



**Monoklonális antitestek elektropray ionizációs
tömegspektrometriás vizsgálata és spektrumaik feldolgozása**

Tudományos diákköri dolgozat

Szabó Dávid Ruben

Vegyész MSc, II. évfolyam

Témavezető: Dr. Gáspár Attila, egyetemi tanár

Debreceni Egyetem

Természettudományi és Technológiai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

2022. november 18.

Tartalomjegyzék

Rövidítések magyarázata	1
1. Bevezetés	2
2. Irodalmi előzmények	3
2.1 Monoklonális antitestek	3
2.2 Elektrospray ionizációs tömegspektrometria	6
2.3 Intakt monoklonális antitestek ESI-MS vizsgálata	13
2.4 Intakt fehérjék ESI-MS spektrumának feldolgozása	15
3. Kísérleti körülmények	18
3.1 Vegyszerek és minták	18
3.2 Készülékek	18
3.3 Szoftverek	18
3.4 Tömegspektrometriás mérési paraméterek	19
3.5 Cetuximab mátrixmentesítése	19
4. Eredmények és értékelésük	20
4.1 Mátrixkomponensek hatása antitestek elektrospray ionizációjára	20
4.2 Monoklonális antitestek ESI-MS spektrumának feldolgozása	29
4.3 Dekonvolúciós szoftverek összehasonlítása	38
4.4 Trastuzumab dekonvolált spektrumának összehasonlítása elméleti és irodalmi adatokkal	41
5. Összefoglalás	43
6. Summary	44
Köszönetnyilvánítás	45
Irodalomjegyzék	46
Mellékletek	48

Rövidítések magyarázata

CE	kapilláris elektroforézis
ESI	elektrospray ionizáció
Ig	immunglobulin
isCID	ionforrásban történő ütközés indukált disszociáció
mAb	monoklonális antitest
MADLI	mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció
MS	tömegspektrometria
RCF	relatív centrifugális erő
TOF	repülési idő

1. Bevezetés

A fehérjemolekulákat hatóanyagként tartalmazó gyógyszereket biológikumoknak nevezzük, melyek egyik csoportját a monoklonális antitestek (mAb-ok) képviselik. Az első mAb alapú gyógyszer (muronomab, Orthoclone) 1986-ban való bejegyzése óta a terápiás antitestek egyre elterjedtebbé válnak, az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala 2021-ben fogadta el a századik antitest tartalmú készítményt. A jelenleg alkalmazott mAb tartalmú készítmények között kiemelkedő számban vannak a rákkezelésre használtak, de emellett dermatológia, hematológia, neurológia, reumatológia, fertőző betegségek kezelésekor, valamint számos más terápiás területen is jelen vannak [1]. A Covid19-világjárvány során a vírust kimutató tesztekben és a fertőzés kezelésre is használtak mAb-okat [2].

Ezen típusú gyógyszerek sikerességüket elsősorban a kismolekulás hatóanyagoknál nagyobb szelektivitásuknak és hatékonyságuknak köszönhetik. Nagy affinitással, specifikusan képesek kapcsolódni a célmolekulához (pl. sejtfelszíni receptoron, szolubilis antigénen, receptoron vagy a receptor ligandján keresztül), így hatásukat célzottan tudják kifejteni és ennek következtében a hagyományos gyógyszereknél kevesebb mellékhatást eredményeznek.

A gyógyszerhatóanyagok szervezetben kifejtett hatását azok szerkezete határozza meg, ami kis molekulák esetén pontosan és egyértelműen meghatározható. A nagy molekulatömegű fehérjék esetén – azok harmadlagos, vagy bizonyos esetekben negyedleges szerkezetének kialakításában – az aminosavszekvenciájuk mellett a poszttranszlációs módosítások is meghatározóak. Mivel a mAb-ok előállítása biológiai úton történik, még megegyező aminosav szekvencia esetén is a poszttranszlációs módosítások sokszínűsége és nagy száma miatt, rendkívüli komplexitás jellemzi azokat. Ennek következtében az antitest különböző variánsai egy ampullában akár százmilliós nagyságrendben is előfordulhatnak [3]. A biológikumok nagyfokú komplexitása jelentős kihívást jelent azok analitikáját tekintve. A mAb-ok karakterizálása azok szerkezetének, tisztaságának, hatóanyag-tartalmának, valamint biológiai aktivitásának meghatározását is igényli. Ez számos egymást kiegészítő analitikai módszer egymás melletti alkalmazásával, és a mérési eredmények együttes értelmezésével lehetséges.

Az antitesteknek a szerzett immunitásban, azon belül a B-sejtekhez kapcsoló ellenanyag vagy más néven humorális immunválaszban van szerepük. A B-sejtek felszínén IgM típusú antitestek találhatók. Ha ezekhez antigén kapcsolódik, az adott B-sejt aktiválódik és megkezdődik annak osztódása. A sejtek felszínén lévő antitestek variábilis régiója genetikai kódolásuk miatt rendkívül változatos. Ez biztosítja, hogy a sejtek összessége számos antigén több epitóp részének felismerésére képes. Az antigénhez legjobban kötődő IgG-vel rendelkező sejtek fognak leggyorsabban osztódni, ami úgynevezett klonális szelekcióhoz vezet. Az osztódás során egyrészt a hosszú távú védetséget biztosító memória B-sejtek jönnek létre melyek felszínén továbbra is megtalálható az IgG antitest, továbbá kialakulnak effektor B-sejtek is, melyek IgG típusú antitesteket termelnek és bocsátanak a szérumba. Ezek az antitestek az antigénekhez kötődve segítik elő az immunrendszer többi részének hatékony működését, például az antigének megjelölését a falósejtek számára. Az előbbieken leírt, az élő szervezetben tipikusan előforduló ellenanyag immunválasz poliklonális jellegű. Ebben az esetben különböző B-sejtek termelik az ellenanyagot, ami így egy antigén több epitópjára is specifikus, mivel az ellenanyag számos különböző variábilis régióval rendelkező antitest keveréke. Ezzel szemben a monoklonális antitesteket egyetlen B-sejt klónjai termelik, így azok egy antigénnek csak egy epitópjára specifikusak, ebből kifolyólag aminosav-szekvenciájuk is azonos.

A monoklonális antitestek *in vitro* előállítása elsőként úgynevezett hibridóma technológiával történt. Ehhez egy kísérleti állat – legtöbbször egér vagy patkány – szervezetébe az antigén többszöri bejuttatásával erős immunválaszt váltanak ki. Az antitesteket termelő B-sejteket a lépéből izolálják, mivel ezek ott dúsulást mutatnak. Ezeket a sejteket mielóma sejtekkel fúzionáltatják elektromos erőter vagy polietilén-glikol alkalmazásával. Az így létrejött sejteket nevezik hibridóma sejteknek. A mielóma sejtek a csontvelőben lévő antitesteket termelő plazmasejtek rákos elváltozásaként jönnek létre. A fúzió célja a B-sejtek antitest termelő képességének és a mielóma sejtek kiemelkedő osztódási tulajdonságainak kombinálása egy sejtben. A fúzionálás után visszamaradó B-sejtek idővel elhalnak, a mielóma sejtektől azonban meg kell tisztítani a hibridóma sejteket. Ehhez olyan táptalajban inkubálják a sejteket, mely timidint és aminopterint tartalmaz, melyek közül utóbbi gátolja a *de novo* nukleotid szintézist. A táptalajba hipoxantint tesznek, melyet egy enzim képes adeninná alakítani. A fúzionáláshoz olyan mielóma sejteket használnak, melyek DNS-e nem kódolja ezt az enzimet, ennek eredményeként 10-14 napos inkubálást követően a mielóma sejtek elhalnak. A megmaradó hibridóma sejteket mikrotiterlemezeken egyenként inkubálják, így azok osztódásakor keletkező klónok teljesen megegyező, monoklonális antitesteket termelnek. A legjobb specificitású mAb-ot termelő sejtenyészetet használják fel a továbbiakban.

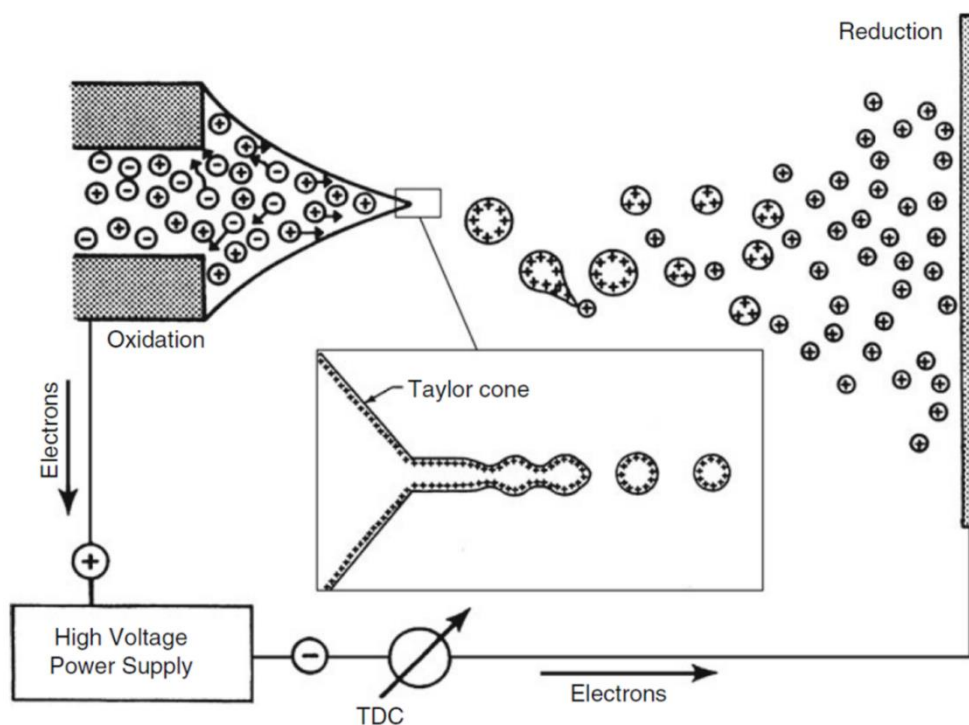
A későbbiekben a rekombináns DNS technológia fejlődésével megjelentek az úgynevezett kiméra antitestek. Ezek variábilis régiója rágsáló, a mAb többi része viszont humán eredetű. Az immunrendszer effektor sejtjei ezeket az antitesteket hatékonyabban ismerik fel, így a mAb-ok hatékonysága nőtt, a szervezet immunogén válasza pedig csökkent. Ezt a humanizált antitestek megjelenése követte, melyek már csak variábilis régió bizonyos részein, az úgynevezett CDR régióban tartalmazznak rágsáló eredetű szekvenciát. Jelenleg a teljesen humán eredetű antitestek fejlesztése zajlik.

A mAb-ok termelésére jelenleg leggyakrabban kínaihörcsög-petefészek sejtjeit használják. Elterjedtségének köszönhetően jól ismertek az előállított antitestek jellemző szennyezői, ami megkönnyíti azok gyógyszerként való engedélyeztetését. Jelenleg számos betegség kezelésére használnak mAb tartalmú készítményeket, legjellemzőbbek a daganatellenes és immunszuppresszív hatású szerek. Az Európai Gyógyszerügynökség a mAb-ok nemzetközi szabadnevét (INN) az alábbi szisztéma szerint határozza meg. A név egy egyedi megkülönböztető előtaggal kezdődik, melyet egy a célpontjára utaló tag (pl. t(u) – tumor), majd egy eredetre utaló tag (pl. xi – kiméra) és végül a mAb utótag követ [5].

2.2 Elektrospray ionizációs tömegspektrometria

A tömegspektrometria (MS) gázfázisú ionok tömeg/töltés arányuk szerinti megkülönböztetésére és azok detektálására alkalmas analitikai módszer. Történetének kezdete a XX. század elejére nyúlik vissza és Joseph John Thomson, valamint Francis William Aston nevéhez köthető [6]. A módszer azóta jelentős fejlődésen ment keresztül, melynek egyik szignifikáns mérföldköve az elektrospray ionizáció (ESI) és a mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció (MALDI) kifejlesztése volt. Ezen lágy ionizációs technikák lehetővé tették fehérjék és más biológiai makromolekulák ionizációját és ezáltal MS vizsgálatukat. Kidolgozásáért John B. Fenn és Koichi Tanaka 2002-ben Nobel-díjban részesültek [7]. A tömegspektrométerek fő részeit az ionforrás, a tömeganalizátor vagy tömeganalizátorok, a detektor, valamint a vákuumrendszer jelentik. Az ionképzésnek számos módja ismeretes (például elektron ionizáció, különböző kémiai ionizációs módszerek, MALDI), melyek közül az elektrospray ionizációs technikát mutatom be.

Az ESI poláris és ionos komponensek ionizációja esetén ideális módszer. A légköri nyomású, lágy ionizációs technikák közé tartozik, mivel az ionok képződése légköri nyomáson, jellemzően fragmensek képződése nélkül történik. Számos különböző addukt és nagy molekulák esetén többszörös töltésű ionok képződése jellemző erre a módszerre. Az ionizációhoz a vizsgálni kívánt mintát tartalmazó porlasztókapilláris és egy ellenelektród közt jellemzően 3-4 kV feszültségkülönbséget hoznak létre. Az elektromos térerő hatására a kapilláris végén az oldat meniszkusza deformálódik, úgynevezett Taylor-kúp alakul ki. Ha a térerő kellően nagy az oldat felületi feszültségének leküzdéséhez, a Taylor-kúp hegyéről vékony folyadéksugár kezd az ellenelektród irányába áramolni. Ebben a folyadéksugárban nagy az ionizáció polaritásának megfelelő töltések sűrűsége. A Coulomb-féle taszítás miatt a folyadéksugár apró, mikrométeres méretű elektrosztatikusan töltött folyadékcseppekre szakad szét, ami aeroszolképződéshez vezet. A folyadékcseppek oldószer tartalmának párolgása a felületi töltéssűrűség növekedését eredményezi. Ha az elektrosztatikus taszítás eléri az ún. Rayleigh-határt a folyadékcseppek apróbb cseppekre darabolódnak. Korábban úgy gondolták Coulomb robbanás okozza a cseppek felhasadását, mára azonban bizonyították, hogy a Taylor-kúp hegyén megjelenő folyadéksugár kialakulásához hasonló folyamat játszódik le az egyes folyadékcseppek esetén is. Az aeroszol oldószertartalmának párolgását azzal ellentétes irányban áramoltatott fűtött szárítógázzal, valamint bizonyos esetekben az interfész kapillárisának melegítésével is elősegítik. Az aeroszol képződését a feszültség mellett legtöbb esetben porlasztógáz alkalmazásával is elősegítik, melyet egy a porlasztókapilláris körül koncentrikusan elhelyezkedő nagyobb átmérőjű kapillárison vezetnek be. A porlasztógáz alkalmazása nagyobb áramlási sebességű folyadékminta porlasztását teszi lehetővé [8].



2. ábra: ESI folyamatának sematikus ábrája [8].

Az egyre kisebb méretű folyadékcseppekből a gáz halmazállapotú ionok kialakulására több elmélet is létezik. Az ionelpárolgási modell (IEM) elsősorban kis molekulák gázfázisba kerülésének leírására alkalmas. E szerint a cseppekben folyadékfázisban lévő ionok az oldószer molekulák párolgásához hasonlóan válnak ki a cseppből. Ehhez az ionok solvatációs energiájának leküzdésére van szükség, melyhez a szükséges energiát a cseppek felületén lévő nagy töltéssűrűség által létrejövő elektromos térerő képes biztosítani kellően kis átmérőjű cseppek esetén. Molekuladinamikai szimulációk alapján a távozó iont kezdetben oldószer molekulák kötik össze a folyadékcseppel, melyek egy része ionhoz kötődve távozik. Ezek az oldószer molekulák végül gázmolekulákkal való ütközés hatására szakadnak le az ionról. Ez a folyamat az aeroszol cseppjeinek felhasadásával mutat analógiát. Nagy molekula esetén az ún. visszamaradó töltés modellt (CRM) tartják érvényesnek, mely szerint a folyadékcseppek aprózódásának végén csak egy-egy analit marad a cseppek belsejében, majd az oldószer teljes elpárolgásával a visszamaradó töltések átkerülnek az analitra. Az elmélet vizsgálata során molekuladinamikai szimulációk igazolták, hogy a nagy méretű makromolekulák a csepp belsejébe záródnak, nem képesek annak felszínére eljutni, így kiválni sem. Az elmélet mellett szól az is, hogy globuláris fehérjék esetén a keletkező ionok töltése közel megegyezik egy, a fehérjéhez hasonló méretű vízcsepp felületén lehetséges töltések számával. Molekuladinamikai szimulációk alapján állították fel a denaturált fehérjék esetén érvényes lánckilökődési modellt (CEM). A denaturálódás során a fehérjék kitekerednek, az apoláris oldalláncok az oldószer számára hozzáférhetővé válnak, aminek következtében a fehérje nem a csepp belsejében hanem

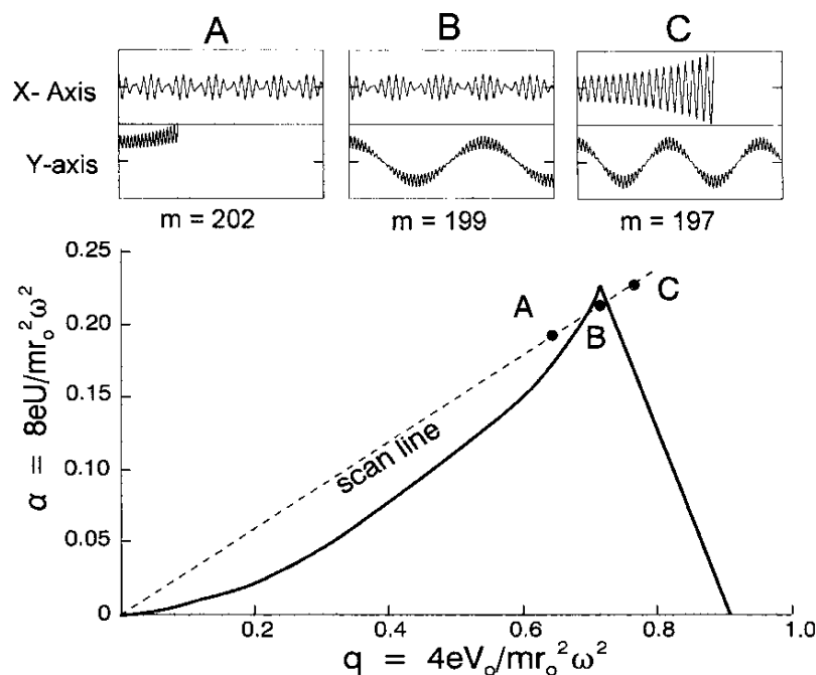
annak felületén lesz energetikailag kedvezőbb helyzetben. Először a polipeptidlánc egyik vége, majd lépésenként az egész fehérje kilöködik a gázfázisba [9].

A nemionizálódó komponensek képesek az elektródok felületén lerakódni vagy a tömegspektrométerbe vezető kapillárisban kiválni, melyek az ESI rendszer működésképtelenségéhez vezetnek. A rosszul ionizálódó anyagok mennyiségét ezért minimalizálni kell, azonban a lerakódások így is sokszor elkerülhetetlenek. Az egyszerűbb tisztítás érdekében leggyakrabban az ESI kapillárist a bemenethez képest szögben helyezik el, de léteznek az aeroszol útjába különböző ütköző elemeket beépítő, valamint „off-axis” és „inflected path” kialakítások is [10].

A légköri nyomáson képződött aeroszol részecskének csak egy része jut egy kapillárison keresztül a tömegspektrométer első, néhány száz Pa-ra csökkentett nyomású részébe. A nem ionos komponensek kiszűrése érdekében korábban közepén lyukas, kúp alakú skimmer elektródokat használtak, melyeket mára az ún. iontölcsérek váltottak fel. Ezek olyan egymástól néhány mm távolságra lévő kör alakú elektródokból állnak, melyek közepén egyre csökkenő átmérőjű nyílás található. Az egymás melletti elektródokra nagy frekvenciájú váltófeszültséget és egyenfeszültséget kapcsolnak, mely az ionokat egy sugárba fókuszálja, ami végsősoron jelentős érzékenység-növekedést eredményez. Jellemzően két iontölcsért helyeznek el a készülékben, melyek ionforrásban történő ütközés indukált disszociációt (isCID) tesznek lehetővé. Ehhez az első iontölcsér kivezető nyílása és a második iontölcsér bevezető nyílása közötti egyenfeszültség különbséget megnövelik. Az ionok potenciális energiája a második iontölcsérbe lépve hirtelen lecsökken, mely a kinetikus energia növekedését eredményezi. A készülék ezen szakaszán lévő nyomás jóval nagyobb, mint egy ütközési cellában, ami az ütközések során a termikus energiavesztésnek kedvez a molekulák fragmentációjával szemben.

