



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση

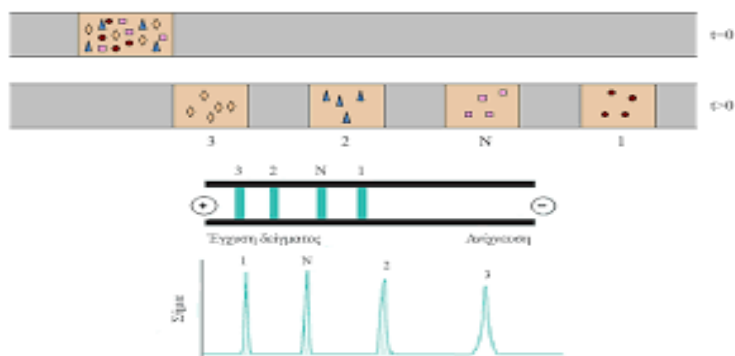


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση στην ανάλυση βιομορίων

POST GRADUATE THESIS

Capillary electrophoresis for the analysis of biomolecules



ΟΝΟΜΑΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

Φλώρα Γεννίτσαρη

Flora Gennitsari

ΟΝΟΜΑΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Μαρία Τράπαλη

Maria Trapali

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2020



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS
Capillary electrophoresis for the analysis of biomolecules

Flora Gennitsari

dml19001

e-mail:florflores@outlook.com

FIRST SUPERVISOR

Maria Trapali

SECOND SUPERVISOR

Petros Karkalousos

THIRD SUPERVISOR

Anastasios Kriembardis

AIGALEO 2020

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Φλώρα Γεννίσαρη του Δημητρίου, με αριθμό μητρώου 19001 φοιτητής/τρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα,

Φλώρα Γεννίσαρη

Περίληψη

Εισαγωγή: Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) έπαιξε σημαντικό ρόλο στις εξελίξεις στις βιοεπιστήμες. Η τεχνική χρησιμοποιείται σήμερα για την ανάλυση τόσο μεγάλων όσο και μικρών μορίων σε εφαρμογές όπου αποδίδει καλύτερα από ή συμπληρώνει τις υγρές χρωματογραφικές τεχνικές.

Σκοπός: Στην παρούσα εργασία, περιγράφονται αρχές διαφορετικών τεχνικών ηλεκτρομετανάστευσης, ιδίως τριχοειδούς ισοηλεκτρικής εστίασης (CIEF), τριχοειδούς γέλης (CGE) και ηλεκτροφόρησης τριχοειδών ζωνών (CZE), καθώς και πρόσφατες εξελίξεις στην οργάνωση, με έμφαση στη σύζευξη με τη φασματομετρία μάζας (MS).

Αποτελέσματα: Ο ρόλος της CE στις βιοεπιστήμες παρουσιάζεται με εφαρμογές στις οποίες είχε μεγάλο αντίκτυπο τις τελευταίες δεκαετίες. Σε αυτό το πλαίσιο, η τρέχουσα πρακτική για τον χαρακτηρισμό των βιοφαρμακευτικών προϊόντων (θεραπευτικές πρωτεΐνες) παρουσιάζεται με CIEF, CGE και CZE χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές ανίχνευσης, συμπεριλαμβανομένης της MS. Στη συνέχεια, η εφαρμογή των CGE και CZE αποδεικνύεται για την ανάλυση των γλυκανών που απελευθερώνονται από πρωτεΐνες στον χαρακτηρισμό των βιοφαρμακευτικών προϊόντων και της ανακάλυψης βιοδείκτη γλυκανών σε βιολογικά δείγματα. Τέλος, συζητείται η ανάλυση CE στην κλινική χημεία και οι τελευταίες εξελίξεις στις προσεγγίσεις της μεταβολομικής για το προφίλ μικρών μορίων σε βιολογικά δείγματα.

Συμπεράσματα: Ο μεγάλος αριθμός εφαρμογών CE που δημοσιεύθηκαν για αυτά τα θέματα τα τελευταία χρόνια καταδεικνύει σαφώς τον καθιερωμένο ρόλο της CE στις βιοεπιστήμες.

Abstract

Introduction: Capillary electrophoresis (CE) has played an important role in developments in the life sciences. The technique is currently used to analyze both large and small molecules in applications where it performs better than or complements liquid chromatographic techniques.

Purpose: This paper describes the principles of different electromigration techniques, in particular capillary isoelectric focusing (CIEF), capillary gel (CGE) and capillary band electrophoresis (CZE), as well as recent developments in the organization, with a focus on MS.

Results: The role of CE in the life sciences is presented with applications in which it has had a major impact in recent decades. In this context, current practice for the characterization of biopharmaceuticals (therapeutic proteins) is presented in CIEF, CGE and CZE using different detection techniques, including MS. Subsequently, the application of CGE and CZE is demonstrated for the analysis of glycans released by proteins in the characterization of biopharmaceuticals and the discovery of a glucan biomarker in biological samples. Finally, CE analysis in clinical chemistry and the latest developments in metabolic approaches to the profile of small molecules in biological samples are discussed.

Conclusions: The large number of CE applications published on these topics in recent years clearly demonstrates the well-established role of CE in the life sciences.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Δήλωση συγγραφέα.....	iv
Περίληψη	vi
Abstract	viii
Κατάλογος Σχημάτων.....	xi
Κατάλογος Πινάκων.....	xiv
Συντομογραφίες	xv
Πρόλογος.....	1
Κεφάλαιο 1	3
Κεφάλαιο 1	6
1.1 Τεχνολογία και Μέθοδοι τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης.....	8
1.1.1 Λειτουργίες CE	8
1.1.2 Ηλεκτροφόρηση της τριχοειδούς ζώνης (CZE).....	8
1.1.3 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση γέλης (CGE).....	12
1.1.4 Τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση (CIEF)	14
1.1.5 CE-MS (Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry)	16
Κεφάλαιο 2	25
Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε περιβάλλον ποιοτικού ελέγχου	25
2.1 Υλικά.....	28
2.2 Μέθοδοι	29
2.2.1 SDS-PAGE (Ηλεκτροφόρηση σε ακρυλαμίδιο)	29
2.2.2 CE-SDS.....	32
2.3 Προετοιμασία των δειγμάτων	32
2.4 Βελτιστοποίηση και Πρωτόκολλο ανάλυσης.....	33
2.6 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός	36
2.6.1 Επικύρωση	38
2.6.2 Ακρίβεια, γραμμικότητα και όριο ποσοτικού προσδιορισμού	38
2.6.3 Ακρίβεια.....	40
2.6.4 Καταλληλότητα συστήματος.....	41
Κεφάλαιο 3	42
Επιλεγμένες εφαρμογές στις βιοεπιστήμες.....	42
3.1 Βιοφαρμακευτικά προϊόντα	42
3.1.1. CGE (τριχοειδής ηλεκτροφόρηση πηκτής).....	43
3.1.2. CIEF (Τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση)	45
3.1.3. CZE-MS (Τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζωνών)	46

3.2 Γλυκανές που προέρχονται από πρωτεΐνες	50
3.2.1. Η προετοιμασία των δειγμάτων.....	51
3.2.3. CE-MS γλυκανών	52
3.3 Συστήματα CE-MS για παγκόσμιες μελέτες μεταβολισμού	56
Συμπεράσματα	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1 Ηλεκτροφόρηση αμινοξέων επί χάρτου.....	4
Σχήμα 2 Σύγκριση των αναλύσεων CE-MS του πεπτιδικού προτύπου χρησιμοποιώντας ένα μη επικαλυμμένο τριχοειδές (άνω τμήμα), προ-επικαλυμμένο πολυβρένιο (PB) και PolyE-323 (PE) και αυτο-επικαλυμμένο τριχοειδές χρησιμοποιώντας 33-660nM PB και PE (από την κορυφή προς τα κάτω)(Garza et al., 2007).των αναλύσεων CE-MS του πεπτιδικού προτύπου χρησιμοποιώντας ένα μη επικαλυμμένο τριχοειδές (άνω τμήμα), προ-επικαλυμμένο πολυβρένιο (PB) και PolyE-323 (PE) και αυτο-επικαλυμμένο τριχοειδές χρησιμοποιώντας 33-660nM PB και PE (από την κορυφή προς τα κάτω)(Garza et al., 2007).....	11
Σχήμα 3 Ηλεκτροφόρηση γέλης.....	12
Σχήμα 4 Ηλεκτροφόρηση CIEF.....	14
Σχήμα 5 Ανάλυση Bevacizumab CIEF-MS σε σύγκριση με την iCIEF-UV: (α) Εκχύλισμα CIEF-MS ιόντων ηλεκτροπαραγωγής που δείχνει βασικές παραλλαγές B1 και B2, κύρια κορυφή M και όξινες παραλλαγές A1 και A2. (β) ηλεκτροδιάγραμμα iCIEF-UV (γ) Φάσματα μάζας CIEF-MS σημαντικών παραλλαγών. Το ένθετο στο μέρος γ είναι η εκτεταμένη όψη της κύριας κορυφής στο φάσμα μάζας(Dai et al., 2018).	15
Σχήμα 6 Μέθοδος ηλεκτροφόρησης φασματομετρίας μάζας.....	16
Σχήμα 7 Κοινές διεπαφές για CE-MS. (A) διεπαφή συν-αξονικού υγρού ESI θήκης, (B) διεπαφή ESI χωρίς θήκη, (C) διεπαφή ESI μικροσκοπικής διασταύρωσης υγρού και (D) διασύνδεση υγρού θήκης με MALDI(Smith et al., 1988).....	17
Σχήμα 8 Συσκευή MCE-ESI. S = δεξαμενή δείγματος; B = δεξαμενή BGE; ΝΔ: δεξαμενή αποβλήτων δείγματος ΕΟ: δεξαμενή ηλεκτροοσμωτικής αντλίας(Batz et al., 2014).....	22
Σχήμα 9 Ακρίβεια της μεθόδου SDS-PAGE. Η ακρίβεια της μεθόδου προσδιορίστηκε με μετατόπιση της 3-φωσφογλυκερικής φωσφοκινάσης στη μήτρα δείγματος και τη μέτρηση της ανάκτησης.....	30
Σχήμα 10 Γραμμικότητα της μεθόδου SDS-PAGE.	31
Σχήμα 11 Γραμμική εφαρμογή για τη μέθοδο SDS-PAGE. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) είναι 0,9850.	31
Σχήμα 12 Παράδειγμα γέλης που δείχνει την ακρίβεια της μεθόδου SDS-PAGE.	32

Σχήμα 13 Ηλεκτρογραφήματα δείγματος που έχει υπερθερμανθεί.....	35
Σχήμα 14 Ηλεκτρογράφημα ενός βέλτιστα παρασκευασμένου δείγματος.	37
Σχήμα 15 Ηλεκτροπεράγραμμα βελτιστοποιημένης μεθόδου. Η βελτιστοποίηση περιελάμβανε προετοιμασία δείγματος και βέλτιστες συνθήκες ηλεκτροφόρησης.....	39
Σχήμα 16 Θήκη CE-MS ανασυνδυασμένου ανθρώπινου EPO (200μg/mL) που χρησιμοποιεί ουδέτερο επικαλυμμένο τριχοειδές. (A) BPE; (B) αποσυμπιεσμένο φάσμα μάζας που λαμβάνεται στην κορυφή της κορυφής που μεταναστεύει στα 38,0 min, (C1) καμπύλη περιγράμματος με ζουμ, (C2) η κατάσταση φόρτισης 14+ των γλυκομορφών και (C3) οι σιαλομορφές SiA13 των 14+ γλυκομορφών(Haselberg et al., 2013).....	48
Σχήμα 17 (α) Διαχωρισμός ανέπαφων παραλλαγών φόρτισης Infliximab από το σύστημα MCE-MS. Οι αναγνωρισμένες παραλλαγές λυσίνης επισημαίνονται ως 2-K, 1-K και 0-K. (β) Αποσυντεθειμένα φάσματα μάζας για κάθε παραλλαγή λυσίνης(Kubotaetal 2017).....	49
Σχήμα 18 Δομές γλυκανών που συνδέονται με πρωτεΐνες. Κίτρινος κύκλος = γαλακτόζη (Gal); κίτρινο τετράγωνο = N-ακετυλαγαλακτοζαμίνη (GalNAc); μπλε τετράγωνο = N-ακετυλογλυκοζαμίνη (GlcNAc); πράσινος κύκλος = μαννόζη; κόκκινο τρίγωνο = φουκόζη, μοβ διαμάντι = N-ακετυλονεραμινικό οξύ (Neu5Ac)(Toraño et al., 2019).....	50
Σχήμα 19 Ηλεκτρογραφήματα που λαμβάνονται με CZE-LIF (a) και CZE-MS (b). Το εκχυλισθέν ιόν ηλεκτροπρογράμματος και ίχνος LIF δείχνουν τα αποτελέσματα ανάλυσης των κοινών N-γλυκανών (1,25 nmol / mL) που παρατηρήθηκαν σε mAbs, επισημάνθηκαν με Teal™ και διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας υψηλή περιεκτικότητα σε μεθανόλη στο BGE. Η αναλογία σήματος προς θόρυβο του ίχνους LIF είναι σαφώς ανώτερη από την αναλογία του ίχνους MS(Khan et al., 2018).....	55
Σχήμα 20 Επιλεγμένα ηλεκτροφόρα ιόντων για κατιονικούς μεταβολίτες που παρατηρούνται σε εκχύλισμα από <i>Bacillus subtilis</i> από CE-MS στην περιοχή m/z από 101 έως 150. Ο αριθμός που παρέχεται στην επάνω αριστερή γωνία κάθε ίχνους είναι η αφθονία που σχετίζεται με την υψηλότερη κορυφή του ηλεκτροπρογράμματος(Soga & Neiger, 2000).....	58
Σχήμα 21 Έγχυση πολλαπλών τμημάτων σε CE-MS. (A) Πολλαπλός διαχωρισμός βάσει σειριακής έγχυσης επτά διακριτών τμημάτων δείγματος εντός ενός τριχοειδούς με	

έγχυση πολλαπλών τμημάτων CE-MS (B) τα ιόντα μεταναστεύουν ως σειρά ζωνών σε ελεύθερο διάλυμα πριν από τον ιονισμό. (C) η διαδικασία καθιστά δυνατή την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση των πολικών μεταβολιτών και των ισομερών τους σε διαφορετικά δείγματα καθώς ο ιονισμός πραγματοποιείται εντός μικρού χρονικού διαστήματος ($\approx 2-6$ λεπτά) υπό συνθήκες σταθερής κατάστασης κατά τη χρήση ESI-MS(Kuehnbaum et al., 2013).....60

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Βελτιστοποίηση προετοιμασίας δείγματος	34
Πίνακας 2 Ρυθμίσεις μεθόδου για το σύστημα MD / P / ACE MDQ	37
Πίνακας 3 Επιλεγμένες παράμετροι επικύρωσης για την επικύρωση μεθόδου CE-SDS ...	38
Πίνακας 4 Γραμμικότητα της μεθόδου CE-SDS	40
Πίνακας 5 Επαναληψιμότητα της μεθόδου CE-SDS	41

Συντομογραφίες

Αγγλική ορολογία – Ελληνική ορολογία

BCA: Bicinchoninic Acid - Βικινχονινικό οξύ

BFS: Capillaries of Bare Fused Silicones - Τριχοειδή γυμνών συντηγμένων πυριτίων

CE: Capillary Electrophoresis - Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

CZE: Capillary Zone Electrophoresis - Ηλεκτροφόρηση της τριχοειδούς ζώνης

CGE: Capillary Gel Electrophoresis - Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση γέλης

CIEF: Capillary Isoelectric Focusing - Τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση

EOF: Electroosmotic Flow - Ηλεκτροοσμωτικές ροές

ESI: Electrospray Ionization - Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό

HPMC: Hydroxypropyl Methyl Cellulose - Υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη

iCIEF: Image Capillary Isoelectric Focusing - Απεικόνιση πλήρους στήλης CIEF

LC: Liquid Chromatography - Υγρή χρωματογραφία

mAbs: Monoclonical Antibodys - Μονοκλωνικά αντισώματα

MCE: Microchip Capillary Electrophoresis - Μικροφόρηση τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

MS: Mass Spectrometry - Φσματομετρία μάζας

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis - Ηλεκτροφόρηση πηκτής δωδεκυλθειικού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου

Πρόλογος

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία τεχνική διαχωρισμού και εν συνεχεία προσδιορισμού μίγματος ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους, όπως π.χ. πρωτεϊνών, λιποπρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA), ενζύμων και ισοενζύμων ή μορίων με μικρότερο μοριακό βάρος, όπως πεπτίδια ή ακόμη και μίγματος ουσιών με μικρό μοριακό βάρος, όπως π.χ. αμινοξέα, βάσεις κ.α. Εφαρμόζεται ακόμη και σε περιπτώσεις κυττάρων. Με λίγα λόγια μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιαδήποτε δείγμα περιέχει χημικές ενώσεις που φέρουν φορτίο. Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται (Καρκαλούσος, 2012): Α) για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό μορίων ποικίλου μοριακού βάρους ενός μίγματος, Β) για τον προσδιορισμό μοριακού βάρους, Γ) για τον προσδιορισμό της καθαρότητας ενός δείγματος, Δ) για την απομόνωση, τον καθαρισμό και χαρακτηρισμό ουσιών, π.χ. πρωτεϊνών, κ.α. Η ηλεκτροφόρηση βρίσκει εφαρμογές στην βιοχημεία και κλινική χημεία, στην μοριακή βιολογία, στην φαρμακολογία και τοξικολογία, στην εγκληματολογία και άλλες επιστήμες. Η ηλεκτροφόρηση είναι απλή, φθηνή και εύκολα εφαρμόσιμη τεχνική, θεμελιώδες εργαλείο στην μοριακή βιολογία και στην εργαστηριακή διαγνωστική ιατρική.

Βασική αρχή της λειτουργίας της μεθόδου της ηλεκτροφόρησης αποτελεί ο διαχωρισμός των μορίων των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθος ή το φορτίο τους ή και το συνδυασμό των παραμέτρων αυτών, κατά τη μετακίνησή τους εντός ενός ομογενούς ηλεκτρικού πεδίου. Η πιο διαδεδομένη παραλλαγή της τεχνικής αυτής είναι με την εφαρμογή του δωδεκυλοθειικού νατρίου σε αποδιατακτικές συνθήκες, όπου μπορούν να προσδιοριστούν οι μοριακές μάζες των πρωτεϊνικών υπομονάδων. Σε αυτή την περίπτωση, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται ανάλογα τη μοριακή τους μάζα. Η πηκτή βαθμίδωσης ακρυλαμιδίου εμφανίζει περισσότερα πλεονεκτήματα σε σχέση με την ομοιογενή πηκτή επιτρέποντας σε πρωτεΐνες ευρύτερης κλίμακας μοριακών μαζών να διαχωρίζονται (Hernández-Borges, Neusüß, Cifuentes, & Pelzing, 2004).

Κατά τη μη αποδιατακτική πηκτή, οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το μέγεθός τους αλλά και το ηλεκτρικό τους φορτίο. Παραλλαγή του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού αποτελεί και η ισοηλεκτρική εστίαση.

Η ισοηλεκτρική εστίαση αποτελεί μία παραλλαγή της ηλεκτροφόρησης όπου ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με τη μετακίνηση των πρωτεϊνών, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, σε πηκτική διαβαθμιζόμενη τιμή pH. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η πρωτεΐνη μετακινείται προς τη ζώνη εκείνη όπου το pH είναι ίσο με το ισοηλεκτρικό σημείο.

Η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς συνδυάζει τις τεχνικές υπό μετουσιωτικές συνθήκες και ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο και το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών.

Στην παρούσα εργασία θα δοθεί ιδιαίτερη σημασία στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση καθώς πρόκειται για μία αυτοματοποιημένη και εξελιγμένη τεχνική διαχωρισμού. Η μέθοδος αυτή βρίσκει πολλές εφαρμογές για το διαχωρισμό πεπτιδίων, φαρμακευτικών ουσιών και νουκλεϊκών οξέων και εμφανίζει μεγάλη ακρίβεια, ευαισθησία και επαναληψιμότητα μεταξύ των δειγμάτων (Stutz, 2005). Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης βασίζεται στην εφαρμογή ενός τριχοειδούς σωλήνα από τηγμένο οξείδιο του πυριτίου ως μέσο μεταφοράς όπου τα άκρα του τοποθετούνται σε δοχεία ηλεκτρολυτών με ηλεκτρόδια. Η ανίχνευση των κλασμάτων των πρωτεϊνών που προκύπτουν γίνεται με τη χρήση ενός οπτικού ανιχνευτή και τα δεδομένα συλλέγονται μέσω ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή υπό τη μορφή κορυφών σε ηλεκτροφόρημα (Fesmire, 2018). Κύριες παραλλαγές της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης είναι η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση ζώνης (CZE), η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση πηκτικής (CGE) και η τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση (CIEF), οι οποίες βρίσκουν εφαρμογές για την ανάλυση των πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων και θα συζητηθούν διεξοδικά στην παρούσα εργασία. Στόχος αυτής της επισκόπησης είναι να παρουσιάσει τις σημαντικές εξελίξεις σε όλα τα παραπάνω πεδία ανάλυσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης.

Κεφάλαιο 1

Βασικές αρχές ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία τεχνική διαχωρισμού και εν συνεχεία προσδιορισμού μίγματος ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους, όπως π.χ. πρωτεϊνών, λιποπρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA), ενζύμων και ισοενζύμων ή μορίων με μικρότερο μοριακό βάρος, όπως πεπτίδια ή ακόμη και μίγματος ουσιών με μικρό μοριακό βάρος, όπως π.χ. αμινοξέα, βάσεις κ.α. Εφαρμόζεται ακόμη και σε περιπτώσεις κυττάρων. Με λίγα λόγια μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιαδήποτε δείγμα περιέχει χημικές ενώσεις που φέρουν φορτίο. Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται:

A) για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό μορίων ποικίλου μοριακού βάρους ενός μίγματος,

B) για τον προσδιορισμό μοριακού βάρους,

Γ) για τον προσδιορισμό της καθαρότητας ενός δείγματος,

Δ) για την απομόνωση, τον καθαρισμό και χαρακτηρισμό ουσιών, π.χ. πρωτεϊνών, κ.α. Η ηλεκτροφόρηση βρίσκει εφαρμογές στην βιοχημεία και κλινική χημεία, στην μοριακή βιολογία, στην φαρμακολογία και τοξικολογία, στην εγκληματολογία και άλλες επιστήμες.

Η ηλεκτροφόρηση είναι απλή, φθηνή και εύκολα εφαρμόσιμη τεχνική, θεμελιώδες εργαλείο στην μοριακή βιολογία και στην εργαστηριακή διαγνωστική ιατρική.

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού κατά την οποία φορτισμένα μόρια (π.χ. πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα) μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στο εσωτερικό πηκτών ή διαλυμάτων. Διαφορετικά μόρια κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες και τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται εάν βρεθούν μέσα σε κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο.

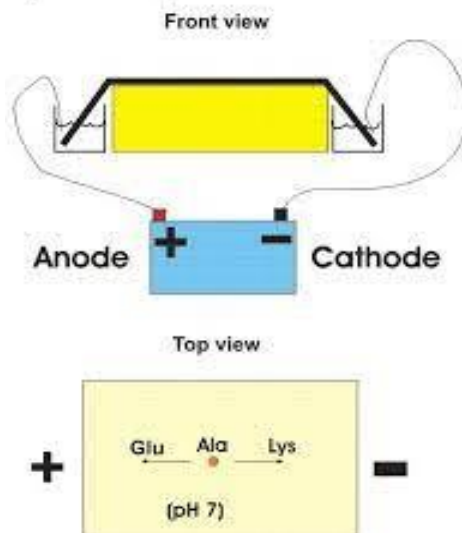
Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των φορτισμένων μορίων εξαρτάται κυρίως από:

- Το καθαρό φορτίο: αρνητικά φορτισμένα μόρια (ανιόντα) μετακινούνται προς την άνοδο (+), ενώ θετικά φορτισμένα μόρια (κατιόντα) μετακινούνται προς την

κάθοδο (-). Τα μόρια που φέρουν υψηλό σθένος μετακινούνται γρηγορότερα προς το ηλεκτρόδιο με το αντίθετο φορτίο από μόρια με μικρότερο σθένος.

- Το μέγεθος: η αντίσταση (λόγω της τριβής) που υφίστανται τα μόρια που κινούνται μέσα σε ένα διάλυμα ή μία πηκτή, έχει ως συνέπεια τα μικρά μόρια να κινούνται γρηγορότερα από τα μεγάλα.
- Το σχήμα: η τριβή επηρεάζεται από το σχήμα του μορίου, με αποτέλεσμα η κινητικότητα να είναι διαφορετική ανάμεσα σε σφαιρικές και ινώδεις πρωτεΐνες ή ανάμεσα σε γραμμικό και κυκλικό DNA.
- Την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου: όσο αυξάνεται η τάση του πεδίου, τόσο αυξάνεται και η κινητικότητα. Όμως, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί στη χρήση υψηλής τάσης, έτσι ώστε να μην αναπτυχθούν θερμικά φαινόμενα.

Paper electrophoresis of amino acids



Σχήμα 1 Ηλεκτροφόρηση αμινοξέων επί χάρτου.

Παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφόρηση

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την τεχνική της ηλεκτροφόρησης είναι:

- το pH,
- η ιοντική ισχύς,
- η ιοντική σύσταση,
- η ένταση,
- η θερμοκρασία,
- ο χρόνος,

- το υπόστρωμα.

Εργαστηριακά όργανα και σκεύη ηλεκτροφόρησης

- τροφοδοτικό,
- λουτρό ηλεκτροφόρησης,
- ηλεκτρόδια,
- υπόστρωμα,
- διηθητικό χαρτί (Watmann),
- διαλύτες,
- απορρυπαντικά μετουσίωσης πρωτεϊνών (SDS, Urea, Lithium Dodecyl Sulfate κ.α.),
- χτενάκια (Applicator - για την εναπόθεση του δείγματος, συνήθως 1-10 μ L, παράλληλα με το δείγμα φορτώνεται μάρτυρας και πρότυπο),
- λουτρό χρωματισμού και αποχρωματισμού – σταθεροποίησης,
- επιφανειακά ηλεκτρόδια,
- υπολογιστής,
- pH-μετρο,
- ρυθμιστές θερμοκρασίας,
- δείκτες ηλεκτροφορητικής κινητικότητας

Κεφάλαιο 1

Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis)

Μετά από μια μακρά εξέλιξη, οι τριχοειδείς τεχνικές ηλεκτρομετανάστευσης είναι τώρα πολύ ισχυρές σε διάφορους τομείς. Ο διαχωρισμός βασίζεται κυρίως στην αναλογία φόρτισης προς μέγεθος και μπορούν να επιτευχθούν υψηλές αποδόσεις με μικρούς χρόνους διαχωρισμού. Δίπλα στη χρήση της ηλεκτροφόρησης της τριχοειδούς ζώνης (capillary zone electrophoresis, CZE) για διαφορετικούς τύπους εφαρμογής, η τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση (capillary isoelectric focusing, CIEF) και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση γέλης (capillary gel electrophoresis, CGE) είναι ισχυρά για την ανάλυση των βιοπολυμερών. Η αναπαραγωγικότητα και η ευρωστία της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (capillary electrophoresis, CE) ήταν συχνά μικρότερη από εκείνη της υγρής χρωματογραφίας (liquid chromatography, LC) και της αέριας χρωματογραφίας (gas chromatography, GC), αλλά τις τελευταίες δεκαετίες βελτιώθηκε με αξιόπιστη έγχυση και σταθερές ηλεκτροοσμωτικές ροές (electroosmotic flows, EOF) στα τριχοειδή. Η ανάπτυξη και εμπορευματοποίηση κατάλληλων αυτοματοποιημένων οργάνων έπαιξε σημαντικό ρόλο στην πρόοδο της CE.

