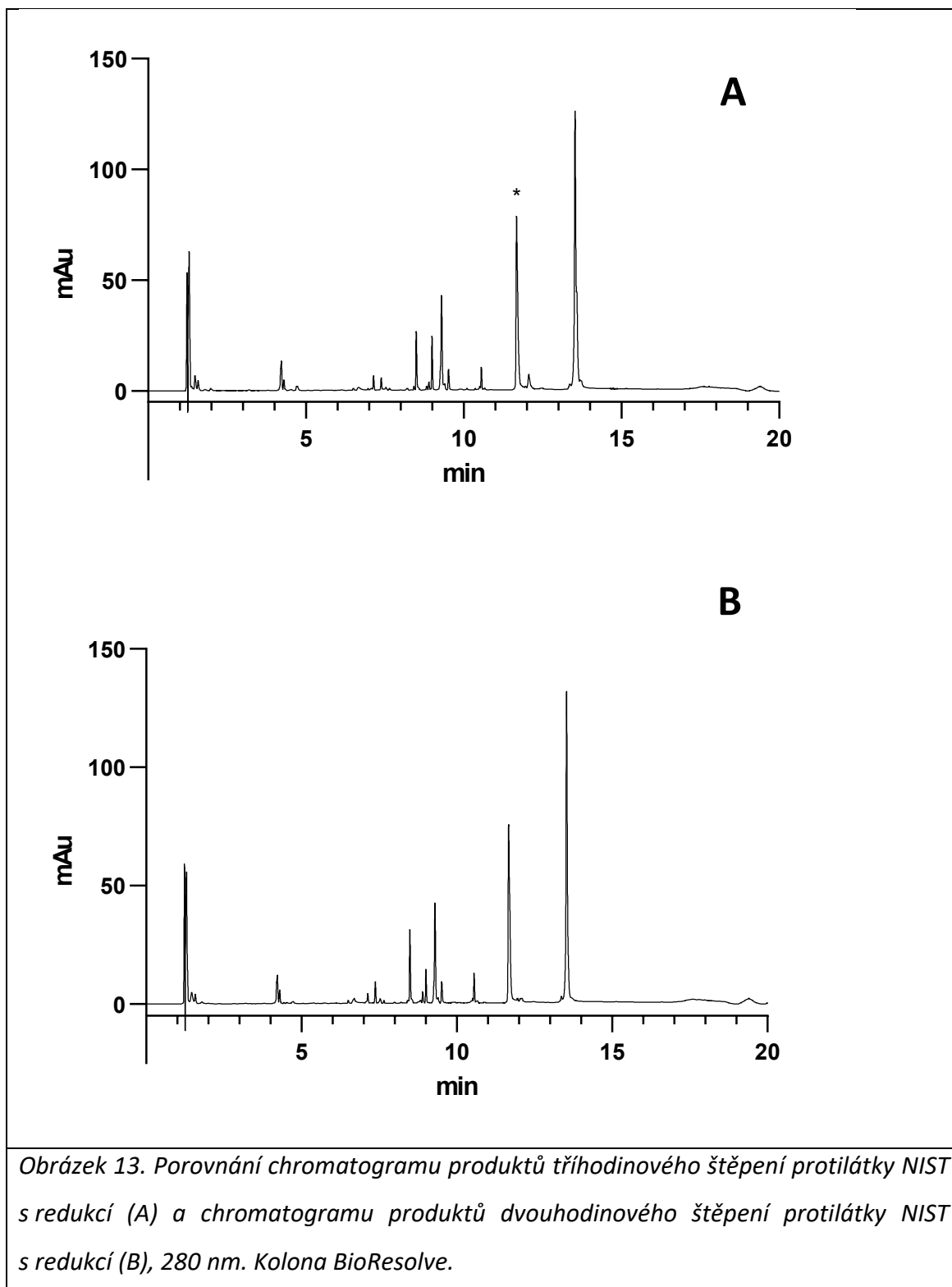
Proto bylo provedeno enzymatické štěpení po dobu 3 hodin. Výsledná peptidová mapa je zobrazena na obrázku 12.



Je vidět, že dvojitý pík s retenčním časem 13 min je přítomen i po 3 hodinách trypsinového štěpení, přičemž se jeho plocha viditelně nezměnila. Takový výsledek ale nesouhlasí s předpokladem o výskytu zbytků protilátky ve vzorku, protože v takovém případě bychom pozorovali znatelný pokles plochy jednoho z těchto dvou píků.

Pro získání podrobnější peptidové mapy byl hydrolyzát NIST redukován pomocí tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP). Dané činidlo redukuje disulfidické můstky, které jsou zachovány po trypsinovém štěpení. Na chromatogramu bychom měli pozorovat rozložení některých velkých píků na několik menších. Mohl by tedy zmizet i neznámý pík s retenčním časem ~ 13 min.

Výsledek HPLC-analýzy hydrolyzátu redukováného vzorku je zobrazen na obrázcích 13A a 13B.

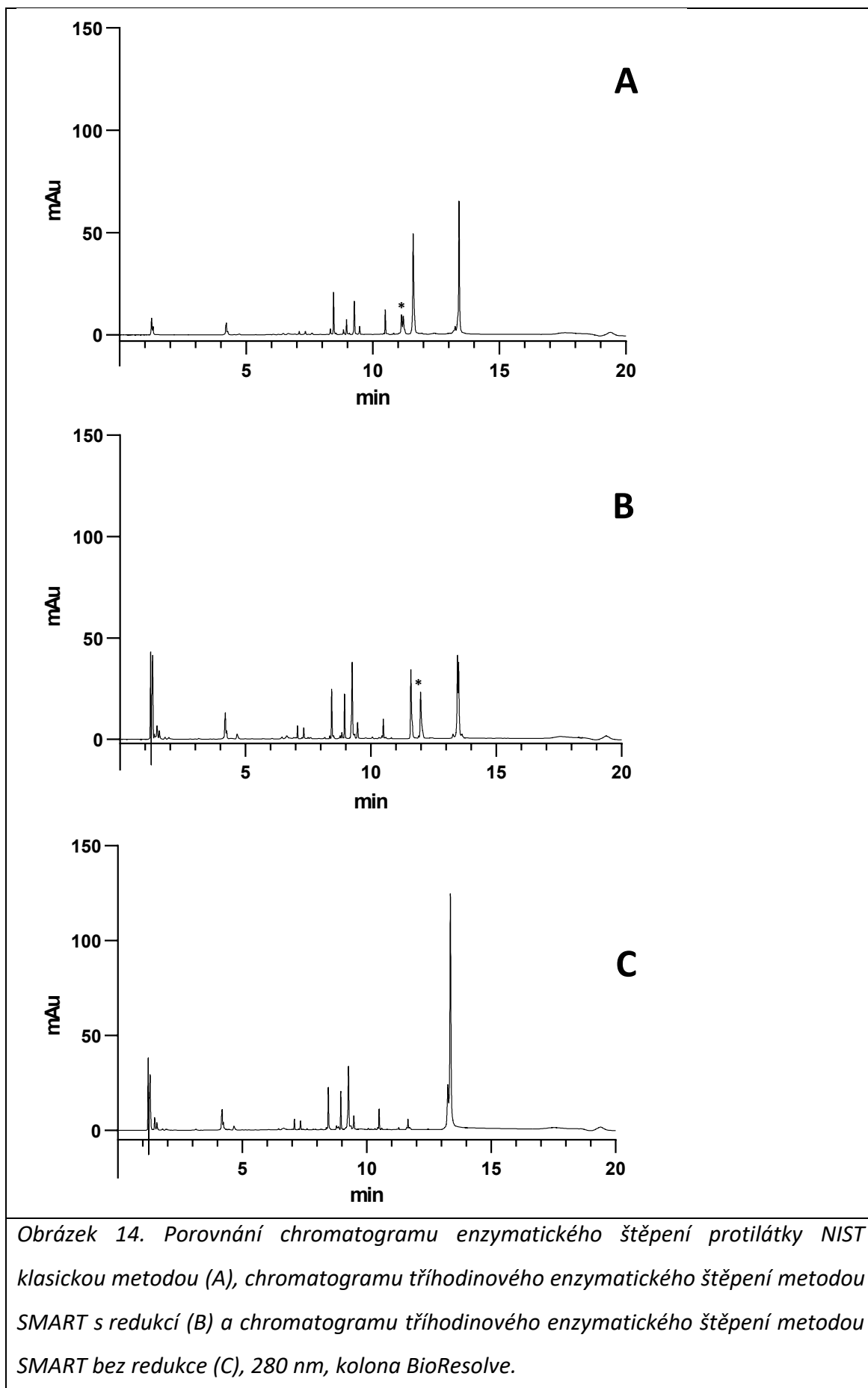


Je vidět, že chromatogramy dvou- a tříhodinového enzymatického štěpení se kvalitativně neliší, případné malé rozdíly ve výšce a poloze některých píků jsou pravděpodobně způsobené nedokonalou opakovatelností měření. Na obrázcích 12 a 13A vidíme, že většinu píků na chromatogramu neredukovaného hydrolyzátu můžeme

pozorovat i na chromatogramu redukovaného hydrolyzátu, musíme ale vzít v úvahu posun píků na chromatogramu redukovaného hydrolyzátu přibližně o 40 s – 1 min. To je pravděpodobně způsobené odchylkou měření. Kvalitativní rozdíly těchto dvou chromatogramů jsou na obrázcích 12 a 13A označeny hvězdičkou – pozorujeme zánik menšího píku s retenčním časem 12,9 min na chromatogramu neredukovaného vzorku a vznik velkého píku s retenčním časem 11,7 min na chromatogramu redukovaného vzorku. Velký pík s retenčním časem 13,5 min pořád pozorujeme na chromatogramu. Jelikož původ daného píku byl stále nejasný, nedá se posoudit kvalita enzymatického štěpení protilátky NIST metodou SMART bez porovnání s konvenční metodou.

