

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATIC UKMAR

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATIC UKMAR

MAGISTRSKA NALOGA

**VALIDACIJA METODE ZA MERJENJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI PRI
CELIČNO POSREDOVANI CITOTOKSIČNOSTI, ODVISNI OD PROTITELES**

**METHOD VALIDATION FOR MEASURING BIOLOGICAL ACTIVITY IN
ANTIBODY DEPENDENT CELL MEDIATED CYTOTOXICITY**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljal na oddelku kontrole kakovosti Bioanalitike podjetja Lek, pod mentorstvom prof. dr. Darka Černeta in somentorstvom dr. Tadeja Čepelnika.

Zahvala

Rad bi se zahvalil svojemu mentorju prof. dr. Darku Černetu in še posebej somentorju dr. Tadeju Čepelniku, da mi je omogočil opravljanje magistrske naloge v laboratoriju kontrole kakovosti in me skozi celoten proces zelo dobro usmerjal. Zahvalil bi se tudi vsem ostalim sodelavcem, še posebej dr. Roku Kebru, ki mi je z nasveti veliko pomagal tako pri praktičnem kot tudi pri teoretičnem delu. Seveda brez spodbujanja, motiviranja in pomoči dekleta, družine in prijateljev ne bi šlo, zato se tudi njim iskreno zahvaljujem.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelal samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Darka Černeta in somentorja dr. Tadeja Čepelnika.

Kazalo vsebine

1	UVOD	1
1.1	Biološka in podobna biološka zdravila	1
1.2	Monoklonska protitelesa	2
1.2.1	Od komplementa odvisna citotoksičnost (CDC)	3
1.2.2	Celično posredovana citotoksičnost odvisna od protiteles (ADCC)	3
1.3	Biološki testi	4
1.4	Validacija metod	6
1.4.1	Specifičnost	8
1.4.2	Linearnost	8
1.4.3	Delovno območje	9
1.4.4	Točnost	9
1.4.5	Natančnost	9
1.4.6	Robustnost	10
1.4.7	Zmožnost metode za sledenje stabilnosti vzorca	10
1.4.8	Testi ustreznosti sistema	10
1.4.9	Predvalidacijski testi	10
2	NAMEN DELA	11
3	MATERIALI IN METODE	12
3.1	Materiali	12
3.1.1	Oprema	12
3.1.2	Programska oprema	13
3.1.3	Potrošni material	13
3.1.4	Kemikalije	14
3.1.5	Priprava raztopin	15
3.1.6	Uporabljeni standardi in vzorci	17
3.2	Metode	17

3.2.1	Kultiviranje tarčnih celic	17
3.2.2	Kultiviranje efektorskih celic	17
3.2.3	Stradanje efektorskih celic.....	18
3.2.4	Biološki test ADCC	18
3.2.5	Validacijski parametri.....	25
4	REZULTATI.....	29
4.1	Specifičnost.....	29
4.2	Linearnost, delovno območje in točnost	29
4.3	Ponovljivost	33
4.4	Vmesna natančnost	34
4.5	Robustnost	35
4.6	Zmožnost metode za sledenje stabilnosti vzorca	36
4.7	Povzetek rezultatov	37
5	RAZPRAVA	39
5.1	Specifičnost.....	39
5.2	Linearnost, delovno območje in točnost	39
5.3	Natančnost	39
5.3.1	Ponovljivost.....	40
5.3.2	Vmesna natančnost.....	40
5.4	Robustnost	41
5.5	Zmožnost metode za sledenje stabilnosti vzorca	41
5.6	Povzetek rezultatov	42
6	SKLEP.....	43
7	LITERATURA.....	44

Kazalo slik

Slika 1: Velikost bioloških zdravil (24).....	2
Slika 2: Mehanizem celično posredovane citotoksičnosti odvisne od protiteles (25).....	4
Slika 3: Prikaz izračuna relativne biološke aktivnosti na grafu odziva napram koncentraciji (12)	5
Slika 4: International conference on harmonisation (26)	6
Slika 5: Točnost in natančnost (27)	7
Slika 6: Primer prikaza rezultatov s programom Magellan.....	22
Slika 7: Primer rezultata pridobljenega s programom PLA	23
Slika 8: Graf linearne regresije.....	31

Kazalo preglednic

Preglednica I: Uporabljena oprema	12
Preglednica II: Uporabljena programska oprema.....	13
Preglednica III: Uporabljen potrošni material	13
Preglednica IV: Uporabljene kemikalije	14
Preglednica V: Shema mikrotitrne ploščice	19
Preglednica VI: Rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti za vrednotenje specifičnosti.....	29
Preglednica VII: Rezultati zahtev parametrov za vrednotenje specifičnosti.....	29
Preglednica VIII: Rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti za vrednotenje linearnosti, delovnega območja in točnosti	30
Preglednica IX: Z Excelom pridobljeni rezultati zahtevanih parametrov za vrednotenje linearnosti (zaokroženi na 4 signifikantna mesta)	31
Preglednica X: Rezultati zahtev parametrov za vrednotenje delovnega območja.....	32
Preglednica XI: Rezultati zahtev parametrov za vrednotenje točnosti.....	32
Preglednica XII: Rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti za vrednotenje ponovljivosti za DS in DP	33
Preglednica XIII: Rezultati zahtev parametrov za vrednotenje ponovljivosti za DS	33
Preglednica XIV: Rezultati zahtev parametrov za vrednotenje ponovljivosti za DP.....	34

Preglednica XV: Rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti za vrednotenje vmesne natančnosti.....	34
Preglednica XVI: Rezultati zahtev parametrov za vrednotenje vmesne natančnosti	35
Preglednica XVII: Rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti za vrednotenje robustnosti	35
Preglednica XVIII: Rezultati zahtev parametrov za vrednotenje robustnosti	36
Preglednica XIX: Rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti (pred in po upoštevanju faktorja centriranja) vzorca, ki je bil izpostavljen stresnim pogojem	36
Preglednica XX: Rezultati geometrične sredine relativnih bioloških aktivnosti, geometričnega relativnega standardnega odklona in relativnega 95 % intervala zaupanja pri analizi vzorca, ki je bil izpostavljen stresnim pogojem.....	37
Preglednica XXI: Izpolnjenost zahtev vseh parametrov, ki smo jih vrednotili med validacijo	38

POVZETEK

Uporaba analitskih metod v farmacevtski industriji omogoča sledenje različnih parametrov, ki so kazalniki uspešnosti in ustreznosti proizvodnega procesa. Pri izvajanju metod v laboratoriju sledimo predpisanim analitskim postopkom. Zelo pomembno je, da so vse metode validirane, pred izvajanjem rednega analitičnega dela za sproščanje. Validacijo je treba opraviti zato, da se dokaže ustreznost metode za njen namen in zmožnost pridobivanja zanesljivih in ponovljivih rezultatov, s katerimi potrdimo varnost, učinkovitost in kakovost proizvedenih zdravil. S tem namenom so regulatorni organi izdali smernice, v katerih so opisani parametri, ki jih je pri validaciji priporočeno ovrednotiti. Smernice Mednarodne konference o harmonizaciji podaja usklajen pristop regulatornih organov Evrope, Japonske in Združenih držav Amerike.

V okviru magistrske naloge smo obravnavali validacijo metode merjenja biološke aktivnosti modelnega biološkega zdravila, ki spada med protitelesa. Predhodno je bilo ugotovljeno, da je za določanje biološke aktivnosti tega protitelesa najbolj reprezentativna metoda celično posredovane celične citotoksičnosti. Pri tej metodi merimo količino sproščenega barvila, ki se sprosti iz tarčnih celic, ko se nanje posredno, s pomočjo monoklonskih protiteles vežejo efektorske celice in povzročijo apoptozo. Predpisali smo si naslednje validacijske parametre, ki smo jih glede na namen metode oblikovali skladno s priporočil smernic. To so specifičnost, linearnost, delovno območje, točnost, natančnost (ponovljivost in vmesna natančnost), robustnost in zmožnost metode za sledenje stabilnosti vzorca.

Na podlagi rezultatov zaključujemo, da je metoda specifična, saj vplivov matriksa nismo zaznali; linearna (točna in ponovljiva) v območju 50–200 % relativne biološke aktivnosti in robustna. V vseh primerih smo dobili rezultate, kjer je bila točnost znotraj 8-odstotnega odstopanja od pričakovane vrednosti, variabilnost pa tudi največ 8 %. Izbrana metoda izpolnjuje vse zahteve pri vrednotenih parametrih ter je tako ustrezna za pridobivanje zanesljivih rezultatov. V prihodnosti se bo pri vsakdanjem delu uporabljala za merjenje biološke aktivnosti modelnega biološkega zdravila.

Ključne besede: Biološka zdravila, monoklonsko protitelo, celično posredovana citotoksičnost odvisna od protiteles, biološki test, biološka aktivnost, validacija.

ABSTRACT

Use of analytical methods in pharmaceutical industry enables monitoring of different parameters that indicate successful and suitable production process. When using a method in a laboratory, prescribed analytical procedures need to be followed. It is very important that the methods are validated before using them for routine use, e.g. release testing. Validation has to be performed in order to prove the suitability of the method for its intended purpose and the capability of producing reliable and reproducible results which confirm safety, effectiveness and quality of the produced medicines. For this purpose, the regulatory authorities issued several guidelines describing the parameters, to be evaluated during validation. The International conference on harmonization guidelines provide a coordinated approach by regulatory authorities from Europe, Japan and the United States of America.

In this master's thesis method validation for biological activity measurement of a model antibody biologics is discussed. It had been determined that the most important mode of action, and consequently the release method for measuring biological activity of this specific antibody was antibody dependent cell mediated cytotoxicity. Using this method, we measure the quantity of released dye from target cells after effector cells kill them with the help of monoclonal antibodies. According to the guidelines, the following validation parameters were defined based on the intended purpose of the method: specificity, linearity, range, accuracy, precision (repeatability, intermediate precision), robustness and stability indicating properties.

Based on the results it can be concluded, that the selected method is specific, as no matrix interferences were detected; linear (accurate and precise) within the 50–200 % range of the relative biological activity, and robust. In all tests the accuracy of the results was within 8 % of the expected value with variability of 8 % or less. The method met all the requirements during the validation and is therefore suitable for its intended use. In the future the method will be used routinely for determining biological activity of a model antibody biologics.

Keywords: Biopharmaceuticals, monoclonal antibody, antibody dependent cell cytotoxicity, bioassay, biological activity, validation.

SEZNAM OKRAJŠAV

ADCC	celično posredovana citotoksičnost odvisna od protiteles (<i>ang. Antibody dependent cell mediated cytotoxicity</i>)
BSA	goveji serumski albumin (<i>ang. Bovine Serum albumin</i>)
CDC	od komplementa odvisna citotoksičnost (<i>ang. Complement dependent cytotoxicity</i>)
DMSO	dimetil sulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DP	farmacevtska oblika (<i>ang. drug product</i>)
DS	zdravilna učinkovina (<i>ang. drug substance</i>)
EMA	Evropska agencija za zdravila (<i>ang. European Medicines Agency</i>)
Fab	regija protitelesa za vezavo antigena (<i>ang. fragment, antigen binding</i>)
FBS	fetusni serum goveda (<i>ang. Fetal Bovine Serum</i>)
Fc	regija protitelesa za vezavo na druge elemente (<i>ang. fragment, crystallizable</i>)
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (<i>ang. Food and Drug Administration</i>)
HAMA	človeška protitelesa proti vnesenim mišjim protitelesom (<i>ang. Human anti-mouse antibody</i>)
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan sulfonska kislina
ICH	The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IFN-γ	interferon gama
IL-2	interlevkin 2
IL-10	interlevkin 10
NK celice	naravne celice ubijalke (<i>ang. Natural killer cell</i>)
PBS	fosfatni pufer s soljo (<i>ang. Phosphate buffered saline</i>)
PLA	Parallel Line Assay
PMDA	Japonska agencija za zdravila in medicinske pripomočke (<i>ang. The Pharmaceuticals and Medical Devices Agency</i>)
ZDA	Združene države Amerike (<i>ang. USA, United States of America</i>)

1 UVOD

1.1 Biološka in podobna biološka zdravila

V preteklosti so kot biološka zdravila smatrali različna zdravila pripravljena s klasično farmacevtsko biotehnologijo (antibiotiki, steroidi) in zdravila, ki so bila pridobljena z izolacijo iz živega organizma bodisi živali, človeka ali rastline. To so tako imenovana tradicionalna biološka zdravila. Danes pa, ko govorimo o bioloških zdravilih, mislimo predvsem na sodobna zdravila, ki so pridobljena z različnimi tehnikami moderne biotehnologije ter se uporabljajo v namene terapije ali diagnostike. To so različne makromolekule, v glavnem proteini in nukleinske kisline, ki jih lahko v grobem razdelimo v pet večjih razredov:

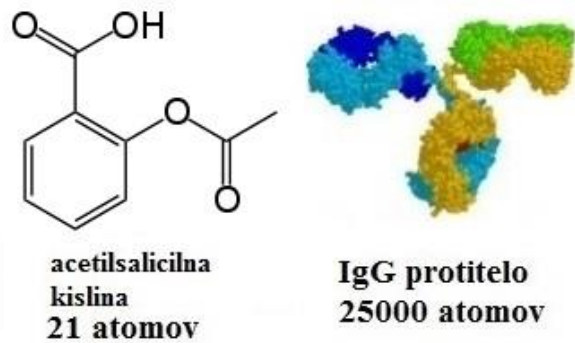
1. Biološka zdravila pridobljena z izolacijo
2. Biološka zdravila pridobljena s sintezo
3. Genske učinkovine
4. Monoklonska protitelesa
5. Rekombinantna biološka zdravila

Zadnja skupina predstavlja največji delež sodobnih bioloških zdravil.