Η ηλεκτροφόρηση είναι γνωστή εδώ και πολύ καιρό και έχουν αναπτυχθεί διάφορες αρχές. Το 1937 ο Tiselius περιέγραψε διαχωρισμούς πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας ένα σωλήνα U, αλλά επιτεύχθηκε μόνο ένας διαχωρισμός δύο συστατικών και η δυνατότητα εφαρμογής ήταν ακόμη περιορισμένη. Η απόδοση διαχωρισμού ήταν μάλλον χαμηλή λόγω της θερμικής διάχυσης και της μεταφοράς. Πρέπει να σημειωθεί ότι η θέση του Tiselius σχετικά με την ηλεκτροφόρηση ως αναλυτική τεχνική εμφανίστηκε ήδη το 1930. Για αυτό το έργο στον τομέα του διαχωρισμού, ο Tiselius απονεμήθηκε ένα βραβείο Νόμπελ. Τα επόμενα χρόνια δημοσιεύθηκαν μερικές νέες εξελίξεις και εφαρμογές. Μια κύρια συνεισφορά προσφέρθηκε από τον Martin που απέκτησε έναν αποτελεσματικό διαχωρισμό χλωριδίου, οξικού, ασπαρτικού και γλουταμικού χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση μετατόπισης (ισοταχοφόρηση, isotachopheresis, ITP) (Sastre Toraño et al., 2019).

Η μεταφορά θεωρήθηκε ένα σημαντικό μειονέκτημα και η καταστολή της επιτεύχθηκε με υλικά φορέα στο σωλήνα διαχωρισμού και πλάκες που περιέχουν πηκτές. Μια επιτυχημένη προσέγγιση ήταν η χρήση τριχοειδών 0,1-0,5 mm i.d. που ήταν

χρήσιμα για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή. Η αρχική εργασία σε ηλεκτροφόρηση ανοιχτού σωλήνα παρουσιάστηκε από τον Hjerten χρησιμοποιώντας τριχοειδή περιστρεφόμενα κατά μήκος του διαμήκους άξονά τους για ελαχιστοποίηση των επιπτώσεων της μεταφοράς. Οι Everaerts, Beckers, Verheggen, & Beckers (1976) εφαρμόστηκαν τριχοειδή με παρόμοιες διαμέτρους από γυαλί και Teflon για ITP. Στη συνέχεια, η διάμετρος μειώθηκε περαιτέρω για τη βελτιστοποίηση της απαγωγής θερμότητας. Το 1981, οι Jorgenson & Lukacs (1981) έδειξαν το δυναμικό των τριχοειδών πυριτικών συντήξεων μικρότερο από 100μm. Η χρήση τριχοειδών γυμνών συντηγμένων πυριτίων (bare fused-silica, BFS) θεωρείται πραγματική ανακάλυψη στην ιστορία της ηλεκτροφόρησης των τριχοειδών. Τονίστηκε ο ρόλος του EOF ως κινητήρια δύναμη και μπορούσε να επιτευχθεί ένας σταθερός EOF. Όπως και στο τριχοειδές GC, αυτά τα τριχοειδή αύξησαν τις δυνατότητες της CE για ανάλυση ρουτίνας. Στα τέλη του περασμένου αιώνα δόθηκε μεγάλη προσοχή στη CE και εμφανίστηκαν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα. Ωστόσο, ο ανταγωνισμός με τις υπάρχουσες τεχνικές διαχωρισμού υψηλής απόδοσης όπως το LC ήταν σκληρός. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αποδειχθεί η πραγματική αξία της CE, ειδικά για τις βιοεπιστήμες.

Με βάση τις εξελίξεις του παρελθόντος, παρουσιάζονται οι τελευταίες εξελίξεις και οι εξελίξεις της CE στις βιοεπιστήμες. Στο τμήμα τεχνολογίας περιγράφονται οι διάφορες αρχές και δίνεται προσοχή στα όργανα. Ο συνδυασμός της CE και της φασματομετρίας μάζας (mass spectrometry, MS) είναι πλέον ώριμος, συμβάλλοντας στη συμπληρωματικότητα της CE με LC και LC-MS και συνεπώς συζητείται σε ξεχωριστή ενότητα. Η CE είναι πολύ κατάλληλη για το διαχωρισμό πολικών και ιοντογόνων ενώσεων και φαίνεται η εφαρμογή σε βασικούς τομείς των βιοεπιστημών. Το δυναμικό της CE για την ανάλυση βιοφαρμακευτικών προϊόντων (θεραπευτικών πρωτεϊνών) και γλυκανών είναι υψηλό. Επίσης, στην κλινική χημεία, διάφορες εφαρμογές καταδεικνύουν τις δυνατότητες των τεχνικών διαχωρισμού τριχοειδών ηλεκτρομαγνητικών μεταβολών για την ανάλυση σύνθετων δειγμάτων, ειδικά για τη δημιουργία προφίλ και την ανακάλυψη βιοδεικτών. Συζητούνται επίσης προηγμένα συστήματα και προοπτικές της CE και ορισμένα στοιχεία δείχνουν ότι η CE είναι πλέον μια ισχυρή τεχνική στις βιοεπιστήμες.

1.1 Τεχνολογία και Μέθοδοι τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης

1.1.1 Λειτουργίες CE

Σε αυτήν την ενότητα συζητούνται σύντομα διάφορες λειτουργίες της CE και περιγράφονται σημαντικές εξελίξεις που τονίζουν την ευελιξία της CE. Στο τμήμα CZE αναφέρονται επίσης τεχνικές τριχοειδούς ηλεκτρομετανάστευσης. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στην πρόοδο των μικρορευστοποιητικών CE.

1.1.2 Ηλεκτροφόρηση της τριχοειδούς ζώνης (CZE)

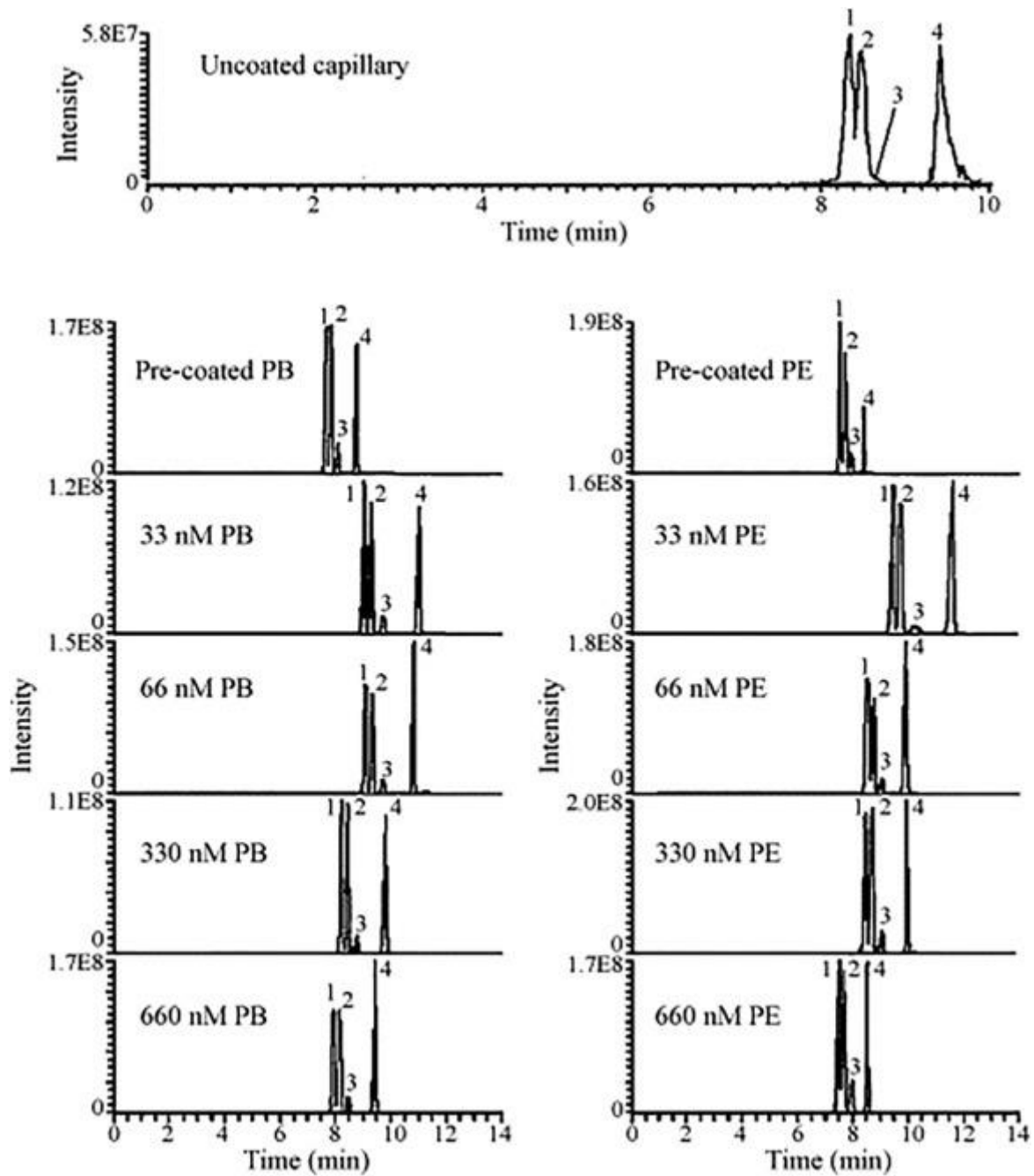
Οι διαχωρισμοί στην CZE λαμβάνονται με διαφορές στην ηλεκτροφορητική μετανάστευση αναλυτών σε ηλεκτρικό πεδίο, με βάση την αναλογία φόρτισης προς μέγεθος. Η εφαρμογή υψηλών τάσεων οδηγεί σε γρήγορη ανάλυση, καθώς η μετεγκατάσταση των αναλυτών είναι αντιστρόφως ανάλογη με την τάση. Γενικά, η κινητικότητα των αναλυτών εξαρτάται επίσης από το EOF, το οποίο προκαλείται από τις φορτισμένες ομάδες σιλανόλης του τριχοειδούς BFS. Η υψηλή απόδοση διαχωρισμού της CE οφείλεται στο προφίλ EOF επίπεδης ροής και τη χαμηλή διάχυση. Βασικά, μόνο η διαμήκης διάχυση, δηλαδή ο όρος B της καμπύλης Van Deemter, συμβάλλει στη διεύρυνση της ζώνης καθιστώντας αυτήν την τεχνική κατάλληλη για την εξαιρετικά αποτελεσματική και επιλεκτική ανάλυση πολικών και φορτισμένων ενώσεων. Δεδομένου ότι η απόδοση διαχωρισμού είναι αντιστρόφως ανάλογη με το συντελεστή διάχυσης της διαλυμένης ουσίας, τα μεγάλα βιομόρια θα έχουν μικρούς συντελεστές διάχυσης και θα ταιριάζουν ιδιαίτερα στην ανάλυση από τη CZE, οδηγώντας σε εξαιρετικά αποδοτικούς διαχωρισμούς με μεγάλους αριθμούς πλακών.

Οι ουδέτερες ενώσεις μπορούν επίσης να διαχωριστούν χρησιμοποιώντας μικκύλια στο ρυθμιστικό διάλυμα (Μικκυλιακή Ηλεκτροκινητική Τριχοειδής Χρωματογραφία, micellar electrokinetic chromatography, MEKC). Αυτή η σημαντική επέκταση των δυνατοτήτων αναπτύχθηκε από τους Terabe, Otsuka, Ichikawa, Tsuchiya, & Ando(1984). Το μικκυλιακό διάλυμα ονομάζεται ψευδοστατική φάση καθώς οι ενώσεις μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ των μικκυλίων και του διαλύματος έξω από τα μικκύλια. Η χρήση διαφορετικών επιφανειοδραστικών (επίσης πτητικών) και άλλων μεθοδολογικών καινοτομιών έχουν κάνει τη MEKC μια ισχυρή τεχνική. Άλλα πρόσθετα που μπορούν να προσφέρουν ειδική

επιλεκτικότητα μέσω μοριακής αλληλεπίδρασης στη CZE είναι π.χ. κυκλοδεξτρίνες για χειρικούς διαχωρισμούς. Ο χειρικός διαχωρισμός φαρμάκων και αμινοξέων είναι ένα από τα κύρια πεδία εφαρμογής της CE. Η κατανάλωση διαλυτών στην CE είναι μικρή καθώς οι ρυθμοί ροής είναι πολύ χαμηλοί (εύρος nL / min) και τα υδατικά ρυθμιστικά χρησιμοποιούνται κυρίως ως ηλεκτρολύτης υποβάθρου (background electrolyte, BGE). Αυτή η τελευταία άποψη σημαίνει ότι η τεχνική είναι βιοσυμβατή και κατάλληλη για την ανάλυση ανέπαφων πρωτεϊνών. Η τριχοειδής ηλεκτροχρωματογραφία (capillary electrochromatography, CEC) με συσκευασμένες και ανοιχτές σωληνοειδείς στήλες έχει επίσης αναπτυχθεί για την ανάλυση φορτισμένων και ουδέτερων ενώσεων. Εδώ, ο διαχωρισμός βασίζεται σε διαφορές στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα και στον διαχωρισμό μεταξύ στατικής και κινητής φάσης. Η κινητή φάση ρέει μέσω της στήλης από τον EOF, που παράγεται από τις ομάδες σιλανόλης της στατικής φάσης. Οι ουδέτεροι αναλυτές κινούνται μέσω της συσκευασμένης στήλης από τον EOF και διαχωρίζονται με διαχωρισμό μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, ενώ οι φορτισμένες αναλυτές προχωρούν μέσω της συσκευασμένης στήλης με την πρόσθετη συμβολή της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των αναλυτών.

Για την ανάλυση πρωτεϊνών μια ειδική πτυχή παίζει σημαντικό ρόλο: Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις προκαλούν προσρόφηση πρωτεΐνης στο τριχοειδές εσωτερικό τοίχωμα λόγω της παρουσίας αρνητικά φορτισμένων σιλανολών. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην ολική κατάρρευση του EOF, καθώς και στην επέκταση της κορυφής ή ακόμη και στην παραμόρφωση της κορυφής. Η τροποποίηση της επιφάνειας του τριχοειδούς τοιχώματος με δυναμική ή μόνιμη επιστρωση είναι μια επιτυχημένη στρατηγική για την αποτροπή αυτών των φαινομένων (Hajba & Guttman, 2017). Δυναμική επικάλυψη του τριχοειδούς με ρυθμιστικό πρόσθετο, όπως υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη (hydroxypropylmethylcellulose, HPMC) ή πολυβρένιο, χρησιμοποιούνται συνήθως για τον χαρακτηρισμό των βιοφαρμακευτικών προϊόντων. Το Σχήμα 1 δείχνει την επίδραση των δυναμικών επικαλύψεων στον διαχωρισμό των πεπτιδίων και την αντιστοιχία μεταξύ των επικαλυμμένων και των αυτο-επικαλυμμένων τριχοειδών (Garza, Chang, & Moini, 2007). Τα πολυμερή προσροφώνται στο τριχοειδές τοίχωμα ελαχιστοποιώντας την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών και σιλανολών, αλλά η επικάλυψη μπορεί να απελευθερωθεί, απαιτώντας βήματα αναγέννησης μεταξύ των

τρεξίματος. Εναλλακτικά, η τροποποίηση του τριχοειδούς τοιχώματος με ομοιοπολική σύνδεση ουδέτερων ή φορτισμένων πολυμερών είναι μια καλή επιλογή. Αν και τα τροποποιημένα τριχοειδή είναι ακόμη διαθέσιμα στο εμπόριο, πολλές διαδικασίες επικάλυψης περιγράφονται στη βιβλιογραφία. Μια επικάλυψη μπορεί επίσης να αυξήσει την επαναληψιμότητα του EOF. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα θετικά φορτισμένα επιχρίσματα αλλάζουν την κατεύθυνση του EOF και η πολικότητα CE πρέπει να αντιστραφεί για να μετακινηθούν οι αναλυτές προς τον ανιχνευτή. Έχουν εφαρμοστεί διάφορες επικαλύψεις για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών αλλά και για την ανάλυση σύνθετων δειγμάτων που περιέχουν μικρές κατιονικές και ανιονικές ενώσεις, όπως στη μεταβολική.

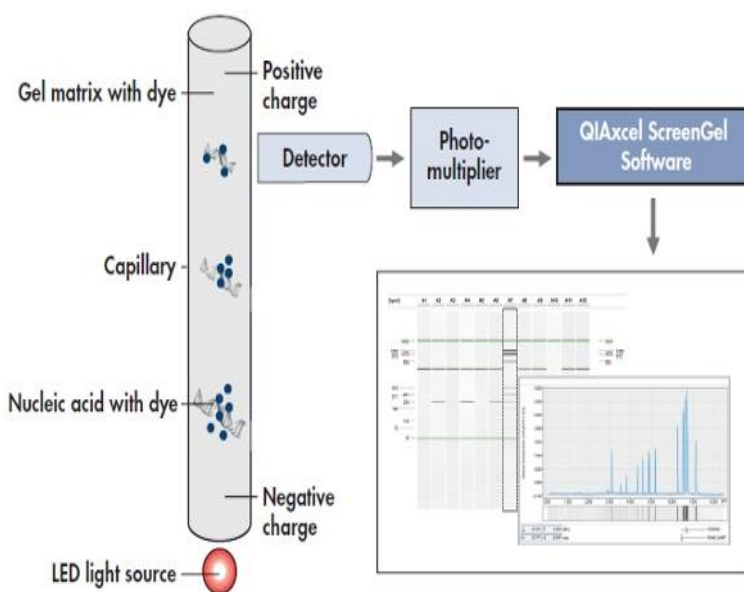


Σχήμα 2 Σύγκριση των αναλύσεων CE-MS του πεπτιδικού προτύπου χρησιμοποιώντας ένα μη επικαλυμμένο τριχοειδές (άνω τμήμα), προ-επικαλυμμένο πολυβρένιο (PB) και PolyE-323 (PE) και αυτο-επικαλυμμένο τριχοειδές χρησιμοποιώντας 33-660nM PB και PE (από την κορυφή προς τα κάτω)(Garza et al., 2007).

Η μικροφόρηση τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (microchip capillary electrophoresis, MCE) είναι μια σημαντική εξέλιξη για τη μικρογραφία των μεθόδων CE (Jacobson, Hergenroder, Koutny, & Ramsey, 1994). Οι ιδιότητες των μικροτσίπ (π.χ. ορθογώνιο κανάλι πλάτους και ύψους περίπου 10–100μm και μήκους 10–100 mm) κάνουν την MCE, ένα σύστημα γρήγορου διαχωρισμού με χρόνους διαχωρισμού <1 λεπτό Η θέρμανση Joule και η ακτινική διασπορά των αναλυτών μειώνονται σε σχέση με τα τριχοειδή με

μεγαλύτερες διαμέτρους. Η μείωση του χρόνου διαχωρισμού μπορεί να κάνει την MCE σε μια νέα προσέγγιση για πολύ γρήγορη και αποτελεσματική ανάλυση. Διάφορα εμπορικά συστήματα είναι διαθέσιμα με ανίχνευση υπεριώδους (ultraviolet, UV). Δυναμική επικάλυψη με HPMC χρησιμοποιείται για ανάλυση ετερογένειας φορτίου μονοκλωνικών αντισωμάτων (monoclonal antibodies, mAbs) (Mohamed Dawod, Arvin, & Kennedy, 2017). Πιο πρόσφατα, οι Ramsey et al. εισήγαγε μια συσκευή MCE-MS βασισμένη σε μια διαδικασία επιφανειακής επικάλυψης με χημική εναπόθεση ενός στρώματος αμινοπροπυλσιλανίου και τροποποίηση με πολυαιθυλενογλυκόλη (Redman, Mellors, Starkey, & Ramsey, 2016). Ο σχεδιασμός και ο διαχωρισμός και ανίχνευση ανέπαφων παραλλαγών mAbs παρουσιάζονται στη συνέχεια.

1.1.3 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση γέλης (CGE)

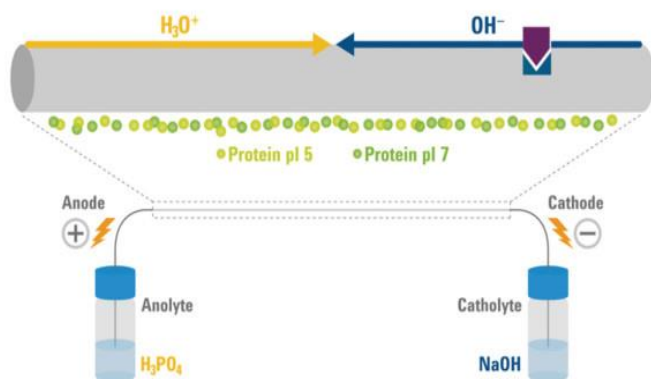


Σχήμα 3 Ηλεκτροφόρηση γέλης.

Η αρχή της CGE είναι ο διαχωρισμός των βιομακρομορίων σε ένα μέσο κοσκινίσματος. Για τις πρωτεΐνες, το δωδεκυλοθειικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS) προστίθεται επίσης στο BGE για να μετουσιωθεί. Η ομοιογένεια φορτίου των συμπλοκών SDS-πρωτεΐνης επιτρέπει τον διαχωρισμό με βάση την υδροδυναμική ακτίνα τους. Η CGE προσαρμόζει την ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) σε μια μικροσκοπική σχεδίαση που μειώνει τα μειονεκτήματα της

SDS-PAGE, όπως μεγάλο χρόνο διαχωρισμού, περιορισμένη αναπαραγωγικότητα και χαμηλή ανάλυση. Το παραδοσιακό πήκτωμα πλάκας έχει αντικατασταθεί από διαλυτά πολυμερή που χρησιμοποιούνται ως αντικαταστάσιμα πηκτώματα επιτρέποντας τον αποτελεσματικό διαχωρισμό θραυσμάτων και πρωτεϊνών δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) (Swerdlow & Gesteland, 1990). Αναπτύχθηκε η αυτοματοποιημένη ηλεκτροφόρηση τριχοειδών συστοιχιών και η απόδοση του δείγματος αυξήθηκε σημαντικά. Η τεχνική είναι πολύ κατάλληλη για το διαχωρισμό θραυσμάτων DNA και διατίθενται εμπορικές συσκευές για προσδιορισμό αλληλουχίας DNA. Η χρήση ενός ανιχνευτή φθορισμού θήκης ροής με παρεμβαλλόμενες βαφές ήταν επίσης ένα σημαντικό βήμα σε αυτόν τον τομέα. Η ταχεία πρόοδος στο Πρόγραμμα Ανθρώπινου Γονιδιώματος επέτρεψε με αυτήν την τεχνική και η διευκρίνιση του πλήρους γενετικού σχεδίου ήταν ένα σημαντικό βήμα στην ιστορία της βιολογίας (Donichi & Zhang, 2000) Στην CGE, το EOF πρέπει συχνά να καταστέλλεται για να διασφαλιστεί ότι ο διαχωρισμός βασίζεται μόνο σε διαφορές στην υδροδυναμική ακτίνα. Έχουν περιγραφεί διάφορες διαδικασίες για ουδέτερες επικαλύψεις για την εξάλειψη του EOF κατά την ανάλυση CGE, χρησιμοποιώντας π.χ. πολυακρυλαμίδιο (polyacrylamide, PAA) υδροξυπροπυλοκυτταρίνη, πολυβινυλική αλκοόλη (polyvinyl alcohol, PVA) και ορισμένοι άλλοι (εμπορικοί) παράγοντες επικάλυψης. Από τα τέλη της δεκαετίας του '80 του προηγούμενου αιώνα, οι μέθοδοι CGE έχουν χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμό και χαρακτηρισμό πρωτεϊνών. Με την ανάπτυξη εμπορικών κιτ κοσκινίσματος, η CGE έχει γίνει μια μέθοδος υψηλής απόδοσης για τον ποιοτικό έλεγχο των βιοφαρμακευτικών προϊόντων και ειδικότερα για την ανάλυση γλυκανών.

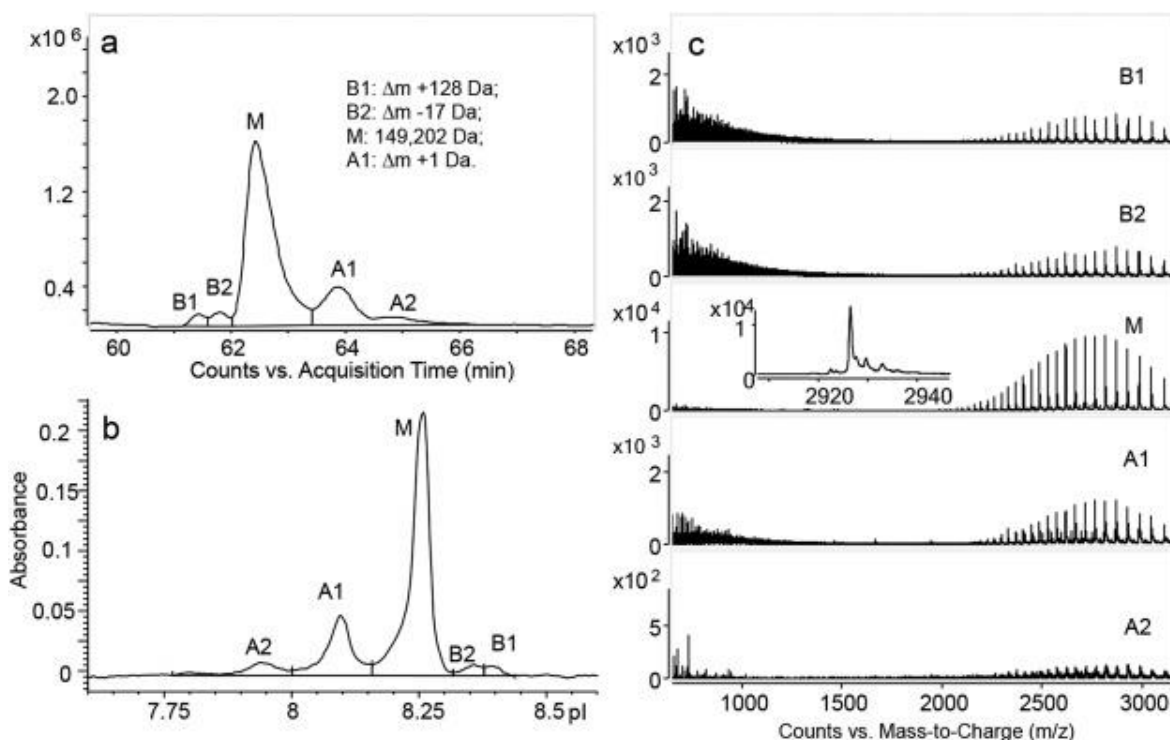
1.1.4 Τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση (CIEF)



Σχήμα 4 Ηλεκτροφόρηση CIEF.