6.1.5. Porovnání kvality konvenční a SMART metody enzymatického štěpení

Bylo provedeno štěpení protilátky NIST konvenčním způsobem s následným porovnáním kvality štěpení pomocí komerční soupravy SMART. Při analýze hydrolyzátu se použila kolona BioResolve. Výsledky HPLC-analýzy produktů štěpení protilátky konvenční metodou, a také metodou SMART (s redukcí i bez redukce hydrolyzátu) jsou zobrazeny na obrázcích 14A-14C.



Podle získaných dat se dá usoudit, že štěpení metodou SMART a štěpení klasickou metodou poskytují podobné peptidové mapy. Nejlépe to je vidět a obrázcích 14A a 14B – mnohé píky, např. píky s retenčním časem mezi 8 a 10 min, pík s retenčním časem 10,5 min a pík s retenčním časem 13,5 min pozorujeme na obou chromatogramech. Určité rozdíly ale pozorujeme například v rozmezí 11-12,5 min; zde lze pozorovat nejen odlišnou intenzitu signálů v peptidových mapách získaných za různých podmínek ale i kvalitativní profil se v této části peptidické mapy liší (kvalitativní rozdíly jsou na obr. 14A a 14B označeny hvězdičkou).

Je vidět, že redukce má příznivý vliv na kvalitu peptidové mapy, jak je patrné porovnáním chromatogramů na obrázcích 14B a 14C. U peptidové mapy po redukci hydrolyzátu pozorujeme pokles píku s retenčním časem 13,5 min a vznik dvou nových píků v rozmezí 11,5-12,5 min. Peptidová mapa po redukci hydrolyzátu je tedy podrobnější, a proto informativnější.

Pro další využití se tedy může použít jak štěpení SMART metodou s redukcí, tak i klasické enzymatické štěpení. Jelikož ale klasická metoda je velmi časově náročná a neposkytuje kvalitnější výsledek než štěpení SMART metodou, bude se pro další experimenty pomocí CE pracovat s enzymatickým hydrolyzátem získaným pomocí soupravy SMART s následnou redukcí.

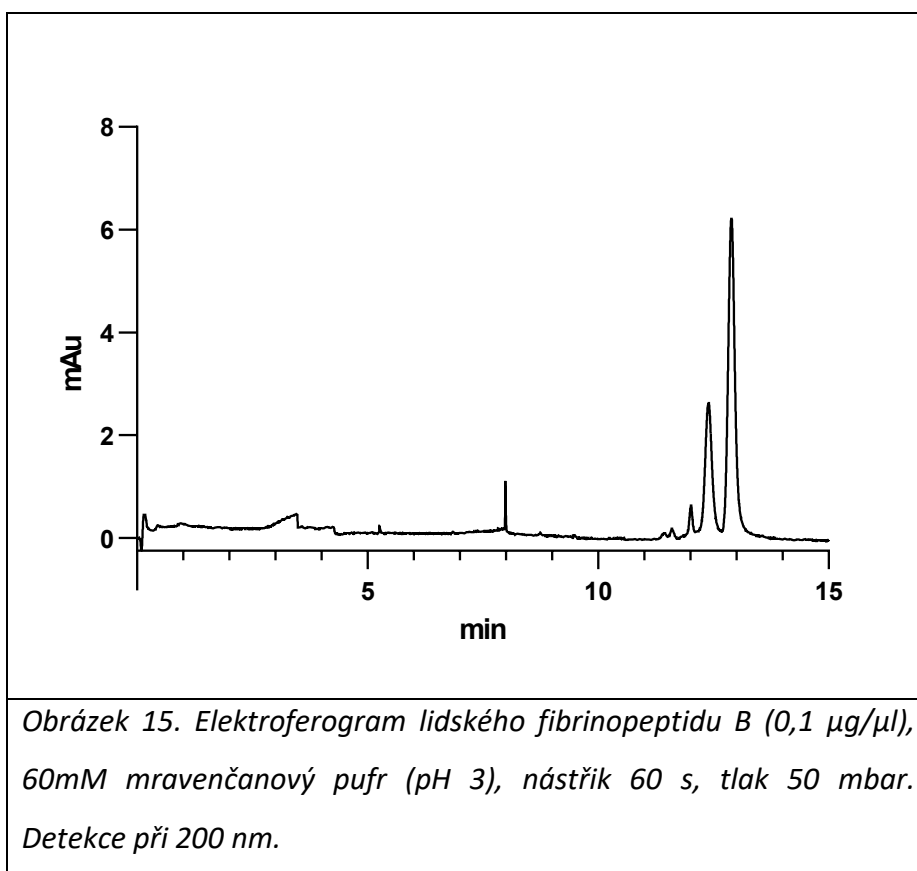
Původ velkého píku s retenčním časem mezi 13. a 14. min byl objasněn pomocí MS analýzy. Jednalo se o peptid vzniklý v průběhu enzymatického štěpení, a nikoliv o nerozštěpený zbytek protilátky. Štěpení protilátky NIST metodou SMART lze tedy považovat za úplné.

6.2. Peptidové mapování proteinů pomocí CE

6.2.1. Analýza lidského fibrinopeptidu B

Předběžné testy ukázaly, že analýza s rozpouštěním vzorku v destilované vodě, tedy bez využití on-line zakoncentrování, poskytuje málo informativní peptidové mapy z důvodu nízké citlivosti.

Pro počáteční hodnocení on-line zakoncentrování přechodným pH rozhraním se použil lidský fibrinopeptid B, který byl rozpuštěn v 10mM hydrogenuhličitanovém pufru o pH 8,5.



Na elektroferogramu peptidu jsou přítomny 3 píky (viz obr. 15). Ten jev se může vysvětlit přítomností různých izoform peptidu, které se podařilo rozseparovat. Vliv doby hydrodynamického dávkování na separaci byl optimalizován v rozmezí 30-120 s inkrementy po 30 s (viz tabulka 5).

Tabulka 5. Průměr dat z elektroferogramů lidského fibrinopeptidu B, 0,1 µg/µl, 200 nm. (n=3)

	1. pík			2. pík			3. pík		
	t _m	N	S/N	t _m	N	S/N	t _m	N	S/N
30s	12,6	119488	6	12,77	55378	34	12,95	96134	85
60s	12,0	139124	12	12,41	34152	52	12,90	39054	125
90s	11,7	72279	15	12,31	19203	51	13,17	14850	104
120s	11,4	82242	12	12,23	11143	53	13,43	5572	91

t_m – migrační čas [min], N – počet teoretických pater, S/N – poměr signálu k šumu

Je vidět, že poměr signálu k šumu pro třetí pík je nejvyšší při 60s nástřiku. Pro první pík je situace odlišná; jako nejvýhodnější z hlediska poměru signál/šum vypadá 90s nástřik. Pro druhý pík je rozdíl mezi 60s a 90s nástřikem nevýznamný. Když ale porovnáme počet teoretických pater při 60s a 90s dávkování, vidíme, že daná hodnota je podstatně vyšší pro 60s u všech hodnocených píků. To svědčí o vyšší separační účinnosti při 60s nástřiku. Pro další experimenty byl zvolen nástřik po dobu 60 s.

Pro hodnocení opakovatelnosti výsledků byla provedena analýza lidského fibrinopeptidu B následující den (viz tabulka 6). Porovnával se pouze 60s nástřik, podmínky měření zůstaly stejné.

Tabulka 6. Průměr dat z elektroferogramů lidského fibrinopeptidu B, 0,1 µg/µl, 200 nm. Nástřik 60 s. (n=3)

1. den	t _m	N	S/N	A
Pík 1	12,0	139124	12	3,23
Pík 2	12,4	34152	52	27,93
Pík 3	12,9	39054	125	64,23
2. den	t _m	N	S/N	A
Pík 1	11,8	172278	4	0,91
Pík 2	12,1	47551	45	19,77
Pík 3	12,5	50064	103	47,48

t_m – migrační čas [min], N – počet teoretických pater, S/N – poměr signálu k šumu, A – plocha píku

Je vidět, že plochy druhého a třetího píku byly první den vyšší. Poměr ploch mezi prvním a druhým dnem je ale zachován: 1,41 pro druhý pík a 1,35 pro třetí, což jsou blízké hodnoty.

Pro kvantitativní hodnocení opakovatelnosti a mezidenní přesnosti byla spočítána relativní směrodatná odchylka (viz rovnice 7) pro poměr signálu k šumu a plochy píků při nástřiku 60 s.

Jelikož signál prvního píku byl blízky mezi kvantifikace, opakovatelnost a mezidenní přesnost pro tento pík nebyla hodnocena.

