

## POVZETEK

Protitelesa in rekombinantne učinkovine druge generacije, kamor sodijo tudi Fc-fuzijski proteini, predstavljajo visok delež na svetovnem trgu bioloških učinkovin, saj obstaja široko področje njihove uporabe za številne indikacije. Ker biološka zdravila proizvajajo živi organizmi, ki so po svoji naravi spremenljivi, lahko zdravilna učinkovina v končnem biološkem zdravilu izraža določeno manjšo stopnjo variabilnosti (mikroheterogenosti), ki pa mora biti znotraj sprejemljivega razpona, da bi dosledno zagotavljali varnost in učinkovitost. Ena izmed pomembnejših posttranslacijskih modifikacij, ki ključno vpliva na njihovo strukturo, topnost, stabilnost, funkcijo, lokalizacijo, zvižanje in na interakcije z drugimi proteini, je glikozilacija. Proizvodnja terapevtskih glikoproteinov tako poteka pod nadzorovanimi pogoji, ki jih je treba konstantno spremljati, da bi zagotovili dosleden, ponovljiv in predvidljiv vzorec glikozilacije. S tem namenom smo želeli razviti kromatografske tehnike za določanje različnih izooblik protiteles, ki bi jih lahko vključili v sledenje bioprocesa. V prvem delu doktorske disertacije smo okarakterizirali lektinske ligande za afinitetno kromatografijo. V ta namen smo lektine modificirali za uspešnejšo vezavo na nosilce in boljšo izpostavljenost aktivnega mesta. Biološko aktivnost smo preverjali z interferometrijo z biološkimi plastmi (ang. Biolayer interferometry oz. kratica BLI). Modificiran lektin rPA-ILNME6, ki smo ga poimenovali rPE6, je, imobiliziran na nosilec, izkazoval boljšo kinetiko vezave v primerjavi s prvim. V drugem delu doktorske disertacije smo v nadaljevanju določali pogoje za delno razvijanje protiteles, ki je potrebno, da se ogljikovi hidrati izpostavijo in s tem postanejo dostopni za vezavo lektinov. Protitelesa smo inkubirali pri povišanih temperaturah ob prisotnosti reducenta in detektirali spremembe s pomočjo merjenja intrinzične fluorescence triptofana, DLS-meritev, gelsko izključitvene kromatografije in ionsko izmenjevalne kromatografije. Glede na rezultate meritev intrinzične fluorescence in BLI-meritev je do razvijanja protiteles sicer prišlo, vendar sta bila delež razvitih molekul, pa tudi njihova stabilnost nizka, saj jih nismo uspeli zaznati s kromatografskimi metodami. Vzporedno smo zato kot predstavnike glikoproteinov pri razvoju kromatografskih nosilcev z lektini uporabljali Fc-fuzijske proteine, z znanimi glikanskimi strukturami, ki so izpostavljene na zunanji strani proteina. Na ta način smo lahko v tretjem delu doktorske disertacije okarakterizirali poliHIPE-nosilec z vezanim lektinom rPE6. Kapaciteto nosilca smo ocenili na 0,57 mg/ml, mejo detekcije pa med 0,19 mg/ml in 8 mg/ml. S pomočjo BLI-metode smo pokazali, da je vezavna kinetika imobiliziranega lektina rPE6 dovolj hitra, da nima vpliva na vezavo Fc-fuzijskega proteina. To omogoča uporabo razvitega nosilca za hitro in učinkovito ločbo izooblik glikoproteinov. Čas ločbe smo optimizirali na 10 min, pri pretoku mobilne faze 8 ml/min. PoliHIPE-nosilec z vezanim lektinom rPE6 je ohranjal stabilnost vsaj še pet mesecev po izvedeni imobilizaciji. V četrtem delu doktorske disertacije smo prikazali še konkretni primer uporabe tega nosilca za spremljanje perfuzijskega bioprocesa proizvodnje Fc-fuzijskega proteina. Vzorec dobljenih koncentracij s poliHIPE-nosilcem se je ujema z rezultati, dobljenimi s pomočjo izolacije s kolono, z imobiliziranim protienom A. Komponente gojišča, kot so HCP-ji in DNK-molekule, niso motila detekcije, zaradi česar je razviti nosilec primeren za ločevanje izooblik glikoproteinov, ki imajo v glikanski strukturi mono-/disaharide, ki jih veže lektinski ligand, v našem primeru terminalno vezani galaktozo in N-acetilaktozamin. Nosilec smo uporabili za metodo določanja debeline sloja z merjenjem padca tlaka, ki omogoča sledenje nastajanja agregatov Fc-fuzijskega proteina, vendar je bila njihova koncentracija pod mejo detekcije, smo pa s to metodo pokazali agregacijo lektina med imobilizacijo.

**Ključne besede:** lektini, monoklonska protitelesa, Fc-fuzijski proteini, kromatografija, interferometrija z biološkimi plastmi.