

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA PODGORŠEK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Univerza v *Ljubljani*
Fakulteta *za farmacijo*



KATJA PODGORŠEK

**VPLIV ZAMRZOVANJA NA AGREGACIJO REKOMBINANTNIH
BIOLOŠKIH UČINKOVIN**

**IMPACT OF FREEZING ON AGGREGATION OF RECOMBINANT
BIOPHARMACEUTICALS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala v farmacevtski družbi Lek d.d., član skupine Sandoz pod mentorstvom prof. dr. dr.h.c. Stanka Srčiča, mag. farm., in somentorstvom dr. Draga Kuzmana, univ. dipl. fiz. Ves eksperimentalni del in analizo podatkov sem opravila v farmacevtski družbi Lek d.d., v razvojnem centru Biofarmacevtike Mengeš na področju Proteinska biofizika in bioinformatika.

Zahvala

Na tem mestu bi se zahvalila farmacevtski družbi Lek d.d., ki mi je omogočila izvedbo magistrske naloge, s čimer sem pridobila veliko izkušenj in znanja. Iskreno se zahvaljujem vodji področja Proteinska biofizika in bioinformatika in obenem somentorju dr. Dragu Kuzmanu za vse koristne nasvete, strokovno pomoč, vodenje in potrpežljivost pri delu. Najlepša hvala tudi vsem ostalim zaposlenim na tem področju za pomoč, spodbudne besede in sproščeno delovno vzdušje.

Prav tako se iskreno zahvaljujem profesorju Stanku Srčiču za možnost opravljanja magistrske naloge pod njegovim mentorstvom, za strokovno pomoč, napotke in podporo pri raziskovanju.

Na koncu gre posebna zahvala staršem, ki so mi omogočili študij, me ves čas spodbujali in mi stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. dr.h.c. Stanka Srčiča, mag. farm., in somentorja dr. Draga Kuzmana, univ. dipl. fiz.

Ljubljana, avgust 2017

Katja Podgoršek

Predsednik komisije: prof. dr. Borut Štrukelj

Mentor: prof. dr. dr.h.c. Stanko Srčič

Somentor: dr. Drago Kuzman

Članica komisije: asist. dr. Irena Prodan Žitnik

KAZALO VSEBINE

<u>KAZALO PREGLEDNIC</u>	<u>III</u>
<u>KAZALO SLIK</u>	<u>III</u>
<u>POVZETEK</u>	<u>VI</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>VIII</u>
<u>SEZNAM OKRAJŠAV</u>	<u>X</u>
<u>1 UVOD</u>	<u>1</u>
1.1 DELITEV BIOLOŠKIH ZDRAVIL	1
1.2 NESTABILNOST PROTEINSKIH MOLEKUL	2
1.2.1 AGREGACIJA	3
1.2.2 PROCES ZAMRZOVANJA	9
1.3 DOLOČANJE LASTNOSTI AGREGATOV	12
1.3.1 PRETOČNA MIKROSKOPIJA (MFI)	12
1.3.2 RESONANČNA TEHNIKA MERJENJE MASE – ARCHIMEDES	14
1.3.3 IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA (SEC)	15
1.3.4 DINAMIČNO SIPANJE LASERSKE SVETLOBE (DLS)	16
<u>2 NAMEN DELA</u>	<u>17</u>
<u>3 EKSPERIMENTALNO DELO</u>	<u>18</u>
3.1 MATERIALI	18
3.2 LABORATORIJSKA OPREMA	19
3.3 METODE	20
3.3.1 PRIPRAVA VZORCEV	20
3.3.1.1 Nekontrolirano zamrzovanje in odmrzovanje	20
3.3.1.2 Kontrolirano zamrzovanje in odmrzovanje	21
3.3.1.3 Vpliv koncentracije proteina na agregacijo pri zamrzovanju in odmrzovanju	22
3.3.1.4 Vpliv stabilizatorja na agregacijo pri zamrzovanju in odmrzovanju	23

3.3.1.5	Zamrzovanje proteina Y v steklenih vialah	24
3.3.2	ANALITSKE METODE	25
3.3.3	ANALIZA PODATKOV	27
4	<u>REZULTATI Z RAZPRAVO</u>	28
4.1	NEKONTROLIRANO ZAMRZOVANJE IN ODMRZOVANJE	28
4.2	KONTROLIRANO ZAMRZOVANJE IN ODMRZOVANJE	32
4.3	VPLIV KONCENTRACIJE PROTEINA NA AGREGACIJO PRI ZAMRZOVANJU IN ODMRZOVANJU	42
4.4	VPLIV STABILIZATORJA NA AGREGACIJO PRI ZAMRZOVANJU IN ODMRZOVANJU	48
4.5	ZAMRZOVANJE PROTEINA Y V STEKLENIH VIALAH	54
5	<u>SKLEP</u>	58
6	<u>LITERATURA</u>	59

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Seznam uporabljenih rekombinantnih monoklonskih protiteles IgG1 in podatki o njih.	18
Preglednica II: Seznam uporabljenih kemikalij in standardov.	18
Preglednica III: Seznam uporabljene laboratorijske opreme in materiala.	19
Preglednica IV: Prostornine proteina X in pufra za pripravo vzorcev.	23
Preglednica V: Prostornine proteina X in pufra ter masa saharoze za pripravo vzorcev.	23
Preglednica VI: Povprečna vrednost Pdl-ja in povprečna velikost delcev v odvisnosti od koncentracije ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih.	43
Preglednica VII: Povprečna vrednost Pdl-ja in povprečna velikost delcev v odvisnosti od koncentracije ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih za vzorce s saharozo.	49
Preglednica VIII: Ocena številčne koncentracije dimerov.	54
Preglednica IX: Rezultati DLS meritev – povprečne vrednosti polidisperznega indeksa in velikosti delcev s standardnim odklonom glede na število ciklov zamrzovanja in odmrzovanja in položaj v škatli (A, B, C). .	55
Preglednica X: Primerjava številčnih koncentracij agregatov, analiziranih z MFI-jem, med PETG in steklenimi vialami.	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba molekule človeškega monoklonskega protitelesa razreda G (IgG) (1).	2
Slika 2: Mehanizem 1 – reverzibilna asociacija nativnih proteinov. Prirejeno po (6).	4
Slika 3: Mehanizem 2 – agregacija konformacijsko spremenjenih monomerov (konformacijska sprememba je hitrost-omejujoč korak agregacije). Prirejeno po (6).	5
Slika 4: Mehanizem 3 – agregacija kemijsko spremenjenih monomerov (verjetno sledi mehanizem 2 ali 4). Prirejeno po (6).	5
Slika 5: Mehanizem 4 – z nukleacijo nadzorovana agregacija. Prirejeno po (6).	6
Slika 6: Mehanizem 5 – agregacija zaradi stika s površino. Prirejeno po (6).	7
Slika 7: Shematski profil reakcije agregacije interferona γ . A je monomerni intermediat. Puščice med pikčastimi črtami prikazujejo premik Gibbsove proste energije (relativno glede na nativno obliko N) med prehodnim stanjem agregacije N^* in razvito obliko U, ko je dodana sukroza ali gvanidinijev klorid. Prirejeno po (20).	8
Slika 8: Shematski prikaz procesa zamrzovanja snovi v raztopini. Prirejeno po (26).	10
Slika 9: Detekcijsko območje nekaterih analitskih metod. Prirejeno po (33).	12
Slika 10: Vzorec s pipeto nanese na nastavek za vzorec, od koder ga črpalka ves čas meritve črpa skozi osvetljeno pretočno celico in od tam po cevkah v odpad. Digitalna kamera posname delce. Prirejeno po (35).	13
Slika 11: Škatla za zamrzovanje in položaj vial v njej. Viala z vodo smo uporabili zato, da je bila škatla v celoti napolnjena.	20
Slika 12: Stojalo za PETG viala.	21
Slika 13: Stojalo za 2 mL viala.	22

Slika 14: Postavitev steklenih vial za zamrzovanje v zamrzovalni skrinji.....	24
Slika 15: Diagram prikazuje povprečno številčno koncentracijo agregatov ob t_0 in po 1, 3 in 5 FT-jih glede na položaj v škatli za obe škatli.....	29
Slika 16: Povprečna številčna koncentracija agregatov vseh vzorcev in standardni odklon meritev ob t_0 in po 1, 3 ter 5 FT-jih.....	30
Slika 17: Diagram prikazuje povprečno velikost (ECD – ekvivalenten krožni premer) agregatov glede na položaj v škatli po 1, 3 in 5 FT-jih za obe škatli skupaj.....	30
Slika 18: Diagram prikazuje povprečno velikost agregatov ob t_0 in po 1, 3 ter 5 FT-jih za obe škatli skupaj.....	31
Slika 19: Povprečno število agregatov/delcev znotraj posameznega velikostnega razreda glede na položaj v škatli za zamrzovanje ob t_0 in po 1, 3 ter 5 FT-jih za obe škatli skupaj.....	31
Slika 20: Profil enega cikla zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev.....	33
Slika 21: Profil treh ciklov zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev.....	33
Slika 22: Profil petih ciklov zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev.....	33
Slika 23: Diagram prikazuje povprečno številčno koncentracijo agregatov glede na položaj v stojalu za PETG vial ob t_0 in po 1, 3 in 5 FT-jih.....	34
Slika 24: Diagram prikazuje povprečno številčno koncentracijo in standardni odklon vseh meritev ob t_0 in po 1, 3 ter 5 FT-jih za vse vzorce skupaj.....	35
Slika 25: Diagram prikazuje povprečno velikost (ECD – ekvivalenten krožni premer) agregatov glede na položaj v stojalu za PETG vial po 1, 3 in 5 FT-jih.....	35
Slika 26: Diagram prikazuje povprečno velikost agregatov ob t_0 in po 1, 3 ter 5 FT-jih.....	36
Slika 27: Število agregatov/delcev znotraj posameznega velikostnega razreda glede na položaj vzorcev v stojalu za PETG vial po 1, 3 in 5 FT-jih.....	36
Slika 28: Primer mikronskih agregatov proteina X po 1, 3 in 5 FT-jih ter njihova povprečna intenziteta slikovnih pik ter krožnost.....	37
Slika 29: Profil enega cikla zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev v vrstah A in D.....	38
Slika 30: Profil enega cikla zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev v vrstah B in C.....	38
Slika 31: Diagram prikazuje povprečno številčno koncentracijo agregatov/delcev ob t_0 in po 1 FT-ju.....	39
Slika 32: Diagram prikazuje povprečno številno koncentracijo in pripadajoči standardni odklon vseh vzorcev skupaj ob t_0 in po 1 FT-ju.....	40
Slika 33: Povprečna velikost (ECD – ekvivalenten krožni premer) agregatov/delcev glede na položaj v stojalu za 2 mL vial po 1 FT-ju.....	40
Slika 34: Diagram prikazuje povprečno številčno koncentracijo agregatov/delcev ob t_0 in po 1 FT-ju.....	41
Slika 35: Diagram prikazuje povprečno številno koncentracijo in pripadajoči standardni odklon vseh vzorcev skupaj ob t_0 in po 1 FT-ju.....	41
Slika 36: Povprečna velikost (ECD – ekvivalenten krožni premer) agregatov/delcev glede na položaj v stojalu za 2 mL vial po 1 FT-ju.....	42
Slika 37: % AP v odvisnosti od koncentracije proteina ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih.....	43
Slika 38: Povprečna številčna koncentracija delcev, večjih od 2 μm , v odvisnosti od koncentracije proteina ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih.....	44

Slika 39: Povprečna številčna koncentracija delcev, večjih od 0,2 μm , v odvisnosti od koncentracije proteina ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih.	44
Slika 40: Makroskopski in mikroskopski prikaz koncentracije proteina med zamrzovanjem vzorcev s koncentracijo proteina 1 mg/mL in 50 mg/mL in prikaz 5 mL vsebnika.	45
Slika 41: Makroskopski prikaz krikoncentracije po 1 in 2 FT-jih za vzorec s koncentracijo proteina 50 mg/mL. Prirejeno po (41).	46
Slika 42: Porazdelitev velikosti delcev, izmerjenih z Archimedesom in MFI-jem, za vzorce s koncentracijo proteina X 1 mg/mL in 30 mg/mL po 5 FT-jih.	47
Slika 43: Shema poteka številčne koncentracije za celotno velikostno območje agregatov.	47
Slika 44: Porazdelitev velikosti delcev, izmerjenih z Archimedesom in MFI-jem, za vzorce s koncentracijo proteina X 1 mg/mL in 30 mg/mL po 5 FT-jih. y-os je v logaritemski skali, x-os pa v linearni skali; premici na diagramu prikazujeta eksponentni funkciji.	48
Slika 45: % AP v odvisnosti od koncentracije proteina ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih za vzorce s saharozo. Prikazano je tudi množinsko razmerje protein : saharoza.	49
Slika 46: Povprečna številčna koncentracija delcev, večjih od 0,2 μm , v odvisnosti od koncentracije proteina ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih za vzorce s saharozo.	50
Slika 47: Povprečna številčna koncentracija delcev, večjih od 2 μm , v odvisnosti od koncentracije proteina ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih za vzorce s saharozo.	50
Slika 48: Razmerje številčnih koncentracij MFI meritev vzorcev s saharozo in brez saharoze po 1 in 5 FT-jih.	51
Slika 49: a) prikazuje preferenčno izključitev sotopljenca zaradi sterične oviranosti, b) povečanje entropije na račun zmanjšanja izključitvega volumna za saharozo (ravnotežje v desno), c) pa konformacijsko spremembo proteina in s tem zvečanje površine proteina, ki je v stiku s topilom – zmanjšanje entropije (ravnotežje je pomaknjeno v levo – konformacijsko bolj stabilna oblika).	53
Slika 50: % AP glede na položaj vial v škatli ob t_0 in po 1, 2, ter 3 FT-jih.	54
Slika 51: Primer rezultatov DLS meritev ob t_0 in po 1, 2 ter 3 FT-jih. Vsak diagram prikazuje 5 replik meritev istega vzorca.	55
Slika 52: Povprečna številčna koncentracija delcev, izmerjenih z resonančno tehniko merjenje mase, glede na položaj v škatli ob t_0 in po 1, 2 ter 3 FT-jih.	56
Slika 53: Povprečna številčna koncentracija delcev, izmerjenih s pretočno mikroskopsko tehniko, glede na položaj v škatli ob t_0 in po 1, 2 ter 3 FT-jih.	56

POVZETEK

Uvod: Agregacija je glavni pojav fizikalne nestabilnosti in predstavlja velik problem v razvoju rekombinantnih bioloških učinkovin. Pojavi se lahko kot posledica nepravilnega zvijanja proteinov pri njihovi biosintezi ali pa kasneje, ko med procesi čiščenja, izdelave končne oblike zdravila oziroma med transportom ter shranjevanjem lahko pride do spremembe nativne konformacije. Zelo pomembno je razumevanje vpliva zamrzovanja in odmrzovanja na izgubo nativne strukture proteina, sočasno nastajanje in rast agregatov ter preprečevanju le-tega. Nastali agregati so lahko reverzibilni ali ireverzibilni in lahko ogrozijo stabilnost produkta, zmanjšajo učinkovitost zdravila ali so vzrok imunogenosti. Zato so v končni obliki zdravila nezaželeni, njihov delež pa strogo nadziran.

Namen: Namen magistrske naloge je bil razviti in optimizirati ustrezen profil zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev rekombinantnih bioloških učinkovin manjših prostornin (1–5 mL) in tako doseči kontrolirano zamrzovanje ter odmrzovanje. Prav tako je bil cilj ugotoviti, kaj se zgodi z rekombinantno učinkovino po več ciklih zamrzovanja in kakšen je vpliv koncentracije proteina ter prisotnosti stabilizatorja na agregacijo pri zamrzovanju in odmrzovanju.

Metode: Vzorce v 2 mL in 5 mL vialah smo zamrzovali v zamrzovalni skrinji (nekontrolirano zamrzovanje) ter z napravo za zamrzovanje in odmrzovanje CryoPilot (kontrolirano zamrzovanje). Razvili smo takšne profile kontroliranega zamrzovanja in odmrzovanja, da odražajo pogoje na proizvodni skali. Po optimizaciji profila zamrzovanja in odmrzovanja smo z uporabo le-tega preverili vpliv koncentracije proteina in saharoze na agregacijo pri zamrzovanju in odmrzovanju. Nastale agregate smo analizirali z dinamičnim sipanjem laserske svetlobe, pretočno mikroskopijo, izključitveno kromatografijo in resonančno tehniko merjenja mase.

Rezultati: Uspeli smo optimizirati profile za kontrolirano zamrzovanje in odmrzovanje vzorcev manjših prostornin. S tem smo dosegli, da so bili vsi vzorci v analizi izpostavljeni enakim pogojem, kar pa seveda ne velja za nekontroliran način. Potrdili smo že znane ugotovitve, da zamrzovanje in odmrzovanje povzroči tvorbo proteinskih agregatov. Ugotovili smo še, da hitrejša zamrzovanja povzroči nastanek večjega števila agregatov. Višja kot je koncentracija proteina, več nanometrskih in submikronskih agregatov ter manj mikronskih agregatov nastane. Pokazali smo tudi, da se lahko stopnja agregacije zmanjša z uporabo stabilizatorjev, vendar le pri njunem ustreznem razmerju.

Ključne besede: agregacija proteinov, kontrolirano zamrzovanje in odmrzovanje, stabilizator, velikostni razredi agregatov

ABSTRACT

Introduction: Aggregation is the most important occurrence of physical instability, which represents a major problem in the development of recombinant biopharmaceuticals. It can be caused by abnormal protein expression and some following technological steps, including protein purification, drug substance storage, drug product manufacture, transport and storage of final product. Knowledge of freezing and thawing fundamentals, which is essential for drug substance storage, is geared toward understanding their impact on native structure loss, temporarily formation and growth of aggregates including their prevention. Aggregates can be reversible (dimers) or irreversible. They can reduce stability of drug product and bioavailability or might potentially be immunogenic and are therefore unacceptable and strictly controlled in drug product.

Purpose: The aim of master's thesis was to develop and optimize the appropriate freezing and thawing profile of small volume recombinant biopharmaceutical samples (1–5 mL) in order to achieve controlled freezing and thawing. The aim was also to determine what happens with recombinant drug substance after several cycles of freezing and thawing. The influence of protein concentration and stabilizer addition on aggregation during freezing and thawing were also studied.

Methods: We were freezing samples in 2 mL and 5 mL vials in a freezer (uncontrolled method) and with a CryoPilot machine to achieve controlled freezing and thawing environment. We developed freeze-thaw profiles, which reflect production scale conditions, and used them to evaluate the impact of protein concentration and sucrose addition on protein aggregation during freezing and thawing. Aggregates were analysed using dynamic light scattering, micro-flow imaging, size exclusion chromatography and resonant mass measurements technique.

Results: We managed to optimize freeze-thaw profiles for small volume samples. This way we achieved that all analysed samples were exposed to the same conditions, which was not possible to ensure by using uncontrolled freezing. We have confirmed already known observations that freezing and thawing cause protein aggregates formation. We found out that faster freezing causes more aggregates. Higher protein concentrations result in increased number of nanometer and submicron particles and decreased number of micron particles. We have shown that aggregation is reduced by the use of stabilizers where only the optimal protein : stabilizer ratio achieves desired stabilizer effect.

Keywords: protein aggregation, controlled freezing and thawing, stabilizer, aggregates size ranges

SEZNAM OKRAJŠAV

AP	% agregatov (dimeri, trimeri) (ang. Aggregate Peaks)
CHO	celice ovarijev kitajskega hrčka
DLS	dinamično sipanje laserske svetlobe (ang. Dynamic Light Scattering)
ECD	ekivalenten krožni premer
FT	cikel zamrzovanja in odmrzovanja (ang. freeze-thaw)
Ig	imunoglobulin
LO	farmakopejska metoda zamreženja svetlobe
MFI	pretočna mikroskopija (ang. Micro-Flow Imaging)
PAS	površinsko aktivne snovi
PdI	polidisperzni indeks
PETG	polietilen tereftalat glikol
SEC	izključitvena kromatografija (ang. Size Exclusion Chromatography)
t_0	nezamrznjeni vzorci, shranjeni 1 dan v hladilniku pri temperaturi 5–8 °C

1 UVOD

1.1 DELITEV BIOLOŠKIH ZDRAVIL

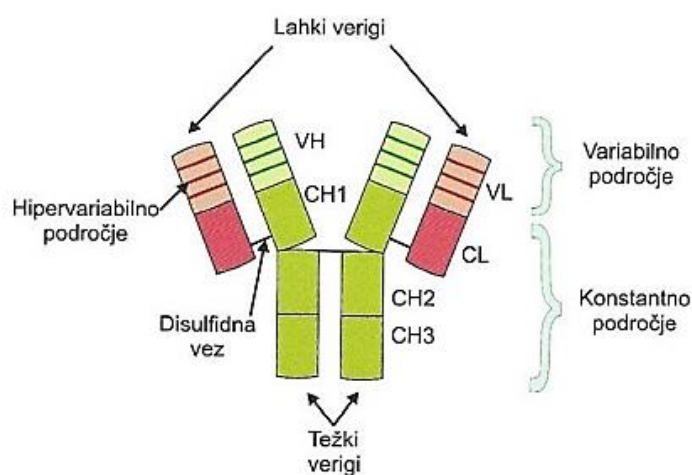
Glede na način pridobivanja biološka zdravila v grobem delimo na tradicionalna biološka zdravila, ki so pridobljena z izolacijo in s klasično biotehnologijo (rastlinski sekundarni metaboliti, polisaharidi, steroidi in antibiotiki), ter na sodobna biološka zdravila, ki so pridobljena s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA. Biološka zdravila tako lahko razdelimo v pet skupin:

- biološka zdravila, pridobljena z izolacijo;
- biološka zdravila, pridobljena s sintezo;
- genska zdravila;
- monoklonska protitelesa in
- rekombinantna biološka zdravila.

Rekombinantna biološka zdravila predstavljajo najobsežnejšo skupino sodobnih bioloških zdravil. Imenujemo jih tudi biotehnološka zdravila in se zelo razlikujejo od klasičnih. Gre za velike beljakovinske ali glikoproteinske molekule z visoko molekulsko maso in s kompleksno tridimenzionalno zgradbo, ki določa, ali bo zdravilo delovalo ali ne. Pri bioloških zdravilih deluje samo ena struktura, ki ji pravimo nativna (1). Terapevtski proteini morajo biti za ustrezno učinkovitost sintetizirani v biološko aktivni obliki, kar zahteva ustrezno zvitost in posttranslacijske modifikacije (2). Biološke učinkovine so v nasprotju s sintezo klasičnih zdravilnih učinkovin proizvedene s pomočjo živih organizmov oziroma mikroorganizmov (*Escherichia coli*, sesalske celice, insektne celice, kvasovke, transgene rastline in živali) (1). Približno 70 % vseh rekombinantnih bioloških učinkovin je proizvedenih v celicah ovarijskega kitajskega hrčka (CHO celice) (2). Molekule bioloških učinkovin so pogosto heterogene, zato se jih zelo težko v celoti ovrednoti z analiznimi metodami. Prav tako so lahko imunogene. Od obvladljivosti vseh stopenj procesa proizvodnje je odvisna ponovljivost proizvodnega procesa bioloških učinkovin. Na področju bioloških zdravil ne govorimo o generikih, ampak o biološko podobnih zdravilih, saj zaradi kompleksne zgradbe in načina proizvodnje praktično ni mogoče izdelati referenčnemu zdravilu identične biološke učinkovine (1).

Največjo podskupino rekombinantnih bioloških zdravil predstavljajo monoklonska protitelesa (imunoglobulini (Ig)). Imunoglobulini oziroma protitelesa so del humoralnega imunskega sistema sesalcev. Ig so glikozilirani globularni proteini z molekulsko maso,

večjo od 150 kDa. Molekule protiteles se med seboj razlikujejo po zgradbi in zaščitni vlogi pri obrambi organizma. Imunoglobulini so prisotni v krvi, telesnih izločkih in tkivnih tekočinah. So simetrične strukture in so sestavljeni iz dveh enakih težkih ter dveh enakih lahkih polipeptidnih verig, povezanih z disulfidnimi vezmi. Glede na vrsto težke verige razlikujemo pet razredov protiteles: A, D, E, G in M, ki se na podlagi razlik v strukturi težke verige delijo še na podrazrede. Poznamo dva podrazreda IgA (IgA1 in IgA2) in štiri podrazrede IgG (IgG1, IgG2, IgG3 in IgG4). Težki in lahki polipeptidni verigi sta sestavljeni iz konstantnih in variabilnih področij. Za interakcije protiteles z ostalimi elementi imunskega sistema so pomembna konstantna področja težkih verig. Variabilna področja lahke in težke verige pa določajo specifičnost protiteles za antigen (slika 1). Monoklonska protitelesa (mAb) so monospecifična in monoafinitetna, kar pomeni, da so usmerjena proti točno določenemu področju antigena. Terapevtska monoklonska protitelesa so najhitreje rastoča skupina sodobnih bioloških zdravil, največ jih je iz razreda IgG (1).



Slika 1: Zgradba molekule človeškega monoklonskega protitelesa razreda G (IgG) (1).

1.2 NESTABILNOST PROTEINSKIH MOLEKUL

Veliko težavo v razvoju in proizvodnji bioloških in biološko podobnih zdravil predstavlja nestabilnost proteinskih molekul, ki jo na splošno delimo na kemijsko in fizikalno. Kemijska nestabilnost vključuje vse procese, ki cepijo ali ustvarijo kovalentne vezi in tako generirajo nove kemijske entitete. Pogosteje opaženi razgradni kemijski procesi so deamidacija, izomerizacija, racemizacija, proteoliza, eliminacija, oksidacija, hidroliza, kaskada radikalnih reakcij, disulfidna izmenjava, tvorba diketopiperazina, tvorba piroglutaminske kisline (prekurzor nitrozaminov) in reakcije kondenzacije. Fizikalna nestabilnost vključuje vse ostale procese nestabilnosti, pri katerih ostane primarna

struktura proteinov nespremenjena, se pa zaradi sprememb v sekundarni, terciarni in kvartarni strukturi proteina spremeni njegova konformacija. To zajema denaturacijo (toplotna, hladna, kemična, povzročena s tlakom in denaturacija v trdnem stanju), agregacijo, precipitacijo (obarjanje) in adsorpcijo na površino (1, 3).

1.2.1 Agregacija

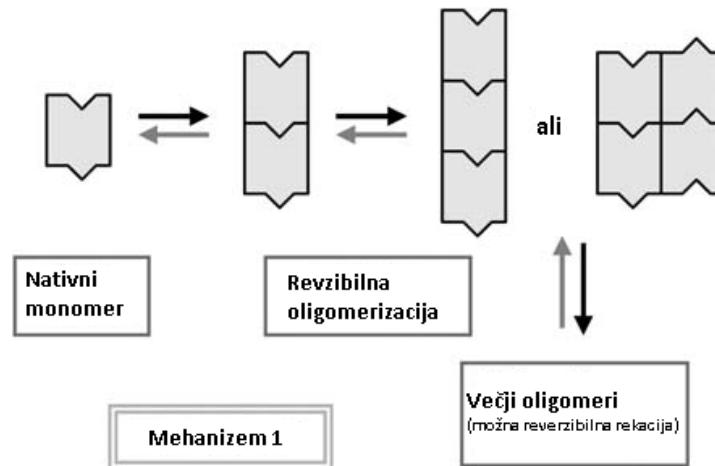
Agregacija predstavlja glavni pojav fizikalne nestabilnosti proteinov. Vključuje različne vrste molekulskih interakcij. Lahko je reverzibilna (nekovalentne interakcije) ali ireverzibilna (kovalentne interakcije) in ima za posledico terapevtsko neustrezen protein. Agregati proteinov lahko imajo zmanjšano aktivnost, topnost in spremenjeno imunogenost, zato so v zdravilu nesprejemljivi (1, 3). Agregacija je lahko posledica nepravilnega izražanja (ekspresije) proteinov, nastanka sprememb native konformacije pri čiščenju proteina, formulacije, zamrznitve in odmrznitve, ultrafiltracije, diafiltracije, polnjenja vial in injekcijskih brizg, transporta ali shranjevanja (4, 5). Ti procesi lahko z izpostavitvijo proteina potencialno škodljivim razmeram, kot so zamrznitev, dehidracija, ekstremni pH-ji, stične površine zrak-tekočina in trdno-tekoče, visoke in nizke temperature, potencialno vplivajo na stabilnost produkta. Interakcije, ki delujejo na proteinsko molekulo v nativni konformaciji, so hidrofobne in elektrostatske ter vodikove vezi. Hidrofobne interakcije so tudi prevladujoče sile pri tvorbi agregatov. Gonilno silo agregacije predstavlja zmanjšanje interakcij med topilom (pufrom) in izpostavljenimi hidrofobnimi deli proteina. Fizikalni dejavniki, ki spodbudijo proces agregacije, pa so sprememba ionske moči, temperature, stik s trdno površino in adsorpcija nanje (1, 3).