Az ionok ezután a tömeganalizátorba jutnak, melynek feladata a különböző m/z -vel rendelkező ionok megkülönböztetése, elválasztása a detektálásuk előtt. A kvadrupól tömeganalizátorok négy egymással párhuzamos henger alakú vagy hiperbolikus profillal rendelkező elektródból állnak. Az egymás melletti elektródokra azonos nagyságú, de ellentétes előjelű egyenfeszültséget és váltakozó feszültséget kapcsolnak. A kialakuló oszcilláló elektromos erőter befolyásolja az analizátorban lévő ionok mozgását. Amennyiben ez a mozgás stabil az elektródokra merőleges x és y irányba is, az adott m/z -vel rendelkező ion képes áthaladni az analizátoron. Az ion tömege és töltése, valamint az analizátor paraméterei alapján a Mathieu egyenletekkel kiszámított a és q értékeket a kvadrupól analizátorokra jellemző stabilitási diagramon ábrázolva kapjuk meg, hogy az ionok stabilak-e az alkalmazott körülmények (frekvencia és feszültség értékek) mellett (3. ábra). Azonos analizátor paraméterek mellett ábrázolva különböző m/z -vel rendelkező ionokat a stabilitási diagramon

egy egyenest kapunk, melyet szkenn vonalnak neveznek, melynek meredeksége az egyenfeszültség és váltakozó feszültség hányadosával arányos. A szkenn vonal meredekségének változtatásával az analizátorban stabil ionok m/z tartományának szélessége befolyásolható. Nagyobb meredekség esetén nagyobb felbontás, kisebb meredekség esetén pedig nagyobb érzékenység érhető el. Kvadrupól analizátorral széles m/z tartomány tömegspektrumának felvételére szkenneléssel van lehetőség. Ehhez a feszültségek arányát úgy állítják be, hogy csak egy nagyon szűk m/z tartomány legyen stabil, majd az egyenfeszültséget és a váltakozó feszültséget úgy kezdik növelni, hogy arányuk állandó maradjon. Ennek következtében egyre nagyobb m/z -vel rendelkező ionok kerülnek a stabil tartományba, melyek így egymás után detektálhatók. A gyakorlatban elterjedt az egységfelbontású szkennelés. Ekkor a vizsgált m/z tartomány szkennelése során a szkenn vonal meredekségét úgy változtatják, hogy a készülék felbontása a mért m/z -nek megfelelő legyen, ami az 1 m/z különbséggel rendelkező csúcsok felbontását biztosítja.



3. ábra: Kvadrupól analizátor stabilitási diagramjának részlete, valamint egy példa különböző tömegű, egyszeres töltéssel rendelkező ionok x és y tengely irányú mozgása [11].

A kvadrupól analizátorok az egyenfeszültség alkalmazása nélkül, úgynevezett ionvezető egységekként (ion guide) használhatók. Ekkor a szkenn vonal a q tengelyre esik, így széles m/z tartományba eső ionok kerülnek a stabil régióba. Ebből a célból előnyösebb a kvadrupól helyett, hat elektródból álló hexapól vagy nyolc elektródból álló oktapól használata. Az oszcilláló elektromos térerő egy effektív mechanikus potenciált hoz létre, mely az elektródok felületétől, az elektródoktól egyenlő távolságra lévő egyenes felé csökken. Ez biztosítja az ionok stabilitását. Az elektródok számának növelésével nő az effektív mechanikus potenciál

meredeksége, aminek eredményeként nagyobb térrészben stabilak az ionok, ami jobb ionáteresztő képességet eredményez. Az ilyen ionvezető egységek ütközési cellaként használhatók, ha a cellába valamilyen ütközési gázt vezetnek.

A repülési idő (TOF) tömeganalizátor működésének elvi alapja az, hogy az azonos kinetikus energiájú ionok a térerőtől és az ütközések lehetőségétől mentes térben azonos távolságot tömegükkel arányos idő alatt tesznek meg. Mivel az ionok kinetikus energiáját elektromos térerővel biztosítják, nagyobb töltés esetén nagyobb lesz az adott ion kinetikus energiája is. Az ionok tömeg/töltése és a repülési idő közt az alábbi összefüggés áll fenn:

$$\frac{m_i}{z} = \frac{2 e U t^2}{s^2} \quad (1)$$

ahol, m_i : az ion tömege, z az ion töltésének száma, e : az elemi töltés, U : a gyorsítófeszültség, t : a repülési idő, s : az ionok által megtett távolság.

Nagy felbontás eléréséhez nagyon kis m/z különbséggel rendelkező ionokat is meg kell tudni különböztetni egymástól, melyek repülési idejének különbsége többnyire nanoszekundumos nagyságrendbe esik, ami nagy frekvenciájú detektálást tesz szükségsszerűvé. A TOF analizátor esetén az ionok nagyrésze detektálható. Kivételt csak azok képeznek, melyek iránya gázmolekulákkal ütközve megváltozik, vagy kezdetben kellően nagy, a gyorsítás irányára merőleges sebességgel rendelkeztek ahhoz, hogy ne a detektorba érkezenek. Ha a gázmolekulákkal való ütközés során az ionoknak iránya nem, csak azok sebessége változik jelentősen, a detektált csúcsok kiszélesednek. Ennek okán a nyomás csökkentése a felbontás növekedését eredményezi, ami miatt a TOF analizátorokat jellemzően nagy vákuum alatt tartják. A nagy pontosságú modern készülékek esetén az analizátor alkatrészeinek hőtágulása miatti repülési úthossz megváltozása is jelentősen befolyásolhatja a mérési eredményeket. Ezt a környezet hőmérsékletének stabilan tartásával, valamint kis hőtágulású anyagok felhasználásával minimalizálják.

A TOF analizátor az ionok impulzusszerű bevezetését igényli, ezért elsősorban a MALDI ionizációs technika megjelenésekor kezdtek elterjedni ezek az analizátorok. A felbontást jelentősen rontja, ha az ionok kezdeti helyzetének és sebességvektorának nagy a szórása. Ennek csökkentésére céljából késleltetett ionextrakciót és kétlépcsős gyorsítást alkalmaznak. A késleltetés miatt az ionok kinetikus energiájuk szerint szeparálódnak, a nagyobb kinetikus energiájúak távolabb jutnak a TOF csőben, mint a kisebb kinetikus energiájúak. Az első lépcsőben a gyorsítófeszültséget gradiensként hozzák létre, így a kisebb távolságot megtett kisebb kezdeti sebességű ionok, nagyobb kinetikus energiára tesznek szert, mint a nagyobb kezdeti kinetikus energiával rendelkező ionok, ezáltal az azonos m/z -vel rendelkező ionok

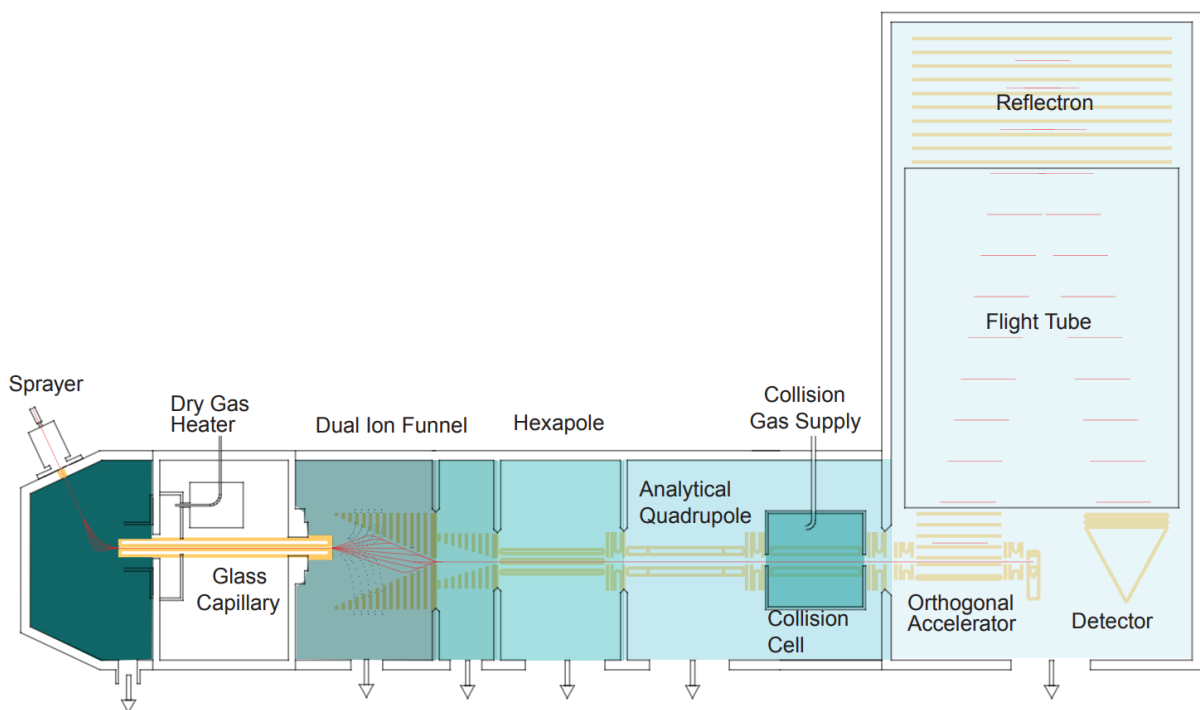
kinetikus energiájának szórása csökken. A második lépcsőben az összes ionra azonos mértékben ható gyorsító feszültséget alkalmaznak a kívánt sebesség eléréséhez.

Az első TOF analizátorokat ma a lineáris jelzővel illetik, mivel az ionok bevezetése az analizátor egyik, detektálásuk pedig annak másik végén történt. Fontos mérföldkövet jelentett az iontükörrel vagy más néven reflektronnal felszerelt TOF analizátorok kifejlesztése. Az iontükör számos egymás mögött elhelyezkedő gyűrű alakú elektródból áll, melyekre az ionok gyorsításánál használnál kicsivel nagyobb feszültséget kapcsolnak. Az ionok az iontükörben fokozatosan elveszítik kinetikus energiájukat, majd a beérkezésükkel ellentétes irányban gyorsulni kezdenek. Az azonos m/z -vel jellemezhető ionok közül a nagyobb kinetikus energiával rendelkezők mélyebbre jutnak az iontükör belsejében, így összességében hosszabb utat tesznek meg, ami kompenzálja a nagyobb sebesség miatti rövidebb repülési időt. Az iontükört általában olyan szögben helyezik el, hogy az ionok belépési helyük mellett legyenek detektálhatók. A reflektronos TOF analizátorral felszerelt készülékek gyakran az iontükör mögött egy második detektort is tartalmaznak, így lineáris módban is használhatók az iontükör feszültségének kikapcsolásával. Az ortogonális gyorsítású TOF analizátorok megjelenése folytonos ionáramot generáló ionforrással (pl. ESI) és ezáltal elválasztástechnikai módszerekkel való kapcsolást tett lehetővé. Az ortogonális gyorsítóba érkező ionok különböző ionoptikákkal fókuszálhatók, így a gyorsítófeszültség alkalmazásakor az ionok helyzetének és kinetikus energiájának szórása jelentősen csökkenthető, ami a felbontás további javulását eredményezi. Mialatt a TOF analizátorban szeparálódó ionok közül az utolsó is eljut a detektorba, az ortogonális gyorsítóba új ionok kerülnek, így az analizátor akár folyamatosan is üzemeltethető. Ennek köszönhetően a képződött ionok jóval nagyobb része detektálható, mint a szkennelő típusú analizátorok (pl. kvadrupól) esetén.

Az ionok detektálása kvadrupólok és TOF analizátorok esetén is ionszámláló detektorokkal lehetséges. Szekunder elektron sokszorozók esetén az ionok speciális fémbe vagy félvezetőbe csapódva szekunder elektronok kibocsátását okozzák, melyek egy feszültség alatt álló elektródba ütközve újabb elektronok kilépését okozzák. A detektorok számos ilyen dinódáknak nevezett elektródot tartalmaznak, melyekre egyre növekvő feszültséget kapcsolnak, ami egyre több elektron kilépését okozza, így 10^6 - 10^8 -szoros jelintenzitás növekedés érhető el. A csatorna elektronsokszorozók (channeltron) esetén a szekunder elektronok nem diszkrét dinódákon, hanem egy folytonos csőben képződnek, melyek az elektronok szóródásának elkerülése érdekében gyakran íveltek. A mikrocsatorna lemezek lényegében számos egymás mellett elhelyezett, kis átmérőjű lineáris csatorna elektronsokszorozókból állnak. Ezeket a mikrocsatorna lemezeket a beérkező ionok síkjához képest szögben helyezik el, az ionok a csatorna falával való ütközésének biztosítása érdekében.

A csatornák rövidsége miatt viszonylag kicsi a jelintenzitás növekedés, melyet több mikrocsatorna lemez egymás mögötti, egymáshoz képest kis szögen való elhelyezésével kompenzálunk. A szekunder elektronok végül egy elektroncsapdában áramot generálnak, melyet analóg-digitális átalakítóval konvertálnak digitális jellé [8].

Napjainkban nagyon elterjedtek a kvadrupólt, ütközési cellát és ortogonális gyorsítású TOF analizátort tartalmazó hibrid készülékek nagy teljesítőképességükhöz viszonyított megfizethető árúknak köszönhetően. A TOF analizátor nagy felbontású spektrumot biztosít, a fragmentálni kívánt ionok kiszűréséhez pedig elegendő a kvadrupól kisebb felbontása is. A 4. ábrán a Bruker impact II-es típusú QTOF készülékének sematikus ábrája látható, melyen megfigyelhető az MS inlethez képest szögben elhelyezett ESI interfész és az isCID fragmentációt lehetővé tevő két iontölcsér, melyeket a töltésnélküli részecskék kiszűrése érdekében az ionokat bevezető kapillárisal nem egyvonalban helyeztek el. Ezt egy ionvezetőként (ion guide) használt hexapól, majd az analitikai kvadrupól követi, mellyel a fragmentálni kívánt ionok izolálhatók. Ezt egy ütközési cella követi, majd egy ortogonális gyorsító és az iontükörrel felszerelt TOF analizátor.



4. ábra: Egy QTOF (Bruker impact II) készülék sematikus ábrája [12].

2.3 Intakt monoklonális antitestek ESI-MS vizsgálata

Biológiai mintákból származó fehérjéknek számtalan proteoformája létezik mutáció, polimorfizmus és különböző poszttranszlációs módosítások következtében. Ezek a proteoformák akár jelentősen eltérő biológiai hatásokat is mutathatnak ezért karakterizálásuk rendkívül fontos. Az egyes proteoformák beazonosítása azok intakt tömegének meghatározásával lehetséges. Az intakt jelző fehérjék esetén arra utal, hogy azok nem estek át enzimatis hasításon vagy a diszulfid hidak redukcióján.

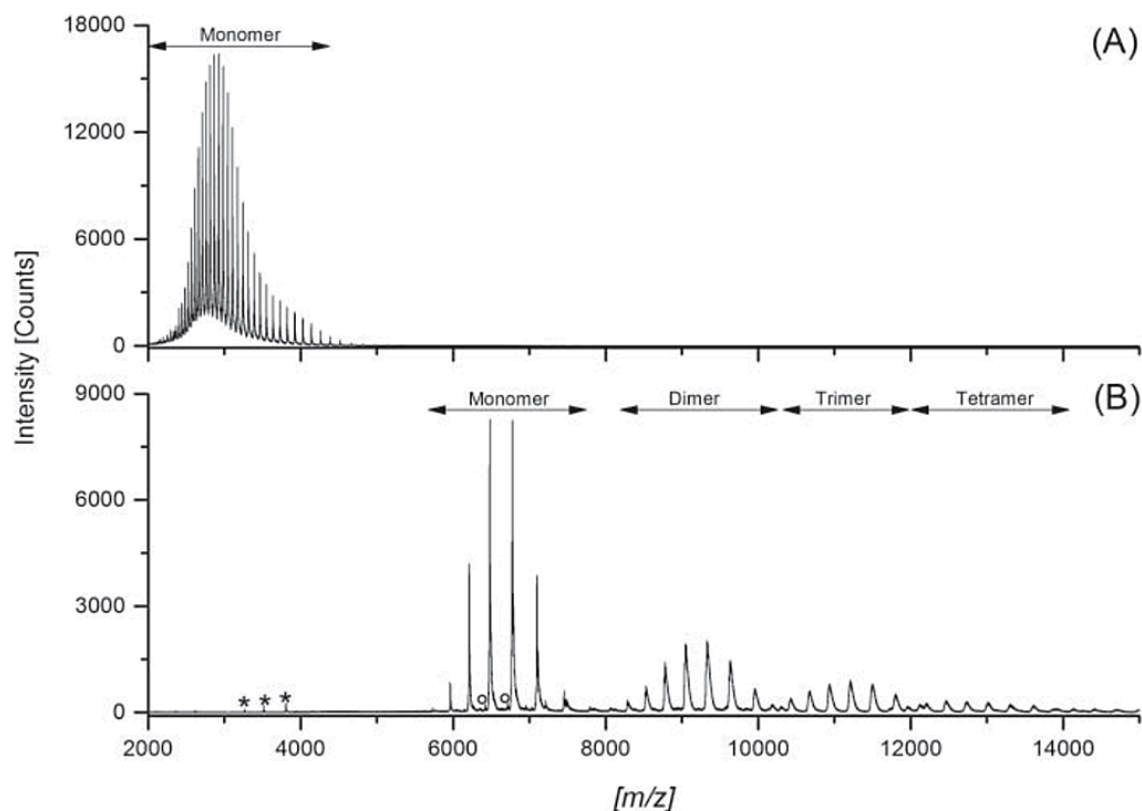
Monoklonális antitestek intakt tömegspektrumai számos esetben biztosíthatnak hasznos információkat. Ilyen a bioszimiláris készítmények összehasonlítása az originálissal [13], az antitestek gyártási tételei közti különbségek követésére [14, 15], a gyógyszerkészítmények stabilitásának tanulmányozása [15], különböző töltésvariánsok megkülönböztetése [16, 17] vagy az antitestek aggregációjának vizsgálata [18]. Az antitest-gyógyszer konjugátumok célzott terápiás szerként nagy specifikussággal juttatják el a kis molekulájú gyógyszer hatóanyagot a megfelelő szövethez. Ezek hatóanyag/antitest arányának meghatározása szintén intakt MS mérésekkel lehetséges [19–23].

Az intakt fehérjék elektropray ionizációjára nagyon jelentős hatással bírnak a mintamátrixban lévő komponensek. Különböző sók, kaotróp ágensek, detergensok és pufferek már nagyon kis koncentráció esetén is jelentős jelelnyomó hatást mutatnak a Top-Down Proteomikai Konzorcium vizsgálatai szerint (1. táblázat). A konzorcium ezért számos különböző mintaelőkészítési protokollt javasol intakt fehérjék mérése esetén, a vizsgálni kívánt fehérje vagy fehérjék és a mátrixkomponensek alapján. Ezek a minta hígítását, különböző centrifugaszűrési vagy kicsapási, majd visszaoldási eljárásokat jelentenek [24].

1. táblázat: Mátrixkomponensek jelelnyomó hatása egy standard fehérje keverék esetén [24].
(SC₅₀: a jelintenzitást 50%-kal csökkentő koncentráció.)

Type	Component	SC ₅₀
Salts	Sodium chloride	1.5 mM
	Magnesium chloride	25 µM
	Ammonium sulfate	1.1 mM
Chaotropes	Guanidinium chloride	38 µM
	Urea	600 µM
Detergents*	SDS	1.7 µM
	Triton X-100	4.2 µM
	Tween 20	1.3 µM
Buffers	Tris base	91 µM
	HEPES	600 µM
	PBS	31 µM
	Antibody formulation	3.4 µM

A fehérjék ionizációjának ma két módját különböztetik meg. Denaturáló körülmények közt az ionizációt a lánckilökődési modell írja le, ilyen esetben jellemzően jóval több nagyobb töltésű formája detektálható a fehérjének. Natív körülmények esetén – mely alatt közel 7-es pH-jú vizes oldatot értünk – a visszamaradó töltés modell érvényesül, így kevés kisebb töltésű fehérjeforma képződése figyelhető meg, ami a jel/zaj arány növekedését eredményezi [25]. A 5. ábrán egy antitest denaturáló és natív körülmények közt mért tömegspektruma látható.



5. ábra: Egy mAb ESI-MS spektruma (A) denaturáló és (B) natív körülmények mellett [22].

Az antitestek tömegspektrumban megjelenő töltésformái és azok eloszlása más módon is befolyásolható. A supercharging reagensek (pl. propilén-karbonát, o-nitroanizol) a fehérje töltésének növelésével csökkentik a vizsgálandó m/z tartományt, elnyomhatják a különböző adduktok képződését, bizonyos esetekben növelhetik az intenzitást, valamint a csúcsok alakját is javíthatják [21]. Ezzel szemben a töltésredukáló ágensek (pl. trietil-ammónium-acetát) a nagy gázfázisú bázicitásuk miatt képesek a natív állapotnál is tovább csökkenteni a fehérje töltését, ezzel növelve a vizsgálandó m/z tartományt és csökkentve a különböző fehérjék csúcsai közti átfedés lehetőségét. E mellett növelhetik a gázfázisú fehérjekomplexek stabilitását [22]. Mindkét típusú reagens esetén azt találták, hogy használatuk nem változtatja meg jelentősen a hatóanyag/antitest arányt antitest-gyógyszer konjugátumok esetén.

A mAb-ok nagy molekulatömege miatt a legtöbb MS készülék nem képes monoizotópos felbontást elérni. Fourier-transzformációs ion-ciklotron rezonancia készülékkel 2011-ben [26], Orbitrap tömeganalizátoros készülékkel pedig 2013-ban értek el először kellő felbontást [27].