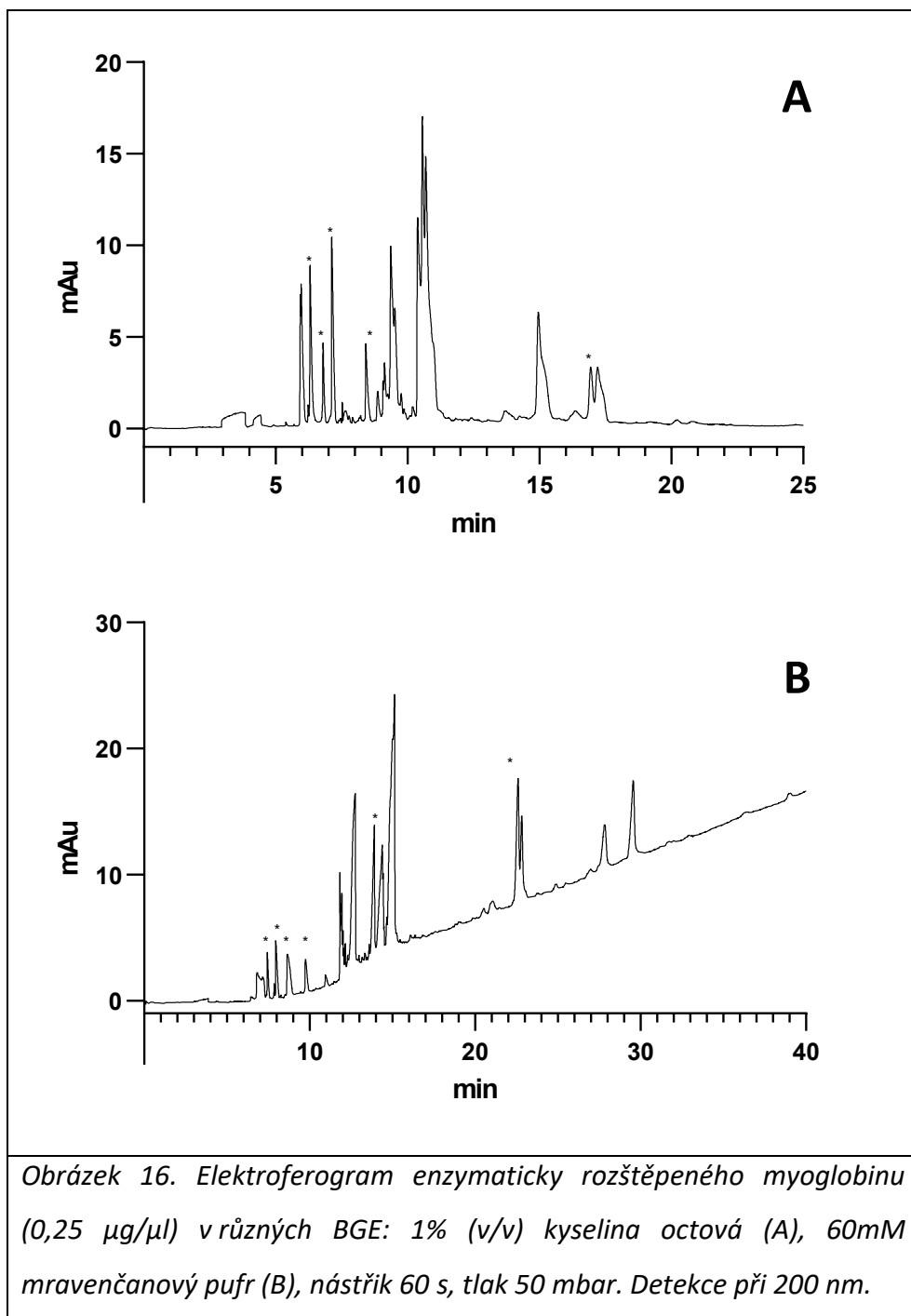
Pro tři analýzy během prvního dne byla hodnota RSD poměru signálu k šumu 11,05 % pro druhý pík a 11,86 % pro třetí pík. Relativní směrodatná odchylka plochy (n=3) měla hodnotu 1,32 % pro druhý pík a 0,55 % pro třetí, což je dobrý výsledek.

Mezidenní přesnost byla hodnocena ze šesti hodnot získaných ve dvou po sobě následujících dnech. Relativní směrodatná odchylka poměru signálu k šumu měla hodnotu 12,15 % pro druhý pík a 13,88 % pro třetí pík. Relativní směrodatná odchylka plochy byla 17,23 % pro druhý a 15,09 % pro třetí pík. Dané hodnoty svědčí o nízké mezidenní přesnosti. Jelikož ale pracujeme hlavně s kvalitativními parametry, tzn. s profily peptidových map, lze podobnou mezidenní přesnost uznat jako akceptovatelnou.

6.2.2. Analýza produktů hydrolýzy myoglobinu

Po získání uspokojivých výsledků s lidským fibrinopeptidem B byla provedena analýza SMART hydrolyzátu myoglobinu pomocí CZE s využitím on-line zakoncentrování přechodným pH rozhraním. Před samotnou CZE analýzou bylo nutno vzorek odsolit a rozpustit v 10mM roztoku hydrogenuhličitanu amonného o pH 8,5 (viz kapitola 5.4.6.1). Výsledná koncentrace peptidů ve vzorku byla 0,25 µg/µl. Odsolení vzorku pomocí extrakce na tuhou fázi bylo naprosto nezbytné, protože složky SMART pufru indukují vznik EOF v PVA kapiláře, který bychom v dané kapiláře neměli pozorovat.

Separace hydrolyzátu byla provedena ve dvou BGE: 1% (v/v) CH₃COOH a 60mM mravenčanovém pufru o pH 3,0. Nástřik trval 60 s, což je optimální doba dávkování podle výsledků předchozího experimentu. Získané elektroferogramy jsou zobrazeny na obrázcích 16A a 16B.



Na obrázcích 16A a 16B vidíme, že separace v prostředí kyseliny mravenčí je o 10 min, neboli 1,5krát, delší, než separace v kyselině octové. Na elektroferogramu odpovídajícímu separaci v prostředí kyseliny mravenčí pak pozorujeme růst základní linie.

Separace hydrolyzátu myoglobinu v obou elektrolytech byla porovnána na základě těchto kritérií: (i) počet píků, jejichž plocha byla vyšší než 3,0 a (ii) píková kapacita pro

daný separační systém (viz rovnice 8, kapitola 5.4.7.). Píky, které byly hodnoceny a použity pro výpočet píkové kapacity, jsou označeny na obrázcích 16A a 16B hvězdičkou. Data jsou shrnuta v tabulce 7.

Tabulka 7. Průměr dat z elektroferogramů hydrolyzátu myoglobinu (0,25 µg/µl), 200 nm. Nástřik 60 s. (n=3)

	1% (v/v) octová kyselina		60mM mravenčanový pufr	
	t_m	$w_{0,5}$	t_m	$w_{0,5}$
Pík 1	6,3	3,72	7,4	4,31
Pík 2	6,8	2,73	7,9	6,01
Pík 3	7,1	4,13	8,6	14,72
Pík 4	8,4	4,43	9,7	7,30
Pík 5	16,9	9,13	13,9	7,45
Pík 6	-	-	22,6	10,57
Průměr $w_{0,5}$	4,83		8,39	
t_α, t_ω	t_α : 352,8	t_ω : 1057,4	t_α : 406,7	t_ω : 2360,8
C_p	86		138	
Počet píků	33		22	

t_m – migrační čas [min], t_α – začátek prvního píku [s], t_ω – konec posledního píku [s], $w_{0,5}$ – šířka píku v polovině výšky [s], C_p – píkova kapacita

Je vidět, že více píků s plochou nad 3,0 bylo detekováno při použití kyseliny octové. Separace v prostředí pufru z kyseliny mravenčí poskytuje méně píků s plochou vyšší jak 3,0. Na druhou stranu je ale v tomto pufru vyšší rozlišení mezi jednotlivými píky. V prostředí 1% (v/v) CH_3COOH pozorujeme více komigrujících peptidů. V mravenčanovém BGE bylo dosaženo vyšší píkové kapacity ($C_p = 138$) než při separaci v 1% (v/v) CH_3COOH ($C_p = 86$)

6.2.3. Vliv koncentrace BGE na kvalitu peptidové mapy myoglobinu

Pro studium vlivu koncentrace BGE na separaci hydrolyzátu myoglobinu byly testovány BGE o koncentraci 30, 60, 90, 120 a 150 mM kyseliny mravenčí (pH 3,0). Podobně byl testován i vliv koncentrace kyseliny octové v BGE a to v rozmezí 0,5 až 2 % (viz tabulka 8).

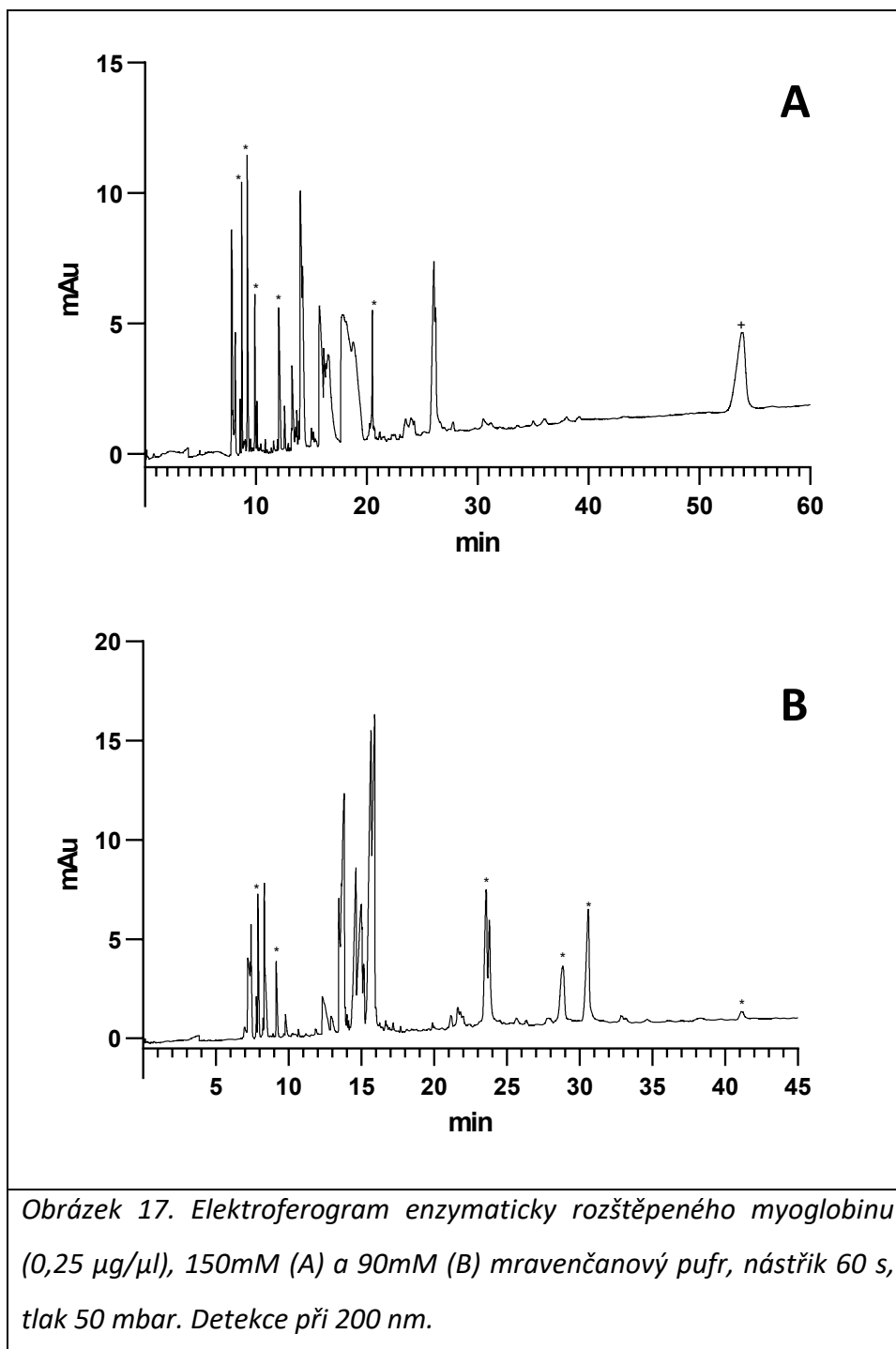
Tabulka 8. Průměr dat z elektroferogramů hydrolyzátu myoglobinu (0,25 µg/µl) v mravenčanovém BGE o různých koncentracích, 200 nm. Nástřik 60 s. (n=3)