Η CIEF είναι ένας τρόπος διαχωρισμού CE που παρέχει διαχωρισμό πρωτεϊνών υψηλής ανάλυσης σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI) και έχει εφαρμοστεί κυρίως για την ανάλυση της ετερογένειας φορτίου των βιοφαρμακευτικών προϊόντων (Shimura, 2009). Στην CIEF, ένα μείγμα αμφολυτών και δείγματος γεμίζει το τριχοειδές. Ένας βασικός καθολίτης, γενικά υδροξείδιο του νατρίου, τοποθετείται στην κάθοδο και ένας όξινος ανολύτης, π.χ. φωσφορικό οξύ, τοποθετείται στην άνοδο. Λόγω των ιδιοτήτων των αμφολυτών, μια διαβάθμιση pH καθορίζεται στο τριχοειδές υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Οι πρωτεΐνες εστιάζονται μέχρι την περιοχή όπου το pH και το pI της πρωτεΐνης είναι ίσο. Σε αυτό το σημείο, το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης είναι μηδέν και η μετανάστευση σταματά. Στο επόμενο βήμα, τα επιμέρους συστατικά μεταφέρονται στον ανιχνευτή με ηλεκτροφορητική ή υδροδυναμική κινητοποίηση. Η θέση του ανιχνευτή στο τριχοειδές άκρο καθιστά απαραίτητο το βήμα κινητοποίησης, το οποίο μπορεί να προκαλέσει αρνητικά αποτελέσματα στην ανάλυση λόγω πιθανής διεύρυνσης κορυφής. Για να αποφευχθεί αυτό το φαινόμενο, η απεικόνιση πλήρους στήλης CIEF (iCIEF) αναπτύχθηκε για να παρέχει ταχύτερους διαχωρισμούς με υψηλότερη ανάλυση, καλύτερη αναπαραγωγικότητα και μειωμένη κατανάλωση όγκου δείγματος. Η iCIEF χρησιμοποιεί μικρά τριχοειδή (5cm) με ανίχνευση κάμερας CCD και επιτρέπει την παρακολούθηση της διαδικασίας εστίασης. Δεν απαιτείται βήμα κινητοποίησης στην iCIEF για την ανίχνευση των πρωτεϊνών. Όσον αφορά τους τρόπους ανίχνευσης, η ανίχνευση υπεριώδους στα 280nm αντιπροσωπεύει σχεδόν όλες τις εφαρμογές που περιγράφονται μέχρι σήμερα. Για δομικές πληροφορίες, η ανίχνευση MS σε συνδυασμό

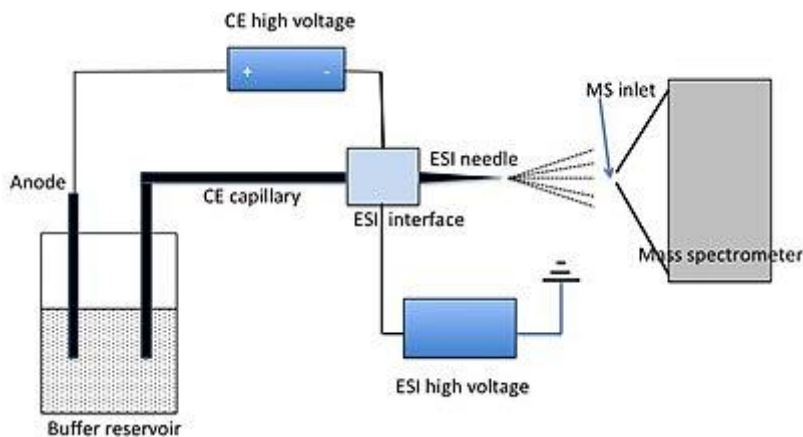
με το CIEF επιτρέπει την αναγνώριση με βάση την τιμή m/z . Ωστόσο, το δυναμικό της σύζευξης CIEF-MS περιορίζεται από την παρουσία αλάτων και αμφολυτών. Ένα πρόσφατο έγγραφο δείχνει τις δυνατότητες του CIEF-MS να χρησιμοποιούν ειδικές συνθήκες για διασύνδεση CIEF και MS. Το Σχήμα 2 δείχνει μια πολλά υποσχόμενη εφαρμογή που περιλαμβάνει τη σύγκριση με την iCIEF-UV. Το διασδιάστατο CE που αποτελείται από CIEF και CE ή CGE αναπτύχθηκε για σύνθετα δείγματα πρωτεϊνών. Οι αμφολύτες αφαιρέθηκαν μετά τον διαχωρισμό της CIEF και βελτιστοποιήθηκαν διάφορες διεπαφές (Dai, Lamp, Xia, & Zhang, 2018). Επί του παρόντος, η CIEF είναι μια μέθοδος αναφοράς για τον χαρακτηρισμό της βιοθεραπευτικής. Παρόμοιο με την CGE, με την ανάπτυξη εμπορικών κιτ και οργάνων, η CIEF έγινε μια σημαντική τεχνική στη βιοφαρμακευτική βιομηχανία.



Σχήμα 5 Ανάλυση Bevacizumab CIEF-MS σε σύγκριση με την iCIEF-UV: A) Εκχύλισμα CIEF-MS ιόντων ηλεκτροπαραγωγής που δείχνει βασικές παραλλαγές B1 και B2, κύρια κορυφή M και όξινες παραλλαγές A1 και A2. B) (ηλεκτροδιάγραμμα iCIEF-UV (γ)) Φάσματα μάζας CIEF-MS σημαντικών παραλλαγών. Το ένθετο στο μέρος Γ είναι η εκτεταμένη όψη της κύριας κορυφής στο φάσμα μάζας (Dai et al., 2018).

1.1.5 CE-MS (Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry)

Η σύζευξη των CE και MS είναι απαραίτητη για τη λήψη συμπληρωματικής τεχνικής για το LC-MS. Το CE-MS παρέχει διαχωρισμό υψηλής ανάλυσης υπό περισσότερες φυσιολογικές συνθήκες, λεπτομερείς δομικές πληροφορίες και χαμηλότερα όρια ανίχνευσης σε σύγκριση με την υπεριώδη ακτινοβολία. Για να χρησιμοποιήσετε πλήρως το συνδυασμένο δυναμικό, είναι σημαντικό να έχετε πρόσβαση σε ισχυρές διεπαφές CE-MS. Ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI) χρησιμοποιείται συχνότερα για τη διασύνδεση τεχνικών διαχωρισμού με βάση υγρά με MS (Yamashita & Fenn, 1984). Διασφαλίζει αποτελεσματικά ότι τα διαλυμένα μόρια μπορούν να εισέλθουν στον αναλυτή MS ως ιόντα αέριας φάσης. Ωστόσο, για το CE, η σύζευξη δεν είναι τόσο απλή, καθώς δεν υπάρχει φιαλίδιο εξόδου ούτε ηλεκτρόδιο στην τριχοειδή έξοδο για κλείσιμο του ηλεκτρικού κυκλώματος. Επιπλέον, τα ξεχωριστά ηλεκτρικά κυκλώματα των CE και MS δεν συνδυάζονται εύκολα καθώς τα ρεύματα που χρησιμοποιούνται στο CE είναι πολύ υψηλότερα από αυτά που συναντώνται στο ESI. Επιπλέον, η χαμηλή ροή υγρού στο CE, που κυμαίνεται από μηδέν έως υπο-μL / min, εμποδίζει τον σταθερό σχηματισμό ηλεκτροψεκασμού.

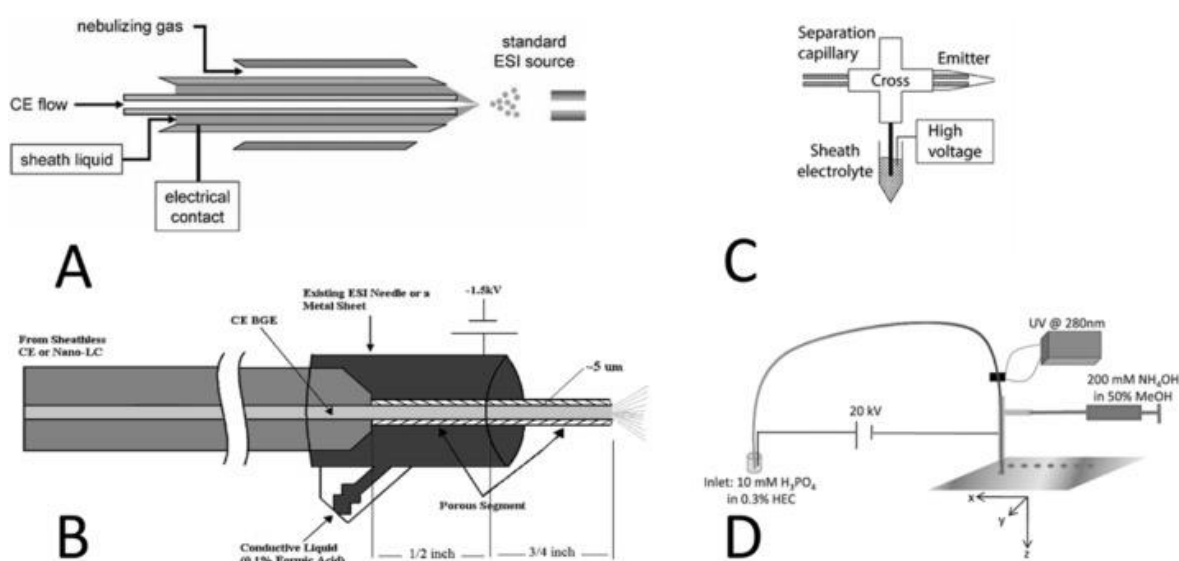


Σχήμα 6 Μέθοδος ηλεκτροφόρησης φασματομετρίας μάζας.

1.1.4.1 Υγρή διεπαφή με θήκη

Τα CE και MS συνδέθηκαν επιτυχώς συνδέοντας την έξοδο του τριχοειδούς με βελόνα ESI από ανοξείδωτο χάλυβα, χρησιμοποιώντας το τόσο ως έξοδο τριχοειδούς όσο και ως ηλεκτρόδιο εκπομπής ESI. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιήθηκε άμεση ηλεκτρική επαφή με την εκρέουσα CE. Αυτή η προσέγγιση αναπτύχθηκε περαιτέρω αυξάνοντας τον

ρυθμό ροής του ψεκασμένου υγρού με μια συν-αξονική διεπαφή υγρού θήκης (co-axial sheath-liquid, SL), εξασφαλίζοντας έτσι έναν πιο αποτελεσματικό ηλεκτροψεκασμό (Σχήμα 3A) (Smith, Barinaga, & Udseth, 1988). Σε αυτήν την εγκατάσταση, ένα κανονικό τριχοειδές CE περιλαμβανόταν από ένα αγωγίμο SL που δημιουργούσε ηλεκτρική επαφή μεταξύ του μεταλλικού ψεκαστήρα και του BGE στο άκρο του ψεκαστήρα. Η SL λειτούργησε ως φιαλίδιο εξόδου και παρείχε ηλεκτρική επαφή στην τριχοειδή έξοδο για να εξασφαλίσει μια σταθερή και ανεξάρτητη ροή CE. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκε ο ηλεκτροψεκασμός απευθείας στην τριχοειδή έξοδο.



Σχήμα 7 Κοινές διεπαφές για CE-MS. (A) διεπαφή συν-αξονικού υγρού ESI θήκης, (B) διεπαφή ESI χωρίς θήκη, (C) διεπαφή ESI μικροσκοπικής διασταύρωσης υγρού και (D) διασύνδεση υγρού θήκης με MALDI (Smith et al., 1988).

Το υλικό της βελόνας ψεκασμού έχει σημαντική επίδραση στη μέτρηση, ειδικά στο σήμα ανιόντων. Οι βελόνες από ανοξείδωτο χάλυβα μπορούν να οξειδωθούν και να διαβρωθούν όταν χρησιμοποιούν αντίστροφη πολικότητα CE λόγω ηλεκτρόλυσης και οι ανιονικές ενώσεις μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με τα οξείδια του σιδήρου, μειώνοντας την ένταση ανίχνευσης. Η εφαρμογή των βελόνων ESI πλατίνας, ωστόσο, απέτρεψε την οξείδωση και τη διάβρωση της βελόνας. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα το όριο βελτιώσεων ανίχνευσης έως 63 φορές για ανιόντα, καλύτερη αναπαραγωγιμότητα και

βελτιωμένη διάρκεια ζωής τριχοειδών, σε σύγκριση με μια βελόνα από ανοξείδωτο χάλυβα (Soga et al., 2009). Ένας άλλος τρόπος για να παρακάμψετε το πρόβλημα με την οξείδωση και τη διάβρωση της ανοξείδωτης βελόνας ESI είναι να αναλύσετε ανιονικές ενώσεις σε κανονική κατάσταση πολικότητας CE σε συνθήκες διαχωρισμού υψηλού pH.

Η διεπαφή SL χρησιμοποιείται συχνά με όργανα MS που χρησιμοποιούν γειωμένη βελόνα ψεκαστήρα, παρέχοντας την τάση ESI από την είσοδο MS και διασφαλίζοντας δύο ξεχωριστές και ρυθμιζόμενες ροές ρεύματος για CE και MS. Αυτό επιτρέπει την ανεξάρτητη βελτιστοποίηση της σύνθεσης BGE και της SL. Το υγρό που χρησιμοποιείται στη συν-αξονική διεπαφή SL αποτελείται συνήθως από ένα μείγμα πτητικών οργανικών διαλυτών και νερού με πτητικά όξινα ή αλκαλικά πρόσθετα για τη διευκόλυνση του σχηματισμού ιόντων. Τα πρόσθετα στο SL ωστόσο, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για να διευκολύνουν τις χημικές αντιδράσεις κατά την ανάμιξη των τριχοειδών εκροών.

Αυτή η ιδέα χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη πρόσθετων δομικών πληροφοριών στην ανάλυση φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιώντας σταθερές ελεύθερες ρίζες, και στον προσδιορισμό του αριθμού των ανταλλάξιμων υδρογόνων σε αναλύτες με την προσθήκη δευτεριωμένων διαλυτών στο SL. Οι ροές SL είναι συνήθως αρκετά $\mu\text{L} / \text{min}$ για να διασφαλιστεί ένας σταθερός ψεκασμός. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αραιώση των εκροών CE, ανάλογα με τον ρυθμό EOF, και συνεπώς χαμηλότερη ένταση σήματος.

Επιπλέον, οι επιδράσεις αναρρόφησης που προκαλούνται από τη ροή υγρού θήκης μπορούν να προκαλέσουν μια στρωτή ροή μέσα στο τριχοειδές CE που έχει ως αποτέλεσμα τη διεύρυνση της ζώνης εάν η πίεση δεν αντισταθμιστεί μέσω του φιαλιδίου εισόδου. Από την άλλη πλευρά, μη πτητικά πρόσθετα BGE που παρέχουν αποτελεσματικό διαχωρισμό αλλά είναι καταρχήν μη συμβατά με MS μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε χαμηλές ποσότητες χωρίς να προκαλέσουν υπερβολική καταστολή ιόντων. Μη πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα εφαρμόστηκαν στο BGE για ανάλυση πρωτεΐνης με CE-ESI-MS (do Lago, Vidal, Francisco, & dos Santos, 2014). Το φωσφορικό νάτριο καταστέλλει έντονα τον ιονισμό, αλλά 25mM βορικού αμμωνίου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί χωρίς να διακυβεύεται η ένταση του σήματος. Το φωσφορικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των αντισταμινικών, εφαρμόζοντας το στο BGE και το SL σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Παρατηρήθηκε ελάχιστη καταστολή ιόντων χρησιμοποιώντας μια διεπαφή με χαμηλή ροή SL και πραγματοποιώντας την ανάλυση

υπό όξινες συνθήκες για να διασφαλιστεί η κινητικότητα των φωσφορικών ιόντων προς την τριχοειδή είσοδο. Για την ανάλυση των ναρκωτικών κατάχρησης, η εφαρμογή φωσφορικού αμμωνίου στο BGE έδειξε επίσης υψηλές επιδόσεις ιονισμού και καλή ανάλυση. Αντίθετα, το τρις(υδροξυμεθυλ) αμινομεθάνιο και το βορικό άλας ως συστατικά BGE, δεν μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην περίπτωση αυτή λόγω σοβαρής καταστολής ιόντων (Gottardo et al., 2012). Προφανώς, χαμηλές συγκεντρώσεις μη πτητικών ρυθμιστικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν με διεπαφές SL, αλλά η δυνατότητα εφαρμογής μπορεί να εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά αναλύτη και τη σύνθεση SL.

Η διεπαφή SL έχει εφαρμοστεί ευρέως και έχει αποδειχθεί ότι είναι πολύ στιβαρή και ως εκ τούτου θεωρείται το πρότυπο για το CE-MS. Πρόσφατες προσαρμογές στο άκρο ψεκαστήρα SL, σε συνδυασμό με τροποποιήσεις πηγής ESI και θέσης ψεκαστήρα, ακόμη και βελτιωμένη ποιότητα ψεκασμού, αποτελεσματικότητα ιονισμού και ένταση σήματος. Αναμένεται επομένως ότι αυτή η διεπαφή θα συνεχίσει να χρησιμοποιείται εκτενώς.

Η διεπαφή SL ήταν πρόσφατα μικροσκοπική για να εργαστεί στην περιοχή νανοροής για να βελτιώσει περαιτέρω την απόδοση ιονισμού, διατηρώντας παράλληλα τα οφέλη της SL. Σε αυτή τη ρύθμιση, το τριχοειδές άκρο περικλείονταν από μια λεπτή γειωμένη μεταλλική βελόνα. Το SL αντλήθηκε μέσω της βελόνας με ρυθμό ροής 1μL / λεπτό χρησιμοποιώντας σύνδεση T και έφτασε σε επαφή με την εκρέουσα CE στο τριχοειδές άκρο. Λόγω του χαμηλότερου ρυθμού ροής SL σε αυτή τη ρύθμιση, δεν απαιτείται αέριο νεφελοποίησης για αποτελεσματικό ESI, το οποίο εξάλειψε το αποτέλεσμα αναρρόφησης. Για να βελτιωθεί η σταθερότητα αυτής της διεπαφής, η εξωτερική διάμετρος του τριχοειδούς διαχωρισμού και η εσωτερική διάμετρος της βελόνας μειώθηκαν περαιτέρω, επιτρέποντας ρυθμούς ροής SL 300nL / min. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα ένα μικρότερο κώνο Taylor και ελαχιστοποίησε τη μέγιστη διεύρυνση με τη διαδικασία ESI. Λήφθηκε καλύτερη απόδοση διαχωρισμού με αυτή τη ρύθμιση, διατηρώντας παράλληλα συγκρίσιμα όρια ανίχνευσης όπως με τη συμβατική διασύνδεση SL (González-Ruiz, Codesido, Far, Rudaz, & Schappler, 2016).

1.1.4.2 Διεπαφή χωρίς θήκη

Για να αποφευχθεί τελείως η αραίωση του εκρέοντος CE χρησιμοποιήθηκε μια θήκη χωρίς πορώδη άκρη (Σχήμα 3B). Το άκρο του τριχοειδούς CE χαράχθηκε με υδροφθορικό οξύ για να ληφθεί ένα πορώδες τριχοειδές άκρο για να παρέχει μια δίοδο για ιόντα και ηλεκτρόνια. Το τριχοειδές άκρο περικλείονταν από έναν μεταλλικό κύλινδρο που δρούσε ως φιαλίδιο εξόδου και ηλεκτρόδιο. Με αυτόν τον τρόπο το BGE μέσα στο τριχοειδές ήταν σε επαφή με το BGE που περιβάλλει το εξωτερικό του τριχοειδούς. Το άκρο του τριχοειδούς προεξέχει ελαφρώς από τον μεταλλικό κύλινδρο και λειτούργησε ως άκρο ψεκαστήρα.

Επιτεύχθηκαν σχετικές τυπικές αποκλίσεις 1-3% για την επαναληψιμότητα του χρόνου μετανάστευσης και ελήφθη ένα σταθερό και πιο αποτελεσματικό ESI, το οποίο είχε ως αποτέλεσμα μια βελτίωση 5 έως 140 φορές του ορίου ανίχνευσης για πρωτεΐνες και 8 έως 30 φορές για επιλεγμένους μεταβολίτες, σε σύγκριση με τη διεπαφή SL (Yin, Li, Guan, & Huang, 2016).

Η διεπαφή χωρίς θήκη είναι καθολική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με όλους τους τύπους οργάνων ESI-MS, ανεξάρτητα από το ηλεκτρικό κύκλωμα του MS. Αν και απαιτούνται ειδικά επεξεργασμένα και σχετικά ακριβά τριχοειδή για αυτήν την εμπορική διεπαφή, η οποία μπορεί να ληφθεί μόνο από τον κατασκευαστή. Επιπλέον, απαιτείται μια συσκευή CE από τον ίδιο κατασκευαστή και, επομένως, είναι δύσκολο να προβλεφθεί εάν αυτή η διεπαφή θα λάβει ευρεία προσοχή.

1.1.4.3 Διεπαφή υγρής σύνδεσης

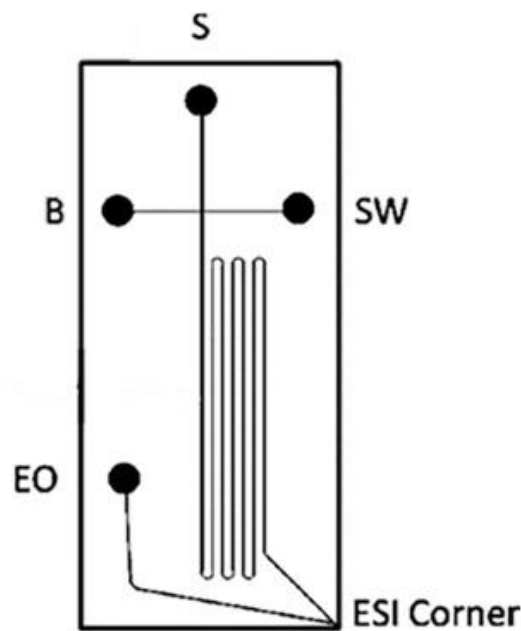
Η υγρή σύνδεση είναι ένας τρίτος, κοινός τύπος διεπαφής που χρησιμοποιεί, όπως η διασύνδεση SL, την αρχή της ανάμιξης των εκροών CE με έναν ηλεκτρολύτη εξόδου που συνδέεται με ένα ηλεκτρόδιο γείωσης. Ο ηλεκτρολύτης προστίθεται μέσω σύνδεσης T με το εκρέον CE πριν από το ESI και συνήθως έχει την ίδια σύνθεση με τα υγρά που χρησιμοποιούνται σε διεπαφές SL. Το εκρέον CE και ο ηλεκτρολύτης εξόδου συνδυάζονται μεταξύ του εκπομπού MS και του τριχοειδούς άκρου CE. Αυτό προκαλεί μέγιστη διεύρυνση και επομένως χαμηλότερη ανάλυση. Επιπλέον, οι αναλυτές εξακολουθούν να αραιώνονται, όπως και με τη διασύνδεση SL, και συνεπώς θέτουν σε

κίνδυνο την ένταση. Από την άλλη πλευρά, η διασύνδεση υγρού είναι καθολικά εφαρμόσιμη και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί με όργανα MS με δυναμικό ESI στο άκρο του ψεκαστήρα.

Η προσέγγιση υγρής-διασταύρωσης έχει χρησιμοποιηθεί σε μια μικροσκοπική συσκευή χρησιμοποιώντας ένα μικροβιακό ροής για το συνδυασμό εκρών CE και εξόδου ηλεκτρολύτη. Αυτή η διεπαφή νανοροής ESI χρησιμοποίησε κοίλη βελόνα από ανοξείδωτο χάλυβα με ασύμμετρη γεωμετρία (Maxwell, Zhong, Zhang, Van Zeijl, & Chen, 2010). Η βελόνα έκλεισε το τριχοειδές CE και δρούσε ως ηλεκτρόδιο εξόδου και φιαλίδιο, μέσω των οποίων αντλήθηκε ο ηλεκτρολύτης εξόδου. Το εξωτερικό άκρο της βελόνας λειτούργησε ως εκπομπός ηλεκτροψεκασμού. Ένας ρυθμός ροής ηλεκτρολύτη $\geq 100 \text{ nL / min}$ μέσω της βελόνας εξασφάλισε ελάχιστη αραίωση εκροής CE χρησιμοποιώντας τριχοειδή κανονικού μεγέθους. Αυτή η προσέγγιση εφαρμόστηκε επίσης για τη διασύνδεση του cIEF-ESI-MS παρέχοντας λύσεις καθολύτη και κινητοποίησης μέσω του μικροβιακού. Πρόσφατα, αναπτύχθηκε μια παρόμοια μικροσκοπική διασύνδεση υγρού-διασταύρωσης, αλλά χρησιμοποιώντας έναν ηλεκτρολυτικά αντλούμενο ηλεκτρολύτη εξόδου και έναν πομπό βοριοπυριτικού γυαλιού (Σχήμα 3C). Ο πομπός είχε ένα άκρο διαμέτρου 15–35- μm και μια απόσταση 20- μm μεταξύ του τριχοειδούς διαχωρισμού και του άκρου του πομπού. Αυτή η γεωμετρία είχε ως αποτέλεσμα ένα EOF περίπου 50 nL / min στον πομπό, ενώ το EOF στο τριχοειδές CE ήταν περίπου 20 nL / min, με αποτέλεσμα την ελάχιστη αραίωση των εκρών CE πριν από την ανάλυση MS, σε σύγκριση με το SL και την κανονική σύνδεση υγρού διεπαφές (Zhong, Maxwell, Ratnayake, Mack, & Chen, 2011). Με αυτήν τη διεπαφή υγρού διασταύρωσης ESI νανοροής, επιτεύχθηκε περίπου 20 φορές βελτίωση για τα όρια ανίχνευσης, σε σύγκριση με τις κανονικές διεπαφές SL. Η διεπαφή κυκλοφόρησε πρόσφατα στο εμπόριο και επομένως αναμένεται ότι η εφαρμογή της θα αυξηθεί σημαντικά στο μέλλον. Λαμβάνοντας υπόψη την ευρεία δυνατότητα εφαρμογής, όσον αφορά την επιλογή των τριχοειδών CE και των οργάνων CE-MS, σε συνδυασμό με τη βελτίωση της έντασης του σήματος, η μικροσκοπική διασύνδεση υγρού-διασταύρωσης θα μπορούσε κάλλιστα να γίνει ένα πιθανό νέο πρότυπο στη διασύνδεση CE-MS.