2.4 Intakt fehérjék ESI-MS spektrumának feldolgozása

Az elektropray egy ionizációs technika mely nagy molekulatömeg fehérjék ionizációját és ezáltal MS vizsgálatukat lehetővé teszi. A fehérjék ESI-MS spektrumára jellemző, különösen nagy molekulatömeg esetén, hogy a fehérjék számos különböző töltésű formában ionizálódnak, így a tömegspektrum széles m/z tartományát fedik le a kapott jelek. Ennek következtében a tömegspektrumban más ionok jelei nagy eséllyel lehetnek átfedésben a fehérjére kapott jelekkel. Ez különösen akkor okozhat problémát, ha több fehérjét detektálunk egyszerre, melyek mind számos különböző töltésű formában jelennek meg a spektrumon. Ez a fehérjék MS detektálása előtti elválasztással elkerülhető lehet. Top-down proteomika vizsgálatok esetén az intakt fehérjék fragmentálásával képződött nagy peptidek vagy fehérjerészletek azonosítása alapján határozzuk meg a fehérje szekvenciáját, valamint poszttranszlációs módosulatait. Ekkor számos nagy méretű peptid különböző töltésű formáit detektáljuk egyszerre, ami rendkívül összetett spektrumot eredményez. Ilyen esetekben a mérések kiértékeléséhez feltétlenül szükséges a spektrum egyszerűsítése, melynek legkézenfekvőbb módja a fehérje töltésnélküli spektrumának létrehozása a mért adatokból. Ezt az eljárást leggyakrabban dekonvolúciónak nevezik.

Az ESI-MS spektrumok dekonvolúciójára először az ESI-t megalkotó John Fenn kutatócsoportjában dolgoztak ki algoritmust 1989-ben [28]. Mindössze két évvel később Ferrige és társai alkalmaztak először maximum entrópia módszerén alapuló eljárást tömegspektrumok dekonvolúciójára [29]. A tömegspektrométereket gyártó cégek által a mért adatok kiértékelésére fejlesztett szoftverek többsége ma már rendelkezik beépített dekonvolúciós algoritmussal, melyek jellemzően a maximum entrópia módszerén alapulnak.

A dekonvolúcióhoz a tömegspektrumban megjelenő csúcsok töltésének megállapítása szükséges, melynek két lehetséges módja van. Izotóposan felbontott spektrumok esetén az izotopológ csúcsok közti m/z különbség reciprokával közelíthető azok töltése. Ez a módszer akkor is használható, ha az adott komponensnek csak egyetlen töltésformája jelenik meg a spektrumban. Ha legalább két összetartozó töltésformát be tudunk azonosítani, a nagyobb m/z -vel rendelkező töltése az alábbi képlettel számolható:

$$n = \frac{m/z_1 - m_{addukt}}{m/z_2 - m/z_1} \quad (2)$$

ahol, n : a nagyobb m/z -vel rendelkező csúcs töltése, m_{addukt} : az addukt töltését biztosító ion (pl. H^+) tömege és $m/z_1 < m/z_2$. Ez a képlet kis felbontású spektrumok esetén is alkalmazható.

Ennek megfelelően a dekonvolúciós algoritmusok is feloszthatók izotóposan felbontott spektrumot igénylőkre és kis felbontású spektrum esetén is használhatókra. Az előbbi

csoportnak számos tagja van (pl. THRASH [30], MASH Suite [31], MS-Deconv [32], AID-MS [33]), ezek azonban intakt antitestek spektrumának feldolgozására nem alkalmasak. Az alábbiakban néhány kis felbontású spektrum dekonvolúciójára alkalmas szoftver működési elvét mutatom be.

Töltés nélküli spektrumot ugyan nem kreál, de a töltés és molekulatömeg meghatározására alkalmas az ESIProt nevű, internetes verzióban is elérhető szoftver, melynek algoritmus standard deviáció optimaláson alapszik. A szoftverben az egyes töltésformák m/z értékeit kell megadni növekvő sorrendben, valamint egy minimális és maximális lehetséges töltésszámot. A szoftver az első csúcsra a megadott maximális töltésszámot, a többi csúcsra pedig egyesével csökkenő töltést feltételezve kiszámolja az azokhoz tartozó molekulatömeget proton adduktok esetén, majd ezek standard deviációját átlagukhoz viszonyítva. Ezt annyiszor ismétli meg a szoftver míg eléri a minimális töltésszámot. Végül legkisebb standard deviációt eredményező töltéseket és az azokhoz tartozó molekulatömeget adja meg eredményként [34].

A MagTran szoftver külön algoritmusokkal rendelkezik kis és nagy felbontású spektrumok dekonvolúciójához. Az algoritmus kiválasztja a legnagyobb intenzitású csúcsot, majd – a felhasználó által megadott határértékek közt – minden töltéshez egy pontszám értéket (score) rendel hozzá. A szoftver az adott töltés alapján meghatározza az annál kisebb és nagyobb töltésekhez tartozó m/z értékeket. A score a tömegspektrum ezen m/z értékeinél lévő jel/zaj arány logaritmusainak összege. A legnagyobb score-ral rendelkező töltésnek megfelelően határozza meg a szoftver a csúcs töltés nélküli spektrumát. Amennyiben egy csúcs minden vizsgált töltés esetén negatív score-ral rendelkezik azt a szoftver zajként kezeli és figyelmen kívül hagyja. Az algoritmus ezeket a lépéseket addig ismétli, amíg egy adott jel/zaj arány fölött lévő csúcsok el nem fogynak. Végül a csúcsok töltés nélküli spektrumait összegezve kapjuk a dekonvolált spektrumot [35].

Az UniDec nem csak az egyes csúcsokhoz, hanem a teljes m/z tartományhoz rendel töltés értékeket. A szoftver algoritmus egy kétdimenziós delta mátrixot használ, mely a mért tömegspektrumhoz képest egy töltés dimenzióval is rendelkezik. A dekonvolúció azzal a kezdeti feltételezéssel indul, hogy minden m/z esetén azonos a valószínűsége az összes lehetséges töltésnek (a minimális és maximális lehetséges töltésszámot a felhasználó adja meg a paraméterek közt). Ezt egy három lépésből álló iteráció követi. Először a delta mátrix töltéseloszlását simítja a szoftver. Ennek lényege, hogy egy m/z -hez tartozó töltések valószínűségét, annak valószínűségével arányosítja, hogy ugyanaz a tömeg megjelenik-e az egyel kisebb és egyel nagyobb töltéshez tartozó m/z értékeknél. Ezt követően a delta mátrixban az intenzitásokat a töltés dimenzió mentén összegzi, ami egy egydimenziós m/z spektrumot eredményez. Végül az eredeti spektrum és a levetített spektrum egyes m/z -inek arányával

súlyozza a delta mátrixban annak megfelelő m/z értékekhez tartozó minden egyes töltés intenzitását. Az iteráció akkor fejeződik be, ha az eredeti spektrum és a levetített spektrum jó egyezést mutat (vagy az iterációk száma eléri a paraméterek közt megadott maximumot). Végül a delta mátrixot egy tömeg és töltés dimenziójú mátrixszá transzformálják, aminek levetítése a dekonvolált spektrumot eredményezi [36]. A UniDec szoftverhez a mai napig készülnek frissítések, fejlesztések. Ilyen volt például a SoftMax függvény használatának bevezetése a műtermékek (artifact-ok) keletkezésének elkerülése érdekében [37].

A dekonvolúció egyik fő célja intakt fehérjék esetén azok tömegének meghatározása. Kis molekulák azonosítására a monoizotópos csúcshoz tartozó tömeget szokás használni, ez azonban már viszonylag kis fehérjék esetén is csekély intenzitású lehet. Ebben az esetben a legnagyobb intenzitású izotopológ csúcs használata merül fel lehetőségként, ami azonban az izotopológ csúcsok közti kis intenzitáskülönbség miatt könnyen ± 1 Da hibához vezethet. Fred McLafferty csoportja ilyen esetekben a monoizotópos tömeg meghatározásához egy fehérje adatbázis adatait felhasználva egy átlagos elemösszetétellel rendelkező fiktív aminosav, az averagine ($C_{4,9384}H_{7,7583}N_{1,3577}O_{1,4773}S_{0,0417}$) használatát javasolta. A meghatározott átlagtömegnek megfelelő méretű poli-averagine molekula elemeit egészen kerekítjük, majd a fennmaradó tömegkülönbséget hidrogén atomokkal kompenzáljuk. Végül az így kapott elemösszetételhez tartozó monoizotópos tömeggel közelítjük a vizsgált fehérje monoizotópos tömegét, akár 10 ppm pontossággal [38]. A legtöbb MS készülék nem képes mAb-ok izotopológ csúcsait felbontani, így csak egy azokat fedő burkoló görbét tudunk detektálni. Az így kapott széles csúcs maximumát a fehérje átlagtömegéhez szokták viszonyítani.

3. Kísérleti körülmények

3.1 Vegyszerek és minták

A kísérletek során felhasznált metanol, acetonitril és izopropanol LC-MS tisztaságú VWR vegyszerek (VWR International, Radnor, PA, USA), a hangyasav és ecetsav oldatok pedig analitikai tisztaságú Sigma termékek voltak (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Az oldatokat háromszorosan ioncserélt vízzel készítettem (Elix-3, Millipore, Darmstadt, Németország). A vizsgált monoklonális antitest tartalmú gyógyszerkészítményeket (Erbix: Merck Europe B.V., Amsterdam, Hollandia; MabThera: Roche Registration GmbH, Grenzach-Wyhlen, Németország; Ontruzant: Samsung Bioepis NL B.V., Delft, Hollandia) a ScanoMed Kft. (Debrecen, Magyarország) biztosította.

3.2 Készülékek

A méréseket egy maXIs II UHR q-TOF MS készülékkel (Bruker, Billerica, MA, USA) végeztem. A tömegspektrométer egy 7100 CE kapilláris elektroforézis készülékhez (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) CE-ESI Sprayer G1 607B (Agilent) interfésszel volt kapcsolva. A CE készüléket ebben a munkámban nem elektroforetikus elválasztásokhoz használtam, csupán a készülék programozható és hatékony mintainjektálási és szállítási rendszerét alkalmaztam a minták tömegspektrométerbe történő beviteléhez. A mintabevitel 60 cm hosszúságú, 75 μm belső átmérőjű poliimid külső bevonatú kvarckapillárison (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, USA) keresztül történt, 2 bar nyomású nitrogéngázzal. Kis áramlási sebesség esetén az ESI interfésznél szükséges segédfolyadékot egy 1260 Infinity II izokratikus pumpa (Agilent) biztosította.

3.3 Szoftverek

Az MS mérési adatokat az otofControl 4.1-es verziójával (build: 3.5, Bruker) rögzítettem, kiértékelésüket pedig a Compass DataAnalysis 4.4 (build: 200.55.2969, Bruker) szoftverrel végeztem. A tömegspektrumok szimulációjához a Compass DataAnalysis mellett a Compass IsotopePattern (Bruker) szoftvert használtam. A tömegspektrumok dekonvolúciójához a Bruker Maximum Entropy szoftverét, az UniDec 5.0.3-as verzióját [36], valamint a MagTran 1.03 b2-es verzióját használtam [35].

3.4 Tömegspektrometriás mérési paraméterek

A monoklonális antitestek elemzéséhez a tömegspektrometriás mérési módszert optimaltam és a méréseim során az alábbi paramétereket alkalmaztam. Adatgyűjtési tartomány: 600-8000 m/z; adatgyűjtési frekvencia 1 Hz; pozitív ion mód; kapilláris feszültség: 4500 V; end plate offset: -500 V; porlasztógáz nyomása: 0,5 bar; szárítógáz áramlási sebessége: 5 L/min; szárítógáz hőmérséklete: 220 °C; funnel RF: 400 Vpp; isCID energia: 160 eV; multipole RF: 400 Vpp; kvadrupól ion energia: 5 eV; kvadrupól alsó kizárási határa: 1000 m/z; ütközési energia: 10 eV; ütközési cella RF: 2000 Vpp; transfer time: 200 µs; pre-pulse storage time: 20 µs.

Tömegkalibráláshoz ESI-L Low Concentration Tuning Mix kalibráló oldatot használtam (Agilent). A kalibráló spektrumának rögzítésekor a szárítógáz hőmérsékletét 100 °C-ra csökkentettem az oligomerek képződésének elősegítése érdekében, ami lehetővé tette a tömegkalibrálást 622-5460 m/z tartományban. Minden más MS paraméter megegyezett a korábban leírtakkal.

3.5 Cetuximab mátrixmentesítése

A mátrixmentesítéshez 150 µl 5 mg/ml koncentrációjú Erbitux oldatot (cetuximab hatóanyagú készítmény) mértem egy 500 µl térfogatú Amicon Ultra-0.5 3K centrifugacső szűrőbe (Millipore), majd 300 µl vizet adtam hozzá. A centrifugacső szűrőt egy Hermle Z 323 K típusú centrifugába (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Németország) helyeztem, majd 14000 RCF-fel centrifugáltam 30 percig. A centrifugacső szűrőben maradt ~30 µl oldathoz 400 µl vizet adtam majd ismét 30 percig centrifugáltam 14000 RCF-fel. Ezt a műveletet még egyszer megismételtem. A szűrőben maradt oldat eltávolításához a centrifugacső szűrőt nyílásával lefelé helyeztem a gyűjtő eppendorf csőbe, majd 1000 RCF-fel centrifugáltam 2 percig. A szűrőt 30 µl vízzel átmostam, majd a mintát 75 µl-re hígítottam vízzel. Így a cetuximab végső koncentrációja 10 mg/ml lett, a mátrixkomponensek mennyisége pedig 0,2% alá csökkent.

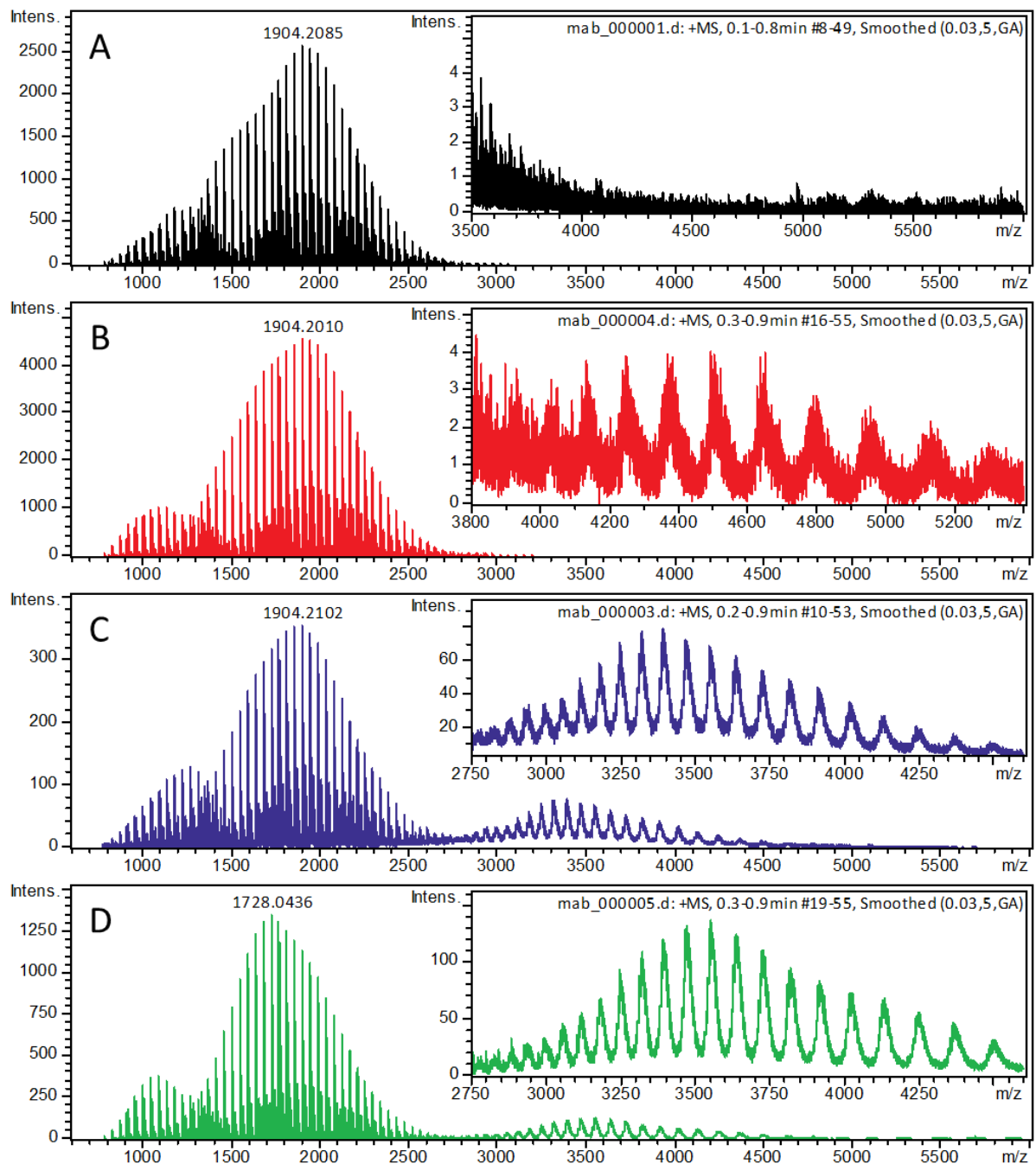
Az acetonitriles mátrixmentesítés esetén a fent leírtakhoz hasonlóan jártam el, de a centrifugacső szűrőben az Erbitux oldathoz 20% acetonitrilt tartalmazó háromszorosan ioncserélt vizet adtam mindháromszor.

4. Eredmények és értékelésük

4.1 Mátrixkomponensek hatása antitestek elektropray ionizációjára

A monoklonális antitestek MS mérése a kis molekulákhoz képest jóval nagyobb kihívást jelentő feladat, mivel az ionizációjukat több tényező, nagyobb mértékben befolyásolja. A mAb-ok elemzése általában a kereskedelmi forgalomban levő készítményből vagy gyártási tételből történik, melyek a fehérje mellett számos szervetlen és szerves összetevőt is tartalmaznak, amelyek az antitest érzékeny detektálását nehezítik. A mátrixanyagok a komponensek adduktképzésén keresztül nagyban csökkenthetik a mAb-ok különböző (pl. glikozilált) formáinak azonosításához szükséges felbontást, valamint a jel megoszlása miatt a detektálás érzékenységét is. Ismeretes, hogy a különböző komponensek ESI ionizációját nagyban elősegítheti a minta savanyítása (pozitív ionizációs mód esetén) vagy illékony oldószer tartalmának növelése, ezek azonban alapvetően meghatározzák az antitest tömegspektrumának jellemzőit (pl. töltés és adduktformák eloszlását, jelintenzitások alakulását). Mindezek miatt fontos a mátrixanyagok ESI ionizációra gyakorolt hatásának vizsgálata.

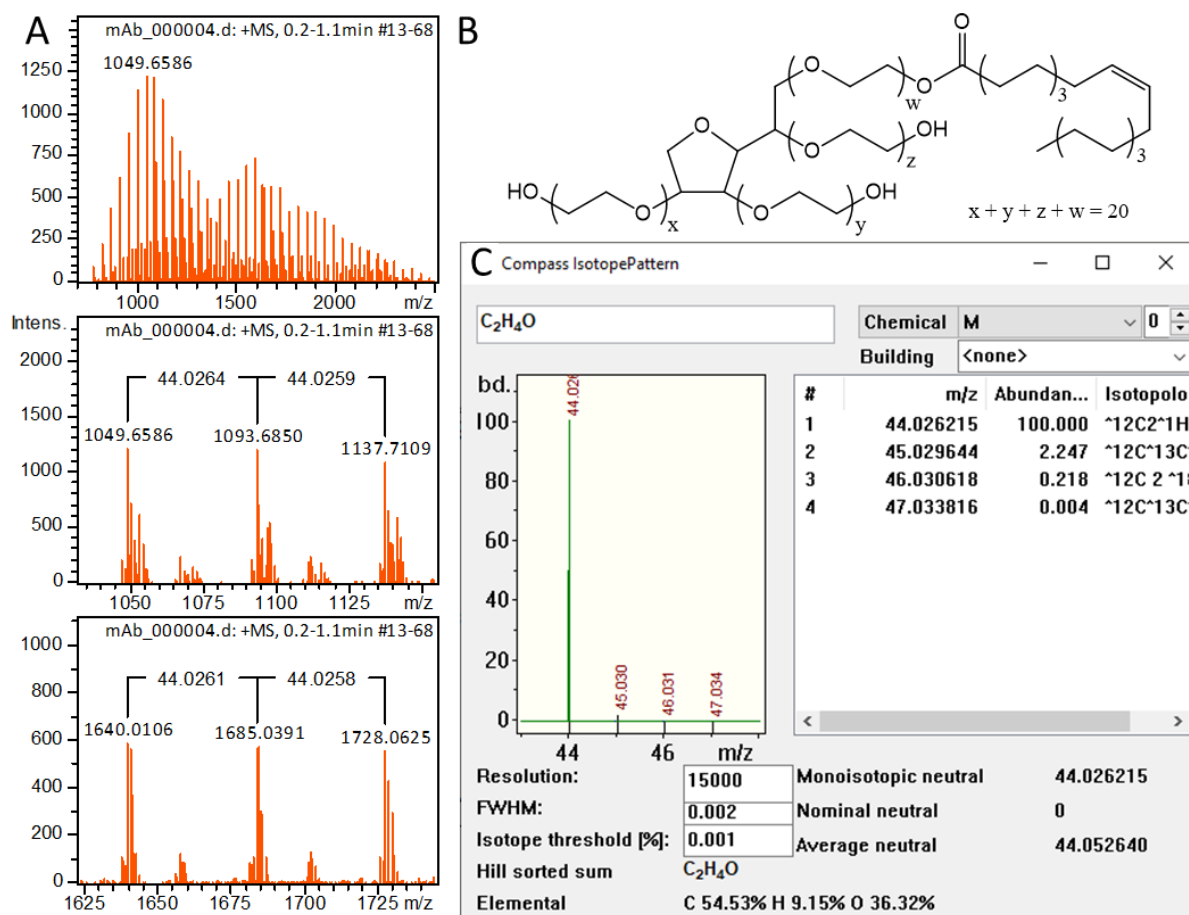
Erbitux (cetuximab) oldatát vizsgálva, a készítmény hígításával kapott mintákat a 3.2 fejezetben leírt módon juttattam a tömegspektrométerbe. (A dolgozatban bemutatott tömegspektrumokon Gauss típusú simítást végeztem 5 pont szélességgel 5 ciklussal.) A mintákhoz a hígítás során különböző anyagokat adtam, az így kapott tömegspektrumok láthatók az 6. ábrán. Vízzel hígított minta esetén nem kaptam az antitestre jellemző jelet, a hígítás során 50% metanolt adva a mintához azonban már megjelent néhány nagyon kis intenzitású csúcs. Az Erbitux oldathoz 10% hangyasavat adva a mért spektrumban már jól kivehető csúcsok jelentek meg, melyek intenzitása 50% metanol tartalom esetén tovább nőtt. Elektropray ionizáció estén jellemző, hogy illékony szerves komponens elősegíti a minta párolgását, és ezzel az ionizációját. Pozitív ionizációs mód alkalmazásakor a pH csökkentése szintén növelte az ionizáció mértékét.