	30mM mravenčanový pufr		60mM mravenčanový pufr		90mM mravenčanový pufr		120mM mravenčanový pufr		150mM mravenčanový pufr	
	t_m	$w_{0,5}$	t_m	$w_{0,5}$	t_m	$w_{0,5}$	t_m	$w_{0,5}$	t_m	$w_{0,5}$
Pík 1	8,4	2,93	7,8	4,98	7,9	4,04	8,3	3,42	8,7	3,06
Pík 2	10,2	4,06	14,7	9,65	9,2	4,64	8,8	8,13	9,2	4,16
Pík 3	12,7	4,16	16,1	19,63	23,6	11,18	9,5	3,57	10,1	3,25
Pík 4	13,6	9,64	24,2	12,68	28,8	18,00	11,8	9,85	12,1	7,04
Pík 5	20,7	18,55	30,8	20,88	30,6	13,83	25,2	14,20	20,5	3,27
Pík 6	27,3	13,50	32,8	15,28	41,2	17,50	41,5	88,58	53,8	50,48
Průměr $w_{0,5}$	8,81		13,85		11,53		21,29		11,88	
t_α, t_ω	$t_\alpha:$ 467,6	$t_\omega:$ 1664,0	$t_\alpha:$ 411,4	$t_\omega:$ 2676,6	$t_\alpha:$ 428,9	$t_\omega:$ 2492,6	$t_\alpha:$ 441,6	$t_\omega:$ 2578,8	$t_\alpha:$ 464,5	$t_\omega:$ 3273,8
C_p	81		97		106		60		140	
Počet píků	34		26		29		30		27	

t_m – migrační čas [min], t_α – začátek prvního píku [s], t_ω – konec posledního píku [s], $w_{0,5}$ – šířka píku v polovině výšky [s], C_p – píkova kapacita

Bylo zjištěno, že změny koncentrace mravenčanového pufru významně ovlivňují selektivitu metody.

Nejlepší hodnoty píkove kapacity při analýze za využití mravenčanového pufru jako BGE pozorujeme u koncentrací 90 mM a 150 mM. Je nutné ale vzít v úvahu, že při měření v 150mM mravenčanovém pufru se na elektroferogramu vyskytuje pík s vysokým migračním časem (viz obrázek 17A, daný pík je označen znaménkem plus), který nepozorujeme při měření za jiných podmínek. Existence daného píku zvyšuje hodnotu Δt , což podle rovnice číslo 8 způsobuje i růst hodnoty píkove kapacity.



Při analýze elektroferogramu hydrolyzátu myoglobinu za využití 150mM mravenčanového pufru jako BGE (obrázek 17A) je patrné, že píky s migračním časem 15-20 min nejsou dostatečně rozseparovány.

Tabulka 9. Průměr dat z elektroferogramů hydrolyzátu myoglobinu (0,25 µg/µl) v octanovém BGE o různých koncentracích, 200 nm. Nástřik 60 s. (n=3)								
	0,5% kyselina octová		1% kyselina octová		1,5% kyselina octová		2% kyselina octová	
	t _m	w _{0,5}	t _m	w _{0,5}	t _m	w _{0,5}	t _m	w _{0,5}
Pík 1	5,9	3,96	6,2	3,63	6,5	3,73	6,6	3,70
Pík 2	6,4	3,54	6,7	2,86	7,0	2,66	7,1	2,66
Pík 3	6,5	5,21	7,0	4,49	7,5	4,37	7,6	4,35
Pík 4	8,2	4,13	8,4	3,92	8,7	3,85	9,9	7,95
Pík 5	10,2	15,90	8,8	4,18	9,8	7,75	11,2	9,19
Pík 6	14,6	10,73	9,3	7,09	15,9	12,07	15,6	11,73
Průměr w _{0,5}	7,25		4,36		5,74		6,60	
t _α , t _ω	t _α : 328,9	t _ω : 1066,5	t _α : 346,3	t _ω : 1066,9	t _α : 363,6	t _ω : 1118,4	t _α : 371,1	t _ω : 1088,8
C _p	61		98		78		65	
Počet píků	18		22		22		18	

t_m – migrační čas [min], t_α – začátek prvního píku [s], t_ω – konec posledního píku [s], w_{0,5} – šířka píku v polovině výšky [s], C_p – píkova kapacita

Analýza v prostředí kyseliny octové je rychlejší a její různé koncentrace nemají tak velký vliv na selektivitu metody. Jistou nevýhodou je menší počet píků v porovnání s analýzou v prostředí kyseliny mravenčí. I když analýza v 1% kyselině octové umožňuje získat hodnotu píkove kapacity 98 (což je porovnatelné s píkove kapacitou 106 při analýze v 90mM mravenčanovém pufru), na příslušných elektroferogramech pozorujeme pouze 22 píků, zatímco za použití 90mM mravenčanového pufru jich získáme 29. Jelikož počet píků těsně souvisí s informační hodnotou peptidové mapy, použití kyseliny octové jako BGE pro peptidové mapování myoglobinu je méně výhodné, protože poskytuje méně podrobné mapy než při použití kyseliny mravenčí.

Jako optimální BGE byl zvolen mravenčanový pufr o koncentraci 90 mmol/l.

6.2.4. Stanovení optimální doby nástřiku při analýze za použití 90mM mravenčanového pufru jako BGE

Jak již bylo zmíněno výše, koncentrace mravenčanu v BGE má významný vliv na selektivitu. Jelikož se dále používal mravenčanový pufr o jiné koncentraci než při pokusech s lidským fibrinopeptidem B, bylo nezbytné provést novou optimalizaci doby nástřiku, protože má vliv na faktor zakoncentrování a tím i výslednou citlivost.

Jako BGE se použil 90mM mravenčanový pufr o pH 3,0.

Testovány byly nástřiky v rozmezí 20-80 s inkrementem po 10 s. V tabulce 10 jsou shrnuty základní kvantitativní informace nezbytné pro porovnání kvality separace za výše popsaných podmínek.

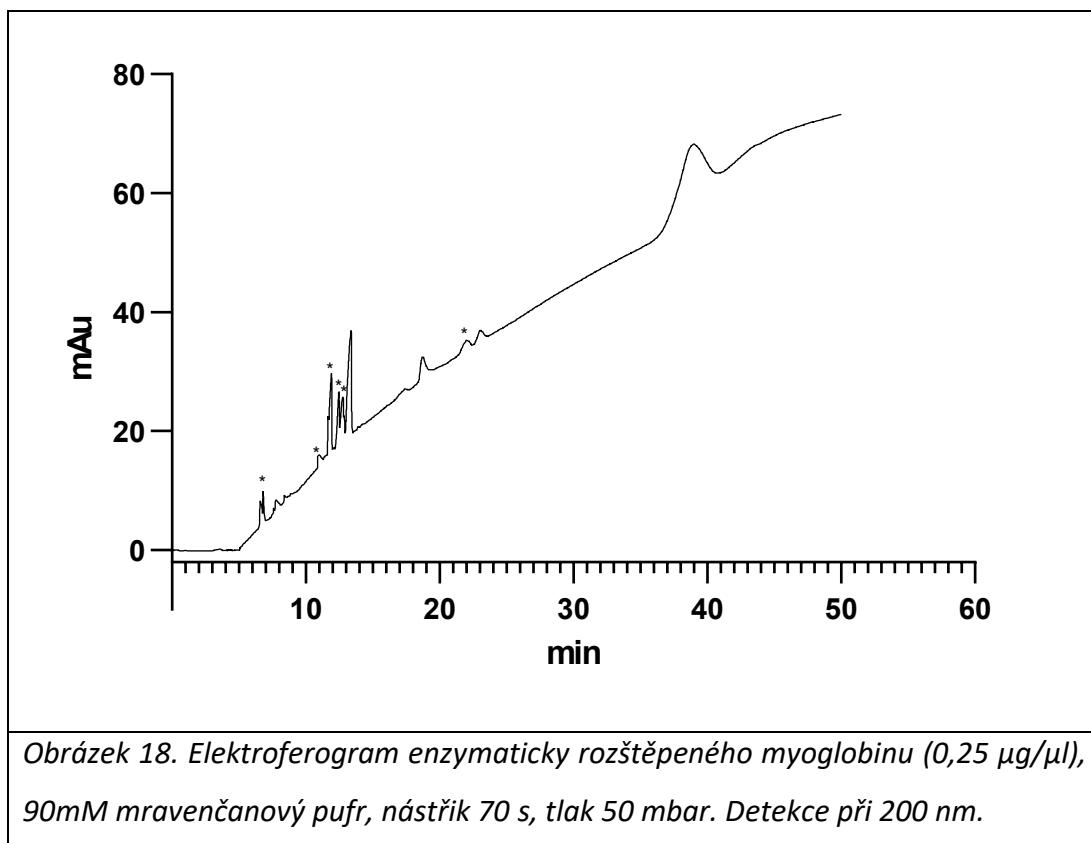
Tabulka 10. Průměr dat z elektroferogramů hydrolyzátu myoglobinu (0,25 µg/µl) v 90mM mravenčanovém pufru, 200 nm. Nástřik 20-80 s. (n=2)

