

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A mérési paraméterek és az elválasztó közeg összetételének hatása  
terápiás fehérjék nátrium dodecil szulfát kapilláris  
gélelektroforézise során**

Filep Csenge Boróka

Témavezető: Prof. Dr. Guttman András



DEBRECENI EGYETEM  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2025

# A MÉRÉSI PARAMÉTEREK ÉS AZ ELVÁLASZTÓ KÖZEG ÖSSZETÉTELÉNEK HATÁSA TERÁPIÁS FEHÉRJÉK NÁTRIUM DODECIL SZULFÁT KAPILLÁRIS GÉLELEKTROFORÉZISE SORÁN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az **elméleti orvostudományok** tudományágban

Írta: **Filep Csenge Boróka** okleveles **biomérnök**

Készült a Debreceni Egyetem **Molekuláris Orvostudomány** doktori iskolája  
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Guttman András, az MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Gáspár Attila, az MTA doktora

Prof. Dr. Szökő Éva, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Gáspár Attila, az MTA doktora

Dr. Novák Levente, PhD

Prof. Dr. Szökő Éva, az MTA doktora

Dr. Tábi Tamás, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati  
Intézet "A" épületének tanterme, 2026. január 15. 13:00 óra

# 1. Bevezetés és célkitűzések

A 10 napjainkban legnagyobb piaci aránnyal rendelkező gyógyszeripari termék közül nyolc valamilyen bioterápiás fehérjekészítmény. Az optimalizált kezelés érdekében a hagyományos kis molekulatömegű gyógyszeres terápiák kiegészíthetők vagy helyettesíthetők terápiás fehérjékkel, mint például monoklonális antitestek és fúziós fehérjék, a hematológiai és szolidtumороk, valamint autoimmun és gyulladásos betegségek kezelése esetében. Ezen gyógyszerként alkalmazott fehérjéknek a jellemzése rendkívüli kihívások elé állítja a gyógyszeripart, a terápiás fehérjék tisztaságának ellenőrzése, illetve az esetleges szerkezeti eltérések felderítése fontos a minőségellenőrzés szempontjából. A biológiai eredetű gyógyszerkészítmények karakterizálása során a kapilláris elektroforézis (CE) különféle elválasztási módjait rutinszerűen alkalmazzák a minőségellenőrzés során és a fehérje méret és töltés heterogenitásának felmérésére a gyógyszeriparban.

A kapilláris gélelektroforézis (CGE) lehetővé teszi a poliionos makromolekulák hidrodinamikai térfogatuk szerinti elválasztását. Kezdetben térhálósított poliakrilamid géleket alkalmaztak a fehérjék méret szerinti elválasztására, melyeket később felváltottak a hidrofil lineáris polimer mátrixok. Manapság a gyógyszeriparban többnyire borát ionnal reverzibilisen térhálósított dextrans gél alkalmaznak fehérjék nagy felbontású, méret szerinti elválasztására, mely szabvány módszernek is tekinthető.

A bioterápiás fehérjék növekvő száma miatt, egyre nagyobb szükség van a jobb elválasztási technikákra, melyek például alkalmasak a nagymértékben glikozilált fehérjék jellemzésére is. A nátrium-dodecil-szulfát kapilláris gélelektroforézis (SDS-CGE), mely napjainkban tetrahydroxyborát ionnal reverzibilisen térhálósított dextrans mátrixot alkalmaz elválasztó közegként, egy nagy hatékonyságú bioanalitikai módszer, gyors elemzési idővel és kis mennyiségű mintaigénnyel, így kiválóan alkalmazható terápiás fehérjék hatékony jellemzésére.

Célom a módszer optimalizálása a hatékonyabb elválasztás érdekében, többek között annak vizsgálatára, hogy a mérési paraméterek (pl. hőmérséklet) és az elválasztó közeg összetétele (pl. bórsav, dextrans koncentráció), hogyan hat a terápiás fehérjék kvalitatív analízisére. Munkám során a dextrans-borát keresztkötés mechanizmusának vizsgálata különös hangsúlyt kapott. A monomer (dextrans) és a térhálósító (borát) koncentráció változás hatását tanulmányoztam fehérje standardok és antitest minták SDS-CGE elválasztása esetén. A háttér

elektrolitok esetében meghatároztam az elválasztás szempontjából fontos fizikai és elektrokinetikus paramétereket, mint például a viszkozitást és az elektroosmotikus áramlást. A migrációs tulajdonságok behatóbb tanulmányozásához a Ferguson módszert alkalmaztam, mely segíthet a megfelelő összetételű gélt kiválasztani egy adott fehérjekeverék minta esetében. A kapott elektroferogramokat úgy értékeltem ki, hogy részletes információt nyerjek az elválasztások teljesítményét illetően, mint például elméleti tányérszám, felbontás és szelektivitási tényező meghatározása. Vizsgáltam a fehérjék hőmérsékletfüggő migrációját az elválasztások aktiválási energia igényének meghatározása, illetve a felbontás optimalizálása érdekében. Az adott gélrendszerben feltárára került az aktiválási energia és a molekulatömeg közötti összefüggés, illetve az SDS-fehérje komplex mobilitása és a molekulatömeg közötti összefüggés.