Prve objave o agregaciji proteinov segajo v leto 1989. Na to temo je bilo narejenih veliko raziskav. Vsaka razkriva del zelo kompleksnega procesa agregacije, ki ga lahko opišemo s petimi osnovnimi mehanizmi. Ti se med seboj ne izključujejo, zato lahko po različnih poteh nastane enak produkt – agregat (6).

Mehanizem 1: Reverzibilna asociacija nativnih proteinov (monomerov)

Za ta mehanizem je značilna težnja po reverzibilnem združevanju (asociaciji) proteinov v nativni obliki v agregat. Površina nativega proteina je komplementarna sama s seboj, tako pride do takojšnjega oblikovanja majhnih reverzibilnih oligomerov. Kot prikazuje slika 2, se lahko na površino monomera adherira več komplementarnih monomerov. Tisti, ki lahko tvorijo več različnih stičnih površin, lahko potencialno tvorijo več konformacij oligomera enake stehiometrije in različnih vzorcev rasti oligomera. Z večanjem koncentracije

proteina se tvorijo vedno večji oligomeri, čez čas pa postanejo ti večji agregati ireverzibilni, saj pride do tvorbe kovalentnih vezi (npr. disulfidnih) (6).

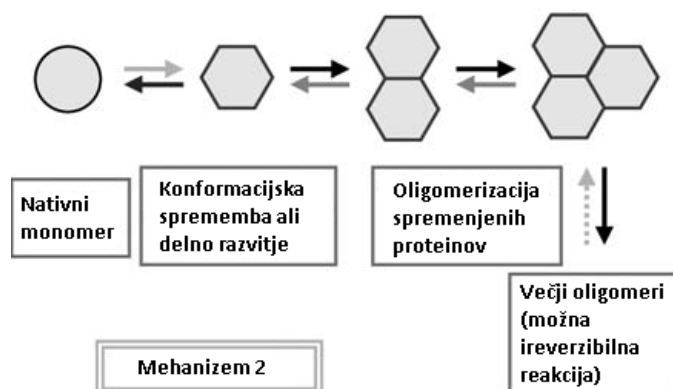


Slika 2: Mehanizem 1 – reverzibilna asociacija nativnih proteinov. Prirejeno po (6).

Primer terapevtskega proteina, ki zlahka tvori reverzibilne oligomere, je inzulin (7). Antagonist receptorja za interleukin 1 je terapevtski protein, ki je v višjih koncentracijah podvržen reverzibilni dimerizaciji, ki ji lahko sledi tvorba ireverzibilnih dimerov in trimerov (8).

Mehanizem 2: Agregacija konformacijsko spremenjenih monomerov (konformacijska sprememba je hitrostno-omejujoč korak agregacije)

V nasprotju z mehanizmom 1 ima pri mehanizmu 2 nativni monomer zelo majhno težnjo po reverzibilni asociaciji. Po konformacijski spremembi ali delnem razvitju konformacijsko spremenjene proteinske molekule močno asociirajo (do neke mere podobno kot pri mehanizmu 1) (slika 3). Ključna razlika med tema dvema mehanizmoma je ta, da je pri mehanizmu 2 prvi korak konformacijska sprememba proteina, ki vodi v nenativno stanje. Običajno je delež proteinov, dovzetnih za agregacijo v nenativnem stanju, zelo majhen. Mehanizem agregacije 2 običajno spodbudimo s stresom, kot sta na primer segrevanje ali preko stika dveh površin, kar povzroči konformacijsko spremembo. Ta mehanizem agregacije zaviramo s pogoji ali z dodatkom pomožnih snovi, ki stabilizirajo nativno konformacijo (6).

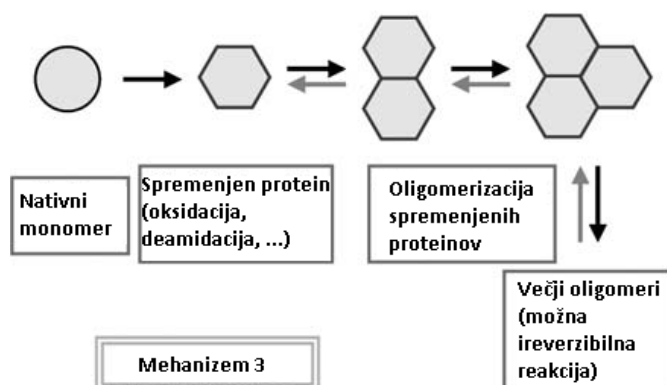


Slika 3: Mehanizem 2 – agregacija konformacijsko spremenjenih monomerov (konformacijska sprememba je hitrost-omejujoč korak agregacije). Prirejeno po (6).

Ta mehanizem agregacije je prevladujoč za večino proteinov (9, 10, 11).

Mehanizem 3: Agregacija kemijsko spremenjenih monomerov

Mehanizem 3 je različica mehanizma 2, kjer je sprememba konformacije proteina posledica razlik v kovalentni strukturi. Običajno so te spremembe posledica kemijske razgradnje (npr. oksidacija metionina, deamidacija ali proteoliza). Kemijske spremembe lahko ustvarijo na površini proteina nova »lepljiva območja« ali spremembe v naboju tako, da se zmanjša elektrostatska odbojnost med monomeri. V nekaterih primerih pa kemijsko različne vrste niso posledica kemijske razgradnje, ampak je to normalna oblika proteina znotraj končnega produkta, to je zdravila (npr. zaradi glikoziliranja). Tako so lahko na primer glikoproteini neglikozilirani ali pa v eni izmed glikoziliranih frakcij, ki je nagnjena k agregaciji (slika 4) (6).



Slika 4: Mehanizem 3 – agregacija kemijsko spremenjenih monomerov (verjetno sledi mehanizem 2 ali 4). Prirejeno po (6).

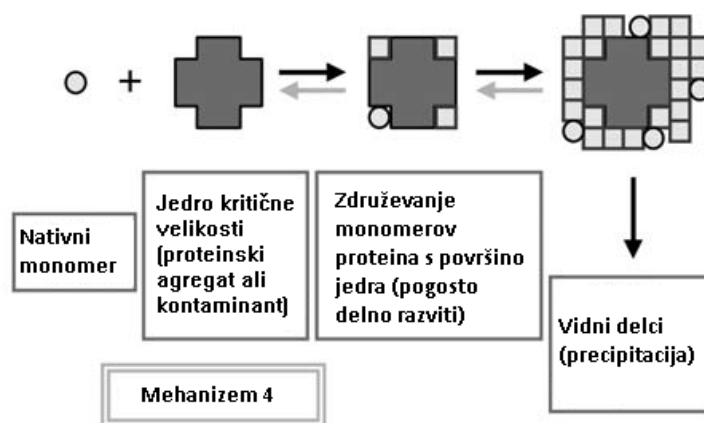
Za mehanizem 3 je značilna tvorba agregatov iz spremenjenih monomerov, vendar agregati vedno ne vsebujejo nujno le spremenjenih monomerov. Včasih lahko spremenjeni monomeri vključijo v agregate tudi normalne monomere, kar pa na sliki 4 ni prikazano (6).

Kadar ta mehanizem agregacije vodi do izboljšanja kemijske stabilnosti, zmanjša tudi agregacijo in obratno, vendar ni nujno, da se v vseh primerih izboljšanja konformacijske stabilnosti monomerov zmanjša tudi agregacija. Kemijsko spremenjen protein je lahko dodatno še imunogen (12).

Mehanizem 4: Z nukleacijo nadzorovana agregacija (oblikovanje jedra agregata)

Z nukleacijo nadzorovana agregacija je splošen mehanizem tvorbe vidnih delcev oziroma oborine. Pri tem mehanizmu ima nativni protein – monomer majhno težnjo po tvorbi malih in srednje velikih oligomerov (združevanje monomerov z manjšimi agregati ni termodinamsko omejeno). Če se uspe oblikovati dovolj velik agregat, temu pravimo jedro kritične velikosti, iz katerega se ob dodatku monomerov hitro izoblikujejo večji agregati. Ta proces je podoben rasti velikih kristalov z dodatkom kristaliničnih jeder v nasičeni raztopini, kjer le-ta prav tako predstavljajo začetek rasti (6).

Značilnost z nukleacijo nadzorovane agregacije je pojav zakasnitvene faze pri tvorbi velikih agregatov. To pomeni, da skozi daljše časovno obdobje (tudi mesece) ni delcev, ki bi jih lahko detektirali, nato pa se nenadoma pojavijo in kopičijo v večje agregate oziroma delce. Dolžina zakasnitvene faze se lahko spreminja naključno od vialo do vialo v eni sami proizvodni seriji, tako da se lahko delci pojavijo v posamezni viali v širokem časovnem območju. To imenujemo »homogena nukleacija«, kjer je jedro kritične velikosti sam protein oziroma agregat, v drugem primeru pa jedro agregata ni protein, ampak neka nečistota (prašni delci, silikonski delci, maziva brizg, oljni delci ...) (slika 5). Temu načinu pravimo »heterogena nukleacija« (6).



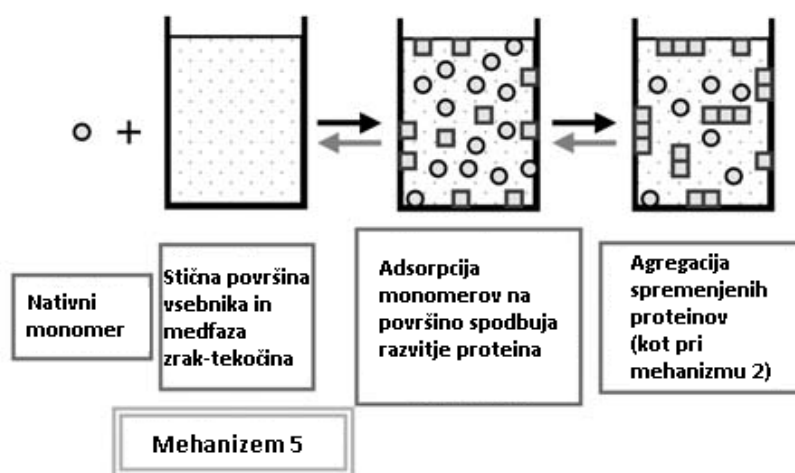
Slika 5: Mehanizem 4 – z nukleacijo nadzorovana agregacija. Prirejeno po (6).

Mehanizem 5: Agregacija zaradi stika s površino

Ta proces agregacije se prične z vezavo nativnega proteina – monomera na površino. V primeru stične površine zrak-tekočina so najverjetneje ključne hidrofobne interakcije, za

trdno površino vsebnika pa tudi elektrostatske. Po začetni reverzibilni vezavi monomera na površino je le-ta podvržen konformacijski spremembi (npr. zaradi povečanja kontaktne površine). Kot pri mehanizmu 2 konformacijsko spremenjen protein agregira, vendar se v tem primeru agregacija izvrši na površini ali pa se spremenjen monomer sprosti nazaj v raztopino (slika 6). Agregacija proteina po zamrzovanju in/ali odmrzovanju je lahko posledica agregacije na stikih površine ledenih kristalov in jo zato uvrščamo pod mehanizem 5, agregacija po zamrzovanju in/ali odmrzovanju proteina pa lahko vključuje tudi druge mehanizme, kot je na primer sprememba pH-ja zaradi pojava kriokonzentracije (6).

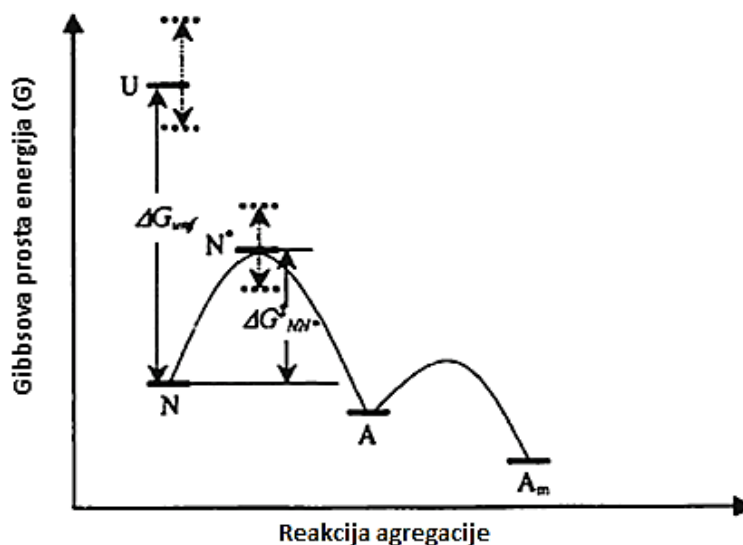
Mehanizem 4 lahko obravnavamo kot poseben primer mehanizma 5, pri čemer je površina, ki inducira agregacijo, površina jedra kritične velikosti (6).



Slika 6: Mehanizem 5 – agregacija zaradi stika s površino. Prirejeno po (6).

Kljub raznolikim možnim načinom agregacije, je cilj doseči nadzor nad agregacijo med procesom proizvodnje in shranjevanjem bioloških učinkovin, za kar je potrebno upoštevati vlogo intrinzične konformacijske stabilnosti in interakcije med proteini. Na splošno velja konformacijska stabilnost za najpomembnejši dejavnik agregacije, ker se agregacija nenativnih proteinov začne iz delno razvite oblike. To je stopnja predhodnih reaktivnih zvrsti, ki jo zaradi strukturne podobnosti z nativno obliko označimo kot N^* . Predvideva se, da je to hitrost-omejujoč dejavnik agregacije proteinov (13, 14). Agregacija interferona γ je tako na primer inhibirana z dodatkom saharoze, ki poveča termodinamsko bariero med nativno in k agregaciji nagnjeno obliko (slika 7). Nasprotno pa denaturant gvanidinijev klorid znižuje bariero in poveča stopnjo agregacije. V vseh primerih je agregacija proteinov zmanjšana ali inhibirana s pogoji v raztopini, ki povečajo Gibbsovo prosto energijo ΔG_0 (15, 16, 17).

Razumevanje mehanizmov agregacije lahko ključno pomaga pri razvoju procesa in formulacije. To je še posebej pomembno pri oblikovanju formulacij, kjer dodajamo splošne proteinske stabilizatorje, kot so saharoza, polioli, polimeri in nekatere aminokisliline ter soli. Ti povečajo stabilnost nativne konformacije proteinov napram različnim okoljskim stresom, ki povzročijo razvitje (6).



Slika 7: Shematski profil reakcije agregacije interferona γ . A je monomerni intermedijat. Puščice med pikčastimi črtami prikazujejo premik Gibbsove proste energije (relativno glede na nativno obliko N) med prehodnim stanjem agregacije N^ in razvito obliko U, ko je dodana sukroza ali gvanidinijev klorid. Prirejeno po (20).*

Poznavanje tipov mehanizma agregacije prav tako pomaga

pri izbiri površinsko aktivnih snovi (PAS) za zmanjšanje agregacije. PAS zmanjšujejo agregacijo preko mehanizma 5 tako, da zmanjšajo izpostavljenost proteina površini. Prav tako lahko PAS pomagajo zmanjšati z nukleacijo nadzorovano agregacijo (mehanizem 4) tako, da obdajo površino jeder kritičnih velikosti. Za PAS značilno pa je, da niso »koristni« za prve tri mehanizme, saj v polisorbatih pogosto najdemo nečistote, ki lahko protein kemijsko spremenijo in zato povzročijo mehanizem agregacije 3 (6).

Agregati terapevtskih proteinov lahko med zdravljenjem povečajo verjetnost neželenih učinkov zaradi imunogenosti, kar je povezano z večjo obolevnostjo pacientov ali umrljivostjo (18, 19). Prav tako lahko spremenijo biološko funkcijo molekul, s čimer se zmanjša učinkovitost zdravljenja. Nenazadnje pa lahko agregati proteinov povzročijo motnost raztopine ali se iz raztopine oborijo, kar za uporabo zdravila ni sprejemljivo (3).

Agregate proteinov glede na velikost razdelimo na vidne ($> 100 \mu\text{m}$), mikronske (1–100 μm), submikronske (100–1000 nm) in nanometrijske delce ($< 100 \text{ nm}$) (21). Še posebej agregati v submikronskem in mikronskem velikostnem razredu so potencialno imunogeni (22, 23). V daljšem časovnem obdobju lahko koalescirajo oziroma se zlijejo v večje ali pa delujejo kot jedra za nadaljnjo agregacijo (24). Zahteve Ameriške in Evropske farmakopeje za mejno koncentracijo vsebnosti delcev v parenteralnih raztopinah so tako zaenkrat določene le za delce, večje od 10 μm , regulatorni organi pa vse bolj stremijo h kvantitativni

opredelitvi mikronskih delcev in kvalitativni karakterizaciji submikronskih delcev že v zgodnjih fazah razvoja. V mnogih primerih so namreč prisotne znatne količine delcev, manjših od 10 μm , proizvod pa kljub vsemu izpolnjuje farmakopejske zahteve. Na splošno so lahko delci vseh velikosti proteinski ali neproteinski. Med neproteinske delce sodijo tudi kapljice tekočih silikonov, ki se jih z rutinskimi metodami da kvantitativno določiti (25).

Degradacija in združevanje proteinov lahko poteka preko številnih mehanizmov, vendar je najpogosteje pri zamrzovanju. Poznavanje osnov zamrzovanja in odmrzovanja je zato usmerjeno k razumevanju vpliva zamrzovanja na sočasno nastajanje in rast agregatov ter preprečevanju le-tega (26).

1.2.2 Proces zamrzovanja

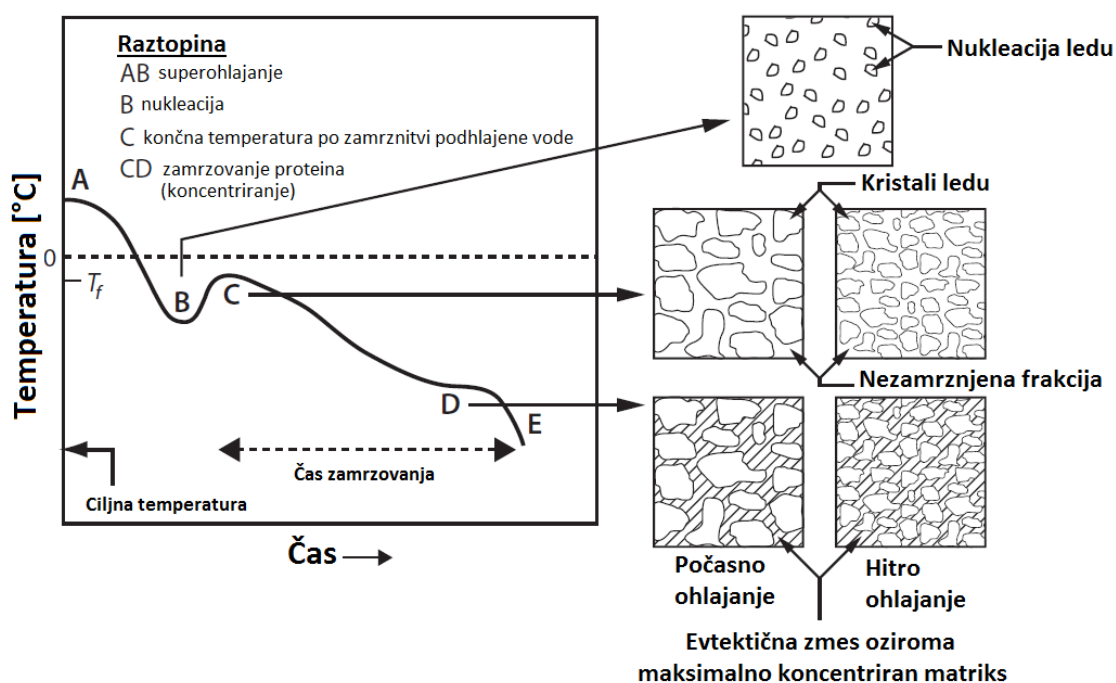
Obnašanje proteina pri nizkih temperaturah moramo razlikovati od samega procesa zamrzovanja. Splošno reverzibilne spremembe proteinske strukture, ki nastanejo kot posledica nizke temperature, imenujemo hladna denaturacija. Proces zamrzovanja zaradi odstranitve vode v obliki ledu podvrže proteine drugim stresom. Dobljeno kriokonzentracijo¹ in protein z odtegnjeno vodo je mogoče opredeliti kot osmotsko obremenitev. Drugi, z zamrzovanjem povzročeni, stresi vključujejo nastajanje ledu na mejnih površinah, spremembo pH-ja in ločitev faz. Za spremembe strukture proteina, ki nastanejo kot posledica teh stresov, je bolj verjetno, da so ireverzibilne. To imenujemo zamrzovalna denaturacija (27, 28).

Pri zamrzovanju in odmrzovanju so pomembni parametri hitrost ohlajanja in ponovnega segrevanja, odmrzovanja ter sestava formulacije. Pri nizkih temperaturah se zmanjša tudi stabilizacijski vpliv vodikovih vezi. Učinki ciklov se seštevajo, pri čemer velja, da hitro zamrzovanje v primerjavi s počasnim do 11-krat bolj denaturira proteine. Ugotovitve, predstavljene v literaturi, ne dajejo jasnih smernic, saj sta izraza »hitro« in »počasi« specifična za vsako študijo oziroma protein posebej (hitrosti ohlajanja in segrevanja se od študije do študije zelo razlikujejo). Prav tako je težko ekstrapolirati rezultate vzorcev majhnih prostornin na zamrzovanje večjih prostornin raztopin proteinov in obratno (29, 30), kar je razumljivo, ker tudi tukaj obstaja pravilo »scale-up«.

Hitrost ohlajanja se v sistemih kaže posredno preko vpliva na tvorbo ledu na medfaznih površinah. Poleg tega se hitrost ohlajanja v literaturi pogosto nanaša na padec temperature v daljšem časovnem obdobju. Vendar je pomembnejša hitrost, opredeljena kot čas,

¹ koncentracija snovi v trdni ali tekoči fazi delno zamrznjene zmesi

potreben, da raztopina dejansko zamrzne in preide iz tekočega v trdno ali steklasto stanje² (čas zamrzovanja). Na sliki 8 je shema zamrzovanja, ki prikazuje različne stopnje zamrzovanja in lastnosti zamrznjenega materiala. Ohlajanje se začne v točki A, v točki B, kjer se pojavi nukleacija, pa je raztopina podhlajena. Sledi zamrzovanje celotne mase med točkama C in D, kar predstavlja čas zamrzovanja. Temperatura ledišča v tem procesu pade, saj se nezamrznjena frakcija postopoma koncentrira. Hitrost ohlajanja določa število nastalih jeder in velikost kristalov ledu. Počasno ohlajanje vodi do nastanka manjšega števila večjih kristalov, hitro ohlajanje pa do nastanka večjega števila manjših kristalov. V točki D nezamrznjena frakcija kristalizira (evtektično strjevanje) ali pa se pretvori v steklasto stanje v maksimalno kriokonzentriran matriks³. Z nadaljnjim ohlajanjem – odstranjevanjem toplote do točke E (ciljna temperatura) je postopek zaključen (26).



Slika 8: Shematski prikaz procesa zamrzovanja snovi v raztopini. Prirejeno po (26).

Ko raztopina zamrzuje, povzroči pretvorba vode v led naraščanje kriokonzentracije nezamrznjene zmesi topljencev, ki vključuje tudi protein, saj zaradi rastočih kristalov vode pride do izključitve sotopljencev. Z naraščanjem koncentracije topljencev v nezamrznjeni

² Trdne snovi so lahko v steklastem (amorfem) ali kristalnem stanju. Razlika med tema dvema stanjema je v urejenosti strukture in spreminjanju viskoznosti nezamrznjene snovi v odvisnosti od temperature. Kristalne snovi imajo strukturo urejeno, medtem ko je urejenost v steklastem stanju omejena le na najbližje sosede, kar spominja na urejenost atomov/molekul v tekočini. Kristalna snov kristalizira pri temperaturi tališča, za snovi v amorfem stanju pa je značilna temperatura steklastega prehoda. Snovi v amorfem stanju so krhke in izotropne.

³ Med zamrzovanjem proteini izpodrivajo topilo in se koncentrirajo med seboj in to imenujemo kriokonzentriran matriks.

frakciji se zvezno zmanjšuje ledišče. Naraščajoča kriokonzentracija nezamrznjene zmesi povzroči povečanje viskoznosti, zmanjšanje difuzijskega koeficienta in na koncu, ko voda ne more več kristalizirati, tvorbo steklastega matriksa. Če vsa prosta voda zamrzne, postane koncentracija topljencev zelo visoka (26).

V praksi majhni podhladitvi raztopine sledi hitra nukleacija ledu tako, da ni ves topljenec usmerjen proti geometrijskemu središču vsebnika. Zaradi smeri prehajanja toplote je rast ledu hitrejša ob stenah v primerjavi s sredino vsebnika. Tako se pojavi majhna difuzija topljencev proti področjem na sredini, ki zamrznejo kasneje. Izključeni topljenci (protein, stabilizatorji, PAS ...) na medfazi znižujejo zmrzišče preostale raztopine in ustvarjajo pogoje, pri katerih je raztopina dlje časa v podhlajenem stanju. To povečuje verjetnost nastanka dendritičnega ledu, ki lažje oddaja latentno toploto v večja in podhlajena področja tekočine. Dendritična rast kristalov ledu omogoča ujetje topljenca v nezamrznjenih kanalčkih oziroma predelih med dendriti. Tako ujeti topljenci so zaradi ekstrakcije vode in zoženja kanalčkov med dendriti tekom rasti ledu kljub vsemu podvrženi lokalnemu učinku kriokonzentracije. Na takšen način nastanejo »ujeti« koncentracijski gradienti (26).

Drugi pomemben vpliv kriokonzentriranja je sušenje. Tekom zamrzovanja se voda v obliki ledu v steklastem (amorfem) stanju loči od proteina in ga s tem izsuši. Vsaka molekula proteina je obdana z molekulami vode, pri čemer je prva plast vode vezana neposredno na protein (~0,3 g vode/g proteina). Hidratacija je pomembna za pravilno zvitje in ohranitev tridimenzionalne strukture proteina. Molekule vode so namreč v pomoč pri pravilnem pregibanju in drsenju glavne ter stranskih verig proteina s hitro tvorbo in izmenjavo vodikovih vezi med aminokislinami. Malo verjetno je, da bi celotno plast vode, ki obdaja protein, odstranili z zamrzovanjem. Notranji del vode je nezmrzljiv oziroma vezan na protein, zato lahko odstranimo le šibkeje vezane zunanje sloje vode (26).

Povečanje ionske moči med zamrzovanjem lahko zmanjša topnost proteina in destabilizira njegovo strukturo zaradi tvorbe solnih mostičkov. Prav tako lahko kristalizirajo pufrne soli in ostale pomožne snovi, če je dosežena njihova mejna koncentracija, in tako spremenijo pH (26).

Proteini lahko tvorijo interakcije s površino ledu, kar vodi v spremembe nativne strukture proteina. Protein se lahko na stični površini ledu denaturira zaradi slabjenja hidrofobnih vezi kot tudi preko adsorpcije na površino ledu (31, 32).

1.3 DOLOČANJE LASTNOSTI AGREGATOV

Obstaja več različnih metod za analizo proteinskih delcev in agregatov, ki se med seboj razlikujejo glede na detekcijsko območje. To so pretočna mikroskopija, vrstična elektronska mikroskopija, ramanska mikroskopija, resonančna tehnika merjenja mase, dinamično sipanje laserske svetlobe, izključitvena kromatografija (SEC), elektronski števec (ang. Coulter counter), infrardeča spektroskopija s Fourierovo transformacijo, pretočno frakcioniranje v polju, kapilarna conska elektroforeza (CZE), poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (SDS-PAGE), tradicionalna farmakopejska metoda zamreženja svetlobe (LO, ang. Light Obscuration). Slika 9 prikazuje detekcijsko območje analitskih metod, ki jih bomo v nadaljevanju podrobneje predstavili.



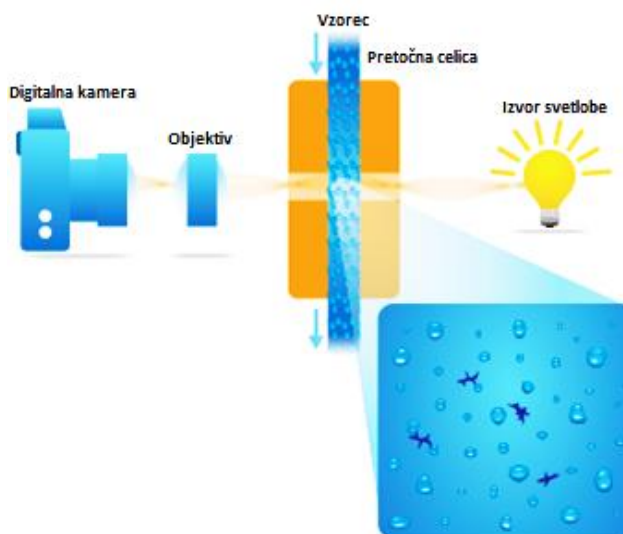
Slika 9: Detekcijsko območje nekaterih analitskih metod. Prirejeno po (33).