6. ábra: 2 mg/ml koncentrációra hígított Erbitux (cetuximab) tömegspektrumai (A) tiszta vizes oldat, (B) 50% metanol, (C) 10% hangyasav, (D) 50% metanol és 10% hangyasav tartalmú oldat esetén. A spektrumok jobb felső részein az antitest különböző töltésű csúcsai láthatók.

A spektrum 800-2500 tartományában megjelenő csúcsok a gyógyszerkészítményben lévő Tween 80 jelei. A Tween 80 vagy más néven poliszorbát 80 egy nem ionos detergens, mely polietilén-oxid láncokat tartalmaz, szerkezete a 7. ábrán látható. A tömegspektrumban megjelenő csúcsok mind egyszeres töltésűek, a köztük lévő tömegkülönbség pedig jó egyezést mutat az etilén-oxid monomer egység elméleti monoizotópos tömegével.

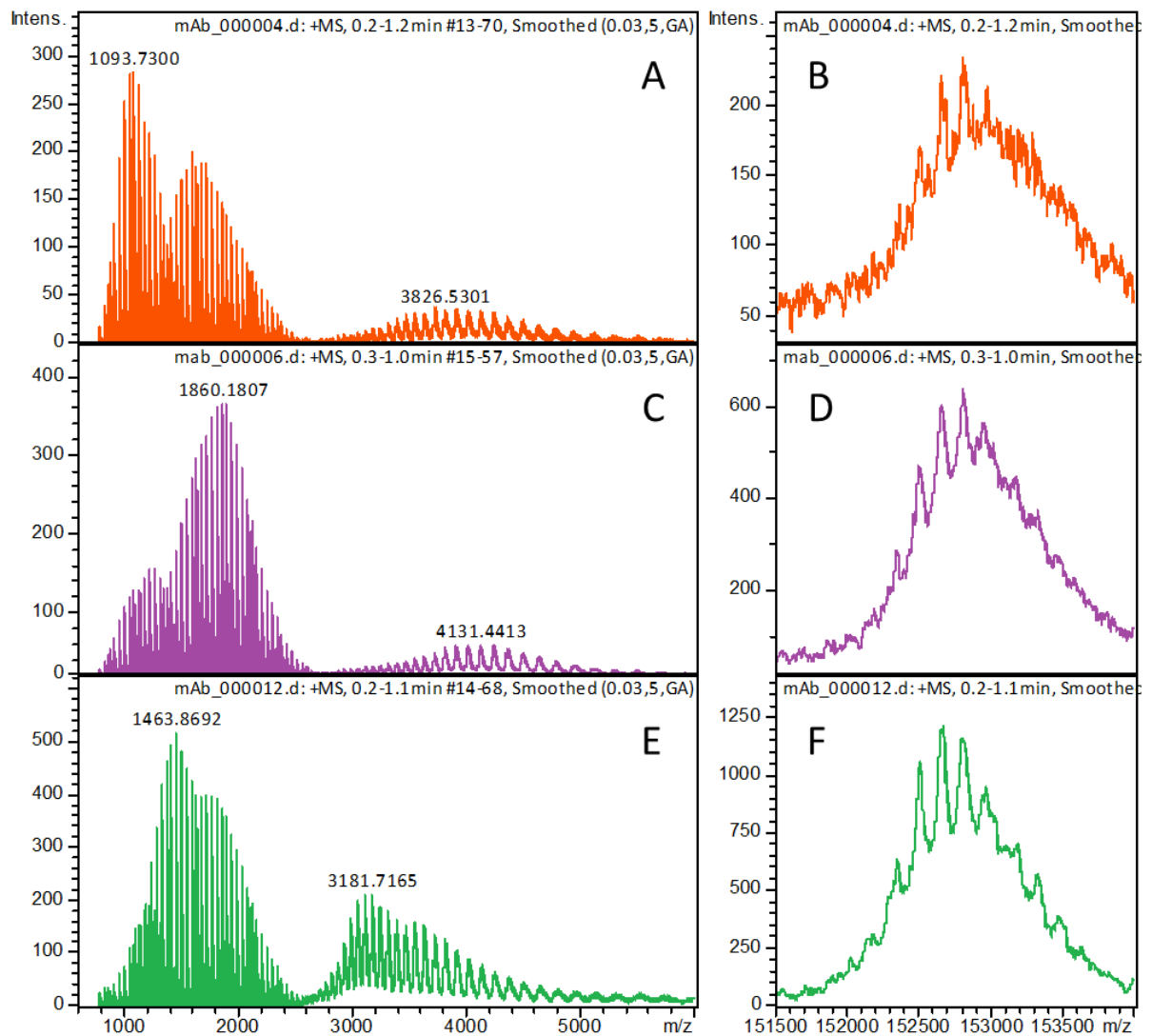
Az 6. ábrán megfigyelhető, hogy a metanol Tween 80 ionizációját elősegíti, a hangyasav azonban látszólag épp ellenkezőleg hat. Ennek következtében amellet, hogy a hangyasav önmagában is elősegíti a mAb ionizációját, a detergens ionelnyomó hatását is csökkentheti.



7. ábra: Tween 80 10% ecetsavat tartalmazó, 1 mg/ml koncentrációjú Erbitux oldatban. (A) A tömegspektrum 700-2600 m/z tartománya és a csúcsok közti tömegkülönbségek, (B) Tween 80 szerkezeti képlete, (C) etilén-oxid monomer egység szimulált tömegspektruma.

Az eddig említett eredmények alapján úgy gondolom az antitest ionizációját a gyógyszerkészítményben található segédanyagok, elsősorban a Tween 80 gátolhatja. Az Európai Gyógyszerügynökség Erbitux-ra vonatkozó alkalmazási előírásának 6.1 szakasza szerint a készítmény az következő segédanyagokat tartalmazza: „Nátrium-klorid, glicin, poliszorbát 80, citromsav monohidrát, nátrium-hidroxid, injekcióhoz való víz” [39]. A segédanyagok eltávolítása érdekében centrifugaszűrővel tisztítottam a mintát, melynek menetét részletesen a 3.5 fejezetben írtam le. A mátrixmentesítést vízzel elvégezve a cetuximab dekonvulált spektrumának jel/zaj aránya javult, azonban a Tween 80 továbbra is jelen volt a tömegspektrumban (8. ábra), annak ellenére, hogy a centrifugacső szűrők csak 3 kDa-nál nagyobb tömegű molekulákat tartja vissza, és a segédanyagoknak elméletileg több mint 99,8%-a el lett távolítva. Ennek oka feltehetően, hogy az antitest és detergens közt kialakuló nagyszámú, viszonylag gyenge kölcsönhatások összessége erős kötődést eredményez, ezért csak egy része távozik a Tween 80-nak a mintából a többi segédanyaggal együtt.

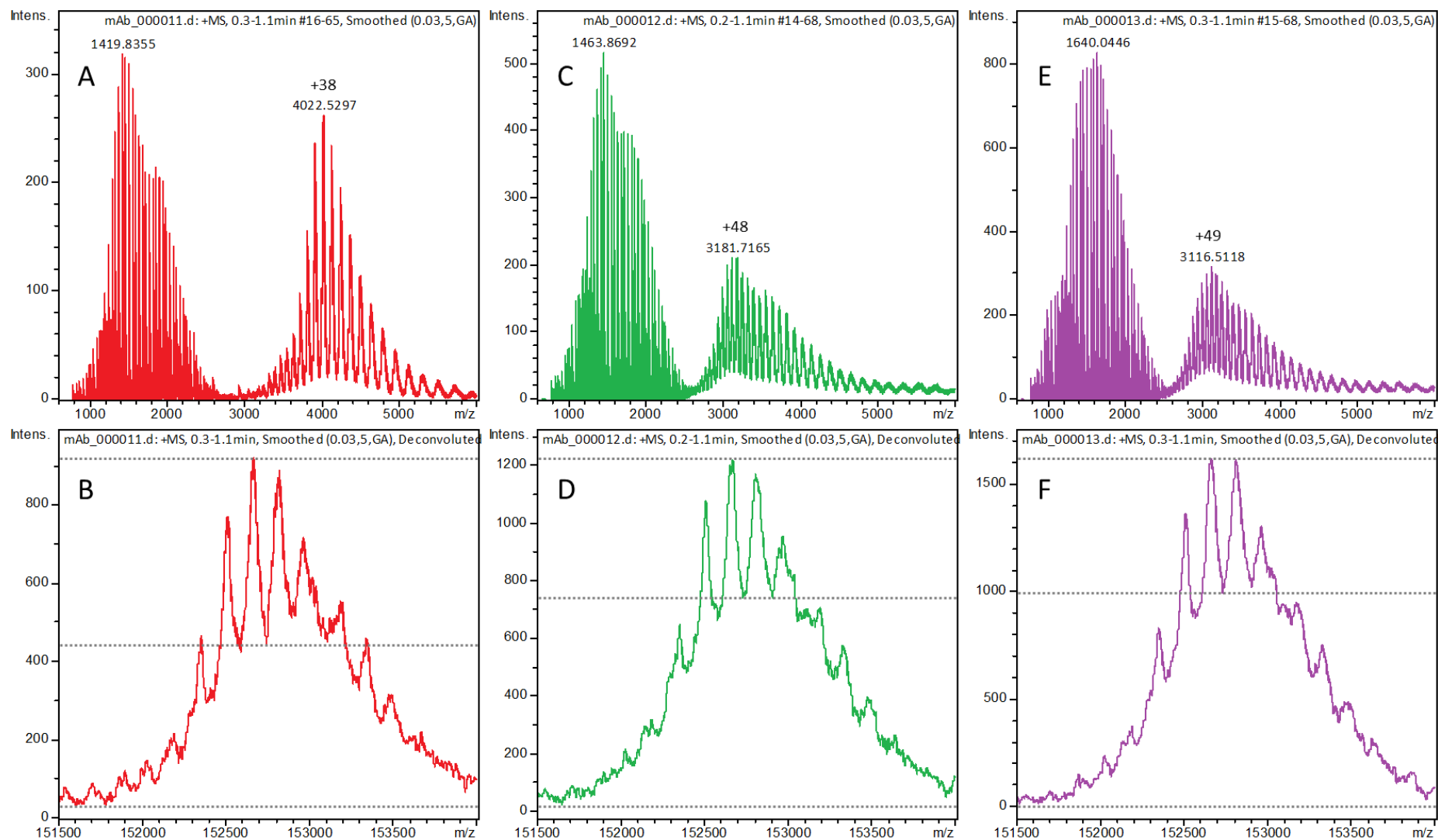
A detergens eltávolításának elősegítése érdekében a mátrixmentesítést újra elvégeztem, ezúttal a centrifugacső szűrővel még kompatibilis maximális 20% acetonitrilt tartalmazó vízzel, így a mért spektrum további javulást mutatott. A Tween 80 jelentős apoláris jellege miatt feltehetően nagyobb affinitást mutat acetonitrilhez mint vízhez, ezért lehetett sikeresebb az acetonitriles mátrixmentesítés. A Tween 80-ra jellemző csúcsok intenzitása a mátrixmentesítés során egyre nőtt, ez azonban feltehetően nem a detergens koncentrációjának növekedésére, hanem az ionizáció hatásfokának javulására utal.



8. ábra: 10% ecetsavat tartalmazó, 1 mg/ml koncentrációjú Erbitux (cetuximab) oldatok tömegspektrumai (A, C, E) és dekonvulált spektrumai (B, D, F): (A, B) mátrixmentesítés nélkül, (C, D) vizes mátrixmentesítéssel, (E, F) 20% acetonitril tartalmú mátrixmentesítéssel.

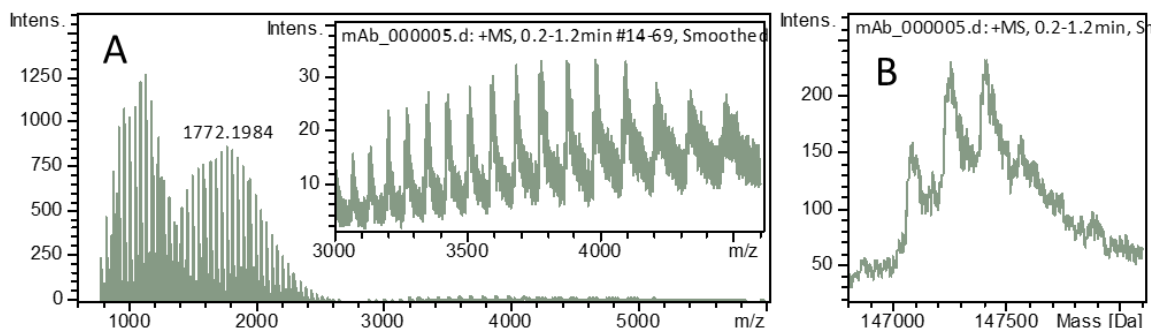
Az acetonitril tartalmú vízzel mátrixmentesített mintával vizsgáltam az ahhoz adott sav mennyiségének hatását a mért tömegspektrumokra (9. ábra). Oldatban a magas oxóniumion koncentrációnak a fehérjékre nézve kettős hatása érvényesül. Egyrészt a protonálódnak a fehérje különböző funkciós csoportjai (pl. amino, karboxilát), másrészt a fehérje denaturálódását okozhatja, a harmadlagos szerkezetet megbontva megváltoztatja annak konformációját.

Denaturálódáskor a fehérjék kitekerednek, ezáltal olyan aminocsoportok kerülhetnek az oldószer számára hozzáférhető helyre, melyek a natív szerkezetű fehérje esetén annak belső részében, az oldószertől és az oxóniumionoktól elzárva voltak a fehérje többi része által. Ez a potenciálisan protonálható csoportok számának és ezáltal az adott fehérje töltésszámának növekedését okozza. Pozitív módú elektropray ionizáció esetén a pH csökkentése közvetlenül az ionizálódó molekulák számára és ezáltal a mért jelek intenzitására hat, a tömegspektrumban megjelenő töltésekre elsősorban közvetetten, a fehérje denaturációja miatt van hatással. A 9. ábrán látható, hogy 1% ecetsavat tartalmazó minta esetén a +38-as töltés, míg 10% és 20% ecetsav tartalom esetén a +48, +49-es töltések rendelkeznek a legnagyobb intenzitással. Ez alapján 10% és annál nagyobb ecetsav tartalom esetén az antitest látszólag közel teljesen denaturált formában van jelen, 1% ecetsav esetén pedig valószínűleg csak részleges a denaturáció. 10%-ról 20%-ra növelve az ecetsav tartalmat a legnagyobb intenzitású töltésforma intenzitása a várt módon növekszik, 1% esetén viszont nagyobb, mint 10% savtartalom mellett. Ennek oka az lehet, hogy az ionizálódott fehérje összintenzitása több töltésforma közt oszlik meg 10% esetén, mint 1%-nál. A dekonvolált spektrumok tekintetében 10% és 20% ecetsav tartalmú minta spektruma közt az intenzitáson kívül nem látni jelentős különbséget, az 1% ecetsav tartalmú minta esetén azonban egyértelműen jobb a csúcsok közti felbontás. A jobb felbontást az alacsony ecetsav tartalmú minta esetén az alábbiak okozhatják. A nagyobb m/z -nél megjelenő kisebb töltésű glikozilált formák csúcsai szélesebb m/z tartományon találhatók, mint a kisebb m/z -nél detektált nagyobb töltésformáké, így a kisebb töltések esetén az egyes csúcsok egymástól távolabb helyezkednek el. Az alkalmazott TOF tömeganalizátor felbontása a vizsgált m/z tartománytól függetlenül közel állandó, ezért tudunk nagyobb felbontást elérni az antitest kisebb töltéseinél. A dekonvolúció során az egyes töltésformák hozzájárulása azok intenzitásának arányában van súlyozva, ezért javítja a dekonvolált spektrum felbontását a kisebb töltésformák intenzitásának növekedése.



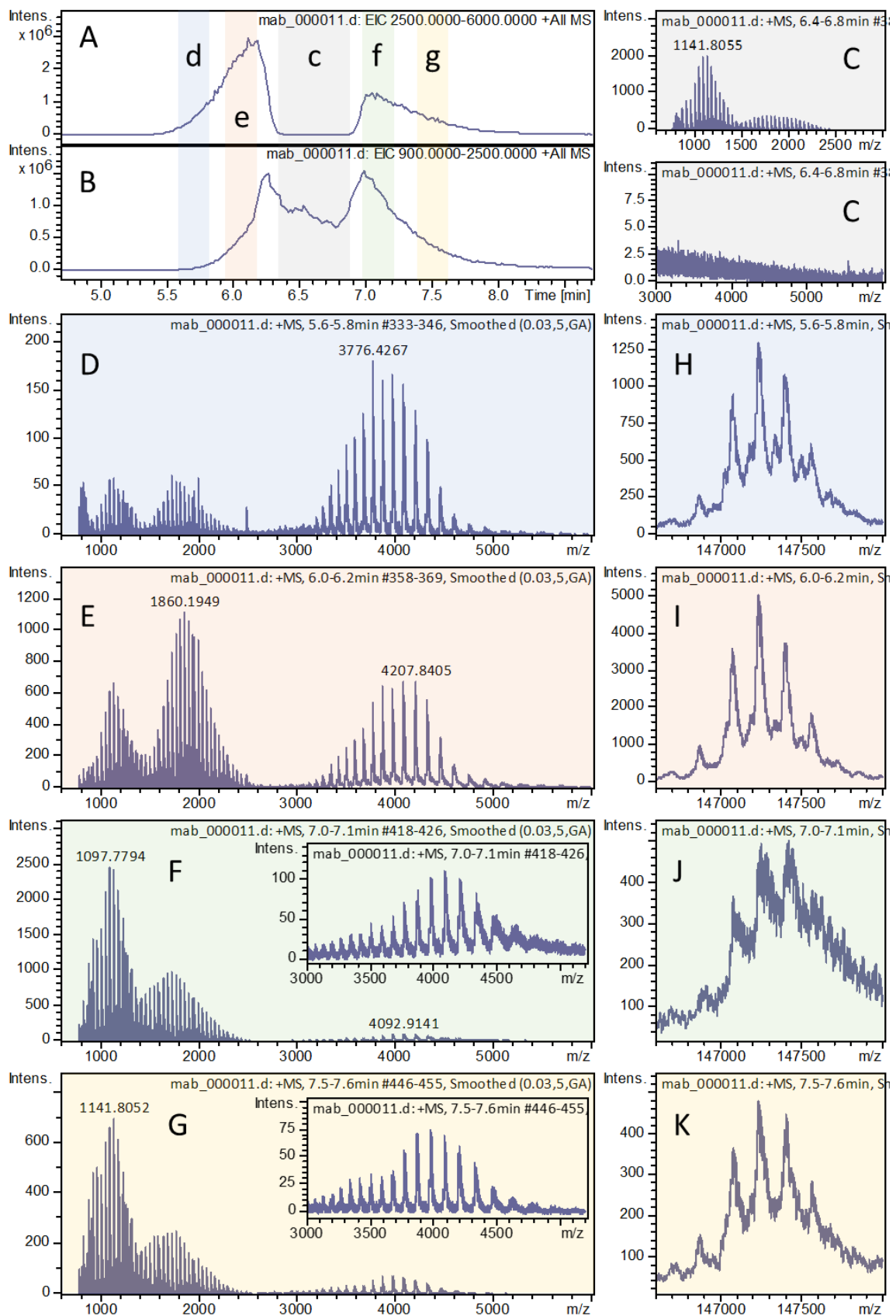
9. ábra: 1 mg/ml koncentrációjú acetonitriles oldattal mátrixmentesített Erbitux (cetuximab) oldatok tömegspektrumai (A, C, E) és dekonvolált spektrumai (B, D, F): (A, B) 1%, (C, D) 10%, (E, F) 20% ecetsav tartalmú oldatok esetén. A spektrumokon antitest legnagyobb intenzitású csúcsának töltése van feltüntetve. A dekonvolált spektrumokon a szaggatott vonalak a két legnagyobb intenzitású csúcs közti felbontást szemléltetik.

A cetuximab után a rituximabot tartalmazó MabThera nevű készítményt vizsgáltam, melyet 1 mg/ml koncentrációjúra hígítottam és 10% ecetsavat adtam hozzá. Ezen minta esetén az Erbitux-hoz hasonlóan nagy intenzitású jelet kaptam Tween 80-ra és rossz jel/zaj arányú jelet az antitestre (10. ábra).