Dolgozatom célja bemutatni 1) a terápiás fehérjék kapilláris gélelektroforézissel történő analízise során a mérési paraméterek optimalizálása hatékonyabb elválasztást eredményezhet, és számos új típusú glikoprotein esetében nélkülözhetetlen, valamint, hogy 2) a dextrans-borát gél-puffer rendszer tulajdonságainak feltárása, az összetétel változtatásának tanulmányozásával lehetővé teszi az elválasztás mechanizmusának mélyebb megismerését, így segítve a glikoproteinek elválasztása során felmerülő kihívások kezelését.

## 2. Eredmények

### 2.1 Fizikai és elektrokinetikai paraméterek

A munkám első lépéseként meghatároztam a dexrán és bórsav koncentrációk peremértékeit 50  $\mu\text{m}$  átmérőjű, 30 cm teljes hosszúságú (20 cm effektív hossz) kapilláris alkalmazása esetén, figyelembe véve a gél viszkozitását, vezetőképességét a könnyű kezelhetőség szempontjából. 10% (m/V) dexrán koncentráció felett, a növekvő viszkozitás nem teszi lehetővé a megfelelő gélcserét a keskeny átmérőjű kapillárisban, figyelembe véve a mérőműszer nyomáshatárait. 2% koncentráció alatt a molekulaszűrő képesség jelentősen csökkent a vizsgált 20 – 225 kDa tartományban.

Magasabb >4% (m/V) bórsav koncentráció esetén az alkalmazott 500 V/cm térerősség és 30 cm oszlophossz mellett jelentősen megnőtt az elektromos áramerősség, amely nemkívánatos Joule-hő képződést eredményez. 2% (m/V) bórsav koncentráció alatt, az elemzési idő jelentősen megnőtt az ellenirányú EOF növekedése miatt. Ennek következtében a kísérleteimhez 2-10% (m/V) dexrán (D) és 2-4% (V/V) bórsav (B) koncentráció tartományokba eső géleket használtam.

Ezt követően koncentráció sorozat felállításával 16 különböző összetételű gélét választottam, melyeket a kísérleteimhez felhasználtam, ezek 10, 7,5, 5 és 2 % (m/V) dexránt valamint 4, 3,3, 2,7 és 2% (m/V) bórsavat tartalmaztak. Ezen gélek esetében meghatároztam néhány fontos fizikai és elektrokinetikus paramétert, mint például viszkozitás, elektroosmotikus áramlás és áramerősség, melyek a fent említett koncentráció határértékek meghatározásához is szükségesek voltak.

A gélek viszkozitása a dexrán és bórsav koncentráció függvényében változik. A 10%D/4%B gél a legmagasabb viszkozitást mutatta (100 mPa\*s) míg a legalacsonyabbat a 2%D/2%B gél (10,7 mPa\*s). A bórsav mennyiségének csökkentésével a viszkozitás is csökkent, például a 10%D/2%B esetben 85 mPa\*s-ra. A dexrán koncentrációjának csökkentése és a bórsav

mennyiségének növelése szintén növelte a viszkozitást, de még így is lényegesen alacsonyabb maradt, mint a magas dextrán tartalmú gélek esetében.

A 10%D/4%B gél esetében a legalacsonyabb EOF ( $-0,18 \pm 0,001 \times 10^{-9} \text{ [m}^2/\text{Vs]})$  volt megfigyelhető, ami a magas viszkozitás és ionerősség következménye. Ezzel szemben a 2%D/2%B formula esetében volt a legnagyobb az EOF áramlás:  $-4,92 \pm 0,03 \times 10^{-9} \text{ [m}^2/\text{Vs}]$ .

Magasabb áramerősség volt jellemző a 4% bórsav tartalmú gélekre, mint a 2% bórsav összetételű gélekre. A 2%D/4%B gél áramerőssége volt a legnagyobb ( $37,53 \mu\text{A}$ ), míg a 10%D/2%B gélben a legalacsonyabb ( $22,58 \mu\text{A}$ ).

## 2.2 Fehérjék hőmérséklet-függő elektromigrációja

A standard fehérje sorozat (20 – 225 kDa) és tesztfehérjekeverék (10 kDa belső standard, PSA specifikus nanobody (14,26 kDa), omalizumab könnyű (23,98 kDa) és nehéz (49,37 kDa) láncai ) méréseit, 15 és 60°C közötti elválasztási hőmérsékleteket alkalmazva 5°C-os intervallumokban hajtottam végre.

A standard fehérje esetében az egyes csúcsok mobilitása az elválasztási hőmérséklet emelésével folyamatosan nőtt:  $\mu_{20 \text{ kDa}} = 3,71\text{E-}09 - 4,66\text{E-}08 \text{ [m}^2/\text{Vs}]$ , míg a felbontás csökkent:  $R_{S_{20 \text{ kDa-}35 \text{ kDa}}} = 7,14 - 4,95$ .

A teszt fehérje keverék csúcsai között a felbontás eltérően változott a hőmérséklet emelésével, szemben a fehérje létra csúcsai esetében megfigyelt szabályossággal. A 10 kDa és a PSA specifikus nanobody csúcsok között nőtt a felbontás ( $R_s = 4,11-7,94$ ) a hőmérséklet emelésével, csaknem megduplázódott annak értéke a legmagasabb hőmérsékleten. Az ellenkezője történt a PSA specifikus nanobody és omalizumab könnyű lánc között, ahol a felbontás több mint felére esett vissza 60°C-on, mint 15°C-on:  $R_s=1,99$  és  $R_s=5,78$ . Az omalizumab könnyű lánc és nehézlánc esetében 35°C elválasztási hőmérséklet alkalmazása mellett volt a legnagyobb a felbontás ( $R_s=11,39$ ), majd körülbelül 30%-kal csökkent a hőmérséklet további emelésével ( $R_s= 8,46$ ).