V drugi polovici dvajsetega stoletja se je pričela eksponentna rast razvoja biotehnologije in ostalih ved. Razvile so se številne tehnike, ki so postavile temelje znanosti, kot jo poznamo danes in omogočile podrobnejše spoznavanje različnih bioloških makromolekul. Poznavanje strukture, sinteze in nenazadnje tudi načina izolacije bioloških molekul, predvsem proteinov in DNK, je vodilo v hiter razvoj genskega inženiringa in z njim do novih odkritij. Za biološka zdravila je imela velik pomen tehnologija rekombinantne DNK, ki je še danes aktualna in se še vedno razvija. Leta 1982 je v Združenih državah Amerike (ZDA) agencija za hrano in zdravila (FDA) izdala dovoljenje za uporabo prvega biološkega zdravila, rekombinantnega inzulina, razvitega s pomočjo tehnologije rekombinantne DNK. Kasneje so sledile še priprave drugih rekombinantnih zdravil. Danes pa se razvijajo že tako imenovana biološka zdravila druge in tretje generacije, ki imajo izboljšane farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti (1, 2).

Glavna razlika med biološkimi in klasičnimi zdravilnimi učinkovinami je kompleksnost. Klasične zdravilne učinkovine so manjše enostavnejše molekule, medtem ko so biološke zdravilne učinkovine velike zapletene molekule, kar omogoča bolj specifično in tarčno delovanje (Slika 1).

Zaradi svojega izvora in strukture pa imajo lahko tudi nekatere neželene oziroma stranske učinke. Ker so to predvsem kompleksni proteini, ki imajo lahko dodane sladkorne enote, se nativna oblika lahko spremeni in možen je neželen imunski odziv pri vnosu v telo. Zato je treba dobro poznati njihovo strukturo in obvladati ter nadzirati vse



Slika 1: Velikost bioloških zdravil (24)

stopnje procesa proizvodnje zdravila. Posledično je proizvodnja dolgotrajna in zelo zapletena, poleg tega pa je treba pred sprostitvijo v uporabo opraviti zelo veliko raziskav, s katerimi moramo dokazati učinkovitost, kakovost in varnost zdravila. Take raziskave prav tako zahtevajo veliko časa in sredstev (1, 3).

Zaradi zapletenosti zgradbe bioloških zdravil, je zelo malo možnosti, skoraj nemogoče, da bi se večkrat proizvedla učinkovina z isto strukturo oziroma nativno konformacijo proteina. Tako so se razvila podobna biološka zdravila, ki so po učinkovitosti, kakovosti in varnosti primerljiva z referenčnim zdravilom. Za sprostitvev na trg in pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom, je treba tudi za podobna biološka zdravila uspešno opraviti predklinične in klinične študije, ki jih v Evropi predpisuje Evropska agencija za zdravila (EMA), v ZDA pa FDA. Te študije so nekoliko drugačne in manj obsežne od tistih, ki jih mora pred sprostitvijo na trg prestatati inovativno zdravilo in njihov glavni namen je dokazati primerljivost v učinkovitosti, kakovosti in varnosti med podobnim in inovativnim biološkim zdravilom. Glavna prednost podobnih bioloških zdravil je njihova cena, ki je znatno nižja od cene inovativnega zdravila in zato so taka zdravila dostopna večjemu številu ljudi (1, 4, 5).

1.2 Monoklonska protitelesa

Monoklonska protitelesa so protitelesa, ki jih izdelava en sam klon limfocitov B. Specifična so za en antigen, največkrat celo eno samo prijemališče – epitop antigena, in to je tudi njihova glavna prednost. Zaradi svoje specifičnosti in ker jih je možno pridobivati *in vitro* v neomejenih količinah, se veliko uporabljajo v diagnostiki in terapiji različnih bolezni. Leta 1975 sta Köhler in Milstein razvila metodo za pridobivanje monoklonskih protiteles. Uspela sta razviti nesmrtno linije celic, hibridome, s katerimi je mogoče pridobiti velike količine monoklonskih protiteles. Hibridomi nastanejo z zlitjem nesmrtno rakave celice in limfocitov B, ki proizvajajo protitelesa. Tako so nastala prva *in vitro* pripravljena protitelesa,

ki so bila mišjega izvora. Leta 1986 je bilo odobreno prvo tako zdravilo za terapevtsko uporabo v ZDA in Evropi, Orthoclone OKT 3 (1, 6, 7).

Pri kliničnih preizkušanjih prvih mišjih monoklonskih protiteles na človeku je bila ugotovljena zmanjšana biološka aktivnost. Do tega pride zaradi nepopolne kompatibilnosti med mišjimi protitelesi in deli človeškega imunskega sistema kot so komplement in obrambne naravne celice ubijalke (NK celice). V najslabšem primeru lahko začne človeški imunski sistem proizvajati protitelesa HAMA (*ang. human anti – mouse antibody*). To so človeška protitelesa proti vnesenim mišjim protitelesom. Te težave je rešil razvoj monoklonskih protiteles pripravljenih s tehnologijo rekombinantne DNK. Tako so nastala himerna, humanizirana in človeška protitelesa. Taka protitelesa imajo dokazano manjšo imunogenost pri vnosu v človeško protitelo. Področja mišjih protiteles s pomočjo genskega inženiringa zamenjamo s človeškimi in tako zmanjšamo imunogenost. Himerna monoklonska protitelesa imajo tako 60–70 % človeške aminokislinske sestave, humanizirana monoklonska protitelesa pa kar 90–95 %.

Monoklonska protitelesa lahko delujejo na različne načine, med katerimi je eden glavnih načinov aktiviranja telesu lastnih imunskih mehanizmov. Sem uvrščamo s komplementom posredovano citotoksičnost (CDC; *ang. complement dependent cytotoxicity*) in s protitelesi posredovano celično citotoksičnost (ADCC; *ang. antibody dependent cell cytotoxicity*) (1, 7, 8).

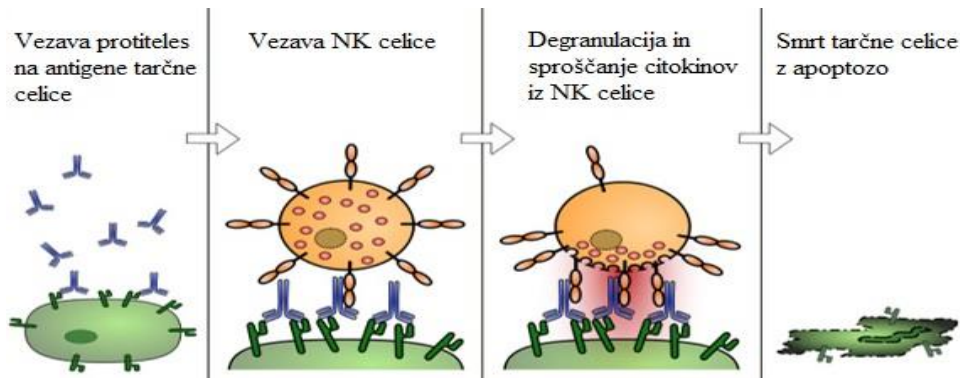
1.2.1 Od komplementa odvisna citotoksičnost (CDC)

Od komplementa odvisna citotoksičnost je glavni obrambni imunski sistem pri ljudeh in živalih. Ko se komplement aktivira s pomočjo monoklonskih protiteles, govorimo o klasični poti aktivacije komplementa. Protitelesa se s svojimi variabilnimi regijami (Fab) vežejo na antigenske determinante tarčne celice. Pri tem se del konstantne regije (Fc) protiteles konformacijsko spremeni in omogoči vezavo prve sestavne molekule komplementnega sistema (C1). Po kaskadi številnih reakcij, v katere so vključene številne komponente komplementa, pride do nastanka končnega litičnega kompleksa. Slednji povzroči nastanek luknje v celični membrani tarčne celice in v končni fazi celično smrt (6, 9).

1.2.2 Celično posredovana citotoksičnost odvisna od protiteles (ADCC)

Monoklonska protitelesa lahko izzovejo citotoksičnost različnih celic. Začne se tako, da se protitelesa s svojimi variabilnimi regijami (Fab) vežejo na tarčno celico in jo tako prekrijejo. Na konstantne regije (Fc) protiteles pa se lahko s svojimi receptorji vežejo efektorske celice. Klasična celično posredovana citotoksičnost odvisna od protiteles vključuje aktivacijo

naravnih celic ubijalk (NK celice). Po vezavi NK celice se ta aktivira in prične izdelovati ter izločati različne citokine (npr. IFN- γ), prav tako pa se izločijo snovi iz njenih citotoksičnih granul. Izločene snovi povzročijo lizo oziroma smrt tarčne celice z apoptozo (Slika 2). Kot efektorske celice lahko služijo tudi makrofagi, nevtrofilci ali eozinofilci. Liza tarčnih celic je odvisna od koncentracije efektorskih celic in monoklonskih protiteles (6, 10).



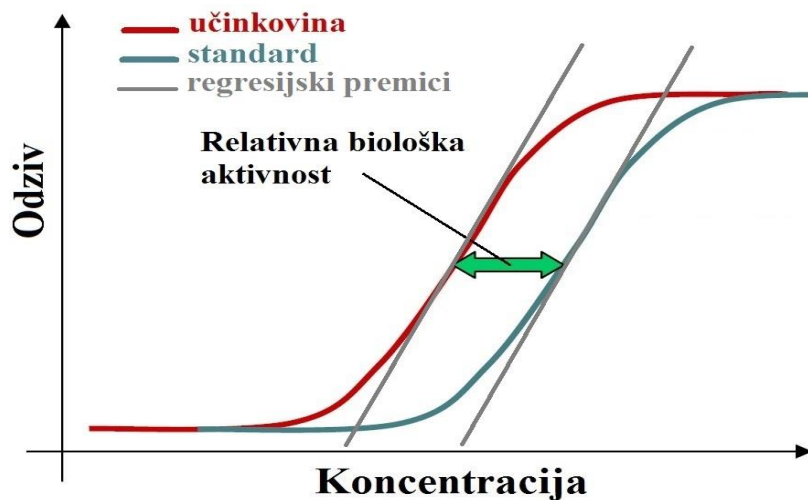
Slika 2: Mehanizem celično posredovane citotoksičnosti odvisne od protiteles (25)

1.3 Biološki testi

Biološki testi so specifični testi, s katerimi skušamo določiti delovanje učinkovine oziroma njeno biološko aktivnost. Kljub napredkom pri fizikalno-kemijski karakterizaciji snovi so biološki testi še vedno ključni za določanje aktivnosti različnih proteinov, cepiv, kompleksnih mešanic in produktov za gensko terapijo, uporabljajo pa se tudi za določanje stabilnosti bioloških produktov. Biološka aktivnost je zmožnost učinkovine, da doseže biološki efekt na organizem. Odvisna je od same učinkovine in njene koncentracije. To odvisnost je treba pri bioloških testih poznati oziroma ugotoviti. Merjenje biološke aktivnosti temelji na primerjavi odzivov preiskovanega vzorca in odzivov t.i. referenčnega standarda z znano, oz. točno določeno biološko aktivnostjo in koncentracijo. Glavni pogoj je torej primerljivost oziroma podobnost vzorca in standarda. Biološka aktivnost učinkovine, ki jo skušamo ugotoviti, je tako relativen parameter, običajno izražen v odstotkih (%). V primerih, ko ima standard predpisane enote na količino, izrazimo biološko aktivnost v teh enotah. Taki testi običajno temeljijo na pripravi zaporednih redčin učinkovine ter standarda in merjenju ter primerjanju odziva glede na koncentracijo (11).

Obstaja več statističnih modelov, ki se lahko uporabijo za izračun biološke aktivnosti iz meritev odzivov. Glede na naravo biološkega testa in tipa podatkov, ki jih z njim dobimo, se odločimo za najustreznejši statistični model. Lahko primerjamo naklona (t.i. »slope – ratio« modeli), enega izmed logističnih modelov (štiri- oz. petparametrični, t.i. 4 – PL oz. 5 – PL),

ali model analize paralelnih linij, ki je najpogosteje uporabljen. Najprej pripravimo graf, na katerega naneseemo odzive v odvisnosti od koncentracije, ki so običajno sigmoidne krivulje. Z modelom analize paralelnih linij lahko izračunamo relativno biološko aktivnost na osnovi odmika dveh vzporednih premic (Slika 3). Zato je treba najprej določiti linearni del krivulje za določitev premice, ki se bo najboljše prilegala rezultatom. To naredimo s pomočjo linearne regresije (opisana v nadaljevanju, pri linearnosti). Standard ima določeno biološko aktivnost, s pomočjo katere lahko preračunamo relativno biološko aktivnost vzorca na podlagi razdalje med premicama (12).



Slika 3: Prikaz izračuna relativne biološke aktivnosti na grafu odziva napram koncentraciji (12)

Poleg relativne biološke aktivnosti vedno ocenimo tudi natančnost določitev. Merilo za natančnost je interval zaupanja relativne biološke aktivnosti. To je interval, v katerem se z določeno gotovostjo nahaja preiskovani parameter. Običajno se uporablja 95-odstotni interval zaupanja, kar pomeni, da bo preiskovani parameter (v našem primeru relativna biološka aktivnost) v 95 % analiz v res tem intervalu.

V številnih primerih se zgodi, da rezultati niso normalno porazdeljeni. Zaradi nesimetrične porazdelitve rezultatov ne moremo direktno izračunati aritmetične sredine in intervala zaupanja. V takih primerih je ustaljen pristop logaritmiranje vrednosti, s katero pridobimo simetrično normalno porazdelitev. Iz tako spremenjenih vrednosti lahko nato izračunamo geometrično sredino in geometrični interval zaupanja (13).