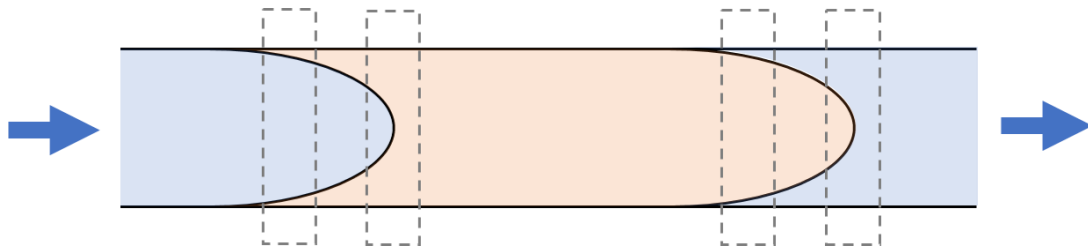


10. ábra: (A) 10% ecetsav tartalmú 1 mg/ml MabThera (rituximab) tömegspektruma és (B) dekonvulált spektruma. Az (A) ábrába ágyazva a mAb különböző töltésű csúcsai láthatók.

A hosszadalmas centrifugaszűrés helyett más megoldást kerestem a gyógyszerkészítmény segédanyagainak negatív hatásainak elkerülésére. A CE kapillárist 0,1 M hangyasav oldattal töltöttem meg, majd hígítatlan 10 mg/ml koncentrációjú MabThera mintából injektáltam hidrodinamikusan 50 mbar nyomást alkalmazva 25 s ideig. A kapillárisba jutott ~4 cm hosszúságú mintadugót 50 mbar nyomással juttattam az tömegspektrométerbe. A stabil elektro spray képződés biztosítása érdekében 1:1 arányú izopropanol-víz elegyet használtam segédanyagként. A mérés eredményei a 11. ábrán láthatók. A 11.A ábrán a 2500-6000 m/z tartományban, a 11.B ábrán pedig a 900-2500 m/z tartományban lévő ionok jeleinek összintenzitása van az idő függvényében ábrázolva. Előbbiben a rituximab különböző töltésformái, utóbbiban pedig a Tween 80 jelei találhatók meg. A 11.C-K ábrán a különböző színekkel és kisbetűkkel jelölt időtartományokban mért tömegspektrumok és azok dekonvulált spektrumai azonos színekkel és nagybetűkkel vannak jelölve. A nyomással áramoltatott folyadék áramlási profilja és ebből következően a mintadugó határfelületei is parabolászerűek, így a mintadugó eleje és vége a kapillárisban lévő hangyasav oldattal egyszerre jutott az ESI-be. Ezt illusztrálja a 12. ábra, melyen a szaggatott vonalak által határolt részek, a 11. ábrán szereplő időtartományokat szemléltetik. A mintadugó középső része (c) sav nélkül jutott a tömegspektrométerbe, így az 6.A ábrához hasonlóan csak a Tween 80-ra kaptam jelet. A mintadugó két határfelületének egyes szakaszai esetén különböző arányban jut az ESI-be a minta és a hangyasav oldat. Elsősorban ez eredményezheti a különböző időtartományok tömegspektrumai közti különbségeket. Ezek alapján azonban a 11.E és 11.F tömegspektrumok esetén hasonló eredményre lehetne számítani. A tapasztalt különbséget valószínűleg a kapilláris falán megtapadó, majd onnan lassan, folyamatosan távozó Tween 80 okozhatja, ahogy azt az idő-intenzitás görbe elnyúló hátsó szakasza jelzi is.

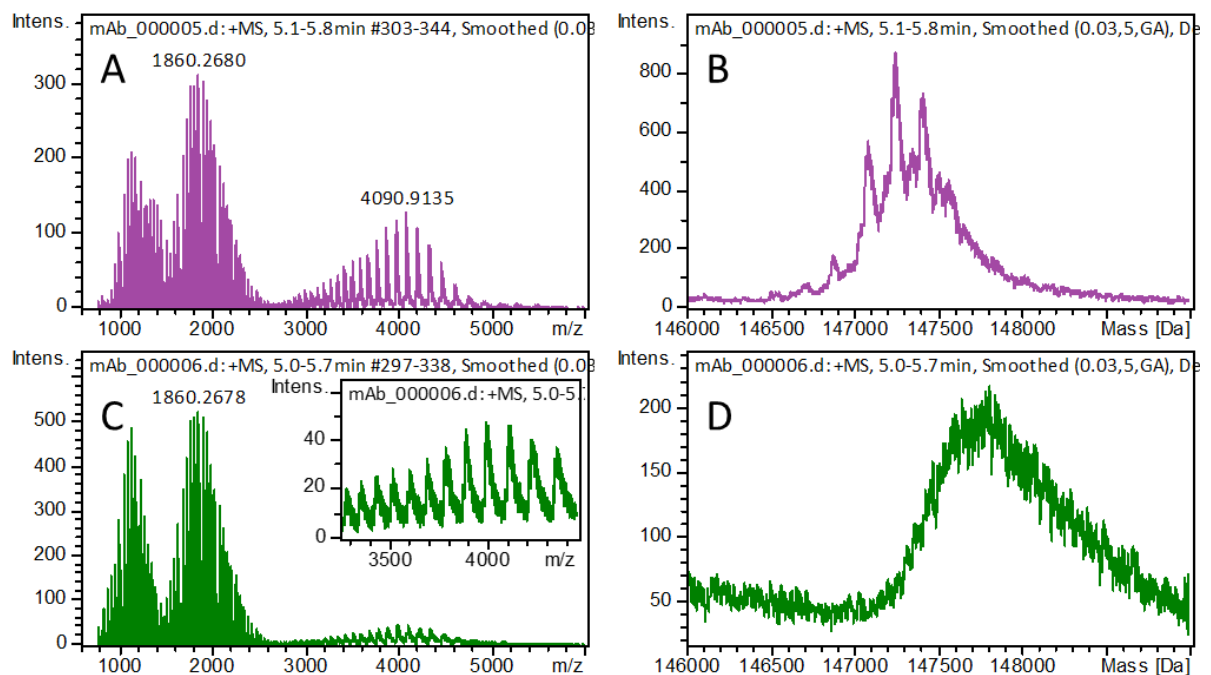


11. ábra: 10 mg/ml koncentrációjú MabThera (rituximab) vizsgálata. A CE kapilláris 0,1 M hangyasavval volt megtöltve, a mintából 50 mbar · 25 s injektáltam, majd 50 mbar nyomással juttattam az tömegspektrométerbe. Az idő függvényében mért összjelintenzitás (A) az antitestre jellemző m/z tartományban (2500-6000) és (B) a Tween 80-ra jellemző m/z tartományban (900-2500). Az egyes időtartományokban mért tömegspektrumok (C-G) és azok dekonvolált spektrumai (H-K) különböző színekkel és betűkkel vannak egymáshoz rendelve.



12. ábra: Kapillárisban nyomással áramtatott mintadugó áramlási profilja.

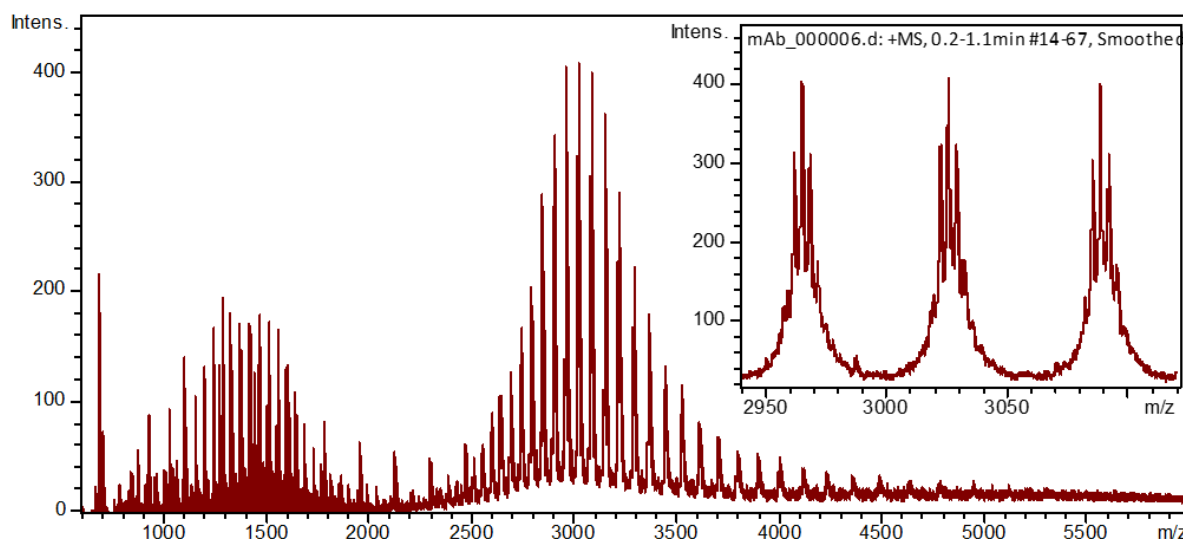
Az antitest ebben az esetben a hangyasav oldattal különböző arányban hígítva, de a segédanyagokkal együtt jutott a tömegspektrométerbe. Ezen komponensek zavaró hatását azonban ellensúlyozni tudta az ionforrásban történő ütközés indukált disszociáció (isCID). Az isCID alkalmazáskor a tömegspektrométerben a két iontölcsér közötti egyenfeszültség különbséget növelve megnő az ionok energiája. Mivel a készülék ezen szakaszában még viszonylag kicsi a vákuum, az ionok gázmolekulákkal ütköznek. Fehérjék esetén ez az ütközési energia többnyire nem elegendő annak fragmentációjához, mindössze a gyengén kötődő kis molekulákat távolítja el a fehérjéről. A 13. ábra dekonvulált spektrumain látható, hogy isCID energia alkalmazása nélkül az antitest számos adduktja detektálható, melyek nagyobb és szélesebb tömegtartományba esnek, mint a mAb. Az adduktok egymásra eső spektrumi miatt nem kivehetőek az egyes glikozilált formákhoz tartozó csúcsok a dekonvulált spektrumban.



13. ábra: Az isCID hatása a mért spektrumra 10 mg/ml koncentrációjú MabThera (rituximab) esetén. A mérési körülmények megegyeznek a 11. ábránál leírtakkal, a tömegspektrumok 5,5-6,2 percnél megfelelő időtartományokból származnak. A mért és dekonvulált spektrumok láthatók (A, B) 160 eV, és (C, D) 0 eV isCID energia esetén.

4.2 Monoklonális antitestek ESI-MS spektrumának feldolgozása

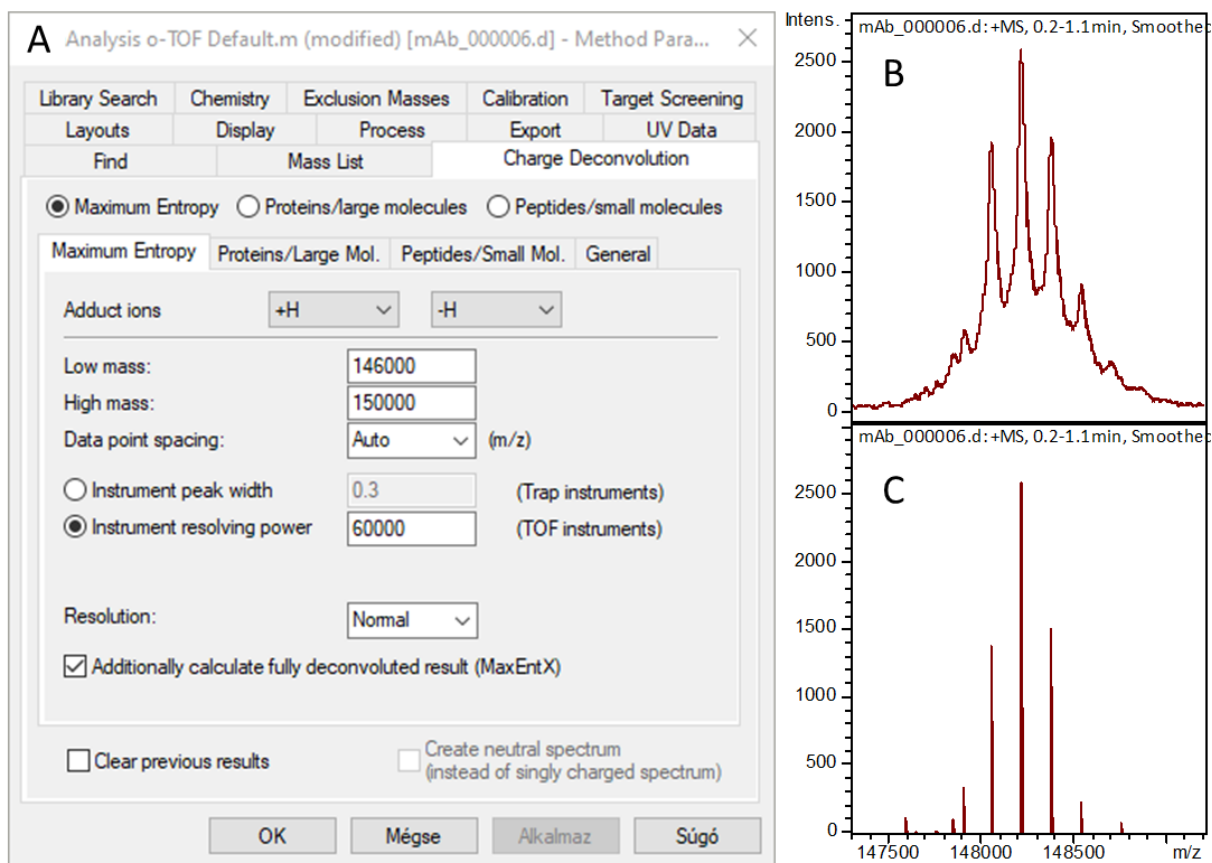
A mért tömegspektrumok az antitest számos különböző töltéssel rendelkező formáját tartalmazzák. Az egyszerűbb kiértékelés érdekében célszerű a mért spektrum dekonvolúcióját elvégezni, mivel az így kapott töltés nélküli spektrum kevésbé összetett. Számos dekonvolúciós algoritmus létezik, legelterjedtebbek a maximum entrópia módszerén alapuló eljárások. A spektrumok dekonvolúcióját és feldolgozásának egyéb lehetőségeit 10% ecetsav tartalmú 1 mg/ml-es Ontruzant (trastuzumab) tömegspektrumát felhasználva vizsgáltam (14. ábra).



14. ábra: 10% ecetsav tartalmú 1 mg/ml Ontruzant (trastuzumab) tömegspektruma, Gauss típusú simítással 5 pont szélességgel 5 ciklussal.

A Bruker DataAnalysis szoftverében elérhető peptidekre vagy kis molekulákra, valamint fehérjékre vagy nagy molekulákra fejlesztett dekonvolúciós lehetőségek vannak, ezek azonban csak izotóposan felbontott spektrumok esetén használhatók. A gyártó rendelkezik egy Maximum Entropy nevű, bármilyen felbontású spektrum dekonvolúciójára alkalmas algoritmussal. Ennek része továbbá egy „fully deconvoluted” opció, melyre a szoftver MaxEntX-ként hivatkozik. Az utóbbi algoritmus a folytonos, dekonvolált spektrumból a csúcsmaximumok keresésével hoz létre egy keskeny csúcsokból álló spektrumot, melyen a csúcsok szélességei azok tömegmeghatározásának pontosságát jelölik. A 15. ábrán a szoftver változatható paraméterei, valamint a 14. ábrán látható spektrum Maximum Entropy dekonvolált és MaxEntX spektruma látható.

Első paraméterként az adduktionok minősége szerepel. Pozitív mód esetén +H, +Na, +K, +NH₄, +O, +Formate, +Acetate; negatív mód esetén pedig -H, -Na, -K opciók közül választhatunk. Mivel a mért Ontruzant minta 10% ecetsavat tartalmazott, az antitest főként [M+nH]ⁿ⁺ adduktok formájában ionizálódott, ezért a szoftver +H opcióját használtam.

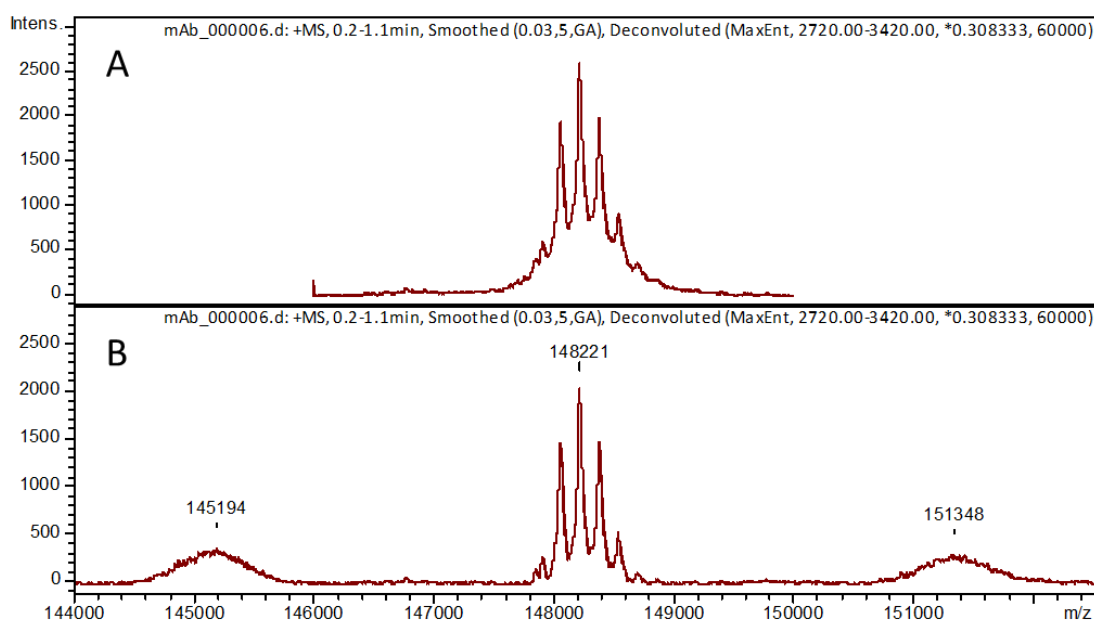


15. ábra: (A) Bruker Maximum Entropy szoftverének dekonvolúciós paraméterei, (B) trastuzumab Maximum Entropy és (C) MaxEntX dekonvolúciója.

Az adatpontok távolsága paraméterhez egy m/z értéket lehet megadni, vagy az automatikus opciót választani. Utóbbi esetben TOF analizátor esetén a felhasználó által megadott felbontásból, vagy ioncsapda típusú analizátorok esetén a megadott csúcshélességből határozza meg a szoftver ezt az értéket. A detektált ionok mennyiségével arányos áramerősséget azonos időközönként menti el a jelfeldolgozó egység. TOF analizátor esetén az ionok repülési ideje azonban nem egyenesen, hanem négyzetesen arányos azok m/z értékével. E miatt egy TOF spektrumban a mért pontok kis m/z -k esetén sűrűbben helyezkednek, mint nagy m/z -nél. Ha az adatpontok távolságát túl nagy értékre állítjuk, a dekonvolúció során a szoftver nem fog minden mért pontot figyelembe venni, vagyis információt veszítünk. Ha azonban a túl kis értéket használunk, a szoftver a pontok jelentős részénél interpolálni fog, mely fals eredményekhez vezethet. A dekonvolált spektrumban a fehérje egyes töltései intenzitásuk szerint súlyozva számítanak, ezért a legintenzívebb töltésre jellemző adatpont távolságot célszerű megadni. A trastuzumab tömegspektruma esetén 3026 m/z -nél található a legintenzívebb csúcs, ahol az adatpontok távolságra 0,0066 m/z , mely a szoftver szerint közel 60000-es felbontásnak felel meg. A dekonvolúciós paramétereknél ezért a készülék felbontását 60000-re, az adatpontok távolságát pedig automatikusra állítottam.

A felbontás paraméternél normál és nagy felbontású opciók közül lehet választani. A szoftver leírás szerint ez dekonvolúció során az iterációk számát határozza meg. Utóbbi esetben nagyobb az iterációk száma, mely a dekonvolúció időtartamát jelentősen növelheti. A két opciót összehasonlítva nem tapasztaltam jelentős különbséget, ezért a továbbiakban a kis felbontású módot használtam.