1.3.1 Pretočna mikroskopija (MFI)

MFI (ang. Micro Flow Imaging) je pretočna mikroskopska tehnika za analizo proteinskih delcev, ki združuje zmogljivost neposrednega slikanja digitalne mikroskopije z natančno kontrolo mikrofluidike v enoten instrument za avtomatizirano analizo delcev, suspendiranih v tekočini. Deluje tako, da zajema slike toka suspendiranih delcev, ki potujejo skozi občutljivo območje pretočne celice. Prostornina vzorca je natančno določena z geometrijo pretočne celice, zato se koncentracija delcev določi absolutno. Na voljo so različne nastavitve povečave, s katerimi dobimo želeno območje velikosti delcev in kakovost slike. Slika vsakega delca se posebej analizira in ustvari bazo podatkov o številu delcev, njihovi velikosti, prepustnosti (transparentnosti) in morfoloških lastnostih. Za vizualno spremljanje vzorca v realnem času so slike delcev ves čas meritve prikazane na računalniškem zaslonu. MFI je edina slikovna tehnika, ki omogoča 85 % učinkovitost

vzorčenja in tako analizira skoraj ves vzorec. Rezultati so zato statistično robustni. Metoda je destruktivna, kar pomeni, da vzorec po meritvi ni več uporaben (34, 35).

Za parenteralne pripravke je primarnega pomena zaznava in analiza delcev, večjih od 2 μm , zelo veliki delci ($> 70 \mu\text{m}$) pa lahko zaradi gostote in posedanja predstavljajo problem pri uvedbi vzorca z aspiracijo. Pri reševanju te težave je v pomoč sam način uvedbe vzorca, ki temelji na težnosti – vzorec potuje v navpični smeri od zgoraj navzdol. Takšen način uvedbe vzorca omogoča analizo velikih delcev, ki jih ni mogoče zanesljivo suspendirati in aspirirati, ter



Slika 10: Vzorec s pipeto nanese na nastavek za vzorec, od koder ga črpalka ves čas meritve črpa skozi osvetljeno pretočno celico in od tam po cevkah v odpad. Digitalna kamera posname delce. Prirrejeno po (35).

je enako učinkovit za majhne in velike delce. Eksperimentalni rezultati kažejo, da je možno izmeriti delce velikosti od 0,75 μm do 400 μm . Za analizo 1 mL vzorca je običajno potrebno 5 minut. Med posameznimi meritvami je potrebno spiranje celice. Princip delovanja MFI-ja je prikazan na sliki 10. Sistemska programska oprema omogoča analizo vzorcev z uporabo različnih klasifikacijskih filtrov (porazdelitev analiziranih delcev v želeno območje velikosti, merjenje površine, ekvivalentnega krožnega premera, intenzitete, krožnosti in maksimalnega Feretovega premera za vsak delec posebej), prav tako pa omogoča uporabniku ustvarjanje lastnih parametrov (34, 35). Za MFI so značilni velika občutljivost za visoko prosojne delce, neodvisnost od vrste materiala, natančna določitev velikosti in koncentracije delcev, analiza morfoloških lastnosti vsakega delca posebej, zmožnost merjenje zelo nizkih koncentracij velikih delcev v prisotnosti visoke koncentracije manjših delcev ter dobra ponovljivost. MFI ima zato pri analizi delcev v parenteralnih raztopinah številne prednosti pred tradicionalno farmakopejsko LO metodo, ki določa velikost delcev na podlagi zatemnitve. Te so izboljšana občutljivost in natančnost za detekcijo skoraj prosojnih delcev, potrditev rezultatov z neposrednim opazovanjem slik, neobčutljivost na vrsto in obliko materiala, večje merilno območje koncentracij (MFI ~ 175000 delcev/mL, LO 12000 delcev/mL), sposobnost merjenja zelo nizkih koncentracij in pridobitev dodatnih informacij o morfologiji delcev (34). Velja pa pripomniti, da je

potrebno biti pozoren na formulacije, katerih lomni količnik je blizu lomnega količnika proteina. V tem primeru se občutljivost MFI metode močno zmanjša.

1.3.2 Resonančna tehnika merjenje mase – Archimedes

Archimedes je aparatura, ki deluje na principu resonančne tehnike merjenja mase in se uporablja za analizo submikronskih in mikronskih delcev. Analizira lahko delce velikosti od 50 nm do 5 μm , kar je odvisno od vrste senzorja. Na voljo so nano- (0,05–1 μm) in mikrosenzorji (0,15–5 μm), ki se razlikujejo v velikosti resonatorja. Izbira vrste senzorja je odvisna od velikostnega reda delcev, ki jih želimo meriti. Za določanje velikosti proteinskih delcev se uporablja mikrosenzor. Kanalček resonatorja se nahaja v hermetično zaprti komori pod vakuumom. Vzorec pride v senzor po obvodnih kanalih in nato zaradi tlačnih razlik v obvodnih kanalih potuje skozi kanalček senzorja (resonatorja), ki spreminja svojo frekvenco v odvisnosti od mase delcev, ki gredo skozi kanal. Spremembo resonančne frekvence izmeri laser, ki odda signal fotodetektorju. Signal nato obdela računalnik oziroma programska oprema. Senzorji omogočajo merjenja mase z natančnostjo 1 femtogram (10^{-15} g). Zaradi sprememb v gostoti in posledično spremembe mase resonatorja, ki se odraža v spremembi resonančne frekvence, je sistem sposoben razlikovati med delci z manjšo gostoto (npr. kapljice silikonskega olja) od gostote nosilne tekočine ter delci z gostoto, večjo od gostote nosilne tekočine (npr. lateks kroglice, proteinski delci). Archimedes kot rezultat poda število delcev, njihovo maso, številčno koncentracijo in porazdelitev velikosti delcev (25, 36).

Določitev velikost delcev z merjenjem resonance temelji na premiku frekvence ($\Delta\nu$), ki je sorazmeren plovni masi (M_p) in odvisen od občutljivosti resonatorja (S) (enačba 1).

$$M_p = \Delta\nu S \quad (\text{enačba 1})$$

Pretvorba M_p (enačba 2) v maso (M) in premer (D) (enačba 3) temelji na gostoti delca, ρ_{delec} (literaturna vrednost in proizvajalčevo priporočilo je 1,32 g/mL za proteinske delce in temelji na gostoti čistega proteina; dobavitelj silikonskega olja pa navaja gostoto 0,97 g/mL) in gostoti tekočine, $\rho_{tekočina}$ (izračunano na podlagi frekvence senzorja relativno glede na frekvenco in gostoto vode kot reference) (25).

$$M = \frac{M_p}{1 - \frac{\rho_{tekočina}}{\rho_{delec}}} \quad (\text{enačba 2})$$

$$D = \sqrt[3]{\frac{6M}{\pi\rho_{delec}}} \quad (\text{enačba 3})$$

1.3.3 Izključitvena kromatografija (SEC)

Izključitvena kromatografija (SEC, ang. Size Exclusion Chromatography) je vrsta tekočinske kromatografije, ki ločuje molekule glede na velikost (Stokesov radij) in obliko. Kadar za ločevanje uporabljamo vodne mobilne faze, govorimo o gelski filtraciji, v primeru uporabe organskih mobilnih faz pa govorimo o gelski permeaciji. Stacionarno fazo kromatografske kolone predstavljajo porozni delci silikagela ali polimerov (agaroza, dekstran, polistiren ali poliakrilamid). Po injiciranju vzorca molekule zaradi toka mobilne faze difundirajo v pore stacionarne faze. Molekule, večje od por, ne morejo prodreti v delce stacionarne faze, temveč se gibljejo le med njimi in se zato z mobilno fazo potujejo najhitreje. Iz kolone se eluirajo z ničelnim volumnom. To je volumen mobilne faze med kroglicami stacionarne faze. Manjša kot je molekula oziroma delec, lažje in globlje difundira v notranjost por. Za elucijo manjših molekul je zato potreben večji elucijski volumen in s tem daljši čas potovanja skozi kolono. Obseg velikosti molekul, ki se bodo lahko med seboj ločile, določa velikost por stacionarne faze (1, 37).

SEC se uporablja za ločevanje molekul različnih velikosti, razsoljevanje vzorcev, zamenjavo pufra, določevanje porazdelitve velikosti molekul analita in določevanje relativne molekulske mase globularnih proteinov. Molekulska masa je sorazmerna Stokesovemu polmeru globularnega proteina, ta pa elucijskemu volumnu. Med elucijskim volumnom in desetiškim logaritmom relativne molekulske mase je linearna zveza. Tipične kalibracijske krivulje temeljijo na proteinih ali polimerih z znanimi molekulskimi masami (1, 37, 38). V biofarmacevtski industriji pa je primarnega pomena analiza agregatov proteinov pri stabilnostnih študijah. Glede na občutljivost in ponovljivost metode, bi lahko rekli, da SEC velja za standardno metodo spremljanja agregacije proteinov. Pogosto se kot analitska metoda uporablja tako pri razvoju procesa, kakor tudi pri razvoju formulacij. Zaradi njene robustnosti in dobre ponovljivosti je SEC metoda pogosto uporabljena za namen analize – sproščanje zdravila na trg. Ker omogoča razlikovanje med različnimi oblikami agregatov, se lahko uporablja tudi kot prvi korak čiščenja proteinov (odstranitev agregatov). SEC je prav tako navedena kot običajno uporabljena metoda v smernicah Evropske farmakopeje z naslovom »Tehnična navodila za izdelavo monografij s področja sinteznih peptidov in rekombinantnih DNA proteinov« (ang. Technical Guide for the Elaboration of Monographs on Synthetic Peptides and Recombinant DNA Proteins). Zato predstavlja del analitične strategije, namenjene zagotavljanju varnosti biofarmacevtskih produktov (38).

1.3.4 Dinamično sipanje laserske svetlobe (DLS)

Dinamično sipanje laserske svetlobe oziroma fotonska korelacijska spektroskopija je dobro uveljavljena metoda merjenja velikosti in porazdelitve velikosti delcev, velikih od 0,3 nm do nekaj μm . Metoda temelji na sipanju svetlobe, ki je posledica Brownovega gibanja delcev. Vzorec je osvetljen z laserskim žarkom, intenziteto fluktuacij sipane svetlobe pri določenem kotu zazna in analizira detektor. Intenziteta sipane svetlobe se spreminja glede na hitrost gibanja delcev v vzorcu, ki je odvisna od velikosti delcev. DLS instrument iz hitrosti Brownovega gibanja določi velikost okroglega delca, ki difundira z enako hitrostjo kot merjeni delec. Brownovo gibanje je naključno gibanje delcev v tekočini zaradi trkov z molekulami topila, ki obdajajo delce. Pri tem velja, da se manjši delci gibljejo hitreje, večji pa počasneje. Korelacijo med hitrostjo delcev in njihovo velikostjo opisuje Stokes-Einsteinova enačba velikosti delcev (enačba 4).

$$d(H) = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (\text{enačba 4})$$

$d(H)$... hidrodinamski premer delca

k_B ... Boltzmanova konstanta

T ... absolutna temperatura

η ... dinamična viskoznost

D ... translacijski difuzijski koeficient

Kot rezultat meritev sta podana polidisperzni indeks (PdI) in povprečna velikost delcev.

PdI je merilo širine porazdelitve velikosti delcev in znaša med 0 in 1.

DLS se uporablja za karakterizacijo proteinov, polimerov, emulzij, micelov, nanodelcev ali koloidov, dispergiranih ali raztopljenih v tekočini (39).

2 NAMEN DELA

Zamrzovanje je pogost način shranjevanja in stabilizacije zdravilne učinkovine bioloških zdravil (proteina). Pri večini bioloških učinkovin se je izkazalo, da zamrzovanje vpliva na njihovo kakovost. Pogosto namreč pride do tvorbe agregatov ter večjih proteinskih delcev, kar vpliva na zmanjšanje učinkovitosti zdravila, hkrati pa poveča verjetnost nezaželenega imunskega odziva pacienta. Zato je za vsak produkt potrebno razviti postopek zamrzovanja zdravilne učinkovine in po potrebi raztopino proteina tudi stabilizirati z dodatki. Pri tem se praviloma preveri vpliv večjega števila stabilizatorjev pri različnih koncentracijah. Da bi zmanjšali porabo proteina za razvoj postopka zamrzovanja, je potrebno razviti sistem, kjer se bodo pri zamrzovanju manjših volumnov odražali vsi bistveni fizikalni pojavi, ki so značilni za zamrzovanje večjih količin (npr. čas zamrzovanja, kriokoncentracija, velikost kristalov, ipd.).

Namen magistrske naloge je razviti in optimizirati ustrezen profil zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev rekombinantnih bioloških učinkovin manjših prostornin (1–5 mL) in tako doseči kontrolirano zamrzovanje ter odmrzovanje, ki bo odražalo pogoje zamrzovanja na večji skali (npr. zamrzovanje zdravilne učinkovine v plastenkah prostornine 2 L). V sklopu magistrske naloge želimo razviti postopek, ki bo omogočal hkratno testiranje vsaj 20 vzorcev. Cilj je ugotoviti, kaj se zgodi z rekombinantno učinkovino po večjih ciklih zamrzovanja, pri zamrzovanju v steklenih vialah in kako vplivata koncentracija proteina ter prisotnost stabilizatorja na agregacijo pri zamrzovanju in odmrzovanju. Kakovost produkta bomo ovrednotili z analizo nastalih agregatov z različnimi metodami: dinamično sipanje laserske svetlobe, pretočna mikroskopija, izključitvena kromatografija, resonančno merjenje mase.

Kontrolirano zamrzovanje vzorcev majhnih prostornin bi omogočilo bistveno manjšo porabo materiala pri tovrstnih študijah zamrzovanja in odmrzovanja. Izboljšali bi trenutno metodo zamrzovanja rekombinantnih monoklonskih protiteles, kjer vzorce za namene shranjevanja ali testiranja kontrolirano zamrzujemo s pomočjo naprave CryoPilot le v večjih volumnih 25–30 mL. Hkrati lahko zamrznemo le deset 30 mL Sartoriusovih vrečk. To bi bistveno znižalo ceno študij ter skrajšalo čas razvoja, saj bi lahko v istem času testirali večje število formulacij.

3 EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 MATERIALI

Za delo smo uporabili dve različni vrsti rekombinantnih monoklonskih protiteles IgG1, proizvedenih s celično linijo CHO, ki so last farmacevtske družbe Lek d.d. Zaradi tajnosti podatkov v magistrski nalogi ne bomo poimenovali vrste IgG1, ampak bomo uporabljali izraza protein X in protein Y. Iz istih razlogov tudi ne bomo podali koncentracij in pH vrednosti pufrov (preglednica I).

Preglednica I: Seznam uporabljenih rekombinantnih monoklonskih protiteles IgG1 in podatki o njih.

IgG1	Koncentracija proteina in pufer izhodnega materiala
Protein X	30 mg/mL, citratni pufer (NaCitr)
Protein Y	70 mg/mL, histidinski pufer (His/Ac)

Za pripravo pufrov in ostalih raztopin smo uporabili kemikalije, našteje v preglednici II.

Preglednica II: Seznam uporabljenih kemikalij in standardov.

Kemikalija	Proizvajalec	Kataloška številka	Namen uporabe
Citronska kislina monohidrat	Merck Millipore	100244	Priprava pufra
Natrijev hidroksid	Merck Millipore	106498	Priprava pufra
Devterijev oksid	Sigma-Aldrich	151882	Referenčna raztopina za Archimedes
Etanojska (ocetna) kislina	Sigma-Aldrich	320099	Priprava pufra
96 (V/V) % etanol	Merck Millipore	100971	Priprava raztopine za čiščenje UPLC-ja
L-histidin	Sigma-Aldrich	H8000	Priprava pufra
Kalijev hidrogenfosfat	Merck Millipore	105101	Priprava mobilne faze za SEC
Kalijev dihidrogenfosfat	Merck Millipore	104873	Priprava mobilne faze za SEC
Standard velikosti 60 nm delcev	Thermo Fisher Scientific	3060A	Preverjanje ustreznosti DLS meritev
Standard velikosti 200 nm delcev	Thermo Fisher Scientific	3200A	Preverjanje ustreznosti DLS meritev
Standard velikosti 5 µm delcev	Thermo Fisher Scientific	CC05	Preverjanje ustreznosti MFI meritev
Standard velikosti 10 µm delcev	Thermo Fisher Scientific	4210A	Preverjanje ustreznosti MFI meritev
Saharoza	Sigma-Aldrich	84097	Priprava pufra

3.2 LABORATORIJSKA OPREMA

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili laboratorijsko opremo, naštetu v preglednici III.

Preglednica III: Seznam uporabljene laboratorijske opreme in materiala.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec	Namen opreme
Acquity UPLC H-Class System	Waters	Analiza agregatov (SEC)
Archimedes	Malvern	Analiza agregatov
Biofotometer	Eppendorf	Določanje koncentracije proteina
Brizge 5 mL, 20 mL, 50 mL	BD Plastipak™	Filtriranje vzorcev
Celsius® S³ System (CryoPilot)	Sartorius	Kontrolirano zamrzovanje in odmrzovanje proteinov
Degazator	Vacuubrand®	Degaziranje vzorcev
PURELAB Chorus 1	ELGA	Visokoprečiščena voda
Filter 0,22 µm	Merck Millipore	Filtriranje raztopin
Hladilnik	Angelorri	Shranjevanje vzorcev in pufrov
Komora z laminarnim pretokom zraka	Klimaoprema	Aseptična priprava vzorcev
Magnetno mešalo C-MAG HS 7 digital	IKA®	Priprava pufrov
Micro-Flow Imaging™ (MFI)	ProteinSimple	Analiza agregatov
Mikrotitrne plošče	VWR International	Vsebnik za analizo vzorcev
NanoDrop 8000	Thermo Fisher Scientific	Določanje koncentracije proteina
Nunc™ krioviale 2 mL	Thermo Fisher Scientific	Vsebnik za vzorce
pH meter SevenExcellence	Mettler Toledo	Merjenje pH pufrov
Polietilen tereftalat glikol (PETG) vial 5 mL	Thermo Fisher Scientific	Vsebnik za vzorce
Precizna in analitska tehtnica	Sartorius	Tehtanje kemikalij za pripravo pufrov
Ročne pipete Eppendorf Research® plus	Eppendorf	Priprava vzorcev – pipetiranje
Sterilni tipsi	Eppendorf	Priprava vzorcev – pipetiranje
Sterilne stripete	Corning®	Priprava vzorcev – pipetiranje
Škatle za zamrzovanje	GLW Storing Systems GmbH	Vsebnik za vial
TECAN Freedom Evo	TECAN	Pipetiranje (priprava vzorcev)
TECAN Infinite M200	TECAN	Merjenje absorbance vzorcev v mikrotitrski plošči
Vakuumska črpalka	Merck Millipore	Filtriranje raztopin
Zamrzovalna skrinja -80 °C	Angelorri	Zamrzovanje in shranjevanje proteinov
Zetasizer APS	Malvern	DLS – analiza agregatov

3.3 METODE

3.3.1 Priprava vzorcev

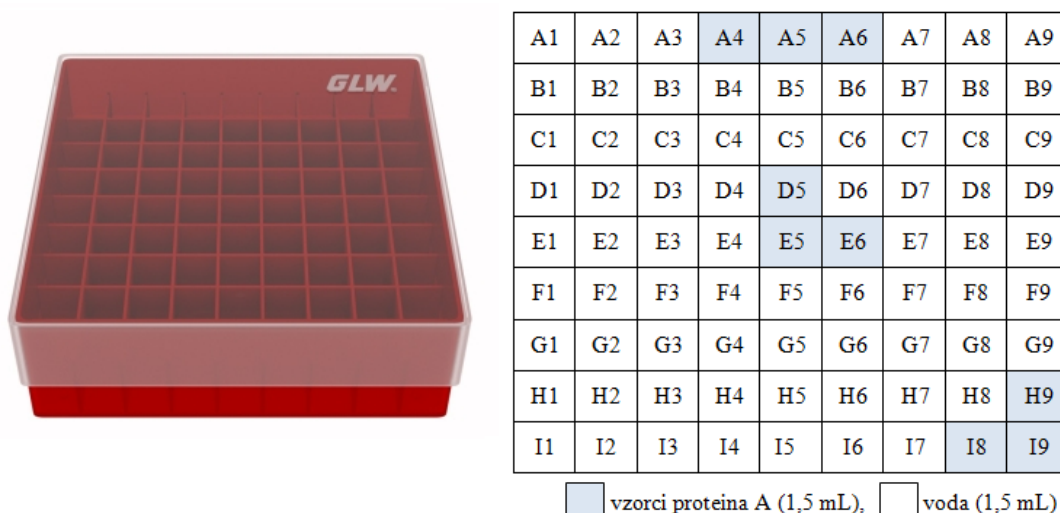
3.3.1.1 Nekontrolirano zamrzovanje in odmrzovanje

Pripravili smo vzorce proteina X s koncentracijo 1 mg/mL. Za redčenje izhodne raztopine proteina X s koncentracijo 30 mg/mL smo uporabili citratni pufer. Pufer smo pripravili iz citronske kisline monohidrata, natrijevega hidroksida in visokoprečiščene vode. Pufer in pripravljeno raztopino proteina smo s pomočjo vakuumske črpalke prefiltrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,22 μm .

V vsako 2 mL kriovialo smo sterilno odpipetirali 1,5 mL pripravljene raztopine proteina X oziroma vode, vialo zaprli, jih zložili v škatle za zamrzovanje, kot je prikazano na sliki 11, škatle zaprli in jih dali v hladilnik oziroma zamrzovalno skrinjo. Pri vseh pogojih priprave vzorcev smo poskus izvajali v dveh paralelah.

Pogoji priprave vzorcev:

- 1 dan shranjeni pri temperaturi 5–8 °C (t_0),
- 1x zamrznjeni v zamrzovalni skrinji (-80 °C) in odmrznjeni na sobni temperaturi,
- 3x zamrznjeni v zamrzovalni skrinji (-80 °C) in odmrznjeni na sobni temperaturi,
- 5x zamrznjeni v zamrzovalni skrinji (-80 °C) in odmrznjeni na sobni temperaturi.



Slika 11: Škatla za zamrzovanje in položaj vial v njej. Viala z vodo smo uporabili zato, da je bila škatla v celoti napolnjena.

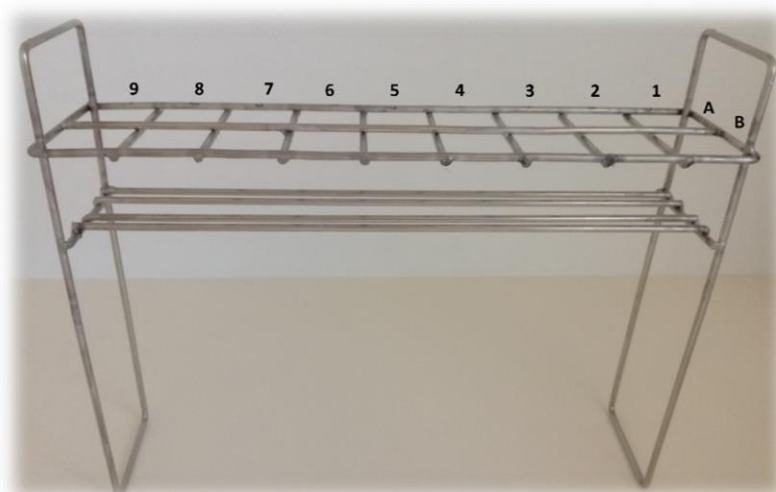
Med posameznimi cikli zamrzovanja in odmrzovanja (FT) vzorcev nismo premešali. Po končnem številu FT-jev smo vzorce nežno premešali z desetkratnim obračanjem vialo okrog vodoravne osi, jih pustili stati na sobni temperaturi 1 uro in jih nato 20 minut degazirali pri znižanem tlaku (podtlaku) 970 mbar.

3.3.1.2 Kontrolirano zamrzovanje in odmrzovanje

Z namenom dosega kontroliranega zamrzovanja in odmrzovanja proteinskih vzorcev smo dali izdelati dve različni stojali. Eno za 5 mL PETG vialo (slika 12) in drugo za 2 mL vialo (slika 13).

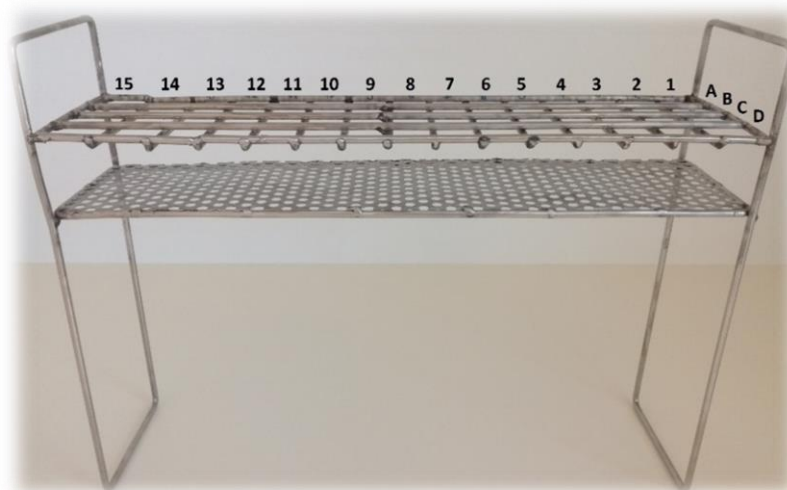
Po enakem postopku kot pri nekontroliranem zamrzovanju smo pripravili raztopino proteina X s koncentracijo 1 mg/mL, jo z vakuumsko črpalko prefiltrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,22 μm in v vsako 5 mL PETG vialo sterilno alikvotirali 4 mL oziroma v vsako 2 mL kriovialo 1,5 mL pripravljene raztopine oziroma vode. PETG vialo in kriovialo smo zaprli, jih zložili v stojali in zamrznili.

Stojalo za PETG vialo: Vzorce proteina X smo zložili izmenjujoče se na vsako drugo mesto, na preostala mesta pa vialo z vodo. V vzorce na sredini in na robu stojala smo namestili sonde za spremljanje temperature vzorcev tekom zamrzovanja in odmrzovanja (slika 12). Poskus smo ponovili večkrat in spreminjali položaje vzorcev in sond.



Slika 12: Stojalo za PETG vialo.

Stojalo za 2 mL vialo: Vzorce proteina X in kriovialo z vodo smo (naključno) zložili v stojalo za 2 mL vialo in testirali več možnih kombinacij postavitve kriovial. Tudi temperaturno sonde smo postavili na različna mesta z vzorcem (sredina stojala, rob stojala). Ustrezna postavitve za kontrolirano zamrzovanje in odmrzovanje je predstavljena v poglavju »Rezultati z razpravo«.



Slika 13: Stojalo za 2 mL viale.

Za zamrzovanje in odmrzovanje vzorcev smo uporabili Celsius[®] S³ sistem (Sartorius Stedim Biotech, Francija), ki je sestavljen iz hladilnega sistema CryoPilot A, stresalnika CryoMixer Jr., S³ modula za zamrzovanje in odmrzovanje, računalnika, krio cevi in enote za priklop termočlenov. Sistem ima prav tako svojo programsko opremo CryoPilot, ki deluje v operacijskem sistemu Windows. Komora se ohlaja preko prenosa toplote s konvekcijo. Nekaj osnovnih profilov zamrzovanja in odmrzovanja programska oprema že vsebuje, možno pa je tudi izdelati poljuben profil. Izvedli smo en, tri in pet ciklov zamrzovanja in odmrzovanja.

Po odmrzovanju smo vzorce v PETG vialah nežno premešali (homogenizacija) z desetkratnim obračanjem vial okrog vodoravne osi, jih pustili stati na sobni temperaturi 1 uro, jih ponovno premešali in alikvotirali 1,5 mL vzorca v 2 mL viale. (Preostanek vzorca smo uporabili za druge raziskovalne namene, ki niso del magistrske naloge.) Nato smo vzorce 20 minut degazirali pri podtlaku 970 mbar in jih analizirali. Vzorce v 2 mL vialah smo prav tako premešali, jih pustili 1 uro stati na sobni temperaturi in jih nato 20 minut degazirali pri podtlaku 970 mbar.

3.3.1.3 Vpliv koncentracije proteina na agregacijo pri zamrzovanju in odmrzovanju

Pripravili smo raztopine proteina X koncentracij 1 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL in 30 mg/mL v citratnem pufri (preglednica IV).

Preglednica IV: Prostornine proteina X in pufra za pripravo vzorcev.

Koncentracija proteina X	V proteina X [mL]	V pufra [mL]
1 mg/mL	1,0	29,0
10 mg/mL	10,0	20,0
20 mg/mL	20,0	10,0
30 mg/mL	30,0	0,0

Pripravljene raztopine proteina smo s pomočjo 50 mL brizg prefiltrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,22 μm in preverili njihove koncentracije z merjenjem absorbance pri 280 nm z NanoDropom. 4 mL vsake izmed pripravljenih raztopin proteina X smo v šestih replikah odpipetirali v sterilne PETG vial, jih zaprli, po dve repliki vzorca vsake koncentracije zložili v stojalo za PETG vial in jih nato kontrolirano enkrat oziroma petkrat zamrznili in odmrznili s Celsius[®] S3 sistemom. Po dve repliki vsakega vzorca smo uporabili za meritve ob t_0 .