Οι συσκευές MCE έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μικρογραφία συστημάτων CE. Επιτρέπει αναλύσεις υψηλής ταχύτητας, δυνατότητα συνδυασμού διαφορετικών τρόπων

διαχωρισμού CE και ενσωμάτωση ESI σε μία συσκευή. Πρόσφατα καταδείχθηκε μια ολοκληρωμένη συσκευή μικρο-ρευστού CE-ESI, σε συνδυασμό με την ανίχνευση MS (Σχήμα 4) (Batz, Mellors, Alarie, & Ramsey, 2014). Η συσκευή ενσωμάτωσε, εκτός από το τμήμα CE, μια ενσωματωμένη εκπομπή ESI και ηλεκτροοσμωτική αντλία που βοηθά το ESI. Οι διασταυρώσεις μεταξύ μεμονωμένων συστατικών απουσίαζαν και επομένως δεν υπήρχαν νεκροί τόμοι. Αυτό το CE-ESI εμπορευματοποιήθηκε και εφαρμόστηκε με επιτυχία στην ανάλυση των βιομορίων.



Σχήμα 8 Συσκευή MCE-ESI. S = δεξαμενή δείγματος; B = δεξαμενή BGE; ΝΔ: δεξαμενή αποβλήτων δείγματος EO: δεξαμενή ηλεκτροοσμωτικής αντλίας (Batz et al., 2014).

1.1.5 Σύστημα CE-MALDI MS (matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry)

Η CE μπορεί επίσης να συζευχθεί έμμεσα με την προσρόφηση / ιονισμό λέιζερ με υποβοήθηση μήτρας (matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI) -MS, η οποία είναι λιγότερο επιρρεπής σε καταστολή ιόντων από μη πτητικά πρόσθετα BGE σε σύγκριση με το ESI. Τόσο ο διαχωρισμός CE όσο και η ανίχνευση MS μπορούν να βελτιστοποιηθούν χωρίς συμβιβασμούς μεταξύ τους, καθώς τα όργανα δεν συνδέονται άμεσα. Η διασύνδεση SL χρησιμοποιείται πιο συχνά για το CE-MALDI-MS (Silvertand, Toraño, de Jong, & van Bennekom, 2009) σε συνδυασμό με μια συσκευή εντοπισμού για την κατάθεση αναλυτών σε μια πλάκα στόχου MALDI (Σχήμα 3D). Ο πίνακας MALDI μπορεί να προστεθεί μέσω του SL πριν ή μετά από τη δειγματοληψία. Σε μια άλλη προσέγγιση, η διασύνδεση χωρίς υγρά χρησιμοποιήθηκε με ένα ασημένιο άκρο για σύνδεση με τη γείωση. Σταγονίδια διαλύματος προ-τοποθετήθηκαν στην πλάκα MALDI για λήψη των αναλυτών κατά την επαφή με το τριχοειδές. Λήφθηκε μια θήκη χωρίς θέρμανση με σύζευξη της CE και ενός ξεχωριστού τριχοειδούς κηλίδας μέσω ενός πορώδους πολυμερούς. Αυτό παρείχε ένα πέρασμα για ιόντα και ηλεκτρόνια. Η πορώδης ένωση περικλείονταν από μια δεξαμενή που περιείχε την έξοδο BGE για να εξασφαλιστεί ένα κλειστό ηλεκτρικό κύκλωμα. Το MALDI είναι πιο ανθεκτικό στα μη πτητικά πρόσθετα από το ESI και μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί με λειτουργίες CE που είναι λιγότερο συμβατές με το ESI-MS. Η ανάλυση των πρωτεϊνών με cIEF-MALDI-MS για παράδειγμα, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί παρουσία αμφολυτών και ουσιών που αυξάνουν το ιζώδες, χρησιμοποιώντας μια διασύνδεση SL που παρείχε το διάλυμα καθολύτη. Ένα μεγάλο μειονέκτημα του CE-MALDI, ωστόσο, είναι η απώλεια ανάλυσης μετά την εναπόθεση. Επομένως, αυτός ο συνδυασμός χρησιμοποιείται κυρίως για την αναγνώριση των κορυφών. Λαμβάνοντας υπόψη τις πολλές εξελίξεις στα όργανα ESI-MS και τις διεπαφές CE-ESI-MS και τις λίγες νέες εξελίξεις στο CE-MALDI-MS, η χρήση του τελευταίου είναι πιθανό να μειωθεί γρήγορα.

Οι πρόσφατες εξελίξεις στη σύζευξη CE-MS επικεντρώνονται στη μικρογραφία χρησιμοποιώντας διεπαφές ESI νανοροής που παρέχουν την ελάχιστη δυνατή αραιώση των εκρών CE και του πιο αποτελεσματικού ιονισμού (Krenkova, Kleparnik, Grym,

Luksch, & Foret, 2016). Η εφαρμογή μη πτητικών συστατικών BGE, ωστόσο, είναι πιο περιορισμένη με αυτές τις διεπαφές και ο διαχωρισμός CE συχνά πρέπει να πραγματοποιείται σε χαμηλότερα ρεύματα, μειώνοντας την ελευθερία στην επιλογή συστατικών και συγκεντρώσεων του BGE. Από την άλλη πλευρά, είναι η προσδοκία ότι οι διασυνδέσεις μικροσκοπικής διασταύρωσης υγρού θα γίνουν πιο σημαντικές στο μέλλον, καθώς επιτρέπουν τη μέτρηση χαμηλότερων επιπέδων συγκέντρωσης και τη χρήση τριχοειδών τακτικών διαχωρισμού.

Κεφάλαιο 2

Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε περιβάλλον ποιοτικού ελέγχου

Οι πρωτεΐνες έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διατήρηση του ανθρώπινου σώματος και, μαζί με τους υδατάνθρακες και τα λιπίδια, είναι η ενέργεια που παρέχουν τα θρεπτικά συστατικά από τη διατροφή. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες θέτουν ένα ευρύ φάσμα άλλων λειτουργιών στο σώμα, όπως η ενζυματική δραστηριότητα και η μεταφορά θρεπτικών ουσιών και άλλων βιοχημικών ενώσεων σε κυτταρικές μεμβράνες (Mæhre, Dalheim, Edvinsen, Elvevoll, & Jensen, 2018). Προκειμένου να διατηρηθούν αυτές οι σημαντικές λειτουργίες, είναι απαραίτητο να παρέχουμε στον οργανισμό καλής ποιότητας πρωτεΐνες μέσω της διατροφής. Η ανεπαρκής πρόσληψη πρωτεϊνών που περιέχουν απαραίτητα αμινοξέα οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη, απώλεια μυϊκής μάζας και μειωμένη ορμονική και ενζυματική δραστηριότητα. Όντας τόσο σημαντικά συστατικά της ανθρώπινης διατροφής, είναι σημαντικό να προσδιορίζονται οι πρωτεΐνες στα λειτουργικά προϊόντα/συστήματα και συνεπώς είναι σημαντικό να αναπτύσσονται αξιόπιστες αναλυτικές μέθοδοι (Angell, Mata, de Nys, & Paul, 2016).

Η ανάλυση των πρωτεϊνών δεν είναι απαραίτητα μια απλή διαδικασία. Αυτό οφείλεται εν μέρει στα συστήματα/μήτρα (πχ. τρόφιμα) που τις περιέχουν και είναι ετερογενή υλικά, αποτελούμενα από μια σειρά διαφορετικών θρεπτικών ουσιών, όπως λιπίδια, υδατάνθρακες και ποικιλία μικροθρεπτικών συστατικών. Η σύσταση, η δομή της μήτρας και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων θρεπτικών ουσιών μπορεί να μειώσουν την εκχυλισσιμότητα των πρωτεϊνών οδηγώντας σε υποεκτίμηση της περιεκτικότητάς τους. Επιπλέον, διαφορετικές μέθοδοι βασίζονται σε διαφορετικές αναλυτικές αρχές, προσδιορίζοντας την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες είτε άμεσα είτε έμμεσα (He et al., 2019). Ο άμεσος προσδιορισμός πρωτεϊνών είναι όταν η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες υπολογίζεται με βάση την ανάλυση των υπολειμμάτων αμινοξέων. Ο έμμεσος προσδιορισμός πρωτεΐνης μπορεί για παράδειγμα να προκύψει μετά τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε άζωτο ή μετά από χημικές αντιδράσεις με λειτουργικές ομάδες εντός της πρωτεΐνης. Ένας επιπλέον παράγοντας που μπορεί να συμβάλει σε ανακρίβειες στον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες είναι η εκχύλιση πρωτεϊνών.

Ορισμένες μέθοδοι απαιτούν κάποιο βαθμό εκχύλισης πρωτεΐνης πριν από την ανάλυση και έτσι, οι αποδόσεις εκχύλισης μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα (Sastre Toraño, Ramautar, & de Jong, 2019).

Οι τυπικές μέθοδοι προσδιορισμού της συνολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης, η μέθοδος Kjeldahl, η αντίδραση διουρίας (Biuret), η φασματοφωτομετρία UV-VIS (υπεριώδης-ορατή), η δέσμευση χρωστικών CBB G-250 (δοκιμή Bradford), η μέθοδος Lowry και η μέθοδος βικινχονινικού οξέος (BCA) (Sapan & Lundblad, 2015). Επιπρόσθετες μέθοδοι προσδιορισμού, όπως η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών είναι απαραίτητες για την ποσοτικοποίηση μίας πρωτεΐνης μικρής συγκέντρωσης ή για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων χημικών ενώσεων (M Dawod, Arvin, & Kennedy, 2017).

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης αποτελεί μία ευρύτατα διαδεδομένη μέθοδο που εφαρμόζεται για τον διαχωρισμό των διαφορετικών πρωτεϊνών που μπορεί να συνυπάρχουν σε μία μήτρα (δείγμα), για την ανίχνευση ανεπιθύμητων προσμίξεων καθώς και για τον έλεγχο της καθαρότητας των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών μπορεί να εφαρμοστεί ως προ-επεξεργασία του δείγματος για την περαιτέρω μελέτη των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της ανοσοχημικής τους ταυτοποίησης μέσω της εφαρμογής της ανοσοαποτύπωσης (Huck & Bonn, 2008).

Μετά από μια δεκαετία ανάπτυξης και βελτίωσης, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) των πρωτεϊνών έχει μετακινηθεί πέρα από το εργαστήριο Έρευνας και Ανάπτυξης στο εργαστήριο ελέγχου ποιότητας (quality control laboratory, QCL). Οι μέθοδοι της CE ιστορικά είχαν χαμηλή αποδοχή σε ένα περιβάλλον QCL επειδή οι απαιτήσεις αποδοτικότητας από πλευράς κόστους ήταν αρκετά υψηλές. Τώρα που η CE έχει κερδίσει θέση, το QCL έχει αποδεχθεί τα πλεονεκτήματά της έναντι των παραδοσιακών τεχνολογιών, όπως η ηλεκτροφόρηση πηκτής δωδεκυλθειικού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου (sodium dodecylsulfate-polyacrylamidegelectrophoresis, SDS-PAGE). Αρκετές εταιρείες ανέφεραν την εφαρμογή της CE για την ανάπτυξη ή απελευθέρωση παρτίδας που αφορούν τα βιοφαρμακευτικά προϊόντα τους. Η CE είχε θεμελιώδη θετική επίδραση σε πρωτεϊνικά προϊόντα όπως το Inerfergen® (Amgen), το Enbrel® (ImmuneX) και το Synagis® (MedImmune). Επιπλέον, η Genentech ανέφερε τη χρήση της CE για πολλά από τα θεραπευτικά της αντισώματα. Σήμερα, η CE μπορεί να

θεωρηθεί «συνηθισμένο εργαλείο ανάλυσης στη φαρμακευτική επιστήμη» (Wätzig, Degenhardt, & Kunkel, 1998).

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στο σχεδιασμό και τη μηχανική των οργάνων της CE. Οι βελτιώσεις στα συστήματα ψύξης και στον έλεγχο της τάσης και η εισαγωγή οργάνων που έχουν σχεδιαστεί για να συντηρούνται ευκολότερα ήταν ιδιαίτερα σημαντικές για την ανάλυση των πρωτεϊνών λόγω της ευαισθησίας αυτών των αναλυτών στο περιβάλλον τους.

Επιπλέον, η προσθήκη ισχυρότερου λογισμικού και ευελιξίας σε τρόπους διαχωρισμού αύξησε τη χρησιμότητα των οργάνων. Οι αντίστοιχες εξελίξεις στα τριχοειδή και τα ρυθμιστικά διαλύματα πηκτής αντικατοπτρίζουν την πρόοδο στα όργανα. Η διακύμανση μεταξύ παρτίδων αυτών των συστατικών έχει μειωθεί σημαντικά και τα αποτελέσματα ήταν εμφανή. Για παράδειγμα, οι Schenerman και Bowen ανέφεραν το συντελεστή διακύμανσης (% CV) να ισούται με μόλις 1,2% και η επαναληψιμότητα με 0,15% (Schenerman & Bowen, 2001). Οι Hunt και Nashabeh ανέφεραν συνολική επαναληψιμότητα ακρίβειας και ενδιάμεση ακρίβεια (RSD) 0,9% για τον προσδιορισμό των θεραπευτικών πρωτεϊνών τους (Hunt & Nashabeh, 1999).

Η ανάλυση γέλης με βάση το SDS (CE-SDS) είναι η πιο κοινή εφαρμογή της CE για φαρμακευτικά προϊόντα πρωτεΐνης. Η ανάπτυξη της μεθόδου είναι απλή και η ίδια η μέθοδος μπορεί να είναι αρκετά ακριβής. Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής έναντι των παραδοσιακών εφαρμογών SDS-PAGE σε περιβάλλον QCL είναι σημαντικά. Η χρώση δεν είναι απαραίτητη (δηλαδή, ανίχνευση στηλών), η οποία επιτρέπει σημαντική εξοικονόμηση χρόνου.

Παρατηρούνται σημαντικές βελτιώσεις στη γραμμικότητα, με υψηλούς συντελεστές συσχέτισης μεγαλύτερους από 0,998 για τις μεθόδους CE. Η τεχνική παρέχει ανώτερη ακρίβεια καθώς έχουν επιτευχθεί εξαιρετικές ανακτήσεις για μεθόδους CE-SDS που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (M Dawod et al., 2017). Οι άμεσες συγκρίσεις των CE-SDS και SDS-PAGE καταδεικνύουν σημαντική μείωση της μεταβλητότητας στην προηγούμενη μέθοδο. Η οργάνωση έχει γίνει πιο αυτοματοποιημένη, διευκολύνοντας την εύκολη ένταξη στο σύγχρονο φαρμακευτικό εργαστήριο. Τέλος, η CE έχει λογισμικό που είναι εύκολα επικυρώσιμο σύμφωνα με τον 21^ο Κώδικα Ομοσπονδιακών Κανονισμών, Μέρος

11. Εταιρείες οργάνων όπως η Beckman και η Agilent έχουν δημιουργήσει συστήματα λογισμικού που μπορούν να ανταποκριθούν στις προσδοκίες του FDA. Τα δεδομένα επικύρωσης που αναφέρθηκαν για τις μεθόδους CE-SDS είναι σε θέση να παραμείνουν στη δική τους αξία αλλά εμφανίζονται ιδιαίτερα ενδιαφέροντα σε σύγκριση με τις μεθόδους SDS-PAGE. Πρόσθετες στρατηγικές για την ανάπτυξη μεθόδων και την επικύρωση των μεθόδων CE έχουν αναθεωρηθεί (Wätzig et al., 1998).

Η ανάπτυξη και επικύρωση μιας τυπικής μεθόδου καθαρότητας για την ανασυνδυασμένη καρβοξυπεπτιδάση Β, που περιγράφεται στη συνέχεια, καταδεικνύει το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για τον καθορισμό μιας μεθόδου CE κατάλληλης για χρήση σε ένα QCL.

2.1 Υλικά

1. Σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Beckman, P / ACE MDQ System),
2. Αναδευτήρας vortex,
3. Πιπέτες μπορούν να διανέμουν με ακρίβεια 10 έως 5000 μL ,
4. Επωαστήρας ξηρού λουτρού (π.χ. Fisher),
5. Σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης πολυπροπυλενίου,
6. Φασματοφωτόμετρο,
7. Καθαρισμένο νερό,
8. Σύριγγες μίας χρήσης 5,0 mL,
9. Φίλτρα σύριγγας με χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες 0,20- μm ,
10. 100- μm id τριχοειδές, επικαλυμμένο με SDS, 65 cm, cat,
11. Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος SDS (Beckman),
12. SDSgelρυθμιστικό διάλυμα (Beckman),
13. Κενόκιτκασέτας (BeckmanP/ACEMDQcartridge),
14. Εσωτερικός δείκτης αναφοράς (π.χ. Orange G, Beckman),

15. Υλικό αναφοράς καρβοξυπεπτιδάσης Β

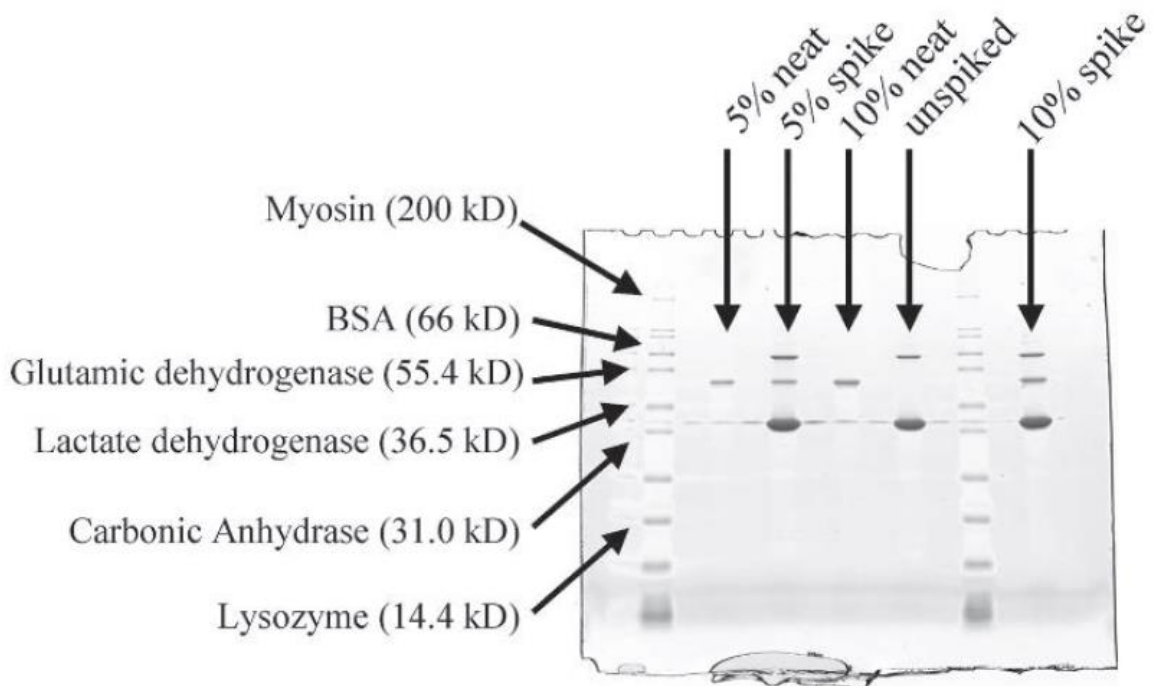
- Πρότυπο αλβουμίνης (αλβουμίνη ορού βόειου [BSA]) (π.χ. Pierce).
- Καθαρισμένο νερό (π.χ. Milli-Q®).
- 1 N HCl.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl: 0,025 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 7,65. Ζύγιση περίπου 3,04 g Tris-HCl και 5,8 g NaCl και διάλυση σε περίπου 950 mL καθαρισμένου νερού Milli-Q. Προσθήκη 5N HCl (σε pH 7,65 ± 0,1) και συμπλήρωση νερού μέχρι τον τελικό όγκο 1 L.
- 5 N HCl.

2.2 Μέθοδοι

Η μέθοδος CE-SDS αναπτύχθηκε για να αντικαταστήσει την υπάρχουσα SDS-PAGE μέθοδο. Οι δύο μέθοδοι αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό της συνολικής καθαρότητας των πρωτεϊνών όπως για παράδειγμα της καρβοξυπεπτιδάσης Β (Good, Cummins-Bitz, Fields, & Brian, 2004). Η μέθοδος SDS-PAGE θα συζητηθεί στην ενότητα 2.2.1. Η μέθοδος CE-SDS θα είναι το επίκεντρο του υπόλοιπου κεφαλαίου 2.

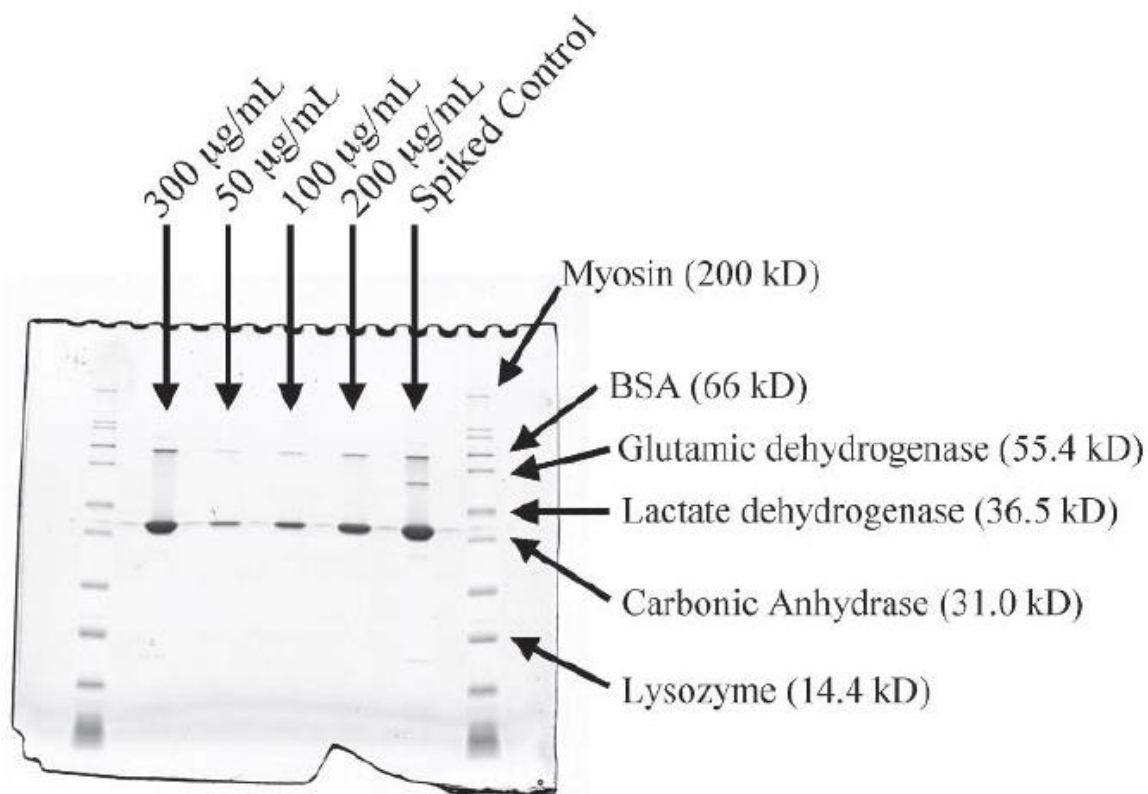
2.2.1 SDS-PAGE (Ηλεκτροφόρηση σε ακρυλαμίδιο)

Η τρέχουσα τεχνική ανάλυσης καθαρότητας για την καρβοξυπεπτιδάση Β είναι μια επικυρωμένη μέθοδος SDS-PAGE. Η ακρίβεια (Σχήμα 5) της μεθόδου προσδιορίστηκε με κλιμάκωση ενός εύρους συγκεντρώσεων 3-φωσφογλυκερικής φωσφοκινάσης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο λόγω της εγγενούς μη γραμμικότητας της πρόσληψης λεκέδων για τις μεθόδους SDS-PAGE. Η ακρίβεια, με την ανάκαμψη της ακίδας, προσδιορίστηκε να είναι 87% για την ακίδα 5% και 97% για την ακίδα 10%. Η μεταφορά μεταξύ των λωρίδων φαίνεται στο πήκτωμα στο Σχήμα 5 (Hwangetal., 2001).

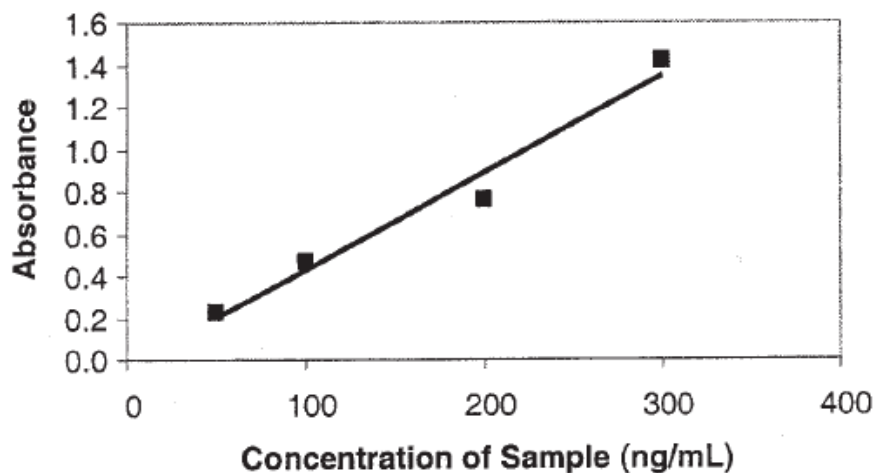


Σχήμα 9 Ακρίβεια της μεθόδου SDS-PAGE. Η ακρίβεια της μεθόδου προσδιορίστηκε με μετατόπιση της 3-φωσφογλυκερικής φωσφοκινάσης στη μήτρα δείγματος και τη μέτρηση της ανάκτησης.

Πρέπει να περιλαμβάνονται κενές λωρίδες για να αποφευχθεί η διασταυρούμενη μόλυνση δείγματος. Αυτό περιορίζει την απόδοση της μεθόδου. Η γραμμικότητα της μεθόδου SDS-PAGE αποδείχθηκε προσαρμόζοντας το σήμα απορρόφησης έναντι της συγκέντρωσης σε μια γραμμή. Ένα δείγμα πηκτής φαίνεται στο Σχήμα 6. Η γραμμική προσαρμογή φαίνεται στο Σχήμα 7. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) για γραμμικότητα ήταν 0,9850, που είναι τυπικός για μια μέθοδο SDS-PAGE.