1.4 Validacija metod

Validacija metode je osnovna zahteva za uporabo metode v analitične namene, ker z njo potrdimo oziroma zagotovimo točnost in zanesljivost pridobljenih rezultatov. Da so rezultati točni in zanesljivi, je ključnega pomena



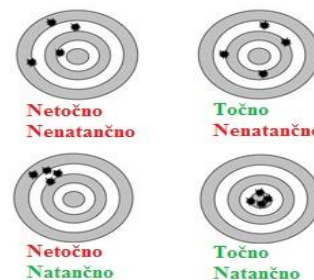
Slika 4: International conference on harmonisation (26)

pri dokazovanju kakovosti, varnosti in učinkovitosti zdravila. V ta namen so se leta 1990 na Mednarodni konferenci o harmonizaciji (ICH; *ang. International conference on harmonisation*) prvič sestali regulatorni organi Evrope, ZDA in Japonske (Slika 4). Cilj konference je bila harmonizacija oziroma zmanjševanje razlik v pristopu k validaciji metod in določitev osnovnih zahtev validacije. Tako so kasneje nastale smernice ICH, ki lahko služijo kot osnova, po kateri bo potekala validacija metode. Smernice, kot že samo ime nakazuje, ne zahtevajo vrednotenja vseh parametrov pri validaciji metode, ampak samo priporočajo in usmerjajo katere parametre je smiselno tekom validacije vrednotiti. Z upoštevanjem priporočil se lahko izognemo številnim nevšečnostim, še posebej ko je treba predložiti zahtevane podatke pri različnih inšpekcijah. Ker obstajajo različne vrste metod, so smernice napisane splošno, za najpogosteje uporabljene tipe metod in priporočajo vrednotenje tipičnih validacijskih parametrov. Te metode lahko v grobem razdelimo na identifikacijske, metode za kvantitativno ter limitno določanje nečistoč in metode za določanje aktivnosti ali vsebnosti učinkovine. Pri različnih metodah je torej treba pripraviti specifične validacijske protokole in vrednotiti parametre, ki so za določeno metodo smiselni, glede na njen namen. Pri identifikacijskih metodah nas zanima samo točno določena učinkovina in je zato treba vrednotiti le parameter specifičnosti. Če želimo kvantitativno določiti nečistote, moramo vrednotiti vse parametre, ki so opisani v nadaljevanju, razen meje detekcije. Pri limitni določitvi nečistot vrednotimo samo parametra specifičnosti in meje detekcije. Pri metodah za določanje aktivnosti oz. vsebnosti učinkovine pa se vrednotijo vsi parametri razen meje detekcije in meje kvantifikacije (15).

Smernica Q2(R1) (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology) priporoča vrednotenje naslednjih parametrov:

- specifičnost – zmožnost metode, da kljub prisotnosti ostalih komponent (npr. nečistoč) nedvoumno določi učinkovino, ki jo preučujemo (17, 18),
- linearnost – zmožnost metode, da nam daje rezultate, ki so v določenem območju linearno odvisni od koncentracije učinkovine v vzorcu (17),

- delovno območje metode – interval med vključno spodnjo in zgornjo koncentracijo učinkovine v vzorcu, kjer je dokazana ustrezna natančnost, točnost in linearnost metode (17, 18),
- točnost (Slika 5) – vrednoti ujemanje izmerjene vrednosti glede na pravo oziroma sprejeto vrednost (17, 18),
- natančnost (Slika 5) – prikazuje skladnost rezultatov pri večkratnih meritvah iste učinkovine pod istimi pogoji.



Natančnost lahko vrednotimo v treh stopnjah (17):

- ponovljivost – vrednoti natančnost rezultatov pri istih pogojih (isti analitik, iste merilne aparature...) znotraj istega laboratorija v kratkem časovnem obdobju (16),
 - vmesna natančnost – vrednoti natančnost rezultatov znotraj istega laboratorija, toda v daljšem časovnem obdobju, z različno uporabljeno opremo in različnimi analitiki (16),
 - reproducibilnost (obnovljivost) – vrednoti natančnost rezultatov, pridobljenih iz različnih laboratorijev (16),
- Slika 5: Točnost in natančnost (27)**
- meja detekcije – najnižja koncentracija učinkovine, ki jo lahko z metodo zaznamo, ne pa nujno tudi določimo (17, 18),
 - meja kvantifikacije – najnižja koncentracija učinkovine, ki jo lahko določimo z ustrežno točnostjo in natančnostjo (17, 18),
 - robustnost – zmožnost metode, da nanjo ne vplivajo že majhne namerne spremembe v različnih parametrih (17).

Obseg validacije je odvisen tudi od stopnje, v kateri se določen projekt nahaja – npr. za potrebe sproščanja za klinične študje je potreben obseg validacije manjši, to se ponavadi imenuje začetna validacija. Za potrebe sproščanja za trg pa je potrebna polna validacija, ki obsega potrditev vseh parametrov glede na namen metode.

Glede na status projekta, metode in izkušnosti laboratorija obstajajo različni pristopi k validacij. Če želimo v laboratorij uvesti in izvajati popolnoma novo metodo, ki se prej še ni izvajala, je nujno treba najprej opraviti polno validacijo, ki je najbolj obsežna. Za klinične faze zadošča manjši obseg, tako imenovana zgodnja validacija, kjer ponavadi validiramo le učinkovino, rezultate pa ekstrapoliramo na končni izdelek in morebitne vmesne procesne kontrolne vzorce. Naslednja je delna validacija, ki je manj obsežna od polne in se izvaja pri različnih spremembah znotraj metod, na primer pri spremembah analitičnega postopka,

matriksa, pri spremembah na opremi ali programih in tudi pri prenosu metod med laboratoriji ali analitiki. Zadnji tip je še navzkrižna validacija (cross-validation), kjer gre za primerjavo dveh metod. Primer je primerjava neke metode glede na drugo metodo, ki je že bila validirana (18).

Namen magistrske naloge je opraviti polno validacijo *in vitro* biološkega testa za merjenje biološke aktivnosti. Zato so v nadaljevanju opisani samo parametri, ki jih je smiselno vrednotiti za tak tip metode.

1.4.1 Specifičnost

Za dokazovanje specifičnosti bioloških testov smernice priporočajo, da se vzorcem, za katere vemo, da vsebujejo želeno učinkovino, doda še druge komponente oziroma nečistote in nato dokaže, da dodane komponente ne vplivajo na rezultat. Rezultate se primerja z rezultati vzorcev, ki jim nismo dodali drugih komponent. Metoda je torej specifična, če lahko z njo določimo samo eno, točno določeno učinkovino. Izraz specifičnosti se pogosto zamenjuje z izrazom selektivnosti. Metoda je selektivna, če lahko z njo določimo več različnih učinkovin in jih med seboj tudi razlikujemo. Specifičnost je torej najvišja stopnja selektivnosti (16, 19).

1.4.2 Linearnost

Pri dokazovanju linearnosti rezultatov v odvisnosti od koncentracije smernice priporočajo uporabo ustreznih statističnih metod. Priporočena je uporaba linearne regresije in priprava regresijske premice z uporabo rezultatov pri vsaj petih različnih koncentracijah vzorca in standarda. S pomočjo regresijske analize skušamo opisati odvisnost med rezultati dveh spremenljivk. Določiti želimo linearno premico skozi dobljene rezultate, ki bi se rezultatom čimbolj prilegala. Za ugotavljanje prileganja premice uporabimo metodo najmanjših kvadratov. Določiti moramo deviacijo oziroma razdaljo vsakega rezultata od premice. Dobljene razdalje nato kvadriramo in seštejemo. Vsota teh vrednosti nam pove, kako dobro se premica prilega rezultatom. Manjša kot je vsota, boljše je prileganje. Pri dokazovanju linearnosti moramo rezultate v nekaterih primerih, ko ti niso normalno porazdeljeni, predhodno matematično preračunati (logaritmiranje vrednosti).

Za oceno linearne zveze med spremenljivkama se vrednotijo naslednji parametri regresijske premice, ki ima enačbo $y = a x + b$: Določiti je treba korelacijski koeficient, ki nam pove prileganje premice rezultatom in je lahko med 0 in 1. Če je 0, pomeni, da se premica ne prilega, če je 1, pa pomeni 100 % prileganje. Določata pa se tudi odsek premice na y osi (v enačbi b) in naklon premice (v enačbi a). Pri odseku premice na y osi moramo dokazati, da se

ta statistično ne razlikuje od 0, pri naklonu premice pa, da se ne statistično razlikuje od 1. To dokažemo s t-testom, pri katerem postavimo dve komplementarni hipotezi in statistično dokažemo, katera od njiju velja. Določimo ničelno hipotezo, ki predvideva enakost (npr. da je naklon enak 1). Izbrati moramo stopnjo tveganja α , ki je odvisna od intervala zaupanja in določa tveganje, da bomo zavrnili ničelno hipotezo, čeprav ta velja. Glede na število neodvisnih preučevanih vrednosti (n) in število preučevanih parametrov določimo prostostne stopnje (npr. pri dveh preučevanih parametrih je to $n-2$). S pomočjo α in prostostnih stopenj določimo tabelarično vrednost testne statistike. Nato iz podatkov izračunamo eksperimentalno vrednost testne statistike. Preostane še primerjava testne statistike glede na tabelarično statistiko in sklepanje o veljavnosti ničelne ali alternativne hipoteze (13, 14, 16).

1.4.3 Delovno območje

Delovno območje metode se običajno določi po študijah linearnosti in je odvisno predvsem od tega, za kakšen namen se bo izvajala metoda. Določi se tako, da se zagotovi linearnost, točnost in natančnost rezultatov pri merjenju aktivnosti različnih koncentracij učinkovine. Analizirajo se tako mejne vrednosti kot tudi vrednosti znotraj delovnega območja (16).

1.4.4 Točnost

Priporočljivo je dokazati točnost metode skozi celotno delovno območje. Točnost se lahko po ICH smernici Q2(R1) določi na več načinov. Lahko analiziramo vzorec z znano koncentracijo učinkovine (standard) ali pa neznan vzorec, ki smo mu dodali znano količino učinkovine in nato izračunamo izkoristke. Točnost lahko potrdimo tudi tako, da dokažemo natančnost, linearnost in specifičnost metode, ali pa izvedemo primerjavo rezultatov izbrane metode z rezultati druge metode, ki ima že določeno točnost (16).

1.4.5 Natančnost

Natančnost se pogosto dokazuje tako, da se vrednoti ponovljivost in vmesno natančnost.

Ponovljivost

Smernice priporočajo vrednotenje ponovljivosti z vsaj tremi določitvami pri treh različnih koncentracijah znotraj delovnega območja metode ali pa s šestimi določitvami pri 100 % pričakovane koncentracije učinkovine (16).

Vmesna natančnost

Pri vrednotenju vmesne natančnosti moramo preveriti, kako različne naključne spremembe, do katerih bo v rutini prihajalo, v metodi vplivajo na natančnost rezultatov. Sami si lahko

določimo oziroma naredimo načrt, katere spremembe bomo uvedli pri testiranju natančnosti metode v daljšem obdobju. Tipične spremembe, ki jih lahko uvedemo znotraj laboratorija za dokaz natančnosti metode, so: različni dnevi analize, različna oprema, različni analitiki, itd. Lahko se uvede in preverja tudi več sprememb hkrati (16).

1.4.6 Robustnost

Evalvacija robustnosti metode se izvaja že med razvojem in je odvisna od tipa metode. Dokazati je treba, da metoda daje zanesljive rezultate kljub manjšim namernim spremembam nekaterih parametrov (npr. temperatura in čas inkubacije) (16).

1.4.7 Zmožnost metode za sledenje stabilnosti vzorca

Med validacijo metode se lahko vrednoti in testira tudi različne stresne vzorce z namenom potrditve sposobnosti metode, da zazna spremembe pri neugodnih razmerah, ki lahko nastanejo med proizvodnjo, skladiščenjem in transportom. Stresni vzorci so običajno podvrženi višjim temperaturam, ki denaturirajo proteine. Taki vzorci imajo zato pogosto znižano biološko aktivnost, ki jo moramo biti sposobni dokazati z metodo. Če je biološka aktivnost močno znižana, lahko dobimo neustrezne kriterije sprejemljivosti vzorca. To se običajno ugotovi že v predvalidacijskih testiranjih ter upošteva pri analiziranju vzorcev med validacijo (20).

1.4.8 Testi ustreznosti sistema

Testi, ki kažejo na ustreznost izvedbe metode, so zelo pomemben del vsake metode. Določi se jih glede na metodo, ki jo bomo uporabljali, v pomoč so lahko smernice v farmakopeji. Ob ustreznem rezultatu teh testov lahko trdimo, da vsa uporabljena oprema (inštrumenti), elektronika (programi za krmiljenje analize in/ali vrednotenje rezultatov), analitični postopki (priprava in rokovanje) in vzorci, dajo zanesljive rezultate (16).

1.4.9 Predvalidacijski testi

Validacija metode je običajno zahteven in drag postopek, ki traja veliko časa. Da se izognemo morebitnim nevšečnostim, na katere bi lahko naleteli med validacijo, je smiselno opraviti predvalidacijska testiranja. V predvalidacijski fazi se z metodo spoznamo in dobimo prve informacije o njeni performanci ter zmožnosti pridobivanja zanesljivih rezultatov. Opravimo lahko poskusna vrednotenja različnih parametrov (npr. robustnosti, delovnega območja, ipd.) in poskusne meritve različnih vzorcev, za katere mislimo, da rezultati ne bi ustrezali kriterijem sprejemljivosti vzorcev (npr. stresni vzorci) (21).

2 NAMEN DELA

Namen dela je oblikovati načrt in izvesti validacijo metode, s čimer bomo zagotovili ustreznost metode, s katero bomo v nadaljnje pridobivali rezultate o biološki aktivnosti proučevane učinkovine. Ko govorimo o ustreznosti rezultatov, mislimo predvsem na vrednotenje različnih parametrov, s pomočjo katerih lahko trdimo oziroma dokažemo, da je metoda, ki jo uporabljamo, ustrezna v pomenu, da nam daje rezultate, na katere se lahko zanesemo. To, da so rezultati zanesljivi, pomeni, da so točni in natančni. Če metoda ne daje ustreznih rezultatov, lahko pride do resnih posledic, kjer je ogrožena lahko naša primarna skrb oziroma zahteva, to je dobrobit bolnika. Da do tega ne pride, je treba torej vsako metodo pred uporabo validirati in dokazati njeno ustreznost.

Najprej bomo pripravili validacijski protokol s pomočjo priporočil smernic ICH. Smernice so napisane splošno, za širok spekter metod. Ker so biološki testi specifični *in vitro* testi, je naš validacijski protokol oblikovan tako, da vključuje vrednotenje parametrov, ki so smiselni za tak tip metode. Uporabili bomo biološki test, ki temelji na principu ADCC, pri katerem se efektorske celice s pomočjo monoklonskih protiteles vežejo na označene tarčne celice in nanje delujejo citotoksično. Določali bomo biološko aktivnost učinkovine in ugotavljali, ali so parametri validacijskega protokola izpolnjeni.