Az Arrhenius módszert [1] alkalmazva meghatároztam az elválasztott fehérjék aktiválási energia értékek ( $E_a$ ), melyek ahhoz szükségesek, hogy a gélen keresztülhaladjanak. A fehérje

létra komponenseinek  $E_a$  értéke konvex csökkenő tulajdonságot mutat, a molekulatömeg növekedésével:  $E_{a20 \text{ kDa}} = 44,76 \text{ kJ/mol}$  és  $E_{a225 \text{ kDa}} = 41,91 \text{ kJ/mol}$ .

A fehérje keverék komponenseinek  $E_a$  igényében nem figyelhető meg semmilyen szabályszerűség, szemben a fehérje létrával. A 49,37 kDa molekulatömegű nehéz lánc esetében a legkisebb az  $E_a$ , viszont majdnem ekkora a mindössze 14,26 kDa-os nanobody  $E_a$  értéke is. A bioterápiás fehérje tesztkeverék SDS-CGE analízise nem mutatott összefüggést a különféle fehérjék aktiválási energiaigénye és molekulatömege között, hangsúlyozva az elválasztási hőmérséklet optimalizálás fontosságát a számunkra fontos molekula mintakomponensek esetében, a lehető legnagyobb felbontás elérése érdekében.

Annak érdekében, hogy jobban megértsem az SDS-protein komplexek migrációs viselkedését a dextrán-borát gélben történő elválasztásuk során, a mobilitás és a molekulatömeg közötti összefüggést is vizsgáltam, felhasználva a molekulásugár lehetséges molekulatömeg ekvivalenseit.

Az SDS-fehérje komplexek elektroforetikus mobilitási értékeit az  $M_w^{-1/3}$  négyzetgyökének függvényében ábrázoltam ( $M_w^{-1/6}$ ), feltételezve azt, hogy alakjuk hengeres (nyakláncmodell). Ez a megközelítés 0,999-es átlagos  $r^2$  értéket eredményezett. E közel tökéletes lineáris kapcsolat alapján arra a következtetésre jutottam, hogy izoterm körülmények között az SDS - fehérje komplexek elektroforetikus mobilitása és a molekulatömeg  $-1/6$  hatványa között lineáris kapcsolat áll fenn.

Ezért a következő egyenletet javaslom az SDS-fehérje komplexek migrációjának leírására boráttal térhálósított dextrán gélek alkalmazása esetén:

$$\mu = const_A \cdot Q \cdot MW^{-1/6} \cdot e^{-E_a/RT} \quad (1)$$

ahol  $\mu$  a mobilitás,  $const_A$  a konstansok összegzése,  $Q$  a SDS-fehérje komplex nettó töltése,  $MW$  molekulatömeg,  $E_a$  aktiválási energia,  $R$  egyetemes gázállandó és  $T$  abszolút hőmérséklet.

A kapott eredményeket figyelembe véve további kísérleteimnél 25°C elválasztási hőmérsékletet alkalmaztam.

### 2.3 Fehérjék migrációjának vizsgálata Ferguson módszerrel

A dextrans-bórsav gélek szűrő hatását vizsgálva, 2% és 4% bórsav koncentrációjú gélekben mértem a standard fehérje sorozat és teszt fehérjekeverékek mobilitását. A Ferguson diagramok nemlineáris, konkáv görbéket mutattak a várható lineáris összefüggés helyett, különösen a magasabb dextrans koncentrációjú gélek esetében. Megfigyeltem, hogy a molekulatömeg növekedésével a görbület mértéke emelkedik a magasabb dextrans koncentráció felé. A 2% bórsav tartalmú gélek esetében a várt linearitás torzult, ellentétben a 4% bórsav tartalmú gélekkel. Az elektroferogramok tükrözték a molekulaszűrés és az elektroosztatikus áramlás hatásait a különböző gélkészítmények esetében.

Amikor a fehérje standardokat elemeztem, azt tapasztaltam, hogy a legnagyobb felbontást és látszólagos szelektivitást a 10%/2% D/B gél biztosította, még ha ez hosszabb elválasztási idővel is járt. Az SDS-fehérje komplexek migrációját tanulmányozva egy új egyenletet vezettem be a mobilitás és molekulatömeg közötti lineáris kapcsolat leírására (1. egyenlet).

A LC/ngHC csúcsok esetében a 10%/2% D/B gél adta a legjobb felbontást és látszólagos szelektivitást, bár hosszabb elválasztási idővel járt. Az intakt mAb és alegységeinek vizsgálatokor megfigyeltem, hogy a 10% D/2% B gél biztosította a legnagyobb felbontást.

A háromdimenziós (3D) Ferguson-diagramok bevezetése, a dextrans egyidejű változtatásán alapuló(D) és borát (B) koncentrációjának változtatása, 16 különböző D/B arányú gélt eredményező beállítása lehetővé tette az az SDS-fehérje komplexek elektromigrációs folyamatának jobb megértését. A fehérjestandardok és az új modalitású fúziós fehérje, az etanercept is konkáv 3D Ferguson-ábrákat eredményeztek. Az elektroosztatikus áramlás és a mátrixok viszkozitása közötti kölcsönhatás kulcsszerepet játszott az eredményül kapott migrációs idő és felbontás tekintetében.