	20 s		30 s		40 s		50 s	
	t _m	w _{0,5}	t _m	w _{0,5}	t _m	w _{0,5}	t _m	w _{0,5}
Pík 1	6,3	4,70	6,4	4,64	6,5	6,75	6,6	8,28
Pík 2	9,7	10,35	10,0	11,83	10,2	12,62	10,5	14,05
Pík 3	10,6	9,60	10,8	10,72	11,2	11,30	11,5	11,93
Pík 4	11,4	6,99	11,7	7,19	11,9	7,68	12,2	8,16
Pík 5	11,7	9,00	11,9	10,19	12,2	11,11	12,4	12,06
Pík 6	20,4	20,50	20,6	31,40	21,0	26,18	21,4	31,95
Průměr w _{0,5}	10,19		12,66		12,61		14,41	
t _α , t _ω	t _α : 374,9	t _ω : 1252,9	t _α : 379,0	t _ω : 1284,6	t _α : 380,1	t _ω : 1314,9	t _α : 384,2	t _ω : 1352,7
C _p	52		43		45		41	
Počet píků	12		15		19		20	
	60 s		70 s		80 s			
	t _m	w _{0,5}	t _m	w _{0,5}	t _m	w _{0,5}		
Pík 1	6,6	4,60	6,8	4,55	6,9	4,60		
Pík 2	10,4	14,60	10,9	26,05	10,9	16,23		
Pík 3	11,3	2,38	11,9	2,40	11,9	2,45		
Pík 4	11,9	8,65	12,5	9,05	12,5	9,77		
Pík 5	12,2	13,05	12,8	14,43	12,7	15,92		
Pík 6	20,6	32,05	22,1	34,98	21,9	44,68		
Průměr w _{0,5}	12,56		15,24		15,61			
t _α , t _ω	t _α : 378,4	t _ω : 1319,0	t _α : 391,3	t _ω : 2499,5	t _α : 390,7	t _ω : 1454,3		
C _p	45		82		41			
Počet píků	21		19		23			

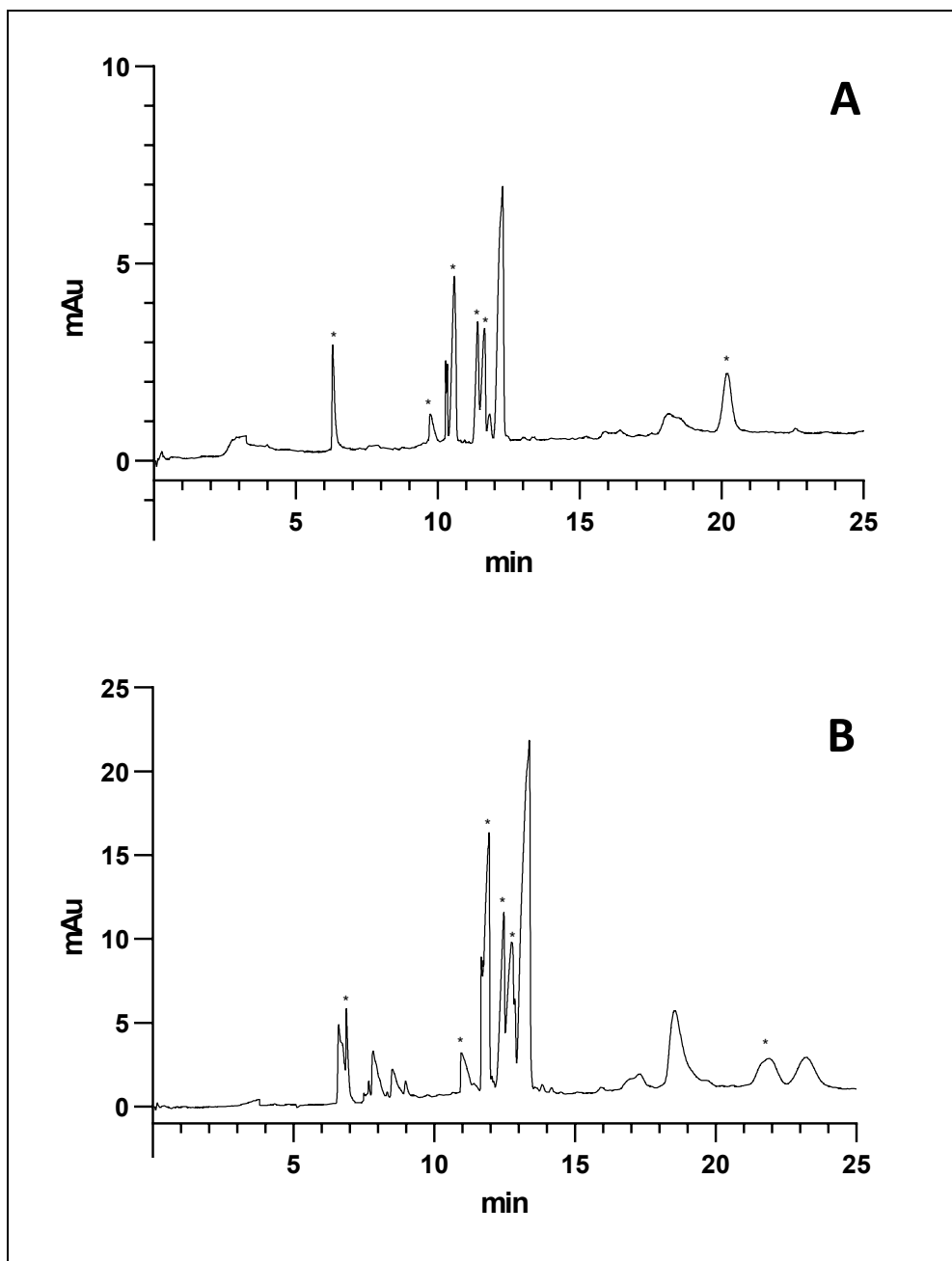
t_m – migrační čas [min], t_α – začátek prvního píku [s], t_ω – konec posledního píku [s], w_{0,5} – šířka píku v polovině výšky [s], C_p – píková kapacita

Na základě získaných dat můžeme udělat závěr, že doba nástřiku nemá velký vliv na píkovou kapacitu, protože se daná hodnota pohybuje mezi 41 a 52 u všech

experimentů bez zjevné korelace s dobou nástřiku. Jedinou odchylku pozorujeme u nástřiku 70 s, jde ale o situaci, jež byla už popsána v kapitole 6.2.3: na daném elektroferogramu se vyskytuje pík s vysokým migračním časem, který není na dalších záznamech. Přítomnost daného píku významně zvyšuje Δt , a tím i píkovou kapacitu. Na obrázku 18 pak vidíme, že byl při analýzách s dobou nástřiku 70 s pozorován výrazný růst základní linie. Daný výsledek proto nemůže být zcela objektivně hodnocen.

