

POVZETEK

Hitri razvoj genske terapije, rekombinantnih zdravil ter klinične diagnostike je povzročil potrebo po proizvodnji večjih količin plazmidne DNA in imunoglobulinov farmacevtske kakovosti. Biološka zdravila, ki uporabljajo plazmidno DNA, predstavljajo velik potencial za zdravljenje različnih bolezni, od preventivnega zdravljenja do terapevtskih cepiv za virusne, bakterijske in parazitske bolezni, kakor tudi za zdravljenje kroničnih bolezni in rakavih obolenj. V zadnjih nekaj letih se je povečalo zanimanje za monoklonska protitelesa, kot so imunoglobulini M. Le te uspešno uporabljajo v klinični diagnostiki kot terapevtske reagente pri zdravljenju avtoimunih bolezni, pri zdravljenju sindroma pridobljene imunske pomanjkljivosti (AIDS), zdravljenju različnih oblik raka ter pri zdravljenju različnih infekcijskih bolezni. Zaradi visokih standardov, ki jih določajo regulatorne agencije, se povečujejo zahteve po čistosti in učinkovitosti končnih produktov.

Proizvodnja plazmidne DNA poteka v več sklopih: gojenje celic, razbitje celic ter izolacija plazmidne DNA (filtracija, precipitacija in različne kromatografske tehnike). Kompleksnost ter velikost omenjenih molekul predstavlja velik izziv; tako pri proizvodnji le-teh, kakor tudi pri razvoju analitskih kromatografskih metod. Analitske kromatografske metode, ki se uporabljajo za preverjanje čistosti in vsebnosti želenih komponent, tako med posameznimi fazami procesa proizvodnje (medprocesna analitika) kakor tudi pri končni določitvi produkta, morajo zagotoviti primerno ločljivost, selektivnost in natančnost med posameznimi komponentami v vzorcu ter morajo biti enostavne za uporabo.

V prvem delu doktorske disertacije opisujem razvoj analitskih monolitnih kolon in metod za kvalitativno in kvantitativno določitev različnih oblik plazmidne DNA, tako v vseh fazah proizvodnje, kakor tudi v končnem produktu. Najprej sem optimiral analitsko monolitno kolono tako, da sem spreminjal velikost por in gostoto liganda na nosilcu ter spreminjal dolžino kolone. V nadaljevanju sem optimiral kromatografske pogoje ločbe različnih oblik plazmidne DNA. Dobljene rezultate sem med seboj primerjal ter skušal razložiti njihov vpliv na selektivnost in učinkovitost. Da sem izključil strukturne značilnosti monolitnih analitskih kolon, sem dobljene rezultate primerjal z rezultati na klasičnih neporoznih analitskih kolonah.

V drugem delu doktorskega dela sem razvil robustno, učinkovito ter ponovljivo analitsko metodo za določevanje IgM v supernatantu celičnega lizata. Analitska kolona z rekombinantnim ali nativnim proteinom A, vezanim na CDI aktiviran nosilec, se je izkazala kot najprimernejša za določitev IgM v kompleksnem vzorcu. V nadaljevanju sem optimiral kromatografske pogoje tako, da sem dobil ponovljivo, robustno in učinkovito metodo za kvalifikacijo in kvantifikacijo v vseh fazah proizvodnje IgM.

Ključne besede: Plazmidna DNA, Imunoglobulini M (IgM), analitska monolitna kolona