S pomočjo čitalnika mikrotitrnih plošč bomo pridobili odzive oziroma tako imenovane surove podatke. Te bomo uvozili v program PLA, s pomočjo katerega podatke statistično obdelamo in pridobimo zelene rezultate o relativni biološki aktivnosti vzorcev. Za vrednotenje različnih parametrov bomo morali opraviti več meritev različnih vzorcev. Po opravljenih meritvah bomo za vsak vrednoteni parameter posebej s pomočjo Excela preračunali zahteve in ugotovili, ali jih metoda izpolnjuje. Glede na pridobljene rezultate bomo sklepali ali je metoda ustrezna za določanje biološke aktivnosti učinkovine ali ne.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Oprema

Uporabljena oprema je navedena v Preglednici I. Navedeni so tudi proizvajalci opreme in uporabljen model.

Preglednica I: Uporabljena oprema

Oprema	Proizvajalec	Model
mikrobiološka komora	Iskra PIO	MC 15-2
inkubator	Binder	CB 150
hladilnik	Loška hladilna tehnika	Po meri narejena hladna soba
zamrzovalnik	Panasonic	MDF-U731M MDF-U443-PE
ultrazamrzovalnik	Panasonic	MDF-U76V-PE
centrifuga	Eppendorf	5810 R
mikrocentrifuga	VWR	Ministar Silverline
mikroskop	Olympus	IX53P1F inverted
čitalnik mikrotitrnih plošč	TECAN	Infinite F200 PRO
pipete	Eppendorf in Sartorius	Elektronske in mehanske, enokanalne ter multikanalne
pipetor	TPP	Mehanski
dispensor	Eppendorf	Mehanski
vodna kopel	Julabo	TW12
vorteks	Scientific Industries	Vortex genie 2
vakuumska črpalka	Millipore	/
hemocitometer	Brand	/

3.1.2 Programska oprema

Uporabljena programska oprema je navedena v Preglednici II.

Preglednica II: Uporabljena programska oprema

Programska oprema	Proizvajalec
Excel	Microsoft
Magellan v7.2	Tecan
PLA 2.1	Stegmann Systems

3.1.3 Potrošni material

Uporabljen potrošni material je naveden v Preglednici III. Navedeni so tudi proizvajalci in kataloške številke.

Preglednica III: Uporabljen potrošni material

Potrošni material	Proizvajalec	Kataloška številka
mikrotitrne ploščice	Greiner bio-one (Cell Star)	650160
	Corning Costar	3603
pokrovčki za mikrotitrne plošče	Greiner bio-one (Cell Star)	656161
pipetni nastavki	Sartorius	790101F
		790201F
		791001F
		791211F
	Eppendorf	022491253
		022491245
		022491237
centrifugirke	Greiner bio-one (Cell Star)	188271
		227261
T-plastenke	TPP	90076 (75cm ²)
		90151 (150cm ²)
		Thermo Scientific
1,5 mL epice	Eppendorf	0030120086
1,5 mL sterilne tubice	Eppendorf	0030121589

Potrošni material	Proizvajalec	Kataloška številka
PushCup tubice s pokrovčki	Micronic	MPW32006BC3 MP53044
sterilne nuče s filtri stripete	Millipore Corning Costar	SCGPU11RE 4487 (5 mL) 4488 (10 mL) 4489 (25 mL) 4490 (50 mL) 4491 (100 mL)
kadičke	Thermo Scientific	8094 (25 mL) 8086 (100 mL)
Sterilna krpa za spiranje pipetnih nastavkov	Hartmann	2513026

3.1.4 Kemikalije

Uporabljene kemikalije so navedene v Preglednici IV. Navedeni so tudi proizvajalci in kataloške številke.

Preglednica IV: Uporabljene kemikalije

Kemikalije	Proizvajalec	Kataloška številka
osnovno rastno gojišče	GIBCO	61870
gojišče za stradanje celic	GIBCO	61870
osnovno testno gojišče	GIBCO	32404
kalcein – AM	Sigma-Aldrich	17783
DMSO	Sigma-Aldrich	D2650
FBS	GIBCO	10082-147
L-glutamin (200 mM)	GIBCO	25030
HEPES	GIBCO	15630-056
BSA	Sigma-Aldrich	A8806
PBS	GIBCO	20012
rekombinantni IL-2	Novartis, Pharma AG	Brez kataloške številke
rekombinantni IL-10	R&D Systems	217-IL
neionizirajoči detergent	Thermo Scientific	28324 (NP-40), 28314 (Triton X-100)

Kemikalije	Proizvajalec	Kataloška številka
barvilo tripansko modrilo (Trypan Blue)	GIBCO	15250061
NaOH	VWR Chemicals	191543M
	Merck	1.09137.1000
voda za injiciranje	B. Braun	3632717

3.1.5 Priprava raztopin

Pripravljeni IL-2 alikvoti (1,1 mg/mL)

Liofiliziran IL-2 raztopimo v ustrezni količini vode za injiciranje, tako da nežno mešamo, dokler se ne v celoti raztopi. Dobimo raztopino s koncentracijo 1,1 mg/mL, iz katere pripravimo alikvote (npr. po 20 µL), ki jih zamrznemo v zamrzovalniku pri < -60 °C. Rok trajanja uporabe je 1 leto po pripravi.

Fosfatni pufer s soljo (PBS), ki vsebuje 0,1 % govejega serumskega albumina (BSA)

5 mg BSA raztopimo v 5 mL PBS. Po raztapljanju raztopino sterilno filtriramo in hranimo pri 2–8 °C. Rok trajanja uporabe je 3 mesece po pripravi.

IL-10 alikvoti (100 µg/mL)

IL-10 raztopimo v PBS, ki vsebuje 0,1 % BSA tako, da dobimo končno koncentracijo 100 µg/mL (npr. 25 µg IL-10 v 0,25 mL PBS, ki vsebuje 0,1 % BSA). Raztopino nato alikvotiramo (npr. po 50 µL) in alikvote zamrznemo v zamrzovalniku pri < -60 °C. Rok trajanja uporabe je 1 leto po pripravi.

Rastno gojišče za tarčne celice

Osnovnemu rastnemu gojišču dodamo 10 % (v/v) toplotno obdelanega fetusnega seruma goveda (FBS) (npr. v 450 mL gojišča dodamo 50 mL FBS). Po sterilnem filtriranju gojišče hranimo pri 2–8 °C. Rok trajanja uporabe je 1 mesec. Pred uporabo je treba gojišče ogreti na 37 °C.

Redčenje IL-2 do 11 µg/mL za pripravo gojišča za efektorske celice

Pripravljene IL-2 alikvote s koncentracijo 1,1 mg/mL razredčimo do koncentracije 11 µg/mL. (npr. dodamo 5 µL IL-2 alikvota (1,1 mg/mL) v 495 mL osnovnega rastnega gojišča za

efektorske celice.). Redčino IL-2 je treba vedno pripraviti tik pred pripravo gojišča efektorskih celic.

Rastno gojišče za efektorske celice

Osnovnemu gojišču za rast efektorskih celic dodamo 10 % (v/v) toplotno obdelanega FBS, 15 mM 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan sulfonske kisline (HEPES pufra), 1,2 ng/mL IL-2 (200 U/mL) in 8,6 ng/mL IL-10 (npr. v 442,5 mL osnovnega gojišča za rast efektorskih celic dodamo 50 mL toplotno obdelanega FBS, 7,5 mL 1 M pufra HEPES, 55 µL sveže redčine IL-2 (11 µg/mL) in 43 µL IL-10 (100 µg/mL)). Po sterilnem filtriranju gojišče hranimo pri 2–8 °C. Rok trajanja uporabe je 14 dni. Pred uporabo je treba gojišče ogreti na sobno temperaturo.

Gojišče za stradanje efektorskih celic

Osnovnemu gojišču za stradanje celic dodamo 10 % (v/v) toplotno obdelan FBS in pufer HEPES do končne koncentracije 15 mM (npr. v 442,5 mL osnovnega gojišča za stradanje celic dodamo 50 mL toplotno obdelanega FBS in 7,5 mL 1 M pufra HEPES). Po sterilnem filtriranju gojišče hranimo pri 2–8 °C. Rok trajanja uporabe je 1 mesec. Pred uporabo je treba gojišče ogreti na sobno temperaturo.

Testno gojišče

Osnovnemu gojišču za test dodamo do 1 % (v/v) končne koncentracije raztopine L-glutamina, 10 % (v/v) toplotno obdelan FBS, 15 mM pufra HEPES in 22 ng/mL IL-2 (npr. v 437,5 mL osnovnega gojišča za test dodamo 50 mL toplotno obdelanega FBS, 5 mL L-glutamina (200 mM), 7,5 mL 1 M pufra HEPES in 10 µL sveže odtaljenega nerazredčenega IL-2 (1,1 mg/mL)) Po sterilnem filtriranju gojišče hranimo pri 2–8 °C. Rok trajanja uporabe je 1 mesec. Pred uporabo je treba gojišče ogreti na sobno temperaturo.

1 % neionizirajoči detergent

V 45 mL osnovnega gojišča za test dodamo 5 mL neionizirajočega detergenta. Hranimo pri 2–8 °C z rokom uporabe do 3 mesece.

1 mM kalcein

Raztopimo 1 mg kalceina v 1 mL DMSO. Alikvotne hranimo pri < -15 °C do 2 leti.

3.1.6 Uporabljeni standardi in vzorci

Pri validaciji metode bomo za zagotavljanje zanesljivosti rezultatov uporabljali referenčni standard, ki ima točno določeno biološko aktivnost.

Za namen vrednotenja specifičnosti bomo kot vzorec uporabili matriks, ki mu je dodan standard znane koncentracije. Za vrednotenje linearnosti, delovnega območja, točnosti in robustnosti bomo kot vzorce uporabili različne koncentracije standarda. Uporabili bomo tudi vzorce DS za vrednotenje ponovljivosti in vmesne natančnosti ter vzorce DP za vrednotenje ponovljivosti in lastnosti, ki kažejo na stabilnost vzorca.

3.2 Metode

3.2.1 Kultiviranje tarčnih celic

Tarčne celice imajo na svoji površini izražene molekule, na katere se vežejo proučevana modelna monoklonska protitelesa z variabilno regijo. Prek regije Fc pa omogočijo posredno vezavo efektorskih celic (glej tudi poglavje 1.2.2). Tarčne celice gojimo v 20 mL kulturah v plastenkah T-75 cm². Kulture vzdržujemo v navlaženih inkubatorjih pri 37 °C in 5 % CO₂. Uporabimo pripravljeno rastno gojišče za tarčne celice. Koncentracijo in viabilnost celic pridobimo s pomočjo štetja celic in barvanja s tripanskim modrilom. Tripansko modrilo lahko prodre le v mrtve celice in jih obarva modrikasto. Zaradi selektivnosti membrane v žive celice barvilo ne prodre in tako celice ostanejo neobarvane. V 50 µL tripanskega modrila dodamo 50 µL dobro premešane kulture prejšnje pasaže in mešanico ponovno dobro premešamo. Barvilo pustimo delovati približno 2 minuti in del mešanice nanesimo v pripravljeno števno komoro (hemocitometer). Sledi štetje živih in mrtvih celic pod mikroskopom, da določimo koncentracijo celic in njihovo viabilnost. Po določeni koncentraciji celic lahko preračunamo, kakšen volumen kulture prejšnje pasaže moramo prenesti v sveže gojišče, da bomo čez določeno število dni imeli ustrezno koncentracijo celic na voljo za test ali za ponovno kultivacijo.

3.2.2 Kultiviranje efektorskih celic

Efektorske celice se prek monoklonskih protiteles vežejo na tarčne celice, se aktivirajo in pričnejo izločati različne citokine ter druge citotoksične snovi, ki povzročijo smrt tarčnih celic prek apoptoze. Efektorske celice gojimo v večjih količinah kot tarčne celice, ker jih za test potrebujemo v prebitku. Kultiviramo jih v plastenkah T-150 cm² ali T-175 cm² v navlaženih inkubatorjih pri 37 °C in 5 % CO₂. Uporabimo pripravljeno rastno gojišče za efektorske celice. Postopek štetja celic je enak kot pri tarčnih celicah. Razlikuje pa se prenos celic v novo

gojišče, kajti pri efektorskih celicah je treba kulturo prejšnje pasaže najprej centrifugirati 5 minut pri $260 \times g$ in sobni temperaturi. Supernatant nato zavržemo in celice resuspendiramo v svežem gojišču do ustrezne koncentracije.

3.2.3 Stradanje efektorskih celic

Da zagotovimo aktivnost oziroma učinkovitost efektorskih celic, ki se uporabijo za test, jih moramo najprej stradati od 40 do 52 ur. To izvedemo tako, da celice prenesemo v gojišče za stradanje, ki ne vsebuje IL-2 in IL-10. Stradanje izvedemo v plastenkah T-150 cm² ali T-175 cm² v navlaženih inkubatorjih pri 37 °C in 5 % CO₂. Postopek je enak kot pri kultiviranju efektorskih celic, le gojišče je različno.

3.2.4 Biološki test ADCC

Biološki testi so *in vitro* testi, pri katerih se za merjenje biološke aktivnosti učinkovine uporabljajo žive celice. Ker so celice žive, lahko pride do kontaminacije oziroma okužbe celic. Z namenom zmanjšanja možnosti okužbe se test izvaja v aseptičnem okolju. V ta namen smo pri validaciji uporabili mikrobiološko komoro z laminarnim pretokom zraka.