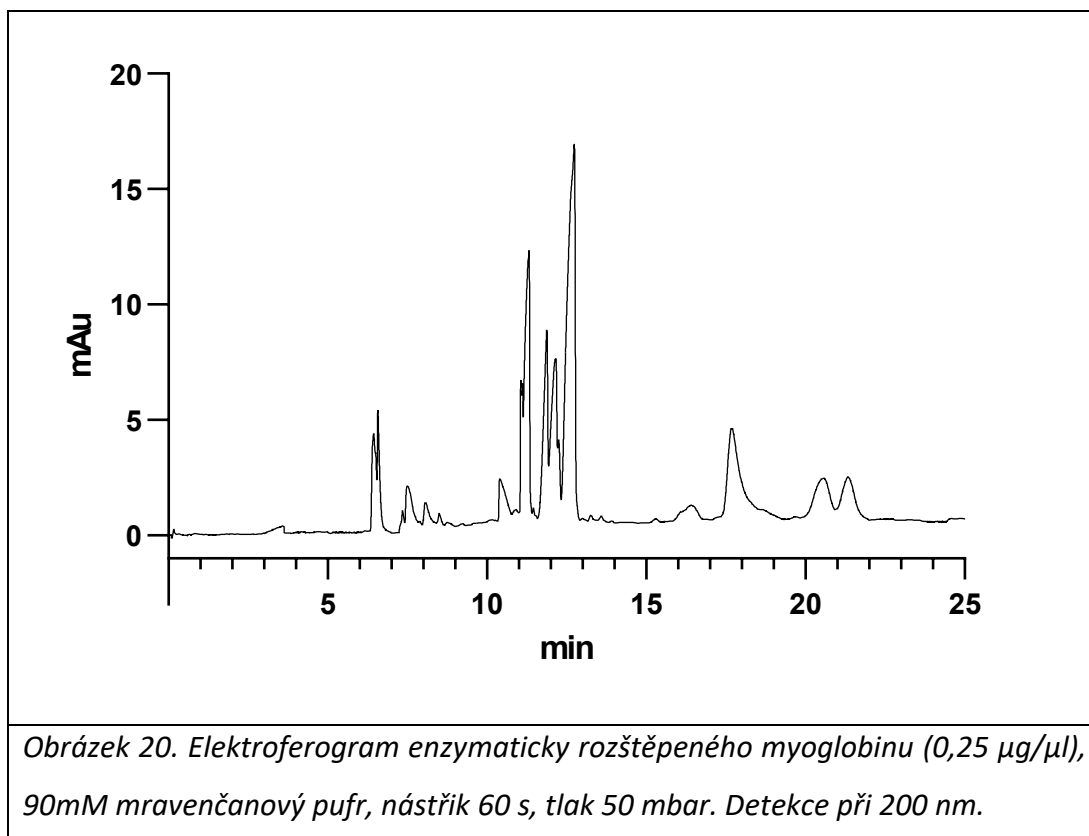


U všech ostatních nástřiků pozorujeme tendenci nárůstu počtu píků se zvýšením doby nástřiku. Takový výsledek se mohl očekávat, jelikož se doba nástřiku nachází v přímém vztahu s množstvím analytu, které se dostane do kapiláry. Podle obrázků 19A a 19B můžeme vizuálně zhodnotit rozdíl mezi 20 s a 80 s nástřikem.



Obrázek 19. Elektroferogram enzymaticky rozštěpeného myoglobinu (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 90mM mravenčanový pufr, nástřik 20 s (A) a 80 s (B), tlak 50 mbar. Detekce při 200 nm.

Využití krátkých nástřiků má za následek ztrátu informací. Rozdíl mezi dříve používaným nástřikem 60 s a nástřikem 80 s skoro nepozorujeme – při nástřiku 80 s pozorujeme na elektroferogramu o 2 píky více, při nástřiku 60 s je mírně vyšší píková kapacita.



Pro další analýzy byl vybrán nástřik 50 mbar po dobu 60 s (viz obr. 20).

Je nutné se zmínit o významných rozdílech mezi výsledky hodnocení separace v experimentu 6.2.3. a 6.2.4. Pokud porovnáme elektroferogramy hydrolyzátu myoglobinu při nástřiku 60 s s využitím 90mM mravenčanového pufru jako BGE v experimentu 6.2.3. (obr. 17B) a v experimentu 6.2.4. (obr. 20), uvidíme značné kvalitativní rozdíly daných peptidových map. Pozorujeme i velký rozdíl v hodnotách píkové kapacity – 106 v experimentu 6.2.3. a 45 v experimentu 6.2.4. Takový výsledek by mohl svědčit o vzniku EOF v kapiláře, který zrychluje analýzu a tím znemožňuje rozdělení peptidů o blízkém poměru q/r . Daný problém může být vyřešen použitím kapilár potažených jinými polymery či optimalizací odsolení vzorku po použití SMART pufru.

6.2.5. Analýza modelové protilátky NIST optimalizovanou metodou

V rámci předběžných experimentů byly provedeny separace vzorků hydrolyzátu protilátky NIST o koncentraci 2,143 a 0,2143 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Koncentrace prvního vzorku byla zvolena tak, aby byl vzorek ekvimolární se vzorkem myoglobinu o koncentraci

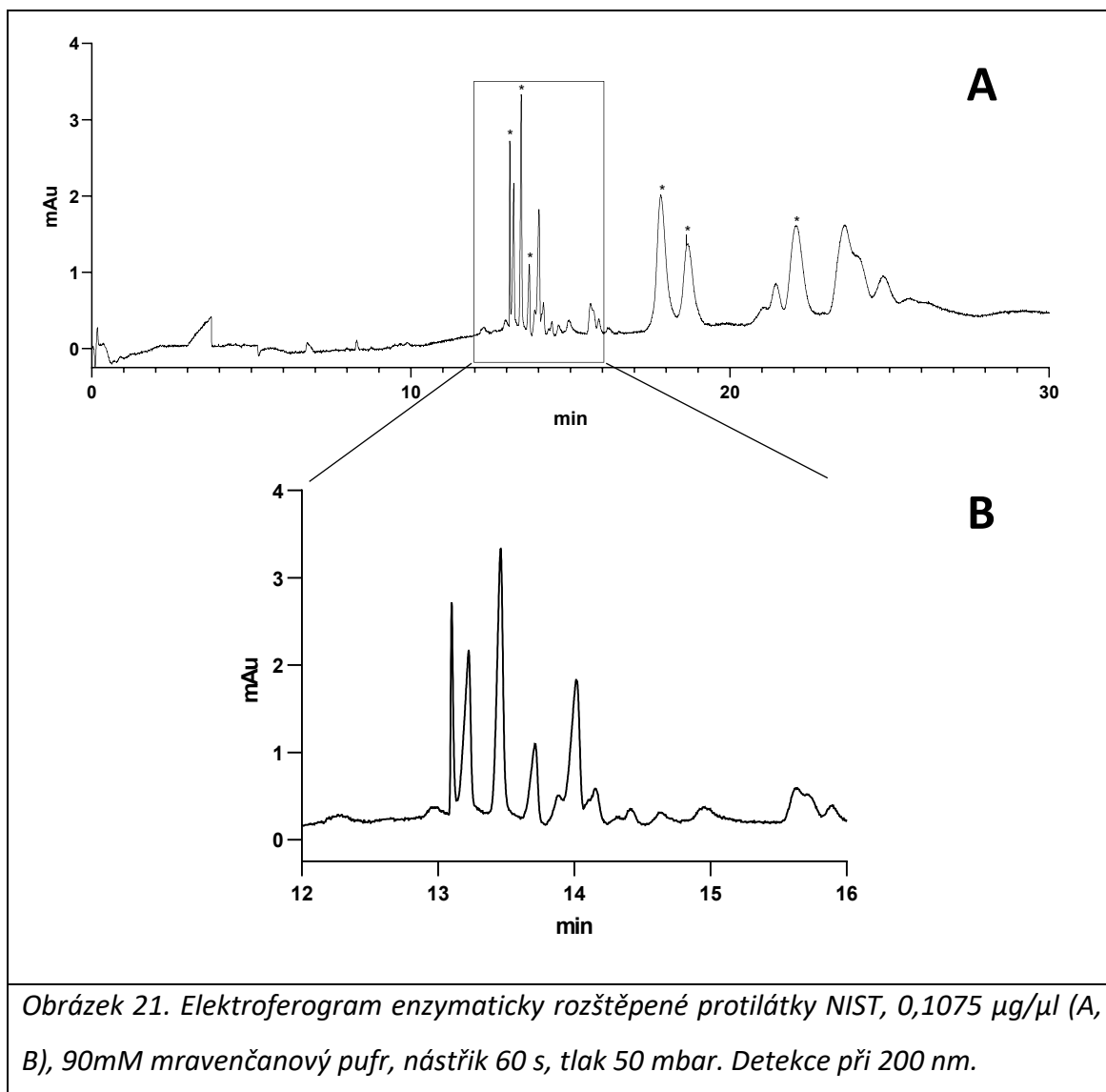
0,25 µg/µl. Koncentrace druhého vzorku byla desetkrát nižší. V daných vzorcích byly pozorovány známky překročení separační kapacity systému, proto se dále pracovalo se vzorky hydrolyzátu protilátky NIST o koncentraci 0,10715 (dvacetkrát naředěný vzorek o koncentraci 2,143 µg/µl) a 0,0714 µg/µl (třicetkrát naředěný vzorek o koncentraci 2,143 µg/µl).

Jako BGE se použil 90mM mravenčanový pufr o pH 3,0. Délka nástřiku byla 60 s. V tabulce 11 jsou shrnuty základní kvantitativní informace, nezbytné pro porovnání kvality separace za výše popsaných podmínek.

