



**Válasz Dr. Kádas János ügyvezető úr
opponensi véleményére**

Doktorjelölt: Szigeti Márton Géza

Doktori disszertáció címe: Analitikai módszerfejlesztés az N-glikánok kapilláris elektroforézissel történő elválasztásához

Témavezető: Dr. Guttman András, D.Sc.

Tisztelt Dr. Kádas János Úr!

Köszönöm az Analitikai módszerfejlesztés az N-glikánok kapilláris elektroforézissel történő elválasztásához címmel írt Ph.D. értekezéssel kapcsolatos írt bírálatát, részletes szakmai véleményét, észrevételeit. A műhelyvitán elhangzottak, valamint az előbírálathoz javasolt javítások legjobb tudásom szerint bekerültek a disszertációba. Köszönöm biztató szavait és a bírálatában megfogalmazott gondolatait. Megfogalmazott kérdéseire azok sorrendjének megfelelően röviden az alábbiakban válaszolok.

1) A „Vizsgálati eredmények és kiértékelésük” fejezet 4.1. pontjában olvashatunk a glikomódosított (glycoengineered – geAb) fehérje analíziséről. Ezek a fehérjék miben különböznek a konvencionális biológiai készítményektől (szerkezet, előállítás módja, stb.), van esetleg nyilvános / nyilvánosságra hozható információ?

A doktori munkám során rendelkezésemre állt, a Roche GmbH által készített fejlesztési fázisban levő fehérjéről sajnos nem állt rendelkezésre mélyre ható szerkezeti – vagy egyéb információ. Az N-glikánok analízisével kapcsolatos probléma annak kapcsán merült fel, hogy a linkerekkel kapcsolt részegységek térbeli orientációja kapcsán a kötött cukor struktúrák olyan térbeli pozícióba kerültek, hogy az emésztéshez használt PNGase F enzim nem fért megfelelően hozzá, ami nem csak az enzimes folyamat időbeli lefutására volt hatással, hanem csúcsaránybeli változást is okozott, mely fals analitikai eredményekhez vezetett. A napjainkban folyó – a szabadalmak lejáratával kapcsolatban egyre nagyobb mértékben meghatározó – bioszimiláris gyártás, és természetesen az újabb és újabb originátor fejlesztések titkosított jellege limitált



lehetőséget adnak a disszertációmban bemutatott jellegű kutatások valós elmélyítésére, részletes információk megszerzésére.

2) Ugyan ebben a pontban (4.1.) láthatjuk a fehérjék cIEF analízis eredményeit (40. oldal). Az eredményeket értékelve milyen különbséget láthatunk a klasszikus ioncserélő oszlopkromatográfiával összehasonlítva? Történt összehasonlítás a módszerek között? Az eredmények alapján ez a módszer sokkal jobbnak és gyorsabbnak tűnik.

Ugyan mind a két – HPLC és CE – technika jelen van a gyógyszeripari gyakorlatban, egyre nagyobb teret kap a kapilláris elektroforézis technikával történő izoelektromos pont meghatározás. Ahogy a kérdésben is megjelenik, szignifikáns különbség van nem csak az analízis időben, hanem a mintaelőkészítés idővonzatát illetően is, mely jelentősen lecsökkenti a mérés költségét. Mindemellett, a kapilláris elektroforézissel végzett izoelektromos pont meghatározás közelebb áll a valós elméleti ponthoz, mert a mérés során csak karbamid segítségével denaturáljuk a mintát, és a kapillárisban valós gradiens hozható létre. A két technika a vizsgált fehérjével kapcsolatban nem lett összehasonlítva.

3) A fejezet 4.2. pontjában olvashatunk a glikánanalízis mintaelőkészítéshez kapcsolható glükóz hatás problémáról (48. oldal). Az eddigi tudományos (és ipari analitikai) méréseket mennyiben befolyásolja az, hogy idézve a jelöltet: „csupán marginális utalásokat tett az esetleges jelenségre.” Az eddigi biomarker keresések – ahol a glikoziláció is szóba kerül – nem válhatnak kérdésessé?

A biomarkerek és gyógyszeripari fehérjék esetén abban az esetben jelentkezhet ez a probléma, ha a formuláló puffer a fehérje tulajdonságai okán, vagy az alkalmazásból kifolyólag nagy mennyiségű cukrot tartalmaz. Az ekkor alkalmazott puffer cseréhez képest a kidolgozott módszer előnye, hogy nem igényel költséges, hosszadalmas centrifugálással történő szűrési eljárásokat, könnyen automatizálható, egyszerűbb és gyorsabb eljárást tesz lehetővé.

4) Ugyan ebben a pontban, az 53. oldalon olvashatunk arról, hogy a csúcsarányok szignifikánsan nem változnak a módosított mintafeldolgozás során. Ez melyik ábrán láthatjuk a nem módosított mintafeldolgozáshoz viszonyítva?

Kiemelt fontosságú az analitikai módszerek fejlesztése során, hogy az esetleges változtatások során nem hozunk létre műterméket. A glikánok abszolút és relatív mennyisége kiemelten



fontos a biológikumok minősítése során, mert ezek alapján állapítható meg a szervezet potenciális immunválasza a készítménnyel szemben. A módszerfejlesztés során minden esetben hIgG1 standard fehérjével végeztem a fejlesztési folyamat kezdeti fázisaiban a méréseket, ahol a kapott eredményeket mindig a kontrol futtatásokhoz hasonlítottam mind intenzitás, mind a kapott profil különbségeinek szempontjából. A doktori dolgozat szükségszerűen tartalmaz egyszerűsítéseket, így nem minden lépés volt mélységeiben kifejtve, így nem minden részeredmény került megjelenítésre.

5) A „Vizsgálati eredmények és kiértékelésük” fejezet utolsó, (4.4.) pontjában az „Automatizált N-glikán szekvenálás” részletesen foglalkozik a glikánanalízis ipari szempontból is nagyon fontos gyorsítási és automatizálási lehetőségével, annak eredményeivel. Vannak-e további tervek a továbbfejlesztésre? Van-e már esetleg a piacon hasonló fejlesztés? Van-e esetleg ipari partner részéről érdeklődés?

Tervek vannak mind a mai napig, sajnos az élet úgy hozta, hogy ezeket a jelen tudásom szerint nem én fogom megvalósítani. Az automatizálás kérdése sokkal inkább jelen lévő tendencia már a mindennapjainkban, mint azt szeretnénk bevallani. Gazdasági szempontból továbbra is az ember a legdrágább a folyamatban, és a mesterséges intelligencia megjelenésével komplex feladatok az automatizálás irányába mozdulnak. Mindezek ellenére az automatizálása egy mintaelőkészítésnek csak az első pillanatban tűnik triviálisnak, egy teljes glikán analízis robotra ültetése ugyan nem megvalósíthatatlan feladat, azonban a kialakított módszer reprodukálhatóságának és minőségbiztosításának feladata ma még nagyobb költséget hordoz magában, minthogy megérje vele érdemben, mélységében foglalkozni.

Veszprém, 2025. november 19.

Szigeti Márton Géza
doktorjelölt