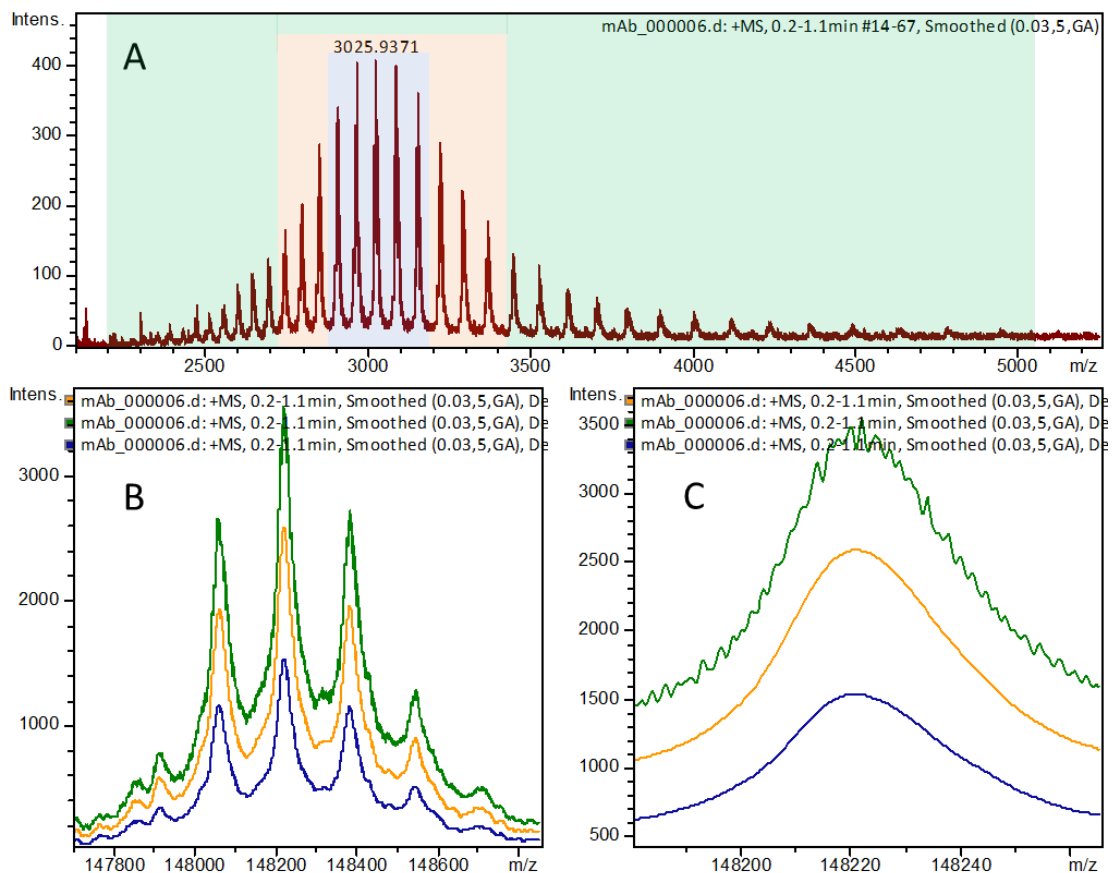
A dekonvolúció elvégzéséhez továbbá a dekonvolált spektrum alsó és felső határát szükséges megadni. A megadott tartományon kívül eső csúcsok nem fognak megjelenni a dekonvolált spektrumon. Ha azonban a tartományt túl szélesre vesszük, úgynevezett szatellitcsúcsok megjelenését tapasztalhatjuk, ahogyan az a 16.B ábrán látható. Szatellitcsúcsok olyan esetben jelenhetnek meg, ha egyes töltései viszonylag nagy m/z tartományt fednek le a mért spektrumban [37]. Vegyük példaként a trastuzumab tömegspektrumában legnagyobb intenzitással, 3026 m/z -nél megjelenő +49-es töltést. A dekonvolúció során a különböző m/z -vel rendelkező mérési pontok töltésének meghatározásánál egyfajta megerősítésként szolgál, ha hasonló intenzitású pont található a meghatározottnál kisebb és nagyobb töltések várt m/z értékénél. Például, ha a 3026 m/z értéknél megjelenő csúcsot +49 helyett +48 töltésűnek tekintjük, 145248 Da-nál kapnánk csúcsot, hasonlóan +50-es töltés esetén 151300 Da-nál várnánk csúcsot. A 16.B ábrán lapos csúcsok jelennek meg ezen értékek környékén. A nagy intenzitású glikoformák jól kivehető csúcsai kellően keskenyek ahhoz, hogy ne jelenjenek meg a szatellitcsúcsokban. A dekonvolúciós tömegtartomány további növelése esetén újabb szatellitcsúcsok és úgynevezett harmonikus csúcsok jelenhetnek meg. Utóbbi a szatellitcsúcsokhoz hasonló módon jöhet létre, ha valós töltés kétszerese vagy feleként állapítja meg a szoftver az egyes pontok töltését.



16. ábra: A dekonvolált tömegtartomány hatása a dekonvolúcióra:
(A) 146000-150000 Da és (B) 142000-154000 Da.

Látható továbbá, hogy az antitest csúcsai alatti jelintenzitás emelkedés megközelítőleg harmadára csökken a szatellitcsúcsok megjelenése miatt, mivel a szoftver a spektrum ezen részeihez három egymás melletti töltést is hozzárendelt hibásan. Ezt az alapvonal-emelkedést valószínűleg a kisebb intenzitással jelen lévő glikoformák és más kis tömegkülönbséggel rendelkező variánsok okozhatják. A szatellitcsúcsok megjelenésével látszólag szebb dekonvolált spektrumot kapunk, ez azonban nem a valós mérési eredményeket tükrözi.

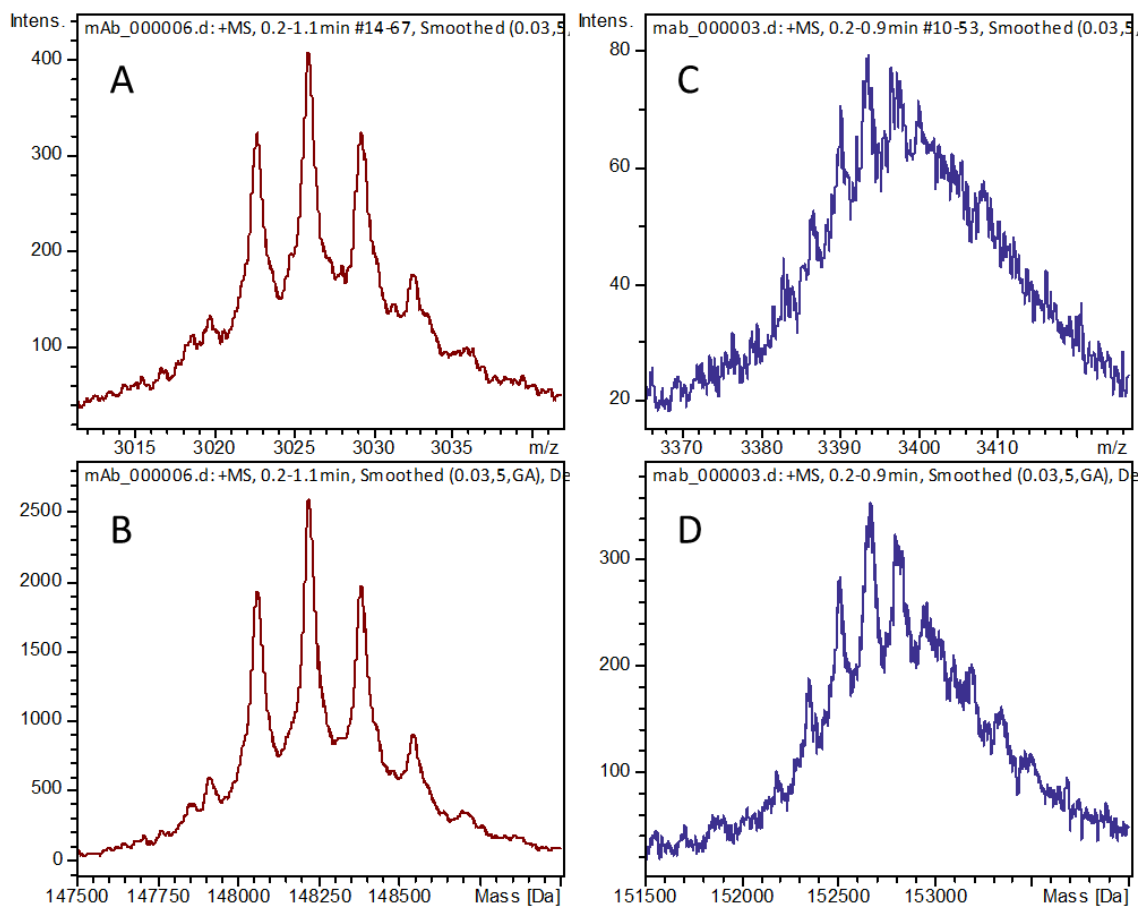
A dekonvolúciós paraméterek közt ugyan nem szerepel, de a dekonvolúció során (a spektrumon kijelölve) megadható az használandó m/z tartomány is. Amennyiben nem alkalmazunk kijelölést, a szoftver a mérés során rögzített teljes m/z tartományt felhasználja, ami azonban jelentősen növeli a dekonvolúció időtartamát. Ha a fehérje összes megjelenő töltése helyett csak a jó jel/zaj aránnyal rendelkező csúcsokat jelöljük ki, jelentősen csökkenthető a dekonvolált spektrumban megjelenő zaj (17. ábra). Ez azonban információvesztéssel jár, amely a meghatározott tömegek pontosságát csökkentheti, e miatt nem célszerű túl szűk m/z tartomány használata sem. Fontos megjegyezni, hogy a kis intenzitású csúcsok esetén gyakran romlik a tömegpontosság, így a kis intenzitású csúcsok figyelmen kívül hagyása nem feltétlenül csökkenti a dekonvolált tömegek pontosságát.



17. ábra: A dekonvolúcióhoz felhasznált m/z tartomány hatása a dekonvolúcióra. (A) A vizsgált m/z tartományok, (B, C) a dekonvolált spektrumok két különböző nagyításban. A dekonvolált spektrumok színe megfelel a felhasznált m/z tartománynak: zöld: 2200-500 m/z ; narancs: 2720-3420 m/z ; kék: 2880-3200 m/z .

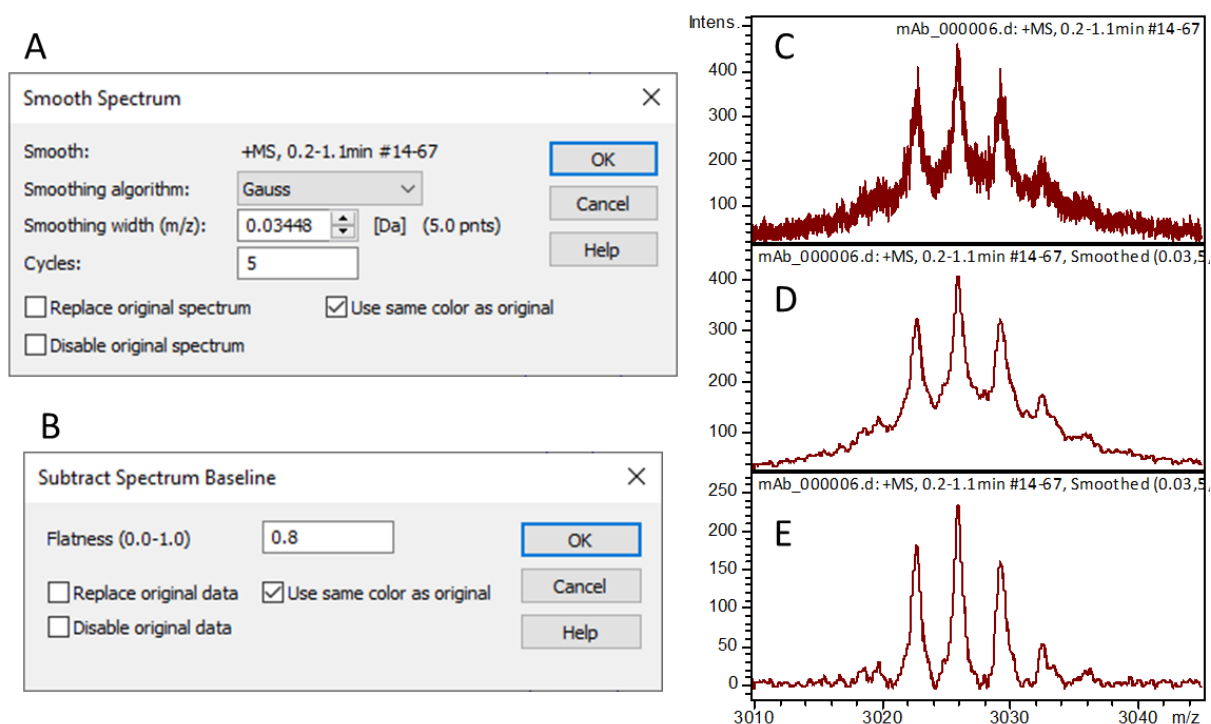
Mivel a dekonvolált spektrumon a csúcsok intenzitását a tömegspektrumon hozzá tartozó csúcsok intenzitásának összeg adja, a dekonvolúciónál felhasznált töltésformák számának csökkentésével a dekonvolált spektrumon a csúcsok intenzitása is csökken. Ezért kvantitatív vizsgálatok esetén célszerű az összes töltést tartalmazó m/z tartományt használni.

Fontos azt is megjegyezni, hogy jó minőségű, nagy intenzitással és jó jel/zaj aránnyal rendelkező spektrum esetén a fehérje egyes, különböző töltéssel rendelkező csúcsai a dekonvolált spektrumtól nem különböznek jelentősen, a töltésnek megfelelő tömegeltolódáson és a 17. ábránál említett intenzitásnövekedésen kívül (18. ábra). A dekonvolált spektrumhoz az egyes töltések mind hozzájárulnak, ami a jel/zaj arány javulását eredményezi. Ez rossz jel/zaj arányú spektrum esetén tekintve akár jelentős javulást is eredményezhet, ahogy az a 17.C és 17.D ábrákon látható. A dekonvolúció különösen előnyös, ha több eltérő tömegű fehérje egymással átfedő, különböző töltésformáit detektáljuk.



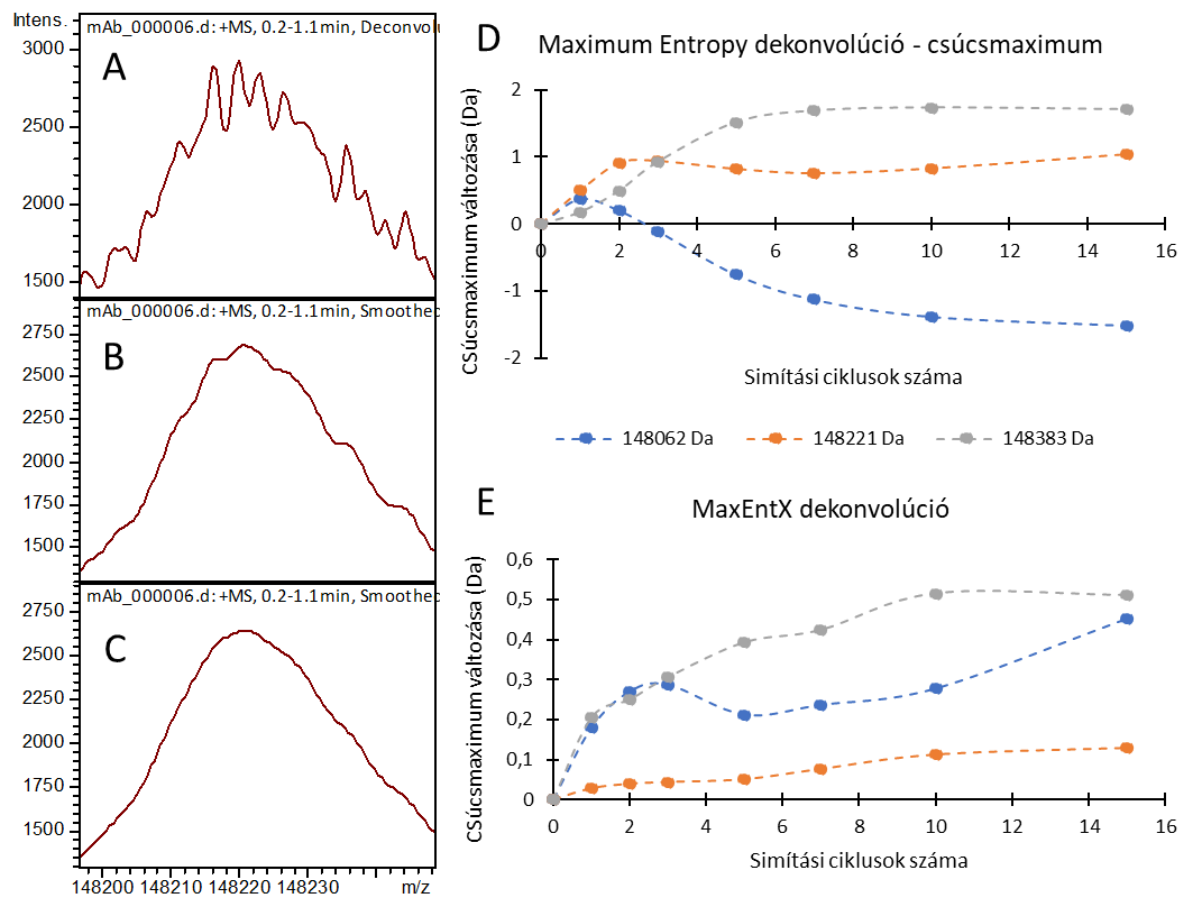
18. ábra: (A) Trastuzumab +49-es töltésének tömegspektruma és (B) dekonvolált spektruma, (C) cetuximab +45-ös töltésének tömegspektruma és (D) dekonvolált spektruma. A cetuximab spektruma (C) 10% hangyasav tartalmú 2 mg/ml Erbitux méréséből származik.

A Bruker DataAnalysis szoftverében a spektrumok feldolgozásakor lehetőség van simításra és alapvonal-korrekciónak. A 19. ábrán láthatók ezen opciók paraméterei, valamint a trastuzumab +49-es töltésformájának tömegspektruma simítás és alapvonal-korrekciónak előtt, Gauss simítás után, valamint Gauss simítás és alapvonal-korrekciónak után.



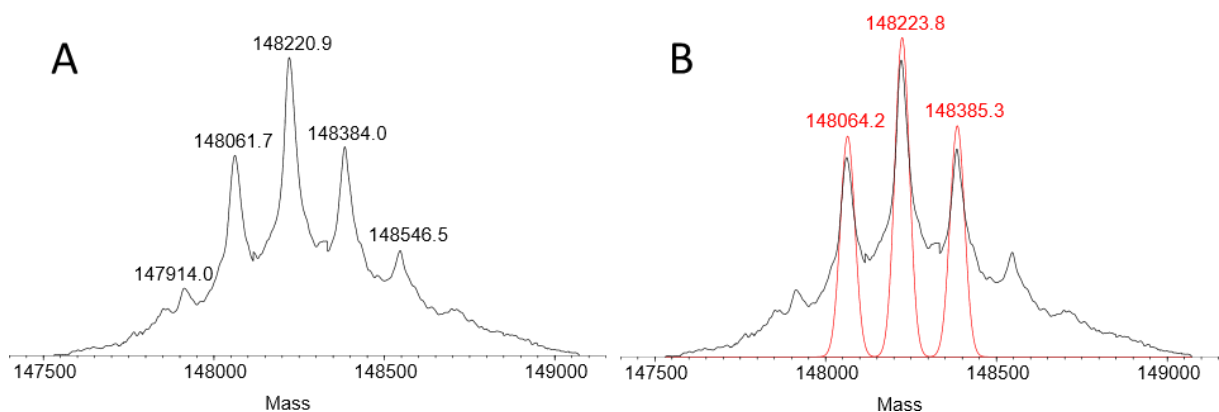
19. ábra: Tömegspektrumok feldolgozási lehetőségei a Bruker DataAnalysis szoftverében: (A) a spektrum simítása, (B) alapvonal-korrektúra. Tömegspektrumok feldolgozásának hatása annak egy részletére (trastuzumab +49-es töltése): (C) nyers tömegspektrum, (D) Gauss simított, (E) Gauss simított és alapvonal-korrigált tömegspektrum.

Simítási algoritmusok közül a Gauss típusút használtam, a szoftverben e mellett Savitzky-Golay, és négyzetes érhető még el. A simítás esetén a ciklusok számát, valamint egy m/z szélességi tartomány paramétert tudunk megadni m/z -ben, melyet a szoftver úgy módosít, hogy a hozzá tartozó adatpontok száma egész legyen. A szoftver leírása nagymértékű simítás szükségessége esetén a ciklusok számának növelését javasolja, a szélesség növelésével szemben. A szélesség növelése esetén a ciklusok számának megfelelő mértékű csökkentésével közel azonos eredményeket értem el (M-1. ábra). Ez alapján úgy ítélt meg, hogy a simítás vizsgálatához elegendő csak az egyik paraméter hatását tanulmányozni. A spektrum simítását a dekonvolúció előtt elvégezve a spektrum alapvonala alacsonyabb volt, mint a dekonvolúció elvégzése után simítva, azonban a spektrum alakja és csúcsmaximumok értékei nem különböztek (M-2. ábra). A simítás hatásait a 20. ábra szemlélteti. A spektrum zajossága miatt simítása nélkül a csúcsmaximumok leolvasásnak nagy a bizonytalanága, valamint a MaxEntX funkció is csak a nagy intenzitású csúcsokat tudja azonosítani ilyen esetben. A simítás mértéke azonban a csúcsok tömegét jelentősen befolyásolhatja. A simításra tehát szükség van, annak mértékét azonban érdemes minimalizálni, a spektrum részleteinek és a mért tömegek értékeinek megőrzése érdekében.