Po odmrzovanju smo vzorce nežno premešali z desetkratnim obračanjem vial okrog vodoravne osi, jih pustili stati na sobni temperaturi 1 uro, jih ponovno premešali in alikvotirali v 2 mL vial 1,9 mL raztopine. Nato smo vzorce 20 minut degazirali pri podtlaku 970 mbar. 1,5 mL vzorca smo porabili za MFI, 100 μL za DLS, 100 μL za SEC in 200 μL za Archimedes. Za SEC analizo smo vzorce višjih koncentracij s pomočjo robota TECAN Freedom Evo v citratnem pufu razredčili na 1 mg/mL in 100 μL vsakega vzorca prenesli v mikrotitrsko ploščo ter preverili koncentracije z napravo za merjenje absorbance vzorcev v mikrotitrskih ploščah TECAN Infinite M200.

3.3.1.4 Vpliv stabilizatorja na agregacijo pri zamrzovanju in odmrzovanju

Pripravili smo raztopine proteina X koncentracij 1 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL in 30 mg/mL ter koncentracijo saharoze 125 mM v citratnem pufu (preglednica V).

Preglednica V: Prostornine proteina X in pufra ter masa saharoze za pripravo vzorcev.

Koncentracija proteina X	V proteina X [mL]	m saharoze [g]	V pufra [mL]
1 mg/mL	1,0	1,28	do 30,0
10 mg/mL	10,0	1,28	do 30,0
20 mg/mL	20,0	1,28	do 30,0
30 mg/mL	30,0	1,28	0,0

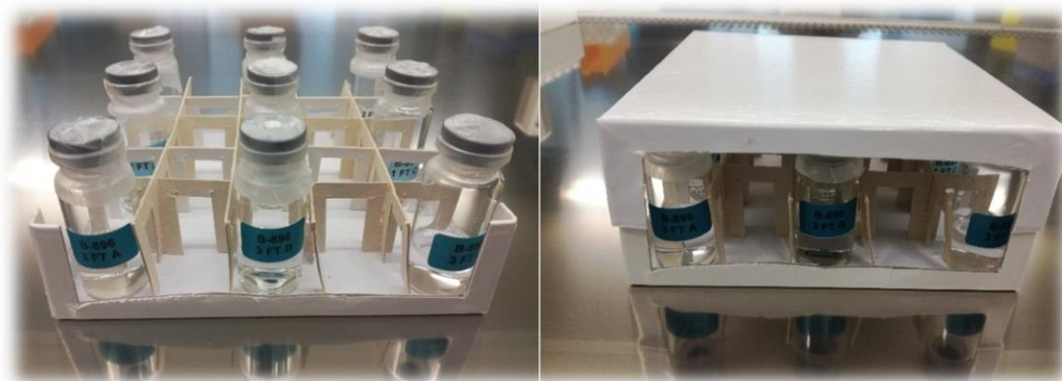
S pripravljenimi raztopinami smo nadalje postopali povsem enako kot pri prejšnjem poskusu (»Vpliv koncentracije proteina na agregacijo pri zamrzovanju in odmrzovanju«), le da smo za redčenje vzorcev pred SEC analizo uporabili citratni puffer s 125 mM saharozo.

3.3.1.5 Zamrzovanje proteina Y v steklenih vialah

Ker smo tekom študije vpliva zamrzovanja in odmrzovanja na agregacijo proteina Y ugotovili, da se število mikronskih agregatov (MFI) po treh ciklih zamrzovanja in odmrzovanja v PETG vialah zmanjša, kar je v nasprotju z rezultati iz preteklih študij drugih proteinov in z ugotovitvami iz člankov, smo za razrešitev nastalega vprašanja ubrali drugo pot raziskovanja. V vseh dosedanjih poskusih smo vzorce terapevtskih proteinov zamrzovali v plastičnih vsebnikih. Zaradi zelo nenavadnega pojava zmanjšanja števila agregatov proteina Y po 3 FT-jih (število agregatov po 3 FT-jih je bilo podobno kot po 1 FT-ju) pa smo se odločili, da bomo vzorce zamrzovali in odmrzovali v steklenih vialah, ki so sicer tudi končna primarna ovojnina zdravila.

Izhodno raztopino proteina Y s koncentracijo 70 mg/mL smo desetkrat razredčili v histidinskem pufru in raztopino prefiltrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,22 μm . Histidinski pufer smo pripravili iz L-histidina, etanojske kisline in visokoprečiščene vode. V sterilne steklene vialo smo sterilno alikvotirali 4 mL pripravljene raztopine in vzorce 0x, 1x, 2x in 3x zamrznili ter odmrznili. Zaradi težav s Celsius[®] S³ sistemom (servis v tujini) smo vzorce zamrzovali v skrinji. Zložili smo jih čim bolj narazen, da so se enakomerno ohlajali (slika 14).

Po odmrzovanju smo vzorce rahlo premešali (homogenizacija) z desetkratnim obračanjem vialo okrog vodoravne osi, jih pustili stati na sobni temperaturi 1 uro, jih ponovno premešali in alikvotirali v epice 1,9 mL. 1,5 mL vzorca smo porabili za MFI, 100 μL za DLS, 100 μL za SEC in 200 μL za Archimedes.



Slika 14: Postavitev steklenih vial za zamrzovanje v zamrzovalni skrinji.

3.3.2 Analitske metode

Pretočna mikroskopija – MFI

Za štetje in karakterizacijo delcev v območju velikosti 2–300 μm smo uporabili instrument MFI (MFI 5100, ProteinSimple, Ottawa, Ontario, Kanada), opremljen z visokoločljivostno 400 μm pretočno celico. Sistem je podprt s programsko opremo MFI View System Software, ki deluje v operacijskem sistemu Windows. Sistem MFI omogoča ročno ali robotsko analiziranje vzorcev. Uporabili smo ročno. Pred analizo vzorcev smo celico in nastavek za tipse očistili z detergentom in visokoprečiščeno vodo. Čistost celice smo preverili z merjenjem dveh zaporednih slepih vzorcev (visokoprečiščena voda). Čistost celice je ustrezna, če je številčna koncentracija delcev v visokoprečiščeni vodi manjša od 80 delcev/mL. Za preverjanje natančnosti metode pa smo uporabili standarda polistirenskih kroglic z znano koncentracijo in velikostjo kroglic 5 μm in 10 μm . Pred vsako meritvijo smo sistem sprali z visokoprečiščeno vodo (Ph. Eur.) pri največjem možnem pretoku in tako zagotovili ustrezno čistost pretočne celice.

Za odstranitev zračnih mehurčkov iz vzorcev, ki sicer lažno povečajo število agregatov ter vplivajo na njihovo povprečno velikost, smo vzorce pred meritvijo 20 minut degazirali pri podtlaku 970 mbar.

Zelo pomemben je način mešanja vzorcev. Vzorcev ne smemo stresati ali mešati na vibracijskem mešalniku (vorteksu), saj s tem povzročimo povečanje števila agregatov. Tik pred meritvijo smo vsak vzorec posebej počasi premešali z desetkratnim obračanjem viala okrog vodoravne osi in ga nato s pomočjo pipete in sterilnega tipsa prenesli na nastavek za nanos vzorca. Od 1,5 mL vzorca smo ga za uvedbo v celico tik pred meritvijo uporabili 0,2 mL (ang. prerun), 0,615 mL pa smo ga nato analizirali pri pretoku 0,150 mL/min.

Ponovljivost MFI meritev je dobra, če je odstopanje med replikami maksimalno $\pm 10\%$. Slednje ne velja za proteinske vzorce ob t_0 , kjer naj bi bila številčna koncentracija manjša od 1000 delcev/mL, ponovljivost pa ni nujno v območju $\pm 10\%$.

Resonančna tehnika merjenja mase – ARCHIMEDES

Za analizo delcev v območju velikosti od 200 nm do 5 μm smo uporabili instrument Archimedes (Malvern, Worcestershire, Združeno kraljestvo Velike Britanije in Severne Irske), opremljen s Hi-Q mikrosenzorjem (Malvern) in podprt s programsko opremo Archimedes verzije 1.20. Pred analizo vzorcev smo pomerili slep vzorec, za kar smo uporabili visokoprečiščeno vodo. Sistem je čist, če je v slepem vzorcu po desetih minutah

analize manj kot 20 delcev. Pred analizo vzorcev sistem samodejno določi mejo detekcije (LOD), ki jo lahko za medsebojno primerjavo in obdelavo rezultatov naknadno spremenimo. Za analizo vzorcev lahko izbiramo med več načini meritev; določimo lahko količino vzorca za analizo (nL), število izmerjenih delcev ali pa izberemo čas meritve. Vzorec smo uvajali v sistem 30 sekund in ga nato analizirali 100 nL. Med posameznimi meritvami vzorcev smo resonatorski kanalček mikrosenzorja splahnjevali z visokoprečiščeno vodo, tekom meritev pa smo morebitne nečistote v kanalu mikrosenzorja odstranili s funkcijo »kihanje«, pri čemer smo tekočino potisnili z obeh strani v kanal senzorja.

Dinamično sipanje laserske svetlobe – DLS

Za merjenje velikosti in porazdelitve velikosti nanometrskih in submikronskih delcev, določitev prisotnosti ter deleža agregatov smo uporabili napravo Zetasizer APS (Malvern, Velika Britanija), podprto s programsko opremo Zetasizer Software DTS. Naprava avtomatizira meritve v mikrotitrskih ploščah.

Za analizo smo uporabili 100 μL vzorca, ki je bil po meritvi poslan v odpadne tekočine. Poleg proteinskih vzorcev smo pred in po analizi le-teh pomerili tudi standarda lateks kroglic velikost 60 nm in 200 nm. Ploščo, napolnjeno z vzorci, smo pred analizo zaščitili z aluminjasto folijo. Za vsak vzorec smo izbrali pet replik meritev, ki so potekale pri temperaturi 25 °C.

Izključitvena kromatografija – SEC

Za določitev deleža monomerov, dimerov, trimerov in razgradnih produktov proteina smo uporabili Acquity UPLC H-Class sistem (Waters, Milford, ZDA), podprt s programsko opremo Empower. Meritve na kromatografskem sistemu smo izvajali pri naslednjih pogojih:

Kolona: Waters 4,6 x 150 mm, napolnjena s kroglicami silikagela velikosti 1,7 μm in velikostjo por 20 nm.

Mobilna faza: 150 mM fosfatni pufer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$), pH = 6,5. Pred uporabo smo mobilno fazo prefiltrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,22 μm .

Tlak: 250–300 bar.

Pretok: 0,4 mL/min.

Injiciranje: 3 μL .

T_{kolone}: 30 °C.

T_{vzorcev}: 5 °C.

Detekcija: UV, valovna dolžina 210 nm.

Za ustreznost analize smo uporabili označevalec molekulske mase (MWM standard), ki sestoji iz tiroglobulina (669 kDa), IgG (150 kDa), holo-transferina (80 kDa), ovalbumina (45 kDa), karbonske anhidraze (29 kDa), aprotinina (6,5 kDa) in histidina (209,6 Da); standard za mejo kvantifikacije (LOQ standard) in standard proteina Y.

Vse vzorce proteina X in Y smo pred analizo redčili na koncentracijo 1 mg/mL s pomočjo robota TECAN Freedom Evo in preverili njihove koncentracije z merjenjem absorbance vzorcev.

Delež agregatov (% AP) smo določili kot delež celotne površine vrhov (% AP = površina agregacijskih vrhov/skupna površina vrhov).

3.3.3 Analiza podatkov

Za analizo podatkov smo uporabili programsko opremo TIBCO Spotfire, Lumetics LINK in Excel.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

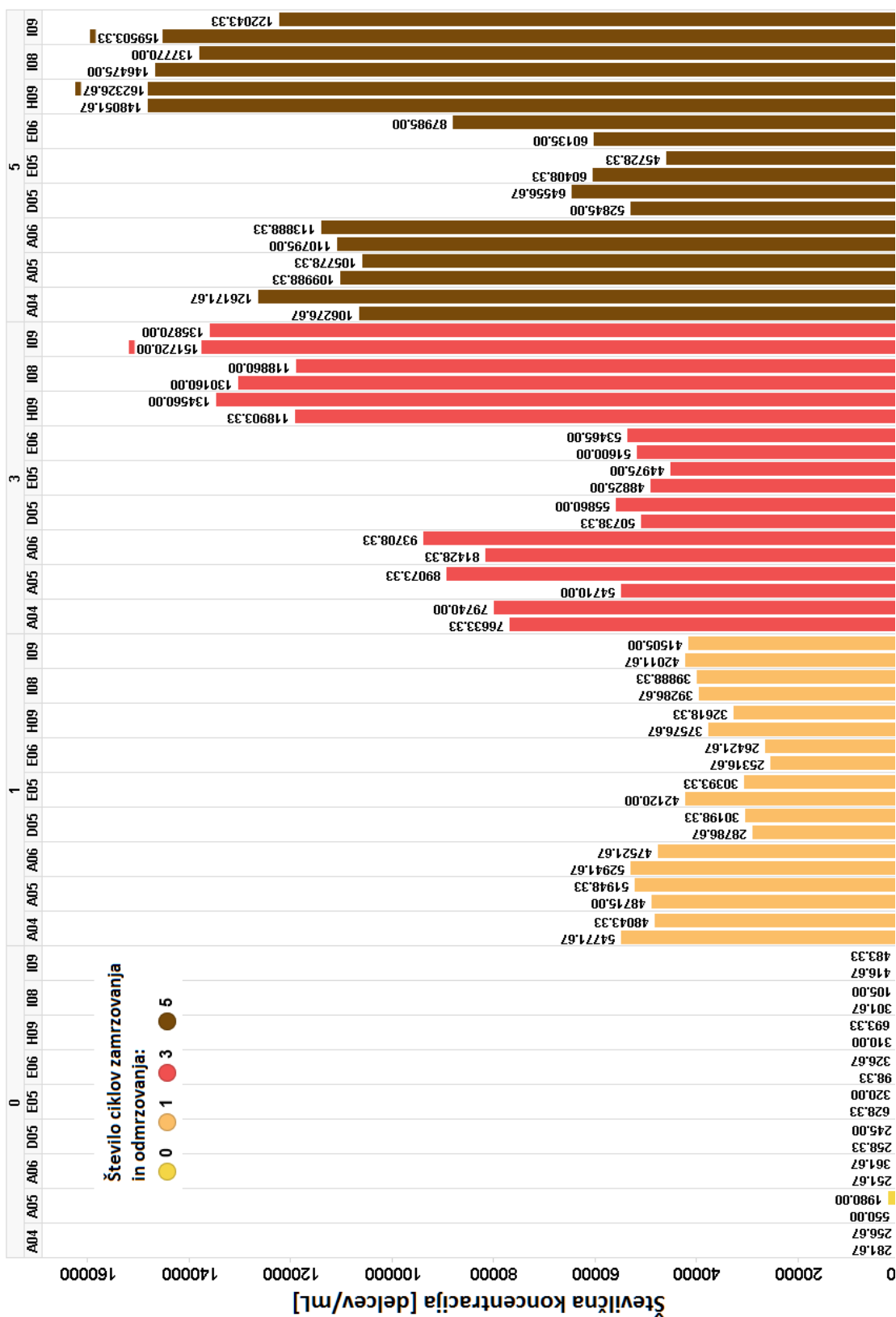
4.1 NEKONTROLIRANO ZAMRZOVANJE IN ODMRZOVANJE

Namen tega poskusa je bil ugotoviti, kako različni položaji vial vzorcev v škatli za zamrzovanje (sredina, rob) vplivajo na hitrost zamrzovanja in s tem na kakovost materiala. Ključnega pomena pa je bilo ugotoviti, ali lahko to metodo zamrzovanja in odmrzovanja uporabljamo pri študijah vpliva zamrzovanja in odmrzovanja na agregacijo različnih formulacij. Kakovost materiala po 0, 1, 3 in 5 FT-jih smo ovrednotili z merjenjem mikronskih delcev z metodo MFI.

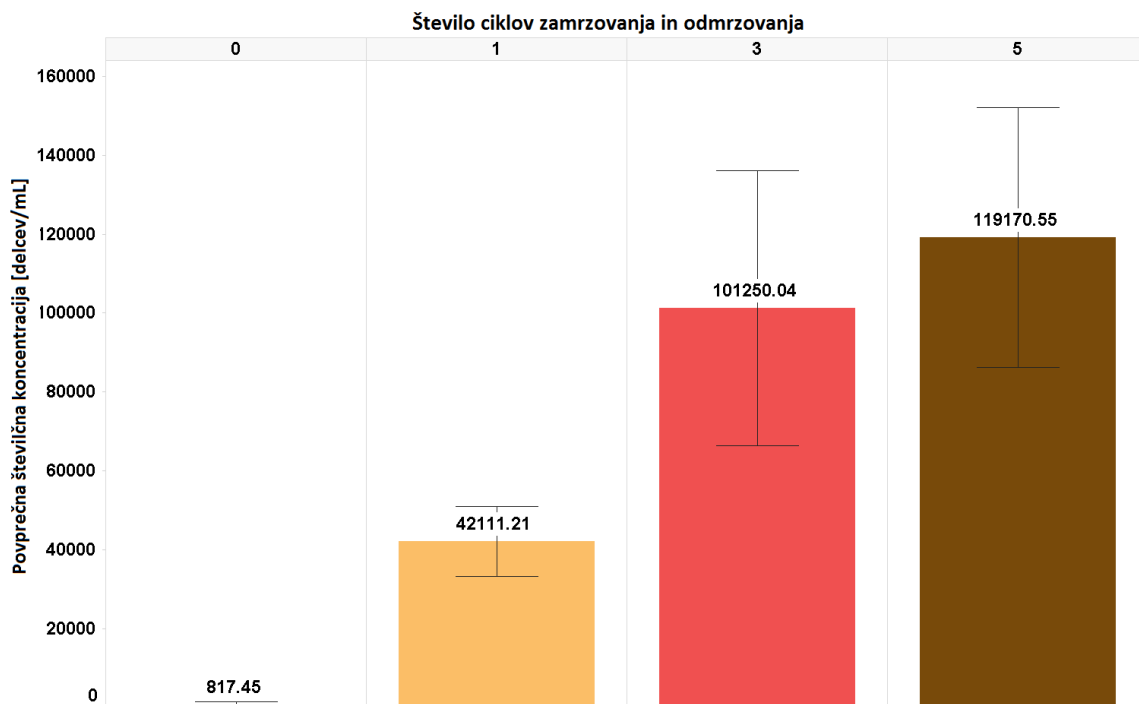
Kot je razvidno iz rezultatov, zamrzovanje povzroči nastanek agregatov, in sicer večkrat kot vzorec zamrznemo, več agregatov nastane (sliki 15 in 16). Na količino in velikost nastalih agregatov vpliva predvsem položaj vial v škatli za zamrzovanje. Vzorci v sredini škatle zamrzujejo in odmrzujejo počasneje kot vzorci ob stenah škatle, zato nastanejo večji kristali ledu, ki predstavljajo mesto nastanka agregatov. Večji kot je kristal ledu, večji agregat nastane. To povzroči nastanek manjšega števila agregatov, ki pa so večji (sliki 15 in 17). Ker se številčne koncentracije med vzorci ob stenah škatle in na sredini razlikujejo več kot dvakrat, je standardni odklon povprečne številčne koncentracije agregatov/delcev velik (slika 16). Število agregatov na sredini škatle se po 3 in 5 FT-jih ne razlikuje bistveno. Ob t_0 je številčna koncentracija agregatov pričakovano približno enaka, neodvisno od položaja v škatli, medtem ko pa se povprečne velikosti agregatov med meritvami precej razlikujejo (slika 18). Vzrok za to je majhno število delcev v vzorcih ob t_0 , kjer zato že nekaj večjih delcev zelo vpliva na povprečno velikost. Kot je razvidno iz diagrama na sliki 15, ena meritev ob t_0 (A05) odstopa od ostalih. Med mešanjem vzorca na položaju A05 je viala padla iz rok na mizo. Ob tem je potrebno poudariti, da manjša kot je številčna koncentracija agregatov, večja je variabilnost med meritvami in zato vse meritve med seboj niso primerljive.

Pri enkrat zamrznjenih in odmrznjenih vzorcih so replike med seboj primerljive, le v dveh primerih (E05 in H09) ponovljivost ni dobra. Pri trikrat in petkrat zamrznjenih in odmrznjenih vzorcih smo po odmrzovanju opazili več zračnih mehurčkov. Možen vzrok za ta pojav je večja topnost plinov pri nižji temperaturi in nato pri odmrzovanju zmanjšanje njihove topnosti. Medfaza oziroma stična površina zrak-tekočina pa predstavlja mesto agregacije. Slednja poteče po mehanizmu 5. Ker cikel zamrzovanja in odmrzovanja ponovimo večkrat, pride do zgoraj opisanega procesa večkrat.

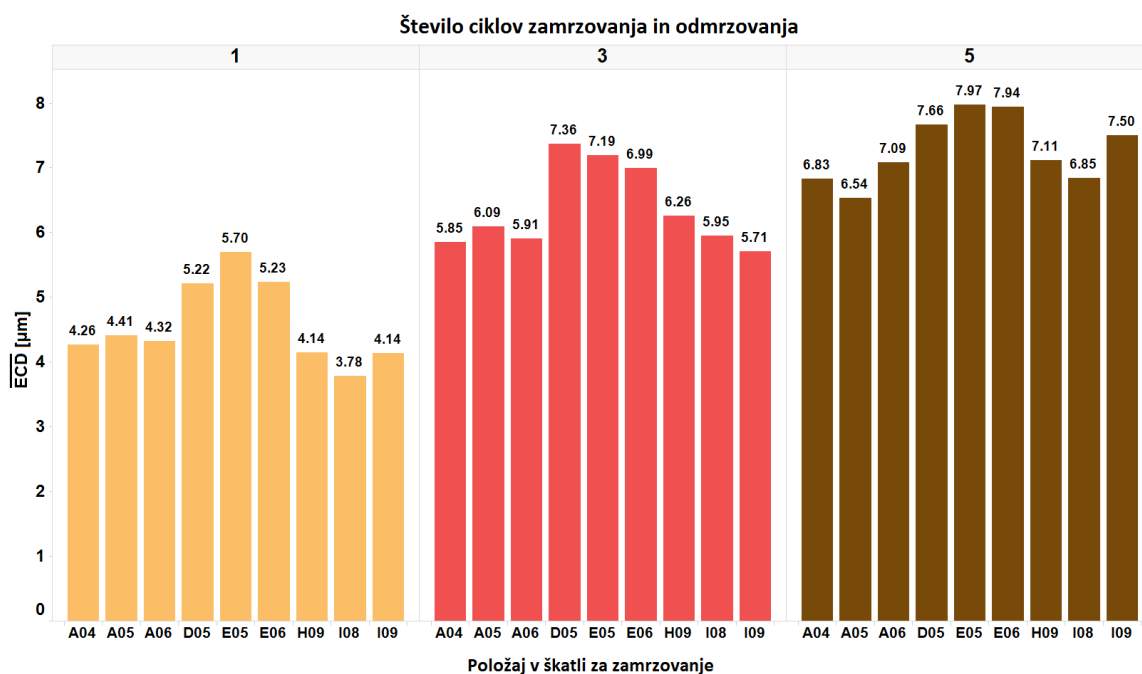
Glede na velikost največji delež agregatov predstavljajo agregati velikosti od 2 do 5 µm – mikronski agregati (slika 19).



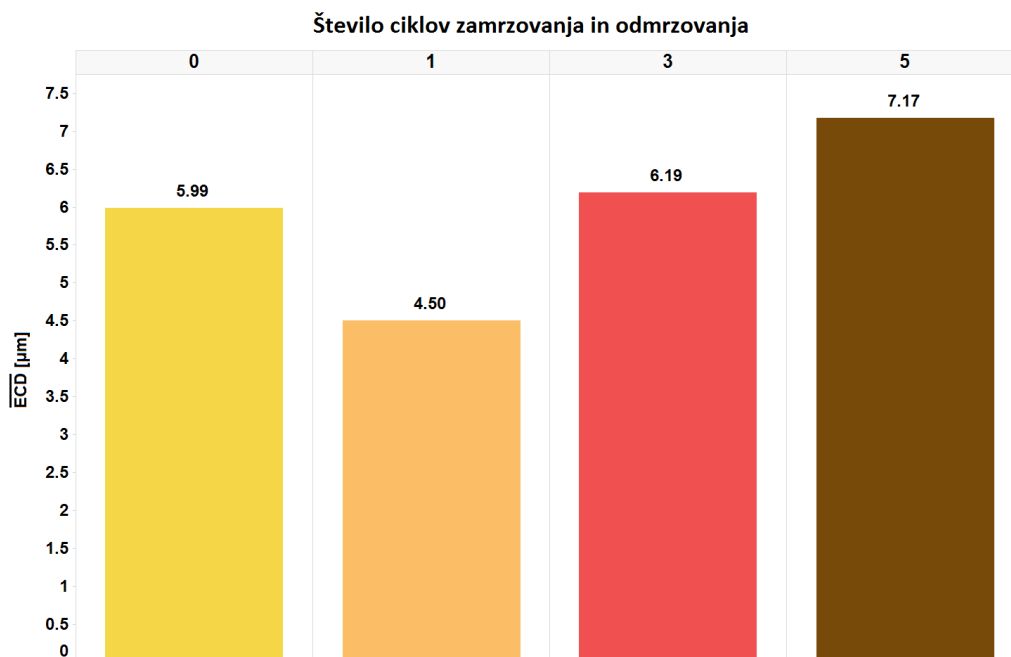
Slika 15: Diagram prikazuje povprečno število koncentracijo agregatov ob t₀ in po 1, 3 in 5 FT-jih glede na položaj v škatli za obe škatli.



Slika 16: Povprečna številčna koncentracija agregatov vseh vzorcev in standardni odklon meritev ob t_0 in po 1, 3 ter 5 FT-jih.



Slika 17: Diagram prikazuje povprečno velikost (ECD – ekvivalenten krožni premer) agregatov glede na položaj v škatli po 1, 3 in 5 FT-jih za obe škatli skupaj.



Slika 18: Diagram prikazuje povprečno velikost agregatov ob t_0 in po 1, 3 ter 5 FT-jih za obe škatli skupaj.

Položaj v škatli za zamrzovanje

A04		A05		A06		D05		E05		E06		H09		I08		I09		Število ciklov zamrzovanja in odmrzovanja
112	495	126	111	160	91	192	73	151										
25	153	33	23	77	20	48	29	60										
15	53	12	5	24	5	20	11	30										
3	27	4	5	10	6	19	4	10										
3	12	4	3	5	1	10	1	7										
1	2	1	1	1	2	2	1	3										1
23353	22385	22435	12198	14086	11117	16631	19521	19810										
4682	4723	4857	2978	4195	2224	2527	2488	2995										
1250	1494	1388	1036	1476	837	791	687	977										
625	724	605	701	952	599	437	413	554										
164	140	126	254	382	286	155	122	172										3
12	7	11	30	52	42	18	4	11										
29887	26585	32697	17262	15481	17358	44921	45795	54421										
9048	8631	10304	6740	5954	6970	16228	15802	17458										
3287	3311	4190	3059	2573	2906	6432	5785	6498										
2386	2355	2924	2585	2145	2277	4532	3758	4170										5
908	955	872	1208	1007	989	1565	1361	1290										
83	67	50	86	76	73	106	111	80										
39770	38464	39004	18577	16603	22366	50606	47400	44831										
14355	13206	13134	7568	6588	9697	20500	18985	17988										
6310	5045	5554	3264	3031	4647	8919	7876	8375										
4811	3915	4724	2853	2836	4115	6869	5648	6870										
2063	1852	2520	1512	1513	1931	2866	2335	3181										
188	178	301	156	157	155	304	258	318										

Število agregatov oziroma delcev

- Legenda:**
Velikost [µm]:
- 2.00 < x ≤ 5.00
 - 5.00 < x ≤ 10.00
 - 10.00 < x ≤ 15.00
 - 15.00 < x ≤ 25.00
 - 25.00 < x ≤ 50.00
 - 50.00 < x

Slika 19: Povprečno število agregatov/delcev znotraj posameznega velikostnega razreda glede na položaj v škatli za zamrzovanje ob t_0 in po 1, 3 ter 5 FT-jih za obe škatli skupaj.