Princip ADCC testa je, da tarčne celice, ki so označene s fluorescenčnim barvilom (kalceinom), inkubiramo z različnimi koncentracijami učinkovine ter prebitkom efektorskih celic. Najprej se na tarčne celice vežejo monoklonska protitelesa, ki tako omogočijo posredno vezavo efektorskih celic. Po vezavi se efektorske celice aktivirajo in povzročijo uničenje označenih tarčnih celic, iz katerih se sprosti kalcein. Količino sproščenega kalceina izmerimo prek fluorescence v čitalniku mikrotitrnih plošč. Od koncentracije in biološke aktivnosti učinkovine je odvisno, koliko tarčnih celic bo uničenih oziroma, koliko kalceina se bo sprostil. Višja, kot sta koncentracija in biološka aktivnost učinkovine, višja bo količina sproščenega kalceina in posledično višji odziv v čitalniku. Količina sproščenega kalceina je torej premosorazmerna s koncentracijo in biološko aktivnostjo učinkovine. S pomočjo standarda lahko določimo relativno biološko aktivnost.

Postopek izvedbe testa

V prvem koraku pripravimo redčine standarda in vzorcev v 15 mL centrifugirkah. Predpogoj je, da poznamo koncentracijo standarda in vseh vzorcev. Končna koncentracija redčin vzorcev v centrifugirkah, s tarčno 100 % relativno biološko aktivnost bo 20,0 µg/mL. Izjema so stresni vzorci, ki so bili že analizirani v predvalidacijskih testiranjih in za katere vemo, da imajo nižjo biološko aktivnost izven predhodno določenega delovnega območja metode (50–200 %). Za take vzorce pripravimo različno, višjo končno koncentracijo in tako izvedemo centriranje.

Faktor centriranja na koncu tudi upoštevamo in preračunamo pravo biološko aktivnost stresnega vzorca. Tudi pri vzorcih za vrednotenje linearnosti, delovnega območja in točnosti pripravimo različne končne koncentracije v centrifugirkah. Glede na določeno začetno in želeno končno koncentracijo, preračunamo kolikokrat moramo referenco ali vzorec redčiti. Zaradi večje napake pri uporabi manjših volumnov in velikih faktorjev redčenja, moramo pri redčenju v centrifugirkah upoštevati pogoja, da je najmanjši dovoljen volumen prenosa 40 μ L in da je največji dovoljen faktor redčenja 1:100.

Sledi priprava prozorne mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami, s pomočjo katere bomo naredili dodatnih osem redčin standarda in vzorcev v razmerju 1:2. Pri testu uporabimo 3 različne kontrole, s pomočjo katerih ugotavljamo ustreznost posamezne mikrotitrne plošče. To so:

- slepa kontrola – ocenimo signal ozadja tako, da označenim tarčnim celicam dodamo samo testno gojišče in označene tarčne celice,
- negativna kontrola – ocenimo aktivnost efektorskih celic tako, da dodamo efektorske celice in označene tarčne celice, ne dodamo pa učinkovine,
- pozitivna kontrola – s katero ocenimo maksimalno lizo označenih tarčnih celic tako, da jim dodamo neionizirajoči detergent, ki povzroči lizo in sprostitvev kalceina.

Na vsako mikrotitrno ploščo nanesemo vse 3 kontrole, standard ter 2 vzorca. Nanešeni volumni so napisani v nadaljevanju. Določitve standarda in vzorcev izvajamo v triplikatih, kot je prikazano v Preglednici V.

Preglednica V: Shema mikrotitrne ploščice

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SL	A-1	R-1	B-1	A-1	R-1	B-1	A-1	R-1	B-1	N	P
B	SL	A-2	R-2	B-2	A-2	R-2	B-2	A-2	R-2	B-2	N	P
C	SL	A-3	R-3	B-3	A-3	R-3	B-3	A-3	R-3	B-3	N	P
D	SL	A-4	R-4	B-4	A-4	R-4	B-4	A-4	R-4	B-4	N	P
E	SL	A-5	R-5	B-5	A-5	R-5	B-5	A-5	R-5	B-5	N	P
F	SL	A-6	R-6	B-6	A-6	R-6	B-6	A-6	R-6	B-6	N	P
G	SL	A-7	R-7	B-7	A-7	R-7	B-7	A-7	R-7	B-7	N	P
H	SL	A-8	R-8	B-8	A-8	R-8	B-8	A-8	R-8	B-8	N	P

Legenda preglednice: R –redčine standarda, A – redčine vzorca 1, B – redčine vzorca 2, SL – slepa kontrola, N – negativna kontrola, P – pozitivna kontrola

V vdolbinice B2 – H10 prozorne mikrotitrne plošče dodamo 50 μ L testnega gojišča. V vdolbinice A2 – A10 pa dodamo 100 μ L redčine standarda, vzorca 1 ali vzorca 2 in sicer:

- v vdolbinice A3, A6 in A9 dodamo redčine standarda,
- v vdolbinice A2, A5 in A8 dodamo redčine vzorca 1,
- v vdolbinice A4, A7 in A10 dodamo redčine vzorca 2.

Nato naredimo 1:2 redčenje v vseh stolpcih razen v stolpcu 1, 11 in 12, v katere bomo kasneje nanесли kontrole. Redčenje naredimo tako, da iz redčin, ki smo jih nanесли v prvo vrsto (A2 – A10) odvezamemo in prenesemo 50 μ L v drugo vrsto, v kateri je 50 μ L testnega gojišča. Po prenosu v drugo vrsto vsaj trikrat premešamo in prenesemo 50 μ L v tretjo vrsto. Ta postopek ponovimo do zadnje vrste iz katere po mešanju odvezamemo 50 μ L in jih zavržemo.

Sledi nanos testnega gojišča v stolpce za kontrole:

- v vse vdolbinice stolpca 11 (negativna kontrola) dodamo 50 μ L testnega gojišča,
- v vse vdolbinice stolpca 12 (pozitivna kontrola) dodamo 75 μ L testnega gojišča,
- v vse vdolbinice stolpca 1 (slepa kontrola) dodamo 125 μ L testnega gojišča.

Naslednji korak je označevanje tarčnih celic s kalceinom. Kalcein je fluorescentno barvilo, ki lahko prehaja celične membrane. V celicah so celične esteraze, ki katalizirajo hidrolizo estrskih vezi dela molekule kalceina in tako nastane kalcein z negativnim nabojem, ki pa ne prehaja celične membrane zaradi selektivne permeabilnosti. Tako je kalcein ujet znotraj celic in se iz njih lahko sprosti le ob poškodbi celične membrane oziroma celični smrti. Signal kalceina, ki ga izmerimo, je prenosorazmeren s koncentracijo učinkovine, ki povzroči od protiteles odvisno celično citotoksičnost (22).

Pred označevanjem tarčnih celic je treba najprej določiti njihovo koncentracijo. To storimo enako kot pri kultiviranju celic. Za eno mikrotitrno ploščo odpipetiramo izračunan volumen kulture, ki vsebuje 1×10^6 celic, v 50 mL centrifugirko in centrifugiramo 5 minut pri $260 \times g$ in sobni temperaturi. Medtem v temi pri sobni temperaturi odmrznemo predpripravljen alikvot kalceina. Po centrifugiranju odstranimo supernatant iz centrifugirke, celice resuspendiramo v 1 mL testnega gojišča in tako dobimo želeno koncentracijo 1×10^6 tarčnih celic na mL. Resuspendiranim celicam dodamo 17,5 μ L kalceina (1 mg/mL) ter nežno premešamo. Da zagotovimo izmenjavo plinov v inkubatorju, centrifugirko ohlapno zapremo s pokrovčkom, ter inkubiramo 30–45 minut pri 37 °C in 5 % CO₂. Po inkubaciji celice spiramo tako, da dodamo 40 mL testnega gojišča, nežno premešamo ter centrifugiramo 5 minut pri $260 \times g$ in

sobni temperaturi. Korak spiranja nato še enkrat ponovimo, odstranimo supernatant ter celice resuspendiramo v 15 mL testnega gojišča. Tako dobimo koncentracijo $6,7 \times 10^4$ označenih tarčnih celic na mL oziroma 5000 označenih tarčnih celic na vdolbinico mikrotitrne plošče.

Sledi priprava efektorskih celic, ki smo jih predhodno stradali 40–52 ur. Najprej določimo koncentracijo efektorskih celic in nato prenesemo 9×10^6 celic (za eno ploščico) v centrifugirko ter centrifugiramo 5 minut pri $260 \times g$ in sobni temperaturi. Odstranimo supernatant in celice resuspendiramo v 7,5 mL testnega gojišča. Tako dobimo koncentracijo $1,2 \times 10^6$ efektorskih celic na mL oziroma 90000 efektorskih celic na vdolbinico.

Po pripravi efektorskih celic nadaljujemo z mešanjem efektorskih celic z delom označenih tarčnih celic. 7,5 mL označenih tarčnih celic zmešamo s 7,5 mL efektorskih celic. Ko so celice dobro premešane, lahko pričnemo z nanosom celic in kontrol na mikrotitrno ploščico:

- v stolpca 1 (slepa kontrola) in 12 (pozitivna kontrola) dodamo 75 μ L označenih tarčnih celic na vdolbinico,
- v ostale stolpce (stolpci 2–11, kjer so standard, vzorci in negativna kontrola) dodamo 150 μ L mešanice efektorskih in označenih tarčnih celic na vdolbinico,
- v stolpec 12 (pozitivna kontrola) dodamo 50 μ L 1 % neionizirajočega detergenta.

Prozorna mikrotitrna ploščica je sedaj pripravljena. Sledi centrifugiranje ploščice 5 minut pri $215 \times g$ in sobni temperaturi in nato inkubacija za 50–70 minut pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in 5 % CO_2 . Po inkubaciji ploščico ponovno centrifugiramo 4 minute pri 400 g in sobni temperaturi. Celice se usedejo na dno, sproščeni kalcein pa se nahaja v supernatantu.

Zadnji korak pred merjenjem sproščenega kalceina je prenos 100 μ L supernatanta iz vsake vdolbinice na novo, črno mikrotitrno ploščico s 96 vdolbinicami in prozornim dnom. Črne mikrotitrne plošče uporabimo zato, ker zmanjšujejo fluorescenco ozadja in razpršenost svetlobe, preprečujejo pa tudi motnje in interferenco svetlobe med sosednjimi vdolbinicami. Pri tem moramo paziti, da se celic na dnu ne dotikamo oziroma da se le te ne odlepijo. Če do tega pride, lahko ploščico ponovno centrifugiramo 4 minute pri 400 g ter sobni temperaturi in postopek prenosa na črno ploščico ponovimo.

V čitalniku mikrotitrnih plošč sledi merjenje sproščenega kalceina v supernatantu pri 535 nm, po ekscitaciji s svetlobo valovne dolžine 485 nm.

Ker imamo opravka z živimi celicami in ker izvajamo teste v sterilnem okolju, je treba neuporabljene celice in druge produkte živih organizmov inaktivirati. To naredimo z ustrezno

koncentracijo natrijevega hidroksida (npr. > 0,1 M NaOH), ki se pogosto uporablja za inaktivacijo odpadkov, ki vsebujejo biološki material, kot so virusi, bakterije, celice, posamezni proteini ali nukleinske kisline. NaOH je dokazano zelo učinkovit in hkrati cenovno ugodnejši od drugih inaktivacijskih sredstev (npr. toplota), kot tudi okoljsko sprejemljiv. Inaktivirano kulturo celic lahko nato odlijemo v industrijski odtok (23).

Merjenje odziva v čitalniku

Ko prenesemo supernatant iz prozorne ploščice na črno ploščico, sledi merjenje fluorescenčnega odziva kalceina, ki je sproščen v supernatantu. To naredimo v čitalniku mikrotitrnih plošč. Pri našem delu smo uporabili čitalnik Tecan Infinite F200 PRO, z uporabo računalniškega programa Magellan verzije 7.2. V programu predhodno ustvarimo metodo, po kateri bomo merili odzive tako, da nastavimo ustrezne parametre, kot so npr. postavitev standarda in vzorcev, valovno dolžino ekscitacije, valovno dolžino emisije, čas merjenja vsake vdolbinice, smer merjenja (od zgoraj ali od spodaj). Po prenosu črne ploščice v čitalnik lahko pričnemo z merjenjem. Odziv vsake vdolbinice dobimo v obliki jakosti fluorescence (Slika 6), ki je premosorazmerna s količino sproščenega kalceina. Višji odziv pomeni več sproščenega kalceina oziroma višja koncentracija ali biološka aktivnost učinkovine.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SM1_1 1/1 4758	SM1_9 1/1 32079	SM1_17 1/1 32063	SM1_25 1/1 31502	SM1_33 1/1 32196	SM1_41 1/1 30785	SM1_49 1/1 31025	SM1_57 1/1 32129	SM1_65 1/1 31651	SM1_73 1/1 31977	SM1_81 1/1 8350	SM1_89 1/1 38661
B	SM1_2 1/1 4702	SM1_10 1/1 30860	SM1_18 1/1 31248	SM1_26 1/1 30188	SM1_34 1/1 31878	SM1_42 1/1 29933	SM1_50 1/1 30756	SM1_58 1/1 31904	SM1_66 1/1 31624	SM1_74 1/1 30950	SM1_82 1/1 7506	SM1_90 1/1 38980
C	SM1_3 1/1 4785	SM1_11 1/1 29001	SM1_19 1/1 29762	SM1_27 1/1 28282	SM1_35 1/1 29656	SM1_43 1/1 28720	SM1_51 1/1 28247	SM1_59 1/1 29468	SM1_67 1/1 28361	SM1_75 1/1 29533	SM1_83 1/1 7339	SM1_91 1/1 38493
D	SM1_4 1/1 4753	SM1_12 1/1 27853	SM1_20 1/1 28040	SM1_28 1/1 27365	SM1_36 1/1 27569	SM1_44 1/1 26501	SM1_52 1/1 26899	SM1_60 1/1 27396	SM1_68 1/1 26876	SM1_76 1/1 27728	SM1_84 1/1 7550	SM1_92 1/1 38881
E	SM1_5 1/1 4908	SM1_13 1/1 23982	SM1_21 1/1 24102	SM1_29 1/1 23305	SM1_37 1/1 24006	SM1_45 1/1 22469	SM1_53 1/1 21714	SM1_61 1/1 22348	SM1_69 1/1 22121	SM1_77 1/1 23327	SM1_85 1/1 7245	SM1_93 1/1 38921
F	SM1_6 1/1 4966	SM1_14 1/1 19715	SM1_22 1/1 20193	SM1_30 1/1 19495	SM1_38 1/1 19819	SM1_46 1/1 18856	SM1_54 1/1 18904	SM1_62 1/1 18118	SM1_70 1/1 17502	SM1_78 1/1 19522	SM1_86 1/1 7594	SM1_94 1/1 40256
G	SM1_7 1/1 4778	SM1_15 1/1 16457	SM1_23 1/1 15604	SM1_31 1/1 16156	SM1_39 1/1 16313	SM1_47 1/1 14600	SM1_55 1/1 14441	SM1_63 1/1 15032	SM1_71 1/1 13820	SM1_79 1/1 14866	SM1_87 1/1 7355	SM1_95 1/1 40970
H	SM1_8 1/1 5063	SM1_16 1/1 12536	SM1_24 1/1 12077	SM1_32 1/1 12785	SM1_40 1/1 12166	SM1_48 1/1 11209	SM1_56 1/1 11209	SM1_64 1/1 12107	SM1_72 1/1 12112	SM1_80 1/1 12384	SM1_88 1/1 7927	SM1_96 1/1 40340