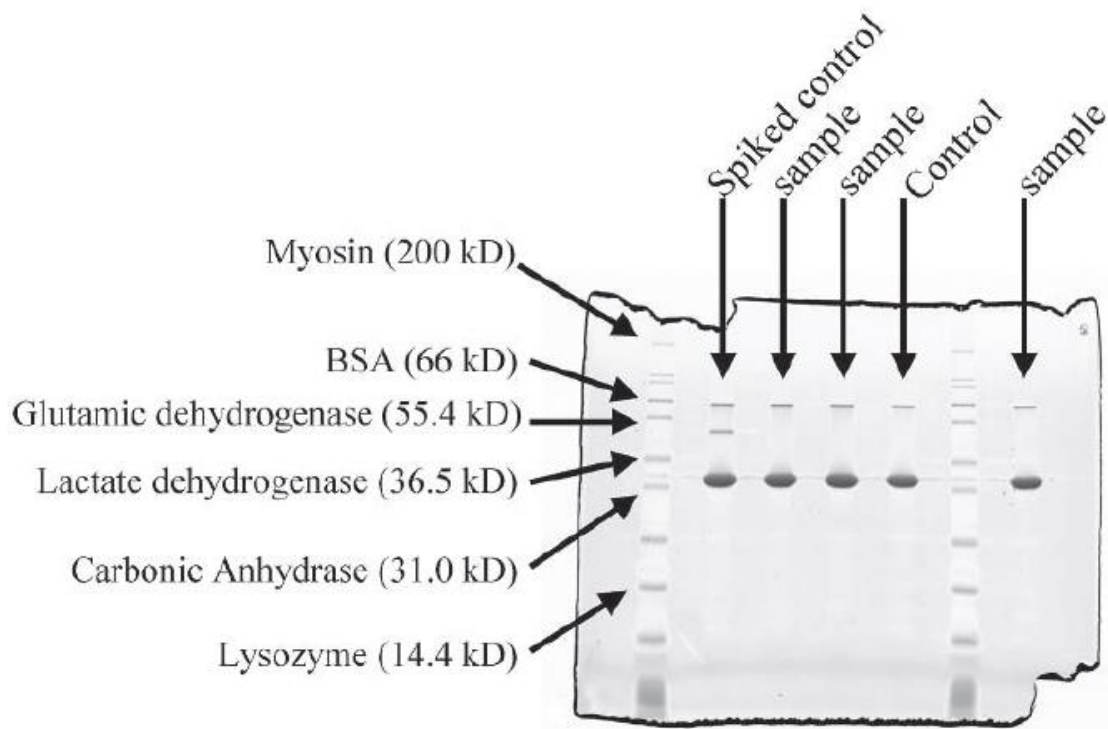
Σχήμα 10 Γραμμικότητα της μεθόδου SDS-PAGE.



Σχήμα 11 Γραμμική εφαρμογή για τη μέθοδο SDS-PAGE. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) είναι 0,9850.

Η χρήση πυκνομετρίας για τον προσδιορισμό της απορρόφησης περιορίζει την ικανότητα της μεθόδου να δείξει υψηλό βαθμό γραμμικότητας. Η ακρίβεια της μεθόδου SDS-PAGE ήταν καλύτερη από το αναμενόμενο. Μονομερές (ζώνη που βρίσκεται στα ~ 32 kD) RSD 3,7% καταδείχθηκε κατά την επικύρωση της μεθόδου. Ένα παράδειγμα

πηκτης SDS-PAGE που δείχνει το πείραμα ακρίβειας φαίνεται στο Σχήμα 8. Το διμερές (ζώνη που βρίσκεται στα ~ 64 kD) RSD προσδιορίστηκε να είναι 25,9%, το οποίο δεν είναι υψηλό λαμβάνοντας υπόψη τα χαμηλά επίπεδα διμερούς που παρατηρούνται στα περισσότερα δείγματα (Izco, Isabel Ordóñez, Torre, & Barcina, 1999).



Σχήμα 12 Παράδειγμα γέλης που δείχνει την ακρίβεια της μεθόδου SDS-PAGE.

2.2.2 CE-SDS

Οι μέθοδοι εδώ περιγράφουν τα βήματα που πρέπει να ακολουθηθούν για την ανάπτυξη της βέλτιστης μεθόδου για προσδιορισμούς καθαρότητας με την CE-SDS. Τα στοιχεία της διαδικασίας είναι η προετοιμασία δειγμάτων, ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός, η επικύρωση και η καταλληλότητα του συστήματος.

2.3 Προετοιμασία των δειγμάτων

Η προετοιμασία των δειγμάτων είναι ένα βασικό βήμα για την επίτευξη της βέλτιστης ανάλυσης στην CE-SDS. Ο στόχος είναι να βρεθούν συνθήκες που μετουσιώνουν

δυναμικά την πρωτεΐνη χωρίς να προκαλούν το σχηματισμό προϊόντων αποδόμησης. Τα πειράματα που περιγράφονται στην επόμενη ενότητα αντιπροσωπεύουν τη βελτιστοποίηση της προετοιμασίας δείγματος σε αυτήν τη μέθοδο (Good et al., 2004).

2.4 Βελτιστοποίηση και Πρωτόκολλο ανάλυσης

Για να επιτευχθεί το χαμηλότερο δυνατό όριο ποσοτικού προσδιορισμού, είναι επίσης απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί η υψηλότερη συγκέντρωση του δείγματος που επιτρέπεται από τη μέθοδο και τον αναλύτη. Εμπειρικά, η συγκέντρωση πρωτεΐνης στο δείγμα περιορίζεται από τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης, τη διαλυτότητα του SDS και την ικανότητα του τριχοειδούς (Ma & Nashabeh, 2001).

Η ανώτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης περιορίζεται πρακτικά στα 2 mg / mL. Περιγράφεται το λεπτομερές δείγμα προετοιμασίας (Goodetal., 2004).

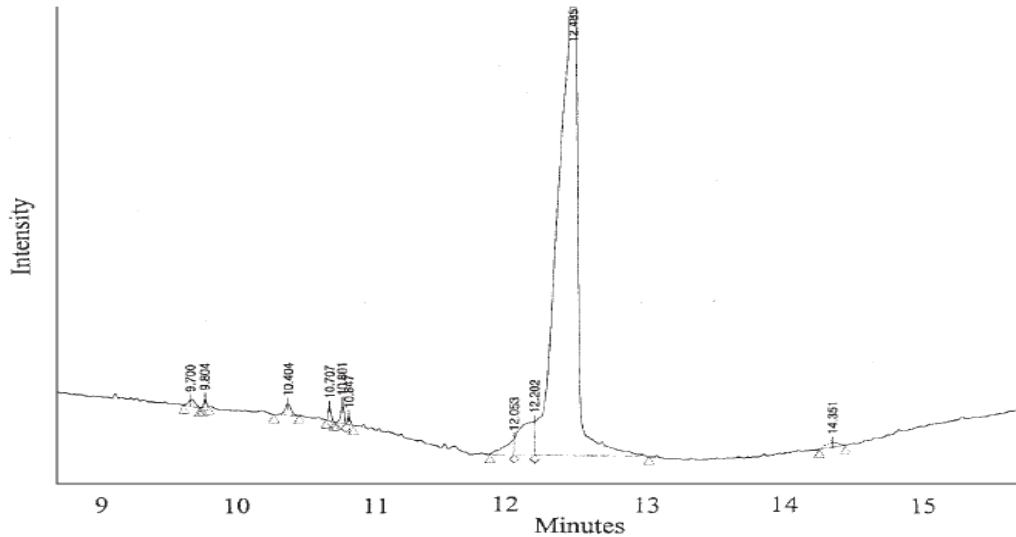
1. Αραίωση του διαλύματος δείγματος, τουλάχιστον 1: 1, σε 1,0 mg / mL με ρυθμιστικό διάλυμα SDS δείγματος σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης 2,0 mL. Στο αραιωμένο δείγμα, ακολουθεί προσθήκη μιας ακίδας 5%, κατ 'όγκο, του δείκτη αναφοράς Orange G και ανακίνηση.
2. Τοποθέτηση των σωλήνων στον επωαστήρα ξηρού λουτρού σε θερμοκρασία περίπου 100 ° C (± 5 ° C) για περίπου 3 λεπτά.
3. Παραμονή των δειγμάτων ώστε να κρυώσουν, μεταφορά σε φιαλίδια δείγματος CE 0,5 mL και αποθήκευση.

Η προετοιμασία του δείγματος βελτιστοποιείται περαιτέρω ελέγχοντας διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1 Βελτιστοποίηση προετοιμασίας δείγματος

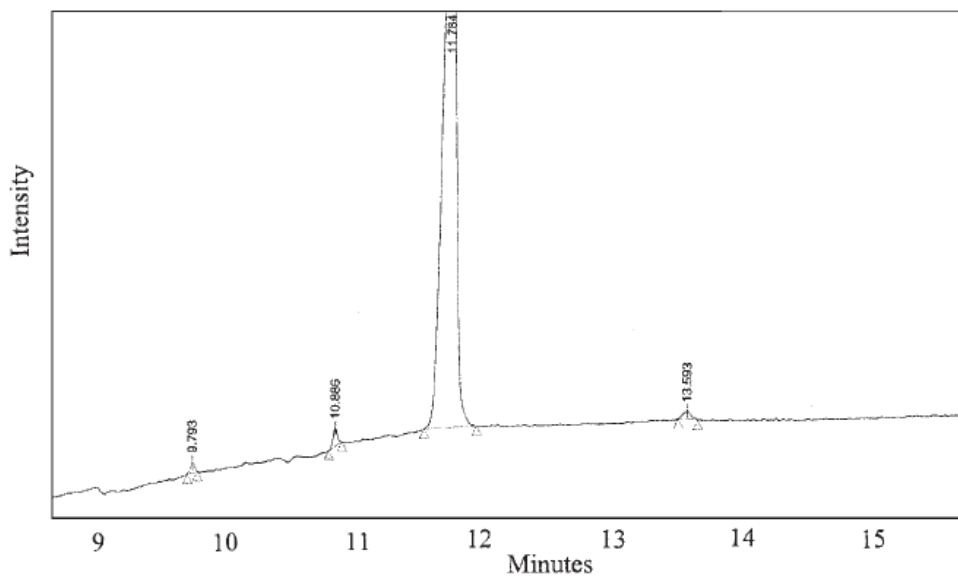
Time (minutes)	Temperature (°C)
2	60
5	60
10	60
2	100
5	100
10	100
2	boiling
5	boiling
10	boiling

Το **Σχήμα 12** δείχνει δείγμα που έχει υπερθερμανθεί. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μιας κορυφής αποικοδόμησης ακριβώς μπροστά από την κύρια κορυφή και τις άλλες νέες κορυφές, σε σύγκριση με το Σχήμα 10. Αυτό δεν είναι ιδανικό και αντιπροσωπεύει μια αναλυτική τροποποίηση του δείγματος, παρά την εγγενή φύση του δείγματος που αναλύεται.



Σχήμα 13 Ηλεκτρογραφήματα δείγματος που έχει υπερθερμανθεί.

Το Σχήμα 14 αντιπροσωπεύει υλικό που έχει παρασκευαστεί με τη βελτιστοποιημένη μέθοδο. Το ηλεκτρόγραμμα δεν δείχνει απρόσμενες κορυφές και αναλυτικά τεχνουργήματα. Παράμετροι όπως το σχήμα κορυφής και η εμφάνιση νέων κορυφών θεωρήθηκαν ότι καθορίζουν τις βέλτιστες συνθήκες. Οι περιοχές κορυφής πρότειναν πλήρη ανάκτηση πρωτεϊνών.



Σχήμα 13 Ηλεκτρογράφημα ενός βέλτιστα παρασκευασμένου δείγματος.

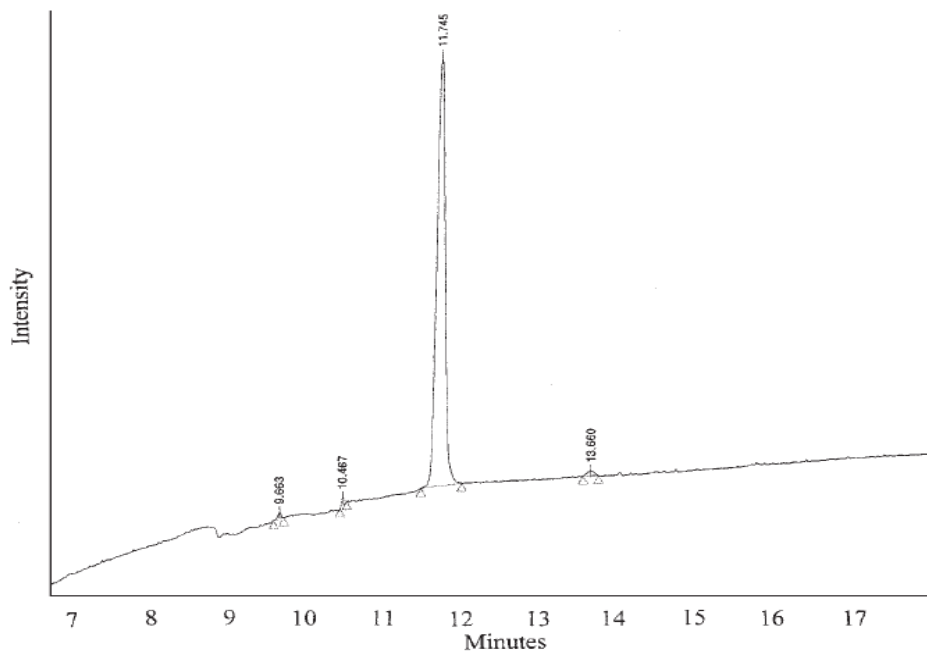
2.6 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός

Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης βελτιστοποιούνται ανάλογα με την πρωτεΐνη που αναλύεται. Η τάση, το μήκος του τριχοειδούς και ο τύπος του ρυθμιστικού διαλύματος ρυθμίζονται ανάλογα με τις ανάγκες για τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού (M Dawod et al., 2017). Για το ρυθμιστικό διάλυμα gel Beckman SDS, οι βέλτιστες συνθήκες ήταν 300 V / cm (π.χ. τριχοειδές 40 cm χρησιμοποιώντας τάση 12 kV). Για το ρυθμιστικό διάλυμα gel Bio-Rad, οι βέλτιστες συνθήκες είναι 600 V / cm (π.χ. τριχοειδές 40 cm χρησιμοποιώντας τάση 24 kV) (Jochheimetal., 2001).

Ο ανιχνευτής UV ρυθμίζεται στα 214 nm, η θερμοκρασία του τριχοειδούς στους 20 °C και η θερμοκρασία του αυτόματου δειγματοληπτή μεταξύ 2-8 °C. Οι παράμετροι της μεθόδου που χρησιμοποιούνται για το σύστημα PACE/MDQ περιγράφονται λεπτομερώς στον Πίνακα 2. Η απαιτούμενη τάση εξαρτάται από την επιθυμητή ισχύ του πεδίου σε σχέση με το μήκος τριχοειδούς και το SDS gel ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται. Το Σχήμα 13 δείχνει το τελικό ηλεκτρόγραμμα με τις βελτιστοποιημένες συνθήκες που περιγράφονται στη ενότητα 2.4.

Πίνακας 2 Ρυθμίσεις μεθόδου για το σύστημα MD / P / ACE MDQ

Step	Time	Event	Value	Duration	Inlet	Outlet	Summary
1		Rinse, pressure	50.0 psi	1.00 min	1 N HCl	Empty	Fwd
2		Rinse, pressure	20.0 psi	1.00 min	1 N HCl	Empty	Fwd
3		Rinse, pressure	20.0 psi	1.00 min	1 N HCl	Empty	Fwd
4		Rinse, pressure	20.0 psi	3.00 min	Gel Buffer	Empty	Fwd
5		Wait		0.00 min	Water	Water	
6		Inject, pressure	0.5 psi	60.0 s	Sample	Gel buffer	Override o.k., fwd
7		Wait		0.00 min	Water	Water	
8	0.00	Separate, voltage	12 or 24 kV*	30.00 min	Gel buffer	Gel buffer	0.17 min Ramp, reverse polarity, 20.0 psi, both
9	0.00	Relay on			N/A	N/A	01:30.0
10	1.00	Autozero			N/A	N/A	
11	30.00	Stop data			N/A	N/A	
12		End			N/A	N/A	



Σχήμα 14 Ηλεκτροδιάγραμμα βελτιστοποιημένης μεθόδου. Η βελτιστοποίηση περιελάμβανε προετοιμασία δείγματος και βέλτιστες συνθήκες ηλεκτροφόρησης.

2.6.1 Επικύρωση

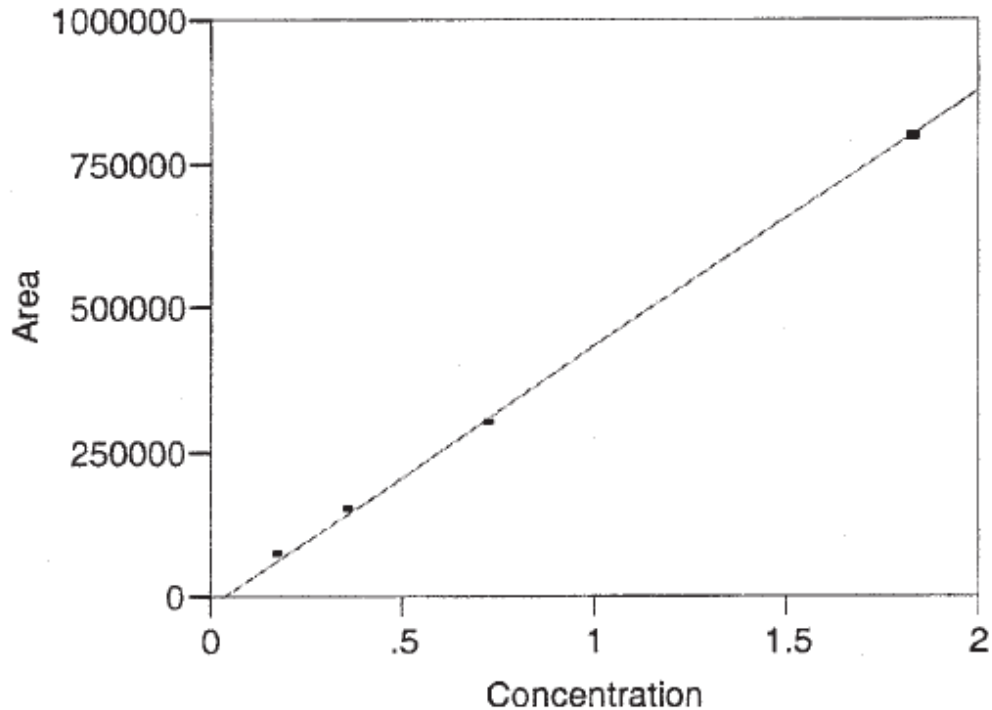
Για να αποδειχθεί ότι η μέθοδος CE-SDS παρέχει αξιόπιστα δεδομένα, πραγματοποιείται μια διαδικασία επικύρωσης. Η μέθοδος CE-SDS επικυρώθηκε ανεξάρτητα από τη μέθοδο SDS-PAGE. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια της επικύρωσης φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3 Επιλεγμένες παράμετροι επικύρωσης για την επικύρωση μεθόδου CE-SDS

Παράμετρος	Περιγραφή
Ακρίβεια / Γραμμικότητα / LOQ	Ορίζει το εύρος στο οποίο μπορούν να δημιουργηθούν δεδομένα
Ακρίβεια	Εκτιμήσεις για εισαγωγή, προετοιμασία και ρύθμιση μεταβλητότητας.
Ανθεκτικότητα	Περιγράφει το βαθμό στον οποίο οι παράμετροι της μεθόδου μπορούν να προσαρμοστούν χωρίς να επηρεάζονται τα αποτελέσματα των δεδομένων.
Εξειδίκευση	Διαβεβαιώνει ότι η μέθοδος μετρά ό,τι προορίζεται να μετρήσει.

2.6.2 Ακρίβεια, γραμμικότητα και όριο ποσοτικού προσδιορισμού

Όπως με οποιαδήποτε μέθοδο καθαρότητας όπου δεν υπάρχουν τυπικές ακαθαρσίες, η ακρίβεια συνάγεται από την ειδικότητα και την ακρίβεια. Για να αποδειχθεί η ακρίβεια σε όλο το εύρος της μεθόδου, η πρωτεΐνη αραιώνεται σε μια σειρά συγκεντρώσεων και κάθε αραιώση εισάγεται στο τριχοειδές. Η περιοχή της κύριας κορυφής στη συνέχεια απεικονίζεται ως συνάρτηση της συγκέντρωσης, όπως φαίνεται στο Σχήμα 12.



Σχήμα 15 Ακρίβεια της μεθόδου CE-SDS. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) είναι 0,9998.

Τα κριτήρια επικύρωσης για ακρίβεια, γραμμικότητα και όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) ήταν τα εξής:

Η τιμή r για τις γραμμές που ταιριάζουν στις κορυφές του μονομερούς και του διμερούς πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,99.

Για ακρίβεια, η μέση τιμή συσχέτισης δεν πρέπει να υπερβαίνει το 20%. Εάν όλα τα σημεία της τυπικής καμπύλης δεν πληρούσαν αυτά τα κριτήρια, το χαμηλότερο σημείο που πληρούσε τα κριτήρια θεωρήθηκε ως το LOQ της μεθόδου.

Η περιοχή σε κάθε συγκέντρωση απεικονίζεται και πραγματοποιήθηκε γραμμική προσαρμογή στα δεδομένα. Τα δεδομένα έδειξαν μια γραμμική σχέση με συντελεστή συσχέτισης 0,9998.

Αν και ο συντελεστής συσχέτισης αναμένεται να είναι μεγαλύτερος από 0,999 (που πληροί το κριτήριο αποδοχής γραμμικότητας), η ακρίβεια επιβεβαιώνεται σχεδιάζοντας μια γραμμή μέσω του μη αραιωμένου υλικού και του μηδενός και μετρώντας τη συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και των μετρημένων τιμών για κάθε αραιώση. Για

το ένζυμο, αυτά τα δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 4. Το χαμηλό επίπεδο συσχέτισης στα δεδομένα δείχνει ότι η μέθοδος CE SDS είναι ακριβής. Τα δεδομένα δείχνουν ότι η μέθοδος CE-SDS παρέχει μεγαλύτερη γραμμικότητα από τη μέθοδο SDS-PAGE, όπως αναμενόταν. Για να γίνει έλεγχος του ορίου του ποσοτικού προσδιορισμού, το τυπικό υλικό περιέχει γνωστά επίπεδα μιας άλλης πρωτεΐνης για την προσομοίωση μιας ακαθαρσίας.

Πίνακας 4 Γραμμικότητα της μεθόδου CE-SDS

Concentration mg/mL	Area	Percent accuracy
1.828	804783	0.00
0.7312	305425	-5.12
0.3656	150130	-6.73
0.1828	76031	-5.53

2.6.3 Ακρίβεια

Η επαναληψιμότητα ελέγχεται τόσο στα παρασκευάσματα όσο και στις ενέσεις με μια τυπική μελέτη που φαίνεται στον Πίνακα 5. Και οι δύο σχετικοί χρόνοι μετανάστευσης (RMT) και η επιφάνεια κορυφής αναμένεται να είναι επαναλαμβανόμενοι. Τα κριτήρια αποδοχής ακρίβειας σχετίζονται με την επαναληψιμότητα, την ενδιάμεση ακρίβεια και τη συνολική μεταβλητότητα καθαρότητας. Η επαναληψιμότητα πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση με 2%. Τα κριτήρια αποδοχής για διακύμανση ενδιάμεσης ακρίβειας και ολικής καθαρότητας ήταν ότι καθένα πρέπει να είναι μικρότερο ή ίσο με 10%.

Πίνακας 5 Επαναληψιμότητα της μεθόδου CE-SDS

Prep	Injection	1/RMT Monomer	1/RMT Dimer	1/RMT unknown	Area Monomer	% Purity Monomer
1	1	0.679	0.590	0.811	752382	99.11
1	2	0.679	0.593	0.811	743520	99.31
1	3	0.680	0.592	0.811	764539	99.29
2	1	0.679	0.592	0.810	718019	99.29
2	2	0.678	0.591	0.810	725156	99.19
2	3	0.678	0.591	0.809	702729	99.22

2.6.4 Καταλληλότητα συστήματος

Η καταλληλότητα του συστήματος είναι το σύνολο των αναλύσεων που πραγματοποιούνται για να διασφαλιστεί ότι το όργανο λειτουργεί σωστά πριν από την εκτέλεση των δειγμάτων που θα εξεταστούν. Για να διασφαλιστεί ότι η απόδοση της μεθόδου εξακολουθεί να είναι αξιόπιστη, αναπτύσσεται μια στρατηγική καταλληλότητας συστήματος για τη μέθοδο. Για παράδειγμα, εάν το ρεύμα είναι σταθερό και ο χρόνος μετανάστευσης δεν ποικίλλει σημαντικά, το όργανο μπορεί να χαρακτηριστεί ως κατάλληλο για ανάλυση δείγματος. Η καταλληλότητα του συστήματος είναι ένας εξελισσόμενος παράγοντας που πρέπει να επανεκτιμηθεί καθώς καθορίζονται πρόσθετες δυνατότητες της μεθόδου.

Κεφάλαιο 3

Επιλεγμένες εφαρμογές στις βιοεπιστήμες

3.1 Βιοφαρμακευτικά προϊόντα

Τα βιοφαρμακευτικά προϊόντα είναι βιομόρια (νουκλεϊκά οξέα, πεπτίδια, πρωτεΐνες) που χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς. Παράγονται κυρίως χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένες τεχνολογίες, οι οποίες επιτρέπουν την παραγωγή πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα. Τα βιοφαρμακευτικά προϊόντα περιλαμβάνουν διαφορετικούς τύπους βιομορίων, π.χ. ορμόνες όπως ινσουλίνη και αυξητικούς παράγοντες (ερυθροποιητίνη, EPO), ιντερφερόνες, ιντερλευκίνες (IL-2), εμβόλια, mAbs και άλλα προϊόντα (διδεικτικά αντισώματα και συσσωματώματα αντισωμάτων-φαρμάκων). Ο χαρακτηρισμός των βιοφαρμακευτικών προϊόντων απαιτεί συνδυασμό πολλών τεχνικών προκειμένου να διερευνηθούν οι διάφορες δομικές ιδιότητες των βιομορίων. Οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι μέθοδοι διαχωρισμού όπως η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση CE και η υγρή χρωματογραφία LC. Από την καθιέρωση της σύγχρονης μεθόδου της CE, οι τριχοειδείς τεχνικές λόγω ηλεκτρομετανάστευσης έχουν αποδειχθεί ότι είναι πολύ κατάλληλες για το διαχωρισμό των βιομορίων. Τα πλεονεκτήματα της CE είναι η υψηλή αποδοτικότητα διαχωρισμού και η χρήση υδατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων που είναι ευνοϊκή για τη διατήρηση της δομής της υψηλότερης τάξης των πρωτεϊνών. Τα θεραπευτικά πεπτίδια και οι πρωτεΐνες είναι συνήθως φορτισμένα μόρια. Η τροποποίησή τους συχνά προκαλεί αλλαγή στο καθαρό φορτίο ή / και στην υδροδυναμική τους ακτίνα. Επομένως, οι ηλεκτροκινητικοί διαχωρισμοί που χρησιμοποιούν τεχνικές με βάση τη CE είναι κατάλληλοι για τον διαχωρισμό βιοφαρμακευτικών προϊόντων (Fekete et al., 2016). Ο διαχωρισμός CE μπορεί να συνδυαστεί με ευαίσθητες τεχνικές ανίχνευσης, συμπεριλαμβανομένων φθορισμού επαγόμενος από λέιζερ (LIF) και φασματομετρία μάζας (MS). Η MS είναι πολύ χρήσιμη για το χαρακτηρισμό της δομής των βιοφαρμακευτικών προϊόντων. Ο χαρακτηρισμός των βιοφαρμακευτικών προϊόντων έχει περιγραφεί σε προηγούμενα κεφάλαια χρησιμοποιώντας διαφορετικούς τρόπους διαχωρισμού CE από CZE έως CGE και CIEF. Στη συνέχεια θα περιγραφούν ορισμένες εφαρμογές μεθόδων που βασίζονται σε CE για τον χαρακτηρισμό των βιοφαρμακευτικών προϊόντων. Πολλά βιοφαρμακευτικά

προϊόντα, όπως τα mAbs, είναι γλυκοζυλιωμένα και επομένως ο χαρακτηρισμός των γλυκανών είναι σημαντικός. Για αυτό το λόγο περιγράφεται σε ξεχωριστή ενότητα η ανάλυση των γλυκανών.