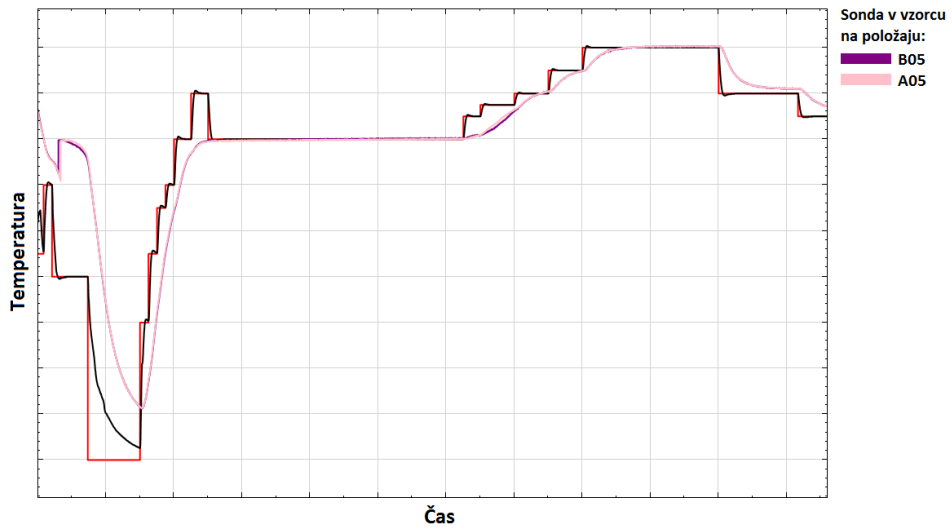
S tem poskusom smo ugotovili, da s trenutno metodo zamrzovanja rekombinantnih bioloških učinkovin vzorci zamrznejo in odmrznejo neenakomerno, odvisno od položaja vial v škatli za zamrzovanje in zato vsebujejo različno število in velikost agregatov. Zato te metode zamrzovanja ne moremo uporabljati pri tovrstnih študijah vpliva zamrzovanja in odmrzovanja na agregacijo različnih formulacij.

4.2 KONTROLIRANO ZAMRZOVANJE IN ODMRZOVANJE

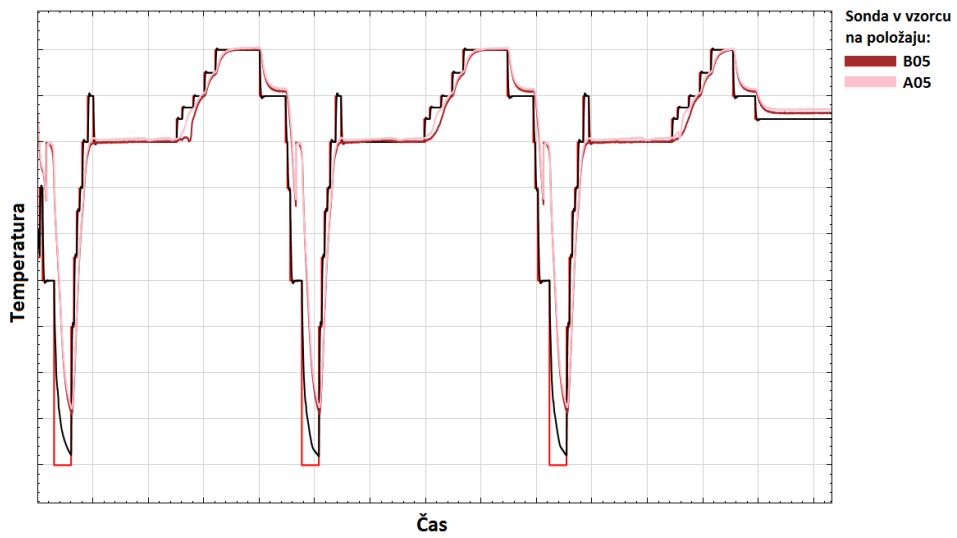
Za razvoj končnih profilov zamrzovanja in odmrzovanja, ki so primerljivi s profili zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev v Sartoriusovih vrečah prostornine 30 mL in tako s standardnim »scale down« profilom zamrzovanja in odmrzovanja, ki simulira proces zamrzovanja in odmrzovanja na večji skali, smo naredili veliko poskusov. Točnih številčnih vrednosti profila (temperatura, čas) zaradi poslovne tajnosti podatkov ne bomo podali. Prikazali bomo samo diagrame profilov zamrzovanja in odmrzovanja za obe stojali brez oštevilčenih osi. Na vseh slikah, ki prikazujejo profile zamrzovanja in odmrzovanja (slike 20, 21, 22, 29 in 30), rdeča krivulja predstavlja nastavljeno temperaturo tekočine za prenos toplote, črna trenutno temperaturo tekočine za prenos toplote, preostali dve barvni krivulji pa temperaturo vzorcev na različnih položajih v stojalu.

Stojalo za PETG vial:

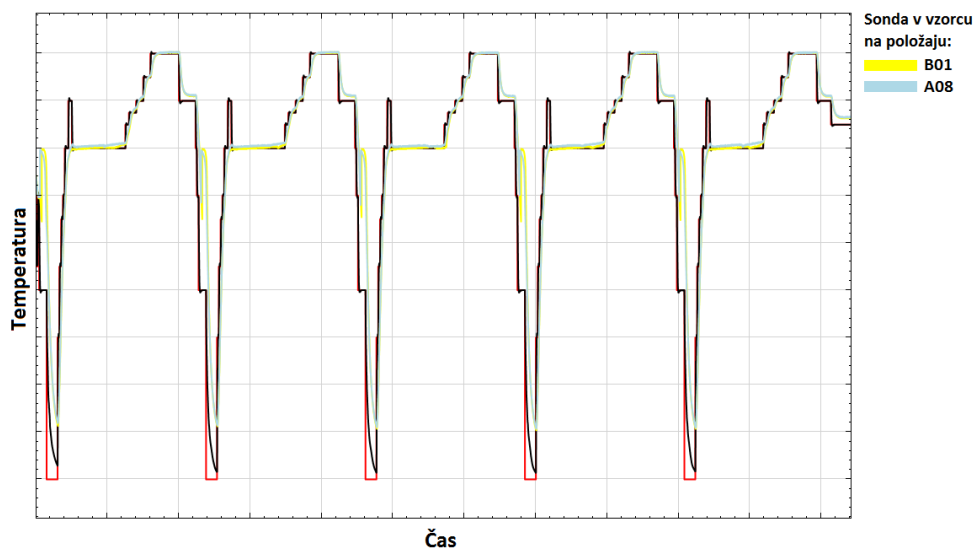
Profili zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev v 5 mL PETG vialah so enaki uradnim »scale down« profilom zamrzovanja vzorcev v Sartoriusovih vrečah prostornine 30 mL, ki simulirajo proces zamrzovanja in odmrzovanja na večji skali (1,6 L vzorca v 2 PETG vsebnikih). Ker je krivulja temperature vzorcev med zamrzovanjem in odmrzovanjem v odvisnosti od časa za vzorce v 5 mL vialah in 30 mL Sartoriusovih vrečah zelo podobna, prilagoditve profila niso bile potrebne. Slednje velja za zamrzovanje 3–5 mL vzorca v 5 mL PETG vialah. V tem stojalu lahko naenkrat kontrolirano zamrznemo in odmrznemo neodvisno od položaja 18 vzorcev.



Slika 20: Profil enega cikla zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev.

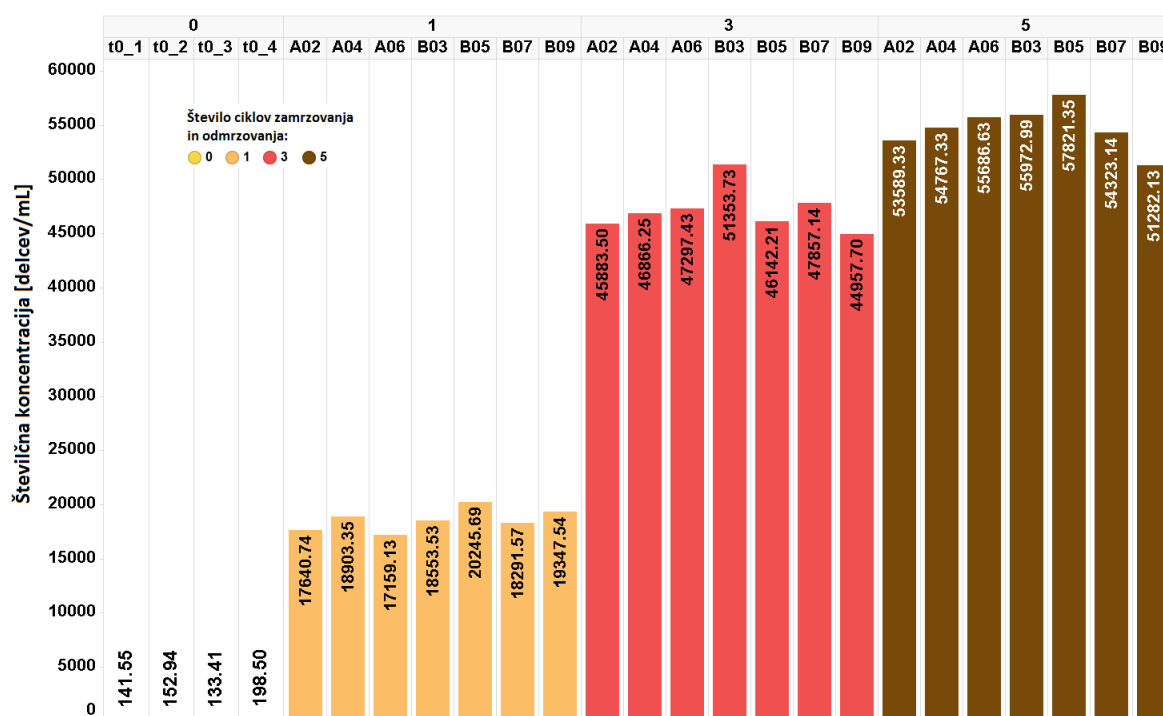


Slika 21: Profil treh ciklov zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev.

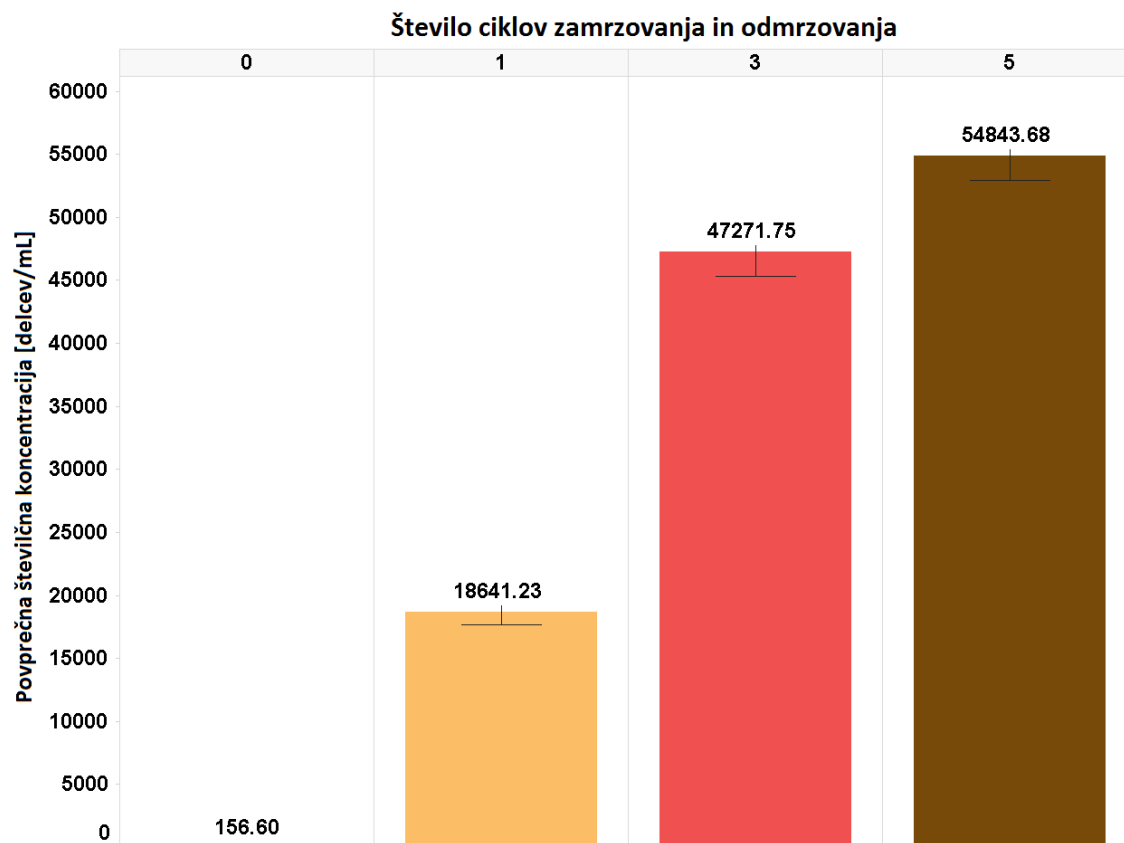


Slika 22: Profil petih ciklov zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev.

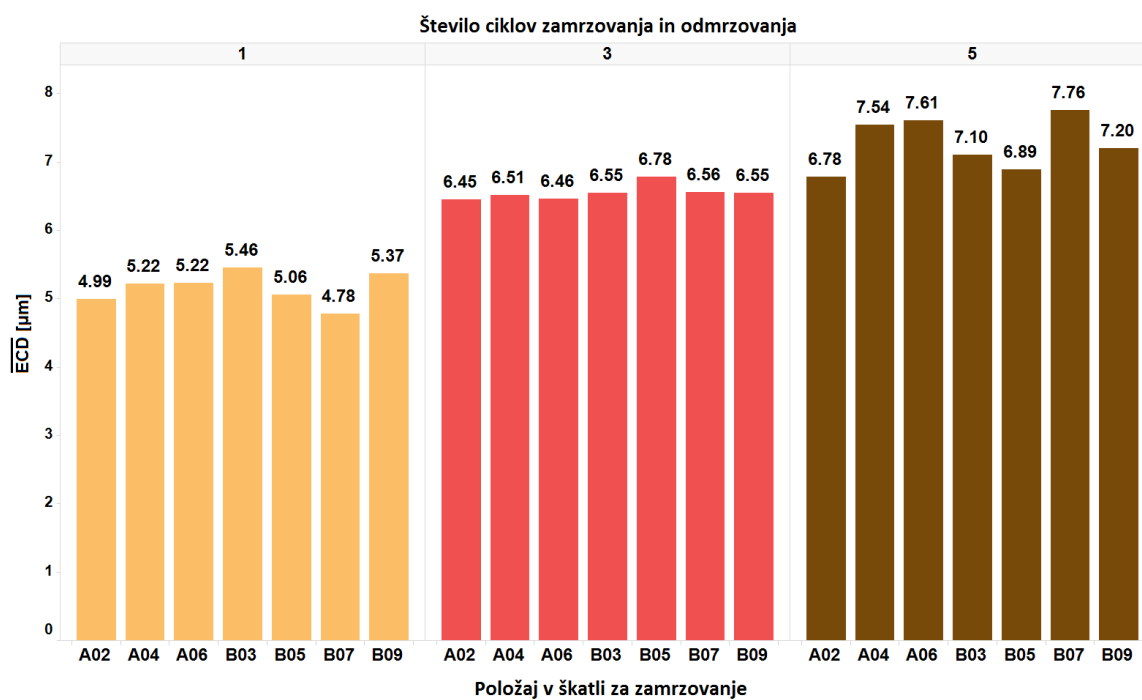
Z zamrzovanjem v CryoPilotu uspemo neodvisno od položaja vial v stojalu zamrzniti in odmrzniti vzorce kontrolirano, kar pomeni, da nastane med vzorci istega izhodnega materiala primerljivo število agregatov (slika 23). Posledično je standardni odklon številčne koncentracije precej manjši v primerjavi s tistim pri nekontroliranem zamrzovanju (slika 24). Tudi povprečna velikost nastalih agregatov ni odvisna od položaja v stojalu in je neglede na položaj v stojalu približno enaka (slika 25). Agregati so po vsakem dodatnem ciklu zamrzovanja večji, povprečna velikost delcev ob t_0 pa je večja, ker je delcev ob t_0 malo in zato že nekaj večjih precej poveča povprečje velikosti (slika 26). Če primerjamo med seboj povprečne vrednosti številčne koncentracije nekontroliranega in kontroliranega zamrzovanja in odmrzovanja, vidimo, da nastane pri kontroliranem po enakem številu FT-jev (1, 3 oziroma 5) pol manj agregatov (sliki 16 in 24). Možna vzroka za to sta hitrost zamrzovanja in oblika vsebnika. V skrinji vzorci zamrznejo hitreje (nastane več kristalčkov ledu) kot v CryoPilotu, saj so takoj izpostavljeni najnižji temperaturi, brez ohlajanja po korakih. Potrebno pa je upoštevati tudi dimenzije vsebnika, ki imajo prav tako vpliv na proces zamrzovanja in odmrzovanja. 5 mL PETG viala so širša od 2 mL vial, medtem ko sta gladini vzorcev v obeh vialah približno enaki, kar pomeni, da material v 5 mL vialah zamrzne kasneje kot v 2 mL.



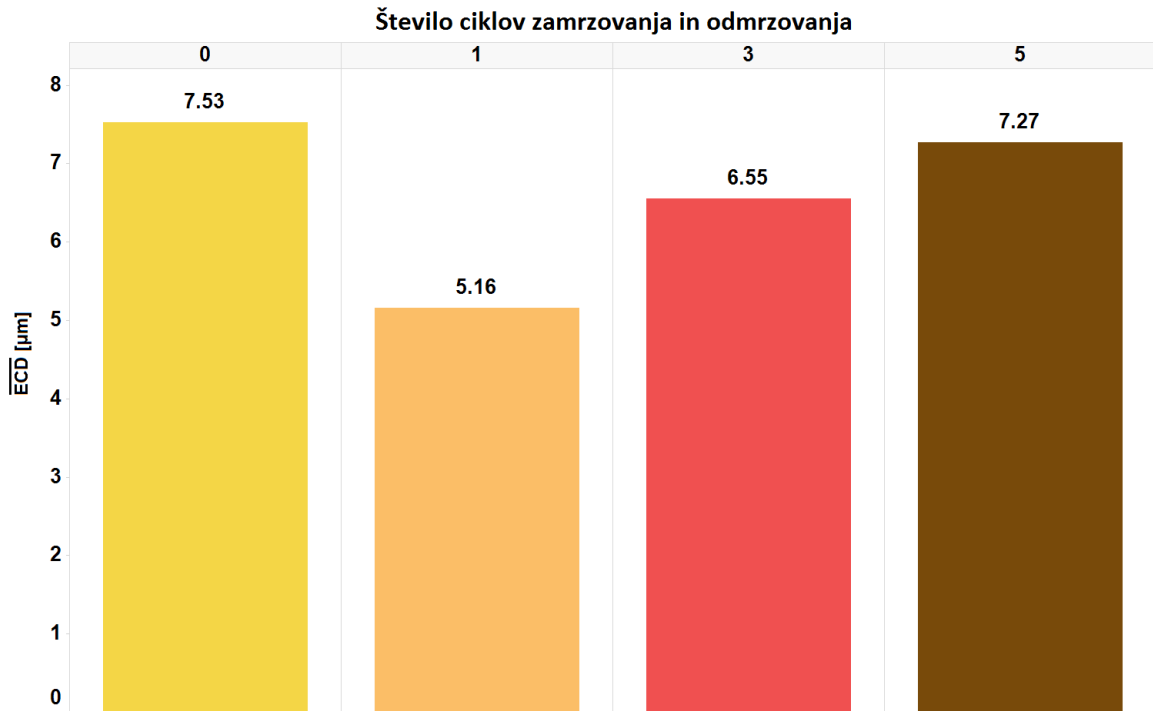
Slika 23: Diagram prikazuje povprečno številčno koncentracijo agregatov glede na položaj v stojalu za PETG viala ob t_0 in po 1, 3 in 5 FT-jih.



Slika 24: Diagram prikazuje povprečno številčno koncentracijo in standardni odklon vseh meritev ob t_0 in po 1, 3 ter 5 FT-jih za vse vzorce skupaj.



Slika 25: Diagram prikazuje povprečno velikost (ECD – ekvivalenten krožni premer) agregatov glede na položaj v stojalu za PETG vialo po 1, 3 in 5 FT-jih.



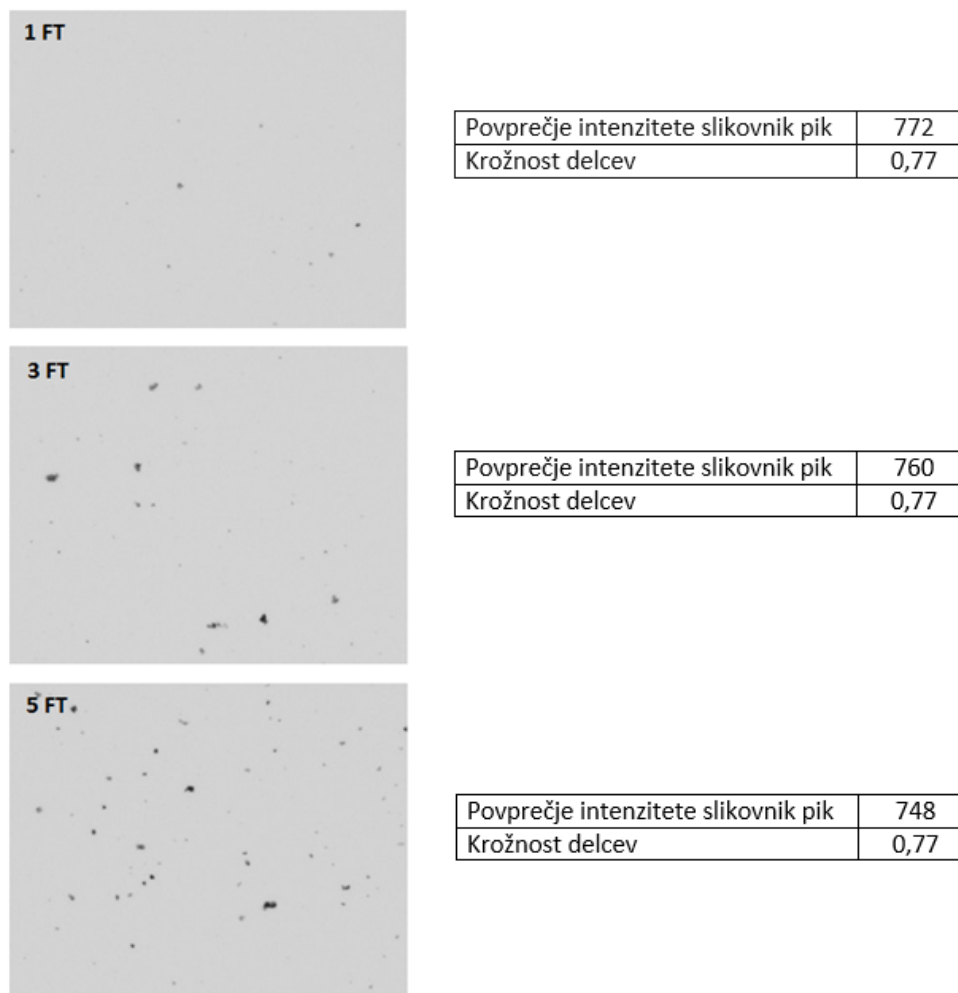
Slika 26: Diagram prikazuje povprečno velikost agregatov ob t_0 in po 1, 3 ter 5 FT-jih.

Podobno kot pri nekontroliranem zamrzovanju glede na velikost agregatov največji delež predstavljajo agregati velikosti od 2 do 5 μm – mikronski agregati (slika 27).



Slika 27: Število agregatov/delcev znotraj posameznega velikostnega razreda glede na položaj vzorcev v stojalu za PETG vialo po 1, 3 in 5 FT-jih.

Večkrat kot zamrznemo protein X, nekoliko temnejši in večji agregati nastanejo. Merilo transparentnosti delcev je intenziteta slikovnih pik (pikslov). Višja vrednost intenzitete slikovnih pik pomeni večjo transparentnost delcev. Delci z manjšo vrednostjo intenzitete so torej temnejši, kar je razvidno tudi iz primera slik agregatov naših meritev. Krožnost delcev (circularity) znaša neglede na število FT-jev 0,77 (slika 28).

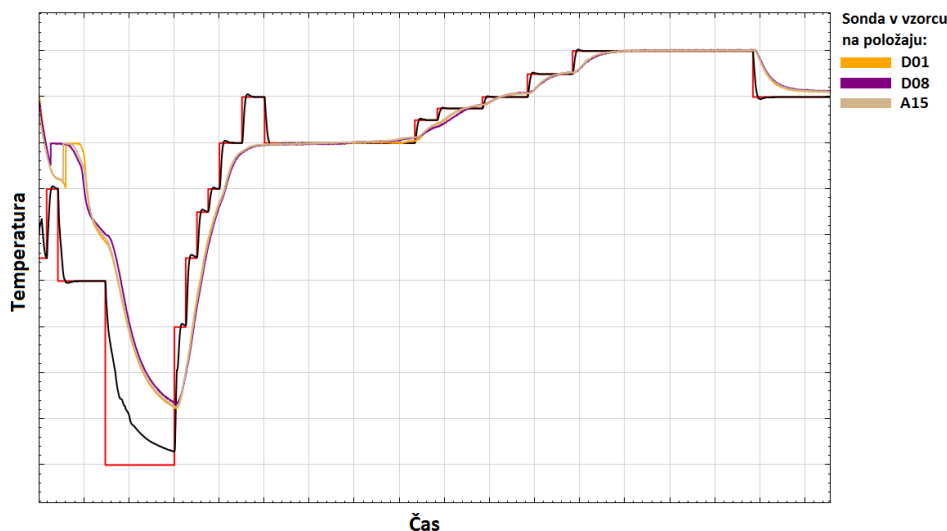


Slika 28: Primer mikronskih agregatov proteina X po 1, 3 in 5 FT-jih ter njihova povprečna intenziteta slikovnih pik ter krožnost.

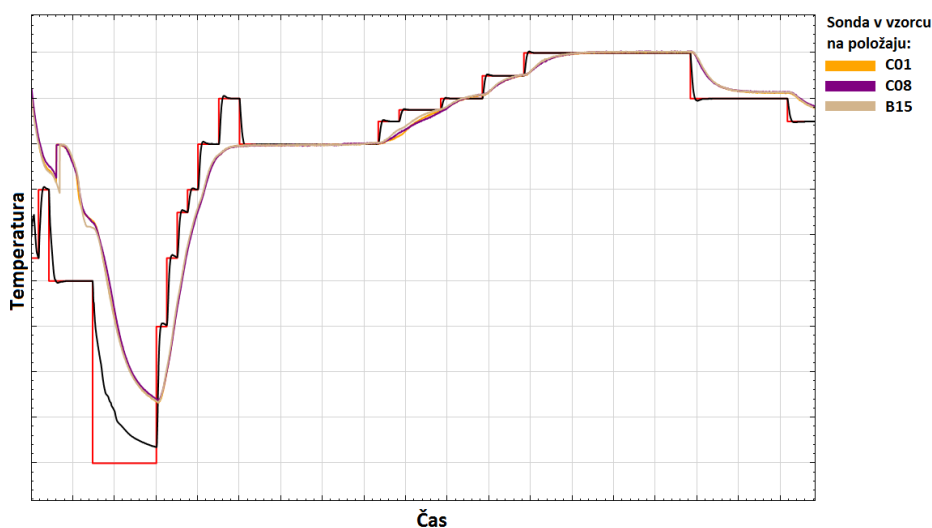
Stojalo za 2 mL vial:

V stojalu za 2 mL vial lahko naenkrat kontrolirano zamrznemo in odmrznemo največ 30 vzorcev (1–2 mL vzorca/vialo), in sicer tako, da jih zložimo hkrati v vrsti A in D ali B in C. Če stojalo napolnimo v celoti (60 vzorcev), vzorci v notranjih dveh vrstah (B in C) ne zamrzujejo in odmrzujejo enako hitro kot vzorci v vrstah A in D. Tudi postavitev vzorcev izmenjujoče se na vsako drugo mesto v stojalu ne da primerljivih rezultatov številčne koncentracije agregatov med različnimi položaji vzorcev. Seveda pa lahko, v kolikor

nimamo veliko vzorcev, slednje zložimo samo v eno (poljubno) vrsto. Profil enega cikla zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev v 2 mL vialah je zelo podoben profilu zamrzovanja vzorcev v 5 mL PETG vialah. Razlikujeta se le v dolžini, in sicer je profil za zamrzovanje vzorcev v 2 mL vialah 20 % krajši (sliki 29 in 30). Profili poljubnega števila FT-jev se analogno sestavijo (seštejejo) iz profila za 1 FT. Če vzorci na robovih stojala zamrzujejo in odmrzujejo enako hitro kot vzorci na sredini stojala, smo preverili tudi s pomočjo temperaturnih sond.



Slika 29: Profil enega cikla zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev v vrstah A in D.