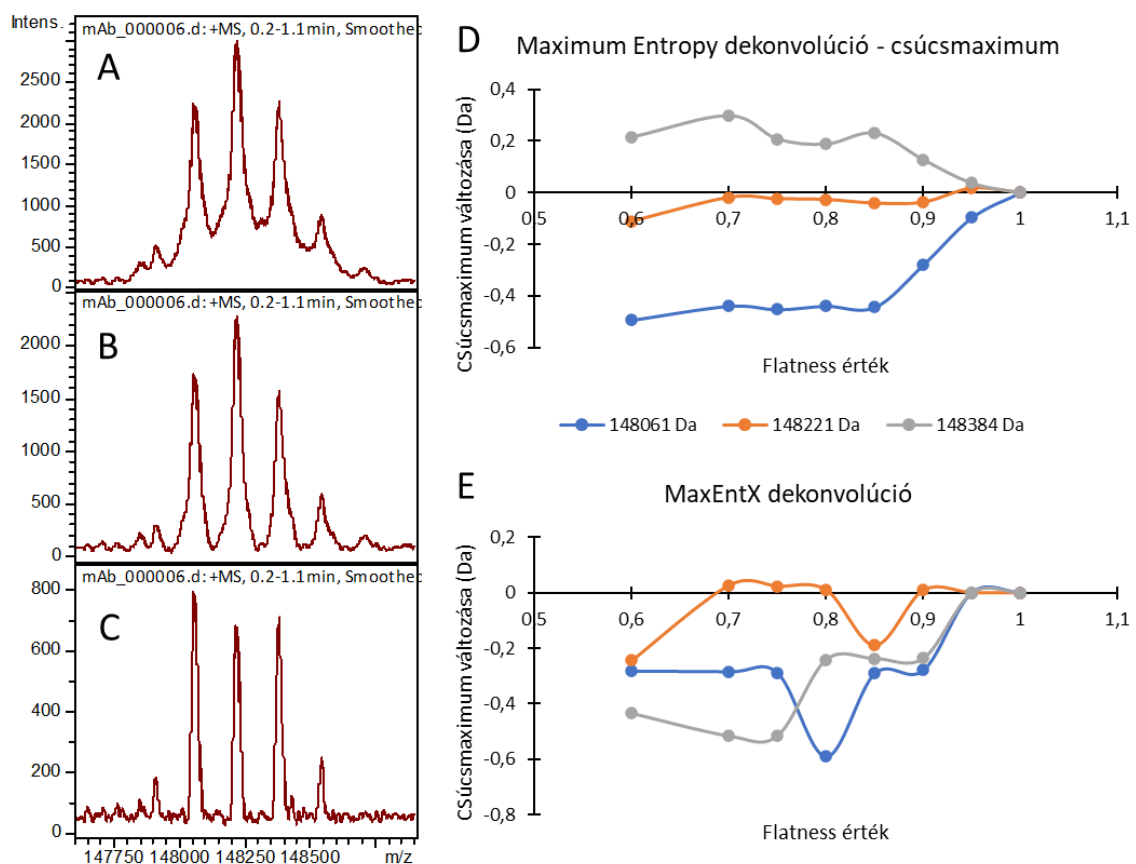
20. ábra: A tömegspektrum simításának hatása a dekonvolúcióra. Trastuzumab dekonvolált spektrumának egyik csúcsa: (A) simítás nélkül, (B) 3 pont szélességgel 2 ciklussal, (C) 3 pont szélességgel 5 ciklussal. A dekonvolált csúcsok maximumának változása különböző ciklusszámú, 3 pont szélességű Gauss simítást alkalmazva, (D) Maximum Entropy és (E) MaxEntX dekonvolúció esetén, a simítást a dekonvolúció előtt elvégezve. A pontok csak szemléletesebb bemutatás érdekében vannak összekötve.

A MagTran dekonvolúciós szoftver rendelkezik egy Gauss típusú dekonvolúciónak nevezett opcióval. Ez a funkció a dekonvolált spektrum csúcsaira Gauss görbéket illeszt, a csúcsmaximum meghatározására érdekében, ahogy az a 21.B ábrán látható.



21. ábra: (A) MagTran által dekonvolált spektrum és (B) a szoftver Gauss típusú dekonvolúciójának eredménye.

Az alapvonal-korrekciónál csak egy ún. simasági (flatness) érték megadására van lehetőség, mely 1 és 0 közt változtatható. 1 simasági érték esetén a szoftver egy egyenest illeszt a spektrum alapvonalához és az egyes pontok intenzitás értékeit az egyenes adott pontjaival korrigálja. Ennél kisebb simasági érték esetén a szoftver görbe vonallal határozza meg a spektrum alapvonalát. A vonal meredekségének maximális változása a simasági érték csökkentésével nő. 1-es simasági érték esetén az intenzitásskala eltolódásán kívül nincs változás, jelentősen kisebb érték esetén azonban a spektrum kis intenzitású, széles csúcsai elveszhetnek, az egyes csúcsok szélessége és intenzitásuk aránya megváltozhat, ahogy az a 22. ábrán látható. Az alapvonal-korrekción kívül a csúcsok tömegét is befolyásolja. A mért komponensek tömegkülönbségétől és a készülék felbontásától függően előfordulhat, hogy az alapvonal-emelkedést a csúcsok kiszélesedése miatti átfedésük okozza, esetünkben azonban jóval valószínűbb, hogy olyan glikoformák és más, kis tömegkülönbséggel rendelkező variánsok okozzák, melyek kis intenzitással vannak jelen. Ezek alapján úgy gondolom az alapvonal-korrekciónál használatát célszerű kerülni. Ennek ellenére publikációban is megfigyelhetők ilyen típusú ábrázolások, valamint az UniDec nevű dekonvolúciós szoftver egyik alapvető funkciójaként is szerepel az alapvonal-korrekciónál lehetősége.



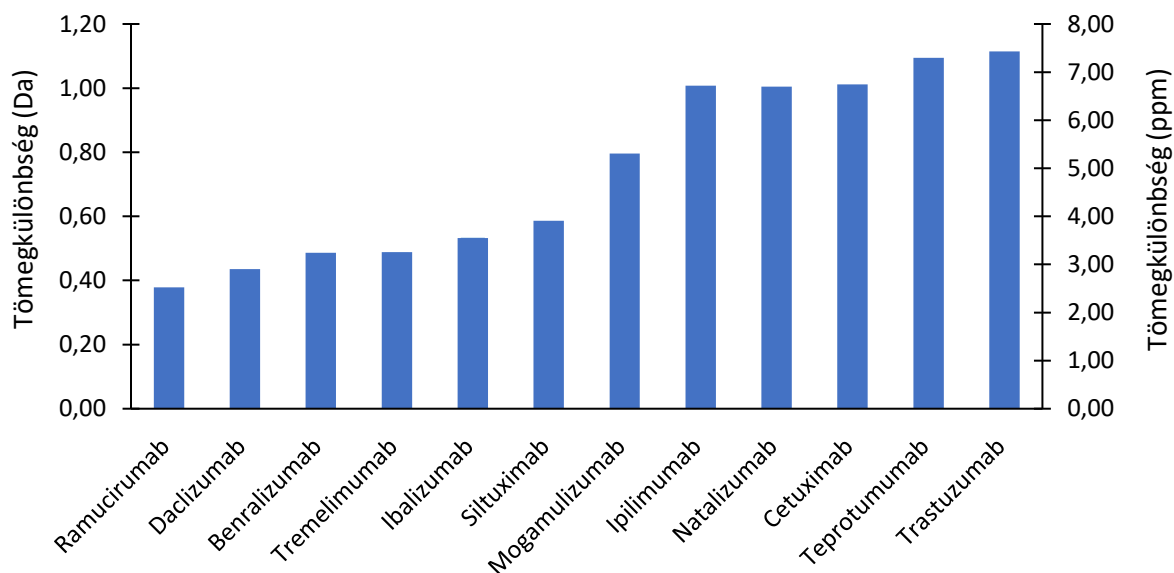
22. ábra: A tömegspektrum alapvonal-korrekciónak hatása a dekonvolúcióra. Trastuzumab dekonvolált spektruma: (A) 1-es, (B) 0,8-as, (C) 0,5-ös simasági értékű alapvonal-korrekciónal. A tömegspektrum különböző simasági értékű alapvonal-korrekciónak hatása a csúcsok maximumára, (D) Maximum Entropy és (E) MaxEntX dekonvolúció esetén.

A dekonvolúció egyik célja az egyes csúcsok tömegének meghatározása. Ennek pontosságát konfidenciája intervallumának meghatározásával vizsgáltam. Ehhez a trastuzumab MS mérési pontjait 5 egyenlő 7-7 mérési pontból álló részre osztottam, melyek dekonvolúcióját azonos paraméterekkel végeztem el. A 2. táblázatban láthatók a három fő csúcsra Maximum Entropy és MaxEntX dekonvolúcióval meghatározott tömegek és azok konfidencia intervallumai.

2. táblázat: Trastuzumab dekonvolált spektrumainak fő csúcsainak maximumához tartozó tömegek, és azok konfidencia intervalluma, melyet az MS mérési pontokat 5 részre osztva 99%-os konfidencia szint mellett határoztam meg.

Maximum Entropy	148060,70 $\pm$ 1,60 Da	148221,58 $\pm$ 0,88 Da	148384,16 $\pm$ 0,77 Da
MaxEntX	148061,56 $\pm$ 0,81 Da	148222,02 $\pm$ 1,10 Da	148384,20 $\pm$ 1,85 Da

Nagy tömegű molekulák esetén a monoizotópos csúcs intenzitása nagyon kicsi, sok esetben nem is detektálható, ezért ilyenkor a molekulákat azok átlagtömegével szokás jellemezni. A molekula tömegének növekedésével annak izotopológ csúcsainak eloszlása egyre jobban közelíthető Gauss-eloszlással. Ennek pontatlanságát a 22. ábra szemlélteti, különböző antitestek átlagtömegének és a legnagyobb intenzitású izotopológ csúcs tömegének különbségével.

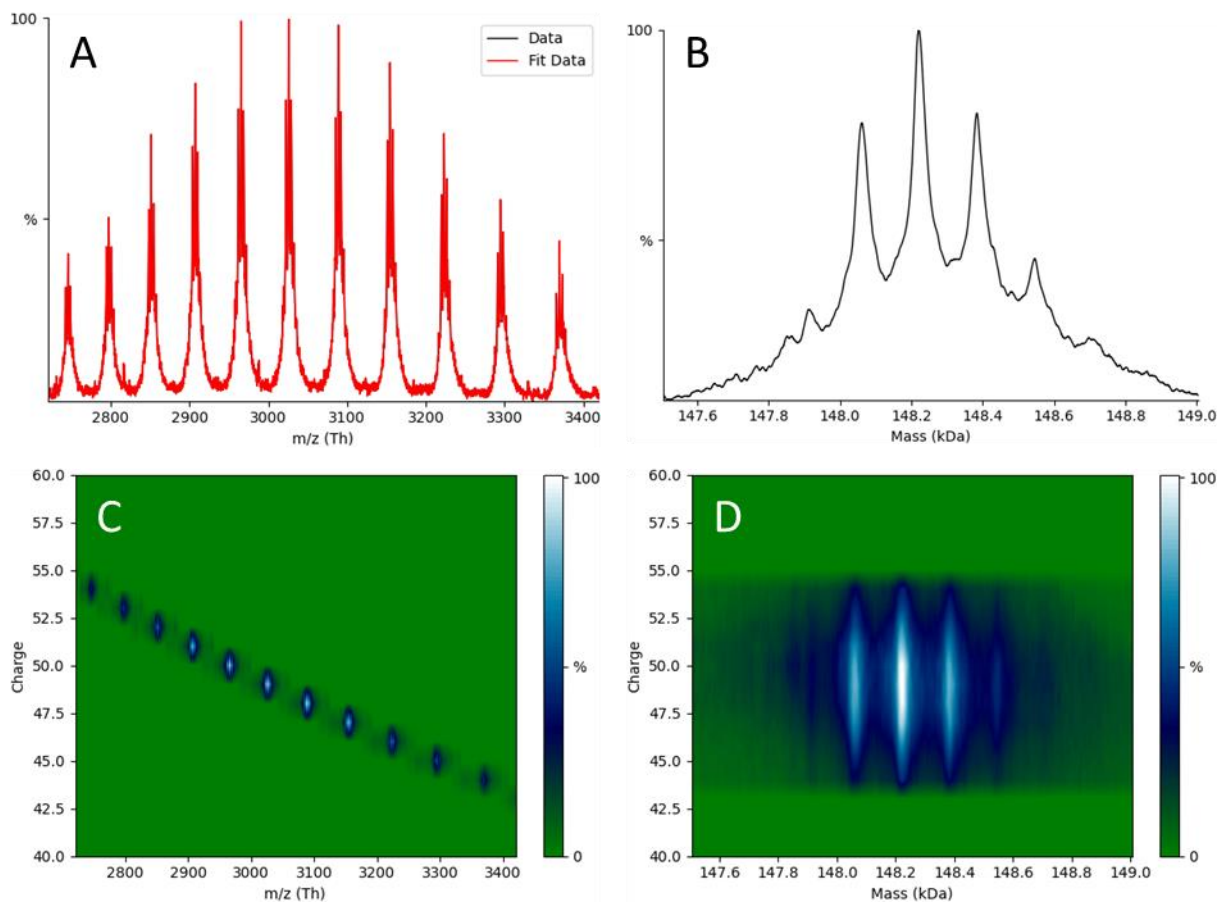


23. ábra: Monoklonális antitestek átlagtömegének és legnagyobb intenzitású izotopológ tömegének különbsége. (Az antitestek összegképletének meghatározásához a KEGG DRUG adatbázis szekvenciaadatait [40], a megfelelő immunglobulin osztályra jellemző diszulfid hidak számát használtam és egy, az antitestekre jellemző glikozilációt feltételeztem minden esetben (2 fruktóz, 6 mannóz, 8 N-acetil-glükózamin).)

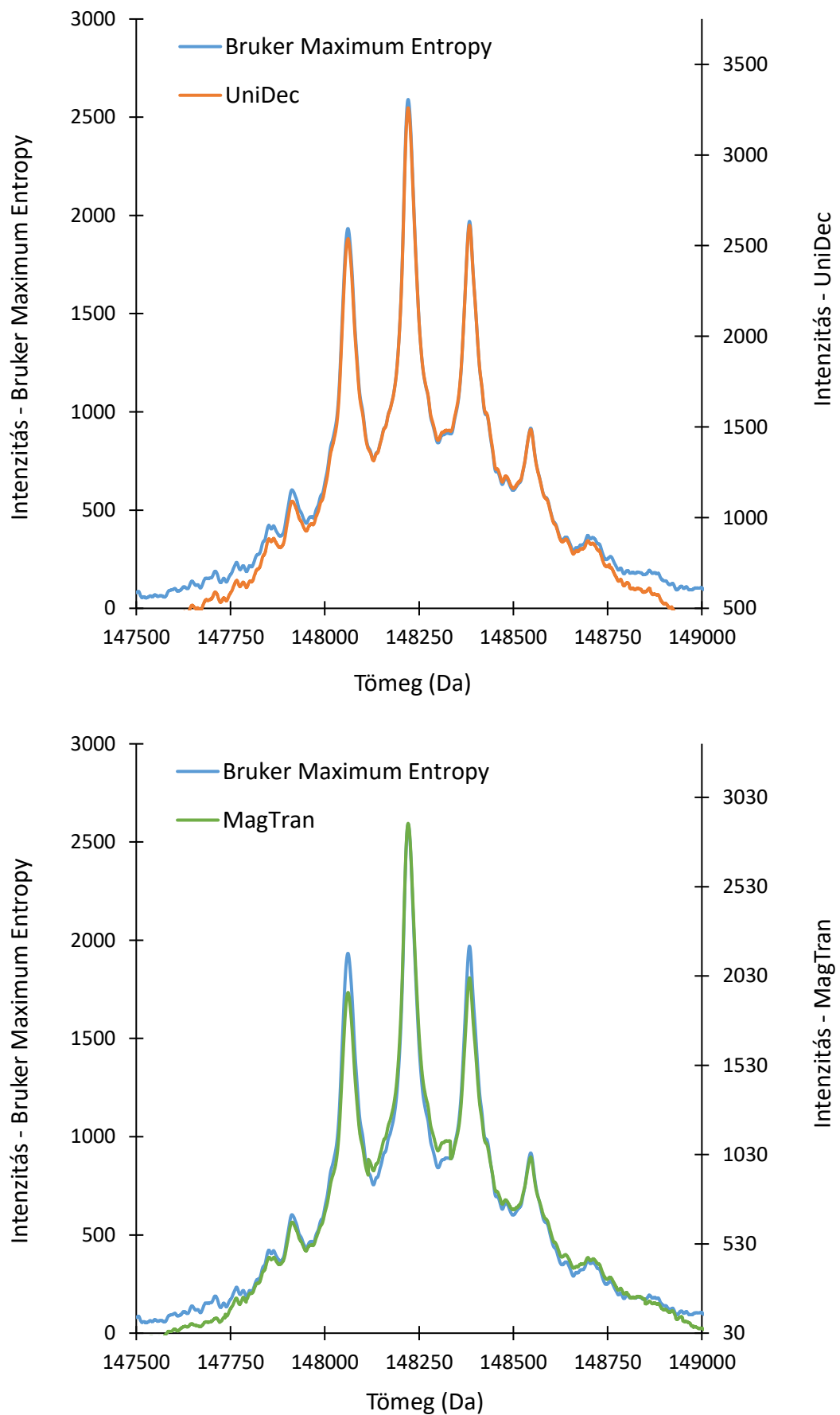
4.3 Dekonvolúciós szoftverek összehasonlítása

A 4.2 fejezetben bemutatott Bruker Maximum Entropy dekonvolúciós szoftvere mellett, két nyílt forráskódú szoftvert, a MagTran-t és az UniDec-t vizsgáltam. A MagTran szoftver esetén a Maximum Entropy-hoz hasonlóan viszonylag kevés paraméter megváltoztatására van lehetőség, a szoftver fő érdekességét a 21. ábrán bemutatott Gauss típusú dekonvolúciónak nevezett funkció jelenti.

Az UniDec szoftver ezzel szemben számos szabadon változtatható paraméterrel rendelkezik, és e mellett a szoftver a dekonvolúció után a dekonvolált spektrumon kívül további informatív spektrumokat is megjelenít (24. ábra). A dekonvolált spektrumot háromdimenziós formában is megjeleníti, amelyen az egyes tömeghez tartozó intenzitás mellett, azok töltéseloszlása is szerepel. Ehhez megegyező módon ábrázol egy a dekonvolúció során meghatározott tömegek és az azokhoz tartozó töltések alapján rekonstruált spektrumot is, melyet a kiindulási tömegspektrumra is rávetít. Utóbbin látható, hogy a dekonvolált spektrum mennyire reprezentálja pontosan a kiindulási tömegspektrumot, a háromdimenziós spektrumok pedig a dekonvolúció hibáira utaló műtermékek (artifact-ok) észlelését segítik.



24. ábra: Az UniDec szoftverben megjelenő spektrumok: (A) a dekonvolúcióhoz felhasznált m/z tartomány (fekete), valamint dekonvolált tömegek és az azokhoz tartozó töltések alapján rekonstruált spektrum (piros), (B) a dekonvolált spektrum, (C) a rekonstruált tömegspektrum a tömegekhez tartozó töltésekkel, (D) dekonvolált spektrum a tömegekhez tartozó töltésekkel.



25. ábra: Különböző dekonvolúciós szoftverek összehasonlítása trastuzumab dekonvolált spektrumai alapján. A dekonvolált spektrumok mindhárom szoftverrel ugyanazon spektrum azonos tartományát felhasználva készültek.

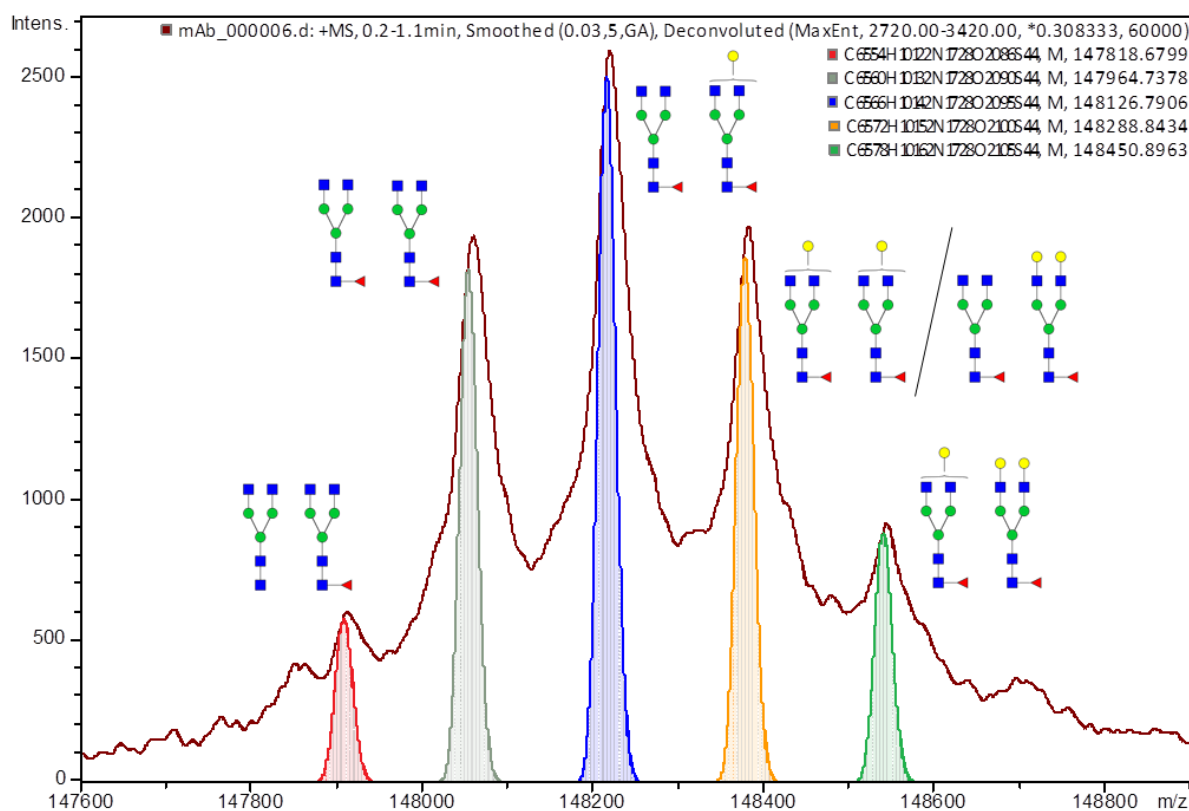
A három szoftver összehasonlításához a trastuzumab 2.4 fejezetben bemutatott spektrumának dekonvolúcióját végeztem el azonos tömegtartományban (146000-150000 Da), a tömegspektrum azonos részét (2720-3420 m/z) felhasználva. A spektrumokat kettessel ábrázoltam azonos tömeg tengellyel (25. ábra). Mivel a dekonvolált spektrumok esetén az intenzitások csak egymásra vonatkoztatott arányának van jelentősége, az intenzitás tengelyeket úgy választottam meg, hogy a spektrumok csúcsai a legjobb egyezést mutassák. A spektrumokon öt jól kivehető glikozilált forma csúcsának maximuma a különböző dekonvolúciós algoritmusok esetén csak kis mértékben tér el egymástól, ahogy az a 3. táblázatban látható. Mivel nem ismert, hogy a MaxEntX algoritmus hogyan határozza meg a csúcsmaximumokat, az ehhez tartozó értéket nem vettem figyelembe a szórások és relatív standard deviációk számolásánál.