A 3D Ferguson diagramok lehetővé teszik az elválasztott SDS-fehérje komplexek migrációs viselkedésének gyors felmérését a dextrans-borát koncentráció függvényében. Ezért ez a megközelítés segíthet kiválasztani a megfelelő összetételű gélt egy adott fehérjekeverék

esetében, melynek elválasztása esetleg nem megfelelő a standard összetételű gélben (10% dextrans, 4% bórsav).

## 2.4 A monomer és keresztkötő ágens arányának hatása az elválasztás szelektivitására

Állandó dextrans koncentráció mellett a borát mennyiségétől függ a 1:1 (BD-) és 1:2 (BD2-) kötések képződésének aránya, melyek befolyásolják a térhálósodás mértékét. Emelve a bórsav koncentrációt nő a láncok közötti kötések (keresztkötések) száma, ami a gél átlag pórusméret csökkenését és strukturáltabb térhálót eredményez. Azonban alacsony dextrans koncentráció mellett a pufferben lévő bórsav felesleg a 1:2 kötések telítéséhez vezethet és az ennek következtében megnövekedett 1:1 kötések száma a dextrans láncok taszítását okozhatja, ami növeli a pórusméretet. A komplexképződés révén a gél negatív töltésű, a láncok az elektromos mező irányába igazodnak, így egy strukturáltabb hálózat jön létre (csökkent konfigurációs entrópia), hasonlóan mint az agaróz esetében lap gélelektroforézisnél.

A következőkben azt vizsgáltam, hogy a bórsav és a dextrans aránya, hogyan hat az elválasztás szelektivitására. Retenciós modellt dolgoztam ki a glikozilált és nem glikozilált nehézláncok közötti szelektivitás jobb megértése érdekében, figyelembe véve a dextrans-borát adduktok interakcióját a fehérjén lévő glikánokkal.

A látszólagos szelektivitás ( $\alpha$ ) a borát-dextrans rendszerekben SDS-CGE során a molekulatömeg szerinti szűrés szelektivitásának ( $\alpha_{MW}$ ) és a másodlagos egyensúlyi komplexképződésen alapuló szelektivitás ( $\alpha_C$ ) szorzata, amely a dextrans-borát-glikán komplexképződésre épül:

$$\alpha = \alpha_{MW} \times \alpha_C$$

(2)

A glikoproteinek polipeptid láncához kapcsolódó glikánokat az SDS nem fedi le, ezért a rajtuk lévő megfelelő pozícióban lévő diol csoportok komplexeket képezhetnek a boráttal. Két féle módon mehet végbe a komplexképződés. A gélben lévő szabad boráttal, amely során nő a komplex felületi töltés sűrűsége és csökken a mobilitás különbség, szelektivitás a nem-glikozilált és glikozilált láncok között. Másfelől a gélben lévő láncon belüli borát (1:1) adduktumok szintén komplexet képezhetnek a glikoprotein szénhidrát részével. Jelen kísérletekhez omalizumab glikoproteint használtam. Ebben az esetben a core fukóz, terminális manóz, szialsavas és terminális galaktóz struktúrák  $\alpha$  orientált vicinális hidroxil csoportokkal vehetnek részt a komplexképződésben. Az ilyen jellegű komplexképződés befolyásolja a differenciális eletromigrációt, mivel a másodlagos egyensúlyon alapuló hídképződés során a nehézlánc átmenetileg immobilizáltá válik, azzal, hogy a boráttal keresztkötött dextransztruktúrához kapcsolódik. A szeparációs időablak ennek következtében növekszik a nem-glikozilált nehézlánc és glikozilált nehézlánc között, tehát eltérő sebességgel fognak vándorolni a gélben.

A fent vázolt rendszerekben tehát a glikoprotein egy része (P) nem komplexált (f) állapotban lesz (R), míg a többi molekula komplexált formában (1-R) lesz jelen. A glikoprotein látszólagos mobilitása ( $\mu$ ) kifejezhető a szabad és komplexált forma összegével:

$$\mu = R\mu^f + (1 - R)\mu^c \quad (3)$$

Az R frakció (7,8) kiszámítható a komplexképződési állandóból (K, 5-ös egyenlet).  $n$  a dextransz-borát láncsal komplexet alkotó glikoproteinek száma.



$$K = \frac{[D_B P_n]}{[D_B][P]^n} \quad (5)$$

$$R = \frac{1}{1+K[D_B]} \quad 1 - R = \frac{K[D_B]}{1+K[D_B]} \quad (6,7)$$

A 3., 6. és 7. egyenlet összevonásával kifejezhető a glikozilált nehéz lánc effektív mobilitása:

$$\mu_{HC} = \frac{\mu_{HC}^f}{1+K[D_B]} + \frac{\mu_{HC}^c K[D_B]}{1+K[D_B]} \quad (8)$$

A glikozilált (HC) és a nem glikozilált (ngHC) nehézláncok közötti másodlagos egyensúlyi komplexképződésen alapuló szelektivitás ( $\alpha_C$ ) az alábbi módon fejezhető ki, a molekulatömeg szerinti szűrés szelektivitásának ( $\alpha_{MW}$ ) figyelembevétele nélkül:

$$\alpha_C = \frac{\mu_{ngHC}}{\mu_{HC}} = \frac{\mu_{ngHC}(1+K[D_B])}{\mu_{HC}^f + \mu_{HC}^c K[D_B]} = \frac{\mu_{ngHC}(1+K[D_B])}{\mu_{HC}^f (1+K[D_B]) \mu_{HC}^c / \mu_{HC}^f} \quad (9)$$