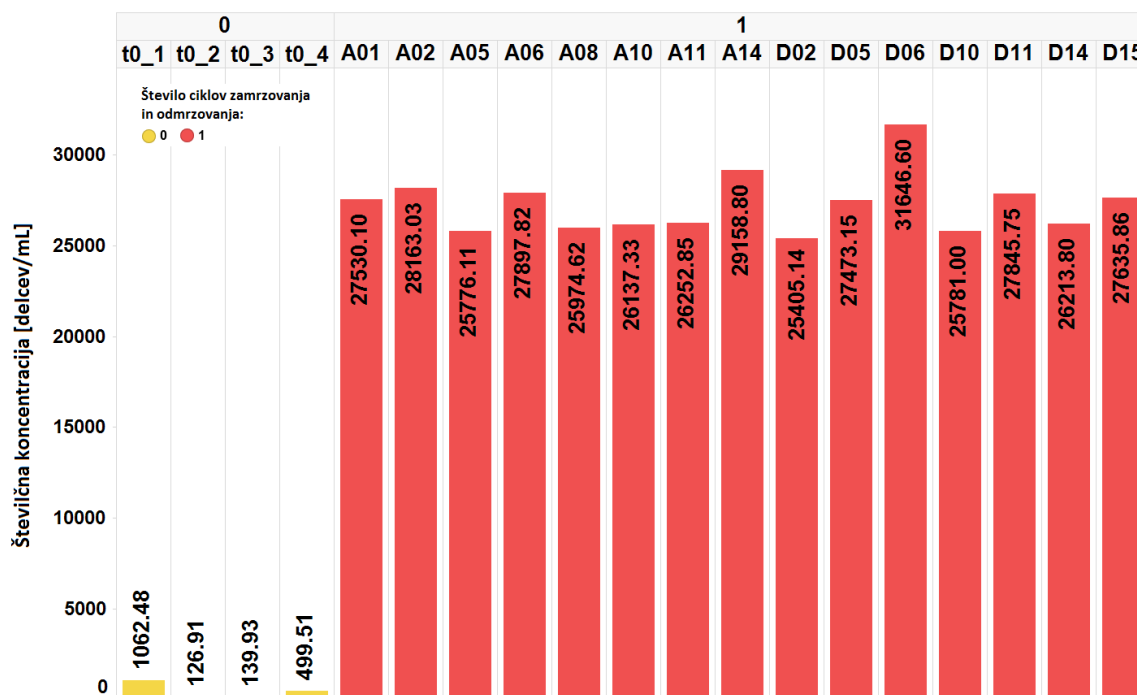


Slika 30: Profil enega cikla zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev v vrstah B in C.

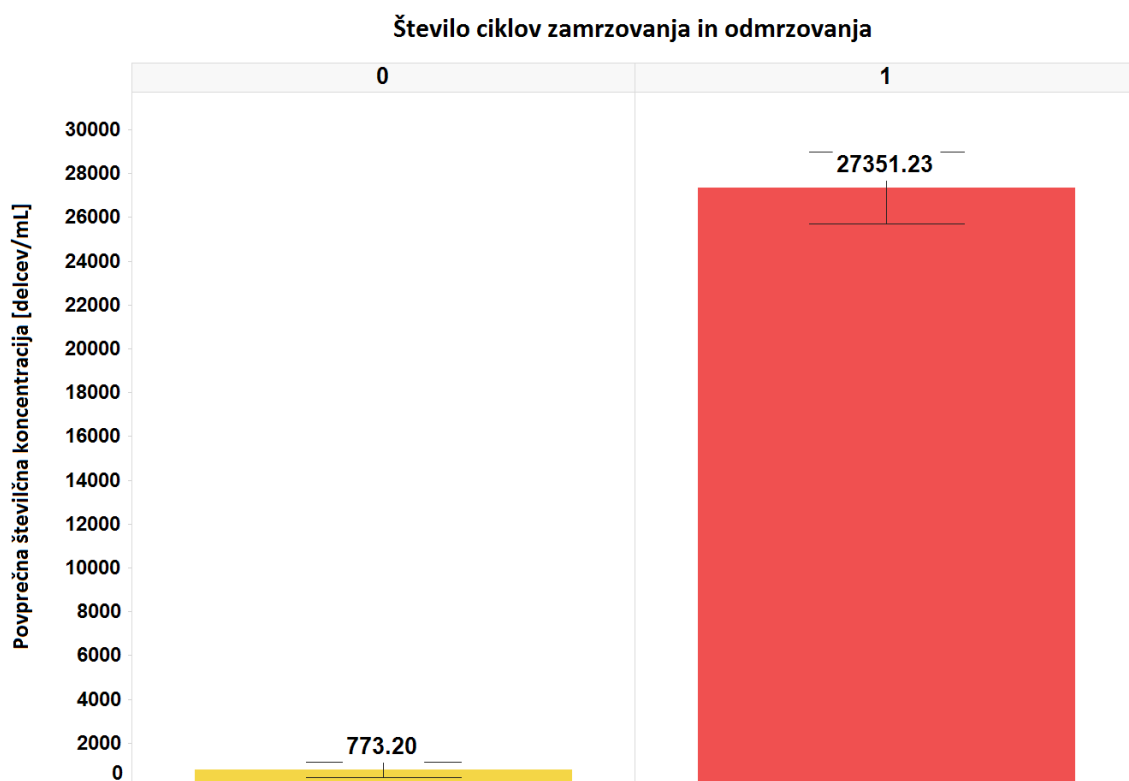
V nadaljevanju so predstavljeni rezultati po 1 FT-ju. Ker ti rezultati zadostujejo za preverbo ustreznosti stojala, preostale podatke po več FT-jih proteina X pa smo pridobili z zamrzovanjem in odmrzovanjem v stojalu za PETG vial, nismo po nepotrebnem porabljali dodatnega materiala in izvajali več FT-jev v stojalu za 2 mL vial.

Iz rezultatov številčne koncentracije (slike 31, 32, 34 in 35) in velikosti delcev (sliki 33 in 36) je razvidno, da s tem stojalom uspemo kontrolirano zamrzniti in odmrzniti vzorce neodvisno od položaja vial v vrstah A in D oziroma B in C. Rezultati kontroliranega zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev v stojalu za 2 mL vial v vrstah A in D ter B in C so med seboj primerljivi. Tako povprečna številčna koncentracija delcev kot njihova velikost sta v obeh primerih podobni. V primerjavi z rezultati kontroliranega zamrzovanja in odmrzovanja v PETG vialah je v 2 mL vialah po 1 FT-ju nastalo ~50 % več agregatov. Možni vzroki za to so krajši profil zamrzovanja vzorcev v 2 mL vialah, oblika vsebnika in starost materiala. Protein, ki smo ga uporabili za zamrzovanje v 2 mL vialah, je stal v hladilniku 2 tedna dlje kot protein za zamrzovanje v PETG vialah. Iz preteklih študij vemo, da je stabilnost proteina v hladilniku po 1 mesecu precej slabša v primerjavi s svežim materialom. Kljub starejšemu materialu pa je v primerjavi z nekontroliranim zamrzovanjem in odmrzovanjem v 2 mL vialah nastalo pri kontroliranem ~40 % manj agregatov. Povprečna vrednost intenzitete slikovnih pik delcev po 1 FT-ju za vzorce v vrsta A in D ter B in C znaša 778, kar je primerljivo z rezultatom zamrzovanja in odmrzovanja v PETG vialah. Tudi krožnost delcev, ki znaša 0,76, je primerljiva s tisto v 5 mL PETG vialah.

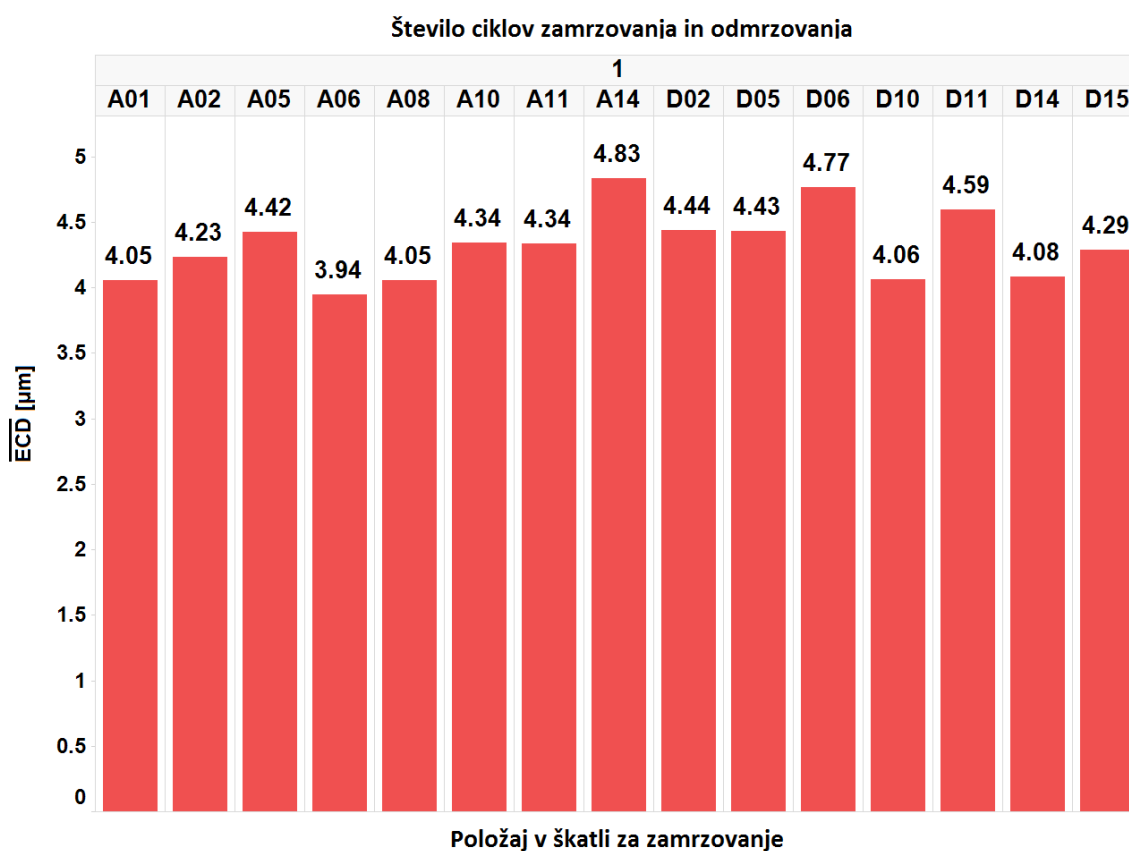
A in D vrsta:



Slika 31: Diagram prikazuje povprečno številčno koncentracijo agregatov/delcev ob t_0 in po 1 FT-ju.

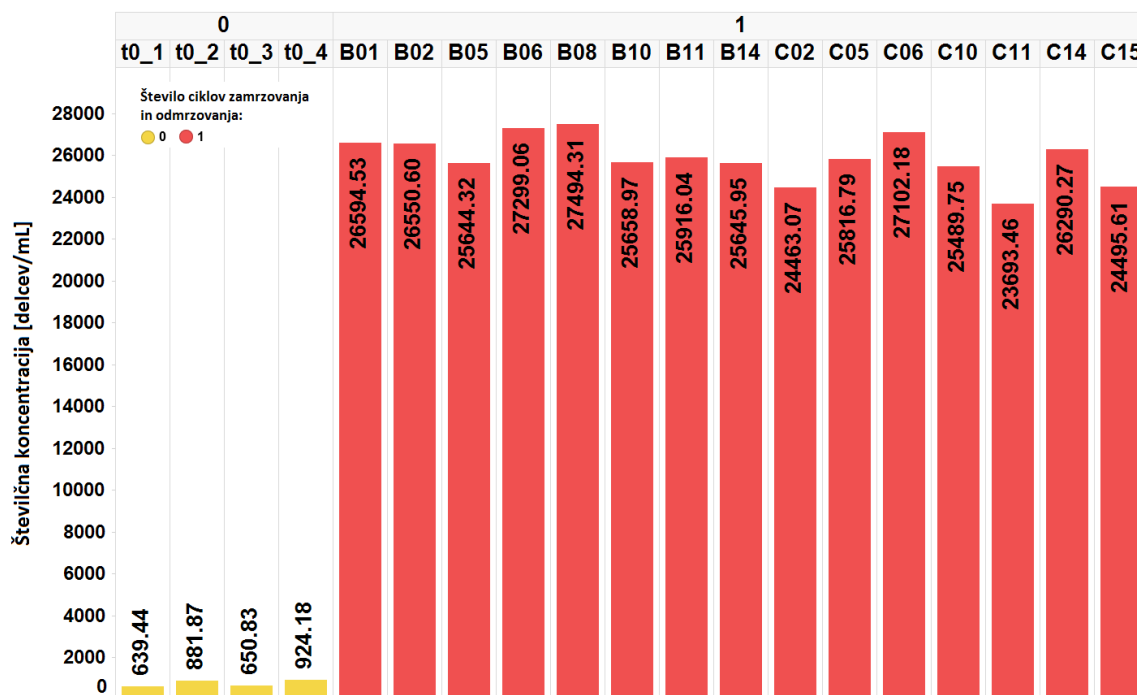


Slika 32: Diagram prikazuje povprečno številno koncentracijo in pripadajoči standardni odklon vseh vzorcev skupaj ob t_0 in po 1 FT-ju.

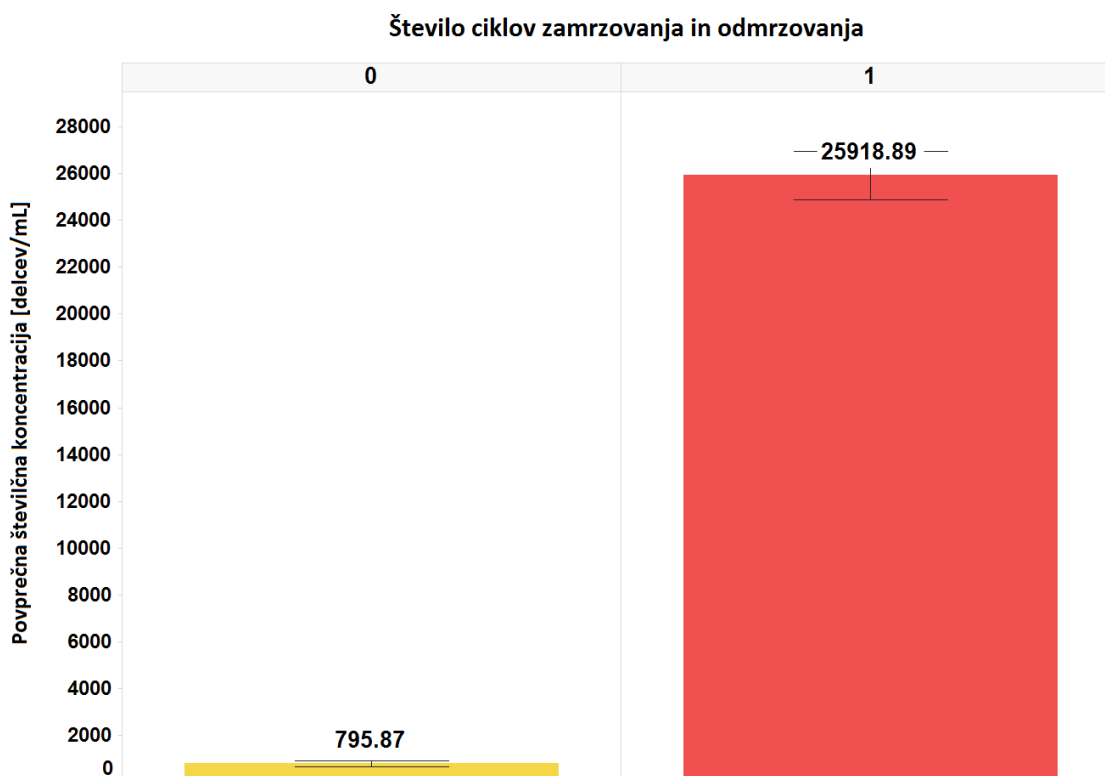


Slika 33: Povprečna velikost (ECD – ekvivalenten krožni premer) agregatov/delcev glede na položaj v stojalu za 2 mL vialo po 1 FT-ju.

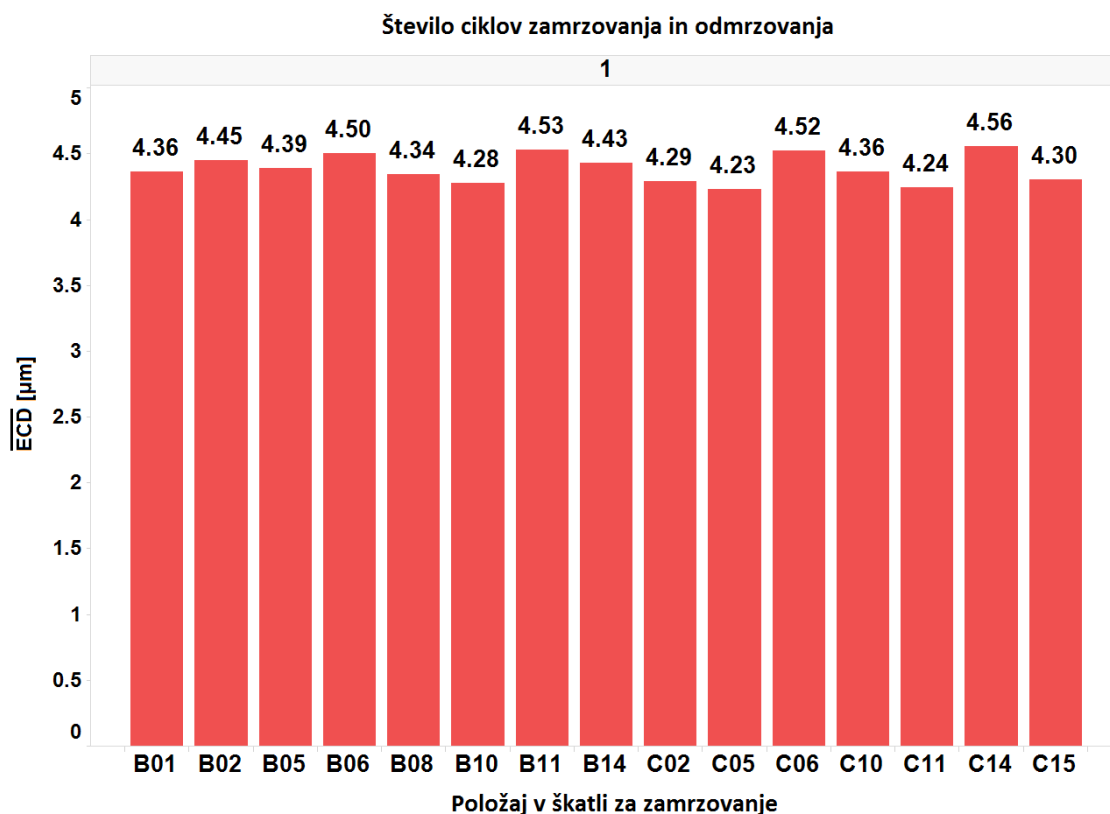
B in C vrsta:



Slika 34: Diagram prikazuje povprečno številno koncentracijo agregatov/delcev ob t_0 in po 1 FT-ju.



Slika 35: Diagram prikazuje povprečno številno koncentracijo in pripadajoči standardni odklon vseh vzorcev skupaj ob t_0 in po 1 FT-ju.



Slika 36: Povprečna velikost (ECD – ekvivalenten krožni premer) agregatov/delcev glede na položaj v stojalu za 2 mL viale po 1 FT-ju.

4.3 VPLIV KONCENTRACIJE PROTEINA NA AGREGACIJO PRI ZAMRZOVANJU IN ODMRZOVANJU

Namen poskusa je bil ugotoviti, kako koncentracija proteina vpliva na agregacijo kot posledico zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev.

Preglednica VI prikazuje rezultate DLS meritev; polidisperzni indeks in povprečni premer delcev ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih. Po 1 in 5 FT-jih vzorcev z isto koncentracijo proteina ni razlik v povprečni velikosti agregatov. Večji premer delcev pri višji koncentraciji je posledica zmanjšane difuzije delcev (Stokes-Einsteinova enačba velikosti delcev (enačba 4)), saj ima protein X v citratnem pufri negativni dinamični interakcijski parameter (k_D), kar pomeni, da se delci gibljejo počasneje (počasnejša difuzija) in so bližje skupaj, ker prevladujejo privlačne sile, velikost pa je zato večja (enačba 5).

$$D = D_0(1 + ck_D) \quad (\text{enačba 5})$$

D_0 ... translacijska difuzijska konstanta neskončno razredčenega proteina [m^2/s]

D ... translacijski difuzijski koeficient [m^2/s]

c ... koncentracija proteina v raztopini [g/mL]

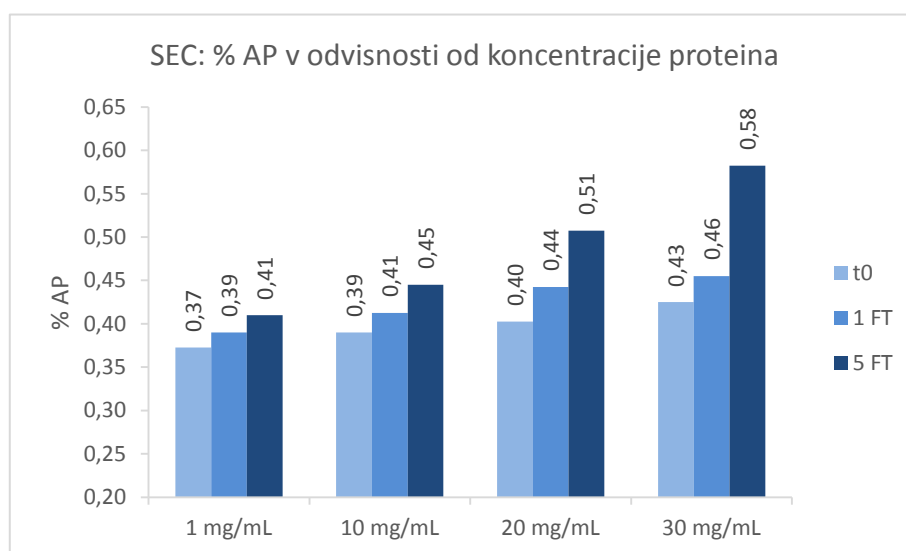
k_D ... dinamični interakcijski parameter [mL/g]

Preglednica VI: Povprečna vrednost Pdl-ja in povprečna velikost delcev v odvisnosti od koncentracije ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih.

	1 mg/mL		10 mg/mL		20 mg/mL		30 mg/mL	
	Pdl	2r [nm]	Pdl	2r [nm]	Pdl	2r [nm]	Pdl	2r [nm]
t_0	0,005	11,4	0,016	12,8	0,047	14,5	0,063	16,2
1 FT	0,006	11,3	0,026	12,7	0,049	14,5	0,065	16,3
5 FT	0,021	11,4	0,042	12,8	0,063	14,8	0,079	16,7

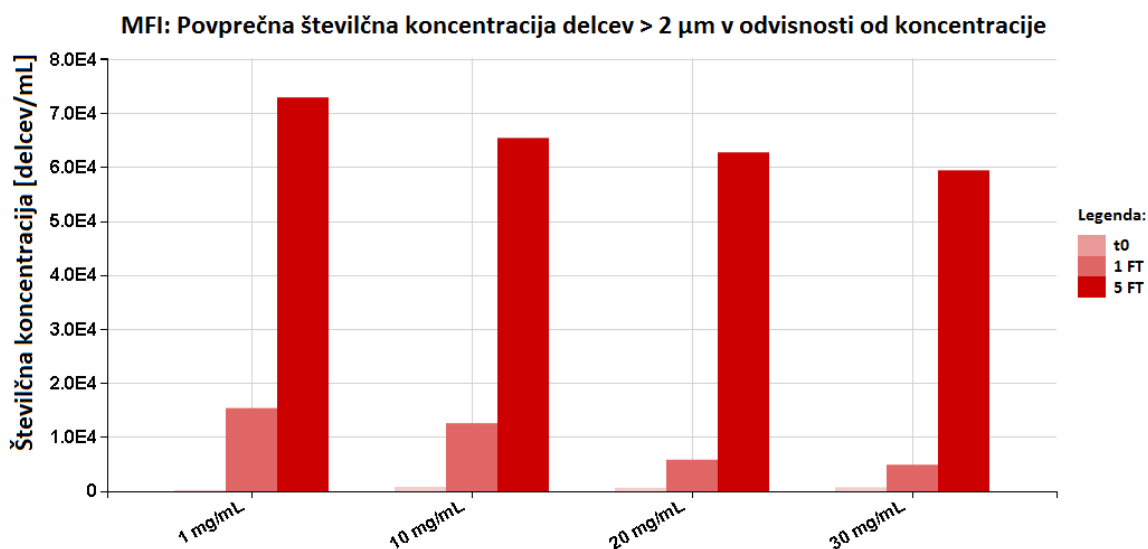
Po zamrzovanju (1 in 5 FT) se Pdl nekoliko poveča, vendar je porazdelitev velikosti delcev kljub temu monodisperzna, saj je Pdl manjši od 0,10. V splošnem velja, da so delci v vzorcu s polidisperznim indeksom, manjšim od 0,10, porazdeljeni monodisperzno in agregacija ne predstavlja težav s stabilnostjo proteina. Kjer je Pdl večji od 0,1, pa podatek o velikosti delca ni reprezentativen, saj lahko večji delci zasenčijo gibanje manjših (39).

Iz rezultatov SEC analize (slika 37) bi lahko sklepali, da pri višji koncentraciji proteina protein bolj agregira, vendar to v splošnem ne velja za delce mikronskih velikosti (MFI), kjer je z višanjem koncentracije nastalih agregatov manj (slika 38). Tudi iz meritev z resonančno tehniko merjenje mase (slika 39) je razvidno, da višja kot je koncentracija proteina, več agregatov nastane (submikronski in mikronski agregati: od 200 nm do 5 μm). Pri tem je pomembno upoštevati, da je večina agregatov, izmerjenih z Archimedesom, manjših od 1 μm . Torej predstavljajo mejo, kjer z višjo koncentracijo nastane manj agregatov, mikronski agregati. Pri višji koncentraciji proteina je večja verjetnost trkov delcev med seboj in zato nastane več dimerov. Zaradi večje viskoznosti pri višji koncentraciji proteina in zmanjšane difuzivnosti pa je združevanje dimerov v večje agregate manj izrazito.

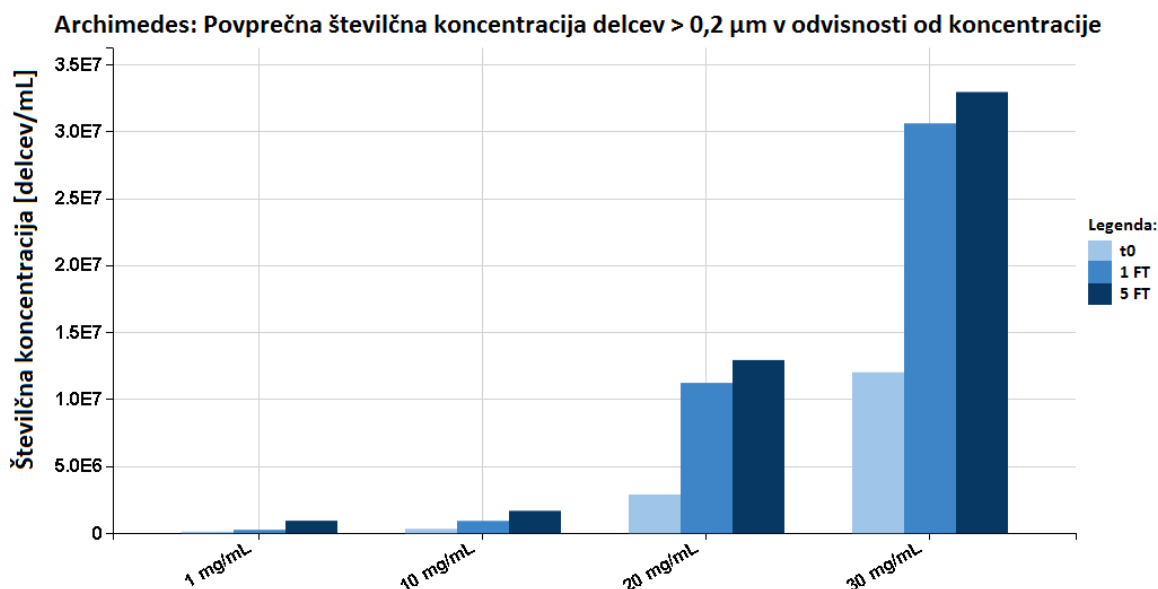


Slika 37: % AP v odvisnosti od koncentracije proteina ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih.

Delež agregatov, izmerjenih s SEC-om, je sicer zelo majhen in ne predstavlja kritičnih vrednosti, vendar se kljub temu vidi trend naraščanja deleža dimerov po več FT-jih v odvisnosti od koncentracije. Iz tega sledi zaključek: višja kot je koncentracija proteina, več manjših (nanometrskih in submikronskih) in manj večjih (mikronskih) agregatov nastane.



Slika 38: Povprečna številčna koncentracija delcev, večjih od 2 μm , v odvisnosti od koncentracije proteina ob t₀ in po 1 ter 5 FT-jih.