3. táblázat: Trastuzumab fő glikoformáinak csúcsmaxima különböző szoftverekkel dekonvolált spektrumokból meghatározva. A dekonvolált spektrumok mind a négy algoritmussal ugyanazon spektrum azonos tartományát felhasználva készültek. A szórás és relatív standard deviáció meghatározása a MaxEntX értékeinek felhasználása nélkül történt.

MaxEntX	147913,71 Da	148061,71 Da	148221,86 Da	148384,84 Da	148545,12 Da
Maximum Entropy	147913,01 Da	148061,37 Da	148221,07 Da	148383,78 Da	148546,14 Da
UniDec	147914,21 Da	148061,75 Da	148220,98 Da	148383,92 Da	148546,23 Da
MagTran	147914,05 Da	148061,66 Da	148220,89 Da	148384,02 Da	148546,48 Da
Szórás	0,65 Da	0,20 Da	0,09 Da	0,12 Da	0,18 Da
RSD	4,41 ppm	1,34 ppm	0,59 ppm	0,79 ppm	1,19 ppm

4.4 Trastuzumab dekonvolált spektrumának összehasonlítása elméleti és irodalmi adatokkal

A trastuzumab különböző glikoformáinak elméleti tömegeinek meghatározásához a KEGG DRUG adatbázisából használtam az antitest könnyű és nehéz láncának szekvenciáját. Ezek alapján meghatároztam a láncok összegképletét, melyek összegének kétszeresét vettem, mivel az antitest két könnyű és két nehéz láncot tartalmaz. A trastuzumab IgG₁-es típusú antitest, melyek összesen 16 diszulfid hidat tartalmaznak, az összegképletet ennek megfelelően 32 hidrogén atommal csökkentettem. A glikozidok lehetséges összetételét az antitestekre általánosan jellemző glikozidok felépítése és Quaranta és munkatársainak cikke alapján határoztam meg [41]. A glikozidokban szereplő cukrok összegképleteit két hidrogénnel és egy oxigénnel csökkentettem, a glikozidos kötések kialakuláskor fellépő vízvesztés miatt, majd ezek összegével bővítettem az összegképletet. Az így kapott összegképletek szimulált spektrumait ábrázoltam a trastuzumab dekonvolált spektrumával együtt a 26. ábrán.



26. ábra: 10% ecetsav tartalmú 1 mg/ml Ontruzant (trastuzumab) dekonvolált spektruma (barna) és öt különböző glikoforma szimulált spektruma. A szimulált csúcsok félmagasságban vett szélessége a 60000-es felbontásnak megfelelő 2,47 Da. A glikoformák jelölésére a Symbol Nomenclature For Glycans (SNFG) szimbólumait használtam [42]. (Piros háromszög: L-fruktóz, kék négyzet: N-acetil-D-glükózamin, zöld kör: D-mannóz, sárga kör: D-galaktóz.)

Az egyes glikoformák összegképlete alapján azok elméleti átlagtömegét a Bruker Compass IsotopePattern szoftverével határoztam meg (4. táblázat). A meghatározott tömegek többsége ~ 3 Da-nal az elméleti érték fölött van, ami az alkalmazott tömegkalibráció pontatlanságára utalhat. A tömegkalibrációhoz használt Tuning Mix oligomereket kis intenzitással detektálta a készülék, ami jellemzően csökkent tömegpontosságot eredményez, ezért a jövőben más tömegkalibrációs oldatokat, például cézium-jodid klasztereket is érdemes kipróbálni. A TOF analizátorok nagyon érzékenyek a hőmérséklet- és feszültségingadozásra ezért a tömegpontosság megőrzése érdekében célszerű minél sűrűbben kalibrálni, ideális esetben lock mass kalibrációt használni. A tömegpontatlanság oka lehet, ha a kalibráció és az antitest mérése közt túl sok idő telt. A Top-Down Proteomikai Konzorcium által javasolt ökölszabály modern QTOF készülékek esetén 20 ppm alatti tömegkülönbséget tekint megengedhetőnek standard fehérjeminták esetén, ami esetünkben közel 3 Da-t jelent [24].

4. táblázat: 10% ecetsav tartalmú 1 mg/ml Ontruzant (trastuzumab) dekonvolált spektrumában azonosított glikoformák tömegeinek összehasonlítása, a számított elméleti átlagtömeggel, valamint egy irodalmi értékkel.

Glikoforma	G0/G0F	G0F/G0F	G0F/G1F	G1F/G1F vagy G0F/G2F	G1F/G2F
Összegképlet	$C_{6554}H_{10122}N_{1728}O_{2086}S_{44}$	$C_{6560}H_{10132}N_{1728}O_{2090}S_{44}$	$C_{6566}H_{10142}N_{1728}O_{2095}S_{44}$	$C_{6572}H_{10152}N_{1728}O_{2100}S_{44}$	$C_{6578}H_{10162}N_{1728}O_{2105}S_{44}$
Elméleti átlagtömeg	147909,93 Da	148056,07 Da	148218,21 Da	148380,35 Da	148542,50 Da
Mért tömeg (Maximum Entropy)	147913,01 Da	148061,37 Da	148221,07 Da	148383,78 Da	148546,14 Da
Quaranta et al. [41]	147907,4 Da	148055,7 Da	148216,9 Da	148378,5 Da	148539,6 Da

5. Összefoglalás

A monoklonális antitest hatóanyagot tartalmazó biológikumok analitikájának egyik legjelentősebb eszköze a tömegspektrometria, mely a minta ionizációját igényli. Ennek egyik elterjedt módja az elektropray ionizációs technika, mely nagy molekulák esetén számos eltérő töltésformát eredményez. Különböző mAb tartalmú készítmények ESI-MS vizsgálata során a mintában lévő mátrixkomponensek jelentős hatását figyeltem meg az antitest ionizációjára. A cetuximab ionizációját a mintához adott sav és illékony szerves oldószer, valamint a készítményben található detergens eltávolítása elősegítette. Rituximab tartalmú készítményből CE kapillárisba injektált mintadugó és a kapillárisban lévő hangyasav oldat határfelületén mért spektrum igen jelentős javulást mutatott a tömbfázisban mérthez képest.

Mivel a monoklonális antitestek ESI-MS spektrumában számos töltésforma csúcsa jelenik meg, a spektrumok speciális feldolgozást igényelnek. Az antitest tömegspektrumának dekonvolúciójával egy töltés nélküli spektrumot hozhatunk létre. Ez a mért spektrum egyes töltésformáihoz nagyon hasonló, azonban jobb jel/zaj aránnyal és nagyobb tömegpontossággal rendelkezik, ami az egyes csúcsok azonosítását és azok tömegének meghatározását segíti. A Bruker Maximum Entropy dekonvolúciós paramétereinek hatását vizsgáltam. A dekonvolált tömegtartományt nem célszerű a szükségesnél szélesebbre állítani, mivel az szatellitcsúcsok megjelenéséhez vezethet. Ha a dekonvolúcióhoz túl nagy m/z tartományt használunk fel, a dekonvolált spektrumban megnőhet a zaj szintje, túl kis tartomány esetén viszont a spektrum egyes részletei elveszhetnek, valamint csökkenhet a tömegpontosság. A dekonvolált spektrumban lévő zaj miatt a csúcsmaximumok meghatározásához a spektrum simítására van szükség. Célszerű minél kisebb mértékű simítást végezni, mivel ez a meghatározott tömegeket befolyásolja. Alapvonal-korrekciónak alkalmazása esetén a spektrum csúcsai ránézésre jobban elkülönülnek, ez azonban a csúcsok alakjára, valamint a csúcsmaximumok értékére is hatással van, ezért használatát célszerű kerülni.

Három különböző szoftverrel elvégezve ugyanazon spektrum azonos tartományú dekonvolúcióját, a dekonvolált spektrumok nagyfokú hasonlóságot mutattak, az egyes csúcsmaximumok relatív standard deviációja pedig csupán 1 ppm körüli volt. Trastuzumab dekonvolált spektrumát elméleti és irodalmi adatokkal összehasonlítva az egyes csúcsok maximumai többnyire ~ 3 Da-nál az elméleti érték fölött voltak, amit valószínűleg a tömegkalibráció pontatlansága okozhat.

Összegzésként elmondható, hogy a különböző mátrixkomponensek jelentősen befolyásolják a mAb ionizációja révén annak spektrumát. A dekonvolúció paramétereinek nagy hatással lehetnek a dekonvolált spektrumra, a különböző algoritmussal kapott eredmények azonban közel azonosak.

6. Summary

One of the most important tools for the analysis of biologics containing monoclonal antibody as active ingredient is mass spectrometry, which requires the ionization of the sample. Electrospray ionization is prevalent technique that generates numerous charge states in the case of large molecules. The effects of matrix components on the ionization of different pharmaceutical products containing mAbs were found to be significant. The ionization of cetuximab was promoted by the addition of acids, volatile organic solvents and the removal of the detergent. Sample containing rituximab was injected into a capillary filled with formic acid. The spectra recorded on the boundaries of the sample plug showed substantial improvement compared to the bulk phase of the sample.

The ESI-MS spectra of monoclonal antibodies consist of many peaks corresponding to different charge states thus, special data processing is required. A process called deconvolution creates a zero-charge mass spectrum. This spectrum is similar to each differently charged peak in the recorded spectrum but has higher signal-to-noise ratio and mass accuracy. This facilitates the identification of peaks and determination of masses corresponding to the peak maxima. The effects of parameters available in Bruker's Maximum Entropy deconvolution algorithm were investigated. The deconvoluted mass range should not be wider than necessary in order to prevent satellite peak formation. A wider m/z range used for the deconvolution increases the noise level in the deconvoluted spectra, on the other hand, narrowing m/z range decreases the mass accuracy and can cause certain details of the spectrum to be lost. The accurate determination of peak maxima requires smoothing of the spectra due to the noise present in the acquired spectra. The extent of smoothing should be kept to a minimum as it affects the masses of peaks. Baseline correction results in seemingly better resolution of the peaks, but also affects the peak shape and maximum, therefore its usage should be avoided.

Three different deconvolution software were compared. The deconvoluted spectra showed high similarity, the relative standard deviation of masses corresponding to peak maxima were around 1 ppm. A deconvoluted spectrum of trastuzumab was compared to data from literature and theoretical values. Masses corresponding to observed peaks were in most cases ~ 3 Da higher than their theoretical values, which most likely indicates inaccurate mass calibration.

As conclusion, different matrix components affect significantly the ionisation of mAbs and thus the acquired mass spectrum as well. The deconvolution parameters can have considerable effects on the deconvoluted spectra, but different algorithms provide nearly identical results.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Gáspár Attilának a munkám során nyújtott tanácsait és segítségét.

Hálásan köszönöm a ScanoMed Kft. munkásainak Dr. Nagy Gábornak és Dr. Vágner Adriennek, hogy a monoklonális antitest tartalmú gyógyszerkészítmények biztosításával lehetővé tették a dolgozat létrejöttét.

Köszönöm Dr. Andrási Melinda egyetemi adjunktusnak az antitestek irodalmával kapcsolatos útmutatását és Nagy Cynthia PhD hallgatónak az MS mérésekhez kapcsolódó javaslatait.

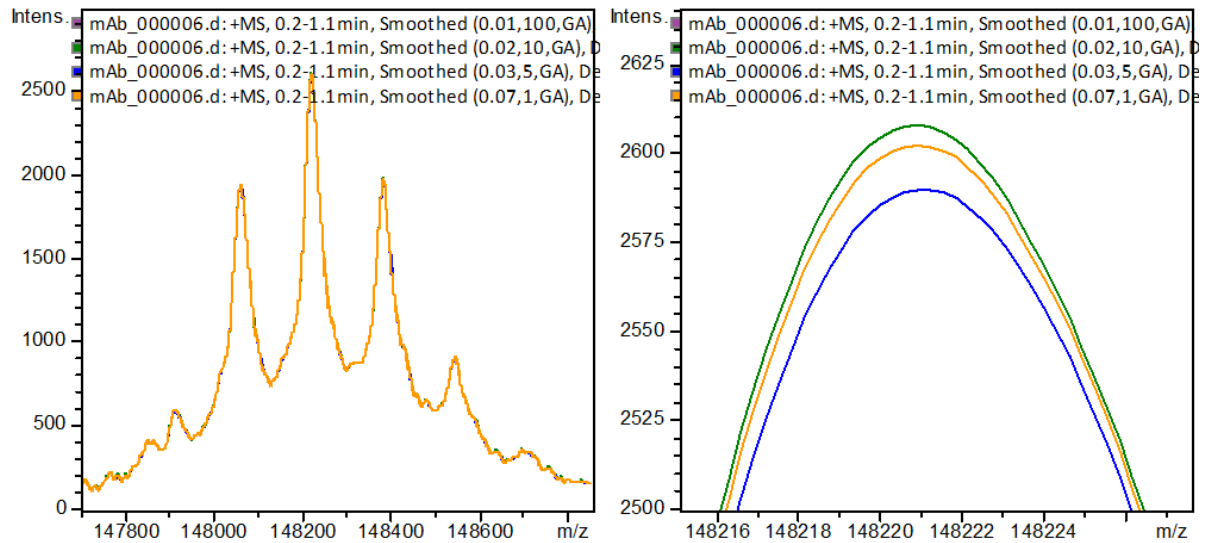
Dolgozatom az Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült (pályázati azonosító: ÚNKP-22-2-I-DE-193).

Irodalomjegyzék

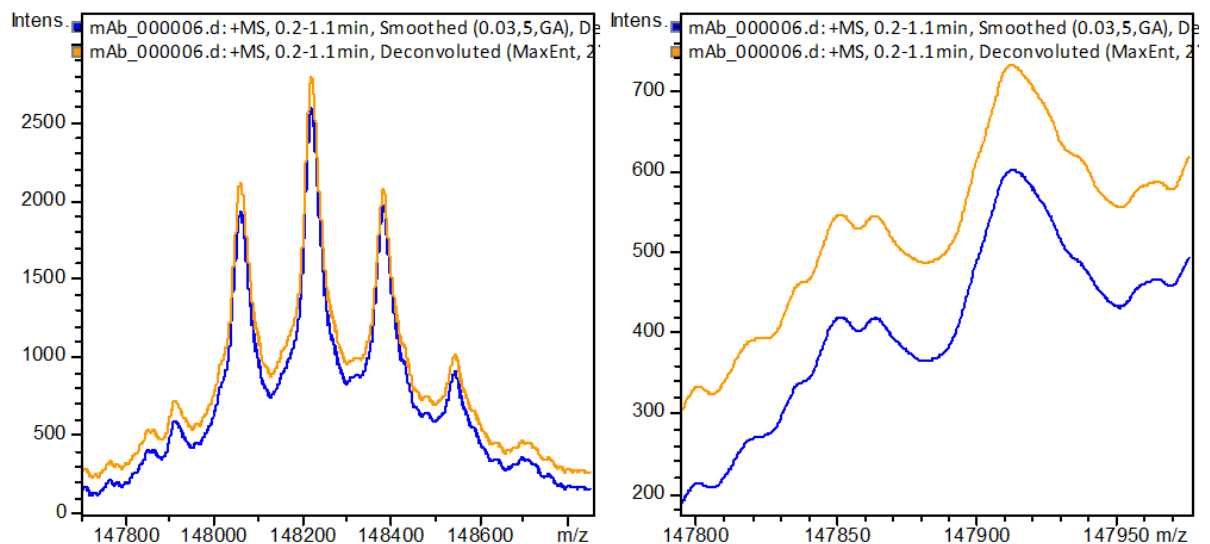
- [1] A. Mullard, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2021, **20**, 491–495.
- [2] Y.-C. Hwang, R.-M. Lu, S.-C. Su, et al., *J. Biomed. Sci.*, 2022, **29**, 1.
- [3] S. Kozlowski, P. Swann, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, **58**, 707–722.
- [4] J. Owen, J. Punt, S. Stranford, Kubly Immunology, W. H. Freeman, 2013.
- [5] Luz Yolanda Toro Suarez, State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 1. Monoclonal Antibody Therapeutics: Structure, Function, and Regulatory Space, American Chemical Society, Washington, DC, 2014.
- [6] R. Wait, Introduction to Mass Spectrometry, Humana Press, New Jersey, 2003.
- [7] <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2002> Megtekintve: 2022. 11. 11.
- [8] J.H. Gross, Mass Spectrometry, Springer International Publishing, Cham, 2017.
- [9] L. Konermann, E. Ahadi, A.D. Rodriguez, et al., *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 2–9.
- [10] J. Abian, *J. Mass Spectrom.*, 1999, **34**, 157–168.
- [11] C. Steel, M. Henchman, *J. Chem. Educ.*, 1998, **75**, 1049–1054.
- [12] S. Beck, A. Michalski, O. Raether, et al., *Mol. Cell. Proteomics*, 2015, **14**, 2014–2029.
- [13] H. Xie, A. Chakraborty, J. Ahn, et al., *MAbs*, 2010, **2**, 379–394.
- [14] M. Adamczyk, J.C. Gebler, C.A. Harrington, et al., *Eur. J. Mass Spectrom.*, 1999, **5**, 165–168.
- [15] A. Planinc, B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, et al., *Eur. J. Hosp. Pharm.*, 2017, **24**, 286–292.
- [16] E.A. Redman, N.G. Batz, J.S. Mellors, et al., *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 2264–2272.
- [17] Y. Yang, G. Wang, T. Song, et al., *MAbs*, 2017, **9**, 638–645.
- [18] B. Kükler, V. Filipe, E. Van Duijn, et al., *Pharm. Res.*, 2010, **27**, 2197–2204.
- [19] F. Debaene, A. Bœuf, E. Wagner-Rousset, et al., *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 10674–10683.
- [20] E.A. Redman, J.S. Mellors, J.A. Starkey, et al., *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 2220–2226.
- [21] M. Källsten, D. Visanu, M. Pijnappel, et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2022, **33**, 1161–1167.

- [22] K.J. Pacholarz, P.E. Barran, *EuPA Open Proteomics*, 2016, **11**, 23–27.
- [23] L. Basa, Drug-to-Antibody Ratio (DAR) and Drug Load Distribution by LC-ESI-MS, in: L. Ducry (Ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 2013: pp. 285–293.
- [24] D.P. Donnelly, C.M. Rawlins, C.J. DeHart, et al., *Nat. Methods*, 2019, **16**, 587–594.
- [25] J.O. Kafader, R.D. Melani, L.F. Schachner, et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2020, **31**, 574–581.
- [26] S.G. Valeja, N.K. Kaiser, F. Xian, et al., *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 8391–8395.
- [27] J.B. Shaw, J.S. Brodbelt, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 8313–8318.
- [28] M. Mann, C.K. Meng, J.B. Fenn, *Anal. Chem.*, 1989, **61**, 1702–1708.
- [29] A.G. Ferrige, M.J. Seddon, B.N. Green, et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1992, **6**, 707–711.
- [30] D.M. Horn, R.A. Zubarev, F.W. McLafferty, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2000, **11**, 320–332.
- [31] H. Guner, P.L. Close, W. Cai, et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2014, **25**, 464–470.
- [32] X. Liu, Y. Inbar, P.C. Dorrestein, et al., *Mol. Cell. Proteomics*, 2010, **9**, 2772–2782.
- [33] L. Chen, S.K. Sze, H. Yang, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 5006–5018.
- [34] R. Winkler, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2010, **24**, 285–294.
- [35] Z. Zhang, A.G. Marshall, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1998, **9**, 225–233.
- [36] M.T. Marty, A.J. Baldwin, E.G. Marklund, et al., *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 4370–4376.
- [37] M.T. Marty, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2019, **30**, 2174–2177.
- [38] M.W. Senko, S.C. Beu, F.W. McLafferty, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1995, **6**, 229–233.
- [39] https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/erbitux-epar-product-information_hu.pdf Megtekintve: 2022. 11. 13.
- [40] <https://www.genome.jp/entry/D03257> Megtekintve: 2022. 11. 13.
- [41] A. Quaranta, M. Spasova, E. Passarini, et al., *Analyst*, 2020, **145**, 1737–1748.
- [42] A. Varki, R.D. Cummings, M. Aebi, et al., *Glycobiology*, 2015, **25**, 1323–1324.

Mellékletek



M-1. ábra: Különböző módon simított tömegspektrumok dekonvolált spektrumai különböző nagyításban: narancs: 10 pont, 1 ciklus; kék: 5 pont, 5 ciklus; zöld: 2 pont, 10 ciklus; lila: 1 pont, 100 ciklus. (A lila spektrum a narancssal teljesen egybe esik, ezért nem látszik.)



M-2. ábra: A spektrum simítása a dekonvolúció előtt (kék), és a dekonvolúció után (narancs) különböző nagyításban. A simítás mindkét esetben Gauss típusú volt: 5 pont szélességgel 5 ciklussal.