A szabad glikozilált nehézlánc mobilitása feltételezhetően sokkal nagyobb, mint a dextransboráttal komplexet képzőé ( $\mu_{HC}^f \gg \mu_{HC}^c$ ), így a szelektivitás az alábbi módon is kifejezhető:

$$\alpha_C = \frac{\mu_{ngHC}}{\mu_{HC}^f} (1 + K[D_B]) \quad (10)$$

ha  $K[D_B] \gg 1$  a szelektivitási egyenlet az alábbi módon egyszerűsíthető:

$$\alpha_C = \frac{\mu_{ngHC}}{\mu_{HC}^f} K[D_B] \quad (11)$$

Továbbá, ha  $K[D_B] \ll 1$  a szelektivitási egyenlet a következő lesz:

$$\alpha_C = \frac{\mu_{ngHC}}{\mu_{HC}^f} \quad (12)$$

A láncok közötti csúcsfelbontás (Rs) kifejezhető a látszólagos szelektivitással ( $\alpha$ ), ahol E – az elektromos térerősség, N – az elméleti tányérszám és l – a kapilláris effektív hossza [2].

$$R_s = \frac{1}{4} \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \sqrt{N} \frac{\mu E}{l} \quad (13)$$

Amennyiben  $\alpha$  közel áll egyhez, jelentős hatással lesz a felbontásra, a kromatográfias módszerekben tapasztaltakhoz hasonlóan.

Az elméleti modellben megállapított tények alátámasztásra kerültek kísérleti eredményekkel is [3]. Ennek megfelelően a nem glikozilált nehézlánc és a normál (glikozilált) nehézlánc közötti elválasztási szelektivitást különböző monomer/keresztkötő arányú gélek alkalmazásával vizsgáltam.

## 2.5 Elektromigrációs diszperzió vizsgálata

Az elektroforetikus elválasztások során az elektromigrációs diszperzió a csúcsszimmetria csökkentése révén rontja az elválasztás hatékonyságát, a csúcsfelbontást és a csúcs kapacitást. Ez a probléma a háttélektrolit ko-ionja és a minta komponensek mobilitásainak illesztése révén kiküszöbölhető. A terápiás fehérjék kapilláris gél elektroforézise során leggyakrabban használt borát háttélektrolit alapú polimer gélek, úgymint agaróz és dextrans esetén, a bórsav nem csak ko-ionként funkcionál, hanem keresztkötőként is szolgál a megfelelő szűrőhatású polimer térháló kialakításához. Ennek a kettős funkcionalitással bíró nagyon fontos puffer alkotónak a hatását vizsgáltam az elektromigrációs diszperzióra, és azon keresztül az elválasztás hatékonyságára, melynek analízisét az irodalom szerint eddig még nem tették meg. Első lépésben felállítottam egy elméletet, amelyet kísérleti eredményekkel támasztottam alá. Az átláthatóság érdekében az egyensúlyi egyenletek esetében az ionokat a nevükre utaló szimbólumokkal jelöltem.

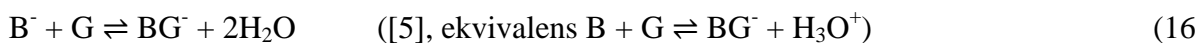
Vizes oldatokban a bórsav ( $B(OH)_3 = B$ ) egyértékű savként viselkedik, disszociációját, illetve a bórsav ( $B$ ) és a tetrahydroxi-borát ion ( $B(OH)_4^- = B^-$ ) közötti eloszlást a következőképpen írta le Zittle [4]:



A  $K_B$  (15a) bórsav egyensúlyi állandójával kifejezhető a tetrahydroxi-borát koncentrációja (15b):

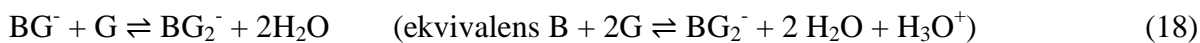
$$K_B = [B^-][H_3O^+]/[B] \quad [B^-] = K_B[B]/[H_3O^+] \quad (15a, b)$$

A tetrahydroxi-borát ionok egyensúlyi reakcióban reagálnak a polioloikkal – pl. glicerin, glükóz – monomer (16) és dimer (18) adduktokat képezve, amelyek képződésének mértékét a poliól és a tetrahydroxi-borát ionok relatív koncentrációja befolyásol. A glicerinnel való reakciót, amely során monomer addukt keletkezik a *16. egyenlet* és a dimer addukt képződést a *18. egyenlet* írja le. A két reakció egyensúlyi állandóját a *17a* és *19a* egyenletek szemléltetik. A *17b* és *19b* egyenleteket a *15b*-vel történő kombinációval kaptam, tehát behelyesítettem az egyenletekbe a tetrahydroxi-borát ion bórsav egyensúlyi állandójával kifejezett koncentrációját.



$$K_{BG} = [BG^-]/[B^-][G] \quad [BG^-] = K_{BG}[B^-][G] = K_{BG}[G]K_B[B]/[H_3O^+] \quad (17a, b)$$