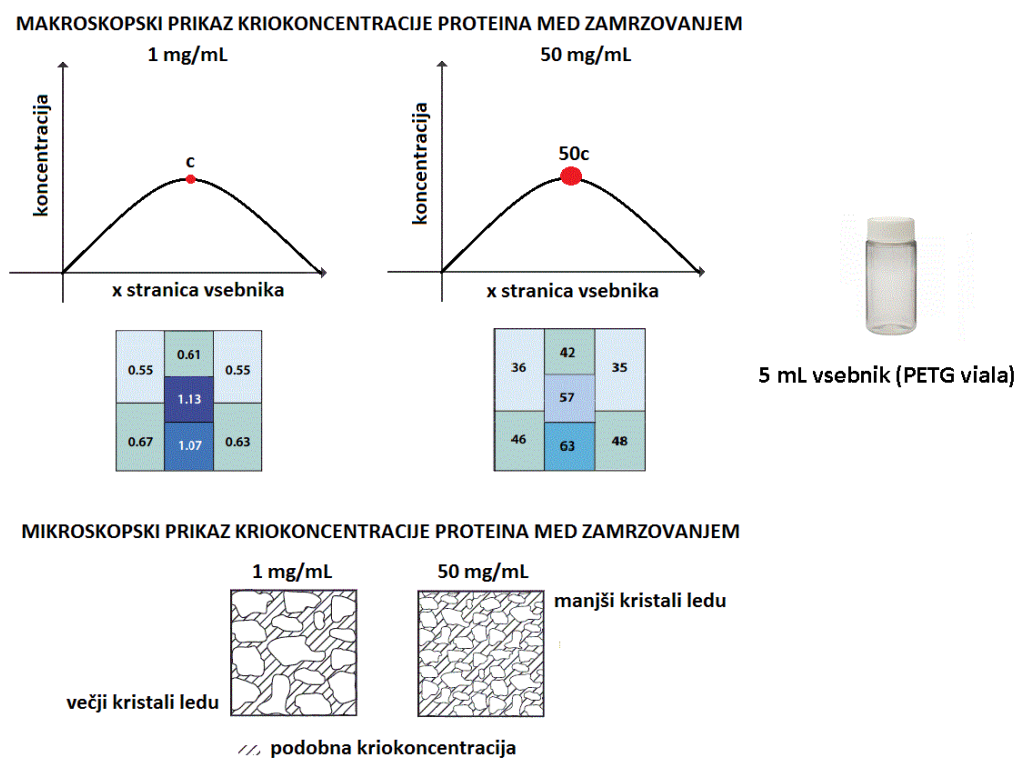


Slika 39: Povprečna številčna koncentracija delcev, večjih od 0,2 μm , v odvisnosti od koncentracije proteina ob t₀ in po 1 ter 5 FT-jih.

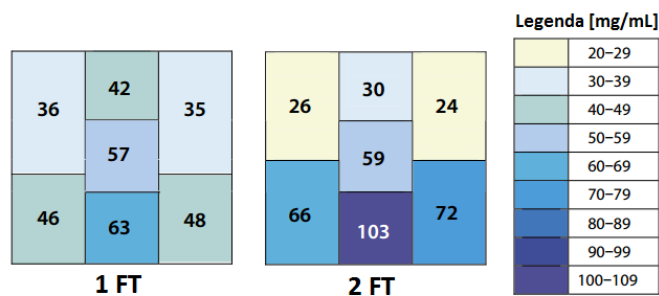
Med zamrzovanjem se protein koncentrira (kriokonzentracija), pri čemer moramo ločiti med makro in mikro stanjem koncentracije proteina med zamrzovanjem. Pri makro stanju

se protein med zamrzovanjem vedno koncentrira tako, da je njegova gostota največja približno na sredini spodnje tretjine vsebnika. Če primerjamo vzorca z različno izhodno koncentracijo proteina (npr. 1 mg/mL in 50 mg/mL), bo makroskopsko gledano kriokonzentracija približno 50-krat večja pri vzorcu s koncentracijo 50 mg/mL (slika 40). Če izvedemo več ciklov zamrzovanja in odmrzovanja, ne da bi vzorec vmes premešali, pa se protein »poseda« oziroma koncentrira proti dnu vsebnika, medtem ko je najmanjša kriokonzentracija v zgornjih plasteh vsebnika (slika 41). Po mešanju raztopine pa le ta postane homogena (40, 41).

Na velikost nastalih kristalov ledu poleg hitrosti ohlajanja vpliva posredno preko koncentracije proteina tudi viskoznost raztopine. Slednja se veča z naraščanjem koncentracije proteina in dodatno še z zniževanjem temperature. Predpostavljamo, da večja kot je viskoznost vzorca, več manjših kristalov in s tem več kanalčkov med kristali ledu nastane v procesu zamrzovanja, zato je mikroskopsko gledano kriokonzentracija podobna neglede na začetno koncentracijo proteina. Manjši kristal ima manjšo stično površino s proteinom in zato nastanejo manjši agregati kot pri vzorcu z nižjo koncentracijo in manjšo viskoznostjo. Za potrditev naših hipotez bi bilo potrebno narediti poskuse tako, da bi proces zamrzovanja in odmrzovanja ves čas lahko opazovali, na primer z rentgenskimi žarki ali krio-mikroskopom, česar pa s trenutno opremo na naši lokaciji ne moremo.



Slika 40: Makroskopski in mikroskopski prikaz koncentracije proteina med zamrzovanjem vzorcev s koncentracijo proteina 1 mg/mL in 50 mg/mL in prikaz 5 mL vsebnika.



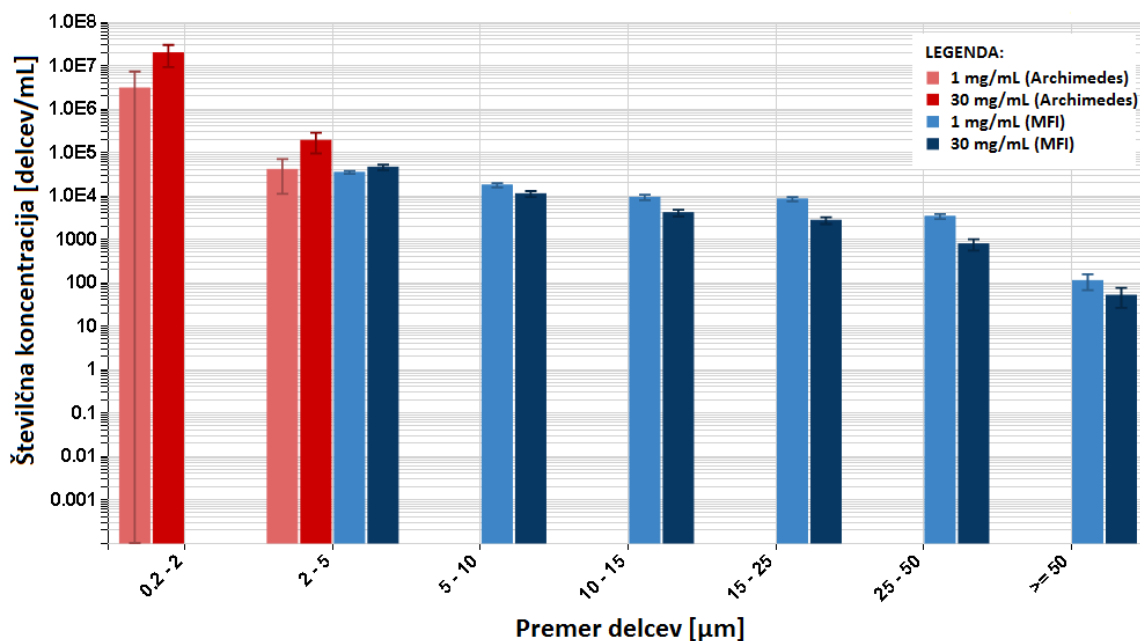
Slika 41: Makroskopski prikaz krikoncentracije po 1 in 2 FT-jih za vzorec s koncentracijo proteina 50 mg/mL. Prirejeno po (41).

Viskoznost vzorcev prav tako vpliva na difuzijo; vzorci z višjo koncentracijo imajo manjšo difuzivnost in zato manj izrazito združevanje manjših agregatov (dimerov) v večje (41).

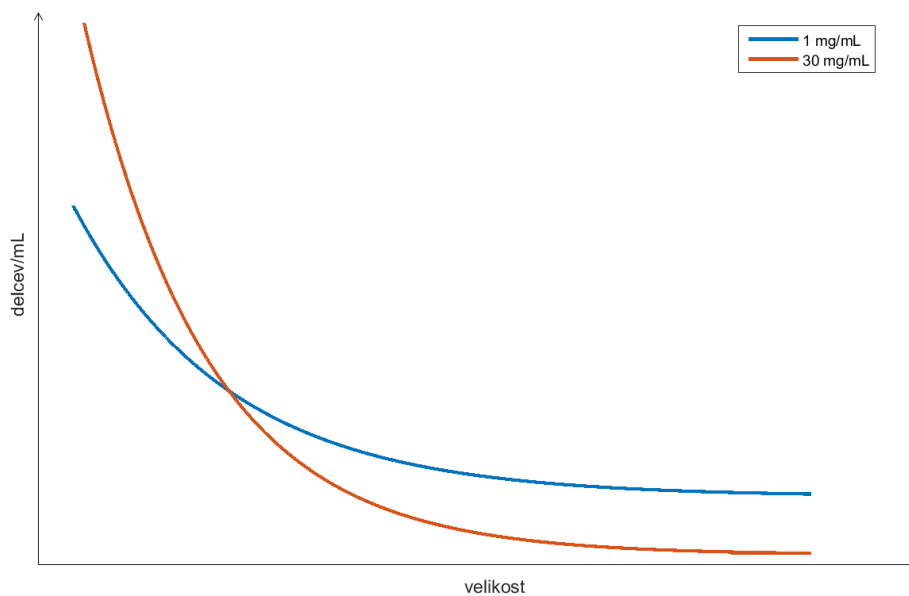
Poleg medfaz vsebnik-protein, zrak-protein tudi medfaza led-tekočina predstavlja mesto agregacije, kjer se makromolekule koncentrirajo na površini kristalčkov ledu. Koncentriranje in delno razvitje amfifilnih molekule, kot so npr. proteini, poteka na medfazah hidrofobno-hidrofilno. Tudi hitrost odmrzovanja je zelo pomembna, saj med odmrzovanjem manjši kristali rastejo v večje (Laplaceova enačba in Ostwaldova rast). Rekrystalizacija je izrazitejša pri počasnejšem odmrzovanju, zato se priporoča hitrejše odmrzovanje (41).

Med analizo podatkov smo ugotovili, da število agregatov v posameznem velikostnem razredu od manjših proti večjim delcem hitreje pada pri vzorcih z višjo koncentracijo proteina, kar je lepo razvidno tudi iz slike 42, ki prikazuje primer vzorcev s koncentracijo proteina X 1 mg/mL in 30 mg/mL po 5 FT-jih. Skico poteka številčne koncentracije za celotno velikostno območje agregatov pa prikazuje diagram na sliki 43.

Porazdelitev velikosti delcev za vzorce s koncentracijo proteina 1 mg/mL in 30 mg/mL po 5 FT-jih

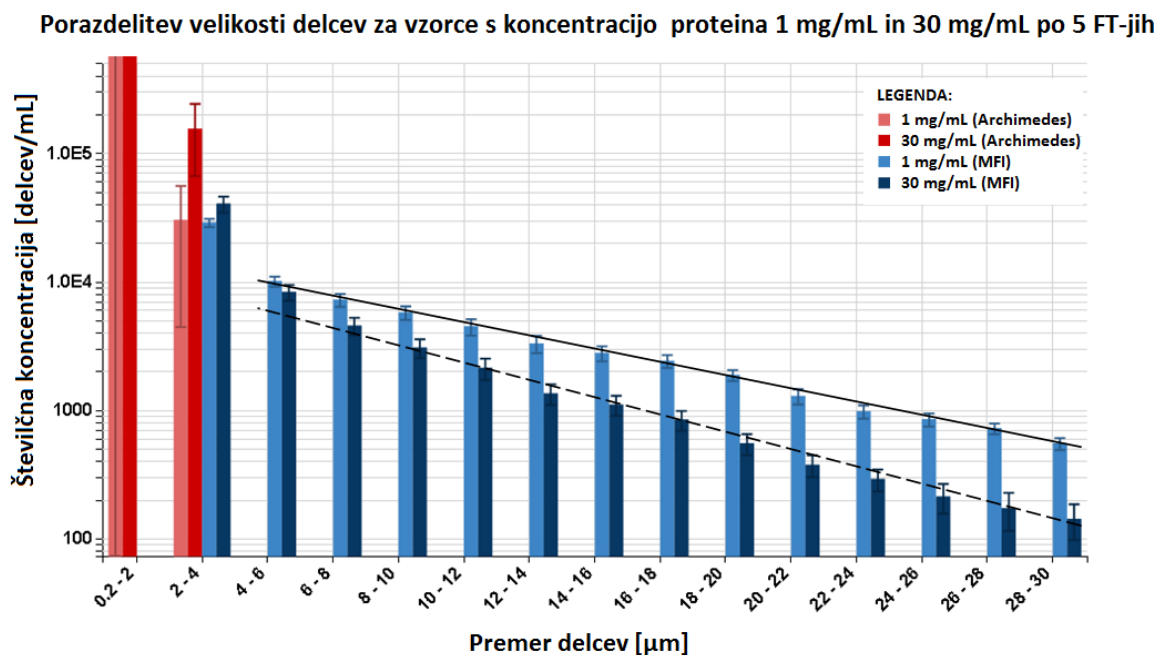


Slika 42: Porazdelitev velikosti delcev, izmerjenih z Archimedesom in MFI-jem, za vzorce s koncentracijo proteina X 1 mg/mL in 30 mg/mL po 5 FT-jih.



Slika 43: Shema poteka številčne koncentracije za celotno velikostno območje agregatov.

Iz razporeditve delcev na sliki 44 je razvidno, da številčna koncentracija mikronskih delcev od velikosti približno 4 μm dalje pada eksponentno. Manjši delci pa ne ustrezajo tej porazdelitvi, saj je njihova koncentracija veliko večja.

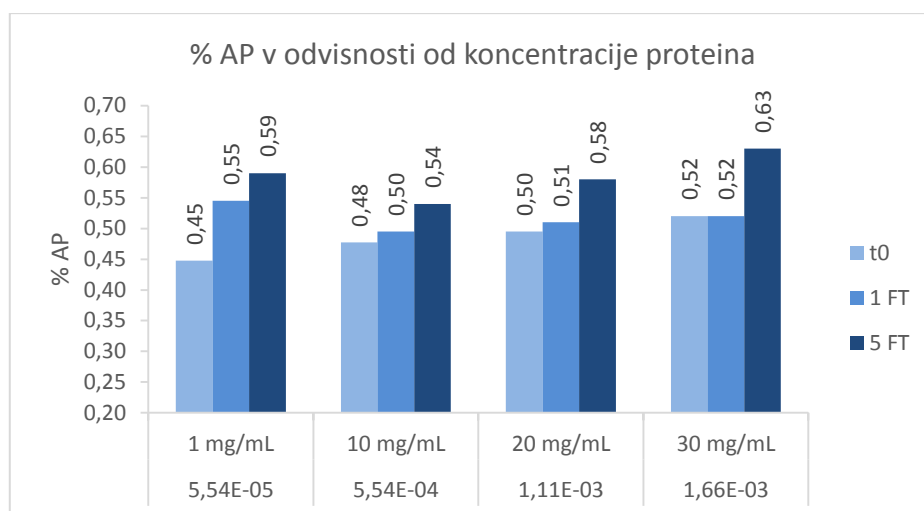


Slika 44: Porazdelitev velikosti delcev, izmerjenih z Archimedesom in MFI-jem, za vzorce s koncentracijo proteina X 1 mg/mL in 30 mg/mL po 5 FT-jih. y-os je v logaritemski skali, x-os pa v linearni skali; premici na diagramu prikazujeta eksponentni funkciji.

4.4 VPLIV STABILIZATORJA NA AGREGACIJO PRI ZAMRZOVANJU IN ODMRZOVANJU

Namen poskusa je bil ugotoviti, kako prisotnost stabilizatorja (v našem primeru saharoze) vpliva na agregacijo med zamrzovanjem in odmrzovanjem modelnih proteinov.

Podobno kot pri poskusu »Vpliv koncentracije proteina na agregacijo pri zamrzovanju« je delež dimerov zanemarljiv in ne predstavlja kritičnih vrednosti. Prav tako ne moremo reči, da je prisotnost saharoze zmanjšala oziroma povečala agregacijo, saj je % AP premajhen, da bi lahko rezultate primerjali z vzorci brez saharoze. Kljub temu pa se vidi trend naraščanja deleža dimerov po zamrzovanju in odmrzovanju. Največja razlika v % AP med t_0 in 1 FT je pri vzorcih s koncentracijo proteina 1 mg/mL, medtem ko je delež dimerov enak pri vzorcih s koncentracijo proteina 30 mg/mL. Po 5 FT-jih je % AP največji pri vzorcih s koncentracijo proteina 30 mg/mL in najmanjši pri srednjih dveh koncentracijah – 10 mg/mL in 20 mg/mL (slika 45). Iz tega lahko zaključimo, da je 125 mM prisotnost saharoze optimalna za stabilizacijo proteina v območju koncentracije 20–30 mg/mL. V splošnem pa lahko rečemo, da saharoza nima signifikantnega vpliva na nastanek reverzibilnih agregatov oziroma dimerov proteina X v primerjavi z vzorci brez saharoze.



Slika 45: % AP v odvisnosti od koncentracije proteina ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih za vzorce s saharozo. Prikazano je tudi množinsko razmerje protein : saharoz.

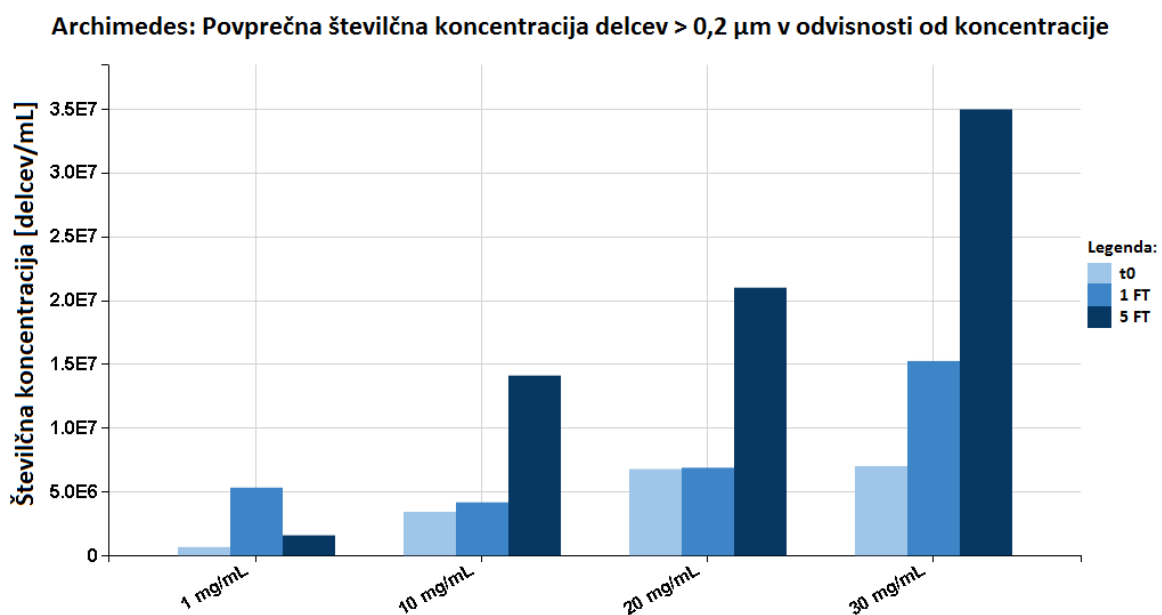
Preglednica VII prikazuje rezultate DLS meritev; polidisperzni indeks in povprečni premer delcev ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih za vzorce proteina X različnih koncentracij in z dodano saharozo. Večji premer delcev pri višji koncentraciji proteina je enako kot v prejšnjem poskusu posledica zmanjšane difuzije delcev proteina X zaradi negativnega dinamičnega interakcijskega parametra (k_D) v citratnem pufru. Prisotnost saharoze v vzorcih s koncentracijo proteina 1 mg/mL vpliva na Pdl. Razmerje protein : saharoz je pri tej koncentraciji proteina v prid saharoze, ki protein zasenči. Pri 1 nm je zato viden tudi vrh saharoze in posledično je Pdl večji.

Preglednica VII: Povprečna vrednost Pdl-ja in povprečna velikost delcev v odvisnosti od koncentracije ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih za vzorce s saharozo.

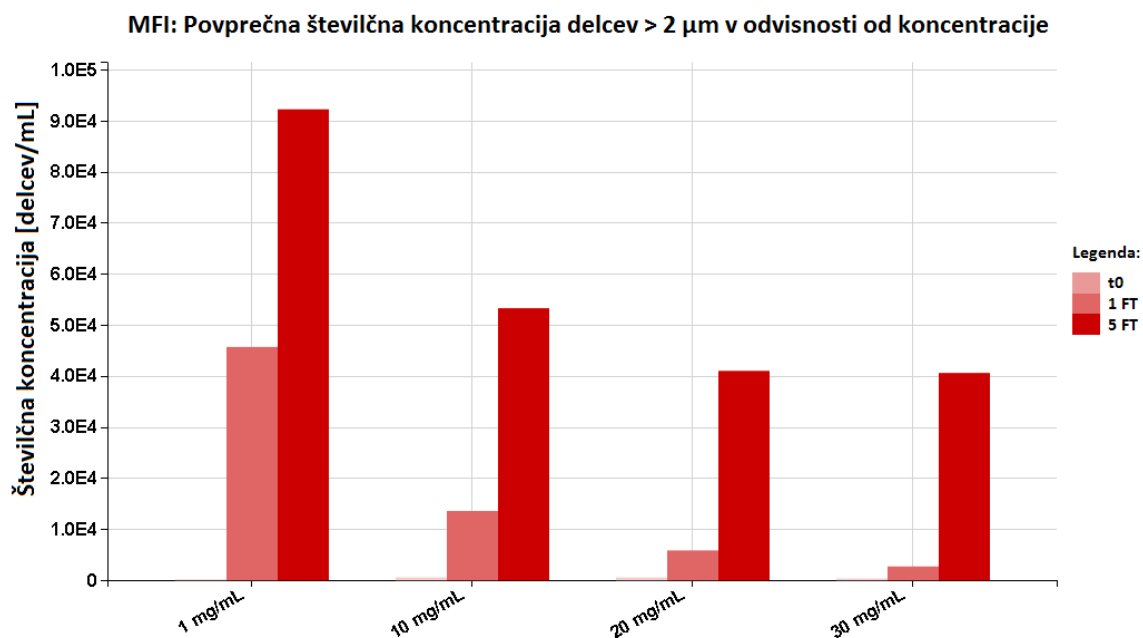
	1 mg/mL		10 mg/mL		20 mg/mL		30 mg/mL	
	Pdl	2r [nm]	Pdl	2r [nm]	Pdl	2r [nm]	Pdl	2r [nm]
t₀	0,193	11,2	0,038	13,8	0,038	15,5	0,062	17,1
1 FT	0,206	11,2	0,041	13,6	0,053	15,4	0,062	17,1
5 FT	0,172	11,4	0,047	13,7	0,078	15,5	0,086	17,2

Iz meritev z resonančno tehniko merjenje mase je razvidno, da pri višji koncentraciji proteina nastane več agregatov (submikronski in mikronski agregati: od 200 nm do 5 μ m) (slika 46), medtem ko je trend števila mikronskih agregatov, izmerjenih z MFI, nasproten. Z večanjem koncentracije proteina je nastalo manj agregatov. Pri koncentraciji proteina 1 mg/mL je po 1 FT-ju nastalo celo 3x več delcev kot pri vzorcih brez saharoze. Takšen rezultat nas je zelo presenetil, saj 100–200 mM saharozo z namenom zmanjšanja agregacije pogosto dodajamo vzorcem v predformulacijskih študijah, kjer je koncentracija proteina 1 mg/mL. Po 1 FT-ju je število nastalih agregatov v vzorcih s koncentracijo

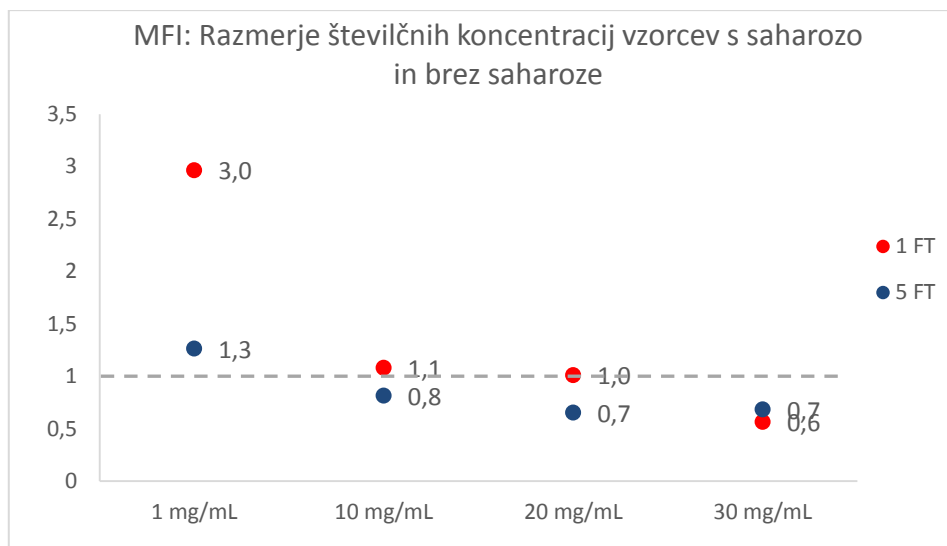
proteina 10 mg/mL s in brez saharoze primerljivo, pri višjih koncentracijah pa se pokaže želen učinek saharoze (sliki 47 in 48).



Slika 46: Povprečna številčna koncentracija delcev, večjih od 0,2 μm , v odvisnosti od koncentracije proteina ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih za vzorce s saharozo.



Slika 47: Povprečna številčna koncentracija delcev, večjih od 2 μm , v odvisnosti od koncentracije proteina ob t_0 in po 1 ter 5 FT-jih za vzorce s saharozo.



Slika 48: Razmerje številčnih koncentracij MFI meritev vzorcev s saharozo in brez saharoze po 1 in 5 FT-jih.

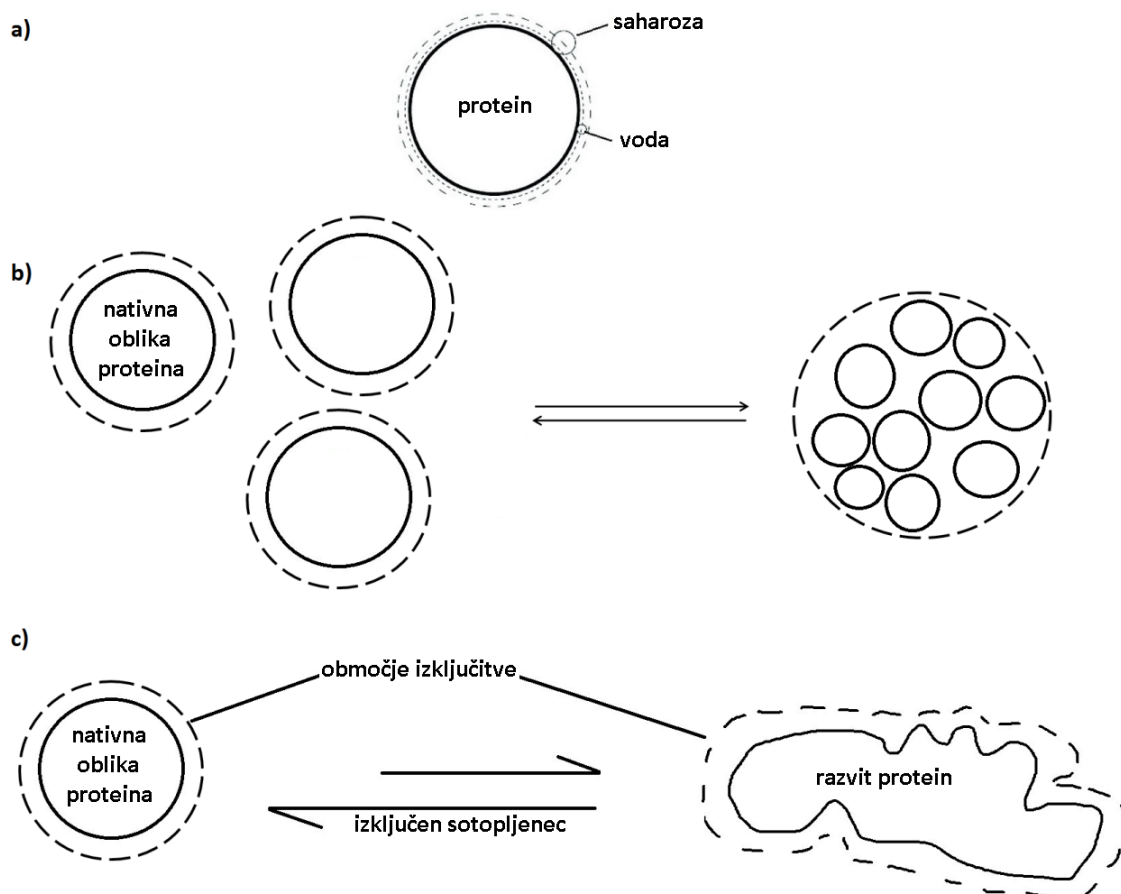
Za utemeljitev dobljenih rezultatov je pomemben podatek, da se stabilizator med zamrzovanjem koncentrira skupaj s proteinom (torej proti dnu vsebnika, če vzorcev med zamrzovanjem ne mešamo) (40). S tem dejstvom in upoštevanjem mehanizma koncentriranja proteina med zamrzovanjem (slika 40) lahko pojasnimo, zakaj je število delcev v vzorcih s 125 mM saharozo in koncentracijo proteina 1 mg/mL napram vzorcem brez dodane saharoze in z isto koncentracijo proteina po 5 FT-jih le 1,3x večje (slika 48). Ker vzorcev med cikli zamrzovanja in odmrzovanja nismo mešali, je bila kriokoncentracija na začetku petega FT-ja bistveno višja kot pri 1 FT-ju. Glede na sliko 41 sklepamo, da je bila približno tolikšna kot bi jo pri 1 FT-ju imeli vzorci s koncentracijo proteina 5 mg/mL. Enako velja za vzorce z višjimi koncentracijami proteina – kriokoncentracija pri 5 FT-jih je bila višja kot pri 1 FT-ju za vzorce z isto izhodno koncentracijo proteina. Če točke razmerja številčnih koncentracij vzorcev s in brez saharoze MFI meritev po 5 FT-jih navidezno premaknemo desno v smeri x-osi, vidimo, da so razmerja podobna kot pri 1 FT-ju.