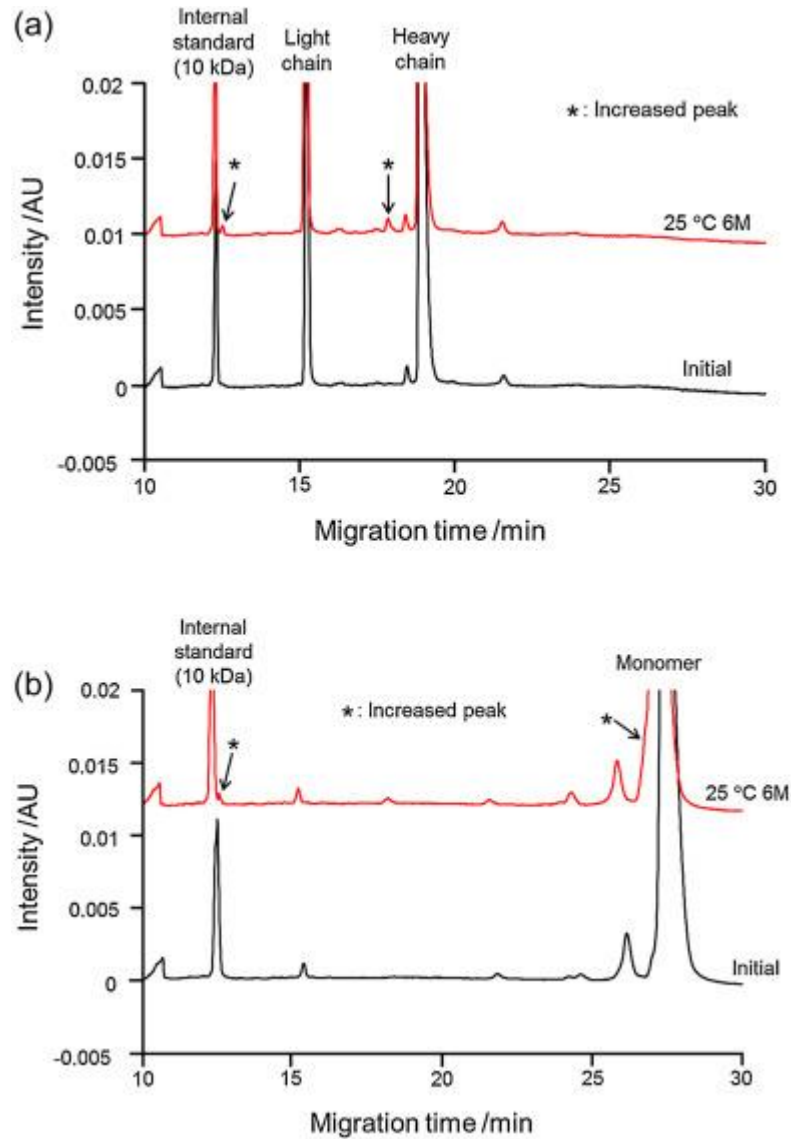
3.1.1. CGE (τριχοειδής ηλεκτροφόρηση πηκτής)

Το μέγεθος της ετερογένειας των πρωτεϊνών επηρεάζεται από τροποποιήσεις όπως μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs) και κατακερματισμό. Μπορεί να παρατηρηθεί μετατόπιση του προφίλ προς όξινες μορφές (απαμίδωση, σιαλυλίωση, γλυκοζυλίωση) ή βασικές μορφές (σχηματισμός ηλεκτριμιδίου) και αυτό μπορεί να επηρεάσει την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του προϊόντος. Οι PTM μπορούν να χαρτογραφηθούν αποτελεσματικά με CGE και συνεπώς οι Salas-Solano et al. (2006) βελτιστοποίησαν μια γενική μέθοδο CGE-LIF για έλεγχο ποιότητας (QC) και παρακολούθηση σταθερότητας των mAbs. Η επικύρωση αυτής της μεθόδου σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της Διεθνούς Επιτροπής Εναρμόνισης καταδεικνύει ότι η μέθοδος καθορίζει τη συνέπεια της κατασκευής mAb. Οι Han et al. (2006) πρότειναν επίσης μια μέθοδο CGE-LIF για διαχωρισμό mAb και η μέθοδος τους μεταφέρθηκε στο εργαστήριο QC για δοκιμή απελευθέρωσης παρτίδας θεραπευτικών αντισωμάτων. Καθώς η CGE αποδείχθηκε πολύ κατάλληλη μέθοδος για το χαρακτηρισμό mAbs, η United States Pharmacopeia (USP) κυκλοφόρησε ένα γενικό πρωτόκολλο για τον χαρακτηρισμό CGE-UV των mAbs.

Περαιτέρω βελτιώσεις στην απόδοση της CGE έχουν γίνει προτείνοντας μια γενικά εφαρμόσιμη μέθοδος πολλαπλών τριχοειδών SDS-CGE-LIF για ανάλυση ποιοτικού ελέγχου υψηλής απόδοσης των mAbs με μειωμένες συνθήκες και Kubota et al. (2017), αποδεικνύοντας την ανάλυση ενός mAb και αποσπασμένων θραυσμάτων χρησιμοποιώντας ορθογώνιες αναλυτικές μεθόδους, συμπεριλαμβανομένου της CGE-UV (Σχήμα 13).

Η πρόοδος στην CGE σχετικά με τη μείωση των χρόνων διαχωρισμού επικεντρώθηκε στο σύστημα MCE-SDS. Ενώ το MCE-SDS είναι μια ελκυστική εναλλακτική λύση έναντι του συμβατικού CE-SDS για ανάλυση πρωτεϊνών, υπάρχουν ακόμη ευκαιρίες βελτίωσης, π.χ. υψηλότερη ανάλυση για διαχωρισμό προϊόντων με παρόμοια μεγέθη. Οι Smith et al. (2017) επικύρωσαν μια μέθοδο MCE-

SDSμεανίχνευσηLIFγιαανάλυσηmAbsμεδιαχωρισμόκαιποσοτικοποίησητωνπαραλλαγών μεγέθους. Η μέθοδος είναι κατάλληλη για μελέτες απελευθέρωσης και σταθερότητας ορθής παρασκευαστικής πρακτικής.



Σχήμα 1 Ηλεκτρογραφήματα του αρχικού δείγματος mAb-A (χαμηλότερο ίχνος) και δείγματος αποικοδόμησης (ανώτερο ίχνος) που λαμβάνεται με SDS-CGE (α) μειωμένες και (β) μη μειωμένες συνθήκες. Η κορυφή εσωτερικού προτύπου, η κορυφή ελαφριάς αλυσίδας, η κορυφή βαριάς αλυσίδας, η κορυφή μονομερούς και οι αυξημένες κορυφές παρουσιάζονται στο σχήμα(Kubota et al., 2017)

3.1.2. CIEF (Τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση)

Η ετερογένεια φορτίου των βιοφαρμακευτικών προϊόντων είναι μια σημαντική παράμετρος ποιότητας. Τα προφίλ ετερογένειας φόρτισης μπορούν επίσης να επηρεαστούν από τροποποιήσεις όπως PTM και κατακερματισμός. Η CIEF και η iCIEF με ανίχνευση UV εφαρμόζονται πλήρως σε εργαστήρια QC και έχουν γίνει μέθοδοι αναφοράς για τον χαρακτηρισμό της ετερογένειας φόρτισης. Η αναγνώριση θεραπευτικών ουσιών και PTM μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας αυτήν τη λειτουργία CE.

Πολλές εργασίες περιγράφουν τις δυνατότητες της CIEF- και iCIEF-UV ως χρήσιμων εργαλείων στην ανάπτυξη της διαδικασίας της βιοθεραπευτικής. Οι Suba et al. (2015) επικύρωσαν μια μέθοδο CIEF-UV για τον προσδιορισμό ταυτοποίησης των φαρμακευτικών προϊόντων mAb με pI μεταξύ 7.0 και 9.0. Η μέθοδος CIEF παρείχε καλή διαβάθμιση pH για εσωτερική βαθμονόμηση ($R^2 > 0,99$) και καλή ανάλυση μεταξύ όλων των ισομορφών.

Αυτοί οι συγγραφείς διαπίστωσαν επίσης ότι η CIEF-UV ήταν μια ακριβής αναλυτική μέθοδος για την επιβεβαίωση της ταυτότητας των πρωτεϊνών στο QC και την απελευθέρωση δοκιμών στη βιοφαρμακευτική βιομηχανία, ειδικά με τη χρήση εμπορικών τυποποιημένων κιτ [80]. Οι μέθοδοι CIEF- και iCIEF-UV είναι επίσης κατάλληλες για το χαρακτηρισμό προϊόντων που σχετίζονται με mAbs. Μια βελτιωμένη μέθοδος για το χαρακτηρισμό όξινων και βασικών παραλλαγών ενός αντισώματος χρησιμοποίησε μια προπαρασκευαστική ακινητοποιημένη βαθμίδα pH για κλασμάτωση και τα κλάσματα χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω με CGE-UV και LC-MS. Για να αποδειχθεί η ακρίβεια των μεθόδων CIEF- και iCIEF-UV ως αναφορές για τον χαρακτηρισμό παραλλαγών φόρτισης, οι Salas-Solano et al. (2011) οργάνωσαν διεργαστηριακές μελέτες. Δημιουργήθηκε μια διεθνής ομάδα 12 εργαστηρίων από βιοφαρμακευτικές εταιρείες για να αξιολογήσει την ακρίβεια και την ανθεκτικότητα των CIEF- και iCIEF-UV για τον προσδιορισμό της ετερογένειας φορτίου των mAbs. Αυτό προκάλεσε την εφαρμογή των μεθοδολογιών CIEF- και iCIEF-UV τόσο στην ανάπτυξη διεργασιών όσο και στο QC των βιοφαρμακευτικών εταιρειών. Η αποτελεσματική σύζευξη της CIEF με MS δεν είναι εύκολη, αυξάνει περαιτέρω τις δυνατότητες του (i)CIEF.

Περαιτέρω βελτίωση του χρόνου διαχωρισμού επιτεύχθηκε με την ανάπτυξη μικροσίπ CIEF. Οι Kinoshita et al. (2013) ανέφεραν μια σύγκριση μεταξύ μικροσίπ CIEF-UV και συμβατικών μεθόδων CIEF-UV για την αξιολόγηση της ετερογένειας φόρτισης mAbs. Παρατηρήθηκε 10πλάσια μείωση του χρόνου διαχωρισμού και εξαιρετικός συσχετισμός των υπολογισμένων τιμών pI και των σχετικών ποσοτήτων των παραλλαγών φόρτισης, αλλά η αυτοματοποίηση της μεθόδου μικροσίπ είναι ακόμη περιορισμένη. Ωστόσο, αυτή η στρατηγική είναι πολλά υποσχόμενη και οι βελτιώσεις θα πραγματοποιηθούν στο μέλλον.

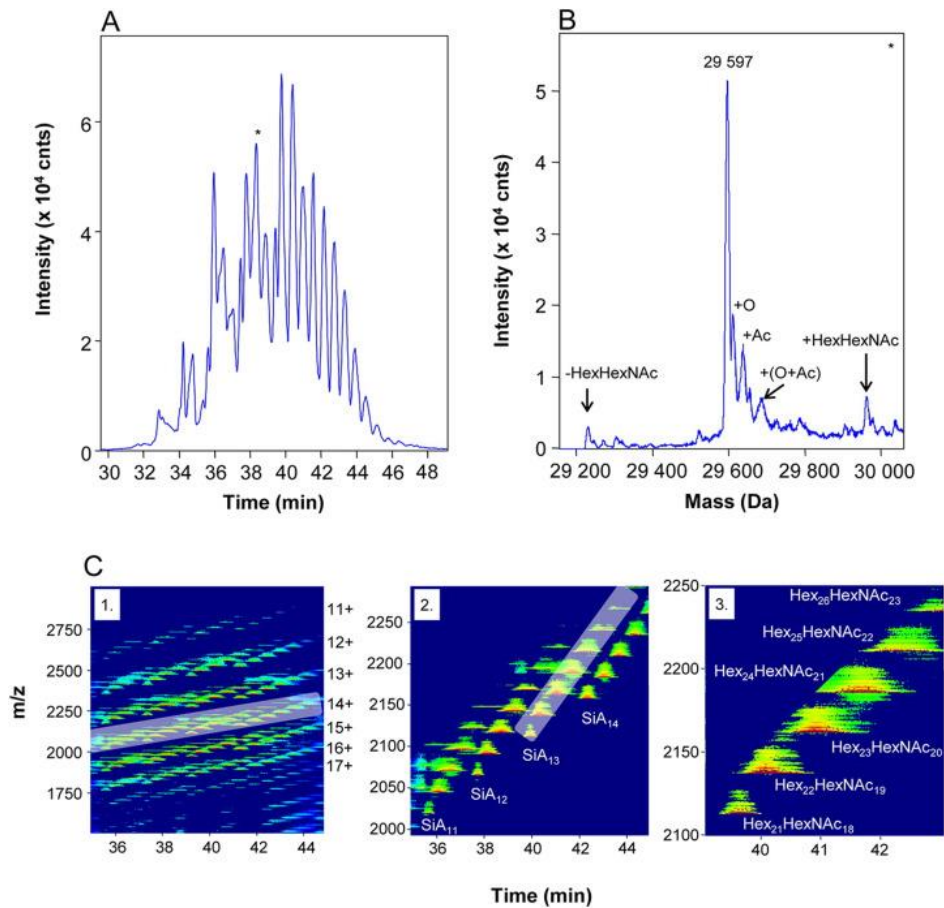
3.1.3. CZE-MS (Τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ζωνών)

Η CZE μπορεί εύκολα να συνδυαστεί με MS και πληροφορίες δομής προϊόντων. Η ανάλυση από μέση προς τα πάνω είναι ο χαρακτηρισμός θεραπευτικών πρωτεϊνών μετά από περιορισμένη πρωτεόλυση, η οποία δημιουργεί πεπτίδια συνήθως μεγαλύτερα από 10kDa. Η πρωτεολυτική θεραπεία πραγματοποιείται με ένζυμα όπως η πεψίνη, η παπαΐνη και η στρεπτοκοκκική πρωτεϊνάση κυστεΐνης. Η χρήση περιορισμένης πέψης είναι ενδιαφέρουσα καθώς μειώνει την πολυπλοκότητα του δείγματος προκειμένου να επικεντρωθεί η ανάλυση σε συγκεκριμένα μέρη της ερευνηθείσας πρωτεΐνης. Κατά συνέπεια, χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση πολύπλοκων πρωτεϊνών όπως τα mAbs, ειδικά επειδή διατίθενται ειδικά ένζυμα για την πρωτεόλυση της ανοσοσφαιρίνης (IgG) 1. Η ανάλυση των mAbs μετά τη μείωση των δισουλφιδικών γεφυρών αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό CE-ESI-MS. Τα αποτελέσματα έδειξαν το διαχωρισμό της βαριάς αλυσίδας mAbs (H) και της ελαφριάς αλυσίδας (L) σε ένα μείγμα μειωμένων mAbs. Το σύστημα CE-ESI-MS χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό των βιοφαρμακευτικών προϊόντων μετά από διαφορετικά δείγματα προκατεργασίας.

Αποδείχθηκε ο πλήρης διαχωρισμός του μίγματος που αποτελείται από αλυσίδα H, αλυσίδα L των mAbs και θραύσματα που παράγονται από την πέψη IdeS (ενζύμου αποικοδόμησης IgG του *Streptococcus pyogenes*). Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν οι διάφορες παραλλαγές λυσίνης για τα θραύσματα κρυσταλλώσιμης περιοχής (fragment crystallizable region, Fc) θραύσματος. Οι διάφορες εφαρμογές του CE-ESI-MS καταδεικνύουν ότι η CE είναι κατάλληλη για το διαχωρισμό μεγάλων πρωτεϊνικών

θραυσμάτων. Οι Biacchi et al. (2015) ανέπτυξαν μια off-line μέθοδο CE-MALDI / ESI-MS για την ανάλυση διαφορετικών θραυσμάτων που παράγονται από την πέψη του cetuximab με IdeS. Έδειξαν το βασικό διαχωρισμό των παραλλαγών Fc λυσίνης και τον ανεξάρτητο χαρακτηρισμό των θέσεων N-γλυκοσυλίωσης που υπάρχουν στην πρωτεΐνη [86].

Για το χαρακτηρισμό των βιοφαρμακευτικών προϊόντων, ο κύριος στόχος είναι η ανάλυση ανέπαφων πρωτεϊνών. Ένα χρήσιμο πρωτόκολλο για ταχεία ανάπτυξη μεθόδου CZE για ανάλυση των mAbs παρουσιάστηκε από τους Suba et al. (2016). Το MS προσφέρει ένα υψηλό επίπεδο πληροφοριών δομής και ένας αποτελεσματικός διαχωρισμός από το MS αυξάνει τις πληροφορίες που λαμβάνονται από τα φάσματα. Το CE-ESI-MS χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη μιας μεθόδου για τον χαρακτηρισμό της ανθρώπινης EPO (Σχήμα 14). Αυτή η μέθοδος παρείχε κλασμάτωση και επακόλουθο χαρακτηρισμό ενός μεγάλου αριθμού γλυκομορφών EPO σε μία μόνο ανάλυση. Ο χαρακτηρισμός της ανέπαφης ιντερφερόνης-β1 πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ανάλυση CE-ESI-MS / MS. Αυτή η προσέγγιση επέτρεψε τον προσδιορισμό των γλυκομορφών και των τροποποιημένων παραλλαγών με ανάλυση MS / MS.



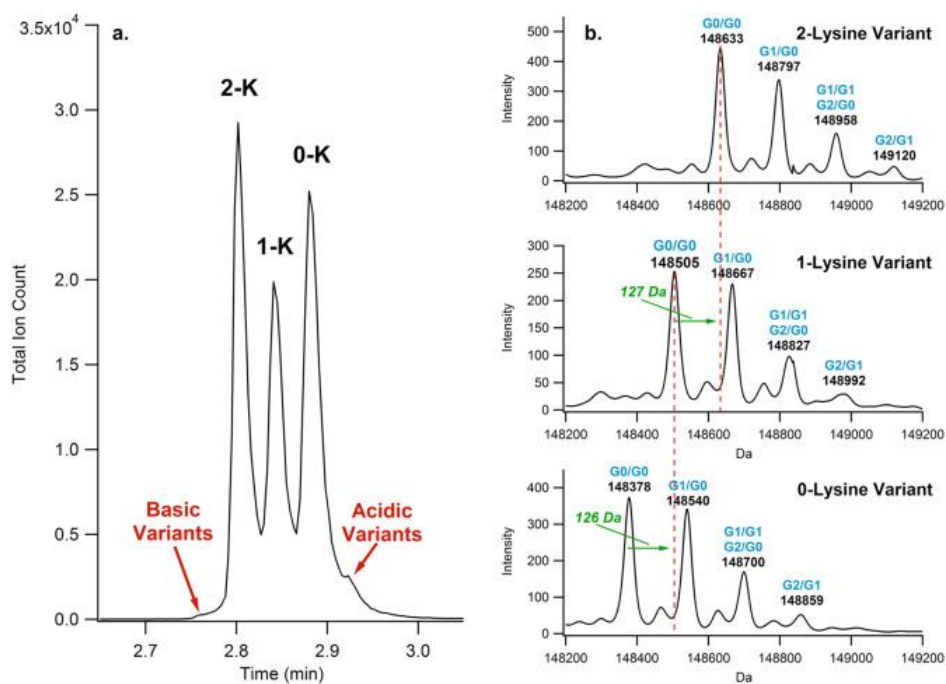
Σχήμα 16 Θήκη CE-MS ανασυνδυασμένου ανθρώπινου EPO (200μg/mL) που χρησιμοποιεί ουδέτερο επικαλυμμένο τριχοειδές. (A) BPE; (B) αποσυμπιεσμένο φάσμα μάζας που λαμβάνεται στην κορυφή της κορυφής που μεταναστεύει στα 38,0 min, (C1) καμπύλη περιγράμματος με ζουμ, (C2) η κατάσταση φόρτισης 14+ των γλυκομορφών και (C3) οι σιαλομορφές SiA13 των 14+ γλυκομορφών (Haselberg et al., 2013)

Η χρήση του διαχωρισμού μεταφοράς ηλεκτρονίων και ο κατακερματισμός διάσπασης υψηλής ενέργειας έδειξαν την πιθανότητα εκτέλεσης ενός χαρακτηρισμού διαφορετικών ισομορφών και της παρουσίας PTMs [88]. Το δυναμικό του CE-MALDI-MS αποδείχθηκε και εφαρμόστηκε για το διαχωρισμό και την ανάλυση MS των παραλλαγών ανέπαφου φορτίου του trastuzumab [89]. Το CZE-MS έχει επίσης εφαρμοστεί για μελέτες σταθερότητας και έχουν εντοπιστεί προϊόντα απαμίδωσης και οξειδωσης. Ειδικά το MS με αναλυτή χρόνου πτήσης (TOF) βρέθηκε να είναι πολύ κατάλληλο για αυτόν τον τύπο ανάλυσης, καθώς παρατηρούνται μικρές διαφορές μάζας.

Χρησιμοποιήθηκε ένα μικροτσίπ CE-nano ESI-MS για την ανάλυση του ανέπαφου infliximab. Οι παραλλαγές λυσίνης διαχωρίστηκαν επιτυχώς και ταυτοποιήθηκαν με MS (Σχήμα 15). Το ίδιο σύστημα χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των συζευγμάτων

αντισώματος-φαρμάκου (antibody drug conjugates, ADCs). Η ανάλυση μικροσίπ MS έδειξε τη δυνατότητα προσδιορισμού της αναλογίας φαρμάκου προς αντίσωμα (DAR).

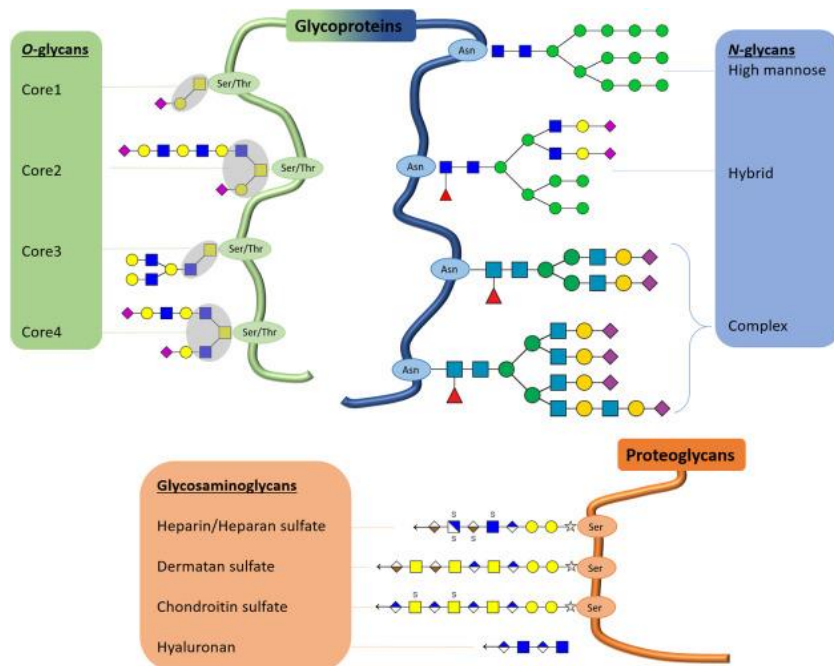
Τα ADC είναι σύνθετα δείγματα στον τομέα των θεραπευτικών πρωτεϊνικών προϊόντων. Οι Said et al. (2016) ανέπτυξαν μια αναλυτική μεθοδολογία για ανάλυση ADCs στο επίπεδο πεπτιδίων. Αυτή η ροή εργασίας βασίζεται κυρίως σε CE-ESI-MS. Επιτρέπει το χαρακτηρισμό της αλληλουχίας αμινοξέων, τον εντοπισμό των διαφορετικών θέσεων σύζευξης για την εκτίμηση των σχετικών επιπέδων σύζευξης για κάθε θέση και τη λήψη του γλυκοπροφίλου της πρωτεΐνης. Επειδή η απόδοση ιονισμού ESI είναι σχετικά χαμηλή για ανέπαφες πρωτεΐνες, οι μέθοδοι CE-ESI-MS για άθικτες πρωτεΐνες θα επωφεληθούν από την ανάπτυξη μιας πιο ευαίσθητης σύζευξης CE-MS. Ο χαρακτηρισμός ανέπαφων θεραπευτικών πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας CE-MS παραμένει μια πρόκληση.



Σχήμα 17 (α) Διαχωρισμός ανέπαφων παραλλαγών φόρτισης Infliximab από το σύστημα MCE-MS. Οι αναγνωρισμένες παραλλαγές λυσίνης επισημαίνονται ως 2-K, 1-K και 0-K. (β) Αποσυντεθειμένα φάσματα μάζας για κάθε παραλλαγή λυσίνης (Kubota et al., 2017)

3.2 Γλυκανές που προέρχονται από πρωτεΐνες

Οι υδατάνθρακες είναι από τις πιο άφθονες ομάδες οργανικών μορίων στον πλανήτη και παίζουν βασικούς ρόλους σε διαφορετικές βιολογικές διεργασίες. Οι γλυκανές συζευγμένες με πρωτεΐνες αποτελούνται από δομικά στοιχεία μονοσακχαριτών που συνδέονται μεταξύ τους σε διαφορετικές αλληλουχίες και συνδέσεις. Οι αλυσίδες μπορούν να είναι γραμμικές ή διακλαδισμένες, αποδίδοντας έναν τεράστιο αριθμό πιθανών δομών γλυκανών και ισομερών μορφών. Στις περισσότερες γλυκοπρωτεΐνες, οι γλυκανές συνδέονται στο ανομερικό κέντρο με την πρωτεΐνη με N- ή O-δεσμούς αμινοξέων (Σχήμα 16).