Slika 6: Primer prikaza rezultatov s programom Magellan

Statistična obdelava surovih podatkov

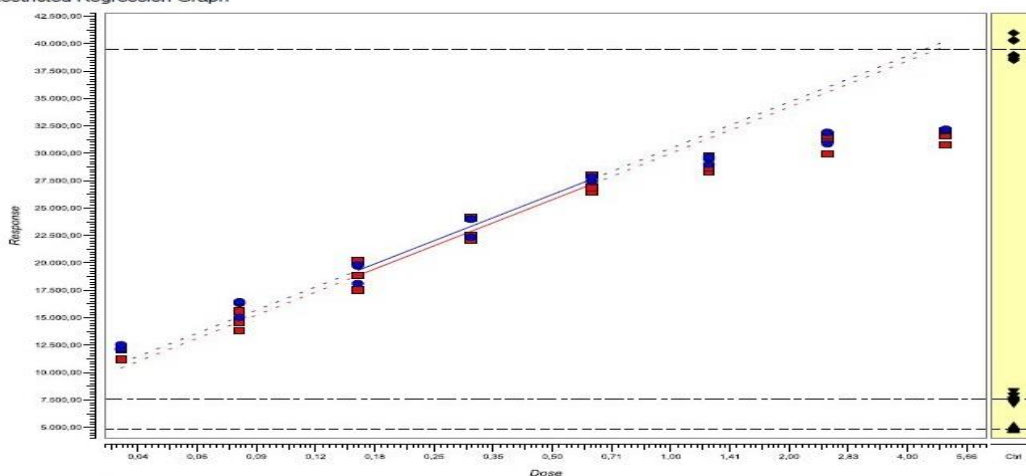
Odzivi, ki jih pridobimo s pomočjo čitalnika mikrotitrnih plošč, so surovi podatki. Ti morajo biti nato statistično obdelani, pri čemer se poslužujemo ustreznega programa, npr. pri našem delu smo uporabili PLA (ang. Parallel Line Assay), verzije 2.1. Računalniški program PLA je namenjen obdelavi podatkov, pridobljenih v bioloških testih. Uporablja se za statistično vrednotenje surovih podatkov in omogoča izračun relativne biološke aktivnosti ter 95 % intervala zaupanja vzorca (Slika 7). To naredi z določitvijo linearnega dela krivulje odvisnosti odziva od koncentracije. Nato prek izračuna linearne regresije krivulje standarda in vzorca izračuna zamik premic in prek tega relativno biološko aktivnost. Za vsako ploščico v testu naredimo neodvisne priprave redčin standarda in naneseemo svoje kontrole. Program PLA lahko tako obravnava vsako ploščico posebej in preračuna parametre neodvisno od mikrotitrne plošče. Na eni ploščici lahko opravimo določitvi biološke aktivnosti dveh vzorcev.

Potency Estimation

Potency Ratio (without Pre-Dilution Factors)	1.0787
95.0% Confidence Interval	0.9310 - 1.2532
Relative Confidence Interval	86.30% - 116.18% (29.87%)

Graphics

Restricted Regression Graph



Slika 7: Primer rezultata pridobljenega s programom PLA

Odzivi, ki jih dobimo z merjenjem, so odvisni od koncentracije in biološke aktivnosti učinkovine. Učinkovina je na ploščici nanešana v različnih redčinah in tako dobimo rezultate v obliki sigmoidne krivulje. Program pripravi graf dveh krivulj, eno za standard in eno za vzorec. V linearnem območju krivulj sta izrisani regresijski premici, ki jih program uporabi za primerjavo med seboj in za izračun relativne biološke aktivnosti vzorca. Standard ima določeno (deklarirano) aktivnost, v našem primeru je to 1,00, oziroma 100 %. Glede na to vrednost program preračuna relativno biološko aktivnost vzorca tako, da določi razdaljo med premicama. Preračuna tudi 95 % interval zaupanja.

Testi ustreznosti sistema in kriteriji sprejemljivosti

Rezultat je veljaven samo v primeru, da sta si premici standarda in vzorca dovolj primerljivi po določenih parametrih. Primerljivost premic program preverja tako, da preračuna naslednje parametre premic, ki služijo kot testi ustreznosti sistema:

- statistični test za naklon premice standarda in vzorca, s katerim dokažemo ustreznost koncentracijskega odziva,
- statistični test za linearnost premice standarda in vzorca, s katerim dokažemo, da je izbrano območje odzivov res linearno,
- statistični test za vzporednost premic, kar je pokazatelj, da ima tako vzorec kot tudi standard koncentracijski odziv primerljiv, kar je ključno pri določanju relativne biološke aktivnosti vzorca.

Z izpolnjevanjem testov ustreznosti dokažemo podobnost standarda in vzorca v odzivih, ki so odvisni od koncentracije. Izpolnjena pa morata biti tudi kriterija sprejemljivosti vsakega posameznega vzorca:

- relativni interval zaupanja izračunane aktivnosti mora biti znotraj 70–143 %,
- biološka aktivnost znotraj validiranega delovnega območja (50–200 % vrednosti standarda). Ta kriterij v sklopu validacije ni pogoj za ustreznost analize, ker analiziramo tudi mejne vrednosti (50 % in 200 %) in so rezultati izven delovnega območja pričakovani in dovoljeni.

Testi ustreznosti sistema za vzorce pa niso vsi testi, ki jih je treba vrednotiti pri vsaki analizi. S pomočjo pozitivne kontrole, negativne kontrole in slepega vzorca je treba vrednotiti tudi teste ustreznosti sistema za testne ploščice. To storimo za vsako ploščico posebej in izpolnjeni morajo biti vsi naslednji kriteriji, da lahko zagotovimo ustreznost rezultatov:

- spontano izločanje kalceina iz tarčnih celic, ki mora biti ≤ 30 %. Formula za izračun spontanega izločanja:

$$\frac{\text{povprečje odzivov slepe kontrole}}{\text{povprečje odzivov pozitivne kontrole}} * 100 \%$$

- aktivnost efektorskih celic mora biti ≤ 40 %. Formula za izračun aktivnosti efektorskih celic:

$$\frac{\text{povprečje odzivov negativne kontrole} - \text{povprečje odzivov slepe kontrole}}{\text{povprečje odzivov pozitivne kontrole} - \text{povprečje odzivov slepe kontrole}} * 100 \%$$

- specifična liza celic pri najvišji koncentraciji standarda mora biti $\geq 30\%$ in vsaj dvakrat višja od aktivnosti efektorskih celic. Formula za izračun specifične lize:

$$\frac{\text{povprečje odzivov standarda} - \text{povprečje odzivov slepe kontrole}}{\text{povprečje odzivov pozitivne kontrole} - \text{Povprečje odzivov slepe kontrole}} * 100\%$$
- ubežniki – največ 1 ubežnik na triplikat in največ 3 ubežniki na krivuljo. Zahtevano število tehničnih osamelcev pri kontrolah je največ 2.

3.2.5 Validacijski parametri

3.2.5.1 Specifičnost

Za vrednotenje specifičnosti bomo matriksu, ki je sestavljen iz 25 mM Na-citrata, 0,7 mg/mL Polisorbata 80, 9 mg/mL NaCl in ima pH 6,5, dodali standard, za katerega poznamo koncentracijo in biološko aktivnost. V končnem vzorcu bo standarda dvakrat manj od ostalih komponent. Vzorec bomo nato analizirali in v dveh neodvisnih analizah dobili štiri določitve.

Za vrednotenje specifičnosti bomo iz rezultatov meritev s pomočjo statističnih metod v Excelu izračunali:

- geometrično sredino relativnih bioloških aktivnosti, ki mora biti znotraj intervala 80–125 % pričakovane aktivnosti standarda,
- relativni 95% interval zaupanja, ki mora biti znotraj 64–156 %.

3.2.5.2 Linearnost, delovno območje in točnost

Za vrednotenje linearnosti, delovnega območja in točnosti bomo naredili po štiri določitve pri šestih različnih koncentracijah delovnega standarda (50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 150 % in 200 %). Različne koncentracije bomo pripravili tako, da bomo pri prvi stopnji testa, pripravili redčin v centrifugirkah, pripravili različne končne koncentracije vzorca (npr. za 50% pripravimo 10,0 µg/mL, za 75 % pripravimo 15,0 µg/mL, za 100 % pripravimo 20,0 µg/mL, za 125 % pripravimo 25,0 µg/mL, za 150 % 30,0 µg/mL in za 200 % pripravimo 40,0 µg/mL končno koncentracijo v centrifugirkah).

Za namen vrednotenja linearnosti bomo s pomočjo Excela pripravili graf linearne regresije, na katerega bomo nanegli dobljene vrednosti v odvisnosti od pričakovanih vrednosti. Vrednosti bomo predhodno matematično spremenili v vrednosti naravnega logaritma.

Iz pripravljenega grafa pridobimo naslednje parametre, s katerimi bomo vrednotili linearnost:

- korelacijski koeficient, ki mora biti $\geq 0,90$,
- naklon, ki se ne sme statistično razlikovati od 1,

- odsek na y osi, ki se ne sme statistično razlikovati 0.

Za parametra naklon in odsek na y osi bomo nato izračunali še T-vrednosti, ki jih bomo primerjali s T-kritično vrednostjo in ocenili statistično razlikovanje od 1 oziroma 0.

Za vrednotenje delovnega območja bomo iz rezultatov meritev s pomočjo statističnih metod v Excelu izračunali:

- geometrični relativni standardni odklon, ki mora biti $\leq 20\%$.

Za vrednotenje točnosti pa:

- geometrično sredino relativnih bioloških aktivnosti, ki mora biti znotraj intervala 80–125 % pričakovane vrednosti,
- točnost (izkoristek),
- relativni 95 % interval zaupanja, ki mora biti znotraj 64–156 %.

3.2.5.3 Natančnost

Natančnost bomo ovrednotili posredno in sicer s preverjanjem ponovljivosti in vmesne natančnosti.

Ponovljivost za zdravilno učinkovino (DS) in farmacevtsko obliko (DP)

Vrednotenje ponovljivosti bomo izvedli tako za DS kot tudi za DP. V dveh ločenih analizah bomo naredili šest določitev za zdravilno učinkovino in šest določitev za farmacevtsko obliko. Vsako posamezno analizo bo izvedel en sam analitik.

Za vrednotenje ponovljivosti za DS in DP bomo iz rezultatov meritev s pomočjo statističnih metod v Excelu izračunali:

- geometrično sredino relativnih bioloških aktivnosti, ki mora biti znotraj intervala 80–125 % pričakovane aktivnosti standarda,
- geometrični relativni standardni odklon, ki mora biti $\leq 20\%$,
- relativni 95% interval zaupanja, ki mora biti znotraj 64–156 %.

Vmesna natančnost

Za vrednotenje vmesne natančnosti bomo naredili šestnajst meritev v osmih neodvisnih analizah. S tem bomo preverili natančnost rezultatov znotraj istega laboratorija v daljšem časovnem obdobju (različni dnevi analiz), s kombinacijami različne uporabljene opreme in s strani različnih analitikov. Analize bodo izvedene v štirih različnih dneh, s strani dveh

različnih analitikov. Uporabljene bodo efektorske celice iz različnih vial in različnih pasaž. Meritve bodo opravljene na dveh različnih čitalnikih mikrotitrnih plošč. Za vrednotenje vmesne natančnosti bomo iz rezultatov meritev s pomočjo statističnih metod v Excelu izračunali:

- geometrično sredino relativnih bioloških aktivnosti, ki mora biti znotraj intervala 80–125 % pričakovane aktivnosti standarda,
- geometrični relativni standardni odklon, ki mora biti ≤ 20 %,
- relativni 95% interval zaupanja, ki mora biti znotraj 64–156 %.

3.2.5.4 Robustnost

Pri vrednotenju robustnosti bomo preizkušali vpliv namernih sprememb določenih faktorjev v testu na rezultate. Spremljali bomo naslednje spremembe:

- različna časa inkubacije označevanja s kalceinom (30 in 45 minut),
- različna časa inkubacije mikrotitrnih plošč (50 in 70 minut),
- različni časi stradanja efektorskih celic (od 42 do 48 ur stradanja),
- različne pasaže celic (zgodnja in pozna pasaža celic).

Preizkus bomo zastavili tako, da bomo naredili po 2 določitvi pri 4 različnih pogojih in sicer:

1. 30 minutno označevanje s kalceinom, 50 minutna inkubacija mikrotitrne plošče
2. 45 minutno označevanje s kalceinom, 50 minutna inkubacija mikrotitrne plošče
3. 30 minutno označevanje s kalceinom, 70 minutna inkubacija mikrotitrne plošče
4. 45 minutno označevanje s kalceinom, 70 minutna inkubacija mikrotitrne plošče

Za vrednotenje robustnosti bomo iz rezultatov meritev s pomočjo statističnih metod v Excelu izračunali:

- geometrično sredino relativnih bioloških aktivnosti, ki mora biti znotraj intervala 80–125 % pričakovane aktivnosti standarda,
- geometrični relativni standardni odklon, ki mora biti ≤ 20 %,
- relativni 95% interval zaupanja, ki mora biti znotraj 64–156 %.

