

4. ZÁVĚR

Tato práce se zabývá nalezením korelace mezi morfologií pevného nosiče chelatajících sorbentů založených na esterech kyseliny methakrylové, koncentrací a typem chelatajících skupin a afinitou jejich nikelnatých komplexů pro navázání specifických imunoglobulinů s využitím principů metody IMAC („immobilized metal affinity chromatography“).

Bylo potvrzeno, že prostorové faktory hrají důležitou roli při modifikaci pevných nosičů chelatajícími skupinami, v jejich koordinaci s ionty Ni^{2+} a následně i v interakci s cílovým imunoglobulinem.

Sorbenty s heterogeními porézními částicovými nosiči vykazovaly vysoké hodnoty kapacit pro specifické navázání imunoglobulinu a mohou být doporučeny pro izolaci preparativního množství imunoglobulinu třídy IgG₁. Avšak znalost pouhých hodnot celkové procentuální porozity nebo velikosti specifického povrchu pevného nosiče nestačí pro odhad efektivity výsledného sorbentu v ligandové výměně; v případě imunoglobulinů byl kritickým faktorem ovlivňujícím přístupnost imobilizovaných kovových komplexů pro ligandovou výměnu (tj. vazbu cílového proteinu) proporcionální obsah makropórů pevného nosiče s průměry ≥ 100 nm. Naopak pro sorbenty s převahou malých pórů v nosiči byla pozorována nízká kapacita pro množství navázaného imunoglobulinu, přestože rozměry většiny přítomných pórů přesahovaly rozměry cílového imunoglobulinu (cca 12 nm). Mimo to bylo zjištěno, že zvýšení koncentrace imobilizovaných nikelnatých komplexů sorbentů s malými póry v pevném nosiči nemělo vliv na množství navázaného cílového imunoglobulinu.

Pokud byly použity homogení, vysoce hydrofilní a striktně cirkulární částice jako polymerní nosiče chelatajících sorbentů, byly pozorovány nízké kapacity pro navázání cílového imunoglobulinu. Připravené sorbenty lze proto použít pouze pro izolaci analytického množství imunoglobulinu. Výhodou těchto sorbentů však byly téměř ideální kinetické vlastnosti jak při koordinaci s ionty Ni^{2+} , tak při vazbě imunoglobulinu.

Na homogeních částicích byl zkoumán též vliv typu chelatající skupiny ethylendiamintriocetové kyseliny (EDTA), chinolin-8-olu (HQ) nebo N -(2-pyridyl)metylglycinu (PMIAA) pro vazbu imunoglobulinu na jejich nikelnatých komplexech. Pozorované rozdíly jak ve vazbě, tak i eluci specifického IgG₁ a případně doprovodných proteinů byly způsobeny především silou interakce mezi proteinem a studovaným Ni^{2+} komplexem, která se zvyšovala v tomto pořadí: Ni^{2+} -EDTA < Ni^{2+} -PMIAA < Ni^{2+} -HQ. Sorbent

s chinolin-8-olem jako chelatající skupinou vykazující vysokou separační efektivitu lze doporučit pro analytické separace.

Byly připraveny též ploché listy sesíťované hydrofilní polymerní membrány, které vykazovaly po modifikaci chelatající kyselinou iminodictovou vysoké kapacity pro sorpci kovových iontů Ni^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , které byly srovnatelné s kapacitami sorbentů používaných k odstraňování toxických kovových iontů z odpadních vodných roztoků.

Závěrem lze konstatovat, že výběr pevného nosiče pro IMAC vhodné morfologie a chemického složení, typu a koncentrace chelatajících skupin a dále kontrola jejich distribuce v pevném nosiči mohou být správnou cestou pro zlepšení kapacity a selektivity sorbentů pro vazbu cílového proteinu a efektivity IMAC procesu.

5. PŘÍNOS PRÁCE

Výsledky práce odhalující závislost vazby specifických imunoglobulinů na vnitřní struktuře polymerního nosiče, typu, prostorovém rozložení a koncentraci chelatajících skupin mohou přispět k návrhu nových sorbentů pro čištění monoklonálních protilátek.

6. PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli Ing. Miroslavu Blehovi, CSc. za vedení mé disertační práce a své konzultantce Ing. Galině Tishchenko, CSc. za cenné rady a pomoc při testování připravených sorbentů.

Děkuji též Ing. Jirimu Hradilovi, CSc. a Ing. Danielu Horákovi, CSc. z Oddělení polymerních částic ÚMCH AV ČR za změní porozit a poskytnutí nemodifikovaných poly(GMA-co-HPMA-co-EDMA) částic. Adamovi Strachotovi, Ph.D. děkuji za vytvoření počítačového programu umožňujícího výpočet ploch za čelem frontálních křívek.

Za profesionální pomoc děkuji dále Ing. Zdeňce Sedlákové, CSc., Ing. Janu Lokajovi, CSc., Ing. Jaroslavu Kahovcovi, CSc. a Ing. Jirimu Dybalovi, CSc.

Můj dík patří také pracovníkům servisních laboratoří ÚMCH AV ČR.

Ráda bych též vyjádřila poděkování svému manželovi Milanovi za jeho neúnavnou všestrannou podporu.

Tato práce byla podpořena grantovými projekty A 4050910 (GA AV ČR) a K 4055109 (GA ČR).