Σχήμα 18 Δομές γλυκανών που συνδέονται με πρωτεΐνες. Κίτρινος κύκλος = γαλακτόζη (Gal); κίτρινο τετράγωνο = N-ακετυλαγαλακτοζαμίνη (GalNAc); μπλε τετράγωνο = N-ακετυλογλυκοζαμίνη (GlcNAc); πράσινος κύκλος = μαννόζη; κόκκινο τρίγωνο = φουκόζη, μοβ διαμάντι = N-ακετυλονεραμινικό οξύ (Neu5Ac)(Toraño et al., 2019)

Από την καθιέρωση της διαμόρφωσης υδατανθράκων στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, έχει σημειωθεί σταθερή πρόοδος στην έρευνα γλυκανών, που συνήθως σχετίζεται με σημαντικές τεχνολογικές εξελίξεις. Πρόσφατα, το πεδίο της γλυκομικής αναδύεται έντονα με την αυξανόμενη ζήτηση για βιοδείκτες γλυκανών για διάγνωση ασθενειών και την τεράστια αναπτυσσόμενη αγορά πρωτεϊνικών φαρμακευτικών προϊόντων και εμβολίων. Επιπλέον, η καινοτομία στην επιστήμη διαχωρισμού και στα MS, μαζί με νέες προσεγγίσεις σύνθεσης για σύνθετους υδατάνθρακες παρέχουν νέες ευκαιρίες σε αυτόν τον τομέα. Επί του παρόντος, η ανάλυση γλυκάνης πραγματοποιείται κυρίως με υδρόφιλη χρωματογραφία αλληλεπίδρασης (HILIC) -MS και πορώδη γραφίτη άνθρακα "πυρήνας-κελύφους" (PGC)LC-MS [94], αλλά η CE παίζει επίσης σημαντικό ρόλο. Αυτή η ενότητα υπογραμμίζει σημαντικές εξελίξεις στην ανάλυση των γλυκανών που προέρχονται από πρωτεΐνες μέσω CE με ιδιαίτερη προσοχή στην παραγωγοποίηση της γλυκάνης.

3.2.1. Η προετοιμασία των δειγμάτων

Οι γλυκανές μπορούν να απελευθερωθούν από πρωτεΐνες ενζυματικά ή χημικά. Οι N-γλυκάνες απελευθερώνονται συνήθως άθικτες από απομονωμένες γλυκοπρωτεΐνες με μετουσίωση της πρωτεΐνης και διάσπαση του δεσμού N-ακετυλογλυκοζαμίνης-ασπαραγίνης από ενδογλυκοσιδάσες όπως πεπτιδίο-N-γλυκοσιδάση F (PNGase F) [95]. Για τις O-συνδεδεμένες γλυκάνες δεν υπάρχει διαθέσιμη καθολική διαδικασία διάσπασης με βάση τα ένζυμα και αντ' αυτού χρησιμοποιείται χημική διάσπαση. Η β-απομάκρυνση σε υψηλό αλκαλικό pH συνήθως χρησιμοποιείται για την απελευθέρωση O-συνδεδεμένων γλυκανών, μετατρέποντάς τις έτσι στη μειωμένη μορφή που καθιστά την παραγωγοποίηση με ετικέτα πιο περίπλοκη. Η απελευθέρωση με άνυδρη υδραζίνη είναι επίσης δυνατή, αλλά η αποφλοιώση της αποικοδόμησης των γλυκανών αυξάνεται σε σύγκριση με την προσέγγιση μείωσης της β-απομάκρυνσης και λαμβάνονται περισσότερα τροποποιημένα υπολείμματα υδατανθράκων (Gaunitz et al., 2017).

Επειδή οι περισσότερες γλυκάνες δεν περιέχουν ένα χρωμοφόρο ενεργό συστατικό στην υπεριώδη ακτινοβολία, απαιτείται συχνά επισήμανση των απελευθερωμένων γλυκανών. Περαιτέρω, εάν δεν υπάρχει N-ακετυλονεραμινικό οξύ (Neu5Ac) ή άλλες φορτισμένες ομάδες, είναι δύσκολο να φορτιστούν γλυκάνες για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό ή κατά τη διάρκεια ESI και συνεπώς προσαρτάται μια ιονίζουσα ομάδα. Ένας

δείκτης αρνητικού φορτίου εφαρμόζεται συχνά για την CE των γλυκανών ώστε να φορτίζουν ουδέτερα και να αυξάνουν το φορτίο σε αρνητικά φορτισμένες ενώσεις. Ένας δείκτης (επισήμανση) θετικού φορτίου από την άλλη πλευρά μειώνει το καθαρό φορτίο και την ηλεκτροφορητική κινητικότητα των αρνητικά φορτισμένων γλυκανών και επομένως εφαρμόζεται μόνο όταν τα υπολείμματα Neu5Ac εξουδετερώνονται. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε δείκτης 3- (4-καρβοξυβενζοϊλ) -2-κινολινοκαρβοξαλδεϋδης (CBQCA) για την ανάλυση υδατανθράκων με ανίχνευση LIF συζευγμένων με CE, επιτρέποντας χαμηλά όρια ανίχνευσης υδατανθράκων και χαρτογράφηση N-γλυκανών που προέρχονται από πρωτεΐνες . Το CBQCA αντικαταστάθηκε σταδιακά από αντιδραστήρια που έδωσαν πιο ευαίσθητα και σταθερά παράγωγα όπως: ανθρανιλικό οξύ (2-αμινοβενζοϊκό οξύ, 2-AA) και θειικά αντιδραστήρια όπως αμινοναφθαλινικά τρισουλφονικά οξέα (ANTS) [100], 9-αμινοπυρένιο-1 , 4,6-τρिसουλφονικό οξύ και 8-αμινοπυρένιο 1,3,6-τρिसουλφονικό οξύ (APTS) (Chen, 1996). Τα τελευταία προσφέρουν υψηλότερη γραμμομοριακή απορρόφηση στο μήκος κύματος διέγερσης για παραγοντοποιημένους υδατάνθρακες. Μια βελτίωση της μεθόδου παραγωγοποίησης APTS εισήχθη πρόσφατα από τους Khan et al. (2018) με τη διαθεσιμότητα ενός νέου αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης Teal™. Αυτή η ένωση αποτελείται από τρία τμήματα σουλφονικού οξέος, όπως το APTS, αλλά έχει μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι των γλυκανών. Επομένως, απαιτείται μικρότερο ποσό για την παραγωγοποίηση. Επιπλέον, οι εντάσεις σήματος αυξήθηκαν ελαφρώς σε σχέση με τα παράγωγα APTS.

3.2.3. CE-MS γλυκανών

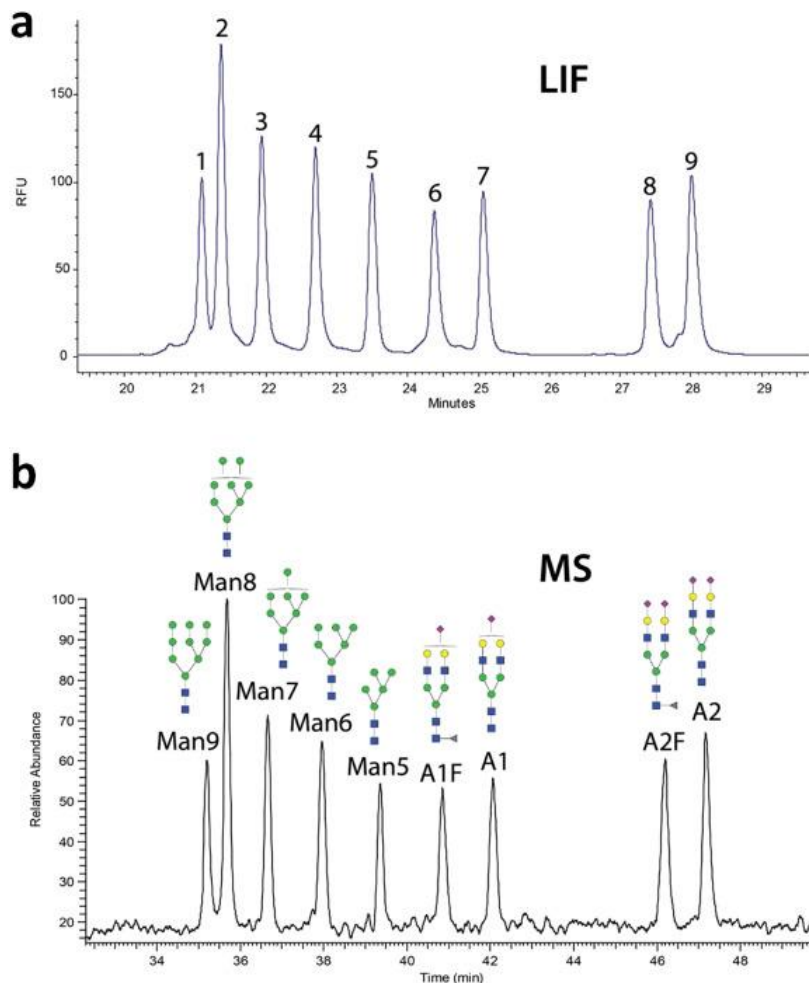
Το σύστημα CE-MS προσφέρει τη δυνατότητα να προσδιοριστεί εύκολα η σύνθεση γλυκάνης χρησιμοποιώντας ακριβείς μετρήσεις μάζας και να ληφθούν πληροφορίες σύνδεσης με πειράματα κατακερματισμού πολλαπλών σταδίων. Η διασύνδεση SL χρησιμοποιείται συχνότερα με CE-MS και για να επιτευχθεί υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης σε αρνητική λειτουργία MS. Αυτό μπορεί να επηρεάσει το διαχωρισμό της γλυκάνης όπως φαίνεται από την εφαρμογή τριαιθυλαμίνης ως SL πρόσθετου. Στη λειτουργία αντίστροφης πολικότητας CE, τα θετικά φορτισμένα ιόντα από το SL εισέρχονται στο τριχοειδές CE και βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα διαχωρισμού δημιουργώντας κινούμενα όρια ιόντων και αλληλεπιδράσεις ιόντων.

Ο διαχωρισμός των αρνητικά φορτισμένων γλυκανών στο CE-MS πραγματοποιείται σχεδόν πάντα σε αντίστροφη πολικότητα CE με ένα ουδέτερο επικαλυμμένο τριχοειδές για την καταστολή του EOF και την εξασφάλιση μεγαλύτερου παραθύρου διαχωρισμού. Τόσο μόνιμες (π.χ. PVA ή PAA) όσο και δυναμικές επικαλύψεις (π.χ. με βάση το διαλυτό PAA) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καταστολή του EOF και η εφαρμογή τους οδηγεί σε παρόμοια προφίλ CE γλυκανών (Bunz et al., 2013). Χρησιμοποιήθηκε επικάλυψη PVA για τη μελέτη της Ο-ακετυλίωσης σε υπολείμματα Neu5Ac N-γλυκανών που ελήφθησαν από ορό ψαριών. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε κατάσταση αντίστροφης πολικότητας CE σε χαμηλό pH και χρησιμοποιήθηκε ένα μικροβιακό ροής για διασύνδεση με MS. Η ανάλυση αποκάλυψε έως και τρία διαφορετικά Ο-ακετυλιωμένα ισομερή για δισυλιωμένες δι- και τριετείς γλυκάνες. Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση μη επισημασμένων N-γλυκανών που απελευθερώθηκαν από ανθρώπινη IgG και ανασυνδυασμένης ανθρώπινης EPO που εκφράστηκε σε κύτταρα ωθηκών κινεζικού χάμστερ. Οι ουδέτερες γλυκάνες μετανάστευσαν με το χαμηλό EOF και δεν διαχωρίστηκαν, ενώ αρκετές σιαλυλιωμένες γλυκάνες διαχωρίστηκαν στο παράθυρο πριν από το EOF. Για να επιτευχθεί μια πιο στιβαρή επίστρωση και επαναλαμβανόμενοι χρόνοι μετανάστευσης, εφαρμόστηκε ένα πολυστρωματικό επίστρωμα PVA για την ανάλυση των N-γλυκανών, η οποία αναφέρθηκε ότι είναι ανώτερη τόσο στην αποτελεσματικότητα διαχωρισμού όσο και στην ευαισθησία ανίχνευσης έναντι των επικαλυμμένων με ένα στρώμα PVA τριχοειδών. Αρκετές N-γλυκάνες που απελευθερώθηκαν από ανθρώπινο ορό διαχωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας MS με διασύνδεση SL.

Σε διαφορετική προσέγγιση, τα φωσφολιπίδια εφαρμόστηκαν ως ημι-μόνιμα επιχρίσματα εσωτερικού τοιχώματος, χρησιμοποιώντας 1,2-διμυριστοϋλ-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη και 1,2-διεπτανουϋλ-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη σε αναλογία συγκέντρωσης 1: 2. Αυτά τα συστατικά τεταρτοταγούς αμμωνίου με μακριές ουρές αλκυλίου αυτοσυναρμολογούνται στην εσωτερική επιφάνεια του τριχοειδούς, σχηματίζοντας έτσι μια σταθερή διπολική διπλή στιβάδα με μηδενικό καθαρό φορτίο ενώ μειώνει το EOF (Langan & Holland, 2012).

Νέες στρατηγικές επισήμανσης έχουν εφαρμοστεί για ανάλυση γλυκανών με CE-MS για περαιτέρω βελτίωση των ορίων ανίχνευσης και απόκτηση δομικών πληροφοριών. Οι N-

γλυκάνες παραγωγοποιημένες με Teal™ αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας πηγή ιόντων νανοψεκασμού SL με βάση ηλεκτροκινητική αντλία με υψηλή περιεκτικότητα σε μεθανόλη στο BGE για διαχωρισμό και υποστήριξη ESI (Σχήμα 17). Διάφορες δομές γλυκάνης διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Teal™ και αποκτήθηκαν παρόμοιες εντάσεις σήματος, σε σύγκριση με την επισήμανση ATPS. Εκτός από την παραγωγοποίηση στο αναγωγικό άκρο, τα υπολείμματα Neu5Ac μπορούν να επισημανθούν για να αποτρέψουν την απώλεια τους κατά την ανάλυση, να εξουδετερώσουν το φορτίο τους ή να λάβουν λεπτομερείς δομικές πληροφορίες κατά την ανάλυση MS. Επομένως, τα υπολείμματα Neu5Ac σε N-γλυκάνες παραγοντοποιήθηκαν με 4- (4,6-διμεθοξυ-1,3,5-τριαζιν-2-υλ) -4-μεθυλομορφολίνιο (DMTMM) για να αμιδώσουν το α2,6-συνδεδεμένο Neu5Ac και να σχηματίσουν λακτόνες με υπολείμματα Neu5Ac συνδεδεμένα με α2,3. Αυτή η αντίδραση σημείωσε κάθε τύπο Neu5Ac με μοναδική μάζα για τον προσδιορισμό ειδικών δεσμών σε σιαλυλιωμένες N-γλυκάνες. Οι N-γλυκάνες παραγοντοποιήθηκαν με DMTMM και ATPS και αναλύθηκαν και με τα δύο CE-MS, χρησιμοποιώντας μια θήκη και μια συσκευή μικρο-ρευστώνγια να ελαχιστοποιηθεί το EOF και να αποφευχθεί η προσρόφηση του δείγματος. Εντοπίστηκαν πολλές δομές 77 N-γλυκάνης που προέρχονται από ανθρώπινο ορό, διαφοροποιώντας μεταξύ ειδικών δεσμών σε σιαλυλιωμένα ισομερή (Snyder et al., 2017).



Σχήμα 19 Ηλεκτρογραφήματα που λαμβάνονται με CZE-LIF (a) και CZE-MS (b). Το εκχυλισθέν ιόν ηλεκτροπρογράμματος και ίχνος LIF δείχνουν τα αποτελέσματα ανάλυσης των κοινών N-γλυκανών (1,25 nMol / mL) που παρατηρήθηκαν σε mAbs, επισημάνθηκαν με Teal™ και διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας υψηλή περιεκτικότητα σε μεθανόλη στο BGE. Η αναλογία σήματος προς θόρυβο του ίχνους LIF είναι σαφώς ανώτερη από την αναλογία του ίχνους MS (Khan et al., 2018)

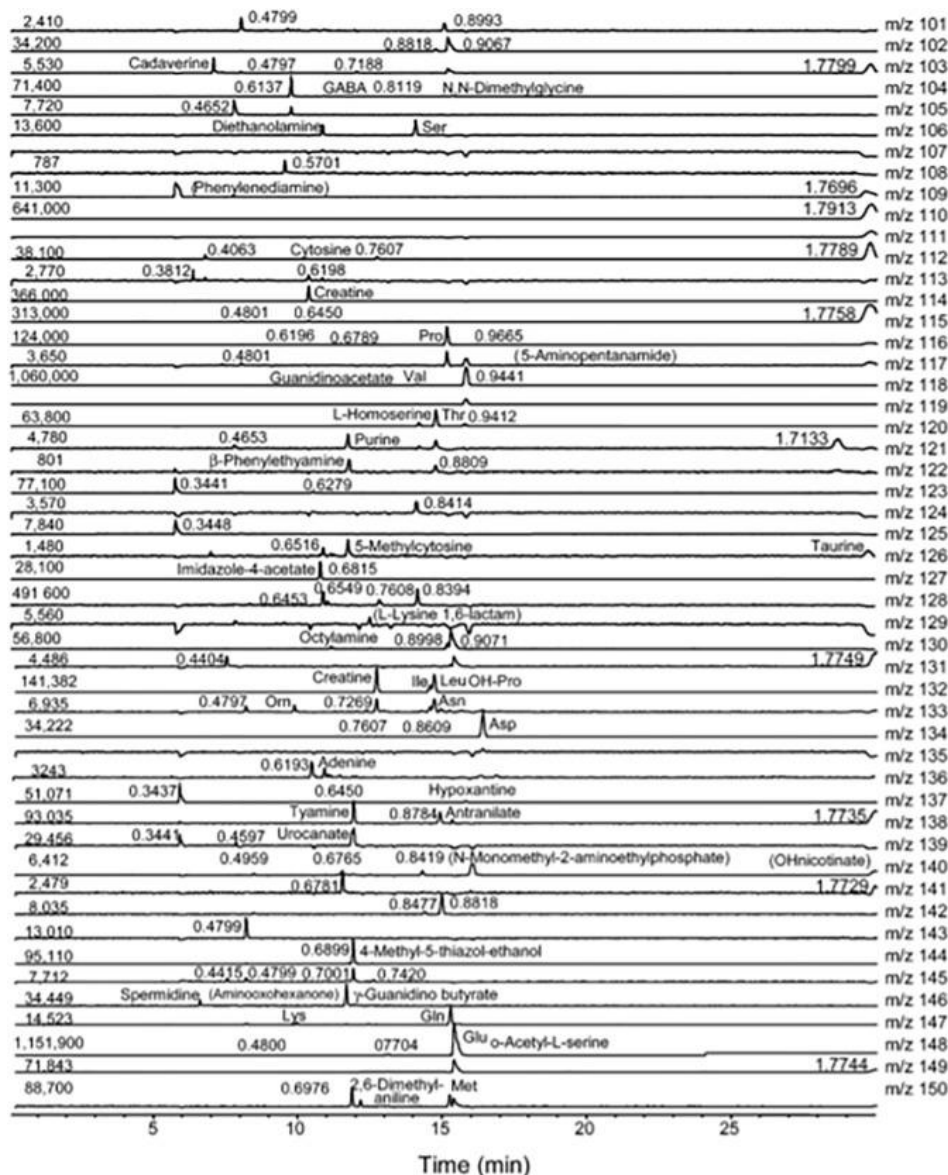
Λόγω των μικρών όγκων έγχυσης που χρησιμοποιούνται στο CE (συνήθως ~ 5–20nL), η ευαισθησία του CE-MS συχνά δεν επαρκεί για την ανάλυση χαμηλών άφθονων γλυκανών σε βιολογικά δείγματα. Για την ανάλυση των προσροφητικών σφαιριδίων ανταλλαγής ανιόντων N-γλυκανών με σήμανση ATPS χρησιμοποιήθηκαν σε μια στερεά φάση εκχύλισης (SPE) -CE που αποτελείται από μια είσοδο, ένα SPE και ένα τριχοειδές διαχωρισμού ενωμένο με ένα πολυμερικό περίβλημα. Η εσωτερική διάμετρος των τριχοειδών εισαγωγής και διαχωρισμού ήταν μικρότερη από τη διάμετρο των σφαιριδίων SPE και του τριχοειδούς SPE, παγιδεύοντας αποτελεσματικά τα σφαιρίδια μεταξύ τριχοειδούς εισόδου και διαχωρισμού. Με την εισαγωγή 90μm σωματιδίων σε τριχοειδή 100μm, δημιουργήθηκε ένα μονό στέλεχος σφαιριδίων που εμπόδισε

καλύτερα την απόφραξη της στήλης SPE από ό, τι με την εφαρμογή συσκευασίας σφαιριδίων πολλαπλών στρωμάτων. Ένας όγκος έγχυσης 10 μL του δείγματος γλυκάνης οδήγησε σε 800 φορές αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης σε σύγκριση με μια ανάλυση CE-MS χρησιμοποιώντας έναν κανονικό όγκο ένεσης. Ωστόσο, η ροή μέσω του τριχοειδούς για τη φόρτωση και την έκλουση των αναλυτών έπρεπε να προσαρμόζεται συνεχώς στη σταδιακά μεταβαλλόμενη αντίθλιψη της κατασκευής SPE. Δυστυχώς, η ευρωστία του SPE-CE είναι ακόμα χαμηλή και επομένως αυτή η προσέγγιση δεν μπορεί ακόμη να εφαρμοστεί κανονικά.

3.3 Συστήματα CE-MS για παγκόσμιες μελέτες μεταβολισμού

Η MS έχει αναδειχθεί ως βασική τεχνολογία για την επιλεκτική και ευαίσθητη ανάλυση των μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα, παρέχοντας τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης και αναγνώρισης των αναλυτών. Συχνά απαιτείται συνδυασμός MS με τεχνική διαχωρισμού front-end προκειμένου να μειωθεί η καταστολή των ιόντων, να επιτραπεί ο διαχωρισμός των ισομερών και των ισομερών και να έχουν πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των μεταβολιτών για αναγνώριση. Μία από τις πρώτες εφαρμογές που ανέφεραν CE-MS σε κλινικό πλαίσιο, προέκυψε από την ομάδα του Presto Elgstoen et al. (2001). Σε αυτό το έργο, αναπτύχθηκε μια μέθοδος CE-MS για την επιλεκτική ανάλυση των μεταβολιτών σε αποξηραμένα σημεία αίματος από ασθενείς με μεταβολική διαταραχή προπιονική οξυουρία. Η CE συζεύχθηκε με MS μέσω διασύνδεσης SL και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός με τριχοειδές BFS χρησιμοποιώντας 20 mM οξικό αμμώνιο (pH 8,5) ως BGE. Περίπου την ίδια περίοδο, οι Soga & Neiger (2000) ανέπτυξαν μια μέθοδο CE-MS για την ανάλυση 19 φυσικών αμινοξέων χωρίς παραγωγοποίηση. Για να καταστεί δυνατή η ταυτόχρονη και επιλεκτική ανάλυση όλων των αμινοξέων με CE-MS, χρησιμοποιήθηκε 1M μυρμηκικό οξύ (pH1,8) ως BGE. Η μέθοδος CE-MS παρείχε όρια ανίχνευσης στο χαμηλό εύρος μM για τα περισσότερα αμινοξέα και η χρησιμότητά της αποδείχθηκε με την ανάλυση της σάλτσας σόγιας, της μπίρας και των ούρων. Οι προσεγγίσεις CE-MS για παγκόσμιες ή μη στοχευμένες μελέτες προφίλ αναπτύχθηκαν από την ίδια ομάδα χρησιμοποιώντας μια πρώτη μέθοδο για τη δημιουργία προφίλ κατιονικών μεταβολιτών, χρησιμοποιώντας μυρμηκικό οξύ 1M (pH1,8) ως BGE και ένα τριχοειδές BFS και μια δεύτερη μέθοδο για τη

δημιουργία προφίλ ανιονικών μεταβολιτών χρησιμοποιώντας ένα κατιονικό επικαλυμμένο με πολυμερές τριχοειδές με 50 mM οξικό αμμώνιο (pH8,5) ως BGE. Χρησιμοποιώντας και τις δύο προσεγγίσεις CE-MS, θα μπορούσαν να παρατηρηθούν > 1600 μεταβολικά χαρακτηριστικά σε ένα εκχύλισμα από *Bacillus subtilis*, εκ των οποίων 150 μπορούσαν να αναγνωριστούν (Σχήμα 18). Οι ανεπτυγμένες προσεγγίσεις CE-MS επέτρεψαν την επιλεκτική και εξαιρετικά αποτελεσματική ανάλυση ενός ευρέος φάσματος τάξεων πολικών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων αμινοξέων, αμινών, νουκλεοσιδίων, νουκλεοτιδίων, οργανικών οξέων και φωσφορικών σακχάρων. Η προσέγγιση CE-MS για το ανιονικό προφίλ βελτιώθηκε περαιτέρω από την ίδια ομάδα την τελευταία δεκαετία. Με βάση αυτές τις μεθόδους CE-MS, οι συγγραφείς ξεκίνησαν την Human Metabolome Technologies (HMT), μια εταιρεία με έδρα την Ιαπωνία η οποία παρέχει διαδικασίες και ροές εργασίας για μεταβολική με βάση το σύστημα CE-MS. Οι προσεγγίσεις CE-MS του HMT χρησιμοποιήθηκαν πρόσφατα για το προφίλ και τον απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό πολικών και φορτισμένων μεταβολιτών σε δείγματα πλάσματος από τη μελέτη Tsuruoka Metabolomics Cohort (> 10.000 ανθρώπινα άτομα) (Harada et al., 2018), απεικονίζοντας έτσι σαφώς την ικανότητα του CE-MS για μελέτες μεγάλης κλίμακας.