és



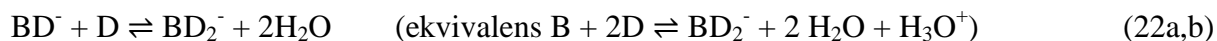
$$K_{BG_2} = [BG_2^-]/[BG^-][G] \quad [BG_2^-] = K_{BG_2}[G][BG^-] = K_{BG_2}K_{BG}[G]^2K_B[B]/[H_3O^+] \quad (19a, b)$$

A következő lépésben a bórsav-glicerin reakcióval analóg módon kerül levezetésre a bórsav-dextrán reakció. A bórsav komplexeket képezhet a dextrán (D) polimer láncok glükóz egységeivel is, így monomer (láncon belüli, *20. egyenlet*) és dimer (láncok közötti keresztkötéssel, *22. egyenlet*) adduktumokat hozva létre. Ezek a reakciók a ko-ion komplexek mobilitását jóformán a nullára csökkentik a dextrán polimer gyakorlatilag elhanyagolható mobilitása miatt [6]. Az egyensúlyi állandók, a  $K_{BD}$  és  $K_{BD_2}$  a *21a* és *23a* egyenletekben kerültek kifejezésre. A *21b* és *23b* egyenleteket a *15b* egyenlettel történő kombináció eredményezte.



$$K_{BD} = [BD^-]/[B^-][D] \quad [BD^-] = K_{BD}[D][B^-] = K_{BD}[D]K_B[B]/[H_3O^+] \quad (21a, b)$$

és



$$K_{BD_2} = [BD_2^-]/[BD^-][D] \quad [BD_2^-] = K_{BD_2}[D][BD^-] = K_{BD_2}K_{BD}[D]^2K_B[B]/[H_3O^+] \quad (23a, b)$$

Továbbá a monomer borát-glicerin addukt komplexet képezhet a dextrans polimerrel (24. egyenlet) a 25a egyenletben leírt  $K_{BGD}$  egyensúlyi állandóval, melyet kombinálva a 15b egyenlettel a 25b egyenletet kapjuk:



$$K_{BGD} = [BGD^-]/[BG^-][D] \quad [BGD^-] = K_{BGD}[BG^-][D] = K_{BGD}K_{BG}[G][D]K_B[B]/[H_3O^+] \quad (25a, b)$$

A borát alapú negatív töltésű ko-ionok ( $CB^-$ ) összkonzentrációja a háttélelektrolitban a, 15b, 17b, 19b, 21b, 23b és 25b egyenletekben szereplő egyes tetrahidroxiborát ion – poliolo koncentrációjának összegével fejezhető ki:

$$C_B^- = [B^-] + [BG^-] + [BG_2^-] + [BD^-] + [BD_2^-] + [BGD^-] \quad (26)$$

A ko-ionok móltörtjei ® a következők:

$$R_B^- = [B^-]/C_B^- \quad (27)$$

$$R_{BG}^- = [BG^-]/C_B^- \quad (28)$$

$$R_{BG_2}^- = [BG_2^-]/C_B^- \quad (29)$$

$$R_{BD}^- = [BD^-]/C_B^- \quad (30)$$

$$R_{BD_2}^- = [BD_2^-]/C_B^- \quad (31)$$

$$R_{BGD}^- = [BGD^-]/C_B^- \quad (32)$$

A borát alapú ko-ion ( $\mu_{\text{eff}}$  ko-ion) effektív mobilitása a megfelelő ionos mobilitások ( $\mu^0$ ) és móltörtje(R) lineáris kombinációjával határozható meg:

$$\mu_{\text{co-ion}}^{\text{eff}} = \mu_{\text{B}^-}^0 \cdot \text{R}_{\text{B}^-} + \mu_{\text{BG}^-}^0 \cdot \text{R}_{\text{BG}^-} + \mu_{\text{BG}_2^-}^0 \cdot \text{R}_{\text{BG}_2^-} + \mu_{\text{BD}^-}^0 \cdot \text{R}_{\text{BD}^-} + \mu_{\text{BD}_2^-}^0 \cdot \text{R}_{\text{BD}_2^-} + \mu_{\text{BGD}^-}^0 \cdot \text{R}_{\text{BGD}^-} \quad (33)$$

15b, 17b, 19b, 21b, 23b, 25b és 27-32 egyenleteket összevonva, az alábbi eredményre jutunk:

$$\mu_{\text{co-ion}}^{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{B}^-}^0 + \mu_{\text{BG}^-}^0 \cdot \text{K}_{\text{BG}}[\text{G}] + \mu_{\text{BG}_2^-}^0 \cdot \text{K}_{\text{BG}_2} \text{K}_{\text{BG}}[\text{G}]^2 + \mu_{\text{BD}^-}^0 \cdot \text{K}_{\text{BD}}[\text{D}] + \mu_{\text{BD}_2^-}^0 \cdot \text{K}_{\text{BD}_2} \text{K}_{\text{D}}[\text{D}]^2 + \mu_{\text{BGD}^-}^0 \cdot \text{K}_{\text{BGD}}[\text{D}] \text{K}_{\text{BG}}[\text{G}]}{1 + \text{K}_{\text{BG}}[\text{G}] + \text{K}_{\text{BG}_2} \text{K}_{\text{BG}}[\text{G}]^2 + \text{K}_{\text{BD}}[\text{D}] + \text{K}_{\text{BD}_2} \text{K}_{\text{D}}[\text{D}]^2 + \text{K}_{\text{BGD}}[\text{D}] \text{K}_{\text{BG}}[\text{G}]} \quad (34)$$