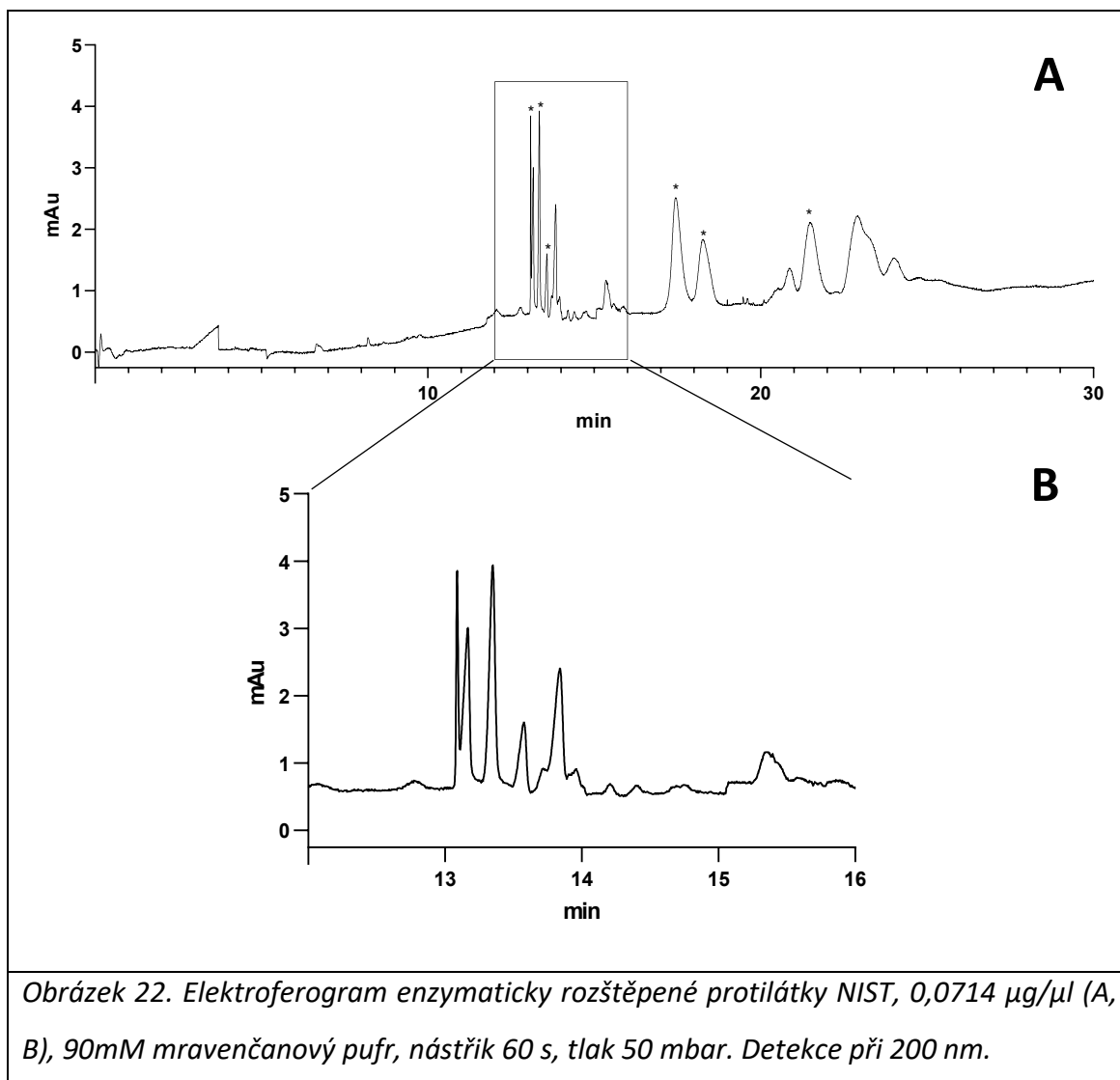
Tabulka 11. Průměr dat z elektroferogramů hydrolyzátu protilátky NIST v 90mM mravenčanovém pufru, detekce při 200 nm, nástřik 60 s. (n=3)

	0.10715 µg/µl		0.0714 µg/µl	
	t_m	$w_{0,5}$	t_m	$w_{0,5}$
Pík 1	13,1	1,16	13,1	1,06
Pík 2	13,5	2,94	13,4	3,02
Pík 3	13,8	3,80	13,6	3,58
Pík 4	18,0	18,15	17,6	18,52
Pík 5	18,9	18,83	18,4	22,05
Pík 6	22,4	25,90	21,7	25,28
Průměr $w_{0,5}$	11,80		12,25	
t_α, t_ω	$t_\alpha: 784,9$	$t_\omega: 1582,0$	$t_\alpha: 779,1$	$t_\omega: 1516,6$
C_p	41		36	
Počet píků	15		15	

t_m – migrační čas [min], t_α – začátek prvního píku [s], t_ω – konec posledního píku [s], $w_{0,5}$ – šířka píku v polovině výšky [s], C_p – píkovaná kapacita



Obrázek 21. Elektroferogram enzymaticky rozštěpené protilátky NIST, 0,1075 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (A, B), 90mM mravenčanový pufr, nástřik 60 s, tlak 50 mbar. Detekce při 200 nm.



Obrázek 22. Elektroferogram enzymaticky rozštěpené protilátky NIST, 0,0714 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (A), 90mM mravenčanový pufr, nástřik 60 s, tlak 50 mbar. Detekce při 200 nm.

Protože koncentrace vzorků je relativně blízká, získané mapy nevykazují významné rozdíly. V obou případech pozorujeme růst základní linie, který ve většině případů nebyl pozorován u myoglobinu. Počet píků s plochou nad 3,0 je u obou koncentrací stejný – 15, zatímco píková kapacita je vyšší pro vzorek s koncentrací 0,1075 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (41) než pro vzorek s koncentrací 0,0714 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (36).

Píková kapacita pro protilátku NIST má tedy hodnotu nižší než pro myoglobin, viz kapitola 6.2.3., kde bylo dosaženo hodnot píkové kapacity nad 100.

Na obrázcích 21 a 22 vidíme, že bylo dosaženo dobrého rozdělení peptidů s migračním časem 13 až 15 min. Je to nejlépe vidět na obrázcích 21B a 22B. Lze si všimnout, že píky s migračním časem 13,1 min a 13,2 min mají lepší rozlišení u vzorku o koncentraci 0,1075 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

V rozmezí 16 až 30 min jsou píky mnohem širší a to zejména z důvodu komigrace peptidů v jedné zóně (např. pík s migračním časem okolo 24 min, obr. 21.)

Na základě vizuálního hodnocení elektroferogramů a také na základě porovnání hodnot C_p můžeme dojít k závěru, že optimální koncentrace vzorku protilátky NIST je 0,1075 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

7. Závěr

Na základě experimentů s tryptickým štěpením proteinů bylo zjištěno, že hydrolyzát protilátky NIST získaný SMART-metodou s následující redukcí poskytuje peptidovou mapu porovnatelné kvality s hydrolyzátem získaným konvenční metodou. Jelikož kompletní rozštěpení protilátky NIST SMART metodou probíhá 3 hodiny (případně 90 min pro koňský myoglobin), je využití SMART metody výhodnější díky své časové efektivitě, protože celý pracovní postup konvenčního štěpení trvá okolo 24 hodin.

Použití deoxycholátu sodného při enzymatickém štěpení SMART metodou se nedoporučuje. Deoxycholát sodný reaguje se SMART pufrům za vzniku sraženiny, což znemožňuje rozštěpení substrátu. Použití destilované vody místo SMART pufru umožňuje získat peptidovou mapu, hydrolyza proteinu ale není úplná.

CZE metoda pro peptidové mapování byla optimalizována pro koňský myoglobin a poté byla přenesena na analýzu referenční protilátky NIST. Při optimalizaci CE-metody byl hodnocen vliv složení BGE, doby nástřiku vzorku a koncentrace vzorku na kvalitu separace. Analýzy probíhaly v PVA-kapiláře o vnitřním průměru 50 μm , celkové délce 64,5 cm a efektivní délce 56 cm za vkládaného napětí 30 kV. Kapilára byla termostatována na teplotu 20 $^{\circ}\text{C}$. Nejpodrobnější peptidové mapy hydrolyzátu myoglobinu byly získány při analýze v 90mM mravenčanovém pufru o pH 3,0 s hydrodynamickým dávkováním vzorku po dobu 60 s při 50 mbar. Koncentrace vzorku hydrolyzátu protilátky by měla být 0,1075 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pro hydrolyzát myoglobinu). Bylo zjištěno, že SMART pufr není kompatibilní s CE analýzou v PVA kapiláře, protože v ní indukuje vznik EOF. Hydrolyzáty proteinů tedy musely být před vlastní CE-analýzou odsoleny pomocí SPE a následně rozpuštěny v 10mM hydrogenuhličitanovém pufru o pH 8,5, aby bylo zajištěno on-line zakoncentrování přechodným pH rozhraním.

Za nalezených optimálních podmínek byla získána kvalitní peptidová mapa NIST obsahující 15 píků. Píková kapacita měla hodnotu 41. V roce 2017 Dada, Zhao, Jaya a Salas-Solano^[36] dosáhli píkové kapacity 94, což je skoro dvojnásobně lepší výsledek. Musí se však počítat s tím, že hodnota píkové kapacity je závislá nejenom na podmínkách měření, ale i na analyzovaném proteinu: v této diplomové práci bylo

dosážno hodnoty píkovej kapacity 106 pro koňský myoglobin, což je výsledek, porovnatelný s výsledky Dady a kolektivu^[36]. Tito autoři pracovali s CE-MS, což umožňuje dosáhnout nejenom vyšší citlivosti, ale i lepší separace díky využití doplňkových činidel v BGE jako jsou dimethylformamid či dimethylacetamid^[36]. Z důvodu vysokého „cut-off“ nelze tato rozpouštědla použít pro analýzy s UV-VIS detekcí při 200 nm. Počítaje s výše uvedenými fakty lze udělat závěr, že získaný výsledek lze hodnotit jako dobrý jak pro protilátku NIST, tak i myoglobin.

Cíl práce, tj. vyvinout a optimalizovat CE-metodu pro separaci produktů štěpení koňského myoglobinu a referenční protilátky NIST, pomocí které by bylo možné získat specifické a reprodukovatelné peptidové mapy, byl splněn. Metoda by ale mohla být optimalizována i dále: jak pro protilátku NIST, tak i pro myoglobin. Jelikož koncentrace BGE a doba nástřiku byly optimalizovány pro hydrolyzát myoglobinu, bylo by možné uskutečnit optimalizaci daných parametrů i pro hydrolyzát protilátky. Dále by mohl být sledován vliv pH základního elektrolytu, pH a koncentrace bazické matrice vzorku na kvalitu separace. Kromě toho by se mohly vyzkoušet i další BGE, kromě octanového a mravenčanového pufru, např., fosfátový nebo malonátový pufr. Do budoucna lze zvážit i využití bezkontaktního vodivostního detektoru, který je na rozdíl od UV-VIS detektoru kompatibilní s dimethylformamidem a dimethylacetamidem, jejichž přídavek k BGE by mohl významně zvýšit množství detekovaných peptidů v příslušných peptidových mapách. Nutné je pak zvážit i použití jiných kapilár. Perspektivní variantou jsou kapiláry potažené lineárním polyakrylamidem, které s úspěchem použil Dada a kolektiv^[36].