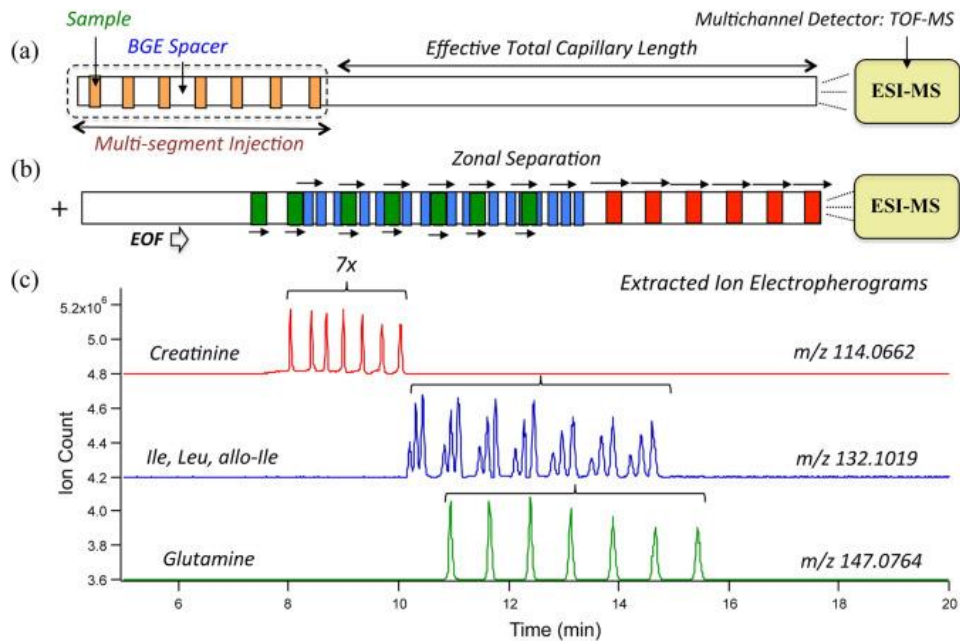


Σχήμα 20 Επιλεγμένα ηλεκτροφόρα ιόντων για κατιονικούς μεταβολίτες που παρατηρούνται σε εκχύλισμα από *Bacillus subtilis* από CE-MS στην περιοχή m/z από 101 έως 150. Ο αριθμός που παρέχεται στην επάνω αριστερή γωνία κάθε ίχνους είναι η αφθονία που σχετίζεται με την υψηλότερη κορυφή του ηλεκτροπρογράμματος (Soga & Neiger, 2000)

Οι περισσότερες μελέτες που βασίζονται σε CE-MS έχουν πραγματοποιηθεί με τη διασύνδεση SL, ωστόσο, το SL παρέχεται γενικά με ρυθμό ροής μεταξύ 5 και 10 μl / λεπτό. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τόσο η CE όσο και το σύστημα ESI-MS έχουν τη βέλτιστη απόδοση σε συνθήκες χαμηλού ρυθμού ροής, το CE-MS θα πρέπει κατά προτίμηση να πραγματοποιείται μέσω μιας διεπαφής η οποία χρησιμοποιεί αποτελεσματικά την εγγενή ιδιότητα διαχωρισμού χαμηλής ροής της CE και τη βελτιωμένη απόδοση ESI υπό αυτές τις συνθήκες. Για παράδειγμα, το CE-MS

χρησιμοποιώντας διεπαφή πορώδους άκρου χωρίς θήκη, έχει αξιολογηθεί για τη δημιουργία προφίλ κατιόντων στα ανθρώπινα ούρα σε συνθήκες διαχωρισμού χαμηλού pH με αποτέλεσμα ένα πλούσιο σε πληροφορίες μεταβολικό προφίλ. Αυτή η προσέγγιση επέτρεψε την αυξημένη κάλυψη των πολικών και φορτισμένων μεταβολιτών του μεταβολώματος των ούρων με όρια ανίχνευσης νανομορίων. Περίπου 900 μοριακά χαρακτηριστικά ανιχνεύθηκαν με θήκη CE-MS, ενώ 300 παρατηρήθηκαν με SL CE-MS. Οι Hirayama et al. (2012) αξιολόγησαν επίσης την απόδοση αυτής της προσέγγισης και έλαβαν δεκαπλάσια αύξηση στον αριθμό των ανιχνευόμενων κορυφών σε σύγκριση με τις μεθόδους SL CE-MS. Η μακροπρόθεσμη απόδοση αυτής της προσέγγισης πρέπει ακόμη να αξιολογηθεί σε πιο εκτεταμένες μελέτες που αναλύουν μεγαλύτερο αριθμό κλινικών δειγμάτων. Η διεπαφή πορώδους άκρου χωρίς θήκη αξιολογήθηκε επίσης για ανιονικούς μεταβολίτες χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες διαχωρισμού με τα κατιόντα, αλλά με αντίστροφη ανίχνευση MS και πολικότητα διαχωρισμού CE. Ένα ευρύ φάσμα κατηγοριών ανιονικών μεταβολιτών θα μπορούσε να χαρακτηριστεί υπό αυτές τις συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των φωσφορικών σακχάρων, των νουκλεοτιδίων και των οργανικών οξέων. Ένας όγκος έγχυσης περίπου 20nL είχε ως αποτέλεσμα τα νανομοριακά όρια ανίχνευσης, το οποίο ήταν μια σημαντική αύξηση σε σύγκριση με τα όρια ανίχνευσης μικρομοριακών που λαμβάνονται συνήθως με κλασικές μεθόδους SL CE-MS.

Οι προσεγγίσεις μεταβολικού προφίλ χρησιμοποιούνται πλέον ευρύτερα για μελέτες φαινοτύπων μεγάλης κλίμακας (π.χ. κλινικά δείγματα από Biobanks). Επομένως, η ικανότητα ανάλυσης χιλιάδων βιολογικών δειγμάτων με αξιόπιστη ακρίβεια υψηλής απόδοσης καθίσταται κρίσιμη. Σε αυτό το πλαίσιο, η πρόσφατα αναπτυγμένη προσέγγιση CE-MS έγχυσης πολλαπλών τμημάτων μπορεί να θεωρηθεί πρακτικό εργαλείο, καθώς αυτή η προσέγγιση επιτρέπει τη σειριακή υδροδυναμική έγχυση επτά ή περισσότερων διακριτών τμημάτων δείγματος εντός ενός μόνο τριχοειδούς (Σχήμα 19). Η απόδοση δείγματος αυξάνεται έως και μία τάξη μεγέθους χωρίς καταστολή / ενίσχυση ιόντων, διατηρώντας παράλληλα την απόδοση διαχωρισμού (Kuehnbaum et al., 2013).



Σχήμα 21 Έγχυση πολλαπλών τμημάτων σε CE-MS. (A) Πολλαπλός διαχωρισμός βάσει σειριακής έγχυσης επτά διακριτών τμημάτων δείγματος εντός ενός τριχοειδούς με έγχυση πολλαπλών τμημάτων CE-MS (B) τα ιόντα μεταναστεύουν ως σειρά ζωνών σε ελεύθερο διάλυμα πριν από τον ιονισμό. (C) η διαδικασία καθιστά δυνατή την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση των πολικών μεταβολιτών και των ισομερών τους σε διαφορετικά δείγματα καθώς ο ιονισμός πραγματοποιείται εντός μικρού χρονικού διαστήματος ($\approx 2-6$ λεπτά) υπό συνθήκες σταθερής κατάστασης κατά τη χρήση ESI-MS (Kuehnbaum et al., 2013).

Σε σύγκριση με άλλες αναλυτικές τεχνικές, η χρήση του CE-MS στη μεταβολομική δεν έχει ακόμη καθιερωθεί. Ωστόσο, με τις πρόσφατες εξελίξεις στα βελτιωμένα σχέδια διασύνδεσης, αναμένεται ότι αυτή η προσέγγιση θα εξεταστεί περισσότερο για το προφίλ σε βιολογικά δείγματα με περιορισμένο υλικό, όπως αναλύσεις μεμονωμένων κυττάρων. Επομένως, αναπτύχθηκε πρόσφατα μια πλήρης αναλυτική ροή εργασίας με βάση το CE-MS που χρησιμοποιεί μια διεπαφή SL χαμηλής ροής. Μια σύγκριση με το HILIC-MS και το LC-MS αντίστροφης φάσης έδειξε ότι το CE-MS είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για τη δημιουργία προφίλ αμινοξέων, θεικών και φωσφορυλιωμένων ενώσεων, απεικονίζοντας έτσι σαφώς την προστιθέμενη αξία του CE-MS για μεταβολομική (Drouin et al., 2018).

Συμπεράσματα

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) έγινε ένα ισχυρό εργαλείο στις βιοεπιστήμες με την ταχεία και αποτελεσματική ανάλυση μικρών πολύ πολικών ενώσεων και μεγάλων βιομορίων όπως το DNA, τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες. Πολλές από αυτές τις ενώσεις αναλύονται συχνά με πιο ισχυρά και ευαίσθητα συστήματα, εν μέρει λόγω των εξελίξεων σε άλλες τεχνικές όπως την υγρή χρωματογραφία LC. Ωστόσο, υπάρχουν εφαρμογές όπου η CE αποδίδει καλύτερα ή παρέχει συμπληρωματικές πληροφορίες, και σε αυτούς τους τομείς οι διάφορες λειτουργίες CE έχουν καταστεί απαραίτητες τεχνικές. Επιπλέον, αρκετές εξελίξεις στα όργανα και τις εφαρμογές εξασφάλισαν ότι η CE δεν θεωρείται πλέον ως μη εφαρμόσιμη τεχνική. Επιπλέον, η ανάπτυξη προσβάσιμων μικροσκοπικών συσκευών, που επιτρέπει πολύ γρήγορες αναλύσεις, συμβάλλει στην εφαρμογή του CE ως ελκυστικής εναλλακτικής λύσης για αναλύσεις ρουτίνας υψηλής απόδοσης.

Η ηλεκτροφόρηση της τριχοειδούς ζώνης (CZE), η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση γέλης (CGE) και η τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση (CIEF) χρησιμοποιούνται επί του παρόντος στη φαρμακευτική βιομηχανία και σε άλλα εργαστήρια για τον χαρακτηρισμό των ανέπαφων πρωτεϊνών. Σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας MS, η CE χρησιμοποιείται για την γρήγορη επίλυση των γλυκομορφών πρωτεΐνης με υψηλή ανάλυση και για την ταυτοποίηση των ενώσεων. Η ανάλυση των απελευθερωμένων γλυκανών σε αντίθεση πραγματοποιείται συνήθως με CZE- ή CGE σε συνδυασμό με ανίχνευση LIF, επειδή τα όρια ανίχνευσης με το σύστημα CE-MS δεν επαρκούν λόγω των χαμηλών όγκων έγχυσης σε CE. Οι πρόσφατες εξελίξεις στις διεπαφές MS οδήγησαν σε χαμηλότερα όρια ανίχνευσης με το CE-MS, αν και η ανίχνευση φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ LIF παραμένει ασυναγώνιστη. Παρά τα υψηλότερα όρια ανίχνευσης, αναμένεται ότι η εφαρμογή του CE-MS σε αυτόν τον τομέα θα αυξηθεί με την αυξανόμενη ζήτηση για βιοδείκτες γλυκανών. Η CE είναι ελκυστική για το κλινικό πεδίο, καθώς ο όγκος του δείγματος για την ανάλυση πολικών μικρών μορίων σε μελέτες ήταν περιορισμένος. Επιπλέον, η υψηλή ανάλυση είναι σημαντική κατά τη δημιουργία προφίλ βιολογικών δειγμάτων που περιέχουν μεγάλο αριθμό μεταβολιτών και επομένως σήμερα το σύστημα CE (-MS) εφαρμόζεται συνήθως στο πεδίο της μεταβολομικής. Η CE

είναι πλέον μια καθιερωμένη τεχνική στους τομείς που περιγράφονται σε αυτήν την κτην εργασία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Angell, A. R., Mata, L., de Nys, R., & Paul, N. A. (2016). The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 511–524. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0650-1>
- Batz, N. G., Mellors, J. S., Alarie, J. P., & Ramsey, J. M. (2014). Chemical vapor deposition of aminopropyl silanes in microfluidic channels for highly efficient microchip capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 86(7), 3493–3500. <https://doi.org/10.1021/ac404106u>
- Biacchi, M., Gahoual, R., Said, N., Beck, A., Leize-Wagner, E., & François, Y. N. (2015). Glycoform Separation and Characterization of Cetuximab Variants by Middle-up Off-Line Capillary Zone Electrophoresis-UV/Electrospray Ionization-MS. *Analytical Chemistry*, 87(12), 6240–6250. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00928>
- Bunz, S. C., Rapp, E., & Neusüss, C. (2013). Capillary electrophoresis/mass spectrometry of APTS-labeled glycans for the identification of unknown glycan species in capillary electrophoresis/laser-induced fluorescence systems. *Analytical Chemistry*, 85(21), 10218–10224. <https://doi.org/10.1021/ac401930j>
- Chen, F. A. (1996). *Acid-catalyzed reductive amination of aldoses with*. 347–351.
- Dai, J., Lamp, J., Xia, Q., & Zhang, Y. (2018). Capillary Isoelectric Focusing-Mass Spectrometry Method for the Separation and Online Characterization of Intact Monoclonal Antibody Charge Variants. *Analytical Chemistry*, 90(3), 2246–2254. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04608>
- Dawod, M, Arvin, N., & Kennedy, R. (2017). Recent advances in protein analysis by capillary and microchip electrophoresis. In *Analyst* (Vol. 142, Issue 11). <https://doi.org/10.1039/c7an00198c>.Recent
- Dawod, Mohamed, Arvin, N. E., & Kennedy, R. T. (2017). Recent advances in protein analysis by capillary and microchip electrophoresis. In *Analyst* (Vol. 142, Issue 11). <https://doi.org/10.1039/c7an00198c>
- do Lago, C. L., Vidal, D. T. R., Francisco, K. J. M., & dos Santos, V. B. (2014). A simple approach to compensate the suction caused by the electrospray ionization source in

- capillary electrophoresis-mass spectrometry systems. *Electrophoresis*, 35(16), 2412–2416. <https://doi.org/10.1002/elps.201300651>
- Dovich, N. J., & Zhang, J. (2000). How Capillary Electrophoresis Sequenced the Human Genome This Essay is based on a lecture given at the Analytica 2000 conference in Munich (Germany) on the occasion of the Heinrich-Emanuel-Merck Prize presentation. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 39(24), 4463–4468. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20001215\)39:24<4463::aid-anie4463>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20001215)39:24<4463::aid-anie4463>3.0.co;2-8)
- Drouin, N., Pezzatti, J., Gagnebin, Y., González-Ruiz, V., Schappler, J., & Rudaz, S. (2018). Effective mobility as a robust criterion for compound annotation and identification in metabolomics: Toward a mobility-based library. *Analytica Chimica Acta*, 1032, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.063>
- Everaerts, F., Beckers, J., Verheggen, T., & Beckers, J. (1976). *Isotachophoresis: Theory, Instrumentation and Applications Elsevier, Amsterdam.*
- Fekete, S., Guillarme, D., Sandra, P., & Sandra, K. (2016). Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Analytical Chemistry*, 88(1), 480–507. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04561>
- Fesmire, J. (2018). A Brief Review of Other Notable Electrophoretic Methods. In *Electrophoretic Separation of Proteins* (pp. 459–499).
- Garza, S., Chang, S., & Moini, M. (2007). Simplifying capillary electrophoresis-mass spectrometry operation: Eliminating capillary derivatization by using self-coating background electrolytes. *Journal of Chromatography A*, 1159(1–2), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.038>
- Gaunitz, S., Nagy, G., Pohl, N. L. B., & Novotny, M. V. (2017). Recent Advances in the Analysis of Complex Glycoproteins. *Analytical Chemistry*, 89(1), 389–413. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04343>
- González-Ruiz, V., Codesido, S., Far, J., Rudaz, S., & Schappler, J. (2016). Evaluation of a new low sheath-flow interface for CE-MS. *Electrophoresis*, 37(7–8), 936–946. <https://doi.org/10.1002/elps.201500523>

- Good, D., Cummins-Bitz, S., Fields, R., & Brian, K. (2004). Capillary Electrophoresis of Proteins in a Quality Control Environment. In *Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptides*. Humana Press.
- Gottardo, R., Mikšík, I., Aturki, Z., Sorio, D., Seri, C., Fanali, S., & Tagliaro, F. (2012). Analysis of drugs of forensic interest with capillary zone electrophoresis/time-of-flight mass spectrometry based on the use of non-volatile buffers. *Electrophoresis*, *33*(4), 599–606. <https://doi.org/10.1002/elps.201100383>
- Hajba, L., & Guttman, A. (2017). Recent advances in column coatings for capillary electrophoresis of proteins. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *90*, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.02.013>
- Han, M., Phan, D., Nightlinger, N., Taylor, L., Jankhah, S., Woodruff, B., Yates, Z., Freeman, S., Guo, A., Balland, A., & Pettit, D. (2006). Optimization of CE-SDS method for antibody separation based on multi-users experimental practices. *Chromatographia*, *64*(5–6), 335–342. <https://doi.org/10.1365/s10337-006-0825-7>
- Harada, S., Hirayama, A., Chan, Q., Kurihara, A., Fukai, K., Iida, M., Kato, S., Sugiyama, D., Kuwabara, K., Takeuchi, A., Akiyama, M., Okamura, T., Ebbels, T. M. D., Elliott, P., Tomita, M., Sato, A., Suzuki, C., Sugimoto, M., Soga, T., & Takebayashi, T. (2018). Reliability of plasma polar metabolite concentrations in a large-scale cohort study using capillary electrophoresis-mass spectrometry. *PLoS ONE*, *13*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191230>
- Haselberg, R., De Jong, G. J., & Somsen, G. W. (2013). Low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry for sensitive glycoform profiling of intact pharmaceutical proteins. *Analytical Chemistry*, *85*(4), 2289–2296. <https://doi.org/10.1021/ac303158f>
- He, M., Luo, P., Hong, J., Wang, X., Wu, H., Zhang, R., Qu, F., Xiang, Y., & Xu, W. (2019). Structural Analysis of Biomolecules through a Combination of Mobility Capillary Electrophoresis and Mass Spectrometry. *ACS Omega*, *4*(1), 2377–2386. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03224>
- Hernández-Borges, J., Neusüß, C., Cifuentes, A., & Pelzing, M. (2004). On-line capillary

- electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of biomolecules. *Electrophoresis*, 25(14), 2257–2281. <https://doi.org/10.1002/elps.200405954>
- Hirayama, A., Tomita, M., & Soga, T. (2012). Sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry with a high-sensitivity porous sprayer for cationic metabolome analysis. *Analyst*, 137(21), 5026–5033. <https://doi.org/10.1039/c2an35492f>
- Huck, C. W., & Bonn, G. K. (2008). Analysis of proteins by capillary electrophoresis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 384, 507–540. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-376-9_20
- Hunt, G., & Nashabeh, W. (1999). Capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate nongel sieving analysis of a therapeutic recombinant monoclonal antibody: A biotechnology perspective. *Analytical Chemistry*, 71(13), 2390–2397. <https://doi.org/10.1021/ac981209m>
- Hwang, K. H., Lee, K. W., Kim, C. S., Han, K., Chung, Y. B., & Moon, D. C. (2001). Determination of Recombinant Human Epidermal Growth Factor (rhEGF) in a Pharmaceutical Preparation by Capillary Electrophoresis. *Archives of Pharmacal Research*, 24(6), 601–606. <https://doi.org/10.1007/BF02975173>
- Izco, J. M., Isabel Ordóñez, A., Torre, P., & Barcina, Y. (1999). Validation of capillary electrophoresis in the analysis of ewe's milk casein. *Journal of Chromatography A*, 832(1–2), 239–246. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00965-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00965-0)
- Jacobson, S., Hergenroder, R., Koutny, L., & Ramsey, J. (1994). High-speed separations on a microchip. *Anal. Chem.*, 66, 1114–1118.
- Jochheim, C., Novick, S., Balland, A., Mahan-Boyce, J., Wang, W. C., Goetze, A., & Gombotz, W. (2001). Separation of Enbrel® (rhuTNFR:Fc) isoforms by capillary isoelectric focusing. *Chromatographia*, 53(SUPPL.), 59–65. https://doi.org/10.1007/978-3-322-83021-0_7
- Jorgenson, J., & Lukacs, K. (1981). Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries. *Anal. Chem.*, 53, 1298–1302.
- Khan, S., Liu, J., Szabo, L., Kunnummal, B., Han, X., Ouyang, R., Linhardt, R., & Xia, Q.

- (2018). *On-line capillary electrophoresis/laser-induced fluorescence/mass spectrometry analysis of glycans labeled with Teal fluorescent dye using an electrokinetic sheath liquid pump-based nanospray ion source* *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, *32*, pp. 882-888.
- Kinoshita, M., Nakatsuji, Y., Suzuki, S., Hayakawa, T., & Takehi, K. (2013). Quality assurance of monoclonal antibody pharmaceuticals based on their charge variants using microchip isoelectric focusing method. *Journal of Chromatography A*, *1309*, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.021>
- Krenkova, J., Kleparnik, K., Grym, J., Luksch, J., & Foret, F. (2016). Self-aligning subatmospheric hybrid liquid junction electrospray interface for capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, *37*(3), 414–417. <https://doi.org/10.1002/elps.201500357>
- Kubota, K., Kobayashi, N., Yabuta, M., Ohara, M., Naito, T., Kubo, T., & Otsuka, K. (2017). Identification and characterization of a thermally cleaved fragment of monoclonal antibody-A detected by sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *140*, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.03.027>
- Kuehnbaum, N. L., Kormendi, A., & Britz-Mckibbin, P. (2013). Multisegment injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry: A high-throughput platform for metabolomics with high data fidelity. *Analytical Chemistry*, *85*(22), 10664–10669. <https://doi.org/10.1021/ac403171u>
- Langan, T. J., & Holland, L. A. (2012). Capillary electrophoresis coupled to electrospray mass spectrometry through a coaxial sheath flow interface and semi-permanent phospholipid coating for the determination of oligosaccharides labeled with 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonic acid. *Electrophoresis*, *33*(4), 607–613. <https://doi.org/10.1002/elps.201100449>
- Ma, S., & Nashabeh, W. (2001). Analysis of protein therapeutics by capillary electrophoresis. *Chromatographia*, *53*(SUPPL.). https://doi.org/10.1007/978-3-322-83021-0_9

- Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O., & Jensen, I. J. (2018). Protein determination—method matters. *Foods*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/foods7010005>
- Maxwell, E. J., Zhong, X., Zhang, H., Van Zeijl, N., & Chen, D. D. Y. (2010). Decoupling CE and ESI for a more robust interface with MS. *Electrophoresis*, 31(7), 1130–1137. <https://doi.org/10.1002/elps.200900517>
- Presto Elgstoen, K. B., Zhao, J. Y., Anacleto, J. F., & Jellum, E. (2001). Potential of capillary electrophoresis, tandem mass spectrometry and coupled capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry as diagnostic tools. *Journal of Chromatography A*, 914(1–2), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01117-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01117-1)
- Redman, E. A., Mellors, J. S., Starkey, J. A., & Ramsey, J. M. (2016). Characterization of Intact Antibody Drug Conjugate Variants Using Microfluidic Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 88(4), 2220–2226. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03866>
- Said, N., Gahoual, R., Kuhn, L., Beck, A., François, Y. N., & Leize-Wagner, E. (2016). Structural characterization of antibody drug conjugate by a combination of intact, middle-up and bottom-up techniques using sheathless capillary electrophoresis - Tandem mass spectrometry as nanoESI infusion platform and separation method. *Analytica Chimica Acta*, 918, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.006>
- Salas-Solano, O., Babu, K., Park, S. S., Zhang, X., Zhang, L., Sobic, Z., Boumajny, B., Zeng, M., Cheng, K. C., Reed-Bogan, A., Cummins-Bitz, S., Michels, D. A., Parker, M., Bonasia, P., Hong, M., Cook, S., Ruesch, M., Lamb, D., Bolyan, D., ... Nunnally, B. (2011). Intercompany study to evaluate the robustness of capillary isoelectric focusing technology for the analysis of monoclonal antibodies. *Chromatographia*, 73(11–12), 1137–1144. <https://doi.org/10.1007/s10337-011-2017-3>
- Salas-Solano, O., Tomlinson, B., Du, S., Parker, M., Strahan, A., & Ma, S. (2006). Optimization and validation of a quantitative capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate method for quality control and stability monitoring of monoclonal antibodies. *Analytical Chemistry*, 78(18), 6583–6594. <https://doi.org/10.1021/ac060828p>

- Sapan, C. V., & Lundblad, R. L. (2015). Review of methods for determination of total protein and peptide concentration in biological samples. *Proteomics - Clinical Applications*, 9(3–4), 268–276. <https://doi.org/10.1002/prca.201400088>
- Sastre Toraño, J., Ramautar, R., & de Jong, G. (2019). Advances in capillary electrophoresis for the life sciences. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1118–1119, 116–136. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.020>
- Schenerman, M. A., & Bowen, S. H. (2001). Optimization, validation, and use of capillary gel electrophoresis for quality control testing of Synagis®, a monoclonal antibody. *Chromatographia*, 53(SUPPL.), 66–74. https://doi.org/10.1007/978-3-322-83021-0_8
- Shimura, K. (2009). Recent advances in IEF in capillary tubes and microchips. *Electrophoresis*, 30(1), 11–28. <https://doi.org/10.1002/elps.200800615>
- Silvertand, L. H. H., Toraño, J. S., de Jong, G. J., & van Bennekom, W. P. (2009). Development and characterization of cIEF-MALDI-TOF MS for protein analysis. *Electrophoresis*, 30(10), 1828–1835. <https://doi.org/10.1002/elps.200800740>
- Smith, M. T., Zhang, S., Adams, T., DiPaolo, B., & Dally, J. (2017). Establishment and validation of a microfluidic capillary gel electrophoresis platform method for purity analysis of therapeutic monoclonal antibodies. *Electrophoresis*, 38(9–10), 1353–1365. <https://doi.org/10.1002/elps.201600519>
- Smith, R. D., Barinaga, C. J., & Udseth, H. R. (1988). Improved Electrospray Ionization Interface for Capillary Zone Electrophoresis-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 60(18), 1948–1952. <https://doi.org/10.1021/ac00169a022>
- Snyder, C. M., Zhou, X., Karty, J. A., Fonslow, B. R., Novotny, M. V., & Jacobson, S. C. (2017). Capillary electrophoresis–mass spectrometry for direct structural identification of serum N-glycans. *Journal of Chromatography A*, 1523, 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.009>
- Soga, T., Igarashi, K., Ito, C., Mizobuchi, K., Zimmermann, H. P., & Tomita, M. (2009). Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81(15), 6165–6174.

<https://doi.org/10.1021/ac900675k>

Soga, T., & Neiger, D. N. (2000). Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72(6), 1236–1241.

<https://doi.org/10.1021/ac990976y>

Stutz, H. (2005). Advances in the analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray-mass spectrometry detection. *Electrophoresis*, 26(7–8), 1254–1290.

<https://doi.org/10.1002/elps.200410130>

Suba, D., Urbányi, Z., & Salgó, A. (2015). Capillary isoelectric focusing method development and validation for investigation of recombinant therapeutic monoclonal antibody. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 114, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.04.037>

Suba, D., Urbányi, Z., & Salgó, A. (2016). Method development and qualification of capillary zone electrophoresis for investigation of therapeutic monoclonal antibody quality. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1032, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.026>

Swerdlow, H., & Gesteland, R. (1990). Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, 18(6), 1415–1419. <https://doi.org/10.1093/nar/18.6.1415>

Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., & Ando, T. (1984). Electronic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal. Chem.*, 56, 111–113.

Wätzig, H., Degenhardt, M., & Kunkel, A. (1998). *Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications*. *Electrophoresis*, 19(16-17), 2695–2752.

Yamashita, M., & Fenn, J. B. (1984). Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *Journal of Physical Chemistry*, 88(20), 4451–4459. <https://doi.org/10.1021/j150664a002>

Yin, Y., Li, G., Guan, Y., & Huang, G. (2016). Sheathless interface to match flow rate of

capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry using regular-sized capillary. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 30, 68–72. <https://doi.org/10.1002/rcm.7621>

Zhong, X., Maxwell, E. J., Ratnayake, C., Mack, S., & Chen, D. D. Y. (2011). Flow-through microvial facilitating interface of capillary isoelectric focusing and electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8748–8755. <https://doi.org/10.1021/ac202130f>