Fontos ismét hangsúlyozni, hogy a dextránhoz kötött tetrahydroxi-borátok gyakorlatilag immobilizálódnak a nagy, térhálósított 2 MDa polimer elhanyagolható mozgékonyasága miatt, azaz  $\mu_{\text{BD}^-}^0 \sim \mu_{\text{BD}_2^-}^0 \sim \mu_{\text{BGD}^-}^0 \sim 0$ . Következésképpen az utolsó három tag a 34-es egyenlet számlálójában bármekkora tetrahydroxi-borát koncentrációnál a nullához közelít, ami fontos következtetés az eredményeink értékelése szempontjából

A fehérje SDS-CGE során a csúcsszélesedés, torzulás két fő faktora a diffúzió ( $\sigma_D^2$ ) és az elektromigrációs diszperzió ( $\sigma_{EMD}^2$ ). Minden más variancia elhanyagolható, beleértve az adszorpciót is, a negatív töltésű kapilláris fal és az SDS-fehérjék közötti taszító hatások miatt. A Joule-hő képződés is elhanyagolható mértékű, köszönhetően a modern kapilláris elektroforézis gépek pontos hőmérséklet szabályozásának. Ehhez még hozzájárul a konstans detektálási zóna és injektálási paraméterek is. A csúcsok teljes térbeli varianciája ( $\sigma_t^2$ ) az alábbi egyenlettel írható le:

$$\sigma_t^2 = \sigma_D^2 + \sigma_{EMD}^2 \quad (35)$$

Az előzőekben bemutatott levezetés, illetve az előző fejezetekben bemutatott eredmények alapján nyilvánvaló, hogy a bórsavval stabilizált dextrán gélek esetében az elektromigrációs diszperzió jelentősen megváltozik a bórsav koncentráció növelésével. Ennek a jelenségnek a megértéséhez a borát koncentráció hatását vizsgáltam az SDS-fehérje komplexek csúcsszimmetriájára, 2% és 10% dextrán alapú gélek (körülbelül 0,12 M és 0,60 M glükóz építőelemeket tartalmaznak) felhasználásával.

### 3. Összefoglalás

PhD munkám során SDS-fehérje komplexek elektromigrációját vizsgáltam különböző összetételű boráttal térhálósított dexrán gélekben kapilláris elektroforézis készülékkel, UV detektálást alkalmazva és a különböző mérési paraméterek hatását figyelembe véve.

Első lépésben meghatároztam az alkalmazható alsó és felső bórsav és dexrán peremkoncentrációkat, figyelembe véve a gél egyszerű cseréjét a kapillárisban, a viszkozitást, illetve a vezetőképességet. Ezt követően meghatároztam a gélek viszkozitását, az elválasztás áramerősségét és a kialakuló elektroosmotikus áramlást, amelyek megszabják az elválasztási profilt, ennek kapcsán nélkülözhetetlenek az SDS-fehérje komplexek migrációs viselkedésének megértéséhez a dexrán-bórsav keresztkötött gélben.

Az elválasztás hatékonyságának növelésében korábbi tanulmányok szerint fontos szerepet játszik a megfelelő hőmérséklet megválasztása is. Ennek tükrében Arrhenius diagrammok segítségével vizsgáltam a fehérjék elválasztásának hőmérséklet függését illetve, az elválasztás aktiválási energia ( $E_a$ ) igényét. A gélek, illetve mérési paraméterek tesztelése különböző terápiás antitestek - monoklonális antitest, bispecifius mAB, nanobodyk – elválasztásával és karakterizálásával valósult meg. A kapott eredmények alátámasztják a sikeres módszerfejlesztést, optimalizálást.

A gél alapvető szűrő képességének vizsgálatához 2,0, 5,0, 7,5 és 10,0 (m/V)% 2 millió molekulatömegű dexrán (D) monomert és 2,0, 2,7, 3,3 és 4,0 (m/V)% borát (B) térhálósító ágenszt tartalmazó kémiai géleket készítettem melyekkel egy 20-225 kDa tartományt felölelő fehérje létra komponenseit valamint egy terápiás monoklonális antitest alegységeit és intakt formáját, illetve egy fúziós fehérjét választottam el kapilláris elektroforézissel.

A migrációs tulajdonságok további tanulmányozásához a Ferguson módszert alkalmaztam, mely segíthet a megfelelő összetételű gélt kiválasztani egy adott fehérjekeverék esetében. A kapott elektroferogramokat úgy értékeltem ki, hogy részletes információt nyerjek az elválasztások teljesítményét illetően, mint például elméleti tényérszám, felbontás és szelektivitási tényező meghatározása. A 3D Ferguson ábrázolás bevezetésével egyszerűen értékelni lehet az elválasztott fehérjemolekula migrációs tulajdonságait különböző monomer és térhálósító koncentráció mellett, így a megfelelő összetételt kiválasztani adott fehérjekeverék esetében. Kísérleteim során vizsgáltam, hogy a bórsav és dextrans aránya hogyan hat az elválasztás szelektivitására. Kidolgoztam egy retenciós modellt a glikozilált és nem glikozilált nehézláncok közötti szelektivitás jobb megértése érdekében, figyelembe véve a dextrans-borát adduktok kölcsönhatását a fehérjén lévő komplex cukrokkal. A dextrans-borát-glikoprotein komplexképződés alacsonyabb monomer/térahálósító koncentráció mellett fokozta a felbontást az antitest glikozilált és nem glikozilált nehézlánca között. Az eredmények ismeretében, olyan összetételű SDS-gél készítményeket lehet fejleszteni, amelyek a nagymértékben glikozilált új modalitású terápiás fehérjék elválasztástechnikai kihívásában is segíthetnek.