3.2.5.5 Zmožnost metode za sledenje stabilnosti vzorca

Ta parameter bomo vrednotili tako, da bomo testirali vzorec, ki je bil izpostavljen stresnemu pogoju in sicer 3 mesece pri 40 ± 2 °C. Naredili bomo štiri določitve biološke aktivnosti v dveh neodvisnih analizah. V predvalidacijskih testiranjih smo ugotovili, da rezultat biološke

aktivnosti ni znotraj delovnega območja metode, zato smo koncentracijo vzorca med validacijo ustrezno centriral s faktorjem centriranja 2. Končna koncentracija v centrifugirkah je bila torej 200 % oziroma 40,0 $\mu\text{g/mL}$. To bomo upoštevali pri evalvaciji rezultatov in bomo dobljeno vrednost meritve pomnožili s korekcijskim faktorjem 0,5.

Za vrednotenje zmožnosti metode za sledenje stabilnosti vzorca, bomo iz rezultatov meritev s pomočjo statističnih metod v Excelu izračunali:

- geometrično sredino relativnih bioloških aktivnosti,
- geometrični relativni standardni odklon,
- relativni 95 % interval zaupanja.

Pri tem parametru nimamo vnaprej določenih zahtev, ker nas zanima zmožnost metode, da zazna znižano biološko aktivnost stresnih vzorcev.

4 REZULTATI

V nadaljevanju so v preglednicah predstavljeni rezultati vrednotenih parametrov in njihovo izpolnjevanje zahtev.

4.1 Specifičnost

Za vrednotenje specifičnosti so v Preglednici VI predstavljeni rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti, v Preglednici VII pa rezultati zahtev parametrov in njihova izpolnjenost.

Preglednica VI: Rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti za vrednotenje specifičnosti

Vzorec	Izmerjena relativna biološka aktivnost
	[%]
Standard v matriksu	93,92
	88,28
	97,83
	110,62

Preglednica VII: Rezultati zahtev parametrov za vrednotenje specifičnosti

Parameter	Zahteva [%]	Dobljena vrednost [%]	Zahteva izpolnjena
Geometrična sredina relativnih bioloških aktivnosti [%]	80–125	97	Da
Relativni 95% interval zaupanja [%]	64–156	86–116	Da

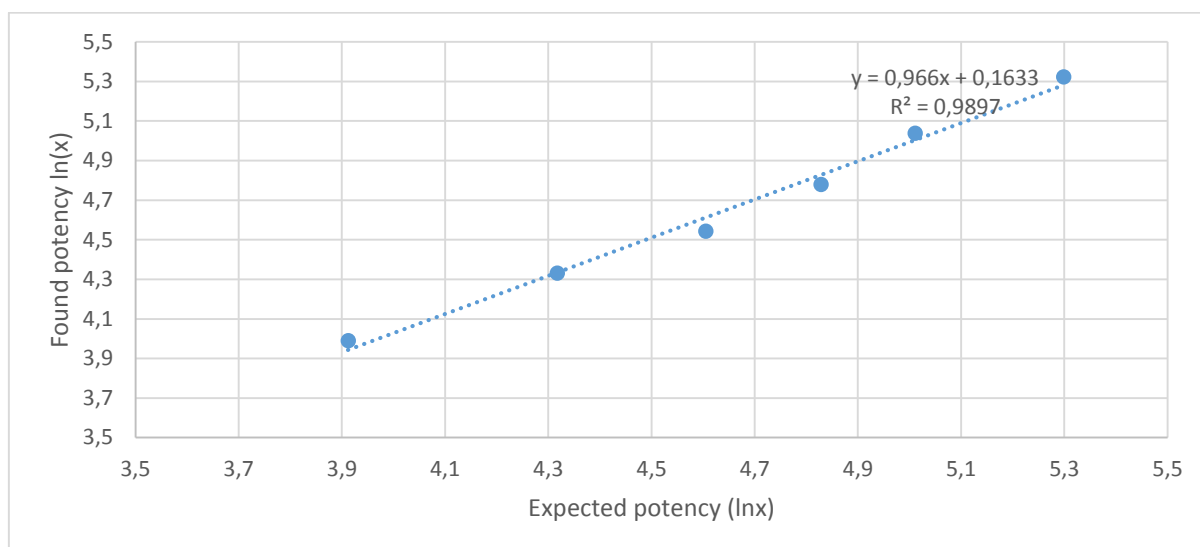
4.2 Linearnost, delovno območje in točnost

V Preglednici VIII so predstavljeni rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti za vrednotenje linearnosti, delovnega območja in točnosti. Preglednica IX prikazuje z Excelom pridobljene rezultate zahtevanih parametrov za vrednotenje linearnosti. Sledita Preglednici X in XI, ki prikazujeta rezultate zahtev parametrov za vrednotenje delovnega območja in točnosti.

Preglednica VIII: Rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti za vrednotenje linearnosti, delovnega območja in točnosti

Vzorec	Izmerjena relativna biološka aktivnost	
	[%]	
		51,32
50 % standard		54,42
		53,07
		56,07
		73,78
		76,90
75 % standard		77,39
		77,87
		100,68
100 % standard		99,49
		81,58
		94,51
		128,87
125 % standard		117,27
		115,97
		115,27
		152,88
150 % standard		146,47
		147,03
		169,81
		217,19
200 % standard		226,88
		201,09
		179,52

Linearnost



Slika 8: Graf linearne regresije

Preglednica IX: Z Excelom pridobljeni rezultati zahtevanih parametrov za vrednotenje linearnosti (zaokroženi na 4 signifikantna mesta)

Linearna regresija: $y = a x + b$	Vrednost	Napaka	Pričakovana oziroma zahtevana vrednost	T-eksperimentalna
Naklon (a)	0,9660	0,02391	1	1,420
Odsek na y osi (b)	0,1633	0,1120	0	1,4584
Korelacijski koeficient (r)	0,9948		$\geq 0,90$	
T-kritična ($\alpha = 0,01$; $n-2$); $n = 6$	4,604			

Delovno območje

Preglednica X: Rezultati zahtev parametrov za vrednotenje delovnega območja

Pričakovana vrednost [%]	Geometrična sredina relativnih bioloških aktivnosti [%]	Geometrični relativni standardni odklon [%]	Zahteva za GRSD [%]	Zahteva izpolnjena
50	54	4	≤ 20	Da
75	76	2	≤ 20	Da
100	94	10	≤ 20	Da
125	119	5	≤ 20	Da
150	154	7	≤ 20	Da
200	205	11	≤ 20	Da

Točnost

Preglednica XI: Rezultati zahtev parametrov za vrednotenje točnosti

Pričakovana vrednost [%]	Geometrična sredina relativnih bioloških aktivnosti [%]	80–125 % (absolutni) interval pričakovane vrednosti [%]	Točnost oz. izkoristek [%]	Relativni 95 % interval zaupanja [%]	Zahteva izpolnjena
50	54	40–62,5	108	94–106	Da
75	76	60–93,75	102	96–104	Da
100	94	80–125	94	86–117	Da
125	119	100–156,25	95	92–109	Da
150	154	120–187,5	103	90–112	Da
200	205	160–250	103	85–118	Da

4.3 Ponovljivost

Za vrednotenje ponovljivosti za DS in DP, so v Preglednici XII predstavljeni rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti, v Preglednicah XIII in XIV pa rezultati zahtev parametrov in njihova izpolnjenost.

Preglednica XII: Rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti za vrednotenje ponovljivosti za DS in DP

Vzorec	Izmerjena relativna biološka aktivnost	
	[%]	
100 % DS	107,87	
	103,03	
	104,75	
	100,24	
	103,45	
	106,89	
	110,81	
100 % DP	97,18	
	97,21	
	102,50	
	96,26	
	102,77	

Preglednica XIII: Rezultati zahtev parametrov za vrednotenje ponovljivosti za DS

Parameter	Zahteva [%]	Dobljena vrednost [%]	Zahteva izpolnjena
Geometrična sredina relativnih bioloških aktivnosti [%]	80–125	104	Da
Geometrični relativni standardni odklon [%]	≤ 20	3	Da
Relativni 95 % interval zaupanja [%]	64–156	97–103	Da

Preglednica XIV: Rezultati zahtev parametrov za vrednotenje ponovljivosti za DP

Parameter	Zahteva [%]	Dobljena vrednost [%]	Zahteva izpolnjena
Geometrična sredina relativnih bioloških aktivnosti [%]	80–125	101	Da
Geometrični relativni standardni odklon [%]	≤ 20	6	Da
Relativni 95 % interval zaupanja [%]	64–156	95–106	Da

4.4 Vmesna natančnost

Za vrednotenje vmesne natančnosti so v Preglednici XV predstavljeni rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti, v Preglednici XVI pa rezultati zahtev parametrov in njihovo izpolnjenost.

Preglednica XV: Rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti za vrednotenje vmesne natančnosti

Analitik	Celice	Čitalnik	Izmerjena relativna biološka aktivnost [%]
A	Viala x, zgodnja pasaža	1	103,88
			102,22
B	Viala x, zgodnja pasaža	2	103,76
			104,80
A	Viala y, pozna pasaža	1	99,71
			110,28
B	Viala y, pozna pasaža	2	101,49
			108,24
A	Viala x, zgodnja pasaža	2	92,57
			94,71
B	Viala y, pozna pasaža	1	109,77
			116,90

Analitik	Celice	Čitalnik	Izmerjena relativna biološka aktivnost [%]
A	Viala y, pozna pasaža	2	88,88
			108,47
B	Viala x, zgodnja pasaža	1	105,72
			113,57

Preglednica XVI: Rezultati zahtev parametrov za vrednotenje vmesne natančnosti

Parameter	Zahteva [%]	Dobljena vrednost [%]	Zahteva izpolnjena
Geometrična sredina relativnih bioloških aktivnosti [%]	80–125	104	Da
Geometrični relativni standardni odklon [%]	≤ 20	8	Da
Relativni 95 % interval zaupanja [%]	64–156	96–104	Da

4.5 Robustnost

Za vrednotenje robustnosti so v Preglednici XVII predstavljeni rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti, v Preglednici XVIII pa rezultati zahtev parametrov in njihova izpolnjenost.

Preglednica XVII: Rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti za vrednotenje robustnosti

Čas označevanja s kalceinom [min]	Čas inkubacije mikrotitrne ploščice [min]	Izmerjena relativna biološka aktivnost [%]
30	50	100,59
		102,40
45	50	101,80
		101,35
30	70	97,80
		101,42

Čas označevanja s kalceinom [min]	Čas inkubacije mikrotitrne ploščice [min]	Izmerjena relativna biološka aktivnost [%]
45	70	97,15
		105,17

Preglednica XVIII: Rezultati zahtev parametrov za vrednotenje robustnosti

Parameter	Zahteva [%]	Dobljena vrednost [%]	Zahteva izpolnjena
Geometrična sredina relativnih bioloških aktivnosti [%]	80–125	101	Da
Geometrični relativni standardni odklon [%]	≤ 20	3	Da
Relativni 95 % interval zaupanja [%]	64–156	98–102	Da

4.6 Zmožnost metode za sledenje stabilnosti vzorca

Za vrednotenje zaznave manjše biološke aktivnosti vzorca, ki je bil izpostavljen stresnim pogojem, so v Preglednici XIX predstavljeni rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti pred in po upoštevanju faktorja centriranja. V Preglednici XX pa so rezultati geometrične sredine relativnih bioloških aktivnosti, geometričnega relativnega standardnega odklona in relativnega 95 % intervala zaupanja.

Preglednica XIX: Rezultati izmerjenih relativnih bioloških aktivnosti (pred in po upoštevanju faktorja centriranja) vzorca, ki je bil izpostavljen stresnim pogojem

Vzorec	Izmerjena relativna biološka aktivnost [%]	Vrednost relativne biološke aktivnosti po upoštevanju faktorja centriranja [%]
200 % standard	90,17	45,085
	79,83	39,915
200% standard	93,85	46,925
	88,76	44,380

Preglednica XX: Rezultati geometrične sredine relativnih bioloških aktivnosti, geometričnega relativnega standardnega odklona in relativnega 95 % intervala zaupanja pri analizi vzorca, ki je bil izpostavljen stresnim pogojem

Parameter	Dobljena vrednost [%]
Geometrična sredina relativnih bioloških aktivnosti [%]	44
Geometrični relativni standardni odklon [%]	7
Relativni 95 % interval zaupanja [%]	90–112

4.7 Povzetek rezultatov

V Preglednici XXI je prikazana izpolnjenost zahtev vseh parametrov, ki smo jih vrednotili med validacijo.

Preglednica XXI: Izpolnjenost zahtev vseh parametrov, ki smo jih vrednotili med validacijo

Parameter	Kriterij	Rezultat	Zahteve izpolnjene
Specifičnost	Ni vpliva matriksa na izmerjeno relativno biološko aktivnost	Vpliva ni bilo	Da
	Korelacijski koeficient \geq 0,90	Korelacijski koeficient = 0,99	
Linearnost	Naklon ni statistično različen od 1	Naklon = 0,97	Da
	Odsek na y-osi ni statistično različen od 0	Odsek na y-osi = 0,16	
Delovno območje	GRSD \leq 20 %	2 – 11 %	Da
Točnost	Znotraj 80–125 % pričakovane vrednosti	Vse vrednosti so znotraj	Da
Natančnost	Ponovljivost (DS in DP)	GRSD \leq 20 %	3 % (DS)
			6 % (DP)
	Vmesna natančnost	GRSD \leq 20 %	8 %
Robustnost	GRSD \leq 20 %	3 %	Da

5 RAZPRAVA

5.1 Specifičnost

Pri analizi vzorcev, kjer je bila vrednost ekscipientov dvakrat večja kot običajno, smo izmerili geometrično sredino relativnih bioloških aktivnosti 78 %, kar je bilo znotraj zahtevanega intervala 64–100 %. Relativni 95 % interval zaupanja je bil 86–116 % in je tudi bil znotraj zahtevanega intervala 64–156 %. Vse vrednosti izpolnjujejo kriterije. Zaključujemo, da dvakrat večja koncentracija matriksa glede na učinkovino ne vpliva na izmerjene rezultate. Metoda je ustrezno specifična. Potrebe po določanju selektivnosti ni bilo, saj metoda ni namenjena določanju istovetnosti.