Interakcije med proteinom, topilom in sotopljencem v raztopini opisujeta preferenčni interakcijski parameter in preferenčni interakcijski koeficient. Preferenčni interakcijski parameter opiše spremembe kemijskega potenciala proteina ob majhnem dodatku sotopljenca, preferenčni interakcijski koeficient pa nam pove, koliko sotopljenca je potrebno dodati ali odstraniti iz raztopine, če za malo povečamo koncentracijo proteina (tako, da ostane kemijski potencial proteina enak). Negativni interakcijski koeficient pomeni, da so interakcije med proteinom in sotopljencem neugodne in je zato sotopljenec

izključen iz neposredne bližine proteinskih molekul, ki so preferenčno hidratirane. V primeru pozitivnega preferenčnega interakcijskega parametra pa so interakcije med proteinom in sotopljencem ugodne in v okolici proteinskih molekul primanjkuje vode. Prisotnost sotopljenca, ki se veže na protein (negativni preferenčni interakcijski parameter oziroma zmanjšan kemijski potencial proteinskih molekul), bi moral povečati topnost proteina, medtem ko naj bi prisotnost sotopljenca, ki se izključuje iz bližine proteina, zmanjšala topnost proteina (42). Saharoza kot nespecifični proteinski stabilizator deluje po mehanizmu preferenčne izključitve, kar pomeni, da z vodo tekmuje za vezavo na protein. Če ima voda večjo afiniteto do vezavnega mesta na površini proteina kot saharoza, bo na nekem mestu v povprečju več molekul vode kot saharoze in bo mesto zato preferenčno hidratirano. Vzrok za preferenčno izključitev sotopljenca s površine proteina je lahko sterična oviranost, zvišanje površinske napetosti vode, odboj od nepolarnih površin proteina in odboj zaradi naboja na površini proteina. Najverjetneje je vzrok za preferenčno izključitev saharoze s površine proteina sterična oviranost. Molekule topila – vode so manjše od molekul saharoze in se zato lahko bolj približajo površini proteina. Kot posledica preferenčne izključitve pride do mikrofazne ločitve, kar pa termodinamsko ni ugodno. Zaradi prerazporeditve molekul saharoze je v neposredni bližini proteina presežek vode, kar pomeni, da so molekule proteina hidratirane. Ker izključitev sotopljenca potrebuje dodatno prosto energijo za ohranitev koncentracijskega gradienta sotopljenca, se to potrebo omili z zmanjšanjem površine proteina, ki je v stiku s topilom. To pomeni, da pride do konformacijske spremembe (1, 42).

Z dodatkom saharoze se entropija celotne raztopine nekoliko zmanjša, kar pomeni, da se energija poveča, kar pa za sistem ni ugodno, ker teži k minimumu energije in s tem k agregaciji (povečanje entropije na račun zmanjšanja izključitvenega volumna za saharozo). Zato v določenih primerih zamrzovanja in odmrzovanja saharoza dejansko povzroči agregacijo. Po drugi strani pa se zmanjša tudi entropija razvite oblike (večji izključitveni volumen) napram nativni obliki. To pomeni, da ima nativna oblika nižjo energijo (višjo entropijo) in je zato bolj konformacijsko stabilna. To vodi k preprečevanju agregacije.

Če povzamemo, saharoza proteinske molekule konformacijsko stabilizira, po drugi strani pa jih koloidno destabilizira. Zaradi teh dveh nasprotnih pojavov obstaja optimalna koncentracija saharoze v raztopini, ki proteinske molekule stabilizira (slika 49).



Slika 49: a) prikazuje preferenčno izključitev sotopljenca zaradi sterične oviranosti, b) povečanje entropije na račun zmanjšanja izključitvega volumna za saharozo (ravnotežje v desno), c) pa konformacijsko spremembo proteina in s tem zvečanje površine proteina, ki je v stiku s topilom – zmanjšanje entropije (ravnotežje je pomaknjeno v levo – konformacijsko bolj stabilna oblika).

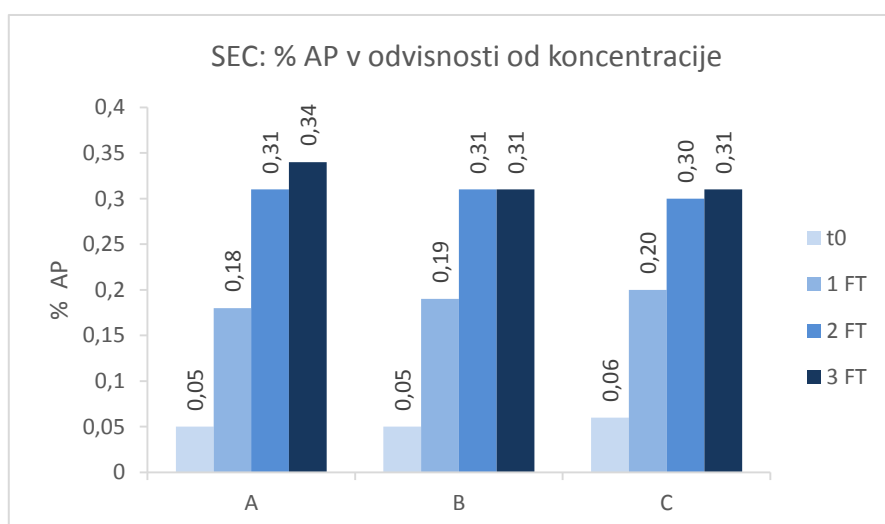
Pri tem mehanizmu stabilizacije oziroma destabilizacije proteina je zelo pomembno razmerje protein : stabilizator, saj lahko s preveliko količino stabilizatorja presežemo mejo topnosti proteina in ga tako oborimo. V tem primeru se termodinamska stabilnost proteina zmanjša. To se je zgodilo tudi v našem primeru, kjer so vzorci s koncentracijo proteina 1 mg/mL v prisotnosti saharoze agregirali 3x bolj kot pa brez nje. Pomembno se je tudi zavedati, da bi z višanjem koncentracije proteina ob isti količini saharoze nastalo večje število agregatov, saj bi bilo saharoze za stabilizacijo premalo. Zato bi bilo v nadaljnjih poskusih smiselno protein skoncitrirati na višje koncentracije (npr. 40, 50 in 60 mg/mL) ter poskus izvesti na večji koncentracijski skali. Tako bi lahko poiskali optimalno območje razmerja protein : saharoza, kjer saharoza pri zamrzovanju in odmrzovanju deluje kot stabilizator.

4.5 ZAMRZOVANJE PROTEINA Y V STEKLENIH VIALAH

Izvedba tega poskusa prvotno v namenu magistrske naloge ni bila načrtovana. Ker smo med eksperimentalnim delom proučevanja vpliva zamrzovanja na agregacijo proteina Y naleteli na zelo zanimiv in nenavaden pojav – zmanjšanje števila mikronskih agregatov proteinov Y po 3 FT-jih v PETG vialah, pa smo ga vključili v nalogo.

Ker smo predpostavili, da se večji agregati lepijo na stene vsebnika, smo vzorce proteina Y zamrzovali v steklenih vialah. Zaradi servisa CryoPilota v tujini smo za zamrzovanje uporabili zamrzovalno skrinjo (-80 °C).

Neglede na to, da smo vzorce zamrzovali v skrinji, so rezultati med položaji vial A, B in C med seboj zadovoljivo primerljivi. Vsak dodaten cikel zamrzovanja proteina Y v steklenih vialah je povzročil nastanek večjega števila agregatov vseh velikostnih razredov, le količina dimerov, izmerjenih s SEC-om, se po 2 in 3 FT-jih ne razlikuje bistveno (slika 50).



Slika 50: % AP glede na položaj vial v škatli ob t₀ in po 1, 2, ter 3 FT-jih.

Iz rezultatov % AP, Avogadrove konstante, molske mase proteina, prostornine injiciranega vzorca in njegove koncentracije smo izračunali, približno koliko dimerov je nastalo (preglednica VIII).

Preglednica VIII: Ocena številčne koncentracije dimerov.

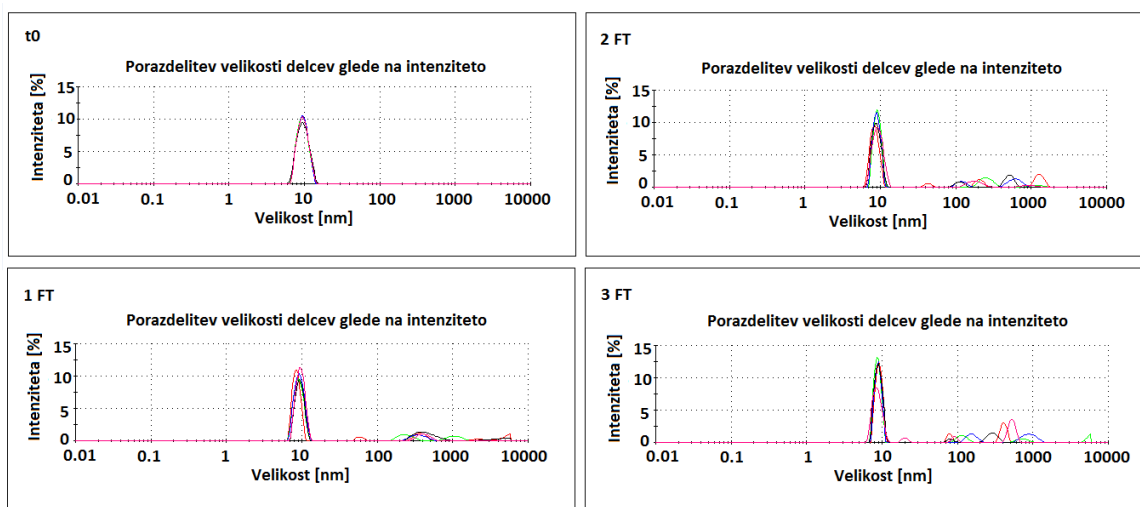
Povprečna številčna koncentracija [delcev/mL]	
t ₀	2,08*10 ¹⁵
1 FT	7,92*10 ¹⁵
2 FT	1,25*10 ¹⁶
3 FT	1,29*10 ¹⁶

Tudi rezultati DLS analize vzorcev kažejo, da je protein precej agregiral. V nasprotnem primeru pa so nastali agregati/delci različnih velikosti, kar pojasni tudi naše rezultate in velik standardni odklon Pdl-ja in povprečne velikosti delcev po 1, 2 in 3 FT-jih (preglednica IX).

Preglednica IX: Rezultati DLS meritev – povprečne vrednosti polidisperznega indeksa in velikosti delcev s standardnim odklonom glede na število ciklov zamrzovanja in odmrzovanja in položaj v škatli (A, B, C).

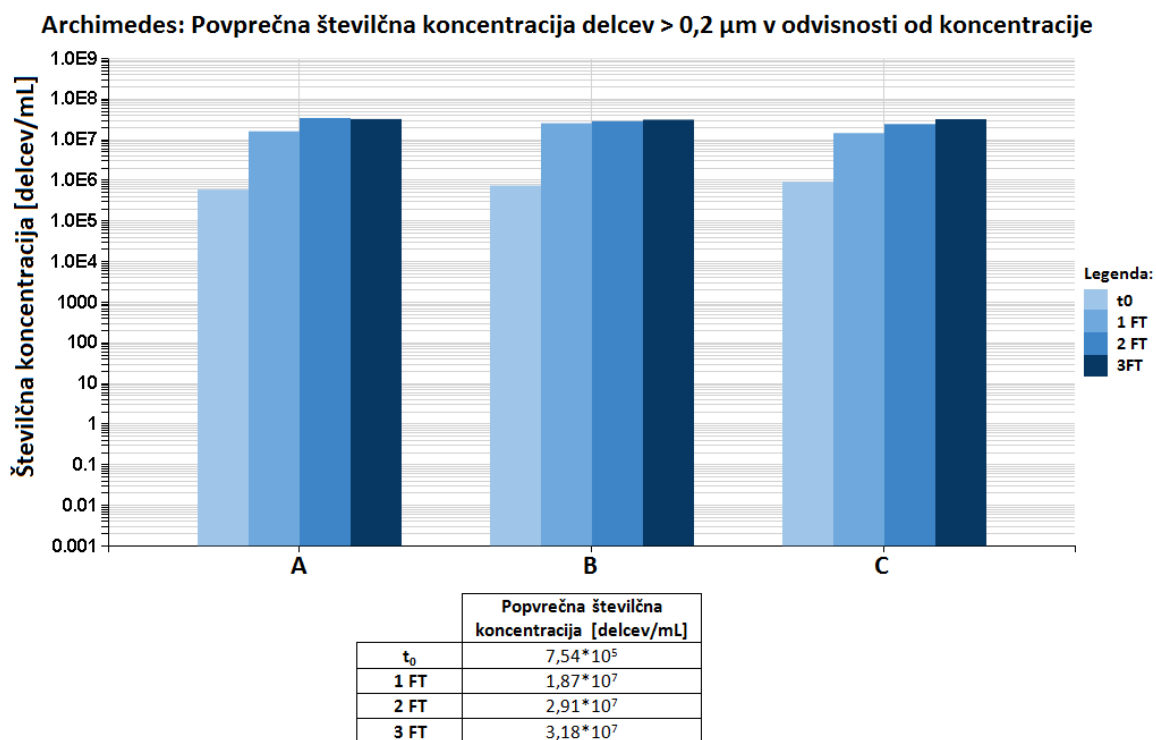
	A		B		C	
	Pdl	2r [nm]	Pdl	2r [nm]	Pdl	2r [nm]
t_0	$0,042 \pm 0,012$	$9,37 \pm 0,05$	$0,025 \pm 0,011$	$9,26 \pm 0,054$	$0,043 \pm 0,018$	$9,27 \pm 0,084$
1 FT	$0,355 \pm 0,086$	$30,26 \pm 13,90$	$0,291 \pm 0,061$	$19,03 \pm 9,82$	$0,253 \pm 0,058$	$21,77 \pm 17,11$
2 FT	$0,390 \pm 0,091$	$57,55 \pm 43,57$	$0,379 \pm 0,099$	$49,38 \pm 45,84$	$0,309 \pm 0,043$	$33,24 \pm 21,03$
3 FT	$0,367 \pm 0,138$	$45,83 \pm 37,18$	$0,338 \pm 0,063$	$24,72 \pm 15,79$	$0,348 \pm 0,074$	$47,00 \pm 21,91$

Iz slike 51 je razvidno, da je ob t_0 vzorec čist, brez agregatov in je porazdelitev velikosti delcev monodisperzna, povprečna velikost proteina pa znaša 10 nm. Po vsakem dodatnem ciklu zamrzovanja pa je nastalo več agregatov različnih velikosti in vzorec ima posledično polidisperzno porazdelitev delcev.

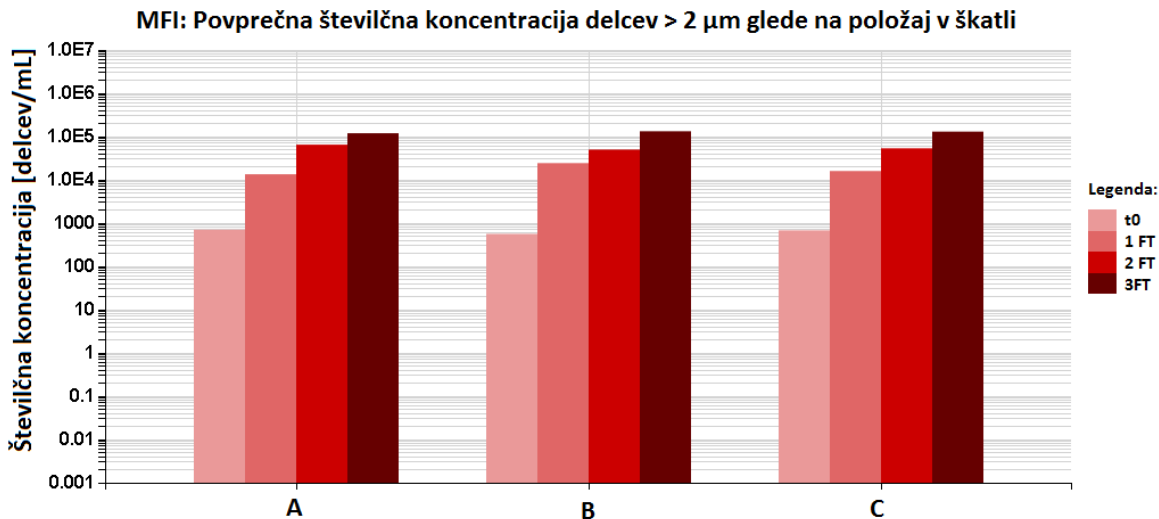


Slika 51: Primer rezultatov DLS meritev ob t_0 in po 1, 2 ter 3 FT-jih. Vsak diagram prikazuje 5 replik meritev istega vzorca.

Rezultati meritev z Archimedesom in MFI-jem so prikazani na logaritemski skali, ker je razlika med rezultati ob t_0 in po 3 FT-jih tolikšna, da meritev ob t_0 na linearni skali sploh ne bi videli (sliki 52 in 53).



Slika 52: Povprečna številčna koncentracija delcev, izmerjenih z resonančno tehniko merjenje mase, glede na položaj v škatli ob t_0 in po 1, 2 ter 3 FT-jih.



Slika 53: Povprečna številčna koncentracija delcev, izmerjenih s pretočno mikroskopsko tehniko, glede na položaj v škatli ob t_0 in po 1, 2 ter 3 FT-jih.

Iz dobljenih rezultatov tega poskusa in predhodnih rezultatov zamrzovanja proteina Y v PETG vialah sklepamo, da se protein Y v primeru zamrzovanja v PETG vialah lepi na stene vial. V primeru zamrzovanja v steklu je agregatov po 1 in 2 FT-jih približno 36x več (preglednica X). To pojasni zmanjšanje števila mikronskih agregatov po 3 FT-jih v PETG

vialah, medtem ko se pri zamrzovanju v stekelnih vialah število mikronskih delcev po vsakem dodatnem ciklu poveča (slika 53). Slednje bi lahko nadalje potrdili ali ovrgli z dodatkom fluorescirajočega barvila in mikroskopiranjem z invertnim mikroskopom.

Najverjetneje je vzrok za drugačno obnašanje raztopine proteina v steklenih vialah napram plastičnim drugačna medfaza trdno-tekoče in s tem različna medfazna napetost med raztopino proteina in vsebnikom. V primerjavi s proteinom X so agregati po zamrzovanju in odmrzovanju proteina Y v PETG vialah večji, bolj podolgovati in prosojni.

Preglednica X: Primerjava številčnih koncentracij agregatov, analiziranih z MFI-jem, med PETG in steklenimi vialami.

	PETG VIALE	STEKLENE VIALE
FT	Povprečna številčna koncentracija [delcev/mL]	Povprečna številčna koncentracija [delcev/mL]
1	489	17900
2	1540	56100
3	782	127000

5 SKLEP

V opravljenem raziskovalnem delu smo razvili oziroma optimizirali ustrezne profile za kontrolirano zamrzovanje in odmrzovanje vzorcev manjših prostornin (1–5 mL), ki ponazarjajo »scale down« model zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev večjih proizvodnih prostornin. To pomeni bistveno manjšo porabo materiala in znižanje stroškov razvoja procesnega koraka zamrzovanja/odmrzovanja rekombinantnih bioloških učinkovin. S temi profili zamrzovanja in odmrzovanja smo nato raziskali, kako na agregacijo proteina vplivata njegova koncentracija in prisotnost stabilizatorja. Prišli smo do naslednjih ugotovitev:

- Vsak cikel zamrzovanja in odmrzovanja poveča število agregatov.
- Hitreje kot vzorec zamrzujemo, več agregatov nastane.
- Višja kot je koncentracija proteina, več nanometrskih in submikronskih ter manj mikronskih in vidnih agregatov nastane.
- Porazdelitev velikosti mikronskih delcev je eksponentna.
- Prisotnost stabilizatorja nujno ne zmanjša agregacije proteina, lahko jo celo poveča. Zelo pomembno je razmerje stabilizator : protein.
- Agregati proteina Y se pri zamrzovanju in odmrzovanju najverjetneje lepijo na stene plastičnega PETG vsebnika. V primeru zamrzovanja v steklu je agregatov po 1 in 2 FT-jih približno 36x več v primerjavi z zamrzovanjem v PETG vialah. Za potrditev naše hipoteze je potrebno narediti dodatne poskuse.
- Na število nastalih agregatov vpliva tudi vrsta filtracije. Pri filtriranju z nadtlakom (brizga) nastane manj agregatov kot v primeru filtracije s podtlakom (vakuumska črpalka).

6 LITERATURA

1. Štrukelj B, Kos J. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007.
2. Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu WS: Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*. 2007; 103: 40–47
3. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, et al: Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. *Pharmaceutical Research* 2010; 27: 544–575.
4. Patro SY, Freund E, Chang BS: Protein formulation and fillfinish operations. *Biotechnol Annu Rev* 2002; 8: 55–84.
5. Rathore N, Rajan RS: Current perspectives on stability of protein drug products during formulation, fill and finish operations. *Biotechnol Prog* 2008; 24: 504–14.
6. Philo JS, Arakawa T: Mechanisms of protein aggregation. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009; 10: 348–51.
7. Pekar AH and Frank BH: Conformation of proinsulin. A comparison of insulin and proinsulin self-association at neutral pH. *Biochemistry* 1972; 11(22): 4013–6.
8. Alford JR, Kendrick BS, Carpenter JF, Randolph TW: High concentration formulations of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist: II. Aggregation kinetics. *J. Pharm. Sci.* 2007; 97(8): 3005–21.
9. Krishnamurthy R, Manning MC: The stability factor: importance in formulation development. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2002; 3(4): 361–71.
10. Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF: Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm. Res.* 2003; 20(9): 1325–36.
11. Wang W: Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int.J. Pharm.* 2005; 289(1–2): 1–30.
12. Hermeling S, Schellekens H, Maas C, Gebbink et al: Antibody response to aggregated human interferon alpha2b in wild-type and transgenic immune tolerant mice depends on type and level of aggregation. *J. Pharm. Sci.* 2006; 95(5): 1084–96.
13. Kendrick BS, Chang BS, Arakawa T, et al: Preferential exclusion of sucrose from recombinant interleukin-1 receptor antagonist: role in restricted conformational

- mobility and compaction of native state. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 11917–22.
14. Kim YS, Jones LS, Dong AC, et al: Effects of sucrose on conformational equilibria and fluctuations within the native-state ensemble of proteins. *Protein Sci* 2003; 12: 1252–61.
 15. Kendrick BS, Carpenter JF, Cleland JL, Randolph TW: A transient expansion of the native state precedes aggregation of recombinant human interferon-gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14142–6.
 16. Lee JC, Timasheff SN: The stabilization of proteins by sucrose. *J Biol Chem* 1981; 256: 7193–201.
 17. Timasheff SN. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Adv Protein Chem.* 1998; 51: 355–432.
 18. Hermeling S, Crommelin DJA, Schellekens H, Jiskoot W: Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm Res.* 2004; 21: 897–903.
 19. Rosenberg AS: Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J* 2006; 8: E501–7.
 20. Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF: Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res* 2003; 20: 1325–36.
 21. Narhi LO, Schmit J, Bechtold-Peters K, Sharma D: Classification of protein aggregates. *J Pharm Sci* 2012; 101: 493–498.
 22. Carpenter J, Cherney B, Lubinecki A, et al: Meeting report on protein particles and immunogenicity of therapeutic proteins: Filling in the gaps in risk evaluation and mitigation. *Biologicals* 2010; 38: 602–611.
 23. Rosenberg AS: Effects of protein aggregates: An immunologic perspective. *AAPS J* 2006; 8: E501–E507.
 24. Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF: Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res* 2003; 20: 1325–1336.
 25. Weinbuch D, Zölls S, Wiggenhorn M, et al: Micro-Flow Imaging and Resonant Mass Measurement (Archimedes) – Complementary Methods to Quantitatively

- Differentiate Protein Particles and Silicone Oil Droplets. *J Pharm Sci* 2013; 102(7): 2152–2165.
26. Satish KS, Parag K, Wei W, Sandeep N: Large-Scale Freezing of Biologics: A Practitioner's Review, Part 1. *BioProcess Int.* 2009; 7(9): 32–44.
 27. Franks F. Protein Destabilization at Low Temperatures. *Adv. Protein Chem* 1995; 46: 105–139.
 28. Franks F. Nucleation of Ice and Its Management in Ecosystems. *Phil. Trans. Royal Soc. London, A* 2003; 361: 557–574.
 29. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. Biološka zdravila, spletni učbenik za študente farmacije. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/e-knjige/Biol-zdravila_e-ucbenik.pdf. Dostop: 23. 7. 2016.
 30. Bhatnagar B, Bogner RH, Pikal MJ: Protein Stability During Freezing: Separation of Stresses and Mechanisms of Protein Stabilization. *Pharm. Dev. Technol* 2007; 12: 505–523.
 31. Strambini GB, Gabellieri E. Proteins in Frozen Solutions: Evidence of Ice-Induced Partial Unfolding. *Biophys. J.* 1996; 70: 971–976.
 32. Chang BS, Kendrick BS, Carpenter JF: Surface-Induced Denaturation of Proteins During Freezing and Its Inhibition By Surfactants. *J. Pharm. Sci.* 1996; 85: 1325–1330.
 33. Laboratory News. Mind the (size) gap. <http://www.labnews.co.uk/features/mind-the-size-gap-25-04-2013/>. Dostop: 25. 7. 2016.
 34. Brightwell Technologies Inc. Application of Micro-Flow Imaging (MFI™) to The analysis of Particles in Parenteral Fluids. <http://www.christison.co.uk/equipment/documents/ParenteralFormulationQualificationStudy.pdf>. Dostop: 26. 7. 2016.
 35. ProteinSimple. MFI 5000 Series Sub-visible particle analysis TECHNOLOGY & APPLICATIONS. http://www.proteinsimple.com/mfi_5000.html. Dostop: 26. 7. 2016.
 36. Malvern. Archimedes Particle Metrology System. <http://www.malvern.com/en/products/product-range/archimedes/default.aspx?gclid=CJ3-5vjyx84CFbgK0wodHUwDWg>. Dostop: 28. 7. 2016.

37. Pečar Fonović U, Obermajer N, Jevnikar Z, et al: Vaje iz farmacevtske biokemije, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2011: 24–26.
38. Hong P, Koza S, Bouvier ESP: Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2012; 35: 2923–2950.
39. Malvern. Manual: Zetasizer Nano User Manual (Man0485-1.1)
<http://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20user%20manual.pdf>. Dostop: 23. 8. 2016.
40. Kolhe P, Badkar A: Protein and Solute Distribution in Drug Substance Containers During Frozen Storage and Post-Thawing: A Tool To Understand and Define Freezing–Thawing Parameters in Biotechnology Process Development. *Biotechnol. Prog.* 2011; 27(2): 494–504.
41. Lashmar TU, Vanderburgh M, Little JS: Bulk Freeze–Thawing of Macromolecules. *BioProcess International*. 2007.
42. American Pharmaceutical Review. Mechanism of Stabilization of Proteins by Poly-hydroxy Co-solvents: Concepts and Implications in Formulation Development.
<http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/112491-Mechanism-of-Stabilization-of-Proteins-by-Poly-hydroxy-Co-solvents-Concepts-and-Implications-in-Formulation-Development/>. Dostop: 10. 4. 2017.