A csökkenő felbontás és csúcs kapacitás egyre nagyobb problémákat okoz az új típusú terápiás fehérjék elektroforetikus elválasztásánál, amihez az elektromigrációs diszperzió révén kialakuló csökkenő csúcsalak (tailing és fronting hatás) is hozzájárul. Az elektromigrációs diszperzió vizsgálatára irányuló kísérleteim alátámasztották, hogy a csúcsok alakjának javítása érdekében a kapilláris gélelektroforézis során az elektromigrációs diszperziót csökkenteni kell. Ez elérhető a megfelelő puffer-ko-ion komponens típusának megválasztásával úgy, hogy az illeszkedjen a vizsgált mintamolekulák mobilitásához. A háromszög típusú torzulások elkerülése érdekében figyelembe kell venni, hogy a boráttal térahálósított dextrans gélt használó SDS-CGE rendszerekben a bórsavnak kettős szerepe van: SDS-fehérje komplexel azonos töltésű ion és részt vesz a molekulaszűrő térháló kialakításában is.

#### 4. Irodalomjegyzék

1. Arrhenius, S., *Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren*. Phys. Chem, 1889. **4**: p. 226-248.
2. Guttman, A., et al., *Use of complexing agents for selective separation in high-performance capillary electrophoresis: Chiral resolution via cyclodextrins incorporated within polyacrylamide gel columns*. Journal of Chromatography A, 1988. **448**: p. 41-53.
3. Filep, C. and A. Guttman, *Effect of the Monomer Cross-Linker Ratio on the Separation Selectivity of Monoclonal Antibody Subunits in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis*. Analytical Chemistry, 2021. **93**(7): p. 3535-3541.
4. Zittle, C.A., *Reaction of Borate with Substances of Biological Interest*, in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 1951. p. 493-527.
5. Böeseken, J., *The use of Boric Acid for the Determination of the Configuration of Carbohydrates*, in *Advances in Carbohydrate Chemistry*, W.W. Pigman and M.L. Wolfrom, Editors. 1949, Academic Press. p. 189-210.
6. Mitchelson, K.R. and J. Cheng, *Capillary Electrophoresis with Glycerol as an Additive*. Methods in Molecular Biology, 2001. **162**: p. 259-277.

## 5. Publikációs lista



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**  
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/97/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Filep Csenge Boróka  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10068626

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Filep, C. B.**, Guttman, A.: Electromigration Dispersion in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis of Proteins.  
*Anal. Chem.* 94 (38), 13092-13099, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02348>  
IF: 7.4
2. **Filep, C. B.**, Guttman, A.: Capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis of proteins: introducing the three dimensional Ferguson method.  
*Anal. Chim. Acta.* 1183, 1-9, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2021.338958>  
IF: 6.911
3. **Filep, C. B.**, Guttman, A.: Effect of the Monomer Cross-Linker Ratio on the Separation Selectivity of Monoclonal Antibody Subunits in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis.  
*Anal. Chem.* 93 (7), 3535-3541, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04927>  
IF: 8.008
4. Guttman, A., **Filep, C. B.**, Karger, B.: Fundamentals of Capillary Electrophoretic Migration and Separation of SDS Proteins in Borate Cross-Linked Dextran Gels.  
*Anal. Chem.* 93 (26), 9267-9276, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01636>  
IF: 8.008
5. **Filep, C. B.**, Guttman, A.: The Effect of Temperature in Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Gel Electrophoresis of Protein Therapeutics.  
*Anal. Chem.* 92 (5), 4023-4028, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05566>  
IF: 6.986





**További közlemények**

6. Szabó, M., **Filep, C. B.**, Nagy, M., Sárközy, D., Szigeti, M., Sperling, E., Csánky, E., Guttman, A.:  
N-glycosylation structure - function characterization of omalizumab, an anti-asthma  
biotherapeutic product.  
*J. Pharm. Biomed. Anal.* 209, 1-5, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114483>  
IF: 3.4
7. **Filep, C. B.**, Szigeti, M., Farsang, R., Habberger, M., Reusch, D., Guttman, A.: Multilevel capillary  
gel electrophoresis characterization of new antibody modalities.  
*Anal. Chim. Acta.* 1166, 1-9, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2021.338492>  
IF: 6.911
8. Csomós, I., Nagy, P., **Filep, C. B.**, Rebenku, I., Nizsalóczki, E., Kovács, T., Vámosi, G., Mátyus,  
L., Dóczy-Bodnár, A.: Opposing Effects of Chelidonine on Tyrosine and Serine  
Phosphorylation of STAT3 in Human Uveal Melanoma Cells.  
*Int. J. Mol. Sci.* 22 (23), 1-14, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312974>  
IF: 6.208
9. **Filep, C. B.**, Borza, B., Járvas, G., Guttman, A.: N-glycosylation analysis of biopharmaceuticals by  
multicapillary gel electrophoresis: generation and application of a new glucose unit database.  
*J. Pharm. Biomed. Anal.* 178, 1-5, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112892>  
IF: 3.935

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 57,767**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
37,313**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai  
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján  
elvégezte.



Debrecen, 2024.03.18.