5.2 Linearnost, delovno območje in točnost

Za vrednotenje linearnosti, delovnega območja in točnosti smo analizirali vzorce pri šestih različnih koncentracijah. Analizirali smo mejne vrednosti in vrednosti znotraj predhodno določenega delovnega območja metode.

S pripravo grafa regresijske premice smo ugotovili, da je bil korelacijski koeficient 0,99 in tako izpolnjuje zahtevo $r \geq 0,90$. Naklon ni bil statistično različen od 1, ker velja, da je T-eksperimentalna vrednost \leq T-kritična vrednost. Prav tako odsek na y-osi ni statistično različen od 0, ker velja, da je T-eksperimentalna vrednost \leq T-kritična vrednost.

Vse dobljene geometrične sredine relativnih bioloških aktivnosti pri različnih koncentracijah so bile znotraj zahtevanega intervala 80–125 % pričakovanih vrednosti. Vsi relativni 95 % intervali zaupanja so tudi bili znotraj zahtevanega intervala 64–156 %.

Geometrični relativni standardni odkloni izmerjenih vrednosti pri različnih koncentracijah so bili med 2–11 % in tako ustrezajo zahtevi ≤ 20 %.

Vse vrednosti izpolnjujejo zahteve in zaključujemo, da je metoda linearna in ima ustrezno delovno območje (za merjenje vzorcev z relativno biološko aktivnostjo 50–200 %) ter točnost. Interval 50–200 % je ustrezen, kajti pri določanju biološke aktivnosti učinkovine pričakujemo, da je ta čim bližje 100 %. Določanje bistveno višje ali nižje vrednosti je zato nepotrebno.

5.3 Natančnost

Natančnost smo potrdili z vrednotenjem ponovljivosti (znotraj testa) in vmesne natančnosti (med testi).

5.3.1 Ponovljivost

Za DS:

Pri analizi vzorcev DS za namen vrednotenja ponovljivosti smo izmerili geometrično sredino relativnih bioloških aktivnosti 83 %, kar je bilo znotraj zahtevanega intervala 64–100 %.

Relativni 95 % interval zaupanja je bil 97–103 % in je tudi bil znotraj zahtevanega intervala 64–156 %. Dobljeni geometrični relativni standardni odklon je bil 3 %, kar ustreza zahtevi ≤ 20 %. Vse vrednosti izpolnjujejo kriterije.

Za DP

Pri analizi vzorcev DP za namen vrednotenja ponovljivosti smo izmerili geometrično sredino relativnih bioloških aktivnosti 81 %, kar je bilo znotraj zahtevanega intervala 64–100 %.

Relativni 95 % interval zaupanja je bil 95–106 % in je tudi bil znotraj zahtevanega intervala 64–156 %. Dobljeni geometrični relativni standardni odklon je bil 6 %, kar ustreza zahtevi ≤ 20 %. Vse vrednosti izpolnjujejo kriterije.

Z izpolnjevanjem vseh kriterijev tako za DS kot tudi za DP lahko potrdimo ponovljivost metode. Pri metodi ADCC se uporabljata dva tipa celic (tarčne in efektorske) kar pomeni, da so rezultati pričakovano nekoliko bolj razpršeni (višji GRSD) kot pri drugih metodah, kjer se uporablja samo en tip celic.

5.3.2 Vmesna natančnost

Z namenom vrednotenja vmesne natančnosti sta vzorce analizirala dva analitika. Analize vseh vzorcev so bile izvedene v daljšem časovnem obdobju, na različne dni. Uporabili smo efektorske celice dveh različnih vial in različnih pasaž in različna čitalnika mikrotitrnih plošč. Izmerili smo geometrično sredino relativnih bioloških aktivnosti 83 %, kar je znotraj zahtevanega intervala 64–100 %. Relativni 95 % interval zaupanja je 96–104 % in je tudi znotraj zahtevanega intervala 64–156 %. Dobljeni geometrični relativni standardni odklon vseh določitev je 8 %, kar ustreza zahtevi ≤ 20 %. Vse vrednosti izpolnjujejo kriterije in s tem potrjujemo ustrezno vmesno natančnost metode. Z ustrezno vmesno natančnostjo dokazujemo, da so naši rezultati natančni tudi pri analizah izvedenih v daljšem časovnem obdobju in pri uvedbi raznih sprememb znotraj posameznih testov. S tem zagotovimo zanesljive rezultate tudi v prihodnosti, ko bo zelo verjetno prišlo do sprememb pri metodi (npr. dodatni izvajalci, novi inštrumenti).

5.4 Robustnost

Za vrednotenje robustnosti smo pri analiziranju vzorcev uvedli namerne spremembe v testih. Uvedli smo različne čase inkubacije mikrotitrnih plošč (50–70 minut) in različne čase označevanja s kalceinom (30–45 minut). Izmerjena geometrična sredina relativnih bioloških aktivnosti je bila 81 %, kar je znotraj zahtevanega intervala 64–100 %. Relativni 95 % interval zaupanja je bil 98–102 % in je tudi znotraj zahtevanega intervala 64–156 %. Geometrični relativni standardni odklon je bil 3 %, kar prav tako ustreza zahtevi ≤ 20 %.

Vse vrednosti izpolnjujejo kriterije in sklepamo, da je metoda robustna v okviru testiranih časov inkubacije mikrotitrnih plošč in označevanja s kalceinom.

Pri izvajanju analiz smo uporabili efektorske celice, ki so bile na stradanju različna časovna obdobja (od 41 ur in 52 minut do 48 ur in 0 minut). Ker so bili testi ustrezni, sklepamo, da je metoda robustna tudi za parameter različnih časov stradanja efektorskih celic.

Uporabili smo tudi efektorske celice različnih pasaž (v rangju med 20 in 36 pasažo). Pri testu kjer smo uporabili celice pozne pasaže (36) so bili odzivi na čitalniku nizki. Tudi rezultati testov ustreznosti sistema sprejemljivosti za ploščice so bili slabši, ampak še vedno sprejemljivi. S tem smo določili pasažo 36 kot najvišjo možno pasažo za uporabo pri analizah. Robustnost je zelo pomemben parameter, ki ga je treba validirati, da dobimo podatke o tem, kako spremembe različnih parametrov vplivajo na rezultate. S tem metodo lažje optimiziramo in tako v prihodnosti privarčujemo s časom in sredstvi. Pri izbiri parametrov, ki jih bomo testirali v okviru robustnosti, imamo proste roke, vključiti pa moramo tiste, za katere mislimo, da se bodo pri rutinski uporabi najbolj spreminjali. Poleg testiranih bi lahko vključili še testiranje različnih reagentov, različne čase nanašanja redčin na ploščico po pripravi le teh, različne čase merjenja v čitalniku po inkubaciji, različne pogoje centrifugiranja itd. Zaenkrat v magistrski nalogi testirani parametri zadovoljivo naslavljajo ta parameter.

5.5 Zmožnost metode za sledenje stabilnosti vzorca

Pri analiziranju vzorca, ki je bil podvržen stresnim pogojem smo izmerili geometrično sredino relativnih bioloških aktivnosti 35 %. Relativni 95 % interval zaupanja je bil 90–112 %, geometrični relativni standardni odklon pa 7 %.

Dobljeni rezultati očitno nakazujejo na zmanjšano aktivnost vzorcev oziroma učinkovine pod stresnimi pogoji. Potrdili smo, da metoda ustrezno zazna spremembe vzorcev pri neugodnih, stresnih razmerah.

5.6 Povzetek rezultatov

Po opravljenih vseh meritvah in statistični obdelavi rezultatov smo ugotovili, da so vse zahteve pri vrednotenih parametrih izpolnjene ter posledično izbrana metoda primerna za merjenje biološke aktivnosti ADCC izbranega modelnega protitelesa.

6 SKLEP

Protitelesa lahko v telesu delujejo na različne načine. Od komplementa odvisna citotoksičnost je glavni obrambni imunski sistem pri ljudeh in živalih. Drugi, nekoliko manj pogost način delovanja pa je celično posredovana citotoksičnost odvisna od protiteles.

V okviru magistrske naloge smo skušali v celoti validirati metodo, s katero bi določali biološko aktivnost modelne učinkovine pri celično posredovani citotoksičnosti odvisni od protiteles. Z validacijo smo skušali dokazati ustreznost metode, ki bi dajala točne in natančne rezultate. Upoštevali smo priporočila ICH smernic in vrednotili različne parametre, ki so smiselni glede na namen izbrane metode. Po opravljenih vseh meritvah in statistični obdelavi rezultatov smo ugotovili, da metoda izpolnjuje zahteve vseh vrednotenih parametrov (specifičnost, linearnost, delovno območje, točnost, ponovljivost, vmesna natančnost, robustnost in zmožnost metode za sledenje stabilnosti vzorca). S tem smo dokazali ustreznost metode in njeno zmožnost pridobivanja zanesljivih rezultatov.

Zaključujemo, da se metoda lahko v prihodnosti uporablja v rutini za določanje biološke aktivnosti izbrane modelne učinkovine in izdelka.

7 LITERATURA

1. Štrukelj B, Kos J, Bozovičar K, Bratkovič T, Lunder M, Glavač I, Kristl J, Doljak B, Slanc P, Kočevar N. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. 1. izdaja. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo, 2007: 4–23, 534–543.
2. Ho R, Gibaldi M. Biotechnology and biopharmaceuticals: transforming proteins and genes into drugs. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003: 5–7.
3. Walsh G, Biopharmaceuticals: Biochemistry and biotechnology. 2. izdaja. Anglija: John Wiley & Sons, 2003: 1–8.
4. Weise M, Bielsky M, De Smet K, Ehmann F, Ekman N, Giezen T, Gravanis I, Heim H, Heinonen E, Ho K, Moreau A, Narayanan G, Kruse N, Reichmann G, Thorpe R, Van Aerts L, Vleminckx C, Wadhwa M, Schneider C. Biosimilars: what clinicians should know. Blood journal 2012; 120: 5111–5117.
5. Schellekens H. How similar do biosimilars need to be?. Nature biotechnology 2004; 22: 1357–1359.
6. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5. izdaja. Združene države Amerike: Elsevier Science, 2003: 45–47, 325–332.
7. Pandey S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. International journal of pharmaceutical sciences review and research 2010; 1: 88–94.
8. Bkhtiar R. Therapeutic Recombinant Monoclonal Antibodies. American Chemical Society and Division of Chemical Education 2012; 89: 1537–1542.
9. Kotnik V, Čurin Šerbec V, Hartman Pretnar K, Ihan A, Jeras M, Kopitar AN, Malovrh T, Simčič S, Stopnišek S, Skvarč M, Vidan Jeras B, Wraber B. Imunološki priročnik. Ljubljana: Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, 2010: 57–60.
10. Schnueriger A, Grau R, Sonderrmann P, Schreitmueller T, Marti S, Zocher M. Molecular immunology: Development of quantitative, cell-line based assay to measure ADCC activity mediated by therapeutic antibodies. Elsevier 2011; 48: 1512–1517.
11. Jackson CM, Esnouf ME, Winzor DJ, Duester DL. Defining and measuring biological activity: applying the principles of metrology. Springer-Verlag 2007; 12: 283–294.
12. General Chapter <1034>, Analysis of Biological Assays, USP 36. The United States Pharmacopeial Convention, 2013.
13. Rowe P. Essential Statistics for the Pharmaceutical Sciences. Chichester, John Wiley & Sons, 2007: 49–51, 62–81, 178–182.

14. Hypothesis test: Difference Between Means
<http://stattrek.com/hypothesis-test/difference-in-means.aspx?Tutorial=AP> (dostopno 17.2.2017)
15. Ermer J, Miller JHM. Method validation in pharmaceutical analysis. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2005: 1–7.
16. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) 2005.
17. Toomula N, Kumar A, Kumar S, Shanti Bheemidi V. Development and validation of analytical methods for pharmaceuticals. *Analytical & Bioanalytical techniques* 2011; 2: 2–3.
18. Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. Workshop/conference report: Bioanalytical method validation – a revisiti with a decade of progress. *Pharmaceutical research* 2000; 17: 1551–1557.
19. Vessman J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier 1996; 14: 867–869.
20. Marthur A, Arora T, Ling L, Crouse-Zeineddini J, Mukku V. Qualification of a homogeneous cell-based neonatal Fc receptor (FcRn) binding assay and its application to studies on Fc functionality of IgG – based therapeutics. *Journal of immunological methods*. Elsevier 2013; 390: 81–91.
21. Grdinić V, Vuković J. Prevalidation in pharmaceutical analysis. Part I. Fundamentals and critical discussion. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier 2004; 35: 489–512.
22. Bischof JC, Pandanilam J, Holmes WH, Ezzell RM, Lee RC, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M. Dynamics of Cell Membrane Permeability Changes at Supraphysiological Temperatures. *Biophysical Journal* 1995; 68: 2608–2614.
23. Application note: Use of sodium hydroxide for cleaning and sanitization of chromatography media and systems. General Electric Company, 2014: 1–8.
24. Conolly M. The Chemistry of Monoclonal Antibodies
<http://www.slideshare.net/bathasu/the-chemistry-of-monoclonal-antibodies> (dostopno 30.12.2016)

25. GenScript: ADCC & CDC assays

<http://www.genscript.com/ADCC-and-CDC-assay-services.html> (dostopno 30.12.2016)

26. GlobalSubmit: ICH

<http://globalsubmit.com/education/standards-organizations/ich/> (dostopno 30.12.2016)

27. McAlexander. Carolina Biological Supply Company: Accuracy Versus Precision
Beanbag Toss

<http://www.carolina.com/teacher-resources/Interactive/accuracy-versus-precision-beanbag-toss/tr10646.tr> (dostopno 30.12.2016)