Zdroje a citace

1. Biopharmaceuticals Market By Type (Monoclonal Antibody, Interferon, Insulin, Growth & Coagulation Factor, Erythropoietin, Vaccine, Hormone, and, Others) and Application (Oncology, Blood Disorder, Metabolic Disease, Infectious Disease, Cardiovascular Disease, Neurological Disease, Immunology, and Others) - Global Opportunity Analysis And Industry Forecast, 2018-2025: Biopharmaceuticals Market Overview [online]. 2018-07. [cit. 2020-09-07]. Dostupné z: <https://www.alliedmarketresearch.com/biopharmaceutical-market>
2. Svedberg, T., & Tiselius, A. A new method for determination of the mobility of proteins. *Journal of the American Chemical Society*. 1926, 48(9), 2272-2278. DOI: 10.1021/ja01420a004.
3. Willis, M. Arne Tiselius. *Laboratory Medicine*. 2009, 40(10), 627-628. DOI: 10.1309/LMKTBKG7YGLD4U0V.
4. Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., & Verheggen, T. P. E. M. High-performance zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1979, 169, 11-20. DOI: 10.1016/0021-9673(75)85029-1.
5. Jorgenson, J. W., & Lukacs, K. D. A. High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis. *Journal of Chromatography A*. 1981, 218, 209-216. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)82057-9.
6. Ahuja, S., & Jimidar, M. *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis, Volume 9*. First edition. Academic Press, 2008-08-05. ISBN 9780123725738.
7. Kim, W., Kang, K. H., & Suh, J.-K. Characterization of Biopharmaceuticals Focusing on Antibody Therapeutics. YEH, Ming-Kung a Yuan-Chuan CHEN, ed. *Biopharmaceuticals*. InTech, 2018, 2018-09-19. DOI: 10.5772/intechopen.79107. ISBN 978-1-78923-718-4.
8. Camilleri, P. *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. Second edition. CRC Press, 1997-11-25. ISBN 978-0849391279.
9. Böcker, J. *Chromatographie: Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese*. LaborPraxis, 1997-01-01. I. ISBN 9783802315824. Ruský překlad: Technosfera, Moskva 2009.

10. Šapovalova, E.N., & Pirogov, A.V. Chromatografické metody analýzy. Moskevská státní univerzita M. V. Lomonosova, 2007.
11. Lauer, H. H., & Rozing, G. P. High Performance Capillary Electrophoresis – A Primer. Second completely revised edition. Agilent Technologies.
12. Erickson, D. Electroosmotic Flow (DC). Li, Dongqing, ed. Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics. Boston, MA: Springer US, 2008, s. 560-567. DOI: 10.1007/978-0-387-48998-8_446. ISBN 978-0-387-32468-5.
13. Aebersold, R., & Morrison, H. D. Analysis of dilute peptide samples by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1990, 516(1), 79-88. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)90206-7.
14. Britz-McKibbin, P., & Chen, D. D. Y. Selective Focusing of Catecholamines and Weakly Acidic Compounds by Capillary Electrophoresis Using a Dynamic pH Junction. *Analytical Chemistry*. 2000, 72(6), 1242-1252. DOI: 10.1021/ac990898e.
15. Imami, K., Monton, M. R. N., Ishihama, Y., & Terabe, S. Simple on-line sample preconcentration technique for peptides based on dynamic pH junction in capillary electrophoresis–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1148(2), 250-255. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.03.014.
16. Zhu, G., Sun, L., & Dovichi, N. J. Dynamic pH junction preconcentration in capillary electrophoresis- electrospray ionization-mass spectrometry for proteomics analysis. *The Analyst*. 2016, 141(18), 5216-5220. DOI: 10.1039/C6AN01140C.
17. Yeh, M.-K., & Chen, Y.-C. Biopharmaceuticals. InTech, 2018-09-19. ISBN 978-1-78923-719-1.
18. Weise, M., Kurki, P., Wolff-Holz, E., Bielsky, M.-C., & Schneider, C. K. Biosimilars: the science of extrapolation. *Blood*. 2014, 124(22), 3191-3196. DOI: 10.1182/blood-2014-06-583617.
19. Rogers, K. What Is the Difference Between a Peptide and a Protein? [online]. [cit. 2020-09-07]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/story/what-is-the-difference-between-a-peptide-and-a-protein>

20. Sluszný, C., He, Y., & Yeung, E. S. Light-emitting diode-induced fluorescence detection of native proteins in capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*. 2005, 26(21), 4197-4203. DOI: 10.1002/elps.200500348.
21. Jenkins, N., Murphy, L., & Tyther, R. Post-translational Modifications of Recombinant Proteins: Significance for Biopharmaceuticals. *Molecular Biotechnology*. 2008, 39(2), 113-118. DOI: 10.1007/s12033-008-9049-4.
22. Hořejší, V., & Bartůňková, J. *Základy imunologie*. Vyd. 3. Praha: Triton, 2005. ISBN 80-725-4686-4.
23. Manis, J. P. *Overview of therapeutic monoclonal antibodies* [online]. 2020-05-08. [cit. 2020-09-07]. Dostupné z: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-therapeutic-monoclonal-antibodies/>
24. Český lékopis 2017: Pharmacopoea Bohemica MMXVII (Ph.B. MMXVII). 1. díl. Evropská část. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
25. Piestansky, J., Galba, J., Olesova, D., Kovacech, B., & Kovac, A. Determination of immunogenic proteins in biopharmaceuticals by UHPLC–MS amino acid analysis. *BMC Chemistry*. 2019, 13(1). DOI: 10.1186/s13065-019-0581-z.
26. Staub, A., Guillarme, D., Schappler, J., Veuthey, J. L., & Rudaz, S. Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011, 55(4), 810-822. DOI: 10.1016/j.jpba.2011.01.031.
27. Rodriguez, J., Gupta, N., Smith, R.D., & Pevzner, P. A. Does Trypsin Cut Before Proline? *Journal of Proteome Research*. 2008, 7(1), 300-305. DOI: 10.1021/pr0705035.
28. Harvey, D. Contributions to Band Broadening in Chromatography [online]. 2013-08-01. [cit. 2020-09-07]. Dostupné z: <https://community.asdlib.org/imageandvideoexchangeforum/2013/08/01/contributions-to-band-broadening-in-chromatography/>
29. Righetti, P. G., Sebastiano, R., & Citterio, A. Capillary electrophoresis and isoelectric focusing in peptide and protein analysis. *PROTEOMICS*. 2013, 13(2), 325-340. DOI: 10.1002/pmic.201200378.

30. Shen, Y., Xiang, F., Veenstra, T. D., Fung, E. N., & Smith, R. D. High-Resolution Capillary Isoelectric Focusing of Complex Protein Mixtures from Lysates of Microorganisms. *Analytical Chemistry*. 1999, 71(23), 5348-5353. DOI: 10.1021/ac9909305.
31. Zhang, C. X., Xiang, F., Paša-Tolić, L., Anderson, G. A., Veenstra, T. D., & Smith, R. D. Stepwise Mobilization of Focused Proteins in Capillary Isoelectric Focusing Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2000, 72(7), 1462-1468. DOI: 10.1021/ac9912653.
32. Shen, Y., & Smith, R. D. Proteomics based on high-efficiency capillary separations. *Electrophoresis*. 2002, 23, 3106-3124. DOI: 10.1002/1522-2683(200209)23:18<3106::AID-ELPS3106>3.0.CO;2-Y
33. Shen, Y., Berger, S. J., Anderson, G. A., & Smith, R. D. High-Efficiency Capillary Isoelectric Focusing of Peptides. *Analytical Chemistry*. 2000, 72(9), 2154-2159. DOI: 10.1021/ac991367t.
34. Zhu, Z., Lu, J. J., & Liu, S. Protein separation by capillary gel electrophoresis: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2012, 709, 21-31. DOI: 10.1016/j.aca.2011.10.022.
35. Cobb, K. A., & Novotny, M. High-sensitivity peptide mapping by capillary zone electrophoresis and microcolumn liquid chromatography using immobilized trypsin for protein digestion. *Analytical Chemistry*. 1989, 61(20), 2226-2231. DOI: 10.1021/ac00195a003.
36. Dada, O. O., Zhao, Y., Jaya, N., & Salas-Solano, O. High-Resolution Capillary Zone Electrophoresis with Mass Spectrometry Peptide Mapping of Therapeutic Proteins: Improved Separation with Mixed Aqueous-Aprotic Dipolar Solvents (N , N -Dimethylacetamide and N , N -Dimethylformamide) as the Background Electrolyte. *Analytical Chemistry*. 2017, 89(21), 11227-11235. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03405.
37. Protein Reversed-Phase Columns: BioResolve RP mAb Polyphenyl Columns [online]. [cit. 2020-09-07]. Dostupné z: https://www.waters.com/waters/en_US/Protein-Reversed-Phase-Columns/nav.htm?cid=134810929&lset=1&locale=en_US&changedCountry=Y

38. Lin, Y., Zhou, J., Bi, D., Chen, P., Wang, X., & Liang, S. Sodium-deoxycholate-assisted tryptic digestion and identification of proteolytically resistant proteins. *Analytical Biochemistry*. 2008, 377(2), 259-266. DOI: 10.1016/j.ab.2008.03.009.
39. SMART Digest Kit User Manual [online]. Version 2, XX21543 Revision B. Thermo Fisher Scientific, 2017-12. [cit. 2020-09-07]. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-21543-SMART-Digest-User-Man21543-EN.pdf>
40. NIST Monoclonal Antibody Reference Material 8671 [online]. 2016-05-09, upd. 2019-09-23. [cit. 2020-09-07]. Dostupné z: <https://www.nist.gov/programs-projects/nist-monoclonal-antibody-reference-material-8671>
41. Halo BioClass: Halo Peptide [online]. [cit. 2020-09-07]. Dostupné z: <https://www.advanced-materials-tech.com/halo-bioclass/